

nfexpert

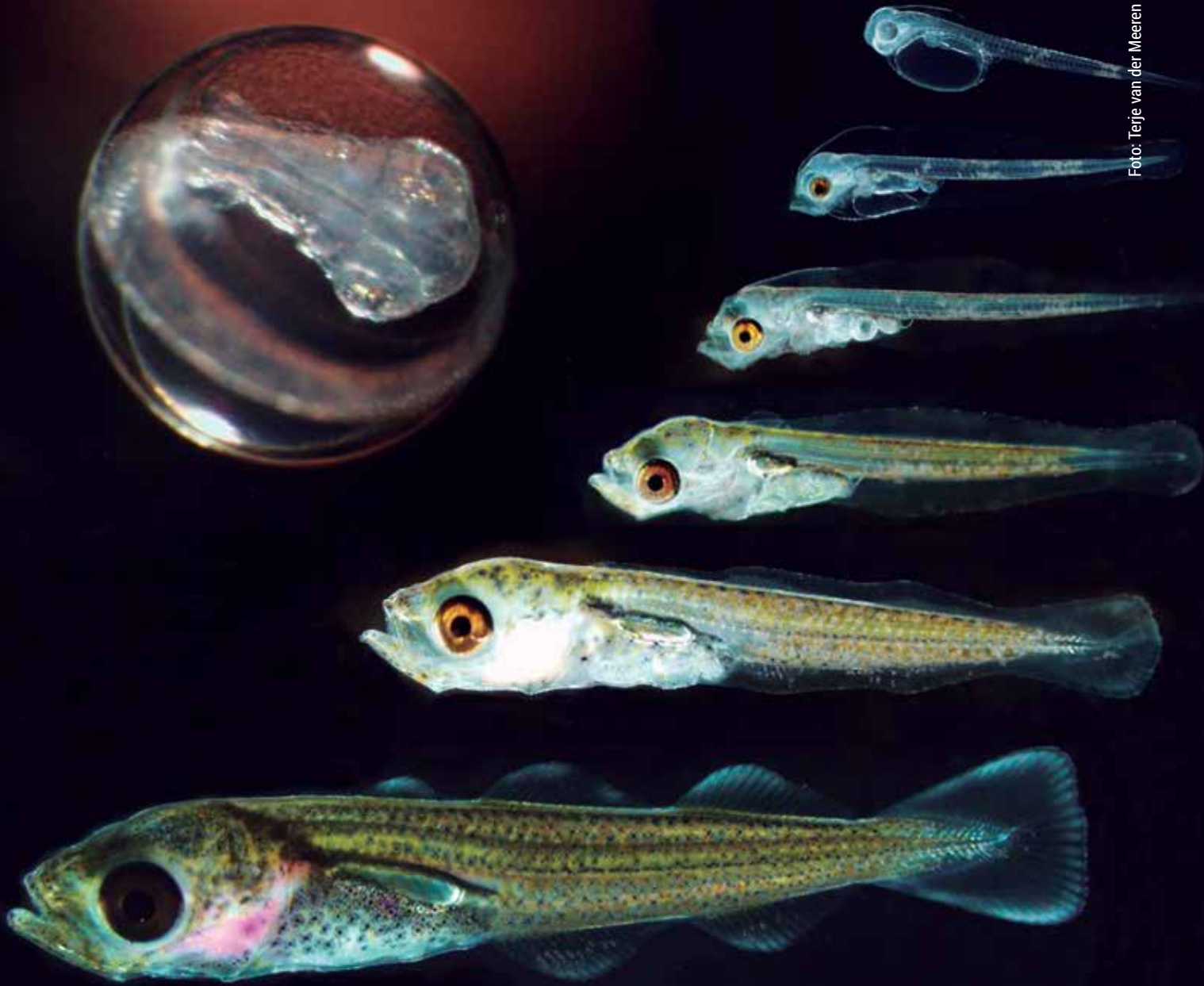


Foto: Terje van der Meeren

Ny, viktig kunnskap om torskens tidligste faser

I samarbeid med kunnskapsplattformen **code** | Cod Development

«En god start er avgjørende for å få en robust fisk»

