

VEIÐIMÁLASTOFNUN
Bókasafn

GENABANKI LAXFISKA

Frjóvgunartilraunir með djúpfrystum sviljum

Stefán Eiríkur Stefánsson

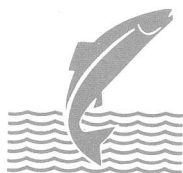
Jónas Jónasson

Oktober 1991

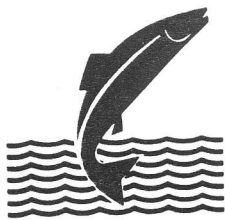
VMST-R/91021

Eintak bókasafns

VMST- R/91021



VEIÐIMÁLASTOFNUN
INSTITUTE OF FRESHWATER FISHERIES
HVERFISGÖTU 116 - P.O.BOX 5252 - 125 REYKJAVÍK - ICELAND



Eldisdeild

Titill: Genabanki

Rannsóknartími:

08.11 '90 - 15.02 '91

1. Höfundur:

Stefán E. Stefánsson

2. Höfundur:

Jónas Jónasson

Upplag: 20 stk.

Síðufjöldi: 10 bls.

Umsjón genabanka:

Sveinbjörn Eyjólfsson

Jónas Jónasson

Sigurður Guðjónsson

Vigfús Jóhannsson

Stefán E. Stefánsson

Samstarfsaðilar:

Búnaðarfélag Íslands

Stangveiðifélag Reykjavíkur

Laxeldisstöð Ríkissins

Samantekt

Tvær tilraunir voru framkvæmdar haustið 1990 í Laxeldisstöð ríkissins í Kollafirði. Markmið tilraunanna var að kanna frjóvgunarhlutfall djúpfrystra svilja. Við djúpfrystingu svilja voru svilin þynnt út með millivökva og perlufryst á þurrís. Því næst var perlunum komið fyrir í ílát sem staðsett var í fljótandi köfnunarefni (-196 °C). Mismargar sviljaperlur voru notaðar á móti ákveðnum hrognafjölda til að ákvarða hagstæðasta fjölda sviljaperla. Hæsta frjóvgunarhlutfallið með frystum sviljum, var 98% en slakasta var 40%, viðmiðunarhópar (fersk svil) höfðu 97% frjóvgun. Meðaltalsfrjóvgun í tilrauninni var 77,9%. Í tilraun með sviljafrumusökk voru könnuð áhrif þéttleika sviljafruma á frjóvgunarhlutfall. Sú tilraun sýnir að meira magn af sviljum þarf úr fiskum sem hafa lága sviljasökks prósentu til að frjóvga hrogn en þeim sem hafa háa sviljasökks prósentu. Niðurstöður sýna að nægjanlegt er að nota um 10 perlur af djúpfrystum sviljum til frjóvgunar á 100 hrognum til að gefa um 70-80% frjóvgunarhlutfall.

Efnisyfirlit

1. Inngangur.....	2
2. Almenn framkvæmd á sviljafrystingu.....	3
2.1 Sviljafrumusökk (Spermatokritt/Sviljafrumupéttleiki..	3
2.2 Djúpfrysting sviljafruma.....	3
2.3 Bráðnun svilja og frjóvgun á hrognum.....	4
3. Tilraunir.....	4
3.1 Efni og aðferðir.....	4
3.2 Frjóvgunartilraun.....	5
3.3 Sviljafrumusökks tilraun.....	5
4. Niðurstöður.....	5
5. Umræða.....	6
6. Þakkarorð.....	7
7. Heimildir.....	8
8. Myndir 1-3.....	9-10

1. Inngangur

Markmið þessara tilrauna er að sannreyna aðferð þá, að djúpfrysta svil til lengri tíma og kanna frjóvgunargetu þeirra miðað við fersk svil.

Góð frjóvgun er m.a. háð góðum sviljum. Mikill breytileiki er á sviljagæðum milli fiska. Erlendis hefur verið reynt að meta sviljagæði út frá sviljahreyfanleika, sviljapéttleika, sviljalit, sviljaosmostyrk ásamt innihaldi af natrium, kalium og glúkosa. (Spermkvalitet hos laks, Greta Hansen Aas). Ein besta mælieiningin til að meta gæði svilja fyrir frjóvgun á hrognum er að styðjast við sviljasökk.

