



HAL
open science

Sterilization, sex inversion and identification of sex in fish reared in fish farms

Roland Billard

► **To cite this version:**

Roland Billard. Sterilization, sex inversion and identification of sex in fish reared in fish farms. *Rivista Italiana di Piscicoltura e Ittiopatologia*, 1983, 18 (2), pp.45-54. hal-01601106

HAL Id: hal-01601106

<https://hal.science/hal-01601106>

Submitted on 2 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

Questo numero contiene: pag.

- Sterilization, sex inversion and identification of sex in fish reared in fish farms (by R. BILLARD). Sterilizzazione, inversione del sesso ed identificazione del sesso in pesci di allevamento 45
- Black Spot disease, a myxosporidiosis affecting silver mullet (*Mugil curema* VAL.) in Venezuela running title: Black spot disease in Silver mullet (by M. AGUIRRE, D. A. CONROY, GINA CONROY, J. M. TORREALBA). Malattia delle Macchie nere, una mixosporidiosi che colpisce il cefalo (*Mugil curema* VAL.) in Venezuela 61
- Recensioni 69
- Formazione, differenziamento istologico ed aspetti patologici della vescica natatoria in larve di branzino (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) (di R. GIAVENNI e M. DOIMI) 71

PUBBLICITÀ INFERIORE AL 70%

La RIVISTA ITALIANA DI PISCICOLTURA E ITTIOPATOLOGIA è stampata ogni trimestre a cura della COOPERATIVA PISCICOLTORI ITALIANI - COPI s.r.l., Via Indipendenza 5, TREVISO, Tel. (0422) 50674.

Gli Interessati a scrivere articoli su di essa sono pregati di mettersi in contatto con la Direzione della COPI, Via Indipendenza 5, 31100 TREVISO, ITALIA, Tel. (0422) 50674. Questa, sentito il parere del Direttore responsabile e dei Redattori, può accettare o meno di pubblicare quanto inoltrato.

Al contributori che ne faranno richiesta saranno inviati a pagamento n. 50 estratti degli articoli pubblicati. Questi avranno lo stesso formato della rivista e saranno senza copertina.

I manoscritti e le figure, anche non pubblicate, non saranno restituiti. Le foto a colori saranno addebitate agli autori, per quanto riguarda le spese di cliché e di stampa.

La COPI non è responsabile per giudizi individuali espressi negli articoli pubblicati.

La rivista viene inviata a tutti i Soci dell'A.P.I. ed agli abbonati che abbiano versato il relativo importo annuale (Lit. 16.000 per l'Italia e Lit. 24.000 per l'estero) alla Direzione della COOPERATIVA PISCICOLTORI ITALIANI - COPI, Via Indipendenza 5, 31100 TREVISO (ITALIA). Per la pubblicità rivolgersi alla Direzione della COPI e inviare testi e figure dei bozzetti direttamente alla Tipografia Emilio Bono.

Autorizz. Trib. Treviso n. 256 del 18-10-1966

COPYRIGHT 1971

by « Associazione Piscicoltori Italiani »

Proprietà Letteraria Riservata

Printed in Italy - Tipografia EMILIO BONO
Via S. Paolo 12 - 10138 TORINO, Italia

Dir. Respons.: Cav. BORTOLO SALVADOR
V. Dir.: Sig. LUIGI FAROLDI - Dr. RENZO MATTEI

Redattori: Prof. Dr. PIETRO GHITTINO
Prof. Dr. ETTORE GRIMALDI

STERILIZATION, SEX INVERSION AND IDENTIFICATION
OF SEX IN FISH REARED IN FISH FARMS

INTRODUCTION

It is advantageous for the fish farmer to commercialize his fish before they reach sexual maturity or after they have been sterilized; the growth rate is better and the feed conversion ratio is lower (SIMPSON, 1976). Furthermore, the quality of the product does not depreciate in immature or sterile animals as it does in mature fish. This way also avoids post-reproductive mortality which can be considerable and allow salt water culture without the mortalities associated with sexual maturity. If the fish are eviscerated, there is no yield loss due to the presence of gonads. In the case of Tilapia, sterilization or the induction of monosex individuals resolves one of the main problems in the rearing of this species, that is, early reproduction before commercial size is reached, causing numerical overpopulation and marked dwarfism. The use of sterile individuals also permits the experimenter to introduce foreign species into the natural environment without risk of population explosion.

