

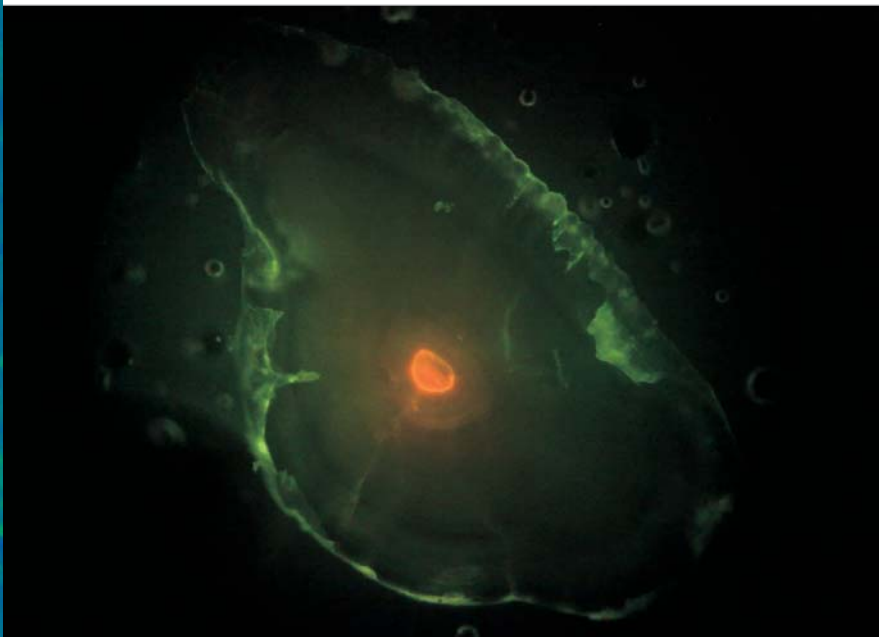
Rapport 1 · 2011

Gruppemerking av laksefisk på øyerognstadiet - Veterinærinstituttets praksis og rutiner

Vidar Moen

Espen Holthe

Torun Hokseggen





Veterinærinstituttets rapportserie · 1 - 2011

Tittel

Gruppemerking av laksefisk på øyerognstadiet.
- Veterinærinstituttet praksis og rutiner.

Publisert av

Veterinærinstituttet · Pb. 750 Sentrum. · 0106 Oslo

Form omslag: Graf AS

Forsidefoto:

Bestilling

kommunikasjon@vetinst.no

Faks: + 47 23 21 64 85

Tel: + 47 23 21 64 83

ISSN 1890-3290 elektronisk utgave

Forslag til sitering:

Moen V, Holthe E, Hokseggen T. Gruppemerking av laksefisk på øyerognstadiet. - Veterinærinstituttets praksis og rutiner. Veterinærinstituttets rapportserie 1-2011. Oslo: Veterinærinstituttet; 2011.

Keywords:

- Norway
- Group-marking
- Alizarin Complexone
- Alizarin reds
- Eyedegg
- Salmon
- Bathmarking
- Immersion marking

© Veterinærinstituttet

Kopiering tillatt når kilde gjengis



Veterinærinstituttets rapportserie
Norwegian Veterinary Institute's Report Series
Rapport 1 · 2011

Gruppemerking av laksefisk på
øyerognstadiet.
- Veterinærinstituttet praksis og
rutiner

Forfattere

Vidar Moen

Espen Holthe

Torun Hokseggen

Oppdragsgiver

Direktoratet for Naturforvaltning

26. april 2011

ISSN 1890-3290 elektronisk utgave



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute

Innhold

Sammendrag	5
Abstract	5
1. Innledning	6
2. Aktuelle merkemethoder	6
3. Bademerking med bruk av Alizarin-preparater	9
3.1. Storskala bademerking av rogn, larver og yngel til kultiveringsformål	9
3.2. Effekter av konsentrasjon, eksponeringstid og pH ved merking av øyerogn i vannbad.	9
3.3. Varighet av merke i otolitt	10
3.4. Bleking av merke og årsaker til redusert merke kvalitet	10
4. Veterinærinstituttets praksis ved bademerking av øyerogn og identifikasjon av merke i otolitt	10
4.1. Teknisk utstyr for avlesing av merke	13
4.2. Opparbeidelse, montering og lagring av otolitter	13
4.3. Kontroll av merke kvalitet	14
4.4. Identifikasjon av merke i otolitt	14
4.5. Prosedyrer ved avlesing av otolitt	16
4.6. Evaluering av prøvesvar etter analyse av otolitt	16
5. Diskusjon	17
6. Referanser	19

Sammendrag

I den senere tiden har gruppemerking av fisk på rognstadiet for styrking og reetablering av lokale laksebestander blitt mer vanlig. Flere har vist at gruppemerking av fisk på rogn og larvestadiet med bruk av Alizarin-preparater (Alizarin Complexone eller Alizarin red S) som aktivt merkestoff gir god merking på en enkel, rask og sikker måte. I denne rapporten ønsker vi å dokumenterer Veterinærinstituttets praksis, rutiner og erfaringer ved gruppemerking av laksefisk på rognstadiet, og senere identifikasjon av merke i ørestein (otolitt) hos ung- og voksen fisk.

Abstract

Resently group-marking of fish at the egg stage for re-stocking and restoration of local populations of salmonids, has become more common. Several studies have shown that the labeling of fish eggs and larval stages with the use of Alizarin preparations (Alizarin complexone or Alizarin red S) as the active material provides a good, simple, fast and secure way of group marking. In this report we document the National Veterinary Institute's practices, procedures and experiences in group-marking of salmon at the egg stage, and later identification of marks in the otoliths of young and adult fish.

1. Innledning

Direktoratet for naturforvaltning startet i 1986 arbeidet med etablering av en nasjonal genbank for vill laks bestående av sædbank og levende genbank. Bakgrunnen var trusler mot ville bestandene i form av sur nedbør, spredning av parasitten *Gyrodactylus salaris*, vassdragsregulering og rømt oppdrettslaks. Levende genbankstasjoner skulle etableres i regioner med truede laksestammer. Den første ble etablert i 1989. Deres oppgaver var ved siden av sykdomskontroll, å sikre aggregering av genetisk variasjon og produksjon av øyerogn for tilbakeføring og gjenoppbygging, styrking og reetablering av truede og sårbare lokale laksestammer.

Et nasjonalt kultiveringsutvalg har gitt anbefalinger om bruk av yngel fremfor smolt, og rogn fremfor yngel ved kultivering. Utsett av øyerogn av stedegen stamme sikrer god lokal tilpasning ved naturlig seleksjon i lokalt vassdrag allerede fra rognstadiet. Bruk av rogn fremfor eldre stadier gir også god utnyttelse av genbankens potensiale til produksjon av et høyt antall øyerogn for tilbakeføring til lokalt vassdrag (Moen et al., 2007, 2008, 2009, 2010). Behov for evaluering og dokumentasjon av denne type tiltak var bakgrunnen for etablering av metodikk for gruppemerking av fisk på rognstadiet (Moen, 2004, 2005).

Merking av fisk på rognstadiet har vist seg å være en kostnadseffektiv, rask og enkel metode for gruppemerking av store mengder rogn. Temperaturmerking og merking med bruk av fluoriserende merkestoff har vist seg egnet ved at merke inkorporeres i kalsiumrike strukturer, og da spesielt i otolitter. Otolitter består av aragonitt og kalsitt samt proteiner. Disse danner stabile strukturer som dannes tidlig på øyerognstadiet. Otolittene vokser gjennom hele fiskens liv. Denne egenskapen gjør dem spesielt egnet som målorgan ved merking på rogn- og larvestadiet, vekststudier samt sporing ved kvantifisering av geokjemiske sporelementer for sammenligning med forekomst i lokalt habitat (Flem et al., 2005).

Merking av rogn skjer normalt først etter at det har nådd øyerognstadiet. Rognkornet er da robust og tåler godt håndtering. Metoden har klare fortrinn sammenlignet med andre merke- og identifikasjonsmetoder: den er rask og kostnadseffektiv, gir jevn og varig merking, muliggjør kodemerking og kostnader ved bruk påløper først ved identifikasjon fremfor ved merking.

Veterinærinstituttets praksis og erfaringer med bademerking av øyerogn og identifikasjon av merke i otolitt er forsøkt sammenholdt med internasjonale studier av merking på rogn-, larve- og yngelstadiet.

2. Aktuelle merkemetoder

Merking for identifikasjon av enkeltindivider og grupper av fisk nyttes for å dokumentere tilslag, estimere bestandsstørrelse, tetthet, atferd og tilvekst. Avhengig av utsettingsstadium, behov for identifikasjon av enkeltindivider, eller grupper av fisk, nyttes det i dag ulike metoder for merking. Ved ytre fysisk merking for gruppemerking og individmerking nyttes gjerne Finneklipping, Carlin-merke, Floy-merke, Dart-merke, Petersen-merke, Stream-merke og Spagetti-merke. Indre fysisk merking omfatter Snute-merke, også kalt Coded Wire-merker, VI-merker og PIT-merker. Fysisk merking (internt eller eksternt) nyttes i hovedsak ved merking av individer større enn 3-5 cm. Oversikter over ulike merkemetoder er gitt i Nielsen (1992), Barlaup & Åtland (1990), Rutherford et al., (2002.).

Ikke-fysisk intern merking baserer seg på inkorporering av identifiserbare endringer i vekstmønster, farge eller kjemisk sammensetning i fiskens øresteiner (otolitter), skjell eller beinstrukturer (Muncy et al. 1990). Slik metodikk er blitt mer vanlig ved gruppemerking av rogn og larvestadier. Økt kunnskap om effekter av slik merking, bedre analysemetoder samt økt behov for gruppemerking av fisk på rogn-, larve- og yngelstadiet til kultiveringsformål er noe av årsaken.

Ved merking av fisk på rogn-, larve- eller yngelstadiet er det i hovedsak otolitter som er målorgan. Otolittene består hovedsakelig av kalsiumkarbonat, da som aragonitt mineraler og morfer av disse (95%) samt en rekke sporstoffer (Calaprice et al., 1975; Campana & Gagne, 1995; Edmonds et al., 1995). Organiske fraksjoner i otolitten fungerer som mal for avsetning av kalsiumkarbonat (Degens et al., 1969).

