

Pekka Keränen

Alitsariinipunainen S (ARS) -väriaineella
merkittyjen kalojen otoliittien tulkinta
fluoresenssimikroskopiolla

Vastaava toimittaja: Raimo Parmanne

Kansi: Silmäpisteasteella mätimunassa alitsariinilla (ARS) merkitty taimenen ruskuaispussipoikanen stereofluoresenssimikroskoopilla kahdella eri suotimella kuvattuna. Merkinnässä värjäytyneet kuulokivet eli otoliitit kuultavat kahtena keltaisena pisteenä pään ihon läpi. Kuvassa oikealla samat otoliitit hieman suurennettuina. (Kuva: Pekka Keränen.)

ISBN 951-776-452-9

ISSN 0787-8478

Edita Prima Oy

Helsinki 2004

Sisällys

1. JOHDANTO	1
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	4
2.1. Otoliittien mikroskopointi ja tulkintatestit	4
2.2. Logistinen regressioanalyysi	6
3. TULOKSET	8
3.1. Otoliittien mikroskopointi ja tulkintatestit	8
3.1.1. ARS-merkin muoto, väri ja laatu	8
3.1.2. ARS-merkin tulkinta kokonaisista ja sahatuista otoliiteista	13
3.2. Logistinen regressioanalyysi	16
4. TULOSTEN TARKASTELU.....	19
4.1. Otoliittien mikroskopointi ja tulkintatestit	19
4.1.1. Autofluoresenssi ja valemerkit	19
4.1.2. ARS-merkin tulkinnan kriteerit fluoresenssimikroskopiassa.....	21
4.1.3. ARS-merkin tulkinta valomikroskopialla	22
4.1.4. Otoliitin sahaamisen vaikutus ARS-merkin havaittavuuteen.....	23
4.2. Logistinen regressioanalyysi	26
5. JOHTOPÄÄTÖKSET	29
KIITOKSET	30
LÄHTEET	31

1. Johdanto

Yksikesäistä nuorempien kalojen, etenkin vastakuoriutuneiden poikasten, istutusten tuloksellisuus on ollut pitkään esimerkiksi Pohjanlahden siikakantojen hoidon ratkaisemattomia kysymyksiä, sillä käytössä ei ole ollut pienpoikasille soveltuvaa merkintämenetelmää (Niva ym. 2003). Suomessa käytössä olevien massamerkintämenetelmien, kuten kuonomerkinnän, kuumapolttomerkinnän, Panjet-laitteella tatuoinnin tai ruiskuvärjäyksen, rajoituksena tässä suhteessa on ollut se, että kalojen on oltava merkittäessä riittävän kookkaita, yleensä vähintään 3-5 cm:n mittaisia tai kesänvanhoja, joten menetelmiä ei voida soveltaa kaikkein pienimpien poikasten merkinnässä (Tsukamoto 1995, Friman ym. 1999). Lisäksi suurten poikasmäärien merkitseminen näillä menetelmillä ei ole rutiininomaisesti mahdollista tai taloudellisesti mielekästä, sillä merkintä edellyttää yleensä satojentuhansien tai miljoonien poikasten käsittelyä lyhyen ajan sisällä. Ratkaisuksi pienpoikasten ja myös vielä mätimunassa olevien alkioiden merkitsemiseksi on kehitetty erilaisia otoliitin käsitteilyyn perustuvia menetelmiä, joissa haluttu merkki saadaan aikaan joko fysikaalisin tai kemiallisin keinoin (Secor ja Houde 1995, Tsukamoto 1995).

Otoliittien merkinnässä on käytetty useita fysikaalisia ja kemiallisia menetelmiä, kuten otoliitin vuorokautisten kasvuvyöhykkeiden muodostumisnopeuteen vaikuttavaa merkintää lämpötilaa tai valojaksoa vaihtelemalla, radioisotooppimerkintää strontiumilla (^{85}Sr), kalsiumin ja merkkiaineen pitoisuuksien suhteeseen perustuvaa alkuainemerkintää strontiumilla (Sr) ja eräillä luonnossa harvinaisina esiintyvillä lantanideilla (La, Ce) sekä kalan Ca-aineenvaihdunnan mukana otoliittiin kertyviä fluoresoivia kemikaaleja (Folkvord ym. 1998, Thorrold ym. 2002). Fluoresoivilla kemikaaleilla merkintä tehdään joko kylvettämällä kaloja merkkiainepitoisessa vedessä, syöttämällä kaloille merkkiainetta sisältävää rehua tai injektioimalla aine suoraan kaloihin (Thomas ym. 1995). Merkintäkokeissa kaloja on merkitty yleisimmin tetrasykliinillä ja sen johdannaisilla, kuten oksitetrasykliinillä (OTC), kalseiinilla, alitsariinikompleksonilla (ALC) ja alitsariinipunainen S (ARS) -väriaineella (Thorrold ym. 2002). Näistä viimeksi mainitun suosio on kasvanut viime vuosina, sillä se on muita väriaineita edullisempi ja luotettavuudeltaan muita vastaava (Nagiec ym. 1995, Beckman ja Schulz 1996, Makkonen ja Pursiainen 1997). Fluoresoivia merkkiaineita on käytetty mm. istutettujen ja luonnonkalojen välisten kasvuerojen (Nagata ym. 1995) ja kalanpoikasten levittäytymisen tutkimisessa (Nagata ja Irvine 1997), istutusten tuloksellisuuden ja kalakantojen vahvistamisen arvioimisessa (Tsukamoto 1995, Eckmann ym. 1998, Støttrup ym. 2002, Champigneulle ja Cachera 2003) sekä myös otoliittien vuorokausirenkaiden ja vuosirenkaiden muodostumisen validoimisessa (Vigliola 1997, Villanueva ja Molí 1997, Al-Husaini ym. 2001).

Lämpötilamerkintä on Pohjois-Amerikassa rutiinikäytössä useiden tyyntenmerenlohilajien (*Oncorhynchus* sp.) poikasten merkinnässä (Volk ym. 1999, Blick ja Hagen 2002). Fluoresoivia merkkiaineita (OTC) puolestaan käytetään vastaavasti ainakin valkosilmäkuhan (*Sander vitreus* (Mitchill)) merkinnässä (Fielder 2002). Fluoresoivilla merkkiaineilla on lisäksi tehty laajamittaisia istutuskokeita mm. Japanissa (Tsukamoto 1995), Puolassa (Nagiec ym. 1995), Ranskassa (Champigneulle ja Cachera 2003), Saksassa (Eckmann ym. 1998) ja Tanskassa (Støttrup ym. 2002). Suomessa otoliittien merkintä on toistaiseksi ollut kokeiluasteella. Fluoresoivista merkkiaineista ARS-väriaineella on kuitenkin jo tehty onnistuneita merkintäkokeita Saimaan nieriällä (*Salvelinus alpinus* (L.)) (Makkonen ja Pursiainen 1997) ja useilla muilla yleisesti istutettavilla lajeilla Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen (RKTL) kalanviljelylaitoksilla Enonkoskella, Inarissa, Kainuussa ja Taivalkoskella. Lämpötilamerkintää ei ole vielä kokeiltu Suomessa, mutta esimerkiksi RKTL:n Taivalkosken kalanviljelylaitoksella on siihen edellytykset (Niva, henk.koht. tiedonanto).

Fluoresoivien merkkiaineiden etuna pidetään sitä, että niillä voidaan merkitä kaloja jo yksilönkehityksen alkuvaiheessa (Thorrold ym. 2002). Eri lajeilla tehdyissä kokeissa

kaloja on merkitty onnistuneesti mädin hedelmöityksen yhteydessä, jolloin edellytyksenä on, että väriaine säilyy mätimunän sisällä siihen saakka, kunnes otoliitti alkaa muodostua (Ruhlé ja Winecki-Kühn 1992), alkioasteella mätimunassa (Rojas-Beltrán ym. 1995a, 1995b, 1998, Eckmann 2003), vastakuoriutuneina (Eckmann ym. 1998), ruskuaisspussipoikasina (Brooks ym. 1994, Nagiec ym. 1995, Makkonen ja Pursiainen 1997, Sánchez-Lamadrid 2001) sekä esikesäisinä ja kesänvanhoina poikasina (Thomas ym. 1995, Lagardère ym. 2000, Skov ym. 2001). Näin ollen fluoresoivilla merkkiaineilla voidaan merkitä kaloja kulloiseenkin tutkimustilanteeseen sopivassa iässä.

Fluoresoivien aineiden sovellettavuuteen otoliittien merkinnässä liittyy kuitenkin myös ongelmia. Käyttöä ovat rajoittaneet mm. merkin havaitsemiseen tarvittava kallis erikoisvälineistö (fluoresenssimikroskooppi), merkin vaihteleva näkyvyys, mikä johtuu yhtäältä merkinnän mahdollisesta epäonnistumisesta aiheutuvien heikkojen merkkien vaikeasta erotettavuudesta ja toisaalta otoliiteissa luontaisesti esiintyvän autofluoresenssin häiritsevistä vaikutuksista, sekä se, ettei merkkiä voida havaita ulkoisesti, vaan kalojen otoliitit on preparoitava erikseen mikroskopiointia varten (Brooks ym. 1994, Makkonen ja Pursiainen 1997, Fielder 2002, Thorrold ym. 2002).

Fluoresoivien merkkien tarkastelussa käytetään fluoresenssimikroskooppia, sillä merkkiä ei yleensä voida muuten saada näkyviin. Eräiden alitsariiniyhdisteillä (ALC, ARS) merkittyjen kalalajien otoliiteista merkki on kuitenkin onnistuttu havaitsemaan valomikroskooppillakin (Beckman ja Schulz 1996, Makkonen ja Pursiainen 1997), mutta merkin havaittavuuteen on toisaalta vaikuttanut myös käytetty merkkiaineen pitoisuus (Vigliola 1997).

Fluoresenssimikroskopiassa näytettä tarkastellaan sen värjäyksessä käytetylle fluoresoivalle merkkiaineelle sopivalla suotimella (Eskelinen ja Vääräniemi 1998). Koska valolähteenä käytetyn Hg-lampun lähettämän valon aallonpituusalue on hyvin laaja, näytteen viritykseen käytetystä säteilystä osa poistetaan eksitaatiosuotimella, joka päästää lävitseen vain merkkiaineen absorptiospektrin huippua vastaavat aallonpituudet. Viritinsäteily puolestaan erotetaan näytteen lähettämästä säteilystä sulkusuotimien tai säteenjakajien avulla, jotka päästävät lävitseen vain merkkiaineen emissiospektrin huippua vastaavat tai sitä pidemmät aallonpituudet, jolloin näytteen fluoresoivat osat näkyvät kirkkaina kohteina tummaa taustaa vasten (Rost 1992). Eksitaatio- ja emissioaallonpituuksiltaan sopivien suotimien löytäminen otoliittien merkinnässä käytetyille merkkiaineille, kuten oksitetrasykliinille, on toisinaan ollut mm. autofluoresenssin häiritsevän vaikutuksen vuoksi vaikeaa, ja optimaalista yhdistelmää on jouduttu hakemaan kokeilemalla (Brooks ym. 1994; Brown, henk.koht. tiedonanto). Alitsariiniyhdisteillä merkittyjen kalojen otoliittien tarkastelussa on käytetty ainakin kahdenlaista suodintyyppiä, joista toinen vastaa eksitaatio- ja emissioaallonpituusalueiltaan alitsariinin vastaavia (Eckmann ym. 1998, Eckmann 2003) ja toinen on niitä lyhytaaltoisempi (Nagiec ym. 1995, Lagardère ym. 2000). Kirjallisuudessa ei kuitenkaan ole mainittu perusteita sille, miksi erityyppisiä suotimia on käytetty, eikä suotimien ominaisuuksia ole vertailtu keskenään.

Heikosti näkyvät merkit sekä otoliiteissa ilmenevä autofluoresenssi ovat myös hankaloittaneet fluoresoivilla aineilla merkittyjen otoliittien tulkintaa (Brooks ym. 1994, Fielder 2002). Autofluoresenssilla (primääri fluoresenssi) tarkoitetaan useimmissa kasvisolukoissa ja eläinkudoksissa UV-valossa säteilytettäessä ilmenevää luontaista fluoresenssia. Luontaisesti fluoresoivia substansseja ovat mm. kasvien klorofyllit ja ligniini sekä eläinten sidekudoksissa esiintyvät elastiinit ja kollageenit (Rost 1992). Autofluoresenssin spektri on yleensä laaja ja ulottuu suurimmalle osalle näkyvän valon aallonpituusaluetta, joten se näkyy myös useimmilla suotimilla ja voi siten alentaa tai jopa ehkäistä kokonaan fluoresoivien merkkiaineiden havaitsemista vähentämällä merkkiaineilla värjäytyneiden kohteiden tai rakenteiden kontrastia ja selvyyttä (Billington ja Knight 2001). Autofluoresenssi voi aiheuttaa ongelmia otoliittien tulkinnassa kahdella tavalla. Yhtäältä se vaikeuttaa heikkojen merkkien havaitsemista sekä toisaalta sen ja otoliitin optisten ominaisuuksien yhteisvaikutuk-

sesta otoliittiin voi syntyä aitoa merkkiä muistuttava valemmerkki (Fielder 2002). Fluoresoivilla värinaineilla tehdyissä merkintäkokeissa autofluoresenssin ongelmaa ei ole juurikaan käsitelty, sillä tutkimusten päämääränä on ollut optimaalisen merkkiainepitoisuuden selvittäminen, mitä yleensä on pidetty riittävänä kriteerinä merkin luotettavalle määrittämiselle. Rutiinitarkastelussa autofluoresenssin vaikutusta ei kuitenkaan voida sivuuttaa, sillä merkin laatu saattaa vaihdella huomattavasti merkin onnistumisesta riippuen, jolloin autofluoresenssista mahdollisesti aiheutuvien tulkintaongelmien merkitys korostuu. Näin ollen myös autofluoresenssin häiritsevää vaikutusta vähentävien menetelmien kehittäminen on oleellista otoliittien tulkinnan kannalta.

Fluoresoivilla väriaineilla merkittyjen kalojen otoliitteja on preparoitu mikroskopointia varten käsin hiomalla, mikäli merkki ei ole ollut havaittavissa kokonaisesta otoliitista, mikä on aikaa vievä menetelmä, sillä yhden otoliitin käsittelyyn kuluu yleensä useita kymmeniä minuutteja (Nagiec ym. 1995, Lagardère ym. 2000; vrt. van der Walt ja Faragher 2002). Kalojen iänmäärityksessä käsin tehtyä katkaisua tai hiontaa on syrjäyttämässä ohuiden leikkeiden sahaaminen otoliiteista (Raitaniemi ym. 2000). Menetelmässä otoliitit kiinnitetään erityiseen valumuottiin, jolloin yhdellä kertaa voidaan käsitellä otoliittien koosta riippuen useita kymmeniä näytteitä. Tämä nopeuttaa huomattavasti otoliittien preparointia, mikä mahdollistaa kymmenien tuhansien otoliittien sahaamisen vuosittain, joten menetelmän edut ovat ilmeiset käsin tehtävään käsittelyyn verrattuna (Bedford 1983). Sahaamisen soveltuvuutta fluoresoivilla väriaineilla merkittyjen otoliittien preparoimiseen ei kuitenkaan toistaiseksi ole selvitetty.

Kalojen iänmäärityksessä määrittäjien tulkintojen yhtenevyyden vertailemiseksi ja tulkintavirheiden vinoumien selvittämiseksi on kehitetty useita tilastollisia ja graafisia menetelmiä (Chang 1982, Kimura ja Lyons 1991, Campana ym. 1995, Hoenig ym. 1995, Campana 2001). Blick ja Hagen (2002) ovat kehittäneet tilastollisen mallin myös lämpötilamerkittyjen kalojen otoliiteista tehtyjen tulkintojen yhtenevyyden ja otoliittien luokittelun luotettavuuden mittaamiseksi. Sen sijaan vastaavista mittareista fluoresoivilla väriaineilla merkittyjen kalojen otoliittien tulkinnan osalta kirjallisuudessa ei ole raportoitu. Autofluoresenssin ja mahdollisten valemerkkien esiintymisen sekä aitojen merkkien laadun ja havaittavuuden vaihtelun vuoksi on kuitenkin todennäköistä, että otoliittien tulkinta on altis määrittäjien kokemuksesta ja muista subjektiivisista tekijöistä aiheutuville virheille. Samoin mm. käytetyt merkkiainekonsentraatiot ja kylvetysajat, kalojen merkintäikä sekä merkkien havainnoinnissa käytetyt välineet voivat vaikuttaa otoliittien tulkintaan (Brooks ym. 1994). Näin ollen myös merkin tulkittavuuteen vaikuttavien tekijöiden tutkiminen ja kvantifiointi on tärkeää merkintöjen luotettavuuden arvioimisessa.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää 1) voidaanko ARS-merkki määrittää otoliitista luotettavasti fluoresenssimikroskopiolla kahdella erilaisella suotimella ja millaisin kriteerein merkitty otoliitti tällöin voidaan erottaa merkitsemättömästä sekä soveltuuko myös valomikroskoopi ARS-merkin määrittämiseen, 2) soveltuuko otoliittien sahaaminen tarkkuusleikkurilla ohutleikkeeksi ARS-merkittyjen otoliittien preparoimiseen ja parantaako sahaaminen merkin havaittavuutta sekä 3) mitkä tekijät vaikuttavat ARS-merkin tulkintaan fluoresenssimikroskoopilla tilanteessa, jossa määritettävä aineisto sisältää tulkitsijoille tuntemattomassa suhteessa sekä merkittyjen että merkitsemättömien kalojen otoliitteja.

2. Aineisto ja menetelmät

2.1. Otolitiittien mikroskopointi ja tulkintatestit

Tutkimusaineistona oli yhteensä 222 paria alitsariinipunainen S (ARS) -väriaineella merkittyjen nieriöiden (*Salvelinus alpinus* (L.)), harmaanieriöiden (*Salvelinus namaycush* (Walbaum)), järvilohien (*Salmo salar* m. *sebag* Girard), taimenten (*Salmo trutta* L.), siikojen (*Coregonus* sp.) ja kuhien (*Sander lucioperca* (L.)) samasta yksilöstä otettuja otoliitteja (sagitta) sekä kontrolleina 75 paria vastaavia merkitsemättömien kalojen otoliitteja. Kalat olivat peräisin RKTL:n kalanviljelylaitoksilta Inarista (harmaanieriä ja siiat sekä kahden viikon ikäisinä merkityt nieriät ja taimenet), Kainuusta (kuha) ja Enonkoskelta (järvilohi sekä kolmen kk:n ikäisinä merkityt nieriät ja taimenet).

Merkityt kalat oli käsitelty kolmessa eri ARS-pitoisuudessa (50 mg l⁻¹, 75 mg l⁻¹, ja 100 mg l⁻¹) kolmea eri kylvetyaikaa (3 h, 4 h ja 6 h) käyttäen (taulukko 1). Merkintäikä oli 2 viikkoa, 2 kk tai 3 kk kuoriutumisen jälkeen. Otolitiitit poistettiin sekä merkityistä että merkitsemättömistä kaloista niiden ollessa 0+ - 1+ -ikäisiä, lukuun ottamatta osaa kuhista, jotka olivat 3+ -ikäisiä. ARS-merkityt nieriät, harmaanieriät, järvilohet ja taimenet olivat keskipituudeltaan ja -painoltaan suurempia kuin merkitsemättömät yksilöt. Merkitsemättömät siiat puolestaan olivat vastaavasti hieman suurempia kuin ARS-merkityt. Merkittyjen ja merkitsemättömien kuhien ryhmässä 0+ -ikäiset kalat olivat kooltaan toisiaan vastaavia, mutta 3+ -ikäiset kontrollit olivat suurempia kuin ARS-merkityt kalat (taulukko 1). Kontrollien ja merkittyjen kalojen pituus- ja painoeroista johtuen myös otoliittien koko vaihteli lajeittain vastaavalla tavalla (vrt. Rojas-Beltrán ym. 1995a). Tutkimuksen aikana järjestetyssä sokkoteistissä mahdollisuutta otoliittien tunnistamiseen koon perusteella merkityiksi tai merkitsemättömiksi vähennettiin satunnaistamalla otoliittien järjestys sekä sekoittamalla osittain eri lajien otoliitteja samoihin näytteisiin.

Kustakin otoliittiparista yksi otoliitti jätettiin kokonaiseksi ja toinen sahattiin ohutleikkeeksi. Kokonaiset otoliitit kiinnitettiin satunnaistetussa järjestyksessä otoliittivahalla (Crystalbond) 76×50 mm:n objektilaseille viiteen 6 otoliittia sisältävään riviin distaalinen puoli ylöspäin. Sahattaviksi valitut otoliitit asetettiin satunnaistetussa järjestyksessä tarkkuusvalumuottiin polyesterihartsipohjalle (Polyester Resin, Martins Plastics Limited) viiteen 5-16 otoliittia käsittävään riviin distaalinen puoli ylöspäin ja kohdistettiin poikittain ytimen eli nukleuksen mukaan ennalta määrätyle sahauslinjalle ristisiirtopöydän ja videokameran avulla. Tämän jälkeen muotti otoliitteineen valettiin umpeen polyesterihartsilla ja hartsin kovetuttua valukappaleista sahattiin jokaiselta riviltä 0,4 mm:n paksuinen leike tarkkuusleikkurilla (Struers Accutom 50, timanttiterä 433CA) siten, että otoliittien nukleus jäi näkyviin leikkeen pinnalle (Bedford 1983). Leikkeiden sahauspintaa ei käsitelty hiomalla tai kiillottamalla. Ohutleikkeet kiinnitettiin objektilaseille mikroskopointia varten. Merkittyjen ja merkitsemättömien otoliittien järjestys satunnaistettiin erikseen molemmissa käsittelyissä (kokonainen tai sahattu otoliitti) Microsoft Excel –taulukkolaskentaohjelmassa RAND-funktiolla. Tarkkuusleikkurissa käytettävän sahanterän jäähdytys- ja korroosionestoaineen (ADDUN) sekä polyesterihartsista sahauksessa syntyvän jätteen fluoresoivuus tutkittiin ennen sahausta. Kummankaan aineksen ei havaittu fluoresoivan, joten ne eivät kontaminoineet näytteitä.