For purposes of sea ranching, it is interesting to augment the number of females in species such as salmonids which are not as highly for fertile. Several strategies may be used but not all are operational in fish farming. Some reviews have dealt with this subject (CHEVASSUS et al., 1979 a, b; BILLARD, 1981; DONALDSON and HUNTER, 1982).

Monosexual lines.

Hybridization. The most classic example of hybridization is that of Tilapia; different hybridizations have given progeny having sex ratios higher than 50% and, in some cases, entirely male or female progeny have been obtained (WOHLFARTH and HULATA, 1981). The male lines are preferred in practice in Tilapia because male growth is better than female growth. In fish farming in Israel and in southeast Asia, *Sarotherodon (Oreochromis) niloticus* females are often crossed with *S. (O.) aureus* males.

Hormonal treatments.

The sex of fish may be reversed by administering sex steroids, if the fish are treated before sexual differentiation. The steroids are given to salmonids such as *Salmo* in the diet beginning at the first feed intake. If 3 mg of methyltestosterone (MT) per kg of feed are given for 70 days, the progeny are male and, if 20 mg of estradiol are given for 30 days, the progeny are female (SIMPSON, 1976; JOHNSTONE et al., 1978). In *Oncorhynchus* which differentiates sexually earlier than *Salmo*, the treatment begins before the first feed intake and is given as a bath during vitelline resorption (DONALDSON and HUNTER, 1982). Steroids administered to the brown carp reverse the sex (NAGY et al., 1981). Sex may also be reversed in Tilapia; the abundant literature on this subject has been reviewed by GUERRERO (1979, 1981). In Israel, male lines of Tilapia are actually produced on a commercial-hatchery scale (ROTBARD, personal communication).

(*) Laboratoire de Physiologie des Poissons, I.N.R.A., 78350 Jouy-en-Josas, France.

at higher doses and for longer periods, the gonads are sterilized. HABIN et al. (1981) thus sterilized rainbow trout by giving 30 mg of MT for 100 days; turbot were sterilized after 70-day treatment at 15°C with MT (25 mg/kg of feed) (BYE and JONES, 1981).

The possibilities of blocking gonadal development in adult fish are limited; they include irradiation or the use of drugs such as steroids (50 µg of MT/kg of feed throughout gametogenesis) (BILLARD et al., 1981), cyproterone acetate or metallibure. However, none of these techniques are easy to apply or they are subject to ethical or legal considerations because they implicate the use of drugs.

Immunisation.

LAIRD et al. (1978, 1980) studied the possibilities of destroying fish gonads by autoimmunization using injections of the ground gonad, but this technique is not yet available to fish farmers.

Triploidy.

THORGAARD and GALL (1979) showed that triploid rainbow trout have only filiform ovaries and partially developed testes. Triploidy has been experimentally obtained in flatfish (LINCOLN, 1981) and, although some developmental gonadal abnormalities have been observed in male hybrids, the gonadosomal index was not changed and the testosterone content was high enough to induce secondary sex characters. Therefore, in the present state of knowledge, triploidy does not seem to be an advantageous technique in rearing flatfish, contrary to what PURDOM's (1972) first results indicated. The induction of experimental triploidy on a large scale in salmonids is recent (REFSTIE, 1981; CHOURROUT, 1980 and unpublished), but the results by LINCOLN and SCOTT (1982) indicates that females are sterile. However, LINCOLN and HARDIMAN (pers. comm.) found that growth was slower in triploid than the diploid controls.

