

TARTU ÜLIKOOL
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
LOODUSRESSURSSIDE ÕPPETOOL

Heli Kirik

**KALA NAHAVÄRVI MÕJUTAVAD TEGURID JA
MUSTRI ANALÜÜS: EKSPERIMENT
ÜMARMUDILAGA (*Neogobius melanostomus*)**

Magistritöö

Juhendaja: PhD Randel Kreitsberg

PhD Arvo Tuvikene

TARTU 2015

Sisukord

1. Sissejuhatus.....	4
2. Probleemi referatiivne ülevaade.....	7
2.1 Kala värvuse põhialused	7
2.1.1 Värvide päritolu	7
2.1.2 Levinumate kromatofooride tutvustus	8
2.2 Värvimuutuse põhialused.....	11
2.3 Kalade värvust mõjutavad keskkonnategurid	15
3. Materjal ja meetodid.....	19
3.1 Katseliigi tutvustus	19
3.2 Laboratoorsed tööd.....	21
3.2.1 Akvaariumikatsed	21
3.2.2 Videoanalüüs	22
3.2.3 Mikroskoopia ja mustri pildistamine.....	23
3.2.4 Töökäigus saadud andmed.....	24
3.2.5 Läbiviidud andmeanalüüsid.....	24
4. Tulemused.....	25
4.1 Värvimuutus ja käitumine	25
4.2 Ümarmudilate mustri muutlikkus.....	34
5. Arutelu.....	37
Kokkuvõte	43
Summary	45
Tänuavaldused	47
Kasutatud kirjandus	48
Lisa	55

1. Sissejuhatus

Värvus on tähtis osa välimusest, mida on intensiivselt uuritud erinevatel loomarühmadel, putukatest kuni lindudeni ning mis näiteks kalade puhul omab suurt tähtsust nii liikide ökoloogia mõistmises kui ka kalamajanduse korraldamises (Leclercq et al., 2010b; Skold et al., 2013). Värvust kontrollivad geenid võivad kergesti muteeruda, seda on inimesedki tihti ära kasutanud koduloomade aretusel, kuid vabas looduses kohtab kõige sagedamini kas samavärviliste isenditega või vaid mõne erineva värvivariandiga liike, sest vabas looduses elavate loomade värvus on tugeva valikusurve all (Linderholm & Larson, 2013). Organismi värv (nagu kogu üldine välimus) sõltub tema keskkonnast, mõjutades looma haavatavust kiskjatele, liigisisest suhtlemist, sigimispartneri leidmist ning mõnel juhul isegi toiduvalikut (Hurd, 1997; Leclercq et al., 2010b; Pike et al., 2010; Taylor et al., 2014). Paljude selgroogsete jaoks, eriti nende puhul, kelle keha katavad näiteks suled ja karvad, on värvus elu jooksul kas peaaegu staatiline või siis vaid kindlates olukordades muutuv omadus. Näiteks linnud peavad igal aastal pulmarüü saavutamiseks sulgi vahetama (Roulin & Ducrest, 2013). Samas kui imetajatel on kõige levinumateks naha ja karvade toonideks erinevad halli ning pruuni varjundid (kuigi leidub ka erandeid), mille põhiline eesmärk on aidata loomadel taustaga ühte sulanduda ning mida vaid mõned liigid suudavad karvavahetusega erinevate aastaegade tarvis muuta (Caro, 2013). Siiski, erinevalt eelnevalt mainitud loomarühmadest, esineb selgroogsete hulgas ka niisuguseid organisme, kes suudavad oma värvi vastavalt elukeskkonnale ja hetkevajadusele suhteliselt kiiresti korrigeerida. Selliseid loomi leiab nii luukalade (*Osteichthyes*) ülemklassist kui ka kahepaiksete (*Amphibia*) ja roomajate (*Reptilia*) klassidest ning nende värvimuutus võib aega võtta nädalaid või läbi olla juba sekunditega (Leclercq et al., 2010b; Olsson et al., 2013; Skold et al., 2013). Selline keha värvuse operatiivne muutmine on kõigisoojastel selgroogsetel võimalik tänu spetsiaalsetele pigmente sisaldavatele rakkudele, mida nimetatakse kromatofoorideks ehk värvirakkudeks (Fujii, 1969, lk 308). On mõistetav, et võime oma välimust vastavalt vajadusele muuta leevendab liikidele mõjuvat valikusurvet ja võimaldab loomadel kasutada laiemat keskkonnanišši (Skold et al., 2013). Poikilotermsete loomade seas on seejuures kalad mõnevõrra erandlikud, sest erinevalt paljudest kahepaiksetest ja roomajatest (kuid mitte kõigist), juhivad nende värvimuutust nii närvi- kui ka endokriinsüsteem, kusjuures esimene kontrollib harilikult kiiremaid ja teine aeglasemaid toonimuutuseid (Fujii, 2000; Olsson et al., 2013). Kõige silmapaistvamad on muidugi kiired üleminekud ühelt värvi tumeduse tasemelt teisele, mida nimetatakse

füsioloogiliseks värvimuutuseks ja mis mõne kalaliigi puhul võib aega võtta vaid sekundeid (Ramachandran et al., 1996). Kusjuures, kalade värv pole oluline ainult neile endile, vaid ka inimestele, kes selle tunnuse järgi näiteks isendite tervist ja väärtust hindavad (Erikson & Misimi, 2008). Oluline on ka see, et looma kohane värvus on üks neis tunnustest, mis suuresti mõjutavad keskkonnakaitse eesmärgil tagasi loodusesse lastud isendite ellujäävust (Fairchild & Howell, 2004). Teisest küljest aitaks kalade kromatofooride ja neid mõjutavate tegurite parem mõistmine kaasa ka uute ornamentaalsete kalasortide aretamisele (Fujii, 2000). Arusaadavalt on kalade värvusel suur ökoloogiline ja majanduslik tähtsus ning selle valdkonna uurimine haarab enda alla nii käitumisbioloogiat, arengubioloogiat, keskkonnateaduseid kui ka kalamajandust (Leclercq et al., 2010b).

Kuigi loomade värvuse ja värvimuutuse evolutsioonilist olulisust ning mehhanisme on juba mõnda aega uuritud, on selles valdkonnas veel hulgaliselt vastamata küsimusi. Isegi varjevärvuse üksikasjad vajavad paljude oluliste kalagruppide ja liikide puhul veel analüüsimist, eriti melanofooridest erinevate kromatofooride puhul (Leclercq et al., 2010b). Samas on leitud, et peale taustavärvi võivad kalade värvust mõjutada veel mitmed erinevad stressi tekitavad keskkonnategurid: näiteks toksilised ühendid, vee läbipaistvuse muutused, vaenlaste lähedus, UV-kiirgus, ebasobiv temperatuur ja vale toitumine (Hurd, 1997; Fairchild & Howell, 2004; Larsen et al., 2008; Leclercq et al., 2010b; Kelley et al., 2012). Indiviidide välimus on seega pidevalt mitme erineva keskkonnaparameetri mõju all (Pavlidis et al., 2008). Veelgi enam, kromatofoorides leiduvad pigmendid võivad omakorda olla seotud teiste füsioloogiliste komponentidega, näiteks erütrofoorides leiduvad karotenoidid aitavad organismil neutraliseerida vabu hapnikuradikaale (Miki, 1991; Grether et al., 2001). Andmeid esineb ka selle kohta, et kromatofoorides leiduv melaniin võib anda märku nii loomale mõjuvast stressist kui ka indiviidide stressitaluvusest, mille järgi oleks võimalik eristada kalakasvatustesse rohkem ja vähem sobivaid isendeid, kuid niisugused pigmentide ning füsioloogiliste omaduste vahelised potentsiaalsed suhted vajavad veel põhjaliku uurimist (Kittilsen et al., 2009). Samuti alles analüüsitakse, kui palju võiks värvimuutus loomadele maksta, kuidas mustri erinevad ülesanded üksteisega suhestuvad, missugused on värvimuutuse konfliktid, näiteks mil moel mõjutab varjevärvus sekundaarse sootunnusena kasutatavaid värvilaike (Rodgers et al., 2013). Hetkel on näiteks kahtluse all ka see, kas melaniinilaigud saavad olla tõelised sekundaarsed sugutunnused või täidavad seda rolli vaid keskkonnas kättesaadavad ehk

eksogeensed erütrofoorides leiduvad karotenoidid (Speares et al., 2007). Oluline oleks ka mitmesuguste hormoonide, näiteks prolaktiini, mõju parem mõistmine (Leclercq et al., 2010b). Lisaks on liiga vähe teada ka kehasiseste kromatofooride tähtsusest ja tööpõhimõtetest (Skold et al., 2013). Üleüldiselt vajavad edasist detailsemat uurimist nii kiiresti toimuv füsioloogiline kui ka aeglasem morfoloogiline värvimuutus (Ramachandran et al., 1996; Sugimoto, 2002). Seega on poikilotermsete loomade värvimuutuses veel hulga vastuseta küsimusi, millele tulevased uurimustööd võiksid keskenduda.

Käesolevas töös üritasime välja selgitada, millist mõju omavad keskkonna taustavärv, sugu, stress ja nägemisteravus kalade värvusele ning kas katseloomad eelistavad seda substraadi värvi, mille jaoks nad on juba värvimuutuse läbiteinud. Samuti on eesmärgiks anda vähemalt esialgne ülevaade katseloomadeks valitud ümarmudilate (*Neogobius melanostomus*) nahamustrist ja selle osadest. Keskendusime füsioloogilise värvimuutuse uurimisele ja vaatlesime eelkõige melaniini sisaldavate kromatofooride muutuseid. Kalade heleduse määramiseks katsetasime suhteliselt uutset meetodit, kus kasutatakse looma üldise nahatoonihindamiseks pilditöötlusprogrammi histogrammi, nagu seda on varem tehtud võsavaksiku (*Ematurga atomaria*) välimuse analüüsimisel (Sandre et al., 2013).

Uurimustöö probleemide lahendamiseks püstitasime eelnevalt läbitöötatud kirjandusele toetudes viis hüpoteesi:

- Ümarmudilad on võimelised füsioloogiliseks värvimuutuseks.
- Isasloomade tumedus takistab neil füsioloogilise värvimuutuse abil emastega võrdväärse heleduse saavutamist (Kornis et al., 2012).
- Enim stressis kalad jäävad teistest heledamaks.
- Silmaparasiitidega isendite värvimuutus on väiksem.
- Juhul, kui kaladel on valida heleda ja tumeda substraadi vahel, siis nad eelistavad viibida põhjal, millega sarnanemiseks on isendid juba värvimuutuse läbi viinud.

Samuti oli meil kaks lisaeesmärki: Katsetada, kas kalade nahavärvi tumeduse hindamiseks saab kasutada pilditöötlusprogrammi funktsioone ja esmakordselt kirjeldada Soome lahe ümarmudilate mustrit värvimuutlikke komponente. Katseliigi värvi ja mustri selgitamiseks tehti isenditest üldpilte, samuti vaadeldi valgusmikroskoobiga ümarmudilate uimi ning soomuseid. Ümarmudilate tumeduse hindamiseks kasutasime pilditöötlusprogrammi Adobe Photoshop CS4 histogrammi, mida siiani on edukalt rakendatud ööliblikate vastsete värvi analüüsimiseks (Sandre et al., 2013).

2. Probleemi referatiivne ülevaade

2.1 Kala värvuse põhialused

2.1.1 Värvide päritolu

Kalade värv ja värvimuutus põhinevad kromatofooridel ehk spetsiaalsetel värvirakkudel, mida klassifitseeritakse neis sisalduvate pigmentide järgi melanofoorideks, erütrofoorideks, ksantofoorideks, leukofoorideks või iridofoorideks, mis on vastavalt musta, punast, kollast, valget ja metalset lillat kuni rohelist värvi (Fujii, 1969, lk 308). Aastal 1995 avastati ka eelpool nimetatud kromatofooridest palju haruldasemad, siniseid pigmente sisaldavad värvirakud, mis nimetati tsüanofoorideks (Goda & Fujii, 1995). Peale selle on olemas ka mitmeid kromatofoori tüüpe, mis sisaldavad mitut erinevat tüüpi pigmente, sellised on näiteks violetsena paistvad erütro-iridofoorid (Goda et al., 2011). Kromatofooride kuju võib olla erinev, paljude värvirakkude (näiteks melano-, erütro-, leuko- ja ksantofooride) kuju on ebaühtlane, koos paljude sõrmjate dendriitidega (Schliwa, 1986, lk 68). Samas leukofoorid ja iridofoorid koosnevad üksteisele laotud peegeldavatest struktuursetest pigmentidest (Parker, 1998). Kromatofoorid on kogu poikilotermsete loomade värvuse aluseks.

Juba embrüogeneesi käigus tekkinud kromatofore leidub mitmel pool loomade nahas ja kehas. Põhiliselt asuvad värvirakud pärisnahas ehk dermises ja marrasnahas ehk epidermises, kusjuures enamikel liikidel on ülekaalus dermises asuvad kromatofoorid, mis asuvad kohe epidermise all (Parker, 1948, lk 238; Schliwa, 1986, lk 68). Samas leidub kromatofore ka mujal kalade kehas, näiteks silmades ja veresoonte ning siseelundite ümber – kehasiseste kromatofooride paigutus paistab olevat seda tähtsam, mida läbipaistvam on kala (Goda & Fujii, 1996; Nilsson Skold et al., 2010; Skold et al., 2013). Selgroogsetel loomadel pärinevad kromatofooride eelkäijad embrüogeneesi varajases staadiumis tekkivast neuraalharjast (imetajatel, lindudel, kahepaiksetel) või samaväärsetest rakkudest (mõningatel kaladel pole hästi väljakujunenud neuraalharja) ja liiguvad embrüo hilisema arengu käigus organismi laiali, jõudes lõpuks ka väliskatetesse. Värvirakkude eelkäijad võivad värvipigmente tootma hakata juba migratsioonifaasis, kusjuures usutakse, et erinevatel kromatofooride tüüpidel pole mitte oma kindlad eelkäijad, vaid nad kõik pärinevad samadest pluripotentsetest tüvirakkudest. (Schliwa, 1986, lk 68)

Kromatofoorides sisalduvaid värvipigmente grupeeritakse nii keemia, tööpõhimõtte kui ka päritolu alusel (Fox, 1976, lk 13). Põhilised kromatofoorides leiduvad pigmendid on melaniinid, karotenoidid, pteridiinid ja värvitud puriinid (Schliwa, 1986, lk 66). Tööpõhimõtte alusel saab loetletud ained jagada värvilisteks pigmentideks (näiteks melaniinid, karotenoidid, pteridiinid) ja valguse murdmise abil värve tekitavateks pigmentideks (puriinid) (Matsumoto, 1965; Odenthal et al., 1996; Parker & Martini, 2006; Ducrest et al., 2008). Pigmente jagatakse ka endogeenseteks, kui loom suudab neid ise sünteesida (näiteks melaniinid, pteridiinid ja puriinid) ja eksogeenseteks, kui kala saab antud pigmente vaid keskkonnast (karotenoidid) (Fox, 1976, lk 13). Pigmentide graanulid on värvirakkudes organellidesse pakitud, lihtsustades nende rakusisest liigutamist (Schliwa, 1986, lk 66). Siiski, loomade lõplik nahavärv oleneb erinevate kromatofooride koostmõjust, näiteks kahepaiksete puhul on leitud, et ksantofoorid, iridofoorid ja melanofoorid võivad looma nahas asuda kihtidena, tekitades koostöötavaid ja üksteist täiendavaid üksuseid (Bagnara et al., 1968). Kromatofoorides leidub erineva keemilise koostise, tööpõhimõtte ja päritoluga pigmente.

2.1.2 Levinumate kromatofooride tutvustus

Melanofoor on ebaühtlase kuju ja sõrmjate dendriitidega rakk, mille tumeduse määrab pigmente kandvate organellide asend rakus: kui organellid on ühtlaselt üle melanofoori laiali jaotunud, siis paistab rakk tumedam võrreldes sellega, kui pigmendid on vaid värvikandja keskele kogunenud (Bagnara et al., 1968). Melanofooride pruunikasmust värvus tuleneb melanosoomidesse paigutatud melaniinist (Fujii, 1969, lk 308; Schliwa, 1986, lk 66). Melaniin on polümeriseeritud pigment, mida kalad suudavad türosinaasi abil ise türosiinist ($C_9H_{11}NO_3$) sünteesida, mis tähendab, et tegemist on endogeense pigmendiga (Schliwa, 1986, lk 66-67). Loomades leidub kolm melaniini gruppi: pruun eumelaniin, punakaspruun feomelaniin ja kõrgemate selgroogsete kesknärvisüsteemis leiduv neuromelaniin. Kusjuures eumelaniini on siiani ainus kaladest leitud melaniini tüüp (Ducrest et al., 2008; Leclercq et al., 2010b). Melaniini pigmendid on loomadele juba iseenesest kasulikud, kaitstes neid UV kiirguse poolt põhjustatud rakukahjustuste eest – see funktsiooni võib olla nii oluline, et ühe teooria kohaselt oligi UV kiirguse vastane mõju melaniini esmane ülesanne ja krüptilisel eesmärgil hakati melaniinist tulenevat värvust kasutama alles hiljem (Mueller & Neuhauss, 2014). Melaniini rohkus võib mõne loomaliigi puhul aimu anda ka teatud iseloomuomadustest, näiteks lõhe (*Salmo salar*)

puhul avastati, et tumedate täppide hulk looma kehal võimaldas uurijatel ennustada nii kala käitumist kui ka stressihormoonide taset – nimelt rohkem eumelaniini sisaldavad kalad tulid stressiga paremini toime kui nende heledamad liigikaaslased (Kittilsen et al., 2009).

