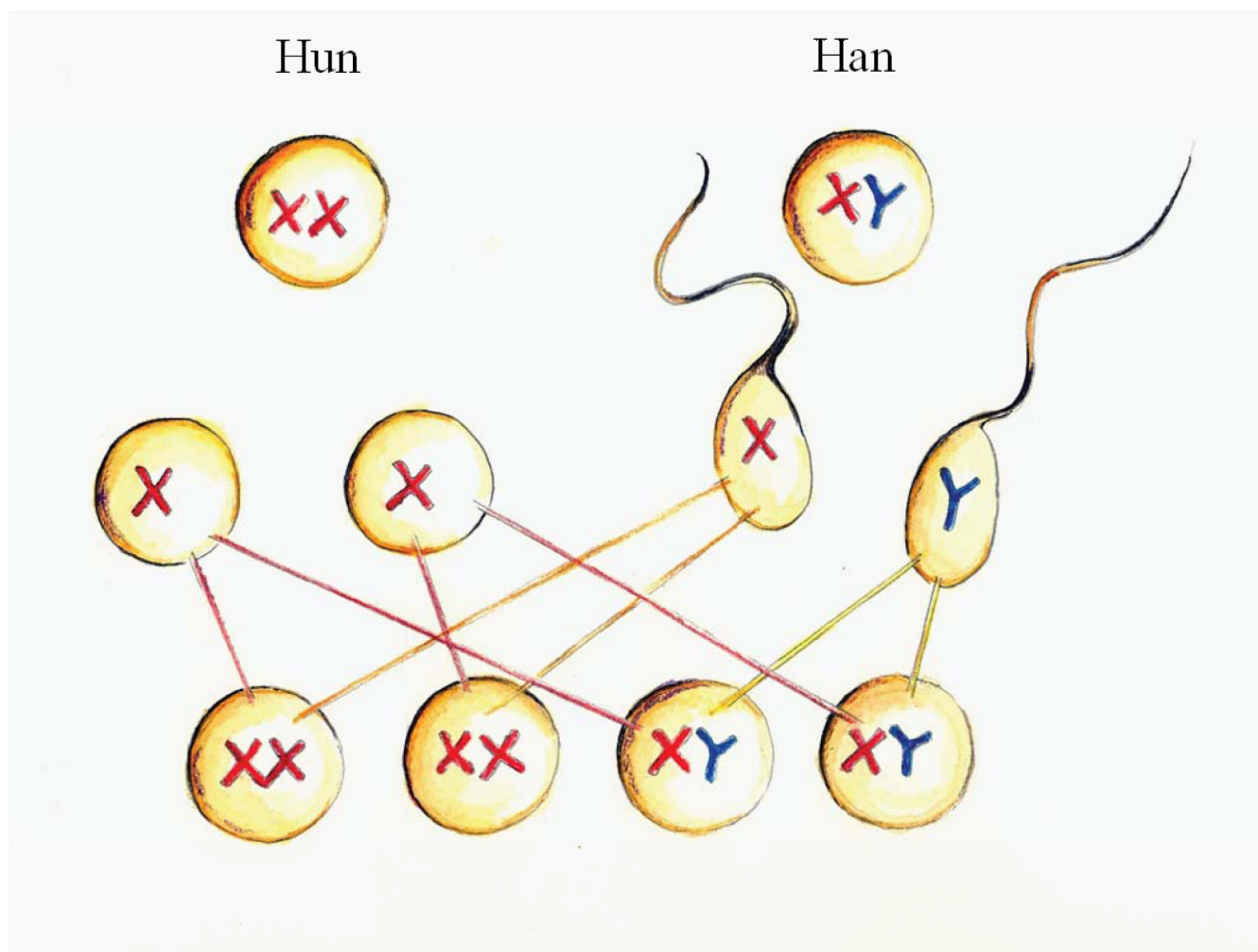


# Oppdrett av steril fisk

av

Tom Hansen, Cecilie Mejdell<sup>1</sup>, Terje Svåsand, Arve Osland,  
Øivind Bergh og Geir Lasse Taranger

Havforskningsinstituttet og<sup>1</sup> Veterinærinstituttet





## Innholdsfortegnelse

Forord

Sammendrag

1. Hvorfor produsere steril fisk? .....	5
2. Kunnskapsstatus om metoder for sterilisering av norske oppdrettsarter.....	6
2.1 Produksjon av hybrider.....	6
2.2 Produksjon av triploider .....	7
2.2.1 Laksefisk .....	8
2.2.2 Kveite .....	10
2.2.3 Torsk.....	10
2.3 Produksjon av all-female fisk .....	10
2.4 Genteknologiske metoder for produksjon av steril fisk.....	12
2.5 Konklusjon over metoder .....	13
3. Konsekvensen av det å være triploid.....	14
3.1 Vekst, kjønnsmodning og dødelighet .....	14
3.2 Triploid fisk og kvalitet .....	18
3.3 Hematologi .....	19
3.4 Hjertefunksjon, respirasjon og fysisk ytelse.....	20
3.5 Immunologi og sykdomstoleranse .....	21
3.6 Produksjonslidelser.....	22
3.7 Stress, stresstoleranse, toleranse for sub-optimalt miljø.....	23
3.8 Sansorganer og adferd og læring .....	24
3.9 Ploiditet – familie interaksjon.....	25
4. Rømming av triploid fisk .....	26
5. Bruk av triploider og genetiske interaksjoner .....	28
6. Kommersiell produksjon av steril fisk .....	29
7. Etske aspekter ved produksjon av steril fisk .....	30
7.1 Oppdrettsfisken.....	30
7.2 Fiskeoppdretteren .....	31
7.3 Konsumenten .....	31
7.4 Villfisk og økosystemet .....	32
7.5 Sportsfiskere og grunneiere .....	32
7.6 Konklusjon etikk.....	33
8. Forskningsbehov .....	34

## Forord

Denne rapporten er skrevet på oppdrag fra fiskeridirektoratet og er basert på tilgjengelige vitenskapelige publikasjoner og rapporter. En av disse er rapporten "Minimising the Interaction of Cultured and wild fish: A Comprehensive Evaluation of the Use of Sterile, Triploid, Atlantic Salmon – Final Report". Dette er sluttrapporten fra EU prosjektet AIR – CT94 – 2216 som Havforskningsinstituttet gjennomførte i perioden 1994-1998. I dette prosjektet deltok også Marine Laboratory i Aberdeen Scotland, National University of Ireland Galway og University of St' Andrews Scotland. I arbeidet har vi prøvd å bruke så relevante publikasjoner som mulig. Vi har derfor konsentrert oss om laksefisk og referanser til andre arter er kun blitt brukt hvor det ikke fantes tilsvarende studier på laksefisk.

## Sammendrag

I andre land og andre arter er det vanlig å bruke triploidisering og/eller oppdrett av monosexbesetninger (f.eks all female). I noen andre arter er det dessuten vanlig å bruke sterile hybrider til ulike typer formål. Triploid fisk har et kromosomsett mer enn det som er normalt (diploid) for arten, og er steril. For mange arter av fisk (også laksefisk) er det utviklet enkle metoder for å lage triploider. Siden triploid fisk er steril har organisasjoner som NASCO, FAO og ICES foreslått at oppdrettsnæringen i større grad burde bruke dem for å begrense den genetiske påvirkningen fra rømt fisk.

*Det er publisert en mengde arbeider på teknikker for å produsere triploid fisk og hvilke effekter dette gir på viktige fysiologiske parametre og rene produksjonsparametre. Det er også publisert noen arbeider som summerer opp erfaringer fra oppdrett av triploid fisk i kommersielt oppdrett i Skottland, Irland, Canada og Tasmania.*

Erfaringen tilsier imidlertid at selv om triploid laks kan gjøre det like bra som vanlig laks under optimale forhold, blir produksjonsresultatet dårligere i praktisk oppdrett. Totalt sett viser denne forskningen at triploid laks har høyere dødelighet gjennom hele livssyklusen, den vokser dårligere og har også lavere toleranse for stress og ugunstige miljøforhold. Resultatene fra studier på slaktekvalitet er noe motstridende, men en vet at triploid laks har færre, men større muskelfibre og mer filetspalting og lavere filetfasthet (de er bløtere) enn vanlig (diploid) laks. Det er også rapportert at triploid laks er mer utsatt for deformasjoner og katarakt.

Forskningen som er gjort på dette er enten imidlertid fra noen år tilbake (utført ved AKVAFORSK og Havforskningsinstituttet), eller er utført under forhold som ikke er representative for dagens oppdrettsnæring. Det er også åpenbart at de publiserte arbeidene er av varierende kvalitet og konklusjonene trekkes ofte på åpenbart sviktende grunnlag.

Ved en kritisk gjennomgang av litteraturen viser finner vi å kunne konkludere med at triploid laksefisk har høyere dødelighet gjennom hele livssyklus, men at den store forskjellen finnes på eggstadiet. Det kan se ut som at det er en tendens til at triploid laksefisk vokser noe dårligere enn diploid fisk, men datagrunnlaget er usikkert. Hovedproblemet for den triploide laksen er at den ser ut til å være mer sårbar ved et dårlig oppdrettsmiljø. Forsøk på Havforskningsinstituttet på 1990-tallet viste at den triploide laksen vokste like godt, hadde like god slaktekvalitet samt lav dødelighet og lav forekomst av feilutvikling når den ble holdt under gode miljøbetingelser i sjøvannskar. Derimot fikk den større problemer når den ble holdt i konvensjonelle merder med et mer variabelt oppdrettsmiljø. Dette samsvarer godt med de publiserte arbeidene som viser at triploid fisk har en lavere toleranse for ugunstige miljøforhold. Vi mener imidlertid at det med bakgrunn i dette litteraturstudiet er problematisk

å entydig anbefale bruk, eller ikke bruk av steril fisk i oppdrett. Både torsk og laks vil det derfor være behov for en grundig vitenskapelig dokumentasjon på hvordan triploider klarer seg under de produksjonsforholdene som er vanlige i kommersielt oppdrett i dag. Vi mener derfor at det er behov for en nærmere kartlegging av fiskevelferd hos triploid laks under ulike miljøforhold, og at en søker å finne ut om det er realistisk å sikre et godt nok oppdrettsmiljø for den triploide laksen i oppdrett. En må også vurdere om en eventuelt økt risiko for redusert fiskevelferd hos triploid laks er akseptabel i forhold til gevinsten ved å sikre villaksen mot negative effekter av oppdrettsfisk.

Et tilleggsmoment her er at bruk av triploid steril laks også kan ha positive effekter på fiskevelferd. Ved bruk av rene hunnfiskpopulasjoner av triploid laks unngår en de negative effektene som kjønnsmodning har på vekst, kvalitet, evne til å regulere vann og saltbalanse i sjøvann og overlevelse. Kjønnsmoden laks som holdes i sjøvann gjennom vinteren vil ha store problemer med å overleve, både på grunn av lav evne til å regulere vann og saltbalanse i sjøvann og på grunn av sterkt reduserte kroppsreserver. Bruk av triploid laks kan dermed ha både negative og positive effekter på fiskevelferd. Før en kan konkludere med om det er forsvarlig å anbefale eller påby bruk av triploid laks i oppdrett, vil det derfor være behov for en grundig vitenskapelig dokumentasjon av hvordan triploid laks klarer seg under de produksjonsforholdene som er vanlige i kommersielt oppdrett i dag.

Etisk sett taler derfor noen hensyn klart for å produsere steril oppdrettsfisk (naturforvaltning og sportsfiskere) og andre imot (hensynet til oppdrettsfiskens velferd), mens andre hensyn trekker i begge retninger (forbrukere, fiskeoppdrettere). Imidlertid mangler viktige deler av kunnskapsgrunnlaget som kunne belyst konsekvensene for dyrevelferden. Slike opplysninger er av helt vesentlig betydning i en etisk vurdering. Dette gjelder først og fremst velferdskonsekvenser for steril fisk under praktisk oppdrett og under transport og slakt. Dersom steril fisk kan produseres uten negative implikasjoner for fiskens velferd, er tungtveiende dyreetiske hensyn ivaretatt. Imidlertid gjenstår hensynet til dyrs integritet. Neste trinn vil da være å kartlegge eventuelle konsumentreaksjoner på ”å tukle med naturen” opp mot de positive konsekvenser steril oppdrettsfisk vil ha for bevaring av villfiskpopulasjonene.

## 1. Hvorfor produsere steril fisk?

Ideen om å produsere steril fisk er gammel og har sitt opphav i ønsket om å unngå tidlig kjønnsmodning. I oppdrett av laks og regnbueørret har uønsket tidlig kjønnsmodning og den effekten dette har på vekst, overlevelse og nedklassing på grunn av redusert kvalitet (filetfarge, fettinnhold og sekundære kjønnskarakterer) alltid vært et av de alvorligste problemene. I oppdrett av regnbueørret i ferskvann får en dessuten kraftige soppinfeksjoner som gir økt dødelighet og redusert velferd. I tillegg må problemet med laks som kjønnsmodnes i sjøvann sannsynligvis regnes som et av næringens mest betydelige velferdsproblemer i dag.

Hos torsk er kanskje problemet med tidlig kjønnsmodning enda større og også her finner vi et betydelig velferdsproblem hos huntorsk som ikke klarer å slippe eggene, og også hos kveite er tidlig kjønnsmodning hos hannene ødeleggende for produksjonsresultatet.

I Norge har problemene omkring tidlig kjønnsmodning hos laks blitt løst ved hjelp av avlsarbeid/seleksjon av fisk med høy alder ved kjønnsmodning og bruk av lys (Hansen et al., 1992; Endal *et al.*, 2000). Utvalg for sen modning har imidlertid i de seneste årene fått mindre fokus fordi flere parametre går inn i avlsmodellen og fordi det er en negativ korrelasjon mellom sen modning og vekst (Kause *et al.*, 2003) og bruk av lys er i dag den viktigste metoden for å kontrollere problemet med tidlig kjønnsmodning. På torsk er avlsarbeidet kommet mye kortere og også her er lysstyring den mest aktuelle metoden for å redusere tidlig uønsket kjønnsmodning.

