

Begrepet klekking brukes om prosessen en organisme bruker til å forlate det beskyttende eggeskallet. Kveite klekker på en fascinerende og nøye tilpasset metode hvor larven lager et lokk i egget ved en avgrenset enzymatisk nedbrytning av eggeskallet. Cellene som produserer klekkeenzymet (klekkekjertlene) er lokalisert i et smalt belte rundt fremre del av plommesekken. Det finnes ingen klekkekjertler på ryggen av larven og skallet forblir her intakt og fungerer som et hengsel til lokket slik at lokket sitter festet til bunnen når larven presser seg ut av egget. Klekkekjertlene dannes halvveis i eggperioden, først som en disk av celler i fremkant av embryo. Denne samlingen av celler migrerer så utover plommesekken inntil ringen av kjertelceller er lokalisert 90 grader på kroppaksen. Ved klekking trekker bakre del av plommesekken seg sammen slik at fremre del av plommesekken presses ut mot eggeskallet og dermed kommer klekkekjertlene i direkte kontakt med eggeskallet. En sikrer da en avgrenset nedbrytning av eggeskallet samtidig som at larven låses i riktig posisjon i forhold til åpningen.

Lys virker hemmende på den normale klekkeprosessen. Denne hemmingen oppheves i mørke. En egggruppe hvor klekkeskjertletidspunktet er utsatt for lyshemming vil ved tilbakeføring til mørke klekke i løpet av en periode på 90 – 120 minutter. Lysregulering kan dermed brukes til å synkronisere en egg-gruppe slik at den klekker innenfor en halv time. I tillegg kan klekkeskjertletidspunktet bestemmes. Klekking kan på mange måter defineres som en adferd som blir igangsatt etter et bestemt utviklingsstadium. Selve utviklingsprosessen av embryoet er uavhengig av klekkeskjertletidspunktet. En larve som klekker sent vil ha samme utviklingsgrad som en larve som klekket tidlig ved et gitt tidspunkt.

Innledning

Embryonalutvikling der en enkelt celle utvikler seg til en hel organisme er en av de mest fascinerende prosesser i naturen. Denne prosessen innebærer deling, vekst og spesialisering av mange ulike celletyper som skal integreres og organiseres til en funksjonell organisme. I denne kritiske fasen er organismen beskyttet av eggeskall. Dette er et generelt fenomen fra lavtstående dyregrupper helt opp til menneske. På et visst punkt i utviklingen må embryoet forlate egget for å kunne vokse og utvikle seg videre. Det er denne prosessen vi kaller klekking. Naturen har utviklet ulike metoder for å klekke. Begrepet klekking assosieres nok først og fremst med hønskyllingen som bruker nebbet til å hakke seg ut av egget til et liv i frihet. Slik klekking betegnes som mekanisk klekking. I tillegg har vi dyregrupper som klekker ved hjelp av å øke trykket inne i egget til eggeskallet sprekker. Fisk, amfibier og pattedyr bruker en mere sofistikert metode for å bryte seg ut av egget, nemlig en enzymatisk nedbrytning. I dette kapitlet skal vi se nærmere på klekkeprosessen hos fisk og spesielt på klekkeprosessen hos kveite.

Historie

Allerede i begynnelsen av dette århundre ble det beskrevet at eggeskallet til lungefisk ble myker før klekking (Kerr, 1900). Noen år senere ble det videre oppdaget at det var enzym "ferment" fra perivitellin væsken som hadde evnen til å bryte ned eggeskallet og at væske fra ett egg kunne bryte ned eggeskallet fra mange egg. Termen klekkeenzym ble først brukt av (Needham, 1931) og klekkekjertlene ble først beskrevet i 1944 av (Ishida, 1944) i arten Medaka (*Oryzias latipes*). Siden den gang er klekkeprosessen hos mange fiskearter beskrevet først og fremst ved morfologiske studier av klekkekjertlene og studier av klekkeenzymet.

Eggeskallet hos fisk

Eggeskallet hos fisk består av et tynt ytre lag (zona pellucida) og et mye tykkere indre lag (zona radiata eller chorion) som utgjør styrken til egget. Dette laget er bygd opp av flere lameller og består av flere proteinenheter (Zr1, Zr2 og Zr3) ((Murata et al., 1994; Murata et al., 1995; Murata et al., 1997), 94,95,97, (Oppen-Berntsen et al., 1990b)) (Oppen-Berntsen et al., 1999) som bindes sammen til et uøselig proteinkompleks ved herdeprosessen.

