

**MARQUAGE VITAL EN MASSE
CHEZ L'ANGUILLE (*ANGUILLA ANGUILLA*)
A L'AIDE D'UNE TECHNIQUE
DE BALNEATION RAPIDE**

Marina ALCOBENDAS¹, Frédérique LECOMTE¹,
Hélène FRANCILLON-VIEILLOT¹, Jacques CASTANET¹,
François J. MEUNIER¹, Philippe MAIRE²

RESUME

L'immersion de civelles (*Anguilla anguilla* L.), pendant 3'30, dans une solution hyperosmotique (5 % de chlorure de sodium) contenant 1 % de chlorhydrate de tétracycline (CHTC) ou 2 % de fluorescéine (DCAF) entraîne une accélération de la vitesse d'entrée de ces deux marqueurs vitaux dans l'organisme des poissons et assure un bon marquage des vertèbres et des otolithes. La mise au point d'une méthode de balnéation rapide dans la tétracycline par choc osmotique, sur de très grosses quantités de civelles, a permis de réaliser des alevinages expérimentaux de 500 kg de poissons dans le Rhin et 16 kg dans un étang de la Somme. Un an après cet alevinage de civelles, dix anguillettes (réparties pour moitié dans chaque milieu) présentant des otolithes marqués par la tétracycline ont été recapturées.

VITAL MASS LABELLING OF GLASS-EELS (*ANGUILLA ANGUILLA* L.) WITH FAST BALNEATION

ABSTRACT

*Immersion of glass-eels (*Anguilla anguilla*), for about three and half minutes, in an hyperosmotic solution (5 % sodium chloride) and containing 1 % of tetracycline chlorhydrate (CHTC) or 2 % of calcein (DCAF), resulted in a fast uptake of these two vital fluorochroms into the fish and a good labelling of vertebrae and otoliths occurred.*

¹ UA CNRS N°1137, Equipe de Recherche "Formations squelettiques", Laboratoire d'Anatomie Comparée, Université Paris 7, 2, Place Jussieu, 75251 PARIS Cedex 05

² Conseil Supérieur de la Pêche, Délégation régionale N°3, 18 rue de Nomeny, 57158 MONTIGNY-LES-METZ

Development of a method of fast mass vital labelling with tetracycline by balneation-shock osmotic of high quantity of elvers, allowed experimental fry release (500 kg in the river Rhine and 16 kg in a pond of the river Somme). One year after, ten young eels (equally distributed in the two rivers) with labelled otoliths have been recaptured.

INTRODUCTION

D'une manière générale l'étude de la biologie ou de l'écologie des poissons nécessite la mise au point de méthodes de reconnaissance des animaux dans le milieu naturel.

Les plus classiques, en liaison avec les techniques de marquage-recapture, sont les marques externes, les tatouages ou les marques chimiques par injection sous-cutanée (Jakobson, 1970 ; Laird et Stott, 1978 ; Herbinger *et al.*, 1990). Cependant ces techniques sont surtout adaptées aux sub-adultes ou adultes et restent relativement stressantes pour le poisson.

De nouvelles méthodes moins lourdes à mettre en oeuvre ont été mises au point pour des individus plus jeunes et/ou de petite taille. Ce sont les implants magnétiques (Champigneulle *et al.*, 1987), les chocs thermiques qui provoquent une strie particulière sur les otolithes (Mosegaard *et al.*, 1987) et, enfin, le marquage vital en masse (Tsukamoto, 1985, 1988 ; Nagiec *et al.*, 1985, 1988 ; Alcobendas *et al.*, 1991).

Ce dernier est généralement utilisé pour étudier différents aspects de la dynamique de l'ostéogenèse et du remaniement osseux (Milch *et al.*, 1957 ; Meunier, 1972 ; Boivin et Meunier, 1978 ; Meunier et Boivin, 1974, 1978 ; Boujard et Meunier, 1991). C'est également un très bon moyen de validation des lectures d'âge par squelettochronologie (Van Coillie, 1967 ; Campana et Neilson, 1982 ; Neilson et Geen, 1982 ; Beamish et McFarlane, 1983 ; Beamish *et al.*, 1984 ; Dekker, 1986 ; McFarlane et Beamish, 1987 ; Tsukamoto, 1989). Les marqueurs utilisés se fixent sélectivement sur les surfaces des tissus squelettiques (cartilage, dents, os) et les otolithes en voie de minéralisation (Meunier, 1974 ; Meunier et Boivin, 1978). L'administration du fluoromarqueur se fait le plus souvent par injection (Kobayashi *et al.*, 1964 ; Weber et Rigdway, 1967 ; Meunier, 1974 ; McFarlane et Beamish, 1987), ce qui limite le nombre d'animaux manipulables. Afin d'augmenter ce nombre et pour pouvoir travailler sur de petits animaux (alevins et larves), on peut ajouter le fluorochrome à la nourriture (Weber et Rigdway, 1967 ; Nagiec et Nagiec, 1983) ou, mieux, le dissoudre dans le milieu et réaliser, ainsi, un marquage par balnéation (Weber et Rigdway, 1967).