*I dag har bruken av steril fisk fått ny relevans fordi bruk av steril laks i oppdrett kan være en gunstig metode for å redusere den genetiske påvirkning rømt oppdrettslaks har på villaks (Pifferrer et al., 2006). Teknikken kan også bli aktuell i oppdrett av torsk, som kan rømme eller gyte i merdene.*

Endal., H.P., Taranger, G.L., Stefansson, S.O., Hansen, T. (2000). Effects of continuous light on growth and sexual maturity in Atlantic salmon, *Salmo salar*, reared in sea cages. *Aquaculture* 191: 337-349.

Hansen, T., Stefansson, S.O., Taranger, G.L. (1992). Growth and sexual maturation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reared in sea cages at two different light regimes. *Aq. Fish. Man.* 23: 275-280.

Kause A., Ritola, Paananen T., Mäntysaari E. and Eskelinen U. (2003). Selection against early maturity in large rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the quantitative genetics of sexual dimorphism and genotype-by-environment interactions *Aquaculture*, 228: 53-68.

Pifferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.-C. and Colombo, L., (2006). I. Performance improvements by polyploidization in aquaculture. In: "Performance improvements by polyploidisation, gene transfer and DNA vaccination in aquaculture". Colombo, L., Crosetti, D. and Svaasand T. (eds). GENIMPACT project: Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations. A European network. WPI workshop "Genetics of domestication, breeding and enhancement of performance of fish and shellfish", Viterbo, Italy, 12-17<sup>th</sup> June, 2006, 5 p. <http://genimpact.imr.no/>

## 2. Kunnskapsstatus om metoder for sterilisering av norske oppdrettsarter

Med dagens kunnskap kan vi i dag lage steril oppdrettsfisk enten ved å krysse arter (artshybrider), eller ved å produsere triploider.

### 2.1 Produksjon av hybrider

De fleste arter av laksefisk lar seg krysse med hverandre. Det er to hovedgrunner til at oppdrett av hybrider kan være interessant. Den ene er at hybridene som regel er sterile og den andre er at hybrider av og til vokser bedre enn de opprinnelige artene. Dette er et forhold som gjerne beskrives som 'hybrid vigour'.

Naturlig forekommende yngel etter krysning mellom laks og ørret (*S. trutta* L.) er blitt identifisert flere ganger (Verspoor, 1988; Garcia de Leaniz og Verspoor, 1989). Krysningene er vanligvis et resultat av gyting mellom ørrethunner og laksehanner. Også voksne individer er blitt identifisert. Youngson, Knox og Johnstone (1992) identifiserte en 3 kg's laks fra River Don (Aberdeen) til å være en hybrid mellom hunlaks og ørrethan.

**Tabell 1:** Gjennomsnittlig overlevelse (øyerogn/klekking/swim-up) og andelen triploide [0/0] i krysninger innen og mellom arter av 'norske' laksefisk. De øvre to rekkene for hver art er fra en krysning hvor gruppen er varmebehandlet for å gi triploider. De nedre to rekkene er fra en vanlig kontrollkrysning. Tabellen er hentet fra Gray, Evans og Thorgaard (1993) og modifisert. Krysninger mellom arter er merket med gult.

Hun	Han		
	Laks	Ørret	Regnbueørret
Laks	50/31/20	34/22/15	5/0/0
	[8/15]	[6/15]	[-/-]
	67/45/17	66/56/47	0/0/0
Ørret	66/4/0	68/49/37	32/0/0
	[-/-]	[14/14]	[-/-]
	81/48/7	98/83/66	0/0/0
Regnbueørret	53/6/0.3	64/29/18	76/60/52
	[5/5]	[5/5]	[15/15]
	36/1/0	45/6/0.5	82/75/66

Fra dataene i Tabell 1. vil det fremgå at det er mulig å gjøre betydelige optimaliseringer av disse hybridkrysningene. F.eks er det meget lav overlevelse selv der hvor laks krysses med laks (17%), ørret krysses med ørret (66%) og regnbueørret krysses med regnbueørret (66%). Dernest er det brukt temperatursjokk for å gi triploider. Dette er bare delvis vellykket (8 av 15 laks) eller gir betydelig reduksjon i overlevelse (ned fra 66 til 37 % i ørret). Forsøket burde kanskje vært gjentatt under forhold hvor en optimaliserer rognoverlevelse og bruker trykkbehandling for å produsere triploider. For øvrig ser krysningene mellom hunlaks og ørrethan og mellom regnbueørret hun og ørret han ut til å være lovende kandidater.

**Tabell 2:** Overlevelse og vekst hos hybrider mellom ulike norske laksefisk. Dataene er hentet fra Refstie og Gjedrem (1975) og Refstie (1983). Krysningforsøket inkluderte også regnbueørret, men disse krysningene gav ikke overlevelse. \* Det er ikke mulig å beregne den totale overlevelsen fra disse dataene fordi overlevelsen mellom klekking og startforing er ikke oppgitt.

Hybrid eller art		Overlevelse*				Vekt (g)		
♀	♂	Øyerogn	Klekking	Startforing til 8 mnd	I sjøvann	11 mnd	Smolt	Slakt
Laks	Laks	60	58	51.1	62.2	30.0	32	4170
Ørret	Ørret	97	96	7.3	44.3	41.8	51	1930
Sjøørret	Sjøørrett	81	81	89.9	42.9	31.8	45	1340
Røye	Røye	92	89	83.2	8.1	55.2	63	1270
Røye	Sjøørret	59	48	95.8	40.5	58.3	95	1500
Røye	Laks	86	59	79	55.6	70.7	104	2380
Laks	Røye	65	29	74	36.4	96.5	116	3940
Laks	Ørret	73	72	55	48.4	7.7	32	2260
Ørret	Røye	77	58	72.8	29.7	58.2	116	1530
Røye	Ørret	55	25	92	46.0	73.3	90	2070
Ørret	Sjøørret	96	96	87.6	39.8	24.9	43	1270
Laks	Sjøørret	95	95	39.4		6.1		
Sjøørret	Laks	93	93	66		8.8		
Ørret	Laks	69	67	34.4		7.3		

Dataene fra dette norske forsøket viser mye høyere overlevelse, men også her er overlevelsen på f.eks laksen og veksten dårligere enn det en ville forvente under dagens forhold. Hybrider vil også avvike mye i utseende fra de opprinnelige artene.

En kjenner også til at noen av dem kan bli kjønnsmodne og igjen befrukte egg fra andre laksefisk. Hybrider har derfor foreløpig ingen praktisk betydning i norsk oppdrett.

Deleaniz CG., Verspoor, E. 1989. Natural hybridization between Atlantic salmon, *Salmo salar*, and brown trout, *Salmo trutta*, in Northern Spain. J. Fish Biol. 34: 41-46.

Gray, AK., Evans, MA., Thorgaard GH. 1993. Viability and development of diploid and triploid salmonid hybrids. Aquaculture, 112: 125-142.

Verspoor, E. 1988. Widespread hybridization between native Atlantic salmon, *Salmo salar*, and introduced brown trout, *Salmo trutta*, in Eastern Newfoundland. J. Fish Biol. 32 : 327-334.

Youngson AF., Knox, D., Johnstone, R. 1992. Wild adult hybrids of *Salmo salar* L. and *Salmo trutta* L. J. Fish Biol. 40: 817-820.

Refstie, T. 1983. Hybrids between salmonid species – growth-rate and survival in seawater. Aquaculture 33: 281-285.

Refstie, T., Gjedrem, T. 1975. Hybrids between salmonidae species – Hatchability and growth-rate in freshwater period. Aquaculture 6: 333-342.

## 2.2 Produksjon av triploider

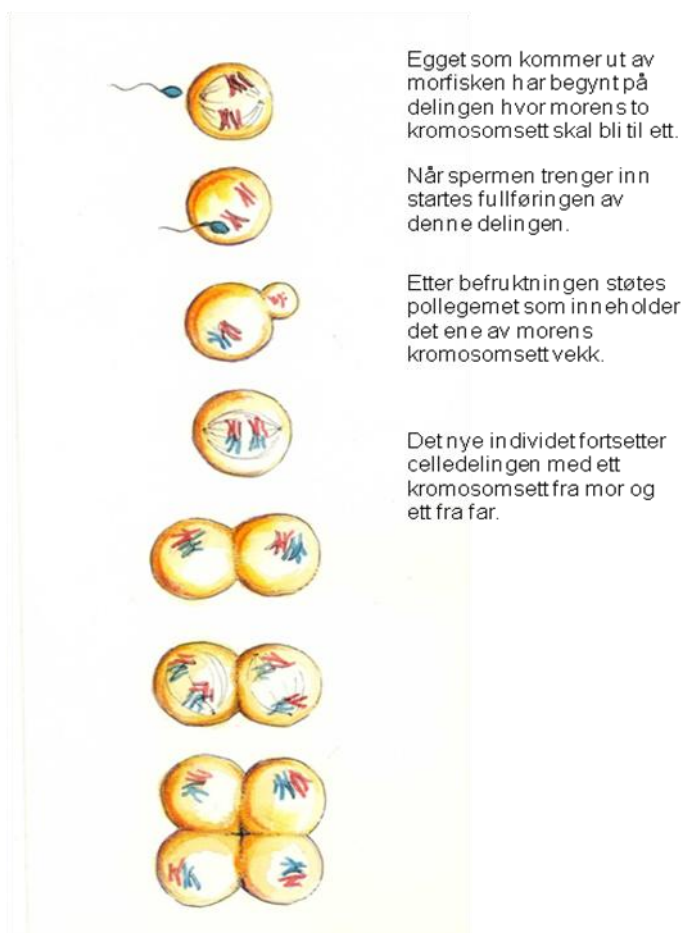
De fleste artene som oppdrettes i verden i dag kan gjøres triploide ved hjelp av temperatursjokk (kulde eller varme). Hos arter med store egg (som f.eks. laks) har det imidlertid vist seg at andelen triploide etter varmebehandling kan variere mye, og varmesjokk gir ofte høy dødelighet på eggene. I praktisk oppdrett lages det ofte rene hunnlige bestander av triploider (se eget kapittel). Dette gjøres fordi hannene går gjennom kjønnsmodning selv om de er sterile. Hannene danner mao melke, men denne er ikke funksjonell. En triploid hun er steril og gjennomgår ikke de endringene som en normalt ser hos kjønnsmodnende fisk.



### 2.2.1 Laksefisk

Den beste og vanligste metoden for å gjøre laksefisk triploide er ved hjelp av høyt trykk på nybefruktede egg (Johnstone et al., 1991). Et tilleggssett med kromosomer som er til stede i egget ved befruktningen, og som vanligvis frastøtes kort etter befruktningen, forhindres fra å bli frastøtt av trykkbehandlingen og inkorporeres i embryoet (Figur 1 og 2). Triploider har derfor tre sett kromosomer i stedet for to. De prosessene som vanligvis skjer med kromosomene etter befruktning er avhengige av et funksjonelt spindelapparat. Det høye trykket fører til en spesifikk og midlertidig oppløsning av spindelen og gjør at de normale prosessene stopper opp. Når trykket senkes igjen, vil de påfølgende celledelingene forløpe normalt fordi spindelapparatet er reetablert og igjen fungerer ved den første normale celledelingen i det nydannede embryoet.

Rent praktisk skjer trykkbehandlingen ved at lakseeggene utsettes for 9500 psi (ca. 650 atmosfærer) i fem minutter, en halv time etter befruktning ved 10°C. For å få et stabilt og godt resultat er det viktig at en er nøyaktig med tidene og temperaturen. I dag blir alle egg som brukes i oppdrett desinfisert, og det er derfor viktig at alle væsker som brukes i prosessen holder 10°C. Det er også viktig at en arbeider med store volum av 10 graders vann slik at ikke temperaturen synker når eggene tilføres. Tilsvarende protokoller er også utarbeidet for regnbueørret og kveite.



Figur 1: Normal befruktning og celledeling fram til firecellestadiet.



Figur 2: Produksjon av triploider. Trykkbehandlingen skjer 30 min etter befruktning.

Triploider er funksjonelt sterile fordi de ikke kan produsere balanserte sett kromosomer i celledelingen hvor foreldrefiskens tre kromosompar skal fordeles på kjønnscellene under reduksjonsdelingen. Det ekstra settet kromosomer fører sannsynligvis til mekaniske problemer når de kromosomene som er bærere av de samme arveegenskapene (homologe kromosomer) skal pares ved celledeling (Benfey 1999).

Triploidisering er bredt akseptert som den mest effektive metoden for å sterilisere fisk for akvakultur (Benfey, 1999; Tave, 1993). Metoden er blitt brukt både på regnbueørret og Atlanterhavslaks. Metodene som blir brukt er enkle å lære og krever kun forholdsvis rimelige og enkle investeringer. Det er også relativt lett å teste resultatet av prosessen. For å undersøke om et dyr er triploid trengs bare en liten blodprøve der en kan sjekke enten størrelsen på kjernene i blodcellene eller måle mengden arvestoff per celle.

Benfey, TJ. 1999. The physiology and behaviour of triploid fishes. *Reviews in Fisheries Science* 7: 39-67.

Johnstone, R., McLay, HA., Walsingham, MV. 1991. Production and performance of triploid Atlantic salmon in Scotland. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1789: 15-36.

Tave, D. 1993. Growth of triploid and diploid bighead carp. *Hypophthalmichthys nobilis*. *J. Appl. Aquacult.* 2(2): 13-25.