Aktuelle metoder for merking av otolitter omfatter i utgangspunktet all bruk av organiske stoffer som radioaktive isotoper, sjeldne jordelementer, metaller samt organiske fluoriserende komponenter. Det kan

også nyttes stressmerking ved manipulering av temperatur (Volk, 1999) eller tørrmerking ved hold av rogn i luft (Rogatnykh et al., 2001). En oversikt er gitt av Muncy et al. (1990), Brothers (1990) og Rutherford et al. (2002).

Produksjon av fluoriserende merke i otolitt kan skje allerede fra tidlig øyerognstadium, straks otolittene er dannet (Tsukamoto 1995, Eckmann et al 1998), eller senere på larve- og yngelstadiet (Wilson & Beckman 1987, Secor & Houde 1995, Thomas et al. 1995; Nagiec *et al.*, 1995). Dette kan skje ved bruk av dels ulike teknikker som har det felles at merking kan foregå i vannbad. Flere ulike preparater kan nyttes som aktive merkestoff. Av gruppen fluoriserende merkestoff nyttes i dag flere ulike preparater: Calcein (CA) og Calcein blue (CAB) (Wilson et al. 1987; Brooks *et al.*, 1994; Frenkel et al., 2002); Alizarin complexone (ALC) (Tsukamoto, 1995; Reichert et al., 2000; Rogers et al., 2001); Alizarin red S (ARS) og Alizarin red (AR) (Blom et al., 1994; Beckman & Schulz, 1996); Tetracycline (TC), Oxytetracycline (OTC) og Erythromycin (EM) (Weber et al. 1967; Hettler 1984; Tsukamoto 1995). Thomas et al. (1995) merket larver og yngel av Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) og analyserte merke kvaliteten i otolitt etter å ha merket ved bademerking, injeksjon i bukhulen og via fôr, og ved bruk av ulike konsentrasjoner av stoffene OTC, CA og ALC. De fant best merking med bruk av de tre ulike preparatene ved hhv fôring, injeksjon og bademerking.

Tetracycliner ble først nyttet i dels betydelig omfang som bredspektret antibiotika mot bakterie- og soppinfeksjoner hos mennesker og dyr. På fisk nyttes tetracycliner i dag kommersielt som et bredspektret antibiotikum ved behandling av generelle bakterieinfeksjoner. Grunnet fare for etablering av resistens er myndighetene generelt tilbakeholdende med bruk av tetracyclin-preparater til andre formål enn behandling av lidelser hos dyr og mennesker som må bekjempes med bruk av bredspektret antibiotika. En sideeffekt ved bruk av tetracyclin-preparater er at det inkorporeres et gult fluoriserende merke i kalsiumrike strukturer hos fisk. Denne egenskapen er utnyttet ved merking av fisk (Rijker et al., 1980; Koenings & Lipton, 1986). De første forsøk med slik merking ble gjennomført ved å gi tetracyclin-preparater via fôr (Weber and Ridgway 1967; Trojan 1973; Odense and Logan 1974; Nagiec et al. (1985, 1988). Hettler (1984) gjorde forsøk med bademerking av *Leiostomus xanthurus* og *Lagodon rhomboides* på larvestadiet. Merke kvaliteten var god ved 1-2 timers eksponering i tetracyclin hydrochloride (TC) ved konsentrasjoner på 100-500 mg/l. Tsukamoto (1985) registrerte 100% merkesuksess og over 90% overlevelse ved bademerking av rogn av *Plecoglossus altivelis* med 200-300 mg/l i 24-48 timer og larver med 200-300 mg/l i 3-24 timer. Likeledes registrerte Dabrowski & Tsukamoto (1986) godt merke ved bademerking av *Coregonus peled* på øyerognstadiet. Det ble nyttet en konsentrasjon på 600 mg/l i 12 timer. Likeledes fant Uchida et al. (1989) godt merke ved bademerking av larver av *Plecoglossus altivelis* med TC for studie av næringskonkurranse mellom vill og kultivert fisk. De nyttet 500 mg/l i 6 timer. Ruhle & Grieder (1989) merket ørret (*S. trutta*) og regnbueørret (*O. mykiss*) ved tilsetning av TC i svellevatnet rett etter befruktning samt ved merking av øyerogn-stadiet. Overlevelsen ved tilsetning i svellevatnet var imidlertid variabel og rundt 50%. Ved tilsetning på øyerogn-stadiet var overlevelsen for regnbueørret på rundt 85% mens den for ørret var på rundt 95%. Hendricks et al. (1991) kodemerket Shad (*Alosa sapidissima*) fire ganger med 4 dagers mellomrom med TC med konsentrasjoner på 200 mg/l i 6 timer. Undersøkelser av merke 6 mnd senere viste 4 distinkte ringer i otolitt.

Ved bruk av oxytetracycline hydrochloride (OTC) merket Secor et al. (1991) sammen nær 7 mill øyerogn, plommeseckklarver, og yngel av Bass (*Morone saxatilis*) ved eksponering i merkebad i 2-3 timer og ved en konsentrasjon på 0,25-0,35 mg/l OTC. Temperaturen var mellom 20-25°C. Ulik ontogenetisk utvikling ved merking ble nyttet for å skille gruppene. De registrerte 100 % merkesuksess ved merking av larver og 70 % merkesuksess ved merking av yngel. De kunne ikke påvise noen forskjell i overlevelse for merket og umerket fisk. Forskjell i merkesuksess for larver og yngel ble begrunnet med forskjeller i metabolsk aktivitet, med høyere aktivitet hos larver. Gjentatt merking av yngel med lengre eksponeringstid (300 mg/l i 6 timer) gav 100 % merkesuksess.

Reimer & Young (1990) fant en nedre grense for deteksjon av OTC og TC på henholdsvis 0.08 og 0.09 ppm. Merking av kanadarøye (*S. namaycush*) med bruk av ulike konsentrasjoner av OTC og TC i vannbad gav en LC₅₀ konsentrasjon på 840 og 250 mg/l ved henholdsvis 1 og 6 timers eksponeringstid (Marking et al., 1988). Ved eksponering i henholdsvis 24 og 96 timer falt LC₅₀ konsentrasjonen til under 200 mg/l. Den økte dødeligheten syntes å skyldes en betydelig redusert pH ved økt konsentrasjon av merkestoff. Ved 200 mg/l og 800 mg/l falt pH til henholdsvis 4 og 3.

Utskillelse av TC etter medisinføring av voksen fisk viste at TC var ute av muskelatur i løpet av 90 dager ved temperaturer rundt 7.5 °C (Salte, 1982; Bjørklund & Bylund, 1990). Det er ikke påvist andre sideeffekter ved bruk av TC-preparater (Bjørklund & Bylund 1990; Marking et al. 1988; Secor et al. 1991; Beckman et al. 1990; Hendricks et al. 1993).

Calceiner (Fluorexon, C₃₀H₂₆N₂O₃Na₂, CAS 1461-15-0, MW 666.51) er et fluorescerende stoff med høy affinitet til kalsium i bein. Calcein (CA) brukes diagnostisk/eksperimentelt til studier av beinvev i vekst. Zahlsen & Krøkje (1998) undersøkte RTECS-basen og fant at den ikke inneholdt data om relevant litteratur på humantoksiske egenskaper for Calcein. Årsaken var trolig at preparatet ikke har hatt noen anvendelse som naturprodukt. De fant at det ikke forelå tilstrekkelige data for å vurdere toksistet for Calcein. Forsøk med bademerking av fisk med bruk av Calcein har vist oppløftende resultat (Wilson et al., 1987).

Alizarin complexone (ALC) (Anthraquinone, 1,2-dihydroxy-, C₁₄H₈O₄, CAS 72-48-0, MW 240.22) finnes naturlig i "madder root" (eng) (Rubiaceae, *Rubia tinctorum* L), og hører til gruppen anioniske fargestoff og regnes som moderat vannløselig. *R. tinctorum* har vært nyttet ved farging av tekstiler i flere tusen år (Egypt, Persia og India). *R. tinctorum* er fortsatt i utstrakt bruk som naturmedisin mot nyrestein. Fra slutten på 1800-tallet ble ALC framstilt syntetisk og nyttes i dag som fargestoff samt som utgangsmateriale for andre fargestoffer i tekstilindustrien. I analyseindustrien utnyttes den for sin egenskap med fargeomslag ved endring i pH. I human medisin nyttes preparatet diagnostisk/eksperimentelt som markør ved studier av beinvev i vekst.

En gjennomgang av toksisitetsdata for ALC i relasjon til human eksponering viser at det er godt dokumentert (Zahlsen & Krøkje, 1998). Estimert maksimal dose ved inntak av voksen fisk merket på rogn- eller yngelstadiet med Alizarin viste at mengdene var for små til å være toksikologisk relevant (Zahlsen & Krøkje, 1998). I RTECS-databasen er toksisitetssgrensen satt til LD₅₀ ved 316 mg/kg, fugl, øyeirritasjonstest - Draize test gav 500 mg/24h, mutasjoner: Ames test, 100 ug/plate, DNA repair test 2 mg/plate, "unscheduled DNA synthesis" 10 mg/l. I USEPA (US Environmental Protection Agency) sitt genetox program har alizarin status som "inconclusive". Datablad fra produsent/importør for alizarin angir at forbindelsene ikke er kreftfremkallende (NTP, IARC, OSHA, Z-LIST). Dokumentene inneholder også informasjon om fysikalsk-kjemiske data, sikkerhet ved håndtering, søl, brann mv.

Bademerking med ALC og CA gav bedre merkekvallitet ved langt lavere konsentrasjon og eksponeringstider sammenlignet med bruk av tetracycliner (Bumguardner et al., 1993; Monteleone et al., 1993; Thomas et al., 1993). ARS [C₁₄H₇NaO₇S] har vist seg å ha mye den samme kjemiske grunnstruktur og effekten som ALC. Imidlertid er ARS langt mer prisgunstig enn ALC og stoffet har de senere år tatt over og erstattet my av bruken av ALC.

Stabile isotoper av Lantanider (Ennevor & Beames, 1993), Strontium Chloride (Behrens-Yamada & Mulligan 1982, 1987; Schroder et al., 1995 og Smith & Whitley, 2010) er nyttet ved gruppemerking av fisk i vannbad.

