

FAGLIG SLUTTRAPPORT

FHF901432 Saltstimulert og aldrende smolt: Kompromitterer vi smoltkvalitet og postsmoltens velferd i dagens lakseoppdrett?

16. juni, 2021

Prosjektleder

Prof. Even H. Jørgensen

UiT Norges arktiske universitet

Prosjektdeltagere

Prof. David Hazlerigg

UiT Norges arktiske universitet

Dr. Juan Fuentes

CCMar, Universitetet i Algarve, Portugal

Dr. Marco António Campinho

CCMar, Universitetet i Algarve, Portugal

Anja Striberny (postdoc)

UiT Norges arktiske universitet

Vilma Duarte (PhD student)

CCMar, Universitetet i Algarve, Portugal¹

Pasqualina Gaetano (PhD student)

CCMar, Universitetet i Algarve, Portugal²



UiT / THE ARCTIC UNIVERSITY
OF NORWAY

1. Finansiert av CCMar
2. Finansiert av Portuguese Science Foundation PhD grant

Innholdsfortegnelse

1. Sammendrag (Summary).....	3
Norsk.....	3
English.....	4
2. Innledning.....	5
Faglig bakgrunn.....	5
Prosjektomfang og organisering.....	6
3. Problemstilling og formål.....	7
4. Gjennomføring, resultater, diskusjon, konklusjon.....	8
4.1 Beskrivelse av design, gjennomføring av forsøk og metodikk.....	8
4.2 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon.....	16
5. Hovedfunn.....	36
6. Leveranser.....	37
7. Sluttkommentar.....	38
Referanser.....	39

1. SAMMENDRAG

Norsk

I naturen er det den økte daglengden om våren som utgjør det utløsende stimuli av lakseungens smoltifisering, og en komprimert lang dag – kort dag – lang dag lysbehandling (heretter 'lysstimulering') har vært dominerende i oppdrett av laks for å stimulere og tidfeste smoltifiseringen. I den senere tid har det imidlertid blitt mer og mer vanlig å stimulere smoltifiseringen vha. såkalte smoltifiseringsfôr, som inneholder forøkte mengder av salt og, som i fôret brukt i dette prosjekter, forøkte mengder av aminosyren tryptofan i tillegg (heretter 'diettstimulering'). En fullverdig smoltifisering har avgjørende betydning for fiskens velferd og prestasjon etter overføring til sjø, og vår hypotese var at diettstimulering ikke gir en fullverdig smolt og derved en fisk med suboptimal velferd og prestasjon etter overføring til sjø. Vi karakteriserte derfor smoltutvikling og prestasjon etter sjøsetting hos to størrelsesgrupper av smolt (tilsvarende 0+ og 1+ smolt i oppdrettsnæringen), hvor sjøvannstilpasning ble stimulert med lys eller diett eller med en kombinasjon av lys og diett, alle disse i relasjon til en ubehandlet kontroll. Vi fant en økt hypo-osmoregulatorisk evne hos fisk i alle behandlingsgruppene, men den sterkeste forbedringen ble sett i diettstimulerte grupper. Syv dager etter overføring til sjø hadde fisk i alle grupper plasma osmolalitetsverdier som var godt innenfor det som regnes som normalt hos fullt sjøvannstilpasset fisk. Bare fisk som hadde blitt lysstimulert (med eller uten diettstimulering) hadde en reduksjon i kondisjonsfaktor, noe som indikerer at bare disse hadde gjennomgått en fullverdig smoltifisering. Sjøvannstoleranse reflekterte ikke prestasjon i sjø: Best tilvekst og appetitt ble funnet i gruppen som ble gitt en kombinasjon av lys- og diettstimulering, mens kontrollgruppen (ubehandlet) hadde den laveste tilvekst og appetitt etter overføring til sjø. De to behandlingsgruppene som bare ble gitt lysbehandling eller diettbehandling hadde lik tilvekst og appetitt, intermediert sammenlignet med de andre behandlingsgruppene. Resultatene var like for begge størrelsesgruppene. Tarmpermeabilitet (målt med elektrofysiologi) var ikke påvirket av behandling, men det ble observert at både lys- og diettstimulering hadde en positiv effekt både på tarmens hypoosmoregulatoriske evne og fôropptaksflate. Denne effekten ble ytterligere forbedret av kombinasjonen lys- og diettstimulering. Tarmtranskriptomet responderte i større grad på lys- enn på diettstimuleringen. Sjøvannsoverføring førte til kraftige endringer i tarmtranskriptom, endringer som var ganske like i alle behandlingsgrupper. Forskjeller i prestasjon etter sjøsetting indikerte imidlertid at lys- og diettstimulering delvis utløste ulike preparatoriske mekanismer og at disse var additive. Det ble ikke funnet forskjeller mellom diett- og lysstimulerte grupper på motstandsdyktighet mot ILA. Et nytt forsøk ble gjennomført i 2019 for på nytt å sammenligne smoltutvikling og prestasjon i sjø hos lys- og diettstimulering, men også for å prøve å avsløre mekanismer utløst av diettbehandlingen kontra de som ble utløst av lysbehandling (blant annet hormonelle). Resultatene på smoltutvikling og prestasjon etter overføring til sjø var identiske med de som ble funnet i forsøk 1. Overraskende nok ble det ikke funnet forskjeller i plasmanivå av veksthormon og kortisol mellom behandlingsgruppene og det er derfor, så langt, ingen informasjon om mekanismer

som utløses av diettstimulering, annet enn stimulering av sjøvannstoleranse. Uttrykk av antatte orexigene og anorexigene appetittregulatorer korresponderte ikke med forskjeller mellom behandlingsgruppene i appetitt. Analyser av genuttrykk i gjelle, med utgangspunkt å produsere en chip med et utvalg av relevante gener som kan predikere prestasjon i sjøvann hos smolt, har gitt oppløftende resultater som det skal arbeides videre med i et nytt FHF-finansiert prosjekt (901589) som er pågående.

English

A photoperiodic cue of long-short-long day ('light stimulation'), mimicking the cue for stimulating and timing of smolting in the wild, has been dominating smolt production in salmon farming. However, it has now become increasingly common to use a dietary salt and amino acid, feed additive ('dietary stimulation'), to prepare pre-smolts for seawater (SW) transference, without light treatment. A completed smolting is pivotal for proper SW performance and we hypothesized that the dietary treatment fails to evoke all physiological preparations triggered by the light-stimulated, systemic endocrine signaling characteristic in true smolting, and hence, compromised welfare and performance after SW transfer. To this end, we characterized smolt development and SW performance in two size classes of parr (representative for production of 0+ and 1+ smolts in the industry) prepared for SW by light or diet, by light and diet in combination, all in relation to an untreated control. We found an improvement of hypoosmoregulatory ability in all groups in both size classes during the smolting period, albeit a bit better in the dietary treated groups. Seven days after SW transfer all groups had plasma osmolality values that was well within those that is expected for a SW tolerant smolt. However, only light stimulated groups (with and without dietary treatment) had a reduction in condition factor during the treatment period in FW, indicating that only these were 'true' smolts. SW tolerance did not reflect SW performance: The best growth and appetite was seen in the groups that were treated with a combination of light and diet, whereas the non-treated group (continuous light throughout) had the lowest appetite and growth. In comparison, growth and appetite was intermediate, and not different between groups that were light and diet only treated. All responses were similar in the two size groups. Gut permeability (measured with electrophysiology) was not much effected by the treatments. However, it was observed that both light- and dietary stimulation positively affected intestine hypoosmoregulatory ability and area for feed assimilation, and that this was enhanced by the combination of light- and dietary treatments. The intestinal transcriptome was more strongly shaped by light treatment than by the use of different diets. The most distinct change in the transcriptome occurred following seawater transference with similar effects on all treatment groups. The results indicate that both light and diet stimulate seawater tolerance. However, differences in performance after SW transfer indicate that light- and dietary stimulation partly stimulated separate, preparatory mechanisms and that these were additive. There were no differences between light- and dietary stimulated groups in resistance to the ILA disease. A new experiment was performed in 2019, in which we compared smolt development and SW performance

