

# Fôrbasert kontra lysstimulert smoltifisering av Atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

- Effekten av smoltifiseringsregime på smoltutvikling og immunstatus i ferskvann, samt vekst og mottakelighet for infeksiøs lakseanemi (ILA) etter sjøsetting

—  
**Bjørn Ellingsen**

*Masteroppgave i Fiskehelse (60 Stp)*

*Mai 2019*





## Forord

Denne oppgaven ble utført ved Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø. Oppgaven ble påbegynt februar 2018 og avsluttet mai 2019.

Først en stor takk til min hovedveileder, Even Jørgensen for muligheten til å delta på dette spennende prosjektet og tilliten du viste meg underveis. Du har stått støtt med god faglig veiledning, positivitet, tålmodighet og godt humør. Takk til min bi-veileder Ingvill Jensen for gode tilbakemeldinger og diskusjoner.

Tusen takk til Anja Striberny for hjelp og veiledning med alt av labarbeid, databehandling og gode diskusjoner. En takk rettes også til Guro Strandskog med veiledning og tips for real-time qPCR.

*I would also express my gratitude towards Chandra Sekhar Ravuri for guidance regarding real-time pPCR and glycogen analysis. Also, a huge thanks to Shiferaw Jenberie for the IL-10 primers.*

En stor takk også til alle bidrag fra Børge Nilsen Fredriksen og PHARMAQ AS for anskaffelse av vaksine og virus. Uten din ekspertise hadde ikke dette forsøket vært mulig.

Tusen takk til alle medstudenter som har gjort 5 år på NFH til å fly av gårde. Dere er helt fantastiske! En spesiell takk til Daniel Engen Lauritzen som var en stor bidragsyter i prosjektet, det har vært godt å ha en likesinnet å dele frustrasjoner og gleder med.

Til sist vil jeg takke min kjære Anette som har vært tilstede med trøstende ord og en god latter, uansett hvordan dagen min har vært. Du betyr uendelig mye for meg.

Tromsø, mai, 2019

Bjørn Ellingsen



## Sammendrag

Dødelighet etter overføring til sjøvann er et stort økonomisk og fiskevelferdsmessig problem i norsk oppdrettsnæring. For å overkomme utfordringene i forbindelse med sjøsetting blir det brukt mye ressurser på å kartlegge og overvåke når fisken er fullstendig smoltifisert for å finne et optimalt sjøsettingstidspunkt. Likevel finnes det ingen statistisk grunnlag for hvor mye av dødeligheten som skyldes suboptimal smoltifisering. Smoltifisering er en krevende prosess for fisken og bruk av daglengdemanipulasjon som etterlikner en naturlig sommer – vinter – sommer syklus («lysstyrt smoltifisering») for å stimulere smoltifisering har hittil vært dominerende i norsk lakseoppdrett. Siden lanseringen i 2014 har imidlertid SuperSmolt FeedOnly, et konsept som baserer seg på å inducere smoltifisering ved bruk av tilsetninger av salt og tryptofan i fôret uten å endre fotoperioden («fôrbasert smoltifisering») blitt etablert som smoltstimuli og i 2017 ble omentrent 20% av all fisken i norsk lakseoppdrett smoltifisert ved denne metoden. Ved å unngå endringer i fotoperiode vil ikke fisken miste verdifull tilvekst i ferskvannsfasen, men den vil trolig heller ikke gjennomgå de klassiske hormonelle, adferdsmessige og morfologiske endringene som kjennetegner en naturlig smolt. Selv om lag 1/5 av norsk laks smoltifiseres ved hjelp av denne metoden, er det ikke nylige rapporterte arbeid som kan verifisere smoltstatus, prestasjon i sjøvann, immunstatus eller mottakelighet for sykdom i denne typen smolt. Derfor er det viktig å undersøke om saltindusert smolt presterer minst like bra som naturlig smoltifisert laks slik at oppdrettere kan velge bedre og riktigere produksjonsstrategier i fremtiden.

Målsetningen med dette forsøket var å studere smoltutvikling, samt immunstatus og mottakelighet for sykdom etter utsett i sjø hos Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) smoltifisert ved endring i fotoperiode eller ved bruk av fôr. Før og etter endt smoltstimulering ble fisk injisert med en multikomponent vaksine for å kvantifisere immunrespons i relasjon til smoltutvikling. Etter overføring til sjøvann ble begge gruppene smittet med infeksjøs lakseanemi (ILA) for å kvantifisere mottakelighet av sykdom i forhold til smoltkvalitet. Gjelle  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aktivitet, samt osmolalitet- og kloridverdier i plasma etter sjøvannstester viste at begge gruppene oppnådde en god sjøvannstoleranse før overføring til sjøvann. I ferskvannsfasen vokste som ventet den fôrinduserte smolten som ble holdt kontinuerlig på lang dag best, mens den tradisjonelle, lysstyrte smolten presterte bedre i sjøvannsfasen. Analyser av uttrykk av immungener etter vaksinerings ved real-time qPCR viste at den fôrinduserte smolten tenderte til en bedre immunkompetanse enn tradisjonell smolt underveis i smoltifiseringen. Dødelighetstallene etter smitte viste at tradisjonell smolt trolig har en marginalt større mottakelighet for ILA enn fôrindusert smolt. Resultatene indikerer at fôrindusert smoltifisering er et godt alternativ til tradisjonell lysstyring i norsk lakseoppdrett.

## Abstract

Smolt mortality after seawater transfer is considered a problem in Norwegian aquaculture as it is causing a huge fish welfare issue as well as big economic losses. To overcome these challenges, it has been spent a lot of resources in the monitoring of the smoltification process to determine the optimal timing for seawater transfer. Even with a considerable effort, there is no statistical basis of how much of the mortality at sea is caused by a suboptimal smoltification. The use of photoperiodic changes, that mimics the natural summer – winter – summer cycle (“photoperiodic smolting”) to stimulate smolting, has been dominating in Norwegian salmon aquaculture. However, since the launch of SuperSmolt FeedOnly (a feed based smoltification inducer) in 2014, it has been established as an alternative method to the photoperiodic smolting. In 2017 approximately 20% of salmon in Norwegian aquaculture was smoltified using this method. By avoiding photoperiodic changes, the rearing routines are simplified and allows the production of lager smolts. With the use of this method the smolts are likely to miss out of the natural changes in physiology, behavior and morphology that comes with a photoperiodic induced smolting. Even though 1/5 of Norwegian salmon is smoltified with this method, there hasn't been published any previous work that can verify smoltstatus, growth, immune status or susceptibility to disease after seawater transfer in these smolts. Therefor it is important to examine if feed based smolting is a proper way to secure good welfare and a safe production of Atlantic salmon.

In this experiment the goal was to study development of smolting, as well as immune status and susceptibility to disease in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after seawater transfer, with the use of photoperiodic changes or feed based smolt stimulation. Before and after smolt stimulation, the fish were injected with a multicomponent vaccine to quantify immune response in relation to smolt development. After seawater transfer the two smolt groups were challenged with infectious salmon anemia (ISA) to quantify susceptibility to disease relative to smolt quality. Gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity, as well as osmolality and chloride concentration in the blood after seawater challenges, showed that both smolt groups had good seawater tolerance before transfer to sea. In the freshwater phase the feed based smolt grew better than the photoperiodic induced smolt, who performed better in the seawater phase. Analysis of immune genes after vaccination using real-time qPCR showed that the feed based smolt had a slightly better immune competence than the photoperiodic induced smolt. Mortality after challenge with ISA showed that the photoperiodic induced smolt had a marginal greater susceptibility to ISA than the feed based smolt. The result from this study indicate that feed based smolting is a good option to the traditionally photoperiodic smolting regime in Norwegian aquaculture business.

## Forkortelser

AJM7	Alpha Ject Micro 7	LL	Kontinuerlig lys
AU	Antigenicity units	LPS	Lipopolysakkarid
cAMP	Syklisk AMP	NKA	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase
cDNA	Komplementært DNA	NKCC	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /2Cl <sup>-</sup> kotransporter
CFTR	Cystic fibrosis transmembran regulator	NRT	No reverse transcriptase
CMS	Kardiomyopatisyndrom	NTC	No template control
Ct	Threshold cycle		
dg	Døgngrader	PBS	Fosfatbufret saltvann
DPI	Days post injection/Dager etter injeksjon	PD	Pankreassykdom
EF1αβ	Elongeringsfaktor-1ab	PMCV	Piscint myocarditisvirus
FCE	Feed Conversion rate/fôrutnyttelse	Poly I:C	Syntetisk RNA, Polyinosinic:polycytidylic syre
FHF	Fiskeri- og havbruksfondets forskningsfond	ppm	parts per million
GH	Growth hormone/Veksthormon	PRV	Piscint orthoreovirus
HE	Hemagglutinin esterase	PST	Par-smolt-transformasjon
HiT	Havbruksstasjonen i Tromsø	RPS	Relative percent survival
HPR	Highly polymorphic region	RT-qPCR	Kvantitativ real-time polymerase chain reaction
HPR0	Avirulent ILA virus med full HPR-region	SAV	Salmonid alphavirus
HPRΔ	Virulent ILA virus med deletering i HPR-region	SEM	Standardfeil
HSMB	Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse	SGR	Spesifikk vekstrate
i.p	Interperitoneal	SOCS	Supressor of cytokine signaling
IGF-1	Insulinliknende vekstfaktor-1	SP	Kort fotoperiode
IFN	Interferon	SVT	Sjøvannstest
IGS	Interferonstimulert gen	T <sub>3</sub>	Trijodtyronin
IHN	Infeksiøs hematopoetisk nekrose	T <sub>4</sub>	Thyroxin
IL	Interleukin	TCID <sub>50</sub>	Tissue culture infection dose 50
ILA	Infeksiøs lakseanemi	TNF	Tumor nekrose faktor
ILAV	Infeksiøs lakseanemivirus	7L:17M	7 timer lys, 17 timer mørke
IPN	Infeksiøs pankreasnekrose	12L:12M	12 timer lys, 12 timer mørke
IPNV	Infeksiøs pankreasnekrosevirus	24L:0M	24 timer lys, 0 timer mørke

# Innhold

<b>1. INNLEDNING</b>	<b>1</b>
<b>1.1. BAKGRUNN</b>	<b>1</b>
<b>1.2 SMOLTIFISERING</b>	<b>2</b>
1.2.1 OSMOREGULATORISKE ENDRINGER	3
1.2.2 MORFOLOGISKE ENDRINGER	4
1.2.3 ADFERDSMESSIGE ENDRINGER	4
<b>1.3 KOMMERSIELL SMOLTPRODUKSJON</b>	<b>5</b>
<b>1.4 SYKDOMSSITUASJONEN I NORSK OPPDRETTSNÆRING</b>	<b>6</b>
<b>1.5 ILA – INFEKSJØS LAKSEANEMI</b>	<b>7</b>
<b>1.6 MEDFØDT IMMUNFORSVAR HOS FISK</b>	<b>8</b>
<b>1.7 PROBLEMSTILLING</b>	<b>11</b>
<b>2. MATERIALER OG METODER</b>	<b>13</b>
<b>2.1 FORSØKSFISK</b>	<b>13</b>
<b>2.2 FORSØKSOPPSETT</b>	<b>13</b>
<b>2.3 SMOLT-, IMMUNISERING- OG SMITTEFORSØKET</b>	<b>15</b>
2.3.1 SMOLTFORSØKET	15
2.3.2 IMMUNISERINGSFORSØKET	17
2.3.3 SMITTEFORSØKET	17
<b>2.4 ANALYSER</b>	<b>20</b>
2.4.1 MÅLING AV OSMOLALITET OG KLORIDKONSENTRASJON I PLASMA	20
2.4.2 GLYKOGENMÅLINGER	21
2.4.3 Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPASE	21
2.4.4 RNA-EKSTRAKSJON FRA HODENYRE	21
2.4.5 CDNA-SYNTESE	22
2.4.6 REAL TIME RT-PCR	22
<b>2.5 DATABEHANDLING OG STATISTIKK</b>	<b>26</b>
<b>3. RESULTATER</b>	<b>27</b>
<b>3.1 SMOLTSTATUS I LYS- OG SALTINDUSERT SMOLT</b>	<b>27</b>



3.1.1 ANALYSE AV SMOLTSTATUS ETTER ULIKE SMOLTIFISERINGSREGIMER	27
VEKST	27
SJØVANNSTOLERANSE	32
<b>3.2 UTTRYKK AV IMMUNGENER I PARR OG I LYS- OG SALTINDUSERT SMOLT.</b>	<b>35</b>
3.2.1 BASALUTTRYKK AV IMMUNGENER	35
3.2.2 UTTRYKK AV IMMUNGENER ETTER VAKSINERING	36
<b>3.3 MOTTAKELIGHET FOR INFEKSIØS LAKSEANEMI I LYS- OG SALTINDUSERTE SMOLTGRUPPER</b>	<b>40</b>
3.3.1 PRESMITTEFORSØKET	40
3.3.2 SMITTEFORSØKET	41
<b>4. DISKUSJON</b>	<b>45</b>
<hr/>	
<b>4.1 SMOLTSTATUS</b>	<b>45</b>
4.1.1 VEKST	45
4.1.2 GLYKOGENKONSENTRASJON I LEVER	47
4.1.3 OSMOLALITET OG KLORID I PLASMA ETTER SVT	48
4.1.4 Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATP -ASE AKTIVITET I GJELLER UNDER SMOLTIFISERINGEN	50
<b>4.2 UTTRYKK AV IMMUNGENER I PARR OG I LYS- OG SALTINDUSERT SMOLT</b>	<b>52</b>
4.2.1 SMOLTIFISERINGENS PÅVIRKNING PÅ IMMUNSTATUS	52
4.2.2 VAKSINERESPONS FØR OG ETTER SMOLTIFISERING	55
<b>4.3 MOTTAKELIGHET FOR ILA I SMOLTGRUPPENE</b>	<b>58</b>
4.3.1 SMITTEFORSØKET	59
<b>4.4 LYSSTYRT OG SALTINDUSERT SMOLTIFISERING</b>	<b>61</b>
<b>4.5 KONKLUSJONER</b>	<b>62</b>
<b>5. REFERANSER</b>	<b>64</b>
<hr/>	
<b>6. APPENDIKS</b>	<b>73</b>
<hr/>	
<b>APPENDIKS 1</b>	<b>74</b>
<b>APPENDIKS 2</b>	<b>75</b>
<b>APPENDIKS 3</b>	<b>76</b>



# 1. Innledning

## 1.1 Bakgrunn

I dag er overføringen av smolt fra ferskvann til sjøvann en av de mest kritiske prosessene i produksjonen av Atlantisk laks (*Salmo salar* L.). I overkant av 14,5 % av all laks som ble satt ut i sjø i Norge i 2018 gikk tapt (dødelighet, utkast og rømming), og en del av dette skyldes dårlig smoltkvalitet (Hjeltnes et al., 2019). Å sikre god smoltkvalitet er et av de største innsatsområdene i norsk havbruksnæring. Tradisjonelt sett har smoltifisering i norsk lakseoppdrett blitt kontrollert ved manipulasjon av daglengde (fotoperiode). I naturlige systemer er det den økte daglengden på våren som stimulerer og tidfester smoltifiseringen (Hoar, 1988). I lakseoppdrett har smoltifiseringen blitt styrt ved enten å holde fisken på en naturlig fotoperiode gjennom vinteren og våren, eller en forkortet «sommer-vinter-sommer»-fotoperiode som bidrar til komprimering av vinterfasen og gir «out-of-season» smolt (Thrush et al., 1994). I dag går flere og flere smoltprodusenter bort fra den tradisjonelle lysstyringen av fisken, og smoltifisering blir heller stimulert ved tilsetning av uorganiske salter (hovedsakelig NaCl) og aminosyren tryptofan i fôret (Europharma, 2018; Ilaks.no, 2018).

Sjøvannstoleranse brukes som den viktigste parameteren for å bestemme smoltstatus til fisken i dagens oppdrettsnæring (Noble et al., 2018). Dette gjøres ved hjelp av 24-timers sjøvannstester (SVT) og/eller måling av  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA) aktivitet i gjellene (Finstad et al., 1989; Urke et al., 2010). Siden laks vil gjennomgå flere morfologiske og fysiologiske endringer som; endring av kroppsform, farge, adferd og metabolisme gjennom smoltifiseringen (Björnsson et al., 2011; McCormick, 2013; Salman & Eddy, 1987), er trolig ikke sjøvannstoleranse et fullverdig mål for å bestemme smoltstatus på fisken. Tidligere studier har vist at suboptimal smoltifisering vil føre til dårligere vekst hos fisken når den overføres til sjø (Strand et al., 2018; Thrush et al., 1994). Det er også sannsynlig at fisken opplever dårligere velferd og har en større risiko å bli syk av patogener ved suboptimal smoltifisering. Tidligere studier på laks som er smoltifisert ved bruk av salter i fôret viser en økt sjøvannstoleranse sammenliknet med kontrollgruppene (Basulto, 1976; Duston, 1993), men det antas at den mangler flere av de andre komponentene som kjennetegner en fullverdig smoltifisering. Derfor er det nødvendig å gjennomføre en objektiv undersøkelse på saltstimulert smolt og samtidig tilegne ny og oppdatert kunnskap rundt smoltifiseringen av laks som forhåpentligvis kan bidra til å redusere svignet etter utsett av laks i sjø.

### 1.2 Smoltifisering

Så godt som all laksefisk (Salmonidae) regnes å være anadrome arter (Spares et al., 2015), dvs. fisk som klekkes i ferskvann og foretar en eller flere beitevandringar til sjøen. Atlantisk laks vil tilbringer de første årene av livet sitt i ferskvann før de vandrer ut i havet. Ved å gyte i ferskvann blir avkommet utsatt for et lavere predasjonspress, men har mindre tilgang til mat enn de ville hatt i sjø. Selv om predasjonspresset er høyere i sjø, vil større tilgang på ressurser og habitat, raskere vekst og økt reproduksjonspotensiale være mer fordelaktig enn å forbli i ferskvann gjennom hele livssyklusen (Augspurger et al., 2017; Gross, 1987). Mesteparten av anadrom laksefisk gjennomgår omfattende fysiologiske, morfologiske og adferdsmessige endringer før vandringen fra ferskvann til sjø. Dette kalles for en parr-smolt-transformasjon (PST), eller smoltifisering som er en preadaptiv/preparatorisk prosess (McCormick, 2013)

Smoltifiseringen hos laks induseres av en økende daglengde på våren etter at den har nådd en tilstrekkelig størrelse (> 10cm) (Handeland et al., 2014; McCormick, 2013; Stefansson et al., 2012). I tillegg til en økende daglengde vil andre miljøfaktorer kunne ha innvirkning på smoltifiseringen. Eksempelvis vil smoltifiseringen gjennomføres på kortere tid ved å øke vanntemperaturen, mens turbiditet og vanngjennomstrømming i elver eller kar antas å stimulere en migratorisk adferd (McCormick et al., 1998; McCormick, 2013; Solbakken et al., 1994). Hjernen til laksen mottar informasjon om endringer i daglengde gjennom en lys-hjernehypofyse-akse som aktiveres ved økende daglengde (Ebbesson et al., 2003) og setter i gang en hormonell kaskadereaksjon i hypofysen. Dette vil stimulere sirkulerende nivåer av veksthormon (*growth hormone*, GH), insulinliknende vekstfaktor-1 (IGF-1), kortisol og tyroidhormonene T3 (trijodtyronin) og T4 (thyroxin) i blodet, mens nivåene av prolaktin blir dempet (Björnsson et al., 2011; McCormick, 2009). Dette fører i sin tur til de karakteristiske endringene i morfologi, fysiologi og adferd som forventes gjennom smoltifiseringsprosessen (Björnsson et al., 2011; McCormick, 2013).

Veksthormon (GH) ser ut til å være det første hormonet som oppreguleres etter en økning i fotoperiode hos smoltifiserende laks, og har en viktig kontrollfunksjon og interagerer mellom andre endokrine akser under smoltifiseringen. Eksempelvis vil en økning i GH kunne gi et økt uttrykk av IGF-1 hos smoltifiserende laks. Økning av GH og kortisol i plasma korrelerer med økt hypo-osmoregulatorisk kapasitet (McCormick, 2013), samt økt ionocyttoproliferering i gjelle og salinitetstoleranse ved behandling (implantering/injeksjon) (Bisbal & Specker, 1991; Pelis & McCormick, 2001). GH, kortisol og IGF-1 er også viktige vekst- og metabolismeregulatorer i både coho-laks (*Oncorhynchus kistuch* L.) og regnbueørret

(*Oncorhynchus mykiss* L), da de er medvirkende til den økte lengdeveksten i forhold til vektøkning (reduert kondisjonsfaktor) under smoltifiseringen (Bergan-Roller & Sheridan, 2018; Sheridan, 1986). Utskillelsen av tyroidhormonene fra thyroidea øker under smoltifiseringen og har vist seg å være delaktig i reguleringen av migrasjon, sølvfarging, atferdsendringer og metabolisme (Björnsson et al., 2011; Dickhoff et al., 1978). Prolaktin på den andre siden er ansett som et hyper-osmoregulatorisk hormon og plasmanivåene minker under smoltifiseringen og etter sjøvannsutsett (Kiilerich et al., 2007).

### 1.2.1 Osmoregulatoriske endringer

Ferskvann og sjøvann vil by på ulike osmotiske utfordringer for fisk. For å opprettholde osmotisk homeostase i ferskvann må fisk sekreere store mengder av utvannet urin og ha et aktivt opptak av salter, hovedsakelig over gjellene, for å motvirke et passivt opptak av vann og et passivt tap av ioner (Marshall, 2002). På den andre siden må fisk aktivt drikke vann i sjø for å forhindre dehydrering. Overflødig ioner og salter blir sekret ut via gjeller, mage-tarm-system, nyrer og hud, samt gjennom små mengder oppkonsentrert urin (Grosell, 2006; Sundell & Sundh, 2012).

I fiskegjeller fins det spesialiserte celler, ionocytter (kloridceller), som har store konsentrasjoner av proteiner som transporterer ioner inn og ut av cellene. Ionocytene er relativt få og små i ferskvannsfasen, men gjennomgår en kraftig proliferering, samtidig som uttrykket av saltvannstyper av transportproteiner som  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaser (NKA),  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  - kotransporter (NKCC) og Cystic fibrosis transmembran regulator (CFTR) induseres under smoltifiseringen (Borgatti et al., 1992; Handeland et al., 2014). En økt rekruttering og aktivitet av NKA sammenfaller med utvikling av sjøvannstoleranse hos laks. Enzymet pumper aktivt  $\text{Na}^+$ -ioner ut fra kloridcellene slik at de får en negativ ladning. Dette fører til at fisken vil kunne kvitte seg med ioner som diffunderer inn i fisken eller kommer inn med sjøvann som drikkes (Langdon & Thorpe, 1985). Klorid- og natriumionene forlater ionocytten og havner i sjøen via henholdsvis CFTR og paracellulære åpninger mellom ionocytten og tilstøtende celler som følge av elektrokjemiske gradienter (McCormick, 2013). På samme måte endres tarmens ionetransportører slik at salter enten transporteres ut av tarmen med avføring, eller transporteres til blod og deretter skilt ut via gjeller og urin (Sundh et al., 2014).

### 1.2.2 Morfologiske endringer

Under smoltifiseringen vil fisken øke i lengde i forhold til kroppsvekten, noe som fører til en mer strømlinjeformet kropp. Dette kan lett observeres ved at K-faktoren (kondisjonsfaktoren) reduseres under smoltifiseringen. En slik endring kan være et resultat av et økende energibehov under smoltifiseringen, som inkluderer en økt basalmetabolisme, økt aktivitet og fettmobilisering (McCormick & Saunders, 1987). Mot slutten av smoltifiseringen vil den relative størrelsen på buk-, bryst- og gattfinner minke, samtidig som finnene vil få en mørkere ytterkant (Pelis & McCormick, 2003). Fisken vil miste de karakteristiske parrmerkene under smoltifiseringen og erstatter den lyse brunfargen med en jevn sølvfarge. Sølvfargingen skjer på grunn av en økt deponering av guanin og hypoxanthine i huden og skjellene til fisken (Johnston & Eales, 1967). Fargeendringene under smoltifiseringen endrer kamouflasjen fra å være vanskelig å oppdage mot et elvesubstrat, til å være godt kamuflert i sjøen der det er fordelaktig med en mørk dorsalside og en lys ventralside. Både reduksjon i kondisjonsfaktor, en mørkere finnekant og sølvfarging brukes som tegn på smoltutvikling i lakseoppdrett.

### 1.2.3 Adferdsmessige endringer

I naturen vil lakseyngel leve alene og i konkurranse med andre for tilgang på mat. Siden inntak av mat er relatert til vekst, vil individer som får tak i mest mat ha en stor fordel overfor andre. I ferskvann er laksen svært territoriell og aggressiv. Når fisken vandrer fra ferskvann til sjøvann endres bevegelsesmønsteret til fisken fra å være relativt statisk i en elv, til et frittstående og pelagisk mønster. Den skifter fra å ha en enslig og aggressiv livsstil, til å utvikle stimadferd som er antatt å være en tilpasning til økt predasjonspress ved migrasjon til sjø (McCormick et al., 1998). Smolt vil utvise en økende negativ reotaksis (nedstrøms retningsbevegelse) i motsetning til parr som står motstrøms i elva (McCormick et al., 1998). Negativ reotaxis utvises også i kommersiell smoltproduksjon der laks i slutten av smoltifiseringsperioden vil utvise en mer rotete og tilfeldig svømmeadferd, mens parr vil stå motstrøms i karene.



### 1.3 Kommersiell smoltproduksjon

På 1970- og 80-tallet ble det produsert smolt som fulgte et tilnærmet naturlig smoltifiseringsregime. Rogn ble tatt inn på lave temperaturer om vinteren og gjennomgikk en lang vekstperiode gjennom året. Våren etter fisken var 1 år (16-18 mnd), ble den utsatt for et naturlig lysregime ved at den ble plassert i kar utendørs. Fisken ville deretter smoltifisere naturlig senere på våren når daglengden øker. Denne typen smolt ble tradisjonelt kalt 1-åring (Stefansson et al., 2005). På slutten av 90-tallet ble det introdusert kunstige lysprogrammer som gjorde det mulig å manipulere fotoperioden som fisken ble utsatt for. Da ble det mulig å produsere smolt som kunne leveres 9-10 måneder etter klekking, såkalte 0-åringer (Bergheim et al., 2009). 0-åringene har en kortere vekstperiode sammenliknet med 1-åringene. Rogna legges inn noe tidligere og temperaturen etter startfôring er høyere for 0-åringene (Stefansson et al., 2005). Når fisken har oppnådd en vekt på rundt 20 gram endres fotoperioden fra kontinuerlig lys til 12 timer lys (eller mindre) og 12 timer mørke per døgn (12L:12M) i seks uker før fotoperioden settes tilbake til et kontinuerlig lysregime (24L:0M) (Lysfjord et al., 2004). Når fotoperioden endres fra kort dag (12L:12M) til kontinuerlig lys vil smoltifiseringen igangsettes og fisken vil være klar til sjøsetting etter 350 døgngrader (dg) (Handeland et al., 2004). En kombinert produksjon av 1-åringer og 0-åringer gjorde det mulig å sette ut fisk i sjø både på våren (1-åringer) og på høsten (0-åringer) slik at oppdrettsnæringen fikk levert smolt i april-mai og i september-oktober. Dette gjorde at den stående biomassen i sjø var mer stabil gjennom året (Bergheim et al., 2009). I dag er begrepene 0-åring og 1-åring så å si borte. De fleste anleggene produserer fisk gjennom hele året, og kan levere når kjøper ønsker (L.G. Jørgensen, Pharmaq, pers. com., 04. oktober, 2018).

Det er enighet om at lysindusert smoltifisering medfører lav tilvekst under kortdagsbehandlingen og kompromitterer energistatusen til fisken (McCormick & Saunders, 1987; Mo et al., 2017; Stefansson et al., 1989). Dette er en uønsket «bieffekt» av lysstyrt smoltifisering som har ført til at næringen har lett etter andre metoder for å produsere en fisk som greier seg godt i sjøvann. Introduksjonen av SuperSmolt Feed Only (Europhama, Leknes) har gjort det mulig å produsere smolt uten å manipulere fotoperioden. Ifølge produsenten er SuperSmolt Feed Only en fôrbasert smoltifiseringsmetode av laks som benytter seg av Ca<sup>2+</sup>-sensitive reseptorer i tarmen. Disse reseptorene responderer på økningen i konsentrasjon av ulike ioner og aminosyrer og øker fiskens salinitetstoleranse. Metoden påstås å sikre en rask og synkron smoltifisering uten bruk av sjøvann eller mørkestimuli. Dette skal kunne gi en bedre vekst, god og homogen smoltstatus som gir god appetitt, lav dødelighet og god fiskehelse og -

velferd etter overføring til sjø (Europharma, 2018). I 2017 ble over 20% av smolten som ble satt ut i norske oppdrettsanlegg smoltifisert ved hjelp av SuperSmolt Feed Only (Fiskeridirektoratet, 2018; Ilaks.no, 2018).

I dagens lakseproduksjon er det antatt at post-smolt-stadiet er det mest sensitive og kritiske med tanke på overlevelse i sjø (Calabrese, 2017). Overføringen fra et landbasert settefiskanlegg til åpne havmerder er en spesiell stressende del av produksjonssyklusen som medfører forøkt dødelighet, svekket immunforsvar og redusert vekst og appetitt etter sjøutsett. (Iversen et al., 2005; Jarungriapisit et al., 2016; Jørgensen & Jobling, 1994; Roberts & Pearson, 2005). Dødelighet hos smolt rett etter utsett skyldes i hovedsak smoltkvalitet og infeksjoner. Dette utgjør en betydelig del av svignet i norsk oppdrettsnæring (Bleie & Skrudland, 2014). Dårlig kvalitet på settefisken kan føre til tapersyndrom etter sjøsetting som er en tilstand hvor fisken ikke klarer å ta til seg næring. Fisken blir svært tynn, men kan leve en hel produksjonssyklus i sjø uten å dø (Hjeltnes et al., 2019). Dårlig smoltkvalitet gir derfor både en redusert inntjening for oppdrettere og, ikke minst, et dyrevelferdsmessig problem (Hjeltnes et al., 2018).

