

3.4.2 PRODUKSJON AV RENE HUNNFISKPULASJONER AV ATLANTISK TORSK

Et av de største problemene med oppdrett av atlantisk torsk i Norge er faren for genetisk påvirkning på ville bestander fra rømt oppdrettstorsk eller torsk som gyter i merd. I tillegg lider oppdretterne økonomiske tap som følge av tidlig kjønnsmodning, med påfølgende tap av vekst og filetkvalitet samt økt dødelighet. Det er aktuelt å produsere steril torsk for å løse disse problemene. Som en del av løsningen på problemet har vi ved Havforskningsinstituttet jobbet med å produsere en populasjon bestående av kun hunnfisk (all-female-populasjon) som kan kombineres med steril fisk for å få best mulige produksjonsresultat.

Trine Haugen

trine.haugen@imr.no

Geir Lasse Taranger

geir.lasse.taranger@imr.no

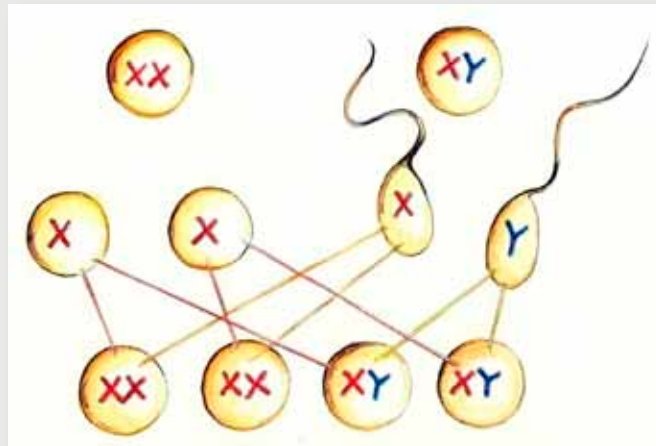
Hunnfiskpopulasjoner

En hunnfiskpopulasjon består av bare hunner. For å oppnå dette må en begynne med å maskulinisere hunnene i foreldregenerasjonen til det som skal bli hunnfiskpopulasjonen. Dette betyr at vi behandler fisken med små doser testosteron eller aromatase-hemmer i tidlige livsstadier slik at genetiske hunner utvikler testis og sperm som en vanlig hann. Disse maskuliniserte hunnene kalles neo-hanner. Sperm fra neo-hanner vil da inneholde de genetiske kodene for hunner, og ved en befruktning mellom sperm fra en neo-hann, og egg fra en normal hann, vil en kunne få en populasjon som består kun av hunner, forutsatt at torsken har et vanlig X- og Y-kjønnskromosomsystem (se figurene 3.4.2.1 og 3.4.2.2). Fisken som går til konsum vil være som en normal hunntorsk. Vi håper at dette i første omgang kan bidra til å hindre spredning av genetisk materiale til ville populasjoner ved å forhindre gyting i merd, siden torsken er avhengig av et visst gyterituelle for å gyte.

Faren for genetisk påvirkning ved rømming derimot, kan ikke lettes med en populasjon bestående av bare hunner. Med bakgrunn i dette er produksjon av steril fisk ønskelig for bruk i oppdrett. Per dags dato er det kun triploidisering av fisk som er aktuelt for å oppnå steril fisk. Det finnes andre metoder for sterilisering av fisk som innebærer bruk av genteknologiske metoder, men disse befinner seg foreløpig på teori-/forsøksstadiet.

Triploidisering

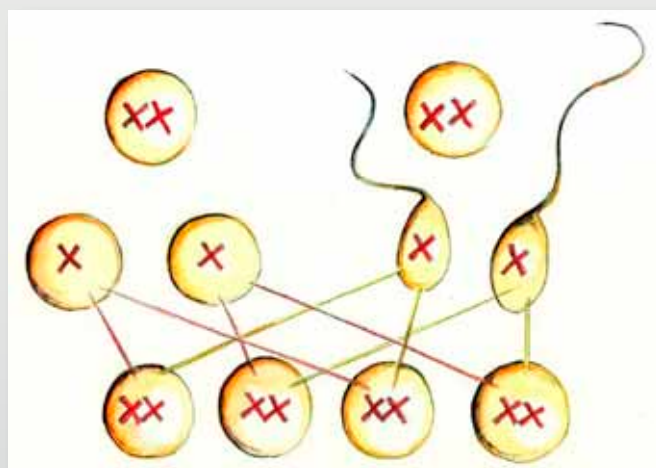
Ved triploidisering behandles befruktete egg med høyt trykk like etter befruktning slik at vi får en fisk med tre sett kromosomer i stedet for to. Denne fisken vil være steril. En triploidisert hann vil kunne utvikle både testis og sperm, selv om den er steril, og en vil derfor ikke få den ønskede gevinst for oppdretteren. En triploidisert hunn derimot vil ikke utvikle seg videre fra det juvenile stadiet og vil normalt ikke



