

DOI: 10.12264/JFSC2024-0092

草鱼仔鱼三类耳石锶标记特征及日轮形成时间验证

朱亚华¹, 姜涛², 陈修报², 刘洪波², 杨健^{1,2}

1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心渔业微化学实验室, 江苏 无锡 214081

摘要: 为了探究耳石锶标记技术应用于草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)增殖放流效果评价的可行性, 利用 80 mg/L 的六水氯化锶对约 9 日龄的草鱼仔鱼进行 2 d 浸泡标记。浸泡完成后, 在恢复饲养的过程中对鱼体进行定期取样, 利用 X 射线电子探针微区分析仪(EPMA)对前处理后的 3 类耳石样本进行面分布和线分析检测, 以探讨锶元素对草鱼仔鱼耳石的元素指纹标记效果, 同时根据耳石日轮计数来探究草鱼 3 类耳石第一日轮的确切形成时间及锶标记时滞。定量线分析结果表明 80 mg/L 的 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液浸泡标记 2 d 能够在草鱼仔鱼耳石上形成锶标记峰值。微耳石和矢耳石的锶标记峰值大于星耳石, 随着恢复饲养时间的增加, 锶标记高峰会逐渐下降至正常水平。在 3 类耳石 Sr 值或 Sr/Ca 比值未出现上升的阶段, 微耳石和矢耳石的 Sr 值和 Sr/Ca 比值检测值也均大于星耳石。面分布检测结果与线分析保持一致, 3 类耳石标记区域显示出明显的红色, 未标记的低锶耳石区域显示为蓝色。此外, 本研究通过对锶标记特征及耳石的生长日轮数进行比较分析, 发现草鱼仔鱼的 3 类耳石中, 星耳石的形成时间晚于微耳石和矢耳石, 在草鱼仔鱼孵化第 12 天时才形成第 1 日轮, 而微耳石和矢耳石的第 1 日轮形成于草鱼仔鱼孵化后第 2 天。微耳石和矢耳石锶标记开始形成与浸泡开始, 及锶标记消失与浸泡结束分别存在 1 d 的时间差, 在星耳石上观察到锶标记出现在耳石核心处, 锶标记信号的消失与浸泡结束存在 1 d 的时间差。从实验鱼存活及行为来看, 本研究设计的 Sr 剂量范围在对照组和实验组之间不存在显著性差异($P>0.05$)。考虑到由于不同耳石对锶元素的吸收程度造成的标记检测效果, 和耳石自身形态结构差异及取样的难易程度, 推荐微耳石可作为观测草鱼仔鱼 Sr 标记最适合的耳石样本, 本研究结果可为草鱼及其他鲤科鱼类的增殖放流标记检测提供理论依据及技术支撑。

关键词: 草鱼; 仔鱼; 六水氯化锶; 耳石; 日轮; 标记

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)06-0640-12

生物矿物化学经常被用于鱼类产卵场的鉴别和生活史事件的推断等^[1], 而生物矿物质主要由钙基衍生物组成, 如耳石中的碳酸钙和鳞片、鳍条、骨骼中的磷酸钙等^[1], 因此, 准确来说, 是硬组织微化学为不同种群地理分布的区分和推断单个鱼类的环境历史提供了强大工具^[2]。近些年来, 随着大型水利设施的修建、过度捕捞、生境破坏等, 野外水体的自然资源量不断锐减, 为了满足人民群众对鱼类等水产品资源的食用需求、对休闲渔业资源的娱乐需求, 各级政府开始实施一系

列的保护政策, 其中最主要的政策是利用人工繁殖的苗种来进行增殖放流, 即向天然水体中投放人工孵化的鱼、虾、蟹、贝类等来增加野外水产品的数量^[3]。然而, 为了对人工孵化的种群和野外群体进行有效区分, 对种群增强型渔业效果进行持续监测, 需要一种可靠和持久的方法来标记放养鱼类。而在标记放流中, 较小的个体的存活率会对渔业资源的动态变化产生重大影响, 因此许多标记技术已被开发并应用于小型鱼类, 以便确定此类计划是否成功^[4]。

收稿日期: 2024-03-28; 修订日期: 2024-05-07.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF0608203); 江苏省研究生科研创新计划项目(KYCX22_0706).

作者简介: 朱亚华(1995-), 女, 博士研究生, 研究方向为渔业生态环境保护. E-mail: 2020213001@stu.njau.edu.cn

通信作者: 杨健, 男, 研究员, 研究方向为渔业微化学. E-mail: jiany@ffrc.cn

目前能够应用于小型鱼类鉴定的标记方法多种多样, 主要可区分为体外标记、体内标记和分子标记等。在增殖放流中, 近年来, 使用元素来标记或鉴定鱼类的来源受到了相当大的关注^[5-8]。锶(Sr)可能是耳石研究中最常用的微量元素, 因为它常被证明与水中的盐度呈正相关^[9-10], 耳石中的 Sr/Ca 比值测定已经在欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)^[11]、奇努克鲑(*Oncorhynchus tshawytscha*)^[12]、刀鲚(*Coilia nasus*)^[13]、毛鳞鱼(*Mallotus villosus*)^[14]、灰鲮(*Mugil cephalus*)^[15]、蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)^[16]等多种鱼类上得到了成功应用。

在耳石研究中, 耳石第一日轮的发现对鱼类资源量的评估以及研究都起到一定的基础作用。1899 年 Reibisch 在欧洲鳎(*Pleuronectes platessa*)上首次观察到了年轮^[17], 1971 年, Panella^[18]在银无须鳎(*Merluccius bilinearis*)上发现耳石的每日生长增量, 这些研究推动了对鱼类耳石微观结构进行解释成为鱼类生物研究的热点^[19]。所谓日轮就是指在鱼类耳石上, 由窄的间隙带和宽的生长带所构成的生长轮, 其沉积率是 1 轮/d, 直到现在耳石微观结构等基础内容仍是研究的重点。耳石存在于大多数硬骨鱼类的内耳的膜迷路内, 有矢耳石、微耳石、星耳石 3 种类型^[19], 大多数研究在以耳石为研究对象时, 都采取 3 类耳石中较大的一个^[20-21], 较少同时以 3 类耳石进行分析探讨。相关研究曾通过标记确定了耳石第一日轮的形成时间^[22-24], 大多也都是对同一种类型的耳石作为研究对象。一般认为, 鱼体耳石在鱼体开始孵化时便开始形成, 但也有部分文献描述称鱼体 3 类耳石形成时间不一致, 对于草鱼仔鱼 3 类耳石, 仍缺乏直接的证据阐明其 3 类耳石形成的具体时间。

草鱼是我国主要的经济鱼类, 作为大宗淡水鱼之一, 在水产养殖的实践中, 对草鱼个体放流后资源量的恢复如何进行有效评估等仍处于瓶颈阶段。同时, 考虑到目前国内外标记方法存在的影响标记鱼正常生活、死亡率高、人力物力花费多或标记易丢(消失)等“瓶颈”问题, 锶元素是否能够在草鱼仔鱼耳石上形成有效标记, 成功区分人工增殖放流种群和野外自然资源种群等问题仍需解决。在之前的研究中, 常剑波等^[25]曾报道草

鱼仔鱼的微耳石在出膜后第 2 天沉积第 1 个生长轮, 除此之外, 并未有研究对草鱼的 3 类耳石确切形成时间进行验证, 草鱼个体 3 类耳石的日轮形成特征等规律也仍需探索。因此本研究以浓度 80 mg/L 的六水氯化锶溶液对约 9 日龄的草鱼仔鱼进行 2 d 浸泡, 通过电子探针微区分析仪对其浸泡后养殖阶段 3 类耳石的微量元素含量进行比较分析, 探究六水氯化锶对草鱼仔鱼标记的可行性, 并结合 3 类耳石的标识标记环和日轮形成规律分析探索 3 类耳石的第一日轮形成时间及标记时滞特征。

