

En innføring i kråkebollens reproduksjons- syklus og bestemmelse av reproduksjonsstadie basert på gonadeprøver



Philip James og Sten Siikavuopio



Bruk av denne publikasjonen

Denne publikasjonen er ment brukt som en veiledning for alle som har behov for å forstå eller har interesse av å lære om kråkebollenes reproduksjonssyklus. Følgende er omtalt: en beskrivelse av kråkebollenes reproduksjonssyklus, faktorer som påvirker størrelses- og kvalitetsvariasjon på rognen, metoder for å ta prøver av gonader og en innføring i hvordan man tolker histologiske snitt med tanke på bestemme reproduksjonsstadier. For å kunne være til videre hjelp med dette har vi i vedlegg 1 tatt med eksempler på histologiske snitt fra de to kråkebollepopulasjonene som er beskrevet i figur 2. Disse viser tydelig hvordan både generelle sesongvariasjoner og variasjon mellom populasjoner påvirker reproduksjonssyklusen til kråkebollene. Forfatterne håper at denne håndboken vil sette de som arbeider med kråkeboller i stand til å følge utvalgte kråkebollepopulasjoners reproduksjonssyklus og at den vil bidra til økt kunnskap om reproduksjonssyklusene til forskjellige populasjoner langs kysten av Norge.

Forfatterne svarer mer enn gjerne på spørsmål fra leserne om tema som tas opp i denne håndboken og kan kontaktes på følgende epostadresser:

Philip James (philip.james@nofima.no)

Sten Siikavuopio (sten.siikavuopio@nofima.no)

Nofima AS

Muninbakken 9-13, Breivika

Postboks 6122

NO-9291 Tromsø

Tel. +47 77 62 90 00

Fax +47 77 62 91 00

E-post: nofima@nofima.no

ISBN 978-82-7251-974-1

Forfatterne ønsker

å rette en stor takk til FHF for finansieringen av denne håndboken. Takk også til alle som har bidratt med å samle inn kråkebolleprøver, til Tor Evensen for oversettelse av tekst fra engelsk til norsk, Atle Mortensen for redigering, Vidar og Atle Mortensen for bildene og Oddvar Dahl for hjelp med illustrasjoner og layout. Vi ønsker også å takke teknikerne på Veterinærinstituttet i Harstad som har laget alle de histologiske snittene som er brukt i denne håndboken.

Om kråkeboller

Kråkeboller er primitive urdyr som mangler mange av de organene vi finner i høyerestående dyr. De har ingen spesialiserte respirasjons eller sirkulasjonssystemer (ikke noe hjerte, ingen blodårer og ingen oksygenbindende molekyler i kroppsvæsken) og de har ingen spesialiserte ekskresjonsorganer. Kort sagt består kråkebollen av en munn, en tarm, gonadene eller rognen og et primitivt nervesystem. Alt dette er omgitt av et hardt skall. På utsiden av skallet sitter piggene og tubeføttene (podia). Til tross for denne primitivt oppbygde kroppen er kråkeboller i stand til å overleve i månedsvis, av og til også årevis, med liten eller ingen tilgang på mat fordi de kan «skru ned» metabolismen (stoffskiftet) og biologiske prosesser som for eksempel reproduksjon for å tilpasse seg varierende miljøforhold og næringstilgang. Derfor vil både kvaliteten på gonadene og rytmen på reproduksjonssyklusen variere mye mellom individer og populasjoner av kråkeboller.

Måling av kråkebollegonader

Størrelsen på kråkebollens rogn måles som gonadeindeks (GI). Dette er mengden rogn i forhold til kråkebollens totalvekt angitt i prosent. For å måle GI må først hele

kråkebollen veies (total våtvekt). Deretter må kråkebollen åpnes, rognen tas ut og renses før den også veies (våtvekt gonade). Nå kan GI bestemmes nøyaktig ved hjelp av formelen:

$$GI (\%) = \text{Våtvekt gonade (g)} / \text{Total våtvekt av hele kråkebollen (g)} \times 100$$

Faktorer som påvirker kråkebolle rognen

GI hos ville kråkeboller kan variere svært mye, fra 1 til 20 % (se Figur 2), mens GI hos oppdrettede kråkeboller kan bli så høy som 35 %. Faktorer som påvirker GI er førtilgang, miljøbetingelser (dagslys, vanntemperatur og strømforhold) og kråkebollens reproduksjonssyklus. Reproduksjonssyklusen påvirker også rognkvaliteten. Dette kommer vi nærmere tilbake til i avsnittet «Reproduksjonssyklus». På grunn av den naturlige variasjonen i GI kan det være store forskjeller mellom individer innen en populasjon og mellom populasjoner som lever svært nær hverandre. Derfor er det svært vanskelig å forutsi størrelsen og kvaliteten på kråkebolle rogn fra en gitt populasjon uten å åpne et antall kråkeboller og beregne GI hos dem.

Figur 1: Anatomien til kråkebollearten *Strongylocentrotus droebachiensis*.

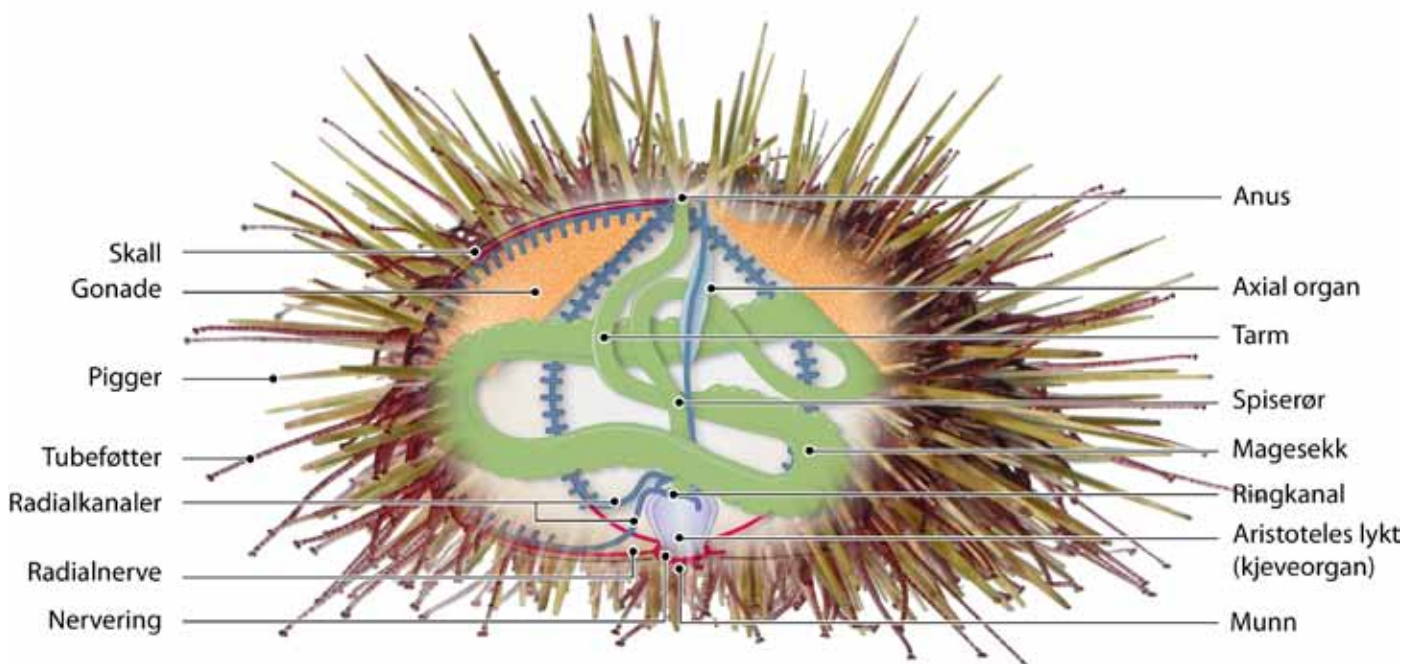


FOTO: VIDAR MORTENSEN / ILLUSTRASJON: ODDVAR DAHL

Prøvetaking av kråkebollegonader

Som forklart tidligere er det umulig å bestemme GI hos kråkeboller uten å ta livet av og åpne dem og veie gonadene. Det er også umulig å bestemme reproduksjonsstadiet uten å ta ut gonaden og ta en prøve. Metoden for å ta gonadeprøver er beskrevet i figur 3 og 4 og består i å skjære ut et tynt (2–3mm) stykke fra midten av en av de 5 rognposene med en skarp, ren skalpell. Når prøven er tatt må den fikseres og farges for at vi skal kunne bestemme kjønn og reproduksjonsstadium. Dette gjøres ved å plassere gonadeprøven i en merket kassett for histologi prøver og å legge kassetten i en beholder med 5–10 % bufret formalin. Beholderen bør oppbevares i kjøleskap frem til den sendes til et laboratorium som kan fiksere og farge prøven (f. eks. Veterinærinstituttet i Harstad). Under fikseringen støpes gona-