La balnéation est une des formes de marquage les plus prometteuses pour traiter une grande quantité d'alevins (Schmitt, 1984 ; Tsukamoto, 1985). Cependant les temps de balnéation cités dans la littérature sont en moyenne de 12 à 48 heures pour obtenir un taux de marquage suffisant (Schmitt, 1984 ; Tsukamoto, 1985 ; Dabrowski et Tsukamoto, 1986 ; Wilson *et al.*, 1987) ce qui entraîne un coût et un stress trop importants pour des manipulations de très grosses quantités d'alevins. Nous présentons une nouvelle forme de balnéation permettant de diminuer significativement les temps de manipulation des animaux.

MATERIEL ET METHODES

Afin de réduire le temps d'action des fluoromarqueurs sans altérer leur efficacité, nous avons utilisé la technique du choc osmotique déjà employée pour la vaccination en masse des truites (Amend et Fender, 1976). Couplé à la balnéation ce choc osmotique entraîne une accélération des processus d'absorption des substances actives et, de ce fait, raccourcit considérablement la durée du marquage (Alcobendas *et al.*, 1991). Après la présentation du principe de la technique nous décrivons une première application effectuée à l'occasion d'un alevinage de civelles destiné à l'étude de la croissance de l'anguille dans un milieu ouvert (le Rhin) et un milieu semi-ouvert (un étang de la Somme) ainsi qu'à l'étude de l'impact des alevinages sur les populations naturelles d'anguilles.

MATERIEL

Les expériences ont été faites sur des civelles capturées dans le cours inférieur de la Loire, au début de leur migration anadrome (fin de l'hiver-début du printemps). Les animaux, d'une taille moyenne de 7 cm, sont au stade VB-VIAO selon la classification de Elie *et al.*, (1982). Chaque lot est constitué de 50 civelles. Après traitement par balnéation, les lots sont maintenus dans un aquarium d'eau courante, dans un volume d'environ 20 litres, à une température de 12 +/- 2°C. Les animaux ne sont pas nourris pendant les 15 jours d'observation post-expérimentale.

METHODE DE MARQUAGE

Le but de la méthode de marquage est de faire pénétrer rapidement une quantité suffisante de fluoromarqueur dans l'organisme des poissons et ce, simultanément, pour un nombre important de spécimens.

Deux procédés de marquage en masse des civelles, par choc osmotique, ont été testés :

- Procédé en deux temps : choc osmotique (3 mn 1/2) suivi de la balnéation (3 mn 1/2) ;
- Procédé en un temps : choc osmotique et balnéation simultanés (durée : 3 mn 1/2).

Les lots de 50 civelles sont balnés dans un volume de 100 ml. Le choc osmotique est réalisé avec du chlorure de sodium en solution à 5 % et les fluoromarqueurs employés pour ces expériences sont, dans un premier temps, le chlorhydrate de tétracycline (CHTC) à 1 % et la fluorescéine (DCAF ou calcéine) à 2 % avec 2 % de NaHCO₃ pour une meilleure dissolution du marqueur.

Devant la similitude des résultats obtenus avec les deux procédés pour chacun de ces deux marqueurs, deux autres substances ont été étudiées avec le seul procédé en un temps :

- orangé de xylénol à 2, 3 ou 4 % pendant 3 mn 1/2 et 7 mn ;
- alizarine (sulfonate d'alizarine et alizarine complexon) à 2 % avec 2 % de NaHCO₃ pendant 3 mn 1/2.

Les résultats des différentes balnéations sont comparés à ceux de plusieurs lots témoins :

- choc osmotique sans balnéation : NaCl 5 % de 3 à 10' ;
- témoins dans l'eau courante ;

- témoins dans du bicarbonate à 2 %.

