



Triploidisering av röding vid VBCN i Kälarne

Jan Nilsson, Eva Brännäs & Torleif Andersson



Sveriges Lantbruksuniversitet
Institutionen för Vilt, Fisk och Miljö

Rapport 9

Swedish University of Agricultural Sciences
Department of Wildlife, Fish, and Environmental Studies

Umeå 2014

Denna serie rapporter utges av Institutionen för Vilt, Fisk och Miljö vid Sveriges lantbruksuniversitet, Umeå med början 2011. Serien publiceras endast elektroniskt på institutionens hemsida www.slu.se/viltfiskmiljo .

This series of Reports is published by the Department of Wildlife, Fish, and Environmental Studies, Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå, starting in 2011. The reports are only published electronically at the department home page www.slu.se/viltfiskmiljo .

E-post till ansvarig författare
E-mail to responsible author

Jan.V.Nilsson@slu.se

Nyckelord
Key words

Triploid, röding, avel, överlevnad, vattenbruk

Ansvarig utgivare
Legally responsible

Hans Lundqvist

Adress
Address

Institutionen för Vilt, Fisk och Miljö
Sveriges lantbruksuniversitet
901 83 Umeå

*Department of Wildlife, Fish, and Environmental
Studies
Swedish University of Agricultural Sciences
SE-901 83 Umeå
Sweden*

En investering för framtiden



EUROPEISKA UNIONEN
Europeiska regionala
utvecklingsfonden

Rapport från mål-2 projektet: Nationellt center för odling av fisk i sötvatten:

Triploidisering av röding vid VBCN i Kälarne

Jan Nilsson¹, Eva Brännäs¹ & Torleif Andersson²

¹ Institutionen för Vilt, Fisk och Miljö Sveriges Lantbruksuniversitet 901 83 Umeå

² Vattenbrukscentrum Norr AB 840 64 Kälarne

Introduktion

Triploidisering innebär att antalet kromosomuppsättningar ändras från normala två till tre. Individer med tre kromosomuppsättningar är som regel sterila då kromosomdelning vid meios (när könsceller bildas) är obalanserad och störd. Anledningen till att man ibland vill använda triploid fisk i odling hänger samman med den framkallade steriliteten. Rymningar är ett problem inom vissa delar av vattenbruket framförallt när man odlar arter som kan föröka sig i den omgivande naturliga miljön och/eller kan korsa sig med befintliga vilda bestånd. Exempel på detta är amerikansk bäckröding som bildat bestånd i Sverige och odlad lax som infiltrerat vilda bestånd av lax i Norge. Användning av steril fisk i odling är ett sätt att undvika sådana problem. I Sverige finns inget akut problem av detta slag men ökad odling av röding kan komma att ge upphov till situationer där användning av steril fisk bör övervägas. Triploidisering är då en metod som bör övervägas för att framställa steril odlingsfisk.

Triploidisering har ibland framställts som ett sätt att öka tillväxten hos fisk då ingen eller litet energi läggs på könsmognad. I praktiken visar det sig emellertid att triploid fisk inte växer snabbare, snarare är tillväxten sämre. Ett ytterligare skäl till att triploidisera fisk och dra fördel av att fisken blir steril är att avkommor som säljs av kläckerier då inte kan användas för att skapa nya avelsbesättningar. På så sätt kan avelsföretag och avelsprogram skydda sina produkter, d.v.s. avelsstammar, och behålla kontroll över dessa. För en vetenskaplig genomlysning av triploidisering i vattenbruk se Benfey (2001). För VBCN i Kälarne skulle användning av triploider exempelvis kunna öka möjligheterna att sälja till kunder utomlands. Denna undersökning avsåg att ge erfarenheter av triploidisering av röding i VBCN med avseende på metoder, överlevnad, tillväxt och missbildningar.

Material och metoder

Tryckbehandling

Denna metod valdes efter genomgång av litteraturen på området, då den enhälligt beskrivs som den effektivaste metoden att skapa triploida besättningar.

Befruktning och tryckbehandling utfördes i Kälarne i oktober 2011 med 11 familjegrupper. Föräldrar till familjegrupperna utgjordes av Arctic superior. Varje honas befruktade ägg

delades i två lika delar (ca 1 dl rom per del) varav en del utsattes för tryckbehandling i syfte att triploidisera dessa och den andra hälften hanterades som normalt och fick utgöra kontroll.

Från 11 rödinghonor togs 1 dl osvälld rom till vardera tryckning och kontroll.

