

李 爽,李 耕,潘玉洲,等. 褐牙鲂幼鱼耳石上的外源 Sr 标记试验[J]. 江苏农业科学,2018,46(12):140-143.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.034

褐牙鲂幼鱼耳石上的外源 Sr 标记试验

李 爽¹, 李 耕¹, 潘玉洲¹, 张 力¹, 申旭东¹, 李忠红¹, 郑文军¹, 杨文波², 袁立来², 姜 涛³, 杨 健³

(1. 中国水产科学研究院营口增殖实验站, 辽宁营口 115004; 2. 中国水产科学研究院, 北京 100039;

3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/院长江中下游渔业生态环境评价与资源养护重点实验室, 江苏无锡 214081)

摘要:为探讨利用外源锶(Sr)在牙鲂耳石上进行人工标记的可行性以及最适浓度,配制了不同浓度 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液(对照组浓度为 0, 试验组浓度为 8、12、16、20 mg/L),再将褐牙鲂幼鱼养于各浓度溶液中,进行 20 d 的浸染试验,之后移入正常水体中恢复养殖 20 d,最后利用 X 射线电子探针微区分析技术对其耳石 Sr 标记结果进行确认。结果表明,浸染组鱼耳石上能形成十分明显的红色环带,对照组则无变化。整体上 Sr 在牙鲂耳石上的沉积量与水体中锶的浓度呈正相关,对 8~16 mg/L 组观察,耳石 Sr/Ca 的峰值会随浸染浓度增加而增大;但在 16~20 mg/L 组, Sr/Ca 的峰值变化不明显。所有试验组幼鱼经恢复养殖后耳石 Sr 水平均能降到与对照组的一致。以上结果表明,利用外源 Sr 标记对褐牙鲂这种海生鱼类而言可行,且符合放流标记技术要求,对褐牙鲂而言最佳暴露浓度应以 16 mg/L 为宜。

关键词:耳石;褐牙鲂;电子探针;锶标记;最适浓度;侵染试验;沉积;放流标记技术

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)12-0140-04

耳石是硬骨鱼类内耳中的一种硬组织,作为一种生物矿

收稿日期:2017-09-12

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(编号:2014A07XK08);温带区海参优质种质资源的引进与应用(编号:2130106);中国水产科学研究院基本科研业务费专项(编号:2010C004)。

作者简介:李 爽(1980—),男,黑龙江哈尔滨人,硕士,工程师,主要从事遗传育种、海珍品等养殖品种的增殖放流、技术推广等工作。
E-mail:lishuangzb6@163.com。

通信作者:李 耕,硕士,高级工程师,主要从事增殖放流、推广等工作。
E-mail:lishuangzb6@163.com。

物伴随着鱼类生长的同时,其能以微化学“指纹”或者微结构特征等形式记录鱼类生活史过程中的全部生境履历信息^[1-3]。鱼体生长环境的水化学特征的变化导致耳石组成元素发生变化,从而形成耳石上的元素环带 X 射线电子探针微区分析技术(EPMA)能够快速分析固相介质表面的元素种类及含量,具有测试精度高、检测点密度大、能保持耳石样品信息完整等优点,为相应元素的检测分析提供技术保障^[4]。由于在不同盐度水体中鱼类耳石上源自生境的锶(Sr)元素沉积水平差异明显,因此利用耳石上 Sr 含量和 Sr/Ca 的值等指标具有有效推演鱼类生活史、重建水体环境变化、识别不同种群的潜力^[5-8]。除此之外,利用耳石生长的一些特性(如从受

[7]王洪斌,宋秀梅,郑金龙,等. 日本鳎对水环境中草甘膦致毒胁迫的生理应答[J]. 农药,2013,52(7):515-518.

[8]史建华,刘智俊,陆锦天,等. 草甘膦对中华绒螯蟹幼蟹的毒性影响[J]. 水产科技情报,2015,42(5):239-242.

