

基于 EPMA 的耳石 Sr : Ca 比分析及其在 鱼类生活履历反演中的应用实例研究*

窦硕增¹ 横内一樹² 于鑫^{1,3} 曹亮¹ 大竹二雄⁴ 塚本勝巳²

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071; 2. 东京大学大气海洋研究所 千叶县柏市 277-8564;
3. 中国科学院研究生院 北京 100049; 4. 东京大学大气海洋研究所大槌国际沿岸海洋研究中心 岩手县大槌町 028-1102)

提要 利用基于电子探针(EPMA)的耳石 Sr : Ca 比和 Sr 含量分析方法研究了长江口水域刀鲚、凤鲚、带鱼和长吻鲛的生活履历及生活史型。结果发现, 刀鲚中除存在淡水洄游性个体生活史型外, 还存在出生并生活于河口或近海的非洄游性个体生活史型, 其平均耳石 Sr : Ca 比在不同水环境履历的基准值为: 淡水 $<2.0 \times 10^{-3}$ 、河口 $(3.5—6.0) \times 10^{-3}$ 、海水 $>6.0 \times 10^{-3}$ 。凤鲚中也有出生并生活于河口水体的个体 (4.8×10^{-3}) 和出生于河口或近海水域 $(>7.8 \times 10^{-3})$ 、周期性地迁徙于二者之间的个体两种生活史型。带鱼 (4.9×10^{-3}) 和长吻鲛则分别表现出其个体均一的近海和淡水生活史履历。研究结果证实了鱼类耳石内 Sr 含量水平遵从海水 $>$ 河口 $>$ 淡水生活履历这一特征。但受鱼类所经历的水温、盐度等环境史变化及鱼类自身的生理发育状况等因素的影响, 耳石内 Sr 的沉积量水平存在显著的种间或种内差异。这些差异显著的独特元素标识是识别鱼类个体生活履历和重新构建鱼类生活史的重要元素指纹。

关键词 耳石 Sr : Ca 比, 电子探针, 生活史重新构建, 刀鲚、凤鲚、带鱼和长吻鲛, 长江口
中图分类号 Q179.3

在硬骨鱼类的发育生长过程中, 水环境中的化学元素通过鱼类的鳃呼吸等方式进入血液, 然后经过细胞递减传输进入其内淋巴结晶后, 以微量元素形式沉积在耳石中。由于耳石的非细胞性和代谢惰性, 沉积在耳石中的微量元素基本上不发生分解或重吸收, 是永久性的。因此, 从耳石中心核区到外缘区的微化学组成(microchemistry)通常按生长时间序列记录着鱼类个体从出生到被捕获时所经历的水化学环境变化, 即元素指纹(elemental fingerprints), 是揭示鱼类个体迁移的表征性指标。自 20 世纪 90 年代以来, 随着元素分析技术(如电子探针分析 EPMA、电感耦合等离子体质谱分析 ICPMS、稳定同位素比值质谱分析)的发展及其在耳石信息研究中的应用, 耳石微化学分析已成为解决鱼类生活史及环境史的重新构建、出生地溯源、混合群体识别、种群鉴定、海洋环境反演等问题的关键技术。国内外文献已经对耳石信

息研究领域的主要技术及其应用做过较深入详细报道(高永文等, 2004; 窦硕增, 2007; Kalish, 1989; Campana *et al*, 1997; Campana, 1999; Secor *et al*, 2000; Elsdon *et al*, 2003)。

不同自然水体中 Sr 的含量与分布方式通常存在显著差异(淡水区含量低、河口区中、海水区高), 沉积在耳石中的 Sr 含量水平可以标记鱼类生活迁移过程中所经历的不同水化学环境特征。因此, 耳石 Sr : Ca 比及 Sr 含量通常被作为有效元素指纹用于前述鱼类生态学问题研究(Radtke *et al*, 1990; Campana *et al*, 1997; Campana, 1999; Phillis *et al*, 2011)。按其应用功能不同, Sr : Ca 比的测定方法主要有 ICPMS 和 EPMA 分析。其中, 基于 EPMA 的耳石 Sr : Ca 比分析在重新构建洄游性鱼类或河口性鱼类生活史和环境史方面具有独特的应用功能。例如, 结合耳石的显微结构的扫描电镜分析(SEM), 耳石 Sr : Ca 比分析不仅可揭

* 国家自然科学基金项目资助, 40676086 号, 40976084 号, 40821004 号, 31061160187 号。窦硕增, 博士, 研究员, E-mail: szdou@qdio.ac.cn

收稿日期: 2010-10-09, 收修改稿日期: 2010-12-18

示洄游性鱼类或河口性鱼类的仔鱼分散与转运过程、洄游履历及生活史型等问题(Secor, 1992; Halden *et al.*, 1995; Limburg, 1995; Arai *et al.*, 1997; Kraus, 2004; Yang *et al.*, 2006), 也可以解决一些传统鱼类生态学方法难以解决的问题如洄游性鱼类中非洄游个体的识别问题(Kalish, 1990; Rieman *et al.*, 1994; Babaluk *et al.*, 1997; Tzeng *et al.*, 2000; Howland *et al.*, 2001; Tsukamoto *et al.*, 2001; Kuroki *et al.*, 2006)。另一方面, 与其它微量元素一样, 水环境中的 Sr 在耳石中的沉积过程受多变的水环境因素(如水温、盐度、水化学组成)及鱼类发育生长的生理因素制约, 目前其应用一般限于单鱼种的相关研究。而开展同一水域多鱼种的耳石内 Sr 含量研究对于认识 Sr 在鱼类耳石中的沉积过程和机制及拓宽其应用研究具有重要意义。