Utvikling av osmoregulerings-systemet hos torskelarver startfôret på rotatorier eller naturlig zooplankton

Lik andre beinfisk som lever i havet er torsken omgitt av et miljø som har et langt høyere saltinnhold enn fiskens vevsvæsker. Dette medfører at fisken mister vann gjennom osmose til sjøvannet. Fisken erstatter dette vanntapet gjennom å drikke sjøvann og samtidig aktivt skille ut overskudd av salter. Osmoregulering er særlig utfordrende for små fiskeegg og larver pga den lille størrelsen og at ikke alle organsystemer som er involvert i salt- og vannbalansen er ferdig utviklet. I dette studiet har vi kartlagt endringer i genuttrykk og fordeling av saltregulerende celler gjennom tidlige utviklingsstadier hos torsk startfôret på to ulike dietter, hjuldyr (rotatorier) eller naturlig zooplankton (hovedsakelig copepoder). Vi har spesielt undersøkt hud og gjelleanlegg, i tillegg til tarm og ekskresjonssystemet.

Tom O. Nilsen, Juliane Lukas, Ragnhild Valen, Jon V. Helvik, Lars O.E. Ebbesson, Ivar Rønnestad, Kristin Hamre, Sigurd O. Handeland, Sigurd O. Stefansson
Tom.Nilsen@uni.no

Voksen fisk opprettholder kroppens vann- og saltbalanse ved hjelp av velutviklede osmoregulatoriske organ som gjelle, nyre og tarm. Osmotisk tap av vann kompenseres ved å drikke sjøvann med påfølgende opptak over tarmen. Dette medfører overskudd av salter (Na^+ , Cl^-) i vevsvæskene som hovedsakelig skilles ut via spesialiserte celler i gjellene, såkalte kloridceller (Figur 1). Selv om fiskelarver tidlig utvikler embryonale kloridceller, og opprettholder vann- og salt balansen under embryonal-

utviklingen så er ikke osmoregulatoriske organ alltid ferdig utviklet og funksjonelle ved klekking. I tillegg vil et ugunstig overflate/volum forhold stille larven ovenfor særlige utfordringer både før, under og etter klekking. Dette løser larven gjennom spesialiserte kloridceller spredt omkring på plommesekken og huden.

Genmarkør for påvisning av kloridceller

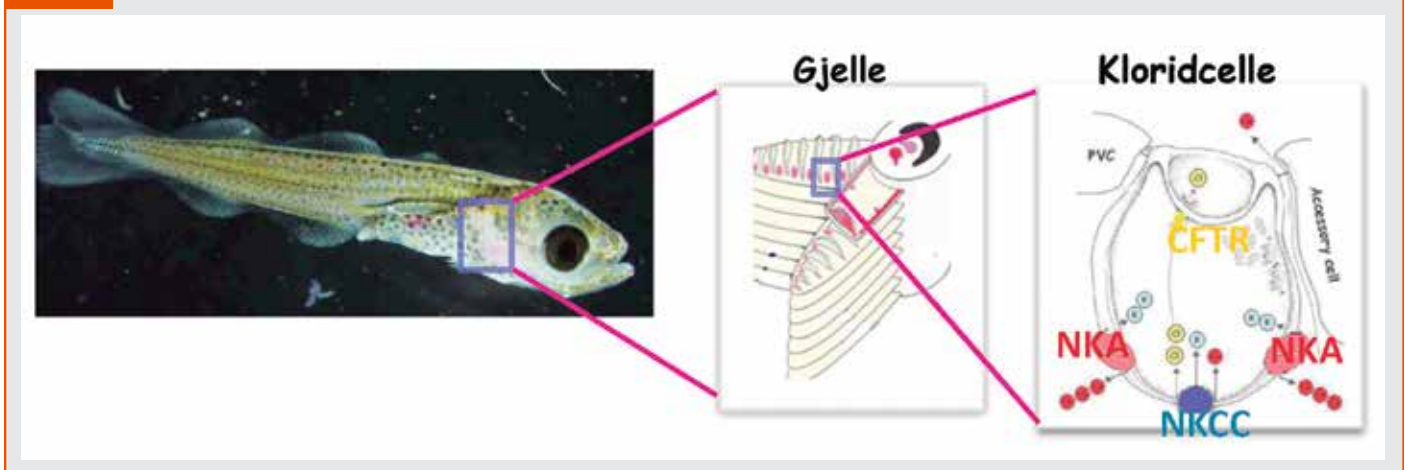
Ved å studere endringer i uttrykket til nøkkelgener som bare fins i celler som er spesialiserte for osmoregulering, kan en kartlegge endringer i funksjonen til organer som gjeller, nyre, tarm og hud under larvens utvikling. Vi utviklet en markør