Í þessari grein verður fjallað um almenna framkvæmd á sviljafrystingum og frjóvgun með frystum sviljum. Einnig er fjallað um tvær tilraunir sem framkvæmdar voru haustið 1990. Í tilraununum sem framkvæmdar voru í Laxeldisstöð ríkisins í Kollafirði var reynt að finna út heppilegt magn sviljaperla til að frjóvga hrogn. Einnig var reynt að sjá út frá frjóvgun með frystum sviljum, samband á sviljasökki (sviljafrumufjölda í sviljavökva) og frjóvgunarprósentu. Mikilvægt er að kanna þátt frystra svilja m.t.t. frjóvgunar. Þannig fæst betri nýting á frystum sviljum og um leið aukin arðsemi.

2. Almenn framkvæmd á sviljafrystingu

2.1 Sviljafrumusökk (Spermatokritt/sviljafrumupéttleiki)

Athuga þarf svil laxfiska áður en farið er út í framkvæmd sviljafrystingar. Hreyfing sviljanna er athuguð í smásjá þ.a. einn dropi af sviljum og einn dropi af vatni eru látnir á þekjugler. Þar sem droparnir mætast er hægt að meta, undir smásjá, hvort svil séu nógu góð til frystingar. Hreyfanleiki sviljanna ræður því, hvort hængur sé talinn nógu frjór til að raunhæft sé að djúpfrysta svilin. Ef hreyfanleiki svilja er góður þá er þéttleiki sviljafruma athugaður. Hægt að nota skilvinduaðferð til að finna sviljafrumusökk. Svilin eru sett í sérstök hematokritt rör og svilin síðan skilin í skilvindu í 7 mínútur. Með skilvindunni er fundin út prósentuhluti sviljafruma af heildar sviljamagninu. Sviljafrumu þéttleikinn er mælikvarði á hver hundraðshluti sviljafruma er í hverjum ml af sviljum.

2.2 Djúpfrysting sviljafruma

Ákveðin aðferð er notuð til að djúpfrysta laxasvil (Beynes, S.M. and Scott, A.P., 1987). Svil eru tekin og sett í plastglas sem er látið standa á ís (0-4 °C). Öll áhöld og efni (glös og pípettur og fl.) sem komast í snertingu við svilin eru látnin liggja á ís. Þetta er gert til að koma í veg fyrir að svilin verði fyrir hitastigsáfalli.

Áður en hafist er handa við að djúpfrysta svilin er útbúinn þurrísklumpur (pressaður CO₂-ís sem er -79 °C og 4cm í radíus), þ.a. boraðar eru smáholur (u.þ.b. 4mm djúpar) í þurrísklumpinn.

Einnig er blandaður er sérstakur millivökvi sem inniheldur:

5,4 gr. glukosi

100,0 ml. H₂O (vatn)

10,0 ml. dimethylsulfoxid (DMSO)

Þegar hafist er handa við að djúpfrysta svilin eru 3 ml. af millivökvanum blandað við 1 ml. af sviljum. Með pasteurpípettu er blöndu millivökvans og sviljanna komið fyrir í boraðar holur á þurrísinn. Eftir að búið er að blanda millivökvanum og sviljunum saman er mikilvægt að lausnin sé fryst

innan 70-80 sek. Teknir eru u.þ.b. 2 ml. af sviljum úr hverjum hæng. Svilin eru fryst niður í dropa (perlur) sem eru u.þ.b. 0,05 ml að stærð. Þegar svilin hafa kólnað niður í -79°C (eftir 2-3 mín.), eru frystu svilin (perlurnar) tekin og sett í sigti lsem staðsett er í fljótandi köfnunarefni (-196°C). Þegar búið er að frysta 2 ml. af sviljum úr einum hæng ásamt 6 ml af millivökva eru perlurnar teknar úr sigtinu og settar í sérmerкта plasthólka. Plasthólkarnir eru látnir í 20-30 l köfnunarefnistank og eru síðan fluttir í 240 l geymslutank sem staðsettur er í Nautastöðinni á Hvanneyri í Borgarfirði.

