

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18270

基于浸泡法的牙鲆耳石锶标记技术研究

司飞¹, 任建功¹, 王青林^{1,2}, 孙朝徽¹, 刘洪波³, 姜涛³, 杨健³, 王俊^{4,5}

1. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100;

2. 河北科技师范学院, 河北 秦皇岛 066600;

3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;

4. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

5. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266200

摘要: 为了探究耳石微化学标记技术在牙鲆增殖放流中的应用, 以全长(1.56±0.16) cm 的牙鲆幼鱼为研究对象, 在其养殖水中分别添加 0.5 mg/L、2 mg/L、8 mg/L、32 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 以无添加 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 组为对照组, 人为改变牙鲆幼鱼生存环境中 Sr^{2+} 浓度 72 h, 研究不同浓度 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对牙鲆耳石锶标记效果。标记期间每 24 h 换水 1 次, 换水量为 50%, 换水后补充 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 至原始浓度, 记录各浓度组标记期间及标记后的鱼苗死亡数量。利用 X 射线电子探针微区分析仪(EPMA)对耳石样本进行分析, 定量线分析结果表明, 0.5 mg/L、2 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浸染不能形成牙鲆耳石锶标记。8 mg/L 浓度组出现 Sr 峰区, Sr/Ca (Sr:Ca×1000) 均值为 4.50~6.60, Sr 峰值为 5.49~8.49。32 mg/L 浓度组 Sr 峰区均值为 4.83~7.55, Sr 峰值为 5.62~11.04。这说明 8 mg/L、32 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 可对牙鲆耳石进行锶标记。但 8 mg/L 浓度组出现未标记样本, 且 Sr 峰区均值较 32 mg/L 浓度组低。32 mg/L 浓度组 Sr/Ca 比值显著增高, 即锶标记的 Sr/Ca 比值为 6.61±0.86, 与标记前和对照组 Sr/Ca 比值差异均显著($P<0.05$), 锶标记率 100%。面分布分析(mapping analysis)结果表明, 从 8 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度组开始, 耳石出现红色“高锶标记环”, 与耳石本底颜色对比明显, 且随浓度升高, 红色“高锶标记环”由浅变深, 锶标记效果明显增强。单因素方差分析和 Duncan 多重比较结果显示, 各浓度组全长、体重与对照组差异不显著($P>0.05$), 不同浓度的 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对牙鲆幼鱼生长无影响。经 χ^2 检验, 各浓度组在浸泡标记期间死亡率及标记后养殖 90 d 的累积死亡率无显著性差异($P>0.05$), 不同浓度的 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对牙鲆幼鱼死亡率无显著影响。因此, 32 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 为最佳标记浓度。

关键词: 锶标记; 耳石; 牙鲆; $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

中图分类号: S937

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)03-0534-12

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是中国重要的海洋经济鱼类, 广泛分布于中国渤海、黄海、东海等海域, 以黄、渤海的产量居多^[1-2]。因个体大、生长快、味道鲜美、经济价值高、洄游距离短等原因, 牙鲆已成为中国海水鱼类增殖放流的主要物种之一, 且其增殖放流规模大、数量多。以 2017 年为例, 据不完全统计, 仅环渤海三省一市放流牙鲆数量高达 1924 万尾。然而大规模牙鲆增殖放

流的效果如何, 需要科学、适用的手段进行评估。目前增殖放流效果评估最常用的手段为标记放流, 标记技术是识别放流群体的关键, 因此, 近年来标记技术作为近海渔业生态修复领域的科学问题之一被广泛研究。如刘奇^[3]利用荧光染料对牙鲆耳石、鳞片及鳍条进行了标记, 刘芝亮等^[4]研究了 T 型标记牌标记, 童爱萍等^[5]进行了 mtDNA 和微卫星标记相结合的牙鲆分子标记研究, 徐永江等^[6]

收稿日期: 2018-08-08; 修订日期: 2019-02-10.

基金项目: 现代农业产业技术体系国家海水鱼产业技术体系(CARS-47-Z03); 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303050).

作者简介: 司飞(1981-), 男, 硕士, 工程师, 主要从事渔业资源增殖与养护研究. E-mail: beyond702@163.com

通信作者: 王俊, 研究员. E-mail: wangjun@ysfri.ac.cn

分析了编码金属标签对牙鲆苗种的标记效果等。在中国牙鲆放流企业多,放流规格小(一般为5 cm),且放流鱼苗遗传背景不清晰,放流数量多且规模大的现状下,荧光标记存在标记浓度高(茜素红 S 200~400 mg/L、茜素络合指示剂 300 mg/L)、大规模标记时荧光染料用量大等问题,T形标记牌及编码金属标签对小规格牙鲆标记效果差,分子标记因亲本遗传信息不清受到局限。因此,需要开发一种适合大规模放流小规格牙鲆的标记方法。

耳石是鱼体中最先骨化的组织,是一种具有新陈代谢惰性的钙化结构,不会被重吸收,其由约96%的碳酸钙、3%的蛋白质和1%的痕量或微量元素组成^[7-8]。其中,耳石元素被认为与生存环境有关,作为天然标记被用于生境履历重建、种群鉴定等,而分析耳石中Sr/Ca比值($\text{Sr}/\text{Ca} \times 1000$)则是鱼类生境重建的重要技术手段^[9-14]。进一步研究发现,人为添加外源 Sr^{2+} 可对大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)及鳗鲡(*Anguilla anguilla*)等产生耳石锶标记^[15-18]。耳石锶标记成本低,标记方法简便易操作,对苗种无损伤,一旦标记不受外界影响,可以对小规格苗种进行大规模标记,近年来成为中国鱼类标记放流领域的热点问题。Brown等^[19]认为淡水及河口鱼类耳石Sr/Ca比值与生境中的Sr/Ca比值直接相关,而海水中的Sr/Ca比值不是影响海水鱼类耳石Sr/Ca比值的主要因素。因此,需要研究海水中锶浓度对海水鱼类耳石Sr/Ca比值的影响,以探讨耳石锶标记的可行性。本研究拟通过不同浓度对比试验,研究短时间浸泡锶盐对牙鲆幼鱼耳石标记效果,分析不同浓度 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对标记鱼苗死亡率的影响,为大规模牙鲆耳石锶标记放流提供基础数据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验鱼来源及标记实验

实验鱼为中国水产科学研究院北戴河中心实验站2016年6月生产的40日龄牙鲆幼鱼[全长(1.56 ± 0.16) cm、体重(0.06 ± 0.02) g],实验鱼养殖在北戴河牙鲆良种场育苗车间的300 L圆柱形玻璃钢水槽中,避免阳光直射,光强在2000 lx以下,

