

鱼类的耳石信息分析及生活史重建^{*}

——理论、方法与应用

窦硕增

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

耳石 (Otolith) 是硬骨鱼类 (Teleosts) 在生长过程中沉积在内耳中的结石, 主要矿物成分是 CaCO_3 , 起声音接收和平衡定向作用。其内部轮纹 (日轮 Daily ring 或年轮 Annular ring) 像在其他海洋动物特定钙化组织 (如瓣鳃类外壳、珊瑚骨骼、多毛类颌骨、乌贼内壳、哺乳动物牙齿) 中的轮纹一样随鱼类的发育而生长, 并沉积着现场水环境中的主要化学元素。由于在形成过程中其轮纹形态结构与化学组成相当稳定, 记录了鱼类个体生活过程中丰富的生物物理化学环境信息, 所以, 耳石信息分析可以揭示鱼类的生活史及其所经历的环境变化。在目前, 耳石信息分析的应用涵盖了鱼类生态学研究的诸多方面, 如鱼类的孵化和早期发育生长、产卵场和产卵期判定、仔鱼的运输过程 (Larval transportation)、年龄鉴定与种群鉴定 (Age determination & population discrimination)、个体迁移 (Migration) 等。近年来, 随着相关科学和技术的发展, 它已经成为一种揭示鱼类生活史、生活史重建 (Reconstruction of life history) 以及海洋环境域变 (Regime shift) 的关键技术, 也是国际上渔业科学和海洋环境科学的研究热点。过去 10 年内三次国际鱼类耳石学术会议的成功举办 (1993-Maryland-USA Secor et al., 1995 & 1998-Bergen-Norway Fossum et al., 2000, 2004-Townsville-Australia Begg et al., 2005) 大大推进了该研究领域的发展。其研究方向主要包括年龄鉴定与验证、显微结构分析 (Microstructure) 和微化学分析 (Microchemistry) (Stevenson et al., 1992; Secor et al., 1995 & Fossum et al., 2000; Campana, 1999, 2001; Elsdon et al., 2003 & Begg et al., 2005) 等。

我国在鱼类年龄生长方面的研究主要集中在 20 世纪 80 年代, 包括大黄鱼、小黄鱼、带鱼、鲱、鲈鱼、鲋鱼、马面、蓝园鲈、二长棘鲷等海洋经济鱼类 (徐恭昭等, 1962; 罗秉征等, 1981; 张其永、张雅芝, 1983; 吴鹤洲等, 1985; 陈大刚, 1991; 邓景耀等, 1991)。1990 年有关于鲈鱼、梭鱼、黑鲷、香鱼、草鱼、鳊鱼等仔鱼耳石日轮方面的研究报道 (李城华等, 1993; 常剑波等, 1994; 解玉浩等, 1995)。但近些年来, 耳石研究进展十分缓慢, 而年龄验证及微化学分析一直是空白。作者参考了近年来相关的主要研究 (Kalish 1991 & 1993; Campana, 1992, 1999, 2001, 2005; Secor et al.,

^{*} 通信作者: 窦硕增, 男, 研究员, 博士研究生导师现从事海洋鱼类综合生态学和渔业资源学研究; E-mail: szda@ms.qd.p.ac.cn

收稿日期: 2006 年 11 月 23 日。

1992, 1995; a, b Stevenson & Campana, 1992; Fowler et al., 1995; a, b Fossum et al., 2000; Eldon & Gillanders, 2003; a, b 2006; Begg et al., 2005), 重点介绍和评述这些耳石信息分析的理论、方法及应用, 以期为我国学者开展相关研究提供参考。

一、耳石年龄鉴定与验证

年龄是鱼类种群动力学研究 (Fish Population Dynamics) 的基本生物学参数。从简单的个体生长规律 (如 von Bertalanffy 生长方程) 到死亡分析 [如实际种群分析 (Virtual Population Analysis)] 乃至各种资源评估和管理模型的建立 (如 Beverton-Holt 世代产量模型和 Ricker 分析模型), 都不能缺少年龄这一关键参数。所以, 年龄鉴定问题直接关系到鱼类种群分析与资源评估的成功与否问题。

鉴定鱼类年龄的基本方法是耳石年轮分析 (Beamish & McFarlane, 1987; Casseman, 1987; Stevenson & Campana, 1992; Secor et al., 1995; a, Campana, 2001)。另外, 鱼体上其他一些钙化组织 (如脊椎骨、鳞片、鳍条和鳃盖骨) 上的轮纹标志也可以被用来识别鱼类的年龄与生长特征 (Cass & Beamish, 1983; Brown & Cruber, 1988; Robillard & Marsden, 1996)。耳石年轮分析就是解析鱼类个体在发育生长过程中, 耳石生长速度差异在其内部结构中记录下来的围绕着耳石核分布的周期性暗环区 (opaque zone) 和明环区 (translucent zone)。这些轮纹的形成与个体发育活动 (如摄食、生长和性成熟过程) 和环境因素 (如水温 and 饵料基础) 的周期性变动密切相关 (Beamish & Wilson, 1995; Francis & Horn, 1997)。它们在透射光或反射光下明暗分布规律明显 (Stevenson & Campana, 1992; Secor et al., 1995; a, Fossum et al., 2000; Begg et al., 2005)。所以, 耳石在经过切割、研磨、酸蚀、涂金后, 在光学显微镜或扫描电镜下可以比较直观地通过计测其断切面上的轮纹数来鉴定鱼类年龄或日龄, 通过测定年 (日) 轮之间的距离和观察其形态结构特征揭示鱼类个体或种群水平上的生长规律。

但是, 由于并非所有硬骨鱼类的耳石都完整而有规则地记录其整个生活史的生物-环境信息, 加之耳石轮纹结构的复杂性及轮纹识读者的主观性, 鱼类年龄被高估或低估的情况时常发生 (Campana, 2001; Brown et al., 2004)。这些年龄鉴定误差小则引起种群分析和资源评估的偏差, 大则导致资源管理的失策和混乱。例如, 过去人们一直认为新西兰近海的大西洋胸棘鲷 *Hoplostethus atlanticus* 寿命为 20~30 岁, 其资源补充相对快, 所以在一段时间里被大量密集捕捞 (Van, 1983)。最近 Smith 等 (1995) 发现该鱼种寿命长达 100 多年, 且生长极其缓慢, 密集型捕捞作业模式显然不适合该渔业的资源开发和管理, 但目前该鱼种资源已经因过度开发而几乎消失殆尽。因此, 年龄鉴定的准确性验证或年龄验证 (Age validation) 问题在鱼类种群分析和资源评估与管理研究中至关重要。自 20 世纪 80 年代初鱼类年龄验证问题被正式提出以来 (Beamish & McFarlane, 1983), 研究者们开始围绕着这一科学问题, 从方法论上做了许多探索性研究, 建立了一些有效的研究方法。最近, Campana (2001) 对近 20 多年来有关鱼类耳石年龄验证方面的研究进行了综合评估和分析, 主要有以下 6 种方法。

1. 标志放流验证法 (Release of known age and marked fish)

对幼鱼 (0^{+} 龄) 进行标志后放流至天然水域, 因为这些鱼类在放流后的生活履历基本反映了其自然种群的生活过程, 所以, 被重捕的标志鱼类 (年龄已确认) 的耳石年轮及其形态结构信息可以用来校对或验证自然种群的年龄结构。这种方法可靠性和操作性高, 适合于人工饲养成功、洄游或迁移路线明确、寿命短、重捕率较高的鱼类 [如: 香鱼 *Plecoglossus altivelis* (Tsukamoto 1988)、欧洲鳗鲡 *Anguilla anguilla* (Sveding et al., 1998)], 鲑科鱼类 *Salmonidae* (如: 大马哈鱼属四类 *Oncorhynchus* spp (Courtney et al., 2000)) 等。标记方法包括: 代码标记法 Coded wire tagging (Quinn et al., 1991)、大规模化学标记物浸染法 Chemical immersion mass marking (Geffen 1992, Tsukamoto 1995) 和温度标记法 Thermal marking (Geffen 1992, Negus 1999, Volk et al., 1999) 等。

目前许多国家开展了多鱼种的放流研究, 如: 对大马哈鱼类的规模化资源增殖活动并取得了较高的回捕率 (Tsukamoto 1988, 1995, Volk et al., 1999, Courtney et al., 2000)。对阿拉斯加鲑鳟鱼增殖放流计划 (Alaska Salmon Enhancement Program) 在 2003 年放流规模已经达到 15 亿尾幼鱼, 回捕放流鱼类 7300 万尾, 占该州捕获的 1 亿 7000 万尾鲑鳟鱼类的 43%。鱼类的标志放流技术日臻完善, 这为本研究方法的推广应用提供了良好的技术保证。

2. 核放射性碳 ^{14}C 年代计验证法 (Bomb radiocarbon chronometry)

自 20 世纪 50 年代末到 70 年代初由于核试验导致大气内 ^{14}C 骤增后逐渐下降, 而 ^{14}C 通过海气相互作用传输至海洋并以溶解无机碳 (Dissolved inorganic carbon, DIC)、溶解有机碳 (Dissolved organic carbon, DOC)、颗粒有机碳 (Particulate organic carbon, POC) 等形式进入海水中, 它们通过鱼类的摄食或呼吸进入鱼体并沉积在鱼类的骨骼或耳石中 (Levin et al., 1992, Kalish 1993)。Kalish (1993) 提出, 鱼类耳石核内 (1 龄以内形成的耳石区) ^{14}C 的沉积含量的时空变化方式与大气或海洋环境中 ^{14}C 的分布方式密切相关, 所以是一个表征鱼类出生时间的稳定指标。而全球或区域性大气圈或海洋物质 (如: DIC, DOC, POC, 鱼类耳石、珊瑚骨骼和瓣鳃类的外壳) 内 ^{14}C 含量的时间系列分布资料的累积和共享为该方法的有效实施提供了参照基准 (Kalish 1995a, b, Kerr et al., 2004)。