### **1.4 Sykdomssituasjonen i norsk oppdrettsnæring**

Norsk lakseoppdrett har siden 1970 – tallet hatt utfordringer med ulike smittsomme sykdommer. På 80 – og 90-tallet var det bakteriesykdommer som dominerte, og forbruket av antibiotika var høyt. Etter introduksjonen av gode vaksiner på midten og slutten av 80 – tallet, gikk forbruket av antibiotika i norsk oppdrettsnæring betraktelig ned (fra 48,5 tonn aktivt stoff i 1987 til 212 kg i 2016), på tross av at produksjonen mangedoblet seg i samme periode (Hastein et al., 2005; Hjeltnes et al., 2019). De fleste bakterieinfeksjonene er i dag under kontroll, men fortsatt er sårproblematikk og gjellehelse forårsaket av bakterielle infeksjoner fremtredende (Hjeltnes et al., 2019).

De fleste av de alvorligste sykdommene i lakseoppdrett i dag skyldes virus (Hjeltnes et al., 2019; OIE, 2018). De mest utbredte virussykdommene i norsk lakseoppdrett er pankreassykdom (PD) som forårsakes av salmonid alphavirus (SAV), infeksiøs pankreasnekrose (IPN) forårsaket av infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV), infeksiøs lakseanemi (ILA) forårsaket av infeksiøs lakseanemivirus (ILAV), hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) som forårsakes av piscine orthoreovirus (PRV) og kardiomyopatisyndrom (CMS) som skyldes piscint myokardittvirus (PMCV). I mange tilfeller fører disse virussykdommene til betydelig redusert fiskevelferd, høy dødelighet og store økonomiske tap (Hjeltnes et al., 2019).

## 1.5 ILA – infeksiøs lakseanemi

Infeksiøs lakseanemi er en alvorlig fiskesykdom forårsaket av det akvatiske orthomyxoviruset infeksiøs lakseanemivirus. Viruset har et lineært, negativt, enkelttrådig RNA genom som består av åtte segmenter med 10 åpne leserammer. Genomet har en størrelse på rundt 14,3 kb og segmentene er nummerert etter størrelse som varierer fra 2,3 til 1,0 kb (Clouthier et al., 2002; Mjaaland et al., 1997). ILAV er et kappevirus med 3 proteiner på overflaten; fusionproteinet induserer fusjonen mellom virusmembranen og vertscellemembranen, Hemagglutinin-esterase glykoproteinene (HE) sørger for binding til vertsceller, samt sørger for utslipp av nye viruspartikler fra infiserte celler, mens det siste proteinet på overflaten fungerer som ionekanaler (Cottet et al., 2011; Falk et al., 2004; Workenhe et al., 2007). HE proteinet inneholder en «Highly Polymorphic Region» (HPR) med varierende lengde (Devold et al., 2001). Denne regionen er særst interessant da regionen ser ut til å bestemme virusets virulens. ILAV-stammer med en full lengde på HPR kalles HPR0 og er betegnet som avirulente virusstammer (Plarre, 2011). Ved mutasjoner eller delesjoner i dette området kan virulensen til viruset endre seg (Devold et al., 2001). Virusstammene med kortere HPR er virulent og kalles HPR $\Delta$  (Nylund et al., 2003; Plarre, 2011; Rimstad et al., 2011).

ILA har vært en utfordring i norsk oppdrettsnæring siden slutten av 80-tallet. Den ble for første gang beskrevet på Atlantisk lakseparr i et anlegg sørvest i Norge i 1984 og ble karakterisert som et kronisk utbrudd av anemi med høy dødelighet (Thorud & Djupvik, 1988). Viruset ble først isolert i 1995, og årsaken til sykdommen ble dermed kjent (Dannevig et al., 1995). Etter de første registrerte utbruddene i Norge økte forekomsten av sykdommen med et toppår i 1990 med flere enn 80 nye registrerte utbrudd (Lyngstad et al., 2018). Dette førte til 'Stopp ILA kampanjen' i 1989, som omfattet blant annet jevnlig helsekontroller, restriksjon for transport av fisk og kontrollsoner mot ILA (Håstein et al., 1999). Tiltakene hadde en positiv effekt på sykdomsutbruddene og siden 1993 har det blitt registrert mellom ett og 20 årlige ILA-utbrudd (Hjeltnes et al., 2019). De senere årene har ILA-situasjonen vært preget av isolerte utbrudd fra ukjente smittekilder langs hele kysten (Hjeltnes et al., 2019). En forklaring på dette kan skyldes at alle laksegrupper trolig er infisert med ILAV-HPR0 på et tidspunkt gjennom produksjonssyklusen (Lyngstad et al., 2018). Dermed vil det sporadisk kunne dukke opp tilfeller av sykdom ved mutasjoner fra HPR0 til den virulente HPR $\Delta$  varianten (Lyngstad et al., 2012; Nylund et al., 2007) ILA er klassifisert som en liste 2 sykdom av EUs fiskehelsesdirektiv (Council Directive 2006/88/EC) og er en meldepliktig sykdom (OIE, 2018)

Kliniske og histopatologiske funn fra fisk med ILA er ofte varierende fra utbrudd til utbrudd. Fisken ses svømmende høyt i vannet og svimeratferd kan oppstå, men fisken kan også synke til bunnen i merda. De vanligste kliniske funnene ved ILA er bleke gjeller, eksoftalmi, blødninger på øyet, petekkier (punktblødninger) på buk og indre organer, skjellødem, blodig ascites i bukhulen, mørk lever (forårsaket av fokale eller sonale hemoragiske nekroser), forstørret milt, alvorlig anemi og mangel av fôr i tarm (Bruno et al., 2013; Evensen et al., 1991; Godoy et al., 2008; Speilberg et al., 1995)

### **1.6 Medfødt immunforsvar hos fisk**

Fisk er en divers gruppe og består trolig av over 27.000 forskjellige arter (Helfman et al., 2009). Som alle høyere vertebrater har høytstående beinfisk (teleoster) cellulære og humorale immunresponser, samt sentrale immunologiske organ. Den største forskjellen fra pattedyr er at fisk ikke har lymfeknuter og beinmarg. Teleoster har to primære lymfoide organ; thymus og hodenyret. Hodenyret antas å være homolog med beinmarg i pattedyr, og fungerer også som et sekundært lymfatisk organ sammen med milten (Koppang et al., 2010; Tort et al., 2003). Immunsystemet til vertebrater består av to deler; det medfødte og det adaptive immunforsvaret. Det medfødte er et hurtig, uspesifikt førstelinjeforsvar mot patogene mikroorganismer, mens det adaptive immunforsvaret tar lengre tid å aktivere. Til gjengjeld er den adaptive delen spesifikk, gir god beskyttelse ved gjenkjennelse av et patogen og husker agens, noe som gir en raskere respons og beskyttelse ved en eventuell reinfeksjon (Abbas & Lichtman, 2011).

### **Komponenter i det medfødte immunforsvaret hos fisk**

Det medfødte immunforsvaret er en fundamental del av forsvarsmekanismene til fisk. Fisk har et begrenset repertoar av antistoffer, samt en langsom proliferering og modning av lymfocytter, noe som gjør den adaptive delen av immunforsvaret sårbart. Derfor er det medfødte immunforsvaret spesielt viktig (Alexander & Ingram, 1992; Magnadóttir, 2006).

Komponentene i det medfødte immunforsvaret bruker ulike reseptorer eller proteiner, til å gjenkjenne patogener som har trengt gjennom vertens eget vev. Disse gjenkjenner bestanddeler fra patogener som virus, bakterier og sopp (Ellis, 2001). Cytokiner er en stor og divers familie av små signalmolekyler i immunsystemet. Disse er svært viktige i cellulær kommunikasjon og i reguleringen av immunresponser under infeksjon eller annen immunstimulering som vaksinerer. Selv om flere piskine cytokingener er blitt identifisert, er det fortsatt begrenset

informasjon om deres biologiske funksjon (Jørgensen, 2014). Blant cytokinene finner man flere underfamilier som Tumor nekrosefaktor (TNF), interleukiner (IL) og interferoner (IFN). TNF og de forskjellige interleukinene er hovedsakelig involvert i reguleringen av betennelsesreaksjoner, mens interferoner er viktig i induksjonen av antivirale responser (Zou & Secombes, 2016). Videre følger en beskrivelse av utvalgte immunmolekyler brukt som markører i denne oppgaven.

### **TNF- $\alpha$ og dets rolle i fisk**

Som et pro-inflammatorisk cytokin er TNF- $\alpha$  et av de første immungenene som blir uttrykt på tidlige infeksjonsstadier i fisk. TNF- $\alpha$  i fisk og i pattedyr har store likhetstrekk med IL-1 $\beta$ , hvor de begge spiller viktige roller i reguleringen av betennelsesreaksjoner. Blant annet vil TNF- $\alpha$  øke mengden med reaktive oksygenforbindelse, øke den fagocytterende aktiviteten til de hvite blodlegemene til fisk, og spille en viktig rolle i reguleringen av proliferering og bevegelsen til leukocytter under infeksjoner (Zou & Secombes, 2016). TNF- $\alpha$  vil også kunne induseres i hjertet sammen med andre pro-inflammatoriske gener under infeksjon med SAV 3 i Atlantisk laks (Xu et al., 2012).

### **Mx er en del av laksens antivirale forsvar**

Laks har et godt utviklet og komplekst type-1 interferonsystem, som er den viktigste komponenten i det medfødte virusforsvaret hos vertebrater (Robertsen, 2018). Interferoner er alarmproteiner som blir produsert under en virusinfeksjon. Verten gjenkjenner viralt RNA via ulike reseptorer og starter en signalprosess ved å syntetisere og sekretere IFN. De fleste celler i kroppen har reseptorer for interferoner, og binding av disse vil føre til flere signaleringsprosesser som til slutt fører til syntese av flere antivirale proteiner. Dette forsvarer vertscellene i startfasen av en infeksjon (Robertsen, 2006). Mx proteinet er et av de mest studerte av de IFN-induserte antivirale proteinene og hindrer trolig virusreplikasjon ved å hemme intracellulær transport av virale nukleokapsider (Robertsen, 2006) og derfor brukes ofte Mx som en markør for hele type-1 IFN-systemet i studier på laks (Robertsen, 2018).

### **IL-10s rolle som anti-inflammatorisk signalmolekyl**

IL-10 er et potent anti-inflammatorisk cytokin som har regulatoriske funksjoner i de fleste immunologiske prosesser under infeksjon og sykdom (Zou & Secombes, 2016). Cytokinet er tilstede i pattedyr, fugler, amfibier og høytstående fisk, og er svært godt konserverert i vertebrater. Dette underbygger også viktigheten av IL-10 opp gjennom evolusjonen (Piazzon et al., 2016). Produksjonen av IL-10 avhenger blant annet av vevstype, størrelsen på infeksjonen og hvilken fase immunresponsen er i (Mosser & Zhang, 2008). IL-10 vil blant annet kunne inhibere uttrykk av pro-inflammatoriske cytokiner, dempe produksjonen av reaktive oksygenforbindelser, samt differensiere immunceller i det medfødte immunsystemet. I tillegg kan IL-10 påvirke det adaptive immunforsvaret direkte ved å inhibere proliferasjon av T-celler eller indirekte ved å nedregulere pro-inflammatorisk aktivitet som har påvirkning på det adaptive immunforsvaret (Piazzon et al., 2016).

### **SOCS1 og SOCS2 påvirkning av immunforsvaret**

SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) – proteiner er inhibitorer av cytokinsignalering og har markert seg blant de viktigste gruppene av intracellulære negative regulatorene i det medfødte immunsystemet (Linossi et al., 2013; Yoshimura et al., 2007). Denne gruppen av proteiner har flere ulike funksjoner og i tillegg til å være delaktig i den negative reguleringen av immunforsvaret (Yoshimura et al., 2007) vil de også være delaktig i reguleringen av veksthormon (Crocker et al., 2008) og å hemme cytokinsignalering (Delgado-Ortega et al., 2013). De fleste SOCS-proteinene blir induisert av cytokiner og er dermed et klassisk eksempel på en negativ feedback-loop, der aktiveringen av signalveien hemmer den samme kaskaden som aktiverte dem. Selv om SOCS-proteinene hovedsakelig hemmer cytokinsignalering, kan uttrykket av disse proteinene også induseres av andre stimuli som for eksempel cyclisk AMP (cAMP) og LPS (lipopolysakkarider) (Palmer & Restifo, 2009; Yoshimura et al., 2007). SOCS1 i fisk har store likhetstrekk med SOCS1 i pattedyr, og det er foreslått at SOCS1 i fisk virker som et ISG (interferonstimulert gen) (Skjesol et al., 2014). SOCS2 derimot er vist å regulere signaler av veksthormon. Metcalf og kollegaer (2000) viste at mus som hadde undertrykt SOCS2 fikk en ukontrollert vekst. I tillegg kan SOCS2 nedregulere aktiviteten av andre SOCS-proteiner (Crocker et al., 2008). Selv om alle SOCS-proteinene er identifisert i teleoster, er funksjonene deres dårlig studert i fisk sammenliknet med pattedyr (Skjesol et al., 2014).



### 1.7 Problemstilling

Med innføring av nye metoder for smoltifisering av laks i oppdrett vil man kunne møte på flere utfordringer. Å sørge for en synkronisert og fullverdig smoltifisering er avgjørende for å oppnå en best mulig smoltkvalitet. Det kan virke som den tradisjonelle lysstyringen som blir brukt for å initiere smoltifiseringen, og som i «vinterfasen» gir redusert tilvekst, ikke er forenelig med den raske veksten og det høye produksjonstrykket som etterstrebes i dagens lakseoppdrett. Tidligere studier har dessuten vist at lysstyrt smolt er mer utsatt for hjerte- og skjelettmuskelbetennelse sammenliknet med parr (Johansen et al., 2016a) og at asymptomatiske bærere av IPNV i ferskvannsfasen kan utvikle sykdomsutbrudd etter overføring til sjø (Johansen et al., 2009). Dette antyder at smoltifisering kompromitterer immunstatusen til fisken og at det kan være et resultat av energimobilisering under smoltifiseringen (Jarungriapisit et al., 2016). Ved bruk av saltstimulert smoltifisering trenger ikke fisken å bli utsatt for endring i fotoperiode som kan føre til nedsatt vekst og redusert energistatus før utsett. I dag velger flere og flere oppdrettere å smoltifisere ved bruk av SuperSmolt Feed Only (heretter kalt saltfôr). Det er imidlertid tvilsomt at stimulering av  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive reseptorer i tarm fører til de samme multifunksjonelle tilpassingene til et liv i sjøen som den lysstyrte smoltifiseringen gir. Med tanke på at fisken som blir sjøvannsadaptert ved hjelp av saltfôr trolig ikke gjennomgår en fullstendig smoltifisering, slik som fisken som blir utsatt for kort fotoperiode, kan det diskuteres om denne fisken bør klassifiseres som smolt eller ikke. Av praktiske hensyn vil likevel fisken som får saltfôr bli kalt for smolt i denne oppgaven, og eventuelle fysiologiske og morfologiske endringer vil bli omtalt som smoltifisering/smoltutvikling på lik linje med fisk som gjennomgår en fullstendig, lysstyrt smoltifisering. Ingen nylige studier på saltindusert smoltifisering i Atlantisk laks er rapportert. Det er heller ikke rapportert studier som fokuserer på saltstimulert smolt i dagens intensive produksjonsform. Derfor er det viktig å gjennomføre objektive studier hvor man sammenlikner den tradisjonelle smoltifiseringen med den saltstimulerte sjøvannsadapteringen, med hensyn på smoltutvikling (endokrinologi, morfologi og hypo-osmoregulering), samt immunstatus under smoltifiseringen og etter overføring til sjøvann med forankring i dagens produksjonsformer. I Akvakulturdriftsforskriften §20 stilles det krav om at «nye metoder og tekniske løsninger skal være utprøvd og dokumentert velferdsmessig forsvarlig før de tas i bruk» (Akvakulturdriftsforskriften, 2008).

Med bakgrunn i dette ble det etablert følgende hypoteser:

1. Saltstimulert smoltifisering gir ikke en fullverdig smoltkvalitet.
2. Lysstyrt smolt utvikler en redusert energistatus og derved et nedregulert immunforsvar under smoltifiseringen, noe som ikke er tilfelle hos den saltstimulerte smolten.
3. Et nedregulert immunforsvar hos lysstyrt smolt fører til et svekket sykdomsforsvar etter overføring til sjø sammenliknet med det hos saltstimulert smolt.
4. En ufullstendig smoltifisering hos salt-stimulert smolt vil gi økt stress og energiforbruk etter overføring til sjø og derved en akutt svekking av sykdomsforsvar.

Disse hypotesene skal undersøkes ved å sammenlikne klassiske smoltindisier (endring i kondisjonsfaktor og hypo-osmoregulatorisk evne), samt endring i energi- og immunstatus ved lys- og saltstimulert smoltifisering. Begge gruppene skal vaksineres underveis i smoltifiseringsforløpet. Vaksinen skal fungere som en immunstimulant for å aktivere immunforsvaret hos fisken. På denne måten kan begge gruppenes immunstatus undersøkes gjennom smoltifiseringen. Etter smoltifiseringen vil fisken bli overført til sjøvann, hvor en andel av fisken vil bli smittet med ILAV. Eventuell forskjell i dødelighet etter smitte mellom behandlingsgruppene vil bli relatert til utvikling av immunstatus under smoltifiseringen og smoltkvalitet vil blant annet bli målt etter appetitt og vekst etter overføring til sjø.

## 2. Materialer og metoder

Studien var en del av et større prosjekt finansiert av FHF (Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond), prosjektnummer 901432. Forsøkene var godkjent av Mattilsynet (smoltforsøket: 13891 og immuniserings- og smitteforsøket: 14495).

### 2.1 Forsøksfisk

I forsøket ble det brukt 700 stk. 1-årige parr av Atlantisk laks (*Salmo salar* L.), Aquagenstamme. Fra startfôring hadde fisken blitt holdt på kontinuerlig lys (LL) i sirkulære 500 liters kar med ferskvann på Landanlegget ved Havbruksstasjonen i Tromsø<sup>1</sup> (HiT) hvor forsøket ble utført. Temperaturen i karene ble holdt på 4°C frem til to uker før forsøksstart, hvorefter temperaturen ble økt med 0,5°C/dag slik at temperaturen var 10°C ved forsøksstart. Gjennomsnittsvekten på fisken ved forsøksstart var  $42,8 \pm 5,6$  gram (n=66). Fisken ble fôret i overskudd med kommersielt fôr fra Skretting<sup>2</sup> (Skretting Nutra Olympic 2-3 mm) kontinuerlig gjennom døgnet med fôrautomater. Temperatur og dødelighet ble sjekket hver dag og oksygenmetning ble målt minst en gang i uken av de ansatte på HiT. Vannmengden inn i karet ble justert slik at oksygenmetning ved utløp var  $\geq 80\%$ .

Prosjektet omfattet tre delforsøk, et innrettet mot effekten av salt- kontra lysbehandling på smoltutvikling (heretter kalt 'smoltforsøket') og det andre effekten av smoltifisering på immun- (heretter kalt 'immuniseringsforsøket') og sykdomsforsvar (heretter kalt 'smitteforsøket').

### 2.2 Forsøksoppsett

Ved forsøksstart (7. februar 2018) ble det opprettet to dupliserte behandlingsgrupper med laks (fordelt i fire sirkulære 500 liters kar, n=175/kar). To av karene ble utsatt for en kort fotoperiode med syv timer lys og sytten timer mørke per døgn (7L:17M) i seks uker, etterfulgt av seks uker på kontinuerlig lys (24L:0M). Denne gruppen betegnes "LL-SP-LL". De resterende to karene ble holdt på kontinuerlig lys i alle 12 ukene (betegnet "LL-LL-LL"). Fisken i begge gruppene fikk fôr i løpet av de 7 timene med lys i den lysstyrte gruppen. Ved oppstart av forsøket ble 20 fisk fra hvert kar (totalt n=80) individmerket med Floy-merker (Floy Tag Inc, WA, USA)

---

<sup>1</sup> Bedriftsadresse: Havbruksstasjonen i Tromsø AS, Skarsfjordvegen 892, 9131 Kårvik

<sup>2</sup> Bedriftsadresse: Skretting, Sjøhagen 15, 4016 Stavanger

beskrevet av Rikardsen (2000). Disse ble målt ( $\pm 0,1$  cm) og veid ( $\pm 0,5$  gram) ved hvert prøveuttak gjennom hele forsøket. Fisk som mistet merker underveis ble fjernet fra målingene.

Etter 6 uker på 7L:17M ble fotoperioden endret til kontinuerlig lys for begge gruppene, temperaturen ble justert til  $12^{\circ}\text{C}$  og et forsøksfôr ble introdusert. LL-SP-LL gruppen ble gitt et kontrollfôr som tilsvarte kommersielt vekstfôr til settefisk fra Skretting. Denne gruppen blir heretter referert til som 'lysgruppen'. Gruppen som hadde gått på kontinuerlig lys hele perioden ble gitt et eksperimentelt fôr produsert av Skretting (Tabell 1). Fôret var en kopi av Europharmas<sup>3</sup> SuperSmolt Feed Only. Denne gruppen blir heretter kalt 'saltgruppen'. Sammensetning av kontroll- og saltfôret er gitt Tabell 1. Fisken ble holdt under disse forholdene i åtte uker (21.mars – 15.mai). Fôringsregimet ble endret til små måltider gjennom hele døgnet.

Den 15. mai ble fisk fra hver behandlingsgruppe overført til det samme karet slik at all fisk fra en behandlingsgruppe var samlet i ett kar. Tettheten i karene ble justert til 50 fisk per kar, inklusive alle Floy-merkede fisk, før de ble overført til sjøvann (33‰). Overflødig fisk ble avlivet med overdose Benzoak og dekapitert. Temperaturen ble gradvis justert ned fra  $12^{\circ}\text{C}$  til  $8^{\circ}\text{C}$  ( $0,5^{\circ}\text{C}$  hver dag i 8 dager) før overføring til sjøvann. Vannmengden inn i karene ble justert slik at oksygenmetningen ved utløp  $\geq 80\%$ . Fôret ble endret fra forsøksfôr til Skretting Spirit 3,0 mm i begge gruppene. I sjøvannsperioden ble fôrspill samlet opp på hverdager (man-fre) i alle kar for å kvantifisere fôrintaket til fisken. Uspist fôr ble samlet opp om morgenen i en sil montert på avløpsrøret før det ble tørket og veid. Metoden er validert og rutinemessig i bruk ved HiT.

---

<sup>3</sup> Bedriftsadresse: Europharma AS, Storgata 9, 8376 Leknes

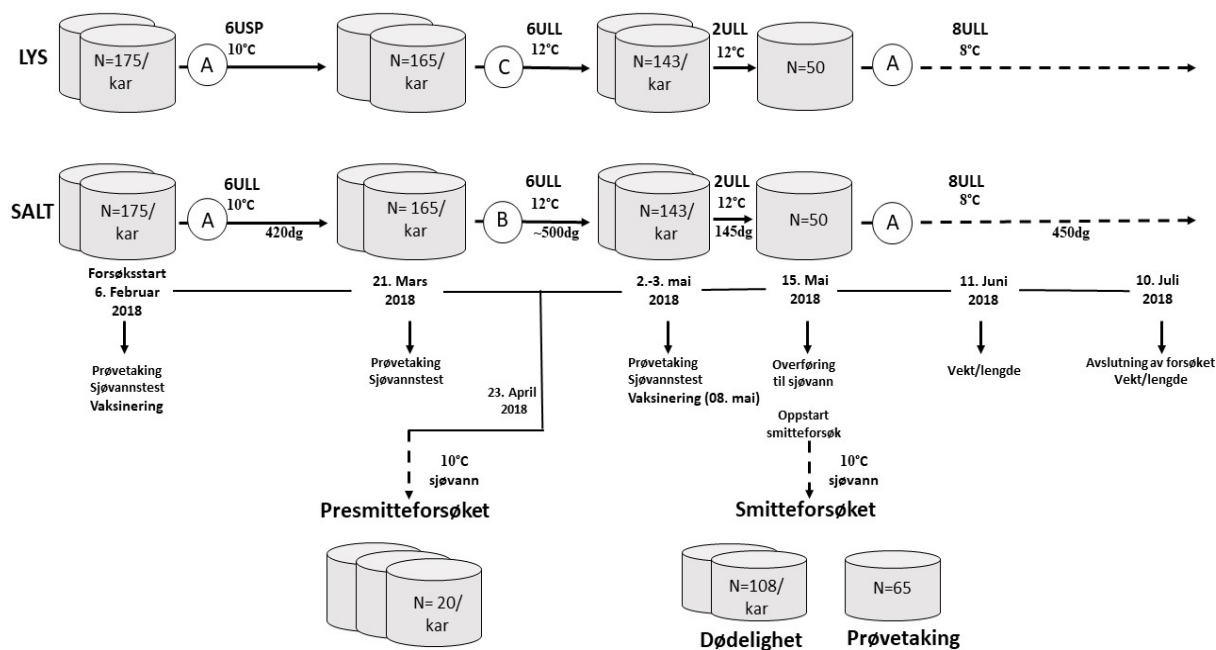
**Tabell 1. Diettsammensetning av forsøksfôr, Skretting (3mm).** Fôret ble gitt til behandlingsgruppene i 8 uker før overføring til sjø. Diettinhold er oppgitt i prosent av tørrvekt. Energiinnhold er oppgitt i MJ.

<b>Diett</b>	<b>Saltfôr (%)</b>	<b>Kontrollfôr</b>
Hvete	9,9	15
Hvetegluten	12	10
Solsikkemel	2	5
Soyaproteinkonsentrat	15	15,5
Skrelte hestebønner	2	4,8
Fiskemel	32,3	31,3
Rapsolje	8,6	8,5
Fiskeolje	8,6	8,5
Vann	1	0,3
Vitamin- og mineralblandinger	1,1	1,1
Salt (NaCl)	6	0
Kalsiumklorid (CaCl <sub>2</sub> )	0,75	0
L-Tryptofan	0,4	0
Magnesiumklorid (MgCl <sub>2</sub> )	0,25	0
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Energiinnhold (MJ)</b>	<b>22,17</b>	<b>21,21</b>

## 2.3 Smolt-, immunisering- og smitteforsøket

### 2.3.1 Smoltforsøket

Det ble gjort tre prøveuttak i ferskvannsfasen (Figur 1). Et uttak ved forsøkets start (7. februar 2018), et uttak seks uker senere ved overføring til kontinuerlig lys og endring i diett (21. mars) og et uttak 2 uker før overføring til sjø, (2. og 3. mai). Ved hvert uttak ble 10 fisk fra hver behandlingsgruppe (5 fra hvert kar) bedøvd i Benzoak (konsentrasjon av virkestoffet benzocaine 80 ppm) i ca. 5 min. før de ble veid og målt. En liten vevsprøve fra 1. gjellebue på fiskens venstre side ble tatt og lagt på 100 µl SEI-buffer (0,3 M sucrose, 0,02M Na<sub>2</sub>-EDTA og 0,2M imidazole) holdt på is. Disse ble lagret ved - 80 °C frem til analyser av Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-aktivitet.



**Figur 1. Skjematisk fremstilling av forsøksoppsettet.** Skjematisk fremstilling av prøvetakingstidspunkt, lysbehandlingsregime, diett, antall fisk og temperatur for de ulike smoltifiseringsregimene. Vaksinerings, sjøvannstester og måling av vekt/lengde, samt smitteforsøket er også vist. USP: Uker på kort fotoperiode; 7L:17M. ULL: Uker på kontinuerlig lys 24L. dg: døgngrader. A: Kommersielt fôr. B: Saltfôr. C: Kontrollfôr. SVT: Sjøvannstest. Heltrukne linjer angir perioden i ferskvann. Stiplede linjer angir perioden i sjøvann.

Ved hvert av prøvetakingstidspunktene i ferskvann, samt etter 4 uker i sjø (11. juni) og ved avslutning av forsøket (10. juli) ble Floy-merket fisk veid og målt for å følge veksten til individer underveis i eksperimentet.

### 2.3.1.1 Sjøvannstest (SVT)

Ved hvert av prøveuttakene i ferskvannsperioden ble ti fisk fra hver behandlingsgruppe (5 fra hvert kar) overført fra ferskvann til et kar med sjøvann (33‰, 7°C). Etter 24 timer ble fisken avlivet med overdose benzocaine (160 ppm). Vekt, lengde og eventuell dødelighet ble registrert. Blodprøver ble tatt, hvoretter de ble sentrifugert (6000 x g i 10 min), før plasma ble pipettert og lagret på -20°C inntil analyser av osmolalitet og kloridkonsentrasjon. I mai ble det i tillegg overført 10 fisk fra hver av behandlingsgruppene som gikk til en 7 dagers SVT.



### 2.3.2 Immuniseringsforsøket

Ved forsøksstart (feb) og 7 dager før overføring til sjø (8.mai) ble 20 umerkede fisk fra hver behandlingsgruppe vaksinert ved intraperitoneal (i.p) injeksjon av 0,1 ml ALPHA JECT micro 7 ILA (batch 13163), AJM7, fra PHARMAQ AS. Vaksinen var en 7-komponentsvaksine som inneholder formaldehydinaktiverte kulturer av *Aeromonas salmonicida* subs. *Salmonicida* RPS  $\geq$  80 (Relative Percentage Survival), *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum* serotype O1 RPS  $\geq$  75, *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum* serotype O2a RPS  $\geq$  75, *Vibrio salmonicida* RPS  $\geq$  90, *Moritella viscosa* RPS  $\geq$  60, Infeksiøs pankreasnekrose virus (IPNV) serotype Sp.  $\geq$  0,1 AU (Antigenicity Units) og Infeksiøs lakseanemi virus (ILAV) RPS  $\geq$  60. Adjuvanten var flytende parafin. Vaksineringsen ble utført med Socorex-sprøyter og 0,5 x 4mm nåler (Unimed, Lausanne, Sveits). I tillegg ble 20 fisk fra hver behandlingsgruppe injisert med 0,1 ml PBS (fosfatbufret saltvann). Før injeksjon ble fisk som skulle vaksineres fettfinneklippt mens fisken som ble injisert med PBS fikk en bit av halefinnen klippet av. Samtlige fisk ble bedøvd med Benzoak (80 ppm) før merking og injeksjon. Gruppene ble så fordelt i to separate kar med ferskvann på 12°C. Fisken ble sultet etter vaksineringsen. Tre og 7 døgn etter injiseringen ble 10 vaksinerte og 10 PBS-injiserte fisk bedøvd i overdose Benzoak før de veid og målt. Den ble deretter dekapitert før uttak av vevsprøver fra lever og hodenyre. Levervevet ble umiddelbart overført til rør på -80°C for senere analyser av glykogenkonsentrasjon, mens hodenyre ble oppbevart på separate rør med 1 ml *RNAlater*® og lagret ved 4 °C i 24 timer før de ble overført til -20°C inntil RNA ekstrahering og videre real-time qPCR (RT-qPCR) analyser. Som uninjisert kontroll ble det tatt prøver fra 10 fisk som ble prøvetatt i smoltforsøket.