for påvisning av transport av Na^+ , K^+ og Cl^- (NKA genet), og brukte denne til å studere forekomst og fordeling av kloridceller på forskjellige utviklingsstadier hos torsk. Utviklingsstadiene er beskrevet av Sæle m.fl. annet sted i bladet.

Kloridceller finnes i både gjeller og hud hos torskelarver

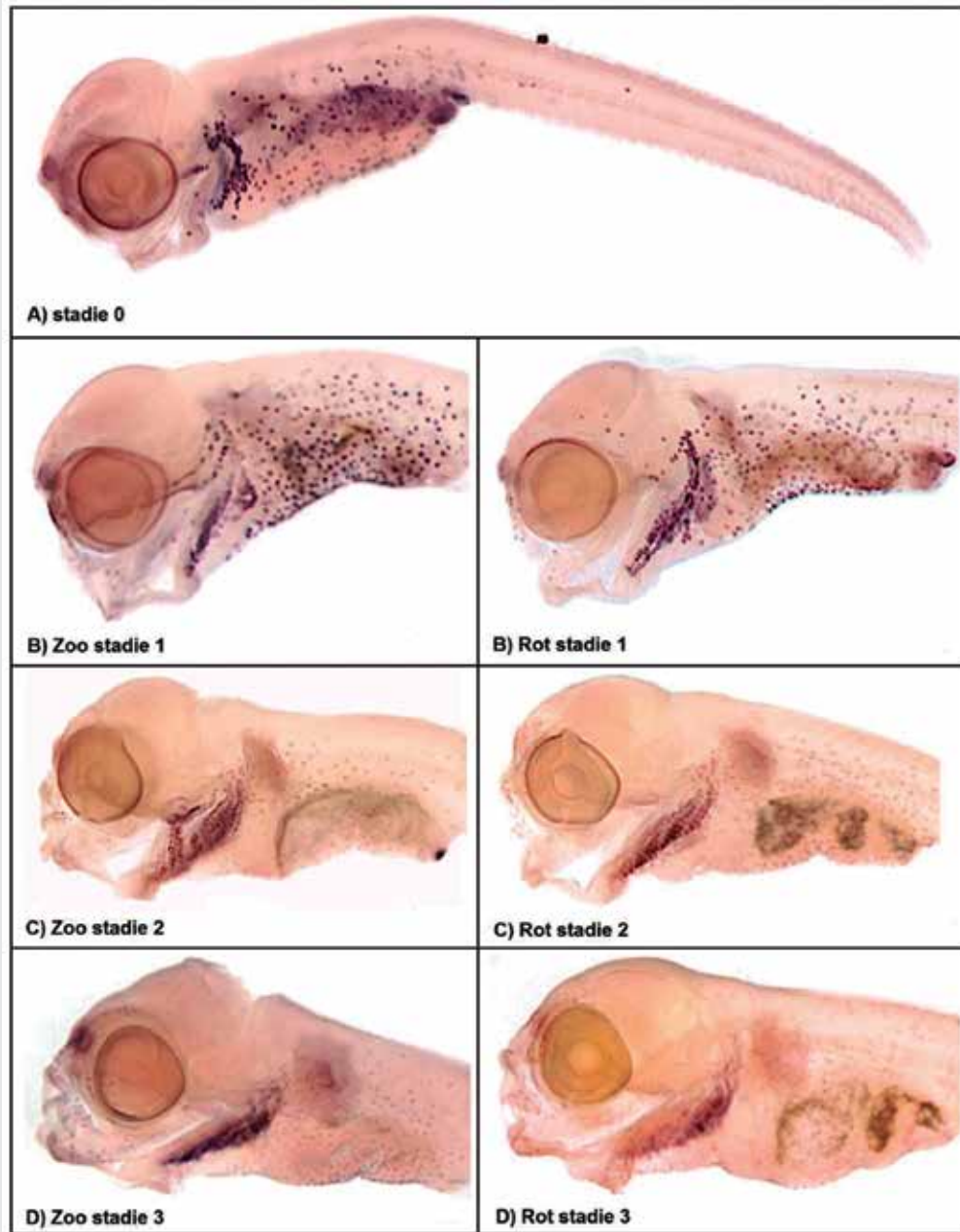
Når en celle produserer genet vi har markør mot vil dette gi en sterk fiolett farge i det histologiske preparatet. Ved stadium 0, som tilsvarer 4 dager etter klekking, ser vi karakteristiske fiolette fargepunkt som representerer kloridceller i hud og gjeller (Figur 2A). Spesielt rundt de tidlige