首先通过切割和研磨取得耳石核样品 (以 0^{+} 龄幼鱼耳石为基准), 在真空中通过与 100% 的磷酸化学反应把样品中的碳转换成 CO_2 。取一定比例的 CO_2 用于 $\delta^{13}\text{C}$ 水平分析, 剩余部分在铁催化剂作用下与过量 H_2 反应转化成石墨后在加速器质谱 (Accelerator mass spectrometry, AMS) 上测定 ^{14}C 水平 (即 $\Delta^{14}\text{C}$)。对鱼类耳石核区中 $\Delta^{14}\text{C}$ 和依据轮纹测定的出生年份 (年龄分析) 进行比较分析得到鱼类耳石核区中 $\Delta^{14}\text{C}$ 随出生年龄变化的时间系列分布趋势, 利用该分布趋势与已知的同时期内相关环境或海洋生物骨骼、耳石或外壳内 $\Delta^{14}\text{C}$ 参照基准的相关度验证常规轮纹法鉴定年龄的准确性。Kalish (1995a, b) 发现, 核爆炸之后出生的鱼类耳石核内 $\Delta^{14}\text{C}$ 水平超过 -20% , 之前出生的鱼类耳石核内 $\Delta^{14}\text{C}$ 水平一般小于 -30% 。该方法在鉴定 1960 ~ 1970 年之间出生的鱼类年龄时灵敏性

最高, 精度可达 1~3^a, 其中 60 年中期出生的鱼类的年龄鉴定可精确到几个月 (Kalish 1995^a b, Campana 2001)。

由于目前对核辐射 $\Delta^{14}\text{C}$ 在深海中传递行为尚缺乏充分的科学认知, 该方法主要用于寿命相对长 (数十年以上、年轮密集而难以用常规方法准确计测其年龄)、出生于 1958~1970 年之间的中上层鱼类 (生活于 200~300m 以内水层) 的年龄验证。如: 金头鲷 *Pagrus auratus* (Kalish 1993)、拟棘鲷 *Centrobery's affinis* (Kalish 1995 b)、蓝鳍金枪鱼 *Thunnus maccoyii* (Kalish et al., 1996)、新西兰银无须鳕 *Macrurus novaezealandiae* (Kalish et al., 1997)、黑线鳕 *Melanogrammus aeglefinus* (Campana 1997)、多须石首鱼 *Pogonias cromis* (Campana & Jones, 1998)、羽背石斑鱼 *Sebastes ruberrimus* (Kerr et al., 2004) 莒鲈 *Sebastes paucispinis* (Andrews et al., 2005) 等鱼种。

3. 放射化学测定年代法 (Radiochemical dating)

通过耳石核内放射性同位素衰变 ($^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$) 作为该方法的依据原理。它有 4 个假定条件 (Campana 1999, Kestelle et al., 2000): ①耳石中的放射性化学物质组成是封闭的, 即除了其本身的化学衰变外, 其含量没有其他变化, 且它们在耳石中不发生迁移 (如从核区迁移至外缘区); ②从外界进入耳石的子体同位素量与衰变生成量相比可以忽略不计; ③同位素及其子体同位素的获取速度与耳石的质量累计速度保持一种稳定的比例状态; ④耳石质量的生长速度或者一定, 或者其变化速度是可知的。具体方法是先测定鱼类耳石核中 ^{226}Ra 和 ^{210}Pb 的活性, 然后根据以下方程计算鱼类的年龄 (t): $A_2/A_1 = 1 - e^{-\lambda t} + R e^{-\lambda t}$, 其中, A_1 和 A_2 分别是鱼类耳石核中 ^{226}Ra 和 ^{210}Pb 的活性, λ 是 ^{210}Pb 的衰变常数, R 是 $^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$ 活性比的初始基准。

样品的制备和分析过程包括: ①耳石核摘取。耳石经过切割 (如 Buehler Isomet Low Speed saw, Struers Discoplan TS) 去掉核区外缘部分、研磨和抛光 (如 Buehler Ecomet Grinder/Polisher, Struers Rotopol 35) 后在 70% 的去离子蒸馏水酒精溶液中保存。②除污。进行同位素分析前, 样品耳石核经过在超音波清洗机 (如 Branson ultrasonic cleaner) 用去离子蒸馏水清洗数次后, 依次通过 30% 过氧化氢溶液、0.05 M 乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液和 0.1 M 的盐酸溶液再除污, 干燥后的样品称重、备用 (Fenton et al., 1991)。③同位素分析。因为鱼类耳石中 ^{210}Pb 与 ^{210}Po 基本达到沉积平衡, 所以, 其活性通常利用阿尔法谱法 (Alpha spectrometry) 测定 ^{210}Po 的活性完成。 ^{226}Ra 的活性则通过闪烁腔 (Lucas cell) 测定其子体同位素 ^{222}Rn 实现, 或利用热电离质谱法 (Thermal ionization mass spectrometry TMS) 直接测定其活性。对比分析用该方法测定的年龄与耳石轮纹法测定的年龄之间的相关性, 验证年龄鉴定的准确性 (Bennett et al., 1982, West & Gauldie, 1994, Burton et al., 1999, Kestelle et al., 2000, Andrews et al., 2005)。

该方法的可操作性、准确性和稳定性较高, 适合高寿命鱼类的年龄鉴定或验证, 如: 鲈科 *Scorpaenidae* 鱼类 (Bennett et al., 1982, Kestelle et al., 2000, Andrews et al., 2005) 的大西洋尖吻平鲈 *Sebastes mentella* (Campana et al., 1990), 新西兰银无须鳕 (Fenton et al., 1990), 大西洋胸棘鲷 (Fenton et al., 1991)、黑鳕 *Anoplopoma fimbria* (Kestelle et al., 1994) 等。在实际操作过程中, 耳石核区及 $^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$ 活性比的初始基

准(R)的确立是直接影响到测定结果精度的关键。理论上, 鱼类出生时形成的耳石部分的放射性同位素信息最能反映鱼类的实际年龄, 但由于这部分耳石一般难以满足同位素测定所需的最小样品量(大于1 g), 加之目前尚欠缺准确摘取该区样品的手段, 所以, 通常以尽量低龄幼鱼的耳石为参照耳石核, 以其中的 $^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$ 活性比为初始基准。Kastelle等(2000)在对5种鲉科鱼类测定年龄时, 就是以3龄左右幼鱼的耳石为参照耳石核。另外, 在制备各龄鱼类的耳石核(分析用样品)时一定要尽量接近参照耳石核的大小, 否则, 鱼类年龄会因测定样品与参照样品的年龄差异而被高估或低估。耳石中的 $^{232}\text{Th}/^{228}\text{Ra}$ 也可以用于尖头文鳐鱼(*Himnichthys affinis*)等鱼种的年龄鉴定和验证(Campana et al., 1993), 但由于对耳石中 ^{228}Th 的分析方法尚不够完善, 有关该指标的研究报道较少(Smith et al., 1991)。

4. 化学标志重捕法(Mark-recapture of chemically-tagged fish)

通过浸染、注射或投喂等方式把一些化学物质标记在放流仔幼鱼的耳石内。如: 茜素氨络合剂(Alizarin complexone, ALC)、钙黄绿素(Calcein, CAL)、盐酸土霉素(Oxytetracycline, OTC)、氯化锶(Strontium chloride)等。它们在荧光或紫外光(UV)下呈现明亮的标记环, 用于标记放流时耳石边缘区和年龄。通过解析重捕鱼类(年龄已知)耳石的标记环以外生长区或轮纹结构可以比较准确地揭示天然生活条件下鱼类耳石生长、形成周期和年龄(Wilson et al., 1987; Geffen 1992; Secor et al., 1995; Thomas et al., 1995; Tsukamoto 1995; Campana 1999)。

化学标志效果与标记对象、化学标志物和标记方法密切相关。如 OTC标记通常有盐酸土霉素溶液浸染法和土霉素注射法。但注射法可能导致土霉素在鱼类血液中的残留而在耳石上形成多个副环(Geffen 1992), 影响识别效果。ALC浸染标记在荧光和白光条件下均呈现明亮环带, 容易观察, 但研究发现在某些鱼种(如红鱼和香鱼)注射 ALC时, 耳石上不能形成明显的标志环(Thomas et al., 1995)。投喂上述化学物质标记物均能有效地在耳石上形成标记环, 且可以通过调节投喂时间在同一个个体的耳石上形成多重标记环, 表征不同的标记年龄。也有学者利用氯化锶溶液浸染法通过锶含量变化标记耳石。但锶含量的检测需要元素分析(如: ICPMS和 EIMA)来实现, 操作起来不如荧光检测方便(Wilson 1995)。受精卵和仔鱼一般用溶液浸染法标记, 成鱼常用化学注射法标记, 两种方法均适合标记稚鱼。当然, 不论哪种化学标记方法, 在操作时应特别注意化学标记物的剂量和处理时间问题, 因为这不但关系到标志效果, 还直接影响到标志鱼类放流后的存活和生长质量。

鱼类耳石化学标记研究兴起于20世纪80~90年代, 经过近些年的发展和完善, 该方法已经成为研究鱼类年龄(日龄)和耳石生长的主要有效手段之一, 尤其适合大规模标记放流(Mass marking)和高龄重捕鱼类的年龄和耳石生长研究。据统计, 迄今为止已开展相关研究的鱼类有近百种(Geffen 1992), 从淡水鱼类(鲤科鱼类 Cyprinidae; Muir et al., 1988)、海水鱼类(金头鲷; Francis et al., 1992)到洄游性鱼类(美洲鳗鲡 *Anguilla rostrata*; Oliveira 1996), 从单龄鱼类(香鱼; Tsukamoto 1988)到高龄鱼类(美国红鱼 *Sciaenops ocellatus*; Thomas et al., 1995), 从冷温性鱼类(马苏大马哈鱼 *Oncorhynchus tshawytscha*)到暖温性鱼类(大西洋鲑 *Salmo salar*)。

corhinichus masou Tsukamoto 1995 到暖水性热带珊瑚礁鱼类 (黄雀鲷 *Pomacentrus moluccensis* Fowler 1990) 均有相关研究报道。

5. 天然标记验证法 (Natural and date-specific markers)

