

HV 2021-16
ISSN 2298-9137



HAF- OG VATNARANNSÓKNIR
MARINE AND FRESHWATER RESEARCH IN ICELAND

Kynproski í Bleikjueldi

Tómas Árnason, Theódór Kristjánsson og Ragnar Jóhannsson

HAFNARFJÖRÐUR - MARS 2021

Kynþroski í Bleikjueldi

Tómas Árnason, Theódór Kristjánsson og Ragnar Jóhannsson

Skýrslan er unnin fyrir atvinnuvega- og nýsköpunarráðuneytið

Upplýsingablað

Titill: Kynþroski í Bleikjueldi		
Höfundur: Tómas Árnason, Theódór Kristjánsson og Ragnar Jóhannsson		
Skýrsla nr: HV 2021-16	Verkefnisstjóri: Tómas Árnason	Verknúmer: 14288
ISSN 2298-9137	Fjöldi síðna: 14	Útgáfudagur: 31.03.2021
Unnið fyrir: ANR	Dreifing: Opin	Yfirfarið af: Agnar Steinarsson
Ágrip <p>Hitastig er sá umhverfisþáttur sem hefur mest áhrif á vöxt fiska. Í Íslenskum landeldisstöðvum er ódýr jarðvarmi því gjarnan nýttur til þess að ná fram sem mestum vaxtarhraða, sérstaklega á seiðastiginu þegar vatnspörfin er minnst. Eldi við hátt hitastig getur hinsvegar verið varasamt, því nýlegar rannsóknir sýna að eldshiti snemma á ævinni getur haft varanleg áhrif á þætti eins og beinabyggingu, vöðvavöxt og aldur við kynþroska. Snemmbúinn kynþroski er stórt vandamál í Íslensku bleikjueldi. Þetta verkefni snýst um að finna leiðir til að draga úr þessu vandamáli. Fyrsta markmið þessa verkefnis er að skima fyrir VGLL3 geni sem talið er að skýri stóran hluta af erfðabreytileika í kynþroska. Næsta markmið okkar er að skilgreina á hvaða aldurskeiði seiðastigsins hitastig hefur mest áhrif á kynþroskaákvörðun. Þetta er bæði gert með því að skoða tjáningu gena sem talin eru stýra kynþroskaákvörðun og með beinum mælingum á kynþroskastigi bleikjunnar. Samhliða þessum rannsóknum er leitað leiða til að framleiða ófrjóa eldisbleikju með nýstárlegri aðferð sem kallast genaþöggun. Rannsóknin er enn í gangi. Búið er að finna VGLL3 breytileikann í erfðamengi bleikju sem opnar fyrir þann möguleika að hægt verði að raðgreina verulegan fjölda fiska. Bleikjuseiði hafa verið alin við mismunandi hitastig og tekin hafa verið RNA sýni sem bíða greiningar hjá Háskóla Ísland. Fyrsta tilraun á framleiðslu ófrjórar bleikju með genaþöggun bar ekki árangur, en lífmælingar á tjáningu dnd-gensins í seinni tilraun á laxi gefa tilefni til töluverðrar bjartsýni.</p>		
Abstract <p><i>Temperature is one of the most critically important environmental factors influencing metabolism and growth rate in fish. One of the main qualities in Iceland with regards to land-based fish farming is the availability of cheap geothermal borehole water, which is used to maintain rapid growth, especially during the juvenile phase when small biomasses require low amount of heated water. Rearing at elevated temperatures can, however, have long-term consequences because temperature does not only affect the size attained at a given age. It can also modify a range of phenotypic traits such as development of axial skeleton, muscle growth dynamics, age at puberty, and head shape. Thus, while heated water can be used to obtain maximum instantaneous growth rates in land-based</i></p>		

aquaculture, such environmental manipulation can have negative consequences in the long-run, because elevated temperatures may also lead to increased incidence of sexual precocity. The first goal of this study is to identify the VGLL3 gene in Arctic charr, which is considered important with regards sexual maturation. In a separate experiment we aim to identify time windows where the temperature has the most effect on the age at puberty by studying both growth and DNA methylation. Finally, we will attempt to eliminate the problem with precocious maturation of Arctic charr by producing sterile fish through gene silencing shortly after conception. The study is still ongoing. However, we have managed to identify the VGLL3 gene in Arctic charr and have collected growth data and RNA samples from juveniles reared at four different temperature regimes. Although the first attempt to produce sterile Arctic charr with gene silencing was unsuccessful, expression measurements on the dnd-gene in new batch of salmon eggs give reason to be very optimistic.

Lykilorð: Bleikja, Kynþroski, Hitastig, Genatjáning, Genapöggun.

Undirskrift verkefnisstjóra:

Tómas Arnason

Undirskrift forstöðumanns sviðs:

Reynir Johannsson

Kynþroski í bleikjueldi



Tómas Árnason
Theódór Kristjánsson
Ragnar Jóhannsson

Efnisyfirlit	Bls.
Inngangur	1
Aðferðir	3
Verkþáttur 1	3
Verkþáttur 2	5
Verkþáttur 3	6
Niðurstöður	8
Verkþáttur 1	8
Verkþáttur 2	8
Verkþáttur 3	9
Umræður	10
Heimildir	14

Inngangur

Hitastig er sá umhverfisþáttur sem hefur mest áhrif á vöxt fiska. Flestar tegundir sýna aukinn vaxtarhraða með hækkandi hita þangað til hámarksvexti er náð við svokallað kjörhitastig. Við frekari hækkun á hita verður skörp lækkun á vexti (Brett, 1979). Hitastig hefur hins vegar ekki bara áhrif á vöxt fiska á tilteknu aldurskeiði, því hitastig er einnig sá umhverfisþáttur sem hefur hvað mest áhrif á utangenaerfðir (eiginleika sem skráðir eru í erfðaeefnið án þess að vera skrifaðir inn í DNA röðina sjálfa). Í gegnum utangenaerfðir (epigenesis) getur hitastig haft varanleg áhrif á þætti eins og beinabyggingu, vöðvavöxt, aldur við kynþroska og höfuðlag (Pavlov & Moksness 1997; Johnston & Cole, 1998; Kuparinen et al. 2011).

Eiginleiki lífvera til að tjá mismunandi svipgerðir kallast sveigjanleiki svipgerða (phenotypic plasticity). Miðað við aðrar fylkingar dýra hafa fiskar mikinn sveigjanleika í svipgerð, sérstaklega á fyrri hluta ævinnar (sjá Pittman et al. 2013). Í landbúnaði hefur rannsóknum farið fjölgandi á utangenaerfðum en minna er hins vegar er vitað um hvernig megi nýta þetta fyrirbæri í fiskeldi (Gavery and Roberts 2017).

Aðgangur að ódýrum jarðvarma hefur oft verið talinn einn af helstu kostum Íslands m.t.t. landeldis og hefur jarðhitinn gjarnan veriðið nýttur til þess að ná fram auknum vaxtarhraða (t.d. í sandhverfu-, þorsk- og bleikjueldi). Nýlegar rannsóknir hjá Hafrannsóknastofnun hafa hins vegar leitt í ljós að hraðari vöxtur við „kjörhita“ á seiðastigi getur haft slæmar afleiðingar til lengri tíma lítið, því fiskur sem alinn er við háan hita hefur aukna tilhneingingu til að verða kynþroska áður en sláturstærð er náð. Almenn séð er ótímabær kynþroski stórt vandamál í fiskeldi þar sem hann leiðir til aukinna affalla, minni fóðurnýtingar, lækkunar á afurðaverði og hægari vaxtar. Komið hefur í ljós að kynþroski í bleikjueldi veldur mun meira tjóni en áður var talið, en samkvæmt nýjustu upplýsingum má áætla að vaxtarskerðing af völdum kynþroska sé að jafnaði um 10%, sem leiðir til taps í sláturverðmætum upp á 500 – 600 milljónir á ári á landsvísu.

Þó almennt sé vel þekkt að hraður vöxtur við háan hita geti leitt til aukins kynþroska í bleikjueldi, er skortur á grunnþekkingu um það hvers vegna hitastig hefur þessi áhrif og ekki síður hvar í þroskaferlinu áhrifin eru mest. Líkindi eru fyrir því að utangenaerfðir spili stórt hlutverk. Því er mikilvægt að komast til botns í því hvenær á þroskastiginu þessum áhrifum sleppir og óhætt er að hækka hita og þar með auka vaxtarhraða án þess að kynþroski aukist.

Aldur við kynþroska er ekki eingöngu ákvarðaður út frá umhverfinu því aldur við kynþroska í laxfiskum er arfgengur og því má hafa bein áhrif á hann með kynbótum. Rannsóknir hafa sýnt að arfgengi kynþroska er um $h^2 = 0.25-0.35$ (Taranger, 2012). Arfgengi segir til um hversu mikið af heildar svipfarsbreytileika megi skýra með erfðum. Að auki eru oft viss svæði í erfðamenginu sem hafa veruleg áhrif í erfðabreytileika og kallast þau magnbundnir erfðavísar (QTL

quantitative trait locus). Samkvæmt Benson et al. 2015 skýrir *VGLL3* genið um það bil 40% af erfðabreytileika kynþroskaaldurs hjá laxi. Þessi erfðabreytileiki finnst nánast í öllum dýrum og þar á meðal hjá mannfólki. Breytileiki *VGLL3* hefur ekki verið rannsakaður áður í bleikju svo vitað sé, en gera má ráð fyrir að breytileikinn sé undir samverkandi áhrifum erfða og umhverfis. Ekki er vitað hversu algengur þessi breytileiki er í íslenskri eldisbleikju og ekki er vitað hversu afgerandi áhrif hann hefur á kynþroskaaldur bleikju við íslenskar aðstæður. Hafa ber í huga að breytileikinn kemur ekki í veg fyrir kynþroska heldur færast kynþroskaaldurinn til og fiskurinn verður eldri við kynþroska.

Í Tilraunastöð Hafrannsóknastofnunar að Stað við Grindavík er hægt að stýra eldisumhverfi mjög nákvæmlega. Þetta gefur einstætt tækifæri til að meta samverkandi áhrif *VGLL3* breytileikans og umhverfis á aldur við kynþroska. Að auki gefa svona staðlaðar aðstæður tækifæri til að meta hversu miklu *VGLL3* breytileikinn ræður við í ákvörðun á kynþroska hjá bleikju.

Markmið þessa verkefnis er að fá betri skilning á því hvaða þættir ákvarða kynþroskaaldur bleikju og hvernig megi með rétttri hitastýringu í eldinu lágmarka þann skaða sem hann veldur. Besta lausnin við vandamálinu væri hins vegar auðsjáanlega fólgin í því að nota skilvirka aðferð til að gelda bleikjuna. Slík aðferð myndi ekki einungis bæta afurðagæði, auka vöxt og lifun, heldur væri líklegast einnig hægt að hraða vexti bleikjunnar að vild án þess að það hefði í för með sér kynþroskavandamál á seinni hluta eldisferilsins. Á undanförunum áratugum hafa verið framleiddir geldfiskar með aðferð sem byggir á því að gera fiska þrílitna. Þó aðferðin hafi tilætluð áhrif hvað varðar kynþroskann, þá hefur hún ekki þótt hentug fyrir flestar tegundir eldisfiska, enda fylgja þrílitna fiskum oftast önnur og álíka stór vandamál og kynþroski (s.s. vansköpun og hægur vöxtur).

Á undanförunum árum hefur hins vegar náðst góður árangur í þróun nýrra aðferða til að geldingar eldisfiska. Ein þessara aðferða, og sú sem hvað mestar vonir eru bundnar við, kallast genþöggun. Aðferðin byggir á því að koma hvarfefnum inn í hrogn, sem gera það svo að verkum að fóstrið myndar ekki kynfrumur, en seiðið verður að öðru leyti eins og venjulegur fiskur. Niðurstöður frá Bandaríkjunum hafa sýnt að aðferðin virkar vel fyrir sebrafiska og regnbogasilung (Wong & Zohar, 2015). Hafrannsóknastofnun er um þessar mundir að þróa þessa aðferð fyrir eldislax í samstarfi við vísindamennina Yonathan Zohar og Ten-Tsao Wong hjá háskólanum í Baltimore í Maryland. Verkefnið er einnig unnið í samstarfi við Benchmark Genetics Iceland. Í þessu verkefni er stefnt að því að þróa þessa aðferð fyrir bleikju.

Markmið rannsóknaverkefnisins „Kynþroski í bleikjueldi“ er því þrjúþætt:

- Verkbáttur 1. Skimun fyrir *VGLL3* erfðabreytileika. Með réttu vali á arfgerð á þessu geni má mögulega velja fyrir seinni kynþroska, en eins og fyrr er getið stýrir *VGLL3*

genið 40% af erfðabreytileika kynþroskaaldurs í laxi. Með nýrri aðferð sem er í þróun á Matís (CRISP-FISH: Rapid identification tool) má með hraðvikum hætti velja foreldrafiska með réttri arfgerð við hrognaframleiðslu.

- Verkpáttur 2. Eldi á bleikjuseiðum við mismunandi hitaferla. Tilgangurinn með verkþætti 2 er að kanna hvort og hvernig hitastig veldur breytingum á genatjáningu. Lögð verður sérstök áhersla á að skilgreina þau aldurskeið þar sem hitastig hefur mest áhrif á genatjáningu. Þetta er gert til þess að fá upplýsingar um hvenær megi nota jarðvarma til að auka vaxtarhraða bleikjuseiða og hvort það sé yfir höfuð skynsamlegt að ala bleikjuseiði yfir 7°C og hvenær í vaxtarferlinu sé óhætt að auka hita og hraða vexti án þess að kynþroski aukist.
- Verkpáttur 3. Gelding bleikjuseiða með genapöggun. Í verkþætti 3 verður unnið náið með vísindamönnum Zohar og Wong við þróun á genapöggun sem aðferð til að gera bleikju ófrjóa. Aðferðin sem verið er að þróa felur í sér böðun á ófrjóvguðum hrognum og var upphaflega þróuð af Zohar og Wong sem báðir starfa við Maryland háskóla í Baltimore. Í þessari genapöggunaraðferð er sameindaferja notuð til að bera svokallaða Morpholino fáliðu inn í eggjð fyrir frjóvgun. Þetta efni er hannað til að hindra tjáningu svokallaðs dnd-gens, sem er nauðsynlegt gen fyrir forstigs kynfrumur. Meðferðin veldur því að kynfrumurnar þroskast í venjulegar líkamsfrumur sem leiðir til þess að fiskarnir verða ófrjóir. Í þessu verkefni erum við að vinna að hagnýtingu þessarar aðferðar. Hrognaskammtar eru meðhöndlaðir með mismunandi Morpholino styrk og mismunandi stoðefnum í mislangan tíma. Markmið tilraunanna er að hámarka skilvirkni meðferðarinnar án neikvæðra áhrifa á lifun eggja. Besti árangur með laxahrogn hingað til er um 70% ófrjósemi án neikvæðra áhrifa á síðari vöxt og þroska. Með áframhaldandi tilraunum er líklegt að niðurstaða varðandi ófrjósemi verði brátt nálægt 100%. Aðferðin er ekki flokkuð sem erfðabreyting og þar með spennandi kostur fyrir bleikju- og laxeldisiðnaðinn.

Aðferðir

Verkpáttur 1. Skimun fyrir VGLL3 erfðabreytileika.

Þessi verkþáttur er unninn í samvinnu við AgResearch á Nýja Sjálandi (agresearch.co.nz). AgResearch stendur mjög framarlega á sviði erfðafræði og kynbóta í landbúnaði og fiskeldi. AgResearch er í samvinnu við mörg fyrirtæki víðsvegar um heim og þar á meðal í áráraðir við Stofnfisk sem nú heitir Benchmark Genetics Iceland.

Í október 2020 voru 100 sýni send til AgResearch á Nýja Sjálandi til raðgreiningar og skimun fyrir *VGLL3* breytileikanum. Markmiðið með þessum sýnum er að búa til þreifara (primers) til afmarka *VGLL3* breytileikann í erfðamengi bleikju þannig hægt sé að magna erfðaeefnið upp og raðgreina það. AgResearch greinir nú þegar *VGLL3* breytileikanum í eldislaxi, þar á meðal fyrir Benchmark Genetics og sú vinna nýtist í bleikjurannsóknum við finna og smíða þreifara fyrir *VGLL3*. Eftir að búið er að fínstillta ferlið við greiningu (optimizing) á *VGLL3* breytileikanum þarf að framkvæma tengslaggreiningu milli *VGLL3* og svipfars einstaklinga (GWAS, genome-wide association study). Senda þarf > 2000 sýni úr fjölskyldum í erfðagreiningu. Að því loknu verður hannað CRISP-FISH greiningartól í samvinnu við Matís sem eldisfyrirtæki geta notað sjálf við val á foreldrafiski með rétta *VGLL3* arfgerð.

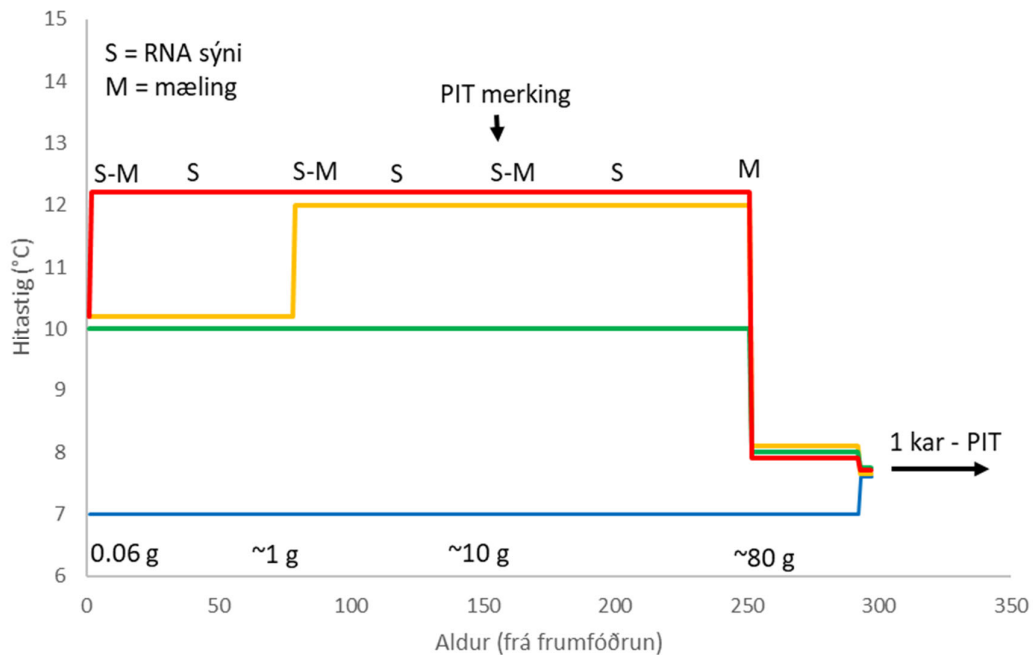


Mynd 1. Skematísk mynd sem skýrir hvernig leitað er eftir erfðabreytileika *VLLG3* gensins.

Verkpáttur 2. Eldi á bleikjuseiðum við mismunandi hitaferla.

Samkomutakmarkanir vegna Covid 19 gerðu það að verkum að verkpáttur 2 fór nokkuð seinna af stað en til stóð í upphafi. Tilraunin er enn yfirstandandi.

Þann 12. janúar 2021 voru 1400 kviðpokaseiði bleikju flutt úr seiðastöð Samherja á Stað yfir í Tilraunastöðina. Seiðunum var dreift á milli átta 500 lítra tilraunakerja. Hver tilraunahópur (hitahópur) er alinn í tveimur kerjum og samtals eru þetta því 4 hópar. Hitaferlar hvers hóps ásamt sýnatökum og mælingum koma fram á mynd 2.



Mynd 2. Tilraunauppsetning verkpáttar 2.

Þegar þessi texti er skrifaður hafa liðið 70 dagar frá því tilraunin hófst. Tekin hafa verið 136 RNA lífssýni á tímum sem tilgreindir eru á mynd 2. Sýnin eru geymd í RNA-later í frysti og bíða greiningar hjá Háskóla Íslands.

Seiðin verða einstaklingsmerkt með pit-merkjum í apríl 2021. Nokkrum mánuðum síðar verður öllum hópum komið fyrir í einu og sama kerinu (hægt að rekja uppruna út frá merkingu) og fiskarnir aldir upp í sláturstærð (~ 1,5 kg).

Verkþáttur 3. Gelding bleikjuseiða með genþöggun.

Tilraun 1.

Vorið 2020 voru ófrjóvguð hrogn og svil flutt frá klakstöð Samherja frá Sigtúnum í Kelduhverfi yfir í Tilraunastöð Hafró við Grindavík. Við komuna í Tilraunastöðina voru hrognin ekki frjóvguð strax heldur sett í gegnum 36 klst. geldingarferli í kæliklefa við 8°C stöðvarinnar fram að frjóvgun. Hrognin voru þá sett í glerskálar með vökva sem innihélt böðunarefni. Í gegnum allt böðunarferlið voru hrognin geymd á snúningsborði. Prófaðar voru sjö mismunandi útfærslur með mismunandi efnastyrk. Að auki var einn viðmiðunarhópur.

Hópur 1: 7,5 µM dnd-MO-Vivo í 36 tíma.

Hópur 2: 10 µM dnd-MO-Vivo í 18 tíma, svo í 5 µM dnd-MO-Vivo í 18 tíma.

Hópur 3: 10 µM dnd-MO-Vivo í 18 tíma, svo í 2,5 µM dnd-MO-Vivo í 18 tíma

Hópur 4: 10 µM dnd-MO-Vivo í 36 tíma

Hópur 5: 12.5 µM dnd-MO-Vivo í 36 tíma

Hópur 6: 15 µM dnd-MO-Vivo í 36 tíma

Hópur 7: 15 µM dnd-MO-Vivo í 18 tíma, svo 2,5 µM dnd-MO-Vivo í 18 tíma

Hópur 8: Viðmiðunarhópur, baðaður í 36 tíma í vökva með engu dnd-MO-Vivo

Þegar meðferðinni var lokið voru hrognin þvegin vandlega og síðan frjóvguð. Eftir sótthreinsun voru egginn sett í hrognaskáp til þroskunar.

Eftir klak voru kviðpokaseiðin geymd í hrognaskápunum þangað til seiðin voru því sem næst búin með forðann úr kviðpokanum. Á þeim tímapunkti voru kviðpokaseiðin færð yfir í 500 lítra tilraunakör þar sem þau fengu lifandi saltvatnsrækju (artemíu) sem fyrsta fóður áður en þau voru vanin yfir á þurrfóður.

Þegar seiðin höfðu vaxið upp í 10 g var hafist handa við að meta árangur genþöggunarinnar. Seiðin voru þá drepin í sterkri lausn af svæfingarlyfi (Finquel vet), og kynkirtlamyndun metin sjónrænt. Í heildina var árangurinn metinn á 1200 einstökum fiskum.



Mynd 3. Frá vinstri til hægri. 1. Dr. Ten-Tsao Wong. 2. Böðun á hreyfiborði. 3. Frjóvgun. 4. Proskun í hrognaskápum. 5. Hrogn. 6. Kviðpokaseiði skömmu fyrir flutning í tilraunakör.

Tilraun 2.

Sett var af stað ný genþöggunartilraun í mars 2021. Tilraun 2 er sett upp með hliðsjón af meðhöndlunum sem hafa gefið bestan árangur í genþöggun á laxi. Í tilraun 2 eru átta hópar sem allir fengu sama styrk af dnd-MO-Vivo ($10 \mu\text{M}$), en mismunandi böðunartíma (6 – 15 tímar). Í tilraun 2 var jafnframt sérstaklega gætt að því skola allan hrognavökva af eggjunum áður en böðunarferlið hófst og allt ferlið frá böðun að klaki er framkvæmt við lægra hitastig (4 í stað 8°C).

Niðurstöður

Verkþáttur 1. Skimun fyrir VGLL3 erfðabreytileika.

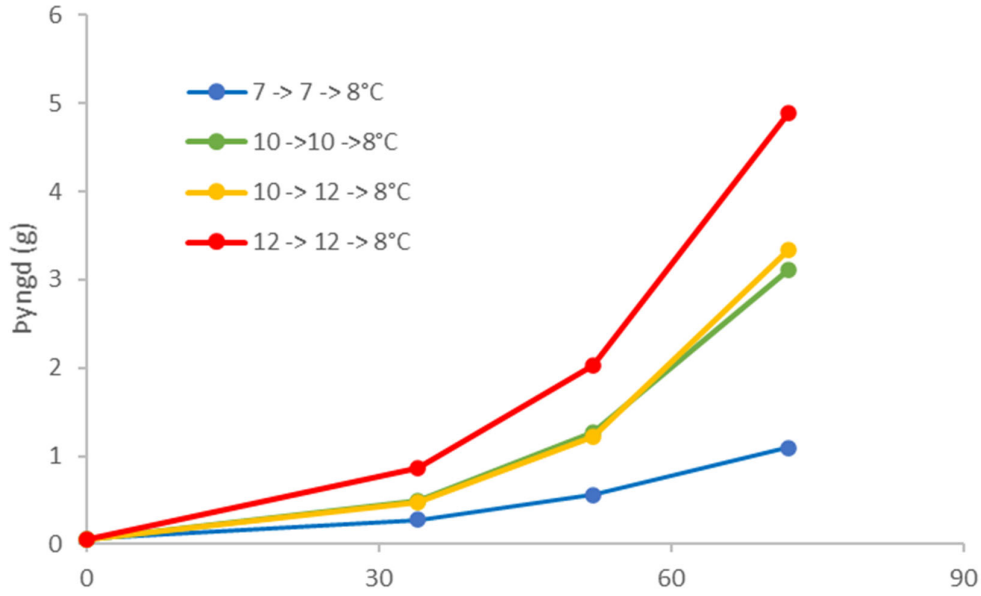
Raðgreiningar fóru seinna af stað en ráð var fyrir gert hjá AgResearch. Kemur þar aðallega til tafir sem urðu á Nýja Sjálandi vegna COVID. Vegna COVID varð AgResearch að loka rannsóknastofum í töluverðan tíma sem leiddi til að sýni söfnuðust upp og miklar tafir urðu á greiningum. Þannig töfðust greiningar á sýnum í þessu verkefni um 4 mánuði.

Nú er búið að raðgreina 100 sýni með þreifurum (primers) sem notaðir voru og smíðaðir fyrir lax. Hér er um bráðabirgðaniðurstöður að ræða. Nú liggur fyrir að vinna úr niðurstöðum raðgreiningar og athuga hversu vel þreifararnir virka í bleikju og hversu vel þeir ná að skýra breytileika í VGLL3.

Að því gefnu að vel takist til við greiningu á VGLL3 geninu verður farið í að safna 2000 sýnum úr fjölskyldum og þau send til AgResearch til greiningar. Gert er ráð fyrir að sú vinna geti klárast á árinu 2021. Þá verður hægt að segja til um hvort að VGLL3 genið sé jafn afgerandi fyrir erfðabreytileika í bleikju eins og í laxi.

Verkþáttur 2. Eldi á bleikjuseiðum við mismunandi hitaferla.

Í þessari eldistilraun eru bleikjuseiði alin við hitastig á bilinu 7 – 12°C og eins og við var að búast er mikill munur á vaxtarhraða milli hitastiga. Seiðin sem alin eru við 12°C vaxa hraðast og 72 dögum frá upphafi tilraunarinnar voru þau tæplega fimmfalt stærri en seiðin sem voru alin við 7°C. Seiðin verða einstaklingsmerkt í maí 2021 og í kjölfarið verða þau öll alin við sama hitastig fram að sláturstærð. Verkþáttur 2 er því stutt á veg kominn. RNA sýni hafa verið tekin með reglulegu millibili og bíða þau svokallaðrar Transcriptomics greiningar hjá Háskóla Íslands.



Mynd 4. Vöxtur bleikjuseiða við mismunandi hitastig í eldistilraun í Tilraunastöðinni.

Verkþáttur 3. Gelding bleikjuseiða með genþöggun.

Tilraun 1.

Í heild voru talsverð afföll á hrognastiginu. Mest voru afföllin á meðal hrogna sem böðuð voru með sterkustu lausninni af dnd-MO-Vivo og afföllin voru minnst í viðmiðunarhópnum (hópur 8) sem fékk ekki MO-Vivo. Niðurstöðurnar gefa vísbendingu um að styrkur efna og lengd böðunarinnar hafi neikvæð áhrif á lifun hrogna.

Hópur	Hrogn í upphafi	Dauð hrogn	Afföll %
Hópur 1	1600	472	29,5%
Hópur 2	1600	935	58,4%
Hópur 3	1600	1255	78,4%
Hópur 4	1600	320	20,0%
Hópur 5	1600	576	36,0%
Hópur 6	1600	1174	73,4%
Hópur 7	1600	1261	78,8%
Hópur 8	1600	229	14,3%

Niðurstöður tilraunar 1 ollu nokkrum vonbrigðum, því öll 10 g seiðin sem voru greind (1200 stk) voru með dæmigerða kynkirtla. Kynjahlutföll voru ekki marktækt frábrugðin hlutfallinu 1:1 og því er ljóst að böðun hrognanna skilaði ekki tilætluðum árangri.

Þó niðurstöðurnar hafi neikvæðar í fyrstu tilraun erum við bjartsýnir á að árangur náist við genþöggun á bleikju í náninni framtíð. Þessa bjartsýni byggjum við á því að frumniðurstöður úr nýjustu tilraunum hjá Hafró sýna að við höfum náð talverðum árangri í genþöggun á laxi. Nú er verið að beyta sömu aðferðum á bleikjuhrogn í tilraun 2.

Tilraun 2.

Einungis þrjár vikur eru liðnar síðan tilraun 2 hófst svo ekki er hægt að greina frá niðurstöðum á þessum tímapunkti.

Umræður

Í þessu rannsóknaverkefni er leitað leiða til að draga úr eða eyða vandamálum sem tengjast ótímabærum kynþroska bleikju. Þetta er gert eftir þremur leiðum:

Verkþáttur 1. Skimun fyrir *VGLL3* erfðabreytileika.

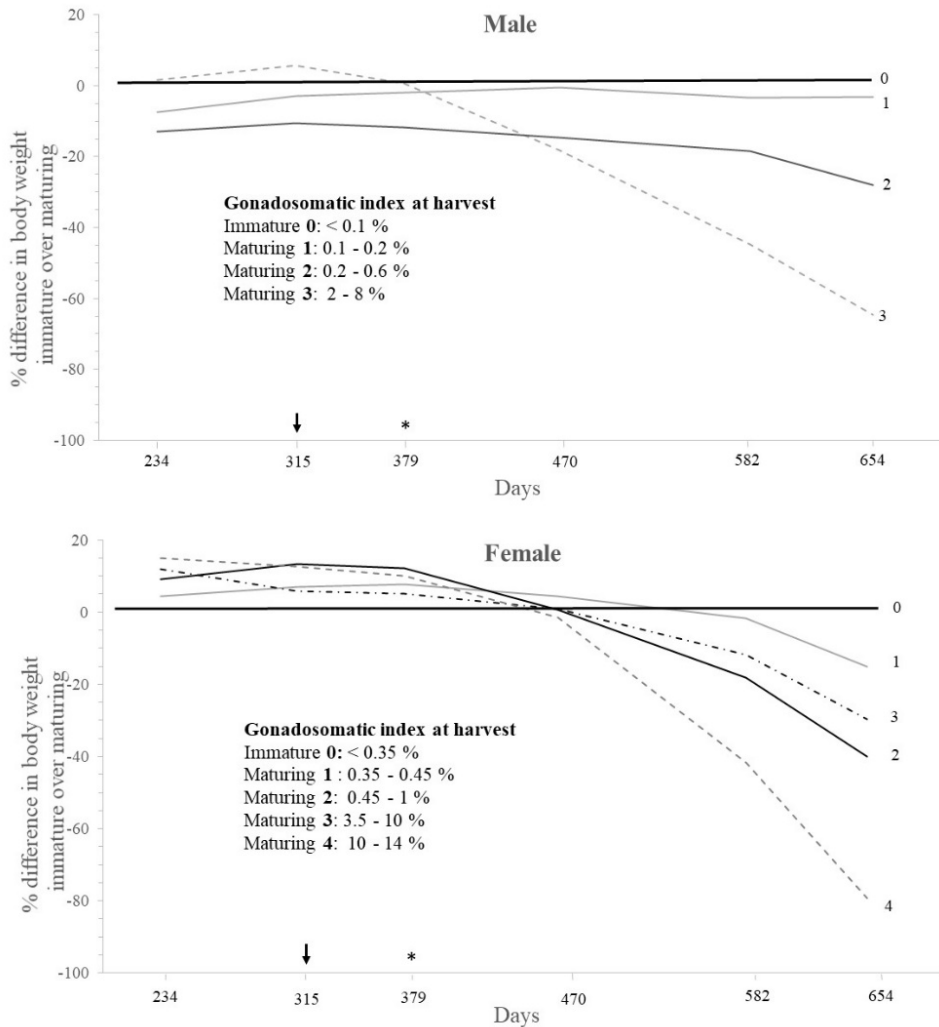
Með þessu verkefni er búið að ýta af stað rannsóknum sem miða að því að nýta sameindaerfðafræðilegar aðferðir í bleikjueldi. Þessar rannsóknir eru mjög tímabærar og má segja að rannsóknir á sviði sameindaerfðafræði séu töluvert langt að baki því sem gerist í laxeldi. Helgast það aðallega af því að umsvif og velta í bleikjueldi eru lítil í samanburði við laxeldi. Það er dýrt að hefja slíkar rannsóknir og er varla á færi einstakra bleikjueldisfyrirtækja. Ljóst er að slíkar rannsóknir þurfa stuðning úr rannsóknasjóðum til að styðja við þróun. Að einhverju leyti verður hægt að nýta og yfirfæra tækni úr laxeldi yfir í bleikjueldi. Samt mun þurfa ákveðna grunnvinnu til að aðlaga þessa aðferðafræði að bleikjueldi. Sé litið til bleikjueldis hjá öðrum þjóðum þá hafa Svíar þegar byrjað að innleiða sameindaerfðafræðilegar aðferðir í sínu bleikjueldi og er það gert í samvinnu við AgResearch í Nýja Sjálandi sem er sama fyrirtæki og við höfum samvinnu við.

Búið er að finna *VGLL3* breytileikann í erfðamenginu sem gerir það mögulegt að raðgreina verulegan fjölda fiska. Það tekur samt meira en sjö mánuði að komast að því hversu mikil áhrif *VGLL3* breytileikinn hefur á kynþroska bleikju. Reynist *VGLL3* hafa veruleg áhrif á aldur við kynþroska má nýta slíkar upplýsingar inn í kynbótakerfi bleikju og ala þannig upp kynslóð sem verður seinna kynþroska og minnka þar með framleiðslutjón sem hlýst af kynþroska.

Verkþáttur 2. Eldi á bleikjuseiðum við mismunandi hitaferla.

Uppsetning verkþáttar 2 byggir á nýlegri rannsókn sem unnin var hjá Hafrannsóknastofnun í samstarfi við Háskólann á Hólum og Samherja. Í þeirri rannsókn kom í ljós að ótímabær kynþroski er verulegt vandamál í íslensku bleikjueldi og vandamálið er meira eftir því sem hitinn er hærri á seiðastiginu. Áður hafði verið talið kynþroski hefði einungis slæm áhrif á vöxt þegar vöxtur kynkirtla er orðinn það mikill að hann tekur orku frá öðrum vexti og kynþroskinn fer að bitna á gæðum afurðarinnar. Í rannsókninni kom hins vegar í ljós að það dregur verulega úr vexti bleikju löngu áður en kynkirtlarnir hafa stækkað að einhverju ráði og þannig má gera ráð fyrir stór hluti eldisbleikju sé verulega vaxtarskertur. Þetta á sérstaklega við um hrygnurnar.

Hlutfall kynkirtla af heildarþyngd (GSI) í ókynþroska bleikjuhrygnu er venjulega undir 0,35%. Ofangreind rannsókn sýndi að þær hrygnur sem mælast með GSI frá 0,35 – 0,45% við slátrun eru að jafnaði um 10% smærri en þær hrygnur sem hafa ekki hafið undirbúning fyrir hrygningu (GSI < 0,35 %). Myndin hér fyrir neðan sýnir hlutfallslegan mun á milli hópa á mismunandi stigum kynþroska við slátrun í samanburði við ókynþroska fiska. Myndin sýnir einungis fiska sem voru aldir við 10°C á seiðastigi, en sambærilegar niðurstöður fengust í þeim hópum sem aldir voru við 12°C. Þarna sést glögglega að eftir því sem kynkirtlarnir eru stærri við slátrun er fiskurinn stærri á seiðastiginu. Dæmið snýst hins vegar við þegar fiskurinn hefur náð sláturstærð.



Mynd 5. Hlutfallslegur stærðarmunur ókynþroska bleikju (immature 0) og bleikju á mismunandi stigum kynþroska eftir slátrun (maturing 1 – 4).

Eins og áður sagði er verkþætti 2 ekki lokið, en framundan eru spennandi tímar. Eitt af markmiðum verkþáttarins er að staðfesta niðurstöðu undangenginnar rannsóknar sem lýsir sambandi hitastigs á seiðastigi og snemmbúins kynþroska. Helsta markmið verkþáttarins er hins vegar að nota sameindaerfðafræðilega aðferð, *transcriptomics*, til að finna á hvaða aldrusskeiði hitastigið hefur mest áhrif á kynþroskaaldur. Transcriptomics tækni veitir víðtæka sýn á það hvaða frumferli eru virk og hver eru í dvala og gerir okkur kleift að rannsaka hvernig tjáning gena breytist með aldrinum við mismunandi hitastig. Það gefur e.t.v. svar við því hvort það sé óhætt að nýta jarðvarma til að auka vöxt bleikjuseiða, t.d. eftir ákveðinn tíma þar sem kynþroskaaldur hefur verið ákveðinn. Það er eftir miklu að slægjast, því eins og sést á mynd 4 er upp undir fimm faldur munur á seiðavexti við 12°C í samanburði við 7°C. Það þarf því varla

að fjölyrða um kosti þess að nýta jarðvarma í bleikjueldi ef við gefum okkur að hann hafi ekki í för með sér kynþroska síðar í eldisferlinu.

Verkþáttur 3. Gelding bleikjuseiða með genapöggun.

Í dag er kynþroski meginþátturinn sem stendur í vegi fyrir því að við getum nýtt jarðvarma til að ná fram auknum vaxtarhraða í íslensku bleikjueldi. Í verkþætti 3 prófum við aðferð til að losna alfarið við kynþroska án þess að hafa þau neikvæðu áhrif á fiskinn sem þrilitnun hefur. Það er ljóst að það myndi valda grundvallarbreytingu á forsendum eldisins.

Á árum áður var reynt að draga úr áhrifum kynþroska með því að gera bleikjur þrilitna með þrýsti- eða hitameðferð á nýfrjóvnguðum hrognum, en vegna ýmissa vandkvæða sem fylgja slíkum aðferðum var fljótlega horfið frá þeim. Draumurinn um að útrýma kynþroska í bleikjueldi var hinsvegar endurvakinn fyrir skömmu þegar Hafrannsóknastofnun í samstarfi við Háskólann í Maryland í Bandaríkjunum (UMBC) hófu rannsóknir á nýrri aðferð sem kallast genapöggun.

Þó þróun aðferðarinnar sé stutt á veg komin hefur þegar náðst góður árangur á tilraunaskala, sérstaklega á sebrafiskum og regnbogasilungi. Á undanförunum mánuðum hefur einnig tekist að framleiða nokkuð af kynlausum laxaseiðum í Bandaríkjunum og síðustu mælingar á kviðpokaseiðum hjá Hafrannsóknastofnun benda til þess að við höfum náð góðum árangri í laxi. Sá árangur náðist eftir ítrekaðar prófanir á ýmsum þáttum eins og skolun hrogna fyrir böðun, efnastyrk í böðunarferlinu og böðunartíma. Að auki höfum við þurft að breyta aðferðafræðinni í tengslum við sótthreinsun hrogna eftir frjóvgun, því hrognin eru sérstaklega viðkvæm fyrir sótthreinsiefnum eftir böðun með MO-Vivo. Kynningarmyndband um genapöggunartilraunir hjá Hafró má finna með því að smella á tengilinn hér fyrir neðan:

<https://www.youtube.com/watch?v=L8HXlx7UGYs>

Í þessu verkefni var aðferðin prófuð í fyrsta sinn á bleikju, en eins og greint var frá í niðurstöðum hafði meðhöndlun hrogna með Mo-Vivo ekki tilætlaðan árangur þar sem allur tilraunafiskurinn myndaði dæmigerða kynkirtla. Frá því að tilraunin var framkvæmd hafa orðið talverðar framfarir í aðferðafræðinni við genapöggun laxahrogna, og ýmislegt bendir til þess að hægt sé að ná betri árangri með því að bæta skolunarferlið, stytta böðunartímann auk fleiri þátta.

Heimildir

Barson, N.J., Aykanat, T., Hindar, K., Baranski, M., Bolstad, G.H., Fiske, P.H., Jacq, C., Jensen, A.J., Johnston, S.E., Karlsson, S., Kent, M., Moen, T., Niemelä, E., Nome, T., Næsje, T.F., Orell, P., Romakkaniemi, A., Sægvog, H., Urdal, K., Erkinaro, J., Lien, S., Primmer, C.P. (2015). Sex-dependent dominance at a single locus maintains variation in age at maturity in salmon. *Nature* 528, 405–408 doi:10.1038/nature16062

Bett, J.R. (1979). *Environmental factors and growth*. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds.), *Fish Physiology. Bioenergetics and growth*, vol. VIII. Academic Press, New York, pp. 599-675.

Gavery, M.R., Roberts, S.B. (2017). *Epigenetic considerations in aquaculture*. PeerJ 5:e4147; DOI 10.7717.

Johnston, I.A., Cole, N.J., Abercromby, M., Vierira V.L.A. (1998). Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring. *J. Exp. Biol.* 201, 623-646.

Kuparinen, A., Cano, J.M., Loehr, J., Herczeg, G., Gonda, A., Merilä, J. (2011). Fish age at maturation is influenced by temperature independently of growth. *Oecologia* 167, 435-443.

Pavlov, D.A., Moksness E. (1997). Development of the axial skeleton in wolffish, *Anarhichas lupus* (Pisces, Anarhichadidae), at different temperatures. *Environ. Biol. Fishes* 49, 401-416.

Pittman, K., Yúfera, M., Pavlidis, M., Geffen, A.J., Koven, W., Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Tandler, A. (2013). Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world. *Reviews in Aquaculture* 5, 224-267.

Taranger G.L., Carrillo M., Schulz R., Fontaine P., Zanuy S., Felip A., Weltzien F., Dufour S., Karlsen O., Norberg B., Andersson E. & Hansen T. (2010) Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 483–515.



HAFRANNSÓKNASTOFNUN

Rannsókn- og ráðgjafarstofnun hafs og vatna