Erütrofoorid on punast värvi tekitavad kromatofoorid (Schliwa, 1986, lk 66). Antud värvirakud saavad oma tooni karotenoididest, pigmentide grupist, mida kalad ise sünteesida ei suuda, vaid peavad need omandama kas otse taimedest või läbi oma saakloomade, mis tähendab, et tegemist on eksogeensete pigmentidega (Fujii, 1969, lk 315). Karotenoidid on rasvlahustuvad, taimede poolt toodetud küllastumata süsivesinikud (Schliwa, 1986, lk 67). Sarnaselt melaniinile on ka karotenoidid loomadele füsioloogiliselt kasulikud: mõned vormid on A-vitamiini prekursoriteks (Fox, 1976, lk 140), teised (eriti astaksantiin) kaitsevad looma vabade hapnikuradikaalide kahjustava mõju eest (Miki, 1991). Karotenoididel põhinev punane nahavärv omab tähtsust nii sugupoolte vahelises, kui ka sugupoolte siseses suhtluses: mõne kalaliigi puhul võivad näiteks dominantsed territoriaalsed isased olla silmapaistvamad punast värvi kui nõrgemad isased, samas ogalike (*Gasterosteus aculeatus*) puhul on tõestatud, et punasemad isased on vähem värvilistest isenditest viljakamad (Dijkstra et al., 2007; Pike et al., 2010). Karotenoidid sobivad isendi tugevust reklaamima just sellepärast, et tegemist on eksogeensete pigmentidega ja piiratud ressursidega keskkonnas on kala punase värvuse ja immuunsüsteemi tugevuse vahel negatiivne seos (Pike et al., 2010).

Ksantofoorid annavad looma nahale kollase või punaka tooni, mis tuleneb organellidesse pakitud pteridiinist, vesilahustuvast ainest, mis koosneb pürimidiini ja pürasiini rõngastest ja on lähedaselt seotud iridofoorides ning leukofoorides leiduvate puriinidega (Schliwa, 1986, lk 67, Fujii, 1969, lk 315). On leitud, et rakkude hilisemas elutsüklis võivad ksantofooridesse ladestuda ka karotenoidid, kuigi selljuhul on küsitav, kas tekkinud kromatofore on mõtet kutsuda ksantofoorideks või mingi muu nimega (Fujii, 1969, lk 315). Peale selle on ka avastatud, et värviliste pteridiinide kõrval leidub ksantofoorides hulgaliselt aine värvusetuid vorme (Schliwa, 1986, lk 67). Seesugused värvusetud versioonid osalevad mitmetes erinevates rakusisestes ja füsioloogilistes protsessides (Leclercq et al., 2010b). Tänapäevaks on teada, et kalad kasutavad ühte pteridiini vormi (7-hüdoksübiopteridiini) muuseas ka alarmina (Win 2000). Lehekonlaste (*Hylidae*) puhul on demonstreeritud, et ksantofoorid osalevad koos melanofooride ja iridofooridega ka funktsionaalsete üksuste moodustamisel ja võivad nahas teistest kromatofooridest kõige kõrgemal paikneda (Bagnara et al., 1968).

Iridofoorid ja leukofoorid sisaldavad organellidesse pakitud läbipaistvaid puriinist (põhiliselt guaniinist) plaadikesi, mis tekitavad värvust tänu struktuuride valgust hajutavatele, murdvatele ja peegeldavatele omadustele (Fujii, 1969, lk 308, Schliwa, 1986, lk 67). Leukofoorid annavad nahale valge tooni ja sisaldavad iridofooridega võrreldes väiksemaid pigmendiplaadikesi, samas kui iridofoorides on suuremad, struktuurselt laotud plaadikesed, mille abil tekitatakse sillerdavaid siniseid ja rohelisi toone (Fujii, 1969, lk 308, Fox, 1976, lk 15). Valge värv tekib siis, kui pigmendiplaadid peegeldatava valguse täielikult hajutavad, kuid teised struktuursete kromatofooride poolt tekitatavad toonid võivad tuleneda näiteks valguse osalisest hajutamisest, interferentsist (kui valguslained ühinevad) või difraktsioonist (kui lained takistustest möödudes painduvad) (Fox, 1976, lk 15). Iridofooride peegeldusvõime oleneb guaniinist struktuuri ülesehitusest, mõnel juhul on võimalik peegeldavate pigmentide asendit spetsiaalsete filamentide abil muuta, teistel juhtudel võivad iridofoorid olla ka täiesti liikumatud ehk passiivsed (Rohrlich, 1974). Struktuursed kromatofoorid võivad loomade nahas koos teiste värvikandjatega komplekte moodustada: näiteks kahepaiksete nahas võivad iridofoorid esineda melanofooride kohal, olles altpoolt melanofooride dendriitidesse mähkunud, mis tähendab, et kui melanosoomid melanofooris disperseeruvad, siis ei paista iridofoorid tumedate pigmentide alt enam välja (Bagnara et al., 1968). Iridofooride ja leukofooride kasutamine on looma jaoks vähem energiakulukas, kui värviliste pigmentide ülalhoidmine. Struktuuride poolt tekitatud värvide puhul on oluline vaatleja asukoht, kuid õige nurga alt vaadates, võivad sellised värvid (ka samades valgustingimustes) välja paista palju tugevamini, kui värvipigmentide põhjustatud toonid. (Parker, 1998)

2.2 Värvimuutuse põhialused

Paljud kalade mustrid ja värvikombinatsioonid võivadki olla staatilised ning muutuda vaid evolutsioonilises ajaskaalas, kuid on ka neid organisme kes suudavad oma kehavärvi oma elu jooksul muuta. Mõningate kalaliikide puhul võivad värvimuutused toimuda pikema eluperioodi vältel, kauakestva kohanemisprotsessi käigus ja püsida hiljem suhteliselt muutumatuna. Samas on ka neid, kelle puhul on värvus väga muutlik omadus. Peale selle, et isendi värvimuutmisvõime oleneb tema liigist, võib värvuse plastilisus varieeruda ka perekondade vahel, mida on täheldatud näiteks võldja *Cottus aleoticus* pesakondade võrdlemisel. Välimuse plastilisusest tulenev kasu oleneb kala eluviisist, nimelt erinevate ühes veekogus elavate liikide võrdlemisel pandi tähele, et bentiliste kalade jaoks võib värvi- ja mustrimuutus olla tulusam ning olulisem kui pelaagilistele liikidele. Võime värvi muuta lubab isendil kasutada laiemat ökoloogilist nišši, vähendades loomale mõjuvat valikusurvet. (Fairchild & Howell, 2004; Cox et al., 2009; Bergstrom et al., 2012; Skold et al., 2013).

Kalad võivad oma värvi muuta mitmetel erinevatel eesmärkidel. Pajudel kalaliikidel, teiste seas ka lõhel (*Salmo salar*), toimub oluline värvimuutus enne sigimisaega, sest spetsiifiline pulmavärv on levinud sekundaarne sootunnus, mis ausa signaalina aitab loomadel oma kvaliteeti reklaamida (Kodricbrown & Brown, 1984; Leclercq et al., 2010a). Värvusel põhinev kommunikatsioon ei pruugi piirduda vaid paarilise valikuga: ahvenaliste (*Perciformes*) seltsi kuuluvate kaladega tehtud katsetest on järeldatud, et mõned liigid võivad mustrikombinatsioonide abil väljendada näiteks häireseisundit, agressiooni ja järglaste eest hoolitsemist, kusjuures niisugused värvimuutused võivad toimuda juba sekunditega (Rodrigues et al., 2009). Kalade omavaheline kommunikatsioon võib mõnel juhul osutuda üllatavalt täpseks, näiteks isekeskis võitlevad ahvenalised *Nannacara anomala* signaliseerivad läbi mustrimuutuste ka spetsiifilisi antagonistlike käitumismalle (Hurd, 1997). Loomulikult on värvimuutus väga kasulik ka põhja hästi matkiva ja vajaduse korral uuesti muudetava varjevärvuse saavutamisel (Skold et al., 2013). Kalade võimekus erisuguste substraatide matkimisel on liigiti erinev, äärmusliku näitena võib välja tuua, et näiteks troopiline rombkala *Bothus ocellatus* suudab nii homogeenseid substraate kui ka erinevaid mustrikombinatsioone, nagu täppe ja laiike, juba mõnekümne sekundiga arusaadavalt väljendada (Ramachandran et al., 1996). Võimetus oma keskkonnaga sulanduda, kas siis läbi värvimuutmise või substraadieelistuse, suurendab loomade

haavatavust: näiteks lestlase *Pseudopleuronectes americanus* puhul tõestati, et kasvandustest pärit isendid, kelle värv ei vastanud pärast vabadusse laskmist täpselt metsiku tüübi värvile, söödi kiskjate poolt kõige kiiremini ära (Fairchild & Howell, 2004).

Kalade värvimuutus põhineb muidugi kromatofooridega toimuvatel muutustel (Fujii, 2000). Värvimuutuse saavutamiseks toimuvaid muutuseid jagatakse füsioloogilisteks ning morfoloogilisteks, mis reeglina toimuvad üheaegselt (Schliwa, 1986, lk 66):

- Füsioloogilise värvimuutuse käigus toimuvad muutused kromatofooride sees. Värvipigmentidega organelle on võimalik rakus ümber paigutada nii, et neid jääb vaatelejale kas rohkem või vähem näha. Kromatofoori värv tundub tumedam, kui kromatoomid on rakupiiride ulatuses laiali jaotunud ja heledam, kui organellid on raku keskele kokku kogunenud ning ülemised pigmendikandjad varjavad alumisi. Füsioloogilist värvimuutust võivad läbi viia ka guaniinistruktuuridel põhinevad kromatofoorid, kui neis leiduvad peegeldavad plaadikesed muudavad valgusallika suhtes asendit. Füsioloogiline muutus toimub kiiresti, mõnel juhul juba sekunditega, kuid võib aega võtta ka mõned tunnid. (Rohrlich, 1974; Schliwa, 1986, lk 65; Ramachandran et al., 1996; Leclercq et al., 2010b)
- Morfoloogiline värvimuutus tähendab muutuseid kromatofooride ja pigmentide arvus. Värvirakke või neis sisalduvate pigmentide hulka võidakse kas suurendada või vähendada. Sellised protsessid on järkjärgulised ja silmaga raskesti märgatavad, kuid ülemineku lõppedes võib toimunud olla drastiline muutus. Morfoloogiline värvimuutus on seega pikaajaline protsess, milleks võib kuluda päevi või isegi nädalaid. (Schliwa, 1986, lk 65-66; Fujii, 2000; Leclercq et al., 2010b)

Kromatofoorides toimuvaid muutused võivad toimuda nii otsese ehk primaarse kui ka kaudse ehk sekundaarse mehhanismi abil (Oshima, 2001). Kaudseks mõjutuseks loetakse seda, kui värvirakk reageerib looma närvi- või hormonaalsüsteemi juhistele. See tähendab, et närvisüsteem saab kromatofoore mõjutada elektriimpulsside abil ja hormonaalsüsteem edastab informatsiooni tänu veres või lümfivedelikus liikuvatele hormoonidele. Varem arvati, et kaudsetest värvimuutuse tekitajatest on tähtsam just endokriinsüsteem, kuid tänapäeval kaldutakse mõtlema just vastupidist. Otseseks värviraku mõjutamiseks loetakse olukorda, kus kromatofoor puutub kehavälist päritolu mõjutajaga vahetult kokku: sellisteks faktoriteks võivad olla näiteks valgus, temperatuur ja keskkonnakemikaalid. (Parker 1948, lk 5)

Sekundaarses värvimuutuses võib osaleda hulk erinevaid aineid. Kalad saavad pidevalt läbi meeleelundite informatsiooni väliste stiimulite kohta, keskkonnast omandatud signaalid liiguvad mööda närve isendi kesknärvisüsteemi, kus andmed töödeldakse ja seejärel saadetakse signaal vastavate hormoonide või närviimpulssidega värvirakkudesse, mille sisesed muutused toimuvad tänu mootor-proteiinidele nagu tubuliin, kinesiin ja düneiin (Fujii, 2000). Nii kromatofooride tekkimist, apoptoosi kui ka pigmentide dispersiooni ja agregatsiooni mõjutavad mitmesugused hormoonid, millest olulisemad on näiteks α -melanofoore stimuleeriv hormoon (α MSH), melaniini kontsentreeriv hormoon (MCH), prolaktiin, adenokortikotroopne hormoon (ACTH), melatoniin ja mitmed steroidsed suguormoonid (Fujii, 2000; Leclercq et al., 2010b). Erinevate hormoonide mõju tähtsus võib erisuguste kalaliikide puhul varieeruda, näiteks harilike pagraste (*Pagrus pagrus*) puhul ei leitud seost taustavärviga kohanemise ja α MSH hulga vahel ning järeldati, et antud liigi puhul võivad olulisemad olla hoopis MCH ja katehhoolamiinid (Van der Salm et al., 2006). Teisest küljest on kindlaks tehtud, et α MSH roll organismis ei piirdu vaid kala naha tumedamaks muutmisega ehk melanosoomide rakus laiali levitamisega, nimelt α MSH võib omada rolli ka looma stressivastuses (Van der Salm et al., 2005). Seega võib sekundaarne värvimuutus kalades toimuda tänu nii närviimpulssidele kui ka paljudele erisugustele hormoonidele.

Kromatofooride hetkekonfiguratsioon ja sekundaarne värvimuutus sõltuvad nii kala nägemisvõimest kui ka keskkonnas leiduvast valgusest. Seejuures on teada, et kunstlikult pimedaks tehtud kalad omandavad nägijatest erineva nahatoonini (Rasquin, 1946; Gentle, 1971). Näiteks P. Rasquin tegi kuldkaladega (*Carassius auratus auratus*) katse, mis näitas, et need isendid, kes optiliste närvide läbilõikamisega pimedaks tehti, omandasid mõne kuuga pruunika värvuse, kuigi nad olid enne operatsiooni oranžid. Samas katses hoiti ka kahte nägijat kuldkala mitu kuud täielikus pimeduses ja katse lõpus olid need isendid vähem pigmenteerunud, hilisemal naha mikroskoopimisel küll leiti melanofoore, kuid nende pigmentidega organellid olid rakku keskele kontsentreerunud. Tolles töös järeldati nii oma eksperimendi kui ka eelneva kirjanduse põhjal, et kalade värvus oleneb nii nägemisest kui ka isendi kehale jõudvast valgusest. Ühes sarnases eksperimendis, mis viidi läbi lepamaimudega (*Phoxinus phoxinus*), uuriti nii optiliste närvide lõhkumise kui ka ajust nägemiskeskuse eemaldamise mõju kalade värvusele. Selles töös leiti, et ühest silmast pimedad kalad muutsid värvi sama hästi kui tervete silmadega isendid, olenemata sellest, kas eemaldatud oli antud silma nägemisnärv või üks ülakünka pool. Kui kalad tehti

optiliste närvide katkestamisega täiesti pimedaks, siis alguses muutusid kõik isendid tumedaks, kuid hiljem muutusid pooled neist jällegi heledaks. Samas, ülakünka täielikul eemaldamisel muutusid lepamaimud alguses just heledaks ja hiljem omandasid uuesti tumedama värvuse. Järeldati, et ülaküngas kontrollib piklikajus asuvat kala kahvatumist mõjutava keskuse tegevust. Kirjeldatud töös ei täheldatud, et kalad pärast pimedaks jäämist vastavalt põhjale värvi muudaksid. Siiski, veelgi uuemas kokkuvõtlikus töös toodi välja, et pimedate kalade kromatofoorid võivad siiski vastavalt valgusele värvi muuta. Selles töö esitatud andmed näitavad, et valguse primaarsele mõjule võivad mõnel juhul reageerida kõik peamised kromatofooride tüübid, kuigi värvirakus toimuvad muutused, ehk siis see kas rakk läheb heledamaks või tumedamaks, on liigispetsiifilised ja siiani tõestatud vaid väheste kalaliikide puhul. (Rasquin, 1946; Gentle, 1971; Oshima, 2001)

2.3 Kalade värvust mõjutavad keskkonnategurid

Kalade nahavärv allub multiparameetrilisele kontrollile: isendi välimust mõjutavad igal ajahetkel mitmed erinevad keskkonnategurid, mis võivad muuta nii kromatofooride ja pigmentide hulka kui ka pigmentidega organellide asendit (Fujii, 2000; Pavlidis et al., 2008). Kalade värvus on tähtis nii isenditele endile kui ka inimestele. Näiteks üks oluline kalade väljanägemisega seotud probleem on see, kui vesiviljeluses kasvatatud isendite värv erineb vabas looduses kasvanud liigikaaslastest – ebaharilik välimus langetab kasvandustes toodetud kalade hinda ja väärtust (Pavlidis et al., 2008). Nimelt, kalade nahavärvuse erinemine harilikust liigiomasest toonist võib anda informatsiooni nii isendi tervise, heaolu kui ka ebasobivate keskkonnaparameetrite kohta: näiteks erinevates uurimustöodes on leitud, et kalade morfoloogilist värvimuutust võivad esile kutsuda järgmised abiootilised tegurid: stress, temperatuur, UV kiirguse intensiivsus, valgustsükli pikkus, toidu kvaliteet, vee läbipaistvus ja vesikeskkonnas leiduvad ained (Mojovic et al., 2004; Pavlidis et al., 2008; Leclercq et al., 2010b; Kelley et al., 2012). Tõenäoliselt mängivad loetletud tegurid rolli ka füsioloogilise värvimuutuse juures, sest pikema aja jooksul toimunud muutustest võtavad arvatavasti osa mõlemad mehhanismid (Schliwa, 1986, lk 66). Seega võivad morfoloogilist ning füsioloogilist värvimuutust mõjutada paljud erinevad keskkonnategurid – seda nii kaladele ja inimestele kasulikus kui ka kahjulikus suunas.