Taulukko 1. Eri-ikäisinä sekä eri ARS-pitoisuuksissa (ARS) ja kylvetysajoilla merkittyjen kalojen ja kontrollien (kontr.) iät näytteenottohetkellä (lkä), keskipituudet (RT-mitta), keskipainot ja määrät lajeittain (sd = keskihajonta).

Laji	ARS (mg l ⁻¹)	Kylvetys- aika (h)	Merkintä- ikä	Ikä (v)	Pituus ± sd (mm)	Paino ± sd (g)	n
Nierä	50	4	2 vk	0+	98,4 ± 12,5	10,2 ± 3,4	5
	75	3	3 kk	1+	203,5 ± 20,0	96,0 ± 32,3	12
	75	6	3 kk	1+	196,4 ± 22,0	90,2 ± 30,9	14
	100	4	2 vk	0+	123,0 ± 18,2	11,5 ± 6,1	6
	kontr.			0+	89,6 ± 10,4	5,5 ± 1,6	8
							yht. 45
Harmaanierä	50	4	2 vk	0+	108,6 ± 13,4	10,9 ± 3,9	5
	75	3	3 kk	1+	201,3 ± 30,7	93,8 ± 35,6	11
	75	6	3 kk	1+	182,3 ± 18,6	73,9 ± 27,2	12
	100	4	2 vk	0+	119,8 ± 4,5	12,0 ± 10,3	5
	kontr.			0+	105,0 ± 12,4	8,1 ± 2,6	10
							yht. 43
Järvilohi	75	3	3 kk	1+	144,2 ± 14,6	39,8 ± 10,7	12
	75	6	3 kk	1+	148,9 ± 13,8	43,5 ± 13,5	9
	kontr.			1+	107,5 ± 23,4	14,5 ± 10,7	10
							yht. 31
Taimen	50	4	2 vk	0+	77,5 ± 6,4	4,9 ± 1,3	6
	75	3	3 kk	1+	140,0 ± 16,8	37,7 ± 13,4	13
	75	6	3 kk	1+	140,7 ± 18,7	38,1 ± 15,9	11
	100	4	2 vk	0+	78,8 ± 5,3	4,8 ± 1,1	9
	kontr.			0+	67,4 ± 4,6	2,9 ± 0,6	8
							yht. 47
Siika	50	4	2 vk	0+	83,6 ± 7,7	4,1 ± 1,2	17
	75	3	3 kk	1	73,3 ± 5,3	2,3 ± 1,2	7
	75	6	3 kk	1	69,0 ± 4,2	1,9 ± 0,7	10
	100	4	2 vk	0+	93,4 ± 6,8	5,7 ± 1,5	11
	kontr.			0+	98,2 ± 12,8	5,8 ± 3,0	25
							yht. 70
Kuha	75	4	2 kk	0+	52,8 ± 3,5	0,6 ± 0,1	22
	75	4	2 kk	3+	160,6 ± 17,7	29,8 ± 10,0	25
	kontr.			0+	51,0 ± 1,7	1,0 ± 0,2	9
	kontr.			3+	186,0 ± 29,3	56,5 ± 32,7	5
							yht. 61

ARS-merkin muoto ja väri sekä kokonaisissa että sahatuissa otoliiteissa tutkittiin stereofluoresenssimikroskoopin (Leica MZ FLIII) avulla 50×-100× suurennuksella käyttäen GFP2-suodinta (eksitaatiosuodin 480/40 nm, sulkusuodin 510 nm) ja G-suodinta (eksitaatiosuodin 546/12 nm, sulkusuodin 590 nm). Osa sahatuista otoliiteista, joissa ARS-merkki näkyi heikosti tai ei ollenkaan 100× suurennuksella, tutkittiin fluoresenssimikroskoopilla (Zeiss Axioplan II) 200×-400× suurennuksella FITC- (eksitaatiosuodin BP 450-490 nm, säteenjakaja FT 510 nm, emissio LP 515 nm)

ja Texas Red -suodinta (eksitaatiosuodin BP 530-585 nm, säteenjakaja FT 600 nm, emissio LP 615 nm) käyttäen. Molemmissa mikroskoopeissa UV-valolähteenä oli 100 W:n Hg-lamppu.

ARS-merkin laatua kokonaisissa ja sahatuissa otoliiteissa selvitettiin testillä (koe 1), jossa kaksi määrittäjää arvioi kolmiportaisella asteikolla (ei merkkiä, heikko merkki, selvä merkki) merkin havaittavuutta erikseen sekä GFP2- että G-suotimella. Testi tehtiin edellä mainitulla Leica-stereofluoresenssimikroskoopilla 100× suurennuksella. Testiaineistona käytettiin merkittyjen siikojen otoliittipareja ($n = 45$, taulukko 1), joissa oli sekä kahden viikon että kolmen kk:n ikäisinä ARS-pitoisuuksissa 50 mg l^{-1} , 75 mg l^{-1} ja 100 mg l^{-1} merkittyjä kaloja. Määrittäjillä oli jonkin verran kokemusta otoliittien käsittelystä, mutta ei alitsariinimerkin tulkinnasta. Ennen testiä kumpikin määrittäjä sai tutustua merkityistä otoliiteista UV-valossa otettuihin valokuviin. Määrittäjien tulkintatulokset yhdistettiin ja niistä laskettiin keskiarvot eri suotimilla tehdyille tulkinnoille sekä merkin laadun suhteelliset osuudet ARS-pitoisuuksittain kokonaisissa ja sahatuissa otoliiteissa GFP2- ja G-suotimella tarkasteltuna. Merkin laadun jakaumia eri ARS-pitoisuuksissa verrattiin Kruskalin-Wallis testillä.

ARS-merkin havaittavuutta ja sen tulkintaan vaikuttavia tekijöitä selvitettiin todellista määritystilannetta jäljittelevällä sokkotestillä (koe 2), jossa viisi määrittäjää tutki otoliittiaineiston fluoresenssimikroskoopilla. Määrittäjistä kaksi suoritti testin Norjassa (Norsk institutt for vannforskning, Trondheim) ja muut kolme määrittäjää tekivät testin Suomessa (Biotekniikan instituutti, Helsinki). Määrittäjät olivat perehtyneitä kalojen iänmääritykseen otoliiteista, mutta aikaisempaa kokemusta alitsariinimerkin tulkinnasta heillä ei ollut. Ennen sokkotestiä määrittäjät saivat tutustua merkityistä ja merkitsemättömistä otoliiteista UV-valossa otettuihin valokuviin. Sokkotestissä kukin määrittäjä kävi otoliittiaineiston läpi kerran.

Norjassa sokkotestissä käytettiin UV-valolähteellä (100 W:n Hg-lamppu) varustettua valomikroskooppia (Zeiss Standard 16 Model), jossa oli Zeissin fluoresenssi-suodinsarjat nro 9 (eksitaatiosuodin BP 450-490 nm, säteenjakaja FT 510 nm, emissio LP 515 nm) ja nro 15 (eksitaatiosuodin BP 546/12 nm, säteenjakaja FT 580 nm, emissio LP 590 nm). Suomessa sokkotestissä käytettiin edellä mainittua Leica-stereofluoresenssimikroskooppia ja suotimia (GFP2 ja G), joiden aallonpituusalueet vastaavat Zeissin suodinsarjojen aallonpituusalueita. Alitsariinin eksitaatioaallonpituus on 530-550 nm ja emissioaallonpituus $\geq 580 \text{ nm}$ (Folkvord ym. 1998), joita Leican G-suotimen ja Zeissin suodinsarjan nro 15 aallonpituusalueet vastaavat täydellisesti. Testissä määrittäjät tarkastelivat otoliitteja mikroskoopin molemmilla suodintyypeillä 100× suurennuksella.

ARS-merkin havaittavuutta valomikroskopiolla arvioitiin lisäksi testillä (koe 3), jossa kaksi määrittäjää tutki kokonaiset otoliitit preparointimikroskoopilla (Olympus SZ60) 50×-100× suurennuksella ja sahatut otoliitit tutkimusmikroskoopilla (Olympus CK30) 125× suurennuksella. Määrittäjillä oli kokemusta kalojen iänmäärityksestä otoliiteista, mutta ei ARS-merkin tulkinnasta. Määrittäjien tulkintatulokset yhdistettiin ja niistä laskettiin suhteelliset osuudet kokonaisista ja sahatuista otoliiteista tehtyjen oikeiden tulkintojen määrälle eri ARS-pitoisuuksissa.

2.2. Logistinen regressioanalyysi

Logistinen regressio on lineaarisen regression erityistyyppi, joka soveltuu tilanteisiin, joissa selitettävä muuttuja on dikotominen eli voi saada vain kahdenlaisia arvoja (0, 1) (Tabachnick ja Fidell 2001). Tässä tutkimuksessa logistisen regressioanalyysin avulla selvitettiin, mitkä tekijät vaikuttivat fluoresenssimikroskopiolla tehdyssä sokkotestissä (koe 2) todennäköisyyteen määrittää otoliitti alitsariinilla merkityksi. Analyysissä tilastoyksikkönä oli määritystapahtuma ($n = 2\ 970$), selitettävänä muuttujana ARS-merkin tulkinta (merkki on tai merkkiä ei ole) ja selittävinä muuttujina (kovariaatteina)

otoliitin merkintä (merkitsemätön tai merkitty), otoliitin käsittely (kokonainen tai sahattu) ARS-pitoisuus (0 mg l^{-1} , 50 mg l^{-1} , 75 mg l^{-1} tai 100 mg l^{-1}), kylvetyaika (0 h, 3 h, 4 h tai 6 h), laji (nieriä, harmaanieriä, järvilohi, taimen, siika tai kuha) ja määrittäjä (määrittäjä 1, 2, 3, 4 tai 5). Kaikki selittävät muuttujat määriteltiin analyysissä kategoriaalisiksi (luokitteluasteikollisiksi), jolloin muuttujien eri tasoja voitiin vertailla niiden referenssitason. Kunkin muuttujan referenssitasona oli muuttujan viimeinen luokka (otoliitin merkintä: merkitty, käsittely: sahattu, ARS-pitoisuus: 100 mg l^{-1} , kylvetyaika: 6 h, laji: kuha, määrittäjä: määrittäjä 5). Muuttujien luokittelusta johtuen ARS-pitoisuus- ja kylvetyaika -muuttujien vapausasteet ($df = 3$) vähenivät analyysissä yhdellä, jolloin kontrolleja vastaavat 0-tasot (0 mg l^{-1} ja 0 h) eivät tulleet mukaan analyysiin erillisinä tekijöinä, vaan ne sisällytettiin vakiotermiin. Selittävien muuttujien tilastollinen merkitsevyys tulkittiin Waldin testisuureen avulla. Mallin lineaarisuus testattiin Hosmerin ja Lemeshow'n yhteensopivuustestillä. Analyysin tulokset tulkittiin ristitulosuhteen (*odds ratio*) avulla mahdollisuutena (*odds*, vedonlyöntisuhde = todennäköisyys, että otoliitti määritettiin merkityksi jaettuna todennäköisyydellä, että otoliitti määritettiin merkitsemättömäksi) tulkita otoliitti merkityksi tai merkitsemättömäksi (merkitsemättömäksi tulkitsemisen ristitulosuhde voidaan ilmaista merkityksi tulkitsemisen ristitulosuhteen käänteislukuna). Testin nollahypoteesina oli H_0 : Otoliitin merkintä, käsittely, alitsariinipitoisuus, kylvetyaika, laji ja määrittäjä eivät vaikuta todennäköisyyteen tulkita otoliitti merkityksi. Vastahypoteesina oli H_1 : Todennäköisyys tulkita otoliitti merkityksi riippuu yhdestä tai useammasta kovariaatista. Riskitasona oli 5 % ($\alpha = 0,05$). Analyysi tehtiin SPSS-tilasto-ohjelmistolla.

3. Tulokset

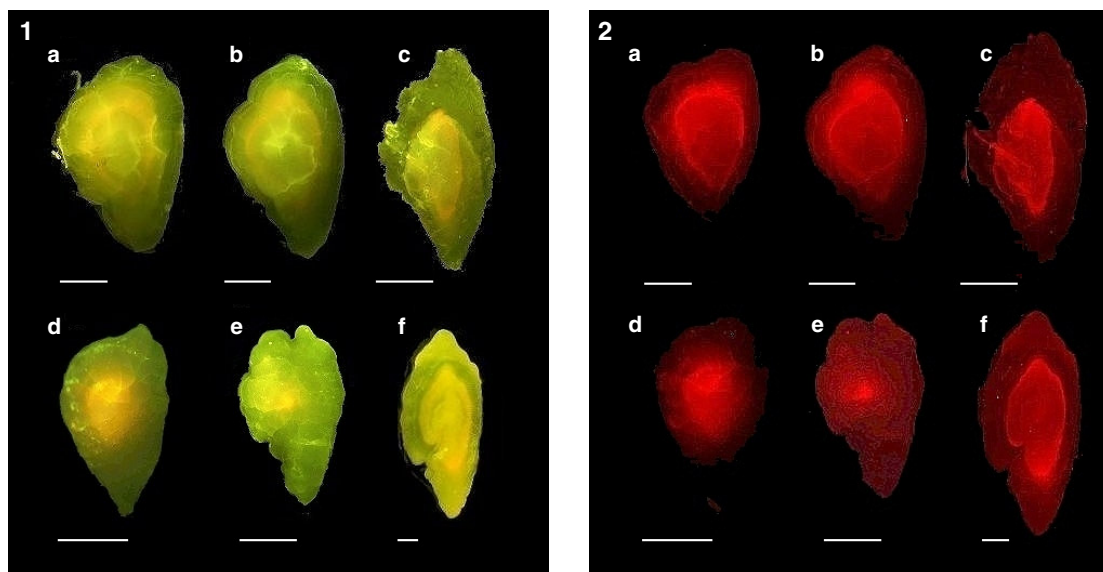
3.1. Otolliittien mikroskopiointi ja tulkintatestit

3.1.1. ARS-merkin muoto, väri ja laatu

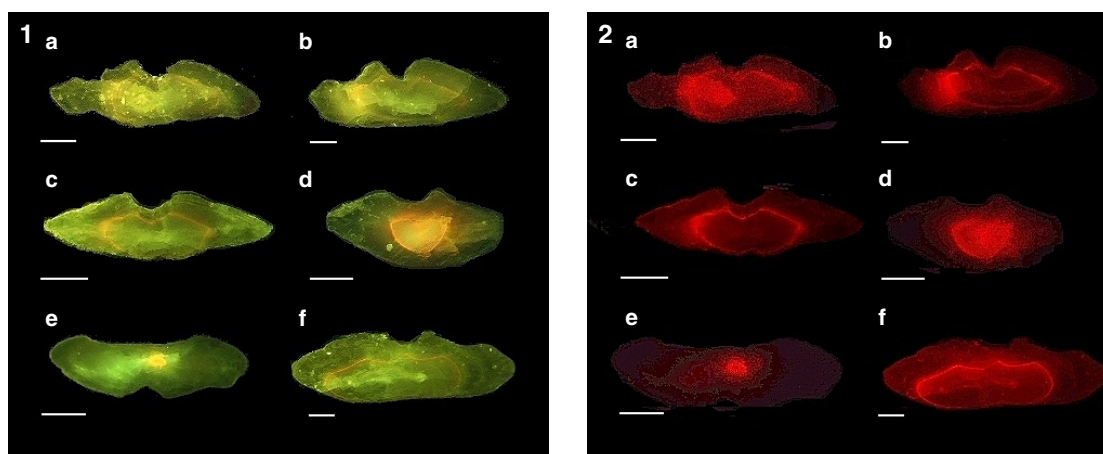
Kahden ja kolmen kuukauden ikäisinä merkittyjen kalojen kokonaisissa otoliiteissa ARS-väriaine näkyi leveänä renkaana nukleuksen ympärillä (kuva 1: a, b, c, f) ja 2 viikon ikäisinä merkittyjen kalojen otoliiteissa pistemäisenä merkinä nukleuksessa (kuva 1: d, e). Väritään ARS-merkki oli oranssi tai keltainen GFP2-suotimella tarkasteltuna ja punainen G-suotimella tarkasteltuna. Vastaavasti sahatuissa otoliiteissa ARS-väriaine näkyi GFP2-suotimella oranssina tai keltaisena ja G-suotimella punaisena renkaana nukleuksen ympärillä (kuva 2: a-d, f) tai pistemäisenä merkinä nukleuksessa (kuva 2: 1 e, 2 e).

Kahden viikon ikäisinä merkittyjen nieriöiden, harmaanieriöiden ja taimenten sahatuissa otoliiteissa ARS-merkki oli yleensä selväpiirteinen merkintäajankohdan vuorokautista kasvuvyöhykettä vastaava ehjä rengas (kuva 2: 1 d). Samoin 2 kk:n ikäisinä merkittyjen kuhien otoliiteissa ARS-merkki oli selväpiirteinen ja merkintäajankohdan vuorokausirenkaan mukainen (kuva 2: 1 f, 2 f). Sen sijaan 3 kk:n ikäisinä merkittyjen kalojen otoliiteissa ARS-merkki näkyi useimmissa tapauksissa vaillinaisena renkaana. Erityisesti nieriän ja harmaanieriän, mutta osittain myös järvilohen ja taimenen, sahatuissa otoliiteissa merkin fluoresenssi oli voimakkaampaa otoliitin dorsaaliosalla, jolloin merkki oli muodoltaan diffuusi ja ulottui useiden vuorokausirenkaiden yli (kuva 2: 2 a-c, otoliitin vasen puoli). Merkin raja oli kuitenkin yleensä selväpiirteinen joko nukleuksen tai sen vastakkaisella puolella riippuen siitä, kummalta puolen leikettä otoliittia tarkasteltiin (kuva 3).

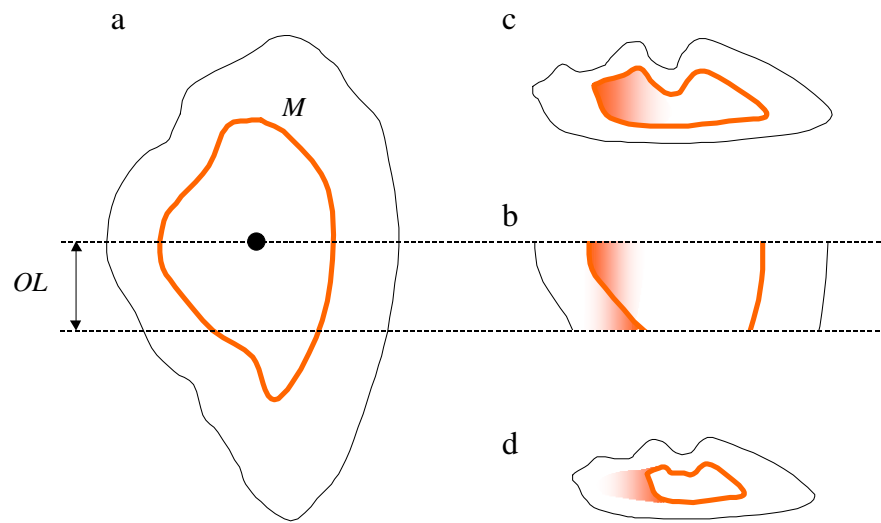
Sekä merkityissä että merkitsemättömissä otoliiteissa havaittiin myös autofluoresenssia, joka näkyi voimakkuudeltaan vaihtelevana vihreänä (GFP2-suodin) tai punaisena (G-suodin) värinä otoliitin eri osissa (kuvat 1 ja 2). G-suotimella tarkasteltuna autofluoresenssin intensiteetti oli yleensä huomattavasti pienempi kuin GFP2-suotimella tarkasteltuna. Autofluoresenssin voimakkuudessa oli eroja lajien välillä, mutta myös saman lajin eri yksilöiden välillä, mikä oli selvimmin havaittavissa sahatuissa otoliiteissa. Voimakkainta autofluoresenssi oli kuhan otoliiteissa, joissa se ilmeni intensiivisesti fluoresoivana diffuusina alueena otoliitin nukleuksessa ja sen ympärillä (kuva 4: 2). Merkityissä otoliiteissa ARS-merkki oli kuitenkin selvästi nukleuksen ulkopuolella, joten autofluoresenssi ei estänyt merkin havaitsemista. Myös osassa nieriän, harmaanieriän ja siian otoliitteja esiintyi voimakasta autofluoresenssia otoliitin nukleuksessa. Järvilohen ja taimenen otoliiteissa autofluoresenssi oli tutkitussa aineistossa vähäisintä. Joidenkin otoliittien pinnalla oli jäänteitä otoliittia suojaavasta kalvosta ja sisäkorvan kudoksista, jotka myös fluoresoivat voimakkaasti. Kudonjäänteet erottuivat kuitenkin erillisinä fluoresoivina kohteina kokonaisten otoliittien pinnalla, kun taas ARS-merkki sijaitsi selvästi otoliitin sisällä. Sahatuissa otoliiteissa kudonjäänteistä aiheutuva fluoresenssi näkyi aivan otoliitin ulkoreunassa, joten sekin oli erotettavissa helposti varsinaisesta otoliitin nukleuksesta tai sen ympärillä olevasta ARS-merkistä.