2.3 Bráðnun svilja og frjóvgun á hrognum

Þegar svil eru bráðd upp er útbúin NaHCO_3 -lausn með því að blanda saman:

1,3 gr. NaHCO_3 (matarsóti)
100,0 ml. H_2O (vatn)

5 ml. af NaHCO_3 -lausninni er hituð í u.þ.b. 27°C . 5-10 djúpfrystar sviljaperlur eru settar í lausnina og hrært í, um leið og sviljaperlurnar eru uppleystar er sviljavökvanum blandað saman við hrogn. Á sama hátt er hægt að sjá hvort svil séu lifandi með því að dropi er settur á þekjugler og hreyfing sviljanna athuguð í smásjá.

3. Tilraunir

3.1 Efni og aðferðir

Þær tilraunir sem framkvæmdar voru haustið 1990 voru framkvæmdar í Laxeldisstöð ríkissins í Kollafirði. Svil og hrogn úr hafbeitarlax voru notuð í tilraununum. Í báðar tilraunirnar voru notuð hrogn frá þremur hrygnum sem dvalið höfðu tvö ár í sjó (meðallengd 83 cm). Hrognunum var blandað saman og þvermál vatnsharðnara hrogna tekið (5,6 mm). Fersk svil sem notuð voru í viðmiðunarhópa beggja tilraunanna voru með 29,4% sviljafrumu þéttleika og góðan hreyfanleika sviljafruma. Í báðum tilraununum var hlutfall frjóvgunar athugað með því að telja dauð hrogn á

aughnrognastigi. Byrjað var á því að frjóvga 7 viðmiðunarhópa (100 hrogn í hóp) með 0.5 ml af ferskum sviljum.

3.2 Frjóvgunartilraun

Svil úr 5 hængum var blandað saman og djúpfryst tveim vikum fyrir frjóvgun (sjá aðferð hér að ofan). Svil frystu hænganna sem notaðir voru höfðu öll góðan hreyfanleika fyrir frystingu og meðaltals sviljasökk 23% .

Í frjóvgunartilraun (sjá mynd 1) var uppsetning tilraunar þannig að notaðar voru mismargar sviljaperlur til frjóvgunar á sjö 100 hrogn hópa. Frystu svilin voru tekin og uppleyst í NaHCO_3 - lausn (12 M, 27 °C) (Sjá aðferð hér að ofan). Sama magn (10 ml) af NaHCO_3 -lausn var notuð á alla hópana. Tveir viðmiðunarhópar, frjóvgaðir með ferskum sviljum, voru notaðir í þessari tilraun. Að lokum var þetta sett í númeruð hólf sem útbúin voru í hrognaklakkbakka.

3.3. Sviljafrumusökks tilraun

Í sviljasökks tilraun (sjá mynd 2), þar sem könnuð voru áhrif sviljasökks á frjóvgunarhlutfall, voru notuð svil úr 24 hængum. Svil hænganna voru djúpfryst 2 vikum fyrir frjóvgun og voru hængarnir með mismunandi sviljafrumupéttleika (sviljasökk). 10 djúpfrystar sviljaperlur voru notaðar úr hverjum hæng til að frjóvga 24 hópa og voru 100 hrogn í hverjum hóp. (sjá mynd 3). Frysting og frjóvgun hrognanna var framkvæmd á samsvarandi hátt og í tilrauninni hér á undan. Fimm viðmiðunarhópar, frjóvgaðir með ferskum sviljum, voru notaðir í þessari tilraun. Að lokum var þetta sett í númeruð hólf sem útbúin voru í hrognaklakkbakka.

4. Niðurstöður

Til þess að þjónusta genabanka sé til einhvers gagns þá þarf að framkvæma ákveðnar hagnýtar grunnrannsóknir. Á mynd 1 sést samband sviljaperlufjölda og frjóvgunarprósentu. Hugsunin að baki þessari tilraun var að finna heppilegastan fjölda

sviljaperla til frjóvgunar á 100 hrognum. Línulegt samband ($P < 0,01$) er á milli fjölda sviljaperla og frjóvgunarprósentu. Viðmiðunarhóparnir tveir gáfu 97% frjóvgun en meðaltalsfrjóvgun í tilrauninni var 77,9% . Besti hópurinn með frystu sviljunum (20 perlum) gaf 98% frjóvgun og sá versti (1 perla) 40% frjóvgun.