Figur 3.4.2.1

Normal befruktning. Kjønnskromosomene i en hunn er XX og hos en hann XY. Eggene hos hunner er kun bærere av et X-kromosom, mens 50 % av spermen er bærere av et X-kromosom og 50 % er bærere av et Y-kromosom. Ved befruktning vil kjønnsfordelingen bli ca. 50/50. En har så langt ikke karakterisert kjønnskromosomsystemet hos torsk, men det er sannsynlig at de har et XY-system. (Tegning: Stein Mortensen)

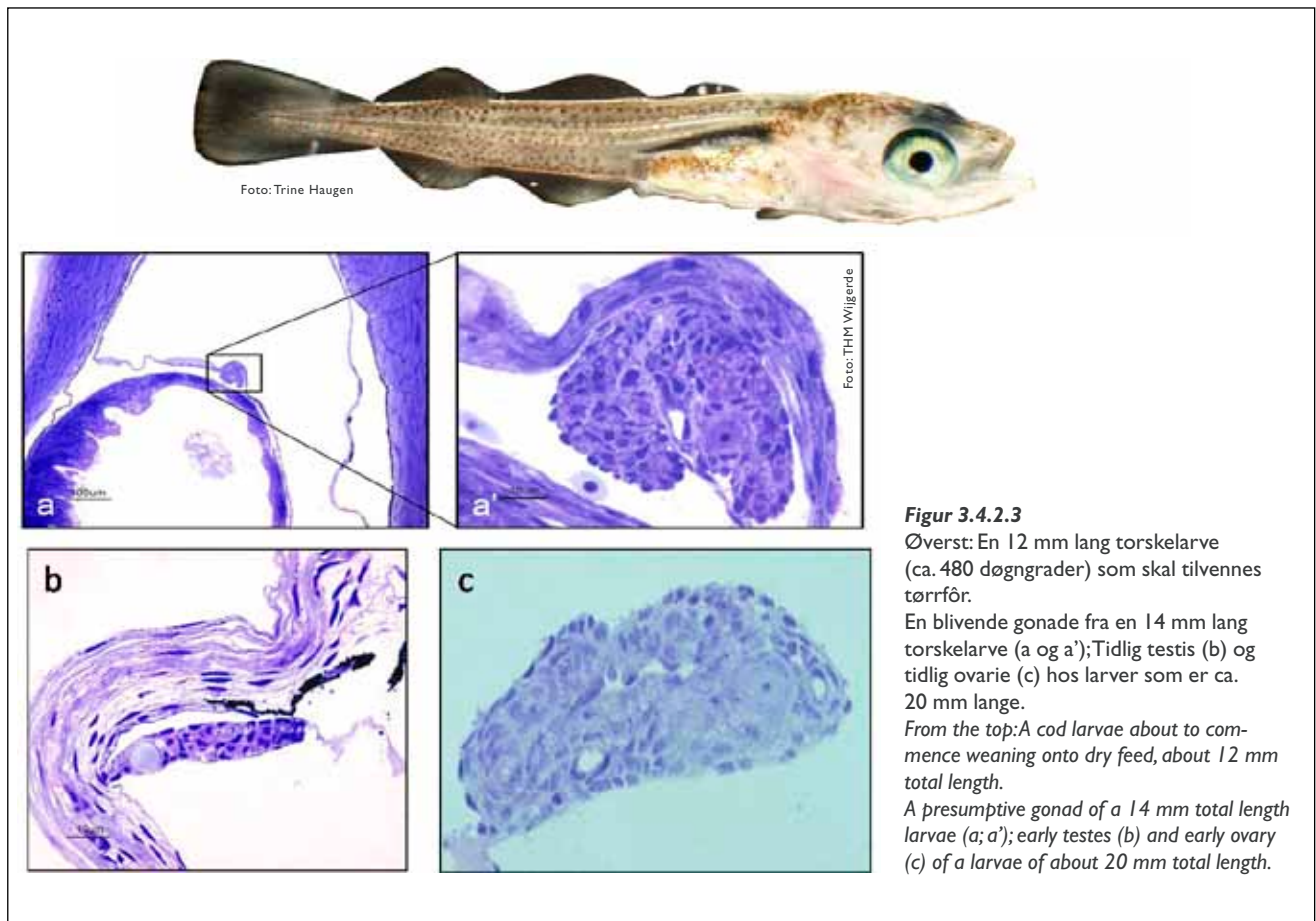
Normal fertilization. The female sex chromosomes are XX and XY in a male. The eggs from the female carries one X chromosome, while 50% of the sperm from the male will carry a Y chromosome and 50% the X chromosome. On fertilization, the resulting sex ratio will approximate 50/50. The sex chromosome system is not yet characterized in cod.