在鱼类的生活过程中, 环境因素 (如: 温度和饵料基础) 的变动和海洋事件 (如: 厄尔尼诺现象) 的发生及其自身的生命活动 (如: 摄食和性成熟) 通常会影响着耳石的生长及形态结构的变化, 并在相应的耳石区记录下特定的“天然标记” (如: 温度标记 Thermal check, 性成熟标记 Onset of maturation check 和异速生长带如断裂带、窄带等)。Wilson & McGonigle (1997) 发现安邦雀鲷 *Pomacentrus amboinensis* 和长崎雀鲷 *P. nagasakiensis* 的耳石中存在着“着底轮” (Settlement mark), 它们形成于鱼类从浮游仔鱼转向底层生活时期, 可以作为研究这些鱼类在着底前后的年龄与生长的基准标记。MacLella 和 Saunders (1995) 则在加拿大卑诗省近海的太平洋无须鲷 *Merluccius productus* 1977 ~ 1979 年的个体耳石中发现由 1982 ~ 1983 年厄尔尼诺现象引起的第四年轮异速缓生长区。而 Francis 和 Horn (1997) 则发现新西兰近海的大西洋胸棘鲷耳石中存在性成熟时所形成的生长过渡区 (Transition zone at maturation), 并以此判定该鱼种的平均性成熟年龄约为 30 龄。这些“天然标记”也可以作为鱼类的年龄鉴定或验证的基准, 或用于解析鱼类生活过程中所经历的特定生活变化或环境变迁 (Campana, 2001)。但是, 由于这类“天然标记”是特定生活事件或环境事件在特定鱼种的特定生活阶段的耳石上记录下来的, 这种方法的适用范围受到较大限制, 一般用于特定种群的年龄验证或生活史研究。而一些常见的天然标记 (如: 孵化标记 Hatch check, 初次摄食轮 First feeding ring) 则常常被用作仔幼鱼的日龄验证基准。

6. 耳石边缘增长分析法 (Marginal increment analysis MIA)

该方法主要用于分析耳石明暗环区形成的时间和增长速度, 进行鱼类年龄验证鉴定。首先, 通过对逐月采集的鱼类个体的整个耳石或其横切面的常规轮纹年龄分析, 利用图像分析系统测定耳石基准轴方向上各连续暗环区之间的距离及最后一个暗环区到耳石外边缘之间的距离, 并记录边缘区的属性 (明环区或暗环区)。根据各耳石的外边缘区的宽度与离其最近的年轮环宽度的比率作为其相对增长量。对该增长量与取样时间进行相关分析, 再结合耳石形态结构, 分析年轮的形成时间和增长过程, 验证鱼类年龄 (Fowler & Short 1998)。而 Kersan (2000) 则利用 von Bertalanffy 生长方程、耳石长度、鱼体长度等关系, 首先建立预测年轮生长模型: $I_{x+1} = a + b \times I_r + c \times I_2 + \dots + z \times I_x$ (其中, I 是各年轮的增长宽度, x 是年轮数), 然后按照 $T_x = t + I_x / I_{x+1}$ (T 是实际年龄, t 是观测年龄, I_x 是 x 龄以后的耳石外边缘宽度, I_{x+1} 是预测年轮宽度) 计算鱼类的实际年龄。

MIA 方法的优点是取样比较简单, 是鱼类年龄验证研究中应用非常广泛的方法之一 (Beckman & Wilson 1995)。但 Campana (2001) 在对过去已发表的相关研究进行分析后发现, MIA 也可能是可靠性低但又最容易被滥用的方法之一, 它常常低估了鱼类的年龄。年轮形成机理的不明、边缘增长区测定技术的不完善、种间或种内个体的耳石内部

结构的差异等都大大降低了该方法的准确性，造成了相关研究结果的相互矛盾和无法得到科学解释的困境。MIA法虽能成功地进行幼鱼的年龄验证，但在高龄鱼中却是失败的 (Hyndes et al., 1992)。

此外，还有饲育试验验证法 (Captive rearing)、长度非连续分布法 (Discrete length modes) 等。前者通过室内外饲育目标鱼种，在已知个体年龄的前提下，分析其耳石生长规律和形态结构，为验证天然种群的个体年龄生长，特别是解析“天然标记轮”的形成机理提供信息 (Geffen, 1992)。但由于饲育环境条件难于模拟鱼类在天然水域中所经历的环境变迁，该方法的可靠性较低，通常作为一种解析天然水域鱼类耳石信息的辅助性手段。后者是根据样本的体长频率分布的不连续性估测各体长组所对应的年龄 (Nantonson et al., 2002)。但由于鱼类个体生长随着年龄增大而变缓慢，高龄个体组之间的体长分布的非连续性变得不明显，加之个体生长差异容易导致较大的估测误差，该方法一般用于生长快、个体生长差异较小的幼鱼阶段的月龄、季节龄或年龄的研究，也是一种辅助性的年龄分析手段。

二、耳石的微化学分析

耳石的微化学 (Microchemistry) 研究兴起于 20 世纪 90 年代，它主要是通过对耳石全区或特定区中的微量元素分析，揭示鱼类整个生活史或特定生活阶段所经历的环境特征，是鱼类生活史及其重建研究的前沿和热点 (Campana, 1999, 2005; Secor et al., 1995; Fossum et al., 2000; Campana & Thorold, 2001; Begg et al., 2005)。其理论依据是，水体中的化学元素通过鱼类的鳃呼吸等方式进入血液，然后经过细胞传输进入内淋巴结晶后沉积在耳石中。这些元素经过在鱼体内部的递减传输后，沉积在耳石上的含量非常小，被称为微量元素。由于耳石的非细胞性和代谢惰性，随着鱼类及其耳石的同步生长，从水环境中沉积在耳石中的化学元素基本上是永久性的。所以，从耳石中心核区到外边缘区微量化学元素含量或时空分布特征按年龄序列完整地记录着鱼类从出生到被捕获时所经历的环境 (如温度和化学环境) 变化 (Campana, 1999)。

依据在耳石中的沉积含量，这些微量元素分为少量元素 (Minor element $> 100 \times 10^{-6}$ ，如：Na, K, Sr, N, P, S 等) 和痕量元素 (Trace element $< 100 \times 10^{-6}$ ，如：Mg, Cu, Pb, Hg, Mn, Fe, Zn 等) (Campana, 1999)。目前耳石微量元素分析方法较多，按其性能和应用可以划分成元素指纹分析 (Elemental fingerprint assay)、激光探测元素分析 (Laser based elemental assay)、碳 ($\delta^{13}\text{C}$) 和氧 ($\delta^{18}\text{O}$) 稳定同位素分析 3 类。

1. 元素指纹分析

该方法的理论依据是经历过不同生活环境的鱼类的耳石上记录着各自特有的元素指纹，它们可以用作鱼类种群鉴别或产卵场与育幼场判定的天然标记。它基于两个假定条件：①指纹元素沉积于耳石后是稳定的，即不再发生分解或重吸收；②指纹元素在耳石中的沉积过程主要受控于环境中的物理 (如水温) 和化学 (如盐度) 因素，而受鱼类本身生理因素的影响可以忽略，即耳石中沉积的指纹元素基本上可以反应它们在生活环境中

的实际情况 (Campana, 1999)。常用的指纹元素包括: Mg Zn Sr Ba Mn Pb Fe Cu Ni S 等 (Edmonds et al., 1991; Campana & Fowler, 1994; Edmonds et al., 1995; Fowler et al., 1995; a b Campana, 1999; Gillanders & Kingsford, 2000; Weber et al., 2002; Milton & Chenery, 2003; Edson & Gillanders, 2003; a Brazner et al., 2004)。测定方法包括电感耦合等离子体质谱分析 (Inductively coupled Plasma mass spectrometry ICP-MS)、原子吸收光谱法 (Atomic absorption spectrometry AAS Hoff & Fuman, 1995)、电感耦合等离子体原子发射光谱法 (Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy ICP-AES Edmonds et al., 1995; Edson & Gillanders 2002 2006) 等, 其中应用最广泛的是 ICP-MS (包括同位素稀释 ICP-MS Isotope dilution ICP-MS 即 ID-ICP-MS Campana et al., 2000; Humphreys et al., 2005)。其优点是: 灵敏度高, 计数率可达数万 / (秒 10^{-9}); 元素的检出限低, 在 $0.000 \times \sim 0.00 \times \text{ng/L}$ 之间, 比 ICP-AES 普遍低 2~3 个数量级, 可测定痕量元素和超痕量元素; 元素质谱相对简单、干扰较少, 可以测定与元素周期表上几乎所有元素; 具有快速同位素比值测定能力等。

耳石 ICP-MS 分析一般按下列程序操作: ①耳石制备与除污 (详细参考 Fowler et al., 1995 a)。耳石首先在酸洗过的聚丙烯管内用去离子水音波清洗—用酸洗过的刷子磨洗—去离子水清洗和音波清洗—去离子水清洗。除污后的耳石样品干燥密封保存在酸洗过的聚丙烯管内备用。②酸溶。除污后的耳石样品在酸洗过的聚丙烯管内进行酸溶处理。例如, 100~500 mg 的样品需要在 2 mL 的硝酸去离子水溶液 (1:1) 中酸溶数小时后, 在 50~60℃ 下温烘 15 min 以完成酸溶过程。用去离子水将这 2 mL 的酸溶液稀释至 30 mL, 然后用去离子水按 10:1 比例进一步稀释, 使最终浓度达到 0.1% W/V。同时, 加入适量的内标物如铟以检测雾化效率的变化。进行 ID-ICP-MS 分析时需要在此阶段加入相应于各指纹元素的强化同位素。③元素测定与数据分析。样品制备完毕后随机分批进行 ICP-MS 分析。利用 MANOVA 及鉴别分析法 (Discriminant analysis) 确立表征种群水平的指纹元素及其基准水平, 解析不同样品之间各指纹元素的差异显著性。