### 2.2.2 Kveite

I kveite har en induisert triploidi både ved varmesjokk og kuldesjokk og ved høyt trykk. Holmefjord og Refstie (1997) fant at varmesjokk gav en høy andel triploider (gjennomsnittlig 84% etter 15-30 min ved 24 °C, men overlevelsen var lav (mellom 10 og 20%). Kuldesjokk gav et betydelig bedre resultat med 95% triploider etter 3 timer ved -1 °C og med over 50% overlevelse. I en større eggruppe ble det oppnådd 95% triploider etter 2 timer ved -1 °C. Denne gruppen viste normal utvikling gjennom hele plommesekkfasen..

Tvedt et al. (2006) brukte høyt trykk for å produsere triploider av kveite. Eggene ble utsatt for høyt trykk (8500 psi) i fem minutter og trykkbehandlingen ble startet henholdsvis 5, 15 og 25 minutter etter befruktning. Trykkbehandlingen påvirket ikke befruktningsprosenten. De tre behandlingene gav gjennomsnittlig 98% triploider og det var ikke signifikant forskjell mellom behandlingene. Overlevelse fram til 41 døgngader var ikke signifikant forskjellig mellom behandlingene (kontroll 48±9%, 5 min 31±13%, 15 min 47±14% og 25 min 31±10%). Det ble ikke observert morfologiske forskjeller mellom diploide og triploide individer. I dette arbeidet ble det også påvist at hunnen er det homogametiske kjønn hos kveite. Dette betyr at hunnen er bærer av de to X-kromosomene og at det er mulig å produsere all-female kveite ved å behandle kveiteegg med metyltestosteron og bruke melke fra disse individene til å befrukte normale kveiteegg (se kapittel om laks).

Holmefjord I, Refstie T. 1997. Induction of triploidy in Atlantic halibut by temperature shocks. *Aquaculture International* 5: 169-173.

Tvedt, HB., Benfey, TJ., Martin-Robichaud, DJ., McGowan, C., Reith, M. 2006. Gynogenesis and sex determination in Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) *Aquaculture* 252: 573– 583.

### 2.2.3 Torsk

I en publikasjon som er under trykking i tidsskriftet *Aquaculture Research* (Peruzzi et al., 2007) har man kommet fram til at den mest effektive metoden for å produsere triploid torsk ved hjelp av temperatursjokk er å gi dem 20 °C i 20 minutter og begynne 20 minutter etter befruktning. Eggene ble holdt på 6 °C før og etter temperatursjokket. Denne behandlingen ga i gjennomsnitt 87% triploider og en overlevelse som var 10-20% lavere enn i kontrollgruppen. Kuldesjokk var ikke en egnet metode for å produsere triploider av torsk. Vi vet foreløpig ikke om hunnen er det homogametiske (bærer av de to X-kromosomene) i torsk, men pågående forskning vil avklare dette i løpet av året.

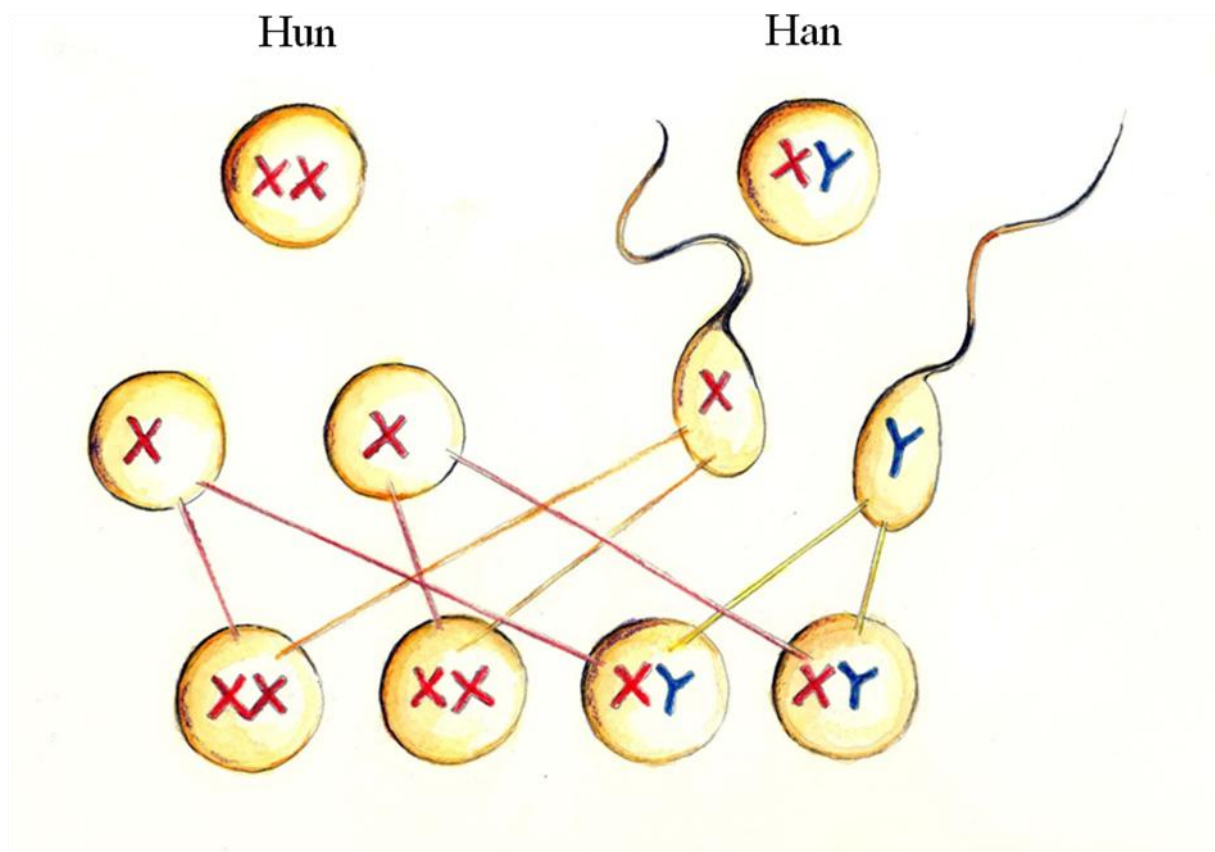
Peruzzi, S., Kettunen, A., Primicerio, R., Kauric, G. 2007. Thermal shock induction of triploidy in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Res.* (in press)

## 2.3 Produksjon av all-female fisk

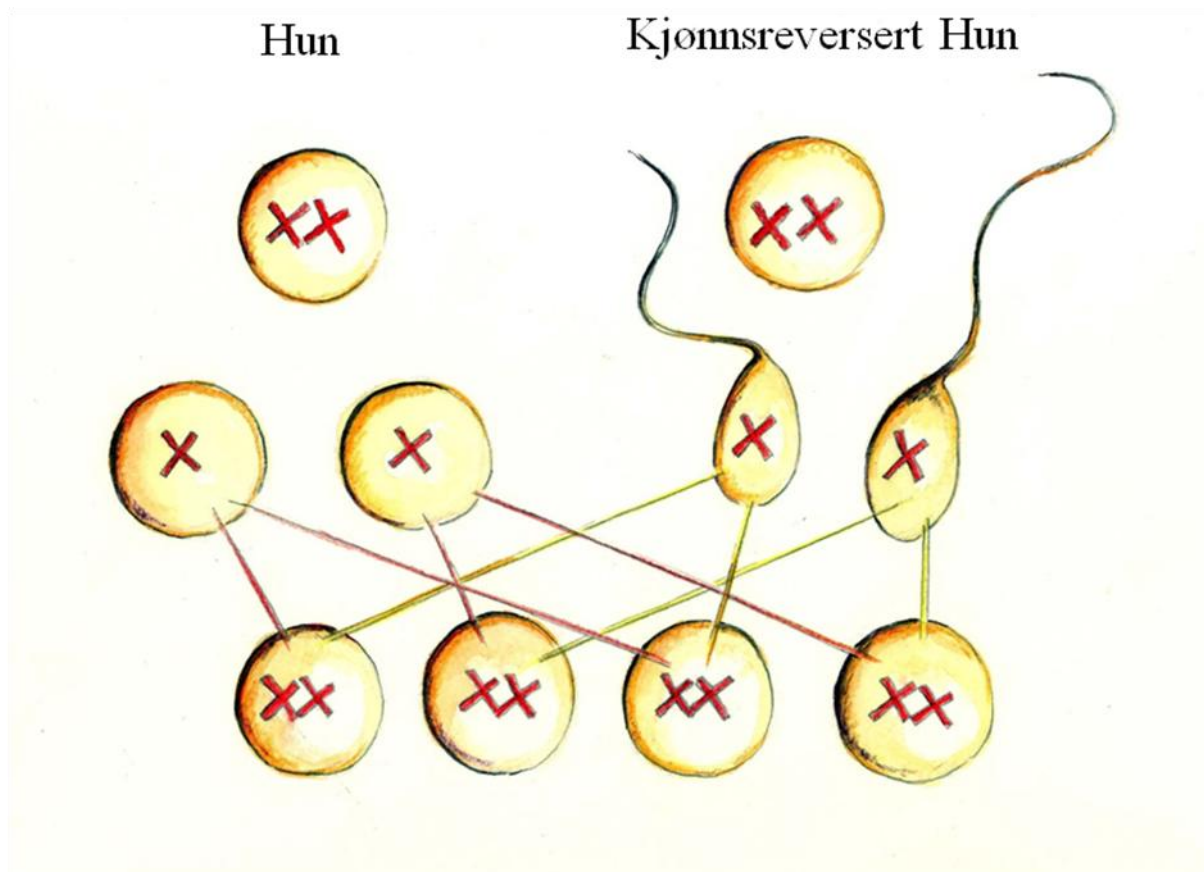
I alle fiskearter som har et XY (Figur 3) system for kjønnkromosomer kan en lett produsere all-female bestander. Hos laks bestemmes kjønn ca 700-800 døgngader etter befruktning. Hvis yngelen gis fôr tilsatt 17  $\alpha$ -metyltestosterone i femti døgngader i denne perioden vil mesteparten av de genetiske hunnene (med XX kromosomer) begynner å danne hanlige gonader (Figur 4). Anbefaling om dose varierer mellom ulike studier. Johnstone et al., (1978) brukte 3 mg 17 $\alpha$  MT/kg for, mens Wilkins et al. (2001) benyttet 15mg/kg fôr. Etter hormonbehandling holdes fisken så i oppdrett til den begynner å gå inn i kjønnsmodning. Ved kjønnsmodning sorteres de modne hannene ut. De hannene som har rennende melke fjernes fordi dette er de opprinnelige (genetiske) hannene. De kjønnsreverserte hunnene ser ut som

modne hanner, men har ikke utførselsåpning for melke. Denne fisken blir tatt livet av og bukhulen blir åpnet. De kjønnsreverserte hunnene identifiseres ved at de har modne testis uten utførselsåpning og små gonader med tilbakedannede egg på toppen av de modne hanlige gonadene. De modne hanlige gonadene kuttes opp og melken samles opp for bruk til befruktning av egg fra normale hunner.

Som et alternativ kan kjønnsreverseringen av hannene skje ved at yngelen bades i  $17\alpha$  MT. Johnstone og Maclachlan (1994) optimaliserte denne protokollen og fant at det beste resultatet ble oppnådd når yngelen ble badet i  $400\mu\text{g/liter}$   $17\alpha$  MT i to timer ved 750, 800 og 850 døgngader etter befruktning.



Figur 3: Hos laksefisk bestemmes kjønnet ved et XY kromosom system. Hunnene har to X kromosomer og alle eggene fra en normal hun er derfor bærere av X kromosomer. Hannen har X og Y kromosomer og når spermene dannes er halvparten bærere av X kromosomer og halvparten bærere av Y kromosomer. De eggene som blir befruktet med spermier med Y kromosomer gir dermed opphav til hanner, mens de som blir befruktet med spermier med X kromosomer gir opphav til hunner.



Figur 4: Når en bruker enn kjønnsreversert hun (en genetisk hun som har dannet spermier på grunn av hormonbehandling), blir alt avkommet hunner.

- Johnstone, R., Simpson, TH., Youngson, AF. 1978. Sex reversal in salmonid culture *Aquaculture* 13: 115-134.  
 Johnstone, R., Maclachlan, PM. 1994. Further observations on the sex inversion of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using  $17\alpha$  methyl testosterone. *Aquaculture and Fisheries Management* 25: 855-859.  
 Wilkins, NP., Cotter, D., O'Maoiléidigh, N. 2001. Ocean migration and recaptures of tagged, triploid, mixed-sex and all-female Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) released from rivers in Ireland. *Genetica* 111: 197-212.

## 2.4 Genteknologiske metoder for produksjon av steril fisk.

*I tillegg til de to forannevnte metodene er det foreslått at fisk kan steriliseres ved hjelp av vaksiner og ulike genteknologiske metoder. Vi vil her nevne tre potensielle metoder basert på genteknologi.*

Uzbekova et al. (2000) hadde som mål å introdusere og få uttrykt gener i fisk som kunne hemme produksjonen av gonadotropin releasing hormon (GnRH). Tanken var at arvelig sterilitet kunne bli introdusert i produksjonsfisken, men at en allikevel kunne få stamfisken til å kjønnsmodne ved å tilføre hormoner. Hemming av GnRH produksjonen ble forsøkt utført ved å introdusere et gen som koder for antisense GnRH, som i prinsippet vil binde til sense GnRH mRNA, og dermed inaktivere dette og hemme produksjonen av GnRH. Forsøksresultatene viste at antisense GnRH mRNA ble uttrykt, med en observerbar senkning av GnRH nivået i hjerne og hypofyse. Denne senkningen var imidlertid liten og indusering av sterilitet i den transgene regnbueørreten ble ikke observert (Uzbekova et al., 2000). Ideen er imidlertid svært interessant og med en mer effektiv hemming av GnRH produksjonen kan kanskje denne tilnærmingen føre frem til målet, en steril fisk med mulighet til å indusere fertilitet.