Temperaturmerking skiller seg fra de øvrige bademerkingemetodene ved at det kun er vanntemperaturen som manipuleres og som forårsaker synlig merking i otolittene (Campana and Neilson, 1985; Mosegaard et al., 1987; Brothers, 1990; Volk, 1999; Munk et al., 1993; Hagen et al., 2000). Ved gjentatt eksponering i vanntemperaturer noen få grader over eller under oppholdstemperaturen skapes det et distinkt og visuelt detekterbart omslag i ringmønsteret i otolittene. Metoden nyttes i dag for storskala merking av stillehavslaks (Urawa et al., 2001). Ved å endre tiden mellom hver eksponering og tiden ragna eksponeres, produseres unik koding (Brothers, 1990; Volk et al., 1994; Munk and Geiger, 1998; Munk, 1999). Det stilles imidlertid strenge krav til temperaturkontroll for å oppnå god merkekvallitet. Anleggene må ha mulighet for oppvarming av vann. Opparbeidelse av otolittene for identifikasjon av temperaturmerker har vist seg å være mer tidkrevende enn opparbeidelse av preparat for identifikasjon av fargemerke (Tsukamoto, 1985, 1988; Tsukamoto et al., 1989B).

3. Bademerking med bruk av Alizarin-preparater

3.1. Storskala bademerking av rogn, larver og yngel til kultiveringsformål

De siste 15-20 år har bruken av otolittmerking i sammenheng med kultiveringstiltak vist en stadig økning.

I perioden 1993-2004 ble det totalt satt ut nær 5 milliarder stillehavslaks fra Russiske, Canadiske, Amerikanske og Japanske settefiskanlegg (Johnson et al. 2006). Andelen fisk med merke i otolitt økte jevnt i denne perioden. I 2004 ble 32%, eller nærmere 1,6 milliarder individer merket i otolitt. Fra 1994-1999 ble 11,5 millioner ketalaks (*Oncorhynchus keta*) individer gruppemerket på rognstadiet med ALC ved ett anlegg i Hokkaido, Japan (Kawamura et al. 2001). Fra 2005 til 2008 ble nær 30 mill individer gruppemerket med ALC. For 2011 er det planlagt utsatt rundt 149 mill ketalaks i Japan. Størstedelen kodemerkes ved temperaturmerking, mens 5,4 millioner planlegges bademerket med ALC og gitt to koder for utsett i to elver. Av et samlet utsett på 26,7 mill yngel av pukkellaks (*Oncorhynchus gorbuscha*) vil rundt 11% bli merket med ALC og gitt tre ulike koder for utsett i tre ulike elver (Takahashi & Sakagami 2010).

Tsukamoto (1995) nyttet ALC for å estimere naturlig produksjon hos ulike stammer av Masu laks (*Oncorhynchus masou*). Fisk ble satt ut på forskjellig tid av året, og ved forskjellig utviklingsstadium. Totalt ble det satt ut 88.000 yngel og parr fra 10 ulike partier hvorav fem hadde merke i otolitt. For å skille gruppene ble det laget kodinger ved å kombinere svak og sterk merking. Koding kan også skje ved gjentatt eksponering i merkebad med dagers mellomrom. Merkenes plassering i otolittene avhenger av rognas ontogenetiske utvikling på merketidspunktet og tidsrommet mellom hver eksponering.

Gruppemerking med ALC og ARS er også nyttet ved evaluering av kultiveringstiltak for styrking og gjenoppbygging av andre arter så som ørret, *Salmo trutta* (Champigneulle & Cachera 2003, Caudron & Champigneulle 2009, Syrjanen et al., 2008); kveite, *Psetta maxima* (Paulsen & Støttrup 2004); *Argyrosomus japonicus* (Taylor et al., 2005); japansk flyndre, *Paralichthys olivaceus* (T.) (Liu et al., 2009); havabbor, *Morone saxatilis* (Secor & Houde 1998). Ved ett forsøk merket de 6,5 millioner havabbor på egg- og larvestadiet (Secor et al. 1995). Morales-Nin et al. (2010) utarbeidet anbefalt prosedyre ved bademerking av yngel av *Argyrosomus regius* ved bruk av ARS. Bruk av 60 mg/l ARS i 22 timer, pH < 9 og tetthet 1 ind/7,3 liter gav mer enn 90 % merking. Dødeligheten var under 8 %. Ved gjentatt merking med ARS for sammenligning av effekter av kultivering ved utsett av tre ulike stadier av ørret (*Salmo trutta* L.) merket Caudron. & Champigneulle (2009) larver ved 10 døgngrader (D°) etter klekking, ved 10 og 220 D° samt ved 10 og 220 D° og rett etter startforing (3-4 cm lengde). Metoden er i tillegg nyttet i forbindelse med studier av tilvekst, tilslag og alder (Nakaya et al., 2008; Li et al., 2008; Masu et al., 2008). Nagata et al., (1995) nyttet ALC merking for sammenligning av veksten hos vill og domestisert yngel av masu laks i Hokkaido elven ved å grave ned merket øyerogn.

3.2. Effekter av konsentrasjon, eksponeringstid og pH ved merking av øyerogn i vannbad.

Konsentrasjon av merkestoff og vannkjemiske parameter er vist å påvirke merke kvalitet (Tsukamoto et al. 1989, Secor & Houde 1995, Tsukamoto 1995, Eckmann 2003, Niva et al. 2005, Caudron & Champigneulle 2006, Baer & Rösch. 2008). En rekke undersøkelser har rapportert om 100% merking ved bruk av ALC ved konsentrasjoner mellom 25 og 200 mg/l og eksponering mellom 6 og 24 timer (Takahashi, 1994; Reichert et al., 2000; Lagardere et al., 2000; Secor et al. 1995; Beckman and Schulz 1996; Tsukamoto 1988; Nagata and Irvine 1997; Kawamura et al. 2001). Ved konsentrasjoner på 50 og 100 mg/l ALC og 3-4 timer eksponeringstid ble det registrert god merke kvalitet ved bademerking av røye (*Salvelinus alpinus*), canadarøye (*Salvelinus namaycus*), brunørret (*Salmo trutta*), laks (*Salmo salar*), sik (*Cregonus* sp) og gjørs (*Sander lucioperca*) på øyerognstadiet (Niva et al. 2005). Likeledes fant Caudron & Champigneulle (2006, 2009) god merking av øyerogn av ørret (*Salmo trutta* L.) i 100 mg/l ALC og 3 timers eksponeringstid. Niva et al. (2005) registrerte redusert merke kvaliteten ved økende eksponeringstid, og rapporterte at det var 11-12 ganger vanskeligere å lese merking i otolitt fra fisk merket i 6 timer sammenlignet med fisk merket i 3-4 timer.

Bruken av ALC og ARS ved bademerking har vist at merke kvaliteten i otolitt fra fisk tilhørende samme merkegruppe varierte lite, både for ungfisk (Uchida et al. 1989; Secor and Houde 1995; Moen 2000; Niva et al 2005; Baer and Rösch 2008) og voksen fisk (Taylor et al., 2005; Candron et al., 2006; Gerdeaux et al., 2006; Moen et al., 2009).

Surhetsgraden i merkebadet er vist å påvirke merke kvaliteten. Ved merking med ALC avtok merke kvaliteten ved en økning av pH fra 6,5 til 8,5 ved bademerking av yngel av sørlig svart brasme (*Acanthopagrus butcheri*) (Partridge et al., 2009). De anbefalte bruk av pH på mellom 7 og 7,5. Morales-Nin et al. (2010) anbefalte pH <9 ved bademerking av yngel av ørnefisk (*Argyrosomus regius*) med bruk av ARS. Ved relativt stort rognvolum i forhold til væskevolum kan pH synke under merking. Eckmann (2003) anbefalte bruk av forholdet 5:1.

3.3. Varighet av merke i otolitt

Undersøkelser har vist at fisk merket med TC hadde godt synlig merking etter 7 år (Hendricks et al., 1991). Kawamura et al., (2001) merket 11, 5 millioner rognkorn av Ketalaks (*Oncorhynchus keta*) med bruk av ALC. De fant godt merke i otolitt i mer enn 5 år etter merking. Potter et al., (2008) fant synlige merker i otolitt av Sørlig Svart Brasme (*Acanthopagrus butcheri*) fanget 3,5 år etter merking. Ved bademerking av yngel av samme art, og med bruk av ALC, fant Partridge et al. (2009) godt synlig merke etter 7 år. Tsukamoto et al. (1989) og Eckmann et al. (1998) registrerte godt synlig merke i otolitt da dette ble undersøkt etter 3 år. Egne undersøkelser har vist godt merke i otolitt hos voksen laks 5 år etter merking med ARS på rognstadiet (Moen et al., 2009).

3.4. Bleking av merke og årsaker til redusert merke kvalitet

Tidligstadier og lite pigmenterte arter vil ofte være mer utsatt for skader grunnet eksponering for UV-lys enn mer pigmenterte individer. Utslukkingen av UV-lys er normalt svært rask i vann og i fiskehud. Lorson & Mudrak (1987) registrerte imidlertid en tendens til redusert merke kvalitet hos TC merket yngel av Amerikansk shad (*Alosa sapidissima*) plassert utendørs i grunne kar og eksponert for kraftig sollys. Individer plassert i hus hadde bedre merke kvalitet. Forskjellene begrunnet de med bleking grunnet eksponering for UV-lys. Fluorescerende merke i otolitter som er montert på objektglass, antas å være mer utsatt for bleking ved lengre tids eksponering for dagslys, eller UV-lys i fluorescent-mikroskop.

4. Veterinærinstituttets praksis ved bademerking av øyerogn og identifikasjon av merke i otolitt

Veterinærinstituttet har siden 1993 nyttet ALC og senere ARS ved bademerking for gruppemerking av øyerogn av laksefisk. Først i forsøkssammenheng, og senere i forbindelse med kultiveringstiltak i vassdrag (Moen 1996, 2000, 2004, 2005; Moen et al., 2007, 2008, 2009, 2010). I perioden 2005-2010 er det bademerket nær 15 mill øyerogn med bruk av ARS i forbindelse med produksjonen i den levende genbanken for laks.

Metoden har muliggjort gruppemerking av et høyt antall individer på en rask, enkel, sikker og rimelig måte. Ett eksempel må oppsett for storskala merking er vist i figur 1. For kodemerking kan en nytte gjentatt merking ved badebehandling ved ulike ontogenetiske utviklingsstadier. Ved bruk av ett merkestoff og ett til tre ontogenetiske stadier (tidspunkt) for gjentatt merkinger kan det produsere syv ulike merkekoder. Med bruk av flere enn tre ulike ontogenetiske stadier kan en øke antall mulige koder.

