

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200923001

<http://www.yykxjz.cn/>

王硕, 张博伦, 郭彪, 姜涛, 陈卫, 杨健, 高燕, 曾祥茜. 耳石锶标记识别鲮放流群体的可行性研究. 渔业科学进展, 2022, 43(1): 38–45

WANG S, ZHANG B L, GUO B, JIANG T, CHEN W, YANG J, GAO Y, ZENG X X. Study of the feasibility of identifying the group of released *Liza haematocheila* by using the strontium marking method in otoliths. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(1): 38–45

耳石锶标记识别鲮放流群体的可行性研究*

王硕^{1,2} 张博伦^{1,2} 郭彪^{1,2①} 姜涛³
陈卫^{1,2} 杨健³ 高燕^{1,2} 曾祥茜^{1,2}

(1. 天津市水产研究所 天津 300457; 2. 天津市海洋牧场技术工程中心 天津 300457;
3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 江苏 无锡 214081)

摘要 为探究耳石锶(Sr^{2+})标记技术在鲮(*Liza haematocheila*)增殖放流群体识别的可行性,以体长5 cm左右的鲮幼鱼为研究对象,将其养殖海水中 Sr^{2+} 的质量浓度分别调至50、100、200和400 mg/L,以自然海水(Sr^{2+} 质量浓度为7.9 mg/L)为对照组,人为改变鲮幼鱼生存环境中 Sr^{2+} 的质量浓度标记48 h。同时开展双环标记实验(在鲮3 cm幼鱼时进行 Sr^{2+} 质量浓度200 mg/L海水96 h标记,待其长至5 cm幼鱼时进行 Sr^{2+} 质量浓度100 mg/L海水48 h标记)。实验结果显示, Sr^{2+} 质量浓度50~400 mg/L的海水48 h标记的鲮耳石Sr/Ca比均出现一个显著的上升阶段且面分析出现明显的“高 Sr^{2+} 标记环”。综合本研究结果和标记效率,推荐采用 Sr^{2+} 质量浓度为50 mg/L的海水进行鲮耳石 Sr^{2+} 标记。双环标记实验鲮耳石 Sr^{2+} 元素面分布结果出现层次分明的双环,且双环标记组鲮耳石2条不同标记环的线性分析结果与其相对应的单环标记组基本一致,这表明通过 Sr^{2+} 标记次数来进行不同放流群体识别是可行的。

关键词 鲮; 耳石; Sr^{2+} 标记; Sr^{2+} 质量浓度; 双环标记

中图分类号 S953.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)01-0038-08

鱼类在生长发育过程中,水体中的 CaCO_3 在耳石上沉积的同时,其他微量元素也被沉积在耳石中,由于它的非细胞性和代谢惰性,一般不会发生分解或重吸收,这种元素的信息可以一直保存下来,成为记录鱼类生活史的元素指纹(elemental fingerprints)(李秀启等, 2017)。目前,在鱼类耳石中已检测出的元素种类有50多种(熊瑛等, 2015),且主要来源于鱼类生活的水环境和食物(郭弘艺等, 2015; 熊瑛等, 2015)。水环境或食物的元素通过吸收进入血液,再由血液进入内

耳淋巴液;最终通过结晶作用将元素沉积在耳石中(Sturrock *et al*, 2012)。但由于各种元素的性质不同,耳石对不同环境元素的响应有所差别(郭弘艺等, 2015; 熊瑛等, 2015)。锶(Sr^{2+})作为一种硬酸元素,水体环境中耳石中 Sr^{2+} 的浓度具有显著的正相关性(Walther *et al*, 2006)。因此,耳石Sr/Ca比分析一直以来被作为鱼类生境重建和种群鉴定的重要技术手段(王玉堃等, 2016; 李孟孟等, 2017a),并逐步在增殖放流效果评估中得以研究应用(李秀启等, 2017; 司飞等, 2019a)。

* 天津市科技重大专项与工程(18ZXRHSF00270)和天津市渔业发展服务中心青年科技创新项目(J2018-13青)共同资助 [The work was supported by Tianjin Science and Technology Major Programs and Projects (18ZXRHSF00270), and Projects of Youth Science and Technology Innovation of Tianjin Fishery Development Service Center (J2018-13Qing)].

王硕, E-mail: wangshuo060712@126.com

① 通讯作者: 郭彪, 高级工程师, E-mail: oucguobiao@163.com

收稿日期: 2020-09-23, 收修改稿日期: 2020-10-20

目前, 增殖放流鱼类标记方法中, 挂牌标记和被动整合式雷达标要求鱼苗体长较大且适合小规模标记(Waldman *et al.*, 1990; Navarro *et al.*, 2007; 周辉霞等, 2017), 而分子标记需要清晰的亲本遗传信息(童爱萍等, 2015)。但目前国内鱼类增殖放流的现状是放流的苗种以小规格苗种为主, 放流数量较大、放流企业较多且存在鱼苗遗传背景信息不清的情况。而耳石 Sr^{2+} 标记具有成本低、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等优点, 是鱼类标记放流技术研究的一个新热点问题(司飞等, 2019a)。