En annen tilnærming tar utgangspunkt i at hos mus av én stamme, vil inaktivering av et spesielt gen (*dnd*) forårsake eliminering av kjønnsstamcellene, slik at musene blir sterile (Saito et al., 2006). I en annen musestamme vil imidlertid inaktivering av *dnd* indusere tumor. Hvordan en slik inaktivering av *dnd* i fisk (laks og torsk) vil komme til uttrykk, er derfor uklart. Forskere (bl.a. på Havforskningsinstituttet) har imidlertid satt seg som mål prøve å finne ut av dette ved å måle genekspresjon ved hjelp av mikroarray, som er tilgjengelig både for laks og torsk. Parallell histologiske undersøkelser av gonader og hormonprofilering er også planlagt utført. Det er håp om at mer grunnleggende kunnskap om effekten av inaktivering av *dnd* i fisk, kan lede til protokoller for indusering av sterilitet.

En tredje mulighet ligger i å injisere små mengder av spesifikke mRNA inn i nylig befruktete egg. Dersom disse mRNA konstrueres på en spesiell måte, vil de bli ledet til kjønnsstamcellene, og dersom de i tillegg inneholder et toksin-gen, vil kjønnsstamcellene dø. Når dette ble gjort på zebrafisk ble imidlertid også vevet omkring disse cellene også påvirket slik at forsøksfisken ikke var levedyktig. Problemet ble løst ved at det samtidig ble injisert mRNA med et antitoksin-gen, som ble fordelt jevnt i embryoet og produserte nok motgift mot toksinet, slik at bare kjønnsstamcellene døde. En blanding av de to mRNA (1 pg av hver), injisert i befruktete egg, forårsaket sterilitet hos 76 % av individene, som utviklet seg til levedyktige, sterile hanner (Slanchev et al., 2005). Interessant i denne sammenheng er at man har observert at slike spesielle mRNA konstrukt blir ledet til kjønnsstamcellene i en rekke andre fiskearter (Saito et al., 2006).

Det gjenstår fremdeles mye forskning og utvikling før disse metodene eventuelt kan anvendes i praksis til å produsere steril fisk til oppdrettsnæringen, men det virker sannsynlig at genteknologiske metoder i fremtiden vil kunne bidra til å nå dette målet.

Uzbekova S, Chyb J, Ferrière F, Bailhache T, Prunet P, Alestrom P and Breton B. (2000) Transgenic rainbow trout expressed sGnRH-antisense RNA under the control of sGnRH promoter of Atlantic salmon. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 337-350.

Slanchev K, Stebler J, de la Cueva-Mendes G and Raz E. (2005) Development without germ cells: The role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 4074-4079.

Saito T, Fujimoto T, Maegawa S, Inoue K, Tanaka M, Arai K and Yamaha E. (2006) Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA. *Int. J. Dev. Biol.* 50, 691-700.

## 2.5 Konklusjon over metoder

Med den kunnskapen vi har i dag er det kun bruk av triploider og all-female triploider som er aktuelt i praktisk oppdrett. Hybridene har høy dødelighet og avviker mye i utseende fra de opprinnelige artene. De genteknologiske metodene er fortsatt på idéstadiet og/eller det vil være nødvendig med mange års forskning før disse eventuelt kan brukes i praktisk oppdrett.

### 3. Konsekvensen av det å være triploid

#### 3.1 Vekst, kjønnsmodning og dødelighet

Av de 'norske' oppdrettsartene finnes det kun erfaringsdata på produksjon av triploider fra laks og regnbueørret og dessuten et arbeid som inkluderer vanlig ørret (tabell 3).

I de fleste arbeidene er det kun ubetydelige forskjeller i vekst mellom triploide og diploide bestander (f.eks Cotter et al., 2002; O'Flynn et al., 1997; Bonnet et al., 1999 og dataene etter 16 mnd i sjø for 1997 årsklassen på Havforskningsinstituttet. O'Flynn et al. (1997) finner imidlertid at produksjonen per utsatt fisk er større for diploider fordi disse har lavere dødelighet. Johnstone et al. (1991) sine data er vanskeligere å sammenligne fordi han skiller mellom moden og umoden fisk uten å oppgi modningsandel. Sheehan et al. (1999) finner bedre vekst i AF3N enn AF2N regnbueørret og mye bedre vekst enn i diploider hvor kjønnsmodningsandelen var 'høy', men ikke rapportert. Fra Frankrike er det rapportert at triploid all-female fisk vokser 10 to 15 % langsommere enn diploider (Quillet *et al.*, 1991).

I Havforskningsinstituttet sine forsøk i 1996 vokste den diploide fisken betydelig bedre enn den triploide, noe som sannsynligvis er forårsaket av mye høyere kjønnsmodning. Havforskningsinstituttet sin årsklasse fra 1997 vokste meget dårlig det første året i sjø pga store vaksineskader. I det andre året i sjø vokste imidlertid den diploide fisken mye bedre enn de triploide ( $2N=6.71$  og  $3N=4.52$ ). Ut i fra disse dataene er det imidlertid vanskelig å konkludere med at det er store forskjeller i vekst mellom diploider og triploider. Forsøkene er delvis gjort under forhold som gjør dem lite relevante. Her er det verdt å merke seg at Cotter et al. (2002) har 60-70% dødelighet i sjøvann på grunn av gjelleflagellater, O'Flynn har 30-40% dødelighet bl.a på grunn av lakselus og Havforskningsinstituttet sitt 1997 utsett har store problemer med vaksineskader. Havforskningsinstituttet gjennomførte i samme periode et forsøk innendørs i store (6 m) kar og under meget stabile miljøforhold. I dette arbeidet ble det funnet at triploider (mixed-sex) vokste betydelig bedre enn diploider når de ble holdt under kontinuerlig lys fra den første vinteren i sjø (Oppedal *et al.*, 2003).

Selv om triploid fisk ikke kan produsere funksjonelle kjønnsceller, er hannene hormonelt 'normale' fordi de hormonproduserende cellene i gonaden er upåvirket av triploidiseringen. Selv om de triploide hannene produserer en vandig og ufunksjonell sperm, produserer de tilnærmet normale nivåer av steroidhormoner og gjennomgår de vanlige kroppslige endringene som er knyttet til kjønnsmodningen. Dette betyr at triploide hanner ikke vil ha noe produksjonsmessig fortrinn foran diploide hanner i oppdrett.

Fordi egget er nødvendig for å få en normal utvikling av de hormonproduserende cellene i ovariet, er triploide hunner sterile også hormonelt sett. Siden de triploide hunnenes oocytter (eggemner) ikke kan gå gjennom meiose (kjønnselledeling), kan de ikke utvikle seg til det stadiet hvor de vanligvis blir dekket av de hormonproduserende cellene (theca- og granulocellene). Triploide hunner produserer derfor aldri tilstrekkelige mengder kjønnsormoner og gjennomgår derfor ikke de kroppslige endringene som vi forbinder med kjønnsmodningen. Det er derfor kun triploide hunner som vil ha noen eventuell tilleggsverdi for oppdretteren

Hvis vi ser på dødelighet er det imidlertid betydelig forskjell mellom diploider og triploider. Denne forskjellen er spesielt stor i den første perioden etter befruktning av egget (Tabell 3), men også senere i ferskvann og i sjøvannsfasen finner en gjennomgående en noe høyere

dødelighet på triploider enn diploider. Det må imidlertid også her tas forbehold om hvor relevante disse dataene er for næringen.

I EU-prosjektet AIR 3 CT94 2216 (se vedlegg) er hovedkonklusjonen at det var få forskjeller i vekst mellom diploide og triploide grupper. Familievariasjonen var ofte like stor eller større enn variasjonen som var forårsaket av ploiditet. Men i to av de fire store vekststudiene som ble gjennomført hadde triploider enn høyere dødelighet som førte til at den totale produksjonen var 10-15% lavere i triploider.

- Bonnet, S., Haffray, P., Blanc, J.M., Vallée, F., Vauchez, C., Fauré, A., and Fauconneau, B. 1999. Genetic variation in growth parameters until commercial size in diploid and triploid freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and seawater brown trout (*Salmo trutta*). *Aquaculture* 173: 359-375.
- Cotter, D., O'Donovan, V., Drumm, A., Roche, N., Ling, EN., Wilkins, NP. 2002. Comparison of freshwater and marine performances of all-female diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*. 33: 43-53.
- Johnstone, R., McLay, H.A. and Walsingham, M.V. (1991). Production and performance of triploid Atlantic salmon in Scotland. *Can. Tach. Rep. Fish. Aquat. Sci.* **1789**, 15-36.
- O'Flynn, FM., McGeachy, SA., Friars GW., Benfey, TJ., Bailey, JK. 1997. Comparisons of cultured triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *ICES Journal of Marine Science*. 54: 1160-1165.
- Oppedal, F., Taranger, G.L. and Hansen, T. 2003. Growth performance and sexual maturation in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater tanks exposed to continuous light or simulated natural photoperiod. *Aquaculture* 215: 145-162.
- Quillet, E., Foisil, L., Chevassus, B., Chourrout, D., Liu, FG. 1991. Production of all-triploid and all-female brown trout for aquaculture. *Aquatic living resources*. 4: 27-32.
- Sheehan, RJ., Shasteen, SP., Suresh, AV., Kapuscinski, AR., Seeb, JE. 1999. Better Growth in All-Female Diploid and Triploid Rainbow Trout. *Trans.Am.Fish.Soc.* 128: 491-498



Tabell 3. En oversikt over forsøk hvor triploider og diploider er sammenlignet under 'kommersielle betingelser'. \* Slaktedataene fra den første syklusen på Havforskningsinstituttet er fra 17 måneder i sjø. \*\* Dataene fra den andre syklusen på Havforskningsinstituttet er fra 16 måneder i sjø, i tillegg er vektdataene ved slakting etter 27 måneder gitt (16mnd/27mnd). \*\*\* Det ble brukt to protokoller hvor desinfeksjonsløsningen ble brukt henholdsvis før og etter trykkbehandling (før/etter).

?	Ploidi	Dødelighet (%)				Deformitet (%)	Katarakt (%)	Slaktevekt (kg)	Merknader	Referanse og art
		Befruktning til startfôring	Startfôring (uker)	Første sjøvannsfase (uker)	I sjøvann					
1995	AF2N	22.2	10.3 (9)	0.9 (11)						
1995	AF3N	42.4	20.3 (9)	1.5 (11)						Cotter et al., 2002
1996	AF2N	21.3	2.5 (7/8)	0.9 (9/10)	62.4		2.76/2.49	Totvekt/		Laks
1996	AF3N	25.5	10.3 (7/8)	3.3 (9/10)	73.4		2.58/2.40	Sløydvekt		
1990	2N	43.8			18.5	13.6	2.99/2.44	Totvekt/Kg slaktet		
	3N	57.1			35.2	28.0	3.20/2.07	pr utsatt smolt.		
1991	2N	26.6			34.8	1.5	3.72/2.43			
	3N	59.0			39.6	23.2	3.79/2.29	Underkjeve-		O'Flynn et al., 1997 og
1992	2N	33.1			23.5	4.1	4.13/3.16	deformitet		Benfey, 2001
	3N	32.2			33.3	11.8	4.51/3.01			Laks
1993	2N	48.3								
	3N	58.1						Avsluttet etter		
1994	2N	75.8						startfôring		
	3N	78.0								
Farm A	AF3N						1.19	14 mnd		
	2N						1.57/1.07	Moden/umoden		Johnstone et al., 1991
								12% modning		Laks
Farm B	AF3N						1.51	13 mnd		
	2N						1.98/1.71	Moden/umoden		
								% modning ukjent		
	AF2N						0.58	265 dager fra 100 g		
	AF3N						0.75	'De fleste' 2N		Sheehan et al., 1999
	2N						0.52	hannene modnet		Regnbueørret

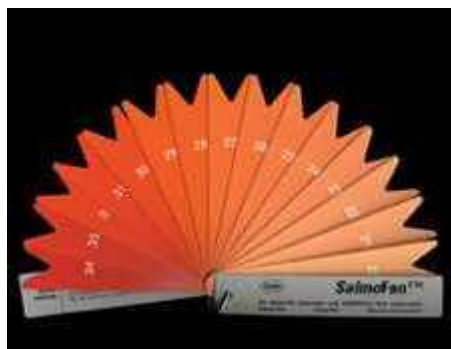
Tabell 3. Forts....