耳石 ICP-MS 分析包括全耳石分析和耳石核区分析。前者样品准备简单可靠, 一般鱼类耳石比较容易满足测试所需量 (5~10 mg), 并能客观反映鱼类从出生到被采捕整个生活期间所经历的总体环境状况, 不易受取样误差影响。它通常用于种群鉴定等, 但它无法揭示鱼类特定生活阶段的环境特征。而后者则是判定育幼场中混合补充群体的产卵群 (即出生源) 及其补充机制的关键技术。对于耳石核区样品的制备, 从理论上应从出生到进入育幼场期间形成的耳石中的化学信息最能客观反映各产卵群的指纹元素的真实状况。所以, 在耳石取样前, 应尽量通过耳石 SEM 分析等准确把握仔幼鱼进入育幼场的时间及其耳石大小基准, 供制样时参考。其次是确立表征各产卵群特征的指纹元素基准 (如元素种类和含量), 然后根据混合补充群体组成, 解析各产卵群体对补充群体贡献大小及其补充过程。再是元素分析数据的统计与解析。Campana 等 (2000) 研究发过去常用的判别分析或 MANOVA 并不能很好地解析关于区分混合补充群体的出生源方面的元素分析数据, 从而影响了该方法的准确性和客观性。随着微取样技术 (如 KCL microsampler) (高永文等, 2004) 和微量级 ($< 0.3 \text{ mg}$) ICP-MS 分析技术的引入, 在耳石上不同年龄区甚至季节区微量采样和元素分析已经成为可能, 加之相关的专业统计分析软件

如 ISMA(Integrated Stock Mixture Analysis)的问世, 这无疑进一步提高了该方法在鱼类生活史及其重建研究方面的精度和应用范围。

2. 激光探测元素分析

该方法的工作原理是利用激光探测方法解析耳石断面上特定生长期(区)的痕量元素含量及其分布特征, 以此研究鱼类生活过程中所经历的环境变迁、迁移规律及栖息地生境特征等。其假定条件和指标性痕量元素与上述的元素指纹分析中的相关问题基本一致。测试方法包括电子微探针(EPMA 如: 能量散射电子微探针法(Energy dispersive electron microprobe ED-EM; Campana et al., 1997)和波长散射电子微探针法(Wavelength-dispersive electron microprobe WD-EM; Campana et al., 1997; Kafemann et al., 2000)、质子诱发 X射线发射分析(Proton induced X-ray emission PIXE; Campana et al., 1997; Hallen et al., 2000)、激光熔融电感耦合等离子质谱分析(Laser ablation ICPMS LA-ICPMS; Campana & Fowler 1994; Fowler et al., 1995 a, b; Campana et al., 1997; Brophy et al., 2003)等。各方法的灵敏度因测试元素的种类和含量而异。常用的方法包括 LA-ICPMS和 EPMA Sr:C 比等。

LA-ICPMS的优点是: 样品制备和测试简单, 易操作, 只需要手工研磨、抛光和超声波清洗后就可以上机测试, 且测试耗时少; 不仅可以分析整个耳石断面上痕量元素的年龄序列上的连续分布规律, 而且在不需要对耳石样品进行特殊处理的情况下可以直观地检测特定耳石区(如: 年轮、季节轮)水平上的微化学组成特征。因此, 它比酸溶法 ICPMS分析的应用更广泛, 不但可以解析鱼类整个生活过程或特定生活阶段所经历的环境变化、种群鉴别、迁移过程等基本生活史问题, 而且也是产卵源示踪、仔鱼的转输和分散过程、育幼过程与栖息生境等研究的重要技术手段。另外, LA-ICPMS虽然在元素探测的敏感度和准确度方面逊于酸溶法 ICPMS(Fowler et al., 1995 a, b; Campana 1999), 但优于电子微探针(如: ED-EM)。为比较各主要测试方法的准确度、精度和敏感度, Campana等(1997)开展了一项名为国际耳石化学成分分析实验(International Otolith Composition Experiment)的研究: 把未作标示的真实耳石样品与数种已知元素组成的“人工耳石”样品同时在美国、加拿大、法国、澳大利亚 4国的 8个实验室内进行 10种元素分析。结果发现, LA-ICPMS分析可以比较准确地探测耳石中的大多数痕量元素的水平, 而多数电子微探针分析只能准确地探测出浓度大于 300×10^{-6} 的微量元素(如: K, Na, S等)。但是, LA-ICPMS法也有其局限性。例如, 目前用的激光束直径一般在 $30 \mu\text{m}$ 以上, 所以测定痕量元素的耳石区单位元空间范围较大, 一般是在数十日增长区以上的水平, 尚难达到日轮水平。另外, 激光发射能对耳石样品结构造成较大的损伤, 每个样品测试位点一般限制在相距 $500 \mu\text{m}$ 的两个发射脉冲。在这两方面, LA-ICPMS分析要逊于电子微探针分析(Fowler et al., 1995 b)。

利用 EPMA探测耳石中 Sr:C 比例解析鱼类生活史及其重新构建问题是耳石微化学研究中很成功的技术之一(Gauldie et al. 1994 b; Campana, 1999; Kafemann et al., 2000; Secor et al. 2000; Kraus & Secor, 2004; Arai et al., 2005; Humphreys et al., 2006)。由于 S的含量与分布方式在不同天然水体中存在明显差异(即淡水区含量低,

河口居中,海水居高),耳石内 Sr:Ca 比的分布特征直接标记了鱼类的生活履历,可以作为表征鱼类所经历的不同生活环境的有效指标。在通过 SEM 耳石分析研究鱼类的孵化、变态发育、早期生长规律的基础上,结合鱼类在不同生活阶段或年(日)龄所形成的耳石区中的 Sr:Ca 比变化特征,可以成功地揭示洄游性鱼类(如:鲑鳟鱼类、鳊鲃目鱼类)或河口性鱼类的仔鱼分散与转运过程、接(离)岸机制(Near shoring or off shoring)、产卵过程、溯(降)河洄游履历以及生活史型等问题(Arai et al., 1997, 1999, Secor et al., 2000, Tzeng et al., 2002)。特别是利用该方法能可靠地判别同一鱼种中具有不同洄游环和生活史型的个体或种群。例如耳石中 Sr:Ca 比的分布规律表明并非所有日本鳊鲃个体都进行淡水洄游(Tsukamoto et al., 1998, Tsukamoto et al., 2001),即自然界中存在着“海洋鳊鲃”个体。利用同样方法,研究者们成功地判定了虹鳊 *Oncorhynchus mykiss* 中存在着淡水洄游与非洄游两种生活史型的个体(Kalish, 1990),而自然界中的欧洲鳊鲃除了洄游性个体外还存在半洄游性个体(Tzeng et al., 2000)。

Sr:Ca 比测定的样品制备比较简单,耳石经过切割、研磨、清洗、干燥后进行真空涂碳后即可在备有波长扩散分光仪的 EPMA(如 JXA-8900R)上进行 Sr:Ca 比测试。另外,同一切片在 EPMA 分析后经过重磨除碳、盐酸蚀刻、真空涂金(Pd-Pb)后可直接用于 SEM 显微结构分析。这样,当仔幼鱼耳石的轮纹(日轮)可识读时,就可以同时获得测试样品的微化学和显微结构组成,从而建立同一样品的日轮耳石增长率-(Sr:Ca)比三者之间的关系,成为研究鱼类的早期生长生存过程尤其是仔鱼转输过程和育幼过程等科学问题的关键技术。

毋庸置疑,利用耳石中 Sr:Ca 比的时间序列变化和空间分布特征可以比较可靠地解析洄游性鱼类个体的生活履历。但困扰人们的最大问题是耳石中的 Sr:Ca 比究竟在多大程度上反映了环境水体中相应的元素成分比例以及如何确立不同水体的 Sr:Ca 比基准水平。近年来,科学家们已经开始在受控条件下研究环境水体中 S 进入耳石的过程以及水环境条件(如: S 浓度、水温、盐度)和鱼类生理发育状态等因素与耳石吸收 S 过程的耦合机制,为探索这些问题提供了依据(Campana, 1999; Bath et al., 2000; Elsdon & Gillanders, 2003 a)。

①在一些鱼类(如金鲈 *Macquaria ambigua*、尼罗罗非鱼 *Oreochromis niloticus*、黄尾平口石首鱼 *Leiostomus xanthurus*、黑棘鲷 *Acanthopagrus butcheri*)中,耳石对 S 的吸收量与水体中 S 的浓度呈明显正相关性(Brown Harris, 1995; Farrell & Campana, 1996; Bath et al., 2000; Elsdon et al., 2003 b; 2006)。

②水温变化是影响耳石对 S 吸收过程的另一个重要因子。实验条件下的研究发现,温度对 S 的被吸收的作用因鱼种而异:二者呈正相关的有美国红鱼(Hoff et al., 1995)、条纹鲈 *Morone saxatilis* (Secor et al., 1995 b)、黄尾平口石首鱼(Bath et al., 2000)、黑棘鲷(Elsdon & Gillanders, 2002)等;呈负相关有鳕鱼 *Gadus morhua* (Townsend et al., 1995)等;相关性不显著的有日本鳊鲃(Tzeng, 1996; Kawakami et al., 1998)、大鳞油鲱 *Brevortia patronus* (Chesney et al., 1998)等。Elsdon 等(2003 a)认为两者之间的相关性可能与实验温度条件有关,如呈正相关者的饲育温度一般高于 20℃,而负相关者则低于 17℃。耳石中 Sr:Ca 比的时空变化曾一度被用于温度史重建研究,但目前人们还没有充足的科学依据用来建立耳石 Sr:Ca 比-温度关系。

③盐度对耳石吸收 S 的作用在多数实验鱼种中不明显。如:细须石

首鱼 *Micropogonias undulatus* (Fowler et al., 1995 a, b)、美国红鱼 (Hoff et al., 1995)、大鳞油鲱 (Chesney et al., 1998)、黑棘鲷 (Elsdon & Gillanders, 2002)。但在日本鳗鲡中二者呈明显的正相关 (Tzeng 1996, Kawakami et al., 1998)。Campana (1999) 认为, 相对于水温, 盐度变化可能更容易影响耳石对 S 的吸收, 因为盐度每提高 1‰ 可以导致耳石中 Sr:Ca 比升高 0.05×10^{-3} 。这样, 假定淡水与海水的盐度相差 30‰~35‰, 生活于两者的鱼类耳石中的 Sr:Ca 比约有 1.5×10^{-3} 的差异, 这足以用来表征洄游性鱼类在不同水体中的生活履历。④耳石对 S 的吸收也与鱼类的生理发育状态和年龄相关。Fowler 等 (1995 a) 发现在恒定条件下从孵化起饲养 71 d 的细须石首鱼的耳石内的 Sr:Ca 比, 从核心区至边缘区 ($500 \mu\text{m}$ 测试间隔) 存在显著差异, 即耳石对 S 的吸收可随鱼类早期发育生长而变。目前人们对上述环境因子如何影响鱼类耳石吸收 S 的过程的认知尚少, 有待于进一步探索。