### 2.3.3 Smitteforsøket

For å sikre en riktig virusdose for bruk i smitteforsøket, samt samle erfaring, ble det gjennomført et presmitteforsøk før gjennomføring av hovedsmitten. I forsøkene ble det benyttet et chilensk ILAV-isolat (PHARMAQ kode: ALV 321) som ble levert av PHARMAQ AS. Viruset ble dyrket og titrert av PHARMAQ AS etter standardiserte protokoller. Informasjon som gjelder dyrkningsbetingelser og cellelinjer er konfidensielle.

**Presmitteforsøket**

Den 23. april ble i alt 60 fisk (snittvekt: 91g) overført fra Landanlegget til 10°C ferskvann på Fiskehelselaboratoriet ved HiT. Fisken som ble brukt i presmitteforsøket kom fra smoltstudien (lys- og saltgruppen) og to andre grupper som ikke var en del av dette forsøket. De to andre gruppene hadde henholdsvis vært lysstyrt (som lysgruppen) og fått saltdiett i 4 uker før smitte eller gått på kontinuerlig lys og fått kontrollfôr gjennom hele perioden. Siden fisken gikk på 12°C før overføring ble fisken akklimerert til forsøkstemperaturen i to døgn før smitte. Ved smitte ble fisk tilfeldig valgt ut fra akklimeringskaret, bedøvd med Benzoak og gruppemerket i tre ulike grupper med *alkaline blue* ved bruk av en PanJet injector (Wright Dental, Dundee, UK). Merkingen fulgte Havbruksstasjonens standardprosedyre.

Etter merking ble tre grupper á 20 fisk injisert i.p med tre ulike doser ILAV, alle i 0,1 ml. Viruset ble fortynt i PBS og injisert som beskrevet i Tabell 2. Før smitte var fisken sultet i 24 timer. Etter smitte ble fisken overført til 10°C sjøvann (33‰),  $\geq 91\%$  oksygenmetning ved utløp og vedlikeholdsfôret (70% av tabell) med kommersielt fôr fra Skretting under kontinuerlig lys gjennom hele presmitteforsøket. Vanntemperatur, oksygennivå og dødelighet ble daglig overvåket av ansatte ved fiskehelselaboratoriet. Alle tre behandlingsgruppene ble holdt i et «common garden»-oppsett (ett og samme kar, 500 L) under forsøksperioden. Forsøket ble avsluttet 27 DPI (dager etter injeksjon) da henholdsvis 100%, 90% og 90% dødelighet i gruppe 1, 2 og 3 var oppnådd. Overlevende fisk ble avlivet med overdose Benzoak og dekapitering ved avslutning av forsøket.

**Tabell 2. Gruppering og injeksjonsdose av fisk i presmitteforsøket.** Forsøksfisken ble tilfeldig delt inn i tre grupper fra 4 ulike fiskegrupper (LL-LL – kontrollfôr, LL-LL – saltfôr, LL-SP – kontrollfôr, LL-SP – saltfôr). Gruppene ble merket med *alkaline blue* med ulik merking for å adskille dem. All fisk ble injisert med et chilensk ILAV-isolat (PHARMAQ kode: ALV 321).

Gruppe	Antall fisk	Injeksjonsvolum (ml)	Dose (TCID <sub>50</sub> /fisk)
1	20	0,1	4,8 x 10 <sup>3</sup>
2	20	0,1	1,2 x 10 <sup>3</sup>
3	20	0,1	4,8 x 10 <sup>2</sup>

### Hovedsmitteforsøket

Hovedforsøket ble utført som presmitteforsøket, men med en lavere virusdose. Dette siden dødeligheten i presmitteforsøket var for høy. Totalt 281 fisk fra smoltstudien ble gruppemerket (lysgruppen, n= 138, 91g; og saltgruppen, n=143, 125g) med *alkaline blue* som i presmitteforsøket. Merkingen ble utført den 22. mars mens fisken ennå ble holdt på ferskvann. Fisken ble flyttet fra Landanlegget til Fiskehelselaboratoriet den 16.mai, hvor de ble akklimert i to kar med 10°C ferskvann i seks dager før smitte. Oppsettet i hovedsmitten var likt som for presmitten med noen modifikasjoner.

Smitte med ILAV ble utført 22. mai. Fisken var sultet i ett døgn før smitte. Fiskegruppene ble bedøvet med Benzoak og injisert i.p. med 0,1 ml ILAV med en dose på  $1,6 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/fisk, før de ble fordelt i tre 500 L kar med 10°C sjøvann som angitt i Tabell 3. Vannmengden inn i karet ble justert slik at oksygenmetningen ved utløp var  $\geq 80\%$  og fisken ble vedlikeholdsfôret (70% av tabell) med kommersielt fôr fra Skretting under kontinuerlig lys.

**Tabell 3. Kar- og gruppeinndeling etter smitte.** Etter smitte ble de to behandlingsgruppene fordelt i tre ulike kar. Kar 1 og 2 var til registrering av dødelighet, mens kar 3 var prøveuttakskaret. Lys; LL-SP-LL + kontrollfôr; Salt; LL-LL-LL + saltfôr.

Gruppe	Kar 1	Kar 2	Kar 3	Totalt
Lys	53	53	32	138
Salt	55	55	33	143
<b>Totalt</b>	108	108	65	281

Karene ble sjekket minst to ganger daglig for død eller døende fisk. Dødfisk ble destruert og døende fisk ble bedøvd ved overdose Benzoak og dekapitert før de ble destruert. Det ble tatt prøver av levende fisk fra prøvetakningskaret (kar 3) 23 DPI og 28 DPI. Seks fisk fra hver gruppe ble avlivet med overdose Benzoak og dekapitering før de ble sjekket inn- og utvendig etter tegn til sykdom. Vevsprøver fra hodenyre ble deretter lagt på separate rør med *RNAlater*® og lagret ved 4°C i ett døgn før de ble overført til -20°C hvor de ble lagret frem til påvisning av ILAV RNA ved RT-qPCR. Ved avslutning av forsøket (42 DPI) ble resterende fisk avlivet med overdose Benzoak og tatt prøver av.

## 2.4 Analyser

### 2.4.1 Måling av osmolalitet og kloridkonsentrasjon i plasma

Til analysene av kloridkonsentrasjonen i plasma til fisken ble det brukt en Corning 925 Chloride Analyser titrator (CIBA Corning Diagnostics, Essex, England). Titratoren registrerer en væskes endring i ledningsevne når kloridioner reagerer med sølvioner og danner sølvklorid ( $\text{AgCl}$ ) og hvor endringen i ledningsevnen avhenger av mengden kloridioner i væska. Et 14 ml glassbeger ble fylt opp med syrebuffer ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  <100g/L,  $\text{HNO}_3$  9g/L, Sherwood Scientific Ltd, Cambridge, UK) og plassert slik at to sølvelektroder kom ned i løsningen. Løsningen ble så tilsatt 2 x 20  $\mu\text{l}$  standard 100 mM (MultiCal, Bayer HealthCare, Nederland) for kalibrering. Plasmaprøvene ble tint sakte på en seng av is før de ble homogenisert med vortex. Deretter ble 20  $\mu\text{l}$  av plasmaprøven tilsatt glassbeget med bufferløsning. Prøvene ble analysert 2 ganger, men ved avvik større enn 3 mM mellom analysene ble det utført opptil 4 analyser og de to nærmeste verdiene brukt. For hver tiende måling ble kalibreringen sjekket med standarden. Det aktuelle instrumentet har en presisjon på  $\pm 2.2$  mM for en løsning med 100 mM klorid (CibaCorning, 1980).

Til analysene av osmolalitet ble det benyttet et Fiske One-Ten Osmometer (Fiske Associates, MA, USA). Metoden som brukes er frysepunktsdepresjon (frysepunkt i relasjon til konsentrasjon av oppløste stoffer) i væsken som analyseres. Maskinen registrerer sammenhengen mellom fryse-/ smeltepunktet og konsentrasjonen av løste stoffer i en væske for å bestemme væskens osmolalitet. Til analysen benyttes en termistor som senkes ned i et rør (Advanced Instruments, Inc., MA, USA) med prøvematerialet i. Maskinen kalibreres ved testing mot en standardløsning (290 mOsm  $\text{kg}^{-1}$ , Accuref 290, Fiske Associates, MA, USA). Kalibrering antas vellykket når målingene stabiliseres på 290 ( $\pm 4$ ) mOsm  $\text{kg}^{-1}$ . Plasmaprøvene som ble analysert ble tint på en seng av is og homogenisert i en vortex før 15  $\mu\text{l}$  ble overført til testrøret. Hver prøve ble analysert 2 ganger, men ved avvik større enn 3 mOsm  $\text{kg}^{-1}$  mellom analysene, ble 3 analyser gjennomført og de to nærmeste verdiene brukt. For hver tiende måling ble kalibreringen sjekket med standarden.

### 2.4.2 Glykogenmålinger

Glykogenkonsentrasjonen ble bestemt ved en enzymkoplet analyse som benytter seg av den enzymatiske nedbrytningen av glykogen og produserer et kolorimetrisk/fluorimetrisk produkt som er proporsjonalt med glykogenet som er tilstede i prøven. For måling av glykogenkonsentrasjon ble det benyttet Glycogen Assay Kit (Sigma-Aldrich, MO, USA) med katalognummer MAK016 med små modifiseringer. For å forhindre nedbrytning av glykogen ble prøvene holdt på is under analysene. 10 mg levervev ble homogenisert i 200  $\mu$ l vann ved bruk av pistill før de ble kokt ved 75°C i fem minutter for å inaktivere enzymer i prøven, før den ble sentrifugert ved 4°C og 13.000 x g i fem minutter for å fjerne uløselig materiale. 10  $\mu$ l supernatant ble fortynnet i 260  $\mu$ l vann, før 40  $\mu$ l ble overført til nytt rør og fortynnet i 150  $\mu$ l hydrolysebuffer. Resten av analysene fulgte protokollen for kolorimetrisk analysemetode etter produsentens protokoll.

### 2.4.3 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

Analysen av enzymaktiviteten til Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ble utført av medstudent Daniel Engen Lauritzen som var delaktig i smoltforsøket. Gjellevevet ble preparert og analysert etter standardiserte metoder for gjellebiopsi og ATPase-målinger (McCormick, 1993).

### 2.4.4 RNA-ekstraksjon fra hodenyre

Til ekstraksjon av RNA ble det benyttet RNeasy Plus Universal Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Tyskland). Vevsprøver av hodenyre lagret på RNAlater ble tint og i underkant av 30 mg vev ble overført til 2 ml mikrosentrifugerør som var tilsatt en stålkule. Prøvene ble tilsatt 900  $\mu$ l QIAzol lysis reagent (Qiagen) før de ble plassert i en TissueLyser II (QIAGEN, Hilden, Tyskland) i 4 minutter på 30 hZ. Rørene ble inkubert ved romtemperatur i 5 minutter for å fremme dissosiering av nukleoproteiner. 100  $\mu$ l med gDNA eliminatorløsning ble tilsatt før prøvene ble blandet ved hjelp av Vortex i 15 sekunder. Deretter ble 180  $\mu$ l kloroform tilsatt og blandet med Vortex i 15 sekunder før prøvene ble inkubert ved romtemperatur i 2 minutter. Rørene ble sentrifugert ved 12.000 x g i 15 minutter på 4°C. Sentrifugeringen førte til at prøven ble delt inn i tre faser; en øvre, fargeløs, vannfase som inneholdt RNA; en hvit mellomfase; og en nedre, rød, organisk fase. Den øverste fasen ble overført til et nytt mikrosentrifugerør og tilsatt 600  $\mu$ l etanol (70%) før 700  $\mu$ l av løsningen ble overført til en RNeasy Mini spinnkolonnesom ble sentrifugert i 15 sekunder ved  $\geq$  8000 x g ved romtemperatur. RNAet i løsningen vil

bli fanget i membranen i kolonnen, mens resterende væske vil samles i røret under membranen. Restvæsken ble fjernet før resten av løsningen ble tilsatt og prosessen gjentatt. For å vaske prøven ble det tilsatt 700 µl RWT buffer til spinnkolonnen før den ble sentrifugert ved samme innstilling. Deretter ble membranen vasket to ganger med 500 µl RPE buffer og sentrifugert i to minutter for å fjerne gjenværende etanol fra prøven. Kolonnen ble så overført til et nytt 1,5 ml eppendorfrør der prøven ble tilsatt 30 µl RNasefritt vann og sentrifugert i ett minutt ved  $\geq 8000 \times g$  i romtemperatur. Prøvene ble videre rensset ved etanolpresipitasjon. RNA-konsentrasjonen til prøvene ble målt ved bruk av NanoDrop ND2000c (Thermo Scientific Inc., MA, USA). Nanodrop måler mengden RNA mot mengden protein i prøven ved å måle absorbans ved 260 og 280 nm. Genomisk DNA ble fjernet ved å behandle prøvene med Ambion Turbo DNA-free<sup>TM</sup> kit (Life Technologies, CA, USA) etter produsentens protokoll.

### 2.4.5 cDNA-syntese

cDNA-syntesen ble utført med RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific Inc., MA, USA). 9 µl mastermix (4 µl 5x reaction buffer, 2 µl 10 mM dNTP Mix, 1 µl Random hexamer primers, 1 µl RiboLock RNase inhibitor, 1 µl RevertAid Reverse transcriptase), 1000 ng RNA og vann ble tilført til et totalvolum på 20 µl i hvert rør. Rørene ble inkubert i Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Scientific, MA, USA) ved 25°C i fem minutter, 42°C i 60 minutter og terminert ved 70°C i fem minutter. Rørene ble avkjølt og lagret ved -20°C.

### 2.4.6 Real time RT-PCR

For å detektere uttrykk av immungener og ILAV-RNA ble det brukt «Real time-quantitative PCR» (RT-qPCR). Metoden brukes for til å måle mengde cellulært RNA eller DNA. RT-qPCR er et kraftig verktøy for å kvantifisere genuttrykk (Schmittgen & Livak, 2008). Ved å bruke spesifikke primere kan gensekvenser oppformes og kvantifiseres ved bruk av fluoriserende fargestoffer som SYBR®Green. Fargestoffene binder til PCR-produktet og intensiteten måles etter hver oppformingssyklus. Fluorescensen øker proporsjonalt med PCR-produktet (Life-Technologies, 2014). Det kvantitative endepunktet i real-time PCR er terskelverdien (Ct). Ct-verdien er definert som den PCR-syklusen hvor fluorescenssignalet av fargestoffet vilkårlig satt terskelverdi. Den numeriske verdien av Ct er omvendt relatert til mengden av PCR-produktet i reksjonen (desto lavere Ct-verdi, desto mer PCR-produkt i prøven) (Schmittgen & Livak,

2008). I denne oppgaven ble det brukt SYBR®Green som deteksjonsmetode. Metoden baserer seg på at når fargestoffet binder seg til fordyppninger i PCR-produktet (dobbeltrådig DNA) utgis det en sterkere fluorescens enn i ubunden form. Det gjør at fluorescensen vil øke desto mer PCR-produkt som er tilstede i prøven (Life-Technologies, 2014). I denne oppgaven ble det benyttet et PCR-program der prøvene gjennomgår 40 amplifiseringssykluser etterfulgt av en smeltekurveanalyse (Tabell 4).

Ved optimale betingelser vil cDNA i prøven fordobles ved hver syklus. En smeltekurveanalyse vil kunne avsløre om det er amplifisert andre sekvenser enn sekvensen til målgenet. Dette kan oppdages siden ulike gensekvenser har ulikt smeltepunkt på grunn av lengden til sekvensen og bindingene mellom basene i sekvensen (Life-Technologies, 2014).

**Tabell 4. RT-qPCR-program brukt for SybrGreen®**

Steg	Temperatur (°C)	Varighet	Antall sykler
<b>Pre-PCR avlesning</b>	50	10 min	Hold
<b>Denaturering</b>	95	5 min	Hold
<b>Denaturering</b>	95	10 sek	40
<b>Amplifisering og ekstensjon</b>	60	30 sek	40
<b>Denaturering</b>	95	10 sek	

Real time RT-PCR ble utført ved å bruke 1:10 fortynnet cDNA fra avsnittet over. Den endelige primerkonsentrasjonen var 250 nM for utenom  $\beta$ -Actin der konsentrasjonen var 200 nM. Konsentrasjonen for  $\beta$ -Actin ble bestemt etter tidligere erfaringer med dette primerparet. For hvert primerpar ble det lagd en mastermix som var blandet etter Tabell 5.

**Tabell 5. Oppsett for tillagning av mastermix (per reaksjon) ved bruk av SybrGreen®. Volum for  $\beta$ -Actin i parentes.**

Komponent	Volum
<b>SybrGreen®</b>	10 $\mu$ l
<b>Forward primer</b>	0,5 $\mu$ l (0,4 $\mu$ l)
<b>Revers primer</b>	0,5 $\mu$ l (0,4 $\mu$ l)
<b>MilliQH<sub>2</sub>O</b>	5,0 $\mu$ l (5,2 $\mu$ l)
<b>cDNA</b>	4 $\mu$ l
<b>Totalt</b>	20 $\mu$ l

16 µl mastermix ble tilsatt hver brønn i en 96-brønnersplate (BioRad) med 4 µl cDNA til et totalvolum på 20 µl per brønn. Det ble brukt tre plater per målgen med standardkurve på hver plate for internkontroll mellom platene. Prøvene ble analysert i duplikater. I to brønner ble det tilsatt vann istedenfor cDNA (NTC; No template control) for å avdekke kontaminering av prøvene eller utilsiktede amplifiseringsprodukter som primer-dimere (Nolan et al., 2013) eventuell uspesifikk binding. I to andre brønner ble det tilsatt cDNA uten reverse transcriptase (NRT; no reverse transcriptase) for å avdekke eventuell DNA-kontaminering i prøvene (Laurell et al., 2012). Analysene ble utført i en CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, CA, USA). PCR-produktet ble utsatt for en smeltekurveanalyse med temperaturspekter fra 65°C til 95°C, med en økning på 0,5°C og en plateavlesning etter hver økning. Dette for å verifisere produktspesifisiteten.

**Tabell 6. Primersekvenser for qPCR, genbaknummer, PCR-effektivitet og referanser.** Primerne ble blandet til en konsentrasjon på 100 µM før de ble fortynnet 1:10 slik at sluttkonsentrasjonen var 10 µM.

Gen	Retning	Primersekvens (5'-3')	Genbank nr.	Effektivitet [%]	Referanse
<b>Mx</b>	F	TGCAACCACAGAGGCTTTGAA	U66475	99,3	(Robertsen et al., 1997)
	R	GGCTTGGTCAGGATGCCTAAT			
<b>TNF-α</b>	F	TGCTGGCAATGCAAAAGTAG	AY848945	100,7	(Ingerslev et al., 2006a)
	R	AGCCTGGCTGTAAACGAAGA			
<b>IL-10</b>	F	CCTTCTCCACCATCAGAGATTAC	EF165029.1	101,9	(S. Jenberie, upublisert)
	R	AACTTCAGGATGCTGTCCATAG			
<b>SOCS1</b>	F	TTCTTGATCCGGGATAGTCG	KF699315	100,0	(Skjesol et al., 2014)
	R	TGTTTCCTGCACAGTTCCTG			
<b>SOCS2</b>	F	CACTGCCAACGAAGCCAAAGAGAT	KF699316	100,0	(Skjesol et al., 2014)
	R	CAAACCTGCTTCAGCTTGGGCTTGA			
<b>β-actin</b>	F	CAGCCCTCCTTCCTCGGTAT	BT059604	100,1	(Julin et al., 2009)
	R	CGTCACACTTCATGATGGAGTTG			
<b>EF1αβ</b>	F	TGCCCCTCCAGGATGTCTAC	BG933853	99,4	(Sobhkhez et al., 2018)
	R	CACGGCCCACAGGTACTG			
<b>ISA (seg 8)</b>	F	CTACACAGCAGGATGCAGATGT	AY151791	98,4	(Lauscher et al., 2011)
	R	CAGGATGCCGGAAGTCGAT			



#### 2.4.6.1 Primere

Elongeringsfaktor-1 $\alpha$  og  $\beta$ -actin ble benyttet som referansegen. Begge har vist seg å ha relativt stabile genuttrykk og er dermed velegnet til dette formålet (Ingerslev et al., 2006b; Julin et al., 2009). Årsaken for å benytte to referansegen er at flere studier har vist at de mest brukte referansegenene viser for stor variasjon til å påvirke genanalyser ved bruk av kun ett referansegen (Bustin et al., 2005; Dheda et al., 2005; Hirayama et al., 2005). Ved å benytte to referansegen sørger man for å oppdage forskjeller i genuttrykk mer nøyaktig.

Primereffektivitet ble testet ved å bruke 2-folds fortyningsserie med poollet cDNA fra alle gruppene i vaksineforsøket i triplikat med seks-åtte fortyninger per gen. Ct-verdiene ble plottet mot fortyningsserien for å lage en standardkurve. Stigningstallet ble benyttet for å regne ut primereffektiviteten (Pfaffl, 2001).

#### 2.4.6.2 Behandling av data fra RT-qPCR

Den relative økningen i genuttrykk mellom 0-gruppene (ikke-injisert) ble regnet ut ved bruk av  $\Delta$ Ct-metoden (komparativ Ct-metode) beskrevet av Schmitgen & Livak (2008).  $\Delta$ Ct definert som differansen mellom gjennomsnittsverdien av en prøve og det geometriske gjennomsnittet for EF1 $\alpha$  og  $\beta$ -actin av samme prøve. EF1 $\alpha$  og  $\beta$ -actin fungerer som interkontroll.  $\Delta$ Ct ble funnet ved likningen:

$$\text{Likning 1: } 2^{-\Delta\text{Ct}}$$

Data fra RT-qPCR ble behandlet ved bruk av  $\Delta\Delta$ Ct-metoden (Livak & Schmittgen, 2001) for å finne fold induksjon. Metoden er avhengig av primereffektivitet er nær 100%.  $\Delta$ Ct blir funnet på samme måte som for den komparative Ct-metoden. Videre blir  $\Delta\Delta$ Ct funnet ved differansen mellom  $\Delta$ Ct til en prøve og gjennomsnittet av  $\Delta$ Ct-verdiene for kontrollgruppen. Uinjisert fisk fra hver behandlingsgruppe ble satt som kontrollgruppe for hvert gen. Deretter blir den relative endringen til referansegenene og kontrollgruppen funnet ved likningen:

$$\text{Likning 2: } 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

## 2.5 Databehandling og statistikk

Fulton's kondisjonsfaktor,  $K$ , ble kalkulert i henhold til Ricker (1975):  $K = (W \times L^{-3}) \times 100$ , hvor  $W$  er kroppsvekt i gram og  $L$  er gaffellengde i cm. Spesifikk vekstrate (SGR) ble kalkulert som:  $SGR = (\ln W_2 - \ln W_1) \times 100\% / \Delta T$ , hvor  $\Delta T$  er antall dager mellom målepunktene  $T_1$  og  $T_2$  og  $\ln W_2$  og  $\ln W_1$  er den naturlige logaritmen av kroppsvekt ved henholdsvis  $T_2$  og  $T_1$  (Hemre et al., 2002). Fôrutnyttelse (food conversion efficiency; FCE) ble kalkulert etter Brett som referert i Handeland, Imsland og Stefansson (2008) som:  $FCE = G/R$ , hvor  $R$  er mengde inntatt fôr i gram i sjøvannsperioden, og  $G$  er den observerte økningen i gram biomasse i samme periode.  $RPS_{50}$  (*relative percent survival 50*) ble kalkulert som  $RPS_{50} = (1 - (\text{dødelighet i saltgruppen ved 50\% dødelighet i lysgruppen} / 50\% \text{ dødelighet i lysgruppen})) \times 100$ .

GraphPad Prism versjon 8.0.1 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ble benyttet for å fremstille figurer, samt for å gjennomføre statistiske analyser. Toveis ANOVA ble bruk for å avgjøre signifikansnivåer mellom gruppene for lengde, vekt og kondisjonsfaktor, og SGR. Sidaks multiple sammenlikningstest ble brukt for å undersøke statistiske forskjeller innad i gruppene ved de ulike prøvetakingstidspunktene. Uparet t-test ble benyttet for å avgjøre statistisk signifikans mellom og innad i gruppene for kloridkonsentrasjon, osmolalitet og NKA-aktivitet i gjeller ved de ulike prøvetakingstidspunktene. ROUT-metoden ble brukt for å identifisere sannsynlige uteliggere. Enveis ANOVA og Tukey's multiple sammenlikningstest ble brukt til å avdekke eventuelle signifikante forskjeller i genuttrykk mellom gruppene. Datasettene for dødelighet i smitteforsøket ble analysert ved bruk av Mantel-Cox test (log-rank) og Gehan-Breslow-Wilcoxon test. Forskjeller ble betraktet som signifikante ved  $p < 0,05$ .

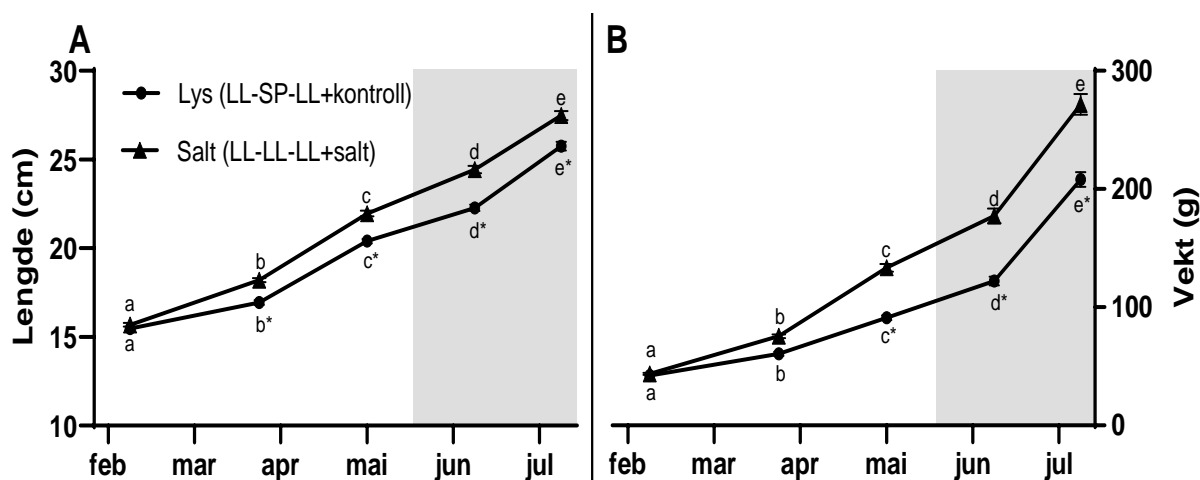
### 3. Resultater

#### 3.1 Smoltstatus i lys- og saltindusert smolt

##### 3.1.1 Analyse av smoltstatus etter ulike smoltifiseringsregimer

Lakseparr ble utsatt for to ulike smoltifiseringsregimer (Figur 1). Det ene regimet bestod av en tradisjonell smoltifisering ved å endre fotoperioden fra kontinuerlig lys til 07L:17M (syv timer lys og sytten timer mørke per døgn) i seks uker, før overføring til kontinuerlig lys i seks uker. Det andre regimet baserte seg på kontinuerlig lys gjennom hele smoltifiseringsprosessen. I stedet for endring i fotoperiode ble smoltifiseringen induisert ved hjelp av et spesialfôr tilsatt NaCl og aminosyren tryptofan i åtte uker før overføring til sjøvann. Fisken hadde ellers like forsøksforhold. Lengde- og vektmålinger, samt plasmaklorid og plasmaosmolalitet ble målt i begge gruppene under hver av prøvetakingstidspunktene i ferskvannsperioden. Plasmaprøver ble tatt etter 24-timers sjøvannstester, samt etter 7 dager på sjøvann ved det siste prøvetakingstidspunktet på ferskvann. I sjøvannsperioden ble lengde- og vektmålinger utført, samt kvantifisering av fôrintak. Vekstdata (lengde og vekt) er fra Floy-merket fisk.

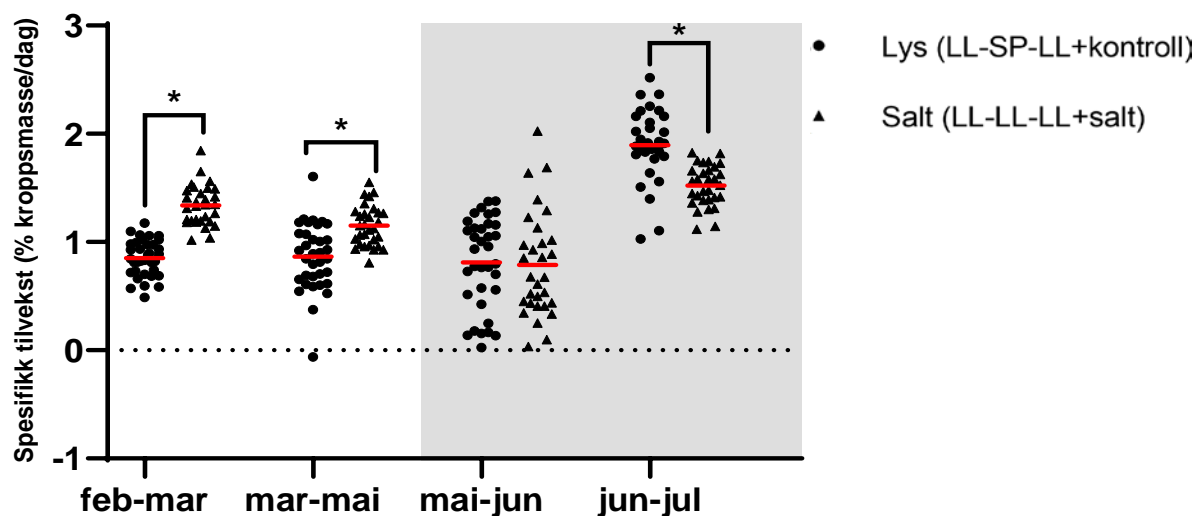
#### Vekst



**Figur 2. Lengde og vekt på Floy-merket laks smoltifisert ved endring i fotoperiode (lys) eller ved saltholdig fôr (salt).** Gjennomsnittsvikt (A) og -lengde (B)  $\pm$  standardfeil (SEM) av Floy-merket fisk i begge behandlingsgruppene (lysgruppen, n= 35; saltgruppen n= 31). Det skraverte området illustrerer perioden på sjøvann. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom tidspunkt innad i gruppene. Signifikante forskjeller mellom gruppene ved hvert tidspunkt er markert med '\*\*'.