deprøven inn i en voksbit og voksbiten skjæres i tynne skiver (histologiske snitt) som legges på objektglass og farges. De forskjellige celletypene tar til seg fargestoffet i forskjellig grad og de kan skilles fra hverandre ved å studere dem i et mikroskop.

(MERK: når hunnkråkeboller er fulle av fullt utviklede egg kan vi se eggene ved å smøre fersk rogn utover et objektglass og undersøke det under mikroskop. Men det er ikke mulig å bestemme reproduksjonsstadium verken for hunner eller hanner ved å bruke denne metoden.)

Figur 2: Eksempler på kråkeboller med svært høy GI (t.v.) og svært lav GI (t.h.)



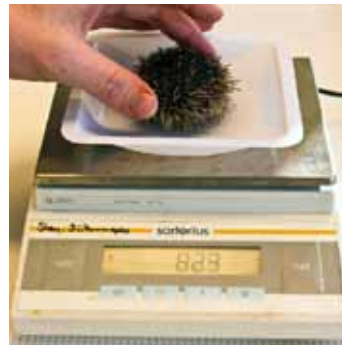
Figur 3: Prosessen for prøvetaking av rogn fra en kråkebolle og konservering av en histologiprøve: (A og B) viser utstyret som trengs: kråkebolleåpneren, en skje, skalpell, kassett for histologiprøver og en plastbeholder med 5–10 % bufret formalin; (C) veiing av hel kråkebolle; (D) måling av skalldiameter; (E) åpning av kråkebolle; (F) uttak av alle fem gonadene; (G) veiing av alle gonadene; (H) utskjæring av en liten bit fra midten av den ene gonaden; (I) plassering av gonadebit i histologikassett; (J) merking av histologikassett og plastbeholder og (K) plassering av histologikassetten i formalinløsningen.



A



B



C



D



E



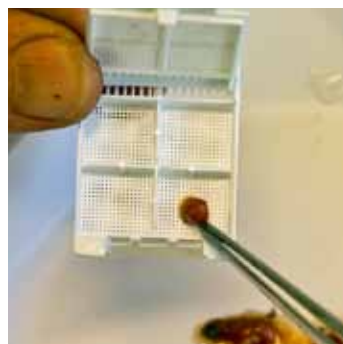
F



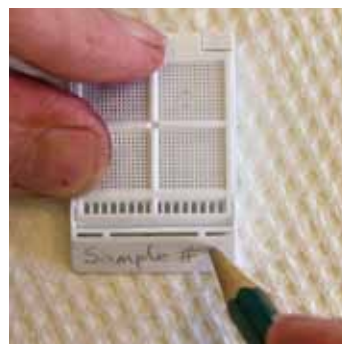
G



H



I



J



K

Figur 4: Et histologisk snitt granskes under mikroskop



Kråkebollenes reproduksjonssyklus

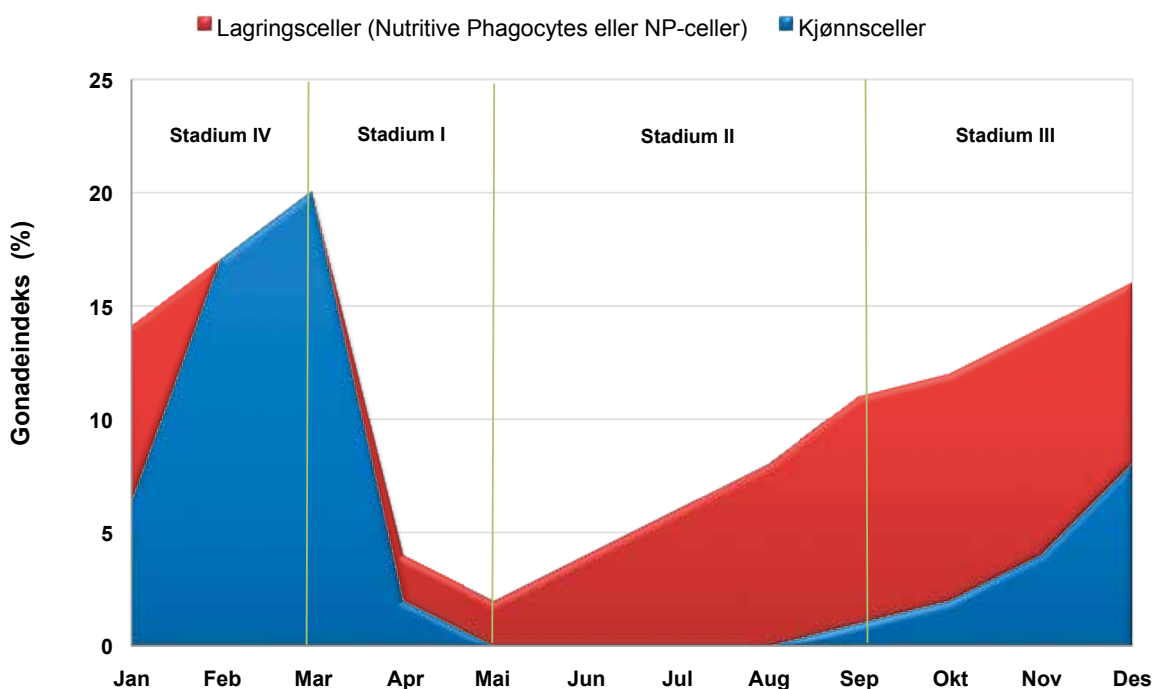
Innen ethvert kråkebollefiskeri eller oppdrett er det viktig å forstå dyrenes reproduksjonssyklus fordi gonadene er det eneste i kråkebollene som har noen kommersiell verdi og reproduksjonssyklusen påvirker både størrelsen og kvaliteten på rognen og følgelig også verdien. Man må også kunne bestemme individets reproduksjonsstadium og reproduksjonssyklusene til populasjonene i områder man driver fangst.

Beskrivelse av kråkebollens reproduksjonssyklus

Voksne kråkeboller er enten hanner eller hunner med en normal kjønnsfordeling på 1:1. Begge kjønnene gyter vanligvis en gang i året ved å slippe gametene (egg eller spermier) ut i de frie vannmassene der blanding og befruktning av eggene skjer. I Norge skjer dette vanligvis omkring april og på denne tiden av året kan vi observere en markert nedgang i størrelsen på kråkebollenes gonader. Etter gytingen på våren/tidlig på sommeren går kråkebollene igjennom en dvaleperiode der gonadene er små og av dårlig kvalitet. Sent på sommeren be-

gytter gonadene å vokse sakte igjen da kråkebollene begynner å produsere næringslagringsceller som øker både i størrelse og antall. Fra tidlig vinter til midtvinters skjer gametogenesen (dannelsen av kjønnsceller) og antallet lagringsceller i rognen reduseres og erstattes av kjønnsceller. Faktorene som stimulerer gametogenesen er ikke fullt ut kjent men man mener at den viktigste enkeltfaktoren er endringer i fotoperiode (daglengde). Faktorene som stimulerer gyting er også uvisse, men man mener at de viktigste er temperatur og miljøfaktorer som algeoppblomstringer og stormer. Figur 5 viser en typisk reproduksjonssyklus hos kråkebolle med store endringer i gonadenes størrelse (GI) og cellesammensetning i løpet av året. Reproduksjonssyklusen kan likevel variere betydelig mellom geografiske områder og også mye innen relativt avgrensede områder. Dette beskrives nærmere i neste avsnitt.

