

MEDDELELSE FRA FORSØGSDAMBRUGET NR. 69
FEBRUAR 1985

VARMEBEHANDLING OG STERILITET HOS ØRREDER II

AF

ALFRED JOKUMSEN, SVEIN O. SOLBERG OG VIGGO HØRLYCK

Forsøgdambruget takker "Henriksens Fond" for støtte til indkøb af udstyr, som var en forudsætning for projektets gennemførelse.

Indledning.

Produktion af store regnbueørreder er forbundet med en række problemer, der skyldes kønsmodning, se Meddelelse fra Forsøgssdambruget nr. 68. Blandt bivirkningerne af kønsmodning kan nævnes:

- a) Nedsat ædelyst.
- b) Nedsat kødtilvækst.
- c) Forringet kødkvalitet.
- d) Større rensespild ved slagtning.
- e) Høj dødelighed, specielt hos hanner i saltvandsopdræt.
- f) Kønsmodne hanner bliver mørkfarvede og påfører ved deres aggressive adfærd hinanden sår, der fungerer som infektionsvej med påfølgende dødelighed.

Blandt fordelene ved opdræt af fisk, der ikke bliver kønsmodne kan nævnes manglende udvikling af funktionsdygtige kønsorganer og reduceret rensespild ved slagtning.

Forsøgssdambruget har udført en række forsøg med henblik på at undgå kønsmodningsproblemerne bl.a. ved fremstilling af sterile fisk.

Metoden går ud på at udsætte nybefrugtede æg for et varmekok, hvorved æg-kromosomernes deling undertrykkes. Ved en normal befrugtning deler æg-kromosomerne sig i to sæt, hvoraf det ene degenerer, mens det andet, ved befrugtningen, smelter sammen med sædcellens kromosomsæt til en normal (diploid) celle ($2n$). Varmekoket forhindrer æg-kromosomernes deling, således at æg-cellens dobbelte kromosomsæt smelter sammen med sædcellens enkelt-sæt til en triploid celle ($3n$).

Ved en tidligere undersøgelse (SOLBERG et al., 1984) blev det sandsynliggjort, at der var en sammenhæng mellem fostrets temperatur, behandlingstidspunktet samt varigheden af behandlingen.

Nærværende undersøgelse havde følgende formål:

A. Varmebehandling af nybefrugtede æg 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.

B. Undersøgelse af 1½ års regnbueørreder udviklet af varmebehandlede æg m.h.t.:

1. Evt. sammenhæng mellem ploiditet, vækst, køn og udvikling af kønsorganer (gonader).
2. Sammenligning af rensespild (ved slagtning) hos diploide og triploide ørreder.

Metode:

Temperaturen i enkelt-æg blev målt med en mikro-elektrode (Type A-ISC) forbundet til et 5-kanal præcisions termometer (Type du 81, Ellab, København). Elektroden blev fikseret i ægget ved hjælp af en af sølv specialfremstillet æg-holder fastgjort på elektrodeskaftet (Fig. 1). Vandtemperaturen samt temperaturen i ægmassen blev målt med mikroelektroder, af type A-F6.

Der blev udført 2 forsøgs-serier i februar-marts 1984:

Første serie foregik på Forsøgsdambruget. Der blev udført 16 forsøg med følgende variable:

1. Tid mellem befrugtning og varmechok.
2. Temperatur af termobad.
3. Varighed af varmechok.

Til varmebehandling af æggene blev anvendt et 250 l isoleret, termostatstyret vandbad. Efter befrugtning og vandtilsætning (10°C) blev æggene ($\frac{1}{2}$ l) nedsænket i termobadet, hvorpå de blev anbragt i klækkerenden ved 10°C .

Anden serie. Der blev udført 20 forsøg med de samme variable som i første serie på et andet dambrug.

I denne forsøgsserie blev æggene efter befrugtning og vandtilsætning (8°C) nedsænket i et 60 l termostatstyret stålkar og derefter sat tilbage i klækkerenden ved 8°C .

Under varmebehandlingen blev temperaturen registreret med intervaller på 30-60 sekunder i:

- a) termobadet
- b) enkelt-æg
- c) æg-massen.

Ca. 10 uger efter klækning blev der udtaget blodprøver til kromosomtællinger (ploeditetsanalyser). Efter afklipping af halen, blev en bloddråbe opsamlet fra halevenen. Blodprøven blev opbevaret i TRIS buffer, pH 8. Ploeditetsanalyserne blev foretaget ved flow cytometrisk måling (JAKOBSEN 1983; SOLBERG et al, 1984).