Figur 3.4.2.2

Maskuliniserte hunner, eller såkalte neo-hanner, er fenotypiske hanner med testis og sperm, men genotypisk er de hunner, dvs. bærere av XX-kromosom. Spermen vil da kun være bærer av X-kromosomet, og ved en befruktning med en normal hunn vil resultatet bli en populasjon bestående av kun hunner.

Masculinized females, so-called neo-males, are phenotypical males with testes and sperm, but genotypically they are females, and therefore carriers of XX chromosomes. The sperm will only carry X chromosomes, and on fertilization there will be produced females only.



Figur 3.4.2.3

Øverst: En 12 mm lang torskelarve (ca. 480 døgngader) som skal tilvennes tørrfôr.

En blivende gonade fra en 14 mm lang torskelarve (a og a'); Tidlig testis (b) og tidlig ovarie (c) hos larver som er ca. 20 mm lange.

From the top: A cod larvae about to commence weaning onto dry feed, about 12 mm total length.

A presumptive gonad of a 14 mm total length larvae (a, a'); early testes (b) and early ovary (c) of a larvae of about 20 mm total length.

få de negative effektene av kjønnsmodning på vekst, kvalitet og overlevelse. Det er derfor aktuelt å bruke befruktede hunnfiskegg i en triploidisering for å få en triploid hunnfiskpopulasjon.

Hvordan produsere hunnfiskpopulasjoner?

Selve produksjonen av neo-hannene må skje i et spesifikt tidsvindu som er arts-spesifikt. Dette tidsvinduet kalles kjønnsdifferensieringen. Hos torsk har vi indikasjoner på at denne fasen starter når larvene har oppnådd en kroppslengde på ca. 12 mm total lengde, dvs. når larvene er ca. 480 døgngader og akkurat skal til å tilvennes formulert fôr. Denne fasen varer til yngelen er litt over 20 mm.

I dette spesifikke tids-/størrelsesvinduet behandles fisken med enten testosteron eller en såkalt aromataseinhibitor, for eksempel fadrozol. De kjønsspesifikke hormonene som styrer kjønnsmodning hos fisk, er blant annet østrogen hos hunner og testosteron hos hanner. Testosteron er forstadiet til østrogen, og i kroppen blir testosteron hele tiden omdannet til østrogen i en prosess kalt aromatisering. Dette er en enzymatisk prosess, som kontinuerlig foregår i kroppen for å balansere mengden testosteron og østrogen til enhver tid. Fadrozol vil hemme omdannelsen fra testosteron til østrogen, og gir på den måten

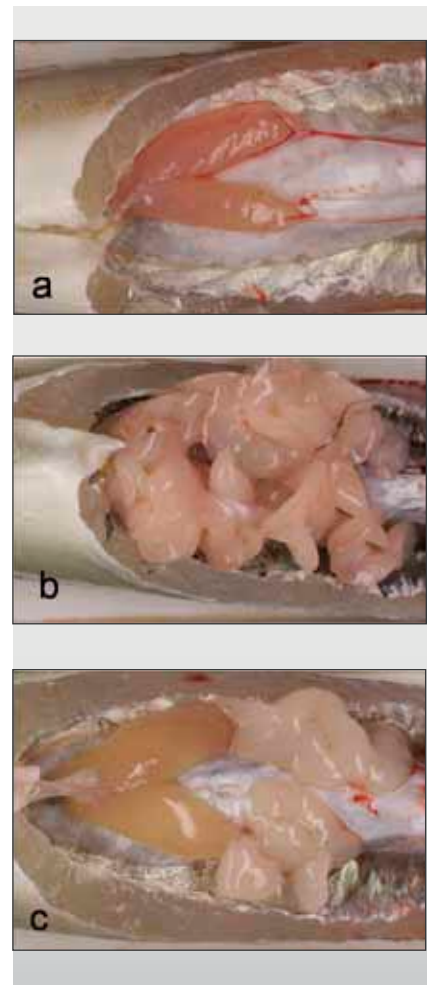
en økt mengde av testosteron i blodplasma. Ved å gi fisken testosteron eller aromatasehemmer rett før og gjennom kjønnsdifferensieringen, kan hunnfisken maskuliniseres. Hos enkelte arter vil kjønn bli totalt reversert, i andre arter vil en få tvekjønnede individer. Det er to typer testosteron som er forsøkt brukt, det ene er vanlig testosteron (MT) som lar seg omdanne til østrogen i kroppen, det andre er dihydrometyltestosteron (DHMT), som ikke lar seg omdanne. Denne siste har på noen arter vist seg å føre til større grad av sterilitet og deformasjoner av testis. Vanlig testosteron gitt i for høye doser, kan føre til økt aromatisering, og økt østrogenmengde, og dermed en motsatt effekt av den ønskede, en feminisering. Det er derfor viktig å finne frem til den optimale behandlingen både når det gjelder type kjemikalie, dose og varighet på behandlingen.