1 材料与方法

1.1 实验准备

本实验在江苏省无锡市中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南区实验基地开展。实验所用草鱼仔鱼(图 1)由上述基地采购(3 日龄)。鱼苗采购之后放在装有经 48 h 曝气后自来水的玻璃缸(长×宽×高=100 cm×45 cm×50 cm)中暂养。暂养过程中投喂蛋黄水, 每日投喂两次, 每日清理鱼体排泄物及换水一次, 换水量占养殖水体的 1/4。在暂养期间养殖水体均正常充气增氧, 水温在 23~32 °C 之间, 自然光照, 不控光周期。

1.2 锶的浸泡标记

实验可分为两个阶段, 第一个阶段为浸泡标记阶段。使用 80 mg/L 的六水氯化锶对草鱼仔进

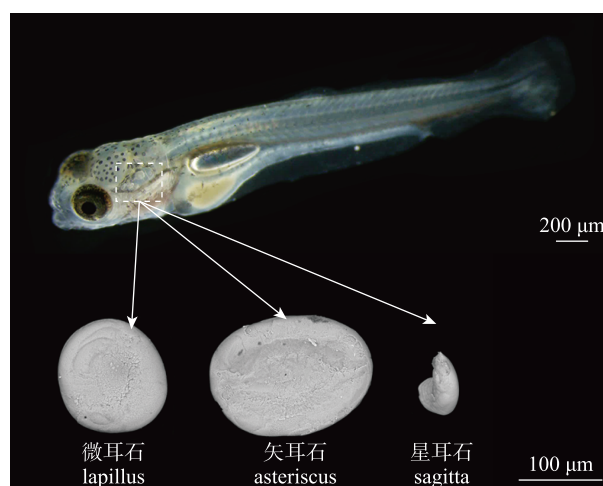


图 1 本实验中所用鱼体样本照及 3 类耳石以浸泡完成后恢复饲养第 5 天样本为例。

Fig. 1 Photograph of the fish and the three types of otoliths used in this experiment Based on the 5th day of post-immersion culture.

行 2 d 浸泡, 实验浓度参考邱晨等^[26]对鲤的六水氯化铈浸泡标记浓度, 同时设置对照组 0 mg/L。实验时随机选取规格基本一致[平均全长为 (8.94 ± 0.96) mm, 平均体重 (0.005 ± 0.001) g]的草鱼仔鱼, 对照组和实验组(分别设置 5 个重复)均置于实验专用标记玻璃缸(长 30 cm×宽 20 cm×高 30 cm)中。浸泡标记期间不喂食, 同时统计 12、24 h 对照组及标记组的个体急性死亡情况。第二个阶段为恢复饲养阶段。浸泡标记结束后, 将标记组和对照组实验鱼移出放至恢复饲养缸(长×宽×高=50 cm×50 cm×40 cm)中继续养殖。在恢复饲养期间前期继续投喂蛋黄水, 待草鱼达到 30 日龄后开始投喂粉状普通配合饲料, 每日投喂两次, 每日清理鱼体排泄物及换水一次, 换水量占养殖水体的 1/3。本研究中样本采集分为两个阶段, 在恢复饲养第 0~40 天的过程中, 标记组和对照组每隔 5 d 定期取样, 每次取样 5 尾。取至第 40 d 后, 每隔 10 d 取样 1 次, 同样是每次取样 5 尾, 直至取样到第 60 天结束。取样之后利用电子天平测量其体重, 电子游标卡尺测量其全长(数据分别精确至 0.001 g 和 0.01 mm)。第 0~20 天的样品保存在 100% 无水乙醇中, 放至 4 °C 冰箱中冷藏, 25~60 d 的样品直接放入自封袋中, 于 -20 °C 下冷冻。在恢复饲养期间统计标记组和对照组死亡数, 并及时移出死鱼。

1.3 耳石取样前处理

在解剖镜(NV10, Shanghai Precision Instruments Co., Ltd., Shanghai, China; Figure 1)下迅速取出鱼头部球状囊中的矢耳石(sagitta)、瓶状囊中的星耳石(asteriscus)、椭圆囊中的微耳石(lapillus), 在恢复饲养第 0 天的样品中, 仅对矢耳石和微耳石进行了分析。所有耳石样本首先用 Elga Purelab Water System (CLXXXDIM2, ELGA, High Wycombe, UK)超纯水冲洗, 99.7% 无水乙醇干燥。然后所有样本用环氧树脂(Epofix, Struers, 丹麦)进行包埋处理, 经 2000 目和 4000 目砂纸打磨至核心即将暴露, 再用自动化磨抛机(LaboPol-35, Struers, Denmark)配合抛光液(OP-S NonDry, Struers, Rødovre, Denmark)将其抛光至核心完全暴露且耳石表面无明显划痕。最后, 将样品放入超声波清洗机中清洗, 再用 Milli-Q 水冲洗, 完全干燥后,

用真空镀膜机(JEE-420, 日本电子株式会社, 日本东京)镀膜(36 A, 25 s)。利用 X 射线电子探针微区分析仪(EPMA, JXA-8100, 日本电子株式会社, 日本东京)对耳石进行元素线分析和面分布检测。线分析检测即测量了每个耳石样本的中轴线从核心到边缘的最长轴线上的 Sr 和 Ca 浓度, 加速电压和光束电流分别为 15 kV 和 2×10^{-8} A。由于耳石样本较小, 其中分析设定参数做了部分调整, 电子束聚焦在直径为 2 μ m 的点上, 测量间隔为 4 μ m。面分布检测的加速电压为 15 kV, 光束电流 5×10^{-7} A, 计数时间 30 mS, 像素尺寸 6×6 μ m, 电子束聚焦在直径为 5 μ m 的点上。使用从中国地质科学院购买的碳酸钙(CaCO_3)和钛酸铈(SrTiO_3)标准品验证测量质量。耳石样本照及日轮背散射电子图像(BSE)通过飞纳台式扫描电子显微镜(Pure-SED, Thermo Fisher Scientific, Eindhoven, The Netherlands)拍摄, 加速电压为 5 kV。

1.4 数据分析

本研究中线分布数据采用 Excel 2016 软件进行分析、作图。采用 SPSS 26.0 (Mann-Whitney U test)对相同恢复养殖时间下标记组与对照组的平均体重和平均全长进行差异显著性分析, 设定差异显著性水平 P 为 0.05, 当 $P < 0.05$ 时为差异显著, 当 $P > 0.05$ 时为差异不显著。由于耳石中的 Sr 含量远小于 Ca 含量, 所以按惯例 Sr/Ca 值指经过标准化的比值, 即统一用 $(\text{Sr}/\text{Ca}) \times 1000$ 的比值表示(简称 Sr/Ca 比值), 不同区域 Sr/Ca 比值用 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示。

2 结果与分析

2.1 在标记和恢复饲养期间草鱼仔鱼死亡率和生长情况

使用六水氯化铈对草鱼仔鱼进行 2 d 浸泡标记, 恢复饲养 60 d, 标记组和对照组在两个阶段均出现了不同的死亡情况。在浸泡标记期间, 标记组死亡 3 尾, 对照组死亡 2 尾; 在 60 d 的恢复养殖期间, 标记组死亡 6 尾, 对照组死亡 8 尾。同时随着恢复取样天数的增加, 对照组和标记组鱼的体重和全长整体上均呈现增长趋势(图 2)。在浸泡后恢复养殖过程中标记组和对照组平均体重和