Valgus on äärmiselt oluline värvuse eksogeenne mõjutaja. Mõned kalaliigid saavad, vastavalt vees paremini levivale valgusele, muuta liigisiseseks suhtlemiseks mõeldud värvisignaalide tooni ja eredust, et tagada signaalide parem levimine (Kelley et al., 2012). On kindlaks tehtud, et mõnel juhul muudab elupaiga põhja värvus naha melaniinisisaldust rohkem kui kiirgustugevus, kuid samas võib nahavärvide eredus oleneda ka isendile langeva valguse värvist, vastavalt sellele, millise lainepikkusega valgus vesikeskkonnas paremini levib (Pavlidis et al., 2008). Harilike pagrustega (*Pagrus pagrus*) tehtud uurimustöös tuli välja, et valguse intensiivsus suurendas põhjavärvi efekti kala nahavärvile; samas katses leiti, et antud liigi välimus olenes ka langeva valguse lainepikkusest – nimelt sinise valguse all elanud kalad muutusid heledamaks (Van der Salm et al., 2004). Peale selle on avastatud, et akvaariumi valgustuse värvus mõjutab ka kalade stressivastust, näiteks niiluse tilapia (*Oreochromis niloticus*) mõjuvad teatud värvid rahustavalt: pärast kalade häirimist ventileerisid valge valguse all olnud kalad tugevamini kui sinise valguse all viibinud loomad ja sellest järeldati, et mugavas elupaigas

on kalad stressile vastupidavamad, kusjuures keskkonna sobivus oleneb muuhulgas langeva valguse värvist (Maia & Volpato, 2013). Ka nähtavast valgusest lühema lainepikkusega kiirgus mõjutab kalade värvi, nimelt üks melaniini omadustest on valguse neelamine ja melanofooride näol on tegemist tõhusa kaitsega UV kiirguse vastu. Katsed on näidanud, et UV kiirgusele enim eksponeeritud kalad tumenevad, kusjuures selline muutus võib toimuda juba 48 tunniga, mille järgi võiks arvata, et tegemist võib olla melanosoomide disperseerumise ehk füsioloogilise värvimuutusega (Fabacher & Little, 1995; Leclercq et al., 2010b). Seega oleneb kalade värv nii sellest, kuidas valgus antud vesikeskkonnas levib kui ka kiirgustugevusest, valguse lainepikkusest ja UV kiirgusest.

Samas on kalade värvimuutused tihti seotud stressireaktsiooniga (Van der Salm et al., 2004). Üheks stressiallikaks võib olla liigne isendite hulk mingis ruumalas, näiteks harilike pagruste (*Pagrus pagrus*) puhul on näidatud, et ülerahvastatus tõstab kalade kortisooli taset, kuid selle leiu seos värvimuutusega on veel lahtine, sest kui ühes katses tõusis stressihormoonide tase ja värvimuutust ei paistnud, siis hilisemas töös ei täheldatud jällegi kortisooli kasvu, kuid kalad muutusid tumedamaks (Rotllant et al., 2003; Van der Salm et al., 2004). Arvatakse, et melaniini-põhine värvus ja looma stressiga toimetuleku võime on omavahel seotud (Kittilsen et al., 2009). Mitmete liikide puhul on täheldatud, et vangistuse stress tekitab esmalt naha tumenemist ning hiljem kahvatumist, mille käigus katseloomad muutuvad heledamaks kui kontrollisendid: näiteks lõhe (*Salmo salar*) puhul on katsed näidanud, et loomade kurnamine enne tapmist mõjutas nii naha kui ka liha värvust, kuigi tekkinud erinevused peaaegu kadusid pärast nädala pikkust kalade jää l hoiustamist (Erikson & Misimi, 2008). Arusaadavalt võivad kalades stressi tekitada kõik liigile ebasobivad keskkonnatingimused, näiteks on leitud seos vee pH ja kalade värvimuutuse vahel. Ühes mosambiigi tilaapiaga (*Oreochromis mossambicus*) läbiviidud töös märgati, et ebasobivalt happelises vees oli kalade keskkonnaga kohanemise suutlikus pidurdatud: madala pH tasemega akvaariumites olid hallil ja mustal põhjal olevad loomad heledamad ning valgel substraadil elavad loomad vastupidi tumedamad kui kontrollisendid, seejuures antud teadustöös järelitati, et α MSH kontroll mängib rolli nii värvimuutuses kui ka stressoritega kohanemises (Van der Salm et al., 2005). Sellest võib järeldada, et stress on oluline kalade värvust mõjutav tegur.

Ka toitainetel on kala nahavärvusele oluline mõju. Punase värviga ornamenteeritud liikide jaoks on eriti oluline just karotenoidide kättesaadavus, sest tegemist on eksogeense pigmendiga, mida kalad ise toota ei suuda; kuid täisväärtusliku toidu puudumine võib

mõjutada ka melaniini sünteesi (Leclercq et al., 2010b). Karotenoididel on tähtis osa nii liigisisel kui ka liikidevahelisel kommunikatsioonil, kuid punast värvi võivad tekitada ka pteridiinid. Tihti leidubki kalade punastel aladel mõlema grupi pigmente, kuid vähemalt gupide (*Poecilia reticulata*) puhul avastati, et nad ei suurenda sekundaarsetes sugutunnustes pteridiinide osakaalu, isegi kui keskkonnas on karotenoidide puudus (Grether et al., 2001). Karotenoidide vähesuse korral peavad kalad valima, kas kasutada antud pigmente signaliseerimiseks või mujal kehas antioksüdantidena: näiteks isased ogalikud (*Gasterosteus aculeatus*) keda toideti suurema hulga karotenoididega viljastasid suurema protsendi marja, kui nende toitainetevaesemat sööki saanud liigikaaslased (Pike et al., 2010). Toidu kättesaadavusest ja kvaliteedist võib oleneda, kui palju vaba energiat on kaladel värvimuutuse läbiviimiseks (Rodgers et al., 2013). Niisiis võib toitainete vähesus piirata kalade värvuse väljendumist.

Kalade kromatofore mõjutab ka temperatuur, sest jahedam keskkond vähendab rakusiseseid protsesse (Fujii, 2000). Harilike pagrustega (*Pagrus pagrus*) läbiviidud katses leiti, et temperatuuri mõju naha värvusele ei ole ainult ühepidine seos: nimelt isendid, keda hoiti temperatuuril 19°C, olid eredamad ja enam agregeerinud melaniiniga kui need loomad, keda peeti 15°C või 23°C vees (Pavlidis et al., 2008). Vee soojus omab mõju ka karotenoididel põhineva värvuse avaldumises: näiteks kuldkalade (*Carassius auratus*) oranžikaspunane värv paistab kõige eredam temperatuurivahemikus 26°C kuni 30°C, kusjuures kõige silmapaistvam toon tuvastati 28°C juures (Gouveia & Rema, 2005). Kalakasvandustes hoitud sägade (*Silurus glanis*) uurimine demonstreeris, et soojematel temperatuuridel hoitud loomadel esines rohkem rohekaid ja kollaseid toone, kui nende külmemates tingimustes hoitud liigikaaslastel (Hallier et al., 2007). Seega oleneb kalade värvus märgatavalt keskkonna temperatuurist.

Kalade välimus oleneb ka keskkonnas levivatest keemilistest ainetest. Vees leiduvad kemikaalid tõenäoliselt ei suuda kalade kromatofore otse läbi naha mõjutada, sest värvirakud on väliskeskkonna keemilise toime eest küllaltki hästi kaitstud, kuid toksiinid võivad kromatofore otseselt mõjutada pärast seda, kui nad on looma kehasse juba toidu või veega sisenenud, näiteks läbi seedetrakti või lõpuste (Fujii, 2000). Kemikaalide otsest mõju värvirakkudele tõestab ka see, et kalanahast eraldatud kromatofooride kultuurid on paljulubavaks meediumiks toksiinide tuvastamisel: erinevad kemikaalid kutsuvad kromatofoorides esile spetsiifilisi muutuseid ja aineid saab üksteisest eristada näiteks selle

järgi, kui kiiresti värvikandjas mingisugune muutus toimus, kui tugev see oli, kas pind läks heledamaks või tumedamaks ning kas muutus sõltus aine kontsentratsioonist või mitte (Mojovic et al., 2004). Elusate kalade puhul on näidatud, et suguküpsede isaste värvust võivad mõjutada ökoöstrogeenid, näiteks gupidega (*Poecilia reticulata*) läbiviidud akvaariumikatsed näitasid, et kunstlike östrogeenidega töödeldud vees elavatel isenditel vähenes 30 päeva jooksul oranžide laikude hulk – niisugune erinevus jäi püsima ka pärast seda, kui katses kasutatud loomi hoiti 3 kuud puhtas vees (Toft & Baatrup, 2001).

Arvatakse, et värvil ja värvimuutusel on ka oma maksumus: kõige lihtsam näide sellest on muidugi asjaolu, et sekundaarsed sootunnused muudavad neid omava isendi kiskjatele lihtsamini nähtavaks (Kodricbrown & Brown, 1984). Kuid peale selle on värvimuutus tõenäoliselt ka energeetiliselt kulukas: näiteks võldjate perekonda kuuluva liigiga *Cottus aleuticus* tehtud katsetes leiti, et muutuva värviga keskkondades elavatest katsekaladest suri töö lõpuks suurem protsent isendeid, kui nende muutumatutes värvitingimustes viibinud liigikaaslastest, kusjuures morfoloogilise värvimuutuse mõju suremusele oli suurem kui füsioloogilise värvimuutuse oma (Bergstrom et al., 2012). Gupide (*Poecilia reticulata*) puhul on näidatud, et muutliku värvusega keskkonnas elavad isendid sõid rohkem, kui nende muutumatul taustal elavad liigikaaslased. Sellest järeldati, et värvimuutus on gupidele ilmselt kulukas tegevus ja kalad peavad kaotatud energia suuremate toiduportsjonitega taastama. Sama artikli raames tehti ka ennustus, et kui kaladel ei oleks kulutatud ressursi kompenseerimiseks piisavalt toitu, siis võiks sage värvimuutus halvasti mõjuda näiteks kala kasvule. (Rodgers et al., 2013)

Keskkond on oluline kalade värvuse mõjutaja, kuid mõnel juhul mõjutab isendi värvus ka tema keskkonna ja kaaslaste valikut. Gupidega (*Poecilia reticulata*) läbiviidud katse näitas, et kalad võivad tõesti eelistada oma värviga sarnanevaid keskkondi ja liigikaaslaseid, kuigi tuli välja, et kui musta põhjaga harjunud kalad eelistasid tumedaid kaaslaseid ja tumedat substraati, siis valge alusega kohanenud loomad soosisid heledaid kalu ja neutraalset värvi ümbrust, vältides nii musta kui valget aluspinda (Rodgers et al., 2013). Oma värvusega sobiva substraadi valikut tuvastati ka vangistuses kasvatatud ja hiljem vabadusse lastud lestlasel *Pseudopleuronectes americanus*: ka selles uurimustöös eelistasid heledad isendid neutraalset pinda ja tumedad isendid tumedamat substraati, kuigi märgati, et pikema aja jooksul liikus rohkem kalu neutraalset värvi põhjale (Fairchild & Howell, 2004).

3. Materjal ja meetodid

3.1 Katseliigi tutvustus

Ümarmudil (*Neogobius melanostomus*, Pallas, 1814) on pika, ristlõikes ümara keha ja otsseisuse suuga ahvenaliste (*Perciformes*) seltsi ning mudillaste (*Gobiidae*) sugukonda kuuluv põhjaeluviisiga kala (Kornis et al., 2012). Ümarmudilad pärinevad Ponto-Kaspia regioonist (piirkond, mis haarab enda alla Aasovi, Musta ja Kaspia mere) ning on eurütermsed ja –haliinsed (Adjers et al., 2006). Ümarmudilate värvust on kirjeldatud varieeruvana, alates pruunidest toonidest kuni halli ja rohekaskollaseni, kusjuures loomade seljal on tavaliselt eristatavad ka suured laigud. Uimed on harilikult halli värvi ja esimesel seljauimel on suur must laik. Katseliigil esineb seksuaalne dimorfism – isased ümarmudilad on suuremat kasvu, ümaramate põskedega ja tumedamat värvi. Mis tähendab, et sigimisperioodil on suguküpsed isased peaaegu ühtlaselt tumedat värvi. Siiski kõige lihtsamini saab emaseid ja isaseid isendeid eristada kõhuuime taga asetseva urogenitaaljätke abil, mis on emaste puhul lai ja tõmp kuid isastel kitsas ning terav (Kornis et al., 2012).

Ümarmudilate välimusega seoses pole varem palju katseid tehtud, kuid mõnes töös on isendite värvust siiski arvesse võetud. Eelnevad laborikatsed on näidanud, et emaste ümarmudilate jaoks on lisaks võimalikele lõhnasignaalidele ka nägemine oluline viis suguküpsete isasloomade tuvastamiseks (Yavno & Corkum, 2010). Samuti on teada, et ümarmudilad võivad liigikaaslaste omadusi ja ohtlikkust näiteks vastase kehasuuruse järgi hinnata (Speares et al., 2007). Ümarmudilate kehavärvi muutlikkust ja tundlikkust illustreerib seegi, et ühes toksikoloogia teemalises katses täheldati neurotoksiiniga mürgitatud isenditel hüperpigmentatsiooni, mis tähendab, et antud loomad muutusid enne surma märgatavalt tumedamaks (Yule et al., 2006). Seega võib järeldada, et välimus ja värvus on ümarmudilate puhul olulised omadused. Seda, et ümarmudilad võivad mõne minuti jooksul oma värvust muuta, täheldasid antud uurimustöö läbiviijad eelnevate vaatluste põhjal.

Enne magistritöö praktilise osa läbiviimist täheldasime, et mitmete hangitud ümarmudilate silmad paistsid kas üleni või laiguti piimjasvalged. Seetõttu kahtlustasime, et meie katseloomad on tõenäoliselt silmaparasiitidega nakatunud. Läänemere edelaosas läbiviidud uurimustöö näitas, et silmades elav imiuss *Diplostomum spathaceum* on üheks levinuimaks ümarmudilate parasiidiks (Kvach & Winkler, 2011). Parasiidid võivad peremehe

füsioloogiat mitmeti mõjutada: tekitades vigastusi või muutes peremehe reproduktiivsust ja elumust kaudselt (Karvonen & Seppala, 2008). Imiussi *Diplostomum sp.* infektsioon mõjutab kalade nägemisvõimet, näiteks tekitades katarakti (hallkae) ja vähendades silmaläätse diameetrit, muutes seeläbi nakatunud loomad kiskjatele lihtsamini kättesaadavaks, mis võibki olla parasiitidele soodne olukord, aidates neil lihtsamini järgmisesse peremehesse levida (Seppala et al., 2005; Karvonen & Seppala, 2008). Samas on ühes varasemas teadustöös leitud, et kuigi parasiitide poolt tekitatud hallkae võib kalade seas levinud olla, ei pruugi katarakt katta kogu nakatunud silma (Seppala et al., 2011). Käesoleva töö läbiviijatel oli seega alust eeldada, et silmaparasiidid mõjutasid katseloomade silmanägemist, kuid kahjustus ei pruukinud ümarmudilaid pimedaks muuta.

Ümarmudilad valiti antud töö katseloomadeks mitmel põhjusel. Esiteks on ümarmudilaid juba varem laborikatsetes kasutatud ja on teada, et nad on võimelised vangistuses elama. Teiseks on kindlaks tehtud, et välimus on antud liigi puhul muutlik tunnus: nimelt suguküpsed isased värvuvad sigimisperioodil tumemustaks, kuigi antud värvimuutus üksi ei pruugi selle liigi puhul olla tõeline isaslooma kvaliteedi näitaja (Yule et al., 2006; Speares et al., 2007; Yavno & Corkum, 2010). Samuti tuvastati (enne siin töös esitatud) katsete läbiviimist visuaalselt, et ümarmudilad suudavad oma värvi suhteliselt kiiresti muuta. Samas on ka oluline märkida, et ümarmudilad on Läänemeres väga elujõuliseks osutunud võõrliik, kelle bioloogia ja morfoloogia täpsem tundmine võib aidata paremini mõista selle liigi edukust ja mõju keskkonnale (Adjers et al., 2006; Kornis et al., 2012).

3.2 Laboratoorsed tööd

3.2.1 Akvaariumikatsed

Katsed viidi läbi 21 ümarmudilaga, kellest 14 olid emased ja 7 isased, kes pärinesid Soome lahest Muuga sadamast. Praktiline töö toimus Võrtsjärve Limnoloogiakeskuses, kus saabunud katseloomad jagati soo alusel kuude numbritega märgistatud akvaariumisse, millest kaks suuremat mahutasid 160 liitrit (80 x 40 x 50) ja ülejäänud neli 120 liitrit (75 x 40 x 40) vett. Sugu määrati katselooma urogenitaaljätke järgi. Akvaariumite põhjad kaeti looduslähedase pruuni kruusaga ja vette paigutati suuremaid kive, vähendamaks katseloomade stressi ja andes neile varjumiskohti. Vee puhastamiseks ja kalade hapnikuga varustamiseks lisati akvaariumitele veefiltrid ning aeraatorid. Enne katsete alustamist anti kaladele oludega harjumiseks kolm kuud, mille jooksul tülitati neid vaid toitmise ajal. Kalad märgistati sabauime tehtavate lõikude abil: kasutati nii uime nurkade lõikamist kui ka sälkude tegemist. Katsepäevade vahel suri üks kala ja ühe isendi üks katsekorra video osutus kasutuskõlbmatuks.