3. 氧和碳稳定同位素分析

该方法的基本原理是在鱼类发育生长过程中, 沉积于鱼类相应的耳石区内的 ^{18}O 和 ^{16}O 同位素主要来源于水环境。所以, 通常情况下, 耳石与水体之间能达到氧同位素平衡 (Kalish 1991 a, b, Gauldie et al., 1994 a, Kennedy et al., 1997, Thorndahl et al., 1997, Campana 1999, 高永文等, 2004)。但遇到环境水温变动时, 沉积到耳石内的 $\delta^{18}\text{O}$ (即 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) 随水温的升高而急剧下降。因此, $\delta^{18}\text{O}$ 可记录鱼类生活过程中环境的水温变化 (Campana 1999, Andrus et al., 2002)。在正常盐度条件下, 1‰ 的 $\delta^{18}\text{O}$ 变化对应于大约 5°C 海水温度变化 (高永文等, 2004)。如果在耳石形成时水环境中的 $\delta^{18}\text{O}$ 是已知的, 而耳石中的 $\delta^{18}\text{O}$ 是可测定的, 就能反演计算出耳石形成时的环境水温。近年来, 由于微取样技术 ($<30 \mu\text{m}$) 的引入和同位素质谱仪测试样品达到微克级水平, $\delta^{18}\text{O}$ 测定区达到了年轮、季节轮甚至日轮水平, 从而极大地提高了鱼类出生源判定和种群鉴别 (Kennedy et al., 1997, Gao et al., 2001)、迁移规律 (Gao & Beamish, 2003)、温度史重建 (Kalish 1991 b, Thorndahl et al., 1997)、海洋环境域变 (Gao 2002) 等研究的水平。Gao 等 (2001) 根据耳石核心区中氧、碳同位素成分组成, 判定了华盛顿州皮基海湾 18 处鲱鱼 *Clupea pallasii* 产卵群实际上来自两个出生源, 即有较多淡水混入的河口或湖口区 and 海水区。而 Thorndahl 等 (1997) 报道, 利用细须石首鱼耳石中 $\delta^{18}\text{O}$ 重建海水温度史的准确度可达 $\pm 1^\circ\text{C}$ 。但利用此方法时有一个前提条件, 即研究的目标耳石区在形成时的现场水环境中 $\delta^{18}\text{O}$ 应该是已知的。当该条件不成立时, 可以用相应的盐度水平代理, 但如此构建的温度史只能是一个相对性指标, 不能表征实际温度变化状况 (Campana 1999)。这样, 在重新构建那些生活过程中经历过复杂的水文环境 (如水团) 变化, 而相关的现场环境信息不易获得的鱼种的小时间尺度 (如月龄水平) 温度史时, 其准确性就会大大降低 (Campana 1999, 高永文等, 2004)。

耳石中碳同位素一部分来源于水环境中的溶解无机碳, 另外有 10%~30% 来自摄取的食物中的碳 (食物源) 和生命代谢过程中产生的碳离子通过血循环进入淋巴系统后在耳石上再沉积 (代谢源) (Kalish 1991 a, Gauldie 1996, Thorndahl et al., 1997, Schwarcz et al., 1998)。一般认为, 耳石中食物源的 $\delta^{13}\text{C}$ (即 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) 随营养级水平 (与发育生长

和摄食能力相关)的升高而增加,而代谢源 $\delta^3\text{C}$ 的贡献则随年龄增长(与生命代谢活动降相关)而降低。生理上,鱼类初次性成熟是摄食能力升高与代谢活动减弱的标志性转折阶段。所以,这阶段形成的耳石中的 $\delta^3\text{C}$ 应该是保持在较高的增长水平(Kalish 1991; Gauldie 1996; Schwarcz et al., 1998; Campana 1999)。也即是说,年龄序列上的 $\delta^3\text{C}$ 峰值或渐进值可能是表征鱼类初次性成熟的有效指标。耳石中 $\delta^3\text{C}$ 对水温变化的敏感度较低,加之耳石与水体之间一般难以达到碳同位素平衡,导致了对耳石中 $\delta^3\text{C}$ 的研究数据难以做出合理的解释的困境。所以,目前 $\delta^3\text{C}$ 在鱼类生活史和环境重建研究中不像 $\delta^{18}\text{O}$ 那么被广泛应用,只作为 $\delta^{18}\text{O}$ 的辅助性指标进行鱼类的种群和出生源判定(Edmonds et al. 1997; Gao et al., 2001)、发育和代谢过程(Kalish 1991; Gauldie 1996; Thomold et al., 1997; Schwarcz et al., 1998 等研究。

三、耳石的显微结构分析

真骨鱼类仔鱼和当年生幼鱼的耳石中普遍存在着日轮,即 24 h 周期性的增长区。它主要受控于鱼类本身的一种内部生理节律,而这一节律首先是在胚胎发育开始后某一特定时期通过 24 h 光周期的刺激诱发启动的。除此之外,生活环境变动(如摄食、运动以及水温变化等都会明显影响耳石增长区的形成,从而在日轮间形成更细微的副轮(Subdaily increment)或标记(check)(Campana et al., 1985)。一般情况下,日轮光滑而连续完整,其排列结构有良好的规律性,记录了 24 h 水平上耳石的生长特征和环境信息,是表征鱼类早期发育生长、仔鱼传输过程和育幼过程的有效指标(Campana 1992)。所以,自 Pannella(1971)发现鱼类耳石中存在日轮以来,耳石显微结构分析在 1980 年代期间曾变革性地推进了鱼类早期生活史研究的发展。尤其随着扫描电镜技术的不断提高,至 1990 年代初期,它已经发展成为一种稳定性高、功能强、标准化程度高、应用最广泛的耳石信息分析技术(Stevenson et al., 1992)。

耳石显微结构分析包括光学显微分析和 SEM 分析,二者都需要制备测试磨片,具体制备方法要依据耳石的大小、形态以及检测水平而定。Seco 等(1992)对各种方法做过详细的介绍和分析。如:树脂包埋(大型耳石可直接切割、研磨)、切割、研磨、切面检测(暴露核区)等过程,SEM 分析时则需要酸蚀(HCl 溶液)和真空涂金(Pd-Pb)。而制作出耳石核区充分暴露的光滑平面切片是保证其显微结构分析的关键,这不但耗时,而且需要操作者具备娴熟的技术经验和高精度的仪器。近年来,随着相关精密仪器在耳石研究中的成功引入,如在 Stuers 系列的 Discoplan TS 型自动精密切割研磨机和 Roto-Pol 35 型自动精密抛磨机上可以制作出厚度为 20 μm 的超薄精片,耳石磨片质量得以大幅度升高,有效提高了耳石显微结构分析的精度。

在进行耳石显微结构分析时,识读、计数轮纹和测定日轮间耳石增长宽度至关重要。SEM 分析的操作自动化和标准化程度、精度较高,具体方法可参考相应的操作手册说明。但进行光学显微结构分析时,需要选择适当的仪器和方法以及分析者熟练的技术和丰富经验。但应注意以下问题(Campana 1992): ①测定基准轴的选择。耳石轴长与轮纹清晰度是确定基准轴的两个先决条件。理论上,最长轴上能标示出连续、完整的

轮纹分布，但它又是副轮出现频率高的区域，这会干扰日轮的准确计数。所以，在实际操作时，要根据耳石的实际情况，也可以选择轮纹连续完整分布而清晰度高的短轴为基准轴。②图像优化。即通过调节显微镜的放大率及其他技术指标优化平衡耳石显微结构图像的清晰度、可识读性和可操作性。低放大率可以降低副轮或视觉伪轮（Visual artifact）的干扰，但同时增加了区分轮纹和计测增长区宽度的难度；反之，则增加了识别真伪日轮的难度，同时降低了识读轮纹的可操作性。400倍的放大率可适合快速生长耳石的显微结构分析，分析生长速率低于 $2\mu\text{m/d}$ 的耳石时，放大率一般在 1000~1250 倍之间。③图像分析系统的运用。即通过显微摄像系统、图像数字化系统、计算机系统把耳石显微结构图像数字化，根据分析者的需要调节图像任意位点的像素和灰度以获得清晰的视觉效果。它可以自由地缩放整个或局部图像，并通过背景图像的任意叠加组合减小噪声图像的干扰，或利用高低频过滤系统增加或删除一些图像细节要素，从而捕获到很多肉眼难以观察到的信息。它还可以更准确、稳定地计测耳石的微增长（如小于 $0.2\mu\text{m}$ ），但该系统无法像其他方法一样通过调节光对比度等参数提高图像的解像度。④轮纹与增长区的识别与测定。耳石显微结构分析时有三种情况容易干扰日轮的正确解读：副轮、视觉伪轮及标记轮。副轮一般集中在快速生长的宽增长区，另外，磨片制作时的过度研磨也可能造成副轮清晰度提高而增加了日轮识读的难度。区分日轮与副轮的基本标准是二者的连续性和规律性的差异，前者一般完整、连续而且分布规律比较明显，而后者有较大的随意性和不规律的间断特征。而光反射和耳石外缘的非圆滑性等外部因素的干扰可导致在耳石外缘部分的图像上产生视觉伪轮，一般利用重复调焦对比的措施检验它们的存在。标记轮形成于特殊的环境压力如温度骤变或鱼类特定的生理发育事件如初次摄食或初次性成熟，从形态结构和分布位置比较容易与日轮区分。轮纹计数与增长区测定的关键是确立初次增长区的位置或者孵化轮为测定基准，选择合适的计量轴向，以获得最优计量效果。对于难以确立初次增长区的鱼类，一般通过人工饲育条件下仔鱼耳石的显微结构分析来验证或确立相应的基准。