每日投喂3~6次配合饲料,日投喂量为体重的4%~8%,水温19~20℃,pH 7.83~8.03,溶解氧8.09~8.58,盐度30。实验鱼在0.5 mg/L、2 mg/L、8 mg/L、32 mg/L 4个 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度的海水中进行耳石锶标记,标记持续时间为72 h,以无添加 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的自然海水养殖作为对照组,其中 Sr^{2+} 质量浓度为8.53 mg/L。每个梯度放养200尾实验鱼,标记期间每24 h换水1次,换水量为50%,换水后补加 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 至原始浓度。选取各浓度组标记后10 d、50 d、90 d的耳石样本进行耳石微化学分析(表1)。由于检测成本较高,标记后不同时间每个梯度组各取3尾实验鱼上机检测。根据标记效果,对标记效果好的浓度组耳石样本进行追加检测至30个样本,并分析其标记率。标记后90 d各浓度组测量实验鱼体重和全长,记录标记期间死亡数量及标记后90 d不同浓度组实验鱼累积死亡数量。

1.2 耳石检测方法

1.2.1 耳石摘取及前处理 从样本中选取大小相对一致的实验鱼进行耳石采集,利用剪刀、尖头镊等工具将矢耳石取出,剔除有机质,分别用去离子水、无水乙醇清洗,置于48孔盒中干燥备用。实验期间实验鱼已完成变态,右眼完全移到左侧,考虑牙鲆双眼位于左侧的特殊形态特征,为增加可比性,本实验统一使用左矢耳石进行锶元素分析。

前处理参照李孟孟等^[20]的方法,先将耳石用Epofix环氧树脂进行固定包埋,38℃烘干12 h以上。然后将包埋块用AB胶粘贴于干净的载玻片上,凝固2 h后,使用金刚石磨轮的碾磨机(Discoplan-TS型,Struers公司)切割碾磨。粗磨阶段用500目金刚砂轮碾磨至耳石微露,接着用1200目砂纸精磨至耳石核心暴露,然后用磨抛机(Labo Pol-35,丹麦 Struers公司)装备织布机抛光盘配合抛光液抛光,至耳石表面无明显划痕。最后将样品放入Milli-Q水中超声清洗5 min后,自然条件下晾干24 h,完全干燥后,使用真空镀膜机(JEE-420,日本电子株式会社)蒸镀碳膜(36A, 25 s)。

1.2.2 耳石的EPMA分析 参考杨健等^[21]的方法,利用X射线电子探针微区分析仪(JXA-8100

表 1 实验鱼及耳石样本信息
Tab. 1 The information of experimental fish and otoliths

耳石编号 otolith number	实验鱼编号 experimental fish number	SrCl ₂ ·6H ₂ O 质量浓度/(mg/L) SrCl ₂ ·6H ₂ O concentration	标记后时间/d days after marked	全长/cm total length	体重/g body weight
BDHFW01	0-10-1	对照组 control	10	1.92	0.11
BDHFW02	0-10-2			2.26	0.13
BDHFW03	0-10-3			2.04	0.11
BDHFW04	0.5-10-1	0.5	10	2.49	0.13
BDHFW05	0.5-10-2			2.64	0.17
BDHFW06	0.5-10-3			1.74	0.05
BDHFW07	2-10-1	2	10	2.63	0.20
BDHFW08	2-10-2			2.49	0.18
BDHFW09	2-10-3			2.42	0.18
BDHFW10	8-10-1	8	10	2.00	0.09
BDHFW11	8-10-2			2.48	0.13
BDHFW12	8-10-3			1.89	0.11
BDHFW13	32-10-1	32	10	2.58	0.30
BDHFW14	32-10-2			2.78	0.21
BDHFW15	32-10-3			2.22	0.14
BDHFW16	0-50-1	0	50	8.91	5.90
BDHFW17	0-50-2			9.11	6.94
BDHFW18	0-50-3			8.13	5.00
BDHFW19	0.5-50-1	0.5	50	8.43	5.21
BDHFW20	0.5-50-2			8.24	4.36
BDHFW21	0.5-50-3			8.14	4.47
BDHFW22	2-50-1	2	50	9.42	9.82
BDHFW23	2-50-2			10.44	9.77
BDHFW24	2-50-3			7.37	2.75
BDHFW25	8-50-1	8	50	11.53	12.06
BDHFW26	8-50-2			10.74	12.24
BDHFW27	8-50-3			10.34	10.08
BDHFW28	32-50-1	32	50	8.12	5.12
BDHFW29	32-50-2			8.80	6.70
BDHFW30	32-50-3			10.44	11.55
BDHFW31	0-90-1	0	90	11.71	18.96
BDHFW32	0-90-2			11.18	14.39
BDHFW33	0-90-3			11.83	15.50
BDHFW34	0.5-90-1	0.5	90	11.42	18.30
BDHFW35	0.5-90-2			12.14	21.46
BDHFW36	0.5-90-3			11.48	12.90
BDHFW37	2-90-1	2	90	11.88	16.50
BDHFW38	2-90-2			11.64	20.19
BDHFW39	2-90-3			11.71	18.46
BDHFW40	8-90-1	8	90	10.96	12.42
BDHFW41	8-90-2			11.42	11.50
BDHFW42	8-90-3			13.49	22.39
BDHFW43	32-90-1	32	90	11.77	15.03
BDHFW44	32-90-2			11.80	19.28
BDHFW45	32-90-3			12.28	20.14

型 EPMA, 日本电子株式会社)从耳石核心沿耳石最长径至耳石边缘呈直线进行耳石锶元素定量线分析。标准样品使用碳酸钙(CaCO_3)和钛酸锶(SrTiO_3)。定量线分析(line transect analysis)EPMA的参数设定: 加速电压为 15 kV, 电子束电流为 $2.0 \times 10^{-8} \text{ A}$; 束斑直径为 $2 \mu\text{m}$, 每点驻留时间 15 s; 以间距 $2 \sim 4 \mu\text{m}$ 连续进行打点测定。所有耳石线分析完后用电子束在耳石矢状面表面扫描进行面分析(mapping analysis)。其 EPMA 加速电压和电子束电流分别为 15 kV, $5.0 \times 10^{-7} \text{ A}$, 束斑直径为 $2 \mu\text{m}$, 像素为 $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$, 每点驻留时间为 30 ms。由于耳石中 Sr 含量远小于 Ca 含量, 按照国际惯例将 Sr/Ca 比值标准化, 即统一用 Sr 含量/Ca 含量 $\times 10^3$ 表示。