Det var ingen signifikante forskjeller i kroppslengde ( $15,5\text{cm} \pm 0,1$  og  $15,7\text{cm} \pm 0,1$ ; gjennomsnitt  $\pm$  SEM i lys- og saltgruppen henholdsvis) mellom Floy-merket fisk i de to gruppene ved oppstart av forsøket i februar (Figur 2A). I løpet av forsøket økte kroppslengden med en faktor på henholdsvis 1,8 og 1,7 i salt- og lysgruppen. Etter seks uker med ulik daglengde i behandlingsgruppene (feb.-mars) var kroppslengden til fisken i saltgruppen signifikant høyere enn i lysgruppen ( $p < 0,001$ ), noe den forble resten av forsøket.

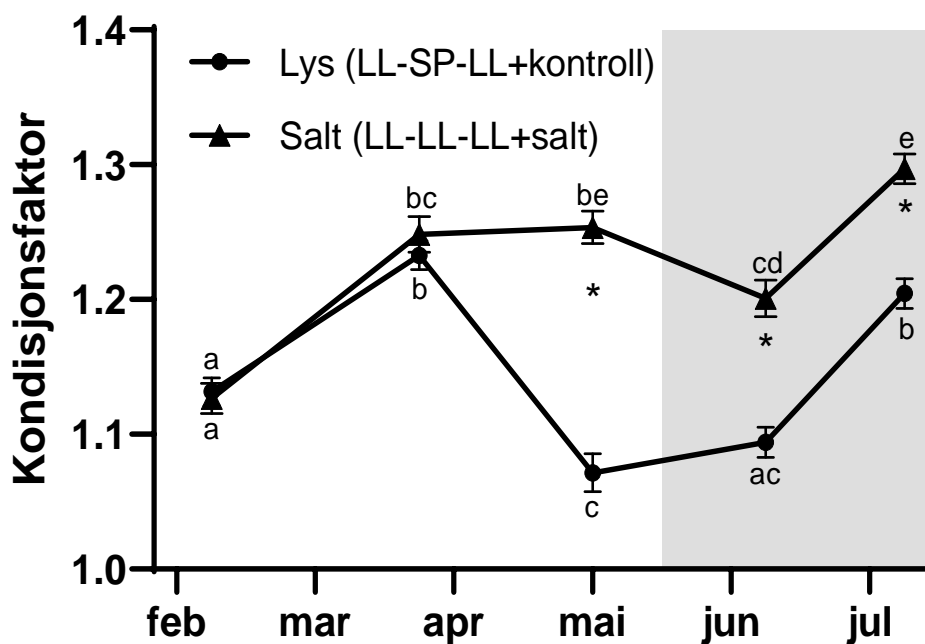
Det var ingen signifikante forskjeller i kroppsvekt ( $42,2\text{g} \pm 1,0$  og  $43,5\text{g} \pm 0,9$ ; gjennomsnitt  $\pm$  SEM i lys- og saltgruppen henholdsvis) mellom gruppene ved start av forsøket (Figur 2B). Vekten økte med en faktor på henholdsvis 6,2 og 4,9 i salt- og lysgruppen i løpet av forsøksperioden. Vekt etter seks uker med ulik daglengde i behandlingsgruppene var ikke signifikant forskjellig mellom salt- og lysgruppen ( $75,5\text{g} \pm 1,5$  og  $60,5\text{g} \pm 0,1,7$  henholdsvis). Før overføring til sjø i mai var vekten til fisken i saltgruppen signifikant ( $p < 0,001$ ), høyere enn lysgruppen ( $132,9\text{g} \pm 3,2$  og  $91,2\text{g} \pm 1,9$ ) noe den forble gjennom resten av forsøket. Både vekt og lengde økte signifikant ( $p < 0,001$ ) innad i gruppene mellom hvert målepunkt.



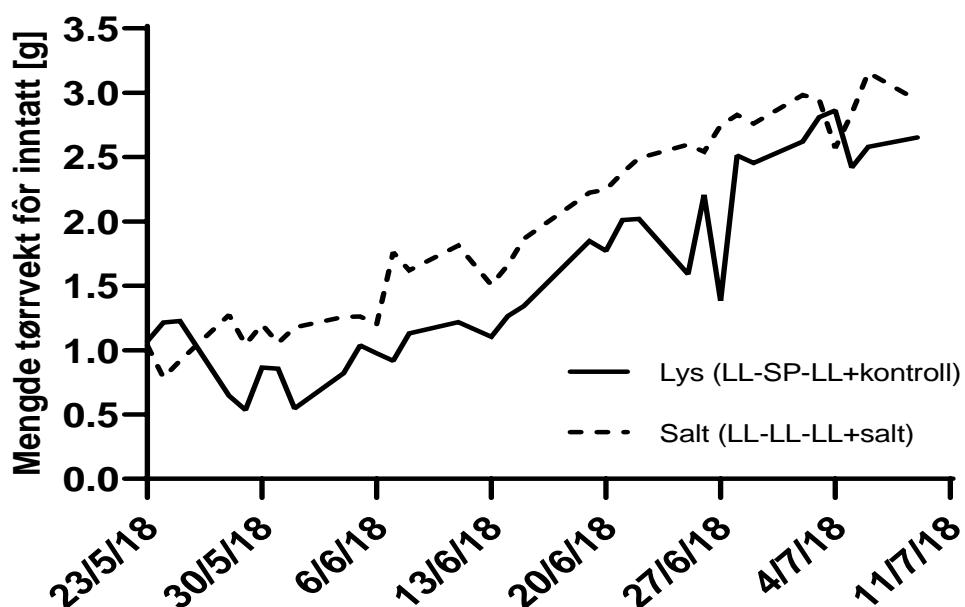
**Figur 3. Spesifikk tilvekst (SGR%) til Floy-merket merket laks smoltfisert ved endring i fotoperiode (lys) eller ved saltholdig fôr (salt).** Punktdiagram med individuelle verdier av den daglige tilveksten til hver av de Floy-merkede fiskene (lysgruppen,  $n=35$ ; saltgruppen,  $n=31$ ) mellom hver av prøvetakingstidspunktene. Gjennomsnittlig tilvekst for gruppen i hver periode er illustrert med rød linje. Det skraverte området illustrerer perioden på sjøvann. Signifikante forskjeller mellom gruppene ved hvert tidspunkt er markert med '\*'. \*

I likhet med både lengdevekst og vektøkning var den spesifikke tilveksten i saltgruppen høyere enn i lysgruppen ( $1,34\% \pm 0,03$  og  $0,85\% \pm 0,03$ ) både gjennom perioden med ulik fotoperiode (feb-mar;  $p < 0,001$ ) og gjennom perioden med saltbehandling ( $1,15\% \pm 0,03$  og  $0,86\% \pm 0,51$ ) (mar-mai,  $p < 0,001$ ) i ferskvannsfasen (Figur 3). I løpet av de første fire ukene på sjøvann var det ingen forskjell i tilvekst mellom behandlingsgruppene ( $0,79\% \pm 0,09$  og  $0,81\% \pm 0,07$  i salt- og lysgruppa henholdsvis), men den var signifikant lavere ( $p < 0,001$ ) i saltgruppen enn i lysgruppen den siste perioden i sjøvann ( $1,52\% \pm 0,03$  og  $1,90\% \pm 0,05$  i salt- og lysgruppen). Mellom juni og juli økte den relative daglige tilveksten signifikant ( $p < 0,001$ ) i begge gruppene sammenliknet med de 4 foregående ukene på sjøvann.

Ved forsøksstart var kondisjonsfaktoren ( $1,14 \pm 0,01$  og  $1,13 \pm 0,01$  i lys- og saltgruppen henholdsvis) i Floy-merket fisk ikke signifikant forskjellig mellom gruppene (Figur 4). K-faktoren økte signifikant ( $p < 0,001$ ) i begge gruppene i løpet av de første seks uker med ulik fotoperiode (feb.-mars.), og forskjellene mellom gruppene forble ikke-signifikante ( $1,24 \pm 0,01$  og  $1,25 \pm 0,01$  i lys- og saltgruppen). I løpet av behandling med ulike dietter (mars - mai) sank K-faktoren signifikant i lysgruppen ( $p < 0,001$ ) mens kondisjonsfaktoren til saltgruppen forble høy og uendret i denne perioden. På dette tidspunktet var K-faktoren signifikant høyere ( $p < 0,001$ ) i saltgruppen sammenliknet med lysgruppen ( $1,07 \pm 0,01$  og  $1,26 \pm 0,01$  i lys- og saltgruppen). Målingene fra juni viste at K-faktoren avtok signifikant ( $p < 0,05$ ) i saltgruppen fra målingene i mai mens økningen i lysgruppen ikke var signifikant ( $1,03 \pm 0,01$  og  $1,22 \pm 0,01$  i lys- og saltgruppen). De siste fire ukene av forsøket økte K-faktoren signifikant i begge gruppene sammenliknet med målingene i juni ( $1,22 \pm 0,01$  og  $1,31 \pm 0,01$  i lys- og saltgruppen). Fisken i saltgruppen hadde en signifikant høyere K-faktor ( $p < 0,001$ ) enn lysgruppen fra mai (før overføring til sjøvann) og ut forsøket.

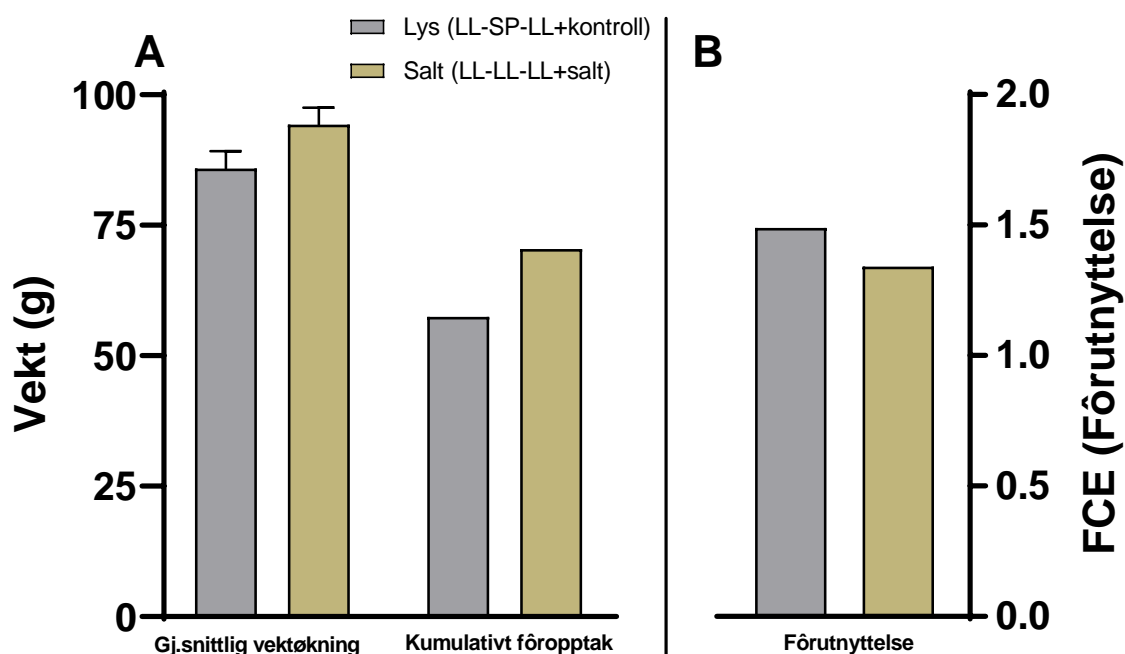


Figur 4. Kondisjonsfaktor til Floy-merket laks smoltifisert ved endring i fotoperiode (lys) eller ved saltholdig fôr (salt). Gjennomsnittlig K-faktor  $\pm$  SEM av Floy-merket fisk i begge behandlingsgruppene (lysgruppen, n=35; saltgruppen, n=31). Det skraverete området illustrerer perioden på sjøvann. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom tidspunkt innad i gruppene. Signifikante forskjeller mellom gruppene ved hvert tidspunkt er markert med '\*'.



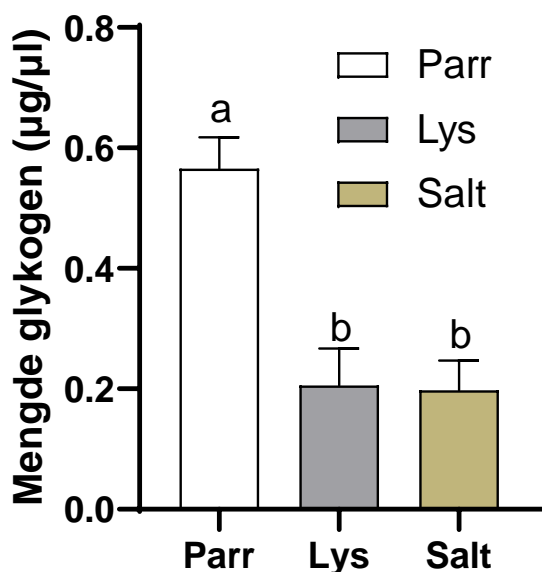
Figur 5. Gjennomsnittlig fôrinntak (g) per fisk per dag i sjøvannsfasen hos laks smoltifisert ved endring i fotoperiode (lys) eller ved saltholdig fôr (salt). Fôrinntak presentert som mengde inntatt fôr i tørrvekt (g) per fisk per dag i sjøvannsfasen. Fôrspill ble samlet opp i på hverdager (man-fre) av fôrøppsamlerne før det ble tørket og veid. Oppsamling ble gjort gjennom hele sjøvannsfasen.

Begge gruppene viser et gradvis økende fôrintak underveis i sjøvannsoppholdet (Figur 5). Saltgruppen tenderer til å ha en større vektøkning, et høyere fôrintak (Figur 6A) og en lavere fôrutnyttelse (Figur 6B) sammenliknet med lysgruppen.



**Figur 6. Tilvekst, fôropptak og fôrutnyttelse i sjøvannsperioden hos laks smoltifisert ved endring i fotoperiode (lys) eller ved saltholdig fôr (salt).** Gjennomsnittlig vektøkning (g)  $\pm$  SEM og kumulativt fôropptak (g) per fisk (A), samt fôrutnyttelsen, FCE, (B) i begge behandlingsgruppene gjennom sjøvannsperioden (lysgruppen, n=35; saltgruppen, n=31). Fôrintaket er fremstilt som gjennomsnittlig inntatt mengde fôr (g) per fisk. Fôrutnyttelsen er beregnet som  $FCE = G/R$ , hvor R er mengde innatt fôr (g) i sjøvannsperioden og G er den observerte vektøkningen i samme periode.

Glykogenkonsentrasjon i lever ble målt ved forsøksstart (feb) og i begge gruppene før overføring til sjøvann i mai (Figur 7). Under smoltifiseringen endres glykogenivåene seg fra 0,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  i parrgruppen i februar til 0,21  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  og 0,20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  i henholdsvis lys- og saltgruppen. Glykogenkonsentrasjonen var signifikant lavere i både lys- og saltgruppen ( $p < 0,001$ ) i mai sammenliknet med verdiene hos parren.



**Figur 7. Glykogenkonsentrasjon i lever hos parr og smolt smoltifisert ved endring i fotoperiode (lys) eller ved saltholdig fôr (salt).** Gjennomsnittlig glykogenkonsentrasjon i lever  $\pm$  SEM for parr, samt, begge behandlingsgruppene ( $n=9$ ) ved bruk av Glycogen Assay Kit (Sigma-Aldrich) MAK016. Lever ble tatt fra ikke-injisert kontrollfisk i vaksineforsøket i februar og fra begge smoltgruppene i mai. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom gruppene.

### Sjøvannstoleranse

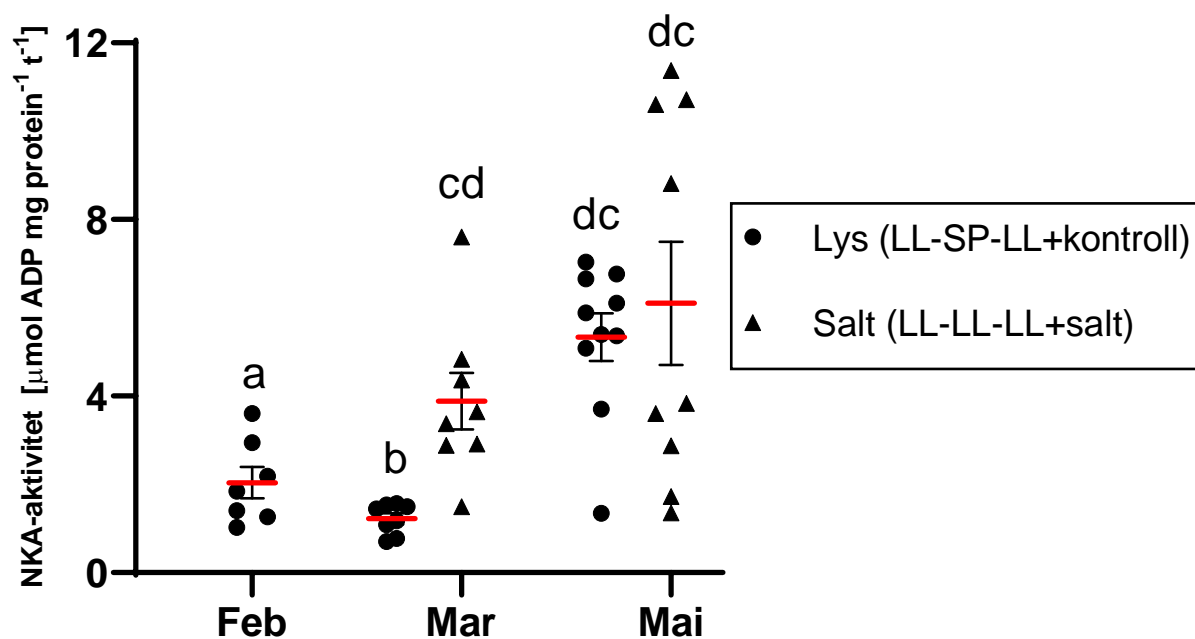
Ingen dødelighet ble sett i noen av gruppene ved 24-timers SVT i hverken februar eller mars (etter 6 uker på ulik fotoperiode). I mai derimot, døde 12 av totalt 26 fisk fra lysgruppen etter 24-timers testen, mens ingen fisk døde i saltgruppen etter den samme testen. I løpet av 7-dagers testen i mai var dødeligheten i lysgruppen 20% (2 av 10 fisk) mens dødeligheten i saltgruppen var 10% (1 av 10 fisk).

Kloridkonsentrasjonen i plasma etter 24-timers SVT i februar var 158 mM. Den forble uendret i lysgruppen mellom målingene i februar og mars (Figur 8A) hvor fisken var utsatt for kort dag ( $158\text{mM} \pm 4,7$ ; gjennomsnitt  $\pm$  SEM). Kloridkonsentrasjonen i saltgruppen, som ble holdt på kontinuerlig lys, sank signifikant ( $p < 0,001$ ) i den samme perioden. Saltgruppen hadde signifikant lavere kloridkonsentrasjon enn lysgruppen i mars ( $p < 0,01$ ). I perioden fisken fikk ulike dietter (mars - mai) opplevde saltgruppen en signifikant økning ( $p < 0,05$ ) i kloridnivåer i plasma sammenliknet med målingene i mars. Det ble også registrert en økning i kloridkonsentrasjon i lysgruppen, men denne var ikke statistisk signifikant. Forskjellene mellom gruppene var også signifikante i mai ( $p < 0,001$ ). Målinger av kloridkonsentrasjon etter





signifikant nedgang ( $p < 0,01$ ) i osmolalitet etter 7 dagers SVT sammenliknet med 24-timers testen i mai mens saltgruppen hadde en svak, ikke-signifikant nedgang. Etter 7 dagers på sjøvann var det signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) mellom gruppene ( $328,6 \text{ mOsm}^{\text{kg}^{-1}} \pm 1,5$  og  $340,0 \text{ mOsm}^{\text{kg}^{-1}} \pm 3,9$ , i henholdsvis salt- og lysgruppen, gjennomsnitt  $\pm$  SEM). Osmolalitet i plasma etter 7 dager i sjøvann var signifikant lavere enn ved start av forsøket i begge behandlingsgruppene.



**Figur 9.**  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aktivitet i gjeller i ferskvannsfasen hos laks smoltifisert ved endring i fotoperiode (lys) eller ved saltholdig fôr (salt). Punktdiagram med individuelle verdier av enzymal NKA-aktivitet i gjellene ved hvert prøvetakingstidspunkt ( $n=7-10$ ). Gjennomsnittlig NKA-aktivitet er markert med rød linje. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom gruppene og tidspunkt.

Ved forsøksstart var NKA-aktiviteten i gjellene  $3,0 \mu\text{mol ADP mg protein}^{-1}\text{t}^{-1}$  (Figur 9). I mars hadde NKA-aktiviteten til saltgruppen ( $3,9 \pm 0,6$ ; gjennomsnitt  $\pm$  SEM) økt signifikant ( $p < 0,05$ ), mens aktiviteten i lysgruppen ( $1,2 \pm 0,1$ ) avtok signifikant ( $p < 0,05$ ) i samme periode. Dette gjorde at saltgruppen hadde signifikant høyere NKA-aktivitet i mars ( $p < 0,01$ ) sammenliknet med lysgruppen. Målingene i mai viste at begge gruppene hadde en økt NKA-aktivitet sammenliknet i mars ( $6,1 \pm 1,3$  og  $5,8 \pm 0,3$  i salt- og lysgruppen henholdsvis), men økningen fra mars var bare signifikant ( $p < 0,001$ ) i lysgruppen. Det var ingen signifikant forskjell i NKA-aktivitet i gjeller mellom gruppene i mai og det var store individuelle forskjeller i begge behandlingsgruppene.

### 3.2 Uttrykk av immungener i parr og i lys- og saltindusert smolt.

For å undersøke endringer i basale genuttrykk gjennom smoltifiseringen ble parr og to smoltgrupper, indusert ved lys eller saltfôr, analysert for et utvalg gener i det medfødte immunforsvaret. Det ble i tillegg gjort en immunstimulering med en 7-komponent vaksine før og etter smoltifiseringen for å undersøke eventuelle forskjeller i responsen på en immunstimulant. Genene som ble analysert var Mx, TNF- $\alpha$ , IL-10, SOCS1 og SOCS2.

#### 3.2.1 Basaluttrykk av immungener

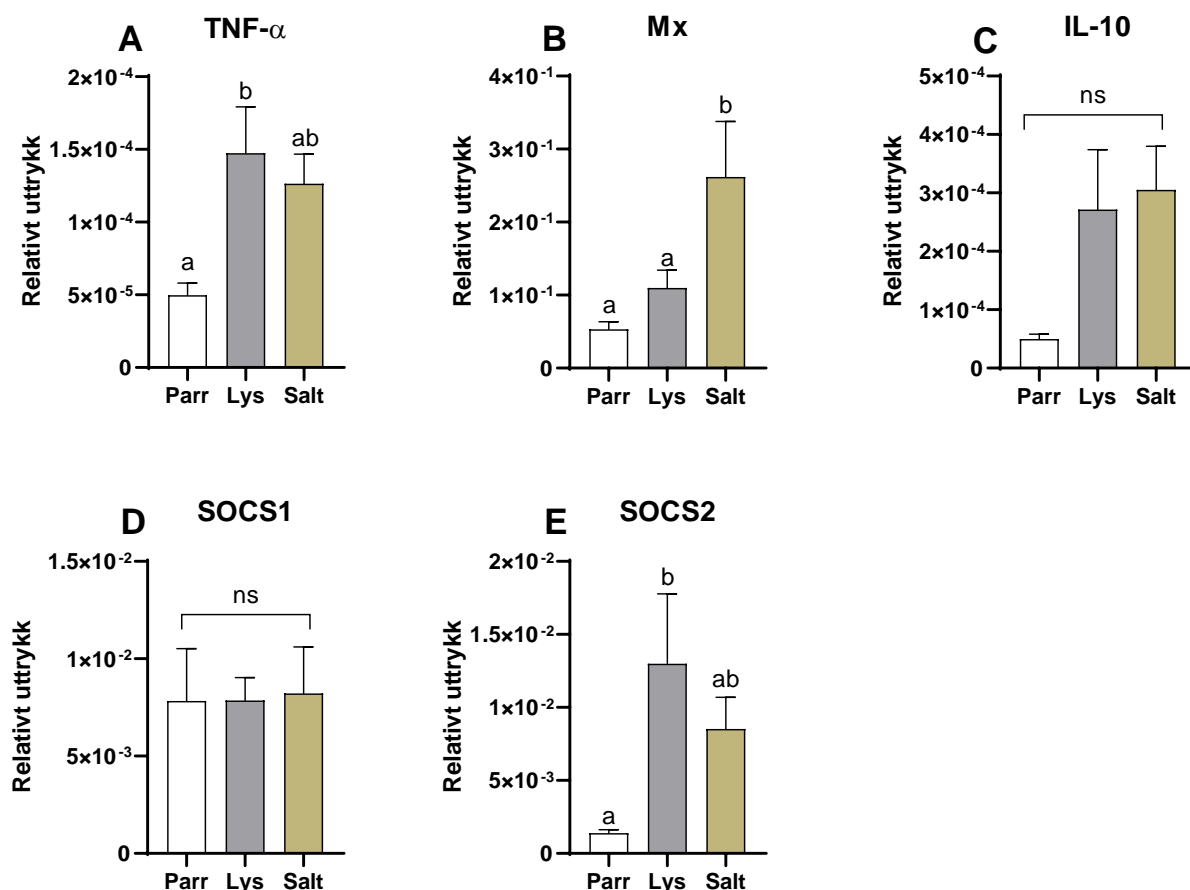
Det basale genuttrykket av utvalgte gener ble analysert i ubehandlet fisk i de tre gruppene (parr og lys- og saltstimulert smolt) ved RT-qPCR. Basaluttrykket av TNF- $\alpha$  var om lag tre ganger lavere i parren enn i lysgruppen i mai (Figur 10A). Forskjellen mellom disse gruppene var signifikant ( $p < 0,05$ ). Selv om økningen i saltgruppen var i overkant av 2,5 ganger, var uttrykket av TNF - $\alpha$  i saltgruppen ikke signifikant forskjellig fra parren. Det var heller ingen forskjeller mellom salt- og lysgruppen.

For Mx var trenden den samme som for TNF- $\alpha$ , med lavest basaluttrykk i parr sammenliknet med smoltgruppene (Figur 10B), men kun saltgruppen hadde et signifikant høyere Mx-uttrykk enn parr ( $p < 0,01$ ) med 4,9 ganger så høyt uttrykk. Saltgruppen hadde også 2,5 ganger høyere Mx-uttrykk enn lysgruppen ( $p < 0,05$ ).

Det var ikke signifikante forskjeller mellom noen av gruppene i genuttrykket av IL-10, selv om parr hadde henholdsvis 6 og 5,5 ganger lavere uttrykk enn salt- og lysgruppen (Figur 10C). Variasjonen innad i lys- og saltgruppen var relativt stor.

Genuttrykket for SOCS1 var ikke signifikant forskjellig mellom gruppene (Figur 10D). For SOCS2 var genuttrykket i parr signifikant lavere ( $p < 0,05$ ) enn i lysgruppen (Figur 10E). Det var ingen signifikante forskjeller å finne mellom parr og saltgruppen, ei heller mellom lys- og saltgruppen. Dette selv om saltgruppen hadde over 6 ganger så høyt uttrykk av SOCS2 sammenliknet med parrgruppen.

Resultatene viste samme trend for alle genene, bortsett fra SOCS1, med lavest basaluttrykk i parr sammenliknet med de to smoltgruppene. Det var kun Mx som gav signifikante forskjeller mellom de to smoltgruppene ( $p < 0,05$ ). Det var generelt høy variasjon i genuttrykk innad i smoltgruppene sammenliknet med parrgruppen. Unntaket er for SOCS1 hvor variasjonen var høy i alle gruppene.



**Figur 10.** Normalisert genuttrykk i hodenyre av TNF- $\alpha$ , Mx, IL-10, SOCS1 og SOCS2 for ikke-injisert parr og smolt som var smoltifisert med endring i fotoperiode (lys) eller ved saltholdig fôr (salt). (A) TNF- $\alpha$ , (B) Mx, (C) IL-10, (D) SOCS1 og (E) SOCS2. Forandring i genuttrykk ble målt ved RT-qPCR (SYBR® Green). Relativt uttrykk er beregnet ved bruk av  $\Delta$ Ct-metoden (komparativ Ct-metode) beskrevet av Schmittgen & Livak (2008). Verdiene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM (n= 4-7). Signifikante forskjeller mellom gruppene er notert med ulike bokstaver. ns = ikke-signifikante forskjeller.