Kogu praktilist tööd filmiti akvaariumite kohale riputatud kaameraga (Sony HDR-SR11E). Kahe katsejadas kasutati kolme akvaariumit:

- Esimene akvaarium (30 liitrit) oli mõeldud värvimuutuse tuvastamiseks. Akvaariumis oli seitsme sentimeetri sügavune veekiht ja põhja katsid ühevärvilised akvaariumikivid. Töös vaadeldi ümarmudilate suutlikust vastavalt substraadile kiiresti, juba 10 minuti jooksul, heledamaks või tumedamaks muutuda. Iga isend pidi katsejada läbima kaks korda: esimesel korral kasutati värvimuutuse akvaariumis valgeid, teisel korral musti kive. Katseloomade identifitseerimiseks kasutati koduakvaariumi numbrit ja sabauime tehtud spetsiaalset lõiget. Iga katsekala viibis akvaariumis korraga 10 minutit, mille jooksul töö läbiviijad akvaariumile ei lähenenud. Nii lühike aeg valiti tagamaks, et toimuda jõuab vaid füsioloogiline värvimuutus.
- Teine akvaarium (40 liitrit) ehk valikuakvaarium andis kaladele võimaluse valida endale sobivam aluspind. Veekihi paksus oli seitse sentimeetrit ja põhja kattev kruusakiht oli jaotatud neljaks ühesuuruseks osaks, millest kaks diagonaalset ristkülikut olid musta ja kaks valget värvi. Akvaariumi küljed kaeti papiga, et vältida olukorda, kus kalad valivad akvaariumis mingi koha ainult sellepärast, et

vältida teistest külgedest sissepaistvat eredamat valgust. Katseloom asetati akvaariumi keskpunkti (kohta, kus kõikide värvilaikude nurgad kohtusid) peaga alati ühes suunas. Ka selles akvaariumis hoiti kala segamatult 10 minutit. Ükski kala ei jäänud kõigiks 10 minutiks akvaariumi keskele.

- Kolmandas akvaariumis (30 liitrit) mõõdeti kalade stressi. Selle akvaariumi põhjas oli sama substraat mis kalade koduakvaariumiteski. Eelnevalt läbitöötatud kirjandusest leidus näiteid selle kohta, et vangistuses viibivad kalad võivad stressivastusena tarduda – seega anti kolmandas akvaariumis kaladele esmalt 6 minutit rahunemisaega ja siis katsetati, millisele häiringule katsekala põgenemisega reageerib (Øverli et al., 2006; Verbeek et al., 2008). Looma liikuma ajamiseks puudutati kas vett või kala keha ja isendi käitumise iseloomustamiseks kasutati viiest kategooriast koosnevat skaalat: (I) reageerib vee puudutamisele, (II) reageerib sabauime puudutamisele, (III) reageerib keha puudutamisele, (IV) reageerib silmaümbruse puudutamisele, (V) ei reageeri üldse. Puudutused viidi läbi kolmekaupa (ühete liigutust korrati kolm korda ja alles siis mindi edasi), tehes neid pipetiga.

3.2.2 Videoanalüüs

Pärast akvaariumikatseid sooritati videoanalüüs. Videote mängimiseks kasutati programmi Media Player Classic. Töös kasutati pildianalüüsi ja katselooma käitumise jälgimist:

- Videotest jäädvustati kuvatõmmised. Ekraanipilte tehti ühe video jooksul viiel erineval hetkel: kui kala pandi katsejada esimesse akvaariumisse, pärast ühe minuti möödumist, pärast 10 minuti möödumist, kui kala asetati teise ehk valikuakvaariumisse ja jällegi pärast 10 minuti möödumist. Pildianalüüs viidi läbi programmiga Adobe Photoshop CS4, rakendades töös tehnikaid, mida on varasemalt kasutatud ööliblika vastsete värvi kirjeldamiseks (Sandre et al., 2013). Iga video puhul võrreldi esimese ja teise akvaariumi pilte eraldi, vältimaks kaamera liigutamise ja muutunud valguse mõju tulemustele. Ühe akvaariumikatse ajal varieerunud valguse mõju vähendamiseks ühtlustati võrreldavate piltide toonid, kasutades lähtepunktiks vaadeldava isendi ümbruses oleva akvaariumikruusa värvi. Pildid asetati pilditöötlusprogrammis kõrvuti ja ühe pildi

tumedust muudeti seni, kuni fotodel paistev kruus polnud enam teineteisest eristatav. Seejärel eraldati igast pildist ümarmudila kehapind (uimedest jäi peale vaid sabauime kõige läbipaistmatum osa) ja tõsteti see uude faili, kus pilt konverteeriti laadi CMYK Color. Seejärel kasutati pildil oleva kala tumeduse tuvastamiseks pilditöötlusprogrammi histogrammi musta värvi heleduse mediaani – see näitaja oli pildi pikslite arvule vähem tundlik kui aritmeetiline keskmine. Musta värvi heleduse mediaan tähendab siinkohal seda, et histogrammis keskenduti ainult musta värvi kanalile ja graafiku statistikutele leiti, mis tooni pikslid on keskmise väärtusega. Seejuures, pilditöötlusprogrammi histogrammis on jpg laiendiga piltide, mis on alati 8-biti, toonid jaotatud 256 erinevaks heleduse tasemeks, kus 0 on puhas must ja 255 on täiesti valge (Sandre et al., 2013).

- Ümarmudilate käitumist jälgiti videolindistuse valikuakvaariumi osas. Esmalt kirjutati üles katselooma esimene värvivalik. Esimeseks valikuks loeti värv, millel kala jäi seisma vähemalt kolmeks sekundiks pärast akvaariumi keskpunktis liikuma hakkamist. Kusjuures mitte ükski katsekala ei jäänud kõigiks 10 minutiks akvaariumi keskele. Teiseks märgiti ära, mis värvi ristkülikutel kala kõige kauem aega veetis. Kui loom oli korraga kahel värvil, siis arvestati valituks see ristkülik, millel asus suurem osa ümarmudila kehast. Juhul kui kala keha oli sama palju nii musta kui ka valge peal, siis loeti valituks see ristkülik, millel asus katselooma pea. Video lõpuks arvutati kokku, mitu minutit viibis isend mustal ja mitu minutit valgel substraadil.

3.2.3 Mikroskoopia ja mustri pildistamine

Ümarmudila mustrit ja värvi uuriti nii rakutasandil kui kogukehapiltidelt. Mikroskoobi all vaadeldi ümarmudilate soomuseid, nahatükke, seljauime ja sabauime lõppu. Mikroskopeerimine kasutati kahte isendit, kalad surmas FELASA C-kategooria sertifikaadiga inimene. Kasutati nii binokulaarset valgus- kui stereomikroskoopi. Ümarmudilate mustri paremaks mõistmiseks tehti ühe katselooma kehast ka üldpilte. Seejuures sooviti pildistada just harilikult ümarmudila kehal leiduvaid mustreid ja arvesse ei võetud suguküpsede isaste pulmavärvi, mis mõningate isendite puhul tähendab peaaegu üleni musta keha. Töökäik oli järgnev: allesjäänud ümarmudilate seast valiti kõige

kontrastsema välimusega kala. Katseloom uinutati vastavaks otstarbeks ettenähtud lahusega MS222 (*tricaine methane sulphonate*) kontsentratsioonil 50 mg/l, et tagada piltide hea kvaliteet. Seejärel paigutati ümarmudil madalasse vette valguse alla ja pildid tehti fotoaparaadiga Canon EOS 5D mark II. Pärast töö lõppu jäeti kala toibuma ja hiljem viidi tagasi koduakvaariumisse.

3.2.4 Töökäigus saadud andmed

Andmeid pandi kirja nii eksperimendi käigus kui ka hiljem videote ülevaatusel, pildistamisel ja mikroskoopimisel:

- Praktilise töö ajal kirjutati iga katselooma kohta üles koduakvaariumi number, sugu, identifitseeriv sabauime lõige, kala reaktsioon häiringule ja see, kui piimjas oli kalade kummagi silma värv.
- Videoanalüüsi käigus märgiti üles katselooma naha tumedus kohe pärast esimesse akvaariumisse panemist, pärast umbes 1 minutit ja pärast 10 minutit. Teises akvaariumis viibimise ajal pandi kirja, mis värvi ruudul kala esimesena peatus ja millisel värvil 10 minuti jooksul kõige kauem viibis. Samuti märgiti ära isendi naha tumedus kohe pärast teise akvaariumisse laskmist ja pärast 10 minutit.
- Mikroskopeerimise käigus saadi pildid melanofooridest ja kollast värvi kromatofooridest kala soomusel ning sabauime lõpul. Stereomikroskoobiga saadi lähivõtte seljauime laigust.
- Näidisloomaks valitud isendi pildistamisest saadi fotod esimese seljauime laigust, valgest sabaäärest ja keha külje ning selja mustritest, samuti pea mustrist.

3.2.5 Läbiviidud andmeanalüüsid

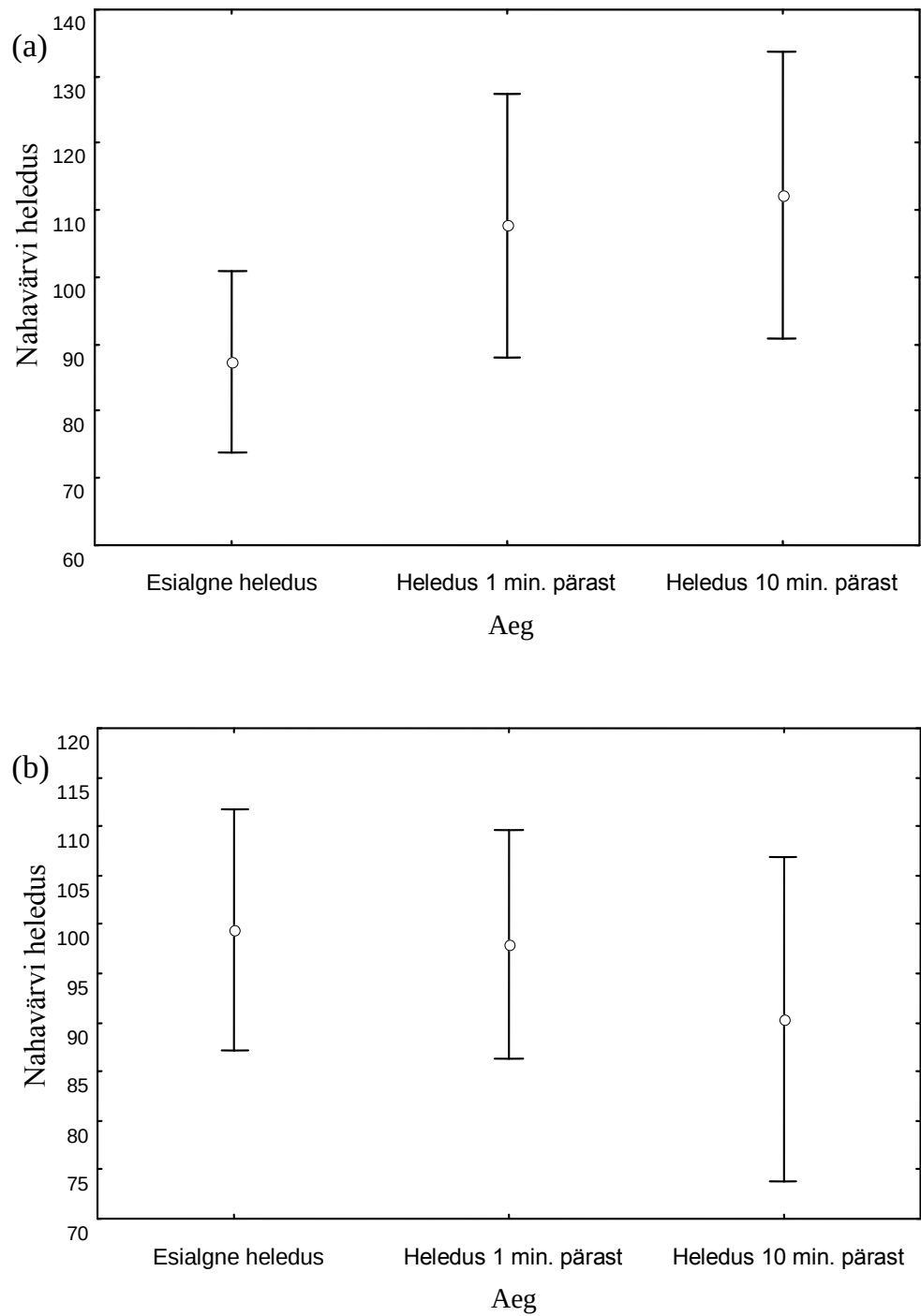
Statistilises analüüsis kasutati sõltuvate valimite t-testi, korduvmõõtmistega ANOVA testi ja mitteparameetrilist Wilcoxonit testi. Kalade füsioloogilise värvimuutuse toimumist hinnati sõltuvate valimite t-testi abil. Katsekalade värvimuutust mõjutavate tegurite hindamiseks kasutati korduvmõõtmistega ANOVA analüüsi, kasutades kofaktoritena kalade sugu, nende reaktsiooni häiringule ja silmade tervise hinnangut. Wilcoxonit testi kasutati valikuakvaariumis aset leidnud käitumise analüüsiks, kui sooviti teada, kas värvimuutuse akvaariumi kruusavärv mõjutas seda, mis tooni riskülikul kalad esimesena peatusid või mis värvil 10 minuti jooksul kõige kauem viibisid.

4. Tulemused

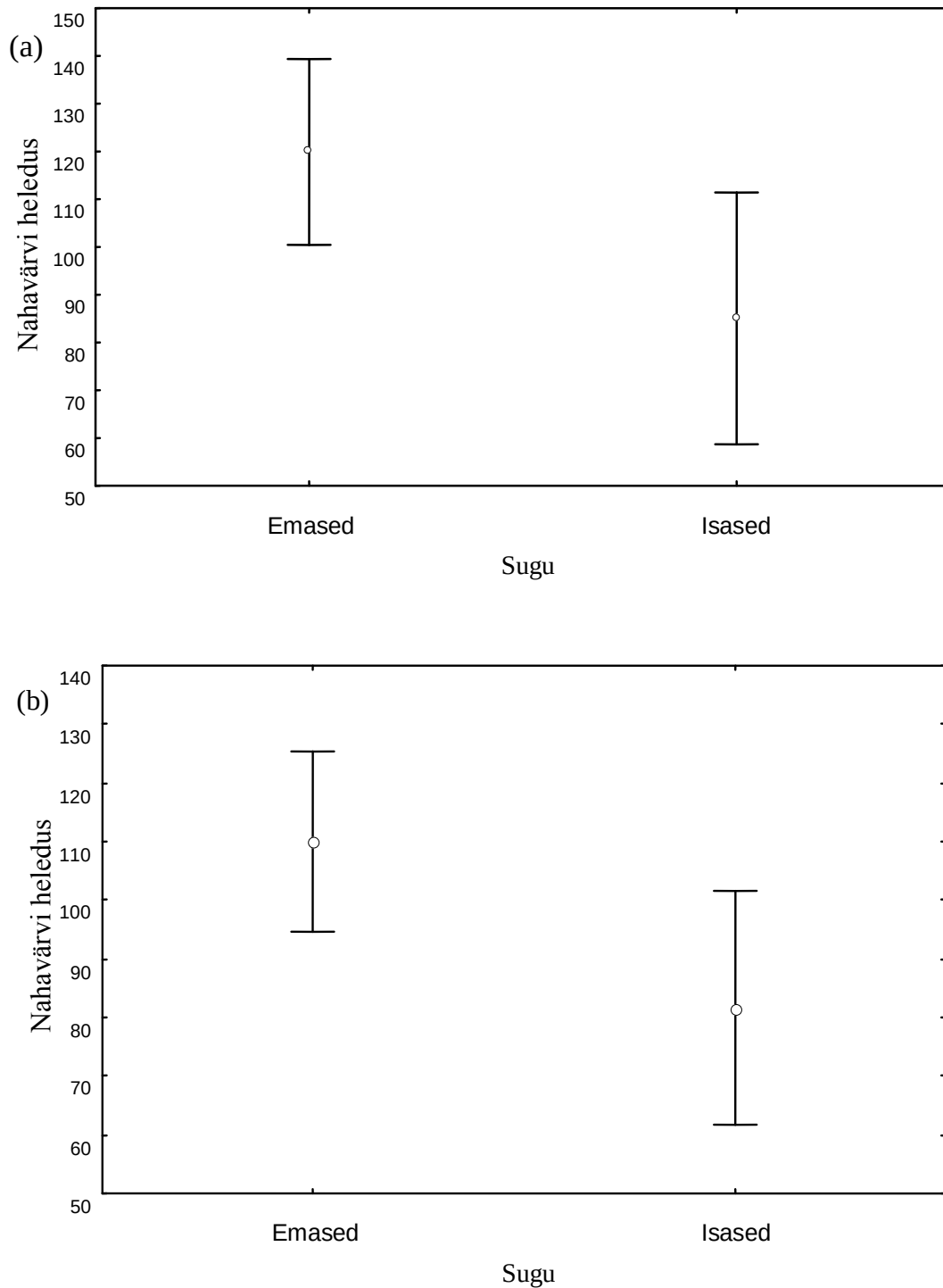
4.1 Värvimuutus ja käitumine

Akvaariumi substraadi värvus mõjutas katseloomade naha heledust. Sõltuvalt sellest, kas katses kasutatud ümarmudilad olid viibinud kümme minutit valgel või mustal põhjal, oli nende nahavärvi väärtus erinev (*Sõltuvate valimite t-test*: $t = 2,91$; $p = 0,01$). Pärast valge substraadiga harjumist olid kalad heledamad kui pärast musta värvi põhjaga harjumist. Sellist kahe grupi vahelist erinevust ei esinenud nende tulemuste hulgas, mis mõõdeti kohe pärast katseloomade valgele või mustale põhjale asetamist (*Sõltuvate valimite t-test*: $t = 1,92$; $p = 0,07$). Seega on ümarmudilad kindlasti võimelised füsioloogiliseks värvimuutuseks.