1.3 数据处理

利用 Excel 2010 对定量线分析检测的 Sr、Ca 含量及 Sr/Ca 比值、测定点等数据进行整理及处理, 并对 Sr/Ca 比值作图。使用 SPSS 19.0 软件对追加样本组不同阶段 Sr/Ca 比值及各浓度组生长数据进行 Duncan 多重比较, 检验追加样本组不同阶段与对照组 Sr/Ca 比值差异性及不同浓度 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对生长影响, $P < 0.05$ 表示差异显著。对标记期间死亡率及标记后养殖 90 d 各浓度组的

累积死亡率进行 χ^2 检验, 分析不同浓度 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对牙鲆幼鱼死亡率的影响。

2 结果与分析

2.1 不同浓度组牙鲆耳石定量线分析的 Sr/Ca 比值

通过定量线分析可知, 标记后 10 d、50 d、90 d 的对照组、0.5 mg/L、2 mg/L 浓度组的 Sr/Ca 比值均未出现增高阶段(图 1), 因此, 0.5 mg/L、2 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浸染不能形成牙鲆耳石锶标记。8 mg/L 浓度组标记后 10 d、50 d、90 d 的样本中均有两个样本, 即 6 个样本 Sr/Ca 比值出现增高, 增高阶段平均 Sr/Ca 比值, 即 Sr 峰区均值为 $4.50 \sim 6.60$, Sr/Ca 极大值, 即 Sr 峰值为 $5.49 \sim 8.49$ (图 2), 说明 8 mg/L 浓度 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 可对牙鲆耳石进行锶标记。32 mg/L 浓度组标记后 10 d、50 d、90 d 的 9 个样的 Sr/Ca 比值均出现明显增高阶段, Sr 峰区均值为 $4.83 \sim 7.55$, Sr 峰值为 $5.62 \sim 11.04$ (表 2)。但 8 mg/L 浓度组中增高阶段的 Sr/Ca 比值和 Sr/Ca 极大值较 32 mg/L 浓度组均低, 且有 3 个样本未出现 Sr/Ca 比值增高阶段, 未形成耳石锶标记, 因此, 8 mg/L 浓度 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 虽可对牙鲆耳石进行锶标记, 但标记效果较差。32 mg/L 浓度 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对牙鲆耳石锶标记良好。对 32 mg/L

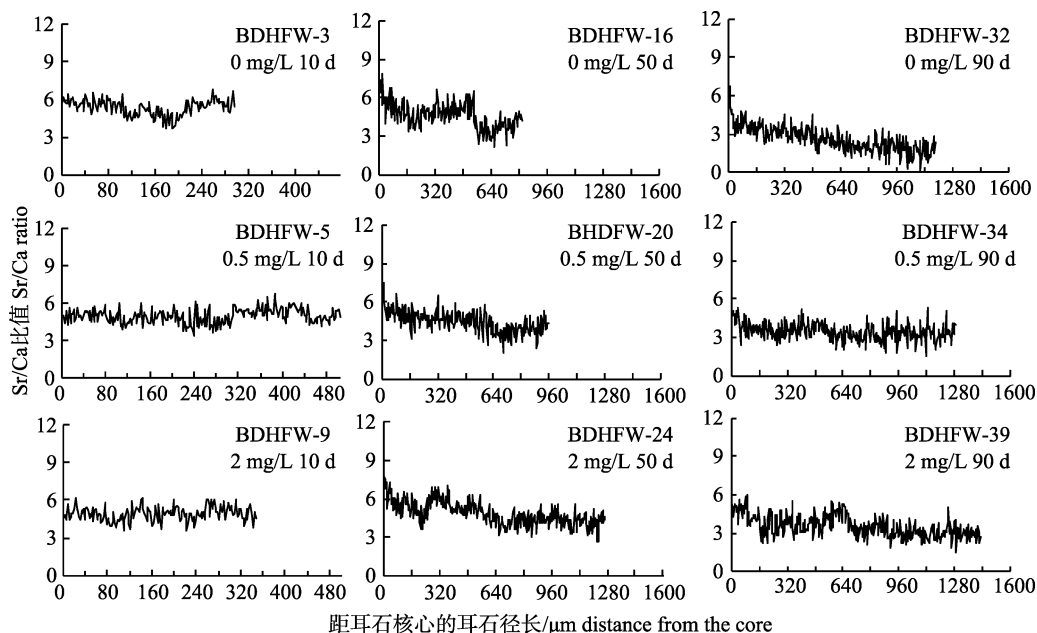


图 1 0~2 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浸浴组牙鲆耳石定量线分析结果

Fig. 1 The line transect analysis result in otoliths of *Paralichthys olivaceus* in 0~2 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

表 2 8 mg/L、32 mg/L 浓度组标记后 10 d、50 d、90 d 牙鲆耳石 Sr/Ca 比值变化
Tab. 2 Fluctuation of Sr/Ca ratio in otoliths of *Paralichthys olivaceus* in the 8 mg/L and 32 mg/L concentration groups at day 10, day 50 and day 90 after marking

SrCl ₂ ·6H ₂ O 浓度/(mg/L) SrCl ₂ ·6H ₂ O concentration	耳石编号 otolith number	实验鱼编号 experimental fish number	阶段 stage	测定点数 detected points	Sr/Ca 比值 Sr/Ca ratio	Sr 峰区均值为 正常均值倍数 multiples of mean values of high Sr area to normal	Sr 峰值为正常均值倍数 multiples of peak value of Sr to average value of normal
8	BDHFW10	8-10-1	I	117	4.87		
			II	24	6.45	1.32	1.65
			III	1	8.04		
	BDHFW11	8-10-2	I	111	4.75		
			II	63	6.25	1.32	1.65
			III	1	7.82		
	BDHFW12	8-10-3	I	146	4.91	—	—
	BDHFW25	8-50-1	I	272	4.52	—	—
			I	238	4.14		
			II	7	6.60	1.59	1.79
	BDHFW26	8-50-2	III	1	7.42		
			I	198	3.97		
			II	6	5.86	1.48	2.14
	BDHFW27	8-50-3	III	1	8.49		
			I	214	3.43		
			II	25	4.50	1.31	1.65
	BDHFW40	8-90-1	III	1	5.49		
			I	146	3.40	—	-
			I	285	3.53		
	BDHFW41	8-90-2	II	7	5.02	1.42	1.68
			III	1	5.92		
32	BDHFW13	32-10-1	I	118	5.11		
			II	55	7.41	1.45	2.16
			III	1	11.04		
	BDHFW14	32-10-2	I	114	4.53		
			II	38	6.65	1.47	2.07
			III	1	9.39		
	BDHFW15	32-10-3	I	100	5.34		
			II	16	6.82	1.28	1.91
			III	1	10.22		
	BDHFW28	32-50-1	I	261	3.33		
			II	23	5.22	1.57	2.11
			III	1	7.02		
	BDHFW29	32-50-2	I	241	4.60		
			II	10	7.49	1.63	1.96
			III	1	9.00		