Interspecific hybridization.

Hybridization in fish may not lead to sterility. CHEVASSUS (1979) reviewed this question in salmonids and showed that the number of hybridizations leading to sterility was relatively limited. Also, few of the many hybridizations in Tilapia appear to produce sterile progeny (AL DAHAM, 1970; WOHLFARTH and HULATA, 1981). This method should be explored further but will not have a wide application in fish farming in the near future.

Identification of sex.

It is often an advantage to know the sex of the fish to be reared, but their secondary sex characters, whether permanent or temporary, are hardly developed. The sex can only be determined, after sexual maturity is reached, by such signs as a prominent

genital papilla, verrucous scales, the gill covers, the first rays of the pectoral fins or simply by the gametes released. The sex can sometimes be identified directly by dimorphic pelvic fins (tench) or dimorphic anal fins (trout: GRUCHY and VLADIKOV, 1968; Tilapia: CHERVINSKI, 1965) or by morphometric analysis (trout: LE BAIL, 1981). Fish can also be sexed by assay of the sex steroids (II ketotestosterone) which are only found in large amounts in adult males and for which there are routine testing techniques (WRIGHT, 1976; SANGALANG and FREEMAN, 1977; SANGALANG et al., 1978; FOSTIER et al., 1982). The steroid levels in juveniles are not easily detectable but they can be stimulated by injecting the gonadotropic hor-

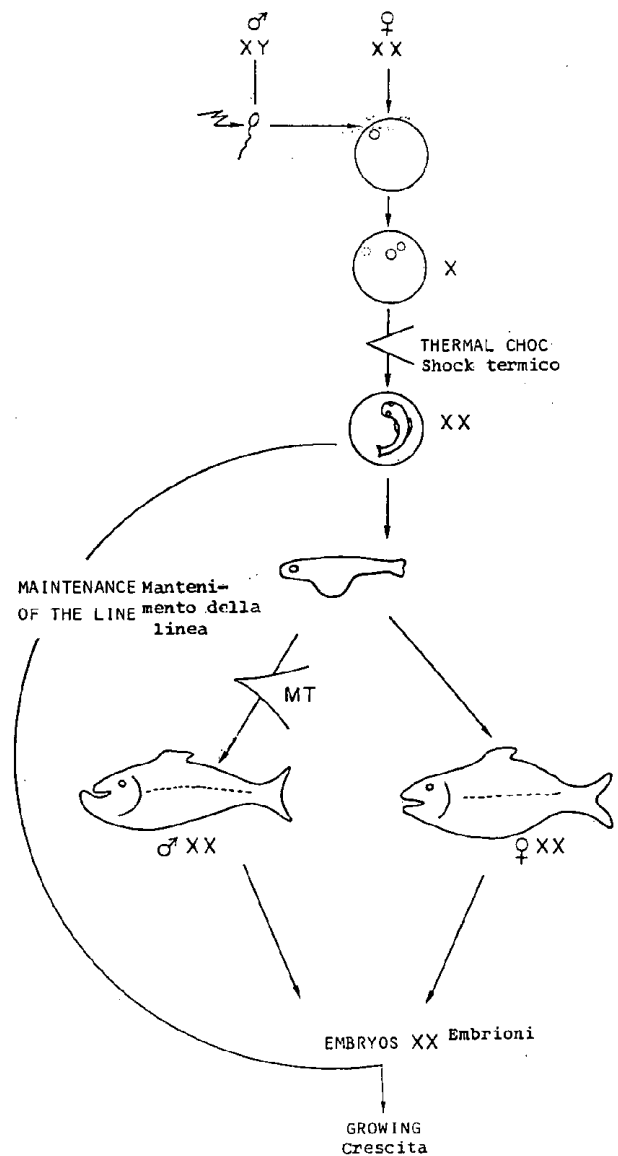


Fig. 2. - In this technique some of the XX embryos first obtained by gynogenesis were reversed into XX males by MT treatment, as in fig. 1.