Figur 5: En typisk reproduksjonssyklus hos kråkebolle (*Strongylocentrotus droebachiensis*) som viser toppen i GI før gyting (februar/april) fulgt av en rask nedgang etter gyting og så en gradvis gjenoppbygging av GI. Endringene i forholdet mellom lagringsceller (NP) og kjønnsceller er også vist. Merk at denne syklusen kan variere mye både mellom og innenfor populasjoner av kråkeboller.

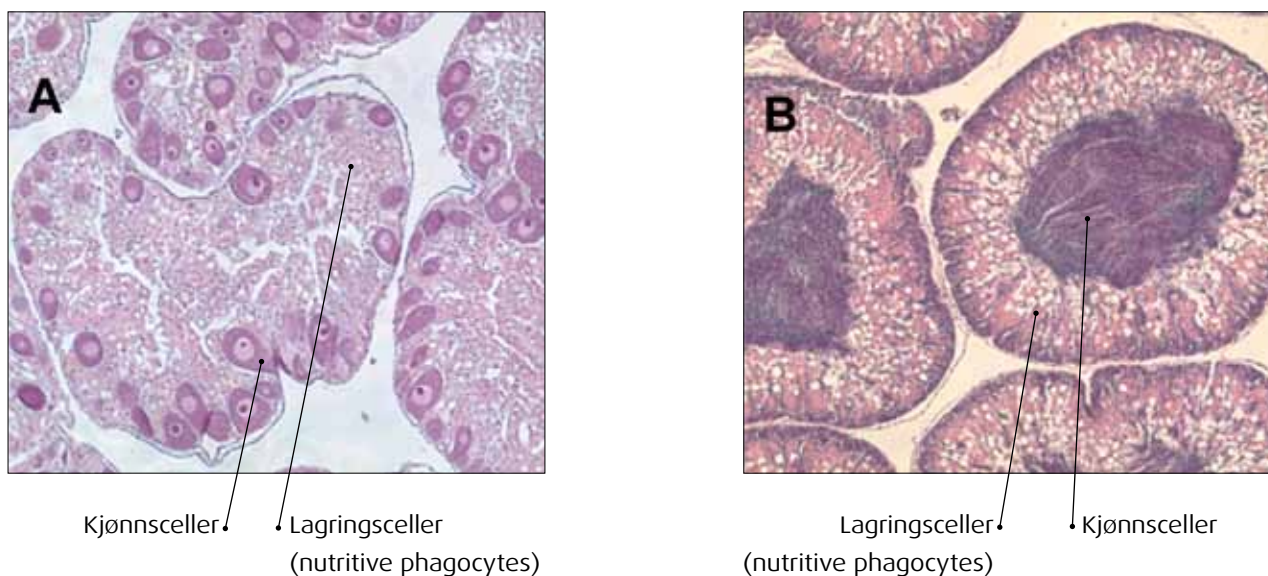


Gonaden er det eneste organet kråkebollene er i stand til å lagre næring i, så den fungerer både som kjønnsorgan og næringslager. Dette betyr at reproduksjonen og behovet for å lagre næring henger nøye sammen. Derfor består kråkebollegonadene av to slags celler: kjønnsceller og lagringsceller for næringsstoffer (Nutritive Phagocytes eller NP-celler) (Figur 6). Kjønnscellene er eggene (oogonier, oocytter og ovum) hos hunnene og sperm (spermatogonier, spermatocytter, spermatider og spermatozoer) hos hannene. NP-cellene er celler som fungerer som lager for næringsstoffer som proteiner, karbohydrater og fett som trengs til gametutviklingen (gametogenesen) eller til basal metabolisme når næringstilgangen er lav. NP-cellene har også evnen til å absorbere (phagocytisere) ubrukte kjønnsceller etter gytingen. Forholdet mellom de to celletypene varierer igjennom reproduksjonssyklusen og har stor betydning både for størrelsen og kvaliteten på rognen (se Figur 5).

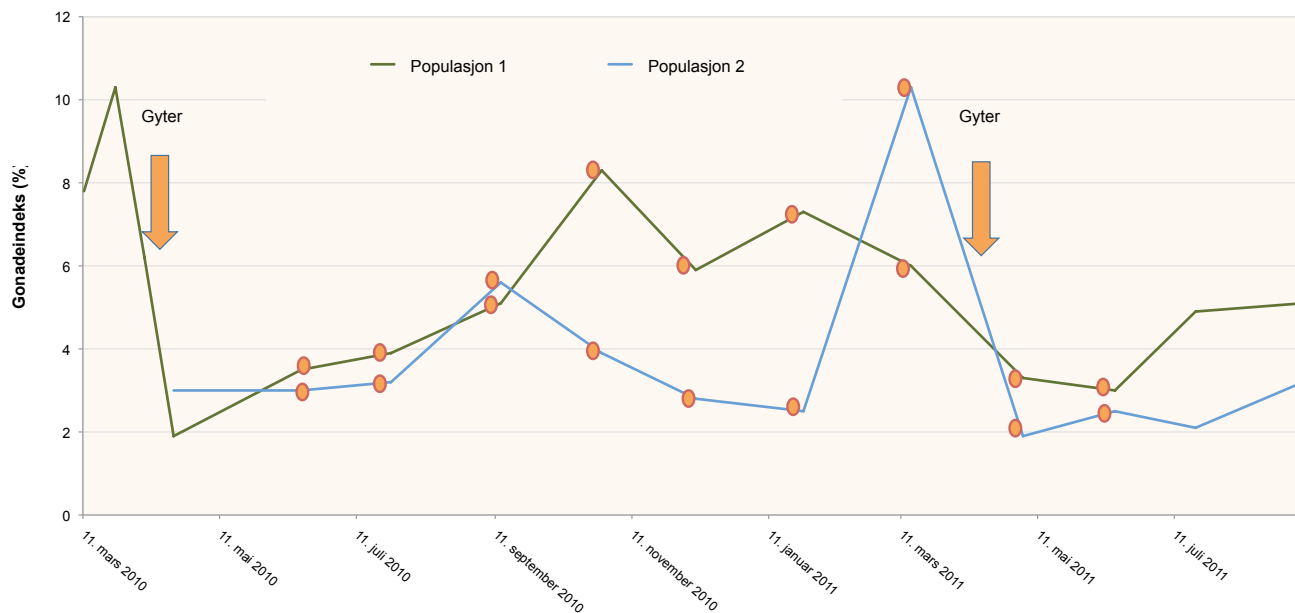
Variasjon i reproduksjonssyklus mellom individer og populasjoner av kråkeboller

Det er vist at både næringstilgangen og tettheten av kråkeboller kan påvirke reproduksjonssyklusen hos kråkeboller i betydelig grad. Når det er lite mat blir gonadene små og når det er rikelig næring tilgjengelig blir de større. Lav næringstilgang har vanligvis en negativ effekt på reproduksjonssyklusen og når mattilgangen er svært lav, (f. eks i svært nedbeitede områder) kan gonadene bli for små til at kråkebollene klarer å produsere kjønnsceller i det hele tatt (Figur 2). Miljøfaktorer, som sesongvariasjon i sjøvannstemperaturen, kan også påvirke reproduksjonssyklusen og føre til stor variasjon mellom kråkebollepopulasjoner, og også stor variasjon mellom individene innen en populasjon. I en nylig gjennomført studie av to kråkebollepopulasjoner en halv kilometer fra hverandre i Kvalsundet utenfor Tromsø fant vi stor variasjon i GI både gjennom sesongen og mellom populasjonene, selv om de lever svært nær hverandre (Figur 7).