由于耳石显微结构分析提供了丰富的有关鱼类早期生活阶段所经历的生物化学物理环境信息，所以，其应用范围非常广泛，几乎涵盖了类鱼类早期生活史中的关键科学问题，如年龄鉴定、早期生长与死亡、产卵期和产卵场的判定、补充机制、早期生活史中的特殊事件及其对补充机制的生态效应、种群鉴别等。对于这方面研究，国内外一些学者做过较深入的综述分析和介绍（Jones 1992；宋昭彬、曹文宣，2001），本文不再赘述。随着耳石微化学研究与 SEM 分析的不断深入开展，耳石显微结构微化学组成之结合已经成为解析鱼类早期生活史中一些生态学难点的重要手段。例如，基于耳石的显微结构和微化学分析，科学家成功地解析了日本鳗鲡生活史中的早期生长、仔鱼运输、变态接岸补充等关键过程，并基本上解决了困扰鱼类生态学家已久的鳗鲡产卵场、产卵期和生态史型等问题（Tsukamoto 1992, 2006；Tsukamoto & Arai 2001；Tsukamoto et al., 1998）。

四、耳石信息分析及其应用的研究动态

近 30 多年来, 鱼类耳石信息分析及其应用研究得以迅速发展。尤其在近年来, 国际每年发表的相关耳石研究的论文平均已达到 200 余篇, 约为国际 70 年代的 5 倍 (Campana, 2005); 研究内容从早期的年龄鉴定发展到目前的年龄验证、显微结构分析、微化学分析, 研究手段也相应地从简单的光学显微镜观察发展到现在的 SEM 和各种元素分析技术; 其应用已经拓宽到鱼类早期补充机制、生活史重建、环境污染和域变等鱼类生态学和海洋环境科学热点 (Campana et al., 2001; Campana, 2005)。相应地, 其研究内容也发生了结构性变化。如 1999 年以前有 80% 的耳石研究集中在年龄生长方面, 而 1999~2005 年期间发表的 862 篇耳石研究中, 年龄生长研究占 39% (年龄鉴定 23%、年龄验证及其方法比较 10%、种群动力学 6%), 显微结构分析占 24%, 微化学研究占 21% (指纹元素分析及其应用 16%、大规模化学标记 4%、同位素分析及环境重建 1%), 其他 16% (种类鉴定 6%、形态 4%、生理与听觉 3%、方法论 3%)。研究内容、方法、应用都呈多样化趋势 (Campana, 2005)。一些新的研究领域近年来也有了长足发展。如: 深海鱼类、热带鱼类、高龄鱼类的耳石 (轮纹 增长区形成不明显) 分析, 化石鱼类耳石分析 (古环境与古生物年龄生长), 规模化年龄鉴定 (耳石重量 年龄 生长模型) 等研究越来越成为科学家们研究的新的课题 (Woydack et al., 2001; Francis et al., 2004; Morales-Ni et al., 2005)。

鱼类耳石研究的发展是多学科 (鱼类生态学、地球化学、海洋物理学与环境生物学等) 交叉、渗透的结果。随着其他学科 (如统计学) 和技术 (如计算机图像处理及数字化技术) 的不断引入, 耳石结构图像分析、数据分析、误差分析及质量控制等方面的研究水平和精度将进一步提高, 耳石信息分析在渔业科学和海洋环境科学研究中的应用将更加广泛。近年来, 我国有关耳石信息分析的技术 (如: SEM、ICMS、EIMA 微量同位素质谱分析、微取样技术及计算机图像处理技术) 已经相当成熟, 这为我国该研究领域的发展提供了重要技术支撑, 未来需要相关学科的研究者合作, 共同推动该研究领域的发展。

参 考 文 献

- 常剑波、邓中焱、孙建贻等. 1994 草鱼仔幼鱼耳石日轮及日龄研究. 中国动物学会成立 60 周年暨纪念陈桢教授诞辰 100 周年论文集 C: 323~329
- 陈大刚. 1991. 黄渤海渔业生物学. 海洋出版社. 北京: 1~503
- 邓景耀、赵传纲等. 1991. 海洋渔业生物学. 农业出版社. 北京: 1~686
- 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
- 解玉浩、李勃、富丽静等. 1995 鸭绿江香鱼耳石日轮与生长的研究. 动物学报, 41: 125~133
- 李城华、沙学绅、尤锋等. 1993 梭鱼仔鱼耳石日轮形成及其自然种群日龄的鉴定. 海洋与湖沼, 24: 345~349
- 罗秉征、卢继武、黄颂芳. 1981 中国近海带鱼耳石生长的地理变异与地理种群的初步探讨. 海洋与湖沼论文集, 181~194
- 宋昭彬、曹文宣. 2001 鱼类耳石微结构特征的研究与应用. 水生生物学报, 25: 613~619

- 吴鹤洲、成贵书、王建飞. 1985 带鱼年龄鉴定问题探讨. 海洋与湖泊, 16 408~416
- 徐恭昭、罗秉征、吴鹤洲、王可玲. 1962 大黄鱼耳石 *Pseudosciaena crocea* (Richardson) 的轮纹形成周期及其年龄鉴定问题. 海洋科学集刊, 2 1~13
- 张其永、张雅芝. 1983 闽南一台湾浅滩二长棘鲷年龄和生长研究. 水产学报, 7 131~143
- Andrews A H, Burton E J, Kerr L A et al. 2005 Bomb radiocarbon and lead-radium disequilibrium in otoliths of bocac-cio rockfish (*Sebastes paucispinus*): a determination of age and longevity for a difficult to age fish. Marine and Freshwater Research, 56 517~528
- Andrus C F T, Crowe D E, Sandweiss D H et al. 2002 Otolith $\delta^{18}O$ record of mid-Holocene sea surface temperatures in Peru. Science, 295 1508~1511
- Arai T, Kotake A, Kayama S, Ogura K et al. 2005 Movements and life history patterns of the skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* in the western Pacific as revealed by otolith Sr/Ca ratios. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 85 1211~1216
- Arai T, Otake T, Limbong D et al. 1999 Early life history and recruitment of the tropical eel *Anguilla bicolor pacifica* as revealed by otolith microstructure and microchemistry. Marine Biology, 133 319~326
- 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
- Bath G E, Thorold Jones S R et al. 2000 Strontium and barium uptake in aragonitic otoliths of marine fish. Geochimica et Cosmochimica Acta, 64 1705~1714
- Beamish R J, McFarlane G A. 1987 Current trends in age determination methodology. In: Age and Growth of Fish (Summerfelt R C & Hall G E, eds), 15~42. Iowa State University Press, Ames, Iowa
- Beamish R J, McFarlane G A. 1983 The forgotten requirement for age validation in fisheries biology. Transactions of the American Fisheries Society, 112 735~743
- Beckman D W, Wilson C A. 1995 Seasonal timing of opaque zone formation in fish otoliths. In: Recent Developments in Fish Otolith Research (Secor D H, Dean J M, Campana S E, eds), 27~43. University of South Carolina Press, Columbia, South Carolina
- Begg G A, Campana S E, Fowler A J et al. (eds) 2005 Fish otolith research and application. Proceedings of the 3rd International Symposium on Fish Otolith Research and Application. Marine and Freshwater Research, 56 477~814
- Bennett J T, Boehlert G W, Turekian K K. 1982 Confirmation of longevity in *Sebastes diploproa* (Pisces: Scorpaenidae) from $^{210}Pb/^{226}Ra$ measurements in otoliths. Marine Biology, 71 209~215
- Brazner J C, Campana S E, Tanner D K. 2004 Habitat fingerprints for Lake Superior coastal wetlands derived from elemental analysis of yellow perch otoliths. Transactions of the American Fisheries Society, 133 692~704
- Brophy D, Danilowicz B S, Jeffries T E. 2003 The detection of elements in larval otoliths from Atlantic herring using laser ablation ICP-MS. Journal of Fish Biology, 63 990~1007
- Brown C A, Gruber S H. 1988 Age assessment of the lemon shark *Negaprion brevirostris* using tetracycline validated vertebral centra. Copeia, 747~753
- Brown P, Green C, Sivakumaran K P et al. 2004 Validating otolith annuli for annual age determination of common carp. Transactions of the American Fisheries Society, 133 190~196
- Brown P, Harris J H. 1995 Strontium batch-marking of golden perch (*Macquaria ambigua* Richardson) and trout cod (*Maccullochella macquariensis* Cuvier). In: Recent Developments in Fish Otolith Research (Secor D H, Dean J M, Campana S E, eds), 693~701. University of South Carolina Press, Columbia, South Carolina
- Burton E J, Andrews A H, Coale et al. 1999 Application of radionuclide age determination to three long-lived fishes using $^{210}Pb/^{226}Ra$ disequilibrium in calcified structures: a review. American Fisheries Society Symposium, 23 77~87
- Campana S E. 1992 Measurement and interpretation of the microstructure of fish otoliths. In: Otolith Microstructure Examination and Analysis. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences, 117 (Stevenson D K, Campana S E, eds), 59~71. Canada Communication Group Publishing, Ottawa