?	Ploidi	Dødelighet			Deformitet	Katarakt	Slaktevekt	Merknader	Referanse og art	
		Befruktning til startføring	Startføring (uker)	Første sjøvannsfase (uker)						I sjøvann
1996	2N	23.4/45.9***		0.8 (14)	4	lite	9	5.07*	19% modning	
	3N	75.4/54.0***		5.0 (14)	19	lite	34	4.34*	3.1% modning	
1997	AF2N	37.7			26	0.4	80	1.85/6.09**	4.4% modning	Havforskningsinstituttet
	2N	34.5			15	8.8	92	2.10/6.71**	2.2% modning	upubl
	AF3N	42.7			17	4.3	88	2.28/5.27**	0% modning	Laks
	3N	36.8			21	5.5	94	1.84/4.52**	0.7% modning	
Regnbue ørret	2N				Snitt 20.4			1.00		
	3N				Ikke signifikant			0.84	17 mnd	Bonnet et al., 1999
Brun ørret	2N				13.4			1.37		
	3N				18.9			1.28		

## 3.2 Triploid fisk og kvalitet

Farge, fettinnhold og tekstur (fasthet/bløthet) er de viktigste parametrene når en vurderer kvaliteten på en laksefilet (Koteng, 1992). Triploider avviker generelt sett lite fra diploider når det gjelder slaktekvalitet, men noen forskjeller er funnet. Den generelle sammenhengen hvor triploid fisk har større celler enn diploid fisk gjelder også for muskelceller. Triploid laks (*S. salar*) (Johnston et al. 1999; Sigurgisladottir et al. 2001; Bjørnevik et al. 2004) og regnbueørret (Suresh and Sheehan 1998), har derfor også færre muskelfibre og dermed også en lavere fibertetthet enn diploider. Muskelcellulariteten er en faktor som påvirker flere kvalitetsparametre. Johnston et al. (2000) fant en positiv korrelasjon mellom høy fibertetthet og ulike mål på fasthet. Også graden av filetspalting i løpet av bearbeidingsprosessen på fabrikk er delvis relatert til muskelcellularitet, med lite eller ingen filetspalting i fisk med fibertetthet over 95 fibre/mm<sup>2</sup> muskel (Johnston et al., 2002). I samsvar med dette fant Bjørnevik et al. (2004) at triploider hadde mer filetspalting og lavere filetfasthet (de var bløtere) enn diploid fisk.

Choubert et al. (1997) rapporterte en høyere rødhet i diploider enn triploider målt i CIELCH<sup>1</sup> colour space ved hjelp av et kromameter. Familiebakgrunnen hadde også en kraftig effect på rødheten, men variasjonen innen familiene var stor. Johnston et al. (2000) fant også en significant positiv sammenheng mellom Roche SalmoFan® (Figur 5) verdien og muskelfibertettheten. Det var imidlertid ingen sammenheng mellom astaxanthin konsentrasjonen og fibertettheten noe som forklares med endringer i overflateegenskapene med endringer i fibertetthet. I et annet arbeid (Bjørnevik et al., 2004) ble det imidlertid funnet at triploider hadde mørkere og rødere filetfarge enn diploider, men ploidi påvirket ikke kjemisk sammensetning og sesong ble funnet å være den viktigste forklaringsvariabelen for variasjonen i filetkvalitet i både triploid og diploid laks.



Figur 5: Roche SalmoFan

Bjørnevik M, Espe M, Beattie C, Nortvedt R, Kiessling A. 2004. Temporal variation in muscle fibre area, gaping, texture, colour and collagen in triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L). Journal of the science of food and agriculture (6): 530-540.

Choubert, G., Blanc, J.M. and Vallée, F. 1997. Colour measurement, using CIELCH colour space, of muscle of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed astaxanthin: effects of family, ploidy, sex and location of reading. Aquaculture Research 28: 15-22.

---

<sup>1</sup> CIELCH colour space beskriver en farges plassering i et rom. L beskriver lysheten til prøven fra 0 (svart) til 100 (hvit). C (Chroma) er et mål på metning og H (Hue) er et mål på farge eller 'lød'. Fargen er presentert som en vinkel mellom 0 og 360°. Vinkler mellom 0 og 90° er røde, oransje og gule; 90 til 180° er gule, gulgrønne og grønne; 180 til 270° er grønne, blågrønne og blå og 270 til 360° er blå, fiolett og tilbake til rødt.

- Johnston IA, Strugnell G, McCracken ML, Johnstone. 1999. Muscle growth and development in normal-sex-ratio and all-female diploid and triploid Atlantic salmon. *J. Exp. Biol.* 202 (15): 1991-2016.
- Johnston IA, Alderson R, Sandham C, Dingwall A, Mitchell D, Selkirk C, Nickell D, Baker R, Robertson B, Whyte D, Springate J. 2000. Muscle fibre density in relation to the colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 189 (3-4): 335-349.
- Johnston IA, Manthri S, Alderson R, Campbell P, Mitchell D, Whyte D, Dingwall A, Nickell D, Selkirk C, Robertson B. 2002. Effects of dietary protein level on muscle cellularity and flesh quality in Atlantic salmon with particular reference to gaping. *Aquaculture*. 210 (1-4): 259-283.
- Jungawalla, PJ. 1991. Production of non-maturing Atlantic salmon in Tasmania. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, 1789: 47-71.
- Koteng, D.F., 1992. Markedsundersøkelser Norsk Laks, FNL, Bergen, Norway.
- Sigurgisladóttir S, Sigurdardóttir MS, Ingvarsdóttir H, Torrisen OJ, Hafsteinsson H. 2001. Microstructure and texture of fresh and smoked Atlantic salmon, *Salmo salar* L., filets from fish reared and slaughtered under different conditions. *Aquaculture Research*. 32 (1): 1-10.
- Suresh AV, Sheehan RJ 1998. Muscle fibre growth dynamics in diploid and triploid rainbow trout. *J. Fish Biol.* 52 (3): 570-587.

### 3.3 Hematologi

I triploid fisk er størrelsen på cellekjernene øket for å gi plass til det økte antallet kromosomer og dette fører også til en tilsvarende økning i cellevolum (f.eks Benfey, 1999). Den økte cellestørrelsen blir imidlertid kompensert av en reduksjon i celleantall slik at hematokrittverdien blir den samme (Benfey og Sutterlin 1984). Den økte cellestørrelsen fører også til at hemoglobinmengden per celle er høyere i triploider enn diploider (Benfey og Sutterlin, 1984; Graham et al., 1985), mens den totale hemoglobinmengden pr fisk varierer fra art til art. Hos laksefiskene er det rapportert at triploid Atlanterhavslaks (Benfey og Sutterlin, 1984; Graham et al., 1985), coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Small and Randall, 1989) og regnbueørret (Yamamoto og Iida, 1994) har lavere total hemoglobinmengde enn diploider, mens triploid canadisk bekkerøye har samme totale hemoglobinmengde som diploide individer.

Fordi blodcellene er større hos triploid fisk har blodcellene også et lavere overflate/volum forhold. Dette ser allikevel ikke ut til å påvirke det cellulære oksygenforbruket. Oksygen forbruket til blod fra triploid fisk er ikke signifikant forskjellig fra diploid blod (henholdsvis  $1.87 \pm 0.51$  og  $1.67 \pm 0.28$  nmol/ml/min/g Hb; Currie and Benfey, unpubl.).

I et nyere arbeid sammenlignet Cal et al., (2005) hematologien (blodparametrene) til diploid og triploid piggvar for å kunne gjøre en vurdering av den triploide fiskens evne til å tolerere suboptimale miljøforhold. Triploid piggvar hadde røde blodceller som hadde 45.9% større volum, altså nær den teoretisk forventede økningen på 50% pga av det ekstra kromosomsettet. Triploider hadde også lavere antall røde blodceller (RBC: 1.27 celler/pL i motsetning til 1.84 cells/pL i diploider). Det lave antallet røde blodceller ble ikke kompensert av økningen i blodcellevolum og de triploide hadde følgelig lavere hematokritt (23.11 mot 26.8% i diploider) og lavere total haemoglobinkonsentrasjon (73.74 g/liter i diploider og 67.54 g/liter i triploider).

- Benfey, TJ., Sutterlin AM. 1984. The haematology of triploid landlocked Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Biol.* 24: 333-338.
- Benfey, TJ. 1999. The physiology and behaviour of triploid fishes. *Reviews in Fisheries Science* 7: 39-67.
- Cal RM, Vidal S, Camacho T, Piferrer F, Guitian FJ. 2005. Effect of triploidy on turbot haematology. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2005. 141: 35-41.
- Graham, MS., Fletcher, GL., Benfey, TJ. 1985. Effect of triploidy on blood oxygen content of Atlantic salmon. *Aquaculture* 50: 133-139.

- Small, SA., Randall, DJ. 1989. Effect of triploidy on the swimming performance of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Can J. Fish. Aquat. Sci. 46: 243-245.
- Yamamoto, A. og Iida, T. 1994. Hematological characteristics of triploid rainbow trout. Fish Pathol., 29: 239-243.

### 3.4 Hjertefunksjon, respirasjon og fysisk ytelse

I litteraturen finnes det ingen sammenligninger av hjertestørrelse hos triploid og diploid laksefisk. Parsons (1993) studie av den abborlignende arten White Crappie (*Pomoxis annularis*) er den eneste publiserte undersøkelsen på hjertestørrelse og denne konkluderer med at det ikke er forskjell på diploide og triploide individer.

Mercier et al., (2002) studerte hjertefunksjonen i triploid ørret (*S. trutta*) og konkluderte med at det var lite som tydet på at triploid fisk hadde redusert maximal hjertekapasitet. De fant imidlertid at hjertet hadde sin maksimalytelse mellom 14 og 18 °C og at dette kunne være med å bidra til økt dødelighet ved temperaturer opp mot 18 °C.

Pustefrekvensen er i noen studier vist å være lik i triploider og diploider (f.eks hos canadisk bekkerøye (Stillwell og Benfey, 1996b), mens i andre er den vist å være høyere hos triploider (Atlantisk laks (King and Lee, 1993 referert i Benfey, 1999)

Flere studier viser at oksygenforbruket hos triploider og diploider er det samme (laks f.eks Benfey og Sutterlin, 1984 og regnbueørret f.eks Yamamoto og Iida, 1994). Benfey 1999 påpeker imidlertid at dette ikke nødvendigvis betyr at den aerobe kapasiteten er den samme og viser til at Yamamoto og Iida, 1994 fant at den triploide regnbueørreten viste tegn på respirasjonsproblemer (søkte mot overflaten og hadde problemer med å opprettholde balansen) ved et høyere oksygennivå enn de diploide.

Altimiras et al. (2002) studerte metabolismen hos triploid ørret ved 14 og 18 °C. Ved 14 °C skilte denne seg ikke nevneverdig fra diploid fisk (f.eks basalmetabolisme (SMR) = 75.1 mg O<sub>2</sub> per time og kilo fisk), rutine metabolsk rate (metabolisme ved 'normal aktivitet')(108.8 mg O<sub>2</sub> per time og kilo fisk), maksimum metabolsk rate (MMR) = 380 mg O<sub>2</sub> per time og kilo fisk), hjertefrekvens (47 slag per min), blodtrykk i dorsalaorta (3.2 kPa) og pustefrekvens (63 per min). Ved lang tids svømming ved 80% av den kritiske svømmehastighet økte blodstrømmen fra hjertet 2.3 ganger på grunn av økning av hjertefrekvens (1.8 ganger) og økning i slagvolum (den mengden som flyttes ved hvert slag) (1.2 ganger). Ved 18°C økte både basalmetabolismen, metabolismen ved 'normal aktivitet, hvilepuls og pustefrekvens ved hvile, men den maximum metabolsk rate var den samme som ved 14°C. Dette betyr at forholdet mellom MMR og SMR (MMR/SMR kalles factorial metabolic scope) blir redusert fra 5.13 ved 14°C til 2.93 ved 18°C. Dette forholdet kan vi si er et mål på organismens evne til å ta ut litt ekstra under de rådende forhold. Siden dette forholdstallet er betydelig redusert ved 18°C kan dette være en medvirkende faktor til at triploid ørret har en økning i dødelighet ved 18°C.

Kritisk svømmehastighet (den høyeste svømmehastighet som kan holdes over tid) er vist å være lik for triploider og diploider (Stillwell og Benfey (1996a); Cotterel og Wardle (2002); Altimiras et al. (2002)) og svømmefrekvensen ser også ut til å være den samme (Stillwell og Benfey, 1996b). Hvis svømmehastigheten økes utover den kritiske svømmehastigheten, er imidlertid utholdenheten høyere hos diploid enn triploid laks. Men når triploid og diploid fisk får svømme til utmattelse ved 9 °C henter de triploide individene seg raskere inn igjen (reduisert acidosis, restituert muskel ATP og reduksjon i muskel laktat) enn de diploide

(Hyndman et al., 2003a). Ved 19°C hadde imidlertid triploid fisk 90% dødelighet i løpet av 4 timer svømming til utmattelse (ingen dødelighet i diploider) og hadde redusert anaerob kapasitet (manglende tømning av fosfokreatin og langsommere gjenoppbygging av muskel ATP og langsommere eliminering av laktat (Hyndman et al., 2003b).

I EU prosjektet AIR CT94 2216 (se vedlegg) ble det også funnet at triploider hadde en lavere startrespons på muskelen (de vill komme langsommere i gang i en krisesituasjon), men dette er ikke en egenskap som en tror har noen betydning for fisk i oppdrett.

- Altimiras, J., Axelsson, M., Claireaux, G., Lefrançois, C., Mercier C., and Farrell, AP. 2002. Cardiorespiratory status of triploid brown trout during swimming at two acclimation temperatures. *Journal of Fish Biology*, 60: 102-116.
- Benfey, TJ. 1999. The physiology and behaviour of triploid fishes. *Reviews in Fisheries Science* 7: 39-67.
- Benfey, TJ. og Sutterlin, AM. 1984. Oxygen utilization by triploid landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 42: 69-73.
- Cotterell, SP., Wardle, C. 2004. Endurance swimming of diploid and triploid Atlantic salmon. *J. Fish Biol.* 65: 55-68.
- Hyndman, CA., Kieffer, JD. and Benfey, TJ. 2003a. The physiological response of diploid and triploid brook trout to exhaustive exercise *Comp. Biochem and Phys. A-Molecular and Integrative Physiology* 134: 169-181.
- Hyndman, C.A., J.D. Kieffer and T.J. Benfey. 2003b. Physiology and survival of triploid brook trout following exhaustive exercise in warm water. *Aquaculture* 221: 629-643.
- Mercier, C., Axelsson, M., Imbert, N., Claireaux, G., Lefrancois, C. Altimiras, J., Farrell, AP. 2002. In vitro cardiac performance in triploid brown trout at two acclimation temperatures. *J. Fish Biol.* 60: 117-133.
- Parsons, G.R. (1993) Comparisons of triploid and diploid white crappies. *Trans. Am. Fish. Soc.* 122, 237-243
- Small, S. A. & Randall, D. J. (1989). Effects of triploidy on the swimming performance of Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 243-245.
- Stillwell og Benfey, 1996a. The swimming performance of triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Bull Aquacult. Assoc Can* 96: 41-43
- Stillwell og Benfey, 1996b. Hemoglobin level, metabolic rate, opercular abduction rate and swimming efficiency in female triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Fish Physiol. Biochem*, 15: 377-383.
- Yamamoto, A. og Iida, T. 1994. Oxygen consumption and hypoxic tolerance of triploid rainbow trout. *Fish Pathol.*, 29: 245-251.

