

# Evaluering av helse, velferd og tilvekst hos steril laks etter embryonal blokkering av kimcellene

Faglig sluttrapport



Illustrasjon: Nofima

Nofima er et ledende matforskningsinstitutt som driver med forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien. Vi leverer internasjonal anerkjent forskning og løsninger som gir næringslivet konkurransefortrinn langs hele verdikjeden.

«Bærekraftig mat til alle» er vår visjon.

### Kontaktinformasjon

Telefon: 77 62 90 00

[post@nofima.no](mailto:post@nofima.no)

[www.nofima.no](http://www.nofima.no)

NO 989 278 835 MVA



#### Hovedkontor Tromsø

Muninbakken 9–13

Postboks 6122

NO-9291 Tromsø



#### Stavanger

Måltidets hus

Richard Johnsensgate 4

Postboks 8034

NO-4068 Stavanger



#### Sunndalsøra

Sjølsengvegen 22

NO-6600 Sunndalsøra



#### Ås

Osloveien 1

Postboks 210

NO-1433 ÅS



#### Bergen

Kjerreidviken 16

Postboks 1425 Oasen

NO-5844 Bergen

## Rapport

<i>Rapportnummer:</i> 11/2022	<i>ISBN:</i> 978-82-8296-713-6	<i>ISSN:</i> 1890-579X
<i>Dato:</i> 28. april 2022	<i>Antall sider + sider vedlegg:</i> 13	<i>Prosjektnummer:</i> 12187
<i>Tittel:</i> <b>Evaluering av helse, velferd og tilvekst hos steril laks etter embryonal blokkering av kimmcellene</b>		
<i>Title:</i> Evaluation of health, welfare, and growth in sterile salmon after deletion of embryonic germ cells		
<i>Forfatter(e):</i> Øivind Andersen (Nofima), Helge Tveiten (UiT), Tina Thesslund (Nofima) og Hans-Petter Kleppen (ACD Pharma AS)		
<i>Avdeling:</i> Produksjonsbiologi		
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)		
<i>Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.:</i> FHF 901459		
<i>Stikkord:</i> Steril laks, kimmceller, velferd, produksjonsegenskaper		
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Oppdrett av steril laks vil kunne redusere de negative interaksjonene mellom rømt oppdrettslaks og villaks, og dessuten forbedre fiskens velferd og kvalitet. Prosjektets hovedmål har vært å evaluere viktige produksjonsegenskaper hos steril laks etter å ha fjernet de embryonale kimmcellene. Inaktivering av kimmcellefaktoren Deadend ga livsvarig tap av kjønnsceller hos både hann- og hunnfisk. Steril laks viste normal osmoreguleringsevne, og sjøvannstoleransen var minst like god som hos fertil laks. Steril og fertil laks viste ingen konsistente forskjeller i stressrespons og immunstatus ved kortisolmåling og qPCR-analyse av stressrelaterte og pro- og anti-inflammatoriske faktorer. Steril laks viste robusthet også i sjø tross ekstreme værforhold og avlusing etter alvorlig luseangrep. Ytre sår, finneskader og rødme i buk ble registrert hos både steril og fertil laks med ubetydelige misdannelser. Steril og fertil laks viste samme vekstforløp i ferskvann, mens sammenlikning av vekst i sjø er usikker grunnet lite antall fertile fisk. Kjønnshormonene ble aktivert hos både sterile og fertile hannfisk i ferskvann, men kjønnssteroidnivået avtok hos de sterile hannene etter sjøutsetting. Prosjektet konkluderer at inaktivering av Deadend på embryostadiet gir en steril laks med samme fenotype som fertil laks, bortsett fra fravær av kjønnsceller, og anbefaler at nødvendig teknologi for storskala-produksjon av steril oppdrettslaks bør utvikles.		

### *English summary/recommendation:*

Sterile farmed salmon would reduce the negative interactions between escapees and wild salmon and improve fish welfare and quality. The main goal of this project has been to evaluate important production traits in sterile salmon after ablation of the primordial germ cells. Transient inactivation of the embryonic germ cell factor Deadend caused lifelong loss of gametes in both males and females. The sterile salmon showed normal osmoregulatory ability and seawater tolerance. No consistent differences were shown in stress-response and immune status by cortisol measurement and qPCR quantification of multiple stress-related and pro- and anti-inflammatory factors. Sterile salmon showed robustness in seawater despite extreme weather conditions and serious sea lice attack. External wounds, fin damages and abdominal bleedings were registered in sterile and fertile salmon with only sporadic malformations. Sterile and fertile salmon showed similar growth performance in freshwater, but the comparison in sea water is uncertain due to few fertile fish left. Sex hormone synthesis was induced in both sterile and fertile males, but sex steroid levels decreased in sterile fish after seawater transfer. The project concludes that embryonic Deadend inactivation results in sterile salmon with the same phenotype as fertile fish, except for the missing gametes, and recommends that technology should be developed for large-scale production of sterile salmon in aquaculture.

## **Forord**

Prosjektet omhandler steril oppdrettslaks og evaluering av dens prestasjoner og velferd i ferskvann og sjøvann. Undersøkelsene er utført fra 1. september 2017 til 1. mai 2022. Arbeidet er i sin helhet finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF).

## Innhold

<b>1</b>	<b>Sammendrag (norsk og engelsk)</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Innledning</b>	<b>2</b>
2.1	Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt	2
2.2	Prosjektets omfang	2
2.3	Prosjektorganisering	3
<b>3</b>	<b>Problemstilling og formål</b>	<b>4</b>
3.1	Prosjektets effektmål	4
3.2	Prosjektets resultatmål	4
3.3	Prosjektgjennomføring	4
<b>4</b>	<b>Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon</b>	<b>6</b>
4.1	Livsvarig fravær av kjønnceller hos steril laks	6
4.2	Steril laks viser god osmoreguleringsevne, sjøvannstoleranse, stressrespons og immunforsvar	6
4.3	Produksjon av kjønns hormoner hos steril og fertil hannlaks	8
4.4	Tilvekst hos steril og fertil laks	8
4.5	Tilvekst i sjøvann	8
4.6	Robusthet, toleranse for lakselus, og dødelighet	9
4.7	Fravær av kimceller har liten innvirkning på extra-gonadalt genuttrykk	9
<b>5</b>	<b>Hovedfunn</b>	<b>11</b>
<b>6</b>	<b>Leveranser</b>	<b>11</b>
<b>7</b>	<b>Publikasjoner og omtaler av prosjektet</b>	<b>12</b>

## 1 Sammendrag (norsk og engelsk)

Tidlig kjønnsmodning hos oppdrettslaks skaper store utfordringer for næringen, og rømt oppdrettslaks interagerer med villaksen og truer dens egenart. Problemene vil kunne reduseres ved å produsere steril laks under forutsetning av at fiskens prestasjoner og velferd ikke påvirkes negativt. Prosjektets hovedmål har vært å evaluere viktige produksjonsegenskaper hos steril laks som har fått fjernet de embryonale kimcellene. Omfattende undersøkelser av tilvekst, osmoregulering, sjøvannstoleranse, stressrespons, immunstatus, kjønnsutvikling og robusthet ved luseangrep viste samme fenotype hos steril og fertil laks, bortsett fra manglende kjønnsceller. Prosjektet anbefaler imidlertid at uttestingen i sjø gjentas på et større materiale, samtidig som den anvendte teknologien videreutvikles for effektiv produksjon av steril oppdrettslaks.

Early sexual maturation in farmed salmon is a major challenge for the industry, and farmed escapees threatens the wild salmon populations. The problems could be reduced by producing sterile salmon with the otherwise same phenotype as intact fertile salmon. The main goal of this project was to evaluate important production traits in sterile after removal of embryonic germ cells. Comprehensive examination of body growth, osmoregulation, seawater tolerance, stress response, immune status, maturation and robustness against sea lice attach documented similar phenotype in sterile and fertile salmon, except for missing gametes. The project recommends, however, that the seawater tests should be repeated using a larger fish material, and to develop necessary technology for efficient production of sterile farmed salmon.

## 2 Innledning

### 2.1 Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt

Norge har en tredjedel av den totale europeiske stammen av Atlanterhavslaks. Den største trusselen for villaksen er i dag rømt oppdrettslaks som går opp i elvene og fortrenger de særegne laksepopulasjonene. Genetiske interaksjoner mellom oppdrettslaks og villaks er dokumentert ved endringer i viktige egenskaper, spesielt vekst og kjønnsmodning, som påvirker livssyklusen hos villaksen. I de syv seneste årene har det i gjennomsnitt rømt 155000 oppdrettsfisk, hovedsakelig laks. Disse problemene vil kunne løses med oppdrett i landbaserte resirkuleringsanlegg, men RAS-produzentene har store utfordringer med høy andel tidlig kjønnsmoden fisk. Kjønnsmodningen reduserer fiskens velferd grunnet nedsatt immunrespons og dermed lavere sykdomstoleranse, samt mindre økonomisk gevinst pga redusert fôrintak og filetkvalitet. Produksjon av steril laks er derfor et sterkt ønske fra oppdrettsnæringen, elveeiere, statlig forvaltning og miljøorganisasjoner.

Sterilisering av laks har frem til i dag hovedsakelig foregått ved triploidisering, men økt forekomst av produksjonslidelser og redusert fiskevelferd resulterte i at Mattilsynet besluttet at det ikke skal settes ut triploid laks i sjø etter 2023. Det har derfor blitt utviklet alternative strategier for å produsere steril fisk basert på å fjerne de embryonale kimcellene, slik at fisken ikke utvikler kjønnsceller. Den materielle overføringen av essensielle kimcellefaktorer til egget har tidligere vært undersøkt i FHF-prosjektet «Steril laks – kartlegging av faktorer sentrale i dannelse av kjønnsceller hos Atlantisk laks» (FHF-900791). Det RNA-bindende proteinet Deadend (Dnd) er nødvendig for dannelsen av kimcellene i embryo hos alle virveldyr. Sterilisering ved inaktivering av Dnd har vært utført hos mange arter, inkludert fisk. Fjerning av kimcellene på embryostadiet påvirker imidlertid kjønnsdifferensieringen hos enkelte fiskearter, som sebrafisk, slik at kun sterile hanner utvikles, mens hos laks, gullfisk og smerling utvikles sterile hunner eller sterile hanner i omtrent samme forhold. Manglende produksjon av kjønnssteroider er rapportert hos sterile laksehanner, som vil kunne påvirke viktige egenskaper som vekst og atferd.

Blokkering av kimcellefaktoren Dnd kan gjøres ved enten å genredigere det kodende *dnd*-genet ved hjelp av Crispr-teknologi, eller ved å fjerne *dnd*-transkriptene under embryoutviklingen uten at det genetiske materialet endres. Sistnevnte strategi ble benyttet av Nofima-forskere i 2017 for sterilisering av over 1600 laks ved at et *dnd*-antisensmolekyl (Gapmer) ble mikroinjisert i befruktete egg. Oppskalering av steriliseringen ved behandling av befruktete egg i en løsning med *dnd*-antisensmolekyler ble først utviklet for sebrafisk ved å benytte såkalte antisens-morfolinos (MO) til å blokkere translasjon av *dnd*-transkriptene. Dette resulterte i den samme fenotypen med bortfall av kjønnscellene som ved bruk av *dnd*-antisens Gapmer. Badebehandlingen ble senere modifisert for storskala-produksjon av steril oppdrettslaks i et samarbeid mellom ACD Pharma-STIM AS og University of Maryland Baltimore County (UMBC) (<https://acdpharma.com/legemiddel/steril-fisk/>).

Før produksjon av steril oppdrettslaks kan tas i bruk er det nødvendig å kunne dokumentere at den sterile laksen har minst like gode produksjonsegenskaper som den intakte fertile laksen. I dette prosjektet var denne evalueringen opprinnelig planlagt å skulle utføres på badebehandlet steril laks, men dette måtte skrinlegges etter gjentatte forsøk som resulterte i høy dødelighet og lav andel steril fisk. Resultatene i denne rapporten er derfor basert på inngående undersøkelser i både ferskvann og sjøvann av den nevnte sterile laksen produsert av Nofima.

### 2.2 Prosjektets omfang

Startdato: 01.10.2017

Sluttdato: 01.05.2022

Budsjett: 6 547 425 kroner

## **2.3 Prosjektorganisering**

### **Prosjektgruppe**

Øivind Andersen (Nofima)

Helge Tveiten (UiT - Norges arktiske universitet)

Hans-Petter Kleppen (ACD Pharma AS)

Paul Midtlyng (NMBU/AquaMediq AS)

Magnus Vikan Røsæg (Salmar)

Helge K. Johnsen (UiT - Norges arktiske universitet)

### **Referansegruppe**

Peter Alestrøm (NMBU)

Torolf Storsul (Aqua Kompetanse AS)

### **FHF-ansvarlig**

Kjell Maroni



## 3 Problemstilling og formål

### 3.1 Prosjektets effektmål

Norge hadde i 2020 en lakseproduksjon på nær 1,4 millioner tonn med en førstehåndsverdi på 65 milliarder norske kroner. Det er i dag ikke mulig å samle informasjon om omfang av nedklassifisering, årsak til nedklassifisering og økonomiske følger av dette på nasjonalt plan. Men basert på et nøkternt estimat på 3 % tap grunnet tidlig kjønnsmodning tilsvarer dette en verdi på 2 milliarder kroner. (<https://www.aqkva.no/extension/media/477/orig/attachment/Arne%20Aarhus%20pr>)

Dessuten vil steril fisk medføre:

- Redusert sløyvesvinn og høyere fôrfaktor som resultat av manglende utvikling av kjønnsprodukter.
- Enklere produksjonsplanlegging og mindre sortering som følge av mer synkron vekst.
- Bedre utnyttelse av de enkelte MTB'er (maksimalt tillatt biomasse).
- Steril fisk vil ikke tape kvalitet og vil dermed gi en fordel i markeder som ønsker stor fisk.
- Avlsselskaper vil kunne beskytte eget fremavlet genmateriale.
- Metoden er direkte overførbart til andre oppdrettsarter av både nasjonal og internasjonal interesse.

### 3.2 Prosjektets resultatmål

Hovedmålet med denne studien har vært å dokumentere hvorvidt sterilitet induisert ved embryonal blokkering av kimcellene påvirker laksens helse, velferd og tilvekst i ferskvann og sjøvann frem til slaktning.

#### Delmål

- 1) Fastslå sterilitet allerede på embryo-stadiet ved å undersøke genekspresjon av kimcelle-markøren *Vasa*.
- 2) Undersøke den sterile laksens toleranse for stress, sykdomspåkjennning og mekanisk lusebehandling, i tillegg til grad av luseangrep.
- 3) Undersøke om tilvekst og slaktekvalitet påvirkes av embryonal *Dnd*-inaktivering
- 4) Undersøke om steril laks viser forhøyet dødelighet og forekomst av senskader.

### 3.3 Prosjektgjennomføring

#### Utfordringer med badebehandling av lakse-egg

Sterilisering av laks ved å behandle lakseegg i en *Dnd*-MO løsning viste seg å være problematisk ved oppstart av prosjektet. Tross gjentatte forsøk med varierende *Dnd*-MO konsentrasjoner, bufferstyrke og varighet av behandlingen viste resultatene gjennomgående høy dødelighet og lav andel sterile fisk. Styringsgruppen vedtok derfor at prosjektet skulle videreføres ved å benytte den sterile laksen produsert av Nofima for evaluering av produksjonsegenskapene som beskrevet i prosjektmålene.

#### Gjennomføring

Steriliseringen av laksen og evalueringen av produksjonsegenskapene ble utført ved Havbruksstasjonen i Kårvika, Tromsø, og egg og melke ble levert av AquaGen. Etter befruktning ble de embryonale kimcellene fjernet ved mikroinjisering av *dnd*-antisens-oligos (*Gapmers*) på én-cellestadiet som medførte at *dnd*-transkriptene ble midlertidig degradert under embryoutviklingen. Dette resulterte i over 1600 sterile hann- og hunnlaks som ble fôret og holdt ved standard oppdrettsbetingelser sammen med intakt fertil kontrollfisk. Totalt 360 steril og fertil fisk ble PIT-tag merket i august 2018 og overført til seks 500-L ferskvannskar for triplikate målinger. Smoltifisering ble induisert ved eksponering til 6L:18D

fotoperiode og vanntemperatur på 5-6 °C i 8 uker etterfulgt av kontinuerlig lys og 10 °C i 6 uker. 10-12 fisk ble vilkårlig håvet fra hver tank på tre tidspunkter: nulluttak (WK0, 24.10), etter 3 uker (WK3, 14.11) og etter 6 uker (WK6, 05.12). Etter avliving ble blodprøver tatt og vekt, lengde og gonader ble målt og veid. Gonader ble delt for hhv fiksering i PFA for histologi og tilsatt RNAlater for qPCR. RNAlater ble også tilsatt dissekert hjerne, hypofyse, gjeller og hodenyre for kvantifisering av genuttrykk relatert til smoltifisering, sjøvannstoleranse, stresstoleranse, immunstatus og kjønnsmodning.

Undersøkelsene ble utført av fem masterstudenter ved Universitetet i Tromsø (Jensen 2020; Karlsen 2020; Aspen 2020; Sævareid 2022; Alstad Ørnhaug 2022). Standardisert 24-timers sjøvannstoleranse-test ble gjennomført ved at 10 fisk fra hvert kar ble håvet over i sjøvann på de tre nevnte uttaksdatoer for måling av Na-K-ATPase aktivitet i gjelle og plasma klorid og osmolaritet. Respons på håndteringstress ble undersøkt i en simulert smolttransport (biltransport under oksygenering i to timer) av sterile og fertile fisk etterfulgt av 24-timer eksponering til sjøvann (34 promille) for måling av kortisol og uttrykk av gener knyttet til hypothalamus-hypofyse-interrenal (HPI), også kalt stress-aksen.

Steril og fertil laks ble overført til sjøvann i mai 2019 etter naturlig smoltifisering over vinteren og våren 2018-2019. På grunn av plassmangel på anlegget ble totalt 142 fisk tatt ut i august 2019 og vekt og lengde ble registrert. I mai 2020 ble resterende 268 fisk Floy-tag merket, målt og veid før de ble satt ut i sjømerd etter stikkvaksinering av 144 fisk (ALPHA JECT micro 6, Pharmaq). Forsøket ble avsluttet i oktober 2020 etter høy dødelighet grunnet ekstreme værforhold og kraftig lakselus-angrep.

## 4 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

### Detaljert oversikt over oppnådde resultater

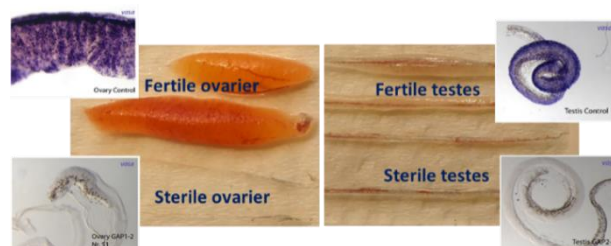
#### 4.1 Livsvarig fravær av kjønnsceller hos steril laks

Over 1600 sterile hann- og hunn-laks ble produsert i Forskningsråds-prosjektet SalmoSteril ved inaktivering av kimcellefaktoren Deadend, slik at kimcellene ikke utviklet seg til kjønnsceller. Manglende kjønnsceller ble dokumentert ved fravær av kimcellemarkøren Vasa med *in situ* hybridisering (ISH) av embryo ved 300 døgngader (DD) (Figur 1), og med immunohistokjemi som farget kun de intakte gonadene hos den fertile kontrollfisken (Figur 2).



Figur 1 Embryonale kimceller hos laks. A. Fluorescensmerkede kimceller i intakt embryo. B. ISH av kontroll-injisert embryo etter 300 DD med intakte kimceller (grønne piler). C. ISH av embryo injisert med *dnd*-antisens viser fravær av kimceller på 300 DD-stadiet.

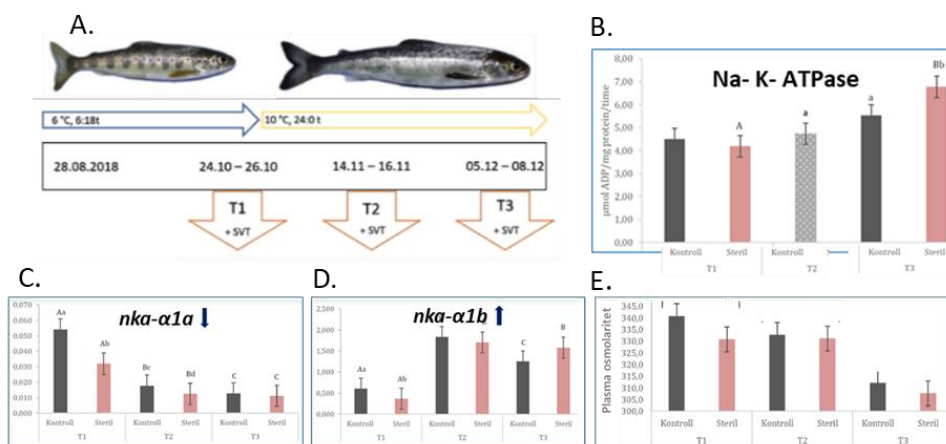
Gjentatte undersøkelser viste over 90 % sterilitet etter behandlingen. Gonadene var redusert til tynne strenger hos både sterile hunner og hanner som viste ca 50:50 % fordeling (Figur 2).



Figur 2 Kjønnsceller og gonadeutvikling hos steril og fertil laks. Kimcellemarkøren Vasa farget ovarier og testikler hos fertile hanner og hunner, i motsetning til de tynne gonadestrengene hos steril fisk.

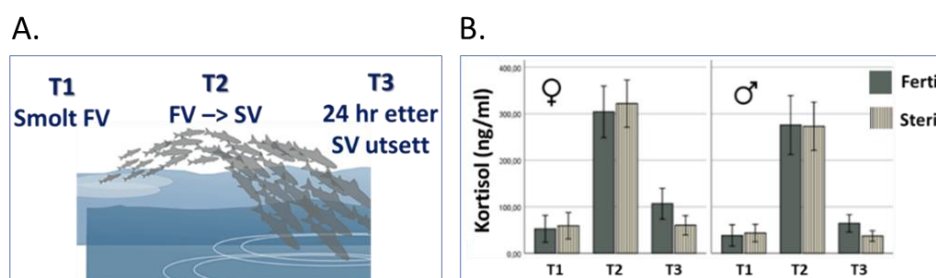
#### 4.2 Steril laks viser god osmoreguleringsevne, sjøvannstoleranse, stressrespons og immunforsvar

Smoltifisering ble induisert hos steril og fertil laks ved eksponering til kontinuerlig lys og økt temperatur over 6 uker (Figur 3A). Den sterile laksen viste økt gjelle Na-K-ATPase aktivitet (Figur 3B), og den forventede opp- og ned-reguleringen av henholdsvis *nka-α1a* og *nka-α1b* var tilsvarende som hos fertil laks (Figur 3C, D). Den hyposmotiske reguleringssevnen i sjøvann var minst like god hos steril som fertil laks, og sjøvannstoleransen var godt utviklet ved avsluttet forsøk (Figur 3E).



Figur 3 Smoltifisering og sjøvannstoleranse hos steril og fertil laks. A. Forsøksbetingelser og uttak, B. Gjelle Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase aktivitet, C. D. Uttrykk av kodende Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase gener, E. Plasma-osmolaritet.

Steril laksesmolt viste samme stressrespons som fertil laks i en simulert transport etterfulgt av full sjøvannseksposering (Figur 4). Begge gruppene viser en markert økning i kortisol som allerede etter 24 timer i sjø var tilbake til normalt nivå, spesielt hos steril fisk. Genuttrykket av viktige hormoner langs stress (HPI)-aksen viste små forskjeller mellom steril og fertil laks gjennom forsøket.



Figur 4 Stressrespons ved simulert transport og utsett av smolt. A. Forsøksoppsett og uttak, B. Plasma kortisol i steril og fertil laks målt før, og 2 timer og 24 timer etter testen.

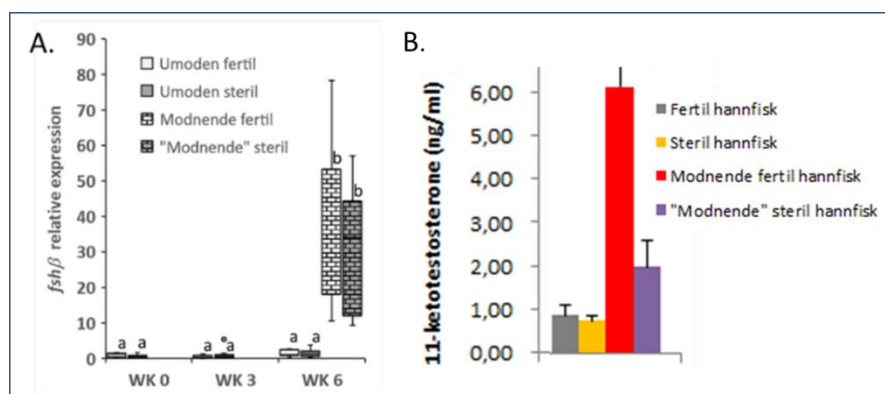
Immunstatus hos steril og fertil fisk ble undersøkt ved å studere endringer i genuttrykk (qPCR) av viktige immunrelaterte faktorer i gjeller og hodenyre gjennom smoltifisering og etter transport-stress, og i hud, gjeller, hodenyre og milt ved endt påvekstfase i sjø. Immunrelaterte gener som ble undersøkt gjennom smoltifisering og i forbindelse med transport og overføring til sjø var IFN-gamma, IL-10, MHC I, IgM, T-celle reseptor1a (TCR1a), cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP), HSP70, og TNF1a. Ved endt periode i sjø ble også MHC II, IgT, og IgD undersøkt, samt IL-22 og natural killer enhancement factor (NKEF) som er involvert i mukøs immunitet.

Ingen konsistente forskjeller ble funnet i immunsystemet hos laks som følge av sterilisering ved fjerning av kjønnscellene. I forbindelse med smoltifisering og påfølgende transport var det ingen av de undersøkte immungenene som varierte systematisk forskjellig mellom steril og fertil fisk. Disse resultatene støttes også av funn fra micro-array-analysene. Tilsvarende funn ble gjort ved endt opphold i sjø; blant de 12 undersøkte genene i de fem ulike vevene ble det funnet kun en statistisk signifikant forskjell med høyere uttrykk av IL-22 i hodenyren hos steril vs. fertil hannfisk.

Etter utsett i sjøvann syntes den sterile laksen generelt å være like robust som fertil laks. Således indikerte uavhengige observasjoner foretatt av personell på landanlegget og på sjøanlegget at den sterile fisken var lett å håndtere, den roet seg relativ fort etter behandling og begynte å spise kort tid etter stress.

### 4.3 Produksjon av kjønnshormoner hos steril og fertil hannlaks

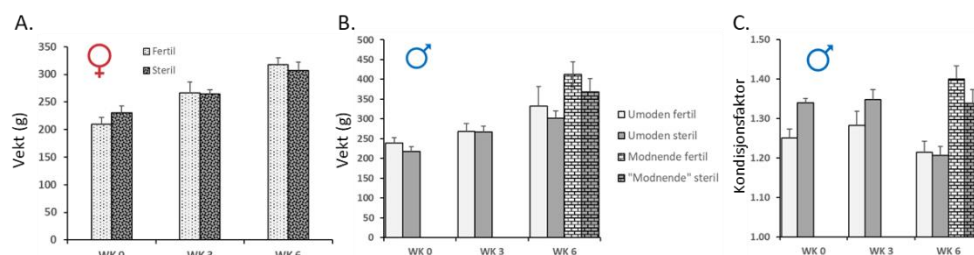
Både sterile og fertile hanner viste pubertale endringer i genuttrykk og hormonnivåer knyttet til hjernehypofyse-gonade (BPG)-aksen etter seks ukers eksponering til kontinuerlig lys og økt temperatur i ferskvann. Hormoner langs BPG-aksen, inklusive FSH $\beta$ , viste økt genuttrykk og plasmakonsentrasjoner under modningen hos henholdsvis 53 og 60% av de sterile og fertile hannene (Figur 5A). Høye verdier av 11-ketotestosteron og testosteron ble målt i modnende fertile hanner, men hos modnende sterile hanner viste nivåer som var signifikant høyere enn basalnivået hos umodne fisk (Figur 5B). Verken sterile eller fertile hunner viste tegn til produksjon av kjønnshormoner i ferskvannsfasen.



Figur 5 Pubertet induisert hos sterile og fertile hannfisk. A. Hypofyse fsh $\beta$  høyt uttrykt hos >50% av sterile og fertile hanner etter induisert smoltifisering, i motsetning til basalnivå hos et mindretall umodne hanner. B. Økt plasma 11-ketotestosteron hos modnende fertile og sterile hanner signifikant høyere enn hos umodne hannfisk.

### 4.4 Tilvekst hos steril og fertil laks i ferskvann

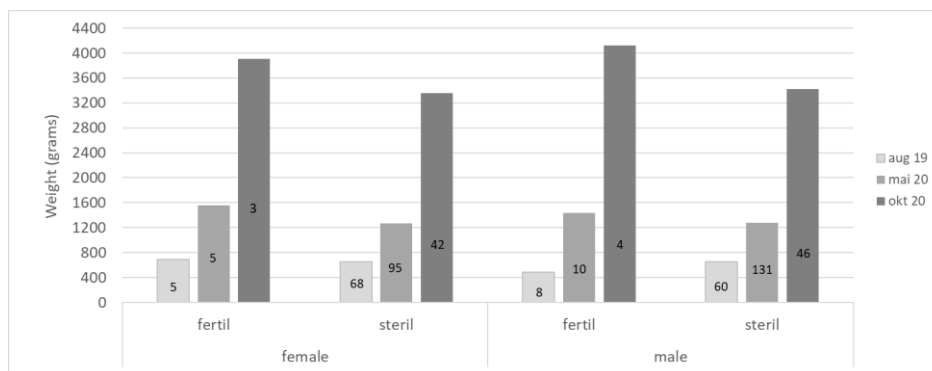
Steril og fertil laks viste ingen forskjell i spesifikk vekstrate som ga tilnærmet samme vekt i ferskvann (Figur 6). Sterile og fertile hanner med økt kjønnshormonnivåer hadde samme kroppsvekt, men de viste en tendens til å være tyngre enn de umodne hannene ved siste uttak (WK6). Tilsvarende ble funnet for kondisjonsfaktoren som var signifikant høyere hos sterile og fertile hanner med økt produksjon av kjønnshormoner (Figur 6C).



Figur 6 Tilvekst hos steril og fertil laks i ferskvann. A. Kroppsvekt hos steril og fertil hunnfisk. Kroppsvekt (B) og kondisjonsfaktor (C) hos umodne og «modnende» sterile og fertile hannfisk.

### 4.5 Tilvekst i sjøvann

Evalueringen av produksjonsegenskaper i sjøvann ble gjort på et begrenset antall fertile kontrollfisk, som gjør sammenlikninger med sterile fisk usikre. Tilvekst i sjø ble målt ved tre tidspunkter og viste samme vekstforløp hos sterile hanner og hunner (**Feil! Fant ikke referanseilden.**). Resultatene antyder noe høyere vekst hos de fåtalls gjenværende fertile kontrollfisk, men dette er ikke statistisk dokumentert. Vaksineringsen hadde liten effekt på tilveksten.



Figur 7 Tilvekst hos steril og fertil laks i sjø fra aug-2019 til okt-2020. Tall i stolper angir antall registrerte individer. Det er ikke skilt på vaksinerte og uvaksinerte

#### 4.6 Robusthet, toleranse for lakselus, og dødelighet

Etter utsett av totalt 268 fisk i sjø, hvorav 144 vaksinerte, ble det registrert kun to deformerte individer av steril fisk (hhv mopsehode og korthale). Rødme på buk, sår og blødninger i finner ble notert hos hhv 17,6 og 9,0 % av de sterile hannene og sterile hunnene ved tidspunkt for vaksinering og overflytting til merd. To av de åtte fertile hannene hadde sår på dette tidspunkt, mens alle de fem fertile hunnene var skadefrie.

Luseangrepet i september 2020 ga stor individuell variasjon i antall lus med over 20 lus hos noen individer, mens andre hadde mindre enn 10 lus. Steril fisk (n= 88) og fertile fisk (n=8) hadde i gjennomsnitt henholdsvis 14,7 og 12,6 lus/fisk. Vaksinert steril fisk hadde i snitt 12,5 lus mens uvaksinert hadde 12,7 lus. Det var ingen forskjell i lusepåslag mellom kjønn blant vaksinert steril fisk. Uvaksinerte sterile hanner viste tendens til høyere lusepåslag enn uvaksinerte hunner, hhv 13,6 og 11,7 lus.

Ekstreme værforhold ved sjøutsetting og senere kraftig lakselusangrep medførte høy dødelighet. Andelen fertile fisk var 4,3 % ved avsluttet forsøk mot >8 % før sjøutsetting, som antyder høyere overlevelse hos steril enn fertil fisk. Dødeligheten var høyere hos sterile hanner (57%) enn hos sterile hunner (35%). Vaksinering hadde en positiv effekt på overlevelse i sjø etter utsett med 72,7 % uvaksinert død fisk, men vaksineringen hadde ingen beskyttende effekt ved luseangrepet og påfølgende avlusing.

#### 4.7 Fravær av kimceller har liten innvirkning på extra-gonadalt genuttrykk

For å avdekke eventuelle forandringer i genuttrykk utenfor gonadene hos den sterile laksen ble det gjennomført transkriptomanalyse av alle laksens gener. Nærmere 400 vevsprøver fra hjerne, hypofyse, hodenyre, gjeller og gonade hos sterile og fertile hanner og hunner ble analysert i et 44K microarray datasett etablert av Aleksei Krasnov. Bortfall av kimcellene medførte at steril og fertil fisk viste forskjellig uttrykk (>1,75-fold) av over 20 000 gener i gonadene, hovedsakelig i ovariene, hvorav en rekke gener ikke var uttrykt hos steril laks. Derimot viste de andre undersøkte organene relativt få gener som var forskjellig uttrykk hos steril og fertil fisk. Dette indikerer at *dnd*-inaktivering har relativt liten innvirkning på genuttrykk i andre organer enn gonadene.

#### Vurdering av funnene

Resultatene fra dette prosjektet viser at en midlertidig blokkering av kimcelle-faktoren Deadend i lakse-embryo resulterer i livsvarig bortfall av kjønnsceller. Til tross for manglende kjønnsceller ble produksjonen av kjønnshormoner aktivert hos sterile hanner tilsvarende fertile hanner, men plasmanivået av kjønnssteroider var høyere hos de fertile hannene. Testosteron påvirker produksjonen av veksthormon og dermed kroppsvekten, i overensstemmelse med høyere vekst og kondisjonsfaktor i

ferskvannsfasen hos modnende sterile og fertile hannene enn de umodne hannene. Etter sjøutsetting avtok imidlertid plasmanivået av kjønnssteroider hos de sterile hannene, som sannsynligvis terminerte kjønnsmodningen i motsetning til stigende plasmakonsentrasjoner hos de fertile hannene.

Vaksinering og sjøutsetting skjedde i forkant av en uværsperiode med sterk kulde etterfulgt av et alvorlig luseangrep med avlusing. Dette medførte at nær to-tredjedeler av fisken døde hvorav en overvekt av uvaksinerte fisk. Dødeligheten syntes å være høyere hos fertile enn sterile fisk, men igjen er dette basert på et statistisk begrenset antall fertile fisk. Dette gjør det også vanskelig å sammenlikne forekomst av sår, blødninger og misdannelser. Luseangrepet viste stor individuell variasjon i påslag med en tendens til mindre lus hos steril enn fertil fisk.

Tap av kjønnsceller hadde ingen negativ innvirkning på osmoreguleringsevnen og sjøvannstoleransen. Steril og fertil laks viste samme stress- og immunrespons i forbindelse med simulert smolttransport og sjøutsetting basert på gnuttrykk av en rekke stress- og immunrelaterte faktorer. Konklusjonen er at prosjektet ikke gir noen indikasjoner på at fjerning av kimcellene påvirker produksjonsegenskapene og velferden til den sterile laksen, men prestasjonene i sjøvann bør undersøkes på et større materiale.

### **Vurdering/drøfting av mulighetene for videre anvendelse av resultater fra prosjektet**

Prosjektet beskriver en sikker og akseptabel metode for produksjon av steril laks. Mikroinjisering av enkeltegg er imidlertid tidkrevende, slik at nødvendig teknologi må etableres for kostnadseffektiv produksjon av steril oppdrettslaks. Til tross for store utfordringer med badebehandling av lakseegg, viser tilsvarende behandling av sebrafisk lovende resultater. Alternativ strategi er bruk av nanoteknologi for overføring av dnd-interagerende molekyler. Eksempler på dette kan være å pakke antisensmolekylene i liposomer, en tilnærming som har blitt brukt av Nofima/UiT til innledende tester for antisensoverføring til lakseegg eller andre typer nanopartikler. Det finnes imidlertid et utall typer nanopartikler og andre «transportmolekyler» som kan benyttes, og innen området nanomedisin og «drug delivery» er det en rivende utvikling når det gjelder antisens-levering/behandling. Gitt tilstrekkelige ressurser er det all grunn til å anta at en kan utvikle et effektivt system for levering av antisensmolekyler til lakseegg, selv om tilnærmingen brukt av ACD Pharma i dette prosjektet viste seg å være lite effektivt.

## 5 Hovedfunn

- Blokkering av kimcellefaktoren Deadend under embryoutviklingen fører til livsvarig tap av kjønnscellene hos både hanner og hunner av Atlantisk laks.
- Sterile hannfisk viser samme pubertale forandringer som fertil fisk med aktivering av kjønns hormoner til tross for manglende kjønns celler.
- Steril laks har normal osmoreguleringsevne, immunrespons, sjøvanns- og stress-toleranse.
- Steril laks viser generelt god helsetilstand og synes å være minst like robust som fertil laks.
- Steril og fertil laks har samme vekstutvikling i ferskvannsfasen, men det begrensede antall fertile fisk etter sjøutsetting gjør det vanskelig å konkludere i sjøvannsfasen.

## 6 Leveranser

Basert på prosjektets målsetning er følgende leveranser dokumentert:

- Sterilitet kan avgjøres på embryo-stadiet ved å undersøke genekspressjon av kimcelle-markøren Vasa ved bruk av *in situ* hybridisering.
- Steril laks viser normal stresstoleranse og immunstatus, og er minst like robust overfor luseangrep og behandling som fertil laks. Den planlagte testen på sykdomspåkjenning lot seg ikke gjennomføre etter revisjon av prosjektet.
- Embryonal Dnd-inaktivering påvirker ikke tilvekst i ferskvann, men det er vanskelig å konkludere i sjøvannsfasen grunnet få fertile fisk.
- Ekstreme værforhold og alvorlig luseangrep medførte høy dødelighet, som syntes å være lavere hos steril enn fertil fisk. Slaktekvalitet ble ikke undersøkt på grunn av nødvendig forsøksterminering, men forekomst av misdannelser var ubetydelig.



## 7 Publikasjoner og omtaler av prosjektet

### Manuskripter

- Tveiten H, Karlsen K, Thesslund T, Johansson GS, Thiyagarajan, DB, Andersen Ø. Impact of germ cell ablation on the activation of the brain-pituitary-gonadal axis in precocious Atlantic salmon (*Salmo salar*) males. *Molecular Reproduction Development* (Akseptert).
- Tveiten H, Andersen Ø, Mommens M, Kumari J, Slanchev K. Production of sterile salmon by germ cell ablation with Gapmer antisense oligonucleotides. *Scientific Reports* (In manus).
- Krasnov A, Tveiten H, Andersen Ø. Transcriptome analysis of germ cell-ablated Atlantic salmon (In preparation).

### Masteroppgaver ved Universitetet i Tromsø

- Alstad Ørnhaug G. Immunstatus hos steril og fertil Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) under sjøfasen. Masteroppgave, Norges Fiskerihøgskole, UiT, 2022.
- Aspen M. Stress hos kjønnscelefri Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) Effekter av transport og sjøvannseksposering på sentrale faktorer i hypothalamus-hypofyse- interrenale (HPI)-aksen. Masteroppgave, Norges Fiskerihøgskole, UiT, 2020.
- Jensen EB. Utvikling av smoltegenskaper og sjøvannstoleranse hos kjønnscelefri Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) Masteroppgave, Norges Fiskerihøgskole, UiT, 2020.
- Karlsen K. Bortfall av kjønnsceller hos Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) – effekter på vekst og uttrykk av gener som er sentrale i regulering av hypothalamus-hypofyse-gonade aksene. Masteroppgave, Norges Fiskerihøgskole, UiT, 2020.
- Sævareid K. Effekt av smoltifisering og transport på uttrykk av immunrelaterte gener hos steril og fertil Atlantisk laks (*Salmo salar* L.). Masteroppgave, Norges Fiskerihøgskole, UiT, 2022.

### Presentasjoner

- Andersen Ø, Tveiten H, Kleppen HP, Dønnum M Produksjon av steril laks ved transient inaktivering av kimcellefaktoren Deadend. Havbrukskonferansen 2020.
- Lazado C, Andersen Ø, Karlsen K, Slanchev K, Thesslund T, Tveiten H. New method for fish sterilization – Evaluation of germ cell ablation on the activation of the brain-pituitary-gonadal axis in precocious Atlantic salmon males. European Aquaculture Society, Madeira, 2021.

### Omtaler og kronikker

<https://thefishsite.com/articles/novel-method-for-sterilising-farmed-salmon-shows-promising-results>

<https://www.hatcheryinternational.com/nofima-announces-research-developments-of-sterilised-salmon/>

<https://www.fishfarmingexpert.com/article/sterilised-salmon-perform-just-as-well-as-fertile-fish/>

<https://fishfocus.co.uk/promising-results-from-research-into-sterile-salmon/>

Steriliser oppdrettslaksen, så berger vi villaksen	DN.no (04.02.2022)
Steriliser oppdrettslaks – så berger vi villaksen	Dagens Næringsliv (05.02.2022)
Steril oppdrettslaks for bevaring av villaksen	Nordnorsk debatt (07.02.2022)
Ny Nofima-rapport hevder steril laks har det velferdsmessig like godt	Ilaks - Nyheter (07.02.2022)
Steril oppdrettslaks har det godt	Kyst.no (07.02.2022)
Steril oppdrettslaks har det godt	Folkebladet (07.02.2022)
Steril oppdrettslaks for bevaring av villaksen	Namdalsavisa (07.02.2022)
Steril oppdrettslaks er forsvarlig	NRK (07.02.2022)
Steril oppdrettslaks for bevaring av villaksen	Driva (07.02.2022)

Steril oppdrettslaks for bevaring av villaksen	Folkebladet (07.02.2022)
Steril oppdrettslaks har det godt	Nofima (07.02.2022)
Steril oppdrettslaks har det godt	Fisk.no – Fiskeoppdrett (07.02.2022)
Steril oppdrettslaks for bevaring av villaksen	Avisa Sør-Trøndelag (08.02.2022)
Steril oppdrettslaks har det godt	Folkebladet (08.02.2022)
Steril oppdrettslaks for bevaring av villaksen	Harstad Tidende (08.02.2022)
Steril oppdrettslaks har det godt	ABC Nyheter – Mat og drikke (08.02.2022)
Steril oppdrettslaks for bevaring av villaksen	Bladet Vesterålen (09.02.2022)
Forskere har nå dokumentert at steril laks har det godt	HavPuls (09.02.2022)
Steril oppdrettslaks for bevaring av villaksen	Nordland (12.02.2022)