between light and diet only treated groups. With this experiment we also attempted to reveal mechanisms stimulated by the diet vs. those stimulated by light. Results on smolt development and SW performance was identical with those found in experiment 1. Surprisingly, no differences were found between the two treatment groups in plasma levels of growth hormone and cortisol. It is therefore, so far, no information revealed on mechanisms stimulated by the dietary treatment, other than stimulation of SW tolerance. Changes in expression of putative orexigenic and anorexigenic appetite regulators in brain, stomach and intestine did not correspond to differences in appetite seen between the two treatment groups. Analyses of expression of selected genes in the gill for making a chip that can be used to predict subsequent performance in the sea of smolt are promising and a good basis for further studies in a new, ongoing project financed by FHF (901589).

2. INNLEDNING

Faglig bakgrunn

I oppdrett av Atlantisk laks (*Salmo salar*) sliter en med flere utfordringer. Blant annet er dødelighet etter utsett i sjø i gjennomsnitt på ca. 17 % og vesentlige årsaker til dette kan være suboptimal smoltkvalitet og infeksjoner [1]. Denne situasjonen synliggjør to problemer; 1) alt for mange fisk som overføres til sjøvann har en for dårlig smoltkvalitet og 2) det er behov for pålitelige, enkle og kostnadseffektive biologiske markører som kan brukes til å påvise fullgod smoltkvalitet. Smoltifisering, eller parr-smolt transformasjon (PST), er en prosess som fører til at lakseungen gjennomgår en fenotypisk endring fra å være en ferskvannslevende parr til å bli en sjøvannstolerant smolt. PST omfatter mange biologiske endringer som er adaptive for livet i sjøvann (SV), hvor utviklingen av gjellas evne til sekresjon av ioner er særlig viktig, og kanskje derfor den mest studerte [2]. Vi tror at PST hos ville lakseunger initieres engang på ettersommeren, og at det skjer prosesser gjennom vinteren, når dagen er kort, som gjør at den siste fasen av PST (den delen vi kjenner best) starter opp når daglengden blir lengre om våren. PST i naturen er altså en sesongstyrt prosess som er regulert av daglengden. På en slik måte kan den migrere til sjøvann på den tiden av året når temperatur og mattilgang er gunstigst [2]. PST er regulert og kontrollert av flere hormoner, hvorav veksthormon (GH), thyroidhormoner (TH) og kortisol er de mest studerte, og kanskje de viktigste. Starten på sjøoppholdet er en kritisk fase og en fullverdig PST er avgjørende for hvordan de greier seg i sjøen.

I oppdrett av laks har det vært vanlig å stimulere og tidfeste PST ved å gi lakseungen, når den har nådd en tilstrekkelig størrelse, en kortdagsbehandling (12 timer lys eller mindre, KD), hvoretter de tilbakeføres til kontinuerlig lys (LL). Dette (kalt 'lysstimulering') er en etterligning av de daglengdeendringene som den i naturen opplever gjennom året, men «sesongene» kan komprimeres i oppdrett pga. høye temperaturer og ubegrenset mattilgang. Nå er det imidlertid blitt mer og mer vanlig å bruke et diettkonsept til å stimulere PST, hvor lakseungen blir gitt et fôr med økte mengder salt,

eventuelt i kombinasjon med salttilsetning i ferskvannet, mens de holdes på kontinuerlig lys ('diettstimulert'). Det er vist at saltet stimulerer kalsium-sensitive reseptorer (kjent som salinitets sensorer), som i sin tur stimulerer utvikling av gjellas evne til ione-sekresjon og fiskens hypoosmoregulerende evne [3]. Denne utviklingen kan en måle gjennom fiskens produksjon av sjøvannsformen av Na^+, K^+ -ATPase (NKA) pumpe i gjella og osmolaliteten i fiskene blod etter sjøvannstester, noe som vært et dominerende mål på om fisken er klar for overføring til sjø i oppdrettsnæringen. Om dette er et tilstrekkelig mål har vi studert i et avsluttet NFR FRIMEDBIO prosjekt ('Light & Salt - Thyroid hormone deiodinase paralogues & the evolution of complex life-history strategy in salmonids'; <https://prosjektbanken.forskningsradet.no/project/FORISS/241016?Kilde=FORISS&distribution=Ar&chart=bar&calcType=funding&Sprak=no&sortBy=score&sortOrder=desc&resultCount=30&offset=0&Fritekst=smoltification>). Vi fant at selv om ubehandlede lakseunger (hold på kontinuerlig lys), etter å ha nådd en tilstrekkelig størrelse, utviklet sjøvannstoleranse (og økt mengde av sjøvannsformen av NKA pumpe), var overføring til sjø assosiert med en kraftig respons i gjella som inkluderte aktivering av stress-relaterte gener. Denne stressresponsen så vi ikke i lysstimulert fisk som hadde samme sjøvannstoleranse [4]. Funnet viser at en kortdagsbehandling er nødvendig for at fisken skal utvikle en fullverdig sjøvannsfenotype, og at evnen til å ione- og osmoregulere i sjøvann ikke er et tilstrekkelig mål på om fisken er fullt ut klar for overføring til sjø. Dette igjen støtter tidligere funn som viser at en fullverdig PST omfatter multifunksjonelle endringer som omfatter funksjonene til mange vev og organer [2], noe som trolig ikke oppnås ved bruk av diettstimulering. Med bakgrunn i at lysstyring i smoltproduksjonen i laksenæringen i større og større grad erstattes med diettstimulering ble hovedmålet med dette prosjektet å sammenligne smoltutvikling og prestasjon etter sjøsetting hos lys- og diettstimulert smolt. Dette ble gjort på to størrelsesgrupper smolt, tilsvarende de som i næringen betegnes som 0+ (≈ 120 g) og 1+ (≈ 300 g).

Prosjektomfang og organisering

Prosjektet omfattet et stort forsøk med lakseunger klekket fra egg levert av AquaGen, den største eggleverandør i norsk oppdrettsnæring. I forsøket sammenlignet vi smoltutvikling og prestasjon etter sjøsetting hos 4 behandlingsgrupper i hver størrelsesgruppe; en ubehandlet kontroll gruppe (LL-LL), en lysstimulert gruppe (KD-LL), en diettstimulert gruppe (uten lysstimulering) og en gruppe som ble både lys- og diettstimulert. Målsetning med dette forsøket var å sammenligne effekten av lys- og diettstimulering på smoltutvikling og postsmoltens prestasjon etter sjøsetting. Samtidig ble det gjennomført et immuniserings- og smitteforsøk med 'overskuddsfisk' fra henholdsvis lys- og diettstimulert fisk i hovedforsøket for å sammenligne mulige effekter av behandling på immunrespons etter vaksine-immunisering og resistens mot ILA etter overføring til sjø. Etter dette ble det gjennomført et oppfølgingsforsøk, hvor smoltutvikling og prestasjon etter sjøsetting igjen ble sammenlignet hos en

diettstimulert og en lysstimulert gruppe. I tillegg ble det gjort analyser av hormonelle responser på behandling, analyser av genuttrykk fra sentrale og perifere appetittregulatorer, karakterisering av sammensetning av tarmmikrobiota under og etter smoltifisering og analyser av genuttrykk i gjelle for å skaffe mer kunnskap om mulig utvikling av 'gjellechip' for predikering av prestasjon i sjøvann.