In questa tecnica alcuni embrioni XX ottenuti dapprima con ginogenesi sono tramutati in maschi XX mediante trattamento con MT, come nella fig. 1.

mone, II-ketotestosterone (N. G. and IDLER, 1980) or estradiol and vitellogenin (IDLER and CAMPBELL, 1980). Females beginning vitellogenesis can also be detected by measuring the vitellogenin. IDLER et al. (1981) and LE BAIL and BRETON (1981) proposed a field method using immunoagglutination for determining the circulating vitellogenin. The use of blood markers such as transferrins and of sex proteins has been proposed by AVTALION (1981) for Tilapia.

The HY antigen, found in the heterogametic sex of many vertebrates, has been identified in fish but since the results are not consistent (it is present in

both sexes in trout: MULLER and WOLF, 1979, or only in homogametic females: SHALEV et al., 1978), it cannot be used yet for sexing fish.

Conclusions.

Table 1 gives a summary of the present possibilities for sex control in fish. Several techniques have already been commercialized (carp and Tilapia) and others, tested on a pilot scale, will soon be available to fish farmers. Some are still in the experimental stage.

THE CONTROL OF SEX IN FISH

Objective	Approach.	Technique	Achievment level		
			Research	Pilot	Fish-farm
Sterilisation	Genetique	Triploidy	+ Trout	Plaice	
		Hybridization	+		
	Irradiation	600 rads eyed stage	+ Carp	Trout	
	Hormonal treatment	Sex steroids in diet (*) before sex differentiation ≥ 100 days - ≥ 30 MG	+ Trout turbot		
Monosex lines	Hormonal treatment	Sex reversal (70 days - 3 MG)	+ Trout Carp	Trout Carp	Tilapia
		Hybridization			Tilapia
	Genetique	Diploid gynogenesis + Sex reversal	Carp Trout	Carp Trout	Carp
Identification of sex	Morphometry	Sexual sec. charact.	+		Tilapia
	Blood assays	11 KT (specific for male)	+		
		vitellogenine immunbaggl.	+	+	

(*) Consumer acceptability.

REFERENCES

- AL DAHAM N. K. (1970): The use of chemosterilisants sex hormones radiation and hybridization for controlling reproduction in Tilapia species (Ph. D. Diss. Auburn Univ., 145 pp.).
- AVTALION R. R. (1981): Genetic markers in Sarotherodon and their use for sex and species identification in Biology of Tilapia (Ed. R. Pullin Iclarm Edition, in press).
- BILLARD R. (1981): The control of fish reproduction in aquaculture. (World Conf. on Aquaculture, Venice, September 1981).
- BILLARD R., BRETON B., RICHARD M. (1981): On the inhibitory effects of some steroids on spermatogenesis in adult rainbow trout (*Salmo gairdneri*). (Can. J. Zool., 59, 1479-1487).
- BYE V., LINCOLN R. (1981): All-female rainbow trout now a practical proposition (Fish Farmer, in press).
- BYE V., JONES A. (1981): Sex control; a method for improving productivity in turbot farming. (Fish Farming Intern., in press).
- CAERVINSKI J. (1965): Sexual dimorphism in *Tilapia*. (Nature, 208, 703).
- CHEVASSUS B. (1979): Hybridization in Salmonids; Results and Perspectives. (Aquaculture, 17, 113-128).
- CHEVASSUS B., CHOÛRROUT D., JALABERT B. (1979 a): Le contrôle de la reproduction chez les poissons. I -