Kuva 1. ARS-merkki kokonaisissa otoliiteissa kuvattuna GFP2-suotimella (1) ja G-suotimella (2) otoliitin distaaliselta puolelta. GFP2-suotimella tarkasteltuna ARS-väriaine näkyy oranssina tai keltaisena ja G-suotimella punaisena leveänä renkaana nukleuksen ympärillä (a, b, c, f) tai pistemäisenä merkinä nukleuksessa (d, e). ARS-merkin sisä- tai ulkopuolinen vihreä (1) tai punainen (2) väri johtuu autofluoresenssista. Lajit: a) nieriä, merkintäikä (merk.) 3 kk, ARS-pitoisuus (kons.) 75 mg l^{-1} , kylvetysaika (inkub.) 3 h, ikä 1+; b) harmaanieriä, merk. 3 kk, kons. 75 mg l^{-1} , inkub. 3 h, ikä 1+; c) järvilohi, merk. 3 kk, kons. 75 mg l^{-1} , inkub. 6 h, ikä 1+; d) taimen, merk. 2 viikkoa, kons. 100 mg l^{-1} , inkub. 4 h, ikä 0+; e) siika, merk. 2 viikkoa, kons. 50 mg l^{-1} , inkub. 4 h, ikä 0+; f) kuha, merk. 2 kk, kons. 75 mg l^{-1} , inkub. 4 h, ikä 3+. (Mittajanat 0,5 mm.)



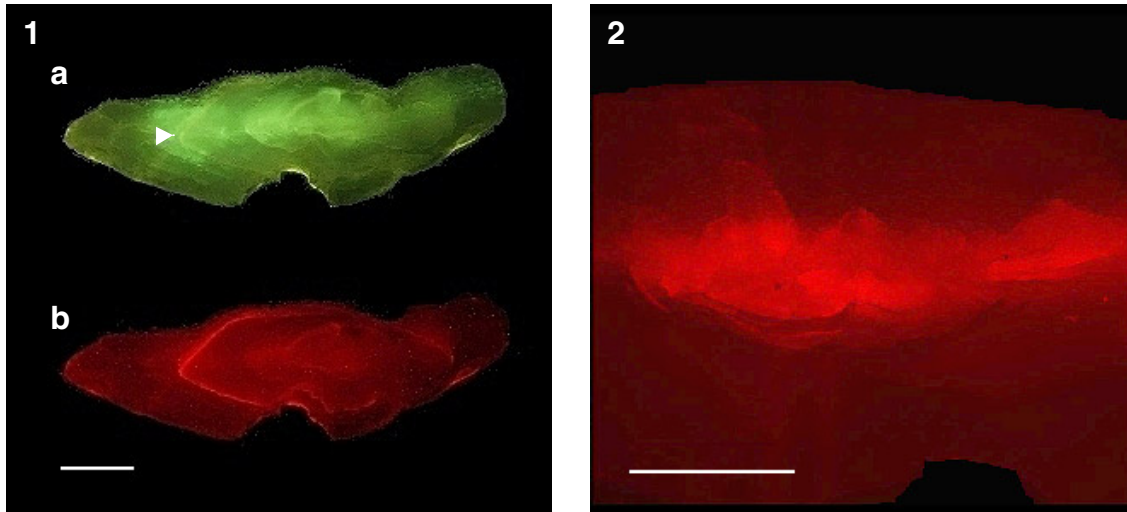
Kuva 2. ARS-merkki sahatuissa otoliiteissa kuvattuna GFP2-suotimella (1) ja G-suotimella (2). GFP2-suotimella tarkasteltuna ARS-väriaine näkyy oranssina tai keltaisena ja G-suotimella punaisena renkaana nukleuksen ympärillä (a-d, f) tai pistemäisenä merkinä nukleuksessa (e). ARS-merkin sisä- tai ulkopuolinen vihreä (1) tai punainen (2) väri johtuu autofluoresenssista. Lajit, merkintäiät, ARS-pitoisuudet, kylvetysajat ja iät kuten kuvassa 1. (Mittajanat 0,2 mm.)



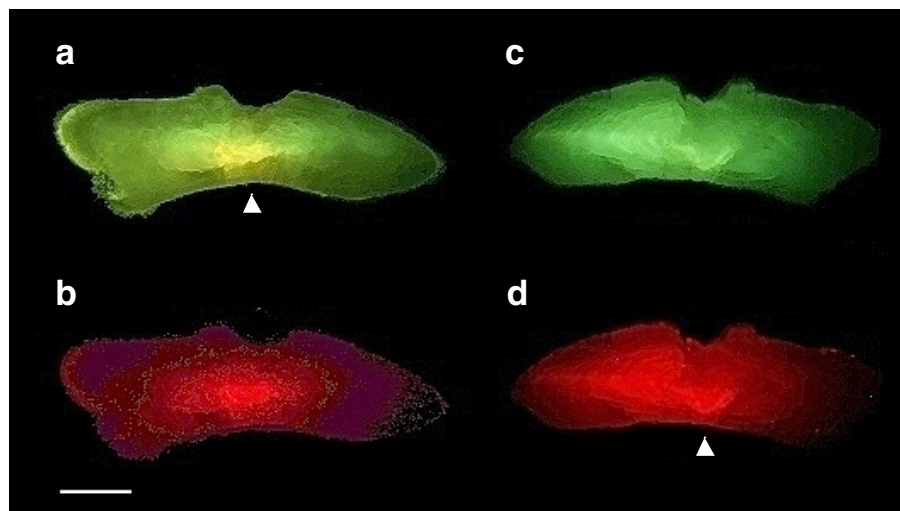
Kuva 3. Diffuusi ARS-merkki 3 kk:n ikäisenä merkittyjen kalojen nukleuksen (●) kautta sahatuissa otoliiteissa aiheutuu otoliitin ja siihen syntyneen ARS-merkin (*M*) muodosta (a, vrt. kuva 1: 2 b) sekä siitä, että fluoresoiva väriaine kuultaa otoliitin läpi (b), jolloin merkissä havaitaan renkaan lisäksi myös epämääräisesti fluoresoiva alue ohutleikkeen (*OL*) pinnalla (c, d). Merkin reuna on teräväpiirteinen joko merkin ulkoreunalla (c, vrt. kuva 2: 2 b) tai sisäreunalla (d), riippuen siitä, kumpaa puolta ohutleikkeestä tarkastellaan. Otoliitin dorsaalinen puoli on kuvassa vasemmalla.

Osassa 3 kk:n ikäisinä merkittyjen kalojen, erityisesti järvilohen ja taimenen, otoliitteja ARS-merkki ei ollut erotettavissa autofluoresenssista GFP2-suotimella 100× suurennuksella (kuva 4: 1 a), mutta G-suotimella merkki oli useimmiten selvästi havaittavissa (kuva 4: 1 b). ARS-merkin keltainen tai oranssi väri näkyi kuitenkin 200×-400× suurennuksella FITC-suotimella, joka vastaa GFP2-suodinta. Ominaisuuksiltaan G-suodinta lähellä olevalla Tex Red -suotimella heikoimmatkin ARS-merkit olivat havaittavissa 200× suurennuksella.

Tutkimusaineistossa sahattujen kontrollien joukossa oli yksi otoliitti (siika), jossa oli voimakkaasta autofluoresenssista ja vuorokausirenkaiden valoa taivuttavasta vaikutuksesta aiheutuva aitoa ARS-merkkiä erehdyttävästi muistuttava rakenne otoliitin nukleuksessa. G-suotimella tätä valemerkkiä ei voinut värin perusteella erottaa aidosta merkistä, sillä sekä aito merkki että valemerkki näkyivät punaisena (kuva 5: b, d). Sen sijaan GFP2-suotimella tarkasteltuna valemerkki erottui selvästi aidosta, sillä siinä ei ollut havaittavissa ARS-merkille tyypillistä oranssia tai keltaista väriä (kuva 5: a, c). ARS-merkin havaittavuutta koskevassa sokkotestissä (koe 2) yksikään määrittäjistä ei kuitenkaan tulkinut kyseistä otoliittia merkityksi (tosin kaksi määrittäjistä tulkitse otoliitin kokonaisen parin merkityksi).



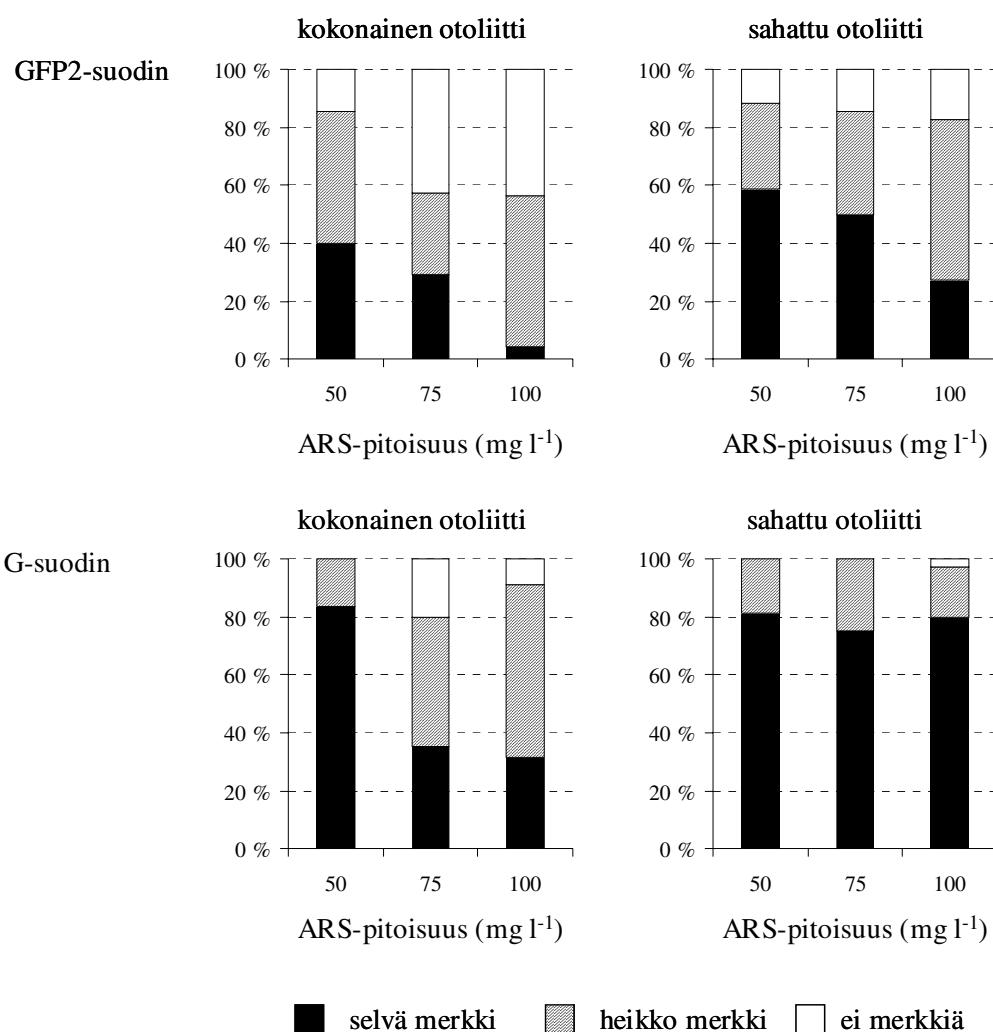
Kuva 4. Kolmen kk:n ikäisenä merkityn taimenen (ikä 1+) sahattu otoliitti kuvattuna GFP2- ja G-suotimella (1). GFP2-suotimella heikko ARS-merkki ei erotu vihreästä autofluoresenssista (1 a), mutta G-suotimella osa alitsariinirenkaasta on selvästi havaittavissa (1 b). Kuhan (ikä 3+, kontrolli) sahatussa otoliitissa autofluoresenssi ilmenee diffuusina alueena otoliitin nukleuksessa (2) (kuvattu Tex Red -suotimella). Kasvuvyöhykkeiden rajapinnat taittavat valoa ja aiheuttavat vaihtelevasti fluoresoivia vyöhykkeitä otoliitin eri osissa (1 a, b; 2). (Mittajanat 0,2 mm.)



Kuva 5. Kahden viikon ikäisenä merkityn siian (ikä 0+) sahattu otoliitti (a, b) sekä merkitsemättömän siian (ikä 1) sahattu otoliitti (c,d) kuvattuna GFP2-suotimella (a, c) ja G-suotimella (b, d). GFP2-suotimella tarkasteltuna merkityn siian otoliitissa ARS-merkki näkyy keltaisena alueena otoliitin nukleuksessa (a) ja autofluoresenssi vihreänä. Vastaavassa merkitsemättömän siian otoliitissa autofluoresenssi on voimakasta, mutta ARS-merkin tyypillistä keltaista tai oranssia väriä ei ole havaittavissa nukleuksessa (c). Sen sijaan G-suotimella tarkasteltuna merkitsemättömän siian otoliitin autofluoresenssi ja kasvuvyöhykkeiden valoa taittava vaikutus saavat otoliitin nukleuksessa aikaan alitsariinimerkkiä muistuttavan rakenteen (d), jota ei voi värin perusteella erottaa aidosta pistemäisestä merkistä (b). (Mittajana 0,2 mm.)

Kokeessa 1 ARS-merkin laadun havaittiin olevan siian otoliiteissa parempi G-suotimella kuin GFP2-suotimella tarkasteltuna. Selväksi tai heikoksi merkiksi tulkittujen määritysten osuus sahattujen otoliittien kohdalla oli G-suotimella 99 % ja GFP2-suotimella 86 %, ja vastaavasti kokonaisten otoliittien kohdalla G-suotimella 90 % ja GFP2-suotimella 67 %.

ARS-merkki oli otoliitin käsittelystä riippumatta selvimmän havaittavissa molemmilla suodintyypeillä ARS-pitoisuudessa 50 mg l⁻¹ merkittyjen siikojen otoliiteissa (kuva 6). GFP2-suotimella tarkasteltuna selvien merkkien suhteellinen osuus oli pienin sekä kokonaisissa että sahatuissa otoliiteissa ARS-pitoisuudessa 100 mg l⁻¹. Sen sijaan G-suotimella tarkasteltuna sahatuista otoliiteista selväksi merkiksi tulkittujen määritysten välillä ei ollut oleellista eroa eri ARS-pitoisuuksissa (kuva 6). Sahattujen otoliittien kohdalla havaitsemattomien merkkien osuudet GFP2-suotimella vastasivat kutakuinkin heikkojen merkkien osuutta G-suotimella.



Kuva 6. Alitsariinimerkin havaittavuuden (selvä merkki, heikko merkki, ei merkkiä) osuudet ARS-pitoisuuksissa 50 mg l⁻¹ (n = 17), 75 mg l⁻¹ (n = 17) ja 100 mg l⁻¹ (n = 11) merkittyjen siikojen kokonaisissa ja sahatuissa otoliiteissa GFP2- ja G-suotimella tarkasteltuna.

Kokonaisten otoliittien kohdalla ARS-merkin laadun jakaumat poikkesivat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan eri ARS-pitoisuuksissa sekä GFP2-suotimella (Kruskalin-Wallis testi, $\chi^2 = 8,893$, $df = 2$, $P = 0,010$) että G-suotimella ($\chi^2 = 18,098$, $df = 2$, $P < 0,001$) tarkasteltuna. Sen sijaan sahattujen otoliittien kohdalla merkin laadun jakaumien välillä eri ARS-pitoisuuksissa ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa kummallakaan suotimella (Kruskalin-Wallis testi, $P > 0,05$).

Sahattujen otoliittien osalta määrittäjät olivat yksimielisiä merkin laadusta G-suotimella 84 %:ssa ja GFP2-suotimella 67 %:ssa tulkinnoista sekä kokonaisista otoliiteista tehtyjen tulkintojen osalta vastaavasti 56 %:ssa ja 36 %:ssa tapauksista. Määrittäjien välillä ei ollut oleellista eroa sahatuista otoliiteista tehdyissä tulkinnoissa, joissa kumpikaan määrittäjä ei havainnut merkkiä GFP2- tai G-suotimella. Toinen määrittäjästä luokitteli kuitenkin keskimäärin 43 % tulkinnoista heikoksi merkiksi ja toinen vastaavasti 23 %, joten määrittäjien näkemykset merkin laadusta poikkesivat toisistaan.

3.1.2. ARS-merkin tulkinta kokonaisista ja sahatuista otoliiteista

Kokonaisista ja sahatuista otoliiteista tehtyjen tulkintojen välillä ei ollut keskimäärin oleellista eroa merkittyjen otoliittien kohdalla, mutta kontrollien osalta sahatuista otoliiteista tehtiin selvästi enemmän oikeita tulkintoja kuin kokonaisista (taulukko 2). Siian merkityistä otoliiteista tehtiin kuitenkin keskimäärin 9,8 %-yksikköä enemmän oikeita määrittäjiä kokonaisista kuin sahatuista otoliiteista. Määrittäjät olivat yksimielisiä kokonaisten kontrollien tulkinnasta 49 %:ssa ja merkittyjen 77 %:ssa tapauksista sekä vastaavasti sahattujen kontrollien tulkinnasta 83 %:ssa ja merkittyjen 77 %:ssa tapauksista.

Otoliittien tulkittavuudessa oli eroja lajien välillä. Sekä kokonaisista että sahatuista järvilohen ja taimenen merkityistä otoliiteista tehtiin keskimääräistä vähemmän oikeita tulkintoja, samoin kuin myös sahatuista siian otoliiteista (taulukko 2). Kontrolleista keskimääräistä vähemmän oikeita tulkintoja tehtiin puolestaan harmaanierian, taimenen ja siian kokonaisista otoliiteista sekä harmaanierian, siian ja kuhan sahatuista otoliiteista (taulukko 2).

Määrittäjien kyvyssä erottaa kontrollit merkityistä otoliiteista oli selviä eroja. Nierian ja harmaanierian sahatuista otoliiteista ainoastaan määrittäjät 4 ja 5 pystyivät erottamaan kontrollit merkityistä otoliiteista (molemmissa tapauksissa oikeita tulkintoja 100 %) (taulukko 2). Määrittäjä 5 erotti toisistaan myös järvilohen kontrollit ja merkityt otoliitit. Kuhan kohdalla puolestaan määrittäjät 1-3 tulkitsivat sekä kontrollit että merkityt otoliitit oikein. Kokonaisten otoliittien osalta ainoastaan määrittäjä 4 kykeni erottamaan (kuhan) kontrollit merkityistä otoliiteista (taulukko 2).

Määrittäjät 1 ja 2 ilmoittivat vaikeuksista tulkita kokonaisista otoliitteja, mikä johtui siitä, ettei käytettävissä olleella mikroskoopilla voinut tarkasti fokusoida kokonaisten otoliittien sisällä olevaan ARS-merkkiin. Etenkin määrittäjä 2 tulkitsi merkityistä otoliiteista, toisin kuin kontrolleista, selvästi muita määrittäjiä suuremman osuuden virheellisesti (taulukko 2). Toisaalta myös määrittäjät 3 ja 5 tulkitsivat erityisesti harmaanierian ja taimenen kokonaisista kontrolleista huomattavan osan virheellisesti merkityiksi (taulukko 2).

Taulukko 2. Merkitsemättömistä (kontrolli) ja merkityistä otoliiteista fluoresenssimikroskopiolla tehtyjen oikeiden tulkintojen suhteelliset osuudet (%) määrittäjittäin ja lajeittain (ka = keskiarvo) eri käsittelyissä (kokonainen tai sahattu otoliitti).