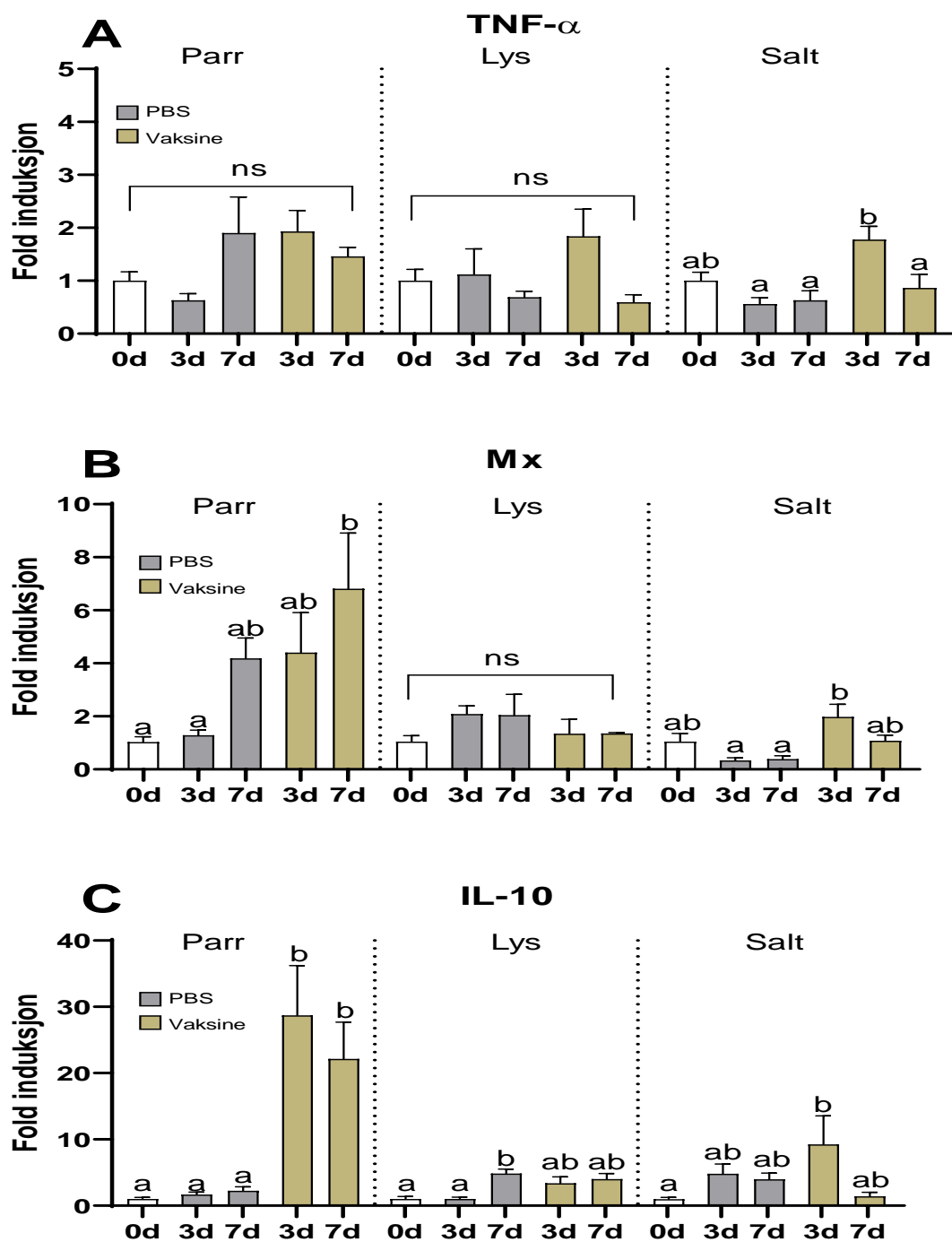
### 3.2.2 Uttrykk av immungener etter vaksinerings

Genuttrykk for utvalgte målgen ble analysert med RT-qPCR i fisk fra alle gruppene (parr, lys og salt). Fisk ble i.p-injisert med en 7-komponent vaksine som fungerte som immunstimulant. Prøver ble tatt 3 og 7 dager etter injeksjon. Fisk injisert med PBS fungerte som kontrollgruppe.

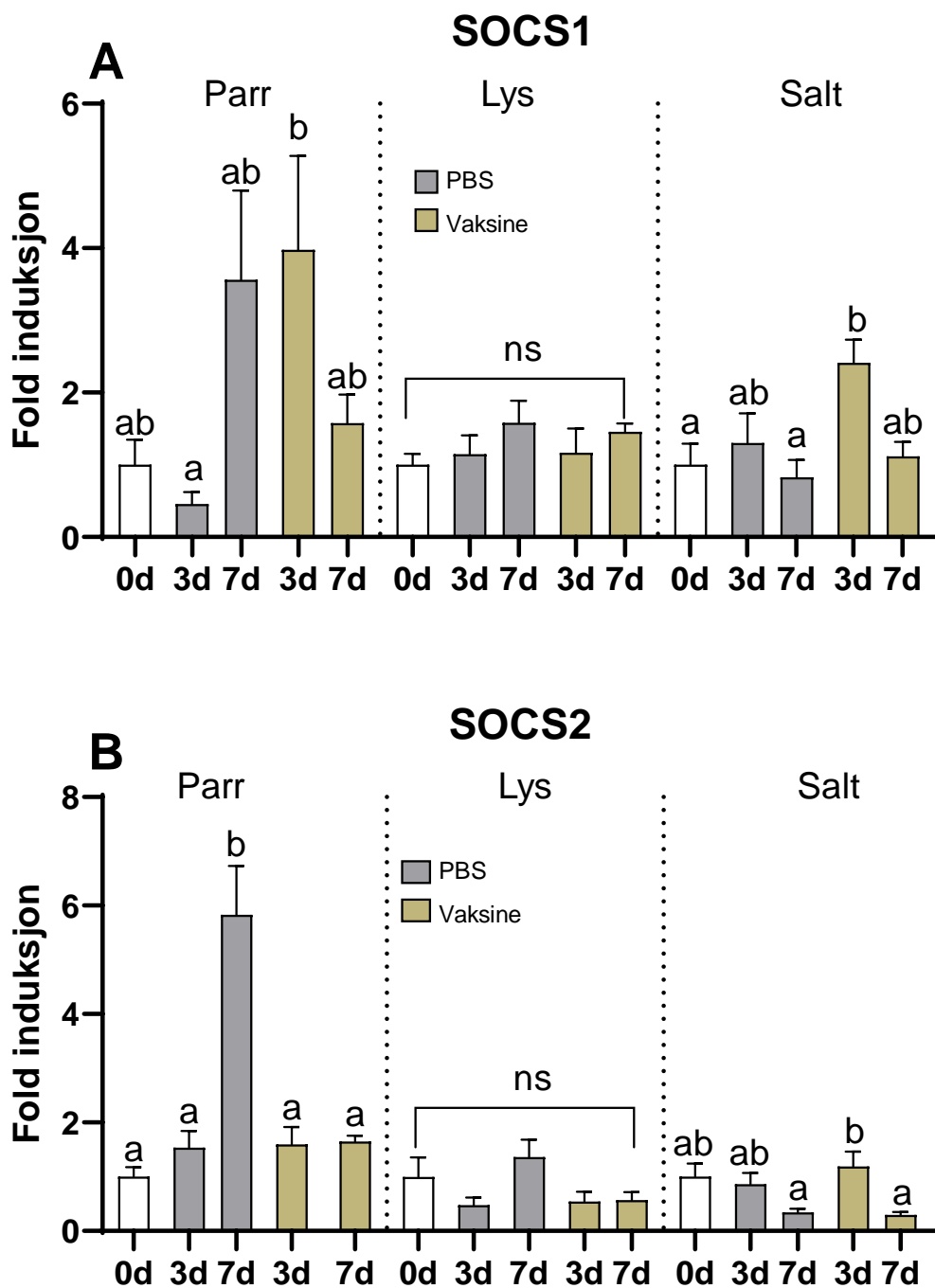
Forskjell i genuttrykk av TNF- $\alpha$  mellom PBS-gruppen og den vaksinerte gruppen var svært små for alle de tre fiskegruppene (Figur 11A). Kun i saltgruppen ble det påvist en signifikant økning i TNF- $\alpha$  uttrykk 3 dager etter vaksinerings TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ) sammenliknet med PBS-injisert fisk, men trenden var den samme i de to andre fiskegruppene. Det var også en signifikant reduksjon ( $p < 0,05$ ) i genuttrykket til vaksinert fisk 7 DPI sammenliknet med 3 DPI i saltgruppen.

I parrgruppen var det ingen signifikante forskjeller i uttrykk av Mx mellom fisk som var injisert med PBS eller vaksine ved 3 og 7 DPI (Figur 11B). Det var derimot et signifikant høyere uttrykk ( $p < 0,05$ ) i vaksinert fisk 7 DPI sammenliknet med den uninjisererte kontrollgruppen hos parr. Lysgruppen viste ingen endring i Mx-uttrykk uavhengig av vaksine/PBS og tid. Vaksinert fisk i saltgruppen hadde et signifikant høyere uttrykk av Mx 3 dager etter injeksjon sammenliknet med PBS-gruppen ved samme tidspunkt ( $p < 0,01$ ).

Vaksinert fisk i parrgruppen viste et signifikant høyere uttrykk av IL-10 sammenliknet med PBS-gruppen både 3 dager etter injeksjon ( $p < 0,05$ ) der uttrykket var 17 ganger høyere, og 7 dager etter injeksjon ( $p < 0,01$ ) der uttrykket var 9,8 ganger høyere (Figur 11C). Den kraftige økningen i uttrykket av IL-10 i vaksinert parr ble ikke observert i hverken lysgruppen eller saltgruppen. I lysgruppen var det ingen signifikante forskjeller mellom PBS-injisert og vaksinert fisk, men genuttrykket 7 DPI i PBS-gruppen var signifikant høyere ( $p < 0,05$ ) sammenliknet med PBS 3 DPI og kontrollgruppen. I saltgruppen hadde den vaksinerte fisken 3 DPI signifikant høyere ( $p < 0,05$ ) genuttrykk sammenliknet med kontrollgruppen. Genuttrykket hadde en svak, ikke-signifikant reduksjon 7 DPI sammenliknet med 3 DPI hos den vaksinerte fisken. Ingen av de andre gruppene var signifikant forskjellig fra hverandre.



**Figur 11. Relativ endring av genuttrykk av TNF- $\alpha$ , Mx og IL-10 i hodenyre hos parr og smolt smoltifisert ved endring i fotoperiode (lys) eller ved saltholdig fôr (salt). TNF- $\alpha$  (A), Mx (B) og IL-10 (C). Fisk ble injisert med PBS eller vaksine og prøvetatt ved 3 og 7 dager etter injeksjon. Forandring i genuttrykk ble målt ved RT-qPCR (SYBR® Green) og sammenliknet med ikke-injisert kontroll for hver gruppe. Verdiene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM (n=4-7). Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller innad i gruppene. ns = ikke-signifikante forskjeller.**



**Figur 12. Relativ økning av genuttrykk av SOCS1 og SOCS2 i hodenyre hos parr og smolt smoltifisert ved endring i fotoperiode (lys) eller ved saltholdig fôr (salt). SOCS1 (A) og SOCS2 (B). Fisk ble injisert med PBS eller vaksine og prøvetatt ved 3 og 7 dager etter injeksjon. Forandring i genuttrykk ble målt ved RT-qPCR (SYBR® Green) og sammenliknet med ikke-injisert kontroll for hver gruppe. Verdiene er presentert som gjennomsnitt ± SEM (n= 4-7). Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller innad i gruppene. ns = ikke-signifikante forskjeller.**

For SOCS1 ble det observert et signifikant høyere uttrykk ( $p < 0,05$ ) 3 DPI i den vaksinerte parrgruppen sammenliknet med PBS-injisert fisk ved samme tidspunkt, hvor uttrykket økte 8,7 ganger (Figur 12A). PBS-injisert fisk viste en motsatt trend sammenliknet med den vaksinerte 3 og 7 DPI. PBS-fisken viste en ikke-signifikant økning i uttrykk mellom 3 og 7 DPI, mens det i den vaksinerte fisken var en svak reduksjon 7 DPI sammenliknet med 3 DPI. I lys- og saltgruppen var uttrykket av SOCS1 i PBS-injisert og vaksinert fisk tilnærmet likt både ved 3 og 7 DPI.

Uttrykket av SOCS2 endret seg svært lite i alle tre fiskegruppene som følge av vaksinerings. Hos parr ble det for SOCS2 observert et signifikant høyere uttrykk ( $p < 0,001$ ) hos PBS-injisert fisk 7 DPI sammenliknet med de andre tidspunktene, som kan antyde en nedregulering av uttrykket SOCS2 som følge av vaksinerings. I saltgruppen var det en signifikant reduksjon ( $p < 0,05$ ) i SOCS2 for den vaksinerte fisken mellom 3 og 7 DPI.

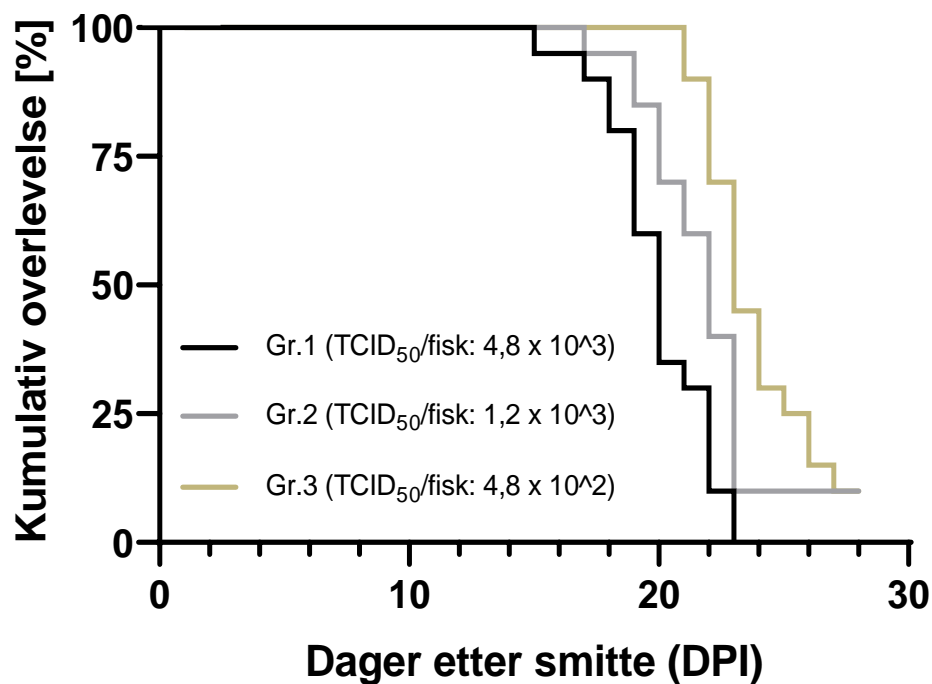
### **3.3 Mottakelighet for infeksiøs lakseanemi i lys- og saltinduserte smoltgrupper**

#### **3.3.1 Presmitteforsøket**

Presmitteforsøket ble utført for å danne erfaringsgrunnlag med virus og smittemodell, samt å teste ut ulike virusdoser før smitteforsøket. Fisken som ble brukt var en blanding av individer som enten hadde fått 6 uker med vintersignal (7L:17M) og fått kontroll- eller saltfôr eller gått på kontinuerlig lys og fått kontroll- eller saltfôr.

Dødeligheten i gruppe 1, som ble smittet med den høyeste dosen, var akutt og startet 15 dager etter smitte (Figur 13). Progresjonen i dødelighet fortsatte jevnt gjennom hele forløpet med en topp 19 og 20 DPI. Dødeligheten i gruppe 2 startet 16 DPI. Progresjonen i denne gruppen var relativt lik som for gruppe 1, med størst utgang 21 og 22 DPI. I gruppe 3, som fikk den laveste dosen, ble ikke dødelighet registrert før 20 DPI. Forløpet var litt mer ujevnt sammenliknet med de andre gruppene. 55% av gruppen døde de første tre dagene etter dødeligheten hadde begynt. Mot slutten av forsøket var det en jevn lav dødelighet i gruppe 3. Det var signifikante forskjeller mellom overlevelseskurvene ( $p < 0,01$ ) i presmitteforsøket.





**Figur 13. Kumulativ overlevelse (%) hos laks etter i.p ILAV smitte med 3 ulike doser.** Fisk tilfeldig sortert i tre grupper (n=20) ble injisert i.p med 0,1 mL ILAV (PHARMAQ ALV 321) med ulike doser. Alle gruppene ble holdt i samme kar på sjøvann, 10°C gjennom hele smitteperioden. Overlevelsen var 0% i gr. 1, 10% i gr. 2 og 10% i gr. 3 ved terminering av forsøket. For å forhindre overlapp av kurver er datasettet til gr. 2 og gr. 3 sidejustert (x=1).

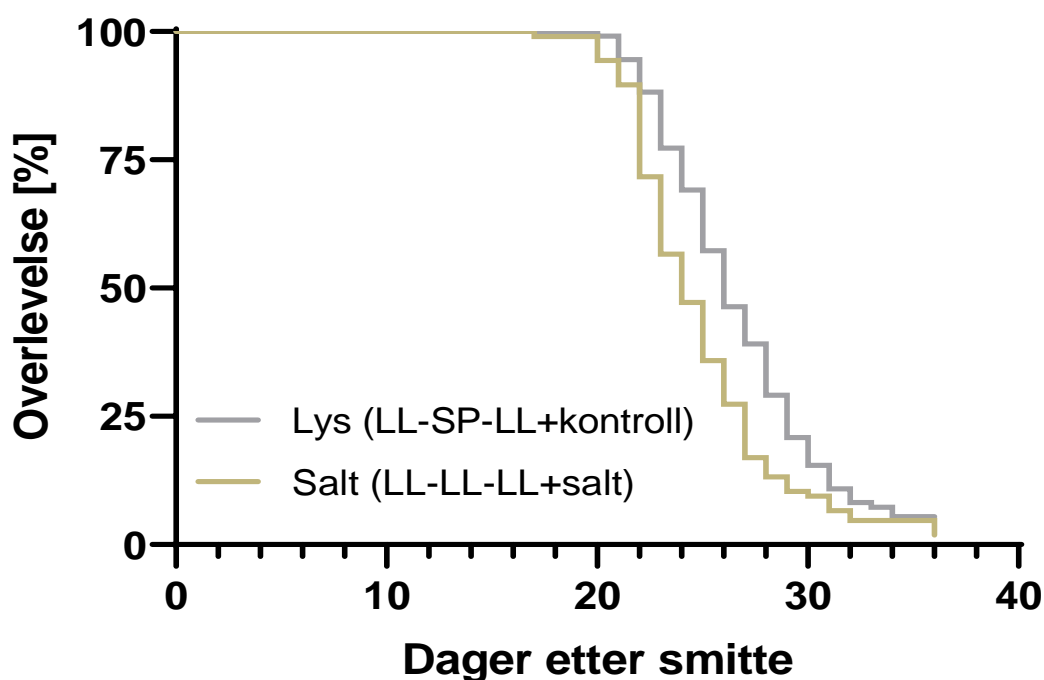
Den totale kumulative overlevelsen ved avslutningen av presmitteforsøket 27 dager etter smitte var henholdsvis 0%, 10% og 10% for gruppe 1, 2 og 3. Selv om det var overlevende fisk i både gruppe 2 og gruppe 3, var det forventet at disse også kom til å dø i løpet av få dager, så disse ble avlivet.

### 3.3.2 Smitteforsøket

Hensikten med forsøket var å se etter forskjeller i sykdomsforsvaret mot ILA etter overføring til sjø i smoltgruppene. Dosen som ble valgt i smitteforsøket ( $1,6 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/fisk) var lavere enn i presmitteforsøket. Dette siden vi ønsket en høyere overlevelse og ett mindre akutt forløp enn det som ble observert i presmitteforsøket. Dødelighet fra to kar (kar 1 og 2) ble slått sammen i presentasjon av resultater.

Dødeligheten startet 17 DPI i lysgruppen (Figur 14). Etter det ble ingen dødelighet registrert i noen av gruppene før 20 DPI, da den akutte fasen startet i begge smoltgruppene. Dødeligheten lå daglig mellom 5-20 fisk i lysgruppen frem til 28 DPI da dødeligheten avtok til 1-4 per dag frem til 32 DPI. Deretter ble det ikke registrert noen døde individer før 2 fisk døde 36 DPI. Saltgruppen fulgte en lik trend som lysgruppen, men dødeligheten var 2-3 dager forsinket

sammenliknet med lysgruppen. Det ble registrert dødelighet i saltgruppen fra 20 DPI til og med 34 DPI.



**Figur 14. Kumulativ overlevelse (%) hos laks smoltifisert ved endring i fotoperiode (lys) eller saltholdig fôr (salt) etter i.p injeksjon med ILAV.** Kumulativ overlevelse i lysgruppen (n=106) og saltgruppen (n=110) etter i.p injeksjon med 0,1 mL ILAV (PHARMAQ ALV 321). Begge gruppene ble injisert med en dose på  $1,6 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/fisk. Fisken ble holdt på sjøvann, 10°C gjennom hele smitteperioden. Data fra kar 1 og 2 er slått sammen. Overlevelsen i lysgruppen var 1,9% mens overlevelsen var 5,6% saltgruppen ved terminering av forsøket. For å forhindre overlapp av kurver er datasettet til saltgruppen sidejustert (x=1).

Forsøket ble avsluttet 36 DPI for å sikre prøvemateriale fra døende fisk. Disse prøvene ble likevel ikke benyttet til videre analyser da fisken var i svært dårlig forfatning, noe som kunne påvirke resultatene. Det ble i tillegg bestemt at formålet med forsøket var oppnådd og at forsøket kunne avsluttes med tanke på de gjenlevende individers velferd. Det var signifikante forskjeller mellom gruppene i overlevelseskurven ( $p < 0,01$ ) i hovedforsøket, noe som betyr at dødeligheten mellom gruppene var forskjellig.

**Tabell 7. Statistisk oversikt for grupper og dødelighet for laks smoltifisert ved endring i fotoperiode (lys) eller saltholdig fôr (salt) etter i.p injeksjon med ILAV.** Dødelighetstall fra kar 1 og 2 er slått sammen. RPS<sub>50</sub> = relative percent survival 50. *p*-verdi indikerer forskjell mellom dødelighetskurvene i smitteforsøket.

Gruppe	Behandling	Antall (n)	Akkumulert dødelighet (%)	RPS50	<i>p</i> -verdi
Lys	LL-SP-LL + kontroll	106	98,1	-	-
Salt	LL-LL-LL + salt	110	94,6	38,2%*	<0,01

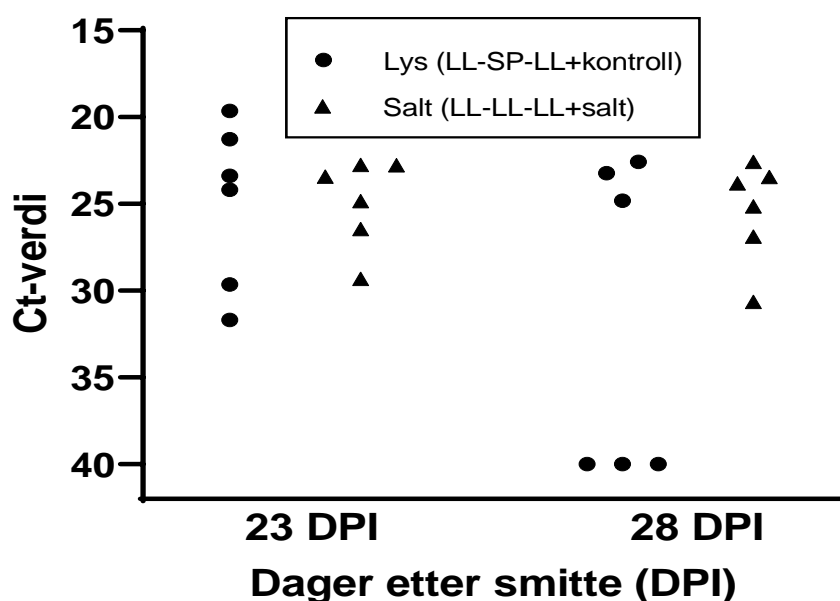
\* RPS<sub>50</sub> kalkulert ved formelen  $RPS = (1 - (\text{dødelighet i saltgruppen ved 50\% dødelighet i lysgruppen} / 50\% \text{ dødelighet i lysgruppen}) * 100)$ .

**Tabell 8. Påvisning av ILAV fra hodenyre med RT qPCR i laks smoltifisert ved endring i fotoperiode (lys) eller saltholdig fôr (salt) etter i.p injeksjon med ILAV.** Tabellen viser prevalens av ILAV for smitteforsøket ved 23 og 28 dager etter injeksjon (n=6). Verdiene representerer antall positive prøver/antall analyserte prøver. Prosentvis andel positive prøver i parentes. Prøver hvor ILAV ikke ble påvist med RT-qPCR ble regnet som negativ.

	23 DPI	28 DPI
Lys (LL-SP-LL + kontroll)	6/6 (100%)	3/6 (50%)
Salt (LL-LL-LL +salt)	6/6 (100%)	6/6 (100%)

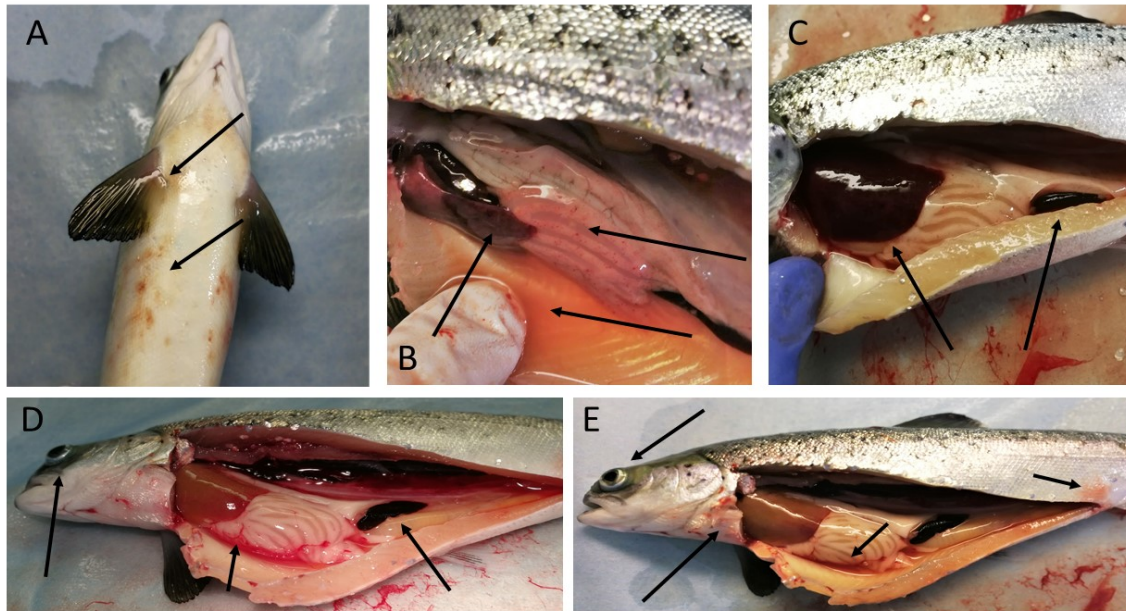
For å påvise at virusinfeksjonen var årsaken til dødeligheten i smitteforsøket ble ILAV RNA (segment 8) detektert i fisk fra prøvetakningskaret ved 23 og 28 DPI etter smitte (

Tabell 8). Ved 23 DPI ble det detektert virus i alle fiskene som ble prøvetatt. Ct-verdiene for de positive prøvene varierte mellom 19,64 – 31,68 (Figur 15). 28 DPI ble det detektert ILAV RNA i halvparten av fiskene i lysgruppen mens alle fiskene i saltgruppen var positive. Prøvene der ILAV ikke ble påvist ved RT-qPCR ble regnet som negativ.



**Figur 15. Individuelle Ct-verdier fra påvisning av ILAV fra hodenyre (segment 8) med RT qPCR i laks smoltifisert ved endring i fotoperiode (lys) eller saltholdig fôr (salt).** Ved 23 DPI ble det påvist ILAV i samtlige fisk i begge gruppene (n=6). 28 DPI ble det påvist ILAV i all fisk i saltgruppen og i halvparten av fisken i lysgruppen. Prøver som ikke ble påvist ved RT-qPCR er satt til Ct = 40.

Fisk fra både lys- og saltgruppen ble obdusert underveis i forsøket. Patologiske endringer forenelig med ILA ble observert (Figur 16).



**Figur 16. Generelle patologiske funn i fisk underveis i smitteforløpet.** Punktblødninger på buk og ved finnebaser (A). Noen av fiskene hadde en mørk lever, punktblødninger på blindsekker og fettvev, samt en blodig ascites i bukhulen (B). Mørk lever og svullen milt (C) og (D). Exoftalmi, blodig ascites, svullen milt, misfarget lever og blødning rundt gatt (E).

## 4. Diskusjon

I norsk oppdrettsnæring blir det stadig vanligere å forberede fisken på overføring til sjø ved å gi den et fôr tilsatt salt og aminosyrer, uten at den utsettes for lysbehandlingen som tidligere har vært vanlig i smoltproduksjon. Dette gir en fisk med god sjøvannstoleranse, men det antas at den ikke gjennomgår alle tilpasninger til et liv i sjøen som følger en ekte smoltifisering. På bakgrunn av dette er det viktig å gjennomføre uavhengige studier basert på responsen av saltstimulering og fiskens evne til å overleve, vokse og trives etter overføring til sjø. I denne oppgaven ble lakseunger fulgt gjennom to ulike behandlingsregimer samtidig som immunforsvaret deres ble testet. Det ble gjort ved at lakseunger enten ble utsatt for en tradisjonell smoltifisering med justering av fotoperiode eller saltbehandling. Immunforsvaret ble utfordret ved å vaksinere fisk gjennom smoltifiseringsforløpet og ved ILA-smitte etter sjøvannsutsett. Resultatene kan bidra til å gi aktører i oppdrettsnæringen et bedre grunnlag for å bestemme produksjonsstrategi som bør velges og om det er forsvarlig å fortsette produksjonen av saltstimulert smoltifisering av fisk uten bruk lysstyring.

### 4.1 Smoltstatus

#### 4.1.1 Vekst

Tilveksten gjennom ferskvannsperioden var størst i saltgruppen (Figur 3). Da lysgruppen ble utsatt for et kunstig vintersignal (kort dag; feb-mars) avtok vekstraten sammenliknet med fisken i saltgruppen som ble holdt på kontinuerlig lys. Dette stemmer overens med tidligere forsøk som har vist at tilvekst hos laks er positivt relatert til daglengden (Berrill et al., 2003; Strand et al., 2018). Saltgruppen hadde en større vektøkning enn lysgruppen også i perioden hvor begge gruppene ble holdt på kontinuerlig lys (mars-mai) og gitt ulikt fôr. Diettene inneholdt like mengder av marine proteiner og fett, men kontrollfôret hadde et høyere innhold av plantebaserte bestanddeler (Tabell 1). Flere studier viser at høyere innhold av plantebaserte ingredienser kan gi dårligere vekst og lavere proteinutnyttelse (Brinker & Reiter, 2011; Espe et al., 2006; Torstensen et al., 2008). Andre studier viser at bruk av lave nivåer med saltsupplementer i fôret ikke har noen effekt på appetitt og fôropptak i regnbueørret (MacLeod, 1978; Salman & Eddy, 1988). Siden gruppene ble fôret med like mengder med fôr og over et like langt tidsspenn hver dag, tyder det på at fisken i saltgruppen enten har spist mer eller har hatt en bedre fôrutnyttelse i denne perioden sammenliknet med lysgruppen. Selv om fisk viser en lavere spesifikk tilvekst med økende vekt (Jobling, 1983), er det lite trolig at dette er tilfellet i dette studiet da

størrelsesforskjellen er relativt liten mellom gruppene gjennom ferskvannsperioden. Det kan også spekuleres i om fisken i saltgruppen har en større mengde vann i kroppen i forhold til lysgruppen. I ferskvann er fisken fortsatt nødt til å kvitte seg med vann, men med et høyere inntak av saltholdig diett, kan det tenkes at salter (dermed også vann) blir tatt opp eller diffunderes inn i kroppen. Dette gir et høyere innhold av vann i kroppen som kan bidra til en høyere kroppsvekt. For å bekrefte eller avkrefte dette burde det vært inkludert en kontrollgruppe som gikk på kontinuerlig lys med kontroldiett som kunne vært sammenliknet opp mot behandlingsgruppene i dette forsøket.