近年来, 国内关于鱼类耳石的外部形态结构和内部显微结构方面的研究较多(叶振江等, 2007; 王英俊等, 2010; 郭弘艺等, 2007; 葛珂珂等, 2010; 黎雨轩等, 2010; Xie *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2008), 但关于耳石微化学及其应用方面的研究报道相对较少(杨良锋等, 2006; 杨健等, 2010; 窦硕增等, 2011¹⁾; Yang *et al.*, 2006)。本文简要报道了长江口水域四种鱼类(洄游性鱼类刀鲚 *Coilia nasus*、河口性鱼类凤鲚 *C. mystus*、海洋鱼类带鱼 *Trichiurus haumela* 及淡水鱼类长吻鲩 *Leiocassis longirostris*)的基于 EPMA 耳石 Sr 含量分析的结果。通过对比研究各鱼种的耳石 Sr : Ca 比的分布特征, 解析它们的生活履历和生活史型, 并依此为实例对该技术方法及其应用中的关键科学问题做初步探讨。本文对相关科学问题尽量全面地附注代表性文献, 以方便国内同行参考。

1 材料与方法

本研究所用四种鱼类的耳石(图 1)均取自中国科学院海洋研究所 1985 年在长江口近岸水域采集的刀鲚(左矢耳石 8 个, 体长 307—364mm)、凤鲚(10 个, 体长 138—191mm)、长吻鲩(5 个, 体长 310—640mm)、带鱼(5 个, 肛长 179—355mm)个体样本。耳石均保存在塑料耳石盒中并有对应的鱼类被捕获时的现场个体生物学(体长、体重、性成熟度、摄食度等)测定记录。耳石经过超声波清洗除污、干燥、树脂包埋、固

定后在 Struers Discoplan-TS 上切割、研磨, 制作成耳石核区充分暴露的光滑切片, 然后在 Struers Roto-pol-35 上抛光、在 Milli-Q 超纯水中超声波清洗除污、在 35℃ 下烘箱干燥后备用。耳石切片制作方法详见 Dou 等(2012)²⁾。

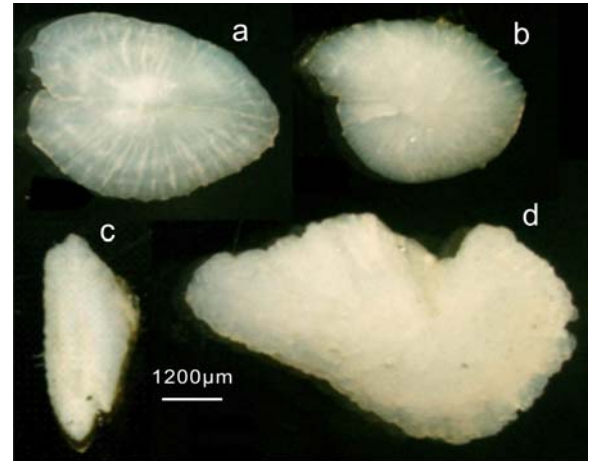


图 1 长江口水域刀鲚(a)、凤鲚(b)、带鱼(c)及长吻鲩(d)的耳石形态特征

Fig.1 Otolith morphology of the *C. nasus* (a), *C. mystus* (b), *T. haumela* (c) and *L. longirostris* (d) in the Yangtze River Estuary

耳石切片经过真空涂碳后在 EPMA(JXA-8900R, JEOL)上进行 Sr : Ca 比线分析和 Sr 含量点分析。以 SrCO_3 和 CaCO_3 为标准样。Sr : Ca 比线分析测定沿着耳石核区至外缘的长轴方向上进行。EPMA 加速电压和电子束电流为 15kV 和 12nA, 直径 1 μm , 每个测点发射时间为 4s, 测点间距为 10 μm 。Sr 含量点分析则是测定整个耳石切片断面上的 Sr 含量水平, 以不同颜色表示其空间分布特征点(从蓝色至红色表示 Sr 含量水平逐渐升高)。电子束电流为 50nA, 直径 1 μm , 每个测点发射时间为 0.4s, 像素大小 4 \times 4 μm 。

根据耳石 Sr : Ca 比或 Sr 含量分布研究各鱼种的生活履历, 比较分析 Sr 在不同生活史型鱼类的耳石内沉积量的差异, 评价 EPMA 技术在鱼类生活史型判别中的应用能力。由于长吻鲩耳石内部形态不规则, 难以准确定位耳石核中心以开展 Sr : Ca 比线分析, 本研究只开展了 3 个耳石样本的 Sr 含量点分析。关于刀鲚耳石 Sr : Ca 比及 Sr 含量的详细研究另文报道

1) 窦硕增, 天野洋典, 于鑫等, 2011. 基于多测点 LA-ICPMS 的耳石核区元素指纹分析技术及其在鱼类群体识别中的实证研究. 海洋与湖沼, (待刊)

2) Dou S Z, Yokouchi K, Yu X *et al.*, 2012. Migratory history of anadromous and non-anadromous tapertail anchovy *Coilia nasus* in the Yangtze River Estuary revealed by otolith Sr : Ca ratio

(Dou *et al.*, 2012)¹⁾, 本文只取其中 8 个代表性样本(5 个 Sr : Ca 比线分析和 3 个 Sr 含量点分析)的结果与其它三种鱼类的结果对比分析。