平均全长之间均不存在显著性差异($P>0.05$)。

2.2 草鱼仔鱼 3 类标记耳石的线分布特征

以耳石中的 Sr 绝对含量对 3 类耳石的标记特

征进行分析(图 3), 可以看到在浸泡结束恢复养殖第 0 天取样时, 标记组的微耳石和矢耳石 Sr 含量均已出现了明显的上升趋势, 其中部分个体的 Sr

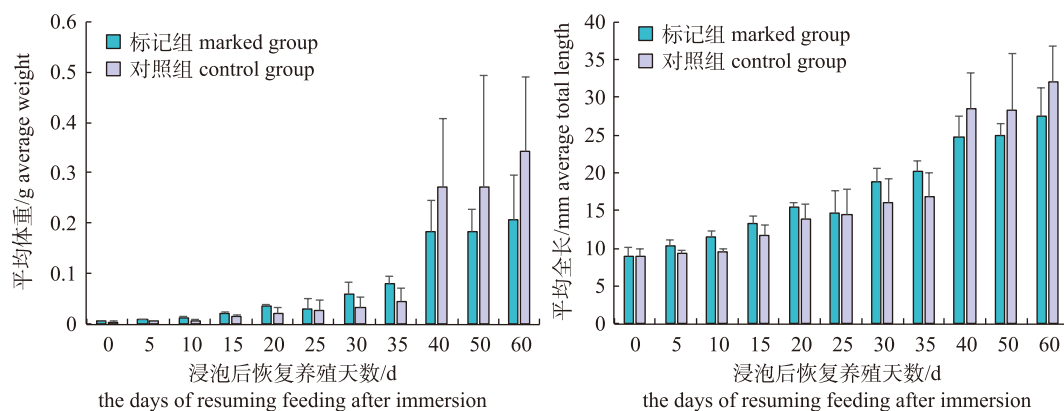


图 2 恢复饲养期间草鱼仔鱼平均体重和平均全长变化

Fig. 2 Changes in mean body weight and mean total length of larval grass carps during the days of resuming feeding after immersion

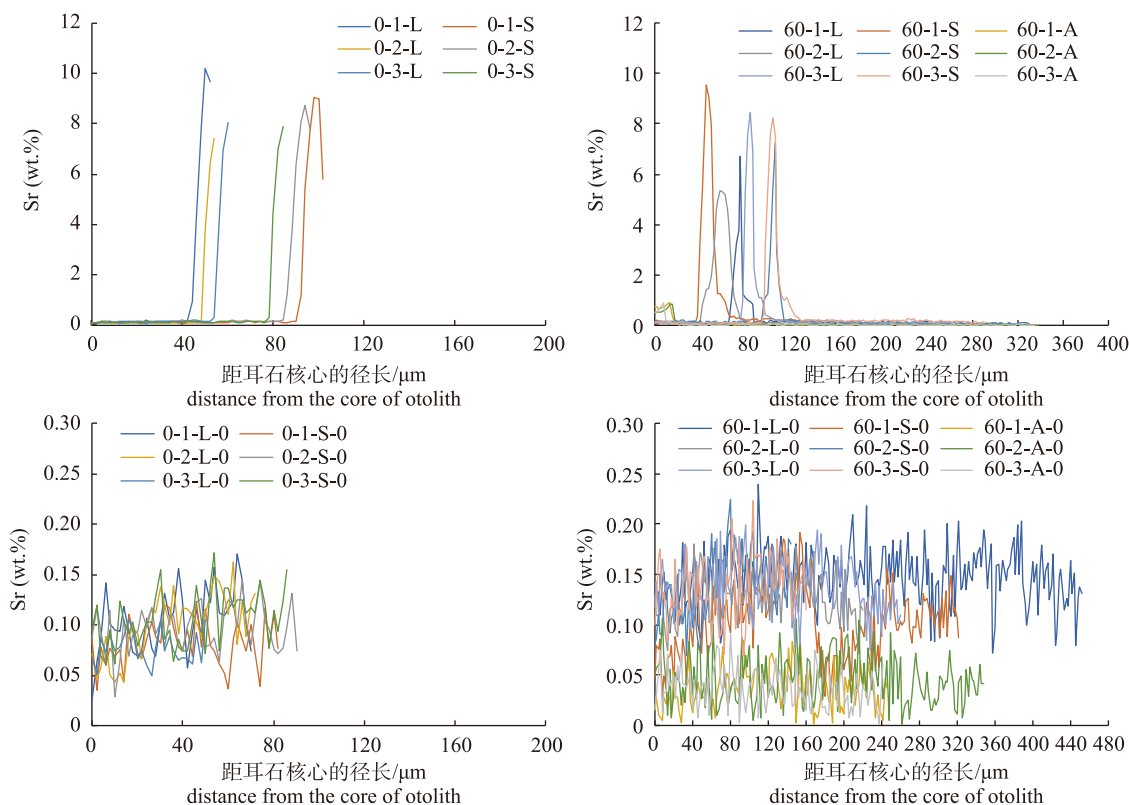


图 3 恢复饲养过程中标记组和对照组第 0 天及第 60 天草鱼仔鱼耳石的 Sr 绝对含量变化

在图中标注的样本名称中, 第一个数字 0、60 表示在浸泡标记完成后的第 0 和第 60 天对鱼进行耳石取样并进行分析;

第二个数字 1、2、3 代表用于检测的每尾鱼的顺序; 第三个字母, L 代表微耳石, S 代表矢耳石, A 代表星耳石。

最后一个数字 0 表示对照组。

Fig. 3 Changes in Sr content in otoliths of larval grass carp in marked and control groups at d 0 and d 60 during post-immersion culture

In the label for each line, the first numbers 0 and 60 indicate that the fish were sampled for otoliths and analyzed on days 0 and 60 after the immersion; the second numbers 1, 2, and 3 represent the order of each fish used in the experiment; and the third letters, "L" for lapillus, "S" for sagitta, and "A" for asteriscus. The last digit 0 means the control group.

绝对含量甚至在达到峰值后, 出现了一定的下降趋势。对照组矢耳石和微耳石的 Sr 含量则一直处于较稳定的状态。在浸泡结束恢复养殖第 60 天取样, 也就是本次实验中最后一次取样时, 标记组的矢耳石和微耳石均经历了一个完整的 Sr 绝对含量上升, 到达峰值, 而后下降到标记前水平的过程。星耳石与矢耳石、微耳石的 Sr 标记峰值出现位置不同, 其标记峰值在最开始核心处出现后, 逐渐下降到和对照组 Sr 含量相同的一个稳定状态。微耳石和矢耳石峰值时的 Sr 含量接近, 均远

远大于星耳石。同时在对照组中整个阶段中的矢耳石和微耳石的 Sr 含量也均大于星耳石。随后对标记组恢复养殖第 5 天至第 60 天的 3 类耳石 Sr 含量进行分析(图 4), 可以看到在恢复养殖第 5 天时, 3 类耳石的 Sr 含量均已经历了峰值, 基本下降到和标记前一样的水平。在第 10 天至第 50 天的整个恢复养殖过程中, 3 类耳石的 Sr 含量峰值未出现明显的波动, 在峰值下降后的恢复养殖过程中, Sr 含量与对照组相一致, 始终处于稳定的状态。