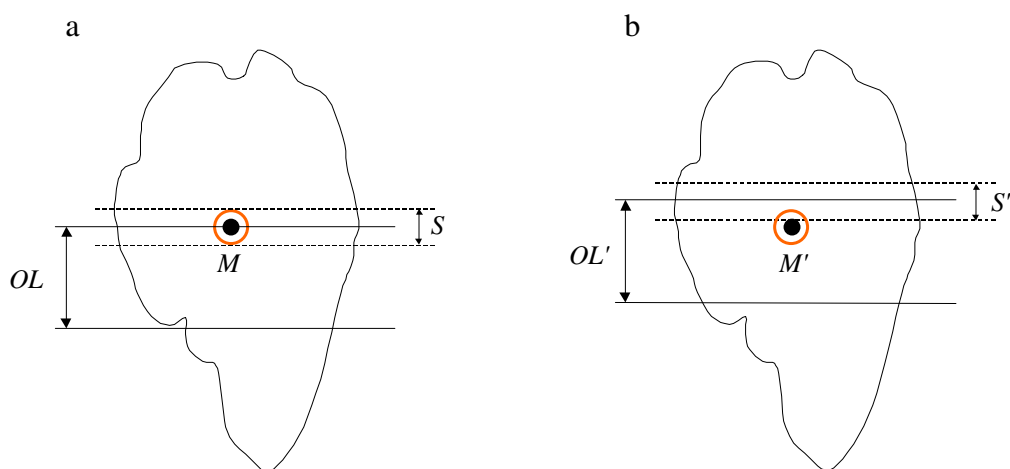
Käsittely	Otoliitti	Määrittäjä	Laji						ka
			nierää	harmaa-nierää	järvi-lohi	taimen	siika	kuha	
Kokonainen	Kontrolli	1	87,5	90	70	87,5	68	57,1	76,7
		2	100	77,8	100	100	100	92,9	95,1
		3	87,5	40	100	25	70,8	92,9	69,4
		4	75	80	90	87,5	84	100	86,1
		5	75	60	100	50	68	78,6	71,9
		ka	85,0	69,6	92,0	70,0	78,2	84,3	79,8
	Merkitty	1	86,5	97	71,4	71,8	100	100	87,8
		2	75,7	71,4	47,6	66,7	77,8	83,0	70,4
		3	97,3	100	95,2	100	100	100	98,8
		4	100	100	95,2	97,4	100	100	98,8
		5	94,6	100	81,0	76,9	100	100	92,1
		ka	90,8	93,7	78,1	82,6	95,6	96,6	89,6
Sahattu	Kontrolli	1	100	80	100	87,5	84	100	91,9
		2	100	100	100	100	100	100	100,0
		3	100	100	100	100	92	100	98,7
		4	100	100	100	100	100	100	100,0
		5	100	100	100	100	92	64,3	92,7
		ka	100,0	96,0	100,0	97,5	93,6	92,9	96,7
	Merkitty	1	94,4	100	76,2	79,5	97,8	100	91,3
		2	91,9	90,9	66,7	69,2	64,4	100	80,5
		3	89,2	90,9	81	84,6	77,8	100	87,2
		4	100	100	76,2	84,6	93,3	97,9	92,0
		5	100	100	100	94,9	95,6	100	98,4
		ka	95,1	96,4	80,0	82,6	85,8	99,6	89,9

Kokonaisista ja sahatuista otoliiteista tehtyjen oikeiden tulkintojen suhteellinen osuus vaihteli jossakin määrin myös ARS-pitoisuuksittain. Kaksiviikkoisina ARS-pitoisuuksissa 50 mg l⁻¹ ja 100 mg l⁻¹ merkittyjen kalojen, etenkin siian, kohdalla oikeita tulkintoja tehtiin keskimäärin enemmän kokonaisista kuin sahatuista otoliiteista, toisin kuin 2-3 kk:n ikäisinä pitoisuudessa 75 mg l⁻¹ merkittyjen kalojen kohdalla (taulukko 3). Kaikki taimenen ARS-pitoisuuksissa 50 mg l⁻¹ ja 100 mg l⁻¹ merkittyjen yksilöiden kokonaiset ja sahattut otoliitit tulkittiin oikein (taulukko 3). Kylvetyksajalla oli huomattava merkitys otoliittien tulkittavuuden kannalta. Kuuden tunnin kylvetyksajalla merkittyjen kalojen, erityisesti järvilohen ja taimenen, otoliiteista tehtiin keskimäärin selvästi vähemmän oikeita tulkintoja molemmissa käsittelyissä kuin 3:n ja 4 tunnin kylvetyksajoilla merkittyjen kalojen otoliiteista (taulukko 3).

Kaksiviikkoisina merkittyjen siikojen kohdalla otoliitin sahaaminen nukleuksen kautta vaikutti ARS-väriaineen jäämään leikkeessä, sillä tarkkuusleikkurin terän säätötarkkuudesta (100 µm) johtuvan sahauslinjan vaihtelun vuoksi ARS-merkki (Ø n. 100 µm) saattoi jäädä joko kokonaisuudessaan tai osittain leikkeeseen tai kokonaan sahausjätteeseen (kuva 7 a). Sahaamalla otoliitti siten, että nukleus jää leikkeeseen, sahauslinjan vaihtelun vaikutusta väriaineen jäämään voidaan kuitenkin vähentää (kuva 7 b).

Taulukko 3. Kokonaisista ja sahatuista otoliiteista fluoresenssimikroskopialla tehtyjen oikeiden tulkintojen suhteelliset osuudet (%) eri ARS-pitoisuuksien (ARS) ja kylvetysaikojen mukaan lajeittain (ka = keskiarvo).

Käsittely	ARS (mg l ⁻¹)	Kylvetys- aika (h)	Laji					ka
			nieriä	harmaa- nieriä	järvi- lohi	taimen	siika	kuha
Kokonainen	50	4	100	95,7		100	98,8	
	75	3	98,3	100	93,3	90,8	91,2	
		4						96,6
		6	77,1	86,7	57,8	49,1	87,2	
	100	4	100	100		100	100	
		ka	93,9	95,6	75,6	85,0	94,3	96,6
Sahattu	50	4	100	100		100	78,8	
	75	3	100	100	98,3	89,2	94,3	
		4						99,6
		6	88,6	93,3	55,6	50,9	96	
	100	4	96,7	92		100	81,8	
		ka	96,3	96,3	76,9	85,0	87,7	99,6



Kuva 7. Ohutleikkeen sahauslinjan vaikutus fluoresoivan väriaineen jäämään ARS-merkityn siian otoliitissa. Ennalta määrätyn sahauslinjan kulkiessa nukleuksen (●) kautta ARS-merkki (M) voi jäädä tarkkuusleikkurin sahanterän säätötarkkuudesta aiheutuvasta todellisen sahauslinjan vaihtelusta (S) johtuen ääritapauksissa joko kokonaisuudessaan ohutleikkeen (OL) sisälle tai kokonaan sen ulkopuolelle (sahausjätteeseen) (a). Mikäli nukleus jätetään sahauksessa ohutleikkeen (OL) sisälle, ARS-merkki (M') jää kokonaan tai suurimmaksi osaksi leikkeeseen todellisen sahauslinjan vaihtelusta (S') huolimatta (b).

Valomikroskopiolla (koe 3) tehtiin keskimäärin selvästi vähemmän oikeita tulkintoja merkittyjen kalojen kokonaisista kuin sahatuista otoliiteista (taulukko 4). Sen sijaan kokonaiset kontrollit tulkittiin 95 %:sesti oikein, mutta sahatuista kontrolleista huomattava osa tulkittiin väärin. Sekä kokonaisista että sahatuista otoliiteista tehtiin selvästi enemmän oikeita tulkintoja kaksiviikkoisina ARS-pitoisuudessa 50 mg l⁻¹ ja 100 mg l⁻¹ merkittyjen kuin 2-3 kk:n ikäisinä pitoisuudessa 75 mg l⁻¹ merkittyjen kalojen, paitsi siian, kohdalla (taulukko 4). Siian kokonaisista otoliiteista tulkittiin oikein keskimäärin vain kymmenesosa, ja sahatuistakin otoliiteista tehtiin selvästi vähemmän oikeita tulkintoja kuin muiden lajien kohdalla (taulukko 4). Määrittäjät olivat yksimielisiä kokonaisten kontrollien tulkinnasta 89 %:ssa ja merkittyjen 82 %:ssa tapauksista sekä vastaavasti sahattujen kontrollien osalta 52 %:ssa ja merkittyjen 67 %:ssa tapauksista.

Taulukko 4. Kokonaisista ja sahatuista otoliiteista valomikroskopiolla tehtyjen oikeiden tulkintojen suhteelliset osuudet (%) eri ARS-pitoisuuksien (ARS, kontr. = kontrolli) mukaan lajeittain (ka = keskiarvo).

Käsittely	ARS (mg l ⁻¹)	Laji						ka
		nieriä	harmaa- nieriä	järvi- lohi	taimen	siika	kuha	
Kokonainen	50	50	70		50	0		42,5
	75	28,8	23,9	54,8	16,7	26,5	27,7	29,7
	100	25	100		77,8	4,5		51,8
	ka	34,6	64,6	54,8	48,1	10,3	27,7	41,4
	kontr.	93,8	100	95	87,5	92	100	94,7
Sahattu	50	90	90		100	44,1		81,0
	75	32,7	21,7	47,6	33,3	47,1	55,3	39,6
	100	91,7	100		100	31,8		80,9
	ka	71,5	70,6	47,6	77,8	41,0	55,3	60,6
	kontr.	62,5	80	80	56,3	70	46,4	65,9

3.2. Logistinen regressioanalyysi

Sokkoteistiaineistoon (koe 2) sovitetussa logistisessa regressiomallissa sekä vakiotermi että kaikki selittävät muuttujat olivat Waldin testin perusteella tilastollisesti merkitseviä (taulukko 5), joten testin nollahypoteesi (todennäköisyys tulkita otoliitti merkityksi on riippumaton otoliitin merkinnästä, käsittelystä, ARS-pitoisuudesta, kylvetyajasta, lajista ja määrittäjästä) voitiin hylätä 5 %:n riskitasolla. Malli luokitteli oikein 80,6 % määrittäjästä, joissa otoliitti tulkittiin merkitsemättömäksi ja 94,4 % määrittäjästä, joissa otoliitti tulkittiin merkityksi, joten mallin ennustekyky on kohtalaisen hyvä. Kaikista määrittäjästä malli luokitteli oikein 90,4 %. Hosmerin ja Lemeshow'n yhteensopivuustestin perusteella ($\chi^2 = 12,3219$, $df = 8$, $P > 0,05$) ARS-merkin tulkinnan vedonlyöntisuhteen logaritmin (*log odds*) ja mallin selittävien muuttujien välisen suhteen voitiin olettaa olevan lineaarinen 5 %:n riskitasolla, joten aineisto oli kuvattavissa logistisella regressiolla.

Tilastollisesti merkitsevimmät ARS-merkin tulkintaa selittävät tekijät mallissa olivat MÄÄRITTÄJÄ ja KYLVETYSAIKA (taulukko 5). Ristitulosuhteen (*OR*) avulla

ilmaistuna mahdollisuus, että määrittäjä 1 tulkitse otoliitin merkityksi, oli keskimäärin 0,6-kertainen verrattuna referenssitason olleeseen määrittäjään 5 (taulukko 5), ts. mahdollisuus tulkita otoliitti merkitsemättömäksi oli n. 1,7 ($= 1/0,6$) kertaa suurempi määrittäjän 1 kuin määrittäjän 5 kohdalla, riippumatta siitä, oliko otoliitti alun pitäen merkitty vai ei. Vastaavasti mahdollisuus, että määrittäjä 2 tulkitse otoliitin merkityksi, oli keskimäärin 0,1-kertainen määrittäjään 5 verrattuna, ts. mahdollisuus tulkita otoliitti merkitsemättömäksi oli 10 kertaa suurempi kuin määrittäjän 5 kohdalla. Sen sijaan määrittäjien 3 ja 4 kohdalla mahdollisuus tulkita otoliitti merkityksi ei poikennut tilastollisesti merkitsevästi referenssitasosta (ristitulosuhteen 95 %:n luottamusväli sisältää arvon 1) (taulukko 5). Määrittäjän 2 suhteellinen selitysvaikutus (R) mallissa oli myös suurempi kuin muilla muuttujan MÄÄRITTÄJÄ tasoilla (taulukko 5).

Muuttujan KYLVETYSAIKA kohdalla muuttujan yksittäiset tasot 3 h ja 4 h poikkesivat erittäin merkitsevästi referenssitasosta (6 h) (taulukko 5). Mahdollisuus tulkita otoliitti merkityksi tasolla 3 h oli keskimäärin 11 kertaa suurempi ja tasolla 4 h keskimäärin 20 kertaa suurempi kuin referenssitasolla, muiden tekijöiden pysyessä vakiona. Tason 3 h suhteellinen selitysvaikutus (R) oli kuitenkin suurempi kuin tason 4 h (taulukko 5). ARS-pitoisuus (KONSENTRAATIO) oli mallissa tilastollisesti merkitsevä, mutta muuttujan yksittäiset tasot 50 mg l⁻¹ ja 75 mg l⁻¹ eivät poikenneet merkitsevästi referenssitasosta (100 mg l⁻¹) (taulukko 5).

Merkitsemättömien otoliittien (ARS-MERKINTÄ(1)) kohdalla mahdollisuus tulkita otoliitti merkityksi oli keskimäärin 0,06-kertainen merkittyihin otoliitteihin (referenssitaso) verrattuna (taulukko 5), ts. mahdollisuus tulkita ARS-merkitty otoliitti (oikein) merkityksi oli keskimäärin 17 kertaa suurempi kuin kontrollin tulkitseminen (väärin) merkityksi, edellyttäen, että muut tekijät pysyivät vakiona. Mahdollisuus sahatun otoliitin (OTOLIITTI(1)) tulkitsemiseksi merkityksi oli keskimäärin 0,6-kertainen verrattuna mahdollisuuteen tulkita kokonainen otoliitti merkityksi (taulukko 5), ts. kokonainen otoliitti tulkittiin 1,8 kertaa todennäköisemmin merkityksi kuin sahattu otoliitti, riippumatta siitä, oliko otoliitti alunperin merkitty vai ei.

Kalalaji (LAJI) oli ARS-merkin tulkinnan kannalta erittäin merkitsevä tekijä. Mahdollisuus tulkita harmaanieriän otoliitti merkityksi oli keskimäärin 2,3 kertaa suurempi kuin kuhan (referenssitaso) otoliitin kohdalla (taulukko 5), riippumatta otoliitin alkuperäisestä merkinnästä. Mahdollisuus järvilohen ja taimenen otoliittien tulkitsemiseksi merkityksi oli sitä vastoin pienempi kuin kuhan otoliittien (taulukko 5). Järvilohen otoliitti tulkittiin merkitsemättömäksi keskimäärin 2,5 kertaa ja vastaavasti taimenen otoliitti 2 kertaa todennäköisemmin kuin kuhan otoliitti. Sen sijaan mahdollisuus tulkita nieriän tai siian otoliitti merkityksi ei poikennut merkitsevästi mahdollisuudesta tulkita kuhan otoliitti merkityksi (taulukko 5).

Taulukko 5. Sokkotestin tulkintatuloksiin sovitettun logistisen regressiomallin tilastolliset tunnusluvut (B = regressiokerroin, S.E. = kertoimen keskivirhe, Wald = Waldin testisuure, R = muuttujan suhteellinen selitysvoima) sekä ristitulosuhde (OR = odds ratio) ja sen 95 %:n luottamusväli (lv.) muuttujien eri tasoille. Mallissa selittävinä muuttujina ovat *otoliitin merkintä* (tasona ARS-MERKINTÄ(1) = kontrolli, referenssitasona merkitty otoliitti), *ARS-pitoisuus* (KONSENTRAATIO; tasoina 50 mg l⁻¹ ja 75 mg l⁻¹, referenssitasona 100 mg l⁻¹; taso 0 mg l⁻¹ [= kontrolli] sisältyy vakiotermiin), *kylvetysaika* (KYLVEYSAIKA; tasoina 3 h ja 4 h, referenssitasona 6 h; taso 0 h [= kontrolli] sisältyy vakiotermiin), *otoliitin käsittely* (tasona OTOLIITTI(1) = sahattu otoliitti, referenssitasona kokonainen otoliitti), *kalalaji* (LAJI; tasoina nieriä, harmaanieriä, järvilohi, taimen, siika, referenssitasona kuha) ja *määrittäjä* (MÄÄRITTÄJÄ; tasoina määrittäjät 1-4, referenssitasona määrittäjä 5).

Muuttuja	B	S.E.	Wald	df	P	R	OR	95 %:n lv.	
								alaraja	yläraja
ARS-MERKINTÄ(1)	-2,8486	0,6086	21,9063	1	0,0000	-0,0747	0,0579	0,0176	0,1910
KONSENTRAATIO			6,6002	2	0,0369	0,0270			
50 mg l ⁻¹	-0,5171	0,3821	1,8321	1	0,1759	0,0000	0,5962	0,2820	1,2607
75 mg l ⁻¹	0,7650	0,5450	1,9700	1	0,1605	0,0000	2,1490	0,7384	6,2541
KYLVEYSAIKA			120,8758	2	0,0000	0,1810			
3 h	2,4078	0,2514	91,7677	1	0,0000	0,1586	11,1097	6,7882	18,1825
4 h	3,0126	0,4723	40,6794	1	0,0000	0,1041	20,3396	8,0592	51,3328
OTOLIITTI(1)	-0,5585	0,1381	16,3620	1	0,0001	-0,0635	0,5721	0,4364	0,7498
LAJI			62,0849	5	0,0000	0,1208			
nieriä	0,3704	0,3409	1,1806	1	0,2772	0,0000	1,4483	0,7425	2,8251
harmaanieriä	0,8130	0,3341	5,9215	1	0,0150	0,0332	2,2546	1,1714	4,3396
taimen	-0,9108	0,3583	6,4622	1	0,0110	-0,0354	0,4022	0,1993	0,8117
järvilohi	-0,6790	0,3442	3,8914	1	0,0485	-0,0230	0,5071	0,2583	0,9956
siika	0,0922	0,3153	0,0855	1	0,7700	0,0000	1,0966	0,5911	2,0343
MÄÄRITTÄJÄ			134,7262	4	0,0000	0,1885			
määrittäjä 1	-0,5395	0,2278	5,6110	1	0,0178	-0,0318	0,5830	0,3731	0,9111
määrittäjä 2	-2,2902	0,2266	102,1641	1	0,0000	-0,1676	0,1013	0,0649	0,1579
määrittäjä 3	-0,3922	0,2284	2,9479	1	0,0860	-0,0163	0,6756	0,4318	1,0571
määrittäjä 4	-0,4125	0,2278	3,2803	1	0,0701	-0,0189	0,6620	0,4236	1,0345
Vakio	1,5837	0,7861	4,0588	1	0,0439				

4. Tulosten tarkastelu

4.1. Otoliettien mikroskopiointi ja tulkintatestit

4.1.1. Autofluoresenssi ja valemerkit

Otoliettien autofluoresenssi on aiheuttanut ongelmia fluoresoivien merkkien tulkinassa (Brooks ym. 1994). Kirjallisuudessa autofluoresenssin on arveltu aiheutuvan otoliitin kalsiumista (Nagiec ym. 1995), otoliitin optisiin ominaisuuksiin liittyvistä tekijöistä, kuten siihen hiomisen ja kiillottamisen aikana syntyvistä halkeamista (Secor ym. 1991), voimakkaasti kehittyneistä kasvuvyöhykkeistä tai kalojen käsittelystä aiheutuneen stressin vuoksi syntyneistä valerenkaista (*check*), jotka taittavat valoa, sekä otoliittiin jääneestä sidekudoksesta (Brooks ym. 1994) tai tarkemmin määrittelemättömästä "luonnollisesta fluoresenssista" (Rojas-Beltrán ym. 1998).

Otoliitti koostuu pääosin struktuurallisista proteiineista muodostuneeseen orgaaniseen matriisiin kiteytyneestä aragoniitista (CaCO_3) (Wright ym. 1998a). Monet mineraalit, kuten aragoniitti, fluoresoivat, mutta todennäköisimmin otoliitin ARS-merkin havaittavuutta häiritsevä autofluoresenssi johtuu kuitenkin sen orgaanisen matriisin sisältämien kollageenin kaltaisten struktuurallisten proteiinien fluoresenssista, sillä GFP2-suotimella (eksitaatio 480 nm) tarkasteltuna otoliitin autofluoresenssi muistuttaa vihreänä värinä ilmenevää kollageenin ja elastiinin autofluoresenssia (eksitaatio 476 nm) (Billington ja Knight 2001). Murayama ym. (2002) dekalasioivat koiralohen (*Oncorhynchus keta* (Walbaum)) kokonaisia otoliitteja, jolloin jäljelle jäi alkuperäisen otoliitin muotoa vastaava hyytelömäinen rakenne, josta analysoitiin kaksi proteiinia, otoliini-1 ja OMP-1 (*otolith matrix protein 1*). Näistä otoliini-1:n aminohappokoostumus oli pääasiassa kollageeninen. Tutkimuksessa otoliini-1:n havaittiin jakautuvan epätasaisesti otoliitin eri osissa, joten mikäli otoliettien autofluoresenssi johtuu otoliini-1:stä, se selittää, miksi myös tässä tutkimuksessa autofluoresenssin havaittiin vaihtelevan eri osissa otoliittia, samoin kuin sen, että sahattujen otoliettien autofluoresenssin intensiteetissä oli eroja saman lajin yksilöiden välillä. Murayaman ym. (2002) tutkimuksessa ei kuitenkaan voitu menetelmällisistä syistä erottaa proteiinien tiheyseroja nukleuksen ja otoliitin muiden osien välillä. Struktuuralliset proteiinit ovat joka tapauksessa voimakkaasti konsentroituneet nukleuksessa (Murayama, henk.koht. tiedonanto), mikä puolestaan on todennäköisin selitys sille, että tässä tutkimuksessa autofluoresenssin havaittiin olevan intensiivisintä juuri otoliitin keskuksessa ja sen ympärillä.

Tässä tutkimuksessa tarkastelluista lajeista autofluoresenssi oli voimakkainta kuhan otoliiteissa ja erityisesti niiden nukleuksessa. Tutkimuksessa tarkasteltiin myös Suomenlahdelta pyydystettyjen luonnonvaraisten kuhien otoliitteja ($n = 10$), joiden autofluoresenssi ei poikennut silmämääräisesti arvioituna varsinaisen tutkimusaineiston otoliettien (laitoskaloja) autofluoresenssista. Autofluoresenssin on havaittu olevan voimakkaampaa myös valkosilmäkuhan kuin esimerkiksi kelta-ahvenen (*Perca flavescens* (Mitchill)) tai isobassin (*Micropterus salmoides* (Lac.)) otoliiteissa (Brown, henk.koht. tiedonanto), joten kuhansukuisten lajien otoliiteissa autofluoresenssin merkitystä voidaan pitää tulkinnan kannalta suurempana ongelmana kuin muilla istutettavilla lajeilla. Nieriän ja harmaanieriän otoliiteissa autofluoresenssi oli niin ikään voimakkaampaa kuin taimenen ja järvilohen otoliiteissa. Koska autofluoresenssin intensiteetin vaihtelu otoliiteissa kalasukujen sisällä on vähäisempää kuin sukujen välillä, on perusteltua olettaa, että erot sukujen välillä ovat todellisia ja

johtuvat todennäköisesti lajityypillisestä vaihtelusta fluoresoivien proteiinien koostumuksissa ja konsentraatioissa otoliitissa.