- Campana S E 1997 Use of radiocarbon from nuclear fallout as a dated marker in the otoliths of haddock *Melanogrammus aeglefinus* Marine Ecology Progress Series **150** 49~56
- Campana S E 1999 Chemistry and composition of otoliths: pathways, mechanisms and applications. Marine Ecology Progress Series **188** 263~279
- Campana S E, Chouinard G A, Hanson J M et al 2000 Otolith elemental fingerprints as biological tracers of fish stocks Fisheries Research **46** 343~357
- Campana S E, Fowler A J 1994 Otolith elemental fingerprinting for stock identification of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using laser ablation CIMS Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **51** 1942~1950
- Campana S E, Oxford H A, Smith J N 1993 Radiochemical determination of longevity in flying fish *Hirundichthys affinis* using $^{228}\text{Th}/^{226}\text{Ra}$ Marine Ecology Progress Series **100** 211~219
- Campana S E, Thorold S R, Jones C M 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
- Campana S E, Thorold S R 2001 Otoliths: increments and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **58** 30~38
- Campana S E, Zwanenburg K C T, Smith J N 1990 $^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$ determination of longevity in redfish Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **47** 163~166
- Campana S E 2005 Otolith science entering the 21st century Marine and Freshwater Research **56** 485~495
- Campana S E, Jones C M 1998 Radiocarbon from nuclear testing applied to age validation of black drum *Pogonias cromis* Fishery Bulletin **96** 185~192
- Campana S E 2001 Accuracy, precision and quality control in age determination: including a review of the use and abuse of age validation methods Journal of Fish Biology **59** 197~242
- Campana S E, Neilson J D 1985 Microstructure of fish otoliths Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **42** 1014~1032
- Cass A J, Beamish R J 1983 First evidence of validity of the fin ray method of age determination for marine fishes North American Journal of Fisheries Management **3** 182~188
- Caselman J M 1987 Determination of age and growth. In: The Biology of Fish Growth (Weatherley A H, Gill H S, eds) 209~242 Academic Press New York
- 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
- Courney D L, Monsepp D G, Orsi J A, et al 2000 Origin of juvenile Pacific salmon recovered from coastal south-eastern Alaska identified by otolith thermal marks and coded wire tags Fisheries Research **46** 267~278
- Edmonds J S, Caputi N, Morie M 1991 Stock discrimination by trace element analysis of otoliths of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) a deep water marine teleost Australian Journal of Marine and Freshwater Research **42** 383~389
- Edmonds J S, Fletcher W J 1997 Stock discrimination of Pilchards *Sardinops sagax* by stable isotope ratio analysis of otolith carbonate Marine Ecology Progress Series **152** 241~247
- Edmonds J S, Caputi N, Moran M J, et al 1995 Population discrimination by variation on concentrations of minor and trace elements in sagittae of two western Australian teleosts. In: Recent Developments in Fish Otolith Research (Secor D H, Dean J M, Campana S E, eds) 655~670 University of South Carolina Press Columbia South Carolina
- Elsdon T S, Gillanders B M 2003b Relationship between water and otolith elemental concentrations in juvenile black bream *Acanthopagrus butcheri* Marine Ecology Progress Series **260** 263~272
- Elsdon T S, Gillanders B M 2002 Interactive effects of temperature and salinity on otolith chemistry: challenges for de-

- tem in ing environmental histories of fish. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **59**: 1796 ~ 1808
- Elsdon T S, Gillanders B M 2003a 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 SE 1996 Regulation of calcium and strontium deposition on the otoliths of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology A: Physiology **115**: 103 ~ 109
- Fenton G E, Ritz D A, Short S A 1990 $^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$ disequilibria in otoliths of blue grenadier *Macrurus novaezeelandiae*. Problems associated with radiometric ageing. Australian Journal of Marine and Freshwater Research **41**: 467 ~ 473
- Fenton G E, Short S A, Ritz D A 1991 Age determination of orange roughy *Hoplostethus atlanticus* (Pisces: Trachichthyidae) using $^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$ disequilibrium. Marine Biology **109**: 197 ~ 202
- Fossum P, Kalish J, Mokness E 2000 (eds). Proceedings of the second international symposium on fish otolith research and application. Fisheries Research **46**: 1 ~ 371
- Fowler A J, Campana SE, Jones C M et al 1995a Experimental assessment of the effect of temperature and salinity on elemental composition of otolith using solution based ICPMS. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **52**: 1421 ~ 1430
- Fowler A J, Campana SE, Jones C M et al 1995b Experimental assessment of the effect of temperature and salinity on elemental composition of otolith using laser ablation ICPMS. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **52**: 1431 ~ 1441
- Fowler A J 1990 Validation of annual growth increments in the otoliths of a small tropical coral reef fish. Marine Ecology Progress Series **64**: 25 ~ 38
- Fowler A J, Short D A 1998 Validation of age determination from otoliths of the King George whiting *Sillaginodes punctata* (Perciformes). Marine Biology **130**: 577 ~ 587
- Francis R I C C, Campana SE 2004 Inferring age from otolith measurements: a review and a new approach. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **61**: 1269 ~ 1284
- Francis R I C C, Paul L J, Mulligan K P 1992 Ageing of adult snapper (*Pagrus auratus*) from otolith annual ring counts: validation by tagging and oxytetracycline injection. Australian Journal of Marine and Freshwater Research **43**: 1069 ~ 1089
- Francis R I C C, Horn P L 1997 Transition zone in otoliths of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) and its relationship to the onset of maturation. Marine Biology **129**: 681 ~ 687
- Gap Y W 2002 Regime shift signature from stable oxygen isotopic records of otoliths of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Isotopes in Environmental and Health Studies **38**: 251 ~ 263
- Gap Y W, Jøner S H, Bargmann G G 2001 Stable isotopic composition of otoliths in identification of spawning stocks of Pacific herring (*Clupea pallasii*) in Puget Sound. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **58**: 2113 ~ 2120
- Gap Y W, Beamish R J 2003 Stable isotopic composition of otoliths from tagged Pacific halibut *Hippoglossus stenolepis*. Environmental Biology of Fishes **67**: 253 ~ 261
- Gauldie R W, Xi K, Sharma S K 1994b Developing a Raman spectral method for measuring the strontium and calcium concentrations of fish otoliths. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **51**: 545 ~ 551
- Gauldie R W, Thacker C E, Menrett N R 1994a Oxygen and carbon isotope variation in the otoliths of *Beryx splendens* and *Comphaenoides profundus*. Comparative Biochemistry and Physiology A: Physiology **108**: 153 ~ 159
- Gauldie R W 1996 Biological factors controlling the carbon isotope record in fish otoliths: principles and evidence. Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry & Molecular Biology **115**: 201 ~ 208
- Geffen A J 1992 Validation of otolith increment deposition rate. In Otolith Microstructure Examination and Analysis. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 117 (Stevenson D K, Campana SE eds), 101 ~ 113. Canada Communication Group Publishing, Ottawa

- Gillanders B M, Kingsford M J. 2000. Elemental fingerprints of otoliths of fish may distinguish estuarine nursery habitats. *Marine Ecology Progress Series* **201**: 273 ~ 286
- Halden N M, Mejia S R, Babaluk J A et al. 2000. Oscillatory zinc distribution in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) otoliths: the result of biology or environment? *Fisheries Research* **46**: 289 ~ 298
- 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
- Humphreys R L, Campana S E, DeMartini E E. 2005. Otolith elemental fingerprints of juvenile Pacific swordfish *Xiphias gladius*. *Journal of Fish Biology* **66**: 1660 ~ 1670
- Humphreys W F, Shiao J C, Iizuka Y et al. 2006. Can otolith microchemistry reveal whether the blind cave gudgeon *Milyeringa veritas* (Eleotridae), is diadromous within a subterranean estuary. *Environmental Biology of Fishes* **75**: 439 ~ 453
- Hyndes G A, Loneragan N R, Potter I C. 1992. Influence of sectioning otoliths on marginal increment trends and age and growth estimates for the flathead *Platycephalus speculator*. *Fishery Bulletin* **90**: 276 ~ 284
- Jones C M. 1992. Development and application of the otolith increment technique. In: *Otolith Microstructure Examination and Analysis*. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 117 (Stevenson D K, Campana S E eds), 1 ~ 11. Canada Communication Group Publishing, Ottawa
- Kaferian R, Adlerstein S, Neukamp R. 2000. Variation in otolith strontium and calcium ratios as an indicator of life history strategies of freshwater fish species within a brackish water system. *Fisheries Research* **46**: 313 ~ 325
- Kalish J M, Johnson J M, Gunn J S et al. 1996. Use of the bomb radiocarbon chronometer to determine age of southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*. *Marine Ecology Progress Series* **143**: 1 ~ 8
- Kalish J M, Johnson J M, Smith D C et al. 1997. Use of the bomb radiocarbon chronometer for age validation in the blue grenadier *Macrurus novaezelandiae*. *Marine Biology* **128**: 557 ~ 563
- Kalish J M. 1990. Use of otolith microchemistry to distinguish the progeny of sympatric anadromous and non-anadromous salmonids. *Fishery Bulletin* **88**: 657 ~ 666
- Kalish J M. 1991a. ^{13}C and ^{18}O isopic disequilibria in fish otoliths: metabolic and kinetic effects. *Marine Ecology Progress Series* **75**: 191 ~ 203
- Kalish J M. 1991b. Oxygen and carbon stable isotopes in the otoliths of wild and laboratory reared Australian salmon (*Arripis trutta*). *Marine Biology* **110**: 37 ~ 47
- Kalish J M. 1995b. Radiocarbon and fish biology. In: *Recent Developments in Fish Otolith Research* (Secor D H, Deap J M, Campana S E eds), 637 ~ 653. University of South Carolina Press, Columbia, South Carolina
- Kalish J M. 1993. Pre and post-bomb radiocarbon in fish otoliths. *Earth and Planetary Science Letters* **114**: 549 ~ 554
- Kalish J M. 1995a. Application of the bomb radiocarbon chronometer to the validation of redfish *Centroberyx affinis* age. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **52**: 1399 ~ 1405
- Kastelle C R, Kimura D K, Nevissi A E et al. 1994. Using $^{210}\text{Pb}/^{236}\text{Ra}$ disequilibrium for sublethal *Anoplopoma fimbria* age validation. *Fishery Bulletin* **92**: 292 ~ 301
- Kastelle C R, Kimura D K, Jay S R. 2000. Using $^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$ disequilibrium to validate conventional ages in scopaenids (genera *Sebastes* and *Sebastomus*). *Fisheries Research* **46**: 299 ~ 312
- Kawakami Y, Mochizuki N, Morishita K et al. 1998. Factors influencing otolith strontium/calcium ratios in *Anguilla japonica* elvers. *Environmental Biology of Fishes* **52**: 299 ~ 303
- Kennedy B P, Folz C L, Blum J D et al. 1997. Natural isotope markers in salmon. *Nature* **387**: 766 ~ 767
- Keir L A, Andrews A H, Franz B R et al. 2004. Radiocarbon in otoliths of yelloweye rockfish (*Sebastes ruberrimus*), a reference time series for the coastal waters of southeast Alaska. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **61**: 443 ~ 451
- Kernan M. 2000. Estimation of precise ages from the marginal increment widths of differently growing sardine (*Sardinops sagax*) otoliths. *Fisheries Research* **46**: 207 ~ 225

