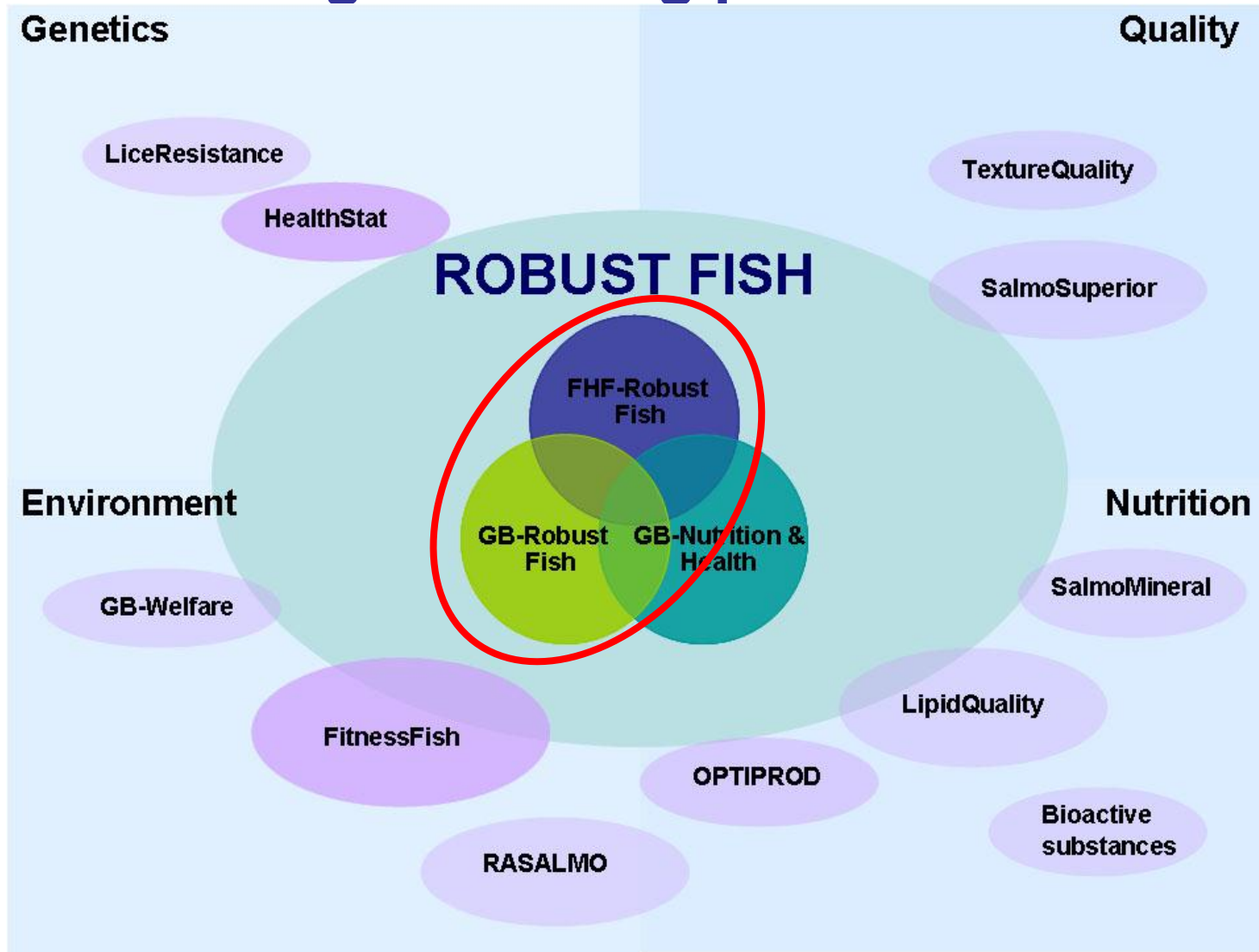


# Kan vi finne markører som identifiserer robust fisk i tidlig produksjonsfase?

Sven Martin Jørgensen & Harald Takle

Nofima Marin, Ås

# Strategisk satsing på robust fisk



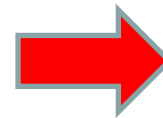
# Hva er en Robust Fisk?

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

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

## Hvordan forbedre robustheten?

- Avl
- Oppdrettsmiljø
- Ernæring
- Produksjonsstrategi



**MARKØRER!**

## Hvordan måle robusthet i tidlig livsfase?

- Tilvekst - trolig assosiert med robusthet
- Mottagelighet for sykdom - trolig dårlig markør
  
- Målsetning:
  - Karakterisere egenskaper hos pre-smolt som er assosiert med robusthet
  - Bygge en kunnskapsbase for utvikling av tester og markører for robusthet

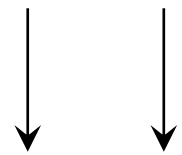
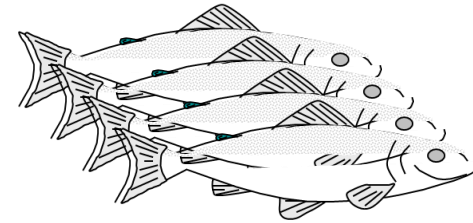
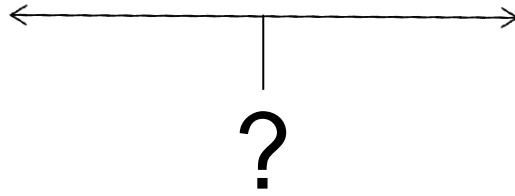
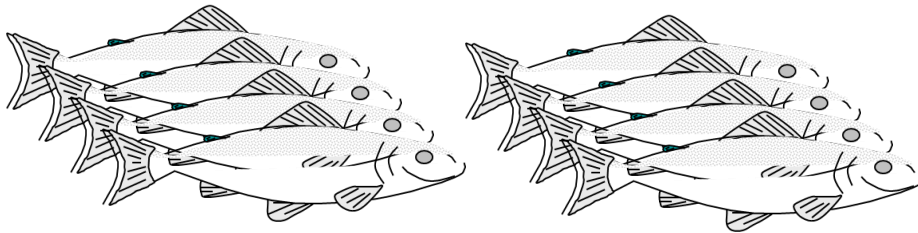
# Betydning for industrien

Markører for robusthet er viktig:

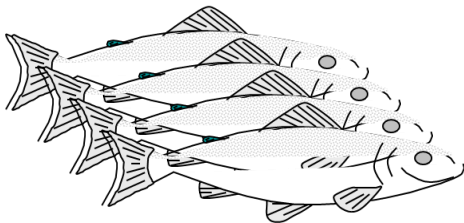
- ✓ Kan fungere som anvendt redskap for å karakterisere robusthet til fiskepopulasjoner
  - Sikre god oppfølging av dårlige smolt-grupper
  - Hindre at svært dårlige smolt-grupper blir satt i sjø
- Forbedre produksjonsbetingelser
  - Modeller og markører grunnlag for standardisert test for relevante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

Robust

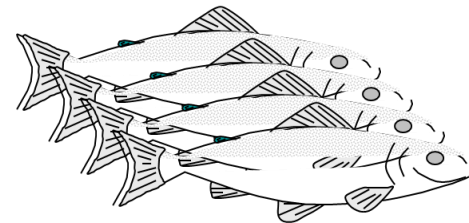
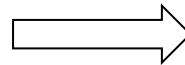
Normal



R N



N



R

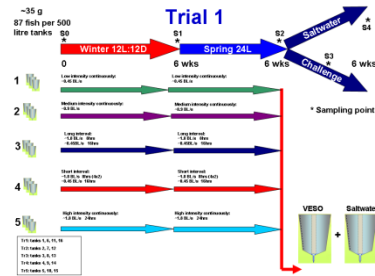
# Utvikle verktøykasse i verdensklasse!

-tilnærming til system biologi

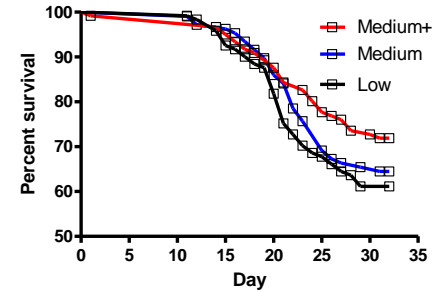
## Fysiologi/Respirometri



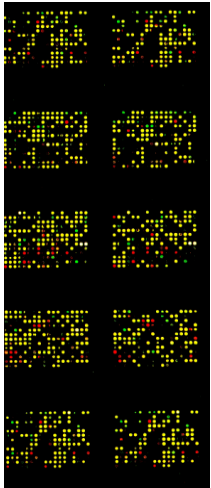
## Treningsforsøk



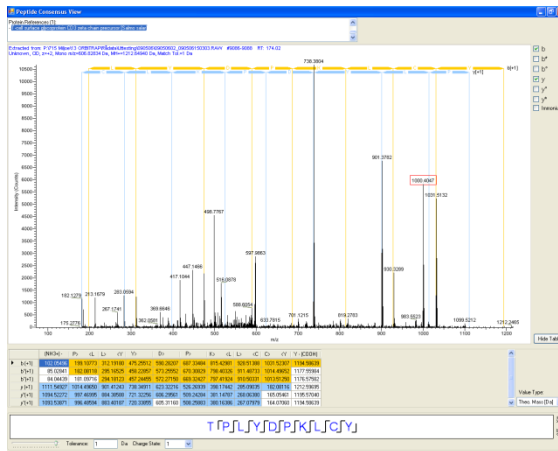
## Utfordringstester



## Genomikk



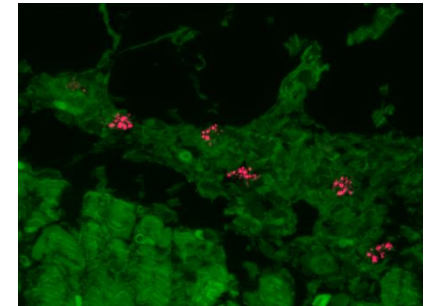
## Proteomikk



## Metabolomikk



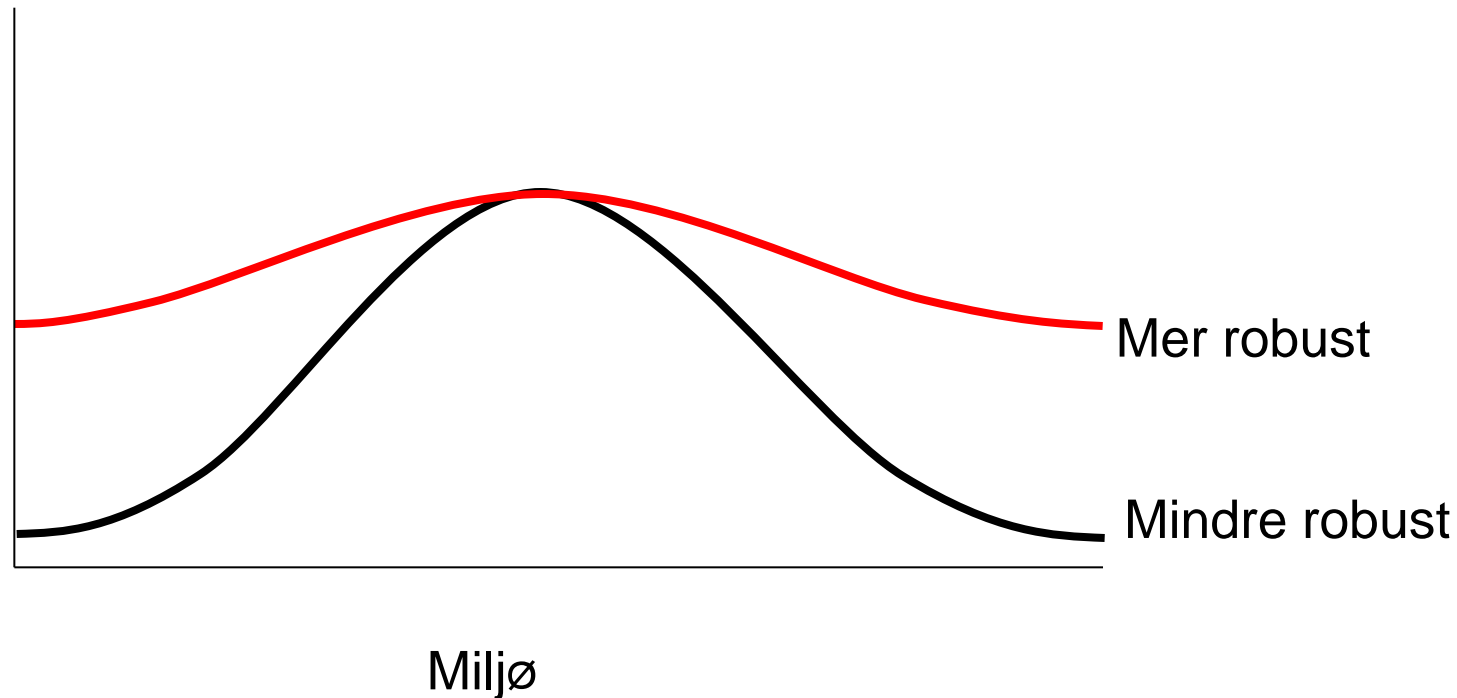
## Histologi



VEGF i epikard

# Robusthet er evne til å opprettholde homeostase under skiftende betingelser

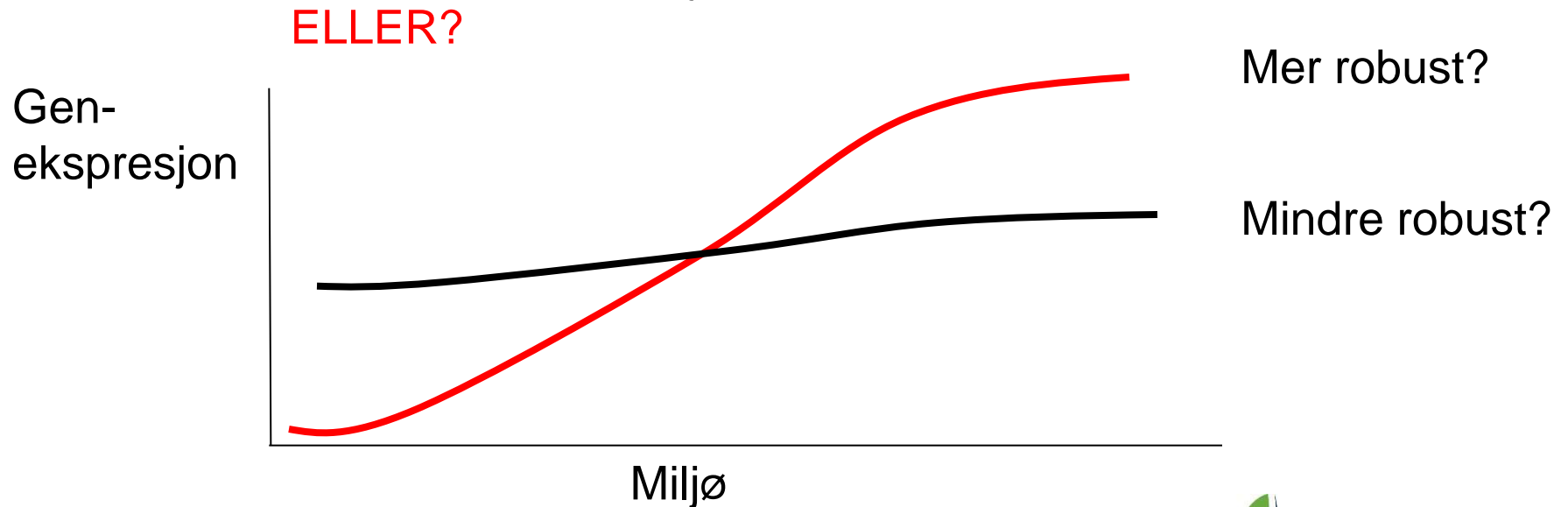
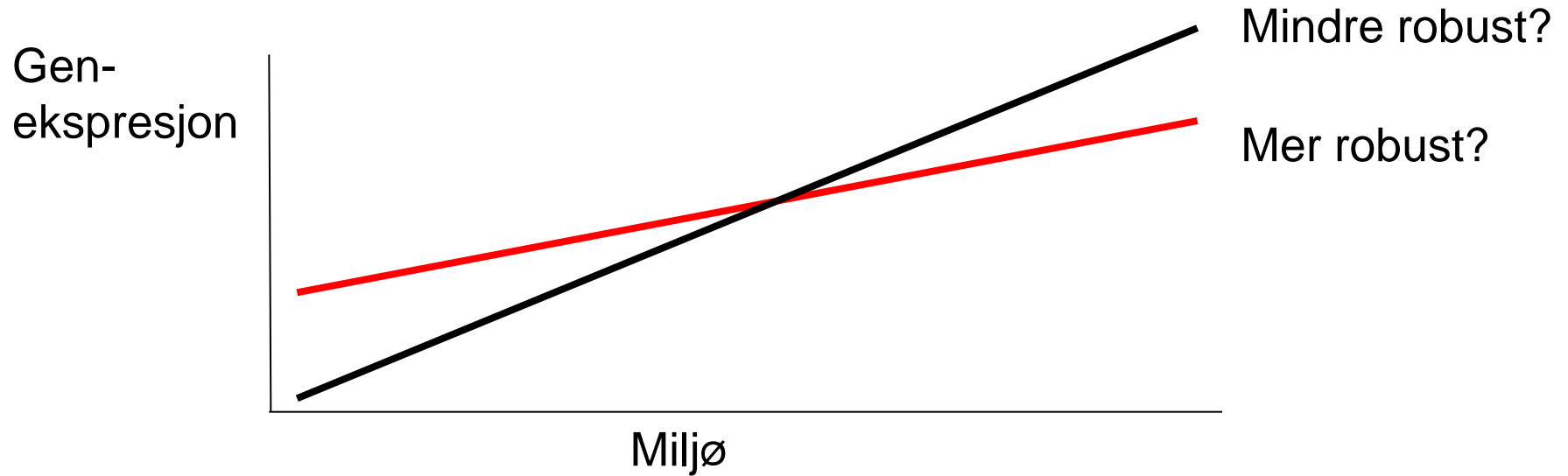
Fenotype  
eks. vekstrate



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



# Underliggende genekspresjonsmønstre?



# Underliggende genekspresjonsmønstre?

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

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

## Fokusområder

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

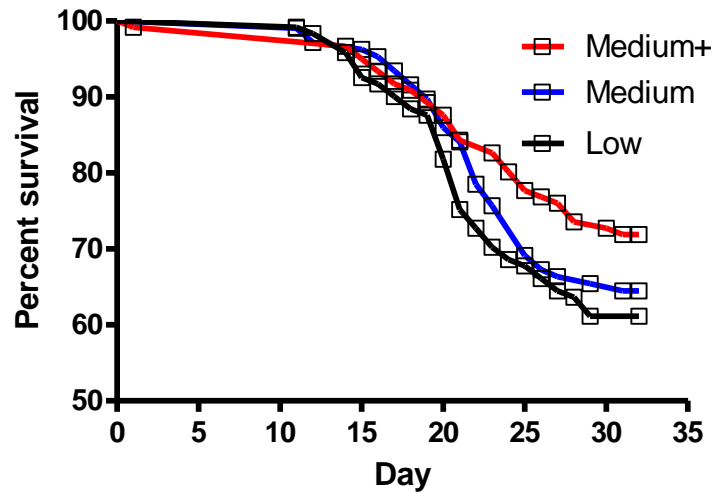
## Modellsystem

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

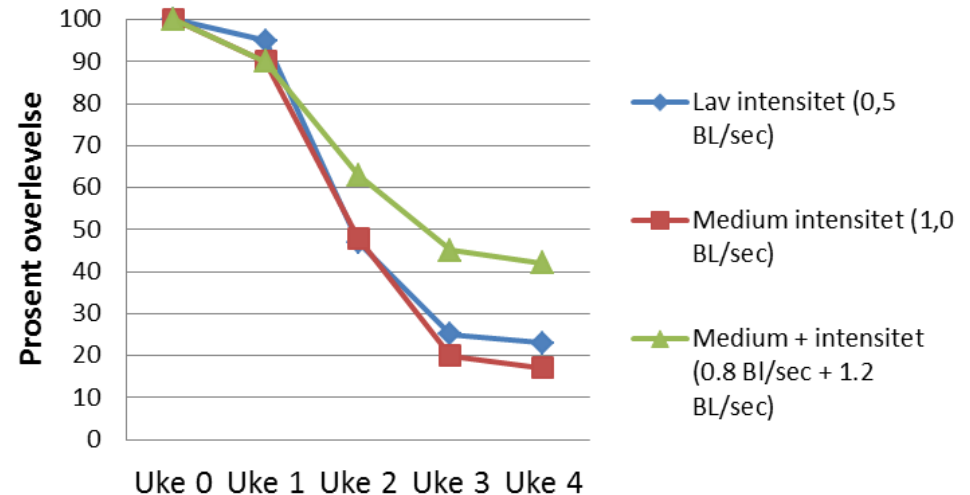
# Aerobisk trening som modell for robusthet

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

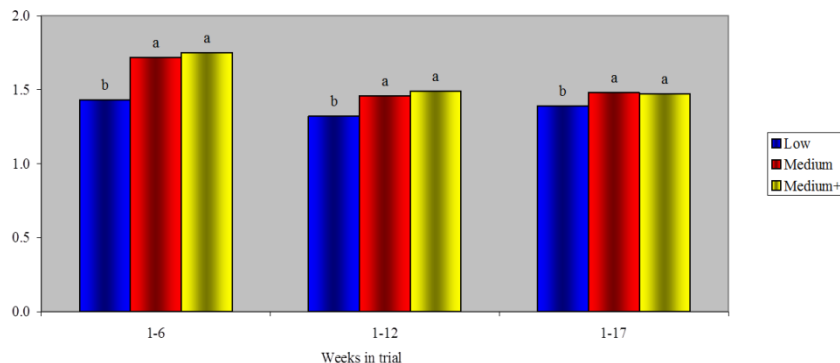
## IPN smittetest



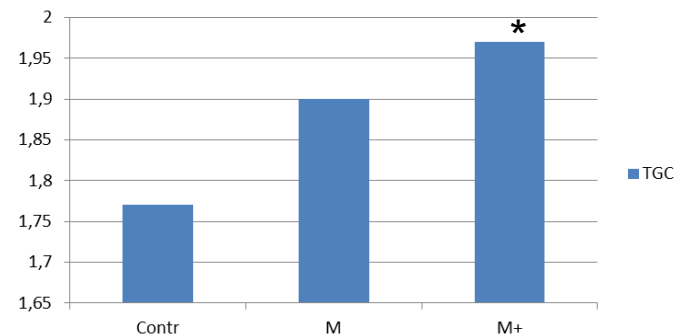
## Naturlig utbrudd av vintersår



## Thermal Growth Coefficient

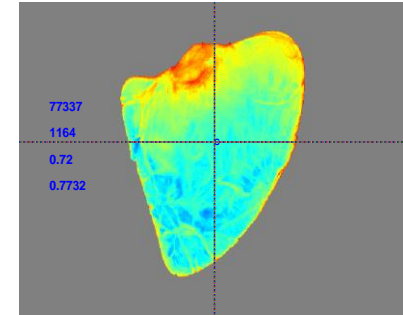


## TGC



# Hjertekapasitet og sirkulasjonssystemet

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



# Robust fisk krever effektivt hjerte!

## HJERTEKAPASITET

$V_{O_2}$  = minuttvolum = hjerterytme x slagvolum



# Etablert markørkart for hjertefunksjon hos fisk

## ENERGI

- AMPK $\alpha$  -P (protein)
- AMPK $\alpha$ 1

### Mitokondriell biogenese

- PGC-1  $\alpha$
- Mt-ratio

### Fettomsetning /transport

- PPAR $\alpha,\beta$
- CPT1  $\alpha$
- ACO
- ACC
- LPL

### Glukoseopptak /omsetning

- GLUT4
- Hexokinase II
- PDHB
- PDK3
- Pygm

### Muskelmodellering

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

### Cellulært stress

- iNOS (IHC/mRNA)
- HSP70 mfl

### Kontraktilitet

- SERCA2
- Calseq1
- DHPR
- RyR
- Fkbp1b

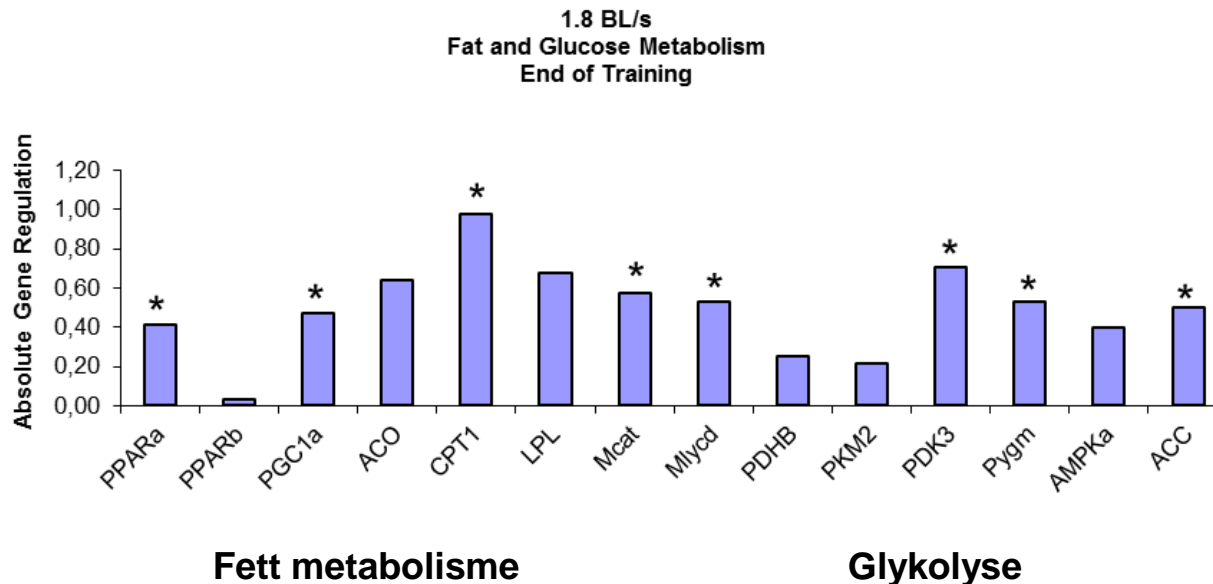
### Oksygentransp.

- EPO
- EPOr
- VEGF

# Markører for kardiovaskulær robusthet

## Trening fører til et mer effektivt hjerte:

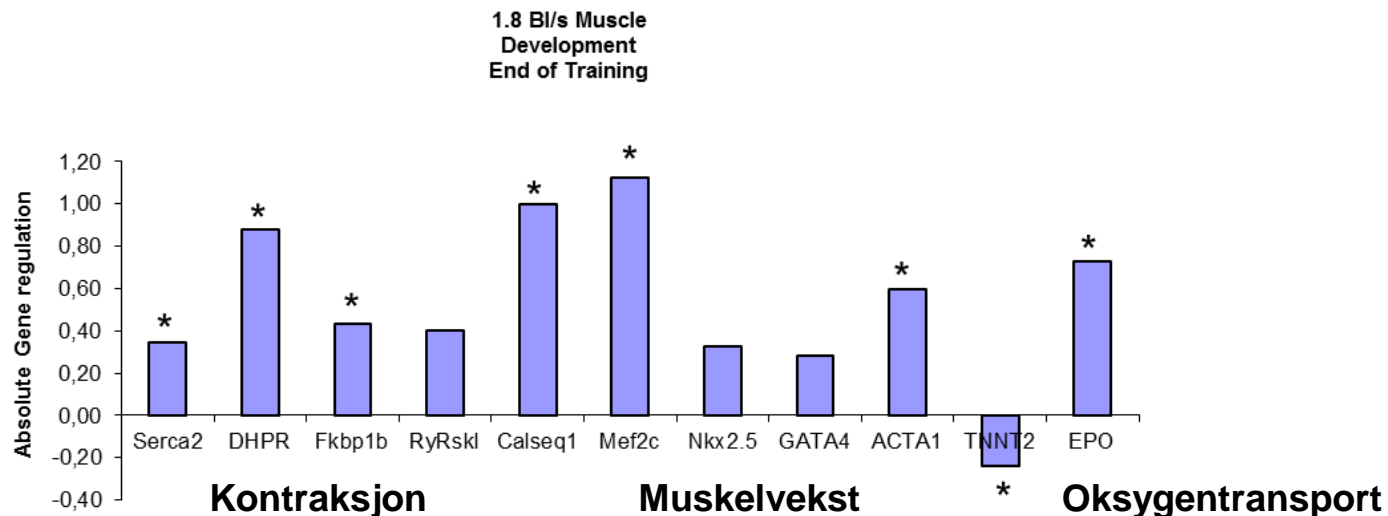
- Øker metabolsk kapasitet
  - Effektiv energimobilisering ved ekstra behov





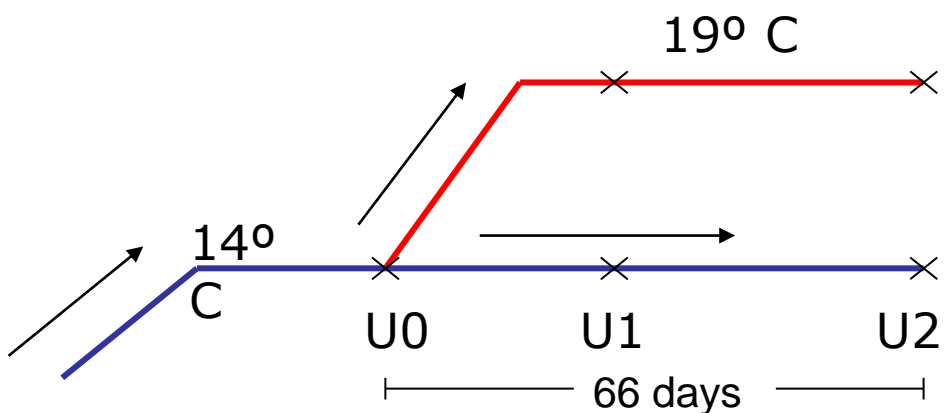
# Trening fører til et mer effektivt hjerte

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



# Robusthetsmarkører også evaluert hos laks eksponert for høye sjøtemperaturer

## Forsøksdesign:



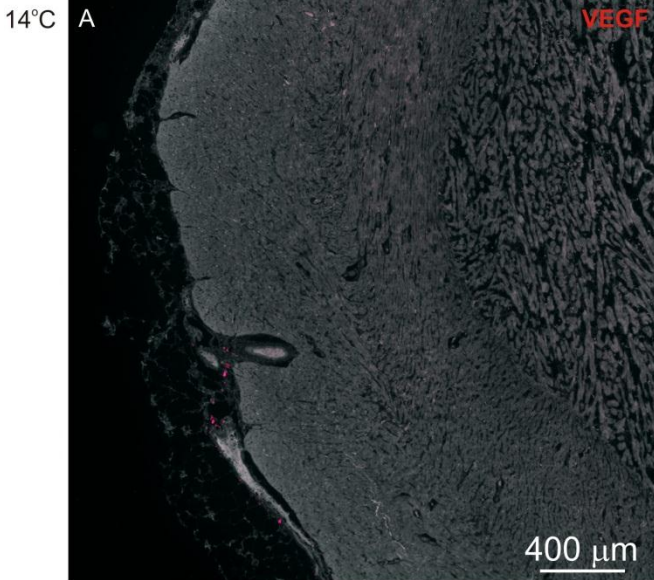
Høy sjøtemperatur førte til anemi

Hvordan påvirker høy temperatur hjertet?

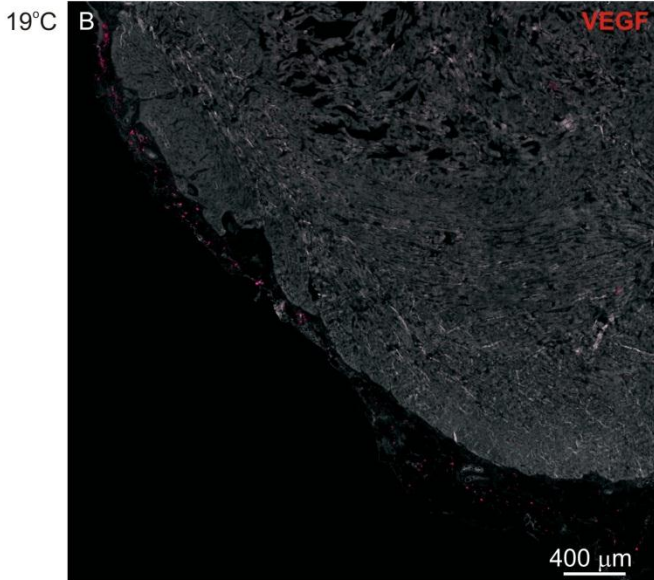
Startvekt 2.0 kg  $\pm$ 0.4, n=31-35, N=340

Fisk fôret til *Ad libitum* 4 t før sampling,  
100 % O<sub>2</sub>

# Immunohistologisk karakterisering av høytemp hjerter

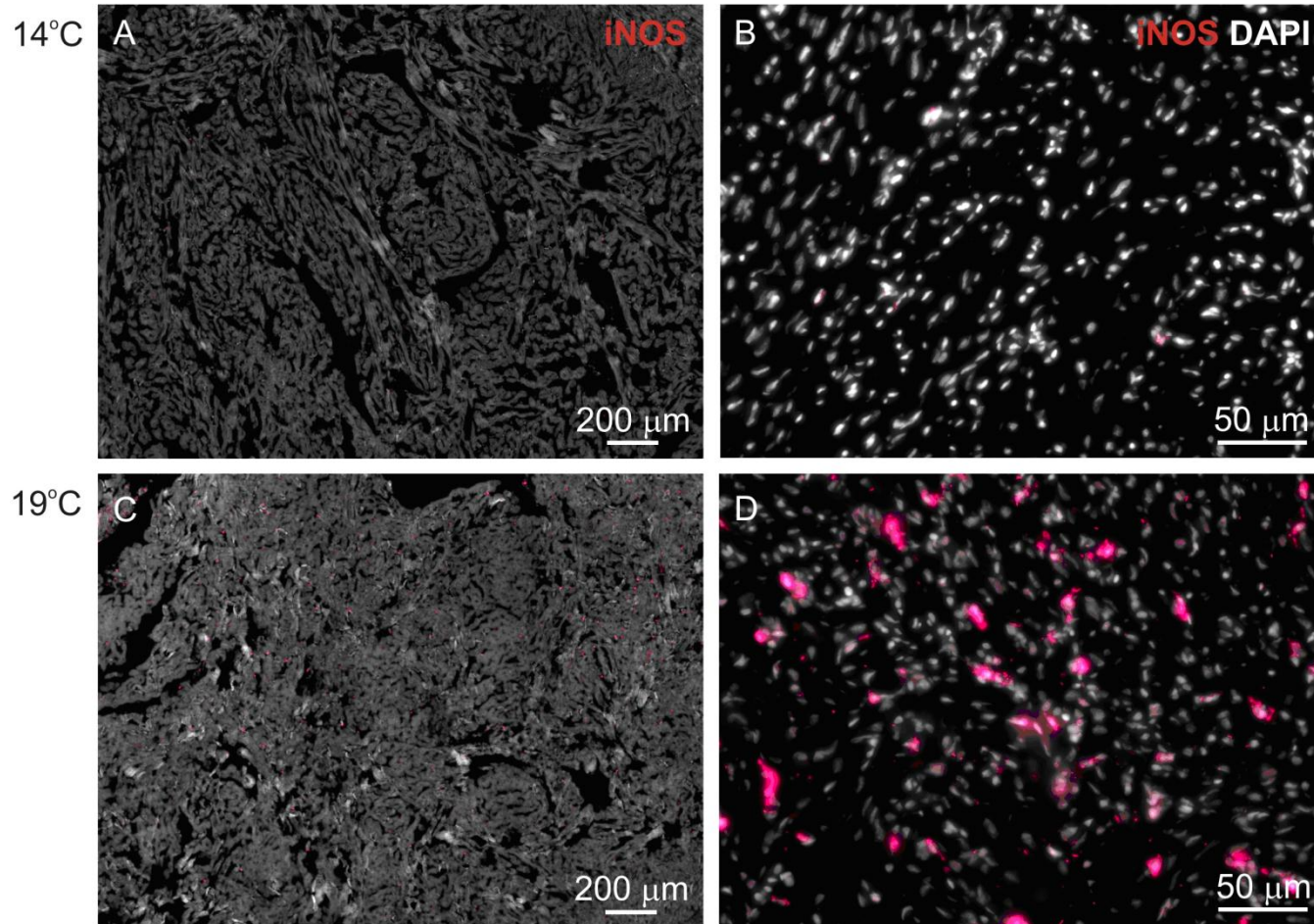


- 14 °C: Tydelig skille mellom kompakt myokardium og spongiosa.
- VEGF uttrykt ved eksisterende kapillærer i epicard



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

## Spong



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

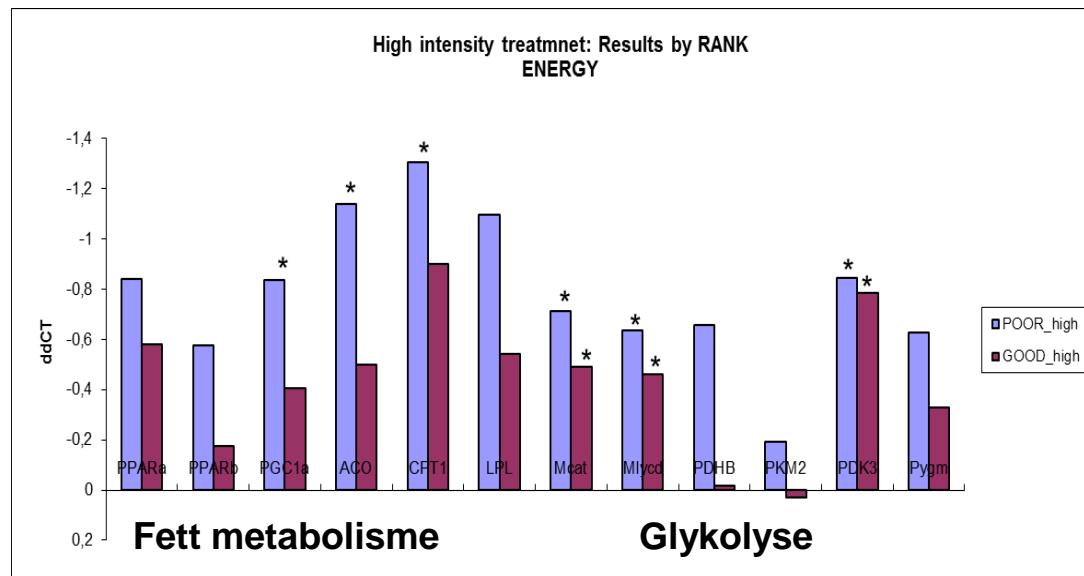
# Gode svømmere er mer robuste enn dårlige svømmere?

Metode:

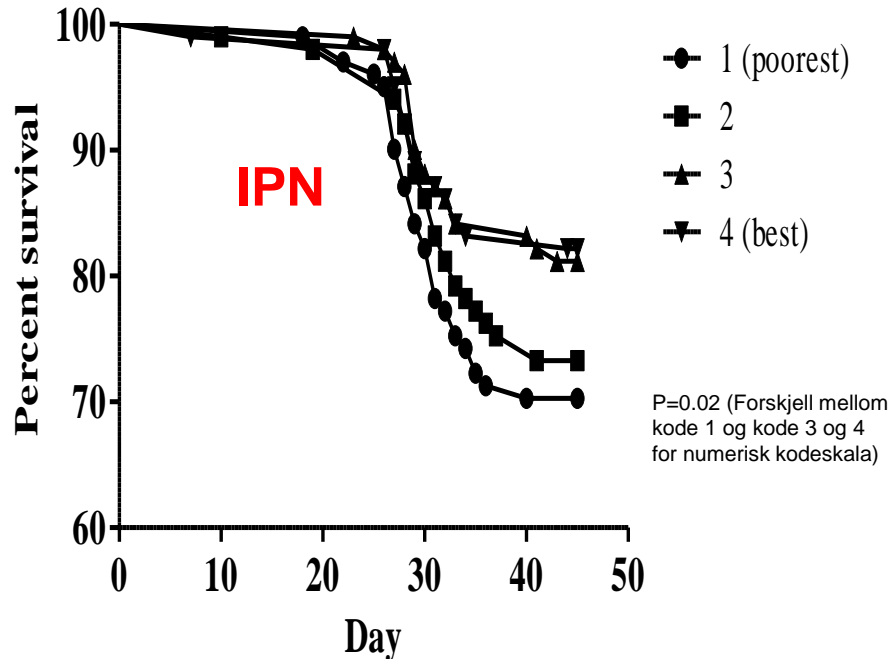
- Sorterer fiskepopulasjonen basert på evne til å svømme mot høy strøm
- Måler arbeidsbelastning på hjertemuskulaturen

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

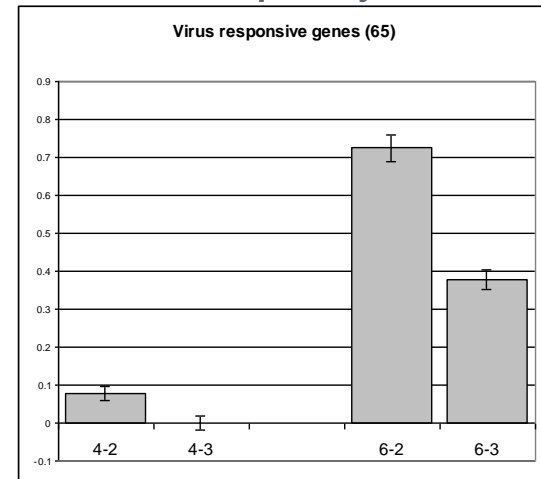
- Muligens er trening ekstra viktig for dårlige svømmere



# Lavere motstandsdyktighet mot IPN virus hos dårlige svømmere



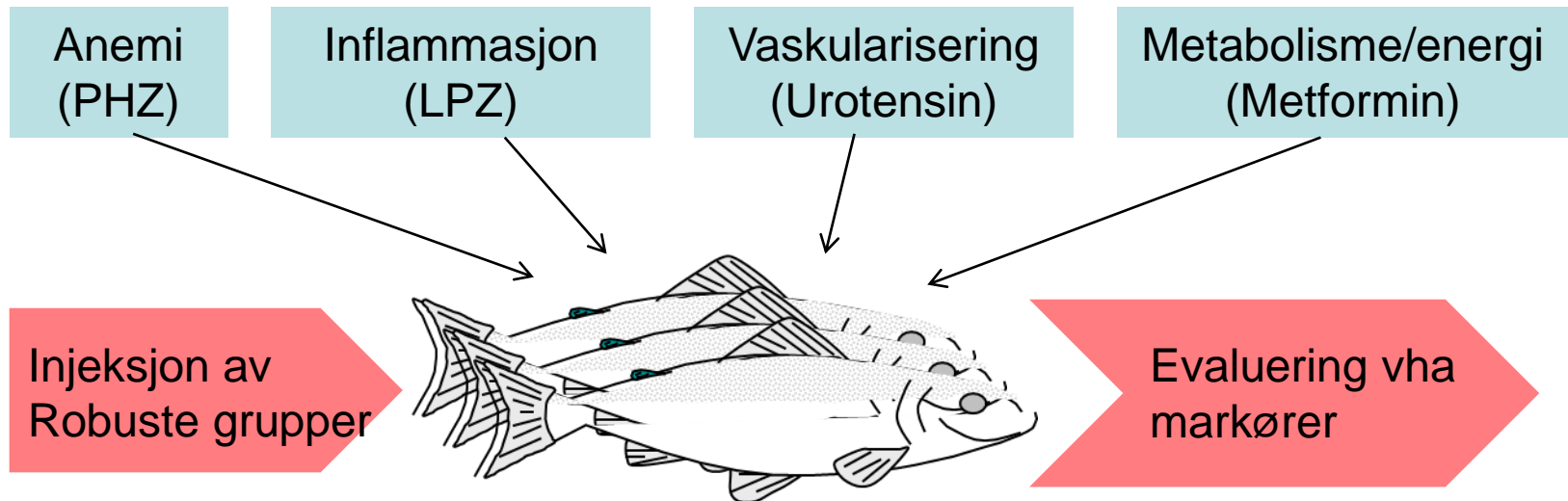
## VRG ekspresjon



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

# Injeksjons-challenge modeller for Robusthet

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



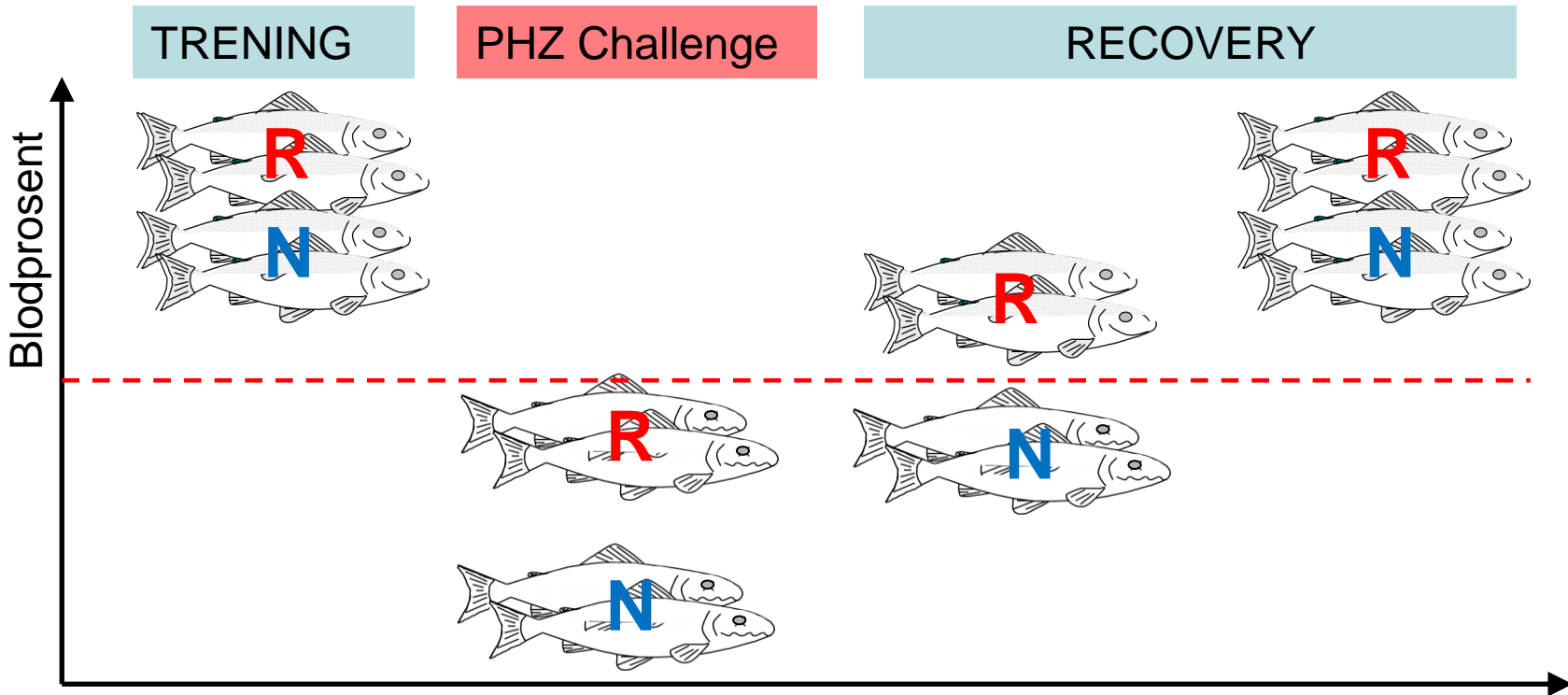
# Injeksjonsmodeller

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

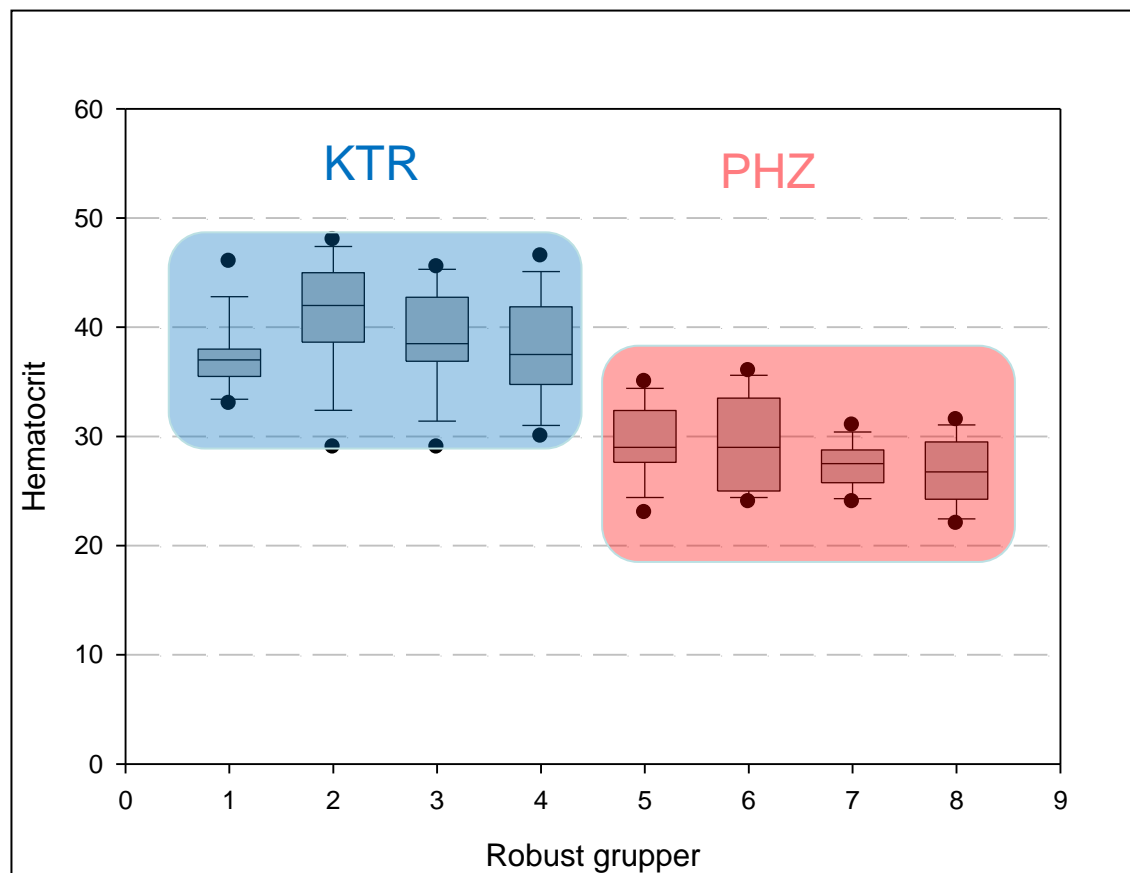


# Anemi (PHZ) vs Robusthet

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



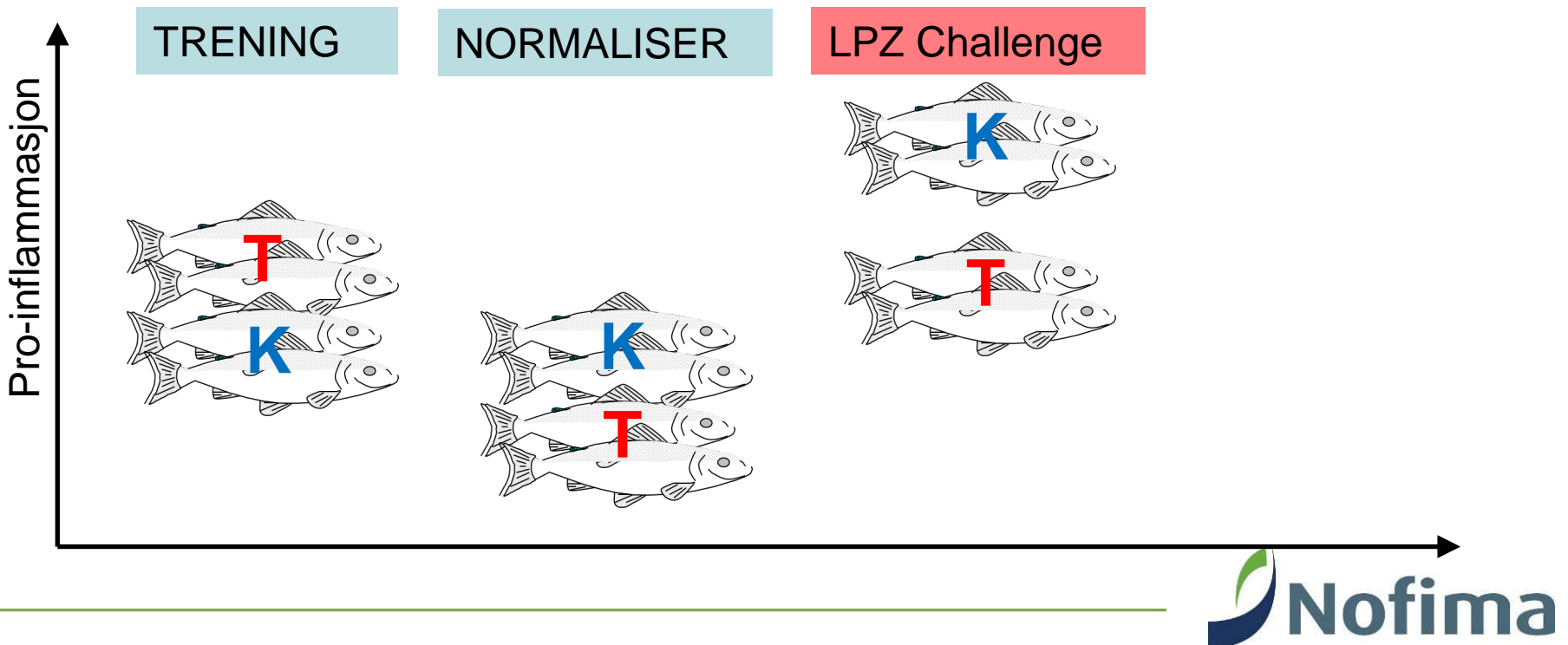
# Anemi (PHZ) vs Robusthet



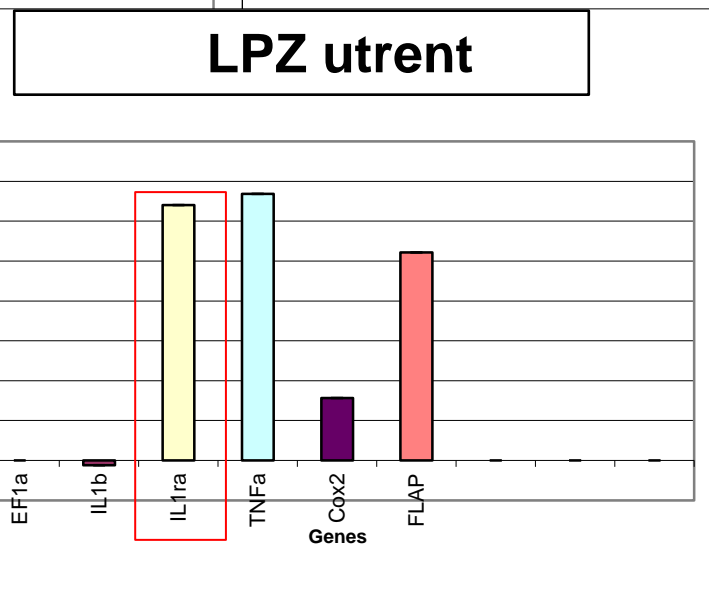
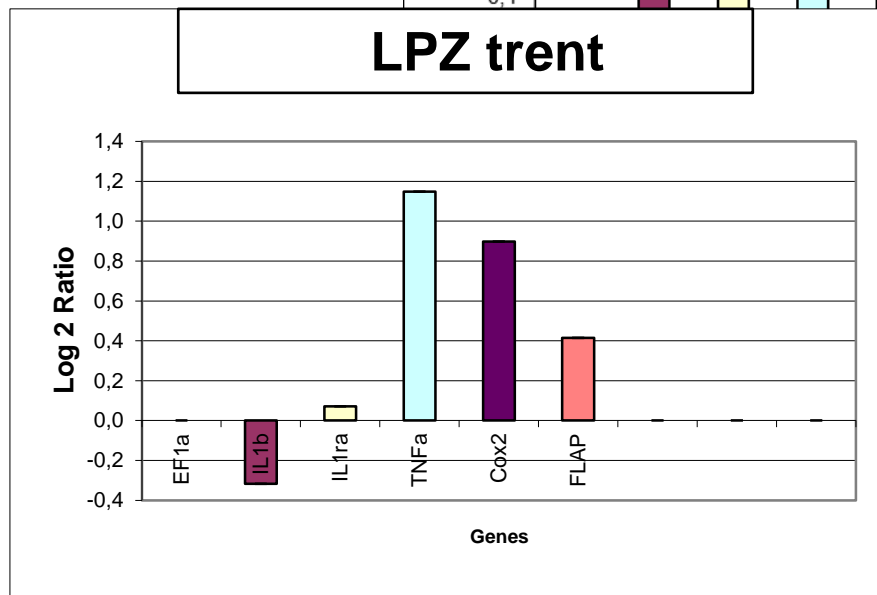
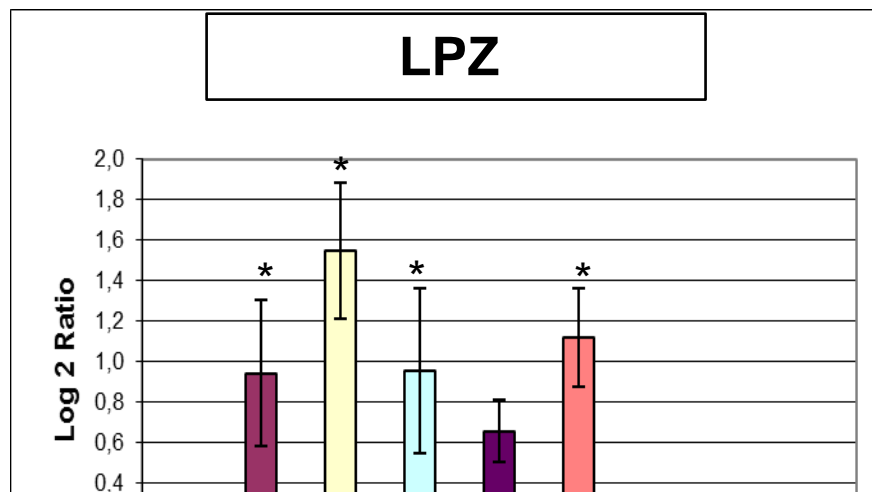
- Hct - høy individvariasjon
- Molekylære analyser (microarrays, EPO (qPCR))

# Inflammasjon (LPZ) vs Robusthet

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



# Inflammasjonsmodell:



# Oppsummering

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

# Oppsummering

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

# Veien fremover

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