2 结果与讨论

2.1 耳石 Sr : Ca 比分析在洄游性鱼类个体生活履历反演中的应用

沉积在耳石中的 Sr 含量与水环境中 Sr 的背景浓度基本呈正相关, 这一结论已经在受控条件下多种鱼类(如尼罗罗非鱼 *Oreochromis niloticus*、黄尾平口石首鱼 *Leiostomus xanthurus*、黄鲈 *Perca flavescens*) 的实验研究中得以证实(Farrell *et al.*, 1996; Bath *et al.*, 2000; Elsdon *et al.*, 2002, 2006; Collingsworth *et al.*, 2010)。由于不同自然水体中 Sr 含量存在较大差异, 沉积在耳石内的 Sr 含量的平面分布或从耳石核心区至外缘区的 Sr : Ca 比的变化可以客观反映鱼类个体在生活过程中所经历过的不同水环境履历。耳石中 Sr 含量的这种空间分布变化特征在移动性强的鱼类如洄游性鱼类中表现得尤为突出。溯河洄游性刀鲚个体在降河入海或溯河产卵时期形成的耳石部分内存在着元素标记, 即 Sr 含量或 Sr : Ca 比迅速升高或降低并在此后一定范围内持续保持在这一水平上。其中, 初次降河入海时的元素标记尤为明显(图 2a—d)。进一步研究发现, 该元素标记在洄游性个体中出现在距离耳石核中心 550—1400 μm 处, 其位置与刀鲚个体早期发育生长、初次淡水生活履历、降河时间和出生地等密切相关(Dou *et al.*, 2012)¹⁾。结合 Yang 等(2006)及 Dou 等(2012)¹⁾的相关研究结果, 长江口水域刀鲚耳石内的 Sr : Ca 比元素标记在淡水、河口区和近海生活履历中分别为: $<2.0 \times 10^{-3}$ 、 $(3.5—6.0) \times 10^{-3}$ 和 $>6.0 \times 10^{-3}$ (图 2a—e)。另外, 这些元素标记也是判定刀鲚产卵洄游频次或年龄的依据。例如, 图 2a—b 表明每个刀鲚个体均有两次溯河洄游履历(除初次降河阶段外另有两个低 Sr : Ca 比阶段)。由于刀鲚一般在 2 龄达到初次性成熟, 且属每年单次溯河产卵性鱼类, 所以, 据其溯河产卵洄游次数可推测它们为 4 龄个体。刀鲚耳石内无清晰年轮, 不易进行年龄鉴定(黎雨轩等, 2010), 上述方法为解决这一问题提供了一种有效的辅助性技术手段。其它溯河性鱼类(如香鱼 *Plecoglossus altivelis*、鲑鱼 *Salvelinus alpinus* 和美洲

鲌 *Alosa sapidissima*)的耳石 Sr : Ca 比也表现出类似的淡水生活履历变化特征(Halden *et al.*, 1995; Limburg, 1995; Kuroki *et al.*, 2006)。降河性鱼类(如日本鳗鲡 *Anguilla japonica*、欧洲鳗鲡 *A. anguilla* 和美洲鳗鲡 *A. rostrata*)的耳石 Sr : Ca 比变化也遵从这一规律, 但与溯河性鱼类相反, 其在耳石核中心区(在海水中产卵、孵化过程中形成的耳石)的 Sr : Ca 比显著高于随后的淡水生活阶段的耳石的 Sr : Ca 比(Otake *et al.*, 1994; Arai *et al.*, 1997; Tzeng *et al.*, 2000; Tsukamoto *et al.*, 2001; Kuroki *et al.*, 2006, 2008)。当然, 受鱼类生活环境条件的变化和鱼类个体发育生长差异等诸多因素影响, 耳石中的这些元素标记有时在耳石切片的某些测点上可能无法清晰地表达出来, 或者出现“伪元素标记”等噪音的干扰, 从而影响其识别鱼类生活履历的能力及其在其它方面的应用效果。因此, 在开展相关研究时要充分考虑各测试样本的代表性, 正确识别有效元素测定值, 或同步分析耳石 Sr 含量点分析和 Sr : Ca 比线分析结果, 以提高利用该方法解决相关鱼类生态学问题的准确性。

溯河洄游性鱼类在长期进化过程中经常会演化出一些非洄游性个体或群体, 如陆封型香鱼、刀鲚(湖鲚)、鲑鱼(Kalish, 1990; Babaluk *et al.*, 1997; Howland *et al.*, 2001; Kuroki *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006)。这些鱼类终生生活于淡水河川或湖泊中, 形成独立的群体, 其生活史和环境履历容易回溯或重新构建。但要利用传统的种群生态学或遗传学方法识别并研究那些迁徙于河口和近海水域之间的少数非洄游性个体及其生活史型并不容易。基于 EPMA 的耳石 Sr : Ca 比分析是解决这一鱼类生态学难点的一种有效技术方法。本研究发现, 有的刀鲚个体的耳石中心区($>5.0 \times 10^{-3}$)显著高于洄游性个体的淡水履历阶段的平均 Sr : Ca 比($<2 \times 10^{-3}$), 这表明在长江口水域存在着出生并生活于河口或近海的非洄游性个体(图 2e)。进一步的研究结果表明, 在 20 世纪 80 年代此类个体在该水域存在一定的数量比例(Dou *et al.*, 2012)¹⁾。因此, 在长江流域(包括河口水域)不仅存在溯河洄游性刀鲚和陆封型刀鲚群体, 可能也存在出生并生活于河口或近海的非洄游性刀鲚群体。但在过去三十年里该水域刀鲚种群资源已发生显著变化, 其现存种群特征及生活史型演变规律等问题还有待于进一步研究。类似