Figur 6: De to typer celler som finnes i gonadene av (A) hunn- og (B) hannkråkeboller: kjønnsceller og lagringsceller (nutritive phagocytes)



Figur 7: Endringene i GI hos to kråkebollepopulasjoner lokalisert 0,5 km fra hverandre i Kvalsundet nær Tromsø. Legg merke til hvor forskjellig GI er mellom de to populasjonene til tross for hvor nært hverandre de lever (de røde prikkene viser når prøvene vist i Appendix 1 er tatt).



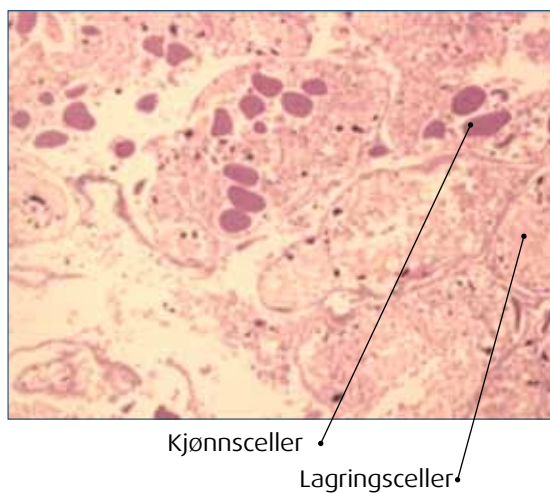
De fire stadiene i reproduksjonssyklusen til *Strongylocentrotus droebachiensis*

Utviklingen i kråkebollens reproduksjonssyklus har blitt delt inn i fire stadier av Walker *et al.* (2007). Denne klassifiseringen blir nå brukt over hele verden til å beskrive reproduksjonsstadier hos en rekke forskjellige kråkebollearter og vi har også brukt den i denne guiden. De fire stadiene er som følger:

Stadium I: Etter gyting (Inter-gametogenese og NP-phagocytose)

Dette stadiet varer i omkring 3 måneder om våren etter gyting. Noen primær-oocytter er igjen i cellene fra hunn-gonader men ellers ser gonadene tomme ut og de har en bløt konsistens med lite struktur. Mot slutten av dette stadiet øker antallet NP-celler og kjønnsceller begynner å dukke opp omkring utkanten av cellene.

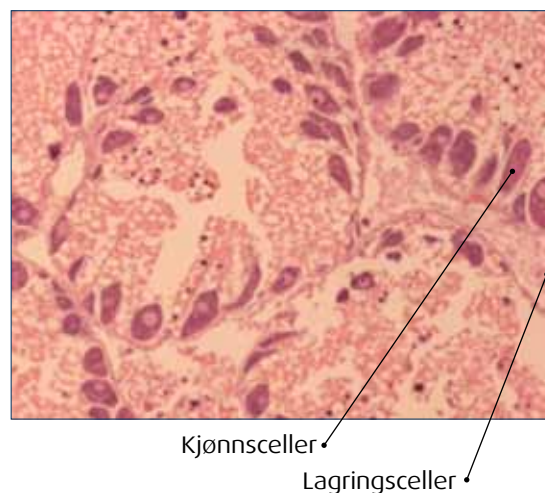
Stadium I: Hunn



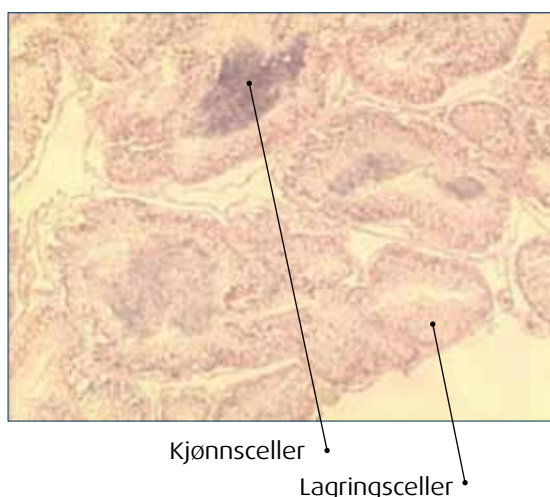
Stadium II: NP-vekst (Pre-gametogenese og NP-fornyng)

Dette stadiet varer i omkring 3-4 måneder gjennom sommeren. Kjønnsceller begynner å dukke opp omkring utkanten av cellene og de begynner å øke både i størrelse og antall. Mot slutten av dette stadiet skjer det en markant økning i antallet av og størrelsen på NP-cellene.

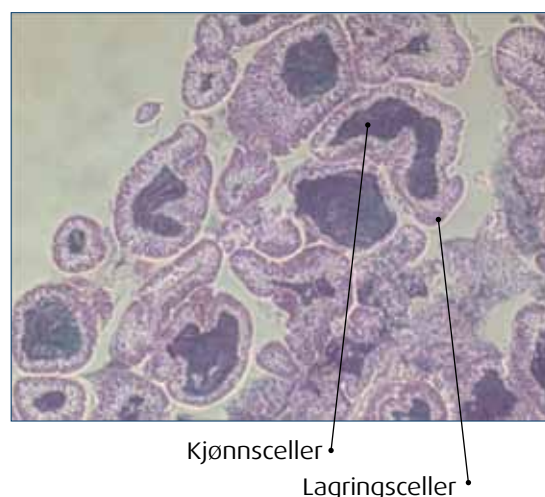
Stadium II: Hunn



Stadium I: Hann



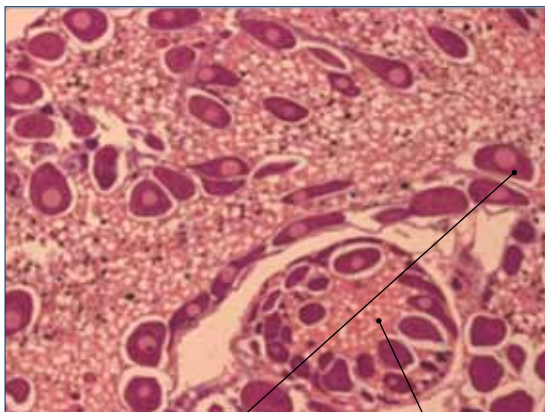
Stadium II: Hann



Stadium III: Utvikling av kjønnsceller (Gametogenese og NP-utnyttelse)

Dette stadiet finner sted fra tidlig på vinteren og varer i omkring 5 måneder. Det overlapper i en periode med stadium II. Kjønnscellene fortsetter å utvikles og begynner å vandre mot midten av cellen. Antallet NP-celler går ned samtidig som kjønnscellene vokser og øker i antall.