Ansvar/roller

UiT Norges arktiske universitet	Prosjektledelse, forsøksgjennomføring, tradisjonell smoltfysiologi
CCMar	Tarmfunksjon; ione- og osmoregulering, histologi, transkriptomikk
Havbruksstasjonen i Tromsø	Forsøksgjennomføring
Skretting	Produksjon av forsøksfôr

Prosjektet er ledet av professor Even H. Jørgensen, UiT Norges arktiske universitet, som har lang erfaring med forskning på fysiologiske mekanismer knyttet til smoltifisering. Professor David Hazlerigg (fra samme universitet) er fysiolog med spesiell fokus på kronobiologi (biologiske sesongrytmer). Eksterne samarbeidspartnere er Dr. Juan Fueentes og Dr. Marco António Campinho, CCMar, Universitetet I Algarve, som arbeider med henholdsvis ione- og osmoregulering i tarm og thyroideahormonenes rolle i metamorfose i fisk. En post-doc, Anja Striberny, er ansatt på prosjektet, mens to studenter på CCMar (Pasqualina Gaetano og Vilma Duarte) tar sine PhD studier på prosjektet. Skretting har vært industripartner og produsert forsøksfôret.

Referansegruppen for prosjektet består av Vibeke Vikeså (Skretting), Morten Lund (Åsen Settefisk), Marit Holmvaag Hansen (Cermaq) og Ingrid Gamlen (Pharmaq)

Sven M. Jørgensen (FHF) har deltatt på møter med referansegruppen.

3. PROBLEMSTILLING OG FORMÅL

Hovedmålet med dette prosjektet var å undersøke hvorvidt bruken av en spesialdiett, uten bruk av lysstyring, til produksjon av laksesmolt kompromitterer laksens prestasjon og velferd etter at den er overført til sjø og på dette grunnlag tilføre oppdrettsnæringen informasjon som vil kunne bidra til en forbedring av dagens situasjon med stor dødelighet i sjøfasen. Spesifikke mål er:

Forsøk 1) Sammenligne smoltutvikling (utvikling av hypoosmoregulerende evne (gjelle/tarm genekspresjon, sjøvannstester), sølvfarging, kondisjonsfaktor, tarmhistologi, tarm transkriptomikk) og

prestasjon etter sjøsetting (mortalitet, tilvekst, appetitt) hos to størrelsesgrupper av lakseunger som a) ikke ble gitt smoltstimuli (kontroll), b) gitt tradisjonell lysstimulering (lys), c) gitt diett uten lysstimulering (diett) og d) gitt både diett- og lysstimulering (diett + lys).

Forsøk 2) Sammenligne immunkompetanse og resistens mot infeksiøs lakseanemi (ILA) mellom lys- og diettstimulert smolt i sjøfasen.

Forsøk 3) Sammenligne smoltstimulerende mekanismer (veksthormon og kortisol), appetittregulerende mekanismer og appetitt i den tidlige fase av sjøoppholdet, tarm mikrobiota før og etter overføring til sjø hos lys- og diettstimulert smolt. I tillegg skal det arbeides vider med etablering av en ikke dødelig gjellechip gen-set for predikering av prestasjon etter sjøsetting.

Prosjektet har følgende leveranser:

- Vellykket gjennomføring av forsøk 1, samt analyser.
- Vellykket gjennomføring av forsøk 2, samt analyser.
- Avslutning av to masterprosjekter basert på resultater fra forsøk 1 og 2.
- Vellykket gjennomføring av forsøk 3, samt de fleste analyser.
- Transkriptomikkanalyser av tarm gjennomført.
- Presentasjon av prosjektet på flere seminarer (se liste)
- Analyser av tarm mikrobiota diversitet gjennomført.
- Vitenskapelig artikkel basert på resultater fra forsøk 1 publisert i Aquaculture.
- Første utkast til 2 publikasjoner (Portugisiske samarbeidspartnere, ionreregulering i tarm samt tarmhistologi).
- Populærvitenskapelig presentasjon av resultater fra forsøk 1 publisert i Kyst.no.
- Påbegynt 2 nye manus med resultater fra forsøk 3 (endokrinologi og gjelle transcriptomikk (gjellechip))
- Faglig sluttrapport etter retningslinjene til FHF

4. GJENNOMFØRING, RESULTATER, DISKUSJON, KONKLUSJON

4.1 Beskrivelse av design, gjennomføring av forsøk og metodikk

I alle forsøk ble det brukt to fôr, et normalfôr som ikke utløser sjøvannstilpasning og samme fôr tilsatt en økt mengde salter samt fritt tryptophan. Fôrsammensetning er gitt i Tabell 1.

Tabell 1. Sammensetning av smolt- og kontrollfôr.

Ingrediens	Smoltfôr (%)	Kontrollfôr (%)
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 ₂)	0,75	0
L-Tryptofan	0,4	0
Magnesiumklorid (MgCl ₂)	0,25	0
Total	100	100

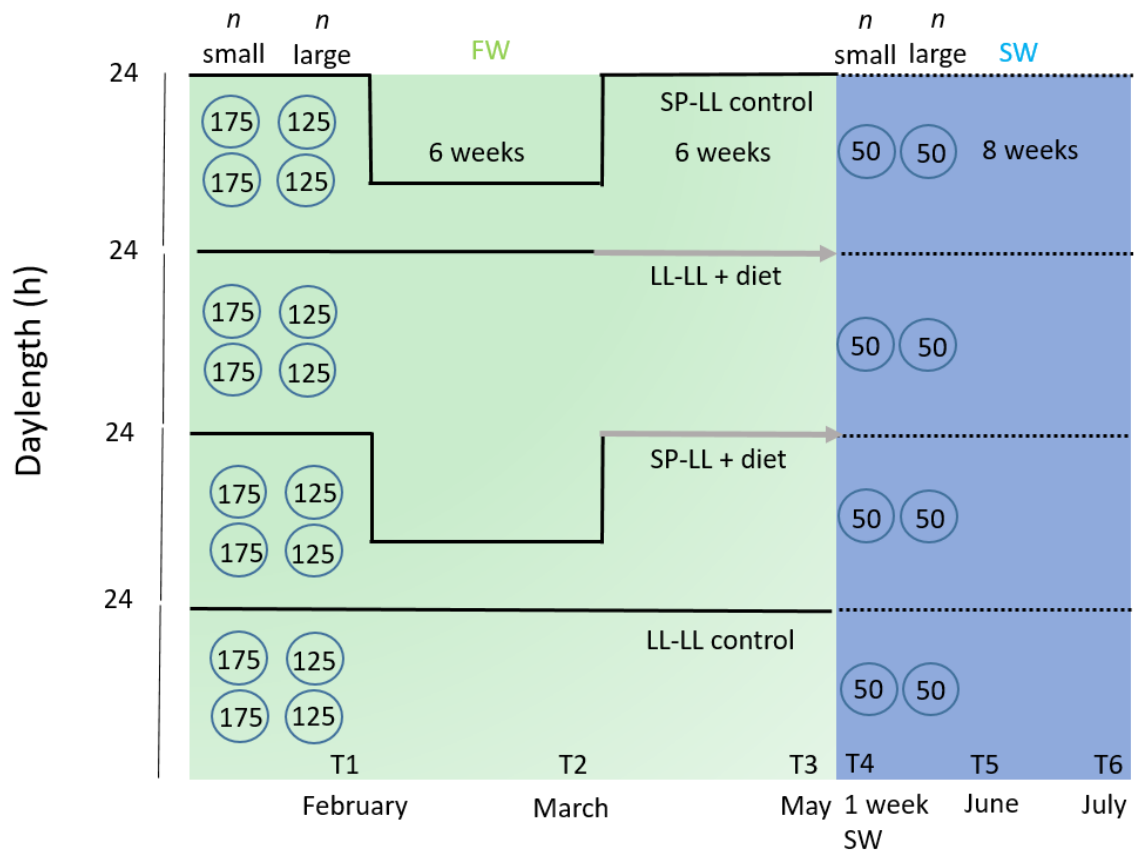
Forsøk 1

Hovedformål:

Studere effekten av lys- kontra diett (alene og i kombinasjon) som smoltifiseringssignal på smoltutvikling (morfologi, hypoosmoregulering, tarmhistologi) og appetitt/vekstprestasjon etter overføring til sjø.