Klekkeenzymet

Ved klekking blir det rigide proteinkomplekset i eggeskallet nedbrutt og svekket slik at larven klarer å presse seg ut av egget. Enzymet som bryter ned eggeskallet kalles klekkeenzym. Hos noen fiskearter er det vist at dette ikke bare er ett enzym, men at det er et enzymesystem bestående av to proteaser som arbeider sammen (Yasumasu et al., 1992). Klekkeenzymet er en endopeptidase som effektivt spalter polypeptidkjeden ved spesifikke aminosyrer. Det ytterste

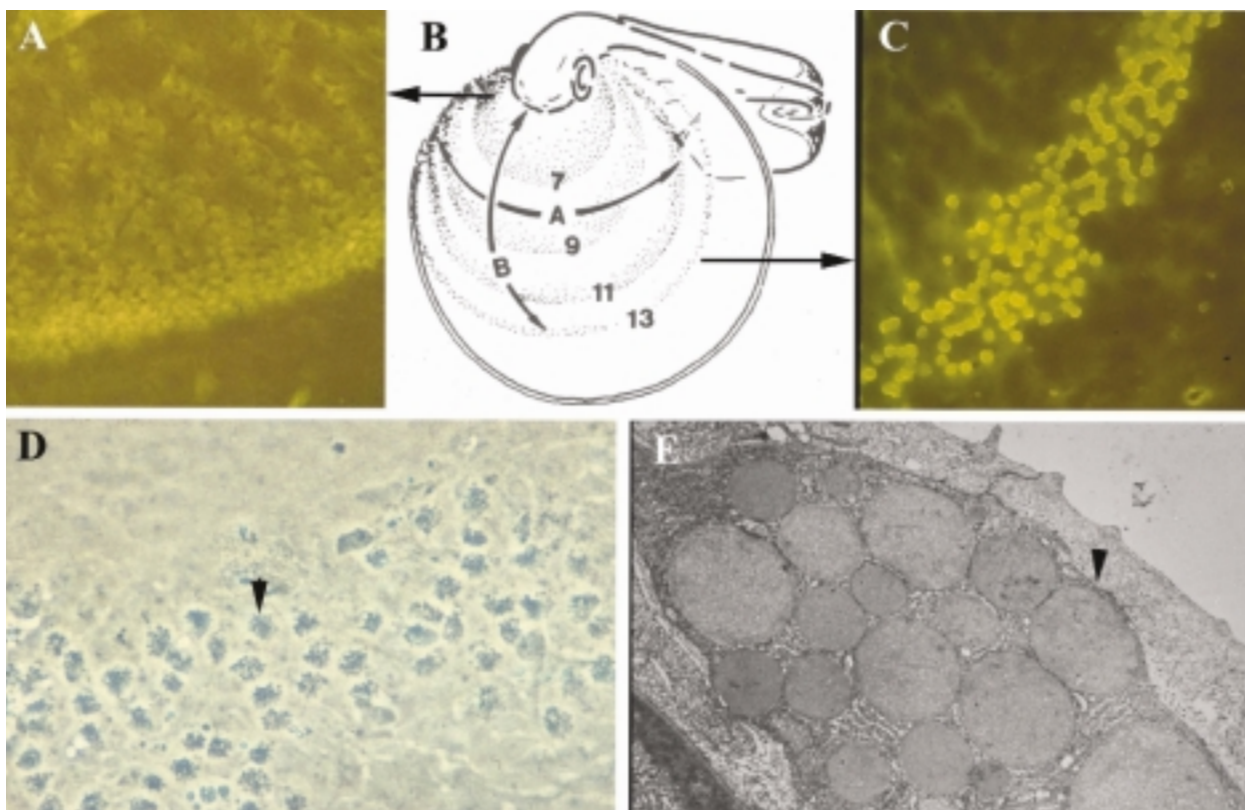


Fig. 1. Klekkekjertlene kan ved dag 7 (A og B) sees som en ring av celler rundt hodet til kveitelarven hvorefter de vandrer utover plommesekken (B, tallene indikerer kjertelcellenes posisjonen i dager etter befruktning). Ved klekking (C, D) er kjertlene lokalisert i et avgrenset belte. På dette stadiet inneholder cellen mange vesikler med klekkeenzym (E). Figuren viser klekkekjertler som er farget immunohistologisk og fotografert med fluorescensmikroskop (A,C), levende celler fotografert med fasekontrast (D) og snitt av celler analysert i elektronmikroskop (E).

laget (zona pellucida) blir ikke nedbrutt av klekkeenzymet og en unngår dermed at det lages hull i egget og at enzymet lekker ut før hele eggskallet er nedbrutt. Enzymet virker altså bare fra innsiden. Fritt klekkeenzym kan dermed ikke hjelpe til å klekke andre egg fra utsiden.