Sen fick det stå 210 minutgrader befruktad men utan vatten (med 4,5 grader blev det 46,6 min) innan tryckningen då vatten tillfördes. Rommen som skulle triploidiseras placerades i tryckkammaren under 5 minuter under 65.5×10^3 kPa med början 210 minutgrader efter befruktningen.

Efter kläckning placerades rödingarna i x-tråg där de gick över första sommaren. Därefter placerades de i två stycken P-tråg i avelshallen.

Kontroll av kromosomtal

I samband med mätningar av triploidiserad röding i oktober 2013 togs från 12 individer blodprov för att testa om triploidiseringen varit effektiv. Denna metod går ut på att mäta storleken på de röda blodkropparna, som förväntas vara större hos triploider jämfört med normala diploida individer.

Från varje fisk togs en liten mängd blod (en droppe) som placerades på ett objektsglas och ströks ut tunt med ett täckglas. På samma sätt togs blodprov från två normala rödingar som kontroll. Blodutstryken lämnades att lufttorka på laboratoriebänk.

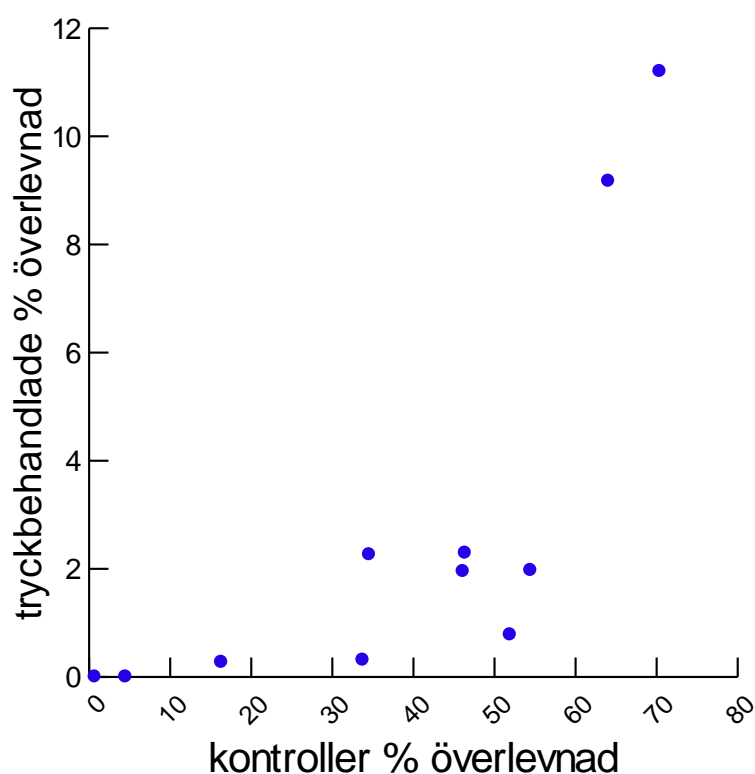
Fixering i 95% alkohol gjordes vid SLU i Umeå en vecka efter provtagning.

De fixerade utstryken färgades i 10 ml Giemsa + 190 ml fosfatbuffer (ph 6.8) enligt tillverkarens rekommendation i 20 min. Den använda färgen var Giemsa's Azure Eosin Methylene Blue (Merck). Efter torkning och efter att ha blivit försedda med täckglas mättes erythrocyternas storlek i ett mikroskop försett med mätokular. Mätningar av största diameter och den vinkelräta diametern gjordes på 10 blodkroppar från var och en av de fjorton fiskarna. Blodkropparnas volym beräknades enl: $V = 4 / 3 \times \Pi \times (A / 2) \times (B / 2)$ där A är största diameter och B den vinkelräta diameter.

Resultat

Överlevnad

Överlevnad till kläckning var för kontrollgrupperna i genomsnitt 38.49 % med variation mellan 0,72 till 70,41 % för enskilda familjegrupper. Detta var en normal nivå på överlevnad i Kälarne för röding. För de tryckbehandlade var den genomsnittliga överlevnaden så låg som 2,75 % (0,00 till 11,20 för enskilda grupper). Avkomman från två honor skiljer ut sig från de övriga genom att ha förhållandevis hög överlevnad för de tryckbehandlade. Den bästa gruppen visade en relativ överlevnad (tryckbehandlade/kontroll) för tryckbehandlade på 16%. Samma honors kontrollgrupper var de som hade den högsta överlevnaden bland kontrollerna. Från Fig 1 framgår att när överlevnaden för kontrollen översteg 60% ökade de tryckbehandlades överlevnad markant.