En skjematisk presentasjon av design av forsøk 1 er gitt i Fig. 1. Befruktede lakseegg ble levert av AquaGen og inkubert og klekket på Havbruksstasjonen i Tromsø (HiT), hvor forsøket ble gjennomført. For å oppnå to størrelsesgrupper ble avkom delt i to grupper som ble holdt på ulike temperaturregimer, slik at vi ved oppstart av forsøket i februar 2018 (T1) hadde en gruppe med fisk med snittvekt på 40 g og en annen gruppe med snittvekt 130 g. Fra T1 til T2 var temperaturen 10 °C, mens den ble økt til 12 °C mellom T2 og T3. Alle hadde gått på kontinuerlig lys og kontinuerlig fôring med automat frem til forsøkstart. I forsøksperioden ble alle gruppene i perioden hvor noen grupper gikk på kort dag (7 timer dagslys) kun gitt fôr i de timene kortdagsgruppene hadde lys. I hver av behandlingsgruppene ble 20 tilfeldige fisk individmerket med utvendige Floy tags (Floy Tag & Mfg. Inc., Seattle, US; www.floytag.com). Ved hver av tidspunktene T1-T3 ble alle individmerkede fisk veid og lengdemålt, samt klassifisert for grad av sølvfarging (1 - godt synlige parrmerker, 2 - svakt synlige parrmerker og 3 - ikke synlige parrmerker). Deretter ble 5 fisk fra hver duplikat avlivet og vekt og lengdemålt, hvorefter en liten gjellebiopsi for analyse av genekspressjon av sjøvanns og ferskvannsformen av Na⁺, K⁺-ATPase (NKA) pumpa (henholdsvis NKA α1a og NKA α1b). I tillegg ble 5 fisk fra hver duplikat overført til

sjøvann (34 ‰ salinitet, 7 °C) i 24 timer, hvorefter de ble avlivet, veid og lengdemålt. Etter avliving ble det tatt en blodprøve fra kaudalvenen med hepariniserte vaccutainere. Prøvene ble oppbevart på is frem til sentrifugering. Plasma ble deretter pipettert ut og oppbevart på – 20 °C frem til analyse av osmolalitet vha. Fiske One-Ten Osmometer (Fiske Associates, MA, USA).



Figur 1. Skjematiske illustrasjon av forsøk 1 som viser de fire behandlingsgruppene i hver størrelsesgruppe. Grå piler representerer den perioden hvor diettgruppene ble gitt smoltifiseringsdietten (Tabell 1). Grønn og blå bakgrunn representerer henholdsvis ferskvann- og sjøfasen av forsøket og T1 - T6 de 6 prøvetidspunkter. Sirklene representerer kar og tallet i sirklene antall fisk.

Hos all fisk som ble avlivet i den minste størrelsesgruppen ble tarmen tatt ut og vasket i saline, hvorefter 2-3 cm tarm kaudalt fra blindsekkene og 2-3 cm anterielt fra ileorektale ventil ble dissekert ut for elektrofysiologisk karakterisering, NKA aktivitet, histologi og transkriptomikk.

Etter prøvetaking T3, ble 50 fisk fra hver behandlingsgruppe (inkludert alle individmerkede) overført til 8 kar med sjøvann (34 ‰ salinitet, 8 °C) og føret kontinuerlig med standard pelletfôr fra Skretting. Fôrintak ble målt 5 dager i uka vha. et silsystem som fanger opp ikke spist fôr. Etter 7 dager (T4) ble 10 fisk (umerkede) fra hver behandlingsgruppe avlivet, veid og lengdemålt, og blodtappet for senere analyser av plasma konsentrasjon av klorid og osmolalitet. Etter en og to måneder (T5 og T6) ble alle individmerkede fisk veid og lengdemålt.

Alle nevnte analyser er vel etablert i våre laboratorier på UiT og CCMar.

Forsøket ble godkjent av Matilsynet (FOTS ID 13891).

Forsøk 2

Hovedformål:

Sammenligne immunkompetanse hos lys- og diettstimulert smolt samt mottakelighet for sykdom etter overføring til sjø.

Forsøk 2 besto av et immuniseringsforsøk i ferskvannsfasen og et smitteforsøk etter overføring til sjøvann. Dette ble gjort på behandlingsgruppene lysstimulert og diettstimulert, stor fisk i forsøk 1. I immuniseringsforsøket ble 20 fisk fra hver behandlingsgruppe vaksinert intraperitonealt med 0,1 ml ALPHA JECT micro 7 ILA (batch 13163), AJM7, fra PHARMAQ AS. I tillegg ble ytterligere 20 fisk fra hver behandlingsgruppe injisert med 0,1 ml PBS (fosfatbufret saltvann). Før injeksjon ble fisk som skulle vaksineres fettfinneklipt mens fisken som ble injisert med PBS fikk en bit av halefinnen klipt av. Gruppene ble så fordelt i to separate kar med ferskvann på 12 °C. Fisken ble sultet etter vaksinerings. Tre og 7 døgn etter injisering ble 10 vaksinerte og 10 PBS-injiserte fisk avlivet for uttak av vevsprøver fra og hodenyre for kvantifisering av mRNA analyser av relevante immungener; tumor nekrosefaktor (TNF), Mx protein, interleukiner (IL) og interferoner (IFN) samt suppressor of cytokin signalisering (SOCS 1 og 2). (Tabell 2). Som ikke-injisert kontroll ble det tatt prøver fra 10 fisk i forsøk 1.

Det ble 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). For å sikre en riktig virusdose for bruk i smitteforsøket, ble det gjennomført et presmitteforsøk før gjennomføring av hovedsmitten. I forsøkene ble det benyttet et chilensk ILA virus-isolat (ILAV; PHARMAQ kode: ALV 321) som ble levert av PHARMAQ AS. Den 23. april ble i alt 60 fisk (snittvekt: 91g) overført fra Landanlegget på til 10°C ferskvann på Fiskehelselaboratoriet ved HiT. Fisken som ble brukt ble hentet fra alle behandlingsgruppene i den minste vektgruppen i forsøk 1. Disse ble gruppemerket i tre ulike grupper med alkaline blue ved bruk av en PanJet injector (Wright Dental, Dundee, UK). Etter merking ble tre grupper á 20 fisk injisert intraperitonealt (i.p) med tre ulike doser ILAV, alle i 0,1 ml fosfatbuffret saline. Etter smitte ble fisken overført til et 500 l kar med sjøvann og vedlikeholdsfôret med kommersielt fôr fra Skretting. Dødelighet ble daglig overvåket av ansatte ved fiskehelselaboratoriet. Forsøket ble avsluttet 27 dager etter injeksjon, da henholdsvis 100%, 90% og 90% av fisken hadde dødd. dødelighet i gruppe 1, 2 og 3 var oppnådd.