Resultater.

A. Varmebehandling af nybefrugtede æg.

Af de udførte 36 forsøg resulterede de 32 i få eller ingen triploider.

I de resterende 4 forsøg, der alle resulterede i 90% triploider, er temperaturforløbet vist i figur 2-4. I eksperimenterne i figur 2 (første serie) er varmebehandlingen udført i henholdsvis 10 og 20 minutter efter vandtilsætningen ved 10°C. Temperaturen i enkelt-æg nåede op på henholdsvis 29,5° og 31,0° efter 60 sekunders varmebehandling, hvorefter de respektive temperaturer holdt sig konstant resten af behandlingstiden (5 min.).

Fig. 3 og 4 (anden serie) refererer til varmebehandlingsforsøg udført henholdsvis 15 og 25 min. efter vandtilsætning (8°C).

I det ene forsøg (figur 3) steg temperaturen i enkelt-æg fra 26° til 30,5°C og i det andet (figur 4) fra 21,5° til 29°C i løbet af behandlingsperioden (9 min. henholdsvis 10 min.).

Diskussion.

Forsøgene viser, at man kan opnå en høj frekvens af triploide regnbueørreder, hvis

1. middeltemperaturen i æggene er 26-30°C.
2. varmebehandlingen udføres 100-200 gradminutter efter vandtilsætningen og
3. behandlingen varer 5-10 minutter.

Et stort vandvolumen af termobadet - f.eks. 250 l - sikrer et mere stabilt temperaturforløb end et lille termobadvolumen (60 l).

Æg-dødeligheden var ca. 50% i hver af de 4 forsøg.

Dette kan bl.a. skyldes:

- a) Triploider har begge hunlige kromosomsæt, hvorved der kan opstå en grad af indavl, der kan medføre øget dødelighed.
- b) Selve varmebehandlingen (temperaturen og varigheden).
- c) Varmechoket kan give fosterskader, der nedsætter levedygtigheden.
- d) Manipulation af æggene før hærkning.

B. Undersøgelse af 1½ års regnbueørreder udviklet af varmebehandlede æg.

Metode.

De undersøgte fisk er udviklet fra æg, der blev varmebehandlet på Forsøgsdambruget i foråret 1983 (se Meddelelse fra Forsøgsdambruget nr. 68 side 6).

Af et vod-træk blev udtaget en stikprøve på 100 fisk.

Til ploidityetsbestemmelse blev der udtaget en blodprøve - med steril sprøjte og kanyle - af hver enkelt fisk, der herefter

blev lagt i en nummereret plasticpose (1-100) til senere undersøgelse.

Ploiditetsanalyserne blev udført som tidligere beskrevet (JAKOBSEN, 1983; SOLBERG et al., 1984).

Resultater:

Eksperimentet viste, at der i stikprøven var 71% triploider: 20 hanner (♂), 0 hunner (♀) og 51 blanke (ikke kønsmodne).

I tabel 1 er angivet rensespild og middelvægt med standardafvigelse (S.D.) for de triploide fisk i henholdsvis rund og rensset tilstand samt for gonader.

Renset vægt af triploide hanner var signifikant højere (5% signifikantniveau) end af blanke, mens rensespildet var 17% lavere hos triploide hanner end hos de blanke. Større rensespild hos blanke skyldtes større mængde flommefedt end hos kønsmodne fisk.

Tabel 2 angiver tilsvarende rund og rensset vægt, gonadevægt samt rensespild for de diploide fisk i stikprøven.

De diploide hanner og blanke fisk havde signifikant højere vægt end triploiderne.

De diploide hanner's gonader vejede 44% mere end de triploide hanner's, ligesom rensespildet var 10-17% større hos diploiderne end hos triploiderne.

Diskussion.

På baggrund af vore undersøgelser og litteratur-referencer, gives følgende status og konklusion:

Status for opdræt af triploide regnbueørreder.