Figur 3.4.2.4

Gonader hos en 10 md. gammel torsk. Normal umoden hunn (a), normal modnende hann (b) og hermafrodit (c) med hunndel posterior (venstre på bildet) og hannedel anterior (høyre på bildet).

(Foto: Trine Haugen)

Gonads of a 10 month old Atlantic cod. Normal immature female (a), normal maturing male (b) and hermaphrodite (c) with the female gonad posterior (left) and the male gonad anteriorly (right).



Forsøkene

Med utgangspunkt i dette har vi ved Havforskningsinstituttet produsert neo-hanner. Foreløpig har vi gjennomført to forsøk hvor vi har testet alle de tre ovenfor nevnte stoffene i høye og lave doser og i varierende lengde på behandlingen. De første resultatene med MT viser at vi hos torsk ikke får fullstendig maskulinisering, men tvekjønnede individer, dvs. en fisk med både ovarie og testis (Figur 3.4.2.5). Varigheten på behandlingen av MT viste seg å være av stor betydning, og de gruppene

som hadde fått den lengste behandlingen (i perioden fra 12 til 18 mm kroppslengde) ved høy dose var mest suksessfull, med 43 % neo-hanner. Med utgangspunkt i dette testet vi i 2008 ut DHMT og fadrozol i høye og lave doser, men denne gangen ble varigheten på behandlingen økt til henholdsvis 20 og 24 mm total lengde. Om vi får en fullstendig maskulinisering ved bruk av DHMT eller fadrozol får vi ikke vite før høsten 2009, når fisken fra det gjeldende forsøket er stor nok til å bli kjønnsbestemt.

Veien videre

Våren 2009 og 2010 vil vi bruke hanndelen av hermafroditene til å befrukte egg fra vanlig hunntorsk. Fisken må da avlives før testis tas ut og spermen fortynnes før befruktning. Vi må derfor produsere nye neo-hanner årlig for å opprettholde en populasjon bestående av kun hunnfisk. Det vil være mulig å ha ett eller flere nasjonale neo-hann produksjonssystem slik at sperm fra disse kan cryo-preserveres (fryses ved -196°C) og sendes til de forskjellige produksjonsfasiliteter.



Figur 3.4.2.5

Bilder fra forsøket våren 2008. Riggene med 50 liters kar (a) og et kar med ca 500 indivier (b).
Pictures from the experiment spring 2008. The experimental stands with twelve 50 L tanks in each stand (a) and one experimental unit containing approximately 500 individuals (b).

Production of All-female Cod

One of the major problems in aquaculture of Atlantic cod is the possibility of genetic impact on wild stocks following escapes or spawning in cage. One way to solve this problem is the use of all-female populations, since the cod cannot spawn in cages without both sexes present. The escapes will however still be a problem. Early sexual maturation also results in economic loss due to weight loss, flesh quality reduction and increased mortality following spawning.

Hence, production of sterile fish is of great interest. The most realistic methods for production of sterile fish at current are triploidisation. However, triploid males often suffer negative effect of sexual maturation as they develop large gonads, while triploid females normally have small gonads throughout life. Hence, it is beneficial to combine triploidy with all-female populations. In fish, the phenotypic sex may be manipulated, e.g. by hormones or aromatase inhibitors. The time-window

when the phenotypic sex can be affected by treatment with sex-reversing chemicals is species-specific. At the Institute of Marine Research, we have produced sex-reversed females, i.e. neo-males, individuals that are phenotypically males with testes and sperm, and genotypically females with XX chromosomes. Fertilization between a neo-male and a normal female will result in a population consisting of females only.