

MEDDELELSE FRA FORSØGSDAMBRUGET NR. 68
FEBRUAR 1984

VARMEBEHANDLING OG STERILITET HOS ØRREDER

AF

SVEIN O. SOLBERG, ALFRED JOKUMSEN OG VIGGO HØRLYCK

Indledning

Et af problemerne med opdræt af større fisk, både i fersk- og saltvand, er at de tit bliver kønsmodne inden de når salgbar størrelse. Foruden at kønsmodningen koster foderkalorier, er kønsmodne fisk, specielt hanner, af en meget ringe kvalitet og kan enten slet ikke sælges, eller må sælges til stærkt nedsatte priser.

Ved at anvende sent modne stammer har man en mulighed for at udskyde kønsmodningen. I praksis giver denne metode dog ikke tilfredsstillende resultater idet en hurtigere vækst bl.a. i saltvand tilsyneladende fremskynder kønsmodningen.

En frasortering af hannerne er en arbejdskrævende og usikker metode. Frasorteringen skal foregå på et så tidligt tidspunkt, at ikke alle hanner kan findes og da metoden heller ikke løser problemet med de tidligt kønsmodne hunner, er den ikke ideel.

Målet må være at kunne fremstille sterile fisk, eller i hvert fald udelukkende hunner.

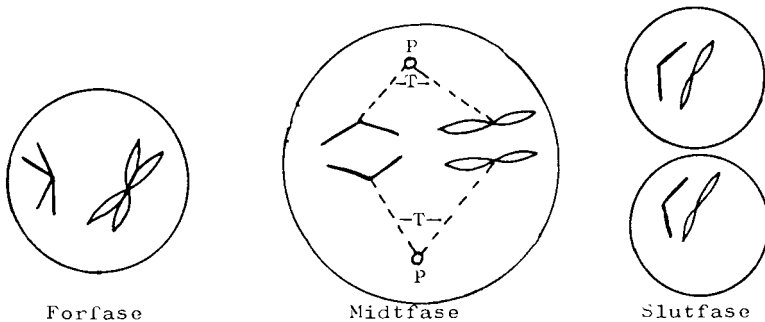
Ved strålebehandling af yngel kan man frembringe sterilitet (Donaldson & Hunter 1982), men denne metode må anses for uanvendelig i praktisk dambrugsdrift. En anden mulighed er temperaturchockbehandling der har vist sig at kunne frembringe sterile fisk.

Til forskellige fiskearter har man forsøgt både kulde- og varmechock (Chourrout 1980), men overfor regnbueørreder har varmechock vist sig at være mest lovende.

Hvis nybefrugtede æg udsættes for et varmechock på det rigtige tidspunkt, medfører dette en forstyrrelse af den normale kromosomdeling. Fostrene får ikke det normale dobbelte kromosomsæt (diploide), men et kromosomsæt mere (triploide) og bliver dermed sterile. Dette har følgende biologiske forklaring:

Ved dannelsen af æg og sæd hos normale hunner og hanner sker der en halvering af kromosomtallet ($1n$) således, at når et æg ($1n$) befrugtes med en sædcelle ($1n$) fås et nyt diploidt afkom ($2n$).

Selve kønscelledannelsen foregår i flere faser, hvoraf én fase er afgørende for fremstillingen af triploide (sterile) fisk. I forenklet form angives her de 3 vigtigste faser, der foregår omkring det tidspunkt, hvor æggene er modne.



I forfasen er kromosomerne (her er kun angivet 2 kromosomer) spaltet på langs, men de hæfter sammen på midten.

Ægudviklingen standser mellem for- og midtfasen, hvor æggene er klar til befrugtning. Befrugtningen stimulerer udvikling af midt- og slutfasen (Allen & Stanley 1981).

I midtfasen er der dannet 2 såkaldte pollegemer (P), hvorfra der udgår tentråde (T), der fæstner til hver sin kromosomhalvdelen. De delte kromosomer trækkes nu til hver sin pol i cellen og der dannes en ny hinde om hver af de to nye celler (slutfasen).

Varmechock i midtfasen medfører ødelæggelse af pollegemer og tentråde, således at kromosom- og celledeling forhindres

(Purdom 1983). Der er herved opstået en ægcelle med dobbelt kromosomtallet ($2n$), der ved befrugtning med en $1n$ sædcelle bliver triploid ($3n$). En afgørende forudsætning for fremstilling af sterile fisk er altså, at varmebehandlingen foretages i midtfasen. Endvidere er det væsentligt at anvende netop modne æg, idet det har vist sig, at blot lidt overmodne æg er ufølsomme overfor varmebehandling (Lemoine & Smith 1980).

Metode

Der er i vintrene 1982 og 1983 forsøgt fremstillet sterile ørreder på flere danske dambrug. Æggene stryges, befrugtes og tilsættes vand som normalt. Temperaturen skal være 10°C . Efter 10 minutter neddyppes æggene i $36-37^{\circ}\text{C}$ varmt vand i et minut og sættes derefter tilbage i klækkerenden (Thorgaard and Jazwin 1981). Da det i praksis viste sig at normale klæktemperaturer ikke var 10°C , men sædvanligvis $7-8^{\circ}\text{C}$ blev tiden fra befrugtning til varmechock omregnet v.h.a. minutgrader. 10 minutter i 10° varmt vand giver 100 minutgrader, og hvis vandtemperaturen kun var 7°C skulle tiden fra befrugtning og vandtilsætning være ($100:7 =$) 14 minutter.

For at undersøge om varmebehandlingen havde resulteret i triploide ørreder, blev der udtaget og analyseret en række blodprøver.