FIGUR 1



Skisse som viser oppbygging av gjeller og kloridceller. Enzymet Na^+/K^+ -ATPase (NKA) er det sentrale transportprotein i kloridceller. Dette enzymet setter opp en elektrokjemisk gradient som brukes av $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2 Cl}^-$ co-transporter (NKCC) for å transportere Na^+ , K^+ og Cl^- inn i cellen, hvorpå Cl^- skilles ut gjennom en kloridkanal (CFTR). Na^+ skilles ut i rommet mellom kloridceller og støtteceller.

FIGUR 2



Uttrykk av NKA genet i torsk larver på ulike utviklingsstadier. Larvene ble startføret på zooplankton (Zoo) eller rotatorier (Rot) og prøver tatt ved stadie 0, 1, 2 og 3. De fiolette punktene representerer kloridceller i hud og gjeller etter at larvene ble fremkalt med fargesubstrat (NBT/BCIP) i 10-15 minutter.

anleggene til gjellespalter kunne vi se svært mange kloridceller (Figur 2A). Dette støtter at gjellene har kapasitet til å skille ut salter tidlig etter klekking. Videre fant vi kloridceller fordelt i epitelet (det ytre hudlaget) som dekker fremre halvdel av kroppen til larven, spesielt rundt indre organer og plommesekken (Figur 2A). En uke seinere (Stadium 1, Figur 2B) økte kloridcellene til maksimal størrelse for deretter å minke i igjen frem til stadium 4. Deretter var kloridceller i huden fraværende. Under utviklingen av gjellene var det en økende tetthet av kloridceller i gjellespal-

tene. Fire par gjellebuer ble først observert ved stadium 1 mens gjellefilamenter og lameller ennå ikke var ferdig utviklet. Gjellefilamenter ble først observert hos larver ved stadium 3 og lameller først observert ved stadium 4. Videre fant vi kloridceller på gjellefilamentene ved basis av lamellene, mens ingen kloridceller ble observert på lamellene (Figur 3). Intensiteten til fargingen i hudens kloridceller avtok med økende alder, noe som tyder på lavere aktivitet i kloridcellene. Dette er i overensstemmelse med en gradvis endring fra hud til gjelle som primær organ for utskilling

av Na^+ og Cl^- etter stadium 4. På grunnlag av forskjellene i ernæring og vekst mellom de to larvegruppene kunne man kanskje forvente fysiologiske forskjeller i osmoreguleringsystemet. Tidspunktene for uttak var tilpasset den ulike veksten i de to gruppene; larvene ble innsamlet på samme stadium for å gjøre gruppene sammenlignbare. Det var ingen forskjeller mellom de to larvegruppene, hverken når det gjaldt fordelingen av kloridceller eller for utviklingen av osmoreguleringsystemet.