[9]章跃陵,王三英,刘光明,等. 南美白对虾血蓝蛋白对酚氧化酶活性的影响[J]. 中国水产科学,2005,12(4):402-406.

[10]Ashida M. Purification and characterization of pre-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1971, 144(2):749-762.

[11]刘晓伟,席貽龙. 百草枯和草甘膦对多刺裸腹蚤的毒性效应[J]. 生态学杂志,2012,31(8):1984-1989.

[12]徐 怡,刘其根,胡志军,等. 10 种农药对克氏原螯虾幼虾的急性毒性[J]. 生态毒理学报,2010,5(1):50-56.

[13]姚翠鸾,王志勇,相建海. 甲壳动物血细胞及其在免疫防御中的功能[J]. 动物学研究,2006,27(5):549-557.

[14]Xian J A, Wang A L, Ye C X, et al. Phagocytic activity, respiratory burst, cytoplasmic free Ca^{2+} concentration and apoptotic cell ratio of haemocytes from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* under acute copper stress[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2010, 152(2):182-188.

[15]Gallo C, Schiavon F, Ballarin L. Insight on cellular and humoral components of innate immunity in *Squilla mantis* (Crustacea, Stomatopoda) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(3):423-431.

[16]Yoganandhan K, Thirupathi S, Hameed A S. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus* [J]. Aquaculture, 2003, 221(1/2/3/4):1-11.

[17]乐亚玲. 铜绿微囊藻及微囊藻毒素对克氏原螯虾的毒性作用[D]. 上海:上海海洋大学,2011:20-30.

[18]徐海圣,徐步进. 甲壳动物细胞及体液免疫机理的研究进展[J]. 大连水产学院学报,2001,16(1):49-56.

[19]陆宏达,刘 凯,张明辉. 中华绒螯蟹血淋巴中酚氧化酶的部分生化特性[J]. 上海水产大学学报,2007,16(3):236-241.

[20]Dong C, Zhao J, Song L, et al. The immune responses in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* challenged with double-stranded RNA [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(3):438-442.

[21]Zhao L L, Yang X Z, Cheng Y X, et al. Effects of histamine on survival and immune parameters of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. Journal of Shellfish Research, 2014, 31(3):827-834.

精卵开始耳石即开始形成、一旦形成后不会发生重吸收现象等),外源 Sr 标记技术也日益受到重视。然而,我国目前海水鱼类耳石外源 Sr 标记技术尚有待系统研究。

褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)别称牙片、偏口、比目鱼,是冷水性、底栖的名贵海产经济鱼类,是北方沿海重要的海水养殖鱼类之一。褐牙鲆个体大、肉质细嫩鲜美、营养丰富、蛋白质含量高、易于消化,是做生鱼片的好材料,深受消费者的喜爱,市场十分广阔,经济价值很高。牙鲆曾在我国的渔业史上占有重要地位,20 世纪七八十年代褐牙鲆的捕获量为 2 000 t/年。近二三十年来,由于过度捕捞和环境污染造成自然资源大幅度下降,中国牙鲆人工繁育的研究开始于 1959 年,20 世纪 70 年代才进入苗种生产研究,1992 年以后牙鲆人工养殖发展迅速,目前山东、辽宁、河北、江苏、浙江等地都开展了牙鲆的人工养殖,除了开展网箱养殖和池塘养殖外,正在大力发展大规模的工厂化养殖,并取得了很好的经济效益和社会效益^[9]。增殖放流在牙鲆资源的恢复中起到重要作用,探寻一种高效、稳定、安全的标记方法显得尤其重要。本研究尝试通过对褐牙鲆幼鱼阶段添加外源 Sr,并利用 EPMA 检测 Sr 在耳石上的沉积情况,一方面分析外源 Sr 标记技术在海水鱼放流标记工作方面的可行性,另一方面尝试探讨褐牙鲆外源 Sr 标记的最佳标记浓度。相关研究结果不仅可为拓展海水鱼类耳石外源 Sr 标记技术提供一个重要的实例,同时也可作为褐牙鲆放流标记探寻一种更加客观而有效的途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试验设计