Figur 1. Överlevnad för tryckbehandlade och normala rödingägg.

Detta försök visar att för att få god överlevnad för tryckbehandlade fiskar är en förutsättning att den normala överlevnaden är god. I detta fall tycks en gräns finnas vid ca 60 % överlevnad som måste uppnås för att man ska erhålla iallafall mer än marginell överlevnad av de tryckbehandlade. Sannolikt innebär behandlingen med tryck en påfrestning på äggen som gör att ägg som inte är av god kvalitet inte klarar sig.

Publicerade studier av triploidisering av röding med tryck, samma metod som tillämpats här, visade att behandlingen inte medfört någon avsevärt ökad dödlighet i förhållande till kontrollgrupper. Den uppnådda relativa överlevnaden till ögonpunktstadiet uppgick till > 85 % i de flesta fall. Överlevnaden för kontrollfisk låg i intervallet 40-80 %, vilket inte är så mycket mer än i Kälarne. Trots att överlevnaden för kontrollfisk inte skiljer så mycket mellan Kälarne och uppgifter från litteraturen så var den relativa överlevnaden för tryckbehandlad fisk i Kälarne avsevärt mycket lägre (max 16 % till kläckning).

Tabell 1. Jämförelse av överlevnad efter tryckbehandling av befruktade ägg

<i>källa</i>	<i>appl. tryck x tid</i>	<i>Tid(post fert)</i>	<i>C°</i>	<i>% överlevnad till öp kontroll</i>	<i>relativ överlevnad tryckbehandlade</i>
Gillet et al 2001	65 MPa x 5min	30-40-50	8	40-80	58-100
Loopstra&	65,5 MPa x5min	40-50-60-	5	66-69	85-98
Hansen 2006		70			
Kälarne	65 MPa x 5min	46,6	4.5	0- 70	0 - 16

Storleksmätningar

Vägning och längdmätning genomfördes vid ca 2 (februari 2013) och 2.5 års ålder (oktober 2013). Vid dessa tillfällen noterades även missbildningar och tecken på könsmodnhet. Test av kromosomtal genomfördes i samband med oktobermätningen.

februari 2013

I februari 2013 mättes 212 rödingar från den tryckbehandlade besättningen. Besättningen var fördelad på två tråg och ca 100 fiskar ur varje tråg mättes. I Tabell a och b redovisas resultaten. Skillnaden i medelvärde mellan trägen var obetydlig, ca 3 g eller 6 mm.

Medelvikten var lägre än förväntat hos en normal diploid besättning. Exempelvis var medelvikten i februari 714g för normal Kälarneodlad diploid röding av samma ålder ur avelsprogrammet senaste generation. Konditionsfaktorn var lägre hos den triploidiserade fisken jämfört med avelsprogrammet röding, 1.40 respektive 1.64. Detta antyder att viktskillnaden kan delvis vara en utfodringseffekt. Emellertid var längdskillnaden 46mm vilket är en tydlig indikation på att de triploida växer långsammare.

Tabell 2. Resultat från längd och viktmätningar februari 2013 för triploidiserade rödingar i Kälarne från två tråg. CF = Fultons konditionsindex.

Tråg P31

	Längd (mm)	Vikt (g)	CF
N	103	103	103
Minimum	190,0	85,0	1,04
Maximum	380,0	806,0	1,91
Medelvärde	304,9	411,9	1,40
Standard Deviation	33,42	129,9	0,147
Coefficient of Variation	0,109	0,315	0,104

Tråg P36

	Längd (mm)	Vikt (g)	CF
N	109	109	109
Minimum	140,0	39,0	0,97
Maximum	375,0	815,0	2,39
Medelvärde	299,8	409,3	1,44
Standard Deviation	41,8	151,0	0,215
Coefficient of Variation	0,139	0,369	0,149

Missbildningar var förhållandevis vanligt förekommande, av 212 granskade triploida fiskar noterades 35 (16,5%) för missbildningar (ögonfel och små fel som överbett ej medräknade). För avelsfiskar i samma storleksklass noterades 16 av 592 (2,7 %) som missbildade. För den triploida fisken dominerade missbildade fenor, käkfel, kort gällock och defekt kroppsform.

oktober 2013

Vid oktobermätningarna 2013 var fisken 32 månader. Vid denna tidpunkt och ålder förväntas en andel av normala rödingar vara könsmogna och i lek.