Tabell 2. Primersekvenser for qPCR, genbaknummer, PCR-effektivitet og referanser.

Gen	Retning	Primersekvens (5'-3')	Genbank nr.	Effektivitet [%]	Referanse
Mx	F	TGCAACCACAGAGGCTTTGAA	U66475	99,3	(Robertsen et al., 1997)
	R	GGCTTGGTCAGGATGCCTAAT			
TNF-α	F	TGCTGGCAATGCAAAAAGTAG	AY848945	100,7	(Ingerslev et al., 2006a)
	R	AGCCTGGCTGTAAACGAAGA			
IL-10	F	CCTTCTCCACCATCAGAGATTAC	EF165029.1	101,9	(S. Jenberie, upublisert)
	R	AACTTCAGGATGCTGTCCATAG			
SOCS1	F	TTCTTGATCCGGGATAGTCG	KF699315	100,0	(Skjesol et al., 2014)
	R	TGTTTCCTGCACAGTTCTCTG			
SOCS2	F	CACTGCCAACGAAGCCAAAAGAGAT	KF699316	100,0	(Skjesol et al., 2014)
	R	CAAACCTGCTTCAGCTTGGGCTTGA			
β-actin	F	CAGCCCTCCTTCCTCGGTAT	BT059604	100,1	(Julin et al., 2009)
	R	CGTCACACTTCATGATGGAGTTG			
EF1$\alpha$$\beta$	F	TGCCCCTCCAGGATGTCTAC	BG933853	99,4	(Sobhkhez et al., 2018)
	R	CACGGCCACAGGTACTG			
ISA (seg 8)	F	CTACACAGCAGGATGCAGATGT	AY151791	98,4	(Lauscher et al., 2011)
	R	CAGGATGCCGGAAGTCGAT			

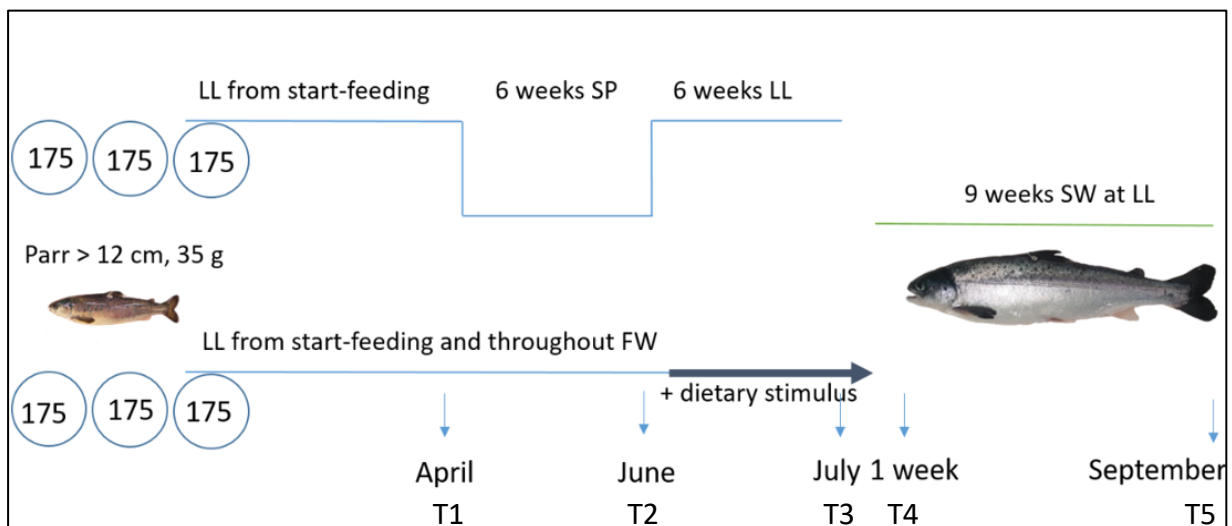
Hovedforsøket ble utført som presmitteforsøket, men med en lavere virusdose. Dette siden dødeligheten i presmitteforsøket var for høy. Totalt 281 fisk fra forsøk 1 (fra henholdsvis lys- og diettstimulerte grupper) ble gruppemerket med alkaline blue som i presmitteforsøket. Merkingen ble utført den 22. mars mens fisken ennå ble holdt på ferskvann. Fisken ble flyttet fra Landanlegget til Fiskehelselaboratoriet den 16. mai, hvor de etter akklimering ble smittet med ILAV den 22. mai. Fisken i gruppene ble injisert i.p. med 0,1 ml ILAV med en dose på $1,6 \times 10^2$ TCID₅₀/fisk, før de ble fordelt i tre 500 L kar med 10 °C sjøvann og vedlikeholdsfôret som vanlig. Etter smitte ble de to behandlingsgruppene fordelt i tre ulike kar for registrering av dødelighet (kar 1 og 2) og for uttak av hodenyre (kar 3) for påvisning av ILAV smitte dag 23 og 28 etter smitte. Karene ble sjekket minst to ganger daglig for død eller døende fisk. Dødfisk ble destruert og døende fisk ble avlivet og destruert. Det ble tatt prøver av levende fisk fra prøvetakningskaret 23 og 28 dager etter smitte for å bestemme om dødeligheten skyldes ILA sykdom. Ved avslutning av forsøket (dag 42) ble resterende fisk avlivet med overdose Benzoak og tatt prøver av. Smitteforsøkene ble godkjent av mattilsynet (FOTS ID 14495).

Forsøk 3

Hovedformål:

- 1) Smoltutvikling og prestasjon i sjø hos lys- og diettstimulert smoltifisering.
- 2) Genuttrykk av appetittregulatorer i hjerne, mage og tarm samt mikrobiell sammensetning i tarm under lys- og diett stimulert smoltifisering og etter overføring til sjøvann.
- 4) Genuttrykk i gjelle som koder for prestasjon etter overføring til sjø (gjellechip).

Også dette forsøket ble utført på HiT, med avkom av befruktete egg levert av Aquagen. Disse ble etter startfôring holdt på kontinuerlig lys og fôret med kommersielt Skretting for i henhold til rutine ved HiT. Design av dette forsøket er presentert i Figur 2.



Figur 2. Skjematiske illustrasjoner av forsøk 3 som viser de to behandlingsgruppene. Lyseblå strek representerer daglengden gjennom ferskvannsperioden, mørkeblå linje indikerer tidsrom med diettstimulering og T1 – T5 de 5 prøvetidspunkter. Sirklene representerer kar og tallet i sirklene antall fisk.