Ved undersøgelsen benytter man sig af, at der er en sammenhæng mellem DNA-indholdet ("arvemassen") og kromosomtallet, d.v.s. ved normalt kromosomtallet (diploide = $2n$) har man $2 \cdot \text{DNA}$, mens man ved en triploid fisk (= $3n$) vil have $3 \cdot \text{DNA}$. Ved analysen måles DNA-indholdet i forhold til en kendt standard. Analysemetoden, der kaldes flow cytometrisk måling, går ud på, at man sender lys af en bestemt bølgelængde gennem den enkelte blodcelle. Blodcellen tilbagesender et lyssignal, hvis styrke afhænger af DNA-indholdet i cellen. Signalet fra en normal diploid celle har en bestemt styrke, mens en triploid celle giver et signal, der er 1,5 gange kraftigere. Metoden giver således et særdeles nøjagtigt svar på, om den foretagne varmebehandling af nybefrugtede æg har resulteret i triploide regnbueørreder.

Resultater:

Fra oktober 1983 - februar 1984 blev der udtaget blodprøver af fisk på 6 dambrug, hvor man havde anvendt den samme varmebehandlingsprocedure.

1. Ensted-anlægget (kølevandsdambrug).

Æggene blev på Dambrug A varmebehandlet af Forsøgsdambruget primo marts 1982. Æggene blev efter befrugtning nedlagt i $7\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$ varmt vand og efter 13 min. neddyppet i 36°C varmt vand i 1 min. for derefter at tilbageføres til normal temperatur. Medio april blev øjenæggene overført til Forsøgsdambruget, hvor de klækkede i tiden 13.-22. april. Der var normal dødelighed. Fiskene voksede godt og var ved overflytningen til Ensted-anlægget den 3. januar 1983 i gennemsnit 230 g.

Blodprøverne viste ingen triploide ørreder.

De efterfølgende behandlinger blev alle foretaget i vinteren 1983.

2. Dambrug B.

To grupper blev i 10 min. efter befrugtning dyppet i h.h.v. 1 og 2 min. i et kar med stillestående 36°C varmt vand og derefter indlagt i klækkebakke som normalt. Der blev konstateret større dødelighed i de æg, der blev behandlet i 2 min., hvorimod der i de i 1 min. behandlede æg ikke var større dødelighed end sædvanligt.

Blodprøveundersøgelsen viste at ingen var triploide.

3. Dambrug C.

Den omtalte behandlingsprocedure blev stort set fulgt.

Ingen af blodprøverne viste triploide ørreder.

4. Dambrug D.

Æggene blev varmebehandlet i 1 min. ved $36-37^{\circ}\text{C}$. 12-13 min.

efter befrugtning og vandtilsætning. Behandlingen blev foretaget på Dambrug A.

Blodprøveundersøgelserne viste, at 50% af fiskene var triploide.

5. Dambrug E.

Jomfruæg - 14.000 stk./l. - blev 12 min. efter befrugtning og vandtilsætning nedsænket i 36°C varmt vand.

Ingen af blodprøveundersøgelserne viste triploide ørreder.

6. Forsøgsdambruget.

13 min. efter vandtilsætningen til de nybefrugtede æg blev de neddyppet i 37°C varmt vand i 1 min. Under dypningen lå æggene i en klækkebakke, og denne bevægedes op og ned, for at sikre en jævn opvarmning af alle æg. Blodprøverne viste, at 70% af fiskene var triploide.

Da der var stor spredning på fiskestørrelsen, kunne man tænke sig at triploiditeten lå til grund for forskelle i væksthastighed. Fiskene blev derfor sorteret i tre størrelser, hvorefter der blev udtaget 20 blodprøver af hver gruppe.

Resultatet fremgår af nedenstående tabel:

Størrelse	% triploide
ca. 150 g/stk.	35
- 100 - -	75
- 50 - -	80

Diskussion

Resultatet viste, at der var flest triploider blandt de mindste fisk. Varmebehandlingen med den deraf følgende kromosomforstyrrelse medfører altså en nedsat vækst, i det mindste, det første år. Yderligere er der konstateret forhøjet dødelighed (op til 90%) blandt varmebehandlede æg og -yngel sammenlignet med normale, diploide ørreder.

Det afgørende for fremkaldelsen af triploiditet i ørreder er sandsynligvis et samspil mellem fosterets temperatur, behandlingstidspunktet samt varigheden af behandlingen. Vi udfører derfor forsøg, i 1984, ved forskellige vandtemperaturer og tidspunkter efter befrugtning og vandtilsætning, for at klarlægge:

1. Hvilken temperatur, der skal opnås inde i æggene, og
2. i hvor lang tid denne temperatur skal vedligeholdes for at opnå triploide ørreder.
3. Hvorledes skal forholdet mellem æg- og vand-volumen være for at man i praksis kan opretholde den rette temperatur i den fornødne tid uden uacceptabel dødelighed.

Referencer:

- Allen, S.K. Jr. and Jon G. Stanley, 1981: Polyploidy and gynogenesis in the culture of fish and shellfish. ICES C.M. 1981/F.: 28. Mariculture Committee.
- Chourrout, D., 1980: Termal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Reprod. Nutr. Develop.*: 20 (3A), 727-733.
- Donaldson, Edward M. and George A. Hunter, 1982: Sex control in fish with particular reference to salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 99-110.
- Lemoine, H.L., Jr. and Lewis T. Smith, 1980: Polyploidy induced in Brook trout by cold shock. *Transactions of the American Fisheries Society* 109: 626-631.
- Purdom, C.E., 1983: Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture*, 33: 287-300.
- Thorgaard, G.H. and Mary Ellen Jazwin, 1981: Polyploidy Induced by Heat Shock in Rainbow Trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 110: 546-550.