Veterinærinstituttet nytter 200 mg/l og 6 timers eksponeringstid ved bademerking av øyerogn med bruk av ARS. pH justeres til 7 i merkebadet. pH overvåkes og heves ved behov ved bruk av tris-buffer (Sigma 7-9-®). Ved lave temperaturer (< 2 °C) nyttes det gjerne noe lengre merketid enn ved høyere temperaturer.

Merking av mindre grupper skjer gjerne i enkeltbeholdere. Merkestoff tilsettes og pH justeres før rogn eksponeres. Vannsirkulasjon og oksygentilsetning sikres ved bruk av vannpumper og lufttesteinere, eller ved bruk av egen oksygenbeholder med diffusor. Temperatur, oksygennivå og ledningsevne kontrolleres og noteres før rogn tilføres merkebadet, og med jevne mellomrom mens merkingen pågår. Ved merking av større grupper kobles gjerne flere klekkebakker sammen via felles tilførsel tilkoblet et ekspansjonskar med sirkulasjonspumpe. Avløpene kobles til ekspansjonskaret slik at de danner en lukket krets. Veskevolum justeres for å sikre riktig merkekonsentrasjon og et betryggende forhold mellom væskevolum og rognvolum (Eckmann, 2003).



Figur 1. Storskala merking ved seriekobling av 30 liters klekkesylindere og bruk av ekspansjonskar med returpumpe og oksygentilsetning. Bilde fra produksjonsklekkeriet ved Genbanken for laks på Haukvik i Sør-Trøndelag (Foto Espen Holthe, Veterinærinstituttet).

Styring og kontroll med den ontogenetiske utviklingen hos ulike rognpartier vurderes som viktig for å kunne kvalitetssikre levering av ferdig sjokket, sortert, merket, desinfisert og pakket rogn for levering til lokalt vassdrag med ønsket ontogenetisk utvikling til riktig tid. Gorodilov (1996) definerte og beskrev ulike stadier av den ontogenetiske utviklingen hos embryo, larve og senere yngel av laks *Salmo salar* L. I denne sammenheng kan det være nyttig å kjenne til hans beskrivelser av morfologisk utvikling ved de ulike ontogenetiske utviklingsstadier. Flere har dokumentert sammenhenger mellom temperatur og hastigheten av den ontogenetiske utviklingen fra befruktning til klekking og videre frem til swimup hos laksefisk (Petersen et al., 1977; Carrick, (1979); Crisp, 1981, Gorodilov, 1983, 1996; Heggberget & Wallace, 1984; Wallace & Heggberget, 1988; Berg & Moen, 1999). Basert på data fra forsøk med rognutvikling og konstante temperaturer er det etablert modeller for rognutvikling som funksjon av temperatur (Crisp, 1981; Elliot et al., 1987). Ved bruk av modeller og gode temperaturmålinger, kan den ontogenetisk utvikling estimeres med tilfredsstillende presisjon. Den løpende utviklingen i prosent kan utledes fra modeller gitt av bla Crisp, (1981) og Elliot et al., (1987). Bademerking av rogn gjennomføres i regelen først etter at rogn har nådd øyeroznstadiet, og etter at ubefruktede- og døde rognkorn er fjernet. Sjøkking, sortering og merking skjer normalt etter at rognkornet har nådd 55% utvikling. For beskrivelse av

den morfologiske differensieringen ved et gitt ontogenetisk stadium i rognutviklingen er godt beskrevet av Gorodilov (1996). Han nyttet antall par somitter (τ_s) (celleansamlinger som dannes symmetrisk på hver side av ryggstrengen) for beskrivelse av embryoets relative utvikling. Ved å kombinere teoretiske modeller for rognutvikling fra Crisp (1981) og Elliot et al. (1987) med Gorodilov (1996) sine beskrivelser av ulike utviklingstrekk ved en gitt τ_s ved 55% utvikling: $\tau_{s(55\%)} \pm \text{STD (N)} = 166 \pm 0,68$ (N=40) i temperaturintervallet 0,1 til 4 °C. Klekking skjer ved τ_s i intervallet 280-320. Dette spennet skyldes at utviklingen varierer noe avhengig av temperaturregime i løpet av rognfasen.

Temperaturfall på seinhøsten kan gi dels betydelige forskjeller i ontogenetisk utvikling mellom ulike rognpartier. Et fall på 7-8 grader i løpet av to - tre uker kan gi dels betydelige forskjeller i ontogenetisk utvikling ved ulike stryketidspunkt. Likeledes kan tidspunkt for kjønnsmodning og kvaliteten på kjønnsproduktene variere mellom familiegrupper innen og mellom årsklasser innen en og samme sesong. Mellom år kan tidspunkt og hastigheten av temperaturfallet variere dels betydelig innen ett og samme kultiveringsanlegg. Ved merking for utsett av rogn i vassdrag kan stor spredning i ontogenetisk utvikling mellom rognpartier være uønsket. For å redusere forskjellene kan det nyttes avkjølt vann for de tidligste gruppene eller oppvarmet vann for de siste gruppene. Det siste bør nyttes med forsiktighet. Temperaturen bør ikke overstige 6-7 grader tidlig på rognstadiet (ved 0-50 % utvikling). God kontroll og gjerne synkronisert utvikling gjør det enklere å planlegge ulike aktiviteter i tilknytning til rognproduksjonen. Det gjelder både med hensyn til tidsrom for merking og siste frist for transport av desinfisert rogn ut av anlegget.

Rognkornets opptak av oksygen og salter over rognmembranen (corion) øker ved økende temperatur og frem mot klekking. Ved lave temperaturer (<2°C) og ved 55 - 70 % utvikling mot klekking er utvekslingen over corion normalt lav sammenlignet med seinere stadier. Bademerking på rognstadiet gjennomføres i regelen mellom 60- 85% utvikling. Ved lave temperaturer og tidlig på øyergnstadiet kan eksponeringstiden i merkebadet gjerne økes noe utover 6 timer, mens ved relativt høye temperaturer og mer fremskreden ontogenetisk utvikling kan eksponeringstiden reduseres noe. Ved 4-5 °C og 80% utvikling kan eksponeringstiden reduseres til 4 timer. Slike justeringer vil bidra til en jevnere merke kvalitet.

Veterinærinstituttet gjennomførte i 2006 en test av effektene av eksponeringstid, salinitet, pH og temperatur på merke kvalitet ved bademerking av øyergn av laks (Tabell 1). Grupper av øyergn (rundt 500 rognkorn/gruppe fra en og samme årsklasse av Ognastamme) ble bademerket og gitt ulike regimer under merkingen. Etter klekking ble yngel avlivet og otolittene analysert. Ved salinitet på 1‰ syntes merke kvaliteten å være høyere enn ved 5‰. Ved salinitet høyere enn 5 ‰ var merket svakt (merke kvalitet = 1) eller ingen merking (merke kvalitet = 0). Ved lav salinitet (< 5 ‰) økte merke kvaliteten ved økende eksponeringstid. Ved å øke surheten i merkebadet fra pH 7 til pH 9 avtok merke kvaliteten. Merke kvalitet som funksjon av temperatur ble undersøkt ved bruk av tre temperaturregimer og 6 timers eksponeringstid. Merke kvaliteten syntes ikke å endre seg nevneverdig ved økt temperatur fra 2,2-10 °C. I dette forsøket ville eventuelle forskjeller i merke kvalitet trolig ha kommet bedre frem ved kortere eksponeringstid.

Tabell 1. Test av merke kvalitet ved bademerking med bruk av ARS som funksjon av eksponeringstid, salinitet, pH og temperatur. Det ble nytted rogn av Ogna stamme og merke kvaliteten ble gradert fra 0 til 5 og hvor 0= ikke lesbart merke; 1= svakt merke; 2=klart merke; 3=godt merke; 4=kraftig merke; 5=svært kraftig merke (godt synlig uten bruk av UV-lys og filterblokker).

Gruppe nr.	Param.	Eksp.-tid (min)	Salinitet (‰)	Ledningsevne (mS/cm)	pH	Temp. (°C)	Merkekvalitet
1	Salinitet	10	35	50 800	7,5	1,8-2,5	0
2	Salinitet	10	20	35 000	7,5	1,8-2,5	0
3	Salinitet	10	12	20 200	7,5	1,8-2,5	0
4	Salinitet	30	35	50 800	7,5	1,8-2,5	1
5	Salinitet	30	20	35 000	7,5	1,8-2,5	0
6	Salinitet	30	12	20 200	7,5	1,8-2,5	0
7	Salinitet	120	35	50 800	7,5	1,8-2,5	0
8	Salinitet	120	20	35 000	7,5	1,8-2,5	1
9	Salinitet	120	12	20 200	7,5	1,8-2,5	1
10	Salinitet	120	5	9 600	7,5	1,8-2,5	1
11	Salinitet	120	1	2 060	7,5	1,8-2,5	2
12	Salinitet	240	5	9 600	7,5	1,8-2,5	2
13	Salinitet	240	1	2 060	7,5	1,8-2,5	3
14	Salinitet	360	5	9 600	7,5	1,8-2,5	3
15	Salinitet	360	1	2 060	7,5	1,8-2,5	4
16	pH	360	0	130	7	1,8-2,5	4
17	pH	360	0	130	8	1,8-2,5	1
18	pH	360	0	130	9	1,8-2,5	1
19	Temp.	360	0	130	8-6,75	2,2	5
20	Temp.	360	0	130	8-6,75	5	4
21	Temp.	360	0	130	8-6,75	10	5

4.1. Teknisk utstyr for avlesing av merke

Veterinærinstituttet nytter moderne fluorescent-mikroskop i sitt arbeid med identifikasjon av merke i otolitt (Leica fluoriscent mikroskop, type DM 2000). Filterpakkene som nyttes er av produsenten tilpasset identifikasjon av bla. Alizarin. Vi nytter i dag tre filterpakker i våre fluorescentmikroskop - N2.1, A og I3.

UV-lampene som nyttes i fluorescent-mikroskop har begrenset levetid. For å opprettholde god kvalitet oppgir leverandøren av lampene en maksimal brukstid. Hvis brukstiden ikke overholdes vil kvaliteten på avlesningene avta. Det er installert timeteller i strømforsyningene til fluorescensmikroskopene hos VIs laboratorium.