(待续 to be continued)

(续表 2 table 2 continued)							
SrCl ₂ ·6H ₂ O 浓度/(mg/L) SrCl ₂ ·6H ₂ O concentration	耳石编号 otolith number	实验鱼编号 experimental fish number	阶段 stage	测定点数 detected points	Sr/Ca 比值 Sr/Ca ratio	Sr 峰区均值为正常均值倍数 multiples of mean values of high Sr area to normal	Sr 峰值为正常均值倍数 multiples of peak value of Sr to average value of normal
32	BDHFW30	32-50-3	I	235	2.77		
			II	13	4.83	1.74	2.03
			III	1	5.62		
	BDHFW43	32-90-1	I	307	4.57		
			II	19	7.55	1.65	2
			III	1	9.15		
	BDHFW44	32-90-2	I	300	4.46		
			II	19	6.96	1.56	2.19
			III	1	9.77		
	BDHFW45	32-90-3	I	385	4.50		
			II	15	7.02	1.56	1.78
			III	1	8.01		

注: I 为 Sr/Ca 比值平稳阶段; II 为 Sr/Ca 显著变化阶段; III 为 Sr/Ca 极大值。
Note: I denotes stationary stage; II denotes stages of Sr/Ca ratio significantly changed in otoliths; III denotes peak value of Sr/Ca ratio.

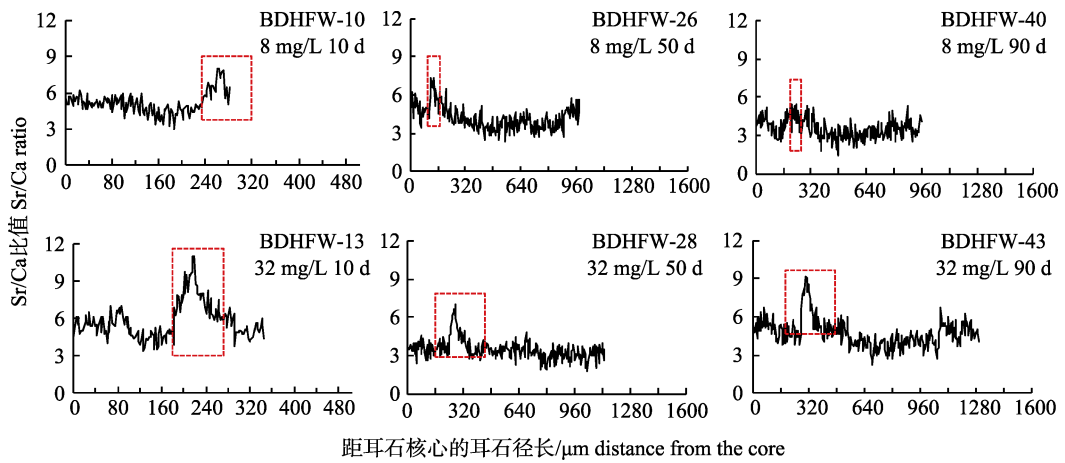


图 2 8–32 mg/L SrCl₂·6H₂O 浸浴组牙鲆锶标记耳石定量线分析结果
Fig. 2 The line transect analysis in the marked otoliths of *Paralichthys olivaceus* in 8–32 mg/L SrCl₂·6H₂O

浓度组追加样本检测发现 30 个样本均出现 Sr/Ca 比值明显增高阶段,即均形成良好锶标记,标记率 100%。标记前 Sr/Ca 比值为 4.49 ± 0.71 ,与对照组 Sr/Ca 比值 3.96 ± 0.89 差异不显著($P>0.05$)。显著增高阶段,即锶标记的 Sr/Ca 比值为 6.61 ± 0.86 ,与标记前和对照组 Sr/Ca 比值差异均显著($P<0.05$) (表 3)。

2.2 不同浓度组牙鲆耳石上锶元素的面分布

对 0.5 mg/L、2 mg/L、8 mg/L、32 mg/L 浓度组及对照组锶元素在耳石上沉积的面分布进行上

机分析。标记后 10 d、50 d、90 d 的对照组、0.5 mg/L 和 2 mg/L 浓度组耳石上均未出现锶标记环(图 3)。8 mg/L 浓度组标记后 10 d、50 d、90 d 的样本中各有 2 个样本出现红色“高锶标记环”,说明 8 mg/L 浓度 SrCl₂·6H₂O 可对牙鲆耳石进行锶标记。32 mg/L 浓度组标记后 10 d、50 d、90 d 的样本均出现红色“高锶标记环”,标记效果良好。进一步比较发现,随浓度升高,红色“高锶标记环”由浅变深,锶标记效果明显增强。8 mg/L、32 mg/L 组标记后 50 d、90 d 较其标记后 10 d 的

表 3 牙鲈标记耳石 Sr/Ca 微化学变化
Tab. 3 Changes of Sr/Ca ratio in the marked
otoliths of *Paralichthys olivaceus*

n=60; $\bar{x}\pm\text{SD}$

浓度/(mg/L) concentration	阶段 stage		
	I	II	III
对照组 control group	3.96±0.89 ^a	—	—
32	4.49±0.71 ^a	6.61±0.86 ^b	8.86±1.52 ^c

注: I 为 Sr/Ca 比值平稳阶段; II 为 Sr/Ca 显著变化阶段; III 为 Sr/Ca 极大值; 不同字母均表示差异显著($P<0.05$).
Note: I denotes stationary stage; II denotes stages of Sr/Ca ratio significantly changed in otoliths; III denotes peak value of Sr/Ca ratio. Values with different letters are significantly different ($P<0.05$).