2016 年 4 月本研究在中国水产科学研究院营口增殖实验站望海科研试验基地进行,试验鱼为实验站望海试验基地人工孵化后的仔鱼,培育 50 d 后再开始试验,配置不同外源 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (天津市大茂化学试剂厂)浓度 0、8、12、16、20 mg/L 等 5 组。试验方案是每组 2 个平行,共 10 个养殖水槽。1 号组对应 0,2 号组对应 8 mg/L,依次类推至 5 号组对应 20 mg/L。将提前配置不同外源 Sr 浓度养殖用水放入对应标志的养殖水槽中,并分别放入健康鱼苗 30 尾。浸染 20 d,各组换水 2 次/d,换入水为对应浓度 Sr 换水换水量为 100%,吸底 2 次/d,投饵 2 次/d,饵料为新鲜的卤虫,20 d 后在自然水体中恢复养殖 20 d,操作方法与前期相同,恢复养殖 20 d 后每组随机取 5 尾送检。耳石分析测试在中国水产科学研究院淡水渔业研究中心进行。

1.2 样品采集、处理与分析

采样后在解剖镜下将矢耳石取出,清洗后晾干,置于培养板中备用。耳石先包埋,待树脂凝固后取出,用 AB 胶将其粘贴于载玻片上,使用 500 目砂轮和 1 200 目砂纸打磨耳石至核心即将暴露后,使用磨抛机装备机抛光,至耳石表面无明显划痕;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,使用真空镀膜机蒸镀碳膜。

该研究利用电子微探针分析仪进行定量线分析和面分布分析。参考 Yang 等的方法^[10-11],从耳石核心沿耳石最长径至边缘连续测定 Sr/Ca 含量。

数据处理利用 Excel 2007 软件进行线分布分析中的平均值和倍数计算以及 Sr/Ca 的值变化作图。耳石中的锶含量远

小于钙含量,按惯例 Sr/Ca 经过标准化的比值,即 $(\text{Sr}/\text{Ca}) \times 10^3$ ^[11]。

1.3 仪器和设备

磨抛机(LaboPol-35,丹麦 Struers 公司);真空镀膜机(JEE-420,日本电子株式会社);电子微探针分析仪(JXA-8100 型 EPMA,日本电子株式会社)。

1.4 数据处理

利用 Excel 2007 软件进行线分布分析中的平均值和倍数计算以及 Sr/Ca 值变化作图,采用 SPSS 17.0 软件进行不同阶段及与对照组的 Sr/Ca 值差异显著性分析,显著性水平设定为 0.05。耳石中的锶含量远小于钙含量,按惯例 Sr/Ca 经过标准化的比值,即 $(\text{Sr}/\text{Ca}) \times 10^3$ ^[11]。