Stadium III: Hunn

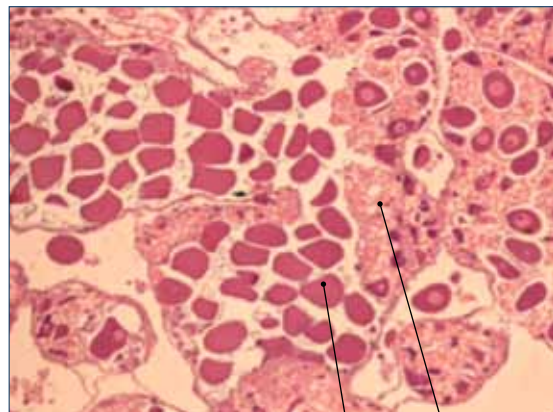


Kjønnsceller
Lagringsceller

Stadium IV: Gyting og etter gyting (Slutten på gametogenesen, NP-utnyttelsen og gyting)

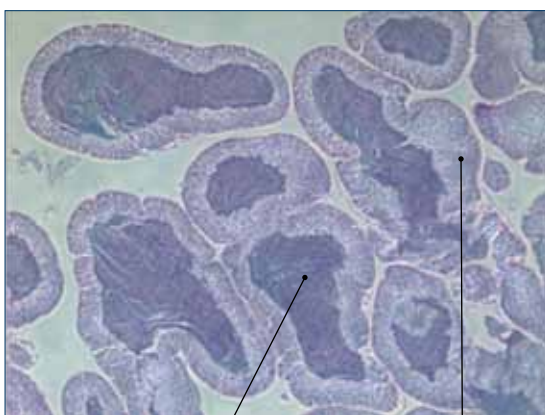
Dette stadiet varer i omkring 2-3 måneder og finner sted sent på vinteren. I midten av cellene (lumen) er det fullt av fullt utviklede (differensierte) kjønnsceller (gameter) klare for gyting. NP-cellene er tomme og har blitt betydelig færre; i noen tilfeller kan de være helt fraværende. Mot slutten av dette stadiet skjer gytingen og noen av eller alle kjønnscellene vil bli sluppet fri fra gonaden.

Stadium IV: Hunn



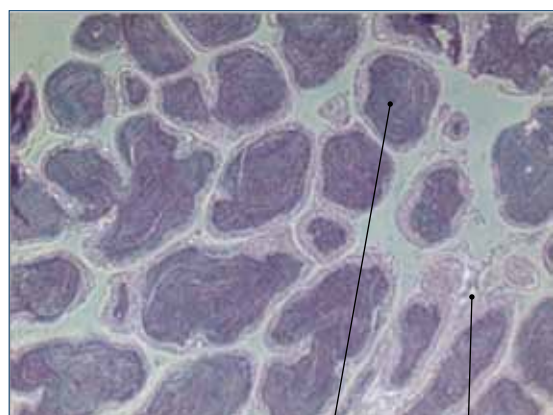
Kjønnsceller
Lagringsceller

Stadium III: Hann



Kjønnsceller
Lagringsceller

Stadium IV: Hann



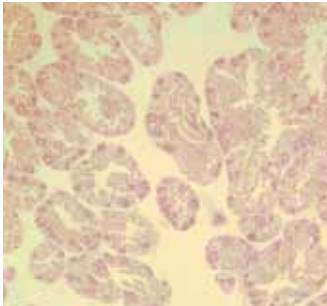
Kjønnsceller
Lagringsceller

Vedlegg 1

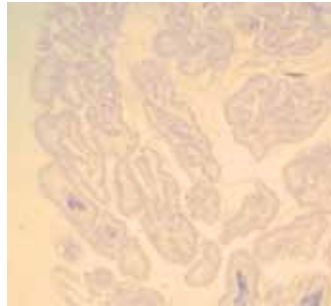
Eksempler på histologiske snitt av gonader fra *Strongylocentrotus droebachiensis* fra to populasjoner i Kvalsundet utenfor Tromsø.