Medelvikten var 1149g, vilket är lägre än förväntat för en normal rödingbesättning. Denna vikt motsvarar vad som uppnås redan 5 månader tidigare (i juni) av obehandlad röding. Konditionsfaktorn var normal (1.64) vilket ger vid handen att det inte föreligger någon underutfodring. Däremot visar variationskoefficienten för vikt ett mycket högt värde som inte har någon motsvarighet från många års mätningar av normal röding i Kälarne. Värdet på 0.47 ska jämföras med ett erfarenhetsbaserat förväntat värde på 0.25-0.30. Ett högt värde på variationskoefficienten anger att det finns en stor spridning, i detta fall för vikt, mellan individerna. Variationskoefficienten för längd var emellertid normal vilket antyder att viktspridningen har uppstått sent, troligen under hösten. En möjlig förklaring kan då vara att det är en effekt av att en del fiskar könsmognat och i samband med det slutat äta.

Tabell 3. Resultat från längd och viktmätningar i oktober 2013 för triploidiserade rödingar i Kälarne. CF = Fultons konditionsindex.

	Längd (mm)	Vikt (g)	CF
N	45	45	45
Minimum	245,0	191,0	0,97
Maximum	480,0	2 362,0	2,44
Medelvärde	399,7	1 149,5	1,64
Standard Deviation	51,9	545,9	0,342
Coefficient of Variation	0,130	0,475	0,208

Av de 45 granskade fiskarna var 7 st utfärgade hanar, dvs exteriört såg de ut att vara i lek men när de inre organen granskades visade det sig att hanarna inte hade någon mjölke och att könsorganen var outvecklade. Deras medelvikt uppgick till 879g men när de utslöts ur materialet kvarstod den höga variationskoefficienten. En närmare titt på mätresultaten visar också att många av de riktigt små var fiskar som karakteriserats som blanka och magra, dvs som inte visade några tecken på könsmognad. Det kan inte uteslutas att de blanka och magra

fiskarna var sådana som påbörjat en könsmognadsprocess men där triploidiseringen medfört att denna process avstannat och den enda påtagliga effekten är minskad aptit.

Analys av blodutstryk för bestämning av kromosomtall

Genomgående var den större diametern längre hos de behandlade fiskarna än för kontrollerna (se Tabell 4). För den mindre diametern var skillnaden inte så tydlig. Skillnaden i volym är därigenom i huvudsak förorsakad av den större diametern. Fisk nr 1 var en könsmogen hona med rom. Denna fisk avvek i erythrocytstorlek mot övriga behandlade fiskar genom att ha diametrar som liknar kontrollfiskarna. Detta (könsmognad och normalstor erythrocytstorlek) är ett väntat utfall för en fisk som inte blivit triploidiserad.

Tabell 4. Erythrocytmedelvärden (n=10) för största diameter (major axis) L, vinkelrät diameter (minor axis) H och volym (vol) för 10 tryckbehandlade rödingar och två kontroller. nm = nanometer.

Fisk nr	L (nm)	H (nm)	vol	Kommentar
1	16.1	9.6	777	Könsm hona med ägg
2	20.7	10.3	1150	hane, outvecklade organ
3	21.2	11.6	1494	ej könsm hane
4	21.3	11.5	1475	ej könsm hane
5	22.5	11.4	1531	ej könsmogen hane
6	21.3	10.8	1301	hona, ej könsmogen
7	21.2	11.1	1367	ej könsmogen hane
8	22.8	11.1	1471	ej könsmogen hane
9	22.2	11.6	1564	ej könsmogen
10	21.3	12.7	1799	ej könsmogen
11	23.5	11.8	1713	hona ej könsmogen
12	22.0	12.0	1659	ej könsmogen hane
K1	17.6	10.2	959	omogen avelsfisk
K2	16.5	10.5	952	omogen avelsfisk

Resultatet visar att även hos röding är mätning av storleken hos röda blodkroppar en användbar metod för att påvisa triploidi. För att klassificera rödingar som triploida eller diploida är det tillräckligt att mäta den största diametern, i likhet med vad som påvisats hos Sea bass (Felip et al 2009). Den avvikande fisken (nr1) som bar rom visar att triploidiseringsmetoden inte är 100%-ig, vilket är ett känt och väntat resultat. Bland de triploida fiskarna fanns även en som kategoriserades som hane i lekdräkt (fisk nr2) men som inte hade någon mjölke eller överhuvudtaget inte hade några utvecklade könsorgan. Detta visar att triploida hanar kan inleda och delvis påverkas av könsmognadsprocessen men att de ändå inte producerar någon mjölke.