- Kraus R T, Secor D H. 2004. Incorporation of strontium in otoliths of an estuarine fish. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **302**: 85~106
- Levin J, Isinger R, Bonari G, et al. 1992. Radiocarbon in atmospheric carbon dioxide and methane: global distribution and trends. In: *Radiocarbon after Four Decades: An interdisciplinary Perspective* (Taylor R E, Long A, Kr R S, eds.), 503~518. Springer-Verlag, New York
- Madellan S E, Saunders M W. 1995. A natural tag on the otoliths of Pacific hake (*Merluccius productus*) with implications for age validation and migration. In: *Recent Developments in Fish Otolith Research* 567~580. University of South Carolina Press, Columbia, South Carolina
- Milton D A, Cheney S R. 2003. Movement patterns of the tropical shad hilsa (*Tenualosa ilisha*) inferred from transects of $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ isotope ratios in their otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **60**: 1376~1385
- Morales-Ni B, Panfili J. 2005. Seasonality in the deep sea and tropics revisited: what can otoliths tell us. *Marine and Freshwater Research* **56**: 585~598
- Muth R T, Nesler T P, Wasowicz E. 1988. Marking cyprinid larvae with tetracycline. *American Fisheries Society Symposium* **5**: 89~95
- Natanson L J, Melp J J, Campana S E. 2002. Validated age and growth of the porbeagle shark (*Lamna nasus*) in the western North Atlantic Ocean. *Fishery Bulletin* **100**: 266~278
- Negus M T. 1999. Thermal marking of otoliths in lake trout sac fry. *North American Journal of Fisheries Management* **19**: 127~140
- Oliveira K. 1996. Field validation of annular growth rings in the American eel *Anguilla rostrata* using tetracycline marked otoliths. *Fishery Bulletin* **94**: 186~189
- Pannella G. 1971. Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science* **173**: 1124~1127
- Quinn T P, Nemeth R S, McIsaac D Q. 1991. Homing and straying patterns of fall chinook salmon in the lower Columbia River. *Transactions of the American Fisheries Society* **120**: 150~156
- Robillard S R, Marsden J E. 1996. Comparison of otolith and scale ages for yellow perch from Lake Michigan. *Journal of Great Lakes Research* **22**: 429~435
- Schwartz H P, Gao Y, Campana S E, et al. 1998. Stable carbon isotope variations in otoliths of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**: 1798~1806
- Secor D H, Dean J M, Laban E H. 1992. Otolith removal and preparation for microstructural examination. In: *Otolith Microstructure Examination and Analysis*. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 117 (Stevenson D K & Campana S E, eds.), 19~57. Canada Communication Group Publishing, Ottawa
- Secor D H, Houde E D, Monteleone D M. 1995c. A mark-release experiment on larval striped bass *Morone saxatilis* in a Chesapeake Bay tributary. *ICES Journal of Marine Science* **52**: 87~101
- Secor D H, Ricker J R. 2000. Is otolith strontium a useful scalar of life cycles in estuarine fishes. *Fisheries Research* **46**: 359~371
- Secor D H, Henderson-Azapa P, A Piccoli P M. 1995b. 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, Dean J M, Campana S E (eds.). 1995a. *Recent Developments in Fish Otolith Research*, 1~735. University of South Carolina Press, Columbia, South Carolina
- Smith D C, Fenon G E, Robertson S G, et al. 1995. Age determination and growth of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*): a comparison of annulus counts with radiometric aging. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **52**: 391~401
- Smith J N, Nelson R, Campana S E. 1991. The use of $^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$ and $^{228}\text{Th}/^{228}\text{Ra}$ disequilibria in the ageing of otoliths of marine fish. In: *Radiocarbon in the Study of Marine Processes* (Kershaw P J, Woodhead D S, eds.), 350~359. Elsevier Applied Science, New York
- Stevenson D K, Campana S E (eds.). 1992. *Otolith Microstructure Examination and Analysis*. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 117.

- tion of Fisheries and Aquatic Sciences **117**: 1~126. Canada Communication Group Publishing, Ottawa.
- Svedäng H, Wicksström H, Reizenstein M, et al. 1998. Accuracy and precision in eel age estimation using otoliths of known and unknown age. *Journal of Fish Biology* **53**: 456~464.
- Thomas LM, Holt SA, Arnold CR. 1995. Chemical marking techniques for larval red drum (*Sciaenops ocellatus*) otoliths using different fluorescent markers. In: *Recent Developments in Fish Otolith Research* (Secor DH, Dean JM, Campana SE eds.), 703~717. University of South Carolina Press, Columbia, South Carolina.
- Thomold SR, Campana SE, Jones CM, et al. 1997. Factors determining $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ fractionation in anadromic otoliths of marine fish. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **61**: 2909~2919.
- Townsend DW, Radtke RL, Malone DP, 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.
- Taukanop K. 1992. Discovery of the spawning area for the Japanese eel. *Nature* **356**: 789~791.
- Taukanop K, Arai T. 2001. Facultative catadromy of the eel *Anguilla japonica* between freshwater and seawater habitats. *Marine Ecology Progress Series* **220**: 265~276.
- Taukanop K, Nakai J, Tesch FW. 1998. Do all freshwater eels migrate. *Nature* **396**: 635~636.
- Taukanop K. 1988. Otolith ageing of ayu embryo with fluorescent substances. *Nippon Suisan Gakkaishi* **54**: 1289~1295.
- Taukanop K. 1995. Use of otolith ageing in a stock enhancement program for masu salmon (*Oncorhynchus masou*) in the Kaji River, Japan. In: *Recent Developments in Fish Otolith Research* (Secor DH, Dean JM, Campana SE eds.), 403~422. University of South Carolina Press, Columbia, South Carolina.
- Taukanop K. 2006. Spawning of eels near a seamount. *Nature* **439**: 929~929.
- Tzeng W N. 1996. Effects of salinity and ontogenetic movements on strontium:calcium ratios in the otoliths of the Japanese eel *Anguilla japonica* Temmick and Schlegel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **199**: 111~122.
- Tzeng W N, Shiao J C, Liukka Y. 2002. Use of otolith Sr:Ca ratios to study the riverine migratory behaviors of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Marine Ecology Progress Series* **245**: 213~221.
- Tzeng W N, Wang CH, Wicksström H, et al. 2000. Occurrence of the semi-catadromous European eel *Anguilla anguilla* in the Baltic Sea. *Marine Biology* **137**: 93~98.
- van den Broek W L F. 1983. Aging deepwater fish species: report of a visit to the United Kingdom September-November 1982. Miscellaneous Series Fisheries Research Division, Ministry of Agriculture and Fisheries (unpublished MAF Fisheries Report). Gretna Pt Library, Wellington, New Zealand.
- Volk EC, Schoder SL, Grimm JJ. 1999. Otolith thermal marking. *Fisheries Research* **43**: 205~219.
- Weber PK, Hutcheon ID, McKeegan KD, et al. 2002. Otolith sulfur isotope method to reconstruct salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) life history. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **59**: 587~591.
- West IF, Gauldie RW. 1994. Determination of fish age using ^{210}Pb / ^{226}Ra disequilibrium methods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **51**: 2333~2340.
- Wilson CA, Beckman DW, Dean JM. 1987. Calcein as a fluorescent marker of otoliths of larval and juvenile fish. *Transactions of the American Fisheries Society* **116**: 668~670.
- Wilson DT, McComick M J. 1997. Spatial and temporal validation of settlement markers in the otoliths of tropical reef fishes. *Marine Ecology Progress Series* **153**: 259~271.
- Wilson DT. 1995. Chemical marking in otoliths. In: *Recent Developments in Fish Otolith Research* (Secor DH, Dean JM, Campana SE eds.), 1~719. University of South Carolina Press, Columbia, South Carolina.
- Woydack A, Morales Ni B. 2001. Growth patterns and biological information in fossil fish otoliths. *Paleobiology* **27**: 369~378.

AN INTRODUCTION TO FISH OTOLITH RESEARCH TECHNIQUES AND APPLICATIONS

DOU Shuozen

(Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences Qingdao 266071)

ABSTRACT

Otoliths are data loggers that record both environmental and biological information in their microstructure and microchemistry which is critically essential for interpreting the life history of fish and constructing environmental history. This information can be used to reveal the age, growth, migration and habitats of fish at either individual or population level. Many techniques have been recently developed for age validation, some of which (e.g. bomb radiocarbon chronometer, radiochemical dating and OTC) have been proven to be robust and reliable in validating the age of the long-lived fishes, the species rarely studied in the past. Techniques commonly used for microchemistry analysis (e.g. elemental fingerprint) include ICP-MS, EPMA, AAS, PKE and stable oxygen and carbon isotopes etc. SEM is mostly applied to microstructure (daily ring and increment) examination, which had ever renovated the research of early life history of fish in the 1980's. According to Campana (2005), due to the technological development in extracting information from the otoliths, the past three decades has witnessed the drastic increasing of otolith research with an annual rate of about 200 papers published in the last few years. This includes otolith microstructure, annual age and growth, age determination and validation, population dynamics, trace elements and their applications, chemical marking and environmental reconstruction and many others. The three international symposia on otolith research held in the past decade had also established recent development and advances in this field and made great contribution to the innovation and implementation of otolith analysis techniques. However, in China, otolith research was merely conducted on age determination and growth of some adult fish species in 1980's and otolith microstructure of a few larval species in 1990's, leaving age validation, microchemistry analysis and other hot topics in this field totally blank. Referring to the recently published otolith works, especially those of the internationally well-known scientists such as S.E. Campana, E. Eldson, T.S. Fowler, A.J. Kalish, J.M. Secor, D.H. Tsukamoto, K. (see reference list for others), this paper is to present a general description of the development of otolith analysis techniques and their applications so that Chinese researchers could have a relatively easy way to obtain referencing information for their otolith studies in the future.