Populasjon En

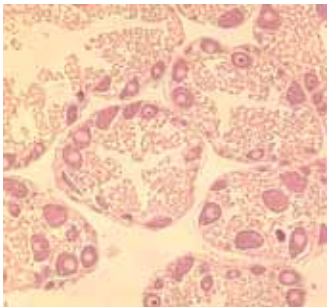
Prøve 1: 16. juni 2010



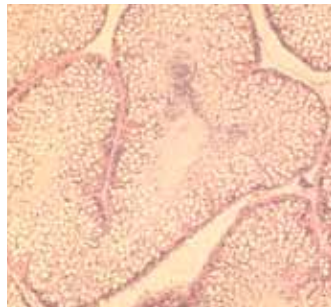
Hunn (x 4) stadium II



Hann (x 4) stadium I

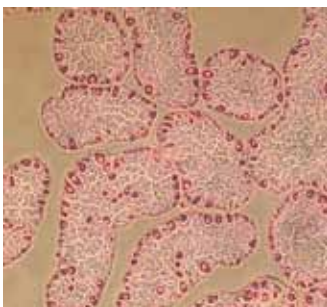


Hunn (x 10) stadium II

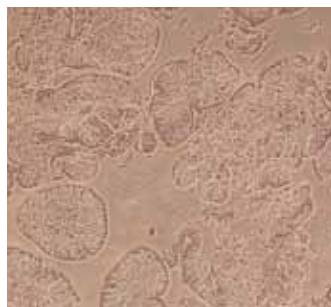


Hann (x 10) stadium I

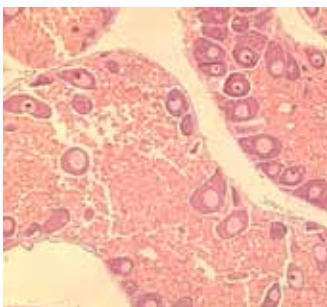
Prøve 2: 26. juli 2010



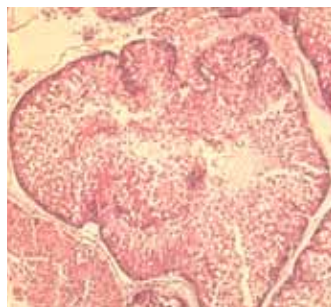
Hunn (x 4) stadium II



Hann (x 4) stadium II



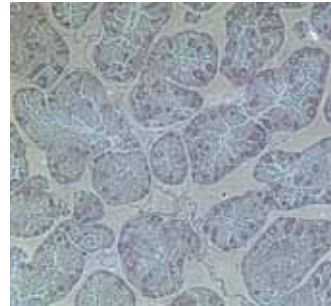
Hunn (x 10) stadium II



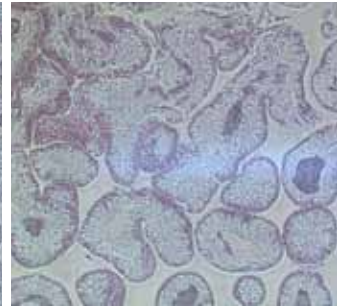
Hann (x 10) stadium II

Populasjon To

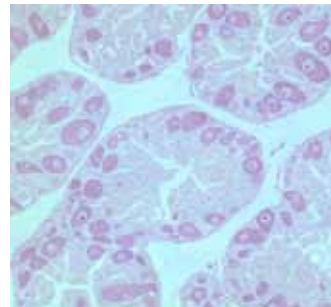
Prøve 1: 16. juni 2010



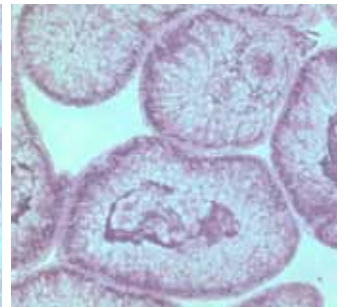
Hunn (x 4) stadium II



Hann (x 4) stadium II

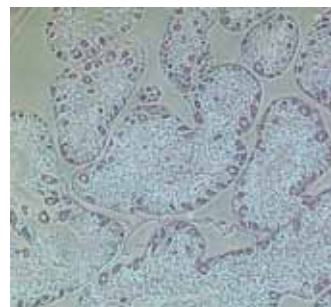


Hunn (x 10) stadium II

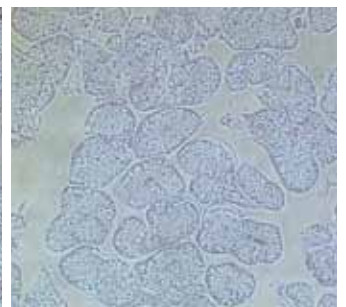


Hann (x 10) stadium II

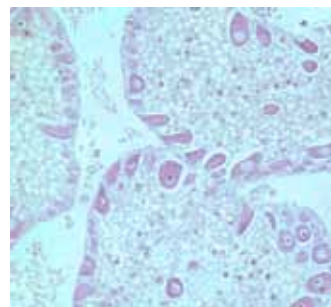
Prøve 2: 26. juli 2010



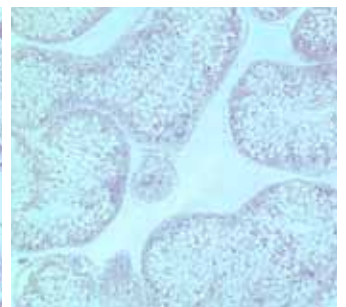
Hunn (x 4) stadium II



Hann (x 4) stadium II



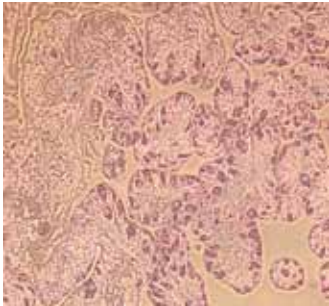
Hunn (x 10) stadium II



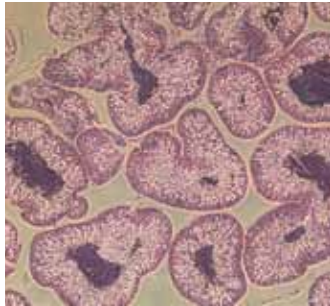
Hann (x 10) stadium II

Populasjon En

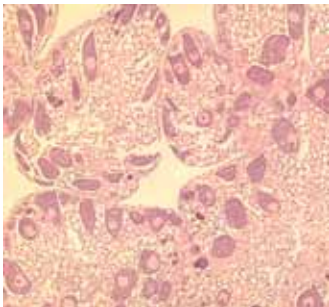
Prøve 3: 13. september 2010



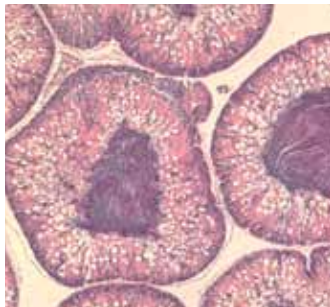
Hunn (x 4) stadium III



Hann (x 4) stadium III

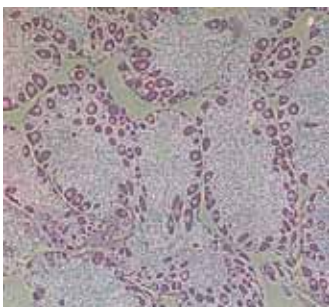


Hunn (x 10) stadium III

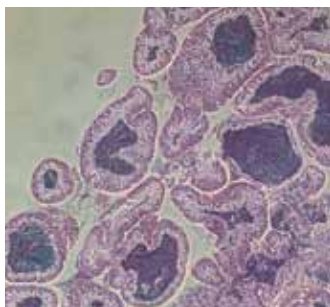


Hann (x 10) stadium III

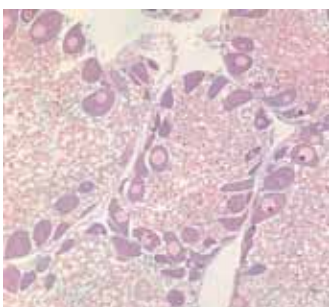
Prøve 4: 28. oktober 2010



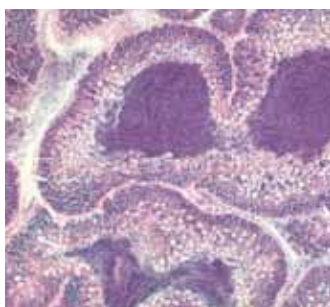
Hunn (x 4) stadium III



Hann (x 4) stadium III



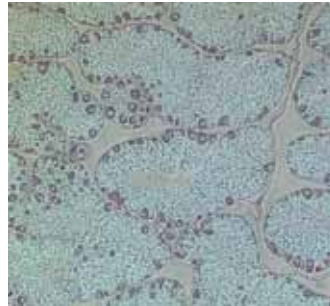
Hunn (x 10) stadium III



Hann (x 10) stadium III

Populasjon To

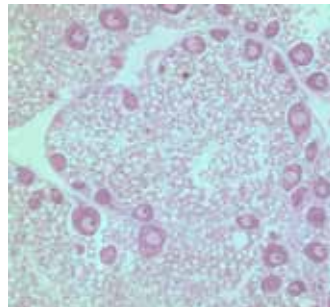
Prøve 3: 13. september 2010



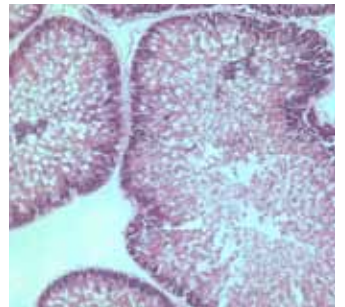
Hunn (x 4) stadium II



Hann (x 4) stadium II

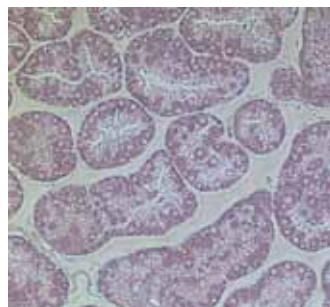


Hunn (x 10) stadium II

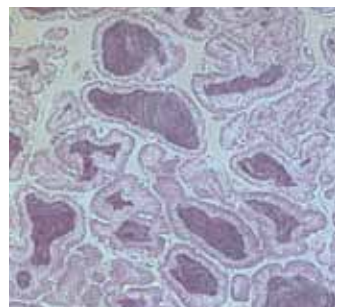


Hann (x 10) stadium II

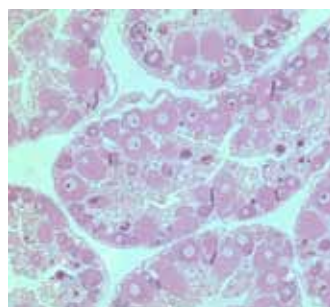
Prøve 4: 28. oktober 2010



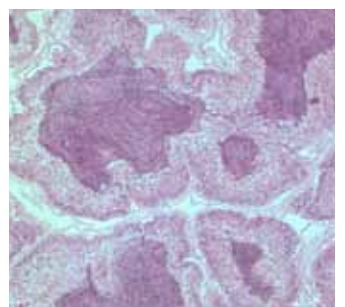
Hunn (x 4) stadium III