Au bout des 15 jours d'observation, 15 à 20 spécimens sont fixés dans l'alcool à 70°. Les vertèbres caudales et les otolithes sont prélevés et montés entre lame et lamelle après déshydratation pour une observation en microscopie à fluorescence.

RESULTATS

MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE BALNEATION RAPIDE

Nous résumerons ici brièvement les résultats obtenus avec la tétracycline et la fluorescéine, travaux exposés en détail ailleurs (Alcobendas *et al.*, 1991). Nous commenterons plus longuement ceux acquis avec l'orangé de xylénol et l'alizarine.

Tétracycline, Fluorescéine

Il n'y a pas de différences dans le taux de mortalité entre lots témoins et lots traités. Les animaux supportent parfaitement la balnéation rapide qu'elle soit en un ou deux temps.

Il n'y a pas non plus de différences significatives dans la qualité du marquage entre les deux procédés de balnéation rapide tant pour les vertèbres que pour les otolithes. Le procédé en un temps (balnéation-choc osmotique simultanés) qui ne dure que 3 mn 1/2 avec une seule manipulation des poissons a été préféré. Des tests complémentaires ont montré que cette durée de balnéation pouvait être portée jusqu'à 8 à 10 mn sans entraîner d'effets notables sur la survie des civelles. Par ailleurs, le tissu osseux est en général plus facilement marqué que les otolithes pour les deux marqueurs (tableau 1). Le CHTC donne cependant les meilleurs résultats (marquage plus intense).

Tableau 1. Qualité du marquage des otolithes et des vertèbres avec la tétracycline (CHTC) et la fluorescéine (DCAF) ; N = pourcentage de spécimens marqués ; Q = proportion de spécimens présentant un marquage bon ou très bon (d'après Alcobendas *et al.*, 1991).

Marqueur cible			Choc puis balnéation	Choc + balnéation
CHTC	otolithe	N	90 %	100 %
		Q		3 / 5
	Vertèbre	N	50 %	100 %
		Q		4 / 5
DCAF	otolithe	N	60 %	75 %
		Q	2 / 5	2 / 3
	Vertèbre	N	45 %	100 %
		Q	1 / 6	4 / 5

Orangé de xylénol, Alizarine

Ces deux marqueurs, comme les deux précédents, ne provoquent aucun effet nocif sur la survie des civelles. Cependant avec l'orangé de xylénol la proportion d'individus marqués est nettement inférieure à celle obtenue par la tétracycline ou la

fluorescéine (tableau 2). Les espoirs que nous avons mis dans ce marqueur ne sont donc pas concrétisés. En effet, l'otolithe s'avère une cible médiocre pour ce fluorochrome et des bons résultats ne peuvent être obtenus pour l'os (vertèbres) qu'avec de fortes concentrations et des durées d'action relativement longues : 7 minutes.

Pour l'alizarine, seule la forme "*alizarine-complexon*" utilisée par Tsukamoto et Umezawa (1988) a donné des résultats positifs. Avec cette substance, bien que le marquage se réalise chez tous les individus, la marque fluorescente des otolithes n'est pas suffisamment intense pour constituer un marqueur intéressant dans le cadre d'expérimentations à grande échelle. En revanche, le marquage des vertèbres est de bonne qualité.

Pour ces deux fluorochromes, tout se passe comme si l'accessibilité de l'otolithe au marqueur était plus difficile que celle du tissu osseux. Ce résultat rappelle, en plus aigu, celui acquis avec la fluorescéine. Nous n'avons aucune explication à ce phénomène, en l'état actuel de nos connaissances. La configuration cristalline du minéral de l'otolithe (carbonate) et ses relations avec la trame organique (non collagénique) pourraient en être partiellement responsables.

En conclusion, l'emploi de la tétracycline et la fluorescéine est à recommander pour des opérations de marquage vital en masse, l'orangé de xylénol et l'alizarine donnant de moins bons résultats. En revanche, pour des travaux expérimentaux à petite échelle au laboratoire ou dans un milieu fermé de faible volume, ces fluoromarqueurs peuvent compléter utilement la panoplie des substances utilisables, surtout dans le cas de marquages multiples.

Tableau 2. Proportion (%) d'otolithes et de vertèbres marquées et qualité du marquage à l'orangé de xylénol en fonction de la concentration (Conc) et de la durée de la baignade ; F = faible ; B = bon ; TB = très bon.