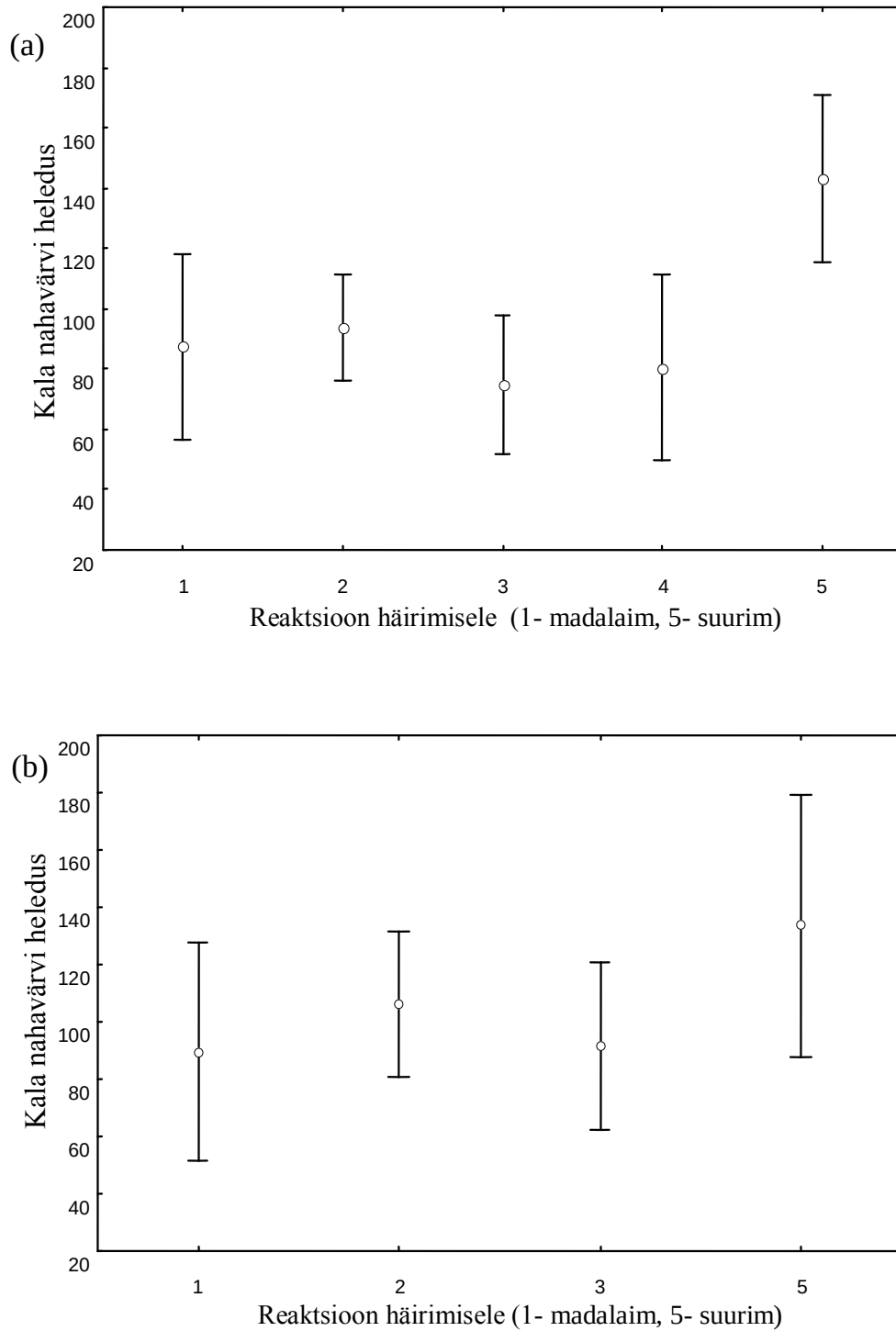
Valge ja must substraat mõjutasid kala värvi erinevalt ning katseloomade heledus oli seotud osaliselt isendite sooga ja tardumisega. Samas silmade tervise väärtused ei osutunud kordagi oluliseks. Valgel põhjal läbiviidud korduvmõõtmiste puhul osutusid kala nahavärvi olulisteks mõjutajateks aeg (*Korduvmõõtmistega ANOVA*: $F_{1,30} = 5,14$; $P = 0,003$) ja isendi sugu (*Korduvmõõtmistega ANOVA*: $F_{2,30} = 7,19$; $P = 0,039$). Musta värvi põhjal tehtud korduvmõõtmiste korral osutusid olulisteks näitajateks loomade sugu (*Korduvmõõtmistega ANOVA*: $F_{1,20} = 5,42$; $P = 0,042$) ja reaktsioon häiringule (*Korduvmõõtmistega ANOVA*: $F_{4,20} = 5,18$; $P = 0,016$). Valgel põhjal muutusid kalad aja jooksul heledamaks, kuid musta põhjaga akvaariumist saadud andmete puhul ei kujunenud aeg oluliseks näitajaks, olgugi, et sellekohane trend oli aimatav (Joonis 1). Sugu oli ainus tegur, mis jäi oluliseks kofaktoriks nii valge, kui ka musta kruusaga tehtud katsetes – mõlemal juhul olid isased isendid emastest tumedamad (Joonis 2). Samas, loomade reaktsioon häirimisele oli kalade värviga seoses oluline näitaja vaid tumedal põhjal – enim tardunud isendid olid teistest heledamad (Joonis 3). Aja, soo ja tardumise vahelisi koosmõjusid ei leitud. Seega mõjutas kalu valgel põhjal enim sugu ja mustal substraadil sugu ja reaktsioon häiringule.



Joonis 1. Graafikud katsekalade värvuse muutumisest (a) valge põhjaga akvaariumis ($N=21$), kus aeg mõjutas kala värvi ja (b) musta põhjaga akvaariumis ($N=19$), kus aeg ei mõjutanud kala värvi. Y-teljel on ümarmudilate nahavärvi näitaja, mille suurem väärtus tähendab heledamat isendit. X-teljel on märgitud uuritavad ajapunktid.



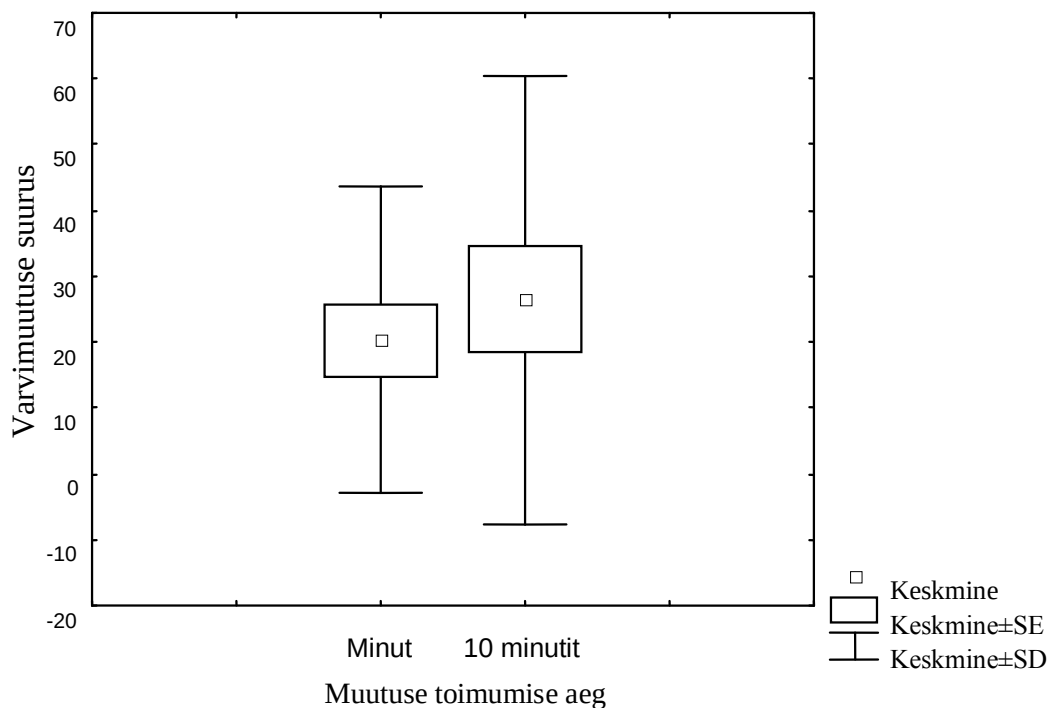
Joonis 2. Soo mõju ümarmudilate värvusele (a) valgel (N=21) ja (b) tumedal (N=19) põhjal läbiviidud korduvmõõtmiste puhul. Y-teljel on ümarmudilate nahavärvi näitaja, mille suurem väärtus tähendab heledamat isendit ja X-teljel on katsekalade sugu (Valgel põhjal oli 14 emast ja 7 isast, mustal põhjal 12 emast ja 7 isast).



Joonis 3. Häiringule reageerimise seos kalade nahavärvusega: (a) musta põhjaga akvaariumis läbiviidud korduvmõõtmiste jooksul leidus seos kalade tardumise ja nende nahavärvi vahel ($N=19$), kuid (b) valge põhjaga akvaariumis tehtud mõõtmiste puhul niisugune seos oluliseks ei kujunenud. Y-teljel on ümarmudilate nahavärvi näitaja, mille suurem väärtus tähendab heledamat isendit. X-teljel on välja toodud katses osalenud

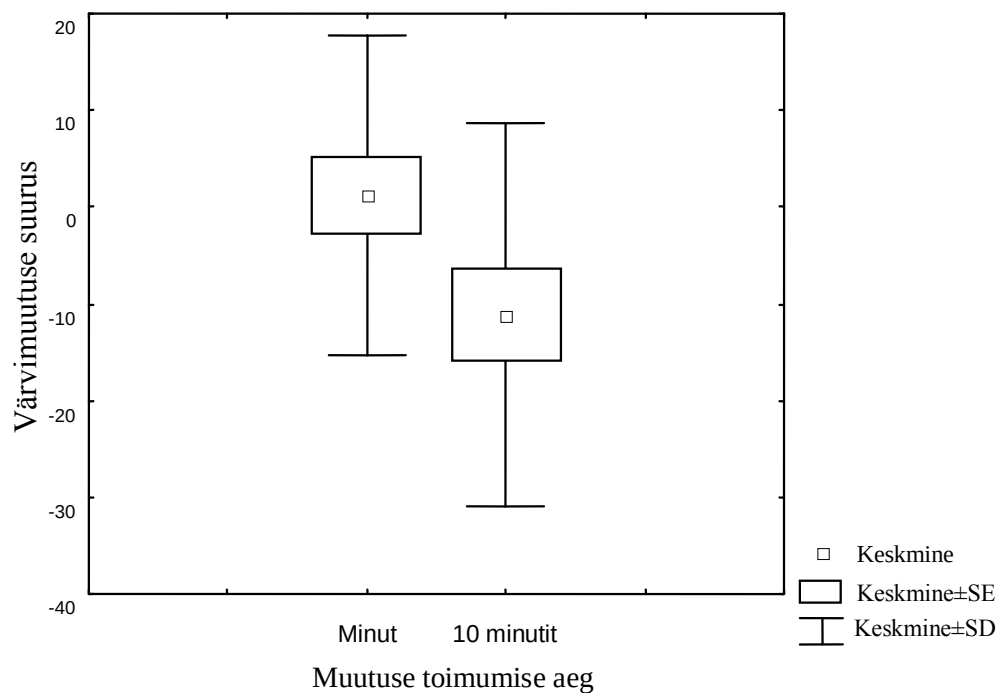
ümarmudilate reaktsioon häirimisele, kus väärtusega 1 tähistatud isendid reageerisid juba akvaariumi vee puudutamisele ja väärtusega 5 tähistatud loomad ei reageerinud isegi silmaümbruse puudutamisele.

Ümarmudilad reageerisid valge ja musta põhjaga akvaariumitele erineva värvimuutusega. Valgel põhjal ei olnud põhimõttelist erisust esimesel minutil ja 10 minuti jooksul toimunud värvimuutuste vahel (*Sõltuvate valimite t-test*: $t = -1,1$; $p = 0,28$), kuid mustal taustal tekkis statistiliselt oluline erinevus (*Sõltuvate valimite t-test*: $t = 2,2$; $p = 0,04$). Kui valge põhjaga akvaariumis jätkasid enamused kalu kõigi 10 minuti jooksul heledamaks muutumist (Joonis 4), siis tumeda põhjaga akvaariumis muutusid mitmed ümarmudilad esimese minuti jooksul heledamaks, kuigi 10 minuti peale kokku toimus põhiliselt isendite tumenemine (Joonis 5). Kusjuures muutusid 10 minuti jooksul valgel põhjal ($N=21$) 17 isendit heledamaks ja kolm tumedamaks (ühe kala värvimuutus teadmata), mustal põhjal ($N=19$) neli kala heledamaks ning 14 ümarmudilat tumedamaks (ühe kala värvimuutus teadmata). 10 minuti jooksul toimunud värvimuutus ei olnud seotud soo, silmade tervise ega kalade reaktsiooniga häirimisele.



Joonis 4. Ümarmudilate värvimuutus valge kruusaga akvaariumis ühe ning 10 minuti jooksul. Statistiliselt olulist erinevust esimesel minutil toimunud muutuse ja 10 minuti jooksul toimunud muutuse vahel polnud. Y-teljel on värvimuutuse suurus, kus positiivsed

numbrid tähistavad isendi kahvatumist ja negatiivsed kala tumenemist. X-telje on tähistatud uuritavad ajapunktid.



Joonis 5. Ümarmudilate värvimuutus musta põhjaga akvaariumis ühe ning 10 minuti möödumisel. Mitmed isendid muutusid esimese minutiga heledamaks, kuigi 10 minuti peale kokku muutusid kalad siiski valdavalt tumedamaks. Y-teljel on värvimuutuse suurus, kus positiivsed numbrid tähistavad isendi muutust heledamaks ja negatiivsed tähendavad kala tumenemist. X-teljel on tähistatud uuritavad ajapunktid.

Valikuakvaariumis läbiviidud katsed ei andnud alust arvata, et ümarmudilate põhjaeelistus sõltuks sellest, mis värvi substraadil nad eelnevalt viibisid. Ümarmudilad eelistasid esimese peatuspaigana tumedaid riskülikuid, olenemata sellest, kas nad olid enne veetnud aega valge või musta põhjaga akvaariumis (Tabel 1). Samuti veetsid katseloomad valikuakvaariumis tumedatel riskülikutel kauem aega, jällegi olenemata sellest, kas loomad olid äsja kohanenud valget või musta värvi põhjaga (Tabel 2). Andmeanalüüs ei tuvastanud, et kalade põhjavalik oleks olenenud soost, häirimisele reageerimisest või silmade tervisest. Siiski, valikuakvaariumiga tehtud katsete tulemused näitasid, et valget värvi põhjaga akvaariumist tulles juhtusid ümarmudilad valikuakvaariumi heledatele riskülikutele rohkem kui tumedalt kruusalt pärinedes. Samas ei olnud need erinevused

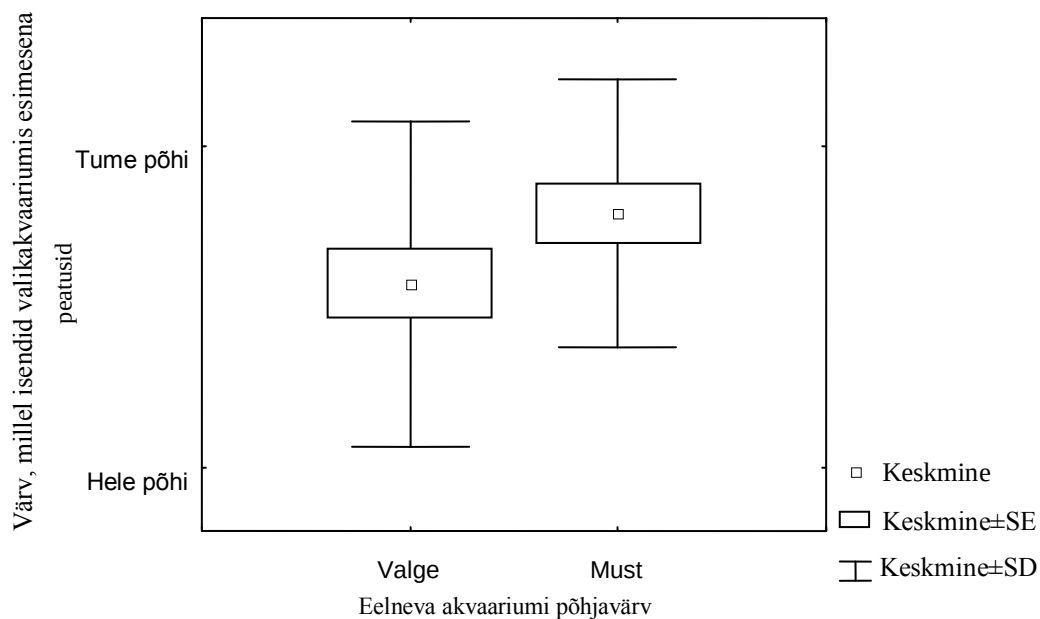
piisavalt suured, et statistiliselt oluliseks kujuneda – seda nii kalade esimese peatuskoha (Joonis 5) kui ka pikemaajalise põhjaeelituse osas (Joonis 7). Andmetest on näha, et rohkem ümarmudilaid meie katses eelistasid tumedat põhja heledale, olenemata sellest, mis värvi substraadiga nad enne 10 minuti jooksul kohanenud olid.