Hann (x 4) stadium III



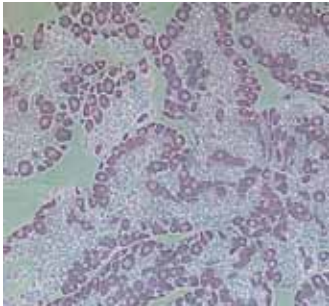
Hunn (x 10) stadium III



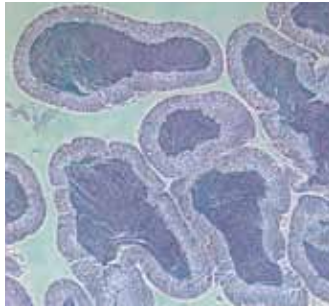
Hann (x 10) stadium III

Populasjon En

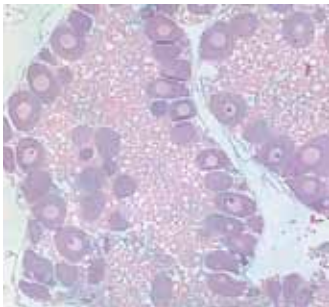
Prøve 5: 9. desember 2010



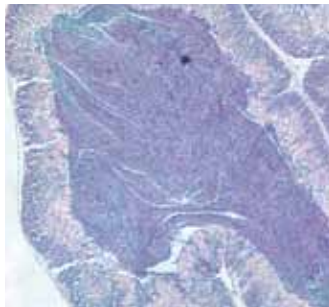
Hunn (x 4) stadium III



Hann (x 4) stadium IV

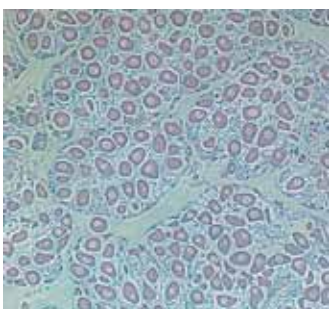


Hunn (x 10) stadium III

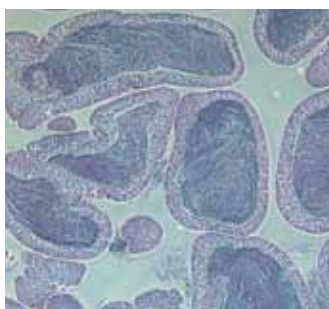


Hann (x 10) stadium IV

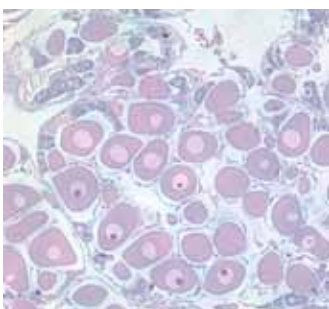
Prøve 6: 26. januar 2011



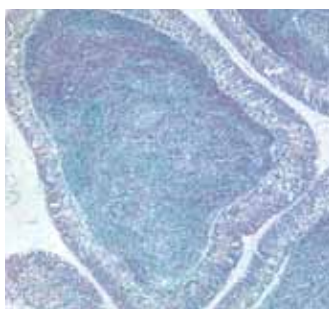
Hunn (x 4) stadium IV



Hann (x 4) stadium IV



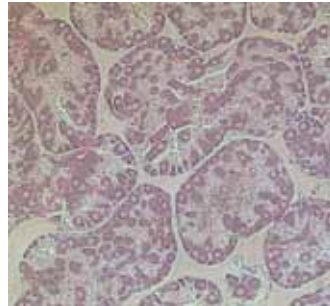
Hunn (x 10) stadium IV



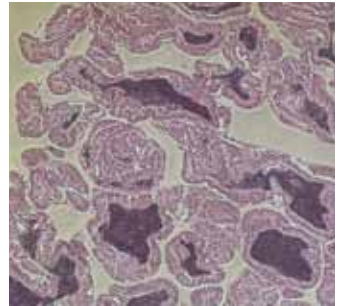
Hann (x 10) stadium IV

Populasjon To

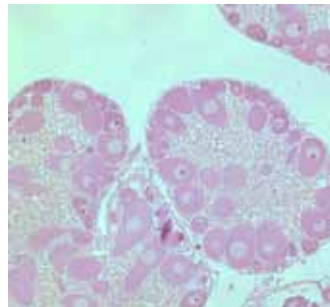
Prøve 5: 9. desember 2010



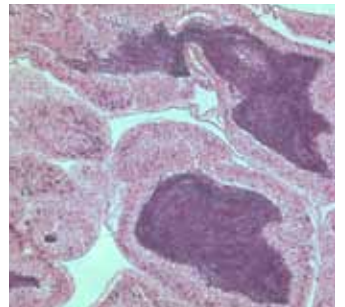
Hunn (x 4) stadium III



Hann (x 4) stadium III

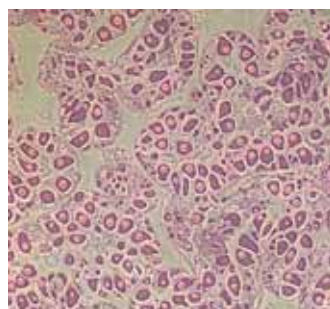


Hunn (x 10) stadium III

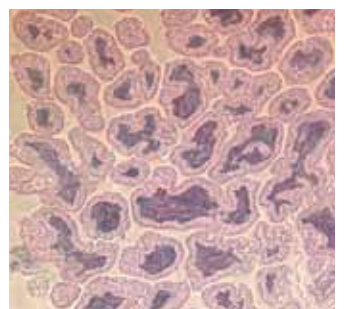


Hann (x 10) stadium III

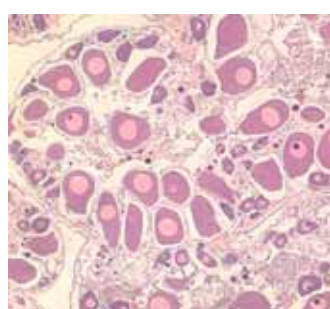
Prøve 6: 26. januar 2011



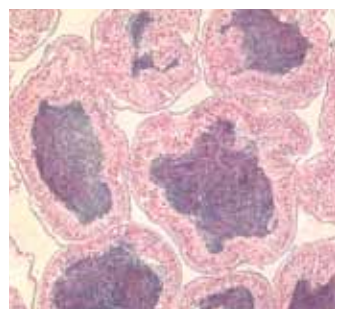
Hunn (x 4) stadium III/IV



Hann (x 4) stadium III/IV



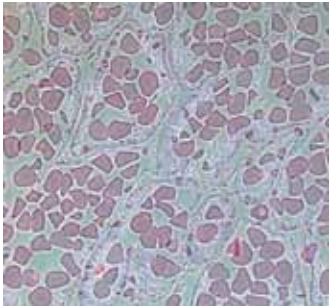
Hunn (x 10) stadium III/IV



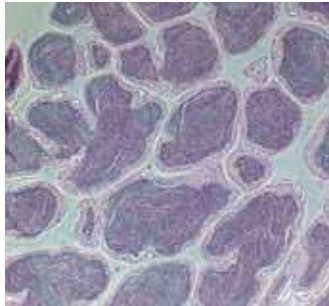
Hann (x 10) stadium III/IV

Populasjon En

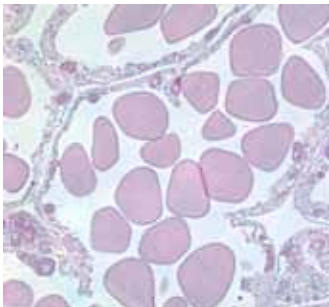
Prøve 7: 15. mars 2011



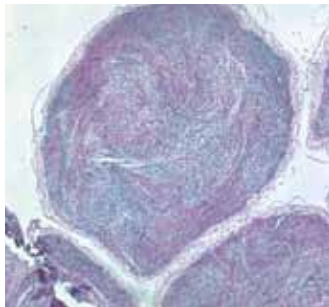
Hunn (x 4) stadium IV



Hann (x 4) stadium IV

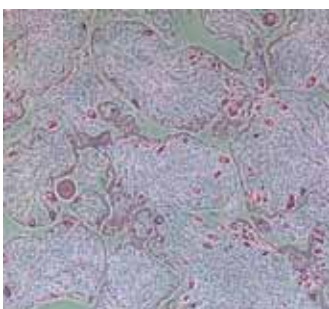


Hunn (x 10) stadium IV

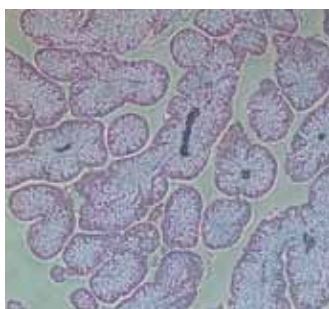


Hann (x 10) stadium IV

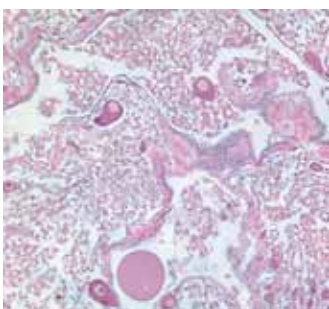
Prøve 8: 4. mai 2011



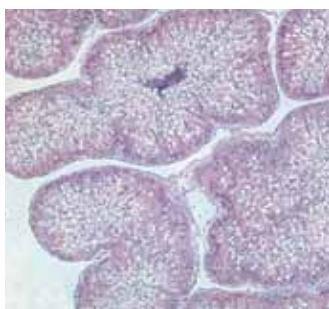
Hunn (x 4) stadium I



Hann (x 4) stadium I



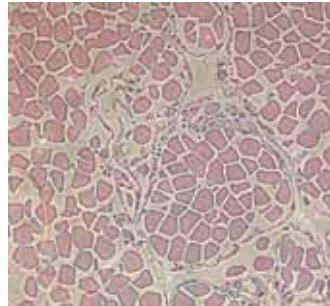
Hunn (x 10) stadium I



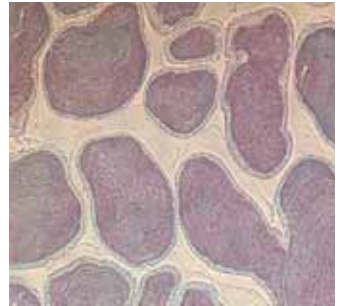
Hann (x 10) stadium I

Populasjon To

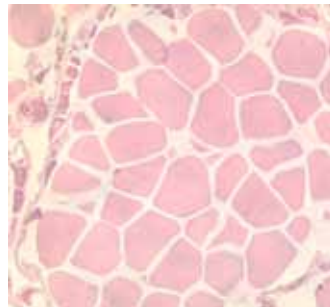
Prøve 7: 15. mars 2011



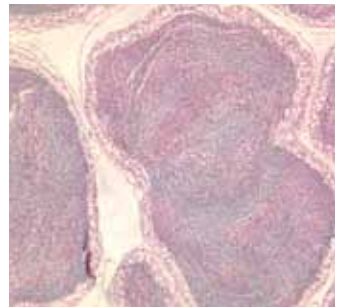
Hunn (x 4) stadium IV



Hann (x 4) stadium IV

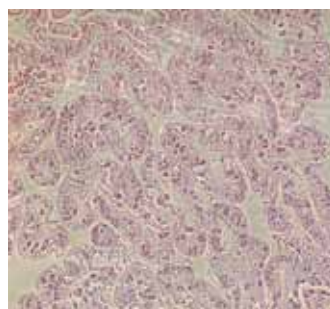