Forskjellen i vektøkning mellom behandlingsgruppene kan også skyldes at lysgruppen hadde en prioritert lengdevekst etter kordagsperioden, som klart kommer frem av en redusert K-faktor fra mars til mai i lysgruppen, noe som ikke skjer i saltgruppen (Figur 4). Reduksjon i K-faktor i lysgruppen samsvarer med det som er funnet i mange tidligere studier og skyldes at økningen i daglengde stimulerer til økt lengdevekst i forhold til vektøkning, samt mobilisering av kroppsfett for å drive energikrevende prosesser i smoltutviklingen (Björnsson et al., 2000; McCormick & Saunders, 1987). Redusert kondisjonsfaktor er etablert som et smoltkriterie for lysindusert smoltifisering ved at fisken viser en avtakende kondisjonsfaktor med økt sjøvannstoleranse (Noble et al., 2018; Strand et al., 2007). Det er antatt at reduksjonen i kondisjonsfaktor i lysgruppen etter overføring fra kort til lang dag skyldes en økning i produksjonen av veksthormon. I Atlantisk laks virker det som at fotoperiode er den viktigste eksterne faktoren i reguleringen av økt produksjon av veksthormon (McCormick, 2013). Derfor vil fisken i saltgruppen trolig ikke oppleve den samme produksjonen av veksthormon under smoltifiseringen som lysgruppen, ei heller oppleve reduksjonen i kondisjonsfaktor.

De fire første ukene etter overføring til sjøvann vokste gruppene jevnt. Fôrinntaket i lysgruppen var noe lavere i denne perioden sammenliknet med saltgruppen. Dette kan ha en sammenheng med at fôrinntaket ble beregnet per fisk og at fisken i saltgruppen var større enn den i lysgruppen og at den dermed hadde et naturlig høyere næringsbehov og fôrinntak. I perioden 4-8 uker etter overføring til sjøvann, hadde fisken i lysgruppen en signifikant høyere daglig tilvekst enn fisken i saltgruppen (Figur 3) på tross av at fisken i saltgruppen har et høyere fôrinntak i denne perioden (Figur 6). Vektøkning i forhold til fôrinntak viser at fisken i lysgruppen omdanner en større del av fôret til egenvekt enn det fisken i saltgruppen gjør, noe som fører til en bedre fôrutnyttelse og en bedre vekst per gram inntatt fôr (Figur 6). Årsaken til at fisken i lysgruppen har en bedre spesifikk tilvekst enn fisken i saltgruppen mellom 4 og 8 uker i sjø kan skyldes at fisken i lysgruppen ikke var optimalt adaptert til sjøvann ved overføringstidspunktet (se

nedenfor), men utviklet en bedre sjøvannstoleranse i løpet av den første måneden i sjø. Usher og kollegaer (1991) argumenterer for at smoltifisering er en sesongbasert prosess og at ikke alle individene i en populasjon innehar den samme fysiologiske tilstanden på det samme tidspunktet. Andre publikasjoner foreslår at nedsatt appetitt og vekst etter overføring til sjøvann skyldes at osmoregulering krever en høy metabolsk aktivitet, og at energi som vanligvis ville blitt brukt til vekst heller blir brukt til å vedlikeholde ionebalansen i fisken (Clarke et al., 1981; Shaw et al., 1975). Økt energiforbruk i forbindelse med osmoregulering, samt stress, er vist å nedregulere appetitt og vekst og er sannsynligvis årsaken til at fiskene i begge grupper vokser dårligere rett etter utsett sammenliknet med 4-8 uker ut i sjøoppholdet. Dette samsvarer med tidligere studier gjort på laksesmolt (Jørgensen & Jobling, 1994; Usher et al., 1991). I siste del av sjøvannsperioden øker kondisjonsfaktoren noe i begge gruppene. Det henger sammen med at den relative vektøkningen er større enn lengdeveksten på dette tidspunktet sammenliknet med siste perioden på ferskvann og den første tiden i sjøvann.

### 4.1.2 Glykogenkonsentrasjon i lever

Glukose spiller en nøkkelrolle som energikilde i de fleste pattedyr. Glukose har også en viktig rolle i fisk, både i den generelle metabolismen og som energikilde i forbindelse med eksempelvis stresshåndtering (Wu et al., 2015). Ved høye nivåer av glukose i blodet kan noe av overskuddet bli lagret som glykogen via glykoneogenesen. Her vil glykogenet virke som et energilager som raskt kan omdannes til energi i form av glukose under sultperioder og stress. Disse prosessene styres hovedsakelig av ernæringsmessige eller hormonelle faktorer (Enes et al., 2008). Smoltifiseringen medfører endringer i karbohydrat- og lipidmetabolismen (McCormick & Saunders, 1987). Woo og kollegaer (1978) og Hemre med kollegaer (2002) observerte en reduksjon i kroppsfett og leverglykogen i løpet av smoltifisering av coho- og kongelaks (*Oncorhynchus tshawytscha* W.) og dermed en nedsatt energistatus i den siste delen av ferskvannsfasen. Dette sammenfaller med funn i mitt forsøk, som viste at fisken i lysgruppen hadde et signifikant lavere leverglykogen i mai sammenliknet med fisken i starten av forsøket.. Denne reduksjonen skyldes aktiviteten til glykogen fosforylase (enzym som bryter ned glykogen) i lever, gradvis øker under smoltifiseringen mens aktiviteten til glykogen syntetase (enzym som syntetiserer glykogen) avtar (Sheridan et al., 1985). Oppregulering av metabolsk rate og reduserte lipid- og glykogennivåer blir ansett for å være en av årsakene til en redusert kondisjonsfaktor og en redusert energistatus hos smolt en hos parr (McCormick & Saunders, 1987). Mitt forsøk viste at fisken i saltgruppen hadde høyere K-faktor sammenliknet med

lysgruppen etter endt smoltifisering, men likevel et redusert glykogennivå i lever. Dette tyder på at saltfôret igangsetter energikrevende prosesser (blant annet utvikling av sjøvannstoleranse, se nedenfor), som i seg selv fører til redusert glykogenkonsentrasjon i lever. Uansett tyder disse resultatene på at både salt- og lysstimulert fisk gjennomgår en reduksjon i energistatus i løpet av behandlingen.

### 4.1.3 Osmolalitet og klorid i plasma etter SVT

Ved oppstart av forsøket (feb.) var plasmaklorid konsentrasjonen 157 mM og osmolaliteten 384 mOsm etter SVT (Figur 8). Rapporterte normalverdier av kloridkonsentrasjoner og osmolalitet i plasma for laksefisk i sjø er henholdsvis 135-160 mM og 325-345 mOsm (Arnesen et al., 1998; Handeland et al., 1998; Handeland et al., 2000; Noble et al., 2018). Kloridverdiene lå i øvre sjikt av forventede verdier hos smolt mens osmolaliteten var som forventet hos parr. Fisken hadde dermed ikke utviklet et optimalt apparat for å kvitte seg med overflødige ioner i sjøvann på dette tidspunktet. Likevel var verdiene noe lavere enn forventet og ingen dødelighet ble observert under SVT. Dette antyder at fisken hadde en relativt god hypoosmoregulatorisk kapasitet ved oppstart av forsøket.

Etter seks uker på kort dag (mars) var plasmaklorid og -osmolalitet etter 24-timers SVT så å si uendret i lysgruppen sammenliknet med testene som ble utført i starten av forsøket. Dette var som forventet da utvikling av sjøvannstoleranse ikke initieres før daglengden øker til minst 16 timer etter at fisken har vært utsatt for en vinterperiode i lysgruppen (Duston & Saunders, 1990; Strand et al., 2018). Derfor var det overraskende å registrere at saltgruppen som ble holdt på kontinuerlig lys i denne perioden, uten å få salt i fôret, hadde en signifikant lavere kloridkonsentrasjon og osmolalitet i mars sammenliknet med oppstart av forsøket i februar. Verdiene lå i området rundt det som er normalt for laks i sjøvann (henholdsvis 135 mM og 350 mOsm for klorid og osmolalitet). Det tyder på at fisken utviklet god sjøvannstoleranse uten å ha blitt utsatt for endring i fotoperiode eller andre smoltifiseringssignaler. Eriksson og Lundqvist (1982) viste at laks spontant utvikler lavere kondisjonsfaktor og sølvfarging i huden etter 10 måneder under konstante miljøbetingelser (12L:12M, 11°C). Fra dette studiet blir det foreslått at fotoperiode eller andre miljøfaktorer fungerer som en synkroniserende faktor («zeitgeber») for endogene prosesser i fisken. De endogene rytmene, som blant annet styrer smoltifisering, vil være frittstående så lenge et ytre signal ikke synkroniserer dem. Ut fra dette kan det antas at de lave osmolalitäts- og kloridnivåene i dette forsøket reflekterer at fisken som gikk på kontinuerlig lys (saltgruppen) i dette forsøket var i en fase av spontan utvikling av



sjøvannstoleranse. Det kan heller ikke utelukkes at fisken i saltgruppen hadde bedre hypo-osmoregulatorisk kapasitet enn lysgruppen på grunn av størrelsesforskjellen ved dette tidspunktet (Figur 2). Tidligere studier på arktisk røye (*Salvelinus alpinus* L.) (Arnesen et al., 2011) og bekkerøye (*Salvelinus fontinalis* M.) (McCormick & Naiman, 1984) viser at størrelse korrelerer negativ med osmolalitet og saltinnhold i blodet etter sjøvannseksponering på grunn av endret forhold mellom fiskens overflate og volum. Liknende funn er også blitt gjort på presmolt av Atlantisk laks, regnbueørret og brunørret (*Salmo trutta* L.) (Parry, 1958).

Kloridnivået i plasma etter SVT økte i begge gruppene i perioden med ulikt fôr (mars – mai). I mai var fortsatt kloridverdiene i saltgruppen innenfor det som regnes for normalt i en smolt, mens kloridnivåene i lysgruppen var høyere enn normalverdiene. Osmolaliteten viste en motsatt trend ved at den sank i begge gruppene i samme periode. Her var også nivåene i saltgruppen innenfor det som forventes hos en smolt mens lysgruppen hadde forhøyede verdier. I denne perioden gikk begge gruppene på kontinuerlig lys og ble fôret ulike dietter. Ved at lysgruppen ble overført fra en kortdagsperiode (simulert vinter) til lang dag (>16 timer lys) var det forventet at fisken i lysgruppen skulle oppnå full sjøvannstoleranse i løpet av 350 - 370 døgnggrader med kontinuerlig lys som vist tidligere (Handeland et al., 2004; Strand et al., 2018), noe den hadde gjort i dette forsøket. Handeland og kollegaer (2004) viste at aktiviteten til NKA i gjellene (mål på smoltstatus) begynte å avta ca. 600 døgnggrader etter overføring til kontinuerlig lys, noe som i vårt forsøk ble oppnådd en uke etter prøvene ble tatt. Derfor er det lite trolig at fisken hadde påbegynt desmoltifisering ved dette tidspunktet. Saltgruppen hadde klorid- og osmolalitetsnivåer som er ansett som normal for sjøvannstilpasset laks (Noble et al., 2018) og resultatene i dette forsøket støtter tidligere studier som har vist at salttilsetning i fôret stimulerer sjøvannstoleranse hos både Atlantisk laks (Basulto, 1976), bekkerøye (Pellertier & Besner, 1992) og regnbueørret (Perry et al., 2006; Salman & Eddy, 1987).

En årsak til at kloridverdiene var høyere i mai enn i mars for begge gruppene kan skyldes stress i forbindelse med utsortering av fisk til SVT. Fisken som ble valgt ut til SVT ble holdt sammen med fisk som var floymerket og med fisken som var merket med *alkaline blue* og som skulle til smitteforsøket. For å være sikre på at bare umerket fisk ble benyttet i sjøvannstesten, ble fisk håvet opp fra karet før de ble sjekket etter merke. Ved funn av merke ble fisken satt tilbake i karet mens umerket fisk ble overført til 100 liters transportkar for overføring til kar med sjøvann. Denne prosessen var mye mer tidkrevende enn forventet da det var en større andel med merket fisk enn umerket. Etter mye håving økte aktivitetsnivået i karene, trolig på grunn av stress. Dette underbygges ved at 46% av fisken fra lysgruppen døde i løpet av SVT (24 timer).

Ingen dødelighet hadde vært observert under de foregående SVT. I tillegg viste gjenværende fisk (spesielt i lysgruppen) i ferskvannskarene en tydelig unnvikelsesadferd i dagene etter håvingen. Flere studier har konkludert med at stress har en innvirkning på ionekonsentrasjonen i blodet og at endringer i disse er en del av sekundære stressresponser hos fisk (Barton & Iwama, 1991; Barton, 2002; Iversen et al., 1998; Veiseth et al., 2006), noe som kan være delaktig til de overraskende høye kloridnivåene i begge gruppene ved dette tidspunktet. Anadrom laksefisk er tilsynelatende spesielt utsatt for stress under smoltifiseringen, og det er rapportert om en økning i stressrespons i løpet av smoltifiseringen (Barton et al., 1985; Barton, 2002). Iversen og kollegaer (1998) viste at plasmaverdier av natrium og klorid i smolt økte signifikant 24 timer etter transport av smolt. Det faktum at både klord- og osmolalitetsverdiene var godt innenfor det som er normalt hos sjøvannsadaptert laks etter 7-dagers SVT (Figur 8), støtter antagelsen om at disse var påvirket av stress ved 24-timers SVT en uke tidligere. Det bør gjøres et poeng av at fisken i saltgruppen opplevde den samme håndteringen og stresset som lysgruppen uten at det førte til dødelighet i saltgruppen etter 24 timer. En antakelse som kan gjøres på bakgrunn av dette er at fisken i saltgruppen muligens var mer hypo-osmoregulatorisk robust enn lysgruppen. Høye stressnivå underbygges også av at 2/10 fisk døde i lysgruppen etter 7 dager på sjøvann mot 1/10 fisk i saltgruppen noe som ikke var forventet. Trolig var håndtering i forbindelse med overføring til sjøvann en stor bidragsyter til denne dødeligheten.

#### **4.1.4 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP -ase aktivitet i gjeller under smoltifiseringen**

Endringer i NKA-aktivitet i gjellene brukes regelmessig som en indikator på smoltstatus og velferd etter overføring til sjø (Kolarevic et al., 2017; McCormick, 2013; Noble et al., 2018) og flere bedrifter tilbyr analyser som kommersiell standard (eks PHARMAQ analytiq og Eurofins). Flere studier viser en økning i NKA-aktivitet på 2-10 ganger fra de basale enzymaktivitetene i parr til aktiviteten av enzymet er på sitt høyeste etter fullført smoltifisering (Bisbal & Specker, 1991; Bradley et al., 1989; Folmar & Dickhoff, 1980; McCormick et al., 1989). I følge en nylig utgitt rapport på velferdsindikatorer for oppdrettslaks, bør NKA-aktiviteten være opp mot 10  $\mu\text{mol ADP mg protein}^{-1} \text{ t}^{-1}$  før fisken kan regnes som fullstendig smoltifisert (Noble et al., 2018). Gjennomsnittlig NKA-aktivitet ved start av dette forsøket var 3  $\mu\text{mol ADP mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Figur 9) og samsvarer med hva som forventes hos ferskvannsadaptert laksefisk (Madsen & Naamansen, 1989; McCormick et al., 1989; Salman & Eddy, 1987). Økt NKA-aktivitet i saltgruppen før den ble gitt saltfôr støtter konklusjonen ovenfor om at denne gruppen gjennomgikk en spontan utvikling av sjøvannstoleranse og

samsvarer med reduserte plasmanivåer av klorid og osmolalitet mellom februar og mars i denne gruppen (Figur 8). Etter seks uker på ulik fotoperiode var det signifikante forskjeller mellom gruppene da NKA-aktiviteten økte i saltgruppen og sank i lysgruppen, noe som antyder at den spontane utviklingen av salinitetstoleranse i gruppa som gikk på kontinuerlig lys ble avbrutt av overføringen til kort dag. Før utsett i sjøvann hadde enzymaktiviteten økt signifikant i lysgruppen, noe som var forventet ved eksponering til lang dag (McCormick, 2013; Strand et al., 2018) mens det ble observert en svak, ikke-signifikant økning i saltgruppen. I mai var verdiene i salt- og lysgruppen henholdsvis 6,1 og 5,3  $\mu\text{mol ADP mg protein}^{-1} \text{ t}^{-1}$ , som er lavere enn hva som er forventet hos fisk som er ferdig smoltifisert (Noble et al., 2018). Saltgruppen hadde en betraktelig høyere variasjon innad i gruppen sammenliknet med lysgruppen før overføring til sjøvann i mai (Figur 9). Årsaken til disse store individuelle forskjellene kan skyldes individuelle forskjeller i appetitt og fôrintak. Dette vil medføre en forskjell mellom individene i stimuleringen av  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive reseptorer i tarmen. Det antatt at endringer i ionekonsentrasjon i blodet fører til en global stimulering av  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive reseptorer slik at hypofysen og andre endokrine vev vil kunne oppfatte og igangsette integrerte signaler via nervøs og endokrin kommunikasjon for å motvirke osmotiske endringer fra miljøet (Loretz, 2008). For lite fôr (og derved salt og aminosyrer) vil derfor ikke føre til en økt NKA-aktivitet i gjellene. I lysgruppen var det mindre individuell variasjon i NKA-aktivitet noe som sannsynligvis reflekterer det faktum at alle individene i gruppen utsettes for den samme fotoperioden og at fisken i denne gruppen ikke er avhengig av faktorer som appetitt for å smoltifisere.

Resultatene åpner for spørsmål vedrørende rollen til NKA og påliteligheten til aktiviteten av enzymet som mål på hypo-osmoregulatorisk kapasitet. Tidligere studier viser at høye nivåer i NKA-aktivitet ikke nødvendigvis er koplet til god hypo-osmoregulatorisk kapasitet i både laks og regnbueørret (Madsen & Naamansen, 1989; Solbakken et al., 1994) og at enzymet videre blir aktivert/indusert ved utsettelse for sjøvann (Madsen & Naamansen, 1989). På denne måten kan enzymet vise seg å være viktigere etter en tid i sjøen, som i dette forsøket da fisken i begge behandlingsgruppene hadde utviklet en tilsynelatende full sjøvannstoleranse etter 7 dager i sjøvann (Figur 8). I tillegg er det viktig å understreke at NKA i gjeller kun er et enzym i en stor portefølje av transportproteiner i kloridcella i flere ulike organ som må gjennomgå endringer i respons til endringer i eksterne osmotiske forhold (Zydlewski & Zydlewski, 2012). Dermed er det paradoksalt at NKA-aktiviteten blir brukt av flere kommersielle aktører som det eneste målet på smoltkvalitet selv om enzymaktiviteten ikke nødvendigvis er koplet til god hypo-

osmoregulatorisk kapasitet. Trolig er dette en av årsakene til at det relativt store tapet av laks i norsk oppdrettsnæring etter utsett i sjø (Bleie & Skrudland, 2014).

#### **4.2 Uttrykk av immungener i parr og i lys- og saltindusert smolt**

Flere studier antyder at fisk som har gjennomgått smoltifisering ved hjelp av endring i fotoperiode har en nedsatt immunologisk status under smoltifiseringen og ved overføring til sjøvann (Jarungriapisit et al., 2016; Jensen et al., 2019; Johansen et al., 2016b). Endringen i immunstatus er antatt å være assosiert med energikrevende prosesser i forbindelse med forøkt endokrin, metabolsk og utviklingsmessige prosesser under smoltifiseringen (Jarungriapisit et al., 2016; Johansen et al., 2009; Johansen et al., 2016b). Med tanke på viktigheten av osmoregulering og andre sjøvannsadaptive forberedelser fisken gjennomgår før vandringen til sjø, er det blitt framstilt hypoteser om at slike endringer fremmer fiskens evne til å kjempe om ressurser i havet, noe som går utover motstandsdyktigheten overfor patogener (Johansen et al., 2016b).

##### **4.2.1 Smoltifiseringens påvirkning på immunstatus**

For å undersøke eventuelle forskjeller i det medfødte immunforsvaret til parr og lys- og saltindusert smolt ble basalnivå for utvalgte gener undersøkt ved RT-qPCR; TNF- $\alpha$ , Mx, IL-10, SOCS1 og SOCS2. Disse genene representerer ulike funksjoner som er viktige deler av det medfødte immunforsvaret. TNF- $\alpha$  er et pro-inflammatorisk signalmolekyl, IL-10 er et anti-inflammatorisk signalmolekyl (Zou & Secombes, 2016), Mx er et antiviralt protein som indueres av type 1 IFN-systemet (Robertsen, 2006; Workenhe et al., 2010), SOCS1 er viktig i den negative reguleringen av signalmolekyler i immunforsvaret (Yoshimura et al., 2007), mens SOCS2 regulerer blant annet vekstfaktorer og uttrykket av andre SOCS-proteiner (Croker et al., 2008). Det er ikke rapporterte arbeid på saltindusert smoltifisering og dens påvirkning på immunsystemet før overføring til sjøvann.

Uttrykket av TNF- $\alpha$  i hodenyre var signifikant høyere i lysgruppen enn i parrgruppen (Figur 10A). Også saltgruppen viste en tendens til et høyere uttrykk sammenliknet med parrgruppen. Ingerselv og kollegaer (2006a) så at villaks som gikk gjennom en naturlig fotoperiode viste en svak oppregulering av TNF- $\alpha$  ved endt smoltifisering i mai sammenliknet med 4 uker tidligere. Dette er i samsvar med resultatene i Figur 10A.

Et tidligere studie har vist at Mx og type-1 IFN (som induserer Mx) oppreguleres i forbindelse med smoltifisering og direkte etter overføring til sjø (Das et al., 2007). Julin og kollegaer (2015) fant små forskjeller i det basale genuttrykket av Mx mellom uinfisert parr og smolt. Et annet studie viser få endringer i det basale genuttrykket av antivirale gener i hodenyre mellom parr og smolt i en «microarray»-analyse (Johansen et al., 2016a). Våre resultater viser at saltgruppen hadde et høyere genuttrykk av Mx (Figur 10B) enn lys- og parrgruppen. Årsaken til dette kan være at lysstyrt smoltifisering nedregulerer det antivirale forsvaret i laks slik at uttrykket av Mx ble lavere i lysgruppen enn i saltgruppen i mai (Eggset et al., 1999; Ingerslev et al., 2006a; Jarungsriapisit et al., 2016; Pontigo et al., 2016).

Selv om salt- og lysgruppen hadde henholdsvis 6,1 og 5,5 ganger høyere uttrykk av IL-10 enn parrgruppen, var ikke forskjellene signifikant på grunn av store individuelle forskjeller. IL-10 er et antiinflammatorisk cytokin som demper immunresponser og betennelsesreaksjoner under en infeksjon. Det er vist at IL-10 demper uttrykket av blant annet TNF- $\alpha$  *in vitro* (Grayfer et al., 2011; Oswald et al., 1992). IL-10 har også en påvirkning på det adaptive immunforsvaret ved at det fremmer B-celle proliferering og IgM antistoff sekresjon etter en endoparasittinfeksjon i karpe (Piazzon et al., 2015). Selv om genuttrykket av IL-10 kun viste en svak økning mellom parrgruppen og smoltgruppene, kan det tenkes at en oppregulering av basalnivåene av IL-10 vil kunne forberede fisken til et høyere smittepress ved vandringsen til sjø. IL-10 vil kunne øke antistoffsekresjon fra B-celler, noe som gjør at fisken vil kunne oppdage en eventuell infeksjon raskere og dermed kunne igangsette immunreaksjoner til denne. I tillegg vil høyere nivåer av IL-10 kunne forhindre overstimulering av betennelsesreaksjoner ved infeksjoner ved og etter utsett.

Det relative genuttrykket for SOCS1 var likt for alle gruppene (Figur 10D). SOCS-proteinene har et bredt spekter av funksjoner og deltar blant annet i reguleringen av førstelinjeforsvaret mot virusinfeksjoner (Yoshimura et al., 2007). Siden SOCS1 er tilknyttet antivirale immunresponser er et basalt nivå av SOCS1 i hodenyre å forvente. Dette stemmer overens med en tidligere studie som viser at SOCS1 (og SOCS2) er jevnt uttrykt i immunologiske organer hos frisk, uvaksinert laks som er sjøvannstilpasset (Skjesol et al., 2014). Dermed er det rimelig å anta at SOCS-proteinene har viktige funksjoner i immunologiske organ hos laks både i ferskvanns- og sjøvannsfasen.

SOCS2 blir i hovedsak tilknyttet reguleringen av veksthormon (GH) og reguleringen av andre SOCS-proteiner i pattedyr (Crocker et al., 2008). Mus som har fått slått ut SOCS2-genet oppnår en enorm vekst og utviser en redusert neural utvikling på grunn av forstyrrelser i veksthormonsignaleren (Metcalf et al., 2000). SOCS2 aktiverer også veksthormonreseptorer som vil fremme produksjonen av SOCS2 og på denne måten skape en negativ «feedback-loop» (Rico-Bautista et al., 2007). Selv om SOCS2-proteiner ikke er fullstendig studert i fisk, virker det som de også spiller en nøkkelrolle i reguleringen av veksthormon også i fisk. Blant annet er det vist at veksthormonbehandling av leverceller i karpe kunne indusere uttrykk av SOCS2 (Jiang et al., 2016). I tillegg er det vist en sammenheng mellom stresseffekter på vekst og nedregulering av medfødte immunresponser med oppreguleringen av genuttrykk av SOCS i fisk (Philip & Vijayan, 2015). Veksthormonnivåene til naturlig lysstyrt smolt vil fluktuere under smoltifiseringen og nivåene vil være høyest midt i smoltifiseringen før de avtar få uker før fisken er smoltifisert (Agustsson et al., 2001; McCormick, 2013). Dermed var det forventet at lysgruppen viste et signifikant høyere uttrykk for SOCS2 enn parrgruppen (Figur 10B), som normalt sett har relativt lave verdier av GH i plasma (Agustsson et al., 2001). Forskjellene mellom salt- og parrgruppen var ikke signifikant, selv om saltgruppen hadde over 6 ganger så høyt uttrykk (Figur 10E). Det er sannsynlig at fisken i saltgruppen ikke vil gjennomgå de samme endokrine endringene som lysstyrt smolt og vil dermed ikke ha behov for en like sterk regulering av veksthormon som lysgruppen. Philip og kollegaer (2018) antar at SOCS2 bidrar til å fylle opp energilagere i fisk ved å redusere effekten av GH, som under smoltifiseringen bidrar til katabolske prosesser som fettmobilisering. Med dette premisset er det ikke overraskende at parrgruppen har et lavere uttrykk av SOCS2 sammenliknet med smoltgruppene.

Flere arbeid konkluderer med at smoltifisering og endokrine forandringer påvirker immunforsvaret hos fisk (Barton & Iwama, 1991; Harris & Bird, 2000; Johansen et al., 2016a; Johansen et al., 2016b). Resultatene fra disse studiene tyder på en nedregulering av basalnivåene til gener relatert til immunforsvaret underveis i smoltifiseringen og i forbindelse med sjøvannsutsett. Det har tidligere blitt foreslått at deler av det spesifikke immunforsvaret blir nedregulert og at deler av det ikke-spesifikke immunforsvaret blir oppregulert under smoltifiseringen (Ingerslev et al., 2006a). Resultatene i vår studie viser at fisken som hadde vært gjennom smoltifiseringen (uavhengig av smoltifiseringsregime) hadde en tendens til høyere basaluttrykk for målgenene enn parrgruppen. Dette er i motsetning til andre studier som har sett en massiv suppresjon av immunforsvaret gjennom smoltifiseringen (Johansen et al.,

2016a; Johansen et al., 2016b). Andre studier har også sett at parr og smolt har hatt ulik mottakelighet for ILA, noe som indikerer en ulik immunkompetanse (Glover et al., 2006). Det bør likevel understrekes at endringene i genuttrykk mellom gruppene er relativt små og at den individuelle variasjonen er nokså stor innad i gruppene. På bakgrunn av dette kan det ikke trekkes noen klare konklusjoner ut fra resultatene.

#### **4.2.2 Vaksinerespons før og etter smoltifisering**

I dette prosjektet ble injeksjon av en multikomponentvaksine brukt som immunstimulant. Hensikten var å undersøke hvordan parr og lys- og saltindusert smolt responderte på vaksinen. Vevsprøvene ble tatt 3 og 7 dager etter injeksjon og det var dermed kun effekter på gener som representerer det medfødte immunforsvaret som ble analysert. Generelt sett var endringer i genuttrykk små i alle gruppene foruten om uttrykk av IL-10 i vaksinert fisk i parrgruppen. Siden utvalget av gener og prøvetakingstidspunkter var begrenset, samt at variasjonen innad i gruppene var høy, er det ikke mulig å trekke klare konklusjoner ut fra disse resultatene.

Uttrykket av TNF- $\alpha$  endret seg ikke i parrgruppen og lysgruppen, uavhengig av injeksjon og prøvetakingstidspunkt (Figur 11A). Den vaksinerte fisken i saltgruppen viste derimot en oppregulering av TNF- $\alpha$  3 DPI i forhold til PBS-gruppen. En trend i alle gruppene var at genuttrykket for vaksinert fisk var lavere 7 DPI i forhold til 3 DPI. Dette stemmer overens med en studie som ble utført av Hynes og kollegaer (2011) hvor uttrykket av TNF- $\alpha$  i parr var høyere 2 og 4 DPI sammenliknet med 7 dager etter stimulering med flaggelin. Generelt sett var det lave uttrykk av TNF- $\alpha$  og det var små endringer i alle gruppene, uavhengig av tidspunkt i vårt forsøk.