Á mynd 2 kemur fram að sviljasökk er mismunandi milli svilja út 24 hængum sem notaðir voru í sviljasökks tilraun. Mynd 3 sýnir frjóvgunarhlutfall svilja úr þessum hængum sem notaðir voru til frjóvgunar á hrognahópum. Línulegt samband ($P < 0,01$) fæst á milli frjóvgunar og sviljapéttleika. Samkvæmt þessari niðurstöðu má gera ráð fyrir að með auknum sviljasökki aukist frjóvgunar hlutfallið. Fimm viðmiðunarhópar (fersk svil) gáfu 88,4 % frjóvgun en meðaltalsfrjóvgun í tilrauninni var 70,5 % frjóvgun (með frystum sviljum).

5. Umræða

Niðurstöður erlendis frá hafa sýnt að sjaldnast er hægt að fá jafngóðar frjóvgunarniðurstöður með frystum sviljum og ferskum. Orsök þessa er að við djúpfrystingu á sviljum eyðileggjast mikið af sviljafrumunum. Þess vegna er mikilvægt að vita magn og hreyfanleika svilja sem tekin eru til frystingar til að viðunandi frjóvgunarprósenta náist.

Þeir þættir sem hafa áhrif á frjóvgun djúpfrystra svilja eru: 1) Samsetning lausnarinnar sem notuð er til að bræða perlurnar.

2) Sviljapéttleiki (í frystum perlum) sem nauðsynlegur er til að frjóvgun hroгна geti farið fram.

3) Áhrif tímabreytileika milli bráðunar sviljaperla og frjóvgunar.

Í tilraununum voru notaðir 0.5 ml af ferskum sviljum til frjóvgunar á viðmiðunarhópum og ætti það sviljamagn að gefa eðlilega frjóvgun á hrognum. Í báðum tilraununum er frjóvgunarhlutfall nokkurra hópa (frjóvgaðir með frystum sviljum) með betri frjóvgun en meðaltal viðmiðunarhópa (frjóvgaðir með ferskum sviljum). Úr tilraun með sviljasökki má sjá, að meira magn af djúpfrystum sviljum þarf úr fiskum sem hafa lága sviljasökks prósentu til að frjóvga hrogn en þeim sem hafa háa

sviljasökks prósentu.

Samkvæmt framangreindum niðurstöðum er hægt að gefa eftirfarandi dæmi. Í 8 ml. af frystum perlum (2 ml. svil og 6 ml. millivökvi), sem hafa 23% sviljasökk, eru u.þ.b. 220 perlur. Þetta sviljamagn er hægt að nota til frjóvgunar á um 8000 hrognum. Frjóvgunarprósenta sem fengist væri þá u.þ.b. 70-80%. Þessi frjóvgun er viðunandi m.t.t. erlendra niðurstaðna. Ef djúpfrysta á svil er æskilegast að sviljasökk hænga er ekki minna en 20 - 23%. Út frá línu í mynd 2 sést að sviljaperlur sem eru með sviljasökk minna en 20% gefa minni en 75% frjóvgun á hrognum. Skv. mynd 3 má gera ráð fyrir að lækki sviljasökk um 1% að þá falli frjóvgunarhlutfallið um 1,5% (m.t.t. sviljasökks á bilinu 15-35%).

Niðurstöður sýna, að djúpfrysting laxasvilja gefur góða raun hvað varðar endurfrjóvgun og sýnir um leið að þessi aðferð er vel nothæf til að geyma djúpfryst laxasvil um ókomin ár.

Að lokum má segja að reynslan sem fékkst úr niðurstöðum síðastliðins hausts var mikilvæg. Reyndar voru aðferðir og tæki og séð hvernig best er að koma skipulagi á genbanka fyrir laxfiska.

6. Þakkarorð

Margir eiga þakkir skyldar fyrir að genabanki sé orðinn að veruleika og vonast höfundur til að gott samstarf haldist næstu árin. Þar er helst að nefna Sveinbjörn Eyjólfsson (Landbúnaðarráðuneyti), Vigfús Jóhannsson (Veiðimálastofnun), Stangveiðifélag Reykjavíkur og Búnaðarfélag Íslands. Hjalti Karlsson fær þakkir fyrir ómetanlega aðstoð vegna frystingar á sviljum. Einnig fær Joachim Stoss bestu þakkir fyrir faglega ráðgjöf og Diðrik Jóhannesson á Hvanneyri í Borgarfirði þakkir fyrir aðstoð og ráðleggingar varðandi geymslu á sviljum. Að lokum fær starfsfólk í Laxeldisstöð Ríkissins í Kollafirði ásamt Vistfræðideild Veiðimálastofnunnar bestu þakkir fyrir aðstoðina.