Voimakas autofluoresenssi ei kuitenkaan haitannut tai ehkäissyt ARS-merkin havaittavuutta kahden kk:n ikäisinä merkittyjen kuhien kohdalla, sillä ARS-rengas sijaitsi kalojen otoliiteissa selvästi nukleuksen ulkopuolella, joten se oli helposti määritettävissä. Nukleuksen ja sen ympäristön autofluoresenssi saattaa kuitenkin vaikuttaa merkin tulkintaan vastakuoriutuneina tai ruskuaispussipoikasina merkityillä kuhilla, joilla merkki muodostuu nukleuksen ympärille ja sijaitsee siten voimakkaimmin autofluoresoivassa osassa otoliittia. Esimerkiksi Brooks ym. (1994) valkosilmäkuhien ruskuaispussi- ja esikesäisillä poikasilla tekemässä kokeessa kontrolli-otoliiteista 40 % tulkittiin virheellisesti heikon merkin omaaviksi. Brooks ym. (1994) arvelivat suurimman osan virhetulkintoista johtuneen otoliiteissa olleista halkeamista, kaloja laitosoloissa käsiteltäessä syntyneistä valemmerkeistä (*stress marks*) ja otoliitteihin jääneestä sidekudoksesta, mutta todennäköisesti virhetulkintoihin on vaikuttanut myös otoliittien luontainen fluoresenssi. Kaylen (1992) valkosilmäkuhan 42 vrk:n ikäisillä poikasilla tekemässä merkintäkokeessa on myös mahdollisesti tulkittu otoliittien nukleuksen autofluoresenssin vuoksi osa luonnonkalojen otoliiteista virheellisesti merkityiksi, sillä merkiksi tulkittuja rakenteita havaittiin otoliitin nukleuksen ulkoreunalla, vaikka merkin olisi pitänyt sijaita selvästi nukleuksen ulkopuolella (Brooks ym. 1994).

ARS-merkki seurasi tässä tutkimuksessa tarkasteltujen lajien otoliiteissa yleensä selväpiirteisesti merkintäajankohtaa vastaavaa vuorokausirengasta, mutta osassa nieriän ja harmaanieriän sekä järvilohen ja taimen sahatuissa otoliiteissa ARS-merkki oli autofluoresenssista aiheutuvien valemerkkien tapaan diffuusi ja ulottui useiden vuorokausirenkaiden yli otoliitin dorsaaliosassa. Merkin raja vuorokausirenkaan kohdalla oli kuitenkin yleensä selväpiirteinen. Poikkeuksellinen merkin muoto aiheutui otoliitin kasvutavasta ja siitä, että sahauslinjasta johtuen leikkeen sisään jäänyt fluoresoiva väriaine kuului otoliitin läpi, joten varsinaisen ARS-merkin ulkopuolinen fluoresenssi oli laadultaan optista. Sen sijaan murisijoihin (Haemulidae) kuuluvan *Pomadasys kaakan* (Cuvier) -lajin alitsariinikompleksonilla merkittyjen otoliittien poikkileikkauspinnalla (ohutleikkeen paksuus 0,15-0,25 mm) merkin on havaittu olevan voimakkaampi otoliitin ventraalisella kuin dorsaaliosalla puolella (Al-Husaini ym. 2001). Usean vuorokausirenkaan yli ulottuvia fluoresoivia merkkejä on havaittu myös oksitetrasyklinillä merkittyjen valkosilmäkuhan poikasten otoliiteissa (Brooks ym. 1994). Al-Husaini ym. (2001) ja Brooks ym. (1994) eivät kuitenkaan pohdi merkkien ominaisuuksien syytä, mutta todennäköisesti molemmissa tapauksissa ne johtuivat otoliitin optisista ominaisuuksista.

Ensimmäisen kesän aikana kalanpoikasten luutumiin voi muodostua poikasrenkaita, jotka johtuvat kalan kasvun nopeutumisesta tai hidastumisesta tilapäisesti kasvukauden aikana (Raitaniemi ym. 2000). Tavallista voimakkaammin kehittynyt kasvuvyöhyke saattaa syntyä kuoriutumisen yhteydessä, ruskuaispussivaiheen päättyessä tai lajin elintavoista riippuen myös habitaatin muutosten, kuten poikasten siirtyessä litoraalista pelagiaaliin tai matalasta vedestä syvään veteen, sekä voimakkaiden ympäristömuutosten myötä (Wright ym. 1998b, Volk ym. 1999). ARS-merkin tulkinnan kannalta ensimmäisten elinviikkojen aikana mahdollisesti syntyvät valerenkaat ovat kaikkein ongelmallisimpia, sillä ne sijaitsevat lähellä otoliitin nukleusta, jossa puolestaan otoliittien autofluoresenssi on voimakkainta. Tällöin otoliittiin voi autofluoresenssin ja valerenkaiden valoa taivuttavan vaikutuksen johdosta syntyä ARS-merkkiä muistuttavia rakenteita, joiden erottaminen aidoista merkeistä on vaikeaa.

Laitoskalojen otoliitteihin on havaittu syntyvän valemerkkejä kaloja käsiteltäessä, kuten siirrettäessä niitä altaasta toiseen, kuljetettaessa istutettavaksi tai istutuksen yhteydessä (Fielder 2002). Tässä tutkimuksessa aitoa ARS-merkkiä muistuttava valemmerkki havaittiin yhdessä siian merkitsemättömässä otoliitissa, joskaan yksikään määrittäjistä ei tulkinnut sitä aidoksi merkiksi. Myös luonnonkaloissa on havaittu toisinaan valemerkkejä, mutta niiden merkitystä ei ole pidetty oleellisenä (Fielder

2002). Valemerkkien esiintymistiheyttä ja niiden mahdollista vaikutusta fluoresoivien merkkien tulkinnan kannalta ei kuitenkaan tiettävästi ole tutkittu luonnonkalojen osalta (Eckmann, Fielder, henk.koht. tiedonanto). Koska autofluoresenssin intensiteetti vaihtelee lajeittain, on todennäköistä, että autofluoresenssin ja kasvuvyöhykkeiden optisten ominaisuuksien yhteisvaikutuksesta muodostuvat valemerkit aiheuttavat erisuuruisia tulkintavirheitä eri lajeilla. Näin ollen sellaisten lajien kohdalla, kuten kuha ja nieriä, joilla autofluoresenssi on tässä tutkimuksessa tehtyjen havaintojen mukaan suhteellisen voimakasta, valemerkkien esiintymistiheys olisi aiheellista selvittää, sillä sen avulla voidaan arvioida valemerkeistä aiheutuvan tulkintavirheen suuruutta esimerkiksi istutustulosten seuranta tutkimuksissa, joissa aineistossa on tuntemattomassa suhteessa merkittyjä ja merkitsemättömiä otoliitteja.

4.1.2. ARS-merkin tulkinnan kriteerit fluoresenssimikroskopiassa

ARS-väriaineella tehdyissä merkintäkokeissa merkin tarkastelussa on käytetty joko alitsariinin eksitaatio- ja emissioaallonpituutta vastaavia suotimia, jolloin ARS-merkin tulkinnan kriteerinä on ollut sen otoliitissa esiintyvää autofluoresenssia voimakkaampi intensiteetti (Eckmann ym. 1998, Eckmann 2003), tai niitä lyhytaaltoisempia suotimia, joilla tulkinnan kriteerinä puolestaan on ollut autofluoresenssista poikkeava merkin väri (Nagiec ym. 1995, Lagardère ym. 2000). Merkin autofluoresenssista poikkeavaa väriä on käytetty kriteerinä myös oksitetrasykliinillä merkittyjen valkosilmäkuhan (Fielder 2002) ja juovabassin (*Morone saxatilis* (Walbaum)) (Secor ym. 1991) otoliittien tulkinnassa.

G- (ja Texas Red) -suotimella ARS-merkin havaittavuus oli yleensä erinomainen ja myös heikot merkit oli mahdollista havaita jo 100×-200× suurennuksella. Kokeessa 2 määrittäjät olivat lisäksi yksimielisiä merkin laadusta sekä sahattujen että kokonaisten otoliittien kohdalla selvästi suuremmassa osuudessa tapauksia G- kuin GFP2-suotimella, joten jopa kokemattomille määrittäjille ARS-merkin tulkinta oli helpompaa tällä suotimella. Ongelmana G-suotimessa on kuitenkin se, että otoliitin autofluoresenssin ja valoa taivuttavista rakenteista aiheutuvien valemerkkien erottaminen aidoista merkeistä ei ole värin perusteella mahdollista, koska sekä ARS-väriaineen että otoliitin luontainen fluoresenssi näkyvät suotimella punaisina.

G-suotimella ja sitä eksitaatio- ja emissioaallonpituuksiltaan vastaavilla suotimilla (esim. Texas Red, TRITC) ARS-merkin tulkintakriteereinä voidaan käyttää merkin *intensiteettiä, selväpiirteisyyttä* ja *sijaintia* otoliitissa. ARS-väriaineen intensiteetti G-suotimella tarkasteltuna on yleensä selvästi autofluoresenssia voimakkaampaa, mikä todennäköisesti johtuu siitä, että otoliitin luonnollisen fluoresenssin aikaansaavien kollageenisten proteiinien eksitaatioaallonpituuden huippu ei vastaa alitsariinin aallonpituusaluetta, joten G-suotimen (toisin kuin GFP2-suotimen) eksitaatio-asteily ei viritä tehokkaasti niiden molekyyliä, jolloin myös emissio jää suhteellisen pieneksi. ARS-merkki on myös yleensä selväpiirteinen ja yhtenäinen rengas. Alle kahden viikon ikäisten kalanpoikasten otoliitit ovat kuitenkin hyvin pienikokoisia, joten niihin muodostuva ARS-merkki on myös pieni. Tämän vuoksi vastakuoriutuneina tai pian kuoriutumisen jälkeen merkittyjen kalojen sahattuja otoliitteja tulisi tarkastella vähintään 100×-200× suurennuksella, jolloin merkin muoto ja eheys (yhtenäinen rengas) on mahdollista havaita myös heikkojen merkkien kohdalla. Valemerkeistä johtuvia tulkintavirheitä voidaan puolestaan ainakin jossakin määrin vähentää käyttämällä hyväksi tietoa kalojen merkintäistä, sillä mikäli mahdolliseksi merkiksi tulkittavissa oleva rakenne sijaitsee otoliitissa selvästi merkintäajankohtaa vastaavan vuorokausirenkaan sisä- tai ulkopuolella, otoliitti voidaan tulkita merkitsemättömäksi (Brooks ym. 1994, Fielder 2002).

GFP2-suotimella ARS-merkin *oranssi* tai *keltainen väri* poikkesi selvästi otoliitin vihreänä ilmenevästä autofluoresenssista, joten sitä voidaan käyttää yksiselitteisenä kriteerinä merkin tulkinnassa tällä suotimella. Ongelmana on kuitenkin se, että heik-

kojen merkkien määrittäminen GFP2-suotimella ei ole eksitaatio- ja emissioaallon-pituuksista johtuvien erojen vuoksi yhtä tehokasta kuin G-suotimella. Fluoresoivien merkkien havaittavuutta voidaan kuitenkin jossakin määrin parantaa käyttämällä mahdollisimman suurta suurennusta (Fielder 2002). Tässä tutkimuksessa pääasiassa käytetyn stereofluoresenssimikroskoopin 100× maksimisuurennuksella osa heikoista merkeistä jäi havaitsematta, mutta GFP2-suodinta vastaavalla FITC-suotimella heikot merkit saatiin näkyviin tavanomaisella fluoresenssimikroskoopilla 400× suurennuksella. Näin ollen GFP2-suodinta käytettäessä mikroskoopissa pitäisi olla vähintään 400× suurentava optiikka. Merkin havaittavuutta voidaan lisäksi tehostaa kiillottamalla hiotun tai sahatun otoliitin pinta alumiinioksidilla (Mosegaard ym. 1998, Lagardère ym. 2000, Al-Husaini ym. 2001, Eckmann 2003) tai käyttämällä mikroskoopoinnissa UV-säteilyä lävitseen päästävää immersioöljyä (Secor ym. 1991, Brooks ym. 1994).

G-suodin on ARS-merkin määrittämisessä tehokkaampi kuin GFP2-suodin, mutta otoliittien tulkinnassa on hyödyllistä käyttää myös GFP2-suodinta, sillä värin perusteella merkki voidaan tulkita täysin luotettavasti. Lisäksi GFP2-suodin on käyttökelpoinen myös merkintöjen laaduntarkkailussa, sillä mikäli ARS-merkki havaitaan kalanpoikasten otoliiteissa tällä suotimella, merkintää voidaan pitää hyvin onnistuneena.

4.1.3. ARS-merkin tulkinta valomikroskopialla

ARS-merkin määrittämisessä on käytetty myös valomikroskopiaa, jossa ARS-väriaine näkyy voimakkuudeltaan ja piirteiltään vaihtelevana violetina tai violetinpunaisena alueena, renkaana tai renkaan osana merkintäajankohtaa vastaavassa kohdassa otoliittia. Onnistuneista kokeista ovat raportoineet ainakin Beckman ja Schulz (1996) sekä Makkonen ja Pursiainen (1997). ARS-pitoisuuksissa 50-100 mg l⁻¹ 4-8 tunnin kylvetysajoilla merkittyjen nieriöiden (Makkonen ja Pursiainen 1997) ja pitoisuuksissa 50-400 mg l⁻¹ 6-24 tunnin kylvetysajoilla merkittyjen valkoimukarppeiden (*Catostomus commersonnii* (Lac.)) ja kahden pohjoisamerikkalaisen särkikalalajin (*Camptostoma anomalum* (Raf.), *Phoxinus erythrogaster* (Raf.)) (Beckman ja Schulz 1996) kokonaisissa otoliiteissa merkki oli havaittavissa selvänä tai erittäin selvänä 95-100 %:ssa tapauksista. Kontrolliotoliiteissa merkkiä ei sitä vastoin havaittu.

Tämän tutkimuksen tulosten mukaan valomikroskopia ei kuitenkaan ole kovin luotettava menetelmä ARS-merkin määrittämisessä, sillä kokeessa 3 merkityistä otoliiteista käsittelystä riippuen tulkittiin keskimäärin vain 40-60 % oikein. Taimenen, nieriän ja harmaanieriän kohdalla merkin havaittavuus tosin oli sahatuissa otoliiteissa fluoresenssimikroskopiaa vastaavasti muita lajeja parempi, mutta samalla näiden lajien sahatuista kontrolleista huomattava osa kuitenkin tulkittiin väärin merkityiksi, joten otoliitin kasvuvyöhykkeiden valoa taivuttavan ja hajottavan vaikutuksen mahdollisesti aiheuttamista väriltään ja muodoltaan ARS-merkkiä muistuttavien valemekkojen erottaminen aidoista merkeistä on valomikroskopiassakin vaikeaa.

Erityisesti siian merkittyjen otoliittien tulkinta valomikroskopialla oli hyvin epävarmaa. Edellä mainitussa Beckmanin ja Schulzin (1996) tekemässä merkintäkokeessa paras tulos saavutettiin ARS-pitoisuuksilla 200-300 mg l⁻¹ ja 12-24 tunnin kylvetysajoilla. Näin suuret pitoisuudet ja pitkät kylvetysajat eivät kuitenkaan sovellu esimerkiksi siian merkintään, sillä vastakuoriutuneilla siianpoikasilla kuolevuus on vaihdellut välillä <10-100 % jo ARS-pitoisuudessa 150 mg l⁻¹ (Eckmann ym. 1998), eivätkä kahden viikon ikäisetkään siianpoikaset kestä merkintää 200 mg l⁻¹:n pitoisuudessa (Niva, henk.koht. tiedonanto), joten ARS-merkin havaittavuutta valomikroskopiaa silmällä pitäen ei voida parantaa merkinnässä käytettyä pitoisuutta kohottamalla ilman, että merkintäkuolevuus oleellisesti suurenee. Myös alitsariini-kompleksonilla (ALC) tehdyissä kokeissa merkki on havaittu valomikroskoopilla eräiden ALC-pitoisuudessa 200 mg l⁻¹ merkittyjen hammasahveniin (Sparidae)

kuuluvien *Diplodus*-lajien otoliiteissa, mutta 50 mg l⁻¹:n pitoisuudessa merkittyjen kalojen otoliiteissa merkki näkyi ainoastaan UV-valossa (Vigliola 1997). Valomikroskoopilla on myös havaittu 100 mg l⁻¹:n ALC-pitoisuudessa merkittyjen punarumpukalojen (*Sciaenops ocellatus* (L.)) otoliiteissa väriltään violetti merkki, mutta tällöinkin merkin havaittavuus oli huomattavasti parempi fluoresenssimikroskoopilla tarkasteltuna (Thomas ym. 1995). Makkosen ja Pursiaisen (1997) tulos kuitenkin osoittaa, että mikäli merkintä onnistuu 50-100 mg l⁻¹:n pitoisuudessa erinomaisesti, ARS-merkki on mahdollista havaita valomikroskoopillakin ainakin nieriän, samoin kuin järvilohen ja -taimenen (Makkonen, henk.koht. tiedonanto), otoliiteissa.

Merkintätutkimusten rutiinitarkasteluun valomikroskopia ei kuitenkaan ole suositeltava menetelmä, sillä ARS-merkin havaittavuus eri lajeilla on siinä yleensä heikompi ja vaihtelee huomattavasti enemmän kuin fluoresenssimikroskopiassa. Sen sijaan merkinnän laaduntarkkailussa valomikroskooppia voidaan, tosin varauksin, käyttää vastaavin kriteerein kuin esimerkiksi fluoresenssimikroskoopin GFP2-suodinta. Makkosen ja Pursiaisen (1997) mukaan ARS-merkki oli osassa tutkittuja nieriän otoliitteja heikko ja epäsäännöllinen tai ei näkynyt lainkaan ensimmäisen vuorokauden kuluttua merkinnästä, mikä johtui todennäköisesti siitä, että merkkiä oli vaikea tai mahdoton havaita valomikroskoopilla pienen otoliitin ulkoreunalla, toisin kuin 59-180 vrk merkinnästä, jolloin merkki oli havaittavissa kaikissa otoliiteissa. Näin ollen valomikroskopia ei sovellu merkinnän laaduntarkkailuun heti merkinnän jälkeen. Sen sijaan harjuksella (*Thymallus thymallus* (L.)) tehdyssä kokeessa ARS-merkki havaittiin fluoresenssimikroskoopilla kalojen otoliiteissa jo merkintäpäivänä (Nagiec ym. 1995), joten mikäli merkinnän onnistumista halutaan arvioida välittömästi merkinnän jälkeen, fluoresenssimikroskoopin käyttäminen on välttämätöntä ARS-merkin luotettavaksi määrittämiseksi.

4.1.4. Otoliitin sahaamisen vaikutus ARS-merkin havaittavuuteen

Merkittyjen otoliittien sahaaminen etenkin kaksiviikkoisina merkittyjen kalojen kohdalla paransi ARS-merkin havaittavuutta valomikroskoopilla, sillä sahatuista otoliiteista tehtiin selvästi enemmän oikeita tulkintoja kuin kokonaisista, mutta samalla sahatuista kontroleista suuri osa tulkittiin väärin. Fluoresenssimikroskoopilla tarkasteltuna (koe 2) merkittyjen otoliittien sahaaminen ei sen sijaan vaikuttanut oleellisesti ARS-merkin tulkittavuuteen verrattuna kokonaisiin otoliitteihin. Tämä johtui siitä, että tutkimusaineiston otoliitit olivat peräisin pääasiassa kesänvanhoista ja yksivuotiaista kaloista, joiden otoliitit ovat suhteellisen pieniä, joten ARS-merkki oli havaittavissa suuressa osassa kokonaisia otoliitteja merkin päällä olevan ohuen kerroksen läpi. Varsinkin kaksiviikkoisina merkittyjen taimenen, nieriän ja harmaanieriän kokonaisissa otoliiteissa merkki oli selvästi havaittavissa. Sahatuista kontroleista sen sijaan tehtiin selvästi enemmän oikeita tulkintoja kuin kokonaisista, joten sahaamisella voitiin merkittävästi vähentää otoliittien autofluoresenssista aiheutuvia virhetulkintoja. Oksitetrasykliinillä merkittyjen valkosilmäkuhién otoliittien hiomisen ohuiksi, sahaamalla saatavaa leikettä vastaaviksi, preparaateiksi on myös havaittu vähentävän huomattavasti autofluoresenssin vaikutusta ja parantavan fluoresoivan merkin havaittavuutta (Fielder, henk.koht. tiedonanto), joten sahaamisen voidaan yleisesti ottaen olettaa helpottavan ARS-merkin tulkintaa otoliiteista.