Den vaksinerte fisken i parrgruppen hadde 3,4 ganger så høyt uttrykk av Mx 3 DPI sammenliknet med PBS-gruppen og 1,6 ganger høyere uttrykk 7 DPI, men ingen av forskjellene var signifikante (Figur 11B). I lysgruppen var det ingen signifikante endringer i uttrykket av Mx hvor uttrykket generelt var lavt. I saltgruppen var det en signifikant økning (5,9 ganger) mellom vaksinert og PBS-injisert fisk 3 DPI. Den vaksinerte fisken i parrgruppen viser en større økning i uttrykket av Mx sammenliknet med den uninjiserte kontrollgruppen i forhold til begge smoltgruppene. Selv om dette viser at parrgruppen responderer mest på vaksinen, kan stemme overens med Johansen og kollegaer (2016a) som viser at antivirale gener har et generelt lavere uttrykk etter fisken har gjennomgått smoltifisering.

En liknende trend ble vist for uttrykket av IL-10 (Figur 11C). Vaksinert fisk i parrgruppen viste et betydelig høyere uttrykk av IL-10 sammenliknet med PBS-fisken. Som for TNF- $\alpha$ , ble det høyeste nivået av IL-10 registrert i vaksinert fisk 3 DPI i både parrgruppen og saltgruppen. I parrgruppen har den vaksinerte fisken et signifikant høyere uttrykk enn PBS-injisert fisk både ved 3 og 7 dager injeksjon, mens det i saltgruppen kun er forskjellig ved 3 DPI. Dette antyder at vaksinen raskt kan igangsette anti-inflammatoriske reaksjoner i disse gruppene, noe som hindrer en overstimulering av immunresponsen i dagene etter vaksinerings. Dette kan være fordelaktig med tanke på å hindre autoimmunitet som følge av overstimulering av det medfødte immunforsvaret. Koppang og kollegaer (2008) viste at autoimmunitet i oppdrettslaks er vanlig og at en av årsakene kan skyldes det høye volumet av vaksiner som injiseres interperitonalt i liten fisk. Dermed er det lite overraskende at parrgruppen viste en høyere respons på vaksinen enn smoltgruppene som var større ved injeksjon, men fikk injisert samme volum. Likevel kan det diskuteres om en høy anti-inflammatorisk respons til en vaksine er heldig, da en dempende effekt på immunforsvaret kan bidra til at vaksineresponsen og følgelig beskyttelsen av vaksinen blir lav.

Uttrykket av SOCS1 var størst i vaksinert fisk 3 DPI i parrgruppen og var signifikant høyere enn den PBS-injiserte fisken ved samme tidspunkt (Figur 12A). For smoltgruppene var det ingen relevante forskjeller i uttrykket av SOCS1. For SOCS2 var det små forskjeller innad i gruppene (Figur 12B) En tidligere studie viser at stimulering av RTS-11 celler fra regnbueørret med poly I:C (syntetisk RNA polyinosinic:polycytidylic syre) og LPS økte uttrykket av SOCS1 og SOCS2 signifikant over en 24-timers periode (Wang et al., 2010). Skjesol og kollegaer (2014) så at transkripsjon av SOCS1 *in vitro* ble induert ved stimulering ved poly I:C i leukocytter fra milt i Atlantisk laks. Induksjonen av SOCS2 var betraktelig lavere ved samme behandling. Med tanke på at vaksinen brukt i vårt forsøk inneholdt inaktiverede gram-negative bakterier og et dobbeltrådig RNA-virus (IPNV) kunne vi forvente en liknende stimulering av SOCS-uttrykk som vist i de nevnte *in vitro* studiene. Selv om forskjellene ikke var like tydelig i mitt forsøk, må en ta hensyn til at flere gener kan være uttrykt forskjellig *in vivo* og *in vitro* (Kitsis & Leinwand, 2018). Mer interessant var det at PBS-injisert fisk i parrgruppen viste et noe høyere uttrykk av SOCS1 (utenom vaksinert 3 DPI) og et signifikant høyere uttrykk av SOCS2, 7 DPI, sammenliknet med de resterende gruppene. Operasjonelle prosedyrer som håndtering kan forårsake endringer i immunresponsen på grunn av stress (Iversen et al., 2005; Wang et al., 2010), noe som kanskje kan forklare de relativt høye nivåene sett i PBS-gruppen 7 DPI.



Generelt sett er det en tendens til at lysgruppen har respondert mindre på vaksinen enn parrgruppen og smoltgruppen. Det var forventet at parrgruppen skulle utvise større respons enn smoltgruppene siden Johansen og kollegaer (2016a) blant annet så at akutfaseproteiner, cytokiner, deler av komplementsystemet og noen antivirale gener var massivt nedregulert etter smoltifisering. En av årsakene til den massive nedreguleringen kan komme av energimobiliseringen fisken gjennomgår under smoltifiseringen. Parrgruppen viste en signifikant høyere glykogenkonsentrasjon i lever enn smoltgruppene (Figur 7), og saltgruppen hadde en signifikant høyere K-faktor enn lysgruppen. Siden glykogenkonsentrasjonen (og K-faktor) er et mål på energistatus i fisken kan dette bety at laks bruker store ressurser på å tilpasse seg til et liv i det marine miljø, fremfor å oppretthold et velfungerende forsvar mot patogener under smoltifiseringen.

Injeksjonsvolumet i immuniseringsforsøket ble gjort i.p med 0,1 ml AJM7 på både parr og smolt. I utgangspunktet skal vaksinen injiseres med et volum på 0,05 ml (mikrodose), men for være sikker på å få en tilstrekkelig immunrespons ble volumet oppjustert. Parren var 42 gram, fisken i lysgruppen var 102 gram og fisken i saltgruppen var 123 gram ved injeksjonstidspunktet. Injeksjonsvolumet i parren ble dermed 2,4 µl/g, mens lys- og saltgruppen ble injisert med et volum på 0,98 µl/g og 0,81 µl/g henholdsvis. Parren ble dermed injisert med henholdsvis 2,5 og 3 ganger så høyt volum i forhold til vekt som lys- og saltgruppen. Dermed kan det tenkes at spesielt uttrykket av IL-10 og til en viss grad SOCS1 er påvirket av at volumet var for stor i parrgruppen. Dette er trolig en medvirkende årsak til at parren tenderte til høyere respons på vaksinerings sammenliknet med smoltgruppene.

Resultatene fra genuttryksanalysene avdekket få store forskjeller i genuttrykk innad i fiskegruppene, unntaket er IL-10 der det var en massiv oppregulering i vaksinert fisk i parrgruppen. Hvis studien skulle gjentas burde det vurderes å måle genuttrykk på flere ulike gener. Sannsynligheten for å oppdage forskjeller i systemisk immunsuppresjon mellom gruppene er svært lav ved å bare analysere på en så liten gruppe av immunparametere. Dermed kunne det vært utført en «microarray»-analyse hvor flere tusen gener analyseres samtidig. I tillegg kan det stilles spørsmål ved prøvetakingstidspunktene. Flere studier har vist at uttrykket av gener brukt i denne studien endrer seg over tid både *in vivo* og *in vitro* (Fast et al., 2007; Hynes et al., 2011; Jensen et al., 2002; Johansen et al., 2016b; Wang et al., 2010). Ved å kun benytte seg av to prøvetakingstidspunkt med flere dagers mellomrom kan det hende at eventuelle forskjeller mellom gruppene ikke ble oppdaget. Eksempelvis har Fast og kollegaer (2007) vist at TNF- $\alpha$  avtar fra 6 timer til 24 timer etter injeksjon av formalininaktiverte kulturer

av *Aeromonas salmonicida* i startfôret pukkellaks (*Oncorhynchus gorbuscha* W.), samtidig som Hynes og kollegaer (2011) målte de høyeste nivåene av genet 2 dager etter immunstimulering med flaggelin før uttrykket avtok over de neste 12 dagene. Andre studier viser at høye nivåer av Mx og TNF- $\alpha$  oppnås etter 2 dager post injeksjon med henholdsvis poly I:C og flaggelin som immunstimulant (Hynes et al., 2011; Jensen et al., 2002; Robertsen et al., 1997). Costa og kollegaer (2011) viste at SOCS1 og SOCS2 hadde en nedregulering av genuttrykk 6 timer etter stimulering med IL-6 fra regnbueørret. Basert på dette kan det tenkes at genuttrykkene for flere av målgenene som ble undersøkt i vårt forsøk hadde avtatt noe allerede 3 DPI, og at et prøveuttak 24 timer etter injeksjon kunne vist større forskjeller mellom PBS og den vaksinerte fisken.

For å kunne avgjøre om resultatene skyldes smoltifisering *per se* burde det vært inkludert en kontrollgruppe som var holdt på kontinuerlig lys med kontrollfôr (LL-LL + kontroll), slik at basalnivåer mellom parr ved starten av forsøket og parr før overføring til sjøvann kunne blitt sammenliknet. Selv om parrgruppen tenderer til en høyere respons på vaksinen enn lysgruppen kan vi ikke si for sikkert at dette skyldes smoltifiseringen alene. I utgangspunktet var det inkludert en slik gruppe i smoltforsøket, men den var ikke inkludert i søknaden til Mattilsynet, ei heller var det nok individer i denne gruppen til å inkludere dem i denne delen av studien.

### **4.3 Mottakelighet for ILA i smoltgruppene**

Hensiktene med dette forsøket var å undersøke om sykdomsforsvaret til smoltgruppene ble svekket etter overføring til sjøvann. For å gjøre dette ble det valgt å utføre et smitteforsøk med ILAV som smitteagens. ILA er en sykdom som har utbrudd i sjø og det var mulig å utføre selve smitten i sjøvann med en kjent smittemodell (Hetland et al., 2011). Sykdommen er også en utfordring i norsk oppdrettsnæring, der det har vært mellom 10-20 utbrudd de siste årene. Utbrudd av ILA reguleres med strenge tiltak, og resulterer i store økonomiske tap for oppdretter og velferdsmessige utfordringer for laksen.

### 4.3.1 Smitteforsøket

Trenden for dødelighet var like i begge gruppene (Figur 14), med høy dødelighet i den akutte fasen som varte ca en uke. Etter den akutte fasen avtok dødeligheten frem til avslutningen av forsøket i begge gruppene. Saltgruppen viste en forsinket dødelighet sammenliknet med lysgruppen, men den relative overlevelsen var 1,9% i lysgruppen og 5,5% i saltgruppen ved avslutningen av forsøket (Tabell 7). Selv om dødelighetskurvene var signifikant forskjellige bør det ikke trekkes slutninger på bakgrunn av dette da forskjellene er små og den akkumulerte dødeligheten ved forsøkets slutt er relativt lik. Ved undersøkelse av mottakelighet for sykdom er det viktig å bruke en smittedose som ikke gir for lav overlevelse i fiskegruppen. Hvis all fisken i begge gruppene dør er det vanskelig å si noe om forskjeller i mottakeligheten for sykdom. Med tanke på at den kumulative dødeligheten var over 94% i begge gruppene, var smittedosen sannsynligvis for høy i dette eksperimentet (Nørstebø et al., 2018). For høy virusdose vil kunne maskere eventuelle forskjeller i fiskens forsvar mot sykdom da den ikke evner å motstå en slik belastning. På bakgrunn av dette ble heller ikke analyser på genuttrykk gjort etter virusmitte, siden virusinfeksjon kan overstyre uttrykk av flere immunrelaterte gener (I. Jensen, UiT, pers.com, 18. februar.2019).

Det er etablerte smitte-modeller basert på i.p-injeksjon, samt kohabitant- og immersjonsmitte for ILAV (Hetland et al., 2011; McBeath et al., 2015; Ritchie et al., 2009). Ved bruk av intraperitoneal injeksjon omgås vertens fysiske mukosale barrierer. Dette gjør at viruset bryter gjennom vertens førstelinjeforsvar og dermed benytter seg av en unaturlig infeksjonsvei. Et interessant poeng ved å bryte den naturlige smitteveien er at viruset kan miste en primær replikasjonsfase i forbindelse med viralt opptak over mukosale barrierer som den ville ha benyttet ved en vannbåren smitte. McBeath og kollegaer (2015) badsmittet laks med to ulike ILAV-isolat (høy- og lavvirulent) og sammenliknet resultatene sine med en studie utført med samme virusisolat, men med i.p-injeksjon (Hetland et al., 2011). De oppdaget at det lavvirulente isolatet utviste en raskere og høyere dødelighet ved immersjonsmitte sammenliknet med i.p-injeksjon. Dermed ble det spekulert i at infeksjonsveien er spesielt viktig for virulensen til et virusisolat og at viruset kan gjennomgå en replikasjonsfase i forbindelse med opptak. Ved immersjons- eller kohabitantsmitte vil hele kroppen til fisken være utsatt for viruset. Når fisken infiseres via vann må viruset krysse mukosale barrierer som hud, øyne, gjeller, finnebaser eller mage-tarm-systemet. Under naturlig eller lysmanipulert smoltifisering gjennomgår fisken store utviklingsmessige endringer i flere mukosale overflater som gjeller og mage-tarmsystemet (McCormick, 2013; Sundell & Sundh, 2012). Eksempelvis vil celletettheten i epidermis (det

ytre hudlaget) reduseres signifikant i løpet av smoltifiseringen (O'Byrne-Ring et al., 2003). Det er også vist at mengden slimceller på overflaten til fisk reduseres med øk salinitet (Shephard, 1994), noe som sannsynligvis gjør fisken mer mottakelig for sykdom etter utsett i sjø. Til vår kjennskap er det ikke utført studier som viser en direkte kopling mellom endringer i fysiologiske endringer på mukosale overflater/ytre barrierer under smoltifiseringen og sykdomsmottakelighet. Dermed ville det vært spennende å utføre et liknende smitteforsøk med bruk av immersjon- eller kohabitantsmitte for å se etter forskjeller mellom lys- og saltindusert smolt, da det ikke er utenkelig at de fysiologiske endringene i forbindelse med smoltifisering har en innvirkning på førstelinjeforsvaret mot sykdom. I dette forsøket ble i.p-injeksjon ble valgt på bakgrunn av anbefalinger fra virusleverandør som har god erfaring med denne smitte modellen for isolatet i denne studien. Dette gjorde også at vi hadde god kontroll på smittetidspunkt og infeksjonsdose. Forsøket ble satt opp som et «Common-garden»-oppsett. Vanligvis benyttes et slikt oppsett for å sammenlikne genetiske ulike stammer, familier eller populasjoner under like forsøksbetingelser (Ljungfeldt et al., 2014).

Hva som er årsaken til at saltgruppen har en noe forsinket dødelighet sammenliknet med lysgruppen er vanskelig å avgjøre basert på funnene i dette forsøket. Basert på sjøvannsprestasjonen til begge fiskegruppene er det forskjeller i både tilvekst i sjøvann (Figur 6) og osmoregulatorisk kapasitet (Figur 8 og Figur 9), men det var ingen dødelighet de første 17 dagene, ei heller noen tegn til dårlig sjøvannstoleranse, så trolig er ikke sjøvannstoleranse årsaken til dette. Likevel replikerer viruset seg i denne perioden, og sjøvannstoleransen kan ha innvirkning på dette. For å utelukke bakgrunnsdødelighet som ikke har sammenheng med ILA, burde fisk fra begge gruppene gått på sjøvann uten smitte gjennom hele forsøket. Fra immunforsøket var det flere forskjeller mellom gruppene. Saltgruppen hadde over dobbelt så høyt basaltuttrykk av Mx (Figur 10B) sammenliknet med lysgruppen. Mx er et antiviralt protein som induseres av IFN $\alpha$  (Workenhe et al., 2010) og som vil bli uttrykt under en virusinfeksjon (Robertsen, 2006). Dermed kan det tenkes at et høyere basaltuttrykk av Mx kan gjøre saltgruppen mer motstandsdyktig i et tidlig stadium i smitteforsøket sammenliknet med lysgruppen. Saltgruppen hadde også en tendens til å ha et høyere uttrykk av målgenene etter vaksinerings enn det som ble vist i lysgruppen (Figur 11A-C og Figur 12A-B). Dette indikerer at saltgruppen har en bedre evne til å respondere på en utfordring av immunforsvaret sammenliknet med lysgruppen, og kan derfor være bedre utstyrt til å bekjempe sykdom.

Overturf og kollegaer (2010) registrerte at regnbueørret viste en positiv korrelasjon mellom størrelse på fisken og sykdomsmotstand ved smitte med bakterien *Flavobacterium psychrophilum* og virussykdommen IHN (Infeksiøs hematopoetisk nekrose). Andre studier har vist at vedlikehold av et godt og funksjonelt immunsystem i vertebrater er svært energikrevende, og at en nedregulering av immunsystemet i visse livsperioder er vanlig. På bakgrunn av dette kan vekst, evnen til reproduksjon og størrelse være assosiert med immunitet (Lochmiller & Deerenberg, 2000). Ved smitte var snittvekten til saltgruppen 45 gram høyere enn saltgruppen. I tillegg var K-faktoren og den daglige tilveksten større i saltgruppen i perioden før smitte. Dermed kan det tenkes at størrelsen, energistatusen og tilveksten på fisken i vårt forsøk spilte en rolle i fiskens evne til å bekjempe virusinfeksjonen.

#### **4.4 Lysstyrt og saltindusert smoltifisering**

Formålet med denne oppgaven var å sammenlikne tradisjonell lysstyrt smolt og fisk som blir sjøvannsadaptert ved tilsetning av salt og aminosyrer i fôret. Det er ikke nylige rapporterte studier som undersøker saltindusert smoltifisering og fiskens evne til å klare seg i en intensiv oppdrettssituasjon, ei heller hvordan en slik smolt presterer i sjøvann. Selv om denne studien ikke avdekket store forskjeller mellom lysstyrt smolt og fisk som ble smoltifisert med saltfôr, kan en konkludere med at i dette forsøket gav saltindusert smoltifisering; god vekst i ferskvannsfasen, god sjøvannstoleranse, samt en marginalt bedre immunstatus etter smoltifisering og sykdomsmottakelighet etter sjøvannsutsett sammenliknet med lysstyrt smolt. En av kritikken mot saltindusert smolt har vært at den ikke utviser de samme hormonelle, adferdsmessige og morfologiske endringene som naturlig smolt gjør. Dette stemmer til en viss grad da denne gruppen hadde en betydelig høyere K-faktor etter smoltifiseringen og en svakere sølvfarging i forhold til lysgruppen (ikke vist). Det bør nevnes at fisk som gikk parallelt med forsøksgruppene på kontinuerlig lys og kontrollfôr (LL-LL + kontroll) også ble sølvfarget utover våren uten å ha blitt utsatt for et smoltifiseringssignal. De hormonelle endringene ble ikke belyst i denne oppgaven. Det kan diskuteres om fisken er avhengig av disse egenskapene i dagens oppdrettssituasjon der fisken hverken er avhengig av kamuflasje eller forbedrede svømmeegenskaper ved overføring til sjø, da fisken lever hele livet sitt inne i en mer beskyttet fra predasjon, og samtidig får servert hvert måltid slik at den ikke trenger å jakte på byttedyr.

## 4.5 Konklusjoner

**Hypotese 1:** Saltstimulert smoltifisering gir ikke en fullverdig smoltkvalitet.

- Saltstimulert smolt utviser kloridkonsentrasjon og osmolalitet i plasma etter sjøvannstester som er innenfor det forventede spekteret hos smolt. Fisken spiste og vokste etter overføring til sjøvann. Tilsetning av salt og aminosyrer i fôret til laks 8 uker før utsett ser ut til å gi god sjøvannstoleranse og prestasjon etter sjøsetting. Bare i den lysstyrte gruppen ble det observert en nedgang i kondisjonsfaktor i løpet av ferskvannsfasen, noe som tyder på at den endokrine responsen på «smoltstimuli» var forskjellig i de to behandlingsgruppene. Det konkluderes derfor med at saltstimulering ikke gav en fullverdig smolt, men likevel en fisk som i oppdrett oppviser samme prestasjon som en fullverdig smolt etter sjøsetting.

**Hypotese 2:** Lysstyrt smolt utvikler en redusert energistatus og derved et nedregulert immunforsvar under smoltifiseringen, noe som ikke er tilfelle hos den saltstimulerte smolten.

- Både lysstyrt og saltstimulert smolt utvikler en redusert energistatus under smoltifiseringen, noe som tydelig fremgår av reduksjonen i glykogennivået i lever i løpet av ferskvannsfasen i hos begge behandlingsgruppene. Basaluttrykket av immungenene er relativt likt for begge gruppene og er høyere enn i parrgruppen. Etter vaksinerings viser parrgruppen et generelt høyere uttrykk av målgenene sammenliknet med smoltgruppene. Immundata fra dette forsøket er ikke gode nok til å konkludere med et nedregulert immunforsvar i noen av gruppene, men dataene tyder på at smoltgruppene responderer dårligere på vaksinen sammenliknet med parrgruppen.

**Hypotese 3:** Et nedregulert immunforsvar hos lysstyrt smolt fører til et svekket sykdomsforsvar etter overføring til sjø sammenliknet med det hos saltstimulert smolt.

- Immundata er ikke sterke nok til å konkludere med et nedregulert immunforsvar hos lysstyrt smolt i forhold til saltstimulert smolt. Lysgruppen utviste en tidligere dødelighet i smitteforsøket og hadde antakelig et marginalt svekket forsvar mot ILA ved overføring til sjø sammenliknet med saltstimulert smolt.

**Hypotese 4:** En ufullstendig smoltifisering hos saltstimulert smolt vil gi økt stress og energiforbruk etter overføring til sjø og derved en akutt svekking av sykdomsforsvar.

- Den saltstimulerte smolten ble ansett å ha utviklet sjøvannstoleranse ved overføring til sjø. Dermed var det trolig ingen forskjell mellom salt- og lysstimulert smolt med hensyn til stress og energiforbruk i forbindelse med overføring til sjøvann, ei heller akutt svekking av sykdomsforsvar på grunn av dårlig sjøvannstoleranse

## 5. Referanser

- Abbas, A. K. & Lichtman, A. H. (2011). *Basic immunology - Functions and disorders of the immune system* Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Agustsson, T. et al. (2001). Growth hormone endocrinology of Atlantic salmon (*Salmo salar*): pituitary gene expression, hormone storage, secretion and plasma levels during parr-smolt transformation. *Journal of Endocrinology*, 170, 227-34.
- Akvakulturdriftsforskriften. (2008). *Forskrift om drift av akvakulturanlegg (akvakulturdriftsforskriften)*. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-06-17-822> [Lest 25.10.2018].
- Alexander, J. B. & Ingram, G. A. (1992). Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 249-279.
- Arnesen, A. M. et al. (1998). Acclimation of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts to 'cold' sea water following direct transfer from fresh water. *Aquaculture*, 168 (1), 351-367.
- Arnesen, A. M., Halvorsen, M. & Nilssen, K. (2011). Development of Hypoosmoregulatory Capacity in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) Reared under either Continuous Light or Natural Photoperiod. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49, 229-237.
- Augspurger, J. M., Warburton, M. & Closs, G. P. (2017). Life-history plasticity in amphidromous and catadromous fishes: a continuum of strategies. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 27 (1), 177-192.
- Barton, B. A. et al. (1985). Changes in plasma cortisol during stress and smoltification in Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*, 59 (3), 468-471.
- Barton, B. A. & Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1, 3-26.
- Barton, B. A. (2002). Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42 (3), 517-525.
- Basulto, S. (1976). Induced saltwater tolerance in connection with inorganic salts in the feeding of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 8 (1), 45-55.
- Bergan-Roller, H. E. & Sheridan, M. A. (2018). The growth hormone signaling system: Insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone. *General and Comparative Endocrinology*, 258, 119-133.
- Bergheim, A. et al. (2009). Production of Atlantic salmon smolts in Europe—Current characteristics and future trends. *Aquacultural Engineering*, 41 (2), 46-52.
- Berrill, I. K. et al. (2003). Photoperiodic effects on precocious maturation, growth and smoltification in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 222 (1), 239-252.
- Bisbal, G. A. & Specker, J. L. (1991). Cortisol stimulates hypo-osmoregulatory ability in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Biology*, 39 (3), 421-432.
- Björnsson, B. T. et al. (2000). Photoperiod Regulation of Plasma Growth Hormone Levels during Induced Smoltification of Underyearling Atlantic Salmon. *General and Comparative Endocrinology*, 119 (1), 17-25.
- Björnsson, B. T., Stefansson, S. O. & McCormick, S. D. (2011). Environmental endocrinology of salmon smoltification. *General and Comparative Endocrinology*, 170 (2), 290-298.
- Bleie, H. & Skrudland, A. (2014). Tap av laksefisk i sjø: Mattilsynet. Tilgjengelig fra: [https://www.mattilsynet.no/fisk\\_og\\_akvakultur/fiskevelferd/tap\\_av\\_laksefisk\\_i\\_sjo\\_rapport.15430/binary/Tap%20av%20laksefisk%20i%20sj%C3%B8%20rapport](https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskevelferd/tap_av_laksefisk_i_sjo_rapport.15430/binary/Tap%20av%20laksefisk%20i%20sj%C3%B8%20rapport) [lest: 14.09.2018].
- Borgatti, A. R., Pagliarani, A. & Ventrella, V. (1992). Gill (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase involvement and regulation during salmonid adaptation to salt water. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 102 (4), 637-643.
- Bradley, T. M., Fay, C. T. & Johanning, K. M. (1989). Investigation of hepatic cytosolic proteins during parr-smolt transformation of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 82, 1-14.



- Brinker, A. & Reiter, R. (2011). Fish meal replacement by plant protein substitution and guar gum addition in trout feed, Part I: Effects on feed utilization and fish quality. *Aquaculture*, 310 (3), 350-360. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.041>
- Bruno, D., Noguera, P. A. & Poppe, T. T. (2013). *A Colour Atlas of Salmonid Diseases*. 2 utg.: Springer Netherlands.
- Bustin, S. A. et al. (2005). Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34 (3), 597-601. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755>
- Calabrese, S. (2017). *Environmental and biological requirements of post-smolt Atlantic salmon (Salmo salar L.) in closed-containment aquaculture systems* Bergen: The University of Bergen, Department of Biology.
- CibaCorning. (1980). 925 Chloride Analyzer Instruction Manual. *Massachusetts, USA, Ciba Corning*.
- Clarke, W. C., Shelbourn, J. E. & Brett, J. R. (1981). Effect of artificial photoperiod cycles, temperature, and salinity on growth and smolting in underyearling coho (*Oncorhynchus kisutch*), chinook (*O. Tshawytscha*), and sockeye (*O. nerka*) salmon. *Aquaculture*, 22, 105-116. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(81\)90137-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(81)90137-X)
- Clouthier, S. C. et al. (2002). Genomic organization of infectious salmon anaemia virus. *Journal of General Virology*, 83 (2), 421-428. doi:10.1099/0022-1317-83-2-421
- Costa, M. M. et al. (2011). Bioactivity studies of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6: Effects on macrophage growth and antimicrobial peptide gene expression. *Molecular Immunology*, 48 (15), 1903-1916. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.05.027>
- Cottet, L. et al. (2011). Infectious salmon anemia virus—Genetics and pathogenesis. *Virus Research*, 155 (1), 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.10.021>
- Crocker, B. A., Kiu, H. & Nicholson, S. E. (2008). SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19 (4), 414-422. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.07.010>
- Dannevig, B. H., Falk, K. & Namork, E. (1995). Isolation of the causal virus of infectious salmon anaemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. *Journal of General Virology*, 76 (6), 1353-1359. 10.1099/0022-1317-76-6-1353
- Das, B. K. et al. (2007). Expression of interferon type I and II, Mx and  $\gamma$ IP genes in the kidney of Atlantic salmon, *Salmo salar*, is induced during smolting. *Fish & Shellfish Immunology*, 23 (3), 514-520. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.10.010>
- Delgado-Ortega, M. et al. (2013). SOCS proteins in infectious diseases of mammals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 151 (1), 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.11.008>
- Devold, M. et al. (2001). Strain variation, based on the hemagglutinin gene, in Norwegian ISA virus isolates collected from 1987 to 2001: indications of recombination. *Diseases of Aquatic Organisms*, 47 (2), 119-128.
- Dheda, K. et al. (2005). The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Analytical Biochemistry*, 344 (1), 141-143. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.05.022>
- Dickhoff, W. W., Folmar, L. C. & Gorbman, A. (1978). Changes in plasma thyroxine during smoltification of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*, 36 (2), 229-232. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(78\)90027-8](https://doi.org/10.1016/0016-6480(78)90027-8)
- Duston, J. & Saunders, R. L. (1990). The entrainment role of photoperiod on hypoosmoregulatory and growth-related aspects of smolting in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Zoology*, 68 (4), 707-715. 10.1139/z90-103
- Duston, J. (1993). Effects of dietary betaine and sodium chloride on seawater adaptation in atlatic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 105 (4), 673-677. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90267-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90267-8)
- Ebbesson, L. O. E. et al. (2003). Neural circuits and their structural and chemical reorganization in the light–brain–pituitary axis during parr–smolt transformation in salmon. *Aquaculture*, 222 (1), 59-70. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00102-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00102-9)

- Eggset, G., Mortensen, A. & Løken, S. (1999). Vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) before and during smoltification; effects on smoltification and immunological protection. *Aquaculture*, 170 (2), 101-112.
- Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 25 (8), 827-839.
- Enes, P. et al. (2008). Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35, 519-39.
- Eriksson, L. O. & Lundqvist, H. (1982). Circannual rhythms and photoperiod regulation of growth and smolting in baltic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 28, 113-121.
- Espe, M. et al. (2006). Can Atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fish meal? *Aquaculture*, 255 (1), 255-262.
- Europharma. (2018). *SuperSmolt - fremtidas smoltifisering!* Europharma red. Tilgjengelig fra: <https://europharma.no/supersmolt/>. [Lest: 09.10.2018].
- Evensen, O., Thorud, K. E. & Olsen, Y. A. (1991). A morphological study of the gross and light microscopic lesions of infectious anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Research in Veterinary Science*, 51 (2), 215-222.
- Falk, K. et al. (2004). Identification and Characterization of Viral Structural Proteins of Infectious Salmon Anemia Virus. *Journal of Virology*, 78 (6), 3063-3071.
- Fast, M. D., Johnson, S. C. & Jones, S. R. M. (2007). Differential expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ -1, TNF $\alpha$ -1 and IL-8 in vaccinated pink (*Oncorhynchus gorboscha*) and chum (*Oncorhynchus keta*) salmon juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*, 22 (4), 403-407.
- Finstad, B., Nilssen, K. J. & Arnesen, A. M. (1989). Seasonal changes in sea-water tolerance of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Journal of Comparative Physiology B*, 159 (4), 371-378.
- Fiskeridirektoratet. (2018). Utsett av fisk 2005-2018 (Fylke). I: Fiskeridirektoratet red. Tilgjengelig fra: <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Statistikk-akvakultur/Biomassestatistikk/Biomassestatistikk-etter-fylke>. [Lest: 09.10.2018]
- Folmar, L. C. & Dickhoff, W. W. (1980). The parr-smolt transformation (smoltification) and seawater adaptation in salmonids. A review of selected literature. *Aquaculture*, 211, 1-37.
- Glover, K. A. et al. (2006). Size-dependent susceptibility to infectious salmon anemia virus (ISAV) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) of farm, hybrid and wild parentage. *Aquaculture*, 254 (1), 82-91.
- Godoy, M. G. et al. (2008). First detection, isolation and molecular characterization of infectious salmon anaemia virus associated with clinical disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Chile. *BMC Veterinary Research*, 4 (1), 28.
- Grayfer, L. et al. (2011). Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) interleukin-10. *Molecular Immunology*, 48 (4), 563-571.
- Grosell, M. (2006). Intestinal anion exchange in marine fish osmoregulation. *Journal of Experimental Biology*, 209 (15), 2813-2827.
- Gross, M. R. (1987). Evolution of diadromy in fishes. *American Fisheries Society Symposium*, 1, 14-25.
- Handeland, S. O. et al. (1998). Effects of temperature and salinity on osmoregulation and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts in seawater. *Aquaculture*, 168 (1), 289-302.
- Handeland, S. O. et al. (2000). Seawater adaptation by out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at different temperatures. *Aquaculture*, 181 (3), 377-396.
- Handeland, S. O. et al. (2004). Temperature influence on the development and loss of seawater tolerance in two fast-growing strains of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 233 (1), 513-529.
- Handeland, S. O., Imsland, A. K. & Stefansson, S. O. (2008). The effect of temperature and fish size on growth, feed intake, food conversion efficiency and stomach evacuation rate of Atlantic salmon post-smolts. *Aquaculture*, 283 (1), 36-42.
- Handeland, S. O. et al. (2014). Osmoregulation in Atlantic salmon *Salmo salar* smolts transferred to seawater at different temperatures. *Journal of Fish Biology*, 85 (4), 1163-1176.
- Harris, J. & Bird, D. J. (2000). Modulation of the fish immune system by hormones. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 77 (3), 163-176.