1. Diploide regnbueørreder har bedre tilvækst end triploide - i hvertfald indtil 1½ års-alderen.

LINCOLN & BYE (1984) fandt tilsvarende vækstforhold mellem diploide og triploide regnbueørreder indtil tidspunktet for diploidernes kønsmodning i 2 års-alderen og dermed nedsat væksthastighed. LINCOLN & BYE mener, at opdræt af diploide og triploide regnbueørreder i samme dam kan forklare de observerede forskelle i vækst ved, at triploider er mere sky end diploider, hvilket stiller triploiderne ringere ved fodertildelingen.

2. Triploider opretholder god vækst sammenlignet med den nedsatte væksthastighed hos kønsmodne diploider i gydeperioden, hvor kønsmodne fisks fødeoptagelse er stærkt reduceret.
3. Der fandtes ingen triploide hunner, men til gengæld 51 triploide blanke. Da undersøgelsen blev foretaget på 1½ års fisk, ville man næppe observere kønsmodne hunner.

Det er tidligere beskrevet, at ovarie udviklingen hos triploide hunner er begrænset til en trådformet struktur (THORGAARD & GALL, 1979; BENTEY & SUTTERLIN, 1984). Der er ingen produktion af kønshormon (LINCOLN & BYE, 1984), hvorfor disse fisk har blank-fisk karakterer. Triploidi menes ikke at påvirke forholdet mellem antal hanner og hunner (SOLAR et al., 1984).

4. Triploider udgør salgbar fisk af god kvalitet i en periode med stor efterspørgsel (jul), hvor kønsmodne diploider har nedsat kødkvalitet.
5. Triploide hanner udvikler testikler, hvis størrelse dog var signifikant mindre end diploide han-gonader.

LINCOLN & BYE (1984) angiver, at selvom triploide hanner er sterile, producerer testiklerne stadig de steroidhormoner, der fremkalder de sekundære køns karakterer.

Konklusion.

1. Forskellig udvikling af kønsorganer hos de to køn - jvf. status pkt. 3 og 5 - medfører, at kun triploide hunner vil have produktionsmæssig interesse.

På Forsøgdambruget arbejdes der for tiden med fremstilling af rene hun-kuld (all female). Ved varmebehandling af sådanne æg, vil de derved dannede triploider være triploide hunner.

2. Hvis slagtning finder sted under kønsmodningen, kan metoden med fordel udnyttes i kølevand, hvor alle hanner og mange hunner kønsmodnes som 2 års fisk og iøvrigt ved produktion af meget store fisk (3-års hunner).

Referencer.

- BENFEY, TILLMANN J. and ARNOLD M. SUTTERLIN, 1984: Growth and gonadal development in triploid landlocked atlantic salmon (*Salmo salar*). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 41: 1387-1392.
- JAKOBSEN, ANDERS, 1983: The use of trout erythrocytes and human lymphocytes for standardization in flow cytometry. Cytometry, 4: 161-165.
- LINCOLN, RICHARD and VICTOR BYE, 1984: Triploid rainbows show commercial potential. Fish Farmer, September 1984: 30-32.
- SOLAR, IGOR I., EDWARD M. DONALDSON and GEORGE A. HUNTER, 1984: Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by heat shock, and investigation of early growth. Aquaculture, 42: 57-67.
- SOLBERG, SVEIN O., ALFRED JOKUMSEN og VIGGO HØRLYCK, 1984: Varmebehandling og sterilitet hos ørreder. Meddelelse fra Forsøgdambruget nr. 68.
- THORGAARD, G.H. and G.A.E. GALL, 1979: Adult triploids in a rainbow trout family. Genetics, 93: 973-981.