Tämän tutkimuksen yhteydessä tarkasteltiin myös RKTL:n Inarin kalanviljelylaitoksella keväällä 2003 vastakuoriutuneina merkittyjen pohjasiaan (*Coregonus lavaretus pidschian* (Gmelin)) ja peledsiän (*C. peled* (Gmelin)) kokonaisia otoliitteja. Niissä ARS-merkki oli havaittavissa otoliitin distaaliselta puolelta, mutta vain harvoissa tapauksissa otoliitin proksimaaliselta puolelta (keskusuurteen puoleinen sivu), jossa nukleuksen päällä oleva kerros oli 2-3 kertaa paksumpi kuin distaalisella puolella (ks. esim. kuva 2: 1 e, kuvassa distaalinen puoli ylhäällä). Näin ollen otoliitin

aines vähentää voimakkaasti ARS-merkin havaittavuutta, ja on oletettavaa, että yksivuotiaita vanhempien siikojen ja muiden vastaavien lajien, kuten muikun (*Coregonus albula* (L.)) ja harjuksen, kokonaisissa otoliiteissa ARS-merkin havaittavuus vähenee oleellisesti iän myötä, joten niiden otoliitit on hiottava tai sahattava merkin määrittämiseksi. Toisaalta lohikaloilla (*Oncorhynchus*-, *Salmo*- ja *Salvelinus*-suvut) otoliitti on jo alkioasteella suurikokoinen, joten siihen muodostuu yleensä myös selvä merkki (Tsukamoto 1995), joka on havaittavissa suhteellisen kookkaidenkin kalojen kokonaisissa otoliiteissa. Esimerkiksi tämän tutkimuksen yhteydessä tarkasteltujen ruskuaispussipoikasina ARS-merkittyjen nieriöiden (Makkonen ja Pursiainen 1997) kohdalla merkki oli selvästi havaittavissa fluorenssimikroskopiolla vielä 5+ -ikäisten kalojen kokonaisissa otoliiteissa (n = 12). ARS-merkin pysyvyys vaikuttaa myös hyvältä, sillä em. nieriät oli merkitty vuonna 1996 (näytteet otettu syyskuussa 2001; Makkonen, henk. koht. tiedonanto) ja merkki näkyi yhä vuonna 2003.

Merkittyjen otoliittien sahaamisella oli kuitenkin vaikutusta ARS-merkin laatuun. Kokeessa 1 selväksi merkiksi tulkittujen tapausten suhteellinen osuus siian sahatuissa otoliiteissa oli suurempi kuin kokonaisissa otoliiteissa, ts. ARS-merkki oli vaivattomammin havaittavissa sahatuista kuin kokonaisista otoliiteista. Sahatuissa otoliiteissa ARS-merkin laadun jakauma ei myöskään vaihdellut eri ARS-pitoisuuksissa. Tämä poikkeaa kirjallisuudessa esiintyvistä tuloksista, joissa merkin laatu on ollut esim. alkioasteella ARS-pitoisuuksissa 200-1000 mg l⁻¹ merkittyjen siikojen (Eckmann 2003) ja ruskuaispussipoikasina pitoisuuksissa 100-150 mg l⁻¹ merkittyjen muikkujen (Eckmann ym. 1998) sekä 10 kk:n ikäisinä pitoisuuksissa 100-400 mg l⁻¹ merkittyjen piikkikampeloiden (*Scophthalmus maximus* (L.)) (Lagardère ym. 2000) otoliiteissa sitä parempi, mitä suuremmassa ARS-pitoisuudessa kalat oli merkitty. Vastaavia tuloksia on raportoitu myös oksitetrasykliinillä, kalseiinilla ja kalseiinisinisellä merkityillä valkosilmäkuhilla (Brooks ym. 1994) sekä tetrasykliinillä merkityillä siiioilla (Ruhlé ja Winecki-Kühn 1992) tehdyistä kokeista. Sekä Eckmann ym. (1998) että Eckmann (2003) käyttivät mikroskoppoinnissa Zeissin suodinsarjaa nro 15, joka vastaa tässä tutkimuksessa käytettyä Leican G-suodinta, ja Lagardère ym. (2000) puolestaan suodinta, jonka eksitaatio- (450-490 nm) ja sulkusuotimen aallonpituus (515 nm) vastaavat Leican GFP2-suotimen vastaavia aallonpituuksia. Käytettyjen ARS-pitoisuuksien suuresta vaihtelusta johtuen ainoastaan Eckmannin ym. (1998) esittämät tulokset ovat suoraan vertailukelpoisia tämän tutkimuksen tulosten kanssa, mutta oleellinen havainto on kuitenkin se, että kaksi viikkoa vanhojen siikojen merkintä ARS-pitoisuudessa 100 mg l⁻¹ ei käytännössä paranna sahatuissa otoliiteissa ARS-merkin laatua ja havaittavuutta verrattuna merkintään 50 mg l⁻¹:n pitoisuudessa, olettaen, että merkintäolosuhteet ovat muutoin samat.

Kokeessa 1 kokonaisten otoliittien kohdalla selväksi merkiksi tulkittujen tapausten määrä oli pienin ARS-pitoisuudessa 100 mg l⁻¹ merkittyjen siikojen otoliiteissa, mikä on selitettävissä sillä, että tässä pitoisuudessa merkittyjen kalojen keskipituus (93,4 mm) oli hieman suurempi kuin pitoisuuksissa 50 mg l⁻¹ (83,6 mm) ja 75 mg l⁻¹ (71,2 mm) merkittyjen kalojen, joten isompien siikojen otoliitit olivat myös hieman suurempia ja merkin päällä olevat kerrokset vastaavasti paksumpia, jolloin myös merkin näkyvyys oli heikompi. Kalan merkintäikä (syntyvän merkin koko) ja laji näyttävät myös vaikuttavan siihen, minkä pituisilla kaloilla ARS-merkki on havaittavissa kokonaisesta otoliitista. Esimerkiksi silmäpisteasteella ALC-pitoisuudessa 200 mg l⁻¹ merkittyjen kirsikkalohien (*Oncorhynchus masou masou* (Brevoort)) otoliiteissa merkki oli selvästi havaittavissa keskipituudeltaan 118 mm:n pituisten kalojen otoliiteissa (Nagata ym. 1995). Tässä tutkimuksessa kaksiviikkoisina pitoisuudessa 50 mg l⁻¹ merkityillä (otoliitin läpimitta merkintähetkellä n. 100 µm) siiioilla ARS-merkki oli havaittavissa alle 83 mm:n pituisten kalojen otoliiteissa. Eckmannin ym. (1998) mukaan vastakuoriutuneina pitoisuudessa 150 mg l⁻¹ merkityillä siiioilla ARS-merkki oli selvästi havaittavissa pituudeltaan alle 60 mm:n kalojen kokonaisissa otoliiteissa (sagitta), mutta sitä suurempien kalojen otoliitit oli hiottava merkin esille saamiseksi. Sen sijaan alkioasteella 42 vrk hedelmöityksestä merkittyjen

(otoliitin läpimitta n. 50 µm) siikojen kohdalla vastaava pituus oli vain 45 mm, joskin ARS-merkki oli havaittavissa vielä 90-100 mm:n mittaisten kalojen kokonaisesta lapillus-otoliitista (Eckmann 2003). Myös ALC-pitoisuudessa 100 mg l⁻¹ merkityillä hauenpoikasilla merkki on havaittu 20-150 mm:n pituisten yksilöiden käsittelemättömissä lapilluksissa (Skov ym. 2001). Ruhlén ja Winecki-Kühnin (1992) mukaan tetrasykliinillä (TC) mädin hedelmöityksen yhteydessä merkityillä siiioilla TC-merkki oli havaittavissa >100 mm:n pituisten kalojen kokonaisessa asteriscus-otoliitissa¹. Siialla ja muilla tässä tutkimuksessa tarkastelluilla lajeilla asteriscus ja lapillus ovat huomattavasti pienempiä kuin sagitta, joten nukleuksen päällä oleva kerros on niissä ohut ja siten myös ARS-merkki on todennäköisesti havaittavissa suhteellisen kookkaidenkin kalojen kokonaisessa otoliitissa. Näin ollen asteriscus tai lapillus soveltuisi ARS-merkin määrittämiseen periaatteessa paremmin kuin sagitta, jonka etuna on kuitenkin se, että samasta otoliitista voidaan määrittää paitsi ARS-merkin olemassaolo myös kalan ikä.

Kokeessa 2 kaksiviikkoisina ARS-pitoisuuksissa 50 mg l⁻¹ ja 100 mg l⁻¹ merkittyjen siikojen sahatuista otoliiteista tehtiin keskimäärin vähemmän oikeita tulkintoja kuin kokonaisista otoliiteista, toisin kuin muiden lajien kohdalla. Tämä tulos on ristiriidassa kokeessa 1 saadun tuloksen kanssa, jonka mukaan ARS-merkin laatu ja siten myös havaittavuus oli parempi sahatuissa kuin kokonaisissa siian otoliiteissa. Kokeiden tulosten ero selittyy kuitenkin sillä, että kokeessa 2 määrittäjät tulkitsivat merkittyjä ja merkitsemättömiä otoliitteja sokkotestitilanteessa, kun taas kokeessa 1 määrittäjät tiesivät kaikkien otoliittien olevan merkittyjä, joten otoliitteja, joissa ARS-merkki oli heikko, ei tulkittu merkitsemättömiksi, toisin kuin kokeessa 2, jossa voimakkaasti autofluoresoivien kontrollien erottaminen heikon merkin omaavista otoliiteista saattoi olla vaikeaa.

Kokeen 2 tulokseen vaikutti kaksi seikkaa, kahden viikon ikäisten siianpoikasten otoliittien ja siten myös ARS-merkin pieni koko (Ø n. 100 µm) sekä käytetty, alun pitäen otoliittien preparoimiseen iänmääritystä varten kehitetty, sahaustekniikka (Bedford 1983), jossa sahauslinja kulki otoliitin nukleuksen ja siihen värjäyksessä muodostuneen ARS-merkin keskeltä. Tällöin osa väriaineesta jäi sahauslinjalle ja joutui sahausjätteeseen. ARS-merkin pieni koko edellytti, että nukleus asetettiin sahauslinjalle 100 µm:n tarkkuudella, mikä oli mahdollista videokameran ja risti-siirtopöydän avulla. Tarkkuussahan terän kohdistaminen valumuotin ennalta määrätyle sahauslinjalle voitiin niin ikään tehdä 100 µm:n tarkkuudella, jolloin todellinen sahauslinja saattoi periaatteessa kulkea paitsi tarkoitetun linjan kautta myös joko nukleuksen ohi, niin että ARS-merkki jäi kokonaan leikkeeseen, tai nukleuksen kautta, jolloin ARS-merkki kokonaisuudessaan joutui sahausjätteeseen. Näin ollen ohutleikkeeseen jäävän väriaineen määrä riippui siitä, kuinka tarkasti otoliitin nukleus sijaitsi todellisella sahauslinjalla, ja siten myös ARS-merkin näkyvyys otoliiteissa vaihteli vastaavalla tavalla. Sokkoteistissä ei kuitenkaan käytetty otoliitteja, joissa ARS-merkki oli jäänyt kokonaisuudessaan sahausjätteeseen.

¹ RKTL:n Inarin kalantutkimusasemalla ARS-merkityistä kaloista tekemiäni havaintojen perusteella siian ja taimenen poikasilla ei ole asteriscuksia ruskuaispussivaiheessa. Vastakuoriutuneina merkittyjen yksivuotiaiden siikojen ja taimenten sagitat ja lapillukset olivat värjäytyneet alitsariinilla, mutta asteriscuksissa ei ollut havaittavissa ARS-merkistä aiheutuvaa fluoresenssia, joten asteriscusten voidaan olettaa muodostuneen vasta merkinnän jälkeen. Mätimunassa tai vastakuoriutuneena fluoresoivilla väriaineilla merkittyjen siikojen tai taimenten asteriscusten perusteella merkittyjä ja merkitsemättömiä kaloja ei siis voida erottaa toisistaan. Näin ollen Ruhlén ja Winecki-Kühn (1992) ovat erheellisesti tulkinneet asteriscukseksi lapilluksen, joka muodostuu sagitan ohella jo alkioasteella. Myös artikkelin kuvissa esitetyt otoliitit muistuttavat muodoltaan ja TC-merkin sijainniltaan (nukleuksessa) lapilluksia. TC-merkin havaittavuus siian kokonaisessa lapilluksessa vastaisi tällöin Eckmannin (2003) ARS-merkinnästä raportoimaa tulosta.

Siian otoliittien sahaaminen siten, että sahauslinja kulkee nukleuksen poikki, ei siis ole suositeltavaa. Koska otoliitin sahaus on peruuttamaton toimenpide, jonka onnistumista ei voida tarkkailla työn edistyessä, toisin kuin otoliitteja hiottaessa (Fielder 2002, Eckmann 2003), nukleuksen tulisi jäädä sahauskassa kokonaisuudessaan leikkeeseen (ks. kuva 7 b), sillä päinvastaisessa tapauksessa merkki saattaa tuhoutua kokonaan, mikä puolestaan johtaa virheellisiin tulkintatuloksiin. Tarvittaessa ohutleikettä voidaan käsitellä vesihiomapaperilla, mikäli merkin päällä oleva kerros on liian paksu ja estää merkkiä näkymästä. Sama pätee myös muiden sellaisten lajien kohdalla, kuten peledsiika, muikku ja harjus, joiden otoliitti on merkintäikäisenä (vastakuoriutuneena tai esikesäisenä) hyvin pieni. Sen sijaan kaksiviikkoisina merkittyjen nieriän, harmaanieriän ja taimenen otoliittien sahaaminen nukleuksen kautta on turvallista, sillä näiden lajien sagitta-otoliitti on merkintäikässä pituudeltaan (*rostrum–postrostrum*) n. 300–400 µm, jolloin otoliittien sahauslinjalle asettelusta tai sahanterän kohdistamisesta mahdollisesti aiheutuvasta vaihtelusta huolimatta ohutleikkeeseen jää riittävästi väriainetta merkin havaitsemiseksi. Silti näidenkin lajien kohdalla nukleuksen jättäminen leikkeeseen on suositeltavaa, mikäli kalat on merkitty kaksiviikkoista nuorempina. Iänmäärittämisessä otoliitit kuitenkin sahataan nukleuksen kautta, joten mikäli edellä kuvatussa menettelyssä leikkeistä halutaan määrittää myös kalojen ikä, nukleuksen leikkeen sisälle jättämisen vaikutus ikämäärittäykseen tulisi selvittää. Todennäköisesti menettelyn vaikutus vuosirenkaiden havaitsemiseen on käytännössä olematon, sillä ensimmäisenkin vuosirenkaan muodostuessa otoliitti on jo niin isokokoinen, että rengas joka tapauksessa on mukana leikkeessä, mutta periaatteessa tällä seikalla voi olla merkitystä ensimmäisen vuosirenkaan läpimittaan perustuvan vuosikasvuvyöhykkeiden kalibroinnin kannalta.

4.2. Logistinen regressioanalyysi

Otoliittien tulkinta on altis erilaisille otoliittien preparoinnista ja määritysten subjektiivisuudesta aiheutuville virheille niin kalojen iänmäärittäksen (Campana 2001) kuin merkittyjenkin otoliittien kohdalla (Volk ym. 1999). Vaikka ARS-merkittyjen otoliittien tulkinnalle fluoresenssimikroskopiolla voidaan antaa selkeät ja esimerkiksi GFP2-suodinta käytettäessä yksiselitteiset kriteerit, mm. merkkiainepitoisuuksista, kylvetysojoista, kalojen merkintäikästä, määrittäyksissä käytettyjen välineiden optisista ja teknisistä ominaisuuksista sekä määrittäjien tulkintakokemuksesta aiheutuvaa hajontaa otoliittien tulkinnassa ei voida kokonaan poistaa (Brooks ym. 1994), mikä ilmeni myös tässä tutkimuksessa tehdyn logistisen regressioanalyysin tuloksista.

Logistisen regressioanalyysin perusteella merkittävimmät tekijät otoliittien tulkinnassa olivat määrittäjä ja kylvetyaika. Määrittäjien 3 ja 4 tulkinnot eivät poikenneet vertailutasona olleen määrittäjän 5 tulkinnoista, toisin kuin määrittäjien 1 ja 2 tulkinnot. Yhtenä syynä tähän oli todennäköisesti se, että määrittäjät 1 ja 2 käyttivät erilaista, kokonaisten otoliittien tarkasteluun huonommin soveltuvaa mikroskooppia kuin muut määrittäjät. Mikroskoopin vaikutusta otoliitin tulkintaan ei kuitenkaan mallissa voitu ottaa huomioon, sillä koeasetelmasta johtuen vapausasteet eivät riittäneet tähän. Toisaalta määrittäjän 2 tulkintatulokset poikkesivat selvästi muiden määrittäjien tuloksista, mikä viittaa siihen, että määrittäjä 2 käytti muista määrittäjistä poikkeavia kriteereitä otoliittien määrittämisessä ja tulkitsi vain selvän merkin omaavat otoliitit merkityiksi. Tällöin heikon merkin omaavat otoliitit tulivat väärin tulkituiksi, kun taas merkitsemättömien otoliittien tulkinta onnistui näennäisesti erinomaisesti. Määrittäjien kokemattomuus ARS-merkin tulkinnassa aiheutti siis hajontaa tulkintatuloksissa, mutta kokonaisuutena merkityistä otoliiteista tehtyjen oikeiden tulkintojen suhteellista osuutta (n. 90 %) voidaan pitää varsin suurena. Merkinnän onnistuessa hyvin ARS-merkki on helposti jopa kokemattomien määrittäjien tulkittavissa (Eckmann ym. 1998). Määrittäjäkokemuksen myötä oikeiden tulkintojen suhteellisen osuuden voidaan olettaa kasvavan.

Koska määrittäjien tulkinnot perustuvat subjektiiviseen arvioon, määritysten todennukaisuuden ja eri määrittäjien välisten sekä saman määrittäjän eri aikoina tekemien tulkintojen yhtenevyyden mittaaminen on oleellista myös ARS-merkintöjen kohdalla. Kalojen iänmäärittämisen laaduntarkkailussa sovellettujen menetelmien, kuten tunnetun ikäisten kalojen otoliiteista määrääjain tehtävissä määritystesteissä käytettyjen referenssikokoelmien sekä testien tulosten analysointiin kehitettyjen tilastollisten ja graafisten välineiden (Campana 2001) kaltaisten menetelmien, kehittäminen olisi hyödyllistä myös ARS-merkityistä ja merkitsemättömistä otoliiteista tehtyjen tulkintojen laaduntarkkailussa. Blick ja Hagen (2002) ovat kehittäneet lämpötilamerkittyjen otoliittien luokittelun arviointiin määrittäjien välisten tulkintojen yksimielisyyteen (κ -indeksi) sekä määrittäjän virhetulkintojen estimointiin latentin luokkamallin (*latent class model*) avulla perustuvia menetelmiä. Lämpötilamerkittyjen otoliittien tulkinta muistuttaa ongelmiseen, kuten merkin laadun vaihteluineen ja valemerkkien esiintymisineen merkitsemättömien kalojen otoliiteissa (Volk ym. 1999), fluoresoivilla väriaineilla merkittyjen otoliittien tulkintaa, joten Blickin ja Hagenin (2002) menetelmät ovat suoraan sovellettavissa myös ARS-merkittyjen kalojen otoliittien tulkintojen laaduntarkkailussa.

Toiseksi merkittäväksi otoliittien tulkintaan vaikuttavaksi tekijäksi osoittautui kalojen kylvetysaika. Koska 6 tunnin kylvetysajalla merkittyjen kalojen otoliiteista tehtiin selvästi vähemmän oikeita tulkintoja kuin lyhyemmällä kylvetysajoilla merkityistä otoliiteista, on todennäköistä, että itse merkintä oli epäonnistunut. Tämä selittää sen, miksi taimenen ja järvilohen 6 tunnin kylvetysajalla merkityistä otoliiteista tehtiin poikkeuksellisen paljon virheellisiä tulkintoja, toisin kuin muilla kylvetysajoilla merkittyjen otoliittien kohdalla. Samasta syystä myös itse lajin vaikutusta otoliitin tulkintaan voidaan näiden lajien kohdalla pitää näennäisenä. Toisaalta kylvetysajan pidentyessä esimerkiksi ARS-merkittyjen nieriöiden kuolleisuuden on havaittu kasvavan (Makkonen ja Pursiainen 1997), joten on myös mahdollista, että 6 tunnin kylvetysaika on aiheuttanut kaloille stressiä, mikä puolestaan on hidastanut aineenvaihduntaa ja siten vähentänyt ARS-väriaineen kertymistä otoliitteihin. Myös kalojen merkintäiän on havaittu vaikuttavan otoliittiin syntyvän merkin laatuun. Vastakuoriutuneina tai esikesäisinä merkityillä kaloilla on saatu parempia merkintätuloksia kuin kesänvanhoina merkityillä kaloilla (Secor ym. 1991, Rojas-Beltrán ym. 1995a, 1995b). Tässä tapauksessa sekä 3 tunnin että 6 tunnin kylvetysajoilla merkityt kalat olivat merkittäessä kolmen kk:n ikäisiä, mutta koska 3 tunnin kylvetysajalla merkittyjen kalojen otoliiteista tehtyjen oikeiden tulkintojen suhteellinen osuus ei oleellisesti poikennut kaksiviikkoisina 4 tunnin kylvetysajalla merkittyjen kalojen otoliiteista tehdyistä tulkinnoista, merkintäikä sinällään ei selitä 6 tunnin kylvetysajalla merkityistä otoliiteista tehtyjen virheellisten tulkintojen suurta osuutta. Näin ollen mahdollisuus määrittää 3:n ja 4 tunnin kylvetysajoilla merkityt otoliitit oikein 11-20 kertaa todennäköisemmin kuin 6 tunnin kylvetysajoilla merkityt voidaan tulkita siten, että merkinnän epäonnistuminen vähentää todennäköisyyttä määrittää merkitty otoliitti oikein samaan suuruusluokkaan kuin merkitsemättömän otoliitin tulkinta merkityksi. Tämän vuoksi myös merkintöjen onnistumisen laaduntarkkailu on oleellista mahdollisten heikoista merkeistä aiheutuvien tulkintavirheiden arvioimiseksi (Fielder 2002).