Slutsatser och rekommendationer

Detta försök visar att den tryckbehandling som applicerades producerade triploida rödingar. Den mest uppenbara svårigheten som påvisades är den låga överlevnaden hos den tryckbehandlade rommen. Det kan delvis vara ett resultat av dålig romkvalitet, överlevnaden för obehandlad kontroll var knappt 40% vilket är normalt i Kälarne men som är långt från önskat och förväntat (ca 90%). Även hos lax har ibland mycket låg överlevnad hos triploider rapporterats (se t.ex. OFlynn et al. 1997). Om den låga överlevnaden beror på dålig äggkvalitet kan man tänka sig att tryckbehandlingen förorsakar en ytterligare belastning som medför att överlevnaden sjunker ytterligare. En generell höjning av överlevnaden skulle i så fall ge betydligt bättre resultat efter tryckbehandling. Förslagsvis bör man i fortsatt utvecklingsarbete använda sig av äldre honor som visat sig ge klart högre överlevnad för normal diploid rom. Man kan även göra försök med behandlingsproceduren genom att använda lägre tryck och variera tiden för behandlingen. Tryck respektive tid som använts i detta försök är visserligen hämtade från litteraturen (Gillet et al, 2001) och bör vara väl utprovade men det kan vara värt att testa även denna aspekt.

Att tryckbehandling resulterade i triploidisering kunde verifieras med mätningar av storlek på röda blodkroppar. Denna metod är enkel att utföra, billig och snabb och bör införlivas bland metodarsenalen i VBCN. Av den testade fisken var det en som hade normal blodkroppstorlek och denna fisk var en hona med ägg. För denna fiskindivid hade behandlingen uppenbarligen inte fungerat. Detta utfall, med några procent diploida fiskar, är att betrakta som förväntat och normalt.

Andelen missbildade var högre än normalt (16,5% mot 2,7%) vilket är förväntat enligt litteraturen. O'Flynn et al (1997) rapporterade frekvenser av missbildad triploid lax mellan 9,1% och 28% beroende på årsklass och kläckeri.

Den mycket ojämna tillväxten vid sista mättillfället då fisken var 32 månader indikerar att triploidisering inte är en bra metod att ta fram storvuxen (flera kilo) röding. Trots triploidisering var intrycket att vissa fiskar var påverkade av könsmognad. Lekfärgade hanar förekom och det fanns en del fiskar som var mycket magra trots att de inte visade yttre tecken på könsmognad. Den mycket stora spridningen i storlek mellan individer skulle göra produktion av stor röding svårhanterlig. Möjligtvis kan triploidisering i kombination med ljusstyrning som förhindrar könsmognad vara en möjlighet.

Vid tidigare mättillfälle som låg närmare normal slakt i storlek och ålder (24 månader) var storleksfördelningen nära normal. Emellertid var tillväxten lägre än vad man kan förvänta av normal diploid röding.

Litteratur:

- Benfey, T. J. 2001. Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for aquaculture in New Brunswick, Canada. – ICES Journal of Marine Science, 58: 525–529.
- Felip A. (ed.), Carrillo M. (ed.), Herráez M.P. (ed.), Zanuy S. (ed.), Basurco B. (ed.) . 2009. Advances in fish reproduction and their application to broodstock management: a practical manual for sea bass: Protocol K - Erythrocyte measurements [Practical guide of protocols :methods of verification of the ploidy] Zaragoza : CIHEAM / CSIC-IATS Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 63 pages 71- 74
- Gillet C., Vauchez, Haffray C. P. 2001. Triploidy induced by pressure shock in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): growth, survival and maturation until the third year. Aquatic Living Resources 14: 327-334
- Loopstra p. d. and Hansen P. A, 2006. Triploidy induction in Arctic charr *Salvelinus alpinus* using heat shocking and pressure shocking techniques. Fishery data series No. 06-19 Alaska Department of Fish and Game
- O'Flynn, F. M., McGeachy, S. A., Friars, G. W., Benfey, T. J.,and Bailey, J. K. 1997. Comparisons of cultured triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). ICES Journal of Marine Science, 54:1160–1165.