2 结果与分析

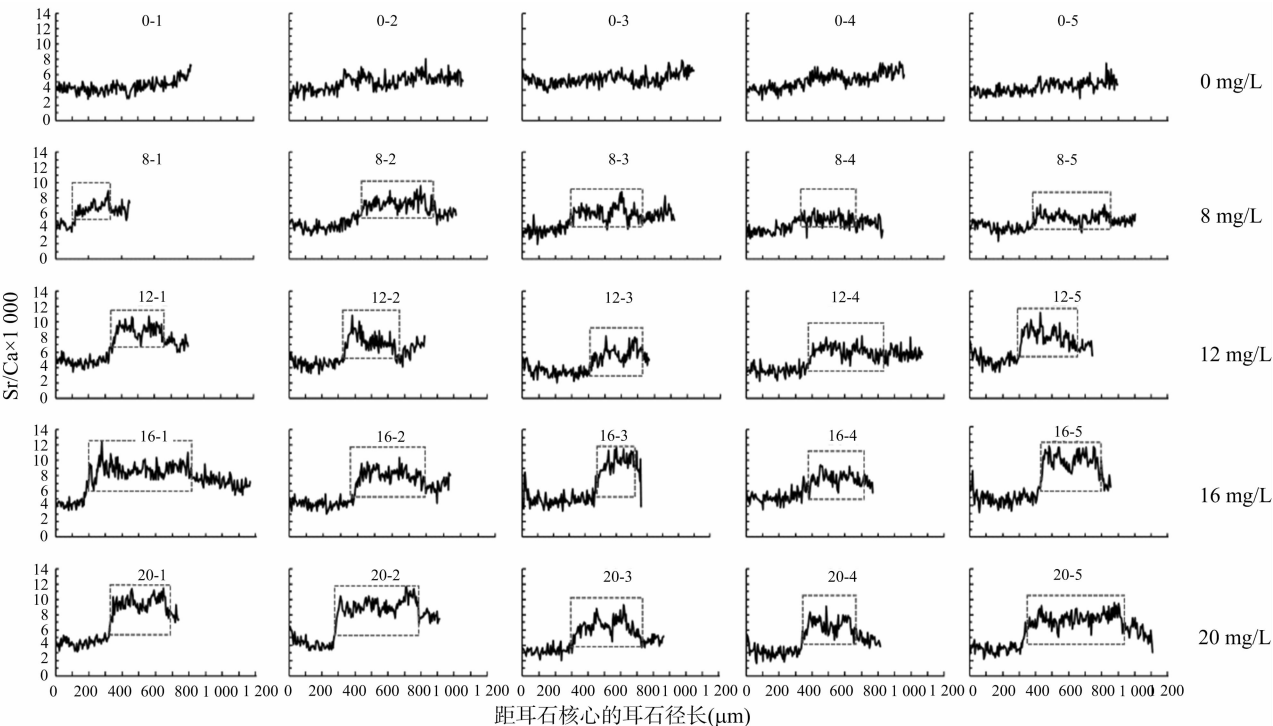
2.1 外源 Sr 在褐牙鲆耳石上线分析的 Sr/Ca 值

由图 1 和表 1 可知,空白组即 0 mg/L 组试验鱼的耳石 Sr/Ca 的值变化不明显,而 8 ~ 20 mg/L 组试验鱼的耳石 Sr/Ca 的值变化十分明显,根据图 2 不同色区的分布可大致将试验鱼的生长分为 3 个色区阶段。8 mg/L 组第一阶段的色区为从耳石核心沿矢状边缘方向的 0 ~ 440 μm 范围,Sr/Ca 的值与空白组基本一致;第二阶段的色区为从耳石核心沿矢状边缘方向的 440 ~ 870 μm 范围,Sr/Ca 的值基本达到最高;第三阶段的色区从耳石核心沿矢状边缘方向的 870 μm 至耳石最长轴边缘,其 Sr/Ca 的值逐渐降低并逐渐趋向第一阶段的 Sr/Ca 的值。12 mg/L 组第一阶段的色区平均为 0 ~ 350 μm 范围,Sr/Ca 的值与空白组基本一致;第二阶段的色区平均在 350 ~ 670 μm 范围,Sr/Ca 的值基本达到最高;第三阶段的色区平均为 670 μm 至耳石最长轴边缘,Sr/Ca 的值逐渐降低并逐渐趋向第一阶段的 Sr/Ca 的值。16 mg/L 组第一阶段的色区平均为 0 ~ 390 μm 范围,Sr/Ca 的值与空白组基本一致;第二阶段的色区平均为 390 ~ 670 μm 范围,Sr/Ca 的值基本达到最高;第三阶段的色区平均为 670 μm 至耳石最长轴边缘,Sr/Ca 的值逐渐降低并逐渐趋向第一阶段的色区。20 mg/L 组平均第一阶段的色区平均为 0 ~ 350 μm 范围,Sr/Ca 的值与空白组基本一致;第二阶段的色区平均为 350 ~ 720 μm 范围,Sr/Ca 的值基本达到最高;第三阶段色区平均为 720 μm 至耳石最长轴边缘,Sr/Ca 的值逐渐降低并逐渐趋向第一阶段的 Sr/Ca 的值。