Conc	Durée	Otolithes	Vertèbres
2 %	3'30	0 %	10 % (F)
	7'	10 % (B)	50 % (1/2 F, 1/2 B)
3 %	3'30	0 %	40 % (3/4 F, 1/4 B)
	7'	30 % (1/3 F, 2/3 B)	70 % (1/4 F, 3/4 B)
4 %	3'30	20 % (1/2 F, 1/2 B)	60 % (2/3 F, 1/3 TB)
	7'	20 % (B)	100 % (1/5 F, 4/5 B à TB)

Marquage rapide de civelles à grande échelle

Des différents résultats obtenus au laboratoire, il ressort que c'est la tétracycline en baignade rapide (procédé en un temps) qui offre les meilleures garanties pour le marquage d'alevins à grande échelle. Nous avons utilisé cette méthode pour un marquage en masse de civelles destinées à des alevinages, respectivement 500 kg dans le Rhin (bassin ouvert) et 16 kg dans un étang de la Somme (bassin semi-fermé).

Les civelles (taille moyenne 69 mm, stade VIA1), capturées dans l'estuaire de la Loire, ont été marquées avec du chlorhydrate de tétracycline (pour 100 kg de civelles : solution de 100 l d'eau, 1 kg CHTC, 5 kg de sel de mer, mixé pendant 45').

Les civelles ont été balnéées par lots de 5 Kg (soit environ 20 000 individus) ; chaque opération (préparation du lot, balnéation, transfert dans le bac de stockage) demande moins de 10 mn. Ce marquage expérimental, réalisé en mars 1989 dans les installations des Etablissements BEAUR, a nécessité 1 jour et demi de travail pour 5 personnes.

L'absence d'augmentation significative de la mortalité dans les 48h suivant l'expérience (par comparaison avec les bacs de stockage voisins) a été observée. Un contrôle de la qualité du marquage sur les vertèbres caudales et les otolithes, 24 h après la balnéation, donne 100 % de spécimens marqués dont 30 % seulement présentent un marquage faible.

Les civelles marquées ont été déversées dans les sites d'alevinage, 48 h pour le Rhin et 4 j pour la Somme, après les opérations de balnéation.

Plus d'un an après les alevinages, des pêches limitées (avril à octobre 1990) ont permis les premières recaptures d'anguillettes balnéées, dans la Somme et dans le Rhin.

- juillet 1990 : dans la Somme, 5 anguillettes marquées sur les 10 capturées : 126 mm de longueur moyenne (120 à 136 mm) ; les cinq autres, non marquées, étant toutes plus grandes (170 à 226 mm) ;
- avril et juin 1990 : dans le Rhin à Kembs, deux anguillettes marquées (115 et 148 mm) sur les 48 pêchées (115 à 232 mm) ;
- juillet et octobre 1990 : dans le Rhin à Rhinau, trois anguillettes marquées (172, 190 et 216 mm) sur 11 capturées (145 à 252 mm).

Ces premiers résultats de capture d'anguillettes marquées, plus d'un an après l'alevinage, montrent la faisabilité de cette technique en milieu naturel et confirment l'intérêt, pour les écologistes des poissons, du marquage vital en masse.

DISCUSSION

Le gain de temps obtenu par la technique de balnéation rapide avec choc osmotique est considérable. En effet, chez les civelles un marquage en balnéation simple (solution de CHTC de 100 à 300 ppM ; DCAF de 100 à 300 ppM) nécessite des bains de 12 à 48 h selon les concentrations (résultats non publiés). Ces valeurs sont du même ordre que celles données par les auteurs pour la balnéation simple chez divers Téléostéens (Hettler, 1984 ; Schmitt, 1984 ; Tsukamoto, 1985 ; Dabrowski et Tsukamoto, 1986). Le choc osmotique, entraînant selon toute évidence une accélération de l'absorption des fluoromarqueurs, permet de diminuer, d'un facteur 300 à 400 environ, la durée de l'expérimentation. C'est certainement un phénomène osmotique naturel équivalent qui intervient dans le cas de marquage d'oeufs de truite au moment de la fécondation (Ruhlé et Grieder, 1989).

Ces premiers résultats, bien que limités, montrent la faisabilité d'une opération de marquage vital en masse, même si le problème de la reconnaissance externe *in natura* des spécimens marqués apparaît comme un facteur limitant à la méthodologie compte tenu, entre autre, de la dispersion des animaux en milieu ouvert. Il faudra donc attendre d'autres recaptures pour obtenir des données utiles sur l'impact de l'alevinage pour les populations naturelles d'anguilles et sur la croissance de l'espèce en milieu naturel (Somme et Rhin dans le cas présent).