4.2. Opparbeidelse, montering og lagring av otolitter

I regelen mottar Veterinærinstituttet prøvematerialer av otolitter i eppendorfrør eller vi mottar hele individer på sprit. Otolittene taes da ut, og monteres. Otolittene skal være rene og tørre før montering. Otolitter monteres enten direkte på objektglass eller støpes inn i resin og sages før montering på objektglass. Det siste nyttes ofte for otolitter fra stor fisk. Otolittene er parede organer og hvor det finnes tre ulike otolitter i fiskens høreorgan disse er sagitta, lapillus og astericus. Sagitta er den største og normalt den som nyttes ved opparbeidelse for avlesing av merke. Ved innsendelse av otolitter er det ønskelig at begge sagitta sendes inn. Innsendelse av kun en otolitt fratrar oss muligheten for å opparbeide en ekstra prøve hvis den første vise seg å være deform eller ha skader grunnet brekkasje. Opplæring av lokalt personell i uttak av otolitter gjennomføres regelmessig.

Opparbeidelse av otolitt fra voksen fisk krever normalt mer tid enn ved opparbeidelse av otolitt fra yngre fisk. Det skyldes at større otolitter krever innstøping i epoxy-resin, saging med diamantsag samt mer sliping før de kan analyseres. Tidsbruken er derfor gjerne det dobbelte sammenlignet med opparbeidelse av otolitt fra 1-2 år gammel fisk.

Tap av merke grunnet bleking som en følge av eksponering for UV-lys mens fisken er i naturen vurderes som lite sannsynlig. Lagring av otolitt under ugunstige forhold med eksponering for lys kan potensielt redusere merke kvaliteten. Av den grunn oppbevares innsendte otolitter i lystette esker og lagres mørkt.

4.3. Kontroll av merkekvalitet

Det lokale klekkeri blir bedt om å holde tilbake et lite antall rognkorn fra hvert rognparti for å registrere klekking samt for innsendelse av 20 individer som avlives ved slutten av plommesekkstadiet. Individene legges på 96% sprit og sendes vårt analyselaboratorium i Trondheim. Uttak av kontrollmaterialer er et ledd i vårt arbeid med kvalitetssikring og gir informasjon om merkekvaliteten og nyttes for verifisering av merkekode for den enkelte gruppe individer fra det enkelte kultiveringsanlegg. En oversikt over innsendt kontrollmaterialer fordelt på vassdrag for perioden 2002-2009 er gitt i tabell 2. For noen av stammene, hvor det er lagt inn grupper med ulik ontogenetisk utvikling, er det sendt inn kontrollmaterialer for den enkelte gruppe.

Tabell 2. Oversikt over mottatte prøver av kontrollmaterialer etter merking fordelt på vassdrag for perioden 2002-2009. 0 = kontrollmaterialer ikke innsendt; X = kontrollmateriale sendt inn.

Vassdrag/År	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Batnfjord				X				
Beiarelva					X			
Bjoreio				0	0	0	X	X
Bya		0	X	X	X			
Bygland			X	0	0	X	X	0
Ekso			0	0	X	0	X	X
Figga		0	X	0	0	X		
Flekkje			X	X	X	0	X	
Jostedøla		0	X	0	X	0	X	0
Jølstra					X	0	X	X
Lærdalselva					0	X	X	X
Mandalselva		0	0	X	0	X	X	X
Nidelva		0	X	X	X			
Ogna		X	0	X	X			
Ranelva					X	X	X	X
Resa		0	X	X				
Røssåga						X	X	X
Stjørdalselva					X			
Tovdalselva	X	X	X	X	X	X	X	0
Vikja			X	0	X	X	X	0
Vosso	X	X	X	X	X	X	X	X

4.4. Identifikasjon av merke i otolitt

Gode rutiner og praksis ved opparbeidelse av prøvematerialer samt bruk av adekvat utstyr vil bidra til å kvalitetssikre analyseresultatet. Niva et.al. (2005) gjennomførte en test av kvaliteten i avlesning ved flere analyselaboratorier. Testmaterialet besto av otolitter fra merket og umerket fisk av bla røye, aure og laks. En avleser utmerket seg ved å ha spesielt høy feilprosent. Ved å utelate vedkommende fant de at 100% av merkede otolitter av laks ble identifisert som merket, og at umerkede otolitter i snitt ble

feilkategorisert i 4,5 % av tilfellene. Opplæring og jevnlig testing av personell vurderes som viktig for å sikre optimal kvalitet i analysearbeidet. Av den grunn er det utarbeidet en egen blindtest/ringtest som alle avlesere må ha gjennomgått og bestått før de er godkjent som otolittavlesere. Imidlertid er det ikke etablert ringtester for dokumentasjon og godkjennelse av praksis mellom ulike analyselaboratorier.

Kvaliteten på merke i kontrollmaterialene graderes på en skala fra 0-5, 0 = ikke synlig merke og 5= svært godt synlig merke. Merkekvalitet med gradering 2 vurderes som et godt synlig merke. Eksempel på evaluering av merkekvalitet er vist i tabell 3 som viser et utvalg kontrollprøver fra tre ulike stammer på Sørlandet.

Tabell 3. Merkekvalitet (gjennomsnitt, STD og N) i kontrollmaterialer fra ulike merkegrupper av tre stammer - Storelva stamme for utsett i Tovdalselva, Bjerkreim stamme for utsett i Mandalselva samt Mandal stamme for utsett i Mandalselva. Stammene Storelva og Mandalselva ble holdt ved genbanken for laks på Finså i Marnardal mens Bjerkereim-stammen ble holdt på lms. Merkekvalitet ble gradert fra 0 til 5, med 0 som ikke synlig merke og 5 som svært godt synlig merke.

Stamme	Utsetnings-lokalitet	Utsetningsår	Merke-gruppe	Merkekvalitet		
				Gj.snitt	STD	N
Storelva i Holt	Tovdalselva	2003	1	2,17	0,41	6
			2	2,29	0,49	7
			3	2,20	0,45	5
		2004	1	3,33	1,15	3
			2	3,00	0,82	4
			3	3,20	0,45	5
			4	2,67	0,58	3
			5	3,40	0,55	5
		2005	1	2,57	0,53	7
			2	2,50	0,55	6
			3	3,00	0,00	6
			4	4,00	0,00	7
		2006	1	3,67	0,52	6
			2	3,00	0,63	6
			3	3,67	0,58	3
		2007	1	3,00	0,00	7
			2	3,17	0,41	6
			3	4,30	0,48	10
			4	4,78	0,44	9
			5	5,00	0,00	6
		2008	1	2,36	0,50	11
			2	2,71	0,76	7
			3	3,57	0,79	7
			4	3,25	0,46	8
5	5,00		0,00	8		
6	5,00		0,00	10		
Mandalselva	Mandalselva	2005	1	3,83	0,41	6
		2007	1	3,00	0,00	6
			2	3,70	0,49	7
2008	1	4,00	0,00	6		
Bjerkreimselva	Mandalselva	2007	1	4,70	0,48	10
		2008	1	4,60	0,55	5

4.5. Prosedyrer ved avlesing av otolitt

Minimum to avlesere foretar uavhengige avlesninger av materialer. Otolitter som er gitt ulikt prøvesvar av to avlesere gjennomgås på nytt i fellesskap ved en ny gjennomgang. Basert på logging fra 2007, og fremover er det gjennomsnittlige avviket mellom rutinerte avlesere ved første gangs avlesing $3,5 \% \pm 1,4$ (gj.snitt $\pm 95 \%$ CI) (Tabell 4). Det gjennomføres fortløpende logging og kontroll av variasjonen mellom avlesere.

Tabell 4. Antall og andel ulike prøvesvar gitt av to rutinerte avlesere ved første gangs gjennomgang av prøvematerialer.

Vassdrag/år	Stadium	# ulike prøvesvar	# undersøkt	% differanse
Røssåga 2008	Yngel	2	48	4.17
Røssåga 2009	Yngel	2	30	6.67
Jostedøla 2008	Yngel	0	21	0
Kosåna 2007	Smolt	4	173	2.31
Kosåna 2008	Smolt	1	48	2.08
Lærdalselva 2007	Yngel	37	713	5.19
Lærdalselva 2008	Yngel	12	250	4.80
Mandalselva 2008	Smolt	3	85	3.53
Tovdalselva 2008	Smolt	2	45	4.44
Tovdalselva 2008	Voksenfisk	1	46	2.17
Nidelva 2005-2007	Voksenfisk	9	269	3.30

4.6. Evaluering av prøvesvar etter analyse av otolitt

I samarbeid med LFI-Bergen gjennomførte Veterinærinstituttet i 2009 en test av avlesningsresultater ved analyse av otolitter ved Veterinærinstituttets analyselaboratorium i Trondheim. Et materiale innsamlet fra felt og laboratorie ble oversendt for analyse og besto av 138 otolitter fra ungfisk. 10 stk (7 %) av de innsendte otolittene var deformerte eller ødelagt. Noen av disse kan ha blitt ødelagt under opparbeidelse av prøvematerialene. Alle 61 otolitter identifisert som merket var merket. Alle 53 otolitter identifisert som umerket var umerket.