Klekkekjertlene

De celler som produserer klekkeenzym kalles klekkekjertler. Disse dannes på et tidlig stadium i embryonalutvikling. Hos zebrafisk og medaka er det vist at de første klekkekjertelcellene oppstår i fremre del av det tidlige embryoet (hypoblast-cellelaget) (Kimmel et al., 1990) (Inohaya et al., 1995) og at det derfra vandrer til sin endelige plassering henholdsvis på plommesekken og inne i munnhulen. Antall kjertler varierer alt fra 200 til 2000 mellom ulike fiskearter. Det er også stor variasjon i plasseringen av klekkekjertlene hos fisk. Hos sild er kjertlene konsentrert på hodet mellom øynene til embryoet, mens hos laksefisk er kjertlene spredt plassert over fremre del av hode og plommesekk foruten munn og gjeller. Denne diffuse lokaliseringen resulterer i en annen klekkemekanisme enn den vi finner hos kveite.

Klekkekjertlene vandrer fra sitt opphav til sin endelige lokalisering igjennom embryonalutviklingen, samtidig som cellene deles og akkumulerer (danner) klekkeenzym. Rett før klekking kan levende klekkekjertler sees i lysmikroskop som celler overfylt med mørke korn (20-30 korn med utkrystallisert klekkeenzym) (Yamagami, 1988). Før klekking åpnes kornene og hele innholdet av kjertelcellene tømmes ut i perivitellinrommet. Klekkeenzymet blir aktivert, angriper og bryter ned eggskallet.

Faktorer i omgivelsene som påvirker klekking

Flere faktorer i omgivelsene som oksygen, temperatur og lys kan påvirke og regulere tidspunktet for klekking. Mange arter bruker

oksygentilgjengelighet som en regulator for klekking. Kravet til oksygen øker etter som embryoet vokser, og ved et gitt tidspunkt er diffusjonene av oksygen gjennom eggskallet utilstrekkelig for embryoet og det igangsetter klekking (DiMichele and Powers, 1984)

I noen ferskvannarter er det vist at økt temperatur i vannet om våren utløser klekkeprosessen. Foruten kveite er det få studier som viser en nøye sammenheng mellom lys og klekking. I laks er det vist at det er høyere hyppighet av klekking i lysperioder enn i mørke (Brännäs, 1987), mens det motsatte ser ut til å være tilfellet hos sild (Blaxter, 1956)

Regulering av klekking

Flere studier har omhandlet reguleringsmekanismene for klekking, men en er langt fra en forståelse av hvordan denne reguleringen foregår. En har klart å indukere klekking med steroid hormonet deoxycorticosteron og med peptid hormonet prolactin (medaka Schoots et al., 1982). Noen forsøk indikerer at klekking er regulert av dopaminerge systemer. (Zebrafisk, Schoots et al., 1983; Laks, Oppen-Berntsen et al., 1990a). Fiskens evne til å regulere tidspunktet for klekking i henhold til faktorer fra omgivelsene tyder på at nervesystemet er involvert.

Klekkeprosessen hos kveite

Klekkeprosessen hos kveite synes mer spesialisert enn hos andre fiskearter. Kveiteegg er blant de størst marine pelagiske fiskeegg som finnes og embryoet klekker på et svært tidlig utviklingsstadium, noe som innebærer at plommesekken er svært stor i forhold til larven. Denne lite utviklede larven med en enorm plommesekk kan derfor tenkes å ha spesielle problemer med å kvitte seg med eggskallet.