Se, että mahdollisuus tulkita ARS-merkitty otoliitti oikein merkityksi oli 17-kertainen verrattuna mahdollisuuteen tulkita merkitsemätön otoliitti väärin merkityksi, voidaan puolestaan tulkita todennäköisyytenä erottaa merkitty otoliitti merkitsemättömästä. Määrittäjien kokemuksen lisääntyessä tämän todennäköisyyden voidaan olettaa kasvavan. Määrittäjät kykenivät erottamaan merkityt otoliitit merkitsemättömistä varmemmin sahatuista kuin kokonaisista otoliiteista. Kokonaiset otoliitit puolestaan tulkittiin suuremmalla todennäköisyydellä merkityiksi kuin sahatut, riippumatta siitä, olivatko ne alun pitäen merkittyjä vai merkitsemättömiä. Kuten edellä jo kävi ilmi, otoliitin sahaaminen ohutleikkeeksi paransi huomattavasti merkitsemättömien otoliittien oikeaa tulkintaa, joten todennäköisin selitys tälle tulokselle on se, että kokonaisten otoliittien kohdalla autofluoresenssi vaikeutti määrittämistä.

Tämän tutkimuksen perusteella helpoimmin tulkittavia lajeja olivat nieriä, harmaanieriä ja kuha. Myös kaksiviikkoisina merkittyjen taimenten otoliitit tulkittiin oikein, joten tätäkin lajia voidaan pitää helposti tulkittavana. Kuten edellä on käynyt ilmi, kuhan kohdalla tulkittavuuteen vaikutti merkintäikä, sillä kahden kk:n ikäisinä merkittyjen kalojen otoliiteissa ARS-merkki sijaitsi voimakkaasti fluoresoivan nukleuksen ulkopuolella. Nieriän, harmaanieriän ja taimenen, sekä todennäköisesti myös järvi-lohen, merkittyjen otoliittien tulkinta on suhteellisen helppoa, sillä näiden lajien otoliitti on jo alkioasteella suurikokoinen, joten otoliittiin muodostuu myös selvä merkki (Tsukamoto 1995). Sen sijaan kaksiviikkoisina merkittyjen siikojen otoliittien tulkinta oli muita lajeja vaikeampaa, mikä sahattujen otoliittien kohdalla johtui siitä, että ohutleikkeiden sahauslinja ei edellä kuvatulla tavalla ollut optimaalinen, jolloin ARS-väriaineen määrä jäi osassa otoliitteja luotettavan määrittämisen kannalta liian vähäiseksi. Merkinnän onnistuessa kaikkien lajien otoliitit ovat kuitenkin melko vaivattomasti tulkittavissa. Käytännön määrittämisen kannalta otoliittien tulkittavuuden erot lajien välillä aiheutuvat ennemminkin autofluoresenssin intensiteetin vaihtelusta sekä valemerkkien mahdollisesta esiintymisestä luonnonkalojen otoliiteissa kuin ARS-merkin laadusta merkittyjen kalojen otoliiteissa.

5. Johtopäätökset

Alitsariinipunainen S (ARS) -väriaine soveltuu hyvin vastakuoriutuneiden ja esikesäisten kalanpoikasten massamerkintään alhaisilla pitoisuuksilla (50-100 mg l⁻¹) ja lyhyillä kylvetysojoilla (3-4 h). Merkinnän onnistuessa otoliitteihin muodostuva ARS-merkki on yleensä selväpiirteinen ja intensiteetiltään hyvin voimakas, jolloin merkitty otoliitti on helppo erottaa merkitsemättömästä fluoresenssimikroskopiolla. Tällöin otoliitteja voidaan tarkastella alitsariinin eksitaatio- ja emissioaallonpituuksia lyhytaaltoisemmalla suotimella (GFP2, FITC), jonka etuna on se, että ARS-merkin väriä voidaan käyttää yksiselitteisenä tulkintakriteerinä merkin olemassaololle tai puuttumiselle. Sen sijaan valomikroskooppi ei ole luotettava ARS-merkin määrittämisessä, ja varsinkin siian otoliittien tulkinta sillä on hyvin epävarmaa.

Otoliittien tulkinnassa ongelmana on yhtäältä merkinnän epäonnistuessa syntyvien heikkojen merkkien vaikea havaittavuus ja toisaalta autofluoresenssista ja otoliitin optisista ominaisuuksista johtuvat valemerkit. Heikkojen merkkien havaittavuutta voidaan parantaa käyttämällä alitsariinin eksitaatio- ja emissioaallonpituuksia vastaavaa suodinta (G, TRITC, Texas Red) tai riittävän voimakasta suurennusta. Valemerkeistä mahdollisesti aiheutuvien tulkintavirheiden suuruus puolestaan riippuu niiden esiintymistäajuudesta luonnonkalojen otoliiteissa, mutta tätä ei tiettävästi ole vielä tutkittu. Koska autofluoresenssin intensiteetti vaihtelee eri lajeilla ja siten myös todennäköisesti vaikuttaa valemerkkien esiintymiseen, olisi tärkeää selvittää, etenkin kuhan kohdalla, jolla autofluoresenssin havaittiin olevan voimakkainta, kuinka merkittävän harhan valemerkit voivat aiheuttaa tulkintatilanteessa.

Otoliittien sahaaminen ei tämän tutkimuksen tulosten mukaan oleellisesti parantanut ARS-merkin havaittavuutta otoliiteissa (sagitta), mikä johtui siitä, että aineiston otoliitit olivat peräisin nuorista kaloista ja siten pienikokoisia, jolloin ARS-merkki kuului otoliitin läpi myös suuressa osassa kokonaisia otoliitteja. Samasta syystä lapillus-otoliitin soveltuvuus ARS-merkin määrittämiseen olisi syytä selvittää. On kuitenkin oletettavaa, että vuotta vanhempien kalojen otoliittien tulkinta lajista riippuen helpottuu, jos otoliitit sahataan ohutleikkeiksi. Sen sijaan merkitsemättömien otoliittien kohdalla sahaamisella oli selvä autofluoresenssista aiheutuvia virhetulkintoja vähentävä vaikutus jo alle vuoden ikäisten kalojen otoliittien kohdalla. Näin ollen otoliittien käsittely sahaamalla tai hiomalla on todennäköisesti välttämätöntä, jotta merkityt ja merkitsemättömät kalat voitaisiin mahdollisimman luotettavasti erottaa toisistaan.

Logistisessa regressioanalyysissä otoliittien tulkintaan merkittävimmin vaikuttaviksi tekijöiksi osoittautuivat määrittäjä ja kalojen merkinnässä käytetty kylvetyaika, mutta myös käytetty ARS-pitoisuus, otoliitin merkintä ja käsittely sekä laji vaikuttivat todennäköisyyteen tulkita otoliitti merkityksi. Merkinnän onnistuessa lajien välillä ei ole oleellisia eroja ARS-merkin tulkittavuudessa, mutta autofluoresenssin intensiteetin vaihtelu ja mahdollisten valemerkkien esiintyminen luonnonkalojen otoliiteissa saattavat aiheuttaa sen, että osalla lajeista otoliitit ovat muita vaikeammin tulkittavissa. Koska ARS-merkittyjen otoliittien tulkinta perustuu määrittäjien subjektiiviseen arvioon, tulkintojen laaduntarkkailu on oleellista myös ARS-merkintöjen kohdalla. Lämpötilamerkittyjen otoliittien luokittelun arviointiin on kehitetty tilastollisia menetelmiä, jotka ovat sovellettavissa suoraan ARS-merkityistä otoliiteista tehtyjen määritysten yhtenevyyden mittaamisessa.

Kiitokset

Kiitän Teuvo Nivaa ja Jari Raitaniemeä mahdollisuudesta työskennellä Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen alitsariinihankkeeseessa, jonka puitteissa tämän tutkimuksen tekeminen oli tieteellisesti hyvin haastava tehtävä ja antoisa kokemus. Kiitän myös Kari Nybergiä, jonka ideasta ja suosituksesta pääsin mukaan hankkeeseen. Tutkimuksen keskeisiä menetelmiä olivat fluoresenssimikroskopia, jonka tekniikkaan sain asiantuntevan ja innostavan johdatuksen Reetta Kariolalta, sekä otoliittien sahaaminen tarkkuusleikkurilla, jonka käytössä minua kärsivällisesti opasti Jari Kämäräinen. Mahdollisuus käyttää vapaasti Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutin stereofluoresenssimikroskooppia edisti tämän tutkimuksen suorittamista oleellisesti, mistä olen kiitollinen Juha M. Partaselle. Kiitän myös Mike Brownia, Reiner Eckmannia, Dave Fielderiä ja Emi Murayamaa autofluoresenssin problematiikkaan ja otoliittien proteiineihin liittyvistä kommentista ja tiedoista. Hans M. Berger, Teppo Juntunen, Kimmo Kahilainen, Teuvo Niva, Kari Nyberg, Randi Saksgård, Tomi Ruohonen ja Sami Vesala mikroskopoivat tutkimuksen määritystesteissä otoliitteja aikaansa ja vaivaansa säästämättä, josta heille myös ansaitut kiitokseni. Tutkimuksen käsikirjoituksen viimeistelyssä arvokkaita neuvoja ja opettavaista kritiikkiä antoivat Hannu Lehtonen, Jari Raitaniemi, Teuvo Niva, Kari Nyberg, Jarmo Makkonen ja Raimo Parmanne. Folke Halling tarkisti ystävällisesti ruotsinkielisen ja Michael Wilkinson englanninkielisen tiivistelmän kieliasun.

Lähteet

- Al-Husaini, M., Al-Ayoub, S. & Dashti, J. 2001: Age validation of nagroor, *Pomadasy kaakan* (Cuvier, 1830) (Family: Haemulidae) in Kuwaiti waters. *Fisheries Research* 53: 71-81.
- Beckman, D.W. & Schulz, R.G. 1996: A simple method for marking fish otoliths with alizarin compounds. *Transactions of the American Fisheries Society* 125: 146-149.
- Bedford, B.C. 1983: A method for preparing sections of large numbers of otoliths embedded in black polyester resin. *Journal du Conseil. Conseil International pour l'Exploration de la Mer* 41: 4-12.
- Billington, N. & Knight, A.W. 2001: Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Analytical Biochemistry* 291: 175-197.
- Blick, D.J. & Hagen, P.T. 2002: The use of agreement measures and latent class models to assess the reliability of classifying thermally marked otoliths. *Fishery Bulletin* 100: 1-10.
- Brooks, R.C., Heidinger, R.C. & Kohler, C.C. 1994: Mass-marking otoliths of larval and juvenile walleyes by immersion in oxytetracycline, calcein, or calcein blue. *North American Journal of Fisheries Management* 14: 143-150.
- 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., Annand, M.C. & McMillan, J.I. 1995: Graphical and statistical methods for determining the consistency of age determinations. *Transactions of the American Fisheries Society* 124: 131-138.
- Champigneulle, A. & Cachera, S. 2003: Evaluation of large-scale stocking of early stages of brown trout, *Salmo trutta*, to angler catches in the French-Swiss part of the River Doubs. *Fisheries Management and Ecology* 10: 79-85.
- Chang, W.Y.B. 1982: A statistical method for evaluating the reproducibility of age determination. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39: 1208-1210.
- Eckmann, R. 2003: Alizarin marking of whitefish, *Coregonus lavaretus* otoliths during egg incubation. *Fisheries Management and Ecology* 10: 233-239.
- Eckmann, R., Czerkies, P., Helms, C. & Kleibs, K. 1998: Evaluating the effectiveness of stocking vendace (*Coregonus albula* (L.)) eleutheroembryos by alizarin marking of otoliths. *Archiv für Hydrobiologie, Special Issues in Advances in Limnology* 50: 457-463.
- Eskelinen, S. & Vääräniemi, J. 1998: Fluoresenssimikroskopia. Julkaisussa: Rantala, I. & Lounatmaa, K. (toim.), *Biologinen valomikroskopia*: 166-175. Helsinki: Yliopistopaino.
- Fielder, D.G. 2002: Methodology for immersion marking walleye fry and fingerlings in oxytetracycline hydrochloride and its detection with fluorescence microscopy [online]. *Fisheries Technical Report 2002-1*. Michigan Department of Natural Resources, Fisheries Division. 21 p. [cited 4 June 2003]. Available from World Wide Web: <<http://www.michigandnr.com/publications/pdfs/ifr/ifrlibra/technical/reports/2002-1tr.pdf>>.
- Folkvord, A., Wright, P.J. & Mosegaard, H. 1998: Marking otoliths [online]. In: Wright, P.J. (ed.), *Otolith preparation and analysis*: 4-9. Proceedings of a workshop held at the University of Bergen, Norway, June 18-20, 1998. EFAN Report 2-98 [cited

18 September 2003]. Available from World Wide Web: <<http://www2.efan.no/News/report1.htm>>.

Friman, T., Koljonen, M.-L., Nyberg, K. & Saura, A. 1999: Kalojen merkintätutkimukset. Julkaisussa: Böhling, P. & Rahikainen, M. (toim.), Kalataloustarkkailu – periaatteet ja menetelmät: 103-135. Helsinki: Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos.

Hoenig, J.M., Morgan, M.J. & Brown, C.A. 1995: Analysing differences between two age determination methods by tests of symmetry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52: 364-368.

Kayle, K. 1992: Use of oxytetracycline to determine the contribution of stocked fingerling walleyes. *North American Journal of Fisheries Management* 12: 353-355.

Kimura, D.K., & Lyons, J.L. 1991: Between-reader bias and variability in the age-determination process. *Fishery Bulletin U.S.* 89: 53-60.

Lagardère, F., Thibaudeau, K. & Bégout Anras, M.L. 2000: Feasibility of otolith markings in large juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, using immersion in alizarin-red S solutions. *ICES Journal of Marine Science* 57: 1175-1181.

Makkonen, J. & Pursiainen, M. 1997: Nieriän ruskuaisspussipoikasten merkintä alitsariinipunainen S –väriaineella. Julkaisussa: Makkonen, J. (toim.), Saimaan nieriä, syvien vesien uhanalainen: 115-129. Kalatutkimuksia 133. Helsinki: Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos.

Mosegaard, H., Morales-Nin, B., Weidman, C., Geffen, A., Arneri, E., Millner, R., Panfili, J. & Folkvord, A. 1998: Otolith thin-section preparation: some problems and new developments [online]. In: Wright, P.J. (ed.), Otolith preparation and analysis: 10-20. Proceedings of a workshop held at the University of Bergen, Norway, June 18-20, 1998. EFAN Report 2-98 [cited 18 September 2003]. Available from World Wide Web: <<http://www2.efan.no/News/report1.htm>>.

Murayama, E., Takagi, Y., Ohira, T., Davis, J.G., Greene, M.I. & Nagasawa, H. 2002: Fish otolith contains a unique structural protein, otolin-1. *European Journal of Biochemistry* 269: 688-696.

Nagata, M., Nakajima, M. & Okada, H. 1995: Growth differences between wild and domestic juvenile masu salmon, *Oncorhynchus masou*, as determined by otolith marking of domestic fish at the eyed-egg stage. In: Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E. (eds.), Recent developments in fish otolith research: 445-454. Columbia: University of South Carolina Press.

Nagata, M. & Irvine, J.M. 1997: Differential dispersal patterns of male and female masu salmon fry. *Journal of Fish Biology* 51: 601-606.

Nagiec, M., Czerkies, P., Goryczko, K., Witkowski, A. & Murawska, E. 1995: Mass-marking of grayling, *Thymallus thymallus* (L.), larvae by fluorochrome tagging of otoliths. *Fisheries Management and Ecology* 2: 185-195.

Niva, T., Keränen, P. & Raitaniemi, J. 2003: Vastakuoriutuneiden kalanpoikasten merkintä alitsariinipunaisella (poster). Julkaisussa: Leskelä, A. (toim.), Kalavesien hoidon uudet tuulet – Kalantutkimuspäivät 2003: 75. Kala- ja riistaraportteja 291. Helsinki: Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos.

Raitaniemi, J., Nyberg, K. & Torvi, I. 2000: Kalojen iän ja kasvun määrittäminen. Helsinki: Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos. 232 s.

Rojas-Beltrán, R., Champigneulle, A. & Vincent, G. 1995a: Mass-marking in bone tissues of *Coregonus lavaretus* (L.) and its potential application to monitoring the spatio-temporal distribution of larvae, fry and juveniles of lacustrine fishes. *Hydrobiologia* 300/301: 399-407.

- Rojas-Beltrán, R., Gillet, C. & Champigneulle, A. 1995b: Immersion mass-marking of otoliths and bone tissue of embryos, yolk-sac fry and fingerlings of Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.). *Nordic Journal of Freshwater Research* 71: 411-418.
- Rojas-Beltrán, R., Ruhlé, C., Kugler, M. & Galán, S. 1998: Preliminary study of a mass-marking method for coregonid eggs. *Archiv für Hydrobiologie, Special Issues in Advances in Limnology* 50: 465-470.
- Rost, F.W.D. 1992: Fluorescence microscopy. Volume I. Cambridge: Cambridge University Press. 253 p.
- Ruhlé, C. & Winecki-Kühn, C. 1992: Tetracycline marking of coregonids at the time of egg fertilization. *Aquatic Sciences* 54 (2): 165-175.
- Sánchez-Lamadrid, A. 2001: The use of alizarin complexone for immersion marking of otoliths of larvae of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Fisheries Management and Ecology* 8: 279-281.
- Secor, D.H., White, M.G. & Dean, J.M. 1991: Immersion marking of larval and juvenile hatchery-produced striped bass with oxytetracycline. *Transactions of the American Fisheries Society* 120: 261-266.
- Secor, D.H. & Houde, E.D. 1995: Larval mark-release experiments: potential for research on dynamics and recruitment in fish stocks. In: Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E. (eds.), *Recent developments in fish otolith research*: 423-444. Columbia: University of South Carolina Press.
- Skov, C., Grønkjær, P. & Nielsen, C. 2001: Marking pike fry otoliths with alizarin complexone and strontium: an evaluation of methods. *Journal of Fish Biology* 59: 745-750.
- Støttrup, J.G., Sparrevohn, C.R., Modin, J. & Lehmann, K. 2002: The use of releases of reared fish to enhance natural populations. A case study on turbot *Psetta maxima* (Linné, 1758). *Fisheries Research* 59: 161-180.
- Tabachnick, B.G. & Fidell, L.S. 2001: Using multivariate statistics. 4th edition. Boston: Allyn and Bacon. 966 p.
- Thomas, L.M., Holt, S.A. & Arnold, C.R. 1995: Chemical marking techniques for larval and juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) otoliths using different fluorescent markers. In: Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E. (eds.), *Recent developments in fish otolith research*: 703-717. Columbia: University of South Carolina Press.
- Thorrold, S.R., Jones, G.P., Hellberg, M.E., Burton, R.S., Swearer, S.E., Neigel, J.E., Morgan, S.G. & Warner, R.R. 2002: Quantifying larval retention and connectivity in marine populations with artificial and natural markers. *Bulletin of Marine Science*, 70 Suppl.: 291-308.
- Tsukamoto, K. 1995: Use of otolith-tagging in a stock enhancement program for masu salmon (*Oncorhynchus masou*) in the Kaji River, Japan. In: Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E. (eds.), *Recent developments in fish otolith research*: 403-422. Columbia: University of South Carolina Press.
- Van der Walt, B. & Faragher, R.A. 2002: Thermal marking of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) otoliths. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 36: 883-888.
- Vigliola, L. 1997: Validation of daily increment formation in otoliths for three *Diplodus* species in the Mediterranean sea. *Journal of Fish Biology* 51: 349-360.
- Villanueva, R. & Molí, B. 1997: Validation of the otolith increment deposition ratio using alizarin marks in juveniles of the sparid fishes, *Diplodus vulgaris* and *D. puntazzo*. *Fisheries Research* 30: 257-260.

Volk, E.C., Schroder, S.L. & Grimm, J.J. 1999: Otolith thermal marking. *Fisheries Research* 43: 205-219.

Wright, P.J., Mosegaard, H., Morales-Nin, B. & Geffen, A. 1998a: The regulation of otolith formation and its significance to age determination, size backcalculation and elemental composition [online]. In: Wright, P.J. (ed.), *The present status of otolith research and applications*: 4-21. Proceedings of a workshop held at ORSTOM, Brest, France 27-29 May, 1997. EFAN Report 1-98 [cited 18 September 2003]. Available from World Wide Web: <<http://www2.efan.no/News/report1.htm>>.

Wright, P.J., Geffen, A.J., Gordon, J., Morales-Nin, B., Palomeres, J.I. & Rebelo, J. 1998b: Interpreting otolith microstructure [online]. In: Wright, P.J. (ed.), *Otolith preparation and analysis*: 21-34. Proceedings of a workshop held at the University of Bergen, Norway, June 18-20, 1998. EFAN Report 2-98 [cited 18 September 2003]. Available from World Wide Web: <<http://www2.efan.no/News/report1.htm>>.