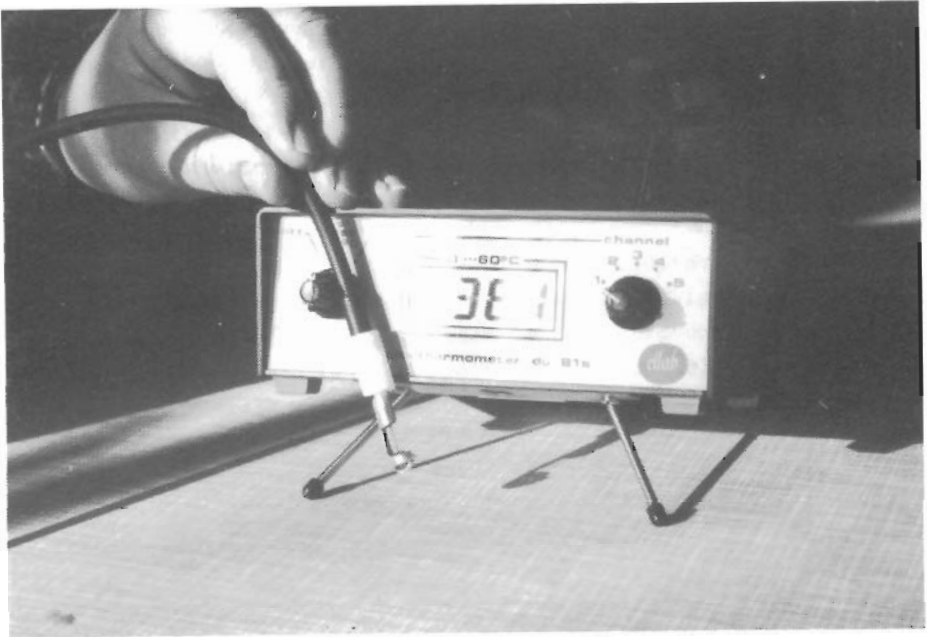


Fig. 1. På det øverste billede ses præcisionstermometret og på det nederste ses den specialfremstillede ægholder med æg, hvori temperaturføleren er indført.

Fig. 2.