- Les populations « monosexes ». (Bull. Fr. Pisc., 274, 18-31).
- CHEVASSUS B., BLANC J. M., CHOURROUT D. (1979 b): Le contrôle de la reproduction chez les poissons. II - Reproduction différée et stérilité. (Bull. Fr. Pisc., 274, 32-46).
- CHOURROUT D. (1980): Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). (Reprod. Nutr. Develop., 20, 727-733).
- DONALDSON E. M., HUNTER G. A. (1982): Sex control in fish with particular reference to salmonids. (Can. J. Fish. Aquat. Sci., 39, 99-110).
- EGAMI N., IJIRI N. (1979): Effects of irradiation on germ cells and embryonic development in teleost. (Int. Rev. Ctol., 59, 195-248).
- FOSTIER A., BILLARD R., BRETON B., LEGENDRE M., MARLOT S. (1982): Plasma 11-oxotestosterone and gonadotropin during the beginning of spermiation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). (Gen. Comp. Endocrinol., 46, sous presse).
- GRUCHY C. G., VLADYKOV V. D. (1968): Sexual dimorphism in anal fin of brown trout, *Salmo trutta*, and close relatives. (J. Fish. Res. Board. Can., 25, 813-815).
- GUERRERO R. D. (1979): Use of hormonal steroids for artificial sex reversal of *Tilapia*. (Proc. Indian natn. Acad., 45, 512-514).
- GUERRERO R. D. (1981): Iclarm conference on the biology and culture of *Tilapia*. (Bellagio Italy 2-5 sept. 1980).
- HARBIN R., WHITEHEAD C., BROMAGE N. R., SMART G., JOHNSTONE R., SIMPSON T. (1981): Sterilization and other effects of methyltestosterone in the rainbow trout. (J. Endocrinol., 87, 66P-67P).
- IDLER E. R., CAMPBELL C. M. (1980): Gonadotropin stimulation of oestrogen and yold precursor synthesis of juvenile rainbow trout. (Gen. Comp. Endocrinol., 41, 384-391).
- IDLER D. R., HWANG S. J., CRIM L. W., REDDIN D. (1981): Determination of sexual maturation stages of Atlantic salmon (*Salmo salar*), captured at sea. (Can. J. Fish. Aquat. Sci., 38, 405-413).
- JOHNSTONE R., SIMPSON T. H., YOUNGSON A. F. (1978): Sex reversal in salmonid culture. (Aquaculture, 13, 115-134).
- LAIRD L. M., ELLIS A. E., WILSON A. R., HOLLIDAY F. G. T. (1978): The development of the gonadal and immune systems in the atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and a consideration of the possibility of inducing autoimmune destruction of the testis. (Ann. Biol. anim. Bioch. Biphys., 18, 1101-1106).
- LAIRD L. M., WILSON A. R., HOLLIDAY F. G. T. (1980): Field trials of a method of induction of autoimmune gonad rejection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). (Repro. Nutr. Develop., 20, 1781-1788).
- LE BAIL P. Y. (1981): Recherche de technique permettant l'identification du sexe en fonction de l'état de maturité chez les poissons. (Thèse Dr. Ingénieur, Ecol. Nat. Sup. Agro. Rennes, 52 pp.).
- LE BAIL Y. P., BRETON B. (1981): Rapid determination of the sex of puberal salmonid fish by a technique of immunoagglutination. (Aquaculture, 22, 367-375).
- LEMOINE H. L., SMITH L. T. (1980): Polyploidy induced in brook trout by cold shock. (Transactions of the American Fisheries Society, 109, 626-631).
- LINCOLN R. F. (1981): Sexual maturation in triploid male plaice (*Pleuronectes platessa*) and plaice x flounder (*Platichthys flesus*) hybrids. (J. Fish Biol. 19, 415-426).
- LINCOLN R. E., AULSTAD D., GRAMMELTVEDT A. (1974): Attempted triploid induction in atlantic salmon (*Salmo salar*) using cold shocks. (Aquaculture, 4, 287-297).
- LINCOLN R. F., SCOTT A. P. (1982): Production of all female triploid rainbow trout. (Aquaculture, 30, in press).
- MULLER U., WOLF U. (1979): Cross-reactivity to mammalian anti-H-Y antiserum in teleostean fish. (Differentiation, 14, 185-187).
- NAGY A., BERCSENYI M., SCANYL V. (1981): Sex reversal in carp (*Cyprinus carpio*) by oral administration of methyltestosterone. (Can. J. Fish. Aquat. Sci., 38, 725-728).
- NG T. B., IDLER D. R. (1980): Gonadotropic regulation of androgen production in flounder and salmonids. (General and comparative endocrinology, 42, 25-38).
- PURDOM C. E. (1972): Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) sperm and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*). (Heredity, 29, 11-24).
- REFSTIE T. (1981): Tetraploid rainbow trout produced by cytochalasin b. (Aquaculture, 25, 51-58).
- SANGALANG G. B., FREEMAN H. C. (1977): A new sensitive and precise method for determining testosterone and 11-ketotestosterone in fish plasma by radioimmunoassay. (General and comparative endocrinology, 32, 432-439).
- SANGALANG G. B., FREEMAN H. C., FLEMMING R. B. (1978): A simple technique for determining the sex of fish by radioimmunoassay using 11-ketotestosterone antiserum. (Gen. Comp. Endocrinol., 36, 187-193).
- SHALEV A., BERCI I., HAMERTON J. L. (1978): Detection and cross-reaction of H-Y antigen by haemagglutination. (J. Immunogenetics, 5, 303-312).
- SIMPSON T. H. (1976): Endocrine aspects of salmonid culture. (Royal Soc. Edinburgh, 75, 241-252).
- TASHIRO F. (1972): Effects of irradiation ⁶⁰Co gamma-ray on the maturation of rainbow trout. (Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 38, 793-797).
- THORGAARD G. H., GALL G. A. E. (1979): Adult triploids in a rainbow trout family. (Genetics, 93, 981-973).