Sr/Ca 比值同样也能表明 80 mg/L 的六水氯化

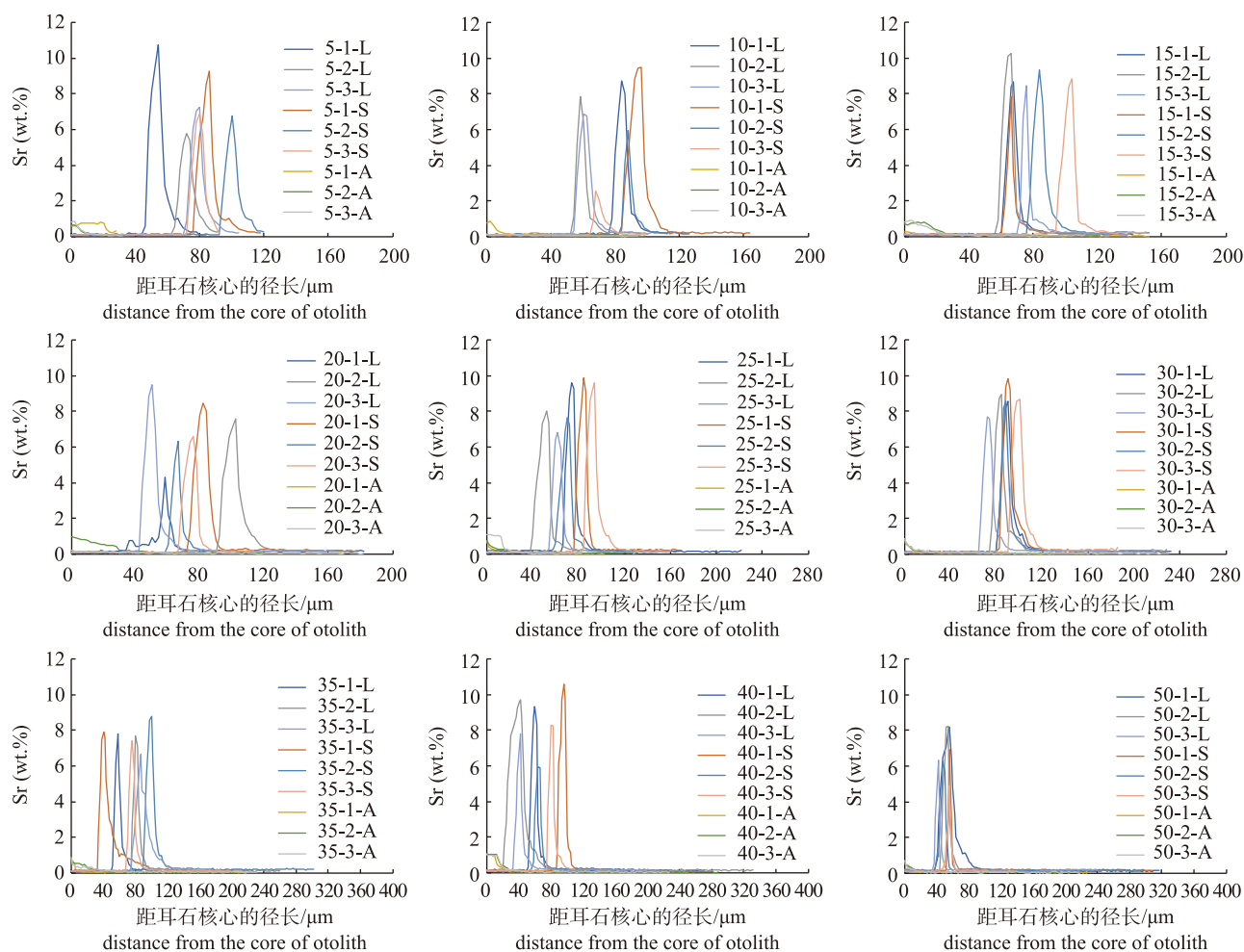


图 4 恢复饲养过程中标记组第 5、10、15、20、25、30、35、40、50 天草鱼仔鱼耳石的 Sr 绝对含量变化
在图中标注的样本名称中, 第一个数字 5、10、15、20、25、30、35、40、50 表示在浸泡标记完成后对鱼进行耳石取样并进行分析的具体天数; 第二个数字 1、2、3 代表用于检测的每尾鱼的顺序; 第三个字母, L 代表微耳石, S 代表矢耳石, A 代表星耳石。

Fig. 4 Changes in Sr content in otoliths of larval grass carp in marked and control groups at d 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 50 during post-immersion culture

In the label for each line, the first numbers 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 50 indicate that the fish were sampled for otoliths and analyzed on days 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 50 after the immersion; the second numbers 1, 2, and 3 represent the order of each fish used in the experiment; and the third letters, "L" for lapillus, "S" for sagitta, and "A" for asteriscus.

锶溶液对草鱼仔鱼进行 2 d 浸泡, 能够在 3 类耳石上形成标记信号(图 5), 对照组 Sr/Ca 比值水平无明显变化。在恢复养殖第 0 天时, 锶标记峰值正处于一个上升阶段, 部分个体已达到峰值且开始下降。在恢复养殖第 60 天时, 对草鱼仔鱼 3 类耳石的 Sr/Ca 比值峰值进行比较, 发现矢耳石和微耳石的锶标记峰值要远远高于星耳石, 星耳石的锶标记峰值较低, 矢耳石和微耳石锶标记峰值接近。此外, 星耳石的锶标记峰值出现在线分布检测的核心处, 矢耳石和微耳石的 Sr/Ca 比值在出现峰值前存在一段稳定阶段, 随后 Sr/Ca 比值开始升高, 达到最大值后, 又逐渐下降至稳定阶段。在对照组中, Sr/Ca 比值始终处于稳定状态的矢耳石、微耳石的 Sr/Ca 比值也远远大于星耳石。

在对标记组恢复养殖第 5 天至第 50 天的耳石 Sr/Ca 比值进行观察时(图 6), 与 Sr 含量观测结果一致。第 5 天时, Sr/Ca 比值峰值已经下降, 且基本达到标记前水平。一直到第 60 天取样的恢复养殖过程中, 耳石的 Sr/Ca 比值变化过程均与第 5 天相似, 且 Sr/Ca 比值也未出现明显的波动。

2.3 草鱼仔鱼三类耳石的面分布特征

草鱼仔鱼耳石上 Sr/Ca 比值面分布与线分布特征所呈现的结果基本一致(图 7)。浸泡结束后恢复养殖 40 d 时, 在耳石面分布图上可直观观察到在标记组的矢耳石和微耳石上中央区域都有一个低 Sr 的蓝色阶段, 随后产生了高 Sr 的红色标记阶段。但是在星耳石上, 红色的“Sr 标记区”出现在核心处, 这与星耳石在一开始出现的 Sr 含量或者

