

1.6

Ryggradsutvikling og deformasjoner i ryggøylen hos oppdrettsfisk

Anna Wargelius, Per Gunnar Fjellidal, Ulla Nordgarden, Arne Berg og Tom Hansen, Havforskningsinstituttet

Inntil nylig har forskningen på norske oppdrettsarter i hovedsak dreid seg om å redusere produksjonskostnader og øke kvaliteten på sluttproduktene. I den senere tid har imidlertid dyrevelferd generelt fått økt oppmerksomhet både nasjonalt og internasjonalt, og er nå i ferd med å bli inkludert i et utvidet kvalitetsbegrep. Konsumenten skal ikke bare kunne føle seg trygg på at matvarene som tilbys er sikre, sunne og velsmakende, men også på at dyrene de stammer fra har hatt det godt. Havforskningsinstituttet har de siste årene valgt å sette fokus på produksjonslidelser i akvakultur. Det finnes mange av dem, og de kan gi store konsekvenser både for fisken selv og for økonomien til den enkelte oppdretter. Flere av lidelsene er knyttet til feilutvikling eller deformasjoner i skjelettet hos oppdrettsfisk. Nå har forskere avdekket ny viten om smoltifiseringens betydning for utviklingen av virveløylen hos laks, og om effekten av høy temperatur i kritiske stadier. Fortsatt gjenstår det imidlertid å finne svar på mange viktige spørsmål.

Kunnskapen omkring skjelettet hos fisk er meget begrenset, og mye av den kommer fra studier på zebrafisk. Havforskningsinstituttet har derfor i de senere år økt satsingen på forskning og kunnskap omkring skjelettet i våre vanligste oppdrettsarter. Arbeidet skjer i samarbeid med AKVA-FORSK, NIFES og universitetene i Bergen, Göteborg og Wageningen.

SKJELETTDEFORMASJONER

Omfanget av deformasjoner er vanskelig å angi. Årsak til nedklassing på slaktelinjen ble i 1994 undersøkt i 100 slaktegrupper i Hordaland. Andelen fisk som ble nedklassifisert på grunn av ryggdeformasjoner lå rundt 3 %, men varierte fra 0–20 %. Hvis dette er representativt for Norge i dag, vil det si at det årlig slaktes ca. 6 millioner deformerte fisk.

De mest iøynefallende deformasjonene på stor fisk finner vi i virveløylen. Disse gir gjerne betydelige endringer i kroppsform slik som pukkel, krumninger eller forkortinger. Den mest gjenkjennelige formen for ryggradsdeformasjoner finner vi i “korthalene”. Dette er fisk med sammenvokste og/eller forkortede virvler i haleregionen.

Ulike typer av deformasjoner kan ha ulike årsaker, og kan påvirkes og utvikles i ulike livsfaser. Vi snakker derfor ikke om et problem med én løsning, men om ulike typer deformasjoner, med mange årsaker. Problemet er størst i lakse-næringen fordi det er her produksjonsvolumet er størst, men

deformasjoner er til stede i alle typer oppdrett. Etter hvert som volumet øker for marine arter og nye arter kommer inn i bildet, vil man trolig også få økt oppmerksomhet omkring skjelettdeformasjoner hos disse artene.

HVA GJØR HAVFORSKNINGSINSTITUTTET?

Produksjonslidelser er et satsingsområde ved Havforskningsinstituttet. For å kunne finne løsninger som kan redusere problemene med deformasjoner, arbeides det nå på mange områder. Forskning trengs for å forstå hva som forårsaker deformasjoner, når og hvordan de oppstår og hvilke mekanismer som styrer skjelettutviklingen hos fisk.

En deformitet kan skyldes én enkeltfaktor eller en kombinasjon av flere samvirkende faktorer. Den kan også dannes ved ulike livsstadier. Det trengs derfor et bredt spekter av metoder for å kartlegge årsaksforhold, og for å kunne foreslå tiltak som vil gjøre det mulig for oppdrettsnæringen å unngå deformasjoner.