Hos kveite er klekkekjertlene lokalisert i et smalt belet rundt fremre del av plommesekken (Helvik et al., 1991a). Ved klekking trekker bakre del av plommesekken seg sammen slik at fremre del presses ut mot eggskallet og dermed bringer klekkekjertlene i direkte kontakt med

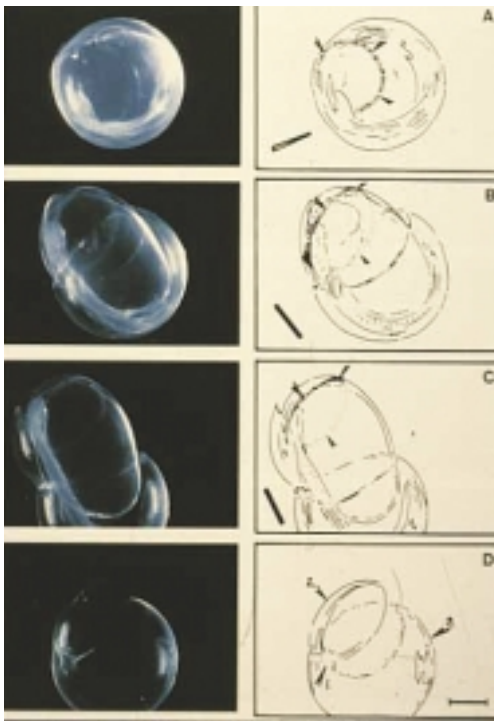


Fig. 2. Klekkemekanisme hos kveite. Billedserie viser hvordan kveitelarven bryter seg ut av egget ved klekking etter en avgrenset nedbrytning av eggskallet. (Figuren er hentet fra Helvik et al 1991 og er gjengitt med løyve fra International Journal of Developmental Biology)

eggskallet (Helvik et al., 1991b). En oppnår da en avgrenset deponering av klekkeenzymet og nedbrytning av eggskallet i område rett over klekkekjertlene. Dette resulterer i at eggskallet deles i to, lokk og bunn, hvor bunndelen er området som har ligget fremfor kjertelbeltet. Det finnes ingen klekkekjertler på ryggen av larven noe som resulterer i at en smal sektor forblir intakt. Denne delen hengsler lokket til bunnen slik at lokket henger fast i bunnen når larven forlater egget.

Formendringen av plommesekken er med på å låse larven i posisjon i forhold til åpningen før klekking, mens den etter nedbrytning er med på å åpne lokket og presse larven ut av egget. Rytmiske muskel-kontraksjoner i larvekroppen fører til at larven presses mer og mer ut av egget til den til slutt er fri. Vekten av

eggskallet er også med på å dra skallet av larven.

Lokalisering av klekkekjertlene slik at det dannes et lokk i eggskallet er svært forskjellig fra klekking hos andre arter hvor en diffus plassering av klekkekjertlene resulterer i en jevn nedbrytning av hele eggskallet. For kveite er dermed plasseringen av klekkekjertlene av avgjørende betydning for ut fallet av klekkingen. Kjertlene må vandre og plasseres i en slik posisjon at lokket/åpningen blir stort nok for at larven kommer seg ut. Klekkekjertlene dannes halvveis i eggperioden, først som en disk av celler i fremkant av embryo. Denne samlingen av celler vandrer så utover plommesekken inntil ringen av kjertelceller er lokalisert 90 grader på kroppsaksen. I denne perioden akkumulerer kjertlene klekkeenzym i korn.

Lys har en kraftig innvirkning på klekkeprosessen og det kan virke som om prosessen er lysregulert. Både lysets intensitet og spekter har betydning for hemming. En lysstyrke over 0,1 lux (0,006 mEsr-1m²) har evne til å utsette i ett døgn (Helvik and Walther, 1992). Med økende lysintensitet utsettes klekketidspunktet ytterligere. Lys i den blå delen av spekteret er mest effektivt. Overføres eggene til mørke oppheves den hemmende effekten av lys og eggene klekker i løpet av en periode fra 90 – 120 minutter. Lysregulering kan dermed brukes til å synkronisere en egg-gruppe slik at den klekker innenfor en halv time på et gitt tidspunkt. Studier av stimulert klekking (tilbakeføring til mørke av egg som er lys-hemmet) på ulike tidspunkt av embryonalutviklingen viser at evne til å klekke varierer med utviklingsstadium. Før tidspunktet for naturlig klekking er det umulig å stimulere til klekking (Helvik and Walther, 1993a). Deretter følger en periode med stadig raskere og mere synkront klekkeforløp med et maksimum 2 dager etter naturlig klekking, for så å avta. Dersom embryo holdes mer enn 7 dager inne i egget etter naturlig klekketidspunkt mister det evnen til å klekke. Dissekerer en ut slike embryo finner en at halen har vokst helt rundt plommesekken og har mistet evnet til å strekke

seg ut og resulterer i at larven bare svømmer i ring. Ved klekking er øynene hos kveite bare en samling av celler i delingsfasen og mangler fullstendig cellulære strukturer som kan detektere lys (Helvik et al., 1997; Kvenseth et al., 1996). Pinealorganet (lysfølsomt organ i hjernen) derimot er differensiert før klekking (Forsell et al., 1997) og inneholder komponenter (proteiner) som er typisk for en funksjonell fotoreseptorcelle. En kan derfor tenke seg at pinealorganet er involvert i lys-reguleringen av klekking hos kveite.