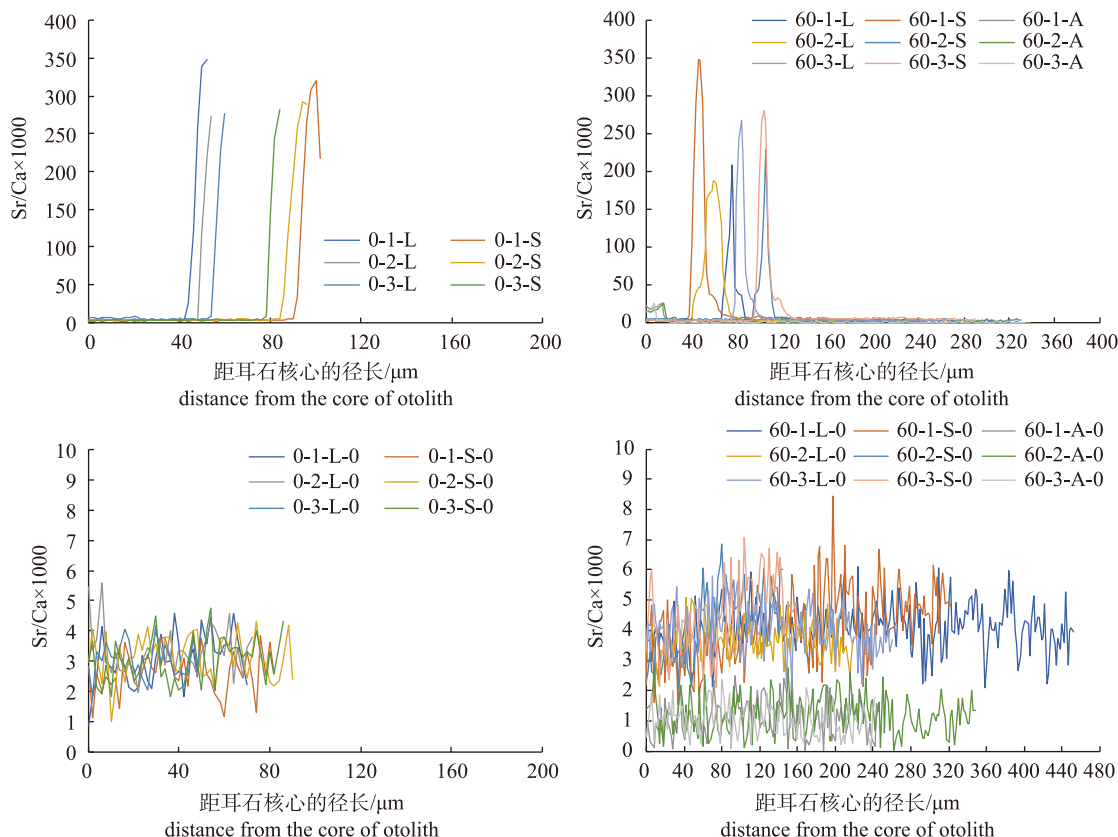


图 5 恢复饲养过程中标记组和对照组第 0 天及第 60 天草鱼仔鱼耳石的 Sr/Ca 比值特征

在图中标注的样本名称中, 第一个数字 0、60 表示在浸泡标记完成后的第 0 和第 60 天对鱼进行耳石取样并进行分析; 第二个数字 1、2、3 代表用于检测的每尾鱼的顺序; 第三个字母, L 代表微耳石, S 代表矢耳石, A 代表星耳石。最后一个数字 0 表示对照组。

Fig. 5 Characteristics of Sr/Ca ratio in otoliths of marked and control group of larval grass carp at d 0 and d 60 during post-immersion culture

In the label for each line, the first numbers 0 and 60 indicate that the fish were sampled for otoliths and analyzed on days 0 and 60 after the immersion; the second numbers 1, 2, and 3 represent the order of each fish used in the experiment; and the third letters, “L” for lapillus, “S” for sagitta, and “A” for asteriscus. The last digit “0” means the control group.

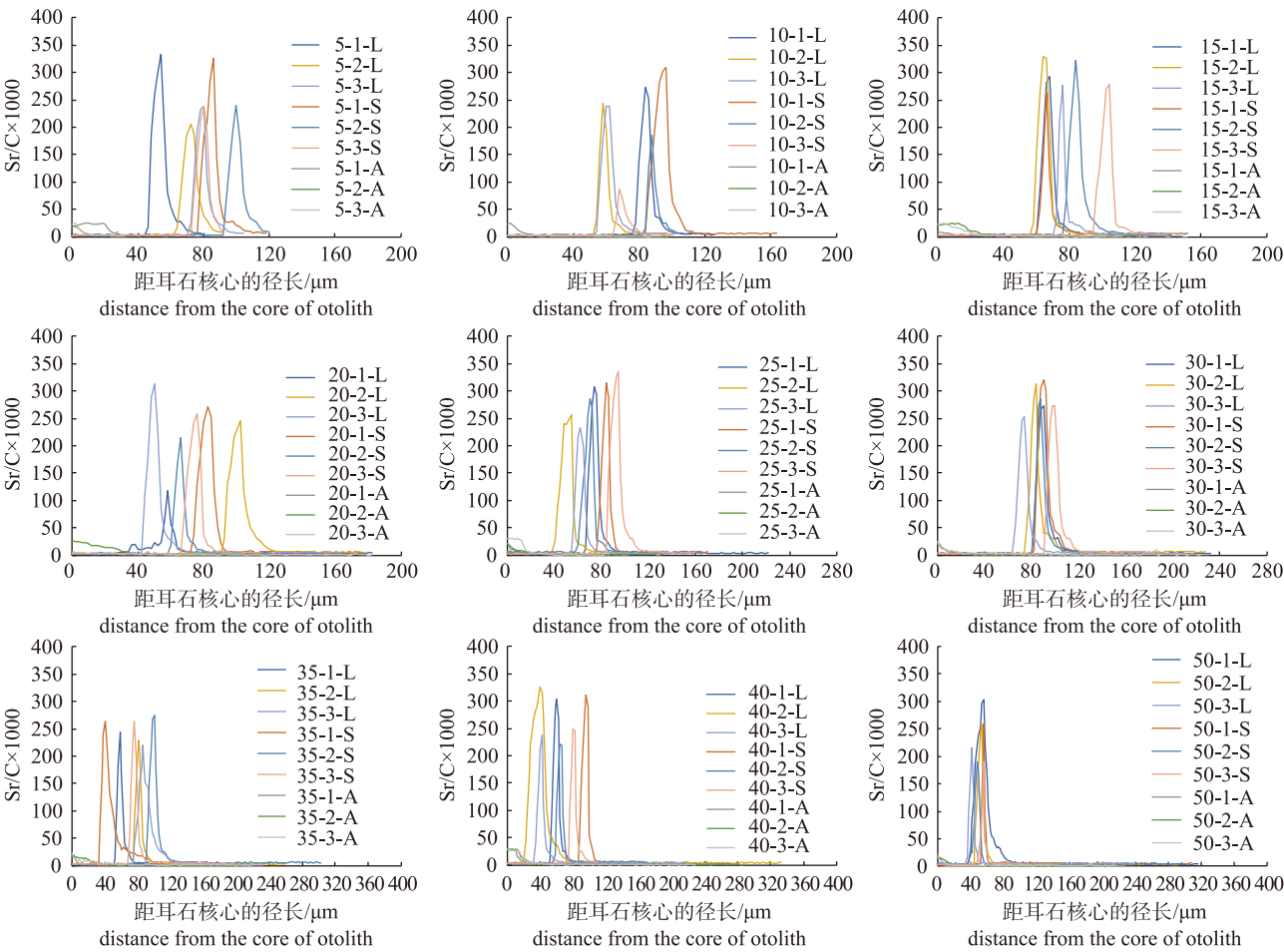


图 6 恢复饲养过程中标记组第 5、10、15、20、25、30、35、40、50 天草鱼仔鱼耳石的 Sr/Ca 比值特征
在图中标注的样本名称中，第一个数字 5、10、15、20、25、30、35、40、50 表示在浸泡标记完成后对
鱼进行耳石取样并进行分析的具体天数；第二个数字 1、2、3 代表用于检测的每尾鱼的顺序；
第三个字母，L 代表微耳石，S 代表矢耳石，A 代表星耳石。

Fig. 6 Characteristics of Sr/Ca ratio in otoliths of marked and control group of larval grass carp at d 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 50 during post-immersion culture

In the label for each line, the first numbers 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 50 indicate that the fish were sampled for otoliths and analyzed on days 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 50 after the immersion; the second numbers 1, 2, and 3 represent the order of each fish used in the experiment; and the third letters, “L” for lapillus, “S” for sagitta, and “A” for asteriscus.

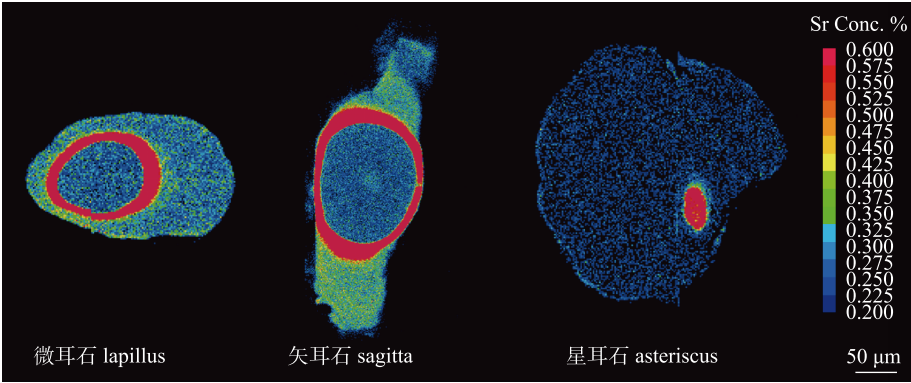


图 7 恢复饲养过程中标记组草鱼仔鱼耳石的面分布图
以恢复饲养 40 d 为例。

Fig. 7 Mapping of otoliths in marked group of larval grass carp during post-immersion culture 40 d of post-immersion culture as an example.

