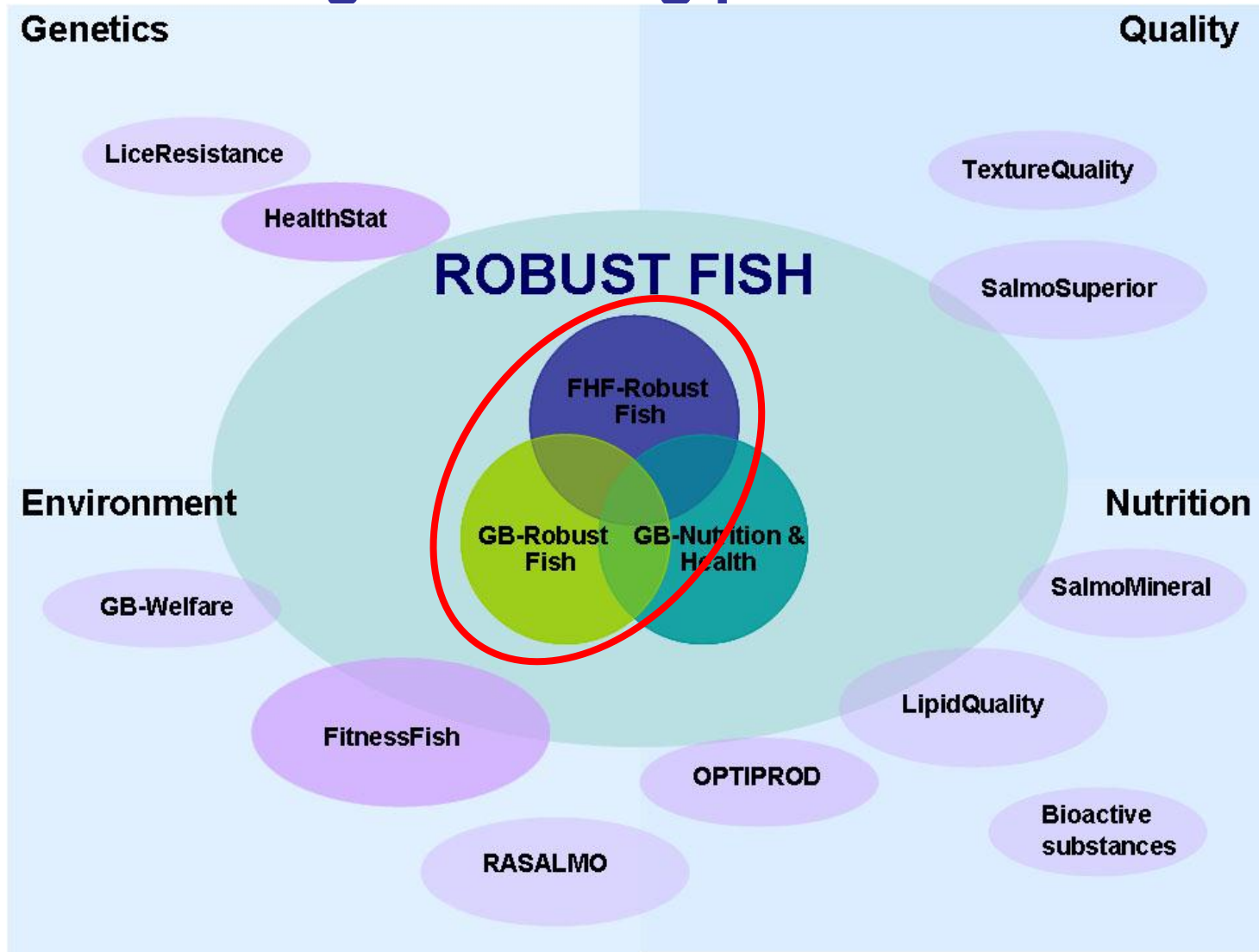


Kan vi finne markører som identifiserer robust fisk i tidlig produksjonsfase?

Sven Martin Jørgensen & Harald Takle

Nofima Marin, Ås

Strategisk satsing på robust fisk



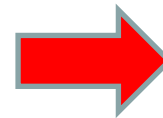
Hva er en Robust Fisk?

En robust fisk har **sterk sykdomsmotstand** mot virus, bakterier og parasitter, god evne til å **takle ulike miljøendringer**, samt evne til å **kombinere rask vekst med normal utvikling** av kroppens organsystem.

- **En robust fisk vil yte bedre:**
- Raskere vekst med bedre fôrutnyttelse
 - Mer motstandsdyktig mot sykdom
 - Bedre velferd

Hvordan forbedre robustheten?

- Avl
- Oppdrettsmiljø
- Ernæring
- Produksjonsstrategi



MARKØRER!

Hvordan måle robusthet i tidlig livsfase?

- Tilvekst - trolig assosiert med robusthet
- Mottagelighet for sykdom - trolig dårlig markør

- Målsetning:
 - Karakterisere egenskaper hos pre-smolt som er assosiert med robusthet
 - Bygge en kunnskapsbase for utvikling av tester og markører for robusthet

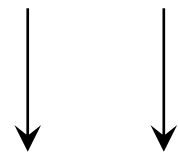
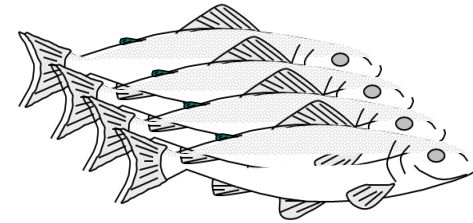
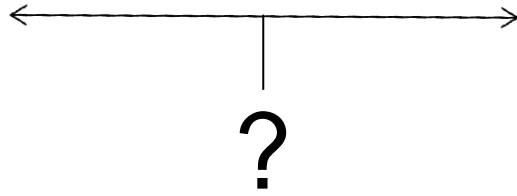
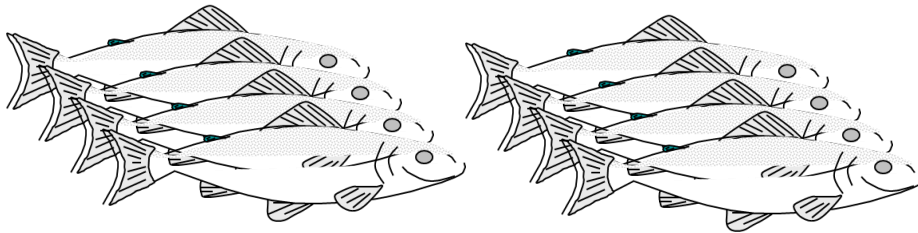
Betydning for industrien

Markører for robusthet er viktig:

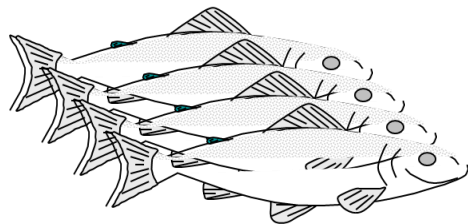
- ✓ Kan fungere som anvendt redskap for å karakterisere robusthet til fiskepopulasjoner
 - Sikre god oppfølging av dårlige smolt-grupper
 - Hindre at svært dårlige smolt-grupper blir satt i sjø
- Forbedre produksjonsbetingelser
 - Modeller og markører grunnlag for standardisert test for relevante egenskaper:
 - Miljø
 - Ernæring
 - Genetikk

Robust

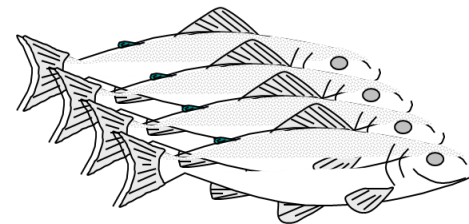
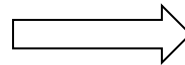
Normal



R N



N



R

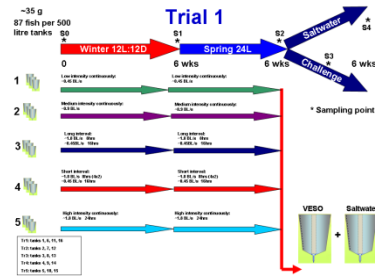
Utvikle verktøykasse i verdensklasse!

-tilnærming til system biologi

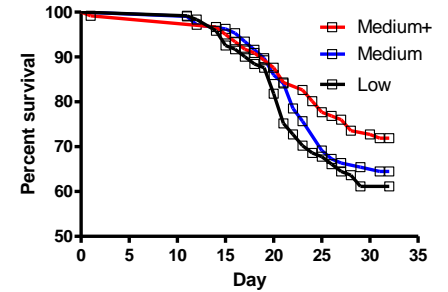
Fysiologi/Respirometri



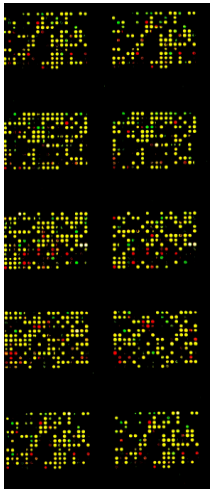
Treningsforsøk



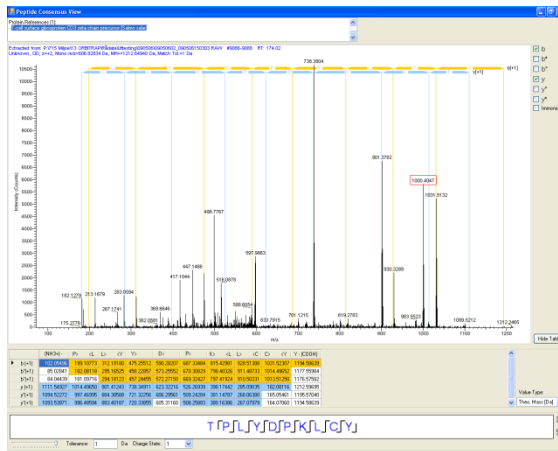
Utfordringstester



Genomikk



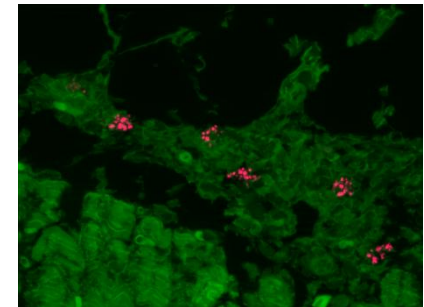
Proteomikk



Metabolomikk



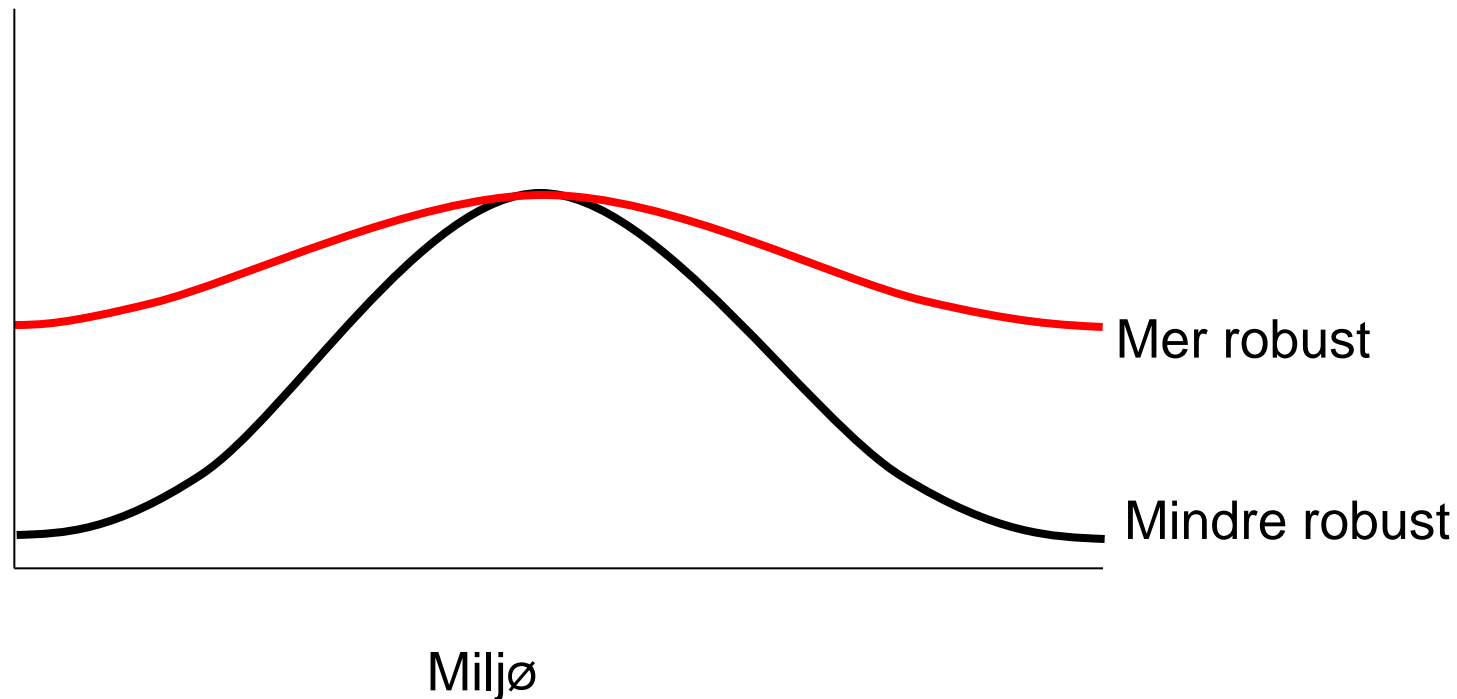
Histologi



VEGF i epikard

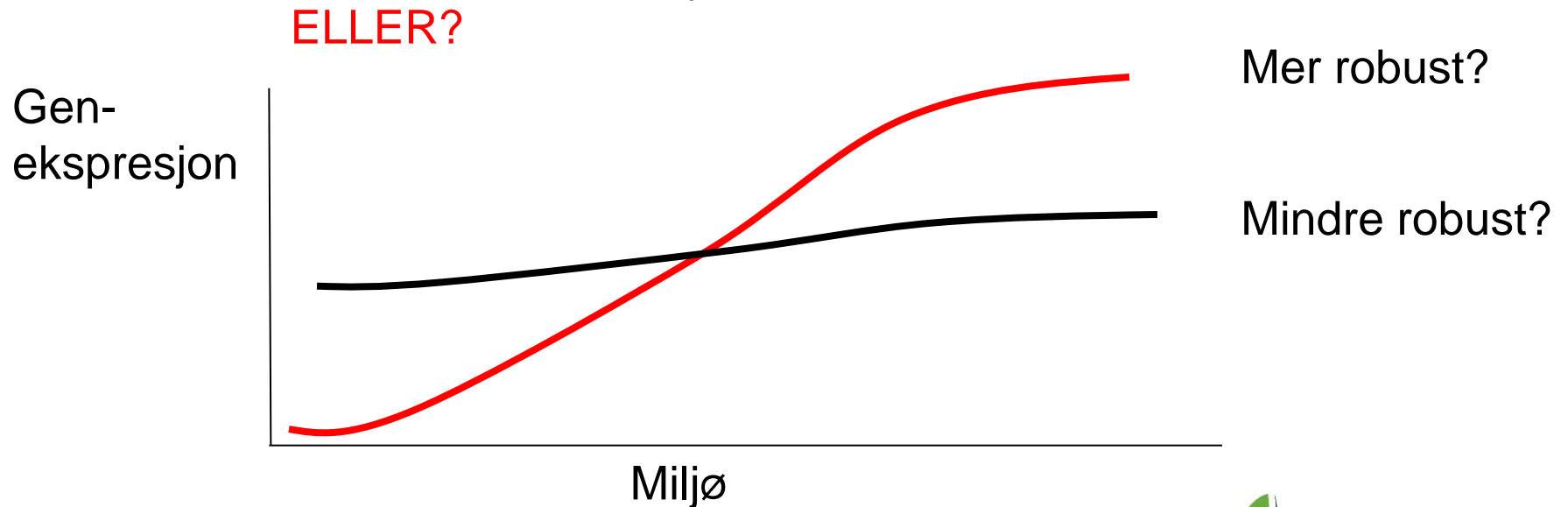
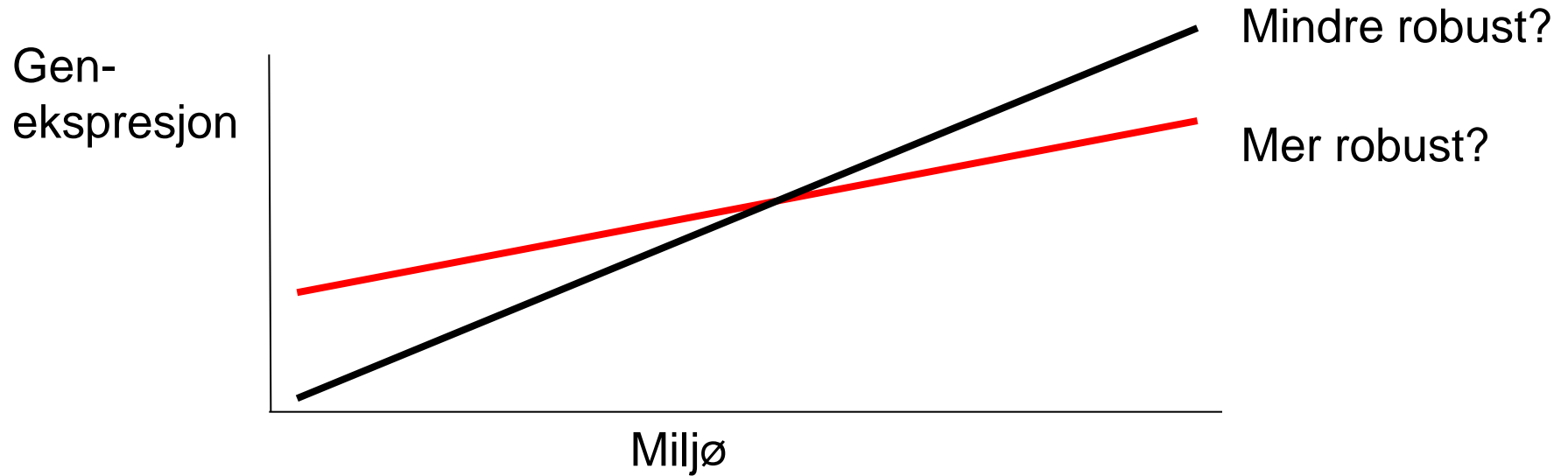
Robusthet er evne til å opprettholde homeostase under skiftende betingelser

Fenotype
eks. vekstrate



=Bedre prestasjon ved stress og sykdom!
=Jevnere prestasjoner under ulike miljøforhold

Underliggende genekspresjonsmønstre?



Underliggende genekspresjonsmønstre?

- Robust fisk viser muligens mindre varierende ekspresjonsrespons mot miljøendringer for noen gener, og/eller mer varierende respons mot miljøendringer for andre gener.
- Er det en assosiasjon mellom varians i genekspresjonsrespons og robusthet?

- Utvalg av genekspresjonstester for robusthet!
- Kunnskap om involverte gen-pathways

Fokusområder

- Hjertekapasitet og sirkulasjonssystemet
- Immunkapasitet
- Skjelettsystemet og mineralstatus
- Osmoregulering

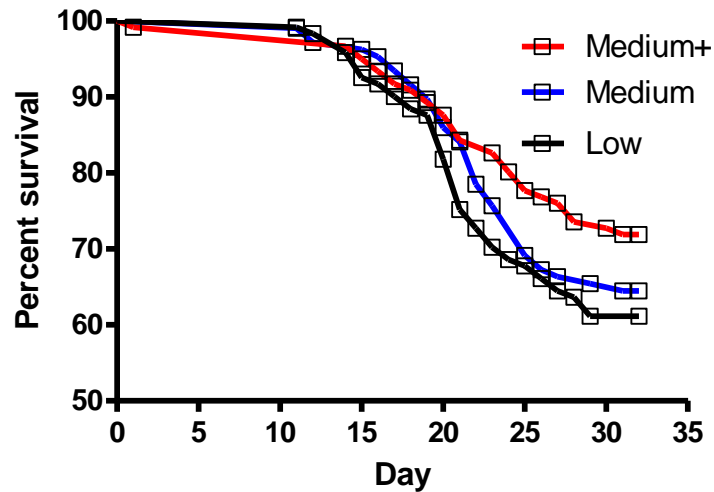
Modellsystem

- Trening, svømmekapasitet, temperatur, ernæring, injeksjonsmodeller
- Trening, svømmekapasitet, sykdom, ernæring, injeksjonsmodeller
- Trening, temperatur, ernæring
- Trening, RAS-miljø

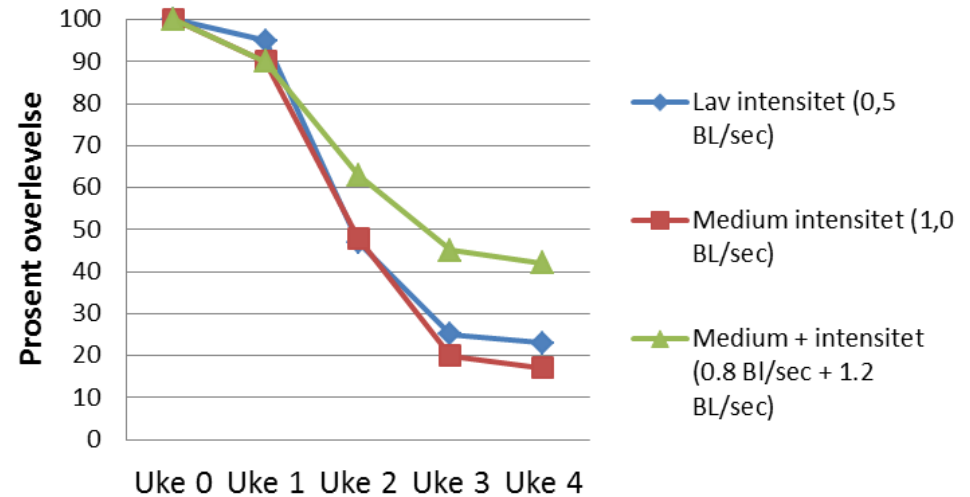
Aerobisk trening som modell for robusthet

Uavhengige treningsforsøk har vist at aerob intervalltrening øker smoltens robusthet og vekst

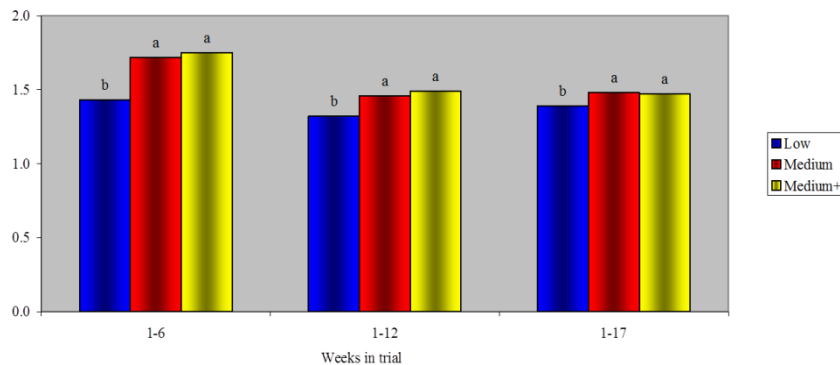
IPN smittetest



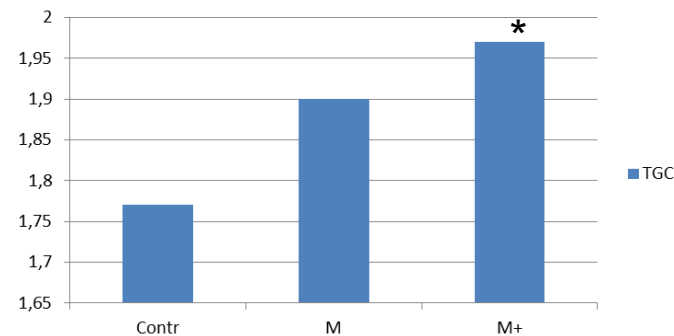
Naturlig utbrudd av vintersår



Thermal Growth Coefficient

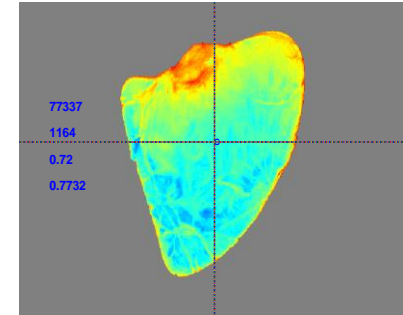


TGC



Hjertekapasitet og sirkulasjonssystemet

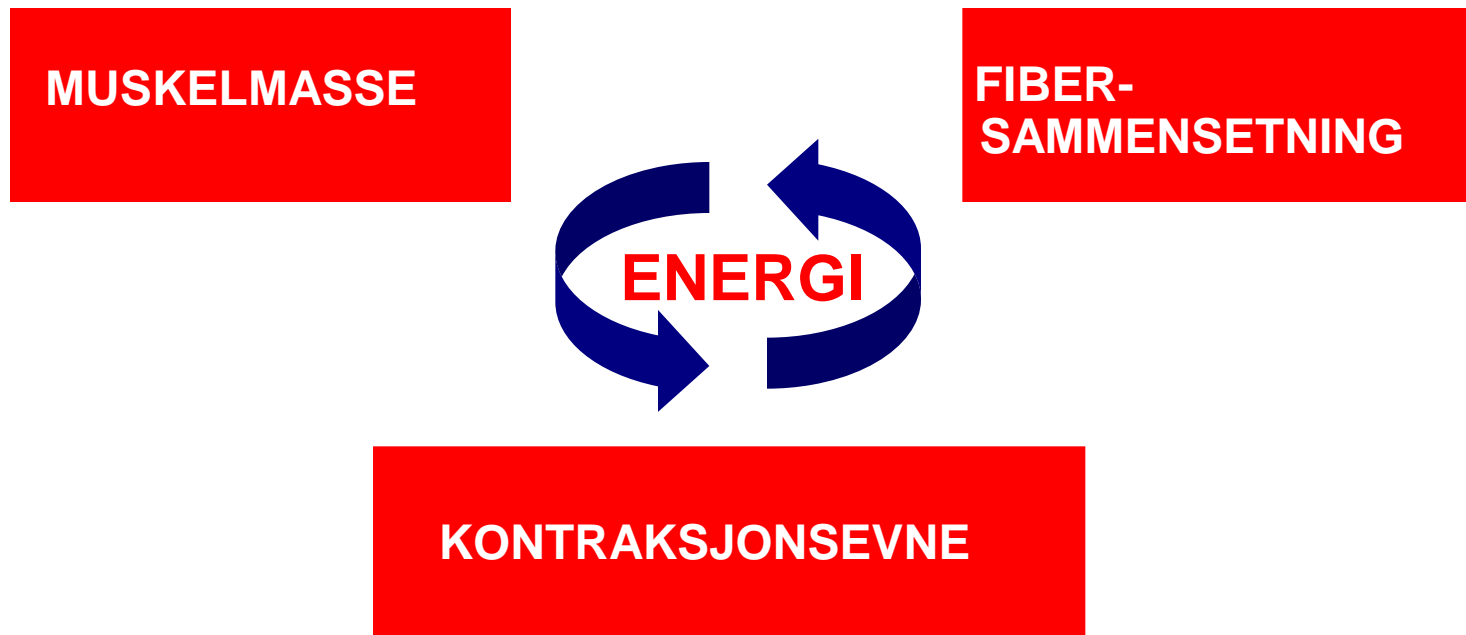
- Markører:
 - Hjertemorfologi (lite egnet hos liten fisk)
 - Respiometri: oksygenforbruk ved belastning (tidkrevende)
 - Molekylære markører
 - Metabolitter
 - Proteiner
 - Gener



Robust fisk krever effektivt hjerte!

HJERTEKAPASITET

V_{O_2} = minuttvolum = hjerterytme x slagvolum



Etablert markørkart for hjertefunksjon hos fisk

ENERGI

- AMPK α -P (protein)
- AMPK α 1

Mitokondriell biogenese

- PGC-1 α
- Mt-ratio

Fettomsetning /transport

- PPAR α,β
- CPT1 α
- ACO
- ACC
- LPL

Glukoseopptak /omsetning

- GLUT4
- Hexokinase II
- PDHB
- PDK3
- Pygm

Muskelmodellering

- MMP9&13
- Myosin
- Actin
- Troponin
- MEF2c

Cellulært stress

- iNOS (IHC/mRNA)
- HSP70 mfl

Kontraktilitet

- SERCA2
- Calseq1
- DHPR
- RyR
- Fkbp1b

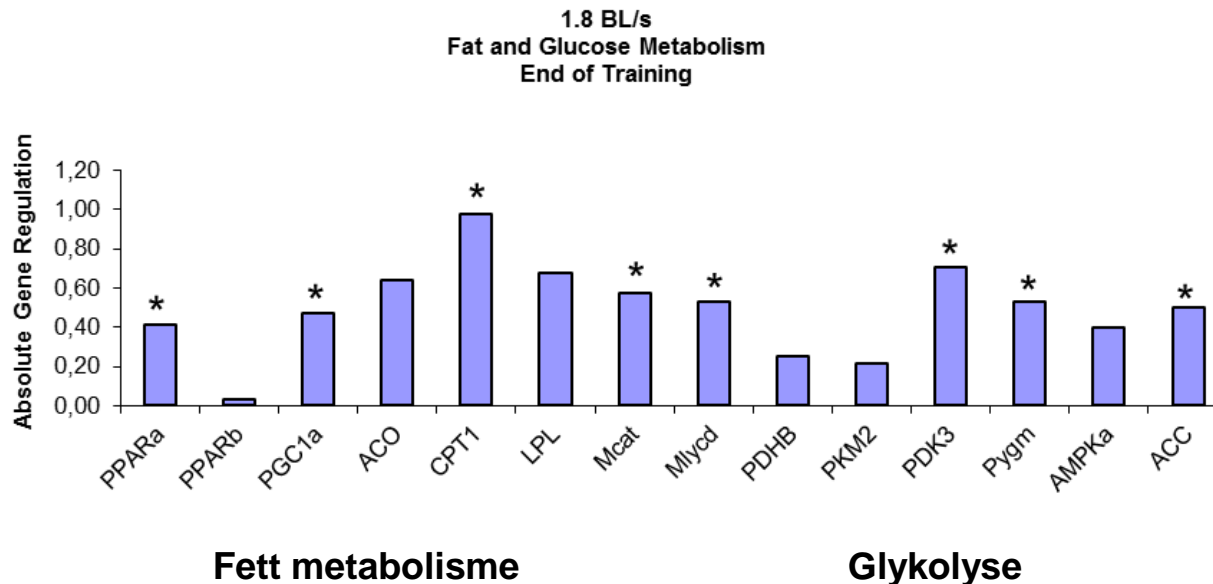
Oksygentransp.

- EPO
- EPOr
- VEGF

Markører for kardiovaskulær robusthet

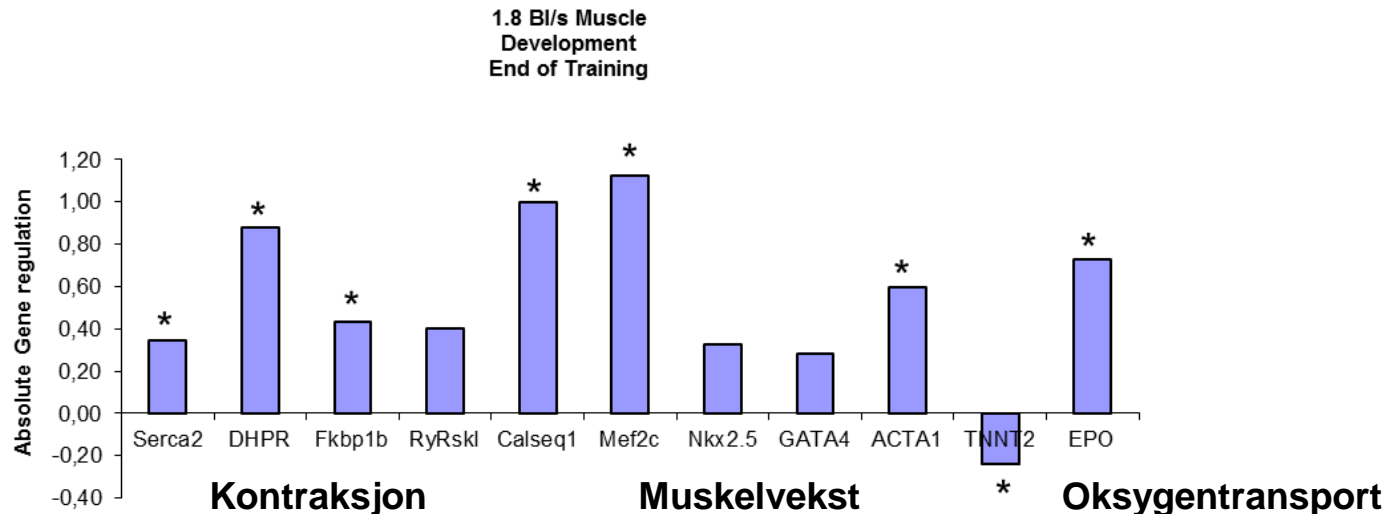
Trening fører til et mer effektivt hjerte:

- Øker metabolsk kapasitet
 - Effektiv energimobilisering ved ekstra behov



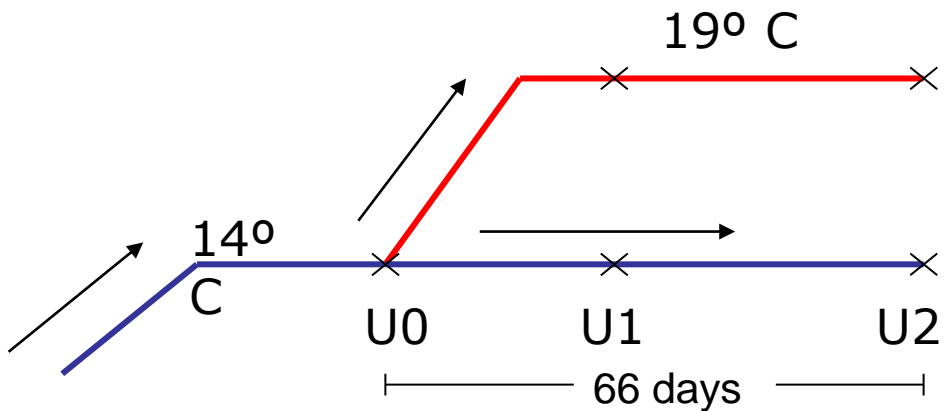
Trening fører til et mer effektivt hjerte

- *Større metabolsk kapasitet*
 - Effektiv energimobilisering ved ekstra behov
- Forbedret kontraksjonsevne
 - Muliggjør raskere slagfrekvens
- Stimulerer hjertemuskelvekst
 - Større hjertemuskel medfører større slagvolum
- Øker hjertets produksjon av EPO
 - Stimulerer dannelse av røde blodceller og dermed transport av oksygen



Robusthetsmarkører også evaluert hos laks eksponert for høye sjøtemperaturer

Forsøksdesign:



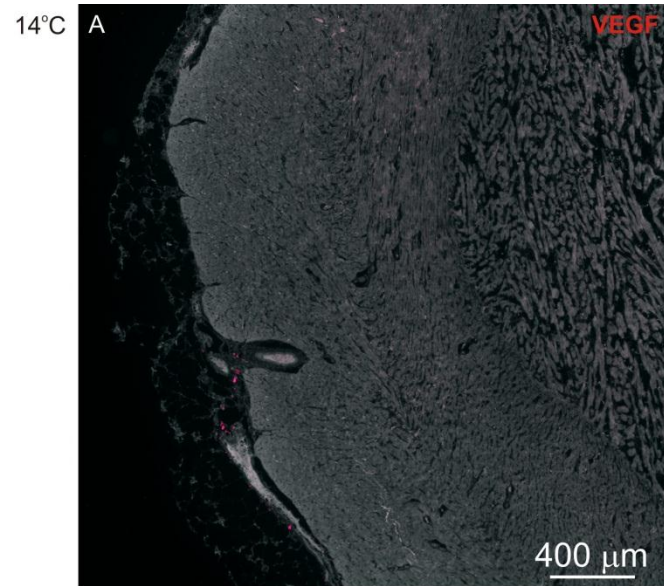
Høy sjøtemperatur førte til anemi

Hvordan påvirker høy temperatur hjertet?

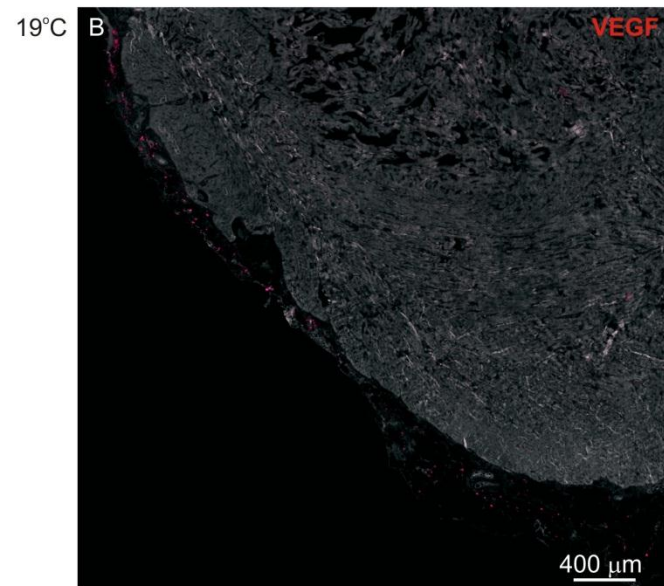
Startvekt 2.0 kg \pm 0.4, n=31-35, N=340

Fisk fôret til *Ad libitum* 4 t før sampling,
100 % O₂

Immunohistologisk karakterisering av høytemp hjerter

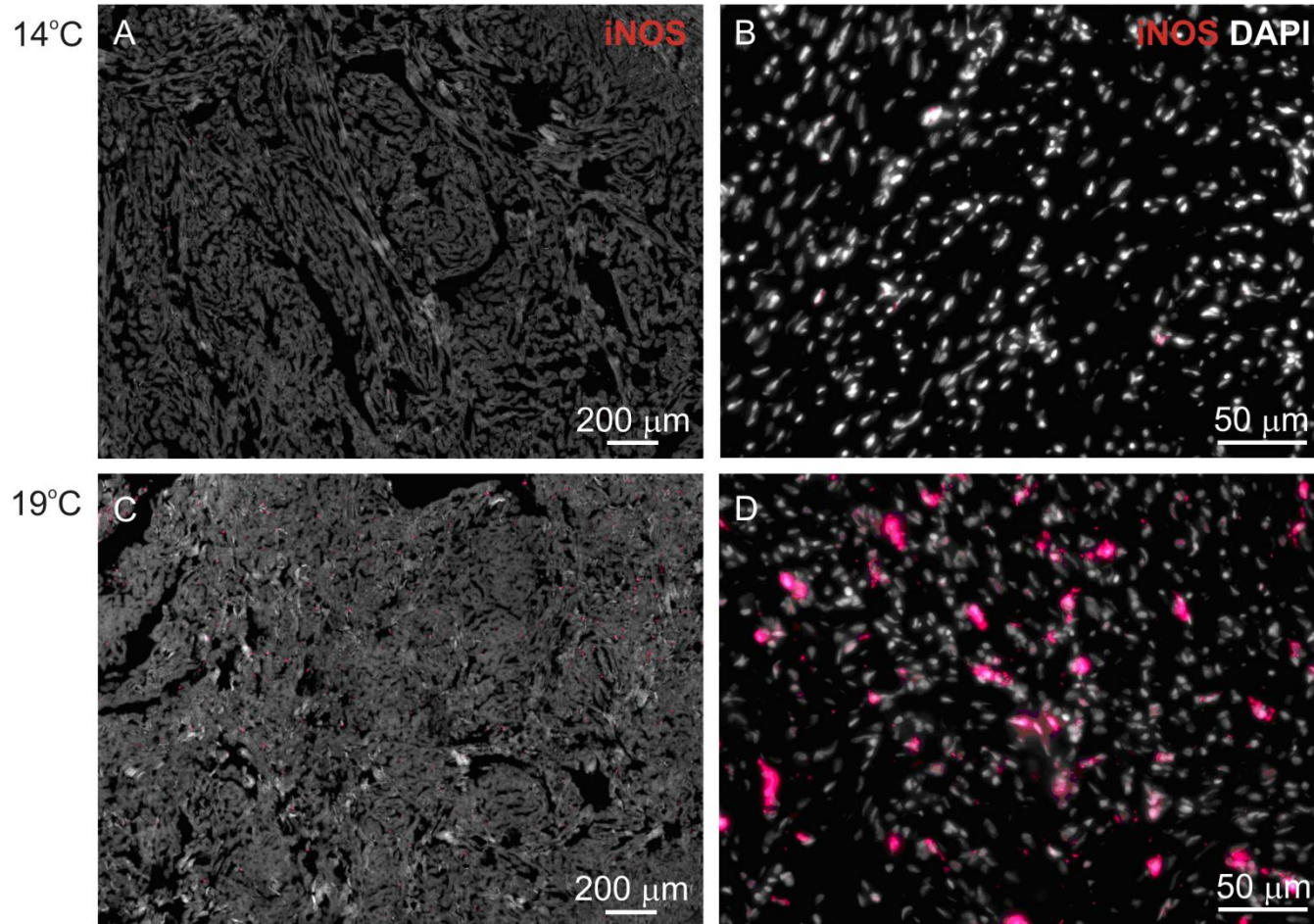


- 14 °C: Tydelig skille mellom kompakt myokardium og spongiosa.
- VEGF uttrykt ved eksisterende kapillærer i epicard



- 19 °C: Uorganisert struktur i kompakt myokardium og mindre tydelig skille mot spongiosa. Generell nedbryting av hjertemuskulaturen.
- VEGF uttrykt i hele epicard.

Spong



- 14 °C: iNOS nesten ikke detekterbart i kompaktlaget og spongiosa
- 19 °C: iNOS uttrykt i uorganiserte deler av kompaktlaget. Fleste celler i spongiosa uttrykker iNOS
- iNOS aktivering gir ROS, oksidativt stress og vevsnedbrytelse
- iNOS aktivert gjennom Interleukiner og TNF α

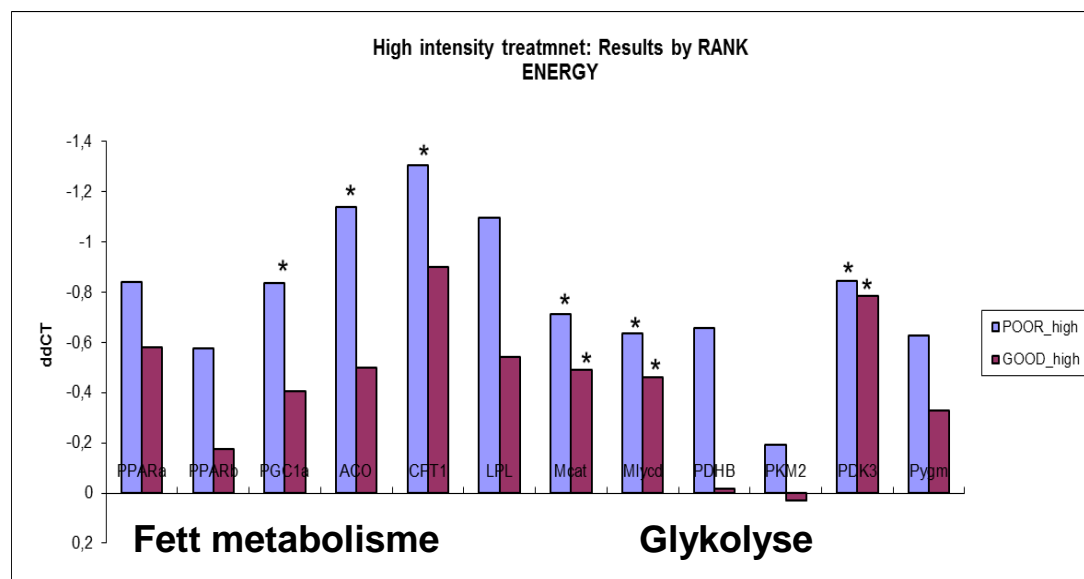
Gode svømmere er mer robuste enn dårlige svømmere?

Metode:

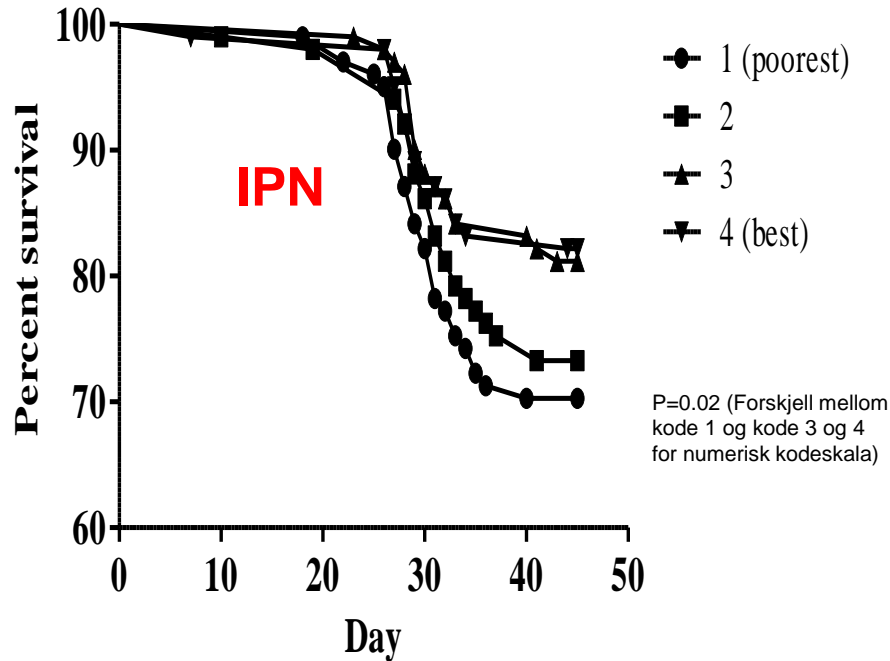
- Sorterer fiskepopulasjonen basert på evne til å svømme mot høy strøm
- Måler arbeidsbelastning på hjertemuskulaturen

Hjertet til dårlige svømmere må bruke mer energi på å pumpe blod under hard svømming sammenliknet med gode svømmere

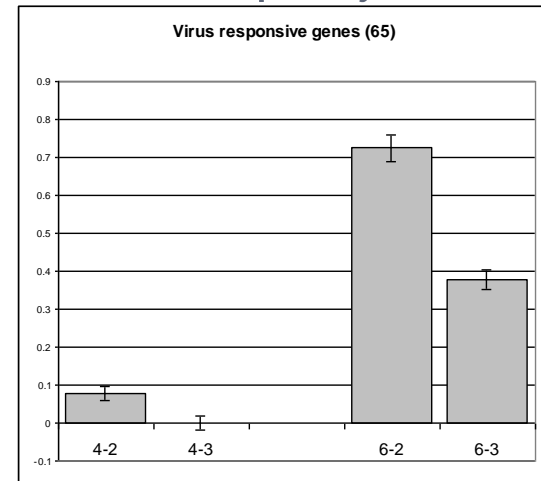
- Muligens er trening ekstra viktig for dårlige svømmere



Lavere motstandsdyktighet mot IPN virus hos dårlige svømmere



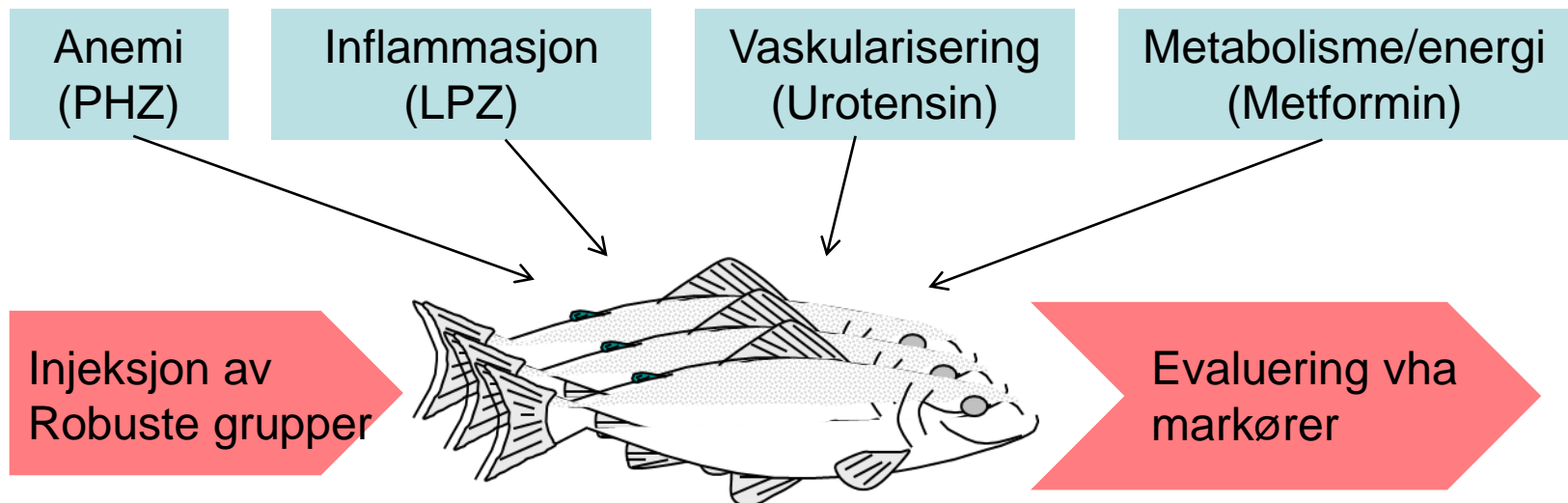
VRG ekspresjon



- 10-15 % bedre overlevelse hos gode svømmere!
- Virus-responsive gener lavere uttrykt i gode svømmere hos fisk som overlevde smittetesten
- Virus/infeksjonspress lavere hos gode svømmere?
 - Mekanisme ukjent

Injeksjons-challenge modeller for Robusthet

- Modeller som simulerer relevante fysiologiske utfordringer i merden
- Utfordringer som induserer målbare, kontrasterende responser i ulike robusthets grupper
- Generalisert/målrettet, ikke-patologisk
- Standardiserte betingelser, ikke skadelig for fisken, unngå smittetester (velferd, tid, kostnad etc)
- Optimalisering modeller og markører

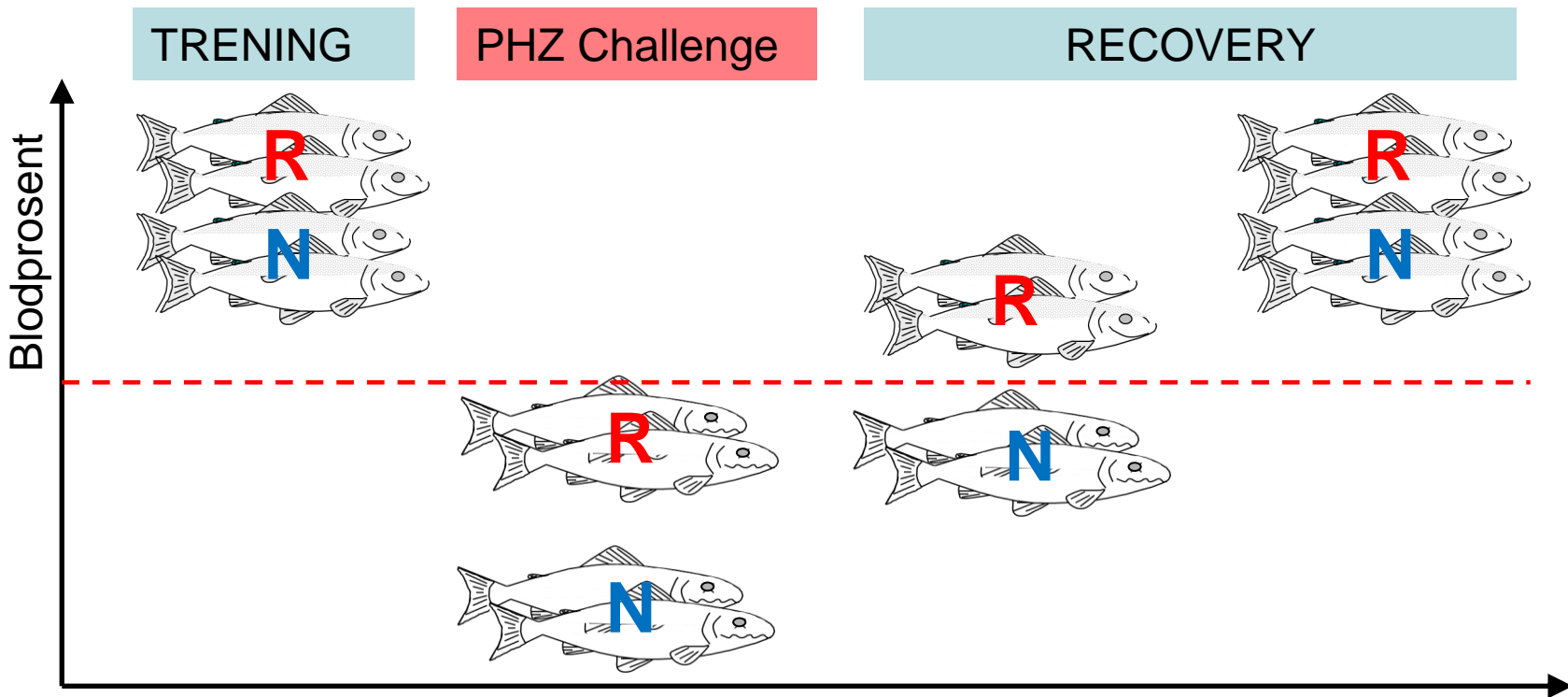


Injeksjonsmodeller

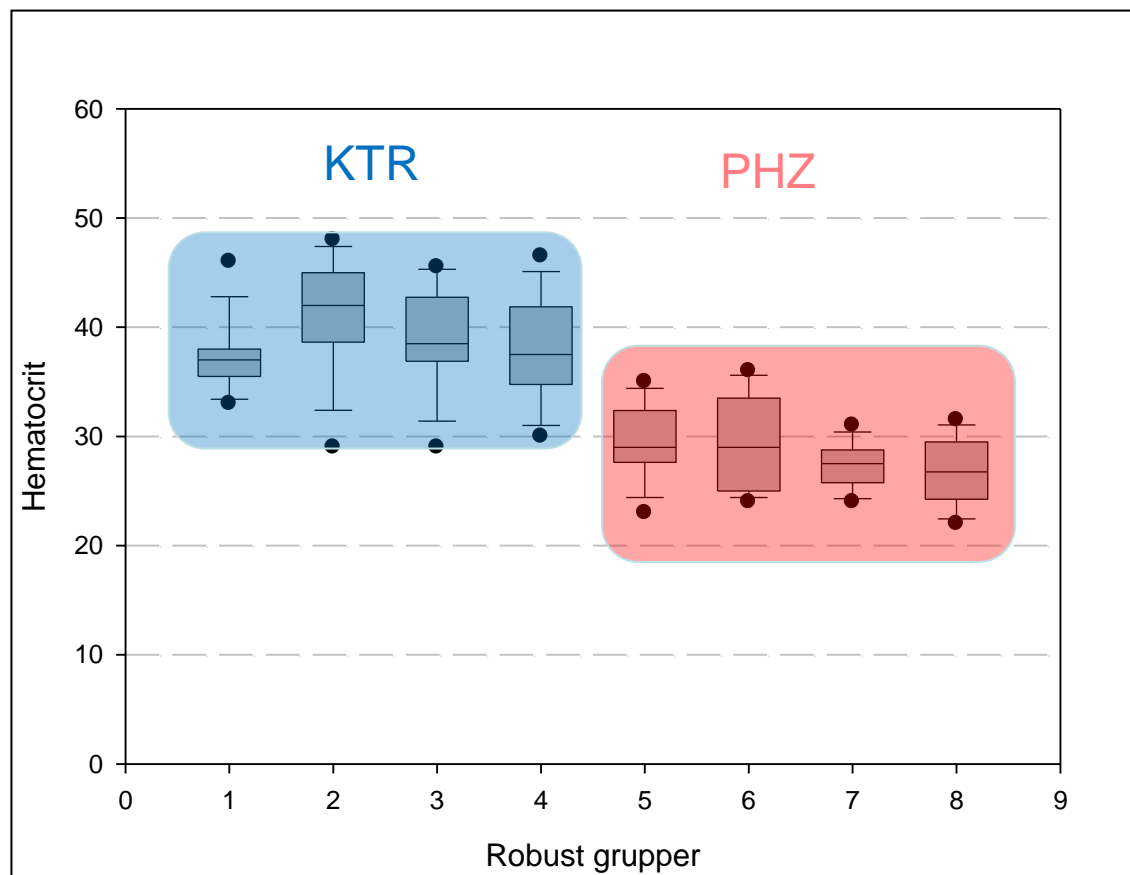
- Pilot-forsøk:
 - Evaluering effekter/markører
 - Optimalisering dose/tidsuttak/vev etc
- Forsøk på trente/utrente & høy/lav-robuste grupper:
 - Anemi modell
 - PHZ, ødelegger røde blodceller
 - Inflammasjons modell
 - LPZ, lipopolysakkarid + zymosan, endotoksin

Anemi (PHZ) vs Robusthet

- Simulerer patologisk tilstand under infeksjonssykdommer
- Optimale blodverdier fysiologisk viktig
- Trening (økt robusthet) stimulerer blodparametre
 - Økt hematokrit i trent vs utrent laks



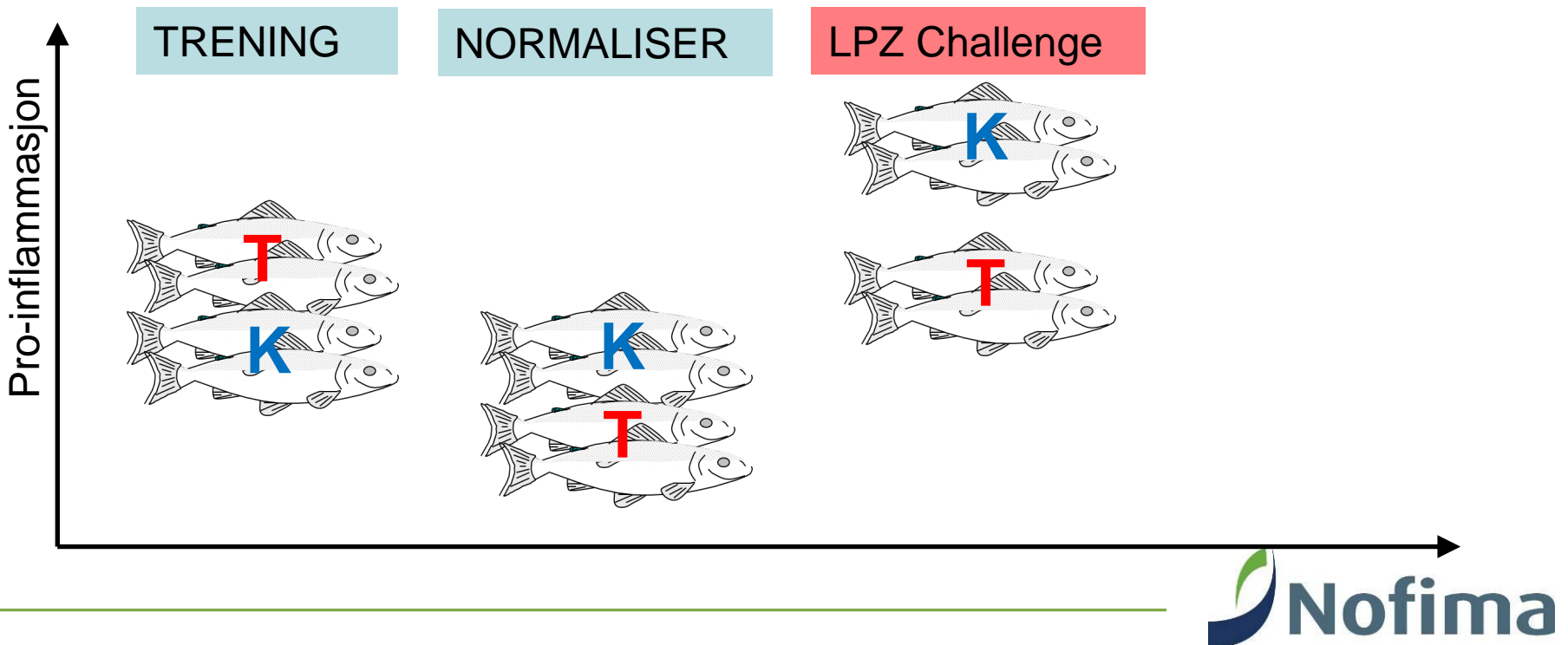
Anemi (PHZ) vs Robusthet



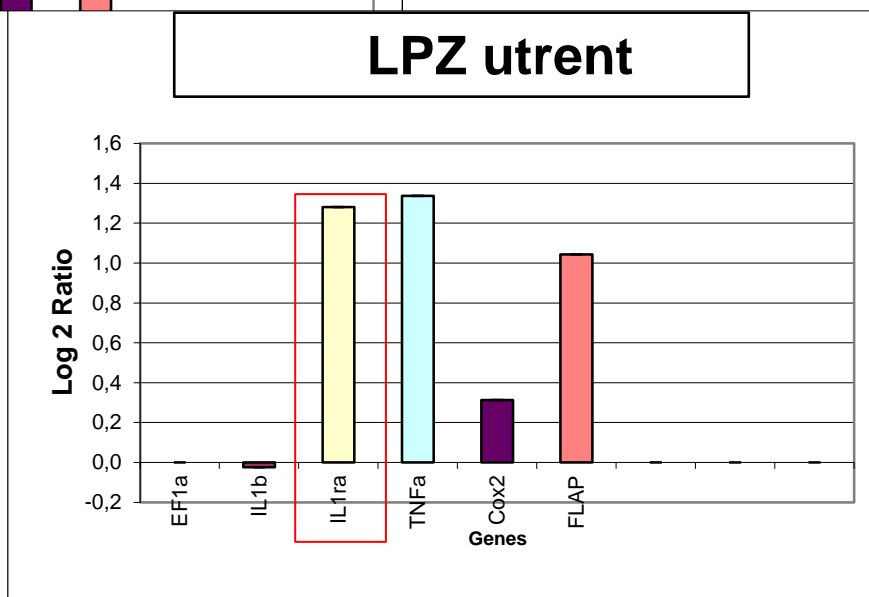
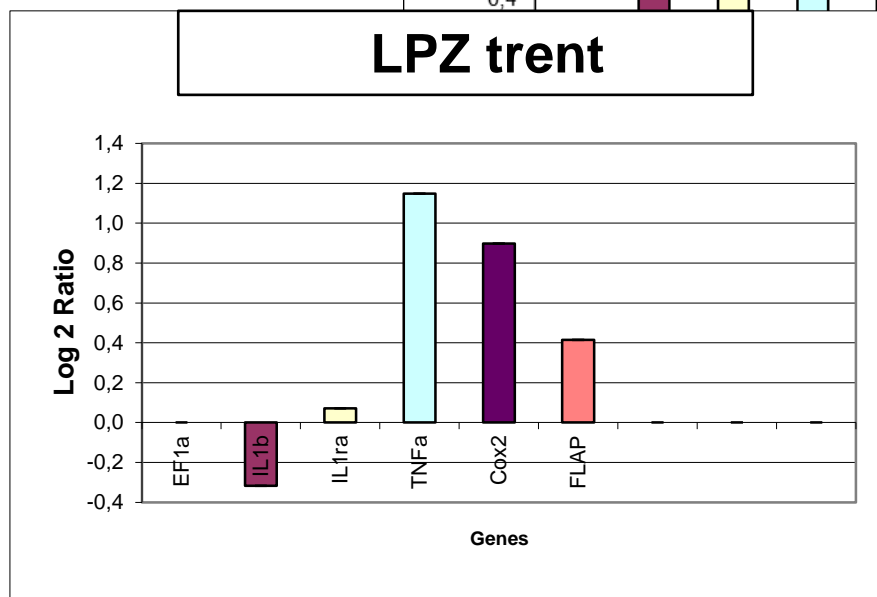
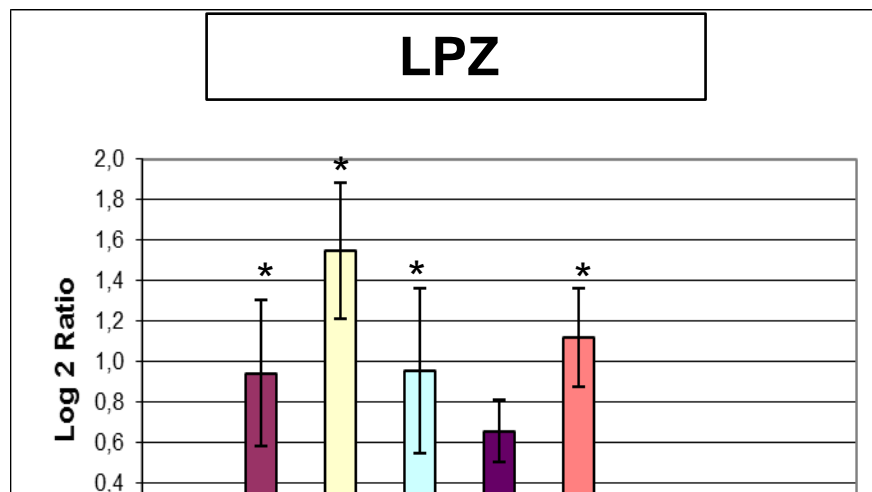
- Hct - høy individvariasjon
- Molekylære analyser (microarrays, EPO (qPCR))

Inflammasjon (LPZ) vs Robusthet

- Simulerer mulig patologiske/immunologiske responser ved infeksjonssykdommer (lav-virulente)
- Implikasjoner metabolske (diett), kardiovaskulære og fysiologiske (stress) responser
- Trening (økt robusthet) påvirker anti/pro-inflammatoriske responser
- Anti-inflammatorisk profil viktig for kardiovaskulær helse



Inflammasjonsmodell:



Oppsummering

- Vi har identifisert spesifikke markører som karakteriserer et effektivt (robust) hjerte i tidlig livsfase
- Trening er en god modell for å produsere mer robust fisk
- Utfordringstester er viktig for å fremprovosere forskjeller i robusthet:
 - Svømmetest
 - Stress
 - Kjemisk injeksjon

Oppsummering

- Vi har etablert ulike injeksjonsmodeller
- Arbeider med å identifisere markører for robusthet:
 - Hjertekapasitet
 - Hematologi
 - Immunsystem
 - Metabolisme
- **Konklusjonen** er at det er mulig å finne tidlige markører for robusthet, men stor genetisk variasjon er utfordrende samtidig som det gir store muligheter for forbedring!

Veien fremover

- Utnytte laksens genomkartlegging til å identifisere robusthetsmarkører som kan utnyttes i avlsarbeid
- Beste fremgangsmåte: Opprette robust vs sårbare familiegrupper
 - Større genetisk kontrast
 - Definerte genetiske grupper
- Kombinere informasjon fra funksjonelle gener (hjertefunksjon, immunsystem m.fl.) med genetiske markører SNP