Eksperimentelt har det så langt vært arbeidet med å kartlegge følgende årsaksforhold;

- Temperatur
- Vekstrate
- Vaksinerings
- Vannkvalitet og oppdrettsmiljø

Metoder for å undersøke deformasjoner er bl.a.:

- Registrering av ulike typer synlige deformasjoner
- Genteknologi for å undersøke hvilke gener som uttrykkes
- Histologi og helpreparat for å studere forandringer i vev
- Røntgen for å studere vekst og utseende på ryggvirvler
- Kjemiske analyser for beinsammensetning og hormonanalyser
- Tekstur for å måle beinstyrke
- Vekst og kondisjon

Nedenfor er en kort gjennomgang av noen av de nyeste resultatene fra Havforskningsinstituttets forskning på området. Resultatene kommer fra det strategiske instituttprogrammet “Fast growth and welfare in Atlantic salmon and rainbow trout”. Dette er et femårig program som har finansiering fra Norges forskningsråd, og hvor AKVA-FORSK er med som hovedsamarbeidspartner.

TIDLIG RYGGGRADSUTVIKLING HOS LAKS

Kunnskapen om hva som skjer under dannelsen og senere under veksten av ryggraden hos laks er meget begrenset. Den eksisterende kunnskapen kommer fra modellstudier på zebrafisk, mus og kylling. I disse organismene har man sett at virvelsøylen dannes fra grupper av celler langs ryggstrengen (notochorden) som kalles sklerotomale (skjelettdannende) celler. Det er påvist at disse skjelettdannende cellene først dannes under ryggstrengen, for så å vokse rundt ryggstrengen hvor de sammen danner selve ryggraden hos organismen.

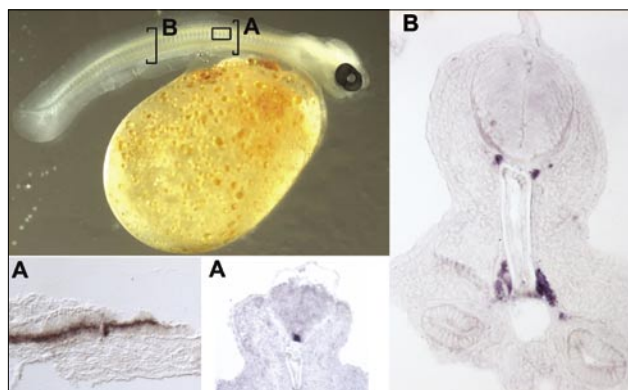
Man tror at disse skjelettdannende cellene induseres, defineres og bestemmes gjennom eksterne og interne signaler. Et av disse interne signalene kalles “*Twist*” og er en såkalt transkripsjonsfaktor, det vil si en faktor som binder seg til DNA og som initierer eller hindrer genuttrykk. Funksjonelle studier i mus har vist at *Twist* blant annet hindrer det muskelspesifikke programmet i de skjelettdannende cellene. Man tror dette gjør at cellene beholder sin evne til å svare på det skjelettspesifikke programmet. For å undersøke om laks også har skjelettdannende celler, klonet vi *Twist* hos laks. På øyerognstadiet fant vi genuttrykk av *Twist* i celler som omgir ryggstrengen (Figur 1). Dette genuttrykket stemmer bra med det som tidligere er vist i zebrafisk; med andre ord har vi påvist skjelettdannende celler hos laks.

Skjelettdannende celler påvirkes også av eksterne faktorer. Dette er stoffer som skilles ut i andre celler, og som vandrer gjennom vevet fram til de cellene de skal påvirke. En slik eksternt faktor som vi vet påvirker de skjelettdannende cellene er “Sonic hedgehog” (*Shh*). Mus som mangler *Shh* utvikler ikke skjelettdannende celler og mangler ryggrad. I Figur 1 vises genuttrykket av *Shh* på øyerognstadiet hos laks. Dette uttrykket stemmer godt overens med det som tidligere er vist i zebrafisk.

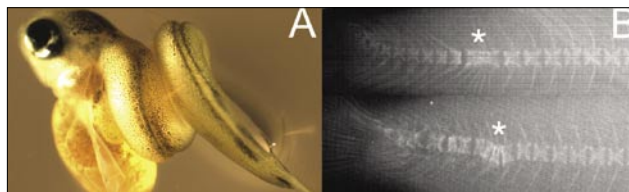
EFFEKTER AV HØY TEMPERATUR

Høy temperatur under egginkuberingen fører til deformiteter hos fisk. Vi ville undersøke om stress på grunn av høy temperatur tidlig i utviklingen skadet ryggradsdannelsen hos laks. Man vet at de skjelettdannende cellene dannes tidlig i utviklingen. Hos laks kan disse cellene påvises allerede 50 døgngrader etter befruktning (etter dannelsen av de tre kimlagene i embryoet). På dette stadiet overførte vi lakseegg fra 6 til 12 °C, og holdt dem der i 24 timer, før de igjen ble satt tilbake på 6 °C.