Pendant, dès à présent, la mise au point de cette méthode rapide de marquage qui permet de réduire de 3 à 400 fois le temps de balnéation, rend possible le traitement

d'un grand nombre d'alevins en un minimum de temps avec une main d'oeuvre réduite. Cette méthode est a priori applicable à toutes les espèces de poissons pouvant supporter un choc osmotique. Elle doit pouvoir être transposée à différents stades de développement (plutôt les stades jeunes) : larves, alevins ou même oeufs embryonnés. En réduisant le temps d'action des fluorochromes, notre méthode permet de procéder au marquage rapide d'un grand nombre d'animaux, par kilogramme ou dizaines de kilogrammes, avec des manipulations réduites. Elle devrait ainsi voir son champ d'application se développer, notamment dans les travaux d'écologie et les études expérimentales de la croissance du squelette intégrant les premiers stades de développement. Pour ces dernières, il est même possible d'envisager des marquages multiples par des séries successives de baignades rapides.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre gratitude à M. Mabit, Directeur des Etablissements BEAUR (44400 Rezé) pour les facilités qu'il a mises à notre disposition dans la réalisation du marquage vital en masse. Nous remercions M. Decroix, maire de Frise (Somme), qui a accepté de mettre un étang à notre disposition pour notre travail expérimental en milieu semi-ouvert. Nous remercions les établissements SANDOZ qui ont fourni gracieusement le chlorhydrate de tétracycline.

Cette étude a bénéficié d'une aide du Conseil Supérieur de la Pêche : contrat du 30 Juin 1988.

REFERENCES

- ALCOBENDAS M., LECOMTE F., FRANCILLON-VIEILLOT H., CASTANET J., MEUNIER F.J., MAIRE P., 1991. Marquage vital en masse chez l'anguille *Anguilla anguilla* à l'aide d'une technique de baignade rapide. *Bull. Fr. Pêche Pisc.*, 321 (sous presse).
- AMEND D.F., FENDER D.C., 1976. Uptake of bovine serum albumin by rainbow trout from hyperosmotic solutions : a model for vaccinating fish. *Science*, 192 : 793-794.
- BEAMISH R.J., MCFARLANE G.A., 1983. The forgotten requirement for age validation in fisheries biology. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112 : 735-743.
- BEAMISH R.J., MCFARLANE G.A., DHILTON D.E., 1984. Use of oxytetracycline and other methods to validate a method of age determination for sablefish. In : *Proc. Intern. Sablefish Sympos.*, Alaska Sea Grant Report, 83-3 : 95-116.
- BOIVIN G., MEUNIER F.J., 1978. Bone formation and fluorescent labelling in teleost fishes. In : *Symp. "Tissus calcifiés des Poissons"*, Brest, 12-13 Mai 1978 : 5 p.
- BOUJARD T., MEUNIER F.J., 1991. Croissance de l'épine pectorale, histologie osseuse et dimorphisme sexuel chez l'atipa, *Hoplosternum littorale* Hancox, 1828 (Callichthyidae, Siluriforme). *Cybiurn*, 15 : 55-68.
- CAMPANA S.E., 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 : 937-942.