7. Heimildir

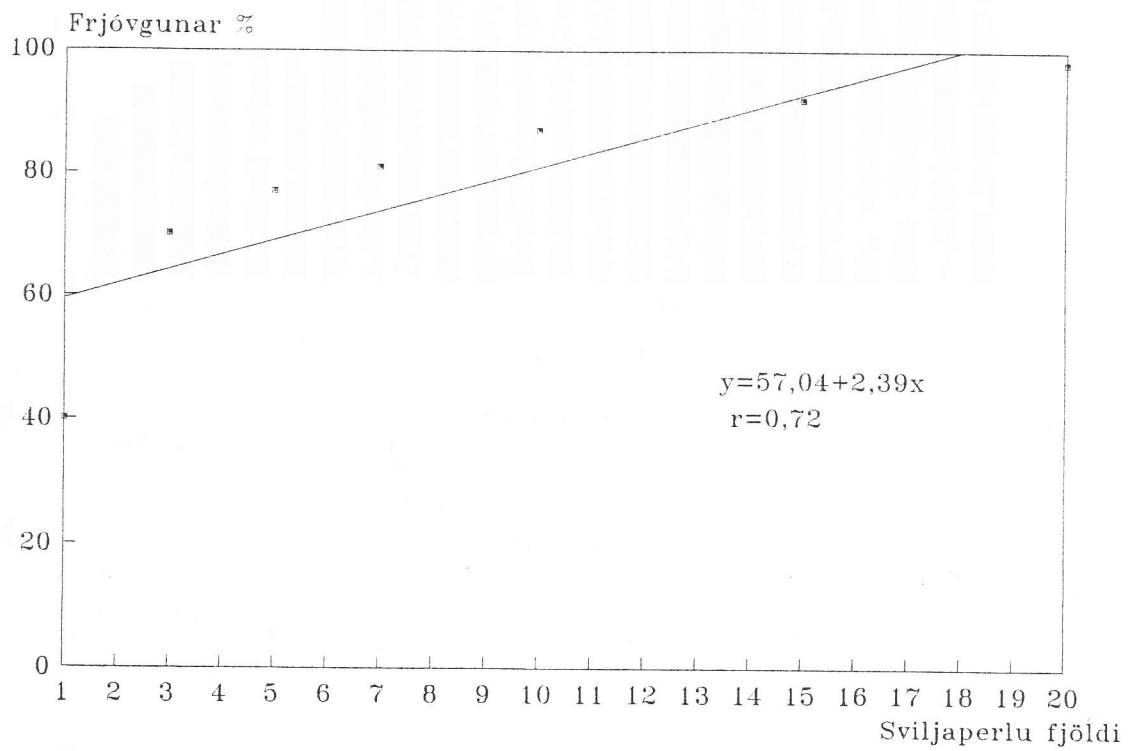
Aas, Grete Hansen; Spermkvalitet hos laks, Husdyrforsökmötet 1990. Aktuelt fra statens fagtjeneste for landbruket. Plakat 47. Bls 129-133.

Baynes, S.M. and Scott, A.P., 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition og post-thaw fertility. *Aquaculture*, 66:53-67.

Stoss, J. and Holtz, W., 1981. Cryopreservation of rainbow trout (Salmo gairdneri) sperm. I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing insemination. *Aquaculture*, 22:97-104.