Deretter tok vi prøver for å se hva som skjedde med genuttrykket til *Twist* og *Shh*. Vi fant ingen endring i uttrykket av *Twist* etter varmebehandlingen, mens det derimot var klare indikasjoner på at *Shh* reduseres. 40 % av plommesekkyngelen som kom fra egg som hadde vært varmebehandlet var deformert, og ved ni måneders alder hadde ca. 30 % sammenvokste ryggvirvler i den bakre del av ryggstøylene (Figur 2 B). Ved startfôring hadde om lag 20 % av individene som var blitt gitt varmebehandling utviklet så alvorlige deformasjoner at de ble avlivet (Figur 2 A). Disse resultatene viser at ryggradsdannelsen er en meget stressfølsom prosess. I det videre arbeidet vil vi studere hva som skjer med genuttrykket på andre kritiske stadier i laksens utvikling.



Figur 1
Genuttrykk av *Twist* (B) og *Shh* (A) på øyerognstadiet hos laks. Bildet illustrerer hvor tverrsnittet (*Twist*-uttrykket) og lengdesnittet (*Shh*-uttrykket) er gjort på fisken.
Gene-expression of Twist (B) and Shh (A) at eye-pigmentation in salmon embryos.



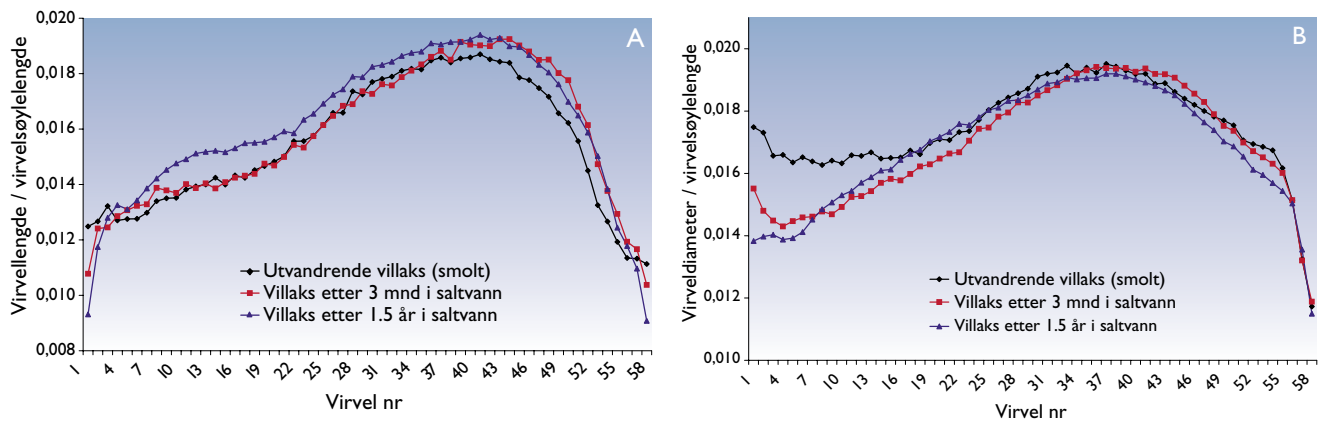
Figur 2
Ved startfôring hadde om lag 20 % av individene gitt varmebehandling utviklet så alvorlige deformasjoner at de ble avlivet, mange hadde “griserumper” (A). Ved ni måneders alder hadde om lag 30 % sammenvokste ryggvirvler i den bakre del av ryggstøylene (B).
At first-feeding about 20 % of the heat-shocked fish had developed malformations of which the “curly tail” was the most common phenotype (A). At the age of nine months about 30 % of the fish showed fused vertebrae (B).

VIRVELVEKST HOS ATLANTISK LAKS

Virvelsøylen hos laks består vanligvis av 57–59 virvler. De 30 første virvlene er tilknyttet bukhulen. Laksens virvelsøyler har ikke den vekt bærende funksjonen vi finner hos landlevende dyr, grunnet svømmeblærens oppdrift og vannets tetthet. Bevegelse mellom virvlene hos beinfisk er begrenset til svingninger til siden ved svømming.

Når en lakseunge gjennomgår en prosess som kalles smoltifisering, dvs. at den blir blank og gjennomgår en rekke fysiologiske forandringer, er den klar for å overføres fra ferskvann til saltvann; eller i naturen, vandre ut fra elven den har vokst opp i til saltvann. Oppdrettet laks stammer hovedsakelig fra en av to ulike smolttyper, høstsmolt eller vårs smolt. Høstsmolten overføres til sjøvann om høsten samme år som den er klekket, mens vårs smolten overføres om våren ca. 16–17 måneder etter klekking. Lakseungene gis forskjellige lysregime for å oppnå dette. Høstsmolt vokser mye fortere enn vårs smolt i ferskvannsfasen, noe som igjen kan påvirke virvlenes vekst, struktur og sammensetting.

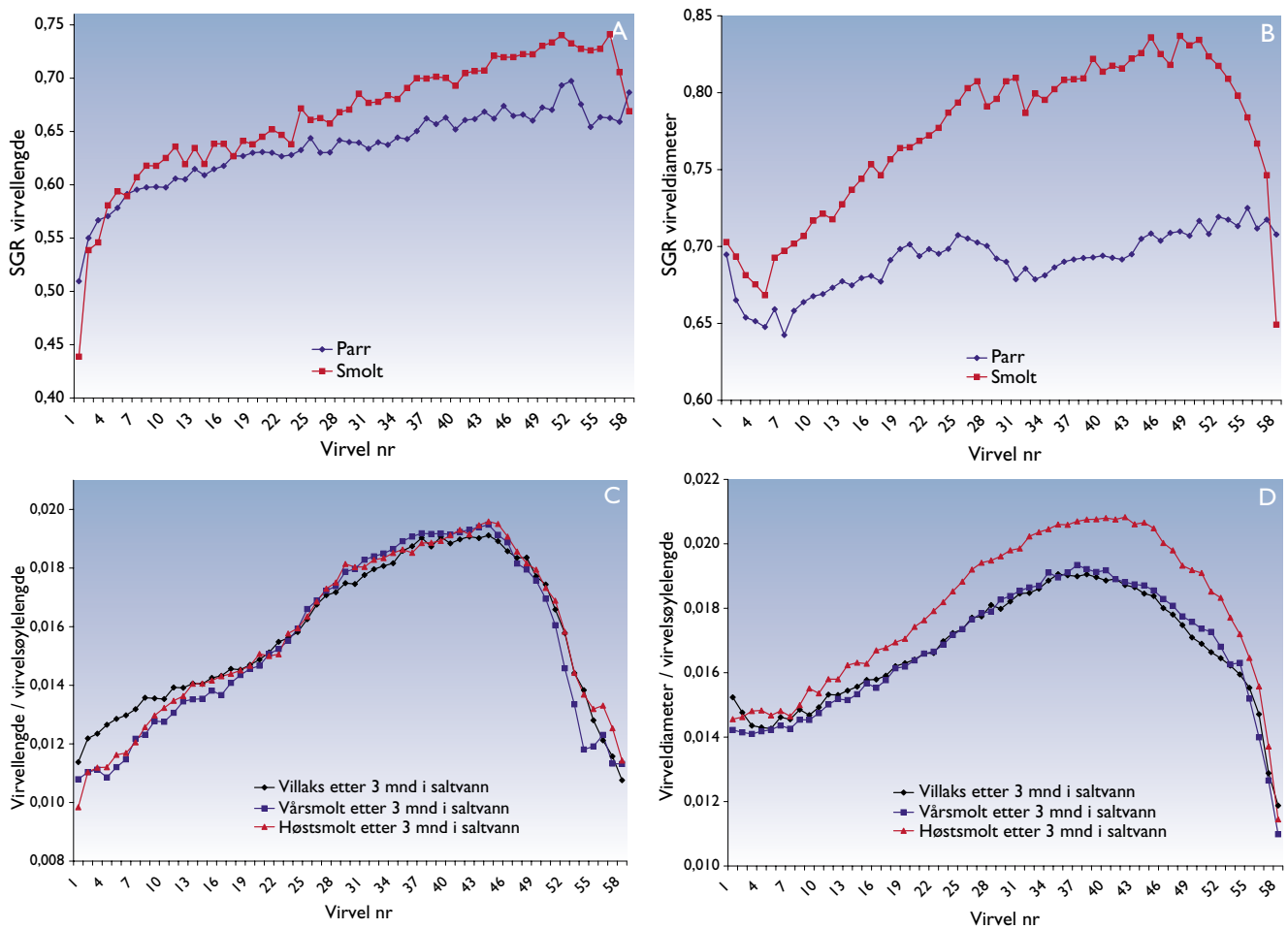
Lysmanipulering i form av kontinuerlig belysning brukes også i sjøvannsfasen. Dette gjøres for å redusere andelen av



Figur 3

Virvellengde/virvelsøylelengde (A) og virveldiameter/virvelsøylelengde (B) hos villaks ved utvandring til saltvann i mai, etter tre måneder i saltvann i august og etter 1,5 år i saltvann.

Vertebrae length/ vertebral column length (A) length and vertebrae diameter/ vertebral column length (B) in wild salmon which had; migrated into sea water in May, stayed three months in sea water (August) and stayed 1,5 year in sea water.



Figur 4 A–D

Vekst i virvellengde (A) og -diameter (B) hos parr holdt i ferskvann og høstsmolt overført til sjøvann ved smoltifisering. Virvellengde/ virvelsøylelengde (C) og virveldiameter/ virvelsøylelengde (D) hos vill smolt og oppdrettet høst- og vårs smolt tre måneder etter utvandring og overføring til saltvann. SGR = spesifikk vekstrate.

Growth of vertebrae length (A) and diameter (B) in parr and smolt. Vertebrae length/ vertebral column length (C) and vertebrae diameter/ vertebral column length (D) in; wild, cultured spring and cultured autumn smolt three months after migration into salt water. SGR=specific growth rate.

fisk som blir kjønnsmodne, noe som både innebærer dårlig økonomi og dårlig dyrevelferd. En slik strategi gir også økt vekst og større fisk ved slakting. Denne veksteffekten av lys kan også tenkes å påvirke virvlens vekst, struktur og sammensetting.

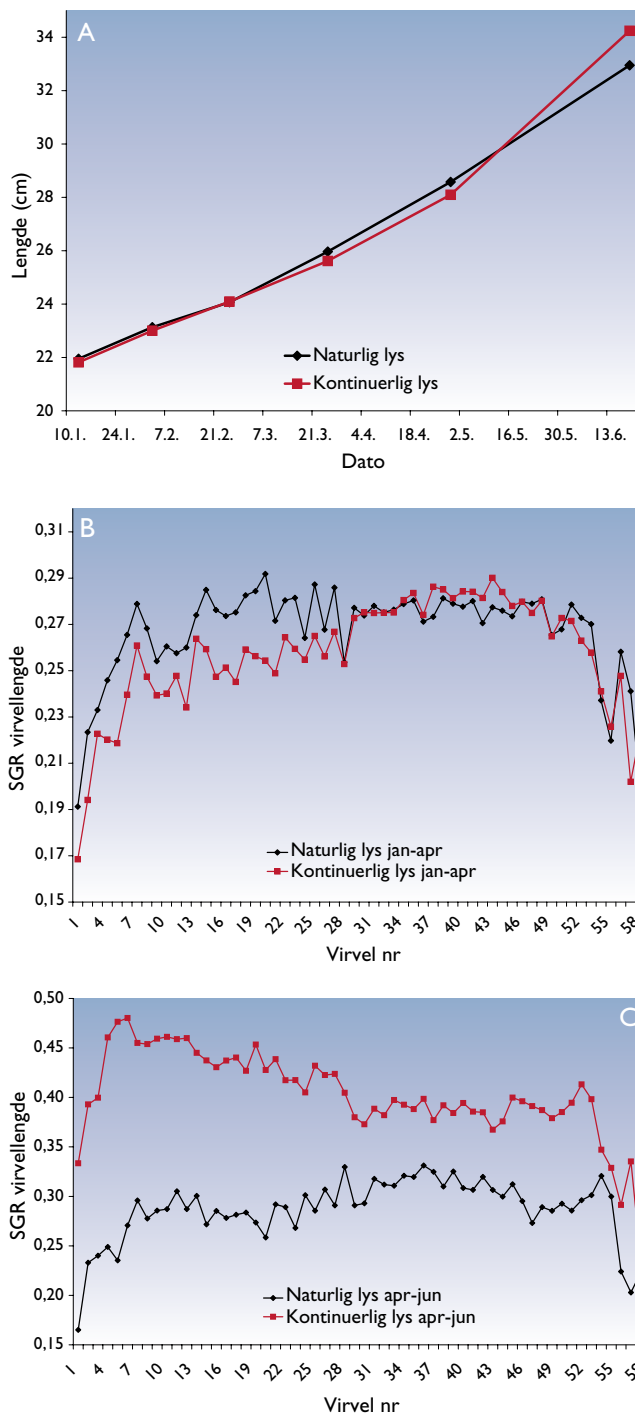
For å få kunnskap om den normale veksten og utviklingen av virvelsøylen hos laks, har vi gjort en undersøkelse av virvelsøylen hos villaks fanget på ulike livsstadier og til ulike tider av året. Dette materialet viser at forskjellige regioner i virvelsøylen vokser i ujevn grad ved ulike tidspunkter i laksens livssyklus. I den tidlige sjøvannsfasen, ved utvandring fra ferskvann til saltvann i mai til august, vokser virvlene i den bakre delen av ryggsøylen relativt mer i lengde enn i den fremre delen (Figur 3). Det motsatte er tilfellet senere i sjøvannsfasen, fra august til juli.