- CHAMPIGNEULLE A., ESCOMEL J., LAURENT P., 1987. Marquage d'ombles chevalier (*Salvelinus alpinus*) de petite taille par injection de micromarques magnétisées. *Bull. Fr. Pêche Pisc.*, 304 : 22-31.
- DABROWSKI K., TSUKAMOTO K., 1986. Tetracycline tagging in coregonid embryos and larvae. *J. Fish Biol.*, 29 : 691-698.
- DEKKER W. 1986. Age reading of european eels using tetracycline labelled otoliths. *Inter. Coun. Explor. Sea*, 16 : 1-14.
- ELIE P., LECOMTE-FINIGER R., CANTRELLE I., CHARLON N., 1982. Définition des limites des différents stades pigmentaires durant la phase civelle d'*Anguilla anguilla* L. (Poisson téléostéen anguilliforme). *Vie Milieu*, 32 : 149-157.
- HERBINGER C.M., NEWKIRK G.F., LANES S.T., 1990. Individual marking of atlantic salmon : evaluation of cold branding and jet injection of alcian blue in several fin locations. *J. Fish Biol.*, 36 : 99-101.
- HETTLER W.F., 1984. Marking otoliths by immersion of marine fish larvae in tetracycline. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 113 : 370-373.
- JAKOBSON J., 1970. On fish and tagging. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 8 : 457-499.
- KOBAYASHI S., YUKI R., FURI T., KOSUGIYAMA T., 1964. Calcification in fish and shellfish. I - Tetracycline labeling patterns of scale, centrum and otolith in young goldfish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 30 : 6-13.
- LAIRD L.M., STOTT B., 1978. Marking and tagging. In : "*Methods for assessment of fish production in fresh waters*", T. Bagenal Ed., IBP Handbook NO 3, Oxford : 84-100.
- MCFARLANE G.A., BEAMISH R.J., 1987. Selection of dosages of oxytetracycline for age validation studies. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44 : 905-909.
- MEUNIER F., 1972. Marquages simples et marquages multiples du tissu osseux de quelques Téléostéens par des substances fluorescentes. *C. R. Acad. Sci.*, 275 : 1685-1688.
- MEUNIER F., 1974. La technique de marquage vital des tissus squelettiques des poissons. *Bull. Fr. Pisc.*, 255 : 51-57.
- MEUNIER F., BOIVIN G., 1974. Divers aspects de la fixation du chlorhydrate de tétracycline sur les tissus squelettiques de quelques Téléostéens. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 99 : 495-504.
- MEUNIER F.J., BOIVIN G., 1978. Action de la fluorescéine, de l'alizarine, du bleu de calcéine et de diverses doses de tétracycline sur la croissance de la truite et de la carpe. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18 : 1293-1308.
- MILCH R.A., RALL D.P., TOBIE J.E., 1957. Bone localization of the tetracyclines. *J. Nat. Cancer Inst.*, 19 : 87-91.
- MOSEGAARD H., STEFFNER N.G., RAGNARSSON B., 1987. Manipulation of otolith microstructures as a mean of mass-marking salmonid yolk sac fry. In : *Proc. V Congr. Europ. Ichthyol.*, Stockholm 1985 : 213-220.

- NAGIEC M., DABROWSKI K., NAGIEC C., MURAWSKA E., 1988. Mass-marking of coregonid larvae and fry by tetracycline tagging of otoliths. *Aqua. Fish. Manag.*, 19 : 171-178.
- NAGIEC M., NAGIEC C., 1983. Marking of juvenile whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) by tetracycline antibiotics. *Rocznik Nauk Rolniczych*, 100 : 107-114.
- NAGIEC M., NAGIEC C., DABROWSKI K., MURAWSKA E., 1985. Marking of juvenile whitefish *Coregonus lavaretus* (L.) with tetracycline antibiotics. *Acta Ichthyol. Piscat.*, 13 : 47-57.
- NEILSON J.D., GEEN G.H., 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 : 937-942.
- RUHLE C., GRIEDER C., 1989. Nouvelle méthode de marquage vital d'oeufs de salmonidés par incorporation osmotique de tétracycline à la fécondation : expériences préliminaires sur des oeufs de truite fario (*Salmo trutta fario*) et de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 315 : 181-188.
- SCHMITT P.D., 1984. Marking growth increments in otoliths of larval and juvenile fish by immersion in tetracycline to examine the rate of increment formation. *Fish. Bull.*, 82 : 237-242.
- TSUKAMOTO K., 1985. Mass marking of ayu eggs and larvae by tetracycline-tagging of otoliths. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51 : 903-911.
- TSUKAMOTO K., 1988. Otolith tagging of ayu embryo with fluorescent substances. *Nip. Suisan Gak.*, 54 : 1289-1295.
- TSUKAMOTO K., 1989. Otolith daily increments in the japanese eel. *Nip. Suisan Gak.*, 55 : 1017-1021.
- TSUKAMOTO K., UMEZAWA A., 1988. Otolith-tagging of leptocephali with fluorescent substance, alizarin complexon. Prel. Rep. Hakuho Maru Cruise KH-86-4, *Ocean Res. Inst. Edt.*, Tokyo, 8 : 45-47.
- VAN COILLIE R., 1967. Etude à l'aide de tétracyclines de la croissance périodique des écailles de Téléostéens. *Nat. Can.*, 94 : 29-58.
- WEBER D.D., RIDGWAY G.J., 1967. Marking pacific salmon with tetracycline antibiotics. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 24 : 849-865.
- WILSON C.A., BECKMAN D.W., DEAN J.M., 1987. Calcein as a fluorescent marker of otoliths of larval and juvenile fish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 116 : 668-670.