Pekka Keränen

Alitsariinipunainen S (ARS) -väriaineella merkittyjen kalojen otoliittien tulkinta fluoresenssimikroskopiolla

Tutkimusraportti

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos

Tiivistelmä

Tutkimuksessa vertailtiin alitsariinipunainen S (ARS) -väriaineella merkittyjen sekä merkitsemättömien nieriän, harmaanieriän, järvilohen, taimenen, siian ja kuhan kokonaisten ja ohutleikkeiksi sahattujen otoliittien tulkittavuutta fluoresenssimikroskopiolla. ARS-merkki on yleensä selväpiirteinen ja intensiteetiltään voimakas, jolloin merkitty otoliitti on helppo erottaa merkitsemättömästä. Tällöin otoliitteja voidaan tarkastella alitsariinin eksitaatio- ja emissioaallonpituuksia (530-550 nm/ >580 nm) lyhytaaltoisemmalla (480 nm/ 510 nm) suotimella, jolloin ARS-merkin otoliitin vihreänä näkyvästä autofluoresenssista poikkeavaa oranssia väriä voidaan käyttää yksiselitteisenä tulkintakriteerinä merkin olemassaololle tai puuttumiselle. Alle kaksivuotiailla kaloilla otoliittien sahaaminen ei parantanut oleellisesti ARS-merkin havaittavuutta verrattuna kokonaisiin otoliitteihin, mutta on todennäköistä, että tätä vanhempien kalojen otoliittien tulkinta helpottuu, jos otoliitit sahataan ohutleikkeiksi, sillä otoliitin kasvaessa ARS-merkin päälle kertyvä aines heikentää merkin havaittavuutta kokonaisessa otoliitissa. Sen sijaan merkitsemättömien otoliittien kohdalla sahaamisella oli selvä autofluoresenssista aiheutuvia virhetulkintoja vähentävä vaikutus jo alle vuoden ikäisillä kaloilla. Tulkintatesteissä määrittäjät tulkitsivat oikein keskimäärin 90 % sekä sahatuista että kokonaisista ARS-merkityistä otoliiteista. Kokonaisista merkitsemättömistä otoliiteista tulkittiin oikein vain 80 %, mutta vastaavasti sahatuista 97 %. Määrityskokemuksen karttuessa tulkintojen tarkkuuden voidaan kuitenkin odottaa parantuvan. Lajien välillä ei havaittu oleellisia eroja ARS-merkin tulkittavuudessa, mutta autofluoresenssin intensiteetin vaihtelu ja mahdolliset valemmerkit luonnonkalojen otoliiteissa saattavat aiheuttaa sen, että osalla lajeista, kuten kuhan kohdalla, otoliitit ovat muita vaikeammin tulkittavissa. Tämän vuoksi sekä merkintöjen että määrittysten laaduntarkkailu on pienpoikasistutuksista saatavien tulosten luotettavuuden kannalta oleellista.

Asiasanat

alitsariinipunainen, autofluoresenssi, fluoresenssimikroskopia, kalamerkintä, otoliitti

Kalatutkimuksia – Fiskundersökningar 192

951-776-452-9

0787-8478

34 s.

Suomi

Julkinen

Myynti

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos
Asiakaspalvelu ja myynti
Pukinmäenaukio 4, PL 6
00720 Helsinki
Puh. 0205 7511 Faksi 0205 751 201
julkaisumyynti@rktl.fi

Kustantaja

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos
PL 6
00721 Helsinki
Puh. 0205 7511 Fax 0205 751201

Utgivare

Vilt- och fiskeriforskningsinstitutet

Utgivningsdatum

Juni 2004

Författare

Pekka Keränen

*Publikationens namn***Analys, med hjälp av fluorescensmikroskopi, av otoliter från fisk, som märkts med alizarinrött S (ARS) .***Typ av publikation*

Rapport

Uppdragsgivare

Vilt- och fiskeriforskningsinstitutet

*Datum för uppdragsgivandet**Projektnamn och -nummer**Referat*

Undersökningen omfattar analys och klassificering, med hjälp av fluorescensmikroskopi, av obehandlade otoliter från röding, kanadaröding, insjölox, öring, sik och gös respektive otoliter från samma arter, som sågats i tunna skivor och antingen var märkta med alizarinrött S (ARS) eller omärkta. ARS-märkets form och intensitet är oftast distinkt, vilket gör det möjligt att indentifiera märket också med ett filter som ger kortare excitations- och emissionvåglängder (480 nm/ 510 nm) än optimalt för alizarin (530-550 nm/ >580 nm). Därför kan den orange eller gula färgen från ARS märkningen, som skiljer sig från den gröna färgen från autofluorescens i otoliter, användas som ett objektivt kriterium för att skilja mellan märkta och omärkta otoliter. Sågning av otoliter förbättrade inte nämnvärt möjligheten att spåra ARS-märken jämfört med obehandlade otoliter av fisk yngre än 2 år. Enligt blindtester var 90 % av ARS-märkena korrekt indentifierade, vilket gällde både obehandlade och sågade otoliter. Det är ändå sannolikt att sågning av otoliter i tunna skivor kan vara till hjälp vid identifiering av ARS-märken i äldre fisk, eftersom den tjockare kalkstrukturen kan hindra ARS-märket från att synas i obehandlade otoliter. Det var däremot lättare att skilja mellan märkta och omärkta otoliter, när otoliterna var sågade. Av omärkta otoliter visade det sig, vid en kontroll, att 97 % av de sågade respektive 80 % av de obehandlade var rätt klassificerade. Orsaken till detta var tydligen det, att sågningen minskade den störande effekten av autofluorescens i otoliterna. Vid spårning av ARS-märken i otoliter där märkningen lyckats väl, observerades endast obetydliga skillnader mellan de olika fiskarterna. Beroende på fiskart, variation i autofluorescens intensitet och eventuella falska märken hos otoliter från vild fisk, kan det ändå uppstå problem vid identifiering av äkta ARS-märken hos otoliterna. För att kunna få pålitliga resultat från utsättningar av nykläckta fiskyngel är det därför nödvändigt att kontrollera kvaliteten både på märkning av fisk med ARS och spårning av märken i otoliterna.

Nyckelord

alizarinrött, autofluorescens, fluorescensmikroskopi, fiskmärkning, identifiering av märken, otolit

Seriens namn och nummer

Kalatutkimuksia – Fiskundersökningar 192

ISBN

951-776-452-9

ISSN

0787-8478

Sidoantal

34 s.

Språk

Finska

*Pris**Sekretessgrad*

Offentlig

Försäljning

Vilt- och fiskeriforskningsinstitutet
Kundtjänst och försäljning
Bocksbackaplanen 4
Tel. 0205 7511 Fax 0205 751 201
julkaisumyynti@rktl.fi

Förlag

Vilt- och fiskeriforskningsinstitutet
PB 6
00721 Helsinki
Tel. 0205 7511 Fax 0205 751 201

Published by

Finnish Game and Fisheries Research Institute

Date of Publication

June 2004

Author(s)

Pekka Keränen

Title of Publication

The interpretation of alizarin red S (ARS) labelled fish otoliths with fluorescence microscopy

Type of Publication

Research report

Commissioned by

Finnish Game and Fisheries Research Institute

Date of Research Contract

Title and Number of Project

Abstract

The research compares the interpretability of entire otoliths with thin-sectioned otoliths of Arctic charr, lake trout, landlocked salmon, brown trout, whitefish and pikeperch labelled using different alizarin red S (ARS) concentrations and immersion times. The otoliths were examined using fluorescence microscopy, and unlabelled otoliths were used as controls. The form and intensity of an ARS mark is usually distinct, which enables reliable mark detection even with a filter that has lower excitation and emission wavelengths (480 nm/ 510 nm) than are optimal for alizarin (530-550 nm/ >580 nm). As a consequence, the orange or yellow colour of the ARS mark, which differs from the green colour of autofluorescence in otoliths, can be used as unambiguous criteria for the presence or absence of an expected mark. For fish younger than 2 years of age, thin sectioning did not significantly improve the detectability of the ARS mark compared to entire otoliths. In blind tests, the presence of an ARS mark was correctly detected in 90% of the cases for both entire and thin-sectioned labelled otoliths. However, it is probable that sawing otoliths into thin slices will enhance the correct determination of ARS marks in older fish, since the thicker layers of calcium deposited around the ARS mark may reduce its visibility in entire otoliths. Moreover, when thin sectioned, unlabelled otoliths were easier to distinguish from labelled ones than when left entire. 97% of the unlabelled thin-sectioned otoliths were correctly classified as unmarked, whereas the figure was only 80% for the entire ones. This was due to the reduced error-inducing effect of autofluorescence in sawed otoliths. In the detectability of ARS marks in successfully-labelled otoliths, only minor differences were observed between species. However, variation in the intensity of autofluorescence and the presence of possible false marks in the otoliths of wild fish may cause differing error rates in mark detection between species. Therefore, quality control for both otolith labelling and mark detection is necessary in evaluating larval stocking.

Key words

alizarin red, autofluorescence, fluorescence microscopy, fish marking, mark detection, otolith

Series (key title and no.)

Kalatutkimuksia – Fiskundersökningar 192

ISBN

951-776-452-9

ISSN

0787-8478

Pages

34 p.

Language

Finnish

Price

Confidentiality

Public

Distributed by

Finnish Game and Fisheries Research Institute
Customer Service
P.O. Box 6
FIN-00721 Helsinki, Finland
Phone +358 205 7511 Fax +358 205 751 201

Publisher

Finnish Game and Fisheries Research Institute
P.O.Box 6
FIN-00721 Helsinki, Finland
Phone +358 205 7511 Fax +358 205 7511

KALATUTKIMUKSIA – FISKUNDERSÖKNINGAR

Aiemmin ilmestyneitä julkaisuja

191. LOUHI, P., MÄKI-PETÄYS, A.

Elämää soraikon ulkopuolella ja sisällä – lohen ja taimenen kutupaikan valinta sekä mädin elinympäristövaatimukset (Livet utanför och inne i grusbädden – laxens och öringens val av lekplats och rommens krav på miljö) (Living outside and inside the gravel – the spawning habitat selection of Atlantic salmon and brown trout and the habitat requirements of intragravel embryos). 23 s. Helsinki 2003.

190. MIKKOLA, J., YRJÖLÄ, R.

Suomalainen vapaa-ajankalastaja ja -kalastus vuosituhannen vaihtuessa. (Fritidsfiskaren och fritidsfisket i millennieskiftets Finland) (Finnish recreational fishermen and fishery at the turn of the century). 35 s. Helsinki 2003.

189. LAUTALA, T.

Hybridisaatio taimenkantojen hoidossa – uhka vai oljenkorsi taimenen monimuotoisuudelle? (Hybridisering av öringstammarna - hot eller halmstrå för diversiteten?) (Hybridization in trout stock management – a threat, or an opportunity for trout diversity?). 21 s. Helsinki 2003.

187. TOIVONEN, A.-L., MIKKOLA, J., SALMI, P., SALMI, J.

Vapaa-ajankalastuksen monet merkitykset. (Det mångfacetterade fritidsfisket) (Multiple dimensions of recreational fisheries). 30 s. Helsinki 2003.

186. ERKINARO, J., MÄKI-PETÄYS, A., JUNTUNEN, K., ROMAkkANIEMI, A., JOKIKOKKO, E., IKONEN, E., HUHMARNIEMI, A.

Itämeren lohikantojen elvytysohjelma SAP vuosina 1997 – 2002. (Vitaliseringsprogrammet för laxstammarna i Östersjön SAP åren 1997-2002) (The Baltic Salmon Action Plan in Finland, 1997-2002). 31 s. Helsinki 2003.

185. KREIVI, P., SIIRA, A., IKONEN, E., SUURONEN, P., HELLE, E., RIIKONEN, R., LEHTONEN, E.

Hylkeen aiheuttamat saalistappiot ja pyydysvahingot lohirsäkalastuksessa vuonna 2001. (Fångstförluster och redskapsskador förorsakade av säl i fisket med laxryssjor år 2001) (Seal-induced damage to salmon trap net fishery in the year 2001). 20 s. Helsinki 2002.

184. SIIRA, A., IKONEN, E., SUURONEN, P., RIIKONEN, R., LEHTONEN, E.

Lohen eloonjäänti rysästä vapauttamisen jälkeen. (Laxarnas överlevnad sedan de släppts ur ryssjan) (Survival of trap net-caught and live-released salmon in the Gulf of Bothnia in Baltic Sea). 24 s. Helsinki 2002.

183.

Vesialueiden omistus ja alueellinen hallinnointi. Muje, K., Tonder, M. (toim.). (Vattenägande och regional förvaltning) (Ownership of water and regional management). 119 s. Helsinki 2002.

182.

Meritaimenen tila ja kalastus Pohjanlahden alueella. Kallio-Nyberg, I., Jutila, E. & Saura, A. (toim.). (Havsöringens tillstånd och havsöringsfisket i Bottniska viken) (The status and fishing of sea trout in the Gulf of Bothnia area). 69 s. Helsinki 2002.

181. ESKELINEN, P., PIIRONEN, J., PRIMMER, C.

Selviävätkö kaikki lohiperheet yhtä hyvin alkukasvatuksen aikana? (Klarar sig alla laxfamiljer lika bra i början av uppfödningen?) (Do all salmon families manage equally during the early culture stages?). 32 s. Helsinki 2002.

180. HUHMARNIEMI, A., ARONSUU, K.

Kalajoen vaellussiika – lisääntymisongelmia ja istukkaiden liikapyyntiä. (Vandringssiken i Kalajoki – reproduktionsproblem och en alltför intensivt fångst av utplanterad fisk) (Whitefish of the River Kalajoki – Problems with natural production and with overfishing of stocked fish). 32 s. Helsinki 2001.

179. NIVA T.

Perämeren ja sen jokien lohi-istutusten tuloksellisuus vuosina 1959-1999. (Utbytet av laxutsättningarna i Bottenviken och dess ålvar åren 1959-1999) (Results of salmon smolt releases in the Bothnian Bay from 1959-1999). 67 s. Helsinki 2001.

178. PENNANEN, J. T.

Toutaimen istutukset ja niiden tulokset. (Utsättningar av asp och deras resultat) (Releases of asp and their results). 55 s. Helsinki 2001.

177. Paikallinen tieto, asiantuntijuus ja vuorovaikutus kalavesien hallinnassa. Salmi, P. (toim.)

(Lokal kunskap, sakkunskap och samverkan vid administration av fiskevatten) (Local knowledge, expert knowledge and communication in fisheries governance). 115 s. Helsinki 2001.

176. NIEMELÄ, E., ERKINARO, J., KYLMÄÄHO, M., JULKUNEN, M., MOEN, K.

Näätämöjoen lohen poikastiheys ja kasvu. (Yngeltäthet och tillväxt hos laxen i Näätämöjoki) (The density and growth of juvenile salmon in the River Näätämöjoki). 27 s. Helsinki 2001.

175. SAURA, A.

Taimenkantojen tila Suomenlahden pohjoisrannikon joissa. (Öringsbeståndens tillstånd i åar och älvar längs Finska vikens norra kust) (Sea trout stocks in the rivers flowing from the northern coast into the Gulf of Finland). 48 s. Helsinki 2001.

174. KOIVURINTA, M., VÄHÄNÄKKI, P., SAURA, A.

Meritaimen ja sen kalastus itäisellä Suomenlahdella 1990-luvulla. (Havsöring och havsöringsfiske i östra Finska viken på 1990-talet) (Stocking results of sea trout in the eastern Gulf of Finland). 24 s. Helsinki 2001.

173. KALLIO-NYBERG, I., KOLJONEN, M.-L., JUTILA, E.

Taimenatlas. (Öringsatlas) (Atlas of brown trout stocks). 57 s. Helsinki 2001.

172. LÖNNSTRÖM, L.-G., RAHKONEN, R., GRÖNDAHL, A., PASTERNAK, M., LUNDÉN, T., KOSKELA, J., BYLUND, G.

Siian rokotus paisetautia ja vibrioosia vastaan. (Vaccinering av sik mot furunkulos och vibrios) (Vaccination against vibriosis and furunculosis in whitefish, *Coregonus lavaretus* (L.)). 15 s. Helsinki 2001

171. KOSKELA, J., RAHKONEN, R., FORSMAN, L., NORRDAHL, O., LÖNNSTRÖM, L.-G.

Siika ruokakalanviljelyssä – kahden siikakannan ja kantaristeytymän vertailu. (Sik i matfiskodling – en jämförelse mellan två sikstammar och deras hybrider) (Whitefish in aquaculture: comparison of two stocks and their hybrids). 24 s. Helsinki 2001.

170. PARMANNE, R.

Silakan poikasten runsaus Suomen rannikolla vuosina 1974-1996. (Tätheten av strömmingsyngel vid Finlands kuster åren 1974-1996) (Abundance of Baltic herring larvae off the coast of Finland in 1974 – 1996). 44 s. Helsinki 2001.

169. MIKKOLA, J., LAAMANEN, M., JUTILA, E.

Kymijoen vaelluskalat ja kalastus 1990-luvulla. (Kymmene älvs vandringsfiskar och fisket under 1990-talet) (Migratory fish of the Kymijoki river and their fishing in the 1990s). 44 s. Helsinki 2000.

168. LAPPAINEN, A.

Sisävesikalastus muuttuvassa yhteiskunnassa. (Insjöfisket i ett föränderligt samhälle) (Inland Fishing in a Changing Society). 38 s. Helsinki 2000.

167. KOLARI, I., AUVINEN, H., HIRVONEN, E.

Kalastus Puruvedellä vuosina 1979-1995. (Fisket i Puruvesi åren 1979-1995) (Fishing in Lake Puruvesi in 1979-1995). 25 s. Helsinki 2000.

166. MÄKI-PETÄYS, A., HUUSKO, A., KREIVI, P.

Järvilohen poikasten elinympäristövaatimukset kesällä ja syksyllä. (Insjölaxylgens krav på sin livsmiljö under sommar och höst) (Summer and autumn habitat requirements and the habitat use of young landlocked salmon (*Salmo salar m. lacustris*)). 15 s. Helsinki 2000.

165. KEINÄNEN, M., TOLONEN, T., IKONEN, E., PARMANNE, R., TIGERSTEDT, C., RYTI LAHTI, J., SOIVIO, A., VUORINEN P.J.

Itämeren lohen lisääntymishäiriö – M74. (Östersjölaxens reproduktionsstörning – M74) (Reproduction disorder of Baltic salmon – M74). 38 s. Helsinki 2000.

164. KOIVURINTA, M., SYDÄNOJA, A., MARJOMÄKI, T., HELMINEN, H., VALKEAJÄRVI, P.

Taimenen ja järvilohen ravinto ja kasvu Puulassa, Päijänteessä, Konnevedessä ja Säkylän Pyhäjärvestä vuosina 1995-1996. (Öringens och insjölaxens föda och tillväxt i Puula, Päijänne, Konnevesi och Säkylä Pyhäjärvi åren 1995-1996) (Diet and growth of brown trout and landlocked salmon in lakes Puula, Päijänne, Konnevesi (central Finland) and Pyhäjärvi (SW Finland) from 1995-1996). 32 s. Helsinki 2000.

163. KOLARI, I., HIRVONEN, E., FRIMAN, T.

Nieriäistutusten tuloksellisuus Puruvedessä. (Utbytet av rödingsutsättningarna i Puruvesi) (The stocking results of Arctic charr in Lake Puruvesi). 42 s. Helsinki 1999.

162. Ahvenen ravinto Puruvedessä. Vuorimies, O. (toim.). (Abborrens föda i Puruvesi) (The food of perch in Lake Puruvesi). 44s. Helsinki 1999.

161. VALKEAJÄRVI, P.

Päijänteen säännöstelyn vaikutus siikakantaan. (Inverkan av Päijännes reglering på sikbeståndet) (Effect of water level regulation on the whitefish stock in Lake Päijänne). 34 s. Helsinki 1999.

160. SIIRA, A., HUUSKO, A., KORHONEN, P.

Taimenistutusten vaikutus vaikutus Kitkajärvien muikkukantaan ja kalansaaliiseen. (Inverkan av örningsutsättningarna på beståndet av siklöja och på fiskfångsterna i Kitkajärvi-sjöarna) (Affects of stocking of Brown Trout on Vendace population and total catch of fish in Lake Kitkajärvi). 27 s. Helsinki 1999.

159. PARMANNE, R.

Silakan kudun ajoittuminen ja kutuparvien koostumus rysäkalastuksen perusteella. (Strömmingens lektider och de lekande stämmens sammansättning enligt ryssjefångster) (The spawning time and composition of spawning shoals according to trapnet fishing of Baltic herring). 41 s. Helsinki 1999.

158. MUTENIA, A., SALONEN, E., KOTAJÄRVI, M.

Lokan ja Porttipahdan vaellussiika – tekojärvien paikallinen arvokala. (Älvsiken i Lokka och Porttipahta - vattenmagasinens lokala värdefisk) (Whitefish: a Local Fish of Value in the Lokka and Porttipahta Reservoirs) 29. s. Helsinki 1999.

157. SAURA, A.

Taimenen säilyttäminen Gumbölenjoessa. (Åtgärder för att bevara öringen i Gumböleån) (Maintenance of the trout in the Gumbölenjoki River in Espoo). 19. s. Helsinki 1999.

156. NYKÄNEN, M., HUUSKO, A.

Harjuksen elinympäristövaatimukset virtavesissä - kirjallisuusselvitys. (Harrens miljökrav i rinnande vatten - litteraturundersökning) (Habitat requirements and habitat use of riverine European grayling (*Thymallus thymallus* (L.)) — a review). 23 s. Helsinki 1999.

155. Saimaan järvilohen elinolosuhteiden parantaminen. Makkonen, J. (toim.). (Hur kan förhållandena för insjöloxen i Saimen förbättras?) (Improving the living conditions for Saimaa landlocked salmon). 97 s. Helsinki 1999.

154. JUTILA, E., JOKIKOKKO, E., SALO, P.

Viehekalastuksen kehitys Simojoella - kalastus Simossa ja Ranualla 1994 -1997

(Utvecklingen av spöfisket i Simojoki - fisket i Simo och Ranua åren 1994 - 97) (Development of rod fishing in the Simojoki River: fishing in the municipalities of Simo and Ranua, 1994-1997). Helsinki 1999.

153. HEIKINHEIMO, O.

Siian kalastuksen säätely sisävesissä.

(Reglering av sikfisket i insjöområdet) (Management of the whitefish (*Coregonus lavaretus* (L.)) fishery in inland waters). 26 s. Helsinki 1999.