- Hastein, T., Gudding, R. & Evensen, O. (2005). Bacterial vaccines for fish--an update of the current situation worldwide. *Developmental Biology* 121, 55-74.
- Helfman, G. S. et al. (2009). *The diversity of fishes - Biology, Evolution and Ecology* 2utg. Chichester, UK: Wiley-Blackwell.
- Hemre, G. I. et al. (2002). Growth and salt-water tolerance of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*, reared under different combinations of dietary carbohydrate and photoperiod regime. *Aquaculture Nutrition*, 8 (1), 23-32.
- Hetland, D. L. et al. (2011). Depletion of CD8 alpha cells from tissues of Atlantic salmon during the early stages of infection with high or low virulent strains of infectious salmon anaemia virus (ISAV). *Developmental & Comparative Immunology*, 35 (8), 817-826.
- Hirayama, T., Imajoh, M. & Oshima, S.-i. (2005). Quantification of Aquabirnaviruses Isolated from Different Host Species by Real-Time RT-PCR. *Microbiology and Immunology*, 49 (4), 361-371.
- Hjeltnes, B. et al. (2018). Fiskehelse rapporten 2017. I: Veterinærinstituttet red.
- Hjeltnes, B. et al. (2019). Fiskehelse rapporten 2018. I: Veterinærinstituttet red.
- Hoar, W. S. (1988). 4 The Physiology of Smolting Salmonids. I: Hoar, W. S. & Randall, D. J. red. *Fish Physiology*, b. 11, s. 275-343: Academic Press.
- Hynes, N. A. et al. (2011). Immune response of Atlantic salmon to recombinant flagellin. *Vaccine*, 29 (44), 7678-7687.
- Håsteint, T., Hill, B. J. & Winston, J. R. (1999). Successful aquatic animal disease emergency programmes. *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties*, 18, 214-227.
- Ilaks.no. (2018). *SuperSmolt FeedOnly-patentet innvilges*. Ilaks red. Pressemelding. Tilgjengelig fra: <https://ilaks.no/supersmolt-feedonly-patentet-innvilges/>. [Lest 09.10.2018].
- Ingerslev, H. C., Cunningham, C. & Wergeland, H. I. (2006a). Cloning and expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and COX-2 in an anadromous and landlocked strain of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during the smolting period. *Fish & Shellfish Immunology*, 20 (4), 450-461.
- Ingerslev, H. C. et al. (2006b). Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Immunology*, 43 (8), 1194-1201.
- Iversen, M., Finstad, B. & Nilssen, K. J. (1998). Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, 168 (1), 387-394.
- Iversen, M. et al. (2005). Stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts during commercial well boat transports, and effects on survival after transfer to sea. *Aquaculture*, 243 (1), 373-382.
- Jarungsriapisit, J. et al. (2016). Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts challenged two or nine weeks after seawater-transfer show differences in their susceptibility to salmonid alphavirus subtype 3 (SAV3). *Virology Journal*, 13, 66.
- Jensen, I. et al. (2002). Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish & Shellfish Immunology*, 13 (4), 311-326
- Jensen, I. et al. (2019). Differences in smolt status affect the resistance of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against infectious pancreatic necrosis (IPN) while vaccine-mediated protection is unaffected. [Under publisering].
- Jiang, X. et al. (2016). Type II SOCS as a feedback repressor for GH-induced Igf1 expression in carp hepatocytes. 229 (2), 171.
- Jobling, M. (1983). Growth studies with fish—overcoming the problems of size variation. *Journal of Fish Biology*, 22 (2), 153-157.
- Johansen, L.-H., Eggset, G. & Sommer, A.-I. (2009). Experimental IPN virus infection of Atlantic salmon parr; recurrence of IPN and effects on secondary bacterial infections in post-smolts. *Aquaculture*, 290 (1), 9-14.
- Johansen, L.-H. et al. (2016a). Differences in gene expression in Atlantic salmon parr and smolt after challenge with Piscine orthoreovirus (PRV). *Molecular Immunology*, 73, 138-150.

- Johansen, L.-H. et al. (2016b). Smoltification and seawater transfer of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is associated with systemic repression of the immune transcriptome. *Fish & Shellfish Immunology*, 58, 33-41.
- Johnston, C. E. & Eales, J. G. (1967). Purines in the integument of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 24 (5), 955-964.
- Julin, K., Johansen, L. H. & Sommer, A. I. (2009). Reference genes evaluated for use in infectious pancreatic necrosis virus real-time RT-qPCR assay applied during different stages of an infection. *Journal of Virological Methods*, 162 (1), 30-39.
- Julin, K. et al. (2015). Persistent infections with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) of different virulence in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 38 (11), 1005-1019.
- Jørgensen, E. H. & Jobling, M. (1994). Feeding and growth of exercised and unexercised juvenile Atlantic salmon in freshwater, and performance after transfer to seawater. *Aquaculture International*, 2 (3), 154-164.
- Jørgensen, J. B. (2014). The Innate Immune Response in Fish. I: Gudding, R., Lillehaug, A. & Evensen, Ø. red. *Fish Vaccination*.
- Kiillerich, P., Kristiansen, K. & Madsen, S. S. (2007). Hormone receptors in gills of smolting Atlantic salmon, *Salmo salar*: Expression of growth hormone, prolactin, mineralocorticoid and glucocorticoid receptors and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *General and Comparative Endocrinology*, 152 (2), 295-303.
- Kitsis, R. N. & Leinwand, L. A. (2018). Discordance between gene regulation in vitro and in vivo. *Gene expression*, 2 (4), 313-318.
- Kolarevic, J. et al. (2017). Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd - Del B. Bruk av operative velferdsindikatorer for ulike oppdretts- og produksjonssystem. 139-203.
- Koppang, E. O. et al. (2008). Vaccination-Induced Systemic Autoimmunity in Farmed Atlantic Salmon. *The Journal of Immunology*, 181 (7), 4807-4814.
- Koppang, E. O. et al. (2010). Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of Anatomy*, 217 (6), 728-739.
- Langdon, J. S. & Thorpe, J. E. (1985). The ontogeny of smoltification: Developmental patterns of gill Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, SDH, and chloride cells in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 45 (1), 83-95.
- Laurell, H. et al. (2012). Correction of RT-qPCR data for genomic DNA-derived signals with ValidPrime. *Nucleic acids research*, 40 (7), e51-e51.
- Lauscher, A. et al. (2011). Immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following protective vaccination against Infectious salmon anemia (ISA) and subsequent ISA virus infection. *Vaccine*, 29 (37), 6392-6401.
- Life-Technologies. (2014). *Real-time PCR handbook*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf> [Lest 16.04.2019].
- Linossi, E. M. et al. (2013). Suppression of cytokine signaling: The SOCS perspective. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 24 (3), 241-248.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25 (4), 402-408.
- Ljungfeldt, L. E. et al. (2014). A common-garden experiment to quantify evolutionary processes in copepods: the case of emamectin benzoate resistance in the parasitic sea louse *Lepeophtheirus salmonis*. *BMC Evolutionary Biology*, 14 (108).
- Lochmiller, R. L. & Deerenberg, C. (2000). Trade-Offs in Evolutionary Immunology: Just What Is the Cost of Immunity? *Oikos*, 88 (1), 87-98.
- Loretz, C. A. (2008). Extracellular calcium-sensing receptors in fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 149 (3), 225-245.

- Lyngstad, T. M. et al. (2012). Low virulent infectious salmon anaemia virus (ISAV-HPR0) is prevalent and geographically structured in Norwegian salmon farming. *Diseases of Aquatic Organisms*, 101 (3), 197-206.
- Lyngstad, T. M., Gjevre, A. & Svendsen, J. C. (2018). The surveillance program for infectious salmon anaemia (ISA) and bacterial kidney disease (BKD) in Norway 2017 I: Veterinærinstituttet red.: Mattilsynet.
- Lysfjord, G., Jobling, M. & Solberg, C. (2004). Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolt production strategy affects body composition and early seawater growth. *Aquaculture*, 237 (1), 191-205.
- MacLeod, M. G. (1978). Relationships between dietary sodium chloride, food intake and food conversion in the rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 13 (1), 73-78.
- Madsen, S. S. & Naamansen, E. T. (1989). Plasma ionic regulation and gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase changes during rapid transfer to sea water of yearling rainbow trout, *Salmo gairdneri*: time course and seasonal variation. *Journal of Fish Biology*, 34 (6), 829-840.
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20 (2), 137-151.
- Marshall, W. S. (2002). Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology*, 293 (3), 264-283.
- McBeath, A. et al. (2015). Immersion challenge with low and highly virulent infectious salmon anaemia virus reveals different pathogenesis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 38 (1), 3-15.
- McCormick, S. D. & Naiman, R. J. (1984). Osmoregulation in the brook trout, *Salvelinus fontinalis*-II. Effects of size, age and photoperiod on seawater survival and ionic regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 79A (1), 17-28.
- McCormick, S. D. & Saunders, R. L. (1987). Preparatory physiological adaptations for marine life in salmonids: osmoregulation, growth and metabolism. *American Fisheries Society Symposium*, 1, 211-229.
- McCormick, S. D., Moyes, C. D. & Ballantyne, J. S. (1989). Influence of salinity on the energetics of gill and kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 6 (4), 243-254. 10.1007/bf01875027
- McCormick, S. D. (1993). Methods for Nonlethal Gill Biopsy and Measurement of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50, 656-658.
- McCormick, S. D. et al. (1998). Movement, migration, and smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55 (1), 77-92.
- McCormick, S. D. (2009). Evolution of the hormonal control of animal performance: Insights from the seaward migration of salmon. *Integrative and Comparative Biology*, 49 (4), 408-422.
- McCormick, S. D. (2013). 5 - Smolt Physiology and Endocrinology. I: McCormick, S. D., Farrell, A. P. & Brauner, C. J. red. *Fish Physiology*, b. 32, s. 199-251: Academic Press.
- Metcalf, D. et al. (2000). Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature*, 405 (6790), 1069-1073.
- Mjaaland, S. et al. (1997). Genomic characterization of the virus causing infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): an orthomyxo-like virus in a teleost. *Journal of Virology*, 71 (10), 7681-7686.
- Mo, Z. et al. (2017). Effects of body weight on the growth and physiology of *Salmo salar* L. during smoltification. *Aquaculture Research*, 48 (5), 2303-2315.
- Mosser, D. M. & Zhang, X. (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological Reviews*, 226 (1), 205-218.
- Noble, C. et al. (2018). Verferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd., 328.
- Nolan, T., Huggett, J. F. & Sanchez, E. (2013). Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR). LGC.
- Nylund, A. et al. (2003). Emergence and maintenance of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Europe: a new hypothesis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56 (1), 11-24.

- Nylund, A. et al. (2007). Transmission of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in farmed populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Archives of Virology*, 152 (1), 151-179.
- Nørstebø, S. F. et al. (2018). Aliivibrio salmonicida requires O-antigen for virulence in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Microbial Pathogenesis*, 124, 322-331.
- O'Byrne-Ring, N. et al. (2003). Changes in mucus cell numbers in the epidermis of the Atlantic salmon at the onset of smoltification. *Journal of Fish Biology*, 63 (6), 1625-1630.
- OIE. (2018). *OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal*. Online. Tilgjengelig fra: [http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre\\_isav.htm](http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre_isav.htm) [Lest 21.03.2019].
- Oswald, I. P. et al. (1992). Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma induced activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89 (18), 8676-8680.
- Overturf, K. et al. (2010). Relationships between growth and disease resistance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 33 (4), 321-329.
- Palmer, D. C. & Restifo, N. P. (2009). Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends in Immunology*, 30 (12), 592-602.
- Parry, G. (1958). Size and Osmoregulation in Salmonid Fishes. *Nature*, 181, 1218.
- Pelis, R. M. & McCormick, S. D. (2001). Effects of Growth Hormone and Cortisol on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> Cotransporter Localization and Abundance in the Gills of Atlantic Salmon. *General and Comparative Endocrinology*, 124 (2), 134-143.
- Pelis, R. M. & McCormick, S. D. (2003). Fin development in stream- and hatchery-reared Atlantic salmon. *Aquaculture*, 220, 525-536.
- Pellertier, D. & Besner, M. (1992). The effect of salty diets and gradual transfer to sea water on osmotic adaptation, gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activation, and survival of brook charr, *Salvelinus fontinalis*, Mitchell. *Journal of Fish Biology*, 41 (5), 791-803.
- Perry, S. F. et al. (2006). Fooling a freshwater fish: how dietary salt transforms the rainbow trout gill into a seawater gill phenotype. *Journal of Experimental Biology*, 209 (23), 4591-4596.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29 (9), 2002-2007.
- Philip, A. M. & Vijayan, M. M. (2015). Stress-Immune-Growth Interactions: Cortisol Modulates Suppressors of Cytokine Signaling and JAK/STAT Pathway in Rainbow Trout Liver. *PLOS ONE*, 10 (6).
- Philip, A. M. et al. (2018). Extended fasting does not affect the liver innate immune response in rainbow trout. *Developmental & Comparative Immunology*, 79, 67-74.
- Piazzon, M. C. et al. (2015). Carp IL10 has Anti-inflammatory activities on phagocytes, promotes proliferation of memory T-cells, and regulates B-cell differentiation and antibody secretion. *The Journal of Immunology*, 194, 187-199.
- Piazzon, M. C., Lutfalla, G. & Forlenza, M. (2016). IL10, A tale of an evolutionarily conserved cytokine across vertebrates-. *Critical reviews in immunology*, 36 (2), 99-129.
- Plarre, H. (2011). *Infectious salmon anaemia virus (ISAV): Evolution, genotyping, reservoirs and transmission* Bergen: University of Bergen, Institutt for biovitenskap.
- Pontigo, J. P. et al. (2016). Identification and expressional analysis of NLRC5 inflammasome gene in smolting Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & Shellfish Immunology*, 58, 259-265.
- Ricker, E. W. (1975). Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada*, 191 (1975), 1-382.
- Rico-Bautista, E. et al. (2007). In Vivo Transcript Profiling and Phylogenetic Analysis Identifies Suppressor of Cytokine Signaling 2 as a Direct Signal Transducer and Activator of Transcription 5b Target in Liver. *Molecular Endocrinology*, 21 (1), 293-311.
- Rikardsen, A. H. (2000). Effects of Floy and Soft V1alpha Tags on Growth and Survival of Juvenile Arctic Char. *North American Journal of Fisheries Management*, 20 (3), 720-729.

- Rimstad, E. et al. (2011). Infectious Salmon Anaemia. I: Woo, P. T. K. & Bruno, D. W. red. *Fish Diseases and Disorders*, b. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, s. 143-165. Oxfordshire: CAB International.
- Ritchie, R. J. et al. (2009). Comparative virulence of Infectious salmon anaemia virus isolates in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 32 (2), 157-171.
- Roberts, R. J. & Pearson, M. D. (2005). Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 28 (7), 383-390.
- Robertsen, B., Trobridge, G. & Leongt, J.-A. (1997). Molecular cloning of double-stranded RNA inducible MX genes from atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Developmental & Comparative Immunology*, 21 (5), 397-412.
- Robertsen, B. (2006). The interferon system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20 (2), 172-191.
- Robertsen, B. (2018). The role of type I interferons in innate and adaptive immunity against viruses in Atlantic salmon. *Developmental & Comparative Immunology*, 80, 41-52.
- Salman, N. A. & Eddy, F. B. (1987). Response of chloride cell numbers and gill Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase activity of freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to salt feeding. *Aquaculture*, 61 (1), 41-48.
- Salman, N. A. & Eddy, F. B. (1988). Effect of dietary sodium chloride on growth, food intake and conversion efficiency in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture*, 70 (1), 131-144.
- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3, 1101.
- Shaw, H. M. et al. (1975). Effect of dietary sodium chloride on growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 32, 1813-1819.
- Shephard, K. L. (1994). Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4 (4), 401-429.
- Sheridan, M. A., Woo, N. Y. S. & Bern, H. A. (1985). Changes in the rates of glycogenesis, glycogenolysis, lipogenesis, and lipolysis in selected tissues of the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) associated with parr-smolt transformation. *Journal of Experimental Zoology*, 236 (1), 35-44.
- Sheridan, M. A. (1986). Effects of thyroxin, cortisol, growth hormone, and prolactin on lipid metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during smoltification. *General and Comparative Endocrinology*, 64 (2), 220-238.
- Skjesol, A. et al. (2014). Functional conservation of suppressors of cytokine signaling proteins between teleosts and mammals: Atlantic salmon SOCS1 binds to JAK/STAT family members and suppresses type I and II IFN signaling. *Developmental & Comparative Immunology*, 45 (1), 177-189.
- Sobhkhez, M., Krasnov, A. & Robertsen, B. (2018). Transcriptome analyses of Atlantic salmon muscle genes induced by a DNA vaccine against salmonid alphavirus, the causative agent of salmon pancreas disease (PD). *PLOS ONE*, 13 (10).
- Solbakken, V. A., Hansen, T. & Stefansson, S. O. (1994). Effects of photoperiod and temperature on growth and parr-smolt transformation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and subsequent performance in seawater. *Aquaculture*, 121 (1), 13-27.
- Spares, A. D. et al. (2015). A critical review of marine adaptability within the anadromous Salmoninae. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 25 (3), 503-519.
- Speilberg, L., Evensen, Ø. & Dannevig, B. H. (1995). A Sequential Study of the Light and Electron Microscopic Liver Lesions of Infectious Anemia in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Veterinary Pathology*, 32 (5), 466-478.
- Stefansson, S. O., Naevdal, G. & Hansen, T. (1989). The influence of three unchanging photoperiods on growth and parr-smolt transformation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Biology*, 35 (2), 237-247.
- Stefansson, S. O. et al. (2005). Fiskevelferdsmessig vurdering av produksjon av 0-års smolt: Vitenskapskomiteen for mattrygghet.

- Stefansson, S. O. et al. (2012). Growth, osmoregulation and endocrine changes in wild Atlantic salmon smolts and post-smolts during marine migration. *Aquaculture*, 362, 127-136.
- Strand, J. E. T., Johnsen, H. K. & Arnesen, A. M. (2007). Comparison of parr-smolt transformation in hatchery reared offspring of one domesticated and two wild populations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 273 (2), 250-256.
- Strand, J. E. T., Hazlerigg, D. & Jørgensen, E. H. (2018). Photoperiod revisited: is there a critical day length for triggering a complete parr-smolt transformation in Atlantic salmon *Salmo salar*? *Journal of Fish Biology*. 2018: 93:440-448.
- Sundell, K. S. & Sundh, H. (2012). Intestinal fluid absorption in anadromous salmonids: importance of tight junctions and aquaporins. *Frontiers in Physiology*, 3, 13.
- Sundh, H. et al. (2014). Development of intestinal ion-transporting mechanisms during smoltification and seawater acclimation in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, 85 (4), 1227-1252.
- Thorud, K. E. & Djupvik, H. O. (1988). Infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 8, 109-111.
- Thrush, M. A., Duncan, N. J. & Bromage, N. R. (1994). The use of photoperiod in the production of out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture*, 121 (1), 29-44.
- Torstensen, B. E. et al. (2008). Novel production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. *Aquaculture*, 285 (1), 193-200.
- Tort, L., Balasch, J. C. & Mackenzie, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Immunologia*, 22 (3), 277-286.
- Urke, H. A. et al. (2010). Seawater tolerance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., brown trout, *Salmo trutta* L., and *S. salar* × *S. trutta* hybrids smolt. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36 (4), 845-853.
- Usher, M. L., Talbot, C. & Eddy, F. B. (1991). Effects of transfer to seawater on growth and feeding in Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 94 (4), 309-326.
- Veiseth, E. et al. (2006). Accelerated recovery of Atlantic salmon (*Salmo salar*) from effects of crowding by swimming. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 144 (3), 351-358.
- Wang, T. et al. (2010). Identification of suppressor of cytokine signalling (SOCS) 6, 7, 9 and CISH in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and analysis of their expression in relation to other known trout SOCS. *Fish & Shellfish Immunology*, 29 (4), 656-667.
- Woo, N. Y. S., Bern, H. A. & Nishioka, R. S. (1978). Changes in body composition associated with smoltification and premature transfer to seawater in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and King salmon (*O. tshawytscha*). *Journal of Fish Biology*, 13 (4), 421-428.
- Workenhe, S. T. et al. (2007). Demonstration of infectious salmon anaemia virus (ISAV) endocytosis in erythrocytes of Atlantic salmon. *Virology journal*, 4, 13-13.
- Workenhe, S. T. et al. (2010). The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses. *Molecular Immunology*, 47 (16), 2525-2536. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.06.009>
- Wu, H. et al. (2015). Fish stress become visible: A new attempt to use biosensor for real-time monitoring fish stress. *Biosensors and Bioelectronics*, 67, 503-510.
- Xu, C. et al. (2012). Gene expression studies of host response to Salmonid alphavirus subtype 3 experimental infections in Atlantic salmon. *Veterinary Research*, 43 (1), 78.
- Yoshimura, A., Naka, T. & Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature Reviews Immunology*, 7, 454.
- Zou, J. & Secombes, C. J. (2016). The function of fish cytokines. *Biology*, 5 (23).
- Zydlewski, G. B. & Zydlewski, J. (2012). Gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase of Atlantic salmon smolts in freshwater is not a predictor of long-term growth in seawater. *Aquaculture*, 362-363, 121-126.



## **6. Appendiks**

**Appendiks 1:** Reagenser

**Appendiks 2:** Vekt, kondisjonsfaktor og mortalitet etter SVT

**Appendiks 3:** Individuelle Ct-verdier for TNF- $\alpha$ , Mx, IL-10, SOCS1, SOCS2, EF1 $\alpha\beta$  og  $\beta$ -actin

**Appendiks 1**

**Reagenser**

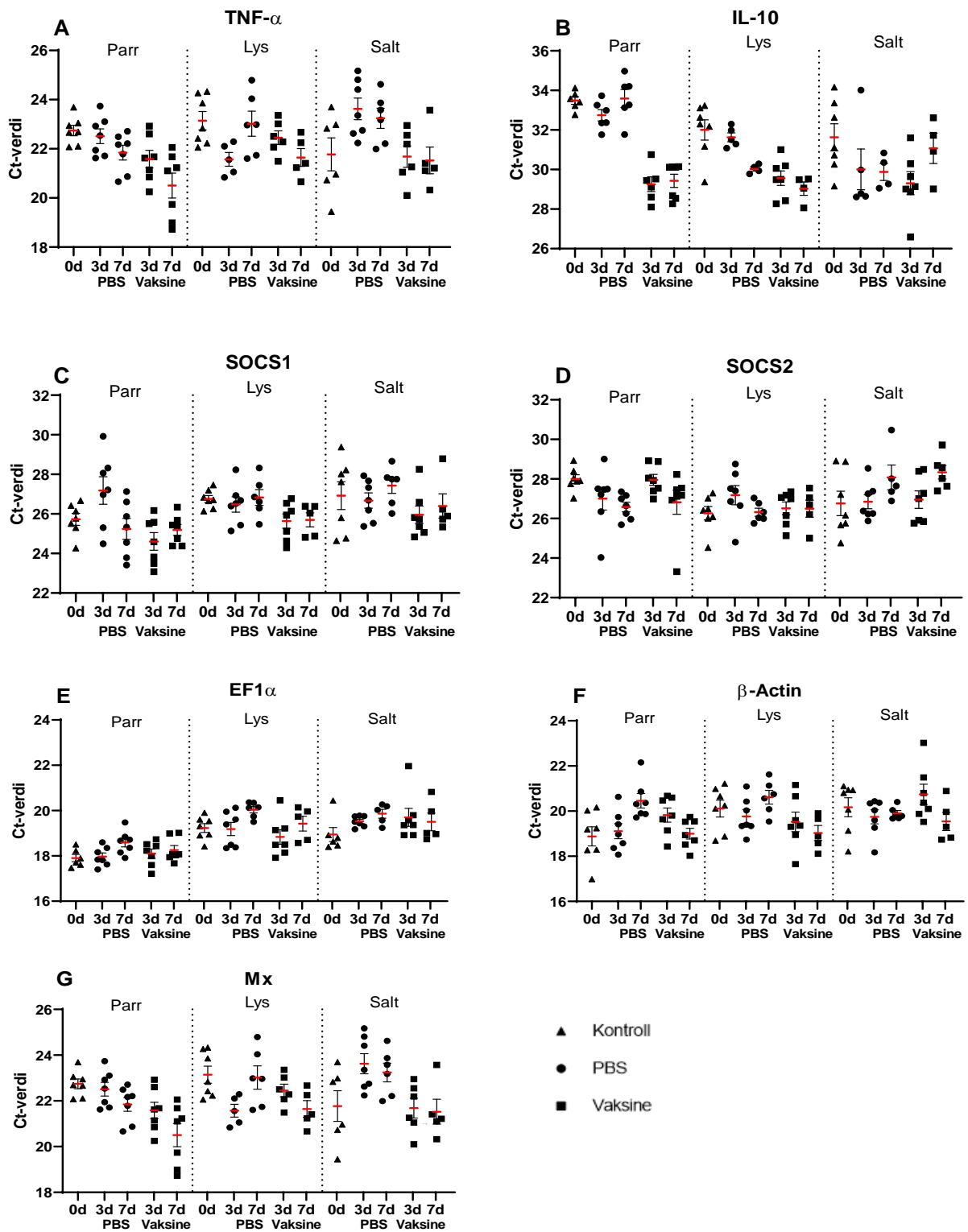
<b>Reagenser</b>	<b>Produsent</b>	<b>Lot/Batchnr</b>
ALPHA JECT micro 7 ILA	PHARMAQ AS	13163
Ambion Turbo DNA-free kit	Life Technologies	00695531
Benzoak Vet. (200 mg bezokain/ml 20%)	A.C.D Pharmaceuticals AS	
Chloride standard 100 mM	Multical, Bayer HealthCare	
Combined acid buffer	Sherwood Scientific Ltd	
Glycogen Assay Kit (MAK016)	Sigma-Aldrich	
Nuclease-Free Water	Ambion	1611317
PBS (Fosfatbufret saltvann)	Sigma-Aldrich	RNBG2903
Primere	Sigma-Aldrich	-----
QIAzol® Lysis Reagent	QIAGEN	557015613
RevertAid First Strand cDNA synthesis kit	Termo Scientific Inc.	00644489
RNAlater	Ambion	-----
RNeasy Mini Kit	QIAGEN	160010060
Sso Advanced Universal Sybr® Green Supermix	Bio-Rad	006390

## Appendiks 2

Vekt og K-faktor av fisk brukt i 24-timers SVT i februar, mars og mai og etter 7 dager SVT i mai. N = 7-10. Data er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM

Tidspunkt	Gruppe	Vekt [g]	K-faktor	Mortalitet [%]
Februar (24 t)	-	42,2 $\pm$ 1,60	1,2 $\pm$ 0,10	0
Mars (24 t)	Lys	54,8 $\pm$ 6,36	1,2 $\pm$ 0,01	0
	Salt	67,6 $\pm$ 1,70	1,1 $\pm$ 0,03	0
Mai (24 t)	Lys	84,2 $\pm$ 4,08	1,2 $\pm$ 0,04	46
	Salt	121,4 $\pm$ 13,50	1,1 $\pm$ 0,03	0
Mai (7 dager)	Lys	85,0 $\pm$ 4,70	1,0 $\pm$ 0,02	20
	Salt	127,1 $\pm$ 5,65	1,0 $\pm$ 0,02	10

Appendiks 3



Individuelle Ct-verdier for immungener i hodenyre av TNF- $\alpha$ , Mx, IL-10, SOCS1 og SOCS2 og referansegener EF1 $\alpha$  og  $\beta$ -actin for ikke-injisert parr (februar) og smolt som var smoltifiser med endring i fotoperiode (lys) eller saltholdig fôr (salt). (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-10, (C) SOCS1, (D) SOCS2, (E) EF1 $\alpha$ , (F)  $\beta$ -actin og (G) Mx. Fisk ble injisert med PBS eller vaksine og prøvetatt ved 3 og 7 dager etter injeksjon. Forandring i genuttrykk ble målt ved RT-qPCR (SYBR® Green). Gjennomsnittlig Ct-verdi er markert med rød linje (n= 4-7).