1) Dou S Z, Yokouchi K, Yu X *et al.*, 2012. Migratory history of anadromous and non-anadromous tapertail anchovy *Coilia nasus* in the Yangtze River Estuary revealed by otolith Sr : Ca ratio

地, 在一些降河洄游性鱼类中, 非洄游性个体如“海洋鳊” (无淡水生活履历的日本鳊)、 “半洄游性鳊” (无淡水生活履历的欧洲鳊) 的发现都是基于耳石 Sr : Ca 比的 EPMA 分析实现的 (Tzeng *et al.*, 2000; Tsukamoto *et al.*, 2001)。一般而言, 非洄游性个体或群体的出现可能与其出生地的环境变迁或鱼类本身的生理生态发育的长期变化等因素密切相关, 但鱼类的这种生活史型的演化机制尚不清楚, 有待于进一步研究。

2.2 耳石 Sr : Ca 比的种间差异及主要受控因子的作用

鱼类耳石内 Sr 的沉积量和沉积方式存在显著的种间或种内差异。与刀鲚类似, 长江口水域凤鲚的耳石 Sr : Ca 比从核中心区至外缘区的变化方式也存在明显的个体差异 (图 2f—o)。一类是耳石 Sr : Ca 比从核中心区至外缘区持续保持在较高位水平上 (图 2f—j), 说明这类个体出生并终生生活于河口水域。另一类是耳石 Sr : Ca 比表现出周期性的高—低或低—高变化特征 (图 2k—o), 说明此类个体出生于河口或近海水域, 并在出生后周期性地迁徙于二者之间。带鱼的耳石 Sr : Ca 比从核中心区至外缘基本上是持续保持在较高水平上 (图 2p—t), 表现出其个体均一的近海生活史履历。本研究中虽然

没开展长吻鲈耳石 Sr : Ca 比的研究, 但其 Sr 含量水平从核中心区至外缘持续处于低水平上 (图 3k—m), 反映了其个体均一的淡水生活史履历。在其它鱼类中, Secor 等 (2000) 分析相关研究后发现, 淡水鱼类 (盐度 0—5)、河口鱼类 (盐度 5—25) 及海水鱼类 (盐度 >25) 的耳石内的平均 Sr : Ca 比分别为 0.9×10^{-3} 、 2.3×10^{-3} 和 3.4×10^{-3} 。同样地, 洄游性鱼类的海水生活履历的平均耳石 Sr : Ca 比 [欧洲鳊 $(9.6—14.4) \times 10^{-3}$ 、美洲鳊 $(8.2—19.1) \times 10^{-3}$ 、香鱼 7.3×10^{-3}] 均显著高于其河口或淡水履历的平均水平 (Kuroki *et al.*, 2006, 2008)。换言之, 尽管鱼类耳石内的 Sr 含量水平存在种间差异, 其总体上是遵从海水 > 河口 > 淡水生

活履历这一特征。对同一种洄游性鱼类而言, 其耳石 Sr : Ca 比在淡水、海水履历之间的显著差异是显而易见的。例如, Tsukamoto 等 (2001) 根据日本鳊耳石核 (海水履历) 的外缘区 (淡水、河口或近海履历) 的 Sr : Ca 比分布特征发现, 出生于海洋的鳊存在三种生活史型个体: 洄游性个体 (耳石外缘区的平均 Sr : Ca 比 $< 2.5 \times 10^{-3}$, 淡海水洄游) 个体、河口性个体 [$(2.5—6.0) \times 10^{-3}$, 迁徙于近海-河口区] 及海洋性个体 (生活于近海, $> 6.0 \times 10^{-3}$)。长江口水域刀鲚个体的耳石 Sr : Ca 比在不同水环境内的基准值约为: 淡水履历 $< 2.0 \times 10^{-3}$, 河口履历 $(3.5—6.0) \times 10^{-3}$, 海水履历 $> 6.0 \times 10^{-3}$ 。凤鲚的河口和近海履历的耳石 Sr : Ca 比分别为 4.8×10^{-3} [$(3.8—5.6) \times 10^{-3}$] 和 $> 7.8 \times 10^{-3}$, 带鱼个体近海履历的耳石 Sr : Ca 比为 4.9×10^{-3} [$(4.4—5.3) \times 10^{-3}$]。从长吻鲈耳石的 Sr 含量点分析结果推断 (图 3k—m), 其整个生活史阶段的耳石 Sr : Ca 比应与刀鲚淡水履历的耳石 Sr : Ca 比相近 ($< 2.0 \times 10^{-3}$)。这些研究结果既证实了鱼类耳石中 Sr 含量与水环境的盐度或 Sr 的背景浓度值呈正相关这一结论, 又表明了其显著的种间差异这一特点。但耳石 Sr 含量在种群或个体水平上基本可以有效反映鱼类在生活史中的水环境履历。