锶标记变细、模糊(图 4)。
本研究发现, 8 mg/L 浓度组标记后 10 d 的耳石样本边缘四周仍为红色(BDHFw-11), 耳石 Sr/Ca 比值未恢复至正常水平, 外源锶在耳石上的沉积仍在继续。32 mg/L 浓度组标记后 10 d 的耳石样本已形成完整的红色标记环, 耳石 Sr/Ca

比值恢复至正常水平, 外源锶在耳石上的沉积刚刚结束。说明外源锶在耳石上沉积具有延迟性。

2.3 不同浓度组牙鲈生长与死亡比较

对标记后 90 d 各浓度组实验鱼全长、体重进行测量, 全长、体重均为 2 mg/L 浓度组最大, 分别为 13.18 cm、18.72 g; 0.5 mg/L 浓度组的全长、体重最小, 分别为 12.48 cm、16.30 g (图 5, 图 6)。经单因素方差分析, Duncan 多重比较结果显示, 各浓度组全长和体重均与对照组无显著性差异($P>0.05$)。在浸泡标记期间, 各浓度组和对对照组均发生不同数量的死亡现象, 但各组死亡率均较低, 其中死亡率最高为 8 mg/L 浓度组, 为 4.5%, 0.5 mg/L 浓度组死亡率最低, 为 1.5% (图 7)。经 χ^2 检验, χ^2 值为 4.44, $P>0.05$, 各浓度组在标记期间的死亡率差异不显著, 标记期间不同浓度的 $\text{SrCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对牙鲈幼鱼死亡率无显著影响。标记后养殖 90 d, 各浓度组累积死亡率为 7.37%~9.33%, 其中对照组

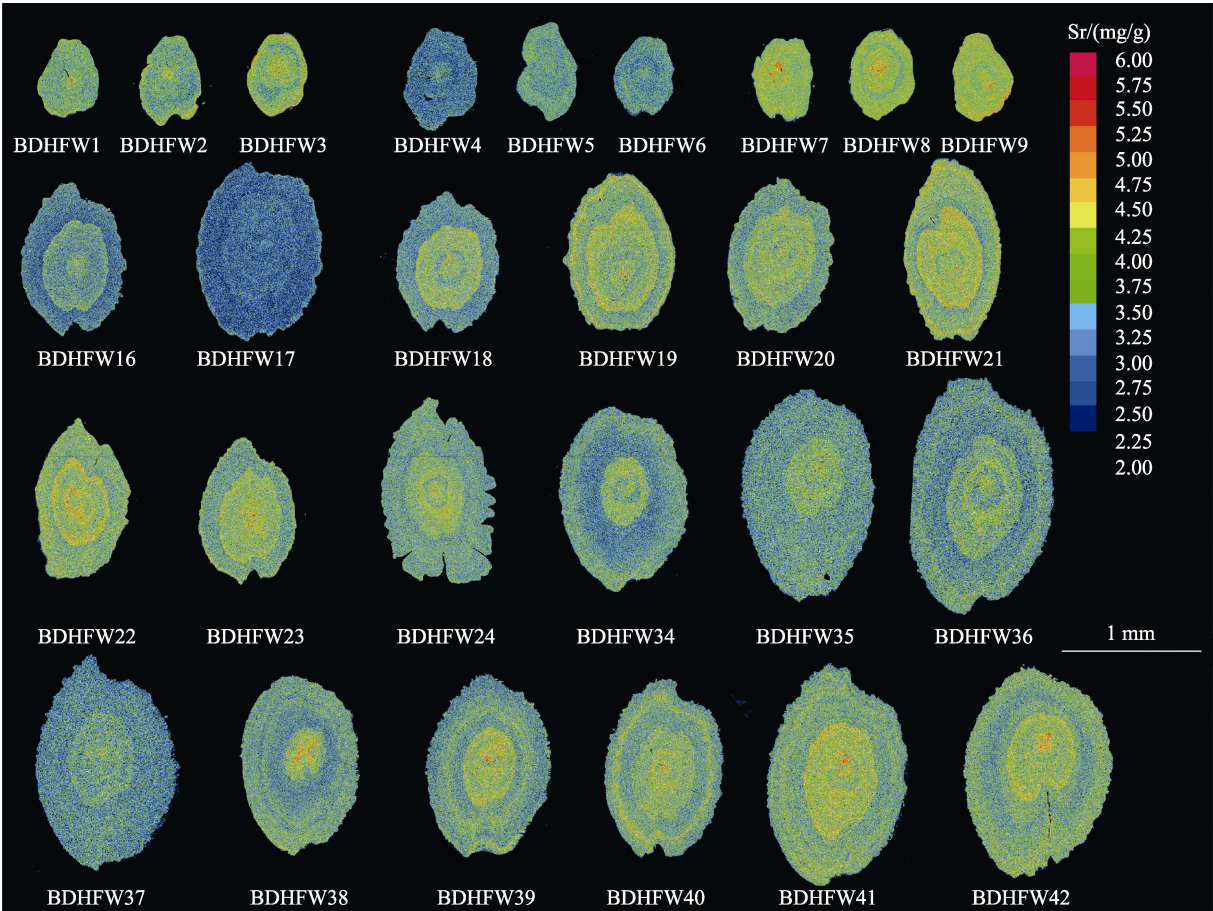


图 3 0~2 mg/L $\text{SrCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浸浴组牙鲈耳石面分析
Fig. 3 Sr concentrations of mapping analysis in otoliths of *Paralichthys olivaceus* otoliths in 0~2 mg/L $\text{SrCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$

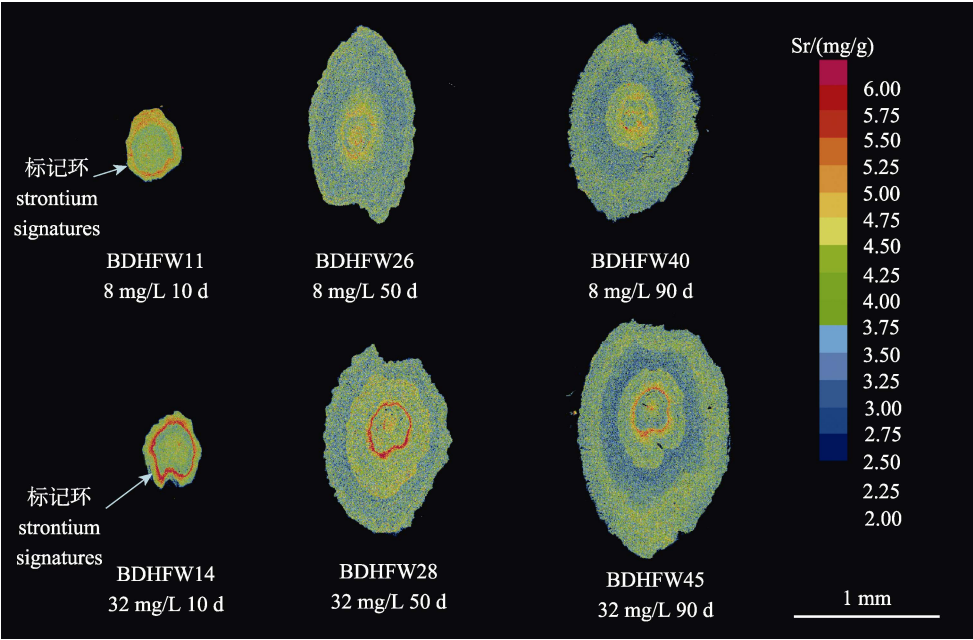


图 4 8–32 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浸浴组牙鲆锶标记耳石面分析

Fig. 4 Sr concentrations of mapping analysis in the marked otoliths of *Paralichthys olivaceus* in 8–32 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