Den 25. mars 2019 ble totalt 1050 fisk fordelt mellom 6 stk. 300 liters kar med ferskvann på 10 °C og kontinuerlig lys. Av disse ble 15 fisk i hvert kar individmerket med Floy tags. Den 23. april ble 3 kar satt på kortdagsbehandling (9 timer dagslys, lys på kl. 10 om formiddagen) i 6 uker, hvoretter de ble satt tilbake på kontinuerlig lys. Den 16. juli ble all resterende fisk overført til sjøvann (34 ‰, 7 °C) hvor de ble holdt til den 24. september. I ferskvannsfasen ble all fisk fôret kun i 8 av de 9 timene hvor kortdagsgruppene hadde lys (kl. 11 til kl. 18.30), et regime som etter 1 uke i sjøvann ble endret til måltidsfôring mellom kl. 11.00 til 03.00. I denne perioden (T1-T5) ble det tatt prøver av 2 umerkede fisk fra alle kar (6 fisk pr. behandlingsgruppe) ved 5 tidspunkter, første dag etter at kortdagsgruppen ble satt på kort dag (april), etter 6 uker på kort dag (juni) og 6 uker etter overføring til kontinuerlig lys (juli), samt dag 7 og 63. Prøvetaking skjedde kl. 10, dvs. 1 time før fisken fikk mat på alle tidspunkter. Fisken ble veid og lengdemålt, hvoretter den ble blodtappet. Deretter ble det tatt to vevsprøver fra gjelle, en for kvantifisering av NKÅ aktivitet og den andre for analyser av genuttrykk. Videre ble hjerne, hypofyse

og en prøve fra lever, mage og tarm dissekert ut og lagret i 1 ml RNAlater for senere analyser av genuttrykk. Til slutt ble en ca. 2 cm. lang bit av tarmen (posterielt fra enden av blindsekkene) dissekert ut. Vevsbiten ble satt i RNAlater for analyser av genuttrykk og innholdet ble antiseptisk tømt og frosset ved -80 °C for senere analyser av mikrobiell sammensetning. Vannprøver ble tatt ut fra forsøkskarene på hvert tidspunkt til å kartlegge mikrobiota sammensetningen i vannet. For dette formålet ble 1 L vann pre-filtrert over en 120 µm fint (60 µm i juni og september) nett og lagret i Douran flasker til filtrering og DNA isolering. Individmerket fisk ble veid og lengdemålt på tidspunktene T1, T2, T3 og T5. Til å følge opp genuttrykk av nye smoltmarkør gener i gjelle (gjelle-chip) og korrelere disse med sjøvannsprestasjon ble det tatt gjentatte biopsier av 5 individmerkede fisk fra hvert kar (15 per behandlingsgruppe) på T1, T2, og T3. Fôrintak ble målt på samme dag som prøvetaking, utenom T4. Måling av fôrintak ble gjennomført på gruppebasis ved at en sil ble montert i karetts avløpssystem, hvor uspist restfôr ble oppsamlet. Systemet er utviklet og validert på HiT, og er rutinemessig i bruk.

I tillegg ble 3 umerkede fisk fra hvert kar (9 pr. behandling) overført til sjøvann (33 ‰ salinitet) i 24 timer ved tidspunktene T1, T2 og T3, hvorefter det ble tatt en blodprøve for analyse av plasma osmolalitet. Plasma til måling av osmolalitet ble oppbevart og analysert som i forsøk 1.

På andre prøvetakingstidspunkt (04.06. /05.06.) ble det i tillegg til prøvetakingene som er beskrevet over tatt ut 6 umerkede fisk pr. behandlingsgruppe (2 pr. kar) hver 4. time gjennom døgnet (kl. 14.00, 18.00, 22.00, 02.00 og 06.00) til å undersøke eventuelle variasjoner i genuttrykk av sentrale og perifere appetitt regulatorer og mikrobiota sammensetningen i tarm. Hjerne, mage, lever og tarm ble dissekert ut og oppbevart til senere analyser av genuttrykk. Uttak om natten ble gjort i mørke med hodelykt med rødt lys. På samme datoer, kl 1000 og 1800 ble ytterligere 3 fisk pr. behandlingsgruppe (1 pr. kar) avlivet, hvorefter hjernen ble dissekert ut og oppbevart i 4 % formalin buffer til senere *in situ* hybridisering for å kartlegge genuttrykk for appetitt regulatorene i hjernen.

Blodprøver ble tatt fra kaudalvenen vha. hepariniserte vakutainere, oppbevart på is frem til sentrifugering (3000 x g) i 10 min, hvorefter plasma ble pipetert ut og oppbevart på - 80 °C frem til analyser av konsentrasjon av veksthormon og kortisol. Analyse av kortisol ble gjennomført vha. et kommersielt ELISA kit (Cayman chemical, kit no. 500360, BioSite, Wayne, PA 19087 USA) i henhold til medfølgende protokoll. Veksthormon ble analysert på Nord Universitet i Bodø vha. et kommersielt ELISA kit (Fish growth hormone, CSB-E12121Fh, Cusabio Technology LLC, Houston, TX, USA) i henhold til etablert protokoll. Ansvarlig for denne analysen var førsteamanuensis Martin Iversen. Analysekvalitet ble vurdert og validert på grunnlag av standardkurver.

RNA ekstraksjon og qPCR ble gjennomført på vårt laboratorium i Tromsø i henhold til gjeldende protokoller. Primersekvenser er oppgitt i tabell 4 (for appetittregulering) og 5 (for gjelle-chip).

Mikrobiota gDNA ekstraksjon: Ekstraksjon ble gjennomført i hht. protokoll (Zymoresearch). Sirka 100 mg faeces ble homogenisert i bashing bead buffer i en tissue lyser (30 hertz/sec) i 1 min. tre ganger (1 min opphold). Den variable V3-V4 regionen av 16s rDNA gen ble amplifisert (primere Tabell 3), produktet ble fusjonert med barcodes og sent til sekvensering (Illumina).

Tabell 3. Primere til amplifisering av den variable V3-V4 regionen i 16s rDNA til metabarcoding av mikrobiota.

Primer navn	Sekvens
341 F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
805 R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

Tabell 4. Gen navn, forward og reverse primer sekvens for hvert gen og amplifiseringseffektivitet (%).

Gene	Sequence (5' - 3')	Efficiency (%)
Ghrelin- 1	Forward: CCAGAAACCACAGGTAAGACAGGGTA Reverse: CTCCTGAAACTCCTCCTCACTCATGG	99
Ghrelin- 2	Forward: GCCCCTCCAGAAACCACAGGGTAAA Reverse: CTCCTGAAACTCCTCCTCACTCATGG	101
Peptide YY (PYY)	Forward: ACTACACCGCGCTCAGACACTACATC Reverse: TCTCTGGTCTCTCTCTGCATTGTGCCG	102
Cholecystokinin (CKK-L)	Forward: GCGCGAACTACTGGCAAGATTGATA Reverse: TGTCCTTTATCTTGTGGCTGGGACCCG	104
Neuropeptide Y (NPY)	Forward: ACTGGCCAAGTATTACTCCGCTCTCA Reverse: CTGTGGGAGCGTGTCTGTGCTCTCCTTCAG	103
Pro- opiomelanocortin A1 (POMCA1)	Forward: AAGACAACTCCTCGGAAGAGAAA Reverse: CAGCCACAGCCAATAACCAC	102
Pro- opiomelanocortin A2 (POMCA2)	Forward: TTTGGCGACAGGCGAAGA Reverse: ATGGGAGATTTGGCGGTGAG	100
Agouti related protein 2 (AgRP2)	Forward: GCGGTGTGGTTCGTCTGATGG Reverse: GGGCCCAGTCTCCAGCAGTG	115
β- Actin	Forward: CCAAAGCCAACAGGGAGAA Reverse: AGGGACAACACTGCCTGGAT	106

Tabell 5. Gen navn, forward og reverse primer sekvens for hvert gen, annealing temperatur og produkt lengde. Effektiviteten lå rundt 100 % på alle gener.