Hunn (x 10) stadium IV

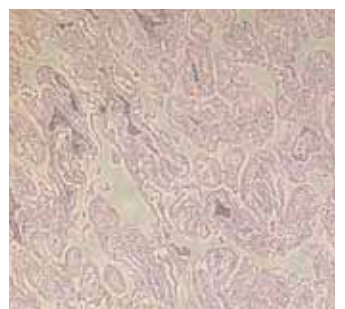


Hann (x 10) stadium IV

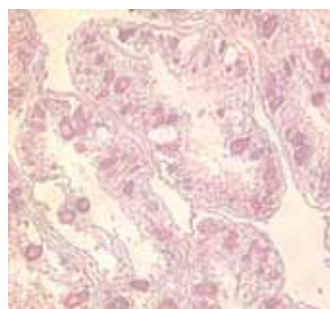
Prøve 8: 4. mai 2011



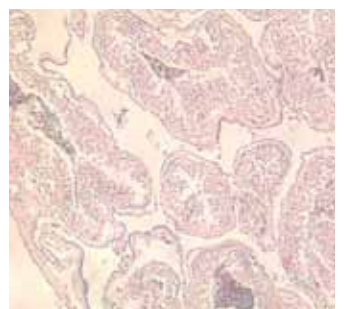
Hunn (x 4) stadium I



Hann (x 4) stadium I



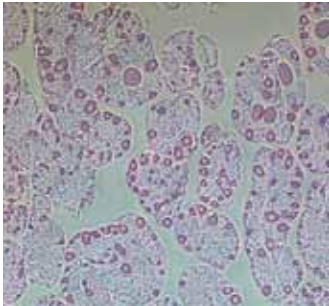
Hunn (x 10) stadium I



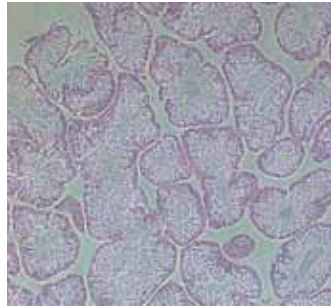
Hann (x 10) stadium I

Populasjon En

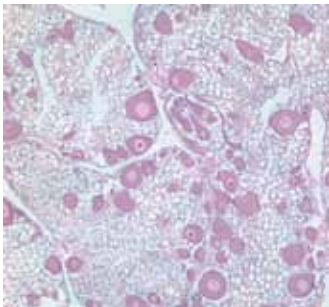
Prøve 9: 14. juni 2011



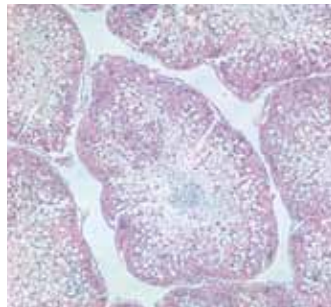
Hunn (x 4) stadium I/II



Hann (x 4) stadium I



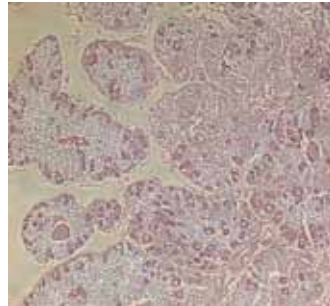
Hunn (x 10) stadium I/II



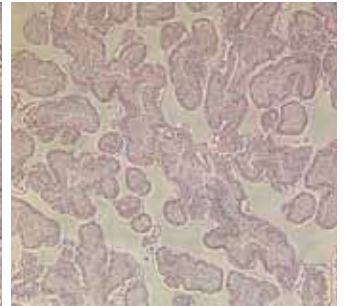
Hann (x 10) stadium I

Populasjon To

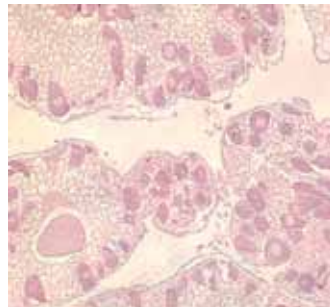
Prøve 9: 14. juni 2011



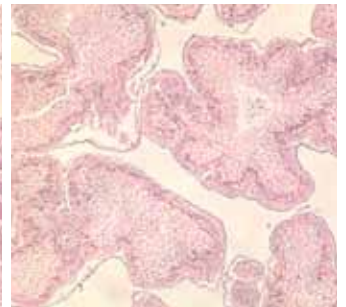
Hunn (x 4) stadium II



Hann (x 4) stadium II



Hunn (x 10) stadium II



Hann (x 10) stadium II

Notater:



Nofima er Europas største institutt for anvendt forskning innen fiskeri, akvakultur og mat. Instituttet har om lag 420 ansatte og omsetter årlig for rundt 500 millioner kroner.

Vi leverer internasjonalt anerkjent forskning og løsninger som gir næringslivet konkurransefortrinn langs hele verdikjeden.

Nofima AS har hovedkontor i Tromsø, og forskningsvirksomhet på Averøy, i Bergen, Stavanger, Sunndalsøra, Tromsø og på Ås.

Nofima AS

Muninbakken 9-13, Breivika
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø

Tel. +47 77 62 90 00

Faks +47 77 62 91 00

E-post: nofima@nofima.no



Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF) skal bidra til økt verdiskaping og bærekraft i sjømatnæringen. I dialog med næringen utformer FHF strategier for forskning og utvikling (FoU), tar initiativ til og finansierer FoU-prosjekter, og driver forskningsformidling.

FHF fordeler midler til næringsrettet FoU på eget initiativ, i samsvar med kort- og langsiktige strategier som er forankret i næringen.

Inntektsgrunnlaget til FHF er en avgift på 3 promille av eksportverdien for fisk og fiskevarer.

Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond

Tollbugata 32
Postboks 429 Sentrum
NO-0103 Oslo

Tel. +47 23 89 64 08

Faks: +47 23 89 64 09

E-post: post@fhf.no