WRIGHT R. S. (1976): Sexing live fish. (Cons. Int. Expl. mer, Anadromous and Catadromous Committee, Demersal fish, C.M. 1976/M: 21).

WOHLFARTH G. W., HULATA G. I. (1981): Applied genetics of tilapias: (ICLARM studies and reviews 6, 26 p. International Center for living aquatic resources management, Manila. ISSN 0115-4389).

R. BILLARD (*)

STERILIZZAZIONE, INVERSIONE DEL SESSO ED IDENTIFICAZIONE DEL SESSO IN PESCI DI ALLEVAMENTO

INTRODUZIONE

È vantaggioso per il piscicoltore mettere in commercio i propri pesci prima che essi raggiungano la maturità sessuale o dopo che essi siano stati sterilizzati; il tasso di accrescimento è migliore e quello di conversione più basso (SIMPSON, 1976). Inoltre, la qualità del prodotto non si deprezza nei pesci immaturi o sterili come invece capita nei pesci maturi. Ciò evita anche le mortalità post-riproduzione, le quali possono essere considerevoli e permette la maricoltura senza le mortalità associate alla maturità sessuale. Se i pesci sono eviscerati, non si hanno perdite dovute alla presenza delle gonadi. Nel caso delle tilapie, la sterilizzazione o l'induzione di individui monosesso risolvono uno dei problemi principali nell'allevamento di queste specie, vale a dire una riproduzione precoce prima che il peso commerciale sia raggiunto, col causare un'iperpopolazione numerica e marcato nanismo. L'uso di individui sterili permette anche allo sperimentatore di introdurre specie esotiche in un ambiente naturale senza rischio di esplosioni di popolazioni ittiche.

Nell'operazione « sea ranching », è interessante aumentare il numero di femmine in specie come i salmonidi che non siano molto fertili. Molte strategie possono essere impiegate ma non tutte sono fattibili in piscicoltura. Alcune rassegne hanno trattato questo argomento (CHEVASSUS & C., 1979 a, b; BILLARD, 1981; DONALDSON & HUNTER, 1982).