Niva et al. (2005) har tidligere gjennomført en undersøkelse hvor de kvantifiserte presisjonen ved avlesing av Alizarin merkede otolitter fra ulike fiskearter, deriblant laks. For å sammenligne dataene fra vår 2009 test med resultatene gitt av Niva et al. (2005) ble dataene analysert med bruk av standard protokoll for validering av alternative mikrobiologiske metoder ved analyser av matvarer, vann, avføring etc. (NordVal/NMKL) (Tabell 5). Vi fant en høyere relativ spesifisitet (RSP%) og høyere andel korrekt avleste prøver - relativ nøyaktighet (RA%) i vår undersøkelse sammenlignet med data fra Niva et al. (2005). Imidlertid hadde vi en lavere frekvens av sanne positive resultat - relativ sensitivitet (RS%). Det skyldes hovedsakelig et høyt innslag av negative avvik (ND). Feilprosenten ($100 \% \times ND/N$) i vår merketest var på 10,1%. En nærmere undersøkelse av dataene bak denne feilprosenten viste at 13 av de 14 negative prøvene var produsert og merket ved ett bestemt lokalt anlegg våren 2003 og våren 2005. Otolitt prøvene var hentet fra individer innfanget på et atskilt restfelt sommeren 2005 og 2007. Isolert sett viste prøvene fra dette vassdraget og tilhørende kultiveringsanlegg at 13 % var rapportert inn som "ødelagt" samt 13 % prosent med "deform-kjerne" i otolitten. Av 2003- materialet fra dette klekkeriet var 46,1 % falske negative prøver. Av 2005-materialet, ble det rapportert inn 13 % som "ødelagt", og 61,5 % falske negative. Det er ikke mottatt kontrollmaterialer fra de nevnte årgangene fra dette klekkeriet. Den høye andelen falske negative prøver kan også skyldes ugunstig oppbevaring av otolittene fra de ble innsamlet i vassdraget og levert vår lab. to og fire år seinere. Den samlede andelen otolitter registrert som ødelagt eller deformerte og levert fra dette klekkeriet var 20 %, mens andelen rapportert som ødelagte eller deformerte som del av merketesten var 7,2 %. Imidlertid vil en slik oppdeling av prøvematerialet være misvisende ettersom en reduksjon av antall prøver vil føre til økt usikkerhet i prøvesvarene.

Tabell 5. Sammenligning av resultater ved avlesing av merke i otolitter fra laks basert på resultater fra undersøkelser utført av VI/LFI-Bergen og Niva et al., (2005). Data fra Niva et al (2005) er gjennomsnittsverdier for 5 avlesere. PA = antall positive prøver; NA= antall negative prøver; ND= antall negative avvik; PD= antall positive avvik; N= antall prøver undersøkt; RA = relativ nøyaktighet, og gir et mål på overensstemmelse med fasit (kjent materiale). $RA \text{ i } \% = [(PA+NA) \times 100] / N$, og angir andelen falske positive prøvesvar; RS= relativ sensitivitet, og angir andel sanne positive resultater i prøvematerialet. $RS \text{ i } \% = (PA \times 100) / (PA+ND)$; RSP= angir andel sanne negative resultater i referansegruppen. $RSP \text{ i } \% = (NA \times 100) / (PD+NA)$, og angir relativ spesifisitet.

Testmaterialer	Positive prøver	Negative prøver	Negative avvik	Positive avvik	Sum	Relativ nøyaktighet	Relativ sensitivitet	Relativ spesifisitet
	PA	NA	ND	PD	N	RA (%)	RS (%)	RSP (%)
VI-LFI-Bergen - test 2009	61	53	14	0	128	89,1	81,3	100
Niva et al. (2005)	16,6	9,6	0,4	4,4	31	84,5	97,7	68,5

I forbindelse med en gjennomgang av et prøvemateriale av laks fra Kosåna innsamlet i 2007 og 2008 gjennomførte LFI-Bergen testing av våre analysesvar ved å legge inn prøver med kjent opprinnelse. Materialet fra 2007 besto totalt av 80 otolitter. I etterkant rapporterte de at det var lagt inn 9 prøver av merket fisk med kjent bakgrunn. Av disse ble 7 vurdert som merket mens 2 ble identifisert som umerket. Det gav en RA% på 78%. Test av materialet fra 2008 gav en RA% på 100%.

I to av de tre ovenfor nevnte testene ble andelen prøver med merke underestimert (Kosåna 2007-. N=9, ND= 22,2 % ; test VI-LFI-Bergen 2009- N=128, ND=10,9 % og test Kosåna 2008 - N=9; ND=0%). Falske positive prøver (prøver som ikke var merket men som er funnet å være merket) ble ikke påvist i noen av testene.

5. Diskusjon

I arbeid med bademerking av rogn og identifikasjon av merke i otolitt er det fokusert på utvikling og kvalitetssikring for å oppnå god og jevn merking samt rask og sikker identifikasjon. Det er likeledes fokusert på etablering av system for overvåking og kontroll av rognkornets ontogenetisk utvikling, fastsettelse av merketidspunkt, konsentrasjon av merkestoff i merkebadet, eksponeringstid og kontroll med vannkjemiske parametere under merking ved logging av pH, ledningsevne, oksygennivå og temperatur. Fokus har også vært på optimalisering av avlesingsmetodikk, etablering av rutiner og prosedyrer ved avlesning, og opplæring av personell ved visuell inspeksjon av merke i otolitt.

Veterinærinstituttets praksis ved bademerking og identifikasjon av merke i otolitt er i tråd med internasjonale resultater og anbefalinger (Tsukamoto et al., 1989B; Blom et al., 1994; Takashi 1994; Secor et al., 1995; Beckman & Schulz, 1996; Eckman et al., 1998; Lagardere et al., 2000; Kawamura et al., 2001; Rutherford et al., 2002; Eckman, 2003; Niva et al., 2005; Caudron et al., 2006; Baer & Rösch, 2008; Caudron & Champigneulle 2009; Partridge et al., 2009; Simon et al., 2009; Morales-Nin, et al., 2010).

Merker i otolitt fra voksen fisk er gjerne like distinkt og tydelig som merke hos yngre individer. Gode rutiner og praksis ved bearbeiding og opparbeidelse av prøvemateriale er imidlertid viktigere ved analyse av voksen fisk enn for yngre individer. Niva et al. (2005) fant at for otolitter innstøpt i epoxy-resin og saget med diamantsag ble 97,0 % av preparatene korrekt avlest, mens det for otolitter som kun var slipt ble 92,3 % av otolittene korrekt avlest. Sannsynligheten for deteksjon av merke synes å variere med kvaliteten i arbeidet med opparbeidelse av otolitt prøvene og i mindre grad av fiskens størrelse og alder.

For å kvalitetssikre analysearbeid og selve analysesvaret gjennomført ved Veterinærinstituttets analyselaboratorium er det i samarbeid med UIB, LFI-Bergen gjennomført blindtester. Resultatene vurderes som fullt tilfredsstillende og fullt på høyde med internasjonale resultater og praksis. Otolitter med misdannelser eller sprekker kan gi økt fare for falske negative prøvesvar. Det skyldes trolig at de ofte har en dels betydelig økt egenfluorescens. Merker vil da ofte være vanskeligere å identifisere visuelt. Av den grunn vil det trolig bli vanskelig helt å kunne eliminere en mindre andel otolitter gitt negative

prøvesvar (otolitter som er merket men som identifiseres som umerket). Falske positive prøvesvar vurderes derimot som langt mer alvorlig sammenlignet med falske negative prøvesvar. Alizarin-preparater gir et rødlig merke som skiller seg godt fra autofluorescens som ligger i den gule delen av spekteret. Det gjør at ALC og ARS vurderes som et bedre merkepreparat i forhold til synlighet sammenlignet med TC-preparater hvor merket gir fluorescens i den gule delen av spekteret.

Merketap er ikke dokumentert hos fisk merket ved badmerking med bruk av ALC eller ARS. Eksponering av ung fisk for kraftig sollys i grunne kar utendørs synes imidlertid å kunne føre til bleking av merke i otolitter (Lorson & Mudrak 1987.) Under normale forhold vil individene i naturen være godt beskyttet mot direkte UV-lys. Hvis relativ sensitivitet (RS%) i vår undersøkelse kan sees som et mål på merketap eller "bleking" vil denne ligge på rundt 10% (tabell 5). Sammenlignet med andre metoder for gruppemerking gir badmerking med ARS og lesing av merke i otolitt en akseptabel feilmargin. Rutherford et al. (2002) vurderte et merketap på 10 % som akseptabel.

For kvalitetssikring av praksis og rutiner ved Veterinærinstituttets laboratorium er det etablert system for logging av ontogenetisk utvikling av rogn, rutiner for logging av vannkjemiske parametere samt uttak av kontrollmaterialer for kvalitetssikring og dokumentasjon av merking. Likeledes er det etablert rutiner for opparbeidelse av prøvematerialer for identifikasjon av merke i otolitter. På sikt er det et mål å etablere system med ringtester i samarbeid med andre analyselaboratorier samt etablere felles system for angivelse av merke kvalitet samt grad av usikkerhet ved identifikasjon av merke.

6. Referanser

- Baer, J. and Rösch, R. 2008. Mass-marking of brown trout (*salmo trutta* L.) larvae by alizarin: method and evaluation of stocking. *J. Appl. Ichthyol.* 24, 44-49.
- Barlaup, B. T. & Åtland, Å. 1990. Merking og bedøving av fisk - en statusrapport. - Forskningsprogram om fiskeforsterkningstiltak i norske vassdrag, Nasjonal komité for miljøvernforskning, Rapport nr. 1: 1-54.
- Berg, O.K. & Moen, V. 1999. Inter- and intrapopulation variation in temperature sum requirements at hatching in Norwegian Atlantic salmon. *J. Fish Biol.* 54: 636-647.
- Beckman, D. W. & Schulz, R. (1996). A simple method for marking fish otoliths with alizarin compounds. *Transactions of the American Fisheries Society* 125, 146-149.
- Beckman, D. W. & Wilson, C. A. 1990. Variability in Incorporation of Calcein as a Fluorescent Marker in Fish Otoliths. *Am. Fish Soc. Symp.* 7:547-549.
- Behrens-Yamada, S. and Mulligan, T.J., 1982. Strontium marking of hatchery-reared coho salmon *Oncorhynchus kisutch* Walbaum: Identification of adults. *J. Fish. Biol.* 20, pp. 5-9.
- Bjørklund, H & Bylund, G. 1990. Temperatur-related absorption and excretion of oxytetracyclin in rainbow trout *Salmo gairdneri* R. *Aquaculture* 84 (3-4):363-372.
- Blom et al., 1994 G. Blom, J.T. Nørdeide, T. Svåsand and A. Borge, Application of two fluorescent chemicals, alizarin complexone and alizarin red S, to mark otoliths of Atlantic cod, *Gadus morhua* L., *Aquacult. Fish. Manage.* 25 (1994), pp. 229-243.
- 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.*
- Brothers, E.B., 1990. Otolith Marking. *Am. Fish. Soc. Symp.* 7, pp. 183-202.
- Bumguardner, B. W. et al. Presentert på Internat.symp: Fish Otolith Research and application, South Carolina USA. Januar 1993. (Abstract) Use of Lappili, Sagittae and Scales to Evaluate Chemical Marking of Striped Bass Juveniles.
- Bumguardner, B. W. & King, T. L. 1996. Toxicity of oxytetracycline and calcein to juvenile striped bass. - *Trans. Am. Fish. Soc.* 125: 143-145.
- Carrick, T. R. (1979). The effect of acid water on the hatching of salmonid eggs. *Journal of Fish Biology* 14, 165-172.
- Calaprice, J.R., Lapi, L.A. and Carlson, L.J., 1975. Stock identification using X-Ray spectrometry and multivariate techniques. *Int. North. Pac. Fish. Comm. Bull.* 32, pp. 81-101.
- Campana, S.E. and Neilson, J.D., 1982. Daily growth increments in otoliths of starry flounder (*Platichthys stellatus*) and the influence of some environmental variables in their production. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39, pp. 937-942.
- Campana, S.E., Gagne, J.A., 1995. Cod stock discrimination using ICPMS elemental assays of otoliths. In: Secor, D.H., Dean, J.M., Campana, S.E. (Eds.). *Recent Developments in Fish Otolith Research*, pp. 671-691.