Frjóvgunartilraun

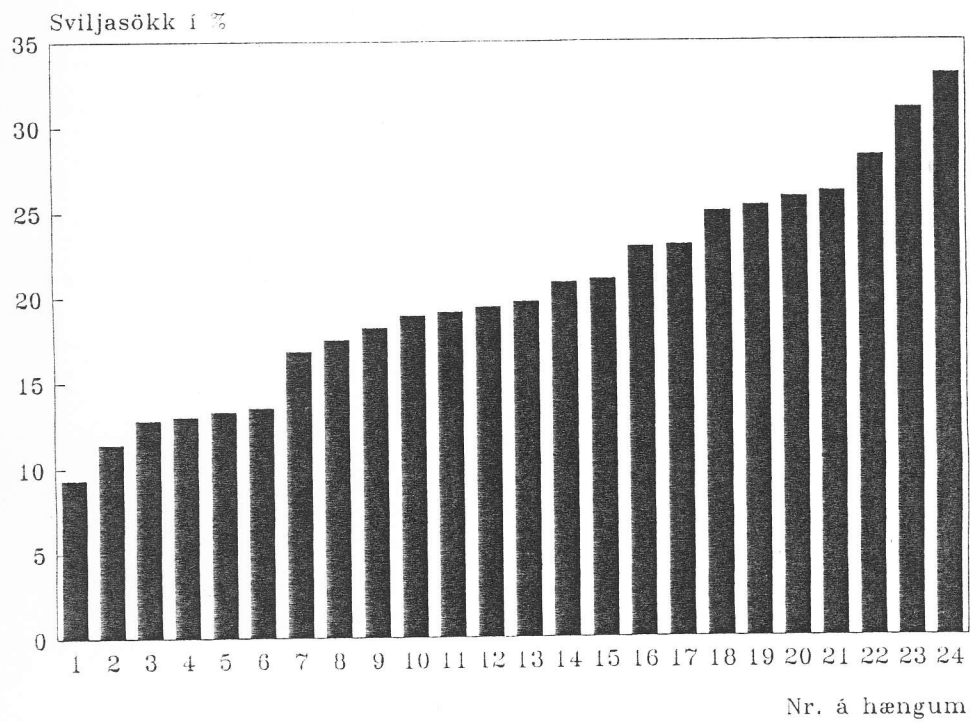
Mynd 1



Mynd 1: Frjóvgun á sjö 100 hrogna hópum. Notaðar voru mismargar sviljaperlur til frjóvgunar á hópum.

Mynd 2

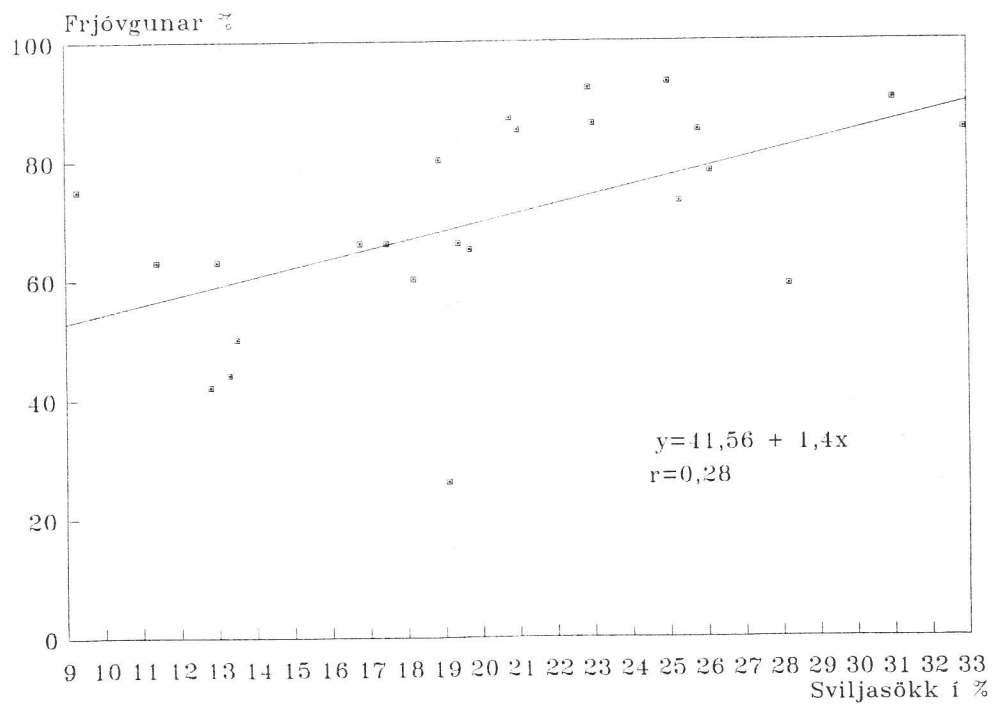
Sviljasökk



Mynd 2: Sviljasökk í % úr 24 hængum sem notaðir voru í tilraun með sviljafrumusökk.

Mynd 3

Sviljasökk



Mynd 3: Frjóvgun á tuttugu og fjórum 100 hrogna hópum. Notaðir voru 24 hængar með mismunandi sviljafrumusökk til frjóvgunar á hópana.