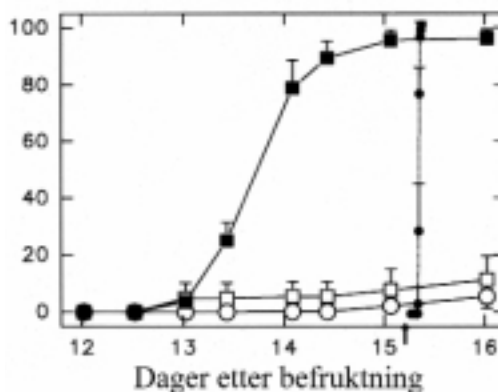
I tillegg til lys har også kraftig bevegelse evnen til å utsette klekking (Helvik and Walther, 1993b). Det kan virke som om bevegelsesstresset i seg selv som har hemmende effekt og ikke økt oksygen tilgang på grunn av bevegelsen. Mangel på oksygen har liten stimulerende effekt på klekkeprosessen hos kveite. Dette er i motsetning til mange andre arter. Det faktum at både lys og bevegelsesstress påvirker klekking tyder på en kompleks regulering av klekking som sannsynligvis involverer det sentrale nervesystemet.

Forurensning

Tungmetaller som sink og kopper har vist seg å ha en hemmende effekt på klekkeprosessen (Ski et al 1999). Konsentrasjoner av sink mellom 0,5 – 2,5 mg/liter fører til en fullstendig hemming. Foruten en langvarig effekt på normal embryonalutvikling kan disse tungmetallene også ha en akutt effekt direkte på selve klekkemekanismen, både hva gjelder fristelsen av klekkeenzym og enzymatisk aktivitet. En bør derfor være forsiktig med bruk av sinkanoder i forbindelse med klekkeriets sjøvannsforsyning.

Bruk av lys regulert klekking i oppdrett

Lys har med stort hell blitt brukt i oppdrett av kveite for å styre og synkronisere klekkeprosessen. En oppnår dermed å ha kontroll over tidspunktet eggene klekker. Siden embryonalutviklingen fortsetter inne i egget bør ikke klekketidspunktet utsettes mere en 1-2 dager etter naturlig klekketidspunkt. Fordelen med synkron klekking er at alle eggskallene blir fraskilt innenfor en kort periode og kan dermed lettere fjernes for å unngå at de skaper grobunn for bakterier i lagringsfasen for plommeseklarver. På den andre side er det vist at lyseksposering i eggfasen hos kveite fører til tyngre egg (se kapittel 3) noe som kan skape problemer i gjennomstrøms inkubatorer.



1) ■ 2) ○ 3) □ 4) ●

Fig. 3. Hemmende effekt av lys på klekking. Kveite egg inkubert i mørke (1) og i kontinuerlig lys fra dag 7 (2) og dag 13 (3) etter befruktning. På dag 15 ble egg fra lysgruppen tilbakeført til mørke (4) og eggene klekket i 90-120 minutter. (For detaljer se Helvik og Walter 1992)