不同浸染浓度 Sr/Ca 的值微化学变化详细信息见表 1,经外源 Sr^{2+} 干扰后,可将耳石 Sr/Ca 分为明显的 3 个阶段。其中,第一阶段的 Sr/Ca 均值与对照均无显著差异,处理组第二阶段的 Sr/Ca 均值、峰值均显著高于相应的第一阶段($P < 0.01$),而比值变动不大的第一阶段与第三阶段没有显著性差异,通过组间比较可以发现 16、20 mg/L 的 Sr 峰比较接近,几乎无差异,故利用人工标记时,可适当选择低浓度来降低标记成本。

2.2 外源 Sr^{2+} 在褐牙鲆耳石上的面分布

由图 2 所示,褐牙鲆在不同浓度的 Sr^{2+} 水体中浸染 20 d,再恢复到自然水体中再养殖 20 d,在耳石上能形成极为明显的红色“高锶环带”,对照组无变化。同时,“高锶环带”明显随着外源水体浓度升高和时间的推移而“变宽”并且恢复至



虚线框所示为外源高 Sr 标记区。0~1、0~2 分别表示 0 mg/L 组中第 1、2 条样本鱼，依次类推。

图1 不同外源 Sr 标记水平下的褐牙鲈耳石从核心(0 μm)至边缘的 Sr/Ca 比值变化

表 1 褐牙鲈耳石中锶钙含量比值的变化

外源 SrCl ₂ ·6H ₂ O 浓度 (mg/L)	比显著变化阶段	耳石径长	在图 2 中对应的色区
0	1	0 ~ 360 μm	蓝色同心环区域
	2	360 μm 至耳石最长轴边缘	绿色同心环区域
8	1	440 ~ 870 μm	蓝色同心环区域
	2	870 μm 至耳石最长轴边缘	红色同心环区域
	3		绿色同心环区域
12	1	0 ~ 350 μm	蓝色同心环区域
	2	350 ~ 670 μm	红色同心环区域
	3	670 μm 至耳石最长轴边缘	绿色同心环区域
16	1	0 ~ 390 μm	蓝色同心环区域
	2	390 ~ 670 μm	红色同心环区域
	3	670 μm 至耳石最长轴边缘	绿色同心环区域

正常水体后, 锶环带缓慢从红色经黄色向绿色转变, Sr/Ca 的值逐渐降低。表明外源 8 ~ 20 mg/L 浓度的 SrCl₂·6H₂O 均能在牙鲈耳石上大量沉积, 且锶环带颜色与外源锶浓度呈正相关, 在浸染结束后仍能持续向耳石上沉积一段时间, 并可恢复至初始水平。