Tabel 1. Katsekalade esimese peatuspaiga eelistus, sõltuvalt eelmise katseakvaariumi põhjavärvist. Tabelis on näha, kui suur hulk kalu valisid pärast valge või musta põhjaga akvaariumist saabumist esimeseks peatuspaigaks valge või musta risküliku.

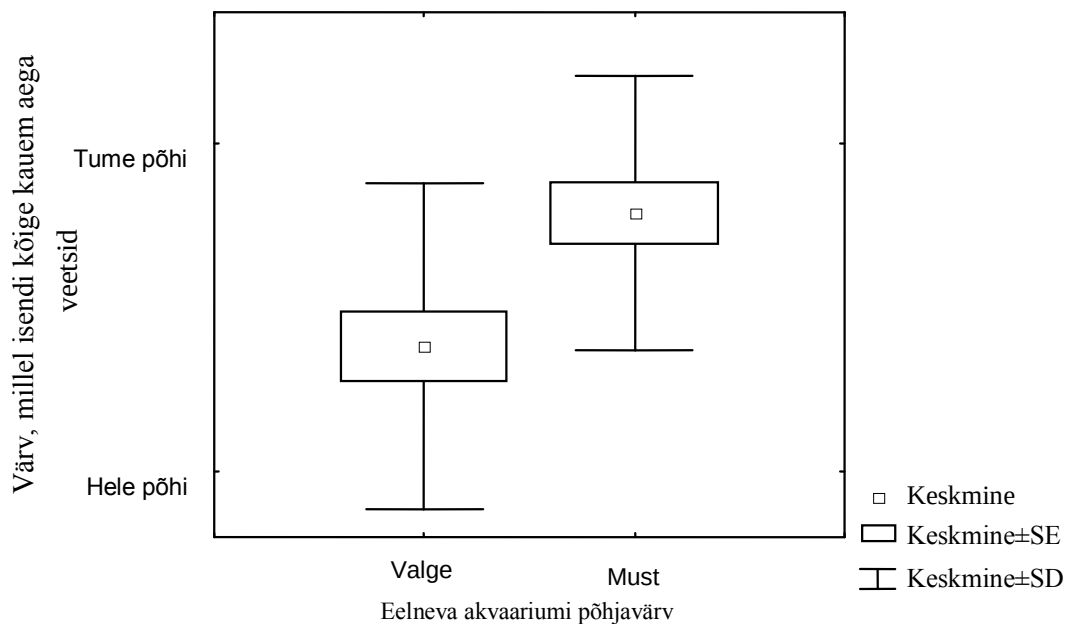
	Valgelt saabunud kalad (N=21)	%	Mustalt saabunud kalad (N=19)	%
Esimene peatus valgel	9	42,9	4	21,1
Esimene peatus mustal	12	57,1	15	78,9

Tabel 2. Ümarmudilate põhjaeelituse pikemaks ajaveetmiseks, sõltuvalt eelmise katseakvaariumi põhjavärvist. Tabelis on näha, mis värvi põhjal veetsid katsekalad 10 minuti jooksul kauem aega, pärast valge või musta põhjaga akvaariumist saabumist.

	Valgelt saabunud kalad (N=21)	%	Mustalt saabunud kalad (N=19)	%
Kauem valgel	8	38,1	4	21,1
Kauem mustal	13	61,9	15	78,9



Joonis 6. Ümarmudilad eelistasid esimese peatuspaigana musta värvi riskülikuid. Väike arvuline erinevus heledatel riskülikutel peatumise osas, olenevalt sellest, kas kalad pärinesid musta või valge põhjaga akvaariumist ei olnud piisav, et statistiliselt oluliseks kujuneda (Wilcoxon matched pairs test: $Z = 0,89$; $p = 0,374$). Y-teljel on välja toodud kaks väärtust, mis esindavad valikuakvaariumi valgeid ja musti riskülikuid. Z-teljel on näha, mis tooni põhjaga akvaariumist katseloomad pärinesid.

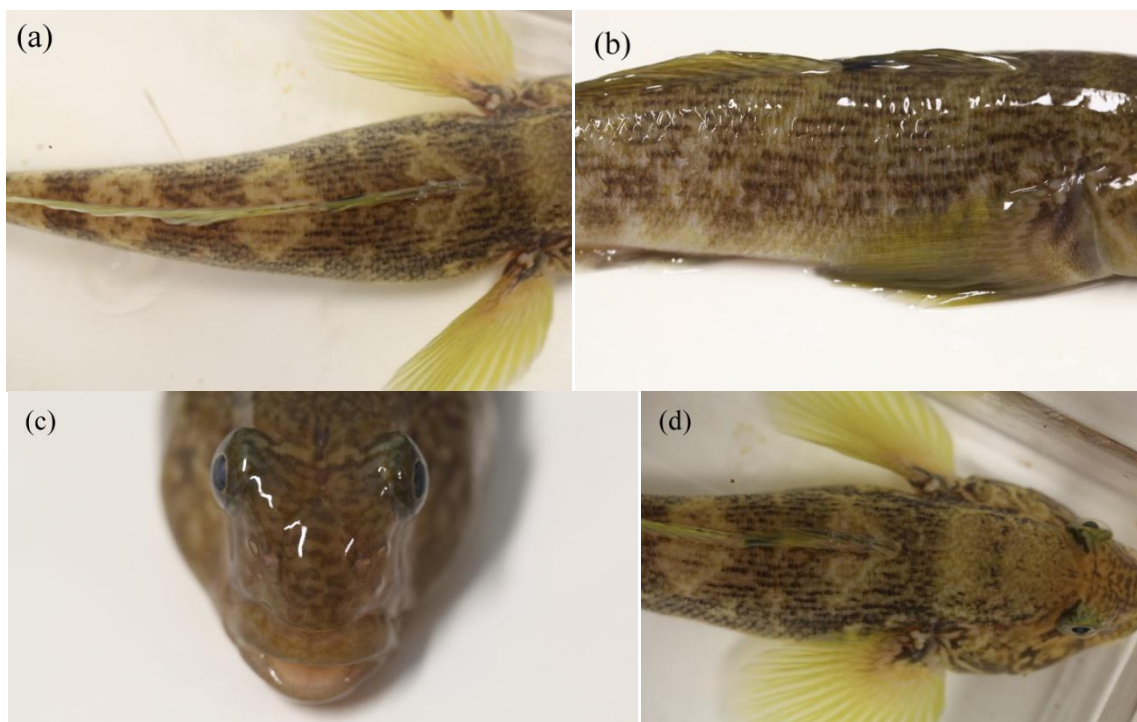


Joonis 7. Ümarmudilad eelistasid valikuakvaariumis 10 minuti jooksul rohkem viibida tumedat värvi riskülikutel. Valge põhjaga akvaariumist pärinevate isendite hulk, kes

viibisid kauem valgel oli veidi suurem kui tumeda põhjaga akvaariumist saabunud kalade puhul, kuid mitte piisav, et esineks statistiliselt olulist erinevust (Wilcoxon matched pairs test: $Z = 1,71$; $p = 0,087$). Y-teljel on välja toodud kaks väärtust, mis esindavad valikuakvaariumi valgeid ja musti ristkülikuid. Z-teljel on näha, mis tooni põhjaga akvaariumist katseloomad pärinesid.

4.2 Ümarmudilate mustri muutlikkus

Soome lahest pärinevate ümarmudilate nahamuster koosneb eraldi kontrollitavatest osadest, mille korrigeerimine võimaldab muuta katkestava värvuse kontrastsust. Antud uurimustöö valimis olnud isendid demonstreerisid suutlikust omandada erinevaid mustast, valgest ja kollasest koosnevaid nahatoone. Samas on ümarmudilate tumedamatest ja heledamatest katkestatud vöötidest moodustunud muster, mida isendid suudavad vastavalt vajadusele kontrastsemaks või vähem kontrastsemaks muuta (Joonis 7). Harilikult on ümarmudilate nahamuster lihtsasti nähtav, sulandudes ülejäänud värviga kokku vaid juhul, kui isend on kas üleni must või valge. Esineb vastuvarjutus: tavaliselt on ümarmudilate ventraalne ala hõbevalge, kuid ka siinkohal on erandiks suguküpsete isaste pulmarüü (Joonis 8). Ümarmudilate mustrit moodustavad kromatofooride triibud on alalised: nende heledus võib küll muutuda, kuid mustri asetus jääb samaks. Seega koosneb Soome lahe ümarmudilate värvus kahest komponendist: peenetest triipudest ja neid katkestavatest laikudest. Põhilise värvi moodustavad melanofoorid ja kollased kromatofoorid. Kusjuures käesolevas töös ei tehtud kindlaks, kas kollased pigmendid olid karotenoidid või pteridiinid. Iridofoore ja leukofoore ei pildistatud, kuid tõenäoliselt leidub ka neid värvirakke: esimestele omast sinakaslillat läiget oli näha päikese käes ja leukofoore võiks leida ümarmudilate helevalgel kõhul.



Joonis 7. Ümarmudila kehal kulgev muster koosneb pikki kala jooksvatest erineva tumedusega joontest, mida katkestavad (a) seljal suured kolmnurga või teemandi kujulised heledamad laigud ja (b) külgedel väikesemad, üksteisega ühendatud, heledamad alad, mis moodustavad marmorja mustri. (c) Ümarmudila pea otsevaates on näha kehaga risti kulgevaid triipe ja pealagi on samuti sageli ülejäänud kehast heledam ning silmaümbruses leidub tumedaid määrgiseid. Fotod: Randel Kreitsberg.



Joonis 8. Ümarmudilate kõht on harilikult hele, nagu teistel vastuvarjutusega kalaliikidel. Seejuures (a) emaste isendite ventraalne pind jääb ka sigimishooajal heledaks, samas kui (b) harilike suguküpsede isaste kõht muutub, nagu nende ülejäänud kehagi, tumedaks. Fotod: Randel Kreitsberg

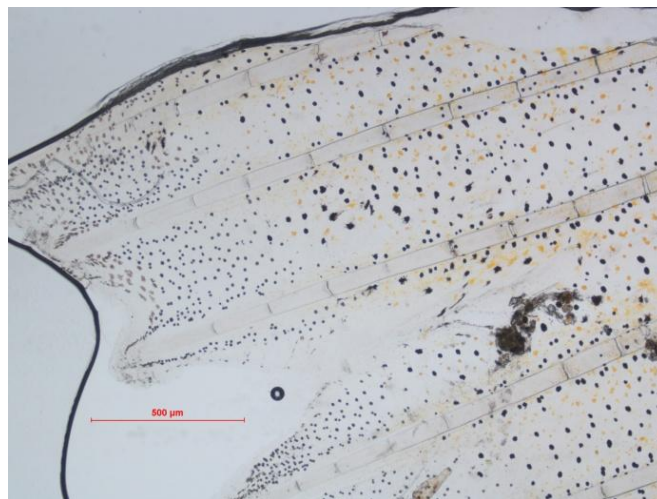
Kehamustri kõrval on ümarmudilate välimuse juures olulised ka uimemärgised. Nimelt leidub kromatofore ka ümarmudilate uimedel, mille värv võib samuti varieeruda valgest tumemustani. Kusjuures pruunide ja kollaste pigmentidega kromatofore võib leida nii uimepinnal hajutatuna kui konsentreerituna uimekiirte ümbert. Esiteks, Soome lahe ümarmudilate esimese seljauime viimaste uimekiirte kohal leidub harjumuspärane liigiomane melanofooride laik (Joonis 9). Teiseks, meie katse valimisse kuulunud ümarmudilate sabauime tagumine äär on ülejäänud uimega võrreldes heledam (Joonis 10). See erinevus hakkab kõige paremini silma sigimishooajal pulmarüüs olevate isaste juures, kuid esineb ka emastel. Heledaid ääri esineb ka tagumisel seljauimel ja anaaluimel. Nii Soome lahe ümarmudilate seljauime laik kui sabaääre hele triip vastasid varasemas kirjanduses kirjeldatule (Kornis et al., 2012). Mikroskopeerimisel oli näha, et sabauime heleda ääre lõpul on märksa väiksema läbimõõduga ja veidi tihedama asetusega kromatofoorid, kui ülejäänud uimel (Joonis 11). Kollaseid kromatofore, olgu need siis ksantofoorid või erütrofoorid, leidub suuremal osal uimelabal küll ohtralt, kuid sabauime heledal äärel vähe.



Joonis 9. Ümarmudila esimese seljauime viimastel uimekiirtel on näha tumedat laiku. Samuti on näha, et kromatofoorid moodustavad ka ümarmudila uimedel tumedamaid triipe. Foto: Randel Kreitsberg.



Joonis 10. Ümarmudila sabauime välisäär on heledam, kui ülejäänud uim. Helekollase sabauime pealt on erinevust raskem näha, kui tumedamat värvi uimede puhul. Foto: Randel Kreitsberg.



Joonis 11. Ümarmudila sabauime tagumise ääre mikroskopeerimine. Fotol on näha erinevus sabauime lõpu ja ülejäänud sabaääre melanofooride suuruste vahel. Samuti on näha, et kollased kromatofoorid esinevad sabaääre lõpus vaid uimekiirte ümber. Punase joone pikkus pildil on 500 μm. Foto: Kristel Panksep.

5. Arutelu

Ümarmudilad on võimelised füsioloogiliseks värvimuutuseks. Meie katses toimus värvimuutus mõne kala puhul juba sekunditega ja suurem osa kalu püüdsid oma nahavärvi samastada akvaariumi põhja värviga. Morfoloogiline värvimuutus nii kiiresti ei toimuks, seega võib järeldada, et tegemist oli füsioloogilise värvimuutusega (Schliwa, 1986). Katseandmed näitasid, et ümarmudilate nahavärv oli pärast valgel taustal viibimist heledam, kui pärast mustal taustal viibimist. See läheb kokku mitmete teiste uurimustöödega, kus on näidatud kalade nahavärvi kohanemist substraadi tooniga: näiteks vangistuses kasvatatud kalade puhul on kirjeldatud mitmel juhul olukordi, kus heledas veemahutis elanud kalad on ka pigmentatsiooni poolest kahvatumad, kui nende vabas looduses elavad liigikaaslased (Fairchild & Howell, 2004; Pavlidis et al., 2008). Siiski, harilikult kirjeldatakse taustavärvusega kohanemisest morfoloogilise värvimuutuse võtmes, mis võtab harilikult päevi, mõnel juhul isegi kuid aega (Leclercq et al., 2010b). Meie katse aga näitab, et Soome lahest püütud ümarmudilad muutsid märgatavalt värvi juba 10 minutiga, kusjuures mõned neist olid suutelised heledal taustal omandama lausa kahvatuvalge välimuse. Mustal taustal viibides oli jällegi näha trendi kalade tumedamaks muutumise poole, kuigi see seos ei osutunud statistiliselt oluliseks. Kui katseloomade värvi mõjutaks vaid stress, siis oleksid loomad pidanud mõlemal taustal sarnaselt kas heledamaks või tumedamaks muutuma. Kuid sellist suundumust katseandmed ei toeta. Seega võib väita, et ümarmudilad suudavad füsioloogilise värvimuutuse abil substraadi heleduse muutustele reageerida. Siiski jääb küsimus, miks põhjavärvi mõju kala värvusele musta substraadiga akvaariumi puhul oluliseks ei kujunenud. Üks võimalik vastus seisneb selles, et katses kasutatud ümarmudilad võisid olla juba koduakvaariumites suhteliselt mustja värviga ja seetõttu polnud enam võimalik ainult füsioloogilise värvimuutuse abil palju tumedamaks muutuda. See võib tähendada, et ümarmudilad ei olnud enam suutelised märgatavalt tumedamaks värvuma, sest nahas ei olnud selleks piisavalt melaniini. Teine põhjus võib olla selles, et ümarmudilad paistavad häirimise järgselt kahvatuvat, mida toetaks ka see, et mustal taustal muutusid mitmed katsekalad esimese minuti jooksul hoopis heledamaks ja niisugune esialgne reaktsioon võib kalade tumenemist pidurdada. Seega võib järeldada, et ümarmudilad suudavad oma nahavärvi ja mustrit põhja tumedusega kohandada ning seda juba minutitega.