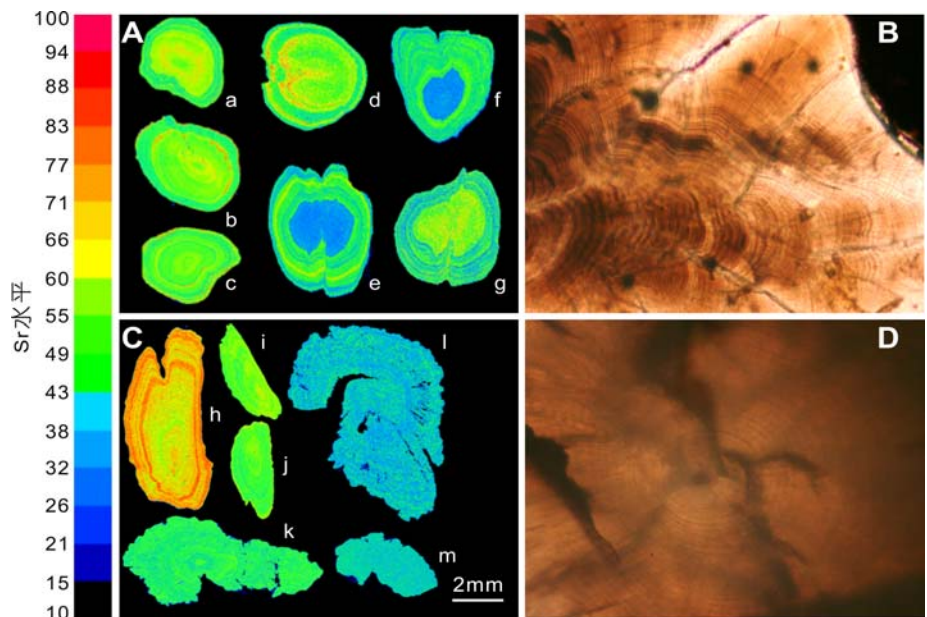


图3 长江口水域凤鲚、刀鲚、带鱼及长吻鲈的耳石 Sr 含量点分析及刀鲚、带鱼的耳石显微结构

Fig.3 Profiles of the otolith Sr intensity maps of *C. mystus*, *C. nasus*, *T. haumela* and *L. longirostris* in the Yangtze River Estuary, otolith microstructures of *C. nasus* and *T. haumela*
A, C. 耳石 Sr 含量点分析。凤鲚 (鱼体体长, 下同): a=181mm, b=152mm, c=179mm, d=191mm; 刀鲚: e=307mm, f=320mm, g=362mm; 带鱼: h=347mm, i=193mm, j=221mm; 长吻鲈: k=600mm, l=640mm, m=310mm。B. 带鱼的耳石显微结构。D. 刀鲚的耳石显微结构

除水环境中 Sr 的背景浓度外, 鱼类的生理发育状态及水环境因素如水温、盐度等也会影响耳石内 Sr 的沉积量和沉积方式。例如, 在恒定受控实验条件下, 从孵化起饲养 71d 的波纹绒须石首鱼 *Micropogonias undulatus* 的耳石 Sr : Ca 比从核中心区至边缘区存在显著差异, 表明鱼类个体发育对 Sr 在耳石中沉积量的显著制约性(Fowler *et al.*, 1995)。在自然水域中, 水体内 Sr 含量一般与盐度呈正相关, 所以鱼类的耳石 Sr : Ca 比通常随盐度升高而增大(Secor *et al.*, 2000)。但在不考虑水体中 Sr 浓度值影响的受控实验条件下, 盐度对 Sr 在耳石中的沉积量的影响则因鱼种而异。在一些鱼类如美国红鱼 *Sciaenops ocellatus* 和大鳞油鲱 *Brevoortia patronus* 中, 盐度对 Sr 在耳石内沉积量的影响并不显著(Hoff *et al.*, 1995; Chesney *et al.*, 1998), 但在日本鳗鲡、黄尾平口石首鱼、条纹鲈 *Morone saxatilis* 中, 二者呈正相关(Secor *et al.*, 1995; Tzeng, 1996; Martin *et al.*, 2004)。黑棘鲷 *Acanthopagrus butcheri* 耳石的 Sr 含量在 16℃ 水温条件下与盐度不相关, 但在 20—24℃ 下与盐度呈负相关(Elsdon *et al.*, 2002)。受控实验结果表明, 温度对耳石内 Sr 沉积量的影响也因鱼种而异。例如, 二者在黄尾平口石首鱼、波纹绒须石首鱼、美国红鱼、澳鲈 *Arripis trutta* 等鱼类中呈正相关(Fowler *et al.*, 1995; Hoff *et al.*, 1995; Kalish, 1989; Bath *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2004), 在大西洋鳕鱼 *Gadus morhua* 和大头鳕 *G. macrocephalus* 中呈负相关(Townsend *et al.*, 1995; DiMarina *et al.*, 2010), 而在日本鳗鲡、大鳞油鲱和澳洲鲷 *Girella elevata* 中的相关性则不显著(Tzeng, 1994, 1996; Gallahar *et al.*, 1996; Chesney *et al.*, 1998)。值得一提的是, 条纹鲈耳石内的 Sr 含量与水温的关系显著地受盐度条件制约(Secor *et al.*, 2000)。类似地, Martin 等(2006)研究了在不同水温(18—33℃)和盐度(5—45)的 20 个组合处理水平中微量元素在灰笛鲷 *Lutjanus griseus* 稚鱼的耳石内的沉积特征。结果发现, 水温在低温条件下(18—23℃)、盐度在高温(28—33℃)条件下显著影响耳石 Sr : Ca 比。因此, 在多环境因子变量的受控实验条件下, 某一特定环境因子可能因受实验变量的交互作用影响会对耳石内 Sr 沉积量产生不同的作用。在本研究中, 长江口刀鲚、凤鲚、带鱼、长吻鲷即使经历过相似的河口或近海生活履历, 其耳石内的 Sr 沉积量也因鱼类个体的环境史的差异而不同。但正是鱼类在生活史中所经历的这些多变的环境因素的影响, 产生了不同鱼种或种群之间

存在差异显著的独特元素标识, 这为研究鱼类种群判定、出生地溯源和个体生活履历的识别等鱼类生态学难点问题提供了有效的技术方法。

2.3 基于 EPMA 的耳石 Sr 分析在鱼类生活史重新构建中的应用

耳石 Sr 含量点分析能有效反映鱼类个体所经历的水环境变化趋势, 其优点在于容易直观地识读元素标记, 这对识读一些在 Sr : Ca 比线分析上不易识别的元素标记具有重要应用价值, 但它无法精确量化耳石内 Sr 的含量水平或基准(图 3A、C)。另外, 完成 Sr 含量点分析的耳石切片由于在电子探针扫描过程中受到电子束的全界面照射而无法进行后续的 SEM 分析, 所以无法获取其显微结构信息, 不能揭示耳石 Sr 含量随耳石或鱼类个体发育生长的变化规律。而耳石 Sr : Ca 比线分析则弥补了这方面的不足。耳石切片在完成 Sr : Ca 比线分析后, 经过研磨除碳、盐酸蚀刻和真空涂金(Pd-Pt)后还可以进行耳石显微结构的 SEM 分析, 以识读日轮、年轮或其它环境标记轮(如孵化轮、初次摄食轮、温度标记轮、生长异化标记轮等)。这样, 利用从同一耳石获取的显微结构和微化学信息, 可以构建鱼类的耳石增长-日龄或年龄-耳石 Sr : Ca 比关系。在此基础上, 结合个体样本的种群生物学信息, 可以解析鱼类的繁殖、早期变态发育生长、仔鱼运输等科学问题(窦硕增, 2007)。这一方法已经被成功地应用到耳石上存在可识读日轮或年轮的洄游性鱼类(如日本鳗鲡和香鱼)的生活史研究中(Otake *et al.*, 1994; Arai *et al.*, 1997; Kuroki *et al.*, 2006)。虽然刀鲚仔幼鱼的耳石中存在可识读的日轮(葛珂珂等, 2010), 但成鱼的耳石上只在耳石核区存在一些可识读轮纹, 其后的轮纹通常是不连续的, 难以识读(图 3D)。因此, 无法建立成体刀鲚的耳石元素-显微结构-种群生物学信息关系。但以后开展刀鲚仔幼鱼的相关研究是可行的, 这对进一步认识刀鲚的繁殖、早期发育生长、出生溯源、混合群体识别和初次降河洄游过程与机制等问题是十分必要的。带鱼耳石上存在比较清晰的日轮结构(图 3B), 这对于利用耳石 Sr : Ca 比线分析技术重新构建其生活史和环境史具有重要的生态学意义。

利用 EPMA 探测耳石 Sr 含量和 Sr : Ca 比以重新构建天然水域鱼类生活史是目前耳石微化学研究中比较成功的技术之一。但如前所述, Sr 在耳石内的沉积过程和机制非常复杂, 其中的一些关键科学问题尚不清楚, 有待于进一步研究。近十年来, 关于 Sr 的沉

积过程与机制研究越来越受到研究者的重视(Campana, 1999; Bath *et al.*, 2000; Elsdon *et al.*, 2002, 2003; Martin *et al.*, 2004, 2006; Diouf *et al.*, 2006; Collingsworth *et al.*, 2010; DiMarina *et al.*, 2010)。例如, Sr 在耳石内的沉积的生理学机制问题; 耳石内的 Sr 沉积量在多大程度上反映了水环境内 Sr 的背景浓度值问题; 环境生态因子及鱼类发育生理对 Sr 在耳石中沉积的控制机制问题; 如何确立不同生活史型鱼类的耳石 Sr : Ca 比基准问题等。这些科学问题的解决将是进一步完善耳石微化学分析技术、提高其应用能力的关键, 也是未来该研究领域研究热点, 值得国内学者关注。

参 考 文 献

- 王英俊, 叶振江, 刘 群等, 2010. 细条天竺鱼(*Apogonichthys lineatus*)与黑鳃天竺鱼(*A. arafurae*)耳石形态识别的初步研究. 海洋与湖沼, 41(2): 282—285
- 叶振江, 孟晓梦, 高天翔等, 2007. 中日两种花鲈(*Lateolabrax sp.*)耳石形态的地理变异. 海洋与湖沼, 38(4): 356—360
- 杨 健, 刘洪波, 2010. 长江口崇明水域鲢鱼耳石元素微化学分析. 中国水产科学, 17: 853—858
- 杨良锋, 李胜荣, 罗军燕等, 2006. 不同水域鲤鱼耳石微化学特征及其环境指示意义. 岩石矿物学杂志, 25: 511—517
- 郭弘艺, 唐文乔, 魏凯等, 2007. 中国鲚属鱼类的矢耳石形态特征. 动物学杂志, 42(1): 39—47
- 高永文, 鲁安怀, 宋玉国, 2004. 鱼耳石的碳、氧稳定同位素成分研究. 自然科学进展, 14: 268—272
- 葛珂珂, 钟俊生, 2010. 长江口沿岸碎波带刀鲚仔稚鱼的日龄组成与生长. 水生生物学报, 34: 716—721
- 冀硕增, 2007. 鱼类的耳石信息分析及其生活史重建——理论、方法及应用. 海洋科学集刊, 48: 93—112
- 黎雨轩, 何文平, 刘家寿等, 2010. 长江口刀鲚耳石年轮确证和年龄与生长研究. 水生生物学报, 34: 787—793
- Arai T, Otake T, Tsukamoto K, 1997. Drastic changes in otolith microstructure and microchemistry accompanying the onset of metamorphosis in the Japanese eel *Anguilla japonica*. Marine Ecology Progress Series, 161: 17—22
- Babaluk J A, Halden N M, Reist J D *et al.*, 1997. Evidence for non-anadromous behaviour of arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from Lake Hazen, Ellesmere Island, northwest Territories, Canada, based on scanning proton microprobe analysis of otolith strontium distribution. Arctic, 50: 224—233
- Bath G E, Thorrold S R, Jones C M *et al.*, 2000. Strontium and barium uptake in aragonitic otoliths of marine fish. Geochimica et Cosmochimica Acta, 64: 1705—1714
- Campana S E, 1999. Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. Marine Ecology Progress Series, 188: 263—297
- Campana S E, Thorrold S R, Jones D G *et al.*, 1997. Comparison of accuracy, precision, and sensitivity in elemental assays of fish otoliths using the electron microprobe, proton-induced X-ray emission, and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 54: 2068—2079
- Chesney E J, McKee B M, Blanchard T *et al.*, 1998. Chemistry of otoliths from juvenile menhaden *Brevoortia patronus*: evaluating strontium, strontium: calcium and strontium isotope ratios as environmental indicators. Marine Ecology Progress Series, 171: 261—273
- Collingsworth P D, van Tassell J J, Olesik J W *et al.*, 2010. Effects of temperature and elemental concentration on the chemical composition of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) otoliths. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 67: 1187—1196
- DiMarina R A, Miller J A, Hurst T P, 2010. Temperature and growth effects on otolith elemental chemistry of larval Pacific cod, *Gadus macrocephalus*. Environmental Biology of Fishes, 89: 453—462
- Diouf K, Panfili J, Labonne M *et al.*, 2006. Effects of salinity on strontium: calcium ratios in the otoliths of the West African black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* in a hypersaline estuary. Environmental Biology of Fishes, 77: 9—20
- Elsdon T S, Gillanders B M, 2002. Interactive effects of temperature and salinity on otolith chemistry: challenges for determining environmental histories of fish. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 59: 1796—1808
- Elsdon T S, Gillanders B M, 2003. Reconstructing migratory patterns of fish based on environmental influences on otolith chemistry. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 13: 219—235
- Elsdon T S, Gillanders B M, 2006. Identifying migratory contingents of fish by combining otolith Sr : Ca with temporal collections of ambient Sr : Ca concentrations. Journal of Fish Biology, 69: 643—657
- Farrell J, Campana S E, 1996. Regulation of calcium and strontium deposition on the otoliths of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology A: Physiology, 115: 103—109
- Fowler A J, Campana S E, Jones S E, 1995. Experimental assessment of the effect of temperature and salinity on elemental composition of otoliths using laser ablation ICPMS. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 52: 1431—1441
- Gallahar N K, Kingsford M J, 1996. Factors influencing Sr/Ca ratios in otoliths of *Girella elevata*: An experimental investigation. Journal of Fish Biology, 48: 174—186
- Halden N M, Babaluk J A, Campbell J I *et al.*, 1995. Scanning proton microprobe analysis of strontium in an arctic charr, *Salvelinus alpinus*, otolith-implications for the interpretation of anadromy. Environmental Biology of Fishes, 43: 333—