Referanser

- Blaxter JHS (1956) Herring rearing-II. The effect of temperature and other factors on development. *Marine Research Scotland* 5: 1-19
- Brännäs E (1987) Influence of photoperiod and temperature on hatching and emergence of Baltic salmon (*Salmo salar* L.). *Can.J.Zool.* 65: 1503-1508
- DiMichele L, and Powers DA (1984) Developmental and oxygen consumption rate differences between lactate dehydrogenase-B genotypes of *Fundulus heteroclitus* and their effect on hatching time. *Physiol.Zool.* 57: 52-56
- Forsell J, Holmqvist B, Helvik JV, and Ekstrom P (1997) Role of the pineal organ in the photo-regulated hatching of the Atlantic halibut. *INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 41: 591-595
- Helvik JV, Oppen-Berntsen DO, Flood PR, and Walther BT (1991a) Morphogenesis of the hatching gland of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Roux.Arch.Dev.Biol.* 200: 180-187
- Helvik JV, Oppen-Berntsen DO, and Walther BT (1991b) The hatching mechanism in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Int.J.Dev.Biol.* 35: 9-16
- Helvik JV, Utne AC, Steinevik EK, Forsell J, Johnsson CM, Ekström P, Holmqvist BI (1997) The development of retina in three marine teleosts species: Analyses by means of immunocytochemical techniques and optomotoric behaviour NATO Advanced course Crete 18-28 june. *Nato advance course Creta 18-28 june: (Abstract)*
- Helvik JV, and Walther BT (1992) Photo-regulation of the hatching process of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs. *J.Exp.Zool.* 263: 204-209
- Helvik JV, and Walther BT (1993a) Development of hatchability in halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) embryos. *Int.J.Dev.Biol.* 37: 487-490
- Helvik JV, and Walther BT (1993b) Environmental parameters affecting induction of hatching in halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) embryos. *Marine Biology* 116: 39-45
- Inohaya K, Yasumasu S, Ishimaru M, Ohyama A, Iuchi I, and Yamagami K (1995) Temporal and spatial patterns of gene expression for the hatching enzyme in the teleost embryo, *Oryzias latipes*. *Dev.Biol.* 171: 374-385
- Ishida I (1944) Hatching enzyme in the fresh-water fish, *Oryzias latipes*. *Annot.Zool.Jpn.* 22: 137-154
- Kerr JG (1900) The external features in the development of *Lepidosiren papadoxa*, Fitz. *Phil.Trans.Roy.Soc.London* 192: 299-330
- Kimmel CB, Warga RM, and Schilling TF (1990) Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development* 108: 581-594
- Kvenseth AM, Pittman K, and Helvik JV (1996) Eye development in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Differentiation and development of the retina from yolk sac stages through metamorphosis. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 53: 2524-2532
- Murata K, Iuchi I, and Yamagami K (1994) Synchronous production of the low- and high-molecular-weight precursors of the egg envelope subunits, in response to estrogen administration in the teleost fish *Oryzias latipes*. *General And Comparative Endocrinology* 95: 232-239
- Murata K, Sasaki T, Yasumasu S, Iuchi I, Enami J, Yasumasu I, and Yamagami K (1995) Cloning of cDNAs for the precursor protein of a low-molecular-weight subunit of the inner layer of the egg envelope (chorion) of the fish *Oryzias latipes*. *Developmental Biology* 167: 9-17

- Murata K, Sugiyama H, Yasumasu S, Iuchi I, Yasumasu I, and Yamagami K (1997) Cloning of cDNA and estrogen-induced hepatic gene expression for choriogenin H, a precursor protein of the fish egg envelope (chorion). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94: 2050-2055
- Needham J (1931) *Chemical embryology*. Cambridge Univ. Press, London and New York,
- Oppen-Berntsen DO, Bogsnes A, and Walther BT (1990a) The effects of hypoxia, alkalinity and neurochemicals on hatching of atlantic salmon (*Salmo salar*) eggs. *Aquaculture* 86: 417-430
- Oppen-Berntsen DO, Helvik JV, and Walther BT (1990b) The major structural proteins of cod (*Gadus morhua*) eggshells and protein crosslinking during teleost egg hardening. *Dev.Biol.* 137: 258-265
- OppenBerntsen DO, Arukwe A, Yadetie F, Lorens JB, and Male R (1999) Salmon eggshell protein expression: A marker for environmental estrogens. *MARINE BIOTECHNOLOGY* 1: 252-260
- Schoots AFM, De Bont RG, Van Eys GJJM, and Denucé JM (1982) Evidence for a stimulating effect of prolactin on teleostean hatching enzyme secretion. *J.Exp.Zool.* 219: 129-132
- Schoots AFM, Meijer RC, and Denucé JM (1983) Dopaminergic regulation of hatching in fish embryos. *Dev.Biol.* 100: 59-63
- Ski HN, Goksøyr A, Norberg B, Walther BT and Helvik JV (1999) Impact of heavy metals and organic pollutants on hatching of Atlantic halibut. 6th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish Bergen
- Yamagami K (1988) Mechanisms of hatching in fish. In: Hoar WS, Randall DJ (eds) *Fish physiology* vol. XI part A. Academic Press, Inc., New York, pp 447-499
- Yasumasu S, Katow S, Hamazaki TS, Iuchi I, and Yamagami K (1992) Two constituent proteases of a teleostean hatching enzyme: Concurrent syntheses and packaging in the same secretory granules in discrete arrangement. *Developmental Biology* 149: 349-356