Kalade reaktsioon häirimisele kujunes statistiliselt oluliseks värvust mõjutavaks faktoriks vaid musta tausta puhul. Arvestades, et töö viidi läbi vabast loodusest pärinevate kaladega, oli katseloomade stressitase tõenäoliselt pidevalt kõrgem, kui see lemmikloomadena peetavate akvaariumikalade puhul oleks olnud. Mustal substraadil tehtud mõõtmistest saadud andmed näitasid, et isendid, kes ei liikunud kolmandas akvaariumis ka silmaümbruse puudutuse peale, olid teistest heledama värviga. On põhjust arvata, et vangistuses tardumine väljendab kalade stressireaktsiooni (Øverli et al., 2006; Verbeek et al., 2008). Stressi ja kalade nahavärvi kohta leidub varasemas kirjanduses erinevaid andmeid: olenevalt liigist võib vangistuses hoidmine põhjustada isendites mitmesuguseid värvidefekte, kuid üldiselt kalduvad tulemused siiski arvamuse poole, et stress põhjustab sagedamini kalade kahvatumist (Van der Salm et al., 2006). Teisest küljest on andmeid ka selle kohta, et isendid, kelle nahas leidub rohkem melaniini, on liigikaaslastega võrreldes stressile vastupidavamad (Kittilsen et al., 2009). Üleüldine tumedus või tumedad märgised võivad kalade puhul sotsiaalsetes olukordades mõnikord olla ka dominantsuse märgiks (Ducrest et al., 2008; Rodrigues et al., 2009). Samas on arutletud selle üle, et stress võib taustavärviga kohanemist hoopis pidurdada (Van der Salm et al., 2005). Meie töös ei määratud värvimuutuse kiirust, seega ei ole võimalik tehtud katse põhjal kommenteerida stressi mõju füsioloogilise värvimuutuse kiirusele. Kuid tõsiasi, et mustal põhjal leidis statistiliselt oluline seos enim tardunud isendite ja suurema heleduse vahel, võiks toetada teooriat, et stressil on värvimuutust pidurdav mõju. Siiski vaidleb sellele järeldusele vastu asjaolu, et kuigi valgel taustal stressivastuse ja värvuse vahel olulist seost ei leitud, siis andmetest saadud joonis näitab, et ägedama stressireaktsiooniga kalad teistest tumedamaks kindlasti ei jäänud. Seetõttu ei saa öelda, et stress oleks ümarmudilate puhul heledamaks muutumist pidurdanud. Musta substraadiga tehtud katsest tuli välja, et ühe minuti ja kümne minuti jooksu toimusid hoopis mõnevõrra erisuunalised muutused. Antud tulemus kinnitab teooriat, et häirimine põhjustab Soome lahe ümarmudilates vähemalt lühiajalist kahvatumist. Sel juhul võiks arvata, et valgel põhjal tuleb esialgne heledamaks muutumine kaladele tõenäoliselt kasuks ja stressi mõju võib aja mõju sisse ära kaduda, samas kui mustal põhjal põhjustab käsitlemisjärgne kahvatumine seda, et kalad muutuvad kokkuvõtteks vähem ning aja mõju ei tule nii kergesti ilmsiks. Võib järeldada, et ümarmudilatel on kalduvus stressi mõjul kahvatuda.

Ümarmudilate sugu mõjutas värvust nii valgel kui mustal taustal. Mõlema põhjavärvi puhul jäid isased isendid emased tumedamateks. Varasema kirjanduse alusel teame, et

sigimisperioodil on suguküpsetele isastele omane süsimust pulmarüü, mis mõjutab partnerivalikut (Speares et al., 2007; Yavno & Corkum, 2010). Samas võib vähemalt ühest allikast välja lugeda, et isased üarmudilad võivad emastest ka aastaringselt tumedamad olla, olenemata pulmavärvist (Kornis et al., 2012). Seega on isaste üarmudilate tumedam värvus kas nende kehavärvi pidev tunnus või morfoloogilise värvimuutuse tulemus. Siin kirjeldatava töö laboratoorsed katsed viidi läbi üarmudilate sigimisperioodi viimasel kuul, 10. kuni 21. septembrini, kui sigimisperioodile omane tumedus oli juba vähenenud. Katsest saadud andmed näitavad, et sugude vaheline värvuseline erinevus polnud kuhugi kadunud. Üarmudilate füsioloogilise värvimuutuse suurus soost ei olenenud. Asjaolu, et isased jäid nii valgel kui mustal kruusal emastest keskmiselt tumedamateks annab alust arvata, et füsioloogilise värvimuutuse suuruse dikteerib olemasolev materjal ehk kromatofooride ja pigmentide hulk. Isaste üarmudilate nahas on tõenäoliselt emastest rohkem melaniini, võimalik, et ka rohkem melanofore. On selge, et melaniinigraanuleid pole võimalik lõputult kokku suruda või laiali hajutada ning seega jäävad isased üarmudilad nii heledal kui tumedal taustal emastest tumedamaks. Seega võib Soome lahe isendite näitel arvata, et üarmudilate värv oleneb muuhulgas isendi soost ja füsioloogiline värvimuutus on piiratud suurusega.

Kalade silmade tervis ei osutunud meie katses üarmudilate värvimuutuse puhul oluliseks faktoriks – tõenäoliselt on tegemist veaga parasiitide kahjustuste hindamisel. Üarmudilate silmade tervist hinnati visuaalselt, pupilli ähmasuse alusel. On teada, et keskkonnas eksisteeriv UV kiirgus mõjutab melanofore otseselt, ilma hormonaal- või närvisüsteemi abita (Mueller & Neuhauss, 2014). Esitatud on ka tõendeid, et kromatofoorid, eriti melanofoorid, võiksid samamoodi primaarse värvimuutusega reageerida ka harilikule taustavalgusele (Oshima, 2001). Tulemus, et Soome lahe üarmudilate nägemine polnud värvimuutuse läbiviimisel oluline on siiski kahtlustäratav. Nimelt, katse käigus ei muutunud lampidest tuleneva valguse hulk, vaid ainult akvaariumi põhjasubstraadi värvus. Tõenäolisem vastus on see, et katseloomade silmade tervise visuaalne hindamine oli ekslik ja kalad nägid paremini, kui katse läbiviijad ootasid. Mikroskopeerimise käigus ei õnnestunud üarmudilate silmadest parasiite tuvastada. Arvatavasti polnud katseloomade silmade tervise visuaalne määramine töökindel meetod.

Varasemalt putukate kehavärvi hindamiseks väljatöötatud meetod töötas ka kalanaha tumeduse määramisel. Üarmudilate naha tumedus defineeriti pilditöötlusprogrammi histogrammi alusel, nagu seda on varem tehtud võsavaksiku (*Ematurga atomaria*) üldise

tumeduse hindamiseks (Sandre et al., 2013). Meetod osutus usaldusväärseks ka kalade nahavärvi hindamisel, andes läbitöötatud kirjanduse kontekstis mitmeid ootuspäraseid tulemusi. Näiteks resultaati, et isasloomad olid emastest ka sigimisperioodi lõpus tumedamad, läheb kokku sellega, mida ümarmudilate bioloogia kohta on eelnevalt arvatud ning mida meil oli tänu uudsele meetodile võimalik ka visuaalselt tuvastada (Marentette et al., 2009). Valge taustaga akvaariumis oli võimalik tuvastada ja statistiliselt tõestada ka aja mõju katseloomade värvusele, kui nad asetati võõrast värvi substraadile – heledal põhjal muutusid loomad kümne minutiga kahvatumaks. Siiski, vahest kõige parem tõestus antud meetodi töökindluse kohta on see, et histogrammi andmete põhjal õnnestus ootuspäraseid ja teiste tulemustega ühilduvaid statistilisi erinevusi leida ka teises akvaariumis tehtud piltide puhul, millel oli halb valgustus. Nimelt kalade nahavärvi määrati ka valikuakvaariumis, kuigi nende piltide andmeid töö tulemustes ei kasutatud, sest samad seosed kajastusid juba homogeense põhjaga akvaariumitest saadud informatsioonis. Kokkuvõttes võib öelda, et pilditöötlusprogrammide histogramm on loomade naha tumeduse määramiseks hea vahend.

Enamus ümarmudilaid eelistavad tumedat värvi põhjasubstraati. Valikuakvaariumiga läbiviidud katsed näitasid, et ümarmudilad eelistasid tumedat värvi põhja nii esimese kui ka pikaajalisema peatuspaigana, olenemata sellest, kas katseloomad olid saabunud valget või musta värvi põhjaga akvaariumist. Üldiselt arvatakse, et morfoloogiline värvimuutus on kalade jaoks energiakulukas tegevus, kuid füsioloogilise värvimuutuse hinna kohta on informatsiooni vähem (Rodgers et al., 2013). Siin kirjeldatavates käitumiskatses püstitati hüpotees, et kui ümarmudilatel on valida heleda ja tumeda substraadi vahel, siis nad eelistavad viibida oma kehavärvile sarnasemat tooni põhjal. Kui see hüpotees oleks õigeks osutunud, oleks see võinud viidata asjaolule, et füsioloogilise värvimuutuse energia kulu tõttu eelistavad kalad käitumuslikku põhjavalikut oma värvi korrigeerimisele. Siiski, andmete analüüs sellist seost ei toetanud. Katseloomade valikut väljendavaid arve uurides on näha, et valgelt põhjalt saabunud kalad püsisid heledal kruusal kauem aega neljal juhul rohkem, kui mustalt põhjalt saabudes, kuigi see erinevus ei olnud statistilise olulisuse jaoks piisavalt suur. Võimalik, et suurema valimi korral oleks antud seos siiski statistiliselt oluliseks kujunenud. Samas on ümarmudilate tumeda tausta eelistus ka arusaadav, arvestades, et tegemist on põhjakaladega, kes pole harjunud helevalge keskkonnaga. Teisest küljest võis aga probleeme tekitada valikuvariantide äärmuslikus. On võimalik, et ümarmudilad ei ole suutelised valge kruusa heledust piisavalt hästi kopeerima ja otsustasid

meie katses tumeda põhjaga ühildumiseks uue värvimuutuse läbida, isegi kui see oli energeetiliselt kulukas. Samas on ka mõeldav, et füsioloogiline värvimuutus ei ole paari toimumiskorra puhul organismi jaoks oluliselt kulukas. Kokkuvõtteks võib siiski arvata, et tõenäoliselt annab tumedat värvi substraat ümarmudilatele lihtsalt parema peitumisvõimaluse kui hele põhi.

Esmakordselt kirjeldasime Soome lahe ümarmudilate nahavärvi muutlikust ja mustri eraldi kontrollitavaid komponente. Ümarmudilad kasutavad keskkonda sulandumiseks nii katkestatud varjevärvust kui vastuvarjutust (Arora & Kanta, 2009). Tumedaima osa nende nahamustrist moodustab külgedel ja seljal melanofooride peenelest triipudest koosnev marmorjas kiri. Ümarmudilate muster on harilikult alati kontrastne, muutudes enam-vähem eristamatuks vaid juhul, kui kala on kas erakordselt hele või tume. Vaatlused näitasid, et Soome lahe ümarmudilad suudavad oma mustri kontrastsust korrigeerida. Seevastu seni, kuni muster on eristatav, jäävad algselt tumedamad osad alati tumedamateks ja heledamad heledamateks. Vastupidist värvijaotust katses kasutatud valimi puhul ei täheldatud. Samuti ei märgatud, et ümarmudilate nahamustri kuju oleks füsioloogilise värvimuutuse käigus tajutavalt ümber kujunenud. Inimeste jaoks nähtavaima osa ümarmudilate värvusest moodustavad melanofoorid, määramata kollased kromatofoorid ja hõbedased leukofoorid. Samas pole välistatud, et kalade endi jaoks mängib suurt rolli iridofooride olemasolu, arvestades, et kalade nägemisvõime on inimeste omast erinev (Kröger, 2013). Kokkuvõtteks võib öelda, et ümarmudilate värvus on korrigeeritav, mustriosad eraldi kontrollitavad ja tekitatud tänu mitmesugust tüüpi kromatofooride koostoimimisele, kuigi melanofoorid paistavad varjumisvärvuses kõige tähtsamat rolli mängivat.

Käesoleva uurimustööga õnnestus selgitada mitmeid ümarmudila värvimuutuse aspekte, kuid mõnedki küsimused on veel vastuseta. Esiteks vääriskid tehtud katsed kordamist: suurem valim aitaks kinnitada stressi kindlasuunalist mõju värvusele ja kalade nägemisvõime hindamise töökindel meetod looks ülevaate silmaparasiitide mõjust isendite krüptilisele värvimuutusele. Samuti oleks kasulik määrata teiste, melanofooridest erinevate kromatofooride tähtsus, sest kuigi käesolevas töös keskenduti ümarmudilate pruunikale varjevärvusele, siis pole välistatud, et samamoodi tähtsat rolli mängivad antud liigi ökoloogias ka kollast pigmenti sisaldavad kromatofoorid ja struktuursed värvikandjad. Eriti seetõttu, et kalade nägemine on inimeste omast erinev ja iridofooride poolt tekitatud metalsed värvid võivad osutada kalade jaoks tähendusrikkamateks kui inimestele (Kröger, 2013). Kolmandaks, oleks hea sarnast katset korrata ümarmudilate sigimisperioodist

märgatavalt hilisemal ajal, tuvastamaks, kas isasloomade tumedam värv oli ainult tingitud äsjasest pulmavärvist või on isased ikka tõepoolest kogu aasta emastest tumedamad. Neljandaks tuleks jätkata värvimuutuse uurimist erinevate kalaliikide puhul, et saada rohkem informatsiooni sellest, kui levinud füsioloogiline värvimuutus tegelikult kalade seas on. Samuti oleks kasulik jätkata nii morfoloogilise kui ka füsioloogilise värvimuutuse võimaliku energia kulukuse uurimist.

Kokkuvõtlikult võib öelda et, Soome lahe ümarmudilad on tõesti kiireks füsioloogiliseks värvimuutuseks suutelised, kusjuures isased on septembri jooksul emastest tumedamad. Samas kalad, kes häirimise tulemusena tardusid, jäid liigikaaslastest heledamateks. Valikakvaariumiga läbiviidud katsed näitasid, et kui ümarmudilatel oli valida valge ning musta substraadi vahel, siis nad eelistasid tumedat põhja, olenemata sellest, mis värvi substraadil nad varem viibisid. Sealjuures, stressiga seotud käitumismallid, sugu ja silmade tervise indeks ei mõjutanud kalade põhjavalikut. Ükski vaadeldud faktoritest ei mõjutanud ka ümarmudilate füsioloogilise värvimuutuse suurust. Kirjeldasime ka ümarmudilate mustri muutlikkust, järeldades, et liigiomane tumedamate ja heledamate alade konfiguratsioon on püsiv, kuid läbi eri osade individuaalse kontrolli korrigeeritav.

Kokkuvõte

Välimus mõjutab elusorganismide ellujäämisvõimalusi. Kusjuures värvus on oluline osa isendite väljanägemisest, mis mõjutab näiteks loomade haavatavust kiskjatele, toitumisvõimalusi, sigimispartneri valikut ja liigisisest suhtlemist. Paljude selgroogsete puhul on nende värv kas vähe või vaid perioodiliselt muutuv omadus, kuid esineb ka erandeid. Mitmed poikilotermid suudavad oma värvi korrigeerida tänu pigmente sisaldavatele rakkudele ehk kromatofooridele. Värvimuutust jagatakse kiiruse ja mehhanismi järgi füsioloogiliseks või morfoloogiliseks, millest esimene tähendab pigmentide asukoha ja teine pigmentide hulga muutust. Värvimuutust on pikka aega uuritud, kuid siiski leidub vastuseta küsimusi: näiteks millised liigid on morfoloogiliseks või füsioloogiliseks värvimuutuseks võimelised, kui suur on värvimuutuse maksumus, või kuidas stress poikilotermide värvi mõjutab.

Sellest tulenevalt uurisime viie hüpoteesi tõesust. Esiteks, ümarmudilad (*Neogobius melanostomus*) on võimelised kiireks ehk füsioloogiliseks värvimuutuseks. Teiseks, ümarmudilate isasloomad on emastest tumedamad ja ei suuda läbi kiire värvimuutuse emastega võrdväärset heledust saavutada. Kolmandaks, stressis kalad jäävad teistest heledamaks. Neljandaks, silmaparasiitidega isendite värvimuutus on väiksem. Viiendaks, kalad eelistavad viibida endaga sarnasemat värvi põhjal. Samuti oli meil kaks lisaeesmärki: tõestada, et kalade värvi saab hinnata pilditöötlusprogrammi histogrammiga ja kirjeldada esmakordselt Soome lahe ümarmudilate eraldi kontrollitavate mustriosade muutlikkust.

Katses kasutasime 21 Soome lahest püütud ümarmudilat, kellel enne eksperimendi algust määrati sugu ja silmade tervis. Kõik loomad läbisid kolmest akvaariumist koosneva katsejada kaks korda, uurimaks värvimuutust nii valgel kui mustal põhjal. Kusjuures kahes esimeses akvaariumis viibisid kalad 10 ja viimases kuus minutit. Esimene akvaarium oli värvimuutuse esilekutsumiseks, teises ehk valikuakvaariumis said kalad valida endale meeldivamat põhja ja kolmandas vaadeldi isendite tardumiskäitumist. Programmi Adobe Photoshop CS4 histogrammi abil määrati kalanaha heledus ja pandi kirja, mis värvi ristkülikul kalad valikuakvaariumis esimesena peatusid ja millisel värvil rohkem aega veetsid.

Leidsime, et ümarmudilad on tõesti suutelised füsioloogiliseks värvimuutuseks, mis mõne isendi puhul toimub juba sekunditega ja misläbi suudavad ümarmudilad oma nahatooni samastada põhjaga tumedusega. Kalad, kes kolmandas akvaariumis täielikult tardusid, jäid

10 minuti jooksul teistest heledamaks, mistõttu usume, et häirimisest tulenev stress põhjustab kahvatumist, mis läheb kokku mitmete varasemate uurimustöödega. Isased ümarmudilad jäid emastest alati tumedamaks, mis näitab, et füsioloogilise värvimuutuse suurus on piiratud olemasoleva pigmendimaterjali hulgaga. Leidsime, et silmade tervise visuaalne hindamine ei olnud töökindel protseduur, samas kui kalade nahavärvi määramine pilditootlusprogrammi histogrammiga oli väga hea meetod. Samuti kirjeldasime Soome lahe ümarmudilate erivärvilistest joontest koosneva katkestatud varjevärvuse ja vastuvarjutuse muutlikkust.

Summary

Factors influencing fish skin coloration and analysis of patterning: an experiment with round gobies (*Neogobius melanostomus*)

Appearance influences species survival. Consistently, coloring has been shown to be an important part of animals' appearance, for example, influencing vulnerability to predators, dietary opportunities, mate selection and interspecies communication. For many vertebrates, body coloring remains a trait, which is either relatively unchangeable or only periodically mutable. However, there are also exceptions to that trend. In particular, many poikilothermic animals are able to alter their coloring according to necessity, thanks to pigment containing cells called chromatophores. The color changing process is divided, according to its speed and mechanics, into physiological and morphological changes. Physiological color change means adjusting the position of pigments in chromatophores, whereas morphological color change implies altering the amount of pigments and chromatophores in the animals' skin. The specifics of color change have been examined for some time now, but many questions still remain. For example, which species are capable of either morphological or physiological color change, what is the price of color change and how does stress influence animal colors.