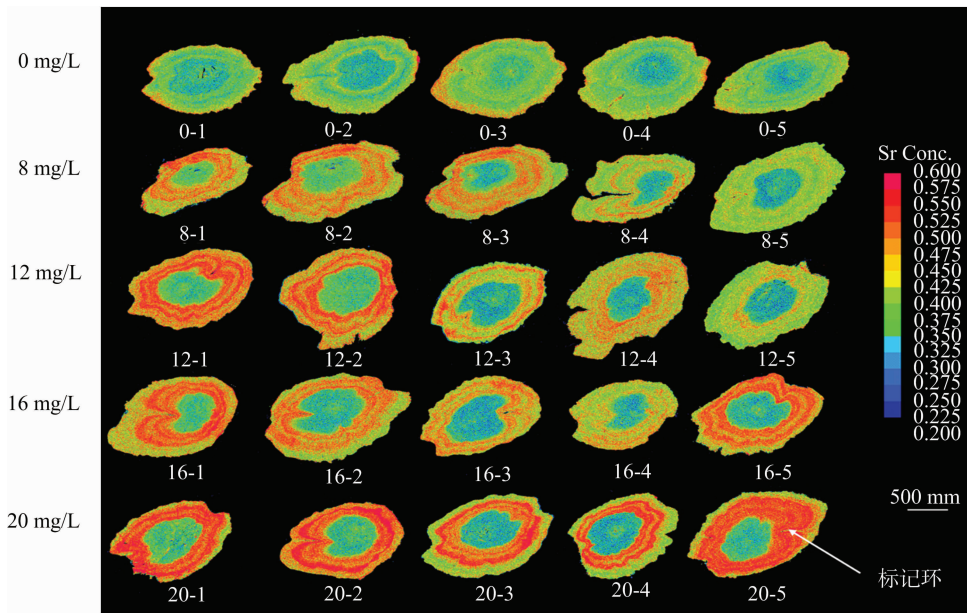
3 讨论与结论

EPMA 作为一种有效测定固相微区元素成分的技术, 在材料科学、矿物学等领域应用广泛^[11-13]。近年来, 随着对鱼类耳石的生态学意义的不断研究, 耳石微化学与鱼类生活史信息间的关系得以论证。因此, EPMA 分析技术也被引入到了鱼类生态学研究, 并凭借交叉学科的优势使其在海洋^[5]、河口^[11]、洄游性^[10]鱼类的生境履历反演、产卵场群体

的识别^[14-15]以及淡水鱼类^[16-17]和洄游性鱼类^[18]增殖放流标记等方面取得了许多突破性的成果。

通常情况下, 鱼类耳石中锶、钙含量的比值与水体盐度具有正相关性^[19], 借此可以通过分析耳石上 Sr/Ca 的值来研究鱼体的生活水环境盐度, 进而反演其生境履历信息, 讨论其时空分布动态以及群体组成情况等。因此, 通过人为控制鱼类的生活水体中的 Sr 浓度也必然会在耳石上产生印记, 这也得到了本研究结果的证实。在 20 d 浸染试验后, 耳石上 Sr 浓度高峰一直持续到接近边缘, 再将其恢复到正常水体养殖 20 d 后能回到正常水平。从浸染开始时到 Sr 在褐牙鲈耳石上沉积有延时过程, 在含有不同浓度的 Sr²⁺ 水体中浸染 20 d, 恢复到正常水体中养殖 20 d, 而 Sr 浓度峰区却持续了 20 d 以上, 在正常水体中养殖时, Sr 浓度峰区依旧存在, 仍能持续向耳石上沉积一段时间。表明 Sr 元素从水体到耳石的沉积过程是循序渐进的。姜涛等分析刀鲚 (*Coilia nasus*) 在快速向淡水洄游后耳石 Sr/Ca 的值也并不能很快下降至淡水水平^[17]。在整个试验进程中, 试验鱼都能保持正常生长、摄食, 未产生明显的应激反应。王臣等在大麻哈鱼耳石 Sr 标记工作的结果显示, 即使在 50 ~ 400 mg/L 这样含量极高的外源 Sr 条件下, 试验鱼依旧未产生明显的应激反应或毒性反应, 并且之后耳石上的 Sr 含量能恢复到正常水平^[18], 说明其急性毒性风险也较小。而 Sr 本身亦作为生物的必需元素^[17], 由此可见本研究所用 0 ~ 20 mg/L 外源 Sr (SrCl₂·6H₂O) 进行褐牙鲈耳石标记工作应该是安全、可行的。