Sr/Ca 比值峰值相一致。在红色的高 Sr 标记外, 在 3 类耳石上均能明显观察到黄绿色的标记环, 随后随着恢复养殖时间的增加, 整个星耳石的面分布图呈现深蓝色, 而矢耳石和微耳石则呈现蓝绿色。此时耳石 Sr/Ca 比值恢复至正常水平, 外源 Sr 在耳石上的沉积结束。

2.4 草鱼仔鱼三类耳石第 1 日轮形成时间及镉标记时滞推断

浸泡标记完成后恢复饲养第 5 天的草鱼仔鱼实际为 16 日龄, 第 10 天的草鱼仔鱼实际为 21 日龄。对恢复养殖第 5 天的矢耳石、第 10 天的微耳石及星耳石日轮数目进行观察并计数(图 8), 在微耳石上可以清晰地看到日轮数为 20, 在矢耳石上

可以清晰地看到日轮数为 15, 即草鱼的矢耳石和微耳石在孵化完成后第 2 天形成第 1 日轮, 在星耳石观测到日轮数为 10, 即草鱼的星耳石在孵化完成后第 12 天形成第 1 日轮, 星耳石的第一日轮形成时间不同于微耳石和矢耳石。草鱼仔鱼在浸泡标记当日为第 9 日龄, 经过 2 d 浸泡后, 草鱼仔鱼为 11 日龄。在微耳石和矢耳石上可以观察到标记环出现在第 9~11 日轮上, 分别对应第 10~12 日龄的草鱼仔鱼, 也就是说镉标记开始形成与浸泡出现及镉标记消失与浸泡结束分别存在 1 d 的时间差。在星耳石上观察到标记出现在耳石核心处, 标记环出现在第 1 日轮上, 对应第 12 日龄的草鱼仔鱼, 即镉标记消失与浸泡结束存在 1 d 的时间差。

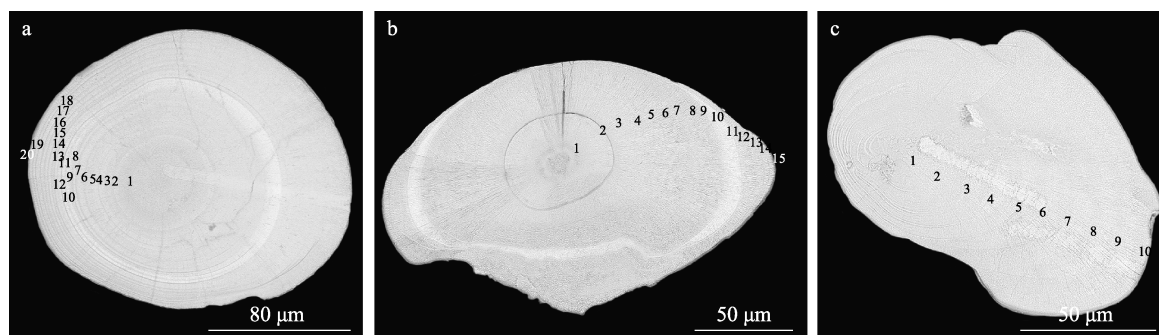


图 8 扫描电镜下草鱼仔鱼三类耳石日轮照片

a. 恢复养殖第 10 天的微耳石; b. 恢复养殖第 5 天的矢耳石; c. 恢复养殖第 10 天的星耳石. 数字代表日轮数.

Fig. 8 Photograph of the three types of otoliths of larval grass carp in scanned electron microscopic
a. Lapillus from the 10th d of post-immersion culture, b. Sagitta from the 5th d of post-immersion culture,
c. Asteriscus from the 10th d of post-immersion culture. The numbers on the otoliths indicate the counting of the daily rings.

3 讨论

3.1 草鱼仔鱼三类耳石镉标记特征分析

在淡水中, 与钡(Ba)类似, Sr 可以在 CaCO_3 基质中取代 Ca, 并随着时间的推移表现出稳定的特征^[19]。无论是从 Sr 绝对含量的角度分析, 还是从 Sr/Ca 比值上分析, 均能证实本研究中 80 mg/L 的六水氯化镉对草鱼仔鱼进行 2 d 浸泡能够很好地在 3 类耳石上产生明显标记, 且两种分析方法得到的结果相同。不同的耳石由不同的 CaCO_3 多态类型形成, 即文石、球文石和方解石^[27], 不同多态类型的分布系数不同。球文石的元素浓度通常低于文石^[28], 然而星耳石大部分是由球文石构成的^[29], 矢耳石和微耳石则通常是由文石构成的^[30],

这也就解释了为什么在未标记的对照组中矢耳石和微耳石的 Sr 绝对含量以及 Sr/Ca 比值均高于星耳石的原因。同时在面分布中, 也能看到在经历过标记峰值后的星耳石整个面都呈现出低浓度的深蓝色, 而矢耳石和微耳石在峰值下降后的生长过程中整个面则呈现出略高浓度的蓝绿色。在大多数的鱼类镉标记研究中, 通常都以单一耳石作为研究对象, 如邱晨等^[31]以鲤的星耳石为研究对象, 司飞等^[32]以牙鲆的矢耳石为研究对象, 在本实验中, 通过对 3 类耳石的标记信号强度检测以及取样的难易程度进行比较, 发现微耳石是更为适宜用来做草鱼镉标记检测的对象。这与 Zhu 等^[33]在鲫耳石镉标记中的结果一致; 因此, 在接下来针对其他鱼类的相关研究中, 建议对 3 类耳石的

锶标记差异进行比对分析,以挑选出最适宜用来鉴定 Sr 标记效果的代表性耳石类型。

3.2 鱼体三类耳石的形成时间差异性分析

此前普遍认为,耳石在鱼体孵化时就已形成,此时耳石一般指鱼体的 3 类耳石。在本次草鱼仔鱼实验中,在浸泡标记后第 0 天取样的时候,矢耳石、微耳石都能成功取到,但是未成功取到星耳石。从浸泡标记的线分布结果来看,星耳石首先出现的是锶标记高峰,随后随着养殖时间的增加, Sr 绝对含量或者是 Sr/Ca 比值才开始逐渐下降。同样在面分布结果中,星耳石的红色锶标记区域出现在核心处,其标记区域形成阶段与矢耳石和微耳石完全不同,这一切均证实了星耳石是后期形成的,并不是在鱼体孵化的阶段就存在,很可能是在对鱼体进行浸泡的过程中,星耳石逐渐形成,并在核心处形成标记。因此在付自东等^[34]用茜素络合物对胭脂鱼仔鱼进行浸泡标记时,由于 12 日龄的胭脂鱼星耳石尚未形成,因此也未在恢复饲养后的星耳石上检测到荧光标记环。在李茂华等^[35]用荧光染料对短须裂腹鱼早期鱼苗进行浸泡标记时,由于 8 日龄的短须裂腹鱼仅有部分个体的星耳石原基形成,也未对星耳石进行分析。在对草鱼仔鱼进行锶标记观察时,特别是在后期需要进行日轮推算日龄时,应尽量避免使用星耳石,考虑到取样过程中的难易程度及 3 类耳石形成时间的差异性,推荐微耳石作为草鱼仔鱼锶标记观察的首选类型。

3.3 草鱼仔鱼锶标记时滞特征分析

元素从环境沉积到耳石中是一个多阶段的过程。元素通过离子转运从血浆进入内耳的内淋巴,最后沉积在耳石表面^[36]。在这个过程中,某种元素从进入鱼体到沉积在耳石中会有一定的时间延迟。通常,特定的时间延迟发生在浸入开始和 3 种类型耳石的标记信号产生之间,以及浸入结束和标记信号终止之间,即时间(例如日期)对于前者 and 后者而言彼此不相等。Brown 等^[37]使用外源 Sr 浸泡金鲈,发现直到标记后培养的第 20 天才能检测到 Sr 标记。在日本鳗的 Sr 标记中,耳石中 Sr/Ca 比值的变化在 10 d 后可见,而耳石中的完全沉积至少需要 30~60 d^[38]。邱晨等^[31]在对鲤仔

鱼锶标记的研究发现在开始浸泡后的第 3 天,耳石上才开始出现锶标记,在浸泡结束后的第 6 天,耳石锶标记才会完全消失。同时 Zhu 等^[33]在之前对鲫 3 类耳石的锶标记时滞进行研究时,发现鲫微耳石和矢耳石上信号的产生与浸泡开始存在 2 d 的时间差,星耳石则表现为 1 d,而微耳石和矢耳石信号完全消失则需要 16 d,星耳石为 12 d。在本实验中,草鱼仔鱼微耳石锶标记信号的产生与消失与浸泡的开始与结束均存在 1 d 的时间差,同时星耳石锶标记信号的消失与浸泡结束也存在 1 d 的时间差,相比之下时滞时间较短,这可能是因鱼类、生长阶段和水环境差异而造成的。为了更好地了解标记过程并客观准确地评估标记效果,耳石取样应避免浸泡的开始和结束,因为在这些时期耳石 Sr 标记可能尚未开始或完成。这种时间延迟的机制必须根据不同鱼类的 Sr 沉积和耳石结构^[29]并结合水环境的基本特征,如盐度^[39]和温度^[40]进一步研究。其他生物学因素,如鱼类遗传学、发育阶段、生长速度、食物和生理条件,也会影响 Sr 在耳石中沉积的时间滞后^[41]。未来对不同物种耳石中 Sr 沉积机制的研究将有助于改进 Sr 标记方法。

4 结论

本实验利用 X 射线电子探针微区分析仪(EPMA)对 80 mg/L 的 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浸泡标记 2 d 的草鱼仔鱼耳石样本进行分析,定量线分析结果表明其能够在草鱼仔鱼耳石上形成锶标记峰值,微耳石和矢耳石的最大锶标记峰值远远大于星耳石,随着恢复饲养时间的增加,锶标记高峰逐渐下降至正常水平,在 3 类耳石未标记的正常生长阶段,微耳石和矢耳石的 Sr/Ca 比值也大于星耳石。由标记峰值出现的特征进一步证实草鱼仔鱼 3 类耳石中,星耳石的形成时间不同于微耳石和矢耳石。从鱼体死亡率、行为学上来看,本实验设计的 Sr 剂量范围对实验鱼的生存和生长无显著影响。考虑到标记检测最优效果及耳石取样的难易程度,微耳石可作为观测草鱼仔鱼 Sr 标记最适合的耳石样本,此结果可为水产养殖实践中增殖放流的标记检测提供理论依据及技术支持,同时为

以不同的研究目的选择 3 类耳石之一作为研究对象提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Loewen T N, Carriere B, Reist J D, et al. Linking physiology and biomineralization processes to ecological inferences on the life history of fishes[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2016, 202: 123-140.
- [2] Pracheil B M, Hogan J D, Lyons J, et al. Using hard-part microchemistry to advance conservation and management of North American freshwater fishes[J]. *Fisheries*, 2014, 39(10): 451-465.
- [3] Warren-Myers F, Dempster T, Swearer S E. Otolith mass marking techniques for aquaculture and restocking: Benefits and limitations[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2018, 28(3): 485-501.
- [4] Skalski J R, Buchanan R A, Griswold J. Review of marking methods and release-recapture designs for estimating the survival of very small fish: Examples from the assessment of salmonid fry survival[J]. *Reviews in Fisheries Science*, 2009, 17(3): 391-401.
- [5] Shippentower G E, Schreck C B, Heppell S A. Who's your momma? Recognizing maternal origin of juvenile steelhead using injections of strontium chloride to create transgenerational marks[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2011, 140(5): 1330-1339.
- [6] 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(1): 203-213.
- [7] Huntsman B M, Kim H, Phelps Q, et al. Limestone remediation of an acidic stream creates a microchemical batch mark for brook trout within an Appalachian watershed[J]. *North American Journal of Fisheries Management*. 2020, 40(6): 1523-1531.
- [8] Loeppky A R, McDougall C A, Anderson W G. Identification of hatchery-reared lake sturgeon using natural elemental signatures and elemental marking of fin rays[J]. *North American Journal of Fisheries Management*, 2020, 40(1): 61-74.
- [9] Bath G E, Thorrold S R, Jones C M, et al. Strontium and Barium uptake in aragonitic otoliths of marine fish[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2000, 64(10): 1705-1714.
- [10] Zimmerman C E. Relationship of otolith strontium-to-calcium ratios and salinity: Experimental validation for juvenile salmonids[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2005, 62(1): 88-97.
- [11] Arai T, Chino N. Opportunistic migration and habitat use of the giant mottled eel *Anguilla marmorata* (Teleostei: Elopomorpha)[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 5666.
- [12] Araya M, Niklitschek E J, Secor D H, et al. Partial migration in introduced wild chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) of southern Chile[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2014, 149: 87-95.
- [13] Yang J, Arai T, Liu H, et al. Environmental signature in the otolith elemental fingerprint of the tapertail anchovy, *Coilia mystus*, from the Changjiang Estuary, China[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2006, 22(5): 459-462.
- [14] Davoren G K, Halden N M. Connectivity of capelin (*Mallotus villosus*) between regions and spawning habitats in Newfoundland inferred from otolith chemistry[J]. *Fisheries Research*, 2014, 159: 95-104.
- [15] Fowler A M, Smith S M, Booth D J, et al. Partial migration of grey mullet (*Mugil cephalus*) on Australia's east coast revealed by otolith chemistry[J]. *Marine Environmental Research*, 2016, 119: 238-244.
- [16] Pan X D, Ye Z J, Xu B D, et al. Population connectivity in a highly migratory fish, Japanese Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*), along the Chinese coast, implications from otolith chemistry[J]. *Fisheries Research*, 2020, 231: 105690.
- [17] Jackson J.R. Earliest references to age determination of fishes and their early application to the study of fisheries [J]. *Fisheries*, 2007, 32(7): 321-328.
- [18] Panella G. Fish otoliths: Daily growth layers and periodical patterns[J]. *Science*, 1971, 173(4002): 1124-1127.
- [19] Campana S E. Chemistry and composition of fish otoliths: Pathways, mechanisms and applications[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1999, 188: 263-297.
- [20] Brown P, Green C, Sivakumaran K P, et al. Validating otolith annuli for annual age determination of common carp[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2004, 133(1): 190-196.
- [21] Swanson R G, Gagnon J E, Miller L M, et al. Otolith microchemistry of common carp reflects capture location and differentiates nurseries in an interconnected lake system of the North American Midwest[J]. *North American Journal of Fisheries Management*, 2020, 40(5): 1100-1118.
- [22] Durham B W, Wilde G R. Validation of daily growth increment formation in the otoliths of juvenile cyprinid fishes from the Brazos River, Texas[J]. *North American Journal of Fisheries Management*, 2008, 28(2): 442-446.
- [23] Fischer A J, Chesney E J, Cowan J H. Validation of first