Target gene	Gene locus	Sequence (5'-3')	Annealing temp. [°C]	Length
EF1a	LOC1001365	F AGGCTGCTGAGATGGGTAAG R AGCAACGATAAGCACAGCAC	63	218
Aloxe3	LOC106602268	F AGGTGCTGAGTACAGTGGAAAC R CAAGCTCAATCACCGATCCTT	60	217
Zym916	LOC106605916	F GGGTCCAGGAAACTGACCCTA R TCAGGGATCACCTCAAATTCTTCC	60	159
Muc2	LOC106608496	F AAAGAGGCTGTGACCAATCCA R AGTTACCGTTGCAGTTGAGTTG	60	111
Capn2	LOC1065899	F GTTGAGGAGATCGTGGTGGA R TGTTCAGAATCCTCCGCAGT	65	118

Target gene	Gene locus	Sequence (5'-3')	Annealing temp. [°C]	Length
NKAa1b(ii)	LOC1065755	F GGGTGTGGGCATCATTTCTG R CATCCAAGTTCGGCTGAC	66	152
S100A1	LOC1065701	F GGATGACCTGATGACGATGC R ATCACATACTCCCCACCAGG	65	122
Fkbp5	LOC1065653	F CTGGGAAAGGGTCAGGTGAT R GACTGTTGATCCGTCGTTGG	65	264
Tph1	LOC1065623	F ACTTCCTCAGAGAACGCACA R CTGGGAGAACTGGGCAAAC	63	218
ST6GALNA C2	LOC1065898	F CTTCGACCGCCAATATCACC R ATGGCAACCTTGAGTGAGTT	63	149
slc5a7	LOC1066021	F AGGTGGGACGTGTTTCAGAT R CCCGACCAACAAAACCCTTT	65	203
Pyr	LOC106561379	F CGCTGGTACGGTAACTGACTT R ATGCACTTGTTGTTTGGCGA	60	179
AmmoTrans RhC	LOC106562250	F GCAGGAGTACCCTTTGAGTCC R TCACTGACTCTTTGTTTGGGAT	60	85
Zym222	LOC106591222	F GTACGGGAAACAGTACCTCCTC R TCCGGGATACCATCCCAAAG	60	70

4.2 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

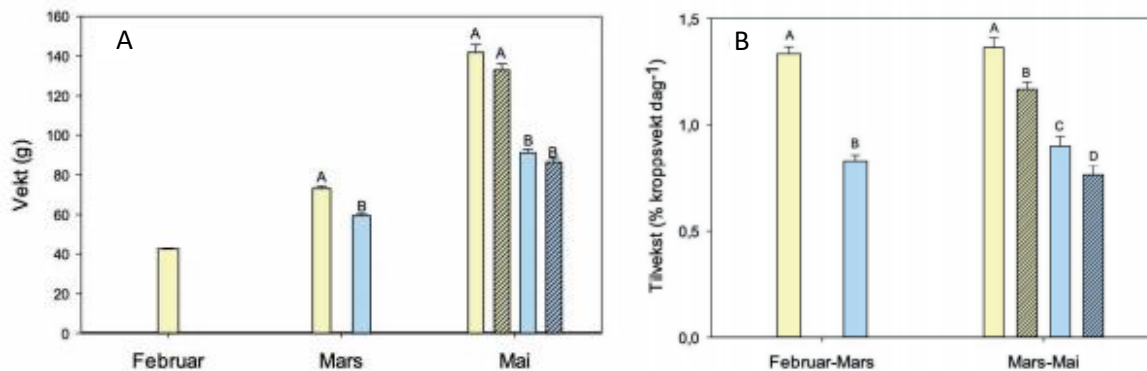
Forsøk 1a: Behandlingseffekter på smoltutvikling og prestasjon etter overføring til sjø.

Det vil i denne rapporten bare presenteres et utvalg av de resultatene vi har, men forhåpentlig de som er mest interessante for de som driver oppdrett; vekst, kondisjonsfaktor, sølvfarging og utvikling av sjøvannstoleranse i ferskvannsfasen, samt fôrinntak og tilvekst i sjøfasen. Resultatene fra forsøket er tilnærmet identisk hos de to størrelsesgruppene og derfor presenteres resultater bare fra gruppen av små fisk.

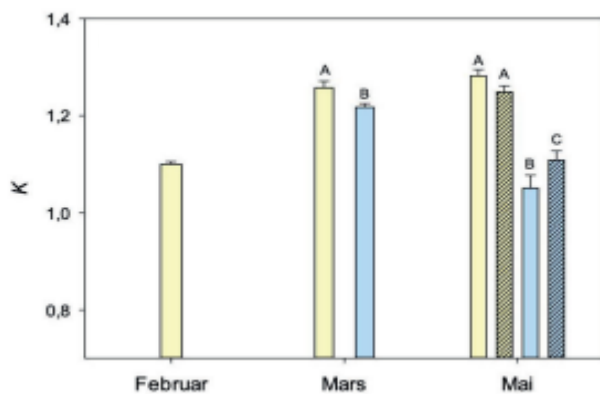
Ferskvannsfasen

Det utviklet seg relativt store forskjeller i størrelse mellom behandlingsgruppene i løpet av ferskvannsfasen (Figur 3A). Dette illustreres godt av dataene på tilvekst (Figur 3B), som var best hos gruppene som ble holdt på kontinuerlig lys. Dette var forventet i og med at det er velkjent at tilvekst hos laks styres av daglengden [5]). Vi trodde tidligere at en redusert tilvekst ved korte daglengder skyldtes at spisetiden ble kortere på grunn av at fisken bruker syn for å finne fôrtidklene. Vi vet nå at det ikke er tilfelle (med mindre at lysperioden er veldig kort) og at lavere tilvekst skyldes redusert appetitt [6] ved at den korte daglengden signaliserer vinter, som hos dyr i tempererte og arktiske områder koder for

energisparing heller enn vekst. Den reduserte tilveksten i løpet av kortdagsbehandlingen er en av grunnene til at oppdrettsnæringen vil bort fra lysstimulert smoltifisering.



Figur 3. Gjennomsnittlig vekt (A) og tilvekst (B) \pm SEM i løpet av ferskvannsfasen hos de ulike behandlingsgruppene av små fisk. Gule kolonner representerer fisk som ble holdt på kontinuerlig lys mens blå kolonner representerer fisk som ble lysbehandlet (kontinuerlig lys avbrutt av 6 uker på kort dag). Skraverte kolonner representerer de gruppene som ble diettstimulert, med eller uten lysbehandling. Forskjellige store bokstaver markerer signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene innenfor hvert tidspunkt (Student's t-test, toveis ANOVA med Holm-Sidak metode).



Figur 4. Gjennomsnittlig kondisjonsfaktor (\pm SEM) hos fisken i de ulike behandlingsgruppene i løpet av ferskvannsfasen. Gule kolonner representerer fisk som ble holdt på kontinuerlig lys mens blå kolonner representerer fisk som ble lysbehandlet (kontinuerlig lys avbrutt av 6 uker på kort dag). Skraverte kolonner representerer de gruppene som ble diettstimulert, med eller uten lysbehandling. Forskjellige store bokstaver markerer signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene innenfor hvert tidspunkt (Student's t-test, toveis ANOVA med Holm-Sidak metode).

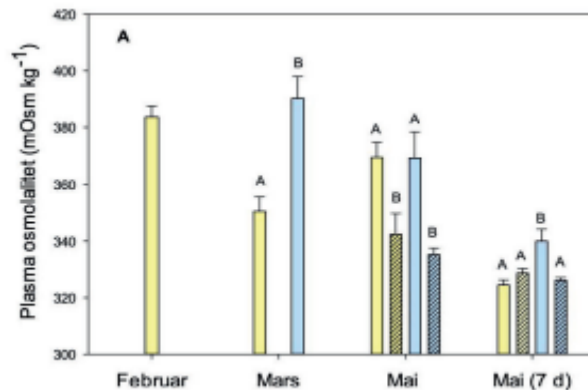
Som det fremgår av Fig. 4 var det bare de lakseungene som ble lysstimulert (med og uten diettstimulering) som hadde den reduksjon i kondisjonsfaktor (ble slankere) etter overføring fra kort til lang dag (Mars til Mai) som er forventet hos en lakseunge som gjennomgår en fullverdig smoltifisering.