### 3.5 Immunologi og sykdomstoleranse

Generelt sett kan en bare måle små forskjeller i immunkompetanse mellom triploid og diploid fisk. Yamamoto og Iida (1995a) fant lik komplementaktivitet i triploid og diploid regnbueørret. Langston et al. (2001) injiserte diploide og triploide søsken av laks med lipopolysakkarid for å studere responsen på to viktige responser i immunforsvaret (komplementaktivitet og såkalt hypoferraemic-respons, d.v.s. at organismen senker nivået av jern i plasma for å gjøre det vanskelig for sykdomsframkallende bakterier å vokse). Forskjellene mellom de triploide og diploide var liten, men de triploide brukte lenger tid på å få opp igjen komplementaktiviteten og det tok lenger tid før hypoferraemic-responsen satte inn. Man konkluderte med at dette kunne tyde på at diploid laks har et noe bedre forsvar mot bakteriesykdommer enn triploid laks

Budiono et al. (2006) studerte aktiviteten til komponenter i immunsystemet hos diploid og triploid piggvar (*Psetta maxima* L). Triploid piggvar hadde større celler (erythrocytter og neutrophiler), men antallet erythrocytter, leukocytter and trombocytter var lavere enn i diploid fisk. Resultatene indikerer imidlertid at immunaktiviteten var lik i triploider og diploider og at forskjellene i celleantall blir kompensert av høyere celleaktivitet. På samme måte fant Small og Benfey (1987) at triploid laks kan ha høyere cellulær fagocytisk aktivitet enn diploider,

men at dette kan balanseres av et redusert antall leukocytter (Yamamoto og Iida, 1994; Benfey, 1999).

Heller ikke gjennom smittetester har en klart å påvise forskjeller i sykdomstoleranse mellom 'normale' diploider og triploider. Yamamoto og Iida (1995b) smittet diploid og triploid regnbueørret med IHN, furunculose og vibriose uten å kunne påvise forskjeller i mottakelighet og Dorson et al., (1991) smittet regnbueørret, røye, bekkerøye og lake trout (*S. namaycush*) og de triploide hybridene mellom regnbueørret hun og hanner av de tre røyeartene med IPNV type sp (infeksiøs pankreas nekrose virus), VHSV type 1 og 3 (Viral haemorrhagisk septikemi virus) og IHNV (infeksiøs haematopoietisk nekrose virus). I det siste arbeidet ble det funnet forskjeller i mottakelighet mellom artene, men ikke mellom diploider og triploider. Yamamoto og Iida (1995a) fant også at diploid og triploid regnbueørret viste samme respons på vaksinerings.

Jhingan et al. (2003) fant imidlertid en en lavere sykdomstoleranse i triploid transgen coho laks enn i sammenlignbare diploider. Det er imidlertid usikkert hvor representativ den transgene fisken er i denne sammenheng

- Benfey, TJ. (1999). The physiology and behaviour of triploid fishes. *Rev. Fish. Sci.* 7: 39-67.
- Budino B, Cal RM, Piazzon MC, Lamas J. 2006. The activity of several components of the innate immune system in diploid and triploid turbot. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 145:108-13.
- Dorson, M., Chevassus, B., Torhy, C. 1991. Comparative susceptibility of three species of charr and rainbow trout x charr triploid hybrids to several pathogenic salmonid viruses. *Dis. Aquat. Org.* 11: 217-224.
- Jhingan, E., Devlin, RH., Iwama, GK. 2003. Disease resistance, stress response and effects of triploidy in growth hormone transgenic coho salmon. *J. Fish Biol.* 63: 806-823.
- Langston, AL., Johnstone, R., Ellis, AE. 2001. The kinetics of the hypoferraemic response and changes in levels of alternative complement activity in diploid and triploid Atlantic salmon, following injection of Lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immun.* 11: 333-345
- Small, SA., Benfey, TJ. 1987. Cell size in triploid salmon. *J. Exp. Zool.* 241: 339-342.
- Yamamoto, A. og Iida, T. 1994. Hematological characteristics of triploid rainbow trout. *Fish Pathol.*, 29: 239-243.
- Yamamoto, A. og Iida, T. 1995a. Non-specific defence activities of triploid rainbow trout. *Fish Pathol.*, 30: 107-110.
- Yamamoto, A. og Iida, T. 1995b. Susceptibility of triploid rainbow trout to IHN, furunculosis and vibriosis. *Fish Pathol.*, 30: 69-70.

### 3.6 Produksjonslidelser

Flere morfologiske forskjeller og deformasjoner er rapportert hos ikke salmonider som pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) (Strüssmann et al., 1993), vanlig karpe (*Cyprinus carpio*) (Gomelsky et al., 1992), suter (*Tinca tinca*) (Flajshãns et al. 1993), 'bighead' karpe (*Hypophthalmichthys nobilis*), graskarpe (*Ctenopharyngodon idella*) (Tave 1993) og malle (*Silurus glanis*) (Varkonyi et al., 1998).

Hos laks er den best beskrevne deformiteten 'underkjevedeformasjonsyndrom' (pappegøyenebb) f.eks. Sutterlin et al. (1987), Jungalwalla (1991). Sadler et al. (2001) rapporterte et høyt innslag av skjelettdeformasjoner (hovedsaklig pappegøyenebb og forkortede gjellelokk) i triploide laksebesetninger i Tasmania, og opp til 60% av triploidene delvis manglende primære gjellefilamenter. Kacem et al. (2004), derimot, studerte virvelsøyledformasjoner i diploid og triploid regnbueørret fra samme befruktningsgruppe, og konkluderte med at triploidiseringsprosessen ikke påvirket den histo-morfologiske karakteristikken av normale eller unormale vertebra. Triploidene hadde imidlertid en ekstra

ryggvirvel. Aegerter and Jalabert (2004) fant heller ikke noen sammenheng mellom andelen triploide ved absorbert plommesekk og andelen med morfologiske avvik.

I EU-prosjektet AIR 3 CT94 2216 ble det funnet at triploider fikk gjennomgående mer katarakt enn diploider (se vedlegg).

- Aegerter S, Jalabert B. 2004. Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Aquaculture 231 (1-4): 59-71.
- Gomelsky, B.I., Emelyanova, O.V., Recoubratsky, A.V. 1992. Application of a acle cover gene (N) to identification of type of gynogenesis and determination of ploidy in common carp. Aquaculture, 106: 233-237.
- Flajshāns, M., Kvasnicka, P., Ráb, P. 1993. Genetic studies in tench (*Tinca tinca*): high incidence of spontaneous triploidy. Aquaculture, 110:243-248.
- Jungalwalla, P.J. 1991. Production of non-maturing Atlantic salmon in Tasmania. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 1789: 47-71.
- Kacem, A, Meunier, F.J., Aubin, J., Haffray, P. 2004. A histo-morphological characterization of malformations in the vertebral skeleton of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after various triploidization treatments. CYBIUM 28 (1): 15-23 Suppl. S, 2004
- Sadler, J., Pankhurst, P.M., King, H.R. 2001. High prevalence of skeletal deformity and reduced gill surface in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture 198: 369-386.
- Strüssmann, C.A., Choon, N.B., Takashima, F., Oshiro, T. 1993. Triploid induction in an atherinid fish, the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). Prog. Fish-Cult, 55, 83-89.
- Sutterlin, A.M., Holder, J., Benfey, T.J. 1987. Early survival rates and subsequent morphological abnormalities in landlocked, anadromous and hybrid (landlocked x anadromous) diploid and triploid Atlantic salmon. Aquaculture 64: 157-164.
- Tave, D. 1993. Growth of triploid and diploid bighead carp. *Hypophthalmichthys nobilis*. J. Appl. Aquacult. 2(2): 13-25.
- Varkonyi, E., Bercsenyi, M., Ozouf-Costaz, C., Billard, R., 1998. Chromosomal and morphological abnormalities caused by oocyte ageing in *Silurus glanis*. J. Fish Biol. 52, 899– 906.

### 3.7 Stress, stresstoleranse, toleranse for sub-optimalt miljø

Triploid fisk er rapportert til å være mer følsom for miljøendringer enn diploid fisk. Fra Frankrike blir det rapportert dødelighet på triploid ørret når temperaturen er høyest i sommermånedene (Altimiras *et al.*, 2002). Ojolic et al. (1995) sammenlignet vekst og overlevelse hos triploide og diploide hunner av regnbueørret ved høye temperaturer. Fisken ble oppdrettet ved 21 °C i 23 dager. Ved denne høye temperaturen hadde triploider høyere dødelighet enn diploider (68.5% vs 39%). Ved slutten av 21 dagers perioden var de diploide 4.8% lenger, 23.9% tyngre og hadde 10.3% høyere kondisjonsfaktor (alle forskjeller signifikante). Årsakene til denne forskjellen i dødelighet er imidlertid usikker.

Triploid Canadisk bekkerøye og regnbueørret viser samme respons på akutt stress (håndtering og trenging) som diploid fisk (Biron og Benfey, 1994; Benfey og Biron, 2000). Selv om de har en lavere toleranse for miljøekstremer er altså stressresponsen den samme. Tilsvarende er det vist at det ikke er forskjeller i stressresponsen hos diploid og triploid regnbueørret under transport (Leggatt et al., (2006).

- Altimiras, J., Axelsson, M., Claireaux, G., Lefrançois, C., Mercier C., and Farrell, A. P. (2002). Cardiorespiratory status of triploid brown trout during swimming at two acclimation temperatures. J. Fish Biol. 60: 102-116.
- Benfey, T.J., Biron, M. 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Aquaculture 184: 167–176.
- Biron, M., Benfey, T.J. 1994. Cortisol, glucose and hematocrit changes during acute stress, cohort sampling and the diel cycle in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis* M.). Fish Physiol. Biochem. 13: 153-160.



- Leggatt, RA., Scheer, K., Afonso, LOB., Iwama, GK. 2006. Triploid and diploid rainbow trout do not differ in their stress response to transportation. *North Am. J. Aquat.* 68: 1-8.
- Ojolic, E.J., R. Cusack, T.J. Benfey and S.R. Kerr. 1995. Survival and growth of all-female diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature. *Aquaculture* 131: 177-187.

### 3.8 Sansorganer og adferd og læring

Fordi triploide individer har færre og større celler er også blitt spekulert i om at sansorganenes følsomhet er lavere i triploider enn diploider. Hvis dette er korrekt vil dette kunne gi seg utslag i endringer i luktesans, smak, lysoppfattelse og synets skarphet. Disse spekulasjonene har imidlertid aldri blitt etterprøvd eksperimentelt.

Når det gjelder adferd er det publisert to arbeider hvor en sammenligner diploider og triploider hos laksefisk.

Det er blitt påstått at triploid fisk gjør det bra når den oppdrettes med andre triploide, men at den taper i konkurransen hvis den oppdrettes sammen med diploid fisk. For å teste dette gjennomførte O'Keefe og Benfey (1997) forsøk hvor de studerte foropptaket til diploider og triploider som ble holdt i par (en diploid og en triploid) og i grupper (tre diploide og tre triploide). Innen hver test var de triploide og diploide individene like store. Det ble gjennomført 10 gruppeforsøk med Atlantisk laks mellom i størrelsesintervallet fra 5.1 til 62.7 gram uten at det ble funnet statistiske forskjeller i fôrøpntak mellom diploider og triploider. I forsøk med to ulike stammer av Canadisk bekkerøye ble det funnet et signifikant høyere fôrøpntak hos diploid fisk av de minste individene av den ene av de to stammene. Forfatterne konkluderer med at det kan være en forskjell i konkurranseevnen hos den minste fisken, men at dette forsvinner forsvinner etter hvert som fisken vokser.

Det er også blitt påstått at en av de potensielt negative miljøkonsekvensene er at triploide hanner (som blir kjønnsmodne, men ikke har funksjonelle spermier), kan gå opp i elvene og gyte med diploide hunner uten å kunne befrukte eggene. For å teste dette gjennomførte Kitamura et al. (1993) forsøk hvor triploide hanner av masu laks (*Amago* stammen, *Oncorhynchus masou rhodurus*) ble holdt sammen med diploide hunner for å se om de klarte å kurtisere og gyte sammen med dem (Tabell 4).

Tabell 4: Resultater fra et forsøk hvor triploide hanner har fått gyte sammen med diploide hunner

	2N han og 2N hun	3N han og 2N hun
<b>Antall par</b>	5	3
<b>Skjelvinger per time</b>	75.8	89.0
<b>Antall par med gyting</b>	5	3

De triploide hannene hadde den samme karakteristiske kjønnsdrakten som diploid fisk, men hadde ikke spermproduksjon. De triploide hannene viste den samme skjelvingen som diploide hanner bruker for å kurtisere hunnene og alle hunnene gytt eggene uavhengig av om de ble kurtisert av en triploid eller diploid han. Dette tyder på at triploide hanner også vil kunne gyte sammen med diploide hunner i naturen.

Det er også publisert to arbeider hvor en kommer innpå læringsevnen til diploid og triploid fisk. I det ene arbeidet sammenlignes evnen til å lære å svømme etter et lysmønster på karsidene (Cotterell og Wardle, 2004) og idet andre sammenlignes evnen til å lære å unnvike

et elektrisk stimuli (Deeley og Benfey, 1995). Det ble ikke funnet forskjeller mellom diploider og triploider i disse undersøkelsene.

Cotterell, SP., Wardle, C. 2004. Endurance swimming of diploid and triploid Atlantic salmon. *J. Fish Biol.* 65: 55-68.

Deeley, MA., Benfey, T J. 1995. Learning ability of triploid brook trout. *J. Fish Biol.* 46: 905-907.

O'Keefe, RA., Benfey, T.J. 1997. The feeding response of diploid and triploid Atlantic salmon and brook trout. *J. Fish Biol.* 51: 989-997.

Kitamura, S., Ogata, H., Onozato, H., Nagoya, H. 1993. Induced Masu Salmon Spawning of Diploid Females by Triploid Males. Proceedings of the 22nd U.S.-Japan Meeting on Aquaculture, Homer, Alaska, August 21-22, 1993.

### 3.9 Ploiditet – familie interaksjon

Det er gjort noen få undersøkelser hvor familier av laks, ørret og regnbueørret er blitt produsert både som triploider og diploider. Hvis familiene rangerer seg forskjellig som triploider og diploider vil dette slå ut som en signifikant ploiditet – familie interaksjon. Dette betyr at det kan være mulig å velge ut familier som gjør det relativt bedre som triploider enn andre familier.

Forsøk som Havforskningsinstituttet har gjort på laks oppdrettet i store kar viser en klar interaksjon mellom lysregime, ploiditet og familiebakgrunn (Oppedal et al., 2003). Bonnet et al., (1999) og (2002) fant signifikant interaksjon mellom ploiditet og familie for vekt ved 12 måneder, men ikke ved 17 måneder i regnbueørret og for vekt, lengde og kondisjonsfaktor ved 17 måneder, men ikke ved 23 og 27 måneder i vanlig ørret. Choubert et al. (1997) fant ingen interaksjon mellom ploiditet og kjøttfarge i regnbueørret.

Dette betyr at det kan være en mulighet for at eventuelle negative konsekvenser av det å være diploid til en viss grad kan utlignes over tid, hvis en tar hensyn til dette i et avlsarbeid. Dette betyr at en i avlsarbeidet må holde diploide og triploide linjer parallelt og velge ut de familiene som gjør det best som triploider. Utvalget må imidlertid gjøres på de diploide fordi disse ikke er sterile.

Bonnet, S., Haffray, P., Blanc, J.M., Vallée, F., Vauchez, C., Fauré, A., and Fauconneau, B. 1999. Genetic variation in growth parameters until commercial size in diploid and triploid freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and seawater brown trout (*Salmo trutta*). *Aquaculture* 173: 359-375.

Bonnet S., Haffray P., Chevassus B., Aubin J., Fauconneau B. (2002). Conformation and carcass quality traits in seawater adult brown trout : correlated responses to selection for freshwater body length growth and triploidy selection interactions. *Aquaculture*, 204: 193.

Oppedal, F., Taranger, G.L. and Hansen, T. 2003. Growth performance and sexual maturation in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater tanks exposed to continuous light or simulated natural photoperiod. *Aquaculture* 215: 145-162.

Choubert, G., Blanc, J.M. and Vallée, F. 1997. Colour measurement, using CIELCH colour space, of muscle of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed astaxanthin: effects of family, ploidy, sex and location of reading. *Aquaculture Research* 28: 15-22.

## 4. Rømming av triploid fisk

Det er bare publisert to arbeider hvor triploid laks har fått lov til å rømme (Wilkins et al, 2001 og Cotter et al., 2000). I det første arbeidet ble diploid og triploid laksesmolt sluppet ut i ferskvann nær settefiskanlegget (Tabell 5). Gjenfangster ble registrert i kystfiskeriene, i fiskefeller i ferskvann og i stangfiske. Gjenfangsten av triploid laks var mellom 12 og 24% av den registrerte gjenfangsten av de respektive diploide søskengruppene. All-female diploid fisk kom inn i fiskeriene tidligere enn vanlig (MS) diploid fisk. Triploid fisk kom inn i kystfiskeriene senere enn diploid fisk. Det ble ikke registrert økt feilvandring på den triploide fisken og størrelsen var den samme som på diploid fisk. Forfatterne sier dette gir en indikasjon på at bruken av triploid fisk vil redusere faren for genetiske innblanding, og redusert potensiale for økologiske og adferdsmessige interaksjoner med de ville bestandene.

Tabell 5: Gjenfangst av merket laks i kystfiskeriene og i ferskvann. Gjenfangsten ble gjort i løpet av de to første årene etter at fisken ble sluppet (etter Wilkins et al, 2001).

Sted og år	Gruppe	Gjenfangst	Gjenfangst i elv
<b>Newport 1996</b>	2N	4.51	50.7
	3N	1.09	52.8
	AF2N	3.85	25.1
	AF3N	0.96	23.9
<b>River Shannon 1996</b>	2N	1.26	27.8
	3N	0.40	27.3
	AF2N	1.61	43.2
	AF3N	0.28	0
<b>Newport 1997</b>	2N	9.90	52.0
	3N	2.05	58.3
<b>River Shannon 1997</b>	2N	1.82	29.2
	3N	0.29	25.0
	AF2N	0.64	57.1
	AF3N	0.08	100

I det andre arbeidet ble laksesmolt sluppet både i ferskvann ved klekkeriet og fra merder i oppdrettsanlegg ved kysten. Også i dette studiet var tilbakevandringen til kysten og til utslippslokaliteten i ferskvann betydelig redusert i triploide grupper (15 til 25%). Ingen laks fra merdslippene vendte tilbake til opprinnelseselven og bare to individer (0.1%) ble gjenfanget i andre elver. Heller ikke i dette studiet var det store forskjeller i størrelse mellom de ulike gruppene. Forfatterne konkluderer også i dette arbeidet med at bruken av triploid fisk i oppdrett kan redusere effekten rømt oppdrettslaks har på ville laksepopulasjoner både gjennom en redusert tilbakevandring og gjennom deres manglende evne til å formere seg.

I perioden 1995 til 1997 gjennomførte Havforskningsinstituttet flere rømningsforsøk med triploid og diploid laks fra forskningsstasjonen i Matre (arbeidet er foreløpig upublisert). I dette arbeidet ble det registrert få gjenfangster på tilbakevandrende laks, men mange laks ble fanget like etter 'rømming'. I dette arbeidet ble det ikke funnet forskjeller i den tidlige gjenfangsten mellom triploid og diploid laks (se også vedlegg fra dette prosjektet).

Tabell 6: Gjenfangst av laks etter 'rømninger' fra merder i sjøvann og fra anlegg i ferskvann (etter Cotter et al., 2000)

Slippsted	Gruppe	Gjenfangst kyst	Gjenfangst elv
<b>I ferskvann ved klekkeri</b>	2N	6.83	2.3
	3N	1.62	0.6
	AF2N	6.71	0.9
	AF3N	1.69	0.2
<b>Fra merd</b>	2N	4.60	0
	3N	1.02	0
	AF2N	8.28	0
	AF3N	1.27	0
<b>Fra merd</b>	AF2N	7.78	0
	AF3N	1.35	0

Cotter, D., O'Donovan, V., O'Maoiléidigh, N., Rogan, G., Roche, N., Wilkins, NP. 2000. An evaluation of the use of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in minimising the impact of escaped farmed salmon on wild populations. *Aquaculture* 186: 61-75.

Wilkins, NP., Cotter, D., O'Maoiléidigh, N. 2001. Ocean migration and recaptures of tagged, triploid, mixed-sex and all-female Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) released from rivers in Ireland. *Genetica* 111: 197-212.

## 5. Bruk av triploider og genetiske interaksjoner

Genetiske interaksjoner mellom oppdrettsorganismer og ville populasjoner er en av de største miljøutfordringene ved dagens oppdrett (Svåsand et al., 2007). I 2006 rømte det f.eks 963 000 laks og regnbueørret og 288 000 torsk og kveite, fra norske oppdrettsanlegg ([www.fiskeridirektoratet.no](http://www.fiskeridirektoratet.no)) Forvaltning og næring har arbeidet målrettet de siste år med å hindre rømming gjennom bedre merder, rutiner med mer, uten ennå å lykkes. Parallelt med å hindre rømming må en derfor også arbeide med å hindre effekten fisk som rømmer, eller gyter i merd.

Genetiske interaksjoner er spesielt stort for torsk, og forsøk med bruk av genetisk merket stamfisk har vist at 20-30 % av egg og larver i nærområdet av gytemerden stammet fra gyting av genetisk merket torsk i gytemerden (Jørstad et al., 2007). Bruk av steril torsk kan være eneste mulighet til å hindre genetiske interaksjoner i en voksende torskenæring.

Gytebestanden av kysttorsk er på et lavmål (Dahl et al., 2007), og dersom økning i torskeoppdrett følger prognosene, vill mengde oppdrettstorsk i merder langs kysten i løpet av få år bli større enn den ville gytebestanden av kysttorsk.

En steril oppdrettsfisk vil hindre genetiske interaksjoner, men en vil fortsatt kunne ha økologisk påvirkning. Gevinsten vil likevel være stor, og metoder for å produsere steril fisk, enten triploider, eller ved bruk av andre metoder bør intensiveres (Piferrer, 2006).

Dahl, E., Hansen, P.K., Haug, T., Karlsen, Ø., (red.) 2007. Kyst og havbruk 2007. Fisken og havet, særnr. 2–2007.

Jørstad, K.E., van der Meeren, T., Paulsen, O.I., Thomsen, T., & Svåsand, T. 2007 (in press). “Escapement” of eggs from farmed cod spawning in net pens and offspring intermingling with natural spawned larvae. Review in Fisheries Science.

Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.-C. and Colombo, L., (2006). I. Performance improvements by polyploidization in aquaculture. In: “Performance improvements by polyploidisation, gene transfer and DNA vaccination in aquaculture”. Colombo, L., Crosetti, D. and Svaasand T. (eds). GENIMPACT project: Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations. A European network. WP1 workshop “Genetics of domestication, breeding and enhancement of performance of fish and shellfish”, Viterbo, Italy, 12-17<sup>th</sup> June, 2006, 5 p. <http://genimpact.imr.no/>

Svåsand T., Crosetti D., García-Vázquez E., Verspoor E. (eds). Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations: a European network. GENIMPACT Final Report (EU contract n. RICA-CT-2005-022802). <http://genimpact.imr.no>

## 6. Kommersiell produksjon av steril fisk

All-female besetninger har rutinemessig vært brukt i oppdrett av porsjonsfisk av regnbueørret i EU (Johnston *et al.*, 1979), mens produksjon av all-female triploider (Chourrout, 1980) som er sterile (Lincoln and Scott, 1983) er begrenset til oppdrett av stor regnbueørret for røykerimarkedet (i dag 15000 til 20000 tonn i Frankrike, Storbritannia og Spania) fordi det er rapportert at triploid all-female fisk vokser 10 to 15 % langsommere enn diploider (Quillet *et al.*, 1991). I damproduksjon av ørret og regnbueørret i porsjonsstørrelse er imidlertid triploidene fortsatt populære og utgjør i dag anslagsvis 80 % av produksjonen i Italia, Spania og Polen, 30 % i Frankrike og 10 % i Storbritannia (Stefano Peruzzi personlig meddelelse). I Nord-Europa (hovedsaklig Norge og Finland) er produksjonen basert på normal diploid regnbueørret selv om også all-female produksjon også har vært prøvd i Norge.

Innen oppdrett av laks har triploider vært prøvd i Canada, Irland, Skottland og Tasmania, men dette har så langt fått liten utbredelse.

Innen oppdrett av stillehavsøsters utgjør i dag triploider rundt 50 %, og brukes fordi disse skjellene har bedre fylningsgrad og ikke går gjennom den kvalitetsforringende gytingen. Men også innen planteproduksjon er triploider mye brukt. Stenfrie vannmeloner og Gravenstenepler er triploide og det samme gjelder hele verdensproduksjonen av bananer.

- Johnstone R., Simpson T.H., Youngson A.F., and Withehead C. (1979). Sex reversal in salmonid culture. Part II. The progeny of sex-reversed rainbow trout. *Aquaculture*, 18 : 13-19.
- Quillet, E., Foisil, L., Chevassus, B., Chourrout, D., Liu, FG. 1991. Production of all-triploid and all-female brown trout for aquaculture. *Aquatic living resources*. 4: 27-32.

## 7. Etiske aspekter ved produksjon av steril fisk

Når man skal foreta en beslutning er det sjelden slik at valget står mellom et alternativ som er ideelt og et som åpenbart er negativt. De aktuelle handlingsalternativene har som oftest både noen positive og noen negative konsekvenser. Valget står dermed oftest mellom nyanser i grått og ikke mellom svart og hvitt. I en etisk vurdering tilstreber man at viktige interesser til alle involverte parter skal klarlegges og presenteres. Mange vil mene at hensynet til involverte dyr skal medregnes, og ikke bare i kraft av å ha verdi for mennesker. Dyrene utgjør en selvstendig interessepart, og deres ”interesser” må ivaretas særskilt. I nyere tid, og ikke minst innen miljøetikk, er det også blitt vanlig å inkludere hensynet til fremtidige generasjoner, ikke bare nålevende individer. Når et faktagrunnlag er klart, kan man foreta en endelig avveining mellom motstridende hensyn og forhåpentligvis konkludere med hvilket handlingsalternativ som samlet sett fremstår som best. Det er viktig å være klar over at to personer kan konkludere forskjellig selv om de legger de samme fagdata til grunn for vurderingen. Dette henger sammen med at deres verdigrunnlag ikke er identisk. En vil kunne legge større vekt på ett aspekt, den andre på et annet. Etiske diskusjoner resulterer dermed ikke i fasitsvar, men er mer å se på som et verktøy for å ta vanskelige beslutninger.

I denne saken har man følgende parter:

- Oppdrettsfisken
- Fiskeoppdretteren
- Konsumenten
- Villfisken og økosystemet
- Sportsfiskere og næringsinteresser knyttet til sportsfiske

### 7.1 Oppdrettsfisken

Oppdrettsfisken eller dens opphav (stamfisk) vil med steril fisk-strategien bli manipulert med en metode som resulterer i at fisken blir forplantningsudyktig. I seg selv er ikke dette noe revolusjonerende, kastrering av huspattedyr har vært gjort til alle tider, og for ulike formål (for eksempel populasjonskontroll av katt, kjøttkvalitet på gris og brukshensyn hos hest). Hvis kastrering utføres under bedøvelse og dyret håndteres skånsomt og det gis postoperativ smertelindring, kan dette forsvares rent dyrevelferdsmessig og i noen tilfeller faktisk resultere i bedre velferd (for eksempel at okser kan slippes på beite), selv om man av etiske årsaker kan mene at kastrering prinsipielt er uønsket ut fra hensynet til dyrets integritet (se Rådet for dyreetikk, uttalelse om kastrering).

Med de metoder som i dag er aktuelle på fisk (triploidi), tyder undersøkelser som er gjort av velferdsrelevante parametere på at triploid fisk har redusert velferd, i første rekke gjennom noe høyere dødelighet, flere deformiteter og at fisken gjennomgående er mer sensibel for lavt oksygennivå og andre suboptimale oppdrettsbetingelser. Ved optimal vannkvalitet og gode forhold for øvrig, synes forskjellen å være liten. Imidlertid vet man at oppdrettsbetingelser, spesielt i sjø, ikke kan kontrolleres fullt ut, og at miljøforholdene i praksis vil variere. Det er derfor sannsynlig at triploid fisk vil ha dårligere velferd. På denne bakgrunn konkluderer viktige dyrevernorganisasjoner (Compassion in World Farming og World Society for the Protection of Animals) med at kromosommanipulering bør forbys (Stevenson 2007).

Kjønnsreversering (”all female”) har ikke vist å ha direkte effekt på velferd. Hvis man velger ”all female” produksjon vil man tvert imot kunne unngå lidelser forbundet med at tidlig

kjønnsmoden hannfisk utsettes for osmotiske problemer når den blir gående i produksjonsmerden. "All female" produksjon er imidlertid ikke nødvendigvis avhengig av produksjon av triploid/steril fisk. Det er derfor rimelig å anta at steril fisk generelt sett vil ha større risiko for å lide i en oppdrettsituasjon enn normal fisk.

## 7.2 Fiskeoppdretteren

Dersom steril fisk viser lavere tilvekst og/eller høyere dødelighet i oppdrettsfasen, vil dette være en klar økonomisk ulempe for produksjonsøkonomien. Det samme gjelder dersom steril fisk har dårligere filetkvalitet, som noen undersøkelser kan tyde på. I tillegg kommer økte kostnader til produksjon av steril fiskeyngel sammenliknet med normal yngel. På den annen side vil oppdretterne kunne nyte godt av færre restriksjoner på oppdrett, i hvert fall i den grad disse er begrunnet i bekymring for konsekvenser av hybridisering med villfisk. Det er uvisst om gevinsten i form av bedre omdømme hos forbrukerne som er opptatt av naturvern vil kompensere for økte produksjonskostnader.

## 7.3 Konsumenten

Den alminnelige forbruker viser gjennom praktisk handling at hun/han er opptatt av pris. Når det gjelder produksjon av steril fisk, vil en omlegging i første omgang snarere øke enn å redusere produksjonskostningene og innebærer slik sett ingen fordel for forbrukeren.

Forbrukere er også opptatt av kvalitet. Dersom filetkvaliteten hos triploid fisk er eller oppfattes som dårligere, vil det ytterligere trekke ned. Dyrevelferd begynner å bli en integrert del av kvalitetsbegrepet og er et hensyn som stadig oftere vektlegges av forbrukerne, også når det gjelder fisk. Endringer i holdningen til fisk gjenspeiles tydelig i regelverket som har kommet de siste årene eller som er under arbeid både nasjonalt, i Europa og internasjonalt (se bl.a. Lund et al. 2007). Dersom dyrevelferden hos steril fisk er dårligere enn hos normal fisk, vil dette sannsynligvis få konsekvenser for folks holdninger til fiskeoppdrett og oppdrettsfisk, og påvirke betalingsvilligheten for varen.

Norske forbrukere har heller ikke i dag særlig stor tillit til oppdrettsfisk. I en undersøkelse gjort av SIFO (Berg, 2002) rangerte intervjuobjektene 11 ulike dyrearter etter hvor godt man mente dyrene hadde det. Elg, villfisk, sau og hund var de dyrene folk mente hadde det best, mens oppdrettsfisk og kylling ble rangert på bunn. 36 % av respondentene uttrykte bekymring for hvordan oppdrettsfisk behandles. Dette er et relativt høyt tall for en dyregruppe som tradisjonelt ikke har vært gitt særlig omtanke for velferd. Som mat synes også oppdrettslaks gjennomgående å ha en lavere status enn villaks. Dette kan ha flere årsaker, men er i noen grad et etterslep etter de negative oppslagene i forbindelse med store sjukdomsproblemer og høyt antibiotikaforbruk i lakseoppdrettet på 1980-tallet. Oppslag i media om smittefare mellom oppdrettslaks og villaks og uheldige genetiske effekter av rømt oppdrettslaks på villaksbestandene kan også ha betydning for oppdrettsfiskens omdømme.

En eliminering av risikoen for genetisk oppblanding vil derfor utvilsomt være gunstig for oppdrettsnæringens image. Å gjøre oppdrettsfisk steril, viser at næringen tar sitt ansvar for å bevare villaksstammene. Det er derfor rimelig å anta at mange forbrukere vil betrakte et slikt tiltak som positivt.

På den annen side er mange forbrukere grunnleggende skeptiske til det som er unaturlig, i betydningen kunstig. Europeiske opinionsundersøkelser (Eurobarometer) viser riktignok en



tendens til at bioteknologi har fått en økende aksept de siste årene, men dette gjelder spesielt for medisinske formål. Skepsisen til for eksempel genmodifisert mat holder seg kontant og er stor, til tross for nye og strenge EU-krav om godkjenning og merking. Å manipulere fisk i den hensikt å skape triploide individer, og eventuelt å hormonbehandle stamfisk for å lage ”all female” fisk kan oppfattes som ”å tukle med naturen” og i manges øyne derfor moralsk forkastelig. Skepsisen til det kunstige gjelder alle næringsmidler, også planteføde, og er derfor ikke primært knyttet opp mot hensynet til dyrets velferd, men heller hensynet til egen helse og eventuelt hensynet til naturen og dens integritet (Olsson og Sandøe 2004).

## **7.4 Villfisk og økosystemet**

Velferden til ville enkeltfisk vil i første omgang neppe påvirkes særlig av hvorvidt den rømte oppdrettsfisken er steril eller forplantningsdyktig, konkurransen mellom individer om ressursene vil uansett være der. Dersom rømt oppdrettsfisk reproducerer i naturen, og deres avkom har redusert fitness, vil avkommet sannsynligvis samtidig ha dårligere velferd.

For en populasjon av villfisk kan konsekvensene av rømt oppdrettsfisk være alvorlige. Dersom oppdrettsarten genetisk sett skiller seg vesentlig fra den ville populasjonen, men likevel ikke mer enn at rømt fisk hybridiserer med vill fisk, kan oppdrettsfisken påvirke den ville populasjonen negativt. Om andelen rømt fisk relativt sett er høy, vil innslaget av ”oppdretts-gener” etter hvert kunne bli betydelig, selv om både den rømte oppdrettsfisken og ville hybrider har dårligere overlevelsessevne i naturen. For triploid laks er det påvist at den går opp i elvene og at hannene viser tilnærmet normal atferd, selv om melken er steril. Tilstedeværelse av triploid hannfisk vil derfor fortsatt kunne være uheldig, fordi vill hannlaks kan fortreges. Imidlertid tyder undersøkelser på at triploid laksefisk vandrer opp i elvene noe seinere i sesongen enn diploid fisk, og at de derfor kan komme til gyteplassene for seint til å forstyrre villfiskens gyting. Velger man ”all female triploid”-produksjon vil fisken ikke gjennomgå de fysiologiske og adferdsmessige endringene som normalt ses under kjønnsmodningen. For bevaring av den ville populasjonens genotyper, vil det derfor være en klar fordel om oppdrettsfisk er gjort forplantningsudyktig gjennom triploidi og ”all female”-strategi.

Laksen har en spesiell posisjon i norsk naturforvaltning, og tiltak i oppdrettsnæringen som bidrar til bevaring av de lokale laksestammene anses derfor som udelt positivt. Det samme vil også kunne angis for andre oppdrettsarter dersom oppdrettsformen avviker vesentlig fra villtypen. For å bevare et økosystem med et stort genetisk mangfold, er det viktig at våre villfiskstammer kan bestå.

## **7.5 Sportsfiskere og grunneiere**

Sportsfiskernes interesse ligger i å fortsatt kunne fiske, og å samtidig oppleve en intakt natur. Det er videre viktige næringsinteresser knyttet til sportsfiske i lakseførende vassdrag, både grunneierinteresser og ringvirkninger for samfunnet rundt. I dag er allerede en betydelig andel av laksen som tas under elvefiske rømt oppdrettsfisk. For selve fiskeopplevelsen er det for noen fiskere kanskje negativt om byttet er en oppdrettsfisk, på den annen side kan antallet fiskesituasjoner øke. Andelen oppdrettsfisk i elvene er imidlertid knyttet til i hvilken grad oppdrettsfisk rømmer og vandrer i vassdrag og ikke til hvorvidt den er steril.

Hovedproblemstillingen er særlig knyttet til fremtidig fiske, om villfiskbestandene vil kunne overleve. Dette synet kommer tydelig fram i ulike utredninger (se bl.a. Rieber-Mohn-

utvalgets innstilling i NOU 1999). Om villaksen på sikt forsvinner, vil dette være et stort tap ikke bare for økosystemet, men for rekreativt fiske og næringsinteresser bygget opp rundt dette.

## 7.6 Konklusjon etikk

Noen hensyn taler klart for å produsere steril oppdrettsfisk (naturforvaltning og sportsfiskere) og andre imot (hensynet til oppdrettsfiskens velferd), mens andre hensyn trekker i begge retninger (forbrukere, fiskeoppdrettere). Imidlertid mangler viktige deler av kunnskapsgrunnlaget som kunne belyst konsekvensene for dyrevelferden. Slike opplysninger er av helt vesentlig betydning i en etisk vurdering. Dette gjelder først og fremst velferdskonsekvenser for steril fisk under praktisk oppdrett og under transport og slakt. Dersom steril fisk kan produseres uten negative implikasjoner for fiskens velferd, er tungtveiende dyreetiske hensyn ivaretatt. Imidlertid gjenstår hensynet til dyrs integritet. Neste trinn vil da være å kartlegge eventuelle konsumentreaksjoner på ”å tukle med naturen” opp mot de positive konsekvenser steril oppdrettsfisk vil ha for bevaring av villfiskpopulasjonene.

Berg, L. Dyr er ikke bare mat. Om synet på dyr i Norge. SIFO-rapport nr. 10, 2002.

Eurobarometer 2006 [http://www.gmo-compass.org/eng/news/stories/227.eurobarometer\\_europeans\\_biotechnology.html](http://www.gmo-compass.org/eng/news/stories/227.eurobarometer_europeans_biotechnology.html)

Lund V, Mejdell CM, Röcklinsberg H, Anthony R, Håstein T. Expanding the moral circle: farmed fish as objects of moral concern. 2007. Diseases of Aquatic Organisms 75, 2:109-118. Tilgjengelig på: <http://www.int-res.com/abstracts/dao/v75/n2/>

Norsk offentlig utredning: Til laks åt alle kan ingen gjera? Om årsaker til nedgangen i de norske villaksbestandene og forslag til strategier og tiltak for å bedre situasjonen. NOU nr. 9, 1999.

Olsson, JAS og Sandøe, P. Ethical decisions concerning animal biotechnology: what is the role of animal welfare science? Animal Welfare 2004, 13: S 139-144.

Rådet for dyreetikk 2001: Kastrasjon. <http://org.umb.no/etikkutvalget>

Stevenson, P. Closed waters: the welfare of farmed atlantic salmon, rainbow trout, atlantic cod and atlantic halibut. A report by CIWF and WSPA 2007.

## **8. Forskningsbehov**

1. Teknikker for å sterilisere oppdrettsfisk må utvikles og/eller optimaliseres. Dette gjelder også andre teknikker triploidisering
2. Triploid fisk kan være vanskelig å oppdrette og forskning er nødvendig for å optimalisere produksjonmetoder for disse.
3. Kunnskapen om hvordan fysiologi og genregulering i triploider blir påvirket under optimale og suboptimale oppdrettsforhold bør økes.
4. Det bør gjennomføres forsøk med triploider i full kommersiell skala for å kartlegge de biologiske og økonomiske konsekvensene av å produsere triploid fisk.
5. Det bør gjennomføres flere forsøk for å kartlegge adferd, vandringsmønster, vekst og overlevelse hos rømt steril fisk, og hvordan disse konkurrerer med villfisk om tilgjengelige ressurser.