与淡水及河口鱼类耳石 Sr/Ca 比和生境中的 Sr/Ca 比直接相关不同, 海水中的 Sr/Ca 比不是影响海水鱼类耳石 Sr/Ca 比的主要因素(Brown *et al.*, 2009), 海水鱼类耳石 Sr/Ca 比可能受到海水环境中的 Sr 和 Ca 的相对浓度、鱼类种类特性、水温、盐度和鱼类生理状态的影响(熊瑛等, 2015)。因此, 海水中的 Sr^{2+} 浓度对海水鱼类耳石 Sr/Ca 比的影响, 需分种类加以区别研究。鲮(*Liza haematocheila*)作为我国增殖放流的重要品种(杨文波等, 2009)和天津市鱼类增殖放流量最大(7347.302 万尾)的一个品种, 全面、科学地评估其增殖放流效果, 是保证放流工作有效开展的基础(罗刚等, 2015)。放流个体标记回捕法作为目前海洋渔业生物增殖放流效果评估的主要方法(刘璐等, 2014), 研究大规模标记小规格鲮苗种的方法是十分有必要的。本研究拟比较不同浓度 Sr^{2+} 浸泡下, 鲮的耳石标记效果, 并尝试对鲮的耳石进行双环标记, 以探讨鲮耳石 Sr^{2+} 标记的可行性和不同放流群体识别的可能性, 为大规模鲮耳石 Sr^{2+} 标记放流提供基础数据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼的来源及暂养

实验用鱼为河北省黄骅市宏润水产养殖有限公司繁育的体长为 3 cm 左右的鲮幼鱼。3000 尾幼鱼运回后, 暂养于天津兴盛海淡水养殖有限责任公司养殖车间的 2 个养殖池中, 养殖池规格为 6.0 m×6.0 m×1.3 m, 每个养殖池盛水约为 30 m³。暂养期间, 每天投喂配合饲料 2~3 次, 日换水量为 30%, 每周倒池 1 次。暂养海水为自然海水, 盐度为 21~23、水温为 21℃~22℃、pH 为 7.83~8.03。

1.2 实验方法

通过向海水中添加 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 将海水中 Sr^{2+} 质

量浓度分别提升至 50、100、200 和 400 mg/L, 其中 Sr^{2+} 质量浓度为 400 mg/L 的海水 Sr^{2+} 浓度处于过饱和状态, 海水呈乳白色。

将 Sr^{2+} 质量浓度为 50、100、200 和 400 mg/L 的海水分别注入 50 L 的实验水族箱中, 作为不同 Sr^{2+} 质量浓度标记组, 分别以 L5M50、L5M100、L5M200 和 L5M400 表示; 同时, 将无添加 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的自然海水单独注入 1 个 50 L 的实验水族箱, 作为对照组, 用 L5M0 表示。

挑选体长为 5 cm 左右健康的幼鱼 500 条, 均匀分配到 4 个标记组和一个对照组, 开始实验。整个标记期间, 不换水, 每天正常投喂 2~3 次。标记 48 h 后, 分别将每个处理组中全部幼鱼单独转移到一个网箱中进行后期饲养。网箱规格为 1.5 m×1.5 m×1.3 m。待幼鱼长至约 10 cm 左右时, 每个处理组随机挑选 5 尾用于耳石微化学分析。后期饲养期间, 养殖用水和养殖管理同暂养, 每天观察幼鱼的死亡状况, 并记录。

1.3 双环标记实验

实验开始前, 海水中 Sr^{2+} 质量浓度经电感耦合等离子质谱仪(ICP MS)测定, 为 7.9 mg/L。通过向海水中添加 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 将海水中 Sr^{2+} 质量浓度分别提升至 100 和 200 mg/L。

将 Sr^{2+} 质量浓度为 200 mg/L 的海水注入到 2 个 50 L 的实验水族箱中, 并随机挑选体长为 3 cm 左右健康的幼鱼 200 尾, 均分到 2 个实验水族箱中。幼鱼在 Sr^{2+} 质量浓度为 200 mg/L 的海水中标记 96 h 后, 将所有标记幼鱼转移到 2 个网箱中继续暂养。标记幼鱼的暂养网箱规格同 1.2, 网箱置于养殖池中, 网箱为透水网衣, 网箱中的海水可与养殖池的海水自由交换。标记幼鱼暂养条件同其他幼鱼暂养一致。暂养 30 d 后, 标志幼鱼长至 5 cm 左右, 开始第 2 次标记。将 Sr^{2+} 质量浓度为 100 mg/L 的海水注入 2 个 50 L 的实验水族箱中, 并随机从第 1 次标记的幼鱼中挑选体长为 5 cm 左右健康幼鱼 100 尾, 移入其中一个实验水族箱中进行二次 48 h 标记; 同时挑选体长为 5 cm 左右未进行标记的健康幼鱼 100 尾, 移入另一个实验水族箱中标记 48 h。将 200 mg/L 的海水标记、双环标记和 100 mg/L 的海水标记幼鱼分别单独转移到一个网箱中继续暂养。分别用 SL3、DL3-5 和 SL5 表示 200 mg/L 的海水标记、双环标记和 100 mg/L 的海水标记。整个标记期间, 不换水, 每天正常投喂 2~3 次。待幼鱼长至约为 10 cm 左右时, 随机挑选 5 尾用于耳石微化学分析。