Figur 5. Bildet viser typiske individer i mai som hadde gått på kontinuerlig lys (med og uten diettstimulering) gjennom ferskvannsfasen (øverst) og de som hadde blitt lysstimulert (med og uten diettstimulering) nederst. Kondisjonsfaktor hos de som hadde gått på kontinuerlig lys var 1,25 og hos de som hadde hatt kortdagsbehandling var 1,10.

Reduksjonen i kondisjonsfaktor hos lysstimulerte individer skyldes økt lengdevekst og fettmobilisering som en følge av de hormonelle responser som følger av økning i daglengde etter kortdagsbehandling (blant annet økning i utskillelsen av veksthormon og kortisol [2]). Manglende reduksjon i kondisjonsfaktor hos gruppene som ikke ble lysstimulert tolkes dit hen at disse ikke gjennomgikk de samme hormonelle endringene som den lysstimulerte fisken og at de derfor ikke gjennomgikk en 'ekte' smoltifisering. Det er imidlertid verd å merke seg at begge behandlingsgruppene utviklet sølvfarging i løpet av ferskvannsfasen (Fig. 5), noe som en ofte skjer parallelt med utvikling av sjøvannstoleranse (se nedenfor).

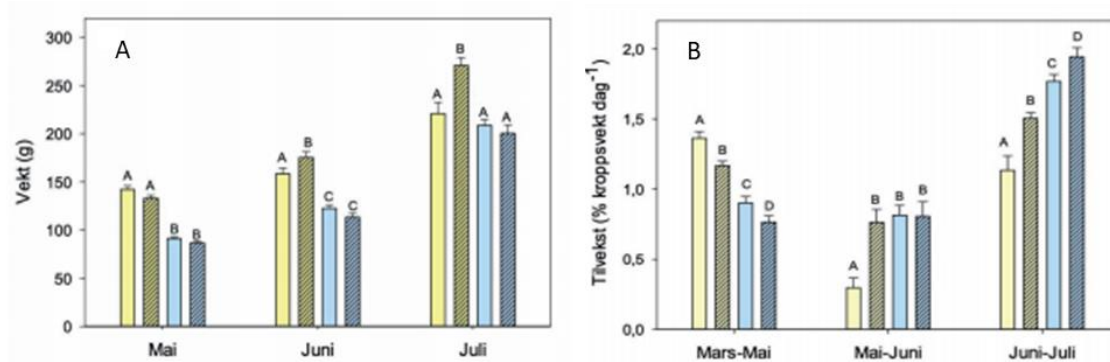
Figur 6. Gjennomsnittlig plasma osmolalitet (\pm SEM) etter 24 timers sjøvannstester, og 7 dager etter overføring til sjø, i de forskjellige behandlingsgrupper. Gule kolonner representerer fisk som ble holdt på kontinuerlig lys mens blå kolonner representerer fisk som ble lysbehandlet (kontinuerlig lys avbrutt av 6 uker på kort dag). Skraverte kolonner representerer de gruppene som ble diettstimulert, med eller uten lysbehandling. Forskjellige store bokstaver markerer signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene innenfor hvert tidspunkt (Student's t-test, toveis ANOVA med Holm-Sidak metode).



Plasma osmolalitet vil øke kraftig når ikke-smoltifisert fisk overføres fra ferskvann til sjøvann, mens denne økningen blir mindre og mindre etter hvert som fisken smoltifiserer. I dette studiet ser vi at osmolaliteten går ned hos begge diettstimulerte grupper (uavhengig av om de lysstimuleres eller ikke) fra februar til mai, mens reduksjonen var fraværende hos de som ikke ble diettstimulert (Figur 6). Dette viser at dietten faktisk stimulerer fiskens sjøvannstoleranse, som tidligere vist i flere forsøk med saltberiket fôr (f.eks. [7]). Etter 7 dager i sjøvann i mai hadde imidlertid alle gruppene plasma osmolalitetsverdier som var innenfor det som en forventer hos en fullt ut sjøvannstilpasset lakseunge (325-345 mOsm kg⁻¹, [8]). At fisken som ble holdt på kontinuerlig lys uten diettstimulering også hadde så god sjøvannstoleranse støtter både vitenskapelige rapporter [9] og praktisk erfaring fra oppdrettsanlegg, som har vist at lakseunger som holdes på kontinuerlig lys spontant kan øke sjøvannstoleransen etter å ha nådd en tilstrekkelig størrelse. I vårt forsøk ble også fisken i denne gruppen

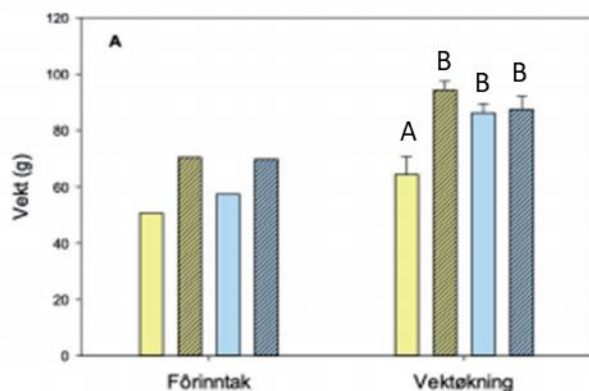
sølvfarget, uten synlige parrmerker (Figur 5). I praktisk oppdrett ville denne fisken antas å være en fullt ut sjøvannstilpasset fisk.

Sjøfasen



Figur 7. Gjennomsnittlig vekt (A) og tilvekst (B) \pm SEM i løpet av sjøfasen hos de ulike behandlingsgruppene av små fisk. Gule kolonner representerer fisk som ble holdt på kontinuerlig lys mens blå kolonner representerer fisk som ble lysbehandlet (kontinuerlig lys avbrutt av 6 uker på kort dag). Skraverte kolonner representerer de gruppene som ble diettstimulert, med eller uten lysbehandling. Forskjellige store bokstaver markerer signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene innenfor hvert tidspunkt (toveis ANOVA med Holm-Sidak metode).

Det ble ikke registrert dødelighet i noen behandlingsgrupper etter overføring til sjø, men tilveksten var svært ulik i de ulike behandlingsgruppene. Det 'forspranget' i vekt i mai som en så hos begge behandlingsgruppene som gikk på kontinuerlig lys i ferskvannsperioden hos både liten og stor fisk (Fig. 3A) ble i løpet av sjøvannsperioden nesten helt utvisket (Fig. 7A). Forskjellen i tilvekst mellom behandlingsgruppene i sjøfasen kommer godt frem på resultatene som viser spesifikk tilvekst (Fig. 7B). På tross av en tilsynelatende godt utviklet sjøvannstoleranse så vi en dårlig tilvekst i gruppene som hadde blitt holdt på kontinuerlig lys uten diettstimulering. Tilveksten var bedre, og relativt lik, hos gruppene som ble holdt på diettstimulering uten lysstimulering og de som ble holdt på lysstimulering uten diettstimulering. Den litt lavere tilvekst i diettgruppen kan skyldes at fisken i denne gruppen, som ble holdt på kontinuerlig lys, var større enn hos fisken i den lysstimulerte fisken, og at den derfor naturlig vokser saktere [10]. Et viktig funn i dette forsøket er at gruppene som ble gitt kombinert diett- og lysstimulering kom best ut mht. appetitt og tilvekst etter overføring til sjø, både hos liten og stor fisk. Forskjellene i tilvekst mellom behandlingsgruppene var tilsynelatende et resultat av forskjeller i fôrinntak. Hos begge størrelsesgruppene av fisk reflekterte forskjellen mellom behandlