


<h1>PROSJEKTRAPPORT</h1>		Distribusjon: Åpen												
 HAVFORSKNINGSINSTITUTTET <i>INSTITUTE OF MARINE RESEARCH</i>		HI-prosjektnummer 11898-07												
Nordnesgaten 50, Postboks 1870 Nordnes, 5817 BERGEN Tlf. 55 23 85 00, Fax 55 23 85 31, www.imr.no		Oppdragsgiver(e): Fiskeridirektoratet og FKD												
		Oppdragsgivers referanse: 201000245- /RB-1												
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 25%; text-align: center;">Tromsø</td> <td style="width: 25%; text-align: center;">Flødevigen</td> <td style="width: 25%; text-align: center;">Austevoll</td> <td style="width: 25%; text-align: center;">Matre</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">9294 TROMSØ</td> <td style="text-align: center;">4817 HIS</td> <td style="text-align: center;">5392 STOREBØ</td> <td style="text-align: center;">5984 MATREDAL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Tlf. 55 23 85 00</td> <td style="text-align: center;">Tlf. 37 05 90 00</td> <td style="text-align: center;">Tlf. 55 23 85 00</td> <td style="text-align: center;">Tlf. 55 23 85 00</td> </tr> </table>		Tromsø	Flødevigen	Austevoll	Matre	9294 TROMSØ	4817 HIS	5392 STOREBØ	5984 MATREDAL	Tlf. 55 23 85 00	Tlf. 37 05 90 00	Tlf. 55 23 85 00	Tlf. 55 23 85 00	Dato: 27.04.2012
Tromsø	Flødevigen	Austevoll	Matre											
9294 TROMSØ	4817 HIS	5392 STOREBØ	5984 MATREDAL											
Tlf. 55 23 85 00	Tlf. 37 05 90 00	Tlf. 55 23 85 00	Tlf. 55 23 85 00											
Rapport: Rapport fra Havforskningen	Nr 13-2012	Program: Akvakultur												
Tittel: Oppdrett av steril fisk		Forskningsgruppe: Reproduksjon og vekst												
Forfattere: Tom Hansen, Anna Wargelius, Geir Lasse Taranger og Per Gunnar Fjellidal		Antall sider totalt:												
<p>Sammendrag (norsk):</p> <p>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.</p> <p>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.</p> <p>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.</p> <p>Forsøkene som ble gjennomført eller startet opp i 'SALMOTRIP' bekrefter at den triploide fisken har større risiko for å utvikle deformiteter hvis den oppdrettes som en vanlig oppdrettslaks. Forsøkene viser også at triploider kan produseres i sjøvann med god vekst og lav dødelighet. Forskning som er i gang viser at deformitetsproblemet sannsynligvis kan løses med tilpassede produksjonsmetoder og tilpassede dietter. Det er også mulig at en vellykket produksjon vil være avhengig av miljøforhold, merdstørrelse og fisketetthet.</p> <p>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.</p>														
Emneord: Steril fisk, triploids, fysiologi, production performance		Subject heading: Farming sterile fish												

Innhold

Forord.....	5
Sammendrag.....	6
Hvorfor produsere steril fisk?.....	7
Metoder for sterilisering av norske oppdrettsarter	9
Produksjon av triploider	9
Produksjon av ”all female” fisk.....	14
Genteknologiske metoder for produksjon av steril fisk	16
Konklusjon over metoder	17
Konsekvensen av det å være triploid.....	18
Vekst, kjønnsmodning og dødelighet.....	18
Triploid fisk og kvalitet.....	24
Hematologi	25
Hjertefunksjon, respirasjon og fysisk ytelse.....	26
Immunologi og sykdomstoleranse.....	28
Produksjonslidelser	29
Stress, stresstoleranse, toleranse for sub-optimalt miljø	31
Sansorganer og adferd og læring	33
Ploiditet – familie interaksjon	34
Rømming av triploid fisk	35
Bruk av triploider og genetiske interaksjoner	37
Kommersiell produksjon av steril fisk	38
Forskningsbehov	38
Håndbok i oppdrett av triploid laks.....	40
Sammendrag.....	40
Hva er en triploid og hvordan lages den?.....	40
Produksjon av triploide egg.....	40
Startfôring og påvekst i ferskvann.....	43
Smoltifisering	43
Produksjon av slaktefisk.....	43
Dietter i sjøvann	44

Forord

Denne rapporten er basert på rapporten fra 2007 (Hansen et al., 2007). Denne er blitt oppdatert med tilgjengelige vitenskapelige publikasjoner og rapporter. Vi har også oppdatert rapporten med de siste dataene fra EU-prosjektet SALMOTRIP (FP7-SME-2007-1, Feasibility study of triploid salmon production, Project 222115) og noe data fra oppfølgende aktiviteter ved Havforskningsinstituttet. Vi prøver fortsatt 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. I rapporten fra 2007 hadde vi med et kapittel om hybrider. Dette er et område som fortsatt har relativt liten relevans, og det er gjort lite forskning på produksjonsbiologi for hybrider siden forrige rapport. Vi har derfor utelatt dette kapitlet, og de som er interessert henvises til 2007-rapporten.

Sammendrag

I andre land og andre arter er det vanlig å bruke triploidisering og/eller oppdrett av monosexbesetninger (for eksempel 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.

Forsøkene som ble gjennomført eller startet opp i SALMOTRIP-prosjektet bekrefter at den triploide fisken har større risiko for å utvikle deformiteter hvis den oppdrettes som en vanlig oppdrettslaks. Forsøkene viser også at triploider kan produseres i sjøvann med god vekst og lav dødelighet. Forskning som er i gang viser at deformitetsproblemet sannsynligvis kan løses med tilpassede produksjonsmetoder og tilpassede dietter. Det er også mulig at en vellykket produksjon vil være avhengig av miljøforhold, merdstørrelse og fisketetthet.

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.

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 ett 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 hunntorsk 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.

Bruken av steril fisk får stadig 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 (Pifferer et al. 2006). Studier gjort på ville laksepopulasjoner har vist at rømt oppdrettsfisk kan endre produktiviteten (Flemin et al. 2000; McGinnity et al. 2003) og genetisk struktur og biodiversitet (Skaala et al. 2006). I en risikoanalyse gjort av Havforskningsinstituttet (Taranger et al. 2010), blir det konkludert med at i 8 av de 9 største lakseproduserende fylkene i Norge er det moderat til høy risiko for en permanent endring i genstrukturen til laksepopulasjonene.

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.

Fleming, I., Hindar, K., Mjølnerød, I.B., Jonsson, B., Balstad, T., Lamberg A. 2000. Lifetime success and interactions of farm salmon invading a native population. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 267: 1517-1523.

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.

McGinnity, P., Prodöhl, P., Ferguson, A., Hynes, R., Ó Maoiléidigh, N., Baker, N., Cotter, D., O'Hea, B., Cooke D., Rogan, G., Taggart, J., Cross, T. 2003. Fitness reduction and potential extinction of wild populations

- of Atlantic salmon, *Salmo salar*, as a result of interactions with escaped farm salmon. Proceedings of the Royal Society of London, Series B 270: 2442-2450.
- 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, 12-17th June, 2006, 5 p. <http://genimpact.imr.no/>
- Skaala, Ø., Wennevik, V., Glover, KA. 2006. Evidence of a temporal genetic change in wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations affected by farmed escapees. ICES journal of Marine Science 63: 1224-1233.
- Taranger, GL., Boxaspen, KK., Madhun, AS., Svåsand, T. (Eds:) 2010. Risikovurdering – miljøvirkninger av norsk fiskeoppdrett (Risk evaluation – environmental effects of Norwegian fishfarming). Fisken og Havet, særnummer 3, 97 sider.

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. Når det gjelder produksjon av hybrider har ikke kunnskapsstatus endret seg og det henvises til rapporten fra 2007 (Hansen et al. 2007).

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 m.a.o. melke, men denne er ikke funksjonell. En triploid hunn er steril og gjennomgår ikke de endringene som en normalt ser hos kjønnsmodnende fisk.

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 3). 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 9.500 psi (ca. 655 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.

Siden 10 °C er noe høyt for lakseegg har Havforskningsinstituttet benyttet temperaturer mellom 7 og 8,5 °C. Om dette har noen betydning for produksjonsresultatet vites ikke. Tabellen som Havforskningsinstituttet bruker ved produksjon av triploid laks finnes i 'Håndbok for oppdrett av steril triploid laks' som finnes som vedlegg til denne rapporten.



Figur 1. Normal befruktning og celledeling fram til firecellestadiet.

Denne utviklingen er ikke spesiell for fisk. I figur 2 er det vist et nybefruktet egg fra en "prøverørsbefruktning" av et menneskeegg.



Figur 2. Nybefruktet egg fra menneske. Inne i egget kan en se to pronukleus. Dette er det genetiske bidraget fra mor og far som er i ferd med å smelte sammen. Pollegemet er blitt skilt ut og kan ses oppe til høyre.



Figur 3. Produksjon av triploider. Trykkbehandlingen skjer 300 minuttgrader etter befruktning og trykket holdes i 50 minuttgrader (se også 'Håndboken' som er vedlagt).

Triploider er funksjonelt sterile fordi de ikke kan produsere balanserte sett kromosomer i celledelingen hvor foreldrefiskens tre kromosompar skal fordeles på kjønncellene 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 atlantehavslaks. 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. I dag er triploide lakseegg tilgjengelige kommersielt fra en leverandør, og det forventes at flere av eggleverandørene vil tilby dette produktet i nær framtid.

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

Johnstone, R., McLay, H.A., Walsingham, M.V. 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.

Kveite

I kveite har en induisert triploidi både ved varmesjokk, 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 tre timer ved -1 °C og med over 50 % overlevelse. I en større eggruppe ble det oppnådd 95 % triploider etter to 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.

Torsk

De siste årene har det blitt utført forsøk med å triploidisere torsk med trykksjokk. For torsk vil det være særlig gunstig å bruke steril hunntorsk, da tidlig kjønnsmodning er et hovedproblem i torskeoppdrett både på grunn av mulig risiko for genetisk påvirkning på villtorsk etter gyting i merd eller ved rømning, samt de store negative effektene modning har på vekst, fôrutnyttelse, kvalitet og velferd (Taranger et al. 2010). En trykkprotokoll for torsk ble utviklet i Canada der en utsatte torskeegg for 8500 PSI i 5 minutter, 30 min. etter befruktning ved 6 °C (180 minuttgrader, Trippel et al. 2008). Denne metoden ble vist å gi tilnærmet 100 % befruktning, og denne fisken ble fulgt fram til kjønnsmodning. Det viste seg at flesteparten av hannene utviklet store gonader på samme tid som normal oppdrettstorsk og produserte sperm. Spermen ga imidlertid ikke opphav til levedyktige avkom. Noe uventet ble det også funnet en viss andel hunner med relativt store gonader.

I et pilotprosjekt ved Havforskningsinstituttet ble det i 2008 produsert triploid (3N) torsk med metoden til Trippel et al. (2008). Egg ble strøket manuelt fra 3 hunntorsk og enten triploidisert med trykk (3N gruppe) eller beholdt som kontroll (2N diploide). Befruktningsprosenten var god i begge grupper (94 % i 3N og 91 % i 2N), og overlevelsen gjennom eggstadiet var også høy (82 % i 3N og 72 % i 2N). Gruppene ble startfôret med anrikede rotatorier og artemia i triplikate 500L-tanker. Det ble observert en god del synlig deformerte torsk i 3N-gruppene

(10–15 %) på dag 56, mens det var lite deformiteter i 2N gruppen (<0,2 %). Det var også bedre overlevelse i 2N-gruppen enn i 3N-gruppen. Overlevelsen videre fram til ca. 40 g var noe høyere i 2N- (99 %) enn i 3N-gruppene (91–96 %), og veksten var litt redusert i 3N-gruppene, spesielt i den miste størrelsessorteringen. Andelen triploide ble estimert til å ligge nær 100 % i 3N-gruppen målt med blodcellediameter. Triploide fisk har større blodceller enn diploide individer. Andel deformiteter ble da studert med røntgen, og viste høye andeler skjelettdeformiteter både i 2N og 3N fisk. Begge gruppene hadde mye ”nakkeknekk” (40 % i 2N og 56 % i 3N), mens andelen lordose (som er en deformitet lenger bak i ryggsøylen) var mye høyere i 3N (42 %) enn i 2N (2 %). Overraskende ble det også her funnet noen hunnfisk med store gonader i 3N-gruppen, og noen ga egg. Disse individene ble verifisert som triploide med blodcellediameter analyse. Denne studien er under publisering av Opstad et al. En mulig forklaring til den høye deformitetsandelen i denne studien både i 2N og 3N kan skyldes suboptimal anrikning av levendefôret samt miljøforholdene i startfôringskarene.

For å teste hypotesen om at en del av problemene en observerte med 3N-torsken skyldtes suboptimal diett, har Havforskningsinstituttet forsøkt å produsere triploid torsk i stor skala i en stor poll, Parisvatnet i Øygarden, der en i mer en ti år har hatt vellykket storskala produksjon av torskeyngel med naturlig dyreplankton. Det har så langt vært observert bedre vekst og mye mindre skjelettdeformiteter generelt i torskeyngel produsert med naturlig dyreplankton i poller eller mesokosm-poser sammenlignet med intensiv startfôring med anrikede rotatorier og artemia. Den samme trykkprotokollen ble brukt til å produsere rundt 150 000 yngel både i 2010 og 2011 i Parisvatnet, og fisken blir fulgt opp til slaktning merder i kommersielle torskeanlegg.

Så langt har resultatene vist at det er relativt lite deformiteter i 3N-fisk produsert på naturlig dyreplankton, men det ser ut som at veksten er litt svakere i 3N-torsk enn i 2N-torsk når de går i samme poll og merd. Dette siste er også dokumentert i laks, der 3N-fisk har noe dårligere vekst når de går i sammen med 2N-fisk, men at de kan vokse bedre enn 2N-laks når de går i egne kar/merder hele livet. Overraskende fant vi at det ikke var 100 % triploider i gruppene som ble produsert med trykksjokk i Parisvatnet. I 2010-årsklassen ser det ut til at rundt 80 % er triploider og 20 % diploide ut fra blodcellediameter, og i 2011 ser andelen triploider ut til å være veldig lav vurdert ut fra blodcellediameter. Dette kan enten tyde på at noen egg ikke blir triploidisert, og at disse diploide individene har mye høyere overlevelse i startfôrings-situasjonen i Parisvatnet slik at de utgjør en stor del av populasjonen som overlever til yngel og voksen fisk, eller at blodcellediameter metoden ikke er helt pålitelig for å påvise triploidi. For å teste det siste har vi også utviklet protokoller for å påvise 3N-status med flow cytometri som er en metode som måler mengden DNA (arvestoff) per celle. En triploid celle skal ha 50 % mer DNA enn en vanlig diploid celle.

Havforskningsinstituttet har også testet ulike tidspunkt for trykkbehandling og ulike trykk, og testet andelen triploider med både blodcellediameter og flow cytometri. Disse studiene tyder på at en kan starte trykket noe tidligere, for eksempel på 25 minutter ved 6 °C, men at den etablerte protokollen fra Trippel et al. (2008) gir tilnærmet 100 % triploider når vi bruker den

i kontrollerte småskalaforsøk. Det er derfor fremdeles et paradoks at en har fått en del diploide etter trykksjokk i storskalaproduksjonen.

Så langt er det relativt positive erfaringer med 3N-torsken fra Parisvatnet, selv om veksten var litt svakere enn i de diploide kontrollfiskerne i samme merd. Det er likevel for tidlig å konkludere med om triploid torsk egner seg kommersielt. Det må til mer inngående studier med røntgen for å sjekke for deformiteter, og 3N-torskens toleranse for høy temperatur og lave oksygennivå bør utforskes. Det pågår også en storskala utprøving av triploide familier i det nasjonale torskeavlsprogrammet ved Nofima i Tromsø. Nofima har hatt vellykket produksjon av et stort antall familier med den samme trykkmetoden i 2011, og oppfølgingen av denne fisken fram til slaktestørrelse vil gi bedre grunnlag for å vurdere potensialet til triploid torsk.

Dette siste er en del av et samarbeidsprosjekt mellom Havforskningsinstituttet, Nofima og Norges Veterinærhøgskole finansiert av Norges forskningsråd, for å legge kunnskapsgrunnlag for å kunne ta i bruk triploid torsk i oppdrett.

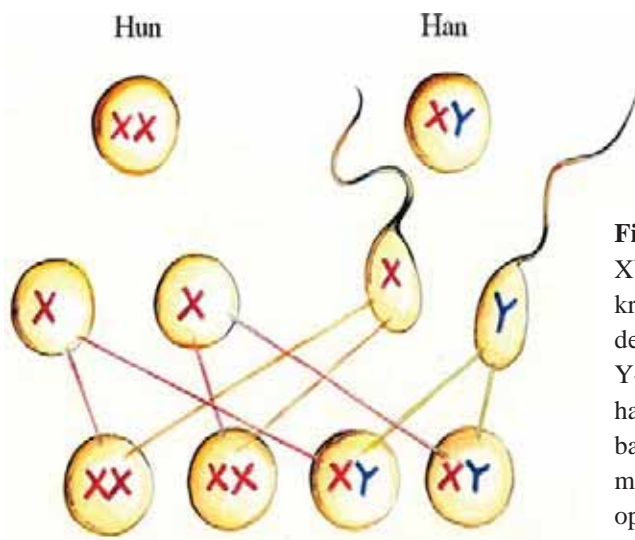
Trippel, EA., Benfey, TJ., Neil, SRE., Cross, N., Blanchard, MJ., Powell, F. 2008. Effects of continuous light and triploidy on growth and sexual maturation in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Cybum* 32: 136-138.

Taranger, GL., Carrillo, M., Schulz, RW., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F.-A., Dufour, S., Karlsen, Ø., Norberg, B., Andersson, E., Hansen, T. 2010. Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology* 165: 483-515.

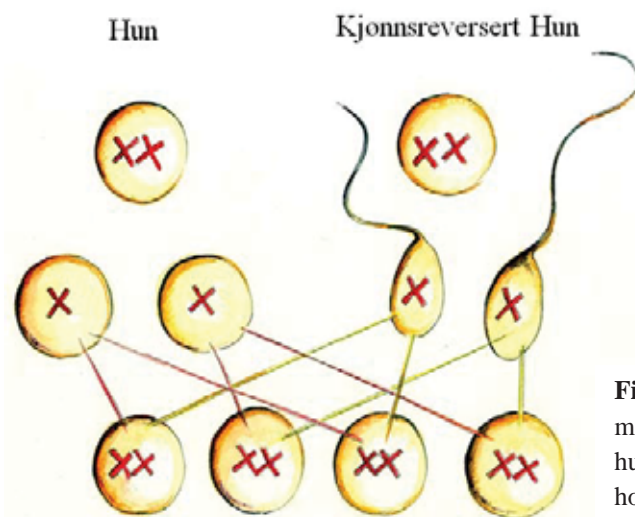
Produksjon av "all female" fisk

I alle fiskearter som har et XY- (figur 4) system for kjønnskromosomer kan en lett produsere all-female-bestander. Hos laks bestemmes kjønn ca. 700–800 døgngader etter befruktning. Hvis yngelen gis fôr tilsatt 17 α -methyltestosteroner i femti døgngader i denne perioden, vil mesteparten av de genetiske hunnene (med XX-kromosomer) begynne å danne hannlige gonader (figur 5). Anbefaling om dose varierer mellom ulike studier. Johnstone et al. (1978) brukte 3 mg 17 α MT/kg fôr, mens Wilkins et al. (2001) benyttet 15 mg/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 utførselåpning og små gonader med tilbakedannede egg på toppen av de modne hannlige gonadene. De modne hannlige gonadene kuttet 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 α MT. Johnstone og Maclachlan (1994) optimaliserte denne protokollen og fant at det beste resultatet ble oppnådd når yngelen ble badet i 400 μ g/liter 17 α MT i to timer ved 750, 800 og 850 døgngader etter befruktning.



Figur 4. Hos laksefisk bestemmes kjønnen ved et XY-kromosomsystem. Hunnene har to X-kromosomer og alle eggene fra en normal hunn 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. 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 5. Når en befrukter eggene fra en vanlig hunn med melke fra en kjønnsreversert hunn (en genetisk hunn som har dannet spermier på grunn av hormonbehandling), blir alt avkommet hunner.

I praktisk oppdrett har det vist seg vanskelig å produsere populasjoner som er garantert 100 % all female. Dette har sin bakgrunn i at hormonbehandlingen gir meget variabelt resultat (for eksempel Lee et al. 2004) og at det kan være vanskelig å skille mellom ekte og reverserte hanner. I Australia har det vært flere saker hvor eggrupper blir solgt som all female, men hvor det senere dukker opp hanner. I løpet av 2012 kommer det imidlertid en publikasjon av en kjønnsmarkør hos laks. Når denne kan tas i bruk blir det enkelt å produsere 100 % sikre hunnlige populasjoner, og dette vil føre til at de blir kommersielt tilgjengelige.

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 17α methyl testosterone. *Aquaculture and Fisheries Management* 25: 855-859.

Lee, P., King, H., Pankhurst, N. 2004. Preliminary assessment of sex inversion of farmed Atlantic salmon by dietary and immersion androgen treatments. *North American Journal of Aquaculture*, 66: 1-7

Wilkins, NP., Cotter, D., O'Maoláidigh, 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.

Genteknologiske metoder for produksjon av steril fisk

Vi kan i dag se for oss flere sterilitetsmodeller som alternativer til triploid fisk. Sekvenseringen av torske- og laksegenomene har åpnet opp for muligheter når det gjelder å studere gener funksjonelt. Genomenes enorme informasjonslager gir flere muligheter til å finne og videre slå ut funksjon til gener, mRNA eller proteiner som er essensielle for dannelsen, overlevelse og kjønnsmodning i både torsk og laks. Alternative sterilitetsmetoder baseres i hovedsak på to muligheter: (1) å ødelegge dannelsen av tidlige kjønnsceller eller (2) forhindre eller stoppe opp pubertet. Metoder som kan brukes før å ødelegge "sterilitets"-faktorer kan deles inn i tre alternativ: (a) angripe proteiner gjennom å vaksinere mot endogent protein, dette kan gjøres i stamfisk eller før pubertet, (b) angripe mRNA med syntetiske "antisense" nukleotider som inhiberer translasjon eller splicing, eller (c) ødelegge spesifikt genet og dermed lage GMO-fisk som permanent kan føre med seg mutasjoner i flere generasjoner.

Kjønnselle-fri fisk

I sebrafisk og værål har man klart å lage sterile fisk gjennom å slå ut genuttrykket (mRNA) av spesifikke gen som styrer dannelsen av kjønnscellene (Slanchev, Stebler et al. 2005; Fujimoto, Nishimura et al. 2010). I sebrafisk og medaka fører mangelen på kjønnsceller til at alle individer blir sterile hanner, mens i værål blir de både hanner og hunner. Om de kjønnsbestemmende faktorene ligger i kjønnscellene hos torsk og laks er ukjent og bør studeres videre. Utviklingen av kjønnsceller skjer allerede fra første cellestadiet i embryoet, og for at de skal utvikle seg normalt er de avhengige av mRNA som er overført fra moren. Derfor er det teoretisk mulig å behandle morfisk med for eksempel en vaksine eller syntetiske nukleotider som kan være med på å stoppe opp dannelsen av tidlige kjønnsceller i avkommet. Det er også mulig å lage en morfisk som er mutant for ett av de maternelle genene som er nødvendig for dannelsen av tidlige kjønnsceller i avkommet (sebrafisk (Draper, McCallum et al. 2007)). Grunnleggende studier av kjønnsellefrie torsk og laks bør gjøres før å avgjøre om det er mulig å lage steril fisk til akvakultur gjennom denne metoden.

Forhindre eller stoppe opp pubertet

I sebrafisk har forsøk vist at kjønnsceller har overlevelsessignaler som må ivaretas for at de skal overleve. Mutasjoner i gener assosiert med overlevelse leder til programmert celledød (apoptose) av kjønnscellene og senere sterilitet hos sebrafisk (Houwing, Kamminga et al. 2007). Antageligvis er det én eller flere mekanismer involvert i overlevelse av kjønnsceller i fisk. Videre studier av laks, torsk og sebrafisk-genomene kan identifisere flere overlevelsessignaler som kan brukes for å lage eventuelle vaksiner mot kjønnsmodning.

I flere pattedyr (kattedyr, hunder og primater) brukes prevensjonsvaksiner. Disse vaksinene er utviklet mot proteiner som styrer kommunikasjonen mellom hjerne, hypofyse og gonade under puberteten, og disse proteinene styrer også puberteten hos fisk (Taranger et al. 2010). Studier i ørret har vist at det er mulig å stoppe kjønnsmodning med hjelp av vaksiner mot både FSHR og LHR (reseptorene for folikkelstimulerende og luteiniserende hormon), men at effekten er kortvarig (Sambroni, Abdennebi-Najar et al. 2009). Mer studier bør gjøres for å se om dette kan være en annen alternativ metode for å lage steril fisk.

- Draper, B.W., C.M. McCallum et al. (2007). "nanos1 is required to maintain oocyte production in adult zebrafish." *Developmental biology* 305(2): 589-598.
- Fujimoto, T., T. Nishimura et al. (2010). "Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(40): 17211-17216.
- Houwing, S., L.M. Kamminga et al. (2007). "A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish." *Cell* 129(1): 69-82.
- Sambroni, E., L. Abdennebi-Najar et al. (2009). "Delayed sexual maturation through gonadotropin receptor vaccination in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*." *General and Comparative Endocrinology* 164(2-3): 107-116.
- Slanchev, K., J. Stebler et al. (2005). "Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(11): 4074-4079.
- Taranger, G.L., M. Carrillo et al. (2010). "Control of puberty in farmed fish." *Gen Comp Endocrinol* 165(3): 483-515.

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 fortsatt være nødvendig med mange års forskning før disse eventuelt kan brukes i praktisk oppdrett.

Konsekvensen av det å være triploid

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 1).

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 md 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 10–15 % 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. Havforskningsinstituttets 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 ifra 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 (kjønnselleding), 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 1), 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 en høyere dødelighet som førte til at den totale produksjonen var 10–15 % lavere i triploider.

I SALMOTRIP-prosjektet ble det gjennomført flere 'fullskala' forsøk. Dataene fra disse er summert opp i tabell 2. Det ble gjennomført to produksjoner av halvtårssmolt (0+). Den første ble gjennomført på Forskningsstasjonen Matre i desember 2007. I denne årsklassen hadde den triploide gruppen høyere dødelighet fram til øyerogn, større smoltstørrelse, vokste like godt i sjøvann (avsluttet på ca. 2,5 kg), men hadde litt høyere innslag av ryggdeformiteter. Den andre produksjonen ble gjort hos Marine Harvest Tveitevåg. Eggene ble transportert til Fister Smolt for smoltproduksjon og smolten ble fordelt på Marine Harvest Lindvik (O+ MH i tabellen) og Havforskningsinstituttets anlegg på Solheim (0+ IMR i tabellen). I denne gruppen hadde de diploide høyere dødelighet i smoltproduksjonen (hovedsakelig fordi en klekkesylinder hadde meget lav overlevelse). De diploide hadde høyere dødelighet i sjøvann hos MH Lindvik (høyere dødelighet gjennom et IPN-utbrudd), mens når de samme fiskegruppene ble holdt på HI Solheim var det nesten ikke dødelighet og ikke forskjell mellom gruppene. På Lindvik var den triploide fisken størst fram til midtsommer 2010, men vokste 700 gram mindre fram til slakting i mai 2011. Hos Havforskningsinstituttet var det ikke forskjell i størrelse mellom diploide og triploide ved slakting, men denne ble slaktet fire måneder før Lindvik fisken. Marine Harvest har sammenlignet denne produksjonen med sin øvrige produksjon og den triploide har en vekst tilsvarende 98 % av gjennomsnittet i Marine Harvest, mens den diploide gjør det bedre enn gjennomsnittet. Både hos MH og HI har den triploide fisken et høyere innslag av deformiteter. De triploide hadde også en lavere andel superior fisk ved slakting.

Det siste 'storskalaforsøket' som ble startet opp i SALMOTRIPs var basert på ettårssmolt. Eggene som ble brukt til denne smoltproduksjonen ble innkubert ved 6 °C for å redusere risikoen for deformiteter forårsaket av høy innkubasjonstemperatur (se tabell 3), men yngelen ble startfôret på et vanlig laksefôr (se kapittel om produksjonslidelser). Fisken ble gjennomgått etter 4 måneder i sjø og hadde da et meget lavt innslag av deformiteter. Fisken slaktes i mai 2012.

Forsøkene som ble gjennomført eller startet opp i SALMOTRIP bekrefter at den triploide fisken har større risiko for å utvikle deformiteter hvis den oppdrettes som en vanlig oppdrettslaks. Forsøkene viser også at triploider kan produseres i sjøvann med god vekst og lav dødelighet. Deformitetsproblemet kan sannsynligvis løses med tilpassede produksjonsmetoder og tilpassede dietter. Det er også mulig at en vellykket produksjon vil være avhengig av miljøforhold, merdstørrelse og fisketetthet. Dette må undersøkes i framtidige forsøk.

- 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 1. En oversikt over forsøk hvor triploider og diploider er sammenlignet under 'kommerielle 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 slakt etter 27 måneder gitt (16 md/27md). ***Det ble brukt to protokoller hvor desinfeksjonsløsningen ble brukt henholdsvis før og etter trykkbehandling (før/etter).

?	Ploidi	Dødelighet (%)				I sjøvann	Deformitet (%)	Katarakt (%)	Slaktevekt (kg)	Merknader	Referanse og art
		Befruktning til startfôring (uker)	Startfôring (uker)	Første sjøvannsfase (uker)	Første						
1995	AF2N	22.2	10.3 (9)	0.9 (11)							
1995	AF3N	42.4	20.3 (9)	1.5 (11)						Cotter et al. 2002 Laks	
1996	AF2N	21.3	2.5 (7/8)	0.9 (9/10)	62.4			2.76/2.49	Totvekt/		
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			
	3N	57.1			35.2	28.0		3.20/2.07	Totvekt/Kg slaktet per 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							Avsluttet etter startfôring		
	3N	58.1									
1994	2N	75.8									
	3N	78.0									
Farm A	AF3N							1.19	14 md		
	2N							1.57/1.07	Moden/umoden 12 % modning	Johnstone et al. 1991	
Farm B	AF3N							1.51	13 md	Laks	
	2N							1.98/1.71	Moden/umoden % modning ukjent		
	AF2N							0.58	265 dager fra 100 g	Sheehan et al. 1999	
	AF3N							0.75	'De fleste' 2N	Regnbueørret	
	2N							0.52	hannene modnet		

Tabell 1. Forts.

	Dødelighet							Referanse og art		
	Ploidi	Befruktning til startfôring	Startfôring (uker)	Første sjøvannsfase (uker)	I sjøvann	Deformitet (%)	Katarakt (%)		Slaktevekt (kg)	Merknader
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 upubl Laks
	2N	34.5			15	8.8	92	2.10/6.71 ^{**}	2.2 % modning	
	AF3N	42.7			17	4.3	88	2.28/5.27 ^{**}	0 % modning	
	3N	36.8			21	5.5	94	1.84/4.52 ^{**}	0.7 % modning	
Regnbue	2N				Snitt 20.4			1.00		
ørret	3N				Ikke signifikant			0.84	17 mnd	Bonnet et al. 1999
Brun	2N				13.4			1.37		
ørret	3N				18.9			1.28		

Tabell 2. En oversikt over 'storskalaforsøkene' i SALMOTRIP-prosjektet. * Fisken som ble satt ut hos Marine Harvest og hos Havforskningsinstituttet var av samme smoltgruppe produsert hos Marine Harvest Fister. ^AEn klekkesylinder hadde meget lav overlevelse.

Forsøk	0+ Matre			0+ MH*			0+ IMR*			1+ IMR		
	Dip	Trip		Dip	Trip		Dip	Trip		Dip	Trip	
Produsert egg		Des 07		Nov 08			Nov 08			Nov 09		
Smoltutsett		Okt 08		Okt 09			Okt 09			Mai 11		
Slaktet		Des 09		Mai 11			Jan 11					
Dødelighet (%)												
Befruktning - øyeroegn	9,5	19,2								4,9	8,6	
Øyeroegn - startføring	3,0	3,4								6,4	9,0	
Startføring - sjøvannsoverføring	3,9	5,4								7,3	11,7	
Befruktning - smolt				53,0 ^A	23,0							
Sjøvann	0,5	1,5		24,8	14,6		0,7	1,3				
Vekt (g)												
Smolt	55	62	86	115						71,2	81,7	
Slakt (mnd etter smoltutsett)	2237 (14)	2592 (14)	5710 (19)	4990 (19)			3580 (15)	3680 (15)				
Modning (%)												
Slakt	15	10	na	na			0,4	0,004				
Deformasjoner (% ytre) (mnd etter smoltutsett)												
Rygg	1,2 (14)	6,6 (14)	0,7 (15)	5,3 (15)			3 (15)	19 (15)		0,3 (4)	1,9 (4)	
Gjelleløkk	1,6 (14)	1,3 (14)	0,0 (15)	9,3 (15)			2,7 (15)	4,5 (15)		0,3 (4)	0,5 (4)	
Kjeve	0,7 (14)	0,1 (14)	0,7 (15)	3,3 (15)			0,3 (15)	5,6 (15)		0,0 (4)	0,2 (4)	
Slaktekvalitet (%)												
Superior			93,4	83,2			95,7	92,4				
Ordinær			4,9	12,0			2,4	3,9				
Produksjon			1,7	4,4			1,6	3,4				
Utkast			0,1	0,4			0,3	0,4				

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 (*Salmo 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/mm² 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.

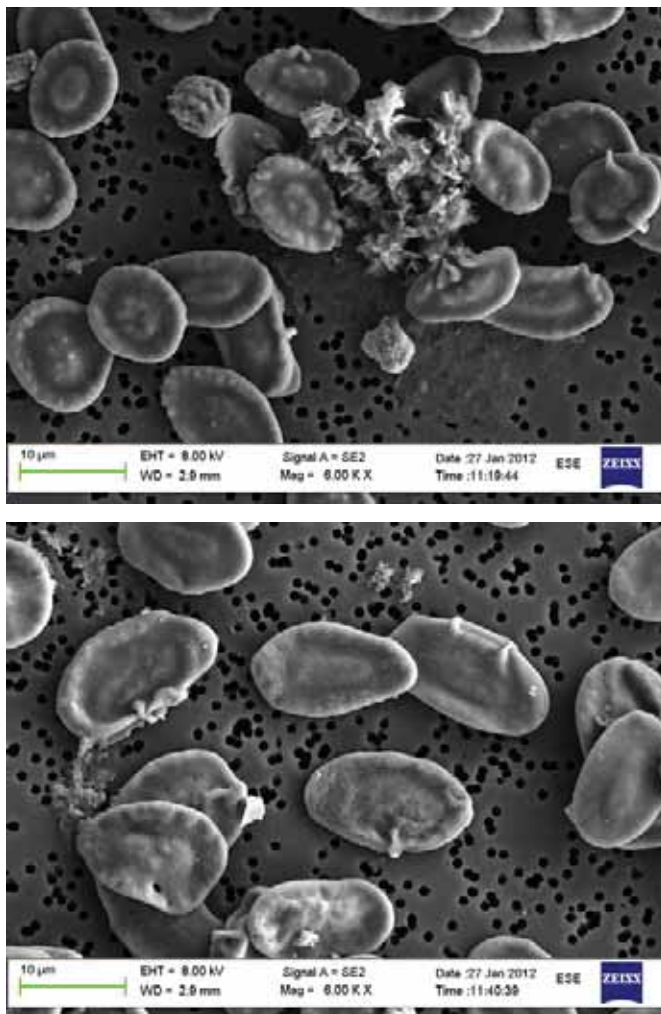
Choubert et al. (1997) rapporterte en høyere rødhet i diploider enn triploider målt ved hjelp av en fargemåler. Familiebakgrunnen hadde også en kraftig effect på rødheten, men variasjonen innen familiene var stor. Johnston et al. (2000) fant også en signifikant positiv sammenheng mellom Roche SalmoFan (TM) 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 ploid påvirket ikke kjemisk sammensetning og sesong ble funnet å være den viktigste forklaringsvariabelen for variasjonen i filetkvalitet i både triploid og diploid laks.

- 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.
- 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, P.J. 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.
- Sigurgisladottir S, Sigurdardottir MS, Ingvarsdottir H, Torrissen 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.

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 hematokritverdien blir den samme (Benfey og Sutterlin 1984). Den økte cellestørrelsen fører også til at hemoglobinnmengden per celle er høyere i triploider enn diploider (Benfey og Sutterlin 1984; Graham et al. 1985), mens den totale hemoglobinnmengden per fisk varierer fra art til art. Hos laksefiskene er det rapportert at triploid atlantehavslaks (Benfey og Sutterlin 1984; Graham et al. 1985), coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Small and Randall 1989) og regnbueørret (Yamamoto og Iida 1994) har lavere total hemoglobinnmengde enn diploider, mens triploid canadisk bekkørøye har samme totale hemoglobinnmengde som diploide individer.



Figur 6. Røde blodceller fra diploid (øverst) og triploid laks (nederst). Bildene er i samme skala og illustrerer størrelsesforskjellen (elektronmikroskopibilde Professor Ivar Hordvik, Universitetet i Bergen).

Fordi blodcellene er større hos triploid fisk (se figur 6 for illustrasjon) har blodcellene også et lavere overflate-/volumforhold. 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. 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, T.J., Sutterlin AM. 1984. The haematology of triploid landlocked Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Biol. 24: 333-338.

Benfey, T.J. 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, T.J. 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.

Hjertefunksjon, respirasjon og fysisk ytelse

I litteraturen finnes det ingen sammenligninger av hjertestørrelse hos triploid og diploid laksefisk. Parsons, G.R. (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 maksimal 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 bekkørøye (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 O₂ per time og kilo fisk), rutine metabolsk rate (metabolisme ved 'normal aktivitet')(108,8 mg O₂ per time og kilo fisk), maksimum metabolsk rate (MMR) = 380 mg O₂ 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); Cotterell 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 ble det også funnet at triploider hadde en lavere startrespons på muskelen (de ville 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.

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, dvs. 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, leukocyter 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 leukocyter (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 hunn og hanner av de tre røyeartene med IPNV type sp (infeksiøs pankreas nekrosevirus), VHSV type 1 og 3 (Viral haemorrhagisk septikemi virus) og IHNV (infeksiøs haematopoietisk nekrosevirus). 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 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.

Produksjonslidelser

Det er ikke gjort noen studier av beinceller hos triploider, men Swarup (1959) fant større cellekjerner og færre celler i bruskevvev hos stingsild (*Gasteosterus aculeatus*).

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*) (Flajshāns 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 deformaten "underkjevedeformasjonsyndrom" (pappegøyenebb) f.eks. Sutterlin et al. (1987), Jungalwalla (1991). Sadler et al. (2001) rapporterte et høyt innslag av skjelettdeformasjoner (hovedsakelig pappegøyenebb og forkortede gjellelokk) i triploide laksebesetninger i Tasmania, og opptil 60 % av triploidene delvis manglende primære gjellefilamenter. Kacem et al. (2004), derimot, studerte virvelsøyledeformasjoner i diploid og triploid regnbueørret fra samme befruktningssgruppe, 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. Fjelldal og Hansen (2010) undersøkte fire laksefamilier med diploide og triploide søsken, og fant at triploid laksesmolt hadde mer ryggradsdeformasjoner enn diploide. Disse deformatjonene var oftest lokalisert under fiskens ryggfinne. I EU-prosjektet "SALMOTRIP" ble det produsert tre årsklasser med triploid laks ved Havforskningsinstituttet, Forskningsstasjonen Matre, som fulgtes til slaktestørrelse. I alle disse hadde triploider mer skjelettdeformasjoner en diploider. Totalt sett var virvelsøyledeformasjoner mer vanlige enn underkjevedeformasjoner. Nye studier har vist at justering av fosforernæring i ferskvann og vanntemperatur under egginnkubering kan bidra til å redusere omfanget av skjelettdeformasjoner hos triploid laks. I et forsøk der triploid og diploid laks ble føret tre forskjellige diettnivå av fosfor fra startfôring til sjøvannsoverføring, viste det seg at ekstra fosfor reduserte innslaget av virveldeformasjoner hos triploid laks til samme nivå som hos diploid (Fjelldal m.fl., in prep). De tre nivåene av fosfor som ble brukt var: Lav, medium (innenfor behovs-estimatet hos diploid laks) og høy. Angående beinmineralisering ved sjøvannsoverføring, så hadde triploid og diploid laks likt mineralinnhold i bein når de var gitt lavt eller høyt fosfornivå i diett, mens triploid hadde lavere mineralinnhold ved medium fosfornivå. Dette kan tyde på at triploid laks har et høyere fosforbehov enn diploid laks. Det er et annet studie der fosforbehov hos triploid laks i ferskvann er undersøkt (Burke m.fl. 2010). I det studiet fant ikke forfatterne noen effekt av fosfor-diettnivå på beinmineralisering. Siden Burke m.fl. (2010) føret laksen fra 45 g, mens Fjelldal m.fl. (in prep) føret laks fra startfôring, kan det tyde at triploid laks har et høyere fosforbehov enn diploid laks i startfôringsfasen. I et nylig avsluttet forsøk der triploide og diploide laksesøsken ble holdt ved 6, 8 eller 10 °C i perioden fra befruktning til startfôring (Fjelldal m.fl., in prep) og undersøkt ved 100 grams størrelse, viste resultatene at triploid laks er mer utsatt for å utvikle skjelettdeformasjoner (rygggrad og underkjeve) og hjertefeil (manglende skillevegg mellom hjertehule og bukhule) ved økende inkuberings-temperatur. Resultatene (tabell 3) viser at de gjeldende anbefalingene for inkubasjonstemperatur (maks 8 °C) i lakseoppdrett ikke kan overføres direkte til triploid fisk.

I EU-prosjektet AIR 3 CT94 2216 ble det funnet at triploider fikk gjennomgående mer katarakt enn diploider. Dette ble bekreftet i to av studiene i SALMOTRIP-prosjektet. Det er imidlertid kjent at kataraktproblemet i vanlig laks er nært knyttet til aminosyren histidin og at katarakt i hurtigvoksende laks kan forhindres med ekstra histidintilsetning. Et arbeid er under utarbeidelse i Skottland (Migaud et al., in prep.) som viser at utviklingen av katarakt i triploider kan reduseres ved å øke tilsetningen av histidin i føret.

Tabell 3. Deformasjoner og septumfeil hos diploid og triploid laks inkubert ved 6, 8 og 10 °C og undersøkt ved 100 g størrelse.

Parameter (%)	Diploider			Triploider		
	6	8	10	6	8	10
Deformasjoner (ytre)						
Rygg	0	0,5	0,7	0,8	4,2	7,7
Kjeve	0	0,4	0,4	1,9	5,5	14,7
Hjertefeil (%)						
Manglende septum	0	0	18	0,7	3,3	30

- 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.
- Swarup, H. 1959. Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L.). *J. Genet.*, 56: 143-155.
- 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.

Stress, stresstoleranse, toleranse for sub-optimalt miljø

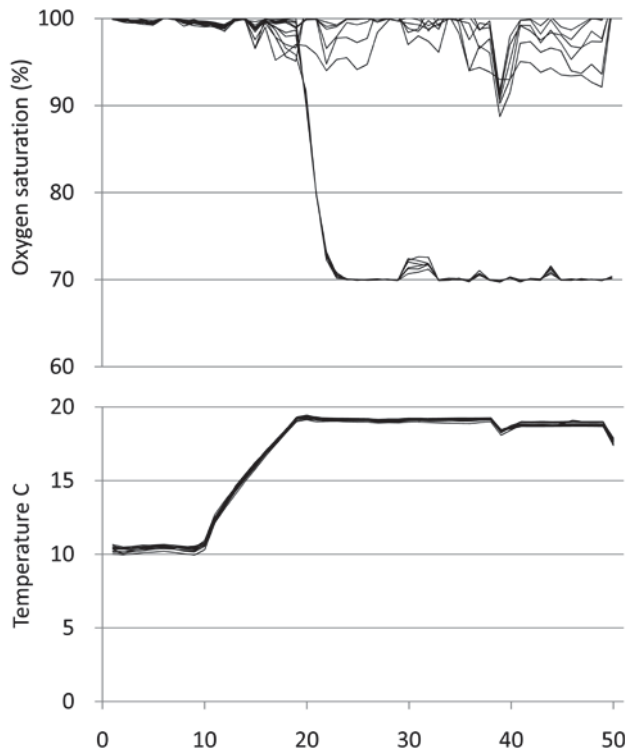
Triploid fisk er rapportert til å være mer følsom for miljøendringer enn diploid fisk. Fra Frankrike blir det rapportert dødelighet på triploid ørret når temperaturen er høyest i sommermånedene (Altimiras *et al.*, 2002). Ojolic et al. (1995) sammenlignet vekst og overlevelse hos triploide og diploide 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-dagersperioden 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).

I SALMOTRIP-prosjektet ble det gjennomført et forsøk for å sammenligne hvordan triploider og diploider fungerte ved høy temperatur og hypoksiske forhold (figur 7). Forsøket ble gjennomført med diploid og triploid laks (3–400 g). Fôrintaksdataene i dette forsøket er vist i tabell 4.

Tabell 4. Fôrintak (% av biomasse) hos diploid og triploid laks i sjøvann. Miljøforholdene gjennom forsøket er vist i figur 7. Tall med ulik bokstav er statistisk forskjellige.

Periode (dager)	Diploid		Triploid	
	70 %	100 %	70 %	100 %
0-10	0.31±0.02		0.37±0.02	
11-18	0.48±0.02a		0.57±0.02b	
19-51	0.55±0.01c	0.76±0.01a	0.25±0.01d	0.60±0.01b



Figur 7. Miljøforholdene i et forsøk for å teste temperatur og hypoksitoleransen hos diploid og triploid laks. Fisken ble holdt på 10 °C i 11 dager før temperaturen ble hevet til 19 °C. Deretter ble oksygenivået i halvparten av karene senket til 70 % metning. I perioden mellom dag 19 og dag 51 hadde vi følgende fire grupper (Dip 70 %; Dip 100 %; Trip 70 % og Trip 100 %).

Forsøket viste at den triploide laksen gjorde det bra i perioden med stabil temperatur på 10 °C og i perioden når temperaturen heves til 19 °C. I den måneden hvor fisken ble holdt på 19 °C og 70 eller 100 % DO gjør imidlertid den triploide fisken det dårligere på 100 % DO og 70 % DO. Dette viser at triploid laks er følsom for langtidseksponering for høye temperaturer og dårlige oksygenforhold.

I et nylig gjennomført forsøk har vi vist at triploid laks (3–400 g) gjør det bedre eller like bra som diploider opptil 12 °C, men dårligere på 15 og 18 °C. Stor fisk er mer følsom for høye temperaturer og hypoksi, så stor diploid fisk vil sannsynligvis være ytterligere favorisert.

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, R.A., Scheer, K., Afonso, L.O.B., Iwama, G.K. 2006. Triploid and diploid rainbow trout do not differ in their stress response to transportation. *North Am. J. Aquat.* 68: 1-8.
- Ojolick, 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.

Sanseorganer og adferd og læring

Det er en generell observasjon at triploider har større og færre kroppsceller en diploid fisk og det er derfor blitt spekulert i om at sanseorganenes følsomhet er lavere i triploider enn diploider. Hos både stingsild (*Gasteosterus aculeatus*)(Swarup 1959) og Ayu (*Plecoglossus altivelis*)(Aliah et al. 1990) er det vist et redusert celleantall i sanseorganene, og hos Ayu førte dette til en lavere følsomhet for både lyd og lys. I hvilken grad det har betydning for fisk i en oppdrettssituasjon er usikkert, men det vil helt sikkert ha betydning hvis fisken settes ut i naturen eller rømmer fra oppdrett. Dette kan være med på å forklare forskjellene i overlevelse/gjenfangst som er beskrevet i kapittelet om rømming.

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 fôropptaket 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 i størrelsesintervallet fra 5,1 til 62,7 gram uten at det ble funnet statistiske forskjeller i fôropptak mellom diploider og triploider. I forsøk med to ulike stammer av canadisk bekkerøye ble det funnet et signifikant høyere fôropptak hos diploid fisk av de minste individene av den ene av de to stammene. Forfatterne konkluderer med at det kan være en forskjell i konkurransevnen hos den minste fisken, men at dette 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 5).

Tabell 5. Resultater fra et forsøk hvor triploide hanner har fått gyte sammen med diploide hunner.

	2N hann og 2N hunn	3N hann og 2N hunn
Antall par	5	3
Skjelvinger per time	75,8	89,0
Antall par med gyting	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 gytte eggene uavhengig av om de ble kurtisert av en triploid eller diploid hann. Dette tyder på at triploide hanner også vil kunne gyte sammen med diploide hunner i naturen. Høsten 2011 gjennomførte Havforskningsinstituttet et forsøk hvor kjønnsmodne triploide hannlaks ble holdt sammen med kjønnsmodne gyteklare hunner (en vill og en oppdrettet). Også her ble det påvist at de triploide hannene kunne kurtisere hunnene og få dem til å slippe eggene.

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 i det 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.

Aliah, R.S., K. Yamaoka, Y. Inada, and N. Taniguchi. Effects of triploidy on tissue structure of some organs in ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 569-575 (1990).

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, TJ.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.

Swarup, H. 1959. Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L.). *J. Genet.*, 56: 143-155.

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. I prosjektet SALMOTRIP ble det imidlertid funnet meget godt samsvar mellom produksjonsresultatet en familie gav som diploid og triploid. Dette betyr at det sannsynligvis ikke er nødvendig å sette opp et eget avlsprogram for triploid fisk, men at de beste diploide familiene også vil gi det beste resultatet i en triploid produksjon.

Blanc et al. (2005) har pekt på at det som rapporteres som ploiditetseffekter ikke nødvendigvis er dette, men heller variasjoner i hvordan det ekstra kromosomsettet som kommer fra mor påvirker de karakterene som vi måler på. I dette arbeidet blir det påpekt at en ved produksjon av triploid rogn må ta mer hensyn til hunnfiskens egenskaper enn hannfiskens fordi det genetiske bidraget fra moren er dobbelt så stort.

Blanc, J.M., P. Maunas, and F. Vallée. Effect of triploidy on paternal and maternal variance components in brown trout, *Salmo trutta* L. *Aquac. Res.*, 36: 1026-1033 (2005).

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.

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)(tabell 6 og 7). I det første arbeidet ble diploid og triploid laksesmolt sluppet ut i ferskvann nær settefiskanlegget. 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 genetisk innblanding, og redusert potensial for økologiske og adferdsmessige interaksjoner med de ville bestandene.

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.

Tabell 6. 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
Newport 1996	2N	4.51	50.7
	3N	1.09	52.8
	AF2N	3.85	25.1
	AF3N	0.96	23.9
River Shannon 1996	2N	1.26	27.8
	3N	0.40	27.3
	AF2N	1.61	43.2
	AF3N	0.28	0
Newport 1997	2N	9.90	52.0
	3N	2.05	58.3
River Shannon 1997	2N	1.82	29.2
	3N	0.29	25.0
	AF2N	0.64	57.1
	AF3N	0.08	100

Tabell 7. 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
I ferskvann ved klekkeri	2N	6.83	2.3
	3N	1.62	0.6
	AF2N	6.71	0.9
	AF3N	1.69	0.2
Fra merd	2N	4.60	0
	3N	1.02	0
	AF2N	8.28	0
	AF3N	1.27	0
Fra merd	AF2N	7.78	0
	AF3N	1.35	0

I perioden 1995 til 1997 gjennomførte Havforskningsinstituttet flere rømningsforsøk med triploid og diploid laks fra forskningsstasjonen i Matre. 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.

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.

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). Bruken av steril fisk får stadig ny relevans fordi bruk av steril laks i oppdrett kan være en gunstig metode for å redusere den genetiske påvirkningen rømt oppdrettslaks har på villaks (Pifferer et al. 2006). Studier gjort på ville laksepopulasjoner har vist at rømt oppdrettsfisk kan endre produktiviteten (Flemin et al. 2000; McGinnity et al. 2003) og genetisk struktur og biodiversitet (Skaala et al. 2006). I en risikoanalyse gjort av Havforskningsinstituttet (Taranger et al. 2010), blir det konkludert med at i 8 av de 9 største lakseproduserende fylkene i Norge er det moderat til høy risiko for en permanent endring i genstrukturen til laksepopulasjonene.

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 av fisk som rømmer, eller gyter i merd.

En steril triploid oppdrettsfisk vil hindre genetiske interaksjoner, men en vil fortsatt kunne ha økologisk påvirkning. En av de viktigste mulige effektene ble demonstrert i forsøk ved Forskningsstasjonen Matre høsten 2011. I forsøk viste vi at triploide hanner kan få hunnlaks til å slippe eggene. Sett sammen med resultatene som viser lavere overlevelse i vill tilstand, lavere tilbakevandring til elv og dårlig evne til å konkurrere, gjør at den triploide fisken sannsynligvis vil ha liten negativ effekt. Dette bør imidlertid testes i felt.

Pifferer, 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, 12-17th 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>.

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 15 000 til 20 000 tonn i Frankrike, Storbritannia og Spania) fordi det er rapportert at triploid all-female fisk vokser 10–15 % 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 (hovedsakelig Norge og Finland) er produksjonen basert på normal diploid regnbueørret selv om også all-female-produksjon 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.

Fra sesongen 2012 vil triploide egg av laks være kommersielt tilgjengelige i Norge.

Johnstone R., Simpson T.H., Youngson A.F., and Withehead C. (1979). Sex reversal in salmonid culture. Part II.

The progeny if 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.

Forskningsbehov

Listen over forskningsbehov har ikke endret seg stort siden siste rapport. Men forsøkene som viser at triploid laks har egne ernæringsbehov og at en del av de negative velferdseffektene knyttet til det å være triploid er et ernæringsproblem, er tatt med.

1. Teknikker for å sterilisere oppdrettsfisk må utvikles og/eller optimaliseres. Dette gjelder også andre teknikker enn 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 må settes sammen dietter som tilfredsstillende den triploide fisken sitt behov i ulike livsstadier.
5. Det bør gjennomføres forsøk med triploider i full kommersiell skala for å kartlegge de biologiske og økonomiske konsekvensene av å produsere triploid fisk.

6. 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.

Håndbok i oppdrett av triploid laks

Sammendrag

Triploid fisk er på de fleste områder lik vanlig laks, men på noen viktige områder er den annerledes. Tidligere erfaring har vist at triploider er mer utsatt for å utvikle deformiteter. I det siste har vi imidlertid vist at en ved å senke inkubasjonstemperaturen og øke fosfornivået i fôret kan redusere denne risikoen betydelig. Det andre viktige området hvor triploider skiller seg ut er i risikoen for å utvikle katarakt. Forsøk gjort i Skottland (Migaud et al., in prep) har vist at dette kan avhjelpest med å øke tilsetningen av histidin i fôret. Det tredje området hvor triploidene skiller seg ut er i lavere toleranse for høye temperaturer og for lave oksygenivåer. Dette betyr at triploid laks sannsynligvis ikke bør oppdrettes i de områdene hvor sannsynligheten for at de skal få lange perioder med høye temperaturer er høyest. Den lavere toleransen for lave oksygenivå kan avhjelpest ved å gå ned på merdstørrelsen og tettheten. Hvis triploid laks skal oppdrettes i temperaturutsatte regioner bør den produseres som ettårsmolt for å unngå å eksponere den største fisken for de høye temperaturene.

Hva er en triploid og hvordan lages den?

Triploidisering er en akseptert, og foreløpig også den eneste praktisk tilgjengelige metoden for å sterilisere oppdrettsfisk. Dette gjøres ved å utsette rognen for høyt trykk rett etter befruktning (se figur 1 og tabell 1). Trykket hindrer at en del av morfiskens arvemateriale, som normalt skilles ut, forblir i egget. Dette gjør at fisken blir triploid og er steril. Triploid fisk har tre kromosomsett (to fra mor og ett fra far), mens vanlig diploid fisk har to kromosomsett (ett fra hver av foreldrene). Triploider forekommer naturlig blant laksefisk, men er naturlig nok sjeldne.

Produksjon av triploide egg

Valg av stamfisk

Tidligere forskning har gitt indikasjoner på at det ikke nødvendigvis er de beste diploide familiene som gir de beste resultatene som triploider. I prosjektet SALMOTRIP ble det imidlertid funnet meget godt samsvar mellom produksjonsresultatet en familie gav som diploid og triploid. Dette betyr at det sannsynligvis ikke er nødvendig å sette opp et eget avlsprogram for triploid fisk, men at de beste diploide familiene også vil gi det beste resultatet i en triploid produksjon.



Figur 1. Produksjon av triploider. Trykkbehandlingen skjer 300 minuttgrader etter befruktning og det høye trykket (9500 psi/655 bar) holdes til 350 minuttgrader. Hvordan dette gjøres ved ulike temperaturer er vist i tabell 1.

Valg av eggrupper

Erfaringen fra mange forsøk og kommersiell testproduksjon viser at hvis en lager triploider av gode eggrupper (grupper som gir høy overlevelse som diploide), så får en meget god overlevelse. Overlevelsen i triploide eggrupper kan være betydelig lavere enn i diploide hvis eggkvaliteten er dårlig (lav overlevelse som diploide). Foreløpig vil vi derfor anbefale å produsere triploide egg fra en normal eggproduksjon. Hvis en produserer triploide egg fra grupper som er lysstyrt eller hormonbehandlet kan en forvente en høyere triploid dødelighet på rogn enn ved en normal eggproduksjon.

Stryking/rognhåndtering

Prosedyrene rundt stryking og rognhåndtering er den samme for en triploid produksjon som en normal eggproduksjon med unntak av trykkbehandlingen (se under) og desinfisering. I småskalaforsøk har vi klart å lage triploide eggrupper med like høy overlevelse som de diploide. I kommersiell skala vil en imidlertid som regel oppleve høyere dødelighet på de triploide eggruppene. Denne dødeligheten kommer i hovedsak før øyerognstadiet. Det er derfor et betydelig potensial i å optimalisere arbeidsoperasjoner og prosedyrer tilknyttet en kommersiell storskala produksjon av triploide egg. I disse prosedyrene må det også lages desinfiseringsrutiner som lar seg kombinere med trykkbehandlingen. I våre forsøk har vi fått betydelig økning i eggdødelighet hvis rognen desinfiseres før trykkbehandling.

Trykkbehandling

Utstyret som er nødvendig for å produsere triploid laks er tilgjengelig fra minst tre internasjonale leverandører. Trykket som brukes er 9500 psi/655 bar. Internasjonalt er det vanlig å utføre selve triploidiseringen av eggene ved 10 °C. Trykket settes på 300 timegrader etter befruktning og tas av 350 timegrader etter befruktning. Havforskningsinstituttet har valgt å bruke en protokoll med temperaturer mellom 7 og 8,5 °C som vi anser som mer normale for lakseegg. I tabell 1 kan en lese av hvordan trykket settes på og tas av ved ulike temperaturer. I praksis bruker trykkcellene noe tid på å nå opp til det ønskete trykket. Havforskningsinstituttets celle bruker ca. 1 minutt på å nå 655 bar, og vi starter derfor trykk-behandlingen ett minutt før tiden som er angitt i tabellen. Når trykket tas av, gjøres dette ved å åpne en ventil og trykket faller umiddelbart til atmosfæretrykket.

Tabell 1. Tid for å sette trykk på og ta trykket av ved ulike temperaturer.

Temp	Trykk på Tid etter befruktning	Trykk av Tid etter befruktning
10	30 min	35 min
8,5	35 min 17 sek	41 min 10 sek
8,4	35 min 42 sek	41 min 39 sek
8,3	36 min 8 sek	42 min 10 sek
8,2	36 min 35 sek	42 min 40 sek
8,1	37 min 2 sek	43 min 12 sek
8	37 min 30 sek	43 min 45 sek
7,9	37 min 58 sek	44 min 18 sek
7,8	38 min 27 sek	44 min 52 sek
7,7	38 min 57 sek	45 min 27 sek
7,6	39 min 28 sek	46 min 3 sek
7,5	40 min	46 min 39 sek
7,4	40 min 32 sek	47 min 17 sek
7,3	41 min 5 sek	47 min 56 sek
7,2	41 min 39 sek	48 min 36 sek
7,1	42 min 15 sek	49 min 17 sek
7	42 min 51 sek	50 min

Inkubasjon

Tidligere forskning har vist at for høy inkubasjonstemperatur kan gi et betydelig innslag av virvelsøyledeformiteter og fravær av membranen som skiller hjertesekken og bukshulen (septum transversum) hos vanlig laks. I dag er det derfor anbefalt å ikke inkubere eggene ved en temperatur høyere enn 8 °C. Helt nye forsøk har vist at triploide egg er mer temperaturfølsomme enn vanlige egg og vår anbefaling er å ikke inkubere triploide egg ved

høyere temperatur enn 6 °C. Denne økte temperaturfølsomheten kan være med å forklare hvorfor triploid fisk kan ha en høyere tendens til å utvikle deformiteter i virvelsøylen. Ved en inkubasjonstemperatur på 6 °C utvikler ikke triploidene mer deformiteter enn de diploide.

Det er sannsynlig at denne temperaturfølsomheten er knyttet til bestemte perioder i egg- og larveutviklingen, og at framtidig forskning vil kunne vise at temperaturen kan økes i de senere utviklingsstadier.

Startfôring og påvekst i ferskvann

Våre erfaringer er at triploid laks i ferskvannsstadiet i all hovedsak kan behandles og oppdrettes som vanlig laks med ett viktig unntak. Erfaringene viser at triploid laks vanligvis vokser bedre enn vanlig laks i ferskvann. Forsøkene våre viser også at triploid fisk har behov for et høyere fosforinnhold i fôret. Når triploid laks ble fôret fra startfôring til smoltifisering med et tradisjonelt laksefôr (0,6 % tilgjengelig fosfor) utviklet de et betydelig innslag med deformiteter i virvelsøylen og kjeve. Når fosforinnholdet ble økt til 1,2 %, utviklet de triploide seg uten deformiteter i virvelsøylen og kjeve. Siden vi ikke har testet dietter mellom 0,6 og 1,2 % tilgjengelig fosfor, er det godt mulig at optimalkonsentrasjonen ligger mellom disse nivåene.

Smoltifisering

I SALMOTRIP-prosjektet ble det produsert flere grupper med høstsmolt med samme lysregime som vanligvis er brukt for å produsere høstsmolt av vanlig laks. Erfaringsdataene viser at den triploide fisken smoltifiserer noe raskere enn vanlig laks og at den utvikler sjøvannstoleranse som er fullt på høyde med vanlig laks. I produksjon av ettårssmolt ble det ikke påvist forskjeller mellom diploider og triploider. Triploid smolt kan derfor produseres på samme måte som vanlig smolt.

Produksjon av slaktefisk

Et merdoppdrett med triploid laks vil ikke skille seg vesentlig fra oppdrett av vanlig laks. Vi har imidlertid vist at triploid laks (3–400 g) gjør det bedre eller like bra som diploider opptil 12 °C, men dårligere på 15 og 18 °C. Vi har også vist at triploid laks er følsom for langtidseksposering for høye temperaturer og dårlige oksygenforhold. Stor fisk er mer følsom for høye temperaturer, og hypoksi på så stor diploid fisk vil sannsynligvis være ytterligere favorisert. Dette betyr at triploid laks sannsynligvis ikke bør oppdrettes i områder hvor de eksponeres for høye temperaturer. Den lavere hypoksitoleransen kan avhjelpest ved å unngå høye temperaturer og å gå ned på merdstørrelse og tetthet. Hvis triploid laks skal oppdrettes i temperaturutsatte regioner bør den produseres som ettårssmolt for å unngå å eksponere den største fisken for de høye temperaturene (se under).

Dietter i sjøvann

Det finnes foreløpig lite data på dietter til triploid laks i sjøvann. Et arbeid er under utarbeidelse i Skottland (Migaud et al. in prep.) som viser at utviklingen av katarakt i triploider kan reduseres ved å øke tilsetningen av histidin fôret. Ut fra kunnskapen om at vanlig laks som settes ut i sjøen ved høye temperaturer tidlig på høsten er spesielt utsatt for å utvikle virvelsøyledeformiteter, og at triploider er mer utsatt enn vanlig laks for å utvikle deformateter, får oss til å anbefale (1) enten å unngå produksjon av tidlig høstmolt av triploider og/eller (2) å supplere dietten til slik fisk med ekstra fosfor.