Det er videre gjennomført to forsøk for å kartlegge veksten til virvelsøylen hos oppdrettet laks i forbindelse med smoltifisering og tidlig sjøvannsfase. I det første forsøket ble én gruppe lakseunger (parr) oppdrettet under kontinuerlig lys, mens en annen ble gitt lysregime for produksjon av høstsmolt fra midten av juli. Parr gitt kontinuerlig belysning ble holdt i ferskvann gjennom hele forsøket, mens høstsmolt ble overført til kar med saltvann ved smoltifisering i oktober. Individmerket fisk ble fotografert med røntgen ved forsøkets start og slutt. Smoltifiseringen initierte økt vekstrate i virvellengdevekst i virvelsøylen bakre del (Figur 4 A). Høstsmolt hadde en stor økning i virveldiameter gjennom hele virvelsøylen, sammenlignet med parr (Figur 4 B). Høstsmolt ble sammenlignet med oppdrettet vårs smolt og villsmolt, som hadde vært i saltvann tilsvarende lengde. Hos disse ble det ikke funnet en tilsvarende økning i virveldiameter i tidlig sjøvannsfase (Figur 4 D). Det er foreløpig ikke klart om økningen i virveldiameter er en kompensasjon for en svak og dårlig mineralisert struktur som et resultat av hurtig vekst hos høstsmolt. Villaks hadde relativt lengre virvler i virvelsøylen fremre del, sammenlignet med oppdrettet høst- og vårs smolt tre måneder etter utvandring/sjøvannsoverføring (Figur 4 C). Hva som forårsaker nedsatt vekst i virvellengde i denne regionen hos oppdrettet laks, vites heller ikke sikkert.

I det andre forsøket ble to grupper av postsmolt fra høstutsett oppdrettet i merder i saltvann under henholdsvis naturlig lys og kontinuerlig belysning fra midten av januar til midtsommer. Laks gitt kontinuerlig lys fra januar vokste dårligere i perioden januar–april enn laks gitt naturlig lys, mens den vokste best fra april til midtsommer (Figur 5 A). I perioden med dårlig vekst var det bare virvelsøylen fremre del som vokste dårlig hos den lyssatte laksen, mens veksten i virvelsøylen bakre del var lik laksen gitt naturlig lys (Figur 5 B). I perioden med god vekst fra april til midtsommer kompenserte den lyssatte laksen ved å øke veksten i ryggsøylen fremre del (Figur 5 C). Disse resultatene viser at en reguleringsmekanisme for vekst i virvelsøylen ligger lokalt i virvlene, og at virvelsøylen fremre og bakre del har ulike reguleringsmekanismer for vekst.

Fra villfiskmaterialet og de to overnevnte forsøkene ser vi at smoltifisering initierer økt vekst i virvellengde i virvelsøylen bakre del, mens det senere i sjøvannsfasen ser ut til at

virvelsøylen fremre del er mest mottakelig for ytre påvirkninger. Dette er ny viten som kan øke forståelsen av når og hvordan deformasjoner i virvelsøylen oppstår hos laks. Hvordan disse vekstreguleringer skjer, og hva det er lokalt i virvlene som styrer dette, er spørsmål vi vil jobbe videre med og kartlegge.



Figur 5 A–C
Økning i lengde i perioden januar til midtsommer hos laks gitt naturlig og kontinuerlig belysning (A). Vekst i virvellengde i perioden januar–april (B) og april–juni (C) hos laks gitt naturlig og kontinuerlig belysning. SGR = spesifikk vekstrate.
Length of salmon grown in natural and continuous light from January until June (A). Vertebrae length January–April (B) and April–June (C) in salmon exposed to continuous and natural light.
SGR = specific growth rate.