- Caudron, A. and Champigneulle, A. 2009. Multiple marking of otoliths of brown trout, *Salmo trutta L.*, whit alizarin reds to compare efficiency of stocking of three early life stages. *Fisheries Management and Ecology*. 16, 219-224.
- Caudron, A., Champigneulle, A. and Guyomards, R. 2006. Assessment of restocking as a strategy for rehabilitating a native population of brown trout *Salmo trutta L.* in a fast-flowing mountain stream in the northern French Alps. *Journal of Fish Biology*. 66 (supplement A), 127-139.
- Champigneulle, A. and 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.
- Crisp, D. T. 1981. A desk study of the relationship between temperature and hatching time for the eggs of five species of salmonid fishes. *Freshwater Biology* 11, 361-368.
- Degens, E.T., Deuser, W.G. and Haedrich, R.L., 1969. Molecular structure and composition of fish otoliths. *Mar. Biol.* 2, pp. 105-113
- Eckman, R., Czerkies, P., Helms, C. & Kleibs K. 1998. Evaluating the effectiveness of stocking vendace (*Coregonus albula*) eleutheroembryos by alizarin marking of otoliths. *Archiv fur Hydrobiologie, Special Issues Advances in Limnology*. 50, 457-463.
- Eckman, R. 2003 Alizarin marking of whitefish, *Coregonus lavaretus* otoliths during egg incubation. *Fisheries management and Ecology*. 10, 233-239.
- Elliott, J. M., Humpesch, U. H., and Hurley, M. A. (1987) A Comparative-Study of 8 Mathematical-Models for the Relationship between Water Temperature and Hatching Time of Eggs of Fresh-Water Fish. *Arch Hydrobiol* 109, 257-277
- Elliott J.M., Hurley M.A. and Maberly S.C. 2000. The emergence period of sea trout fry in a Lake District stream correlates with the North Atlantic Oscillation. *Journal of Fish Biology* 56: 208-210.
- Edmonds, J.S., Caputi, N., Moran, M.J., Fletcher, W.J., Morita, M., 1995. Population discrimination by variation in concentrations of minor and trace elements in sagittae of two western Australian teleosts. In: Secor, D.H., Dean, J.M., Campana, S.E. (Eds.), *Recent Developments in Fish Otolith Research*. pp 665-669.
- Ennevor, B.C. and Beames, R.M., 1993. Use of lanthanide elements to mass mark juvenile salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, pp. 1039-1044.
- Flem, B., Moen, V., and Grimstvedt, A. (2005) Trace element analysis of scales from four populations of Norwegian Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) for stock identification using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Appl Spectrosc* 59, 245-251
- Frenkel, V., Kindschi, G. and Zohar, Y. 2002. Noninvasive, mass marking of fish by immersion in calcein: evaluation of fish size and ultrasound exposure on mark endurance. *Aquaculture*. Volume 214, Issues 1-4, Pages 169-183.
- Gerdeaux, D., Luquet, J.F., Poupart, A. and Tostivint, C. 2006. Contribution of trout yolk-sac fry (*salmo trutta L.*) originating from wild stock to fishing in the River Moselotte, *Bull. Fr. Peche Piscic.* 2006, 383: 13-22.
- Gorodilov, Y. N. 1983. Stadii embrional'nogo razvitiya atlanticheskogo lososya *Salmo salar L.* III. Tablitsa opredeleniya vozrasta i stadii zarodysheyi. (Stages of embryonic development of Atlantic salmon *Salmo salar L.* III. Tables for determining age and stage of embryo development). *Sbornik Nauchnykh trudov GosNIORKh* 203, 8-12

- Gorodilov, Y. N. 1996. Description of the early ontogeny of the Atlantic salmon, *Salmo salar*, with a novel system of interval (state) identification. *Environmental Biology of Fishes* 47, 109-127.
- Heggberget, T. G. & Wallace, J. C. 1984. Incubation of the eggs of Atlantic salmon, *Salmo salar*, at low temperatures. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41, 389-391.
- Hendricks, M. L., Bender, T.R. & Mudrak, V.A. 1991. Multiple marking of American Shad otoliths with tetracycline antibiotics. *North American Journal of Fisheries Management* 11: 212-219.
- Hesthagen, T. red., 2008. Reetablering av laks på Sørlandet. Årsrapport fra reetableringsprosjektet 2007. - DN-utredning 2008-8.
- Hettler, W.F., 1984. Marking otoliths by immersion of marine fish larvae in tetracycline. *Trans. Am. Fish. Soc.* 113, pp. 370-373.
- Johnson, W.F., Josephson, R.P., Frawley, T.R. and Oxman, D.S. 2006. Revised web-based north pacific salmon Otolith mark directory. (NPAFC Doc. 971). 39p.
- Kawamura, H., Kudo, S., Miyamoto, M., and Nagata, M. 2001. Otolith marking with fluorescent substances at eyed egg stage of chum salmon. *North Pacific Anadromous Fish Commission Technical report* 3, 6-8.
- Lagardere, F., Thibaudeau, K., and Begout-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.
- Li, L., Hoie, H., Geffen, A.J., Heegaard, E., Skadal, J. and Folkvord, A. 2008. Back-calculation of previous fish size using individually tagged and marked atlantic cod (*Gaus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 65. 2469-2508.
- Lorson, R. D. & Mudrak, V. A. 1987. Use of tetracycline to mark otoliths of American shad fry. *North American Journal of Fisheries Management*. 7: 453-455.
- Marking, L.L.; Howe, G.E. & Crowther, J.R. 1988. Toxicity of Erythromycin, Oxytetracycline, and Tetracycline administered to lake trout in wather baths, by injection, or by feeding. *The Progressive Fish-Culturist* 50: 197-201.
- Masu, T., Watanabe, S., Aoki, S., Katayama, S., Fukuda, M. and Hino, A. 2008. Establishment of shell growth analysis technique of Juvenile Manila clam *philippinarius*: semidiurnal increment formation. *Fisheries Science*. 74. 41-47.
- Moen, V. 1996. Otolitt-merking av laks, massemerking av rogn og yngel ved tilsetting av fargestoff i vannbad. SVLT Oppdragsavd. Rapport 1996. 20 pp. ISBN 82-7882-000-7.
- Moen, V. 2000. Badmerking av øyerogn - effekter på laks utsatt i vassdrag som øyerogn og plommesekkyngel. VESO - Rapport: 01-2000: 1-31.
- Moen, V., Næss, T., Setså, R., Frøysa, T., Solbakken, F., og Kibsgaard, B. 2007. Reetableringsprosjektet for Ranelva og Røssåga. Årsrapport 2006. Veterinærinstituttets rapportserie 14-2007.
- Moen, V., Næss, T., Solbakken, F., Kibsgaard, B., Frøysa, T., Setså, R., Brennslett, R., Hermansen, U. og Kalkenberg, A. 2008. Reetableringsprosjektet for Ranelva og Røssåga. Årsrapport 2007. Veterinærinstituttets rapportserie 18-2008.
- Moen, V., Holthe, E., Skår, K., Hokseggen, T. og Lo, H. 2009A. Innslag av kultivert laks i Nidelva i 2005-2007. Veterinærinstituttets rapportserie 09-2009. 21 p. Oslo: Veterinærinstituttet.

- Moen, V., Holthe, E., Næss, T., Sæter, L., Solbakken, F., Kibsgaard, B., Frøysa, T., Setså, R., Brennslett, R., Hermansen, U. og Kalkenberg, A. 2009B. Reetableringsprosjektet for Ranelva og Røssåga. Årsrapport 2008. Veterinærinstituttets rapportserie 12-2009.
- Moen, V., Holthe, E., Næss, T., Sæter, L., Solbakken, F., Kibsgaard, B., Frøysa, T., Setså, R., Brennslett, R., Hermansen, U. og Kalkenberg, A. 2010. Reetableringsprosjektet for Ranelva og Røssåga. Årsrapport 2008. Veterinærinstituttets rapportserie 20-2010.
- Monteleone, D. M., Houde, E. D., Secor, D. H. & Morin, L. G. Presentert på Internat.symp: Fish Otolith Research and application, South Carolina USA. Januar 1993. (Abstract) Comparison of Alizarin Complexone and Tetracycline Hydrochloride for Immersion Marking of Otoliths of Fish Embryos and Larvae.
- Morales-Nin, B., Grau, A., Pérez-Mayol, S., & Gil, M. D. M. (2010). Marking of otoliths, age validation and growth of *Argyrosomus regius* juveniles (Sciaenidae). *Fisheries Research*, 106(1), 76-80. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.fishres.2010.07.006.
- Mosegaard, H., Steffner, N.G., Ragnarsson, B., Manipulation of otolith microstructure as a means of mass-marking salmonid yolk sac fry, Proceedings of the Fifth Congress of European Ichthyologists, 1987, pp. 213-220.
- Muncy, R. J., Parker, N. C., & Poston, H. A. 1990. Chemical marks. Inorganic Chemical Marks Induced in Fish. Am. Fish. Soc. Symp. 7. 541-546
- Munk, K.M., Smoker, W.W., Beard, D.R. and Mattson, R.W., 1993. A hatchery water-heating system and its application to 100% thermal marking of incubating salmon. *Prog. Fish. Cult.* 55, pp. 284-288.
- Munk, K.M. and Geiger, H.J., 1998. Thermal marking of otoliths: the "RBr" coding structure of thermal marks. (NPAFC Doc. 367, 19p. CWT and Otolith Processing Laboratory, Alaska Department of Fish and Game, Juneau, Alaska, USA.
- Munk, K.M. 1999. Discrimination of multi-country thermal mark codes by augmentation of coding schemes or marking mechanisms. NPAFC Doc. 396, 14p. CWT and Otolith Processing Laboratory, Alaska Department of Fish and Game, Juneau, Alaska, USA.
- Nagata, M, and Irvine, J.R. 1997. Differential dispersal patterns of male and female masu salmon fry. *Journal of Fish Biology*. 51, 601-606.
- Nagiec, M., Nagiec, C., Dabrowski, K. & Murawska, W. 1985. Marking of juvenile whitefish *Coregonus lavaretus* L. With tetracycline antibiotics. *Acta Ichthyol. Piscat.* 13. 47-57.
- Nagiec, M., Dabrowski, K., Nagiec, C. & Murawska, W. 1988. Mass-marking of coregonid larvae and fry by tetracycline tagging of otoliths. *Aquaculture and Fisheries management* 19: 171-178.
- Nakaya, M., Morioka, T., Fukunaga, K., Sekiya, S., Jinbo, T., Nagashima, H. and Uendo, Y. 2008. Validation of otolith daily increments for larval and juvenile Japanese halfbeak *Hyporhamphus sajori*. *Fisheries Research*. 93- 186-189.
- Niva, T., Keranen, P., Raitaniemi, J. and Berger, H.M. 2005. Improved interpretation of labelled fish otoliths: a cost-effective tool in sustainable fisheries management. *Marine and Freshwater Research*, 56, 705-711.
- Odense, P. H., & Logan, V. H. 1974. Marking Atlantic salmon (*salmo salar* L.) with oxytetracycline. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 31. 348-350.
- Partridge G.J., Jenkins, G.I., Doupe, R.G., De Lestang, S., Ginbey, B.M., and French, D. 2009. Factors affecting mark quality of alizarin complexone-stained otoliths in juvenile black bream *Acanthopagrus butcheri* and a prescription for dosage. *Journal of Fish Biology*. 75, 1518-1523.