外源 Sr 在褐牙鲈耳石上沉积的特点能很好地吻合对鱼类放流标志的要求, 使人工控制外源 Sr 在耳石上做明显的“锶元素标记”成为可能。该标记方法与其他内源性标记方法相比操作简便, 利用精密的 EPMA 技术检测准确, 从 Sr/Ca



白色箭头所指为红色环带为外源高 Sr 标记区

图2 不同外源 Sr 标记水平下的牙鲈耳石锶含量的面分析

高峰的出现而言是很稳定的,应该是我国牙鲈放流标志的新方向。值得注意的是,为今后更好地于褐牙鲈增殖放流标记工作中利用该技术,如何筛选所需标记用 Sr 的最佳剂量、最佳浸染时间,以及如何去评估 Sr 富集对于牙鲈水产品安全是否会产生影响等很多问题还需要在下一步的研究中得到有针对性的探讨。

参考文献:

- [1] Begg G A, Campana S E, Fowler A J, et al. Otolith research and application; current directions in innovation and implementation[J]. Mar & Fresh Res, 2005, 56(5): 477–483.
- [2] Tzeng W N, Tsai Y C. Changes in otolith microchemistry of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, during its migration from the ocean to the river of Taiwan[J]. J of Fish Biol, 2010, 45(4): 671–683.
- [3] 窦硕增. 鱼类的耳石信息分析及生活史重建——理论、方法与应用[J]. 海洋科学集刊, 2007(48): 93–113.
- [4] 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.
- [5] 熊 瑛, 刘洪波, 刘培廷, 等. 基于耳石元素微化学的江苏吕泗近岸小黄鱼生境履历重建[J]. 应用生态学报, 2014, 25(3): 836–842.
- [6] Townsend D W, Radtke R L, Morrison M A, et al. Recruitment implications of larval herring overwintering distributions in the Gulf of Maine, inferred from a new otolith technique[J]. Mar Ecol Prog, 1989, 55(1): 1–13.
- [7] Secor D H, Rooker J R, Zlokovitz E, et al. Identification of riverine, estuarine, and coastal contingents of Hudson River striped bass based upon otolith elemental fingerprints[J]. Mar Ecol Prog, 2001, 211(4): 245–253.
- [8] 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]. 海洋与湖泊, 2011, 42(4): 512–520.
- [9] 陈四清, 刘东朴. 海水安全优质养殖技术丛书[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2008: 204–205.
- [10] Yang J, Arai T, Liu H, et al. 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[J]. Journal of Fish Biology, 2006, 69(4): 1120–1135.
- [11] 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.
- [12] 龚沿东. 电子探针 (EPMA) 简介[J]. 电子显微学报, 2010, 29(6): 578–580.
- [13] 李斌之. 微区分析技术电子探针的原理应用与溯源[J]. 计量与测试技术, 2011, 38(3): 26–28.
- [14] Zenitani H, Kimura R. Elemental analysis of otoliths of Japanese anchovy; trial to discriminate between Seto Inland Sea and Pacific stock[J]. Fisheries Science, 2007, 73(1): 1–8.
- [15] 陆化杰, 陈新军, 马 金. 西北太平洋柔鱼耳石微量元素[J]. 应用生态学报, 2014, 25(8): 2411–2417.
- [16] 李秀启, 丛旭日, 师吉华, 等. 耳石锶标记在识别鳙 (*Aristichthys nobilis*) 放流个体的可行性[J]. 湖泊科学, 2017, 29(4): 914–922.
- [17] 姜 涛, 周昕期, 刘洪波, 等. 鄱阳湖同时存在溯河洄游和淡水定居的刀鲚[J]. 水产学报, 2013, 37(2): 239–244.
- [18] 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.
- [19] Yang J, Jiang T, Liu H. Are there habitat salinity markers of the Sr : Ca ratio in the otolith of wild diadromous fishes? A literature survey[J]. Ichth Res, 2011, 58(3): 291.