Konklusjon

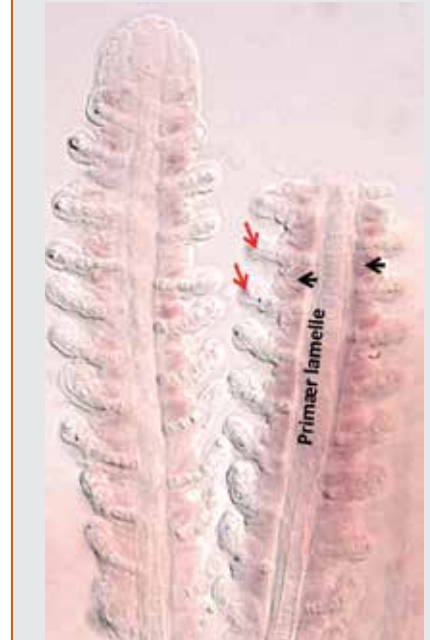
Utviklingen av osmoregulerings-systemet hos torskelarver synes å være likt det som er funnet hos andre marine fiskelarver. Larven klekkes med åpen munn som er forbundet til fordøyelsessystemet og drikkeraten øker betydelig gjennom de første dagene etter klekking. Vann tas opp over tarmen samtidig som overskudd av salt skiller ut ved hjelp av kloridceller i både hud og gjeller. Dette hindrer dehydrering av larven. Etter hvert som torskelarven blir eldre, utvikles gjellenes osmoregulatoriske kapasitet fullt ut og behovet for kloridcellene i huden reduseres. Huden er derfor et viktig osmoregulatorisk organ under larvestadiet, men denne funksjonen forsvinner etter metamorfose. Det var ingen forskjeller i utviklingen av osmoregulerings-systemet mellom torskelarver som spiste rotatorier og copepoder.

FIGUR 3



Uttrykk til NKA i torskelarver ved stadiet 1. Sorte piler viser de mørke punktene og representerer kloridceller i gjeller etter fremkalling med fargesubstrat (NBT/BCIP) i 100-110 minutter.

FIGUR 4



Uttrykk til NKA i gjeller hos torskelarver ved stadiet 4. Sorte piler indikerer kloridceller i gjeller etter fremkalling med fargesubstrat NBT/BCIP. kloridceller er fordelt utelukkende på filamentene ved basis av lamellene, men ikke på selve sekundær lamellene (rød pil).

Referanser

- Hiroi, J., McCormich, S.D., Ohtani-Kaneko, R., Kaneko, T., (2005). Functional classification of mitochondrion-rich cells in euryhaline Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos, by means of triple immunofluorescence staining for Na^+/K^+ -ATPase, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ Cotransporter and CFTR anion channel. *J. Exp. Biol.* Vol. 208: p. 2023-2036.
- Mangor-Jensen, A. (1987). Water balance in developing eggs of the cod *Gadus morhua* L. *Fish Physiol. Biochem.* Vol. 3: pp 17-24.
- Mangor-Jensen, A., Adoff, G.R. (1987). Drinking activity of the newly hatched

larvae of cod *Gadus morhua* L. *Fish Physiol. Biochem.* Vol. 3: pp 99-103.

- Sucre´ E., Charmantier-Daures, M., Grousset, E., Charmantier, G., Cucchi-Mouillot, P., (2010). Embryonic occurrence of ionocytes in the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Cell Tissue Res* 339:543-550
- Tytler, P., Bell, M.V., (1989). A study of diffusional permeability of water, sodium and chloride in yolk-sac larvae of cod (*Gadus morhua* L.). *J. Exp. Biol.* 147, 125- 132.
- Varsamos S, Nebel C, Charmantier G (2005). Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: a review. *Comp Biochem Physiol A* 141:401-429

pH-justering?

Vi hjelper deg med produkt og tekniske løsninger



48 14 25 57

www.kalk.no



FRANZEFOSS
MILJØKALK