- Petersen, R. H., Spinney, H. C. E. & Sreedharan, A. (1977). Development of Atlantic salmon (*Salmo salar*) eggs and alevins under varied temperature regimes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34, 31-43.
- Paulsen, H., and Støttrup, J.G., 2004. Growthrate and nutritional status of wild and released reared juvenile turbot in southern Kattegat, Denmark. *Journal of Fish Biology*. 65, 210-230.
- Reichert, M. J. M., Dean, J. M., Feller, R. J. & Grego, J. M. 2000. Somatic growth and otolith growth in juveniles of a small subtropical flatfish, the fringed flounder, *Etropus crossotus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 254, 169-188.
- Reichert, M.J.M., Dean, J.M., Feller, R.J., and Van den Avyle, M.J. 2000. Somatic growth and otolith growth I juveniles of a small subtropical flatfish, the fringed flounder, *Etropus crossotus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 254, 169-188.
- Reimer, J.R. & Young, L.M. 1990. Validation of a method for determination of tetracyclin antibiotics in salmon muscle tissue. *Journal of the association of Official Analytical chemists* 73 , 5: 813-817.
- Ruhlè, C. & Grieder, C. 1989. New method for the marking of trout (*Salmo trutta fario* and *Oncorhynchus mykiss*) eggs by osmotic incorporation of tetracycline at fertilization. *Bull. Fr. peche Piscic* 0 (315): 181-188.
- Rutherford, E.S., Iacono, J.D and Callahan, G. 2002. Evaluation of Marking Procedures to Estimate Natural Reproduction of Chinook Salmon in Lake Michigan. Great lakes Fishery Commission, Project Completion report. pp.41.
- Salte, R. 1982. Oxytetracycline residues in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed a commercial medical feed. *Acta Vet. Scand* 23: 150-152.
- Secor, D. H. and Houde, E.D. 1995. Larval Mark-Release Experiments: Potential for Research on Dynamics and Recruitment in Fish Stocks. In *Recent Developments in Fish Otolith Research*. (Ed) Secor, D.H., Dean, J.M. and Campana, S.E. The Bell W. Baruch Library in Marine Science Number 19, 423-444.
- Secor, D.H., Houde, E.D. and Monteleone, D.M. 1995. A mark-release experiment on larval striped bass, *Morone saxatilis*, in a Chesapeake Bay tributary. *ICES Journal of Marine Science*. 52: 87-101.
- Secor, D.H.; White, M.G. & Dean, J.M. 1991. Immersion marking of larval and juvenile Hatchery-produced Striped Bass with oxytetracycline. *Transactions of American Fisheries Society* 120. 261-266.
- Simon, J., Dörner, H. & Richter, C. 2009. Growth and mortality of European glass eel *Anguilla anguilla* marked with oxytetracycline and alizarin red. *Journal of Fish Biology*. Volume 74, Issue 1, pages 289-295.
- Smith, K.T. and Whitley, G.W. 2010. Evaluation of a stable-isotope labelling technique for mass marking fin ray of age-0 lake sturgeon. *Fisheries Management and Ecology*. 1-8.
- Takahashi, M., and t. Sakagami. 2010. Proposed otolith marks for brood year 2010 salmon in Japan. NPAFC Doc. 1232, Rev. 1.6p. (Available at www.npafc.org).
- Takashi, Y.I. 1994. Otolith staining by oral administration of alizarin complexone for juveniles of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceous*). *Nippon Suisan Gakkaishi*. 60, 611-615.
- Taylor, M.D., Fielder, D.S. and Suthers, I.M. 2005. Batch marking of otoliths and fin spines to assess the stock enhancement of *Argyrosomus japonicus*. *Journal of Fish Biology*. 66, 1149-1162.

- Thomas, L.M., Holt, S.A and Arnold, C.R. 1995. Chemical Marking Techniques for Larval and Juvenile Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) Otoliths Using Different Fluorescent Marks. In: D.H: Secor, J.M. Dean & S.E Campana (eds) Recent Developments ion Fish Otolith Research. Colombia: University of South Carolina Press, pp. 703-717.
- Trojnar, J. R. 1973. Marking Rainbow Trout fry with Tetracycline. The Progressive Fish Culturist. 35. 1. 52-54.
- Tsukamoto K. (1988) Otholith tagging of ayu embryo with fluorescent substances. Nippon Suisan Gakkaishi. 54, 1289-1295.
- Tsukamoto K. (1995) Use of otolith tagging in a stock enhancement program for masu salmon (*Oncorhyncus masou*) in the Kaji River, Japan. In: D.H: Secor, J.M. Dean & S.E Campana (eds) Recent Developments ion Fish Otolith Research. Colombia: University of South Carolina Press, pp. 403-422.
- Tsukamoto, K. 1985. Mass-marking of ayu eggs and larvae by tetracycline-tagging of otoliths. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 51, 6: 903-911.
- Tsukamoto, K., and six coauthors. 1989A. Size-dependent mortality of red sea bream, Pagrus major, juveniles released with fluorescent otolith-tags in News Bay, Japan. Journal of Fish Biology 35 (Supplement A): 59-69.
- Tsukamoto, K., Seki, Y., Oba, T., Oya, M. and Iwahashi, M. 1989B. Application of otolith to migration study of salmonids. Physiol. Ecol. Japan, Spec. 1: 119-140.
- Uchida, K.; Tsukamoto, S.; Ishii, R. & Kajira, T. 1989. Larval competition for food between wild and hatchery-reared ayu, Plecoglossus altivelis Temminck et Seegel, in culture ponds. Journal of Fish Biology 34; 399-407.
- Urawa, S., Hagen, P.T., Meerburg, D., Rogatnykh, H., and Volk, E.C. 2001. Compiling and coordinating salmon marks in the North Pacific Anadromous Fish Commission, Technical Report. 3:13-15.
- Volk, E., Schroder, S.L., and Fresh, K.L. 1994. Use of a bar-code symbology to produce multiple thermally induced otolith marks. Transaction of the American Fisheries Society 123: 811-816.
- Volk, E. 1999. Otolith thermal marking. *Fisheries Research*, 43(1-3), 205-219. doi: 10.1016/S0165-7836(99)00073-9.
- Wallace, J. C. & Heggberget, T. G. 1988. Incubation of eggs of Atlantic salmon (*Salmo salar*) from different Norwegian streams at temperatures below 1° C. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45, 193-196.
- Weber, D. D. & Ridgway, G. J. 1962. The deposition of tetracycline drugs in bones and scales of fish and its possible use for marking. Progressive Fish-Culturist. 24. 4. 150-155.
- Weber, D. D. & Ridgway, G. J. 1967. Marking Pasific salmon with tetracycline antibiotics. J. Fish. Res. Bd. Can. 24. 4. 849-865.
- Wilson, C.A., Beckman, D.W., and Dean, J.M. 1987. Calcein as a Fluorescent Marker of Otoliths of Larval and Juvenile Fish. Transactions of American Fisheries Society 116. 668- 670.



Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse og mattrygghet med uavhengig forvaltningsstøtte til departementer og myndigheter som primæroppgave. Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium i Oslo og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø, med til sammen ca. 330 ansatte.

www.vetinst.no

Tromsø

Stakkevollvn. 23 b · 9292 Tromsø
9010 Tromsø
t 77 61 92 30 · f 77 69 49 11
vitr@vetinst.no

Harstad

Havnegata 4 · 9404 Harstad
9480 Harstad
t 77 04 15 50 · f 77 04 15 51
vih@vetinst.no

Bergen

Bontelabo 8 b · 5003 Bergen
Pb 1263 Sentrum · 5811 Bergen
t 55 36 38 38 · f 55 32 18 80
post.vib@vetinst.no

Sandnes

Kyrkjev. 334 · 4325 Sandnes
Pb 295 · 4303 Sandnes
t 51 60 35 40 · f 51 60 35 41
vis@vetinst.no

Trondheim

Tungasletta 2 · 7047 Trondheim
Postboks 5695 Sluppen · 7485 Tr.heim
t 73 58 07 27 · f 73 58 07 88
vitr@vetinst.no

Oslo

Ullevålsveien 68 · 0454 Oslo
Pb 750 Semtrum · 0106 Oslo
t 23 21 60 00 · f 23 21 60 01
post@vetinst.no