Linee monosessuali.

Ibridazione. Il più classico esempio di ibridazione è quello delle tilapie; ibridazioni differenti hanno dato progenie con tasso sessuale superiore al 50% e, in alcuni casi, sono stati ottenuti tutti maschi o tutte femmine (WOLFARTH & HULATA, 1981). Le linee dei maschi sono preferite in pratica poiché la crescita del maschio è migliore che nella femmina. In piscicoltura, in Israele e nell'Asia sudoccidentale, femmine di *Sarotherodon (Oreochromis) niloticus* sono sovente incrociate con maschi di *S. (O.) aureus*.

Trattamenti ormonali.

Il sesso dei pesci può essere cambiato sommini-

strandolo steroidi del sesso, se i pesci sono trattati prima della differenziazione sessuale. Gli steroidi sono dati a salmonidi come *Salmo* nel mangime a cominciare dalla prima assunzione di mangime. Se si somministrano 3 mg di metiltestosterone (MT) per kg di mangime per 70 giorni, la progenie sarà maschile e, se si danno 20 mg di estradiolo per 30 giorni, la progenie sarà femminile (SIMPSON, 1976; JOHNSTONE & C., 1978). Negli *Oncorhynchus*, che si differenziano sessualmente prima che i *Salmo*, il trattamento inizia prima della prima assunzione di cibo e ciò è fatto come bagno durante il riassorbimento del sacco vitellino (DONALDSON & HUNTER, 1982). Gli steroidi dati alla carpa bruna fanno cambiare sesso (NAGY & C., 1981). Il sesso può anche essere cambiato nelle tilapie; l'abbondante letteratura in proposito è stata passata in rassegna da GUERRERO (1979, 1981). In Israele, le linee maschili di tilapie sono attualmente prodotte su scala commerciale di piscicoltura (ROTBARD, informazione personale).

Sebbene limitato, questo metodo di mettere in commercio pesci che hanno ricevuto un trattamento con steroidi, lascia residui nel prodotto. La messa in commercio di tale prodotto è illegale in alcuni paesi ed il consumatore può rifiutarsi di mangiarlo. È stato pertanto necessario trovare metodi di commercializzazione che non dipendessero direttamente da trattamenti ormonali. Nelle trote iridee dove le femmine sono omogame, BYE & LINCOLN (1981) hanno sviluppato un sistema per produrre linee femminili col far cambiare sesso ai maschi (tutti i pesci trattati con MT) e poi identificando le femmine genetiche con l'assenza del vaso deferente. Lo sperma X, raccolto dopo autopsia, è mescolato con uova normali onde ottenere solamente progenie femminile (Fig. 1); gran numero di pesci dev'essere trattato ed ucciso ma una femmina XX può essere stabilita da cui maschi XX sono ottenuti con lo stesso trattamento ormonale mascolinizante (Fig. 1).

DONALDSON & HUNTER (1982) hanno identificato il genotipo della progenie di *Oncorhynchus* dopo il trattamento mascolinizante, con criteri più precisi che l'assenza del vaso deferens nei maschi XX e poi hanno realizzato test di progenie. Quindi, il solo sperma maschile XX è stato conservato e congelato. Un altro metodo proposto da CHEVASSUS & C. (1975 a) consiste nell'ottenere direttamente embrioni diploidi ginogenetici XX (Fig. 2).

Ginogenesi diploide.

Le linee monosessuali femminili, come *Poecilia formosa* e *Garassius gibelio*, sono ritrovabili in natura. La ginogenesi è stata indotta sperimentalmente in diverse specie ittiche. Per attivare l'uovo, il ricercatore può usare sia uno spermatozoo specifico, inattivato con UV, X o gamma-raggi, ma sempre mobile, oppure uno spermatozoo la cui dimensione del capo corrisponde al diametro del micropilo. Lo shock al calore (CHOURROUT, 1980) o quello al freddo (LIN-