- annulus formation in red snapper otoliths with the use of an alizarin complexone fluorescent marker[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2010, 89(3-4): 313-317.
- [24] Parkinson K L, Booth D J, Lee J E. Validation of otolith daily increment formation for two temperate syngnathid fishes: The pipefishes *Stigmatopora argus* and *Stigmatopora nigra*[J]. *Journal of Fish Biology*, 2012, 80(3): 698-704.
- [25] Chang J B, Deng Z L, Sun J Y, et al. Daily increments of otoliths in larvae and juveniles of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[C]//China Zoological Society. Proceedings of the 60th Anniversary of the Chinese Zoological Society. Beijing: Science & Technology of China Press, 1994: 323-329. [常剑波, 邓中彝, 孙建贻, 等. 草鱼仔幼鱼耳石日轮及日龄研究[C]//中国动物学会. 中国动物学会成立 60 周年论文集. 北京: 中国科学技术出版社, 1994: 232-239.]
- [26] Qiu C, Jiang T, Chen X B, et al. Study on simultaneous marking of juvenile *Cyprinus carpio* with fluorescent compound and strontium[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2022(6): 57-61. [邱晨, 姜涛, 陈修报, 等. 鲤幼鱼耳石荧光化合物和锶复合标记研究[J]. 湖南农业科学, 2022(6): 57-61.]
- [27] Oliveira A M, Farina M, Ludka I P, et al. Vaterite, calcite, and aragonite in the otoliths of three species of piranha[J]. *Naturwissenschaften*, 1996, 83(3): 133-135.
- [28] Schulz-Mirbach T, Ladich F, Plath M, et al. Enigmatic ear stones: What we know about the functional role and evolution of fish otoliths[J]. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2019, 94(2): 457-482.
- [29] Ren D N, Meyers M A, Zhou B, et al. Comparative study of carp otolith hardness: Lapillus and asteriscus[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2013, 33(4): 1876-1881.
- [30] Thomas O R B, Swearer S E, Kapp E A, et al. The inner ear proteome of fish[J]. *The FEBS Journal*, 2019, 286(1): 66-81.
- [31] Qiu C, Jiang T, Chen X B, et al. Characteristics of otolith strontium marking and its time lags of larval *Cyprinus carpio*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(4): 903-912. [邱晨, 姜涛, 陈修报, 等. 鲤(*Cyprinus carpio*)仔鱼耳石锶(Sr)标记及其时滞特征的研究[J]. 海洋与湖沼, 2019, 50(4): 903-912.]
- [32] Si F, Ren J G, Wang Q L, et al. Strontium marking on otoliths of *Paralichthys olivaceus* based on immersion experiments[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(3): 534-545. [司飞, 任建功, 王青林, 等. 基于浸泡法的牙鲈耳石锶标记技术研究[J]. 中国水产科学, 2019, 26(3): 534-545.]
- [33] Zhu Y H, Jiang T, Chen X B, et al. Inter-otolith differences in strontium markings: A case study on the juvenile crucian carp *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758)[J]. *Fishes*, 2022, 7(3): Article No.112.
- [34] Fu Z D, Li J, Yue B S, et al. Otolith marking of larval and juvenile Chinese sucker with fluorescent substances[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2005, 40(4): 60-65. [付自东, 李静, 岳碧松, 等. 用荧光物质浸泡标记胭脂鱼仔稚鱼耳石[J]. 动物学杂志, 2005, 40(4): 60-65.]
- [35] Li M H, Li T C, Zeng R K, et al. Immersion marking of *Schizothorax wangchiachii* otoliths at early life stages with fluorochrome dyes[J]. *Freshwater Fisheries*, 2021, 51(4): 12-20. [李茂华, 李天才, 曾如奎, 等. 荧光染料对短须裂腹鱼早期鱼苗的浸泡标记研究[J]. 淡水渔业, 2021, 51(4): 12-20.]
- [36] Elsdon T S, Gillanders B M. Reconstructing migratory patterns of fish based on environmental influences on otolith chemistry[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2003, 13(3): 217-235.
- [37] Brown P, Harris J H. Strontium batch-marking of golden perch (*Macquaria ambigua* Richardson) and trout cod (*Maccullochella macquariensis*) (Cuvier)[J]. *Recent Developments in Fish Otolith Research*, 1995: 693-701.
- [38] Yokouchi K, Fukuda N, Shirai K, et al. Time lag of the response on the otolith strontium/calcium ratios of the Japanese eel, *Anguilla japonica* to changes in strontium/calcium ratios of ambient water[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2011, 92(4): 469-478.
- [39] Panfili J, Darnaude A M, Vigliola L, et al. Experimental evidence of complex relationships between the ambient salinity and the strontium signature of fish otoliths[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2015, 467: 65-70.
- [40] Tzeng W N. Temperature effects on the incorporation of strontium in otolith of Japanese eel *Anguilla japonica*[J]. *Journal of Fish Biology*, 1994, 45(6): 1055-1066.
- [41] Sturrock A M, Hunter E, Milton J A, et al. Quantifying physiological influences on otolith microchemistry[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2015, 6(7): 806-816.

Characterization of strontium markers and validation of daily increment formation for three otolith types in larval grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

ZHU Yahua¹, JIANG Tao², CHEN Xiubao², LIU Hongbo², YANG Jian^{1,2}

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Laboratory of Fishery Microchemistry, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: To explore whether strontium otolith-marking technology can be applied to evaluate the effect of grass carp stocking in aquaculture, 9-d-old larval grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) were used. They were immersed for 2 d in 80 mg/L strontium chloride hexahydrate ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). After the immersion, the fish were sampled continuously during the rearing process, and the pre-treated otoliths examined by electron probe micro-analyzer. We used mapping and line analysis to investigate the elemental fingerprinting effect of strontium on the otoliths of grass carp larvae and captured the exact time of formation on the first day and the time lag of strontium marking based on counting of the daily rings of the three otolith types in grass carp. The results of the quantitative line analysis showed that immersion with 80 mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution for 2 d caused strontium-marking peaks to form on the grass carp otoliths. The strontium-marking peaks of lapillus and sagitta were higher than those of asteriscus and gradually decreased to normal levels with an increase in recovery feeding time. Both lapillus and sagitta also had greater Sr and Sr/Ca ratios than asteriscus during the phase when the three otolith types did not show an increase in Sr values or Sr/Ca ratios. The mapping analysis results were consistent with the line analysis, and the marked areas in the three otolith types showed obvious red patterns, while the unlabeled low-strontium otolith areas showed blue patterns. In addition, through the comparative analysis of strontium-marking characteristics and the number of otolith growth days, it was found that among the three otolith types, the formation time of asteriscus was later than that of lapillus and sagitta, with the first daily increment formed at the 12th day of hatching, while lapillus and sagitta formed the first daily increment at the 2nd day of hatching. There was a 1-d time lag between the beginning of strontium-marker formation and the start of immersion and the disappearance of strontium markers and the end of immersion for lapillus and sagitta, respectively. Strontium markers were observed to appear in the core of the asteriscus, and the disappearance of the strontium-marker signals was observed with a time lag of 1 d from the end of immersion. Here, in terms of fish mortality and behavior, the Sr dose had no significant difference ($P > 0.05$) between the control and experimental groups. Considering the effects of marking due to the absorption of strontium by different otoliths and the differences in the morphology and structure of otoliths, as well as the difficulty of sampling, it is recommended that lapillus be used as the most suitable otolith for the observation of Sr markings of grass carp larvae. This can provide a theoretical basis and technological support for marking and detection of the stocking of grass carp and other cyprinids.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; larvae; strontium chloride hexahydrate; otolith; daily increment; marking

Corresponding author: YANG Jian. E-mail: jiany@ffrc.cn