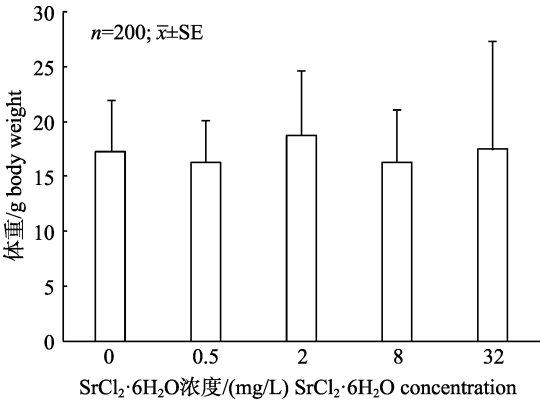


图 5 标记后 90 d 各浓度组牙鲆的体重
Fig. 5 The body weight of *Paralichthys olivaceus* at 90 days after marking

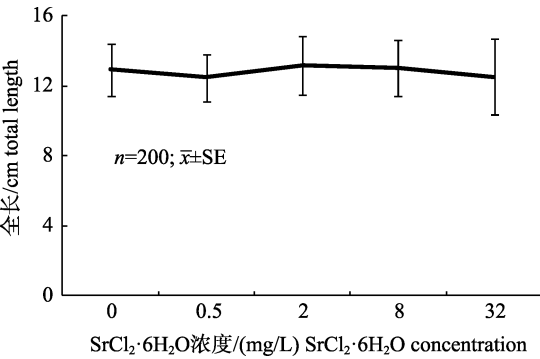


图 6 标记后 90 d 各浓度组牙鲆的全长
Fig. 6 The total length of *Paralichthys olivaceus* at 90 days after marking

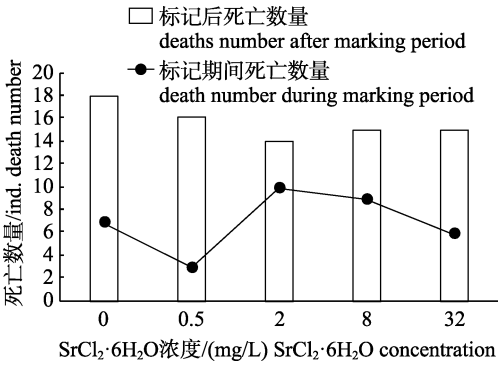


图 7 标记期间和标记后各浓度组牙鲆的死亡数量
Fig. 7 The death number of *Paralichthys olivaceus* during marking period and after marking period

死亡率最高, 2 mg/L 浓度组最低。经 χ^2 检验, χ^2 值为 0.49, $P>0.05$, 即标记后养殖 90 d, 各浓度组的累积死亡率无显著性差异。因此, 0.5~32 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对牙鲆幼鱼生长、死亡率无显著影响, 32 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对牙鲆幼鱼进行耳石锶标记是安全的。

3 讨论

3.1 耳石锶标记的可行性和稳定性

本研究发现通过外源添加 8 mg/L 及以上 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 可对牙鲆耳石进行锶标记, 其中, 8 mg/L 浓度组指纹标记 Sr/Ca 比值是标记前 Sr/Ca

比值的 1.40 倍, 32 mg/L 浓度组指纹标记是标记前的 1.53 倍。随添加 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度增加, 锶标记的 Sr/Ca 比值逐渐增高, 标记效果显著增加。因此, 人为改变养殖环境中 Sr^{2+} 浓度, 对牙鲆耳石进行锶标记是可行的。同时, 人工耳石锶标记在其他海水鱼, 如大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)等得到验证^[22-23], 因此人为改变生境中的 Sr^{2+} 浓度对海水鱼类进行耳石锶标记是可行的。此外, 本研究发现在锶盐中浸泡 72 h 便可形成良好的牙鲆耳石锶标记, 说明尽管自然海水中锶含量较高, 但海水鱼类经过短时间的锶盐浸泡也可形成良好耳石锶标记, 从而大大缩短了海水鱼类耳石锶标记时间, 提高了耳石锶标记效率, 为耳石锶标记应用推广奠定了良好基础。

本研究分别采集标记标记后 10 d、50 d、90 d 的耳石样本进行比较, 分析耳石锶标记稳定性。面分布分析发现, 从 8 mg/L 浓度组开始, 标记后 10 d、50 d、90 d 可检测到锶标记。由于耳石逐渐变大, 面分析检测比例尺变小, 锶标记变细、模糊。但通过定量线分析发现标记后 10 d、50 d、90 d 耳石锶标记明显(图 2), Sr/Ca 比值峰区均值为正常均值的倍数相对稳定, 且不随时间延长而变化, 说明耳石锶标记稳定性强(表 2, 表 3)。该结果在其他鱼类也得到证明, Schroder 等^[24]研究表明红大麻哈鱼(*Oncorhynchus nerka*)耳石锶标记 21 个月后标记仍清晰可见, 王臣等^[15]报道大麻哈鱼耳石锶标记后 100 d 检测, 标记鱼 Sr/Ca 比值是对照组水平的 35.1 倍以上。

3.2 牙鲆耳石锶标记浓度及恢复时间

牙鲆幼鱼从 8 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的海水中浸染 72 h, 可形成耳石锶标记。随 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度增加, 耳石锶元素指纹标记 Sr/Ca 比值波峰逐渐增高, 红色“高锶环带”由浅变深, 说明耳石中的 Sr/Ca 比值与水体中的 Sr/Ca 比值呈正相关关系, 与已报道的尖吻鲈(*Lates calcarifer*)、鳙等河口及淡水鱼结果相同^[16, 25]。进一步分析发现, 8 mg/L 浓度组虽然有样本出现红色高锶标记环(图 4), 但也有样本未出现标记环。32 mg/L 浓度 Sr/Ca 值波峰明显稳定, 红色高锶环稳定清晰, 标记率 100%。