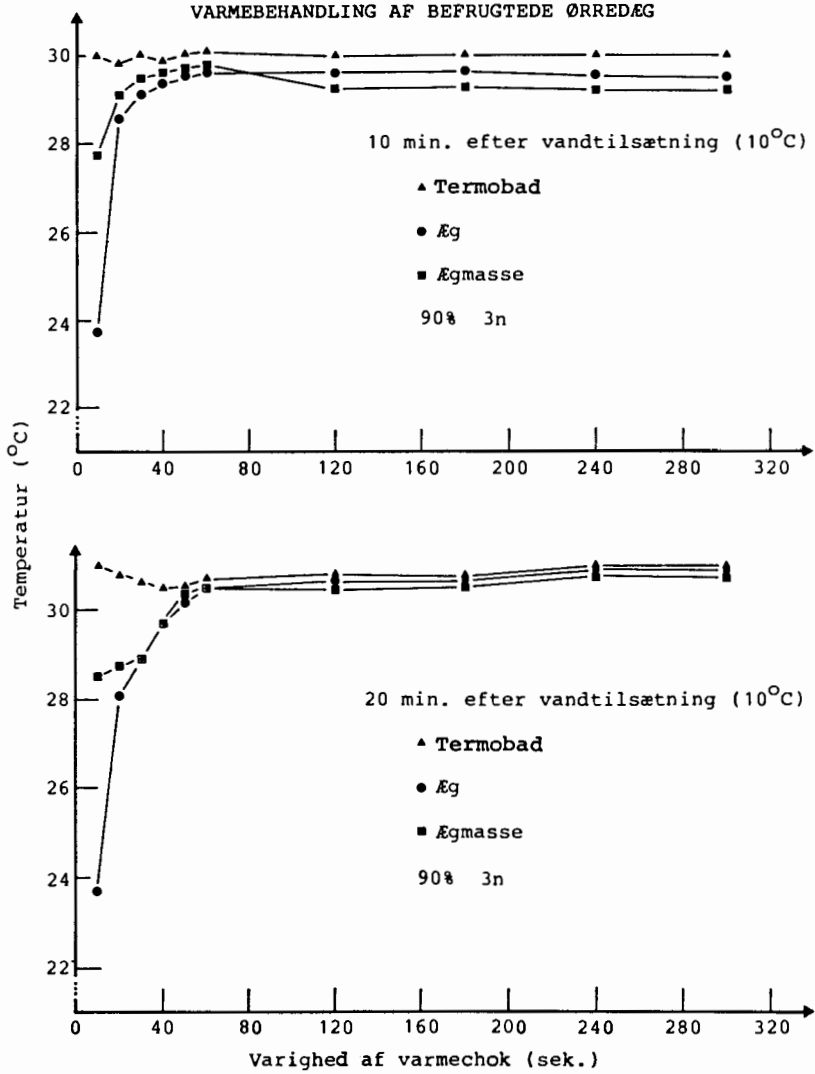


Fig. 3

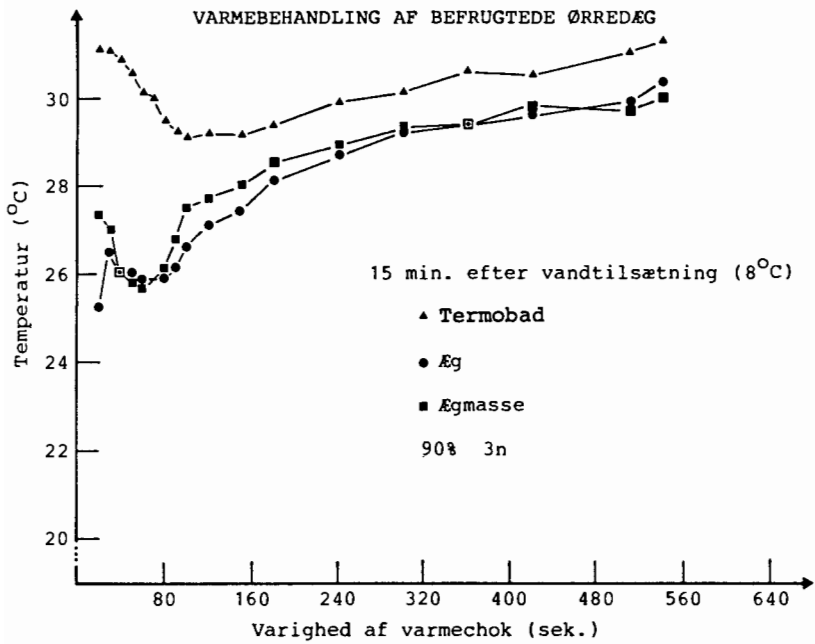
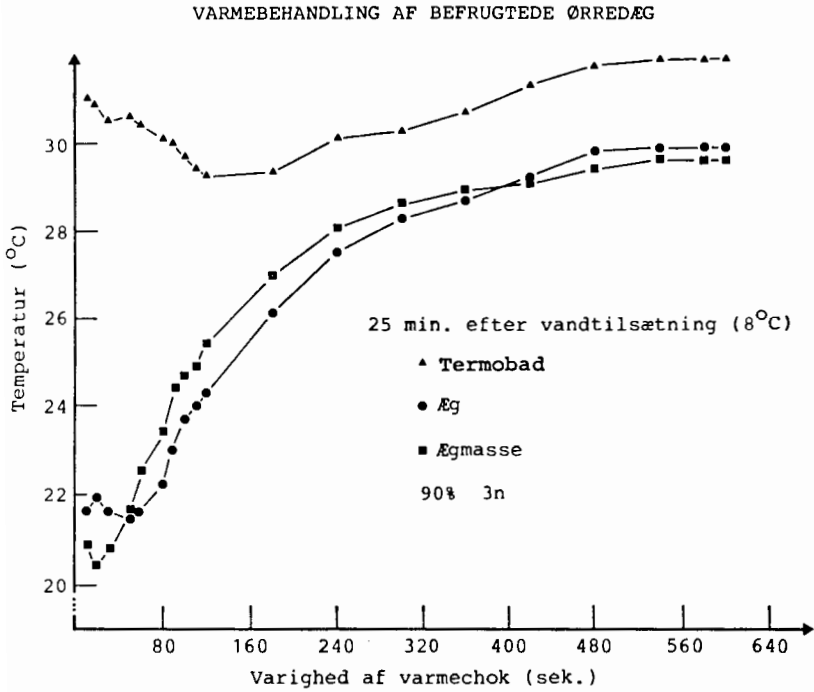


Fig. 4.



Tabel 1. Opdeling af triploiderne efter køn.

Køn	Antal	middelvægt ± S.D. (g)			Rense- spild (%)
		Rund	Renset	Gonade	
♂	20	1272,5 ± 222,9	1110,2 ± 174,4	36,8 ± 14,0	12,8
♀	0	-	-	-	-
Blank	51	1197,7 ± 191,3	1012,7 ± 160,7	-	15,4

Tabel 2. Opdeling af diploiderne efter køn.

Køn	Antal	middelvægt ± S.D. (g)			Rense- spild (%)
		Rund	Renset	Gonade	
♂	12	1547,2 ± 255,2	1306,9 ± 210,1	65,8 ± 14,4	15,5
♀	8	1493,9 ± 389,0	1204,9 ± 304,3	119,2 ± 54,9	19,3
Blank	9	1357,2 ± 243,6	1125,6 ± 226,9	-	17,1