- 339
- Hoff G R, Fuiman L A, 1995. Environmentally induced variation in elemental composition of red drum (*Sciaenops ocellatus*) otoliths. *Bulletin of Marine Science*, 56: 578—591
- Howland K L, Tonn W M, Babaluk J A *et al*, 2001. Identification of freshwater and anadromous inconnu in the Mackenzie River system by analysis of otolith strontium. *Transactions of the American Fisheries Society*, 130: 725—741
- Kalish J M, 1989. Otolith microchemistry-validation of the effects of physiology, age and environment on otolith composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 132: 151—178
- Kalish J M, 1990. Use of otolith microchemistry to distinguish the progeny of sympatric anadromous and non-anadromous salmonids. *Fishery Bulletin*, 88: 657—666
- Kraus R T, 2004. Incorporation of strontium into otoliths of an estuarine fish. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 302: 85—106
- Kuroki M, Kawai M, Ó nsson B *et al*, 2008. Inshore migration and otolith microstructure/microchemistry of anguillid glass eels recruited to Iceland. *Environmental Biology of Fishes*, 83: 309—325
- Kuroki M, Ma T, Ishida R *et al*, 2006. Migratory history of wild and released ayu (*Plecoglossus altivelis*) in the Kurobe River, Japan. *Coastal and Marine Sciences*, 30: 425—431
- Limburg K E, 1995. Otolith strontium traces environmental history of subyearling American shad *Alosa sapidissima*. *Marine Ecology Progress Series*, 119: 25—35
- Martin G B, Thorrold S R, Jones C M, 2004. Temperature and salinity effects on strontium incorporation in otoliths of larval spot (*Leiostomus xanthurus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61: 34—42
- Martin G B, Wuenschel M J, 2006. Effect of temperature and salinity on otolith element incorporation in juvenile gray snapper *Lutjanus griseus*. *Marine Ecology Progress Series*, 324: 229—239
- Otake T, Ishii T, Kakahara M *et al*, 1994. Drastic changes in otolith strontium/calcium ratios in leptocephali and glass eels of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Marine Ecology Progress Series*, 112: 189—193
- Phillis C C, Ostrach D J, Ingram B L *et al*, 2011. Evaluating otolith Sr/Ca as a tool for reconstructing estuarine habitat use. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 68: 360—373
- Radtke R L, Townsend D W, Folsom S D *et al*, 1990. Strontium: calcium concentration ratios in otoliths of herring larvae as indicators of environmental histories. *Environmental Biology of Fishes*, 27: 51—61
- Rieman B E, Myers D L, Nielson R L, 1994. Use of otolith microchemistry to discriminate *Oncorhynchus nerka* of resident and anadromous origin. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51: 68—77
- Song Z B, Fu Z D, Li J *et al*, 2008. Validation of daily otolith increments in larval and juvenile Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. *Environmental Biology of Fishes*, 82: 165—171
- Secor D H, 1992. Application of otolith microchemistry analysis to investigate anadromy in Chesapeake Bay striped bass *Morone saxatilis*. *Fishery Bulletin*, 90: 798—806
- Secor D H, Henderson-Arzapalo A, Piccoli P M, 1995. Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 192: 15—33
- Secor D H, Rooker J R, 2000. Is otolith strontium a useful scalar of life cycles in estuarine fishes? *Fisheries Research*, 46: 359—371
- Townsend D W, Radtke R L, Malone D P *et al*, 1995. Use of otolith strontium: calcium ratios for hindcasting larval cod *Gadus morhua* distributions relative to water masses on Georges Bank. *Marine Ecology Progress Series*, 119: 37—44
- Tsukamoto K, Arai T, 2001. Facultative catadromy of the eel *Anguilla japonica* between freshwater and seawater habitats. *Marine Ecology Progress Series*, 220: 265—276
- Tzeng W N, 1994. Temperature effects on the incorporation of strontium in otolith of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Journal of Fish Biology*, 45: 1055—1066
- Tzeng W N, 1996. Effects of salinity and ontogenetic movement on strontium: calcium ratios in the otoliths of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 199: 111—122
- Tzeng W N, Wang C H, Wickström H *et al*, 2000. Occurrence of the semi-catadromous European eel *Anguilla anguilla* (L.) in Baltic Sea. *Marine Biology*, 137: 93—98
- Xie S, Watanabe Y, Masuda R *et al*, 2005. Growth and morphological development of sagittal otoliths of larval and early juvenile *Trachurus japonicus*. *Journal of Fish Biology*, 66: 1704—1713
- Yang J, Arai T, Liu H *et al*, 2006. Reconstructing habitat use of *Coilia mystus* and *Coilia ectenes* of the Yangtze River estuary, and of *Coilia ectenes* of Taihu Lake, based on otolith strontium and calcium. *Journal of Fish Biology*, 69: 1120—1135

RECONSTRUCTING MIGRATORY HISTORY OF FISH USING OTOLITH STRONTIUM: CALCIUMS RATIOS BY EPMA: A CASE STUDY

DOU Shuo-Zeng¹, YOKOUCHI Kazuki², YU Xin^{1,3}, CAO Liang¹, OTAKE Tsuguo⁴,
TSUKAMOTO Katsumi²

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; 2. Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo, Kashiwa-shi, Chiba 277-8564, Japan; 3. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049; 4. International Coastal Research Center, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo, Otsuchi-chyo, Iwate 028-1102, Japan)

Abstract In this study, the migratory histories of four fish species (tapertail anchovy *Coilia nasus* and *C. mystus*, hairtail *Trichiurus haumela* and longsnout catfish *Leiocassis longirostris*) in the Yangtze River Estuary, China, were investigated using the otolith Sr : Ca ratios and Sr intensity maps by X-ray electron probe microanalyzer (EPMA). Results showed that, in the *C. nasus* stock, both river origin anadromous individuals and estuarine origin non-anadromous ones occurred in this area. The otolith Sr : Ca ratios along the life history transects showed 3 general categories of migratory history: $<2.0 \times 10^{-3}$ for river residence, $(3.5—6.0) \times 10^{-3}$ for estuarine residence and $>6.0 \times 10^{-3}$ for sea residence. In the *C. mystus* stock, the otolith Sr : Ca ratios also indicated two types of migratory histories: estuary origin and residence in the whole life history (4.8×10^{-3}) and shifting periodically between estuarine residence and sea residence ($>7.8 \times 10^{-3}$) after birth in either water. The otolith Sr : Ca ratios of the hairtail consistently maintained at a high level (4.9×10^{-3}) throughout the life history transects, indicating their whole seawater life. Meanwhile, the low Sr levels in the otoliths of the longsnout catfish suggested that the individuals had freshwater residence all their life stages. These findings confirmed that the otolith Sr levels of the four fish species followed an order of seawater residence > brackish residence > freshwater residence. Due to the influences of the varied environmental histories and the physiology of the fish, the inter- or intra-species differences in the otolith Sr level are remarkable, which is helpful for elementally fingerprinting the migratory history and reconstructing the life history of fish.

Key words Otolith Sr : Ca ratio, EPMA, Reconstructing life history, *Coilia nasus*, *C. mystus*, *Trichiurus haumela* and *Leiocassis longirostris*, The Yangtze River Estuary