8 mg/L 浓度组标记后恢复 10 d 耳石样本中锶标记沉积未结束, 32 mg/L 浓度组标记后恢复 10 d 的锶标记沉积刚结束。说明锶元素从水环境通过鳃、肠、表皮、血液、内耳上皮、内淋巴的复杂路径沉积在耳石上^[26], 具有延迟性。耳石锶标记在浸泡氯化锶后不能立刻检测, 需恢复 ≥ 10 d 才能检测到完整的锶标记。但高浓度外源锶浸泡的耳石 Sr/Ca 比值恢复时间较低浓度快的原因有待进一步研究。大麻哈鱼标记后耳石 Sr/Ca 比值恢复时间为 12 d 以上^[15], 鳙在标记 28 d 后检测到不完整“高锶环带”^[16], 也说明了耳石富集外源锶具有延迟性。因此, 在进行耳石锶标记、多锶环标记及检测、多元素标记等耳石元素标记研究时应考虑标记恢复时间影响。

3.3 耳石锶标记的安全性

本研究表明各浓度组 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 牙鲆死亡率差异不显著($P>0.05$), 牙鲆均正常摄食, 生长与对照组差异不显著($P>0.05$), 未产生明显的应激反应。说明短时间浸泡 0.5~32 mg/L 浓度 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对牙鲆幼鱼是安全的, 与王臣等^[15]和李秀启等^[16]报道的外源 Sr 浓度对大麻哈鱼、鳙的幼鱼未产生任何影响结果一致。宋洪建等^[27]研究发现高浓度的锶对大麻哈鱼稚鱼的生长和存活率及肌肉中 Ca^{2+} -ATP 酶和 Na^+/K^+ -ATP 酶的活性有显著影响。因此, 在一定范围内, 外源锶对鱼苗不产生影响, 安全性高, 而超过一定范围可能对机体造成不良影响。

以上研究结果表明, 人为在牙鲆生存水环境中添加 8 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 牙鲆耳石开始形成锶标记, 32 mg/L 浓度耳石标记稳定、效果良好, 为各浓度中最佳标记浓度。上述牙鲆耳石锶标记结果将有助于改变中国小规格牙鲆大规模标记放流方法匮乏的现状, 为牙鲆增殖放流效果评估提供一种重要的评价手段。然而, 耳石锶标记研究刚刚起步, 标记方法简单, 但后期检测成本较高, 建议今后加强此方面研究工作, 结合其他标记方法, 降低检测成本, 达到分地域、分厂家、分年限大规模标记放流鱼的目的, 为有效评估牙鲆增殖放流效果提供科学依据。

参考文献:

- [1] Liu H J, Hou J L, Liu Y. Gynogenesis in Japanese flounder: A review[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(4): 902-912. [刘海金, 侯吉伦, 刘奕. 牙鲆雌核发育研究进展[J]. 中国水产科学, 2017, 24(4): 902-912.]
- [2] Lei J L. Marine Fish Culture Theory and Techniques[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 482. [雷霖. 海水鱼类养殖理论与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 482.]
- [3] Liu Q. Japanese flounder marking techniques and juveniles released for stock enhancement[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009. [刘奇. 褐牙鲆标记技术与增殖放流试验研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.]
- [4] Liu Z L, Xu Y J, Liu X Z, et al. Tagging of Japanese flounder using T-bar tags[J]. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(6): 80-86. [刘芝亮, 徐永江, 柳学周, 等. T型标志牌标记牙鲆苗种[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 80-86.]
- [5] Tong A P, Si F, Liu H J, et al. Application of mtDNA and microsatellite markers to distinguish the released or non-released Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(4): 630-637. [童爱萍, 司飞, 刘海金, 等. mtDNA和微卫星标记在放流牙鲆和非放流牙鲆鉴定中的应用[J]. 中国水产科学, 2015, 22(4): 630-637.]
- [6] Xu Y J, Liu X Z, Zhang K, et al. Tagging juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) with coded wire tags[J]. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(1): 168-174. [徐永江, 柳学周, 张凯, 等. 编码金属标签对牙鲆苗种标记的效果[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 168-174.]
- [7] Gao Y H, Li Z, Qiao L, et al. Raman and FTIR characteristics of otolith of ornamental carp[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(10): 2689-2693. [高永华, 李卓, 乔莉, 等. 鲤鱼耳石的拉曼及红外光谱特征研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(10): 2689-2693.]
- [8] Wang Y K, Huang J S, Dai F Q, et al. Insights into population structure of juvenile small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) in the Yellow Sea and the Bohai Sea from otolith elemental fingerprints[J]. Haiyang Xuebao, 2016, 38(6): 32-40. [王玉堃, 黄建生, 戴芳群, 等. 黄、渤海小黄鱼耳石元素指纹分析及其在种群补充群体识别中的应用[J]. 海洋学报, 2016, 38(6): 32-40.]
- [9] Xiong Y, Liu H B, Tang J H, et al. Application of otolith microchemistry on reconstruction of migratory patterns and stock discrimination in marine fishes[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2015, 27(7): 953-959. [熊瑛, 刘洪波, 汤建华, 等. 耳石微化学在海洋鱼类洄游类型和种群识别研究中的应用[J]. 生命科学, 2015, 27(7): 953-959.]
- [10] Fu Z D, Xie T M, Song Z B. Studies on elemental fingerprints in otolith of fish[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2007, 13(2): 278-283. [付自东, 谢天明, 宋昭彬. 鱼类耳石元素指纹研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(2): 278-283.]
- [11] Dou S Z, Yokouchi K, Yu X, et al. Reconstructing migratory history of fish using otolith strontium: calcium ratios by EPMA: a case study[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2011, 42(4): 512-520. [窦硕增, 横内一树, 于鑫, 等. 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[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(4): 512-520.]
- [12] Chen T T, Jiang T, Lu M J, et al. Microchemistry analysis of otoliths of *Coilia nasus* and *Coilia brachygnathus* from the Jingjiang section of the Yangtze River[J]. Journal of Lake Sciences, 2016, 28(1): 149-155. [陈婷婷, 姜涛, 卢明杰, 等. 基于耳石微化学的长江靖江段长颌鲢与短颌鲢生境履历重建[J]. 湖泊科学, 2016, 28(1): 149-155.]
- [13] Li M M, Jiang T, Khumbanyiwa D D, et al. Reconstruction habitat history of *Coilia Nasus* from the Hexian section of the Yangtze river in Anhui province by otolith microchemistry[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(5): 1054-1061. [李孟孟, 姜涛, Khumbanyiwa D D, 等. 基于耳石微化学的长江安徽和县江段刀鲢生境履历重建[J]. 水生生物学报, 2017, 41(5): 1054-1061.]
- [14] Phillis C C, Ostrach D J, Ingram O B, et al. Evaluating otolith Sr/Ca as a tool for reconstructing estuarine habitat use[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2011, 68: 360-373.
- [15] Wang C, Liu W, Zhan P R, et al. Exogenous Sr^{2+} sedimentation on otolith of chum salmon embryos[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2015, 26(10): 3189-3194. [王臣, 刘伟, 战培荣, 等. 外源 Sr^{2+} 在大麻哈鱼胚胎耳石上的沉积[J]. 应用生态学报, 2015, 26(10): 3189-3194.]
- [16] Li X Q, Cong X R, Shi J H, et al. Feasibility analysis of releasing individuals of *Aristichthys nobilis* identification based on otolith Sr markers[J]. Journal of Lake Sciences, 2017, 29(4): 914-922. [李秀启, 丛旭日, 师吉华, 等. 耳石锶标记在识别鳊(*Aristichthys nobilis*)放流个体的可行性[J]. 湖泊科学, 2017, 29(4): 914-922.]
- [17] Wickström H, Sjöberg N B. Traceability of stocked eels - the Swedish approach[J]. Ecology of Freshwater Fish, 2014, 23: 33-39.
- [18] Kullmann B, Hempel M, Thiel R. Chemical marking of

- European glass eels *Anguilla anguilla* with alizarin red S and in combination with strontium: in situ evaluation of short-term salinity effects on survival and efficient mass-marking[J]. *Journal of Fish Biology*, 2018, 92: 203-213.
- [19] Brown R J, Severin K P. Otolith chemistry analyses indicate that water Sr:Ca is the primary factor influencing otolith Sr:Ca for freshwater and diadromous fish but not for marine fish[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2009, 66: 1790-1808.
- [20] Li M M, Jiang T, Chen T T, et al. Otolith microchemistry of the estuarine tapertail anchovy *coilia nasus* from the Anqing section of the Yangtze River and its significance for migration ecology[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(8): 2788-2795. [李孟孟, 姜涛, 陈婷婷, 等. 长江安庆江段刀鲚耳石微化学及洄游生态学意义[J]. *生态学报*, 2017, 37(8): 2788-2795.]
- [21] Yang J, Liu H B. Otolith microchemistry of grey mullet *Mugil cephalus* from Chongming water in the Yangtze River estuary, China[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(4): 853-858. [杨健, 刘洪波. 长江口崇明水域鲻鱼耳石元素微化学分析[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(4): 853-858.]
- [22] Zhang H, Jiang Y Z, Yuan X W, et al. Strontium marking on otolith of *Larimichthys crocea*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(6): 1270-1277. [张辉, 姜亚洲, 袁兴伟, 等. 大黄鱼耳石锶标志技术[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(6): 1270-1277.]
- [23] Zhang Y, Jiang Y Z, Xu K D, et al. Evaluation on effectiveness of marking juvenile *Sparus macrocephalus* otoliths with strontium[J]. *Marine Fisheries*, 2018, 40(2): 171-178. [张翼, 姜亚洲, 徐开达, 等. 锶元素对黑鲷幼鱼耳石的标记效果分析[J]. *海洋渔业*, 2018, 40(2): 171-178.]
- [24] Schroder S L, Knudsen C M, Volk E C. Marking salmon fry with strontium chloride solutions[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1995, 52(6): 1141-1149.
- [25] Milton D A, Chenery S R. Sources and uptake of trace metals in otoliths of juvenile barramundi (*Lates calcarifer*)[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2001, 264: 47-65.
- [26] Cabrera W E, Schrooten I, De Broe M E, et al. Strontium and bone[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1999, 14(5): 661-668.
- [27] Song H J, Liu W, Wang J L, et al. Effects of strontium ion on growth and ATPase activity in muscle of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) juveniles[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2013, 26(4): 23-28. [宋洪建, 刘伟, 王继隆, 等. 锶对大麻哈鱼稚鱼生长发育及肌肉 ATP 酶活性的影响[J]. *水产学杂志*, 2013, 26(4): 23-28.]

Strontium marking on otoliths of *Paralichthys olivaceus* based on immersion experiments

SI Fei¹, REN Jiangong¹, WANG Qinglin^{1,2}, SUN Zhaohui¹, LIU Hongbo³, JIANG Tao³, YANG Jian³, WANG Jun^{4,5}

1. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China;

2. Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066600, China;

3. Freshwater Fisheries Research Center of Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

4. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

5. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200, China

Abstract: To explore the method of microchemistry marking on the otolith of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, during the process of proliferation and release, the juveniles with a total length of (1.56 ± 0.16) cm were immersed at four different concentrations (0.5, 2, 8, and 32 mg/L) of $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ for 72 h to detect the Sr sedimentation effect. During the immersion period, half of the water was exchanged by fresh seawater daily, and $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ were added to maintain constant concentration for each group. The exogenous Sr sedimentation in otoliths was detected by X-ray electron probe microanalyzer (EPMA). Results of line transect analysis showed that the strontium marking on otoliths could not be formed after the immersion of two concentrations (0.5 mg/L and 2 mg/L). The Sr high area appeared in the 8 mg/L concentration group with a 5.49–8.49 peak value, and the mean value of the Sr/Ca ($\text{Sr} : \text{Ca} \times 1000$) ratio was 4.50–6.60. Furthermore, in the 32 mg/L group, the mean value of the Sr/Ca ratio was 6.61 ± 0.86 , and the peak value of Sr was 5.62–11.04. This means that otoliths of *Paralichthys olivaceus* can be marked with strontium by the method of $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ immersion. However, in the 8 mg/L concentration group there were also unlabeled samples. and the mean value of Sr/Ca was lower than that of the 32 mg/L group. In the 32 mg/L group, the strontium marking rate was 100%, and the mean value of the Sr/Ca ratio was 6.61 ± 0.86 , which was significantly different ($P < 0.05$) compared with that of the control group. The EPMA mapping analysis showed that the red “high strontium marking ring” in the otolith appeared in the 8 mg/L group and 32 mg/L group, and the color of the “high strontium marking ring” was deepened with increasing of concentration. One-way analysis results showed that the total length and weight was not significantly different between the experimental groups and the control group ($P > 0.05$), which means that the $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ immersion did not affect the growth of young fish. A Chi-square test ($P > 0.05$) showed there were no significant differences in mortality rate among the different concentration groups. Overall, 32 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ was the best marker concentration.

Key words: strontium marking; *Paralichthys olivaceus*; otolith; $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Corresponding author: WANG Jun. E-mail: wangjun@ysfri.ac.cn