Therefore we examined the veracity of five hypotheses. Firstly, round gobies (*Neogobius melanostomus*) are capable of fast physiological color changes. Secondly, round goby males are darker than females and thus unable to reach the same lightness values through physiological color change. Thirdly, highly stressed fish remain lighter than their companions. Fourthly, eye parasites impede color change. Fifthly, fish prefer substrates, to which they have already matched their body color. Also, we had two side objectives: to show, that fish body coloration can be analyzed with the help of a raster graphics editors histogram and to describe for the first time the separately controlled components of the skin patterns of round gobies from the Gulf of Finland.

In this work, 21 round gobies from the Gulf of Finland were used. At the start of the experiment, the sex and eye health of each fish was assessed. All fish completed a sequence of three aquariums twice, to study, how round gobies react to either a white or black background. Every fish spent 10 minutes in each of the first two aquariums and

roughly six minutes in the last one. The first aquarium was designed to initiate color change, second offered fish a choice between light as well as dark substrates and third was intended for measuring stress response. The histogram of Adobe Photoshop CS4 was used to determine the lightness of the skins of round gobies in the experiment. It was also recorded, which substrate color was the round gobies first stop in the second aquarium and what color fish spent the most time on overall.

We found, that round gobies are indeed capable of physiological color changes that sometimes only take seconds to occur and help the fish to blend into the background. Fish that showed an extreme stress response by freezing to place, remained lighter than their companions. Therefore, we believe that stress induces paling in round gobies, as it has been shown in several other fish species. Male round gobies always remained darker than the females, which indicates that the magnitude of physiological color change is severely limited by existing pigmentary material. We sadly found, that visual appraisal was not a trustworthy way to determine eye health in fish. However, the relatively new method of assessing skin coloration through a histogram of a raster graphics editor was indeed reliable. We also described the separately controlled nature of the different components of round goby skin patterns.

Tänuavaldused

Suured tänud juhendajatele Randel Kreitsbergile ja Arvo Tuvikesele. Suured tänud mikroskopeerijale Kristel Panksepale, samuti abilistele Merle Raigile ja Liina Veskele. Tänan ka kalade varustajat. Suured tänud töö kontrollimise eest Sirje Kirikule, Randel Kreitsbergile, Merle Raigile ja Taavi Virrole. Samuti tänan kõiki hea nõu andjaid.

Tänan Võrtsjärve Limnoloogiakeskust ruumide, varustuse ja abivalmiduse eest.

Kasutatud kirjandus

- Adjers, K., Andersson, J., Appelberg, M., Eschbaum, R., Fricke, R., Lappalainen, A., Minde, A., Ojaveer, H., Pelczarski, W., Repecka, R., 2006. Assessment of coastal fish in the Baltic Sea. *Baltic Sea Environment Proceedings* 103A, 1-26.
- Bagnara, J.T., Taylor, J.D., Hadley, M.E., 1968. The dermal chromatophore unit. *Journal of Cell Biology* 38, 67-79.
- Bergstrom, C.A., Whiteley, A.R., Tallmon, D.A., 2012. The heritable basis and cost of colour plasticity in coastrange sculpins. *Journal of Evolutionary Biology* 25, 2526-2536.
- Caro, T., 2013. The colours of extant mammals. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24, 542-552.
- Cox, S., Chandler, S., Barron, C., Work, K., 2009. Benthic fish exhibit more plastic crypsis than non-benthic species in a freshwater spring. *Journal of Ethology* 27, 497-505.
- Dijkstra, P.D., Hekman, R., Schulz, R.W., Groothuis, T.G.G., 2007. Social stimulation, nuptial colouration, androgens and immunocompetence in a sexual dimorphic cichlid fish. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61, 599-609.
- Ducrest, A.L., Keller, L., Roulin, A., 2008. Pleiotropy in the melanocortin system, coloration and behavioural syndromes. *Trends in Ecology & Evolution* 23, 502-510.
- Erikson, U., Misimi, E., 2008. Atlantic salmon skin and fillet color changes effected by perimortem handling stress, rigor mortis, and ice storage. *Journal of Food Science* 73, C50-C59.
- Fabacher, D.L., Little, E.E., 1995. Skin component may protect fishes from ultraviolet-B radiation. *Environmental Science and Pollution Research* 2, 30-32.
- Fairchild, E.A., Howell, W.H., 2004. Factors affecting the post-release survival of cultured juvenile *Pseudopleuronectes americanus*. *Journal of Fish Biology* 65, 69-87.
- Fujii, R., 2000. The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment Cell Research* 13, 300-319.

- Gentle, M.J., 1971. The central nervous control of colour change in the minnow (*Phoxinus phoxinus* L.). 1. Blinding and the effects of tectal removal on normal and blind fish. *The Journal of Experimental Biology* 54, 83-91.
- Goda, M., Fujii, R., 1995. Blue chromatophores in two species of callionymid fish. *Zoological Science* 12, 811-813.
- Goda, M., Fujii, R., 1996. Biology of the chromatophores of the Ice Goby, *Leucopsarion petersii*. *Zoological Science* 13, 783-793.
- Goda, M., Ohata, M., Ikoma, H., Fujiyoshi, Y., Sugimoto, M., Fujii, R., 2011. Integumental reddish-violet coloration owing to novel dichromatic chromatophores in the teleost fish, *Pseudochromis diadema*. *Pigment Cell & Melanoma Research* 24, 614-617.
- Gouveia, L., Rema, P., 2005. Effect of microalgal biomass concentration and temperature on ornamental goldfish (*Carassius auratus*) skin pigmentation. *Aquaculture Nutrition* 11, 19-23.
- Grether, G.F., Hudon, J., Endler, J.A., 2001. Carotenoid scarcity, synthetic pteridine pigments and the evolution of sexual coloration in guppies (*Poecilia reticulata*). *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 268, 1245-1253.
- Hallier, A., Chevallier, S., Serot, T., Prost, C., 2007. Influence of farming conditions on colour and texture of European catfish (*Silurus glanis*) flesh. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 814-823.
- Hurd, P.L., 1997. Cooperative signalling between opponents in fish fights. *Animal Behaviour* 54, 1309-1315.
- Karvonen, A., Seppala, O., 2008. Eye fluke infection and lens size reduction in fish: a quantitative analysis. *Diseases of Aquatic Organisms* 80, 21-26.
- Kelley, J.L., Phillips, B., Cummins, G.H., Shand, J., 2012. Changes in the visual environment affect colour signal brightness and shoaling behaviour in a freshwater fish. *Animal Behaviour* 83, 783-791.
- Kittilsen, S., Schjolden, J., Beitnes-Johansen, I., Shaw, J.C., Pottinger, T.G., Sorensen, C., Braastad, B.O., Bakken, M., Overli, O., 2009. Melanin-based skin spots reflect stress responsiveness in salmonid fish. *Hormones and Behavior* 56, 292-298.

- Kodricbrown, A., Brown, J.H., 1984. Truth in advertising - the kinds of traits favored by sexual selection. *American Naturalist* 124, 309-323.
- Kornis, M.S., Mercado-Silva, N., Vander Zanden, M.J., 2012. Twenty years of invasion: a review of round goby *Neogobius melanostomus* biology, spread and ecological implications. *Journal of Fish Biology* 80, 235-285.
- Kröger, R.H.H., 2013. Optical plasticity in fish lenses. *Progress in Retinal and Eye Research* 34, 78-88.
- Kvach, Y., Winkler, H.M., 2011. The colonization of the invasive round goby *Neogobius melanostomus* by parasites in new localities in the southwestern Baltic Sea. *Parasitology Research* 109, 769-780.
- Larsen, M.G., Hansen, K.B., Henriksen, P.G., Baatrup, E., 2008. Male zebrafish (*Danio rerio*) courtship behaviour resists the feminising effects of 17 alpha-ethinyloestradiol - morphological sexual characteristics do not. *Aquatic Toxicology* 87, 234-244.
- Leclercq, E., Dick, J.R., Taylor, J.F., Bell, G., Hunter, D., Migaud, H., 2010a. Seasonal Variations in Skin Pigmentation and Flesh Quality of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.): Implications for Quality Management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 7036-7045.
- Leclercq, E., Taylor, J.F., Migaud, H., 2010b. Morphological skin colour changes in teleosts. *Fish and Fisheries* 11, 159-193.
- Linderholm, A., Larson, G., 2013. The role of humans in facilitating and sustaining coat colour variation in domestic animals. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24, 587-593.
- Maia, C.M., Volpato, G.L., 2013. Environmental light color affects the stress response of Nile tilapia. *Zoology* 116, 64-66.
- Marentette, J.R., Fitzpatrick, J.L., Berger, R.G., Balshine, S., 2009. Multiple male reproductive morphs in the invasive round goby (*Apollonia melanostoma*). *Journal of Great Lakes Research* 35, 302-308.

- Matsumoto, J., 1965. Studies on fine structure and cytochemical properties of erythrophores in swordtail, *Xiphophorus helleri*, with special reference to their pigment granules (pterinosomes). *Journal of Cell Biology* 27, 493-504.
- Miki, W., 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 63, 141-146.
- Mojovic, L., Dierksen, K.P., Upson, R.H., Upson, R.H., Caldwell, B.A., Lawrence, J.R., Trempy, J.E., McFadden, P.N., 2004. Blind and naive classification of toxicity by fish chromatophores. *Journal of Applied Toxicology* 24, 355-361.
- Mueller, K.P., Neuhauss, S.C.F., 2014. Sunscreen for Fish: Co-Option of UV Light Protection for Camouflage. *Plos One* 9, 5.
- Nilsson Skold, H., Svensson, P.A., Zejlon, C., 2010. The capacity for internal colour change is related to body transparency in fishes. *Pigment Cell & Melanoma Research* 23, 292-295.
- Odenthal, J., Rossnagel, K., Haffter, P., Kelsh, R.N., Vogelsang, E., Brand, M., vanEeden, F.J.M., FurutaniSeiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Kane, D.A., Mullins, M.C., NussleinVolhard, C., 1996. Mutations affecting xanthophore pigmentation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 391-398.
- Olsson, M., Stuart-Fox, D., Ballen, C., 2013. Genetics and evolution of colour patterns in reptiles. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24, 529-541.
- Oshima, N., 2001. Direct reception of light by chromatophores of lower vertebrates. *Pigment Cell Research* 14, 312-319.
- Øverli, Ø., Sørensen, C., Nilsson, G.E., 2006. Behavioral indicators of stress-coping style in rainbow trout: Do males and females react differently to novelty? *Physiology & Behavior* 87, 506-512.
- Parker, A.R., 1998. The diversity and implications of animal structural colours. *Journal of Experimental Biology* 201, 2343-2347.
- Parker, A.R., Martini, N., 2006. Structural colour in animals - simple to complex optics. *Optics and Laser Technology* 38, 315-322.

- Pavlidis, M., Karkana, M., Fanouraki, E., Papandroulakis, N., 2008. Environmental control of skin colour in the red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture Research* 39, 837-849.
- Pike, T.W., Blount, J.D., Lindstrom, J., Metcalfe, N.B., 2010. Dietary carotenoid availability, sexual signalling and functional fertility in sticklebacks. *Biology Letters* 6, 191-193.
- Ramachandran, V.S., Tyler, C.W., Gregory, R.L., RogersRamachandran, D., Duensing, S., Pillsbury, C., Ramachandran, C., 1996. Rapid adaptive camouflage in tropical flounders. *Nature* 379, 815-818.
- Rasquin, P., 1946. On the reappearance of melanophores in blind goldfish. *Copeia Ann Arbor*, pp. 85-91.
- Rodgers, G.M., Gladman, N.W., Corless, H.F., Morrell, L.J., 2013. Costs of colour change in fish: food intake and behavioural decisions. *Journal of Experimental Biology* 216, 2760-2767.
- Rodrigues, R.R., Carvalho, L.N., Zuanon, J., Del-Claro, K., 2009. Color changing and behavioral context in the Amazonian Dwarf Cichlid *Apistogramma hippolytae* (Perciformes). *Neotropical Ichthyology* 7, 641-646.
- Rohrlich, S.T., 1974. Fine structural demonstration of ordered arrays of cytoplasmic filaments in vertebrate iridophores. A comparative study. *Journal of Cell Biology* 62, 295-304.
- Rotllant, J., Tort, L., Montero, D., Pavlidis, M., Martinez, M., Bonga, S.E.W., Balm, P.H.M., 2003. Background colour influence on the stress response in cultured red porgy *Pagrus pagrus*. *Aquaculture* 223, 129-139.
- Roulin, A., Ducrest, A.-L., 2013. Genetics of colouration in birds. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24, 594-608.
- Sandre, S.L., Kaasik, A., Eulitz, U., Tammaru, T., 2013. Phenotypic plasticity in a generalist insect herbivore with the combined use of direct and indirect cues. *Oikos* 122, 1626-1635.
- Seppala, O., Karvonen, A., Valtonen, E.T., 2005. Manipulation of fish host by eye flukes in relation to cataract formation and parasite infectivity. *Animal Behaviour* 70, 889-894.

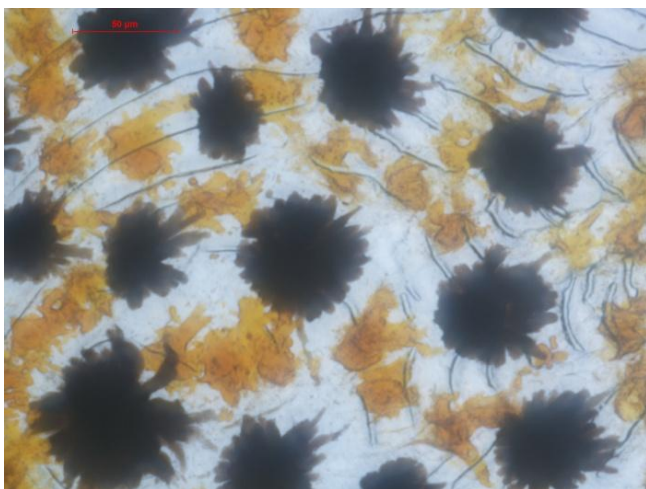
- Seppala, O., Karvonen, A., Valtonen, E.T., 2011. Eye fluke-induced cataracts in natural fish populations: is there potential for host manipulation? *Parasitology* 138, 209-214.
- Skold, H.N., Aspengren, S., Wallin, M., 2013. Rapid color change in fish and amphibians - function, regulation, and emerging applications. *Pigment Cell & Melanoma Research* 26, 29-38.
- Speares, P.A., Andraso, G.M., Phillips, E.C., Callahan, L.D., 2007. Response of round gobies (*Apollonia melanostomus*) to fibreglass models of conspecifics. *Ethology Ecology & Evolution* 19, 183-191.
- Sugimoto, M., 2002. Morphological color changes in fish: Regulation of pigment cell density and morphology. *Microscopy Research and Technique* 58, 496-503.
- Taylor, L.A., Maier, E.B., Byrne, K.J., Amin, Z., Morehouse, N.I., 2014. Colour use by tiny predators: jumping spiders show colour biases during foraging. *Animal Behaviour* 90, 149-157.
- Toft, G., Baatrup, E., 2001. Sexual characteristics are altered by 4-tert-octylphenol and 17 beta-estradiol in the adult male guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48, 76-84.
- Van der Salm, A.L., Martinez, M., Flik, G., Bonga, S.E.W., 2004. Effects of husbandry conditions on the skin colour and stress response of red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture* 241, 371-386.
- Van der Salm, A.L., Pavlidis, M., Flik, G., Bonga, S.E.W., 2006. The acute stress response of red porgy, *Pagrus pagrus*, kept on a red or white background. *General and Comparative Endocrinology* 145, 247-253.
- Van der Salm, A.L., Spanings, F.A.T., Gresnigt, R., Bonga, S.E.W., Flik, G., 2005. Background adaptation and water acidification affect pigmentation and stress physiology of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology* 144, 51-59.
- Verbeek, P., Iwamoto, T., Murakami, N., 2008. Variable stress-responsiveness in wild type and domesticated fighting fish. *Physiology & Behavior* 93, 83-88.

- Yavno, S., Corkum, L.D., 2010. Reproductive female round gobies (*Neogobius melanostomus*) are attracted to visual male models at a nest rather than to olfactory stimuli in urine of reproductive males. *Behaviour* 147, 121-132.
- Yule, A.M., LePage, W., Austin, J.W., Barker, I.K., Moccia, R.D., 2006. Repeated low-level exposure of the round goby (*Neogobius melanostomus*) to *Clostridium botulinum* type E neurotoxin. *Journal of Wildlife Diseases* 42, 494-500.

Lisa



Joonis 12. Ümarmudila soomusel on näha musti ja kollaseid kromatofore. Pildil leiduva punase joone pikkus on 500 µm. Foto: Kristel Panksep.



Joonis 13. Soomusel leiduvate kromatofooride lähivaade. Tumedat värvi kromatofoorid on melanofoorid, kollased kas erütrofoorid või ksantofoorid. Punase joone pikkus on 50 µm. Suurendus 400x. Foto: Kristel Panksep.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Heli Kirik

(sünnikuupäev: 04.03.1990)

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Kala nahavärvi mõjutavad tegurid ja mustri analüüs: eksperimenti ümarmudilatega (Neogobius melanostomus),

mille juhendajad on PhD Randel Kreitsberg ja PhD Arvo Tuvikene

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015