1.4 耳石检测方法

1.4.1 耳石摘取及前处理 利用剪刀、尖头镊等工具将一对矢耳石取出,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。从一对矢耳石中随机选取一块用于前处理和微化学分析,前处理参照李孟孟等(2017b)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,丹麦)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)。

1.4.2 耳石的 EPMA 分析 耳石的电子探针显微分析(electron probe microanalysis, EPMA)参考司飞等(2019a)和杨健等(2010)的方法,利用X射线电子探针微区分析仪((JXA-8100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 Sr^{2+} 元素定量线分析。标准样品使用 CaCO_3 和 SrTiO_3 。定量线分析 EPMA 的参数设定:加速电压为15 kV,电子束电流为 2.0×10^{-8} A;束斑直径为3 μm ,每点驻留时间为15 s;以间距10 μm 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。其 EPMA 加速电压和电子束电流分别为15 kV 和 5.0×10^{-7} A,束斑直径为3 μm ,像素为6 $\mu\text{m} \times 6 \mu\text{m}$,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 比标准化,即统一用 Sr 含量/Ca 含量 $\times 10^3$ 表示。

1.5 数据处理

采用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)或 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著;利用 Excel 2010 和 SigmaPlot 1.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 鲮耳石上 Sr^{2+} 元素的面分布

对50、100、200和400 mg/L 浸泡组和对照组 Sr^{2+} 元素在鲮耳石上沉积的面分布进行上机分析。4个标

记浓度处理组均出现明显的“高 Sr^{2+} 标记环”(图1)。

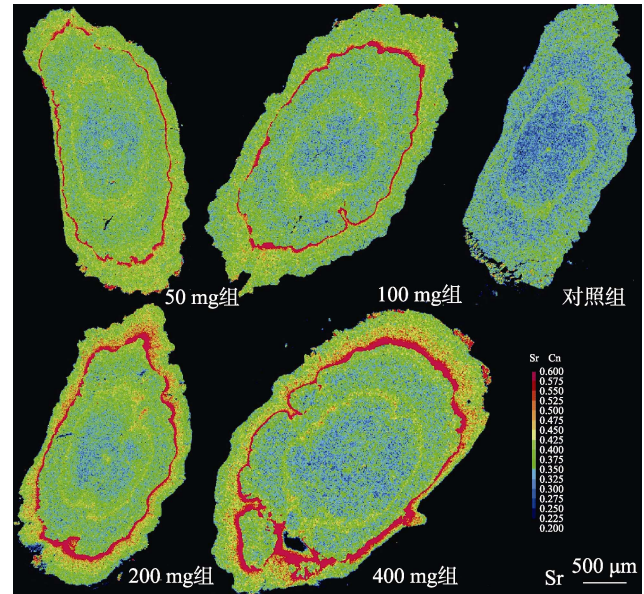


图1 不同 Sr^{2+} 浓度处理后鲮耳石 Sr^{2+} 元素面分布结果

Fig.1 Mapping analysis of Sr in the otoliths of *L. haematocheila* marked with Sr solutions of different concentrations

2.2 鲮耳石上 Sr^{2+} 元素线性分析结果

通过定量线分析可知,50、100、200和400 mg/L 浸泡组的 Sr/Ca 比均在距核1100 μm 附近出现增高阶段(图2)。线性分析结果显示, Sr^{2+} 质量浓度为50~400 mg/L, 标记时长为48 h, 鲮均被成功标记。

将鲮耳石的 Sr/Ca 比的变化分成平稳阶段和显著变化阶段,并对其不同阶段的数值进行单因素方差分析,分析结果见表1。4个不同标记浓度组平稳阶段和对照组鲮耳石的 Sr/Ca 比未发现显著差异($P > 0.05$)。鲮耳石 Sr/Ca 比显著变化阶段均值与平稳阶段均值的比值变化规律和 Sr/Ca 比显著变化阶段均值的变化规律一致;其中, L5M50 组和 L5M100 组显著低于 L5M200 组和 L5M400 组($P < 0.05$)。Sr/Ca 峰值(即Ⅲ阶段 Sr/Ca 比)在4个不同标记浓度组均存在显著差异, Sr/Ca 峰值与平稳阶段均值的比值在4个不同标记浓度组也存在显著差异($P < 0.05$),且变化规律一致,其中 L5M50 组最低,显著低于其他处理组($P < 0.05$);其中, L5M400 组最高,显著高于其他处理组($P < 0.05$)。L5M50 组鲮耳石形成的标记环宽度值最低,显著低于 L5M100 组和 L5M400 组($P < 0.05$),但与 L5M200 组差异不显著($P > 0.05$); L5M400 组鲮耳石形成的标记环宽度值最高,显著高于 L5M50 组和 L5M200 组($P < 0.05$),但与 L5M100 组差异不显著($P > 0.05$)。

表 1 不同处理组鮟耳石 Sr/Ca 比变化(平均值±标准误)

Tab.1 Chang of Sr/Ca ratio in the marked otoliths of *L. haematocheila* in different treatments (Mean±SE)

组别 Treatments	I 阶段 Sr/Ca 比 Sr/Ca ratio of stage I	II 阶段 Sr/Ca 比 Sr/Ca ratio of stage II	III 阶段 Sr/Ca 比 Sr/Ca ratio of stage III	标记环宽度 Width of marking ring/ μm	Sr ²⁺ 峰区均值 为正常均值的倍数 Multiples of mean values of high Sr ²⁺ area to average value of normal	Sr ²⁺ 峰值 为正常均值的倍数 Multiples of peak value of Sr ²⁺ to average value of normal
L5M0	6.458 2±0.266 0					
L5M50	6.330 2±0.156 8	18.029 1±1.415 5 ^a	27.856 7±1.428 6 ^a	54.00±10.29 ^a	2.86±0.25 ^a	4.42±0.27 ^a
L5M100	6.251 7±0.129 0	20.442 9±1.691 2 ^a	45.420 2±4.000 2 ^b	78.00±4.90 ^{bc}	3.29±0.32 ^a	7.32±0.77 ^b
L5M200	6.191 6±0.293 7	34.137 1±3.791 3 ^b	81.842 4±5.789 7 ^c	76.00±7.48 ^{ab}	5.49±0.45 ^b	13.29±0.99 ^c
L5M400	6.471 1±0.307 0	29.720 8±1.214 4 ^b	109.663 6±5.848 9 ^d	100.00±4.08 ^c	4.65±0.39 ^b	17.04±1.18 ^d

注: I 为 Sr/Ca 比平稳阶段, II 为 Sr/Ca 比显著变化阶段, III 为 Sr/Ca 比极大值。同一列数值上不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: I denotes stationary stage, II denotes stages of Sr/Ca ratio significantly changed in otoliths, III denotes peak value of Sr/Ca ratio. Different letters in the same column indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$)

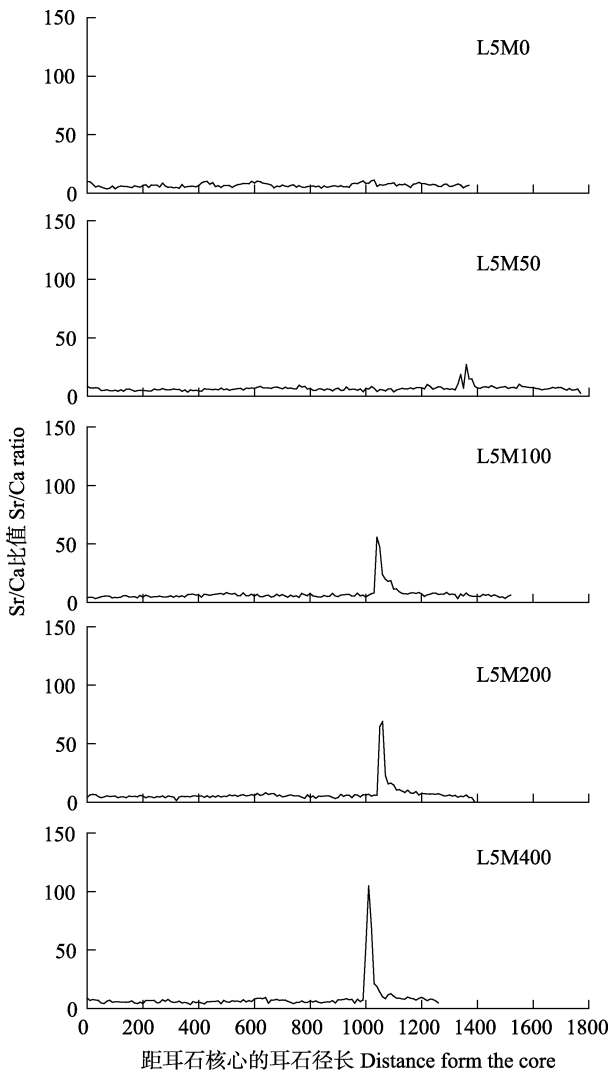


图 2 不同处理组鮟耳石样品定量线分析结果

Fig.2 The line transect analysis in the marked otoliths of *L. haematocheila* in different treatments

2.3 双环标记鮟耳石上 Sr²⁺元素 EPMA 分析结果

鮟耳石上 Sr²⁺元素的面分布结果显示, 在 Sr²⁺质量浓度为 200 mg/L 的海水中标记 96 h 的 3 cm 鮟和在 Sr²⁺质量浓度为 100 mg/L 的海水中标记 48 h 的 5 cm 鮟均出现明显的“高 Sr²⁺标记环”, 双环标记鮟出现层次分明的双“高 Sr²⁺标记环”(图 3)。

线性分析结果显示, Sr²⁺质量浓度为 200 mg/L, 标记时长为 96 h, 体长为 3 cm 的鮟的 Sr/Ca 比均在距核 550 μm 附近出现增高阶段。体长为 5 cm 的鮟在 Sr²⁺质量浓度 100 mg/L 的海水中标记时长为 48 h, Sr/Ca 比均在距核 1100 μm 附近出现增高阶段(图 4)。双环标记组 2 次峰值出现明显, 彼此间几乎没有影响。

将鮟耳石的 Sr/Ca 比的变化分成平稳阶段和显著变化阶段, 并对其不同阶段的数值进行单因素方差分析, 分析结果见表 2。无论是平稳阶段 Sr/Ca 比、显著变化阶段 Sr/Ca 比、Sr/Ca 比峰还是标记环宽度, 在同一体长、同一标记浓度和同一标记时间下, 对照组和双环标记组鮟耳石 Sr/Ca 比均未发现显著差异($P>0.05$)。但是 2 次标记(鮟体长不同、标记浓度不同、标记时间不同)的鮟耳石 Sr/Ca 比出现显著差异, 体长为 3 cm 的鮟在 Sr²⁺质量浓度为 200 mg/L 的海水中标记 96 h, 平稳阶段 Sr/Ca 比、显著变化阶段 Sr/Ca 比、Sr/Ca 比峰值和标记环宽度均显著高于体长为 5 cm 的鮟在 Sr²⁺质量浓度为 100 mg/L 的海水中标记 96 h 的值($P<0.05$)。

3 讨论

由于耳石是一种具有新陈代谢惰性的钙化结构

表2 双环标记实验鲷耳石 Sr/Ca 比变化(平均值±标准误)

Tab.2 Change of Sr/Ca ratio in the marked otoliths of *L. haematocheila* in double ring marking experiment (Mean±SE)

组别 Treatments	SL3	SL3-5		SL5
		第1次标记 First marking	第2次标记 Second marking	
I 阶段 Sr/Ca 比 Ratio of stage I	6.511 5±0.201 1	6.274 1±0.119 6	6.274 1±0.119 6	6.251 7±0.129 0
II 阶段 Sr/Ca 比 Ratio of stage II	32.809 8±1.423 9 ^a	32.734 8±1.934 0 ^a	20.584 6±1.612 9 ^b	20.442 9±1.691 2 ^b
III 阶段 Sr/Ca 比 Ratio of stage III	97.027 8±3.514 7 ^a	96.949 7±3.180 8 ^a	45.340 2±3.735 8 ^b	45.420 2±4.000 2 ^b
标记环宽度 Width of Marking ring/μm	225.50±13.77 ^a	217.50±16.52 ^a	78.00±4.90 ^b	80.00±3.16 ^b
Sr ²⁺ 峰区均值为正常均值的倍数 Multiples of mean values of high Sr ²⁺ area to average value of normal	14.97±0.84 ^a	15.61±0.82 ^a	7.27±0.71 ^b	7.32±0.77 ^b
Sr ²⁺ 峰值为正常均值的倍数 Multiples of peak value of Sr ²⁺ to average value of normal	32.81±1.42 ^a	32.73±1.93 ^a	20.58±1.61 ^b	20.44±1.69 ^b

注：I 为 Sr/Ca 比平稳阶段，II 为 Sr/Ca 比显著变化阶段，III 为 Sr/Ca 比极大值；同一行数值上不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: I denotes stationary stage, II denotes stages of Sr/Ca ratio significantly changed in otoliths, III denotes peak value of Sr/Ca ratio. Different letters in the same row indicate significant differences among different treatments ($P < 0.05$)

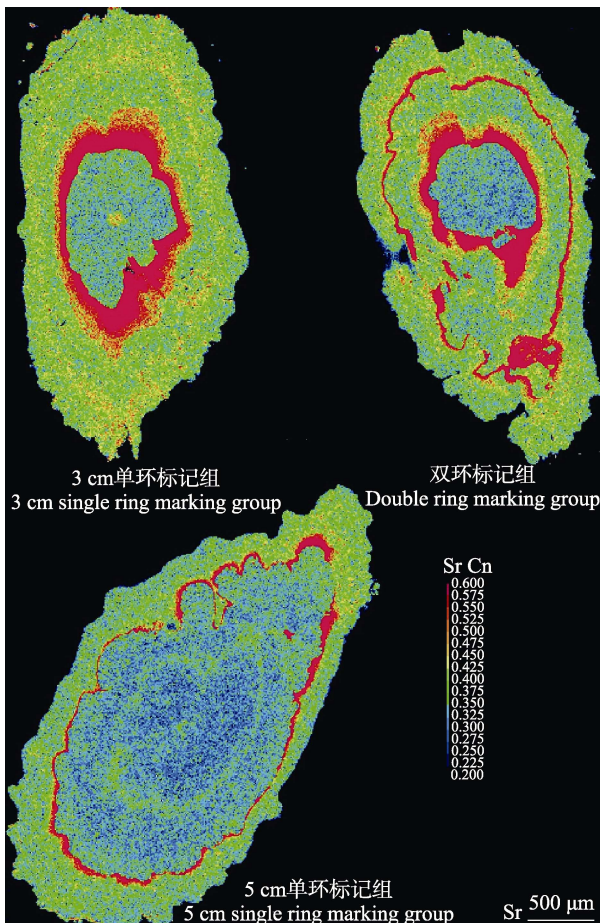


图3 双环标记实验鲷耳石 Sr²⁺元素面分布
Fig.3 Sr²⁺ concentrations of mapping analysis in the marked otoliths of *L. haematocheila* in double ring marking experiment

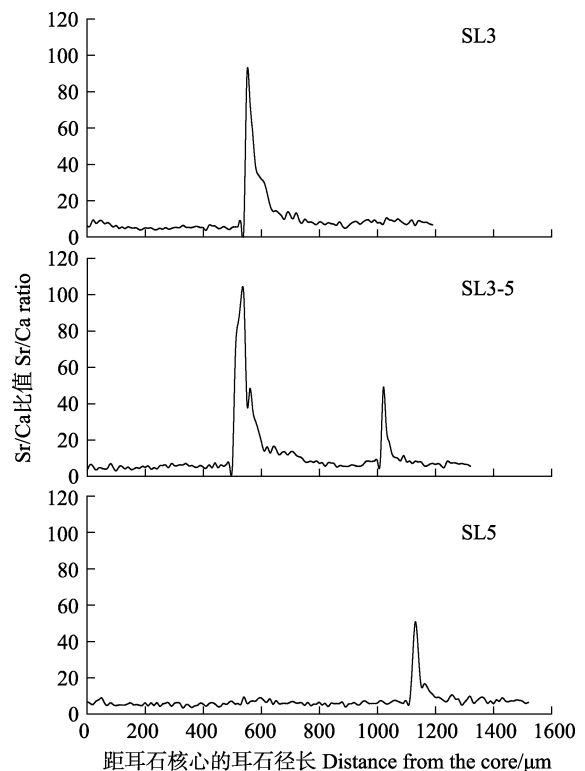


图4 双环实验鲷耳石样品定量线分析
Fig.4 The line transect analysis in the marked otoliths of *L. haematocheila* in double ring marking experiment

(Campana *et al*, 1985), 沉积在耳石中的生境元素能永久性保存, 其可很好地记录鱼类生境的变迁(Elsdon *et al*, 2008)。因此, 耳石微化学分析一直以来均作为一种重要的技术手段, 用于鱼类的生境重建和种群鉴

定(王玉堃等, 2016; 李孟孟等, 2017a)。随着学者们对大规模小规格鱼类标记方法的探索, 耳石 Sr^{2+} 标记技术逐步由标记淡水鱼类(李秀启等, 2017)向标记海水鱼类(张辉等, 2015; 司飞等, 2019a)发展。本研究中, 4 个标记浓度处理组鲮耳石 Sr/Ca 比均出现一个显著的上升阶段, 耳石 EPMA 面分析也出现明显的“高 Sr^{2+} 标记环”。这说明通过人为向海水中添加一定浓度 Sr^{2+} 对鲮耳石进行微化学标记是可行的。

鲮耳石中 Sr/Ca 比波峰随着标记海水中 Sr^{2+} 浓度的增加逐渐增高, 说明鲮耳石中的 Sr/Ca 比与水体中的 Sr/Ca 比呈正相关关系, 这与司飞等(2019a)对牙鲮 (*Paralichthys olivaceus*) 的研究结果一致。虽然标记环的宽度也是随着标记海水中 Sr^{2+} 浓度的增加逐渐增高, 但是其变化趋势与耳石中的 Sr/Ca 比波峰有所不同。如果将耳石“高 Sr^{2+} 标记环”中的 Sr/Ca 比极大值、Sr/Ca 比显著变化阶段均值和标记环宽度与标记浓度的比分别作为标记效率的 3 个指标值, 那么随着标记浓度的增加, 其标记效率是下降的, 尤其是标记环宽度标记效率下降最为明显。结合耳石生境元素在耳石的永久保存性(Elsdon *et al.*, 2008)和 EPMA 精确定位性(司飞等, 2019b), 依据本研究结果, 认为 50 mg/L Sr^{2+} 标记 48 h 完全可以实现小规格鲮苗种大规模标记的需求。该标记浓度较其他海水鱼类的最低标记浓度高(张辉等, 2015; 司飞等, 2019a), 更低的海水 Sr^{2+} 标记浓度是否同样能够实验鲮的成功标记需要进一步研究。

鱼类的耳石随着鱼类的生长而不断生长(邓维德等, 2010), 随着耳石的总重量不断增加, 一些特定环境如 Sr^{2+} 标记在耳石中沉积的特定元素相对含量逐渐下降(Yamada *et al.*, 1979; Schroder *et al.*, 1995)。由于原子吸收光谱法(AAS)和电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)等检测方法只能检测均一化后的整体耳石样品(司飞等, 2019b), 故非常容易出现 Sr^{2+} 标记随着鱼类生长而消失的假象。与之相比, EPMA 可精确分析耳石剖面上不同位置的 Sr^{2+} 含量沉积情况, 从而不受标记鱼生长等限制, 可避免上述局限, 同时也为开展小规格鲮大规模标记提供了可能。在双环标记实验中, 鲮耳石 Sr^{2+} 元素面分布结果出现层次分明的双环, 且双环标记组鲮耳石线性分析结果与对照组基本一致。这说明通过 Sr^{2+} 标记次数来进行不同放流群体识别是可行的。

外源 Sr^{2+} 在耳石内沉积量响应性变化存在着一定时滞性(邱晨等, 2019), 不同的标记实验其时滞性有所不同(王臣等, 2015; 李秀启等, 2017; 邱晨等, 2019)。本研究中, 2 次实验间隔时间约为 20 d, 2 次

标记环之间层次分明。但双环标记时间是否可以进一步缩短, 需要结合时滞现象与耳石结构、 Sr^{2+} 沉积机制及鱼体生长阶段特征等相关性进一步深入研究。

综上所述, 耳石 Sr^{2+} 标记技术可实现小规格鲮大规模标记, 也可通过多环标记实现不同放流群体的识别, 但是多环标记过程中, 不同标记时间所需的最短时间间隔需要通过进一步的研究确定。

参 考 文 献

- 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. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2009, 66(10): 1790–1808
- CAMPANA S E, NEILSON J D. Microstructure of fish otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1985, 42(5): 1014–1032
- DENG W D, ZHAO Y H, KANG B, *et al.* Application of otolith in studies on fish age and growth. *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(2): 171–180 [邓维德, 赵亚辉, 康斌, 等. 耳石在鱼类年龄与生长研究中的应用. *动物学杂志*, 2010, 45(2): 171–180]
- ELSDON T S, WELLS B K, CAMPANA S E, *et al.* Otolith chemistry to describe movements and life-history parameters of fishes: Hypotheses, assumptions, limitations and inferences. *Oceanography and Marine Biology*, 2008, 46: 297–330
- GUO H Y, ZHANG Y, TANG W Q, *et al.* Analysis of otolith microchemistry and screening of environmental indicator elements in early life history of Japanese eels (*Anguilla japonica*). *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(10): 1467–1478 [郭弘艺, 张亚, 唐文乔, 等. 日本鳗鲡幼体的耳石微化学分析及其环境指示元素筛选. *水产学报*, 2015, 39(10): 1467–1478]
- 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. *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. *生态学报*, 2017b, 37(8): 2788–2795]
- LI M M, JIANG T, KHUMBANYIWA D D, *et al.* Reconstructing habitat history of *Coilia nasus* from the Hexian section of the Yangtze River in Anhui Province by otolith microchemistry. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017a, 41(5): 1054–1061 [李孟孟, 姜涛, Khumbanyiwa, 等. 基于耳石微化学的长江安徽和县江段刀鲚生境履历重建. *水生生物学报*, 2017a, 41(5): 1054–1061]
- 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. *Journal of Lake Sciences*, 2017,

- 29(4): 914–922 [李秀启, 丛旭日, 师吉华, 等. 耳石镉标记在识别鳊(*Aristichthys nobilis*)放流个体的可行性. 湖泊科学, 2017, 29(4): 914–922]
- LIU L, LIN L, LI C H, *et al.* Effect assessment of marine fishery stock enhancement: A review of the literature. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014(2): 133–137, 143 [刘璐, 林琳, 李纯厚, 等. 海洋渔业生物增殖放流效果评估研究进展. 广东农业科学, 2014(2): 133–137, 143]
- LUO G, ZHANG Z D. Problems and countermeasures of aquatic organisms proliferation and release in China. *China Fisheries*, 2015(3): 32–34 [罗刚, 张振东. 我国水生生物增殖放流存在的问题及对策建议. 中国水产, 2015(3): 32–34]
- NAVARRO A A, AFONSO J M, OLIVA V, *et al.* Evaluation of PIT system as method to tag fingerling of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.): Effects on growth, mortality and tag loss. *Aquaculture*, 2007, 272(S1): S294
- QIU C, JIANG T, CHEN X B, *et al.* Effectiveness of otolith strontium marking for juvenile *Cyprinus carpio*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, 30(6): 2093–2100 [邱晨, 姜涛, 陈修报, 等. 鲤稚鱼耳石镉标记效果. 应用生态学报, 2019, 30(6): 2093–2100]
- SCHRODER S L, KNUDSEN C M, VOLK E C. Marking salmon fry with strontium chloride solutions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1995, 52: 1141–1149
- SI F, REN J G, WANG Q L, *et al.* Strontium marking on otoliths of *Paralichthys olivaceus* based on immersion experiments. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019a, 26(3): 534–545 [司飞, 任建功, 王青林, 等. 基于浸泡法的牙鲆耳石镉标记技术研究. 中国水产科学, 2019a, 26(3): 534–545]
- SI F, WANG Q L, YU Q H, *et al.* Use of strontium chloride in otolith marking of Japanese flounder. *Progress in Fishery Sciences*, 2019b, 40(4): 65–72 [司飞, 王青林, 于清海, 等. 基于投喂法的牙鲆耳石镉标记. 渔业科学进展, 2019b, 40(4): 65–72]
- STURROCK A M, TRUEMAN C N, DARNAUDE A M, *et al.* Can otolith elemental chemistry retrospectively track migrations in fully marine fishes? *Journal of Fish Biology*, 2012, 81(2): 766–795
- 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*. *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. 中国水产科学, 2015, 22(4): 630–637]
- WALDMAN J R, DUNNING D J, MATTSON M T. Notes: A morphological explanation for size-dependent anchor tag loss from striped bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1990, 119(10): 920–923
- WALTHER B D, THORROLD S R. Water, not food, contributes the majority of strontium and barium deposited in the otoliths of a marine fish. *Marine Ecology Progress Series*, 2006, 311(8): 125–30
- WANG C, LIU W, ZHAN P R, *et al.* Exogenous Sr^{2+} sedimentation on otolith of chum salmon embryos. *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. 应用生态学报, 2015, 26(10): 3189–3194]
- 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. *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. 海洋学报, 2016, 38(6): 32–40]
- 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. *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. 生命科学, 2015, 27(7): 953–959]
- YAMADA S B, MULLIGAN T J, FAIRCHILD S J. Strontium marking of hatchery-reared coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*, Walbaum). *Journal of Fish Biology*, 1979, 14(3): 267–275
- YANG J, LIU H B. Otolith microchemistry of grey mullet *Mugil cephalus* from Chongming water in the Yangtze River estuary, China. *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. 中国水产科学, 2010, 17(4): 853–858]
- YANG W B, LI J L, ZHANG B, *et al.* Ecological service function and species selection of living aquatic resources enhancement. *Chinese Fisheries Economics*, 2009, 27(4): 88–96 [杨文波, 李继龙, 张彬, 等. 水生生物资源增殖的服务功能分析和品种选择. 中国渔业经济, 2009, 27(4): 88–96]
- ZHANG H, JIANG Y Z, YUAN X W, *et al.* Strontium labeling technique for otoliths of *Pseudosciaena crocea*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(6): 1270–1277 [张辉, 姜亚洲, 袁兴伟, 等. 大黄鱼耳石镉标志技术. 中国水产科学, 2015, 22(6): 1270–1277]
- ZHOU H X, GAN W X. Advances in fish labeling technology and its application in artificial proliferation and release. *Hubei Agricultural Sciences*, 2017, 56(7): 1206–1210 [周辉霞, 甘维熊. 鱼类标记技术研究进展及在人工增殖放流中的应用. 湖北农业科学, 2017, 56(7): 1206–1210]

Study of the Feasibility of Identifying the Group of Released *Liza haematocheila* by Using the Strontium Marking Method in Otoliths

WANG Shuo^{1,2}, ZHANG Bolun^{1,2}, GUO Biao^{1,2①}, JIANG Tao³,
CHEN Wei^{1,2}, YANG Jian³, GAO Yan^{1,2}, ZENG Xiangxi^{1,2}

(1. Tianjin Sea Fisheries Research Institute, Tianjin 300457, China;

2. Center for Marine Ranching Engineering Science Research of Tianjin, Tianjin 300457, China;

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

Abstract To study the feasibility of using the strontium marking method in otoliths to identify the group of released *Liza haematocheila*, juveniles with a total length of ~5 cm were immersed in four different concentrations (50, 100, 200, and 400 mg/L) of Sr^{2+} for 48 h to detect the Sr^{2+} sedimentation effect. A double ring marking experiment was also conducted: *L. haematocheila* juveniles with a total length of about 3 cm were immersed in seawater with Sr^{2+} concentrations of 200 mg/L, for 96 h. When the length of the first marked juveniles reached 5 cm, half of them were again immersed in seawater with Sr^{2+} concentrations of 100 mg/L, for 48 h. A significant peak was observed in EPMA (electron probe microanalysis) line transect analysis and a "high strontium marking ring" appeared in EPMA mapping analysis of *L. haematocheila* otoliths in all the marked treatments. Based on the results of the experiment and the marking efficiency, we suggest that a marking concentration of 50 mg/L Sr^{2+} could be used for strontium marking on otoliths of *L. haematocheila*. A well-structured double marking ring was observed in EPMA mapping analysis of *L. haematocheila* otoliths in double ring marking treatment, and the EPMA line transect analysis result of each ring in double-ring marking juveniles otoliths was the same as that in the corresponding monocyclic ring treatment. These results suggest that it is feasible to identify different groups of released *L. haematocheila* by changing the strontium marking times.

Key words *Liza haematocheila*; Otolith; Strontium marking; Concentration of Sr^{2+} ; Double ring mark

① Corresponding author: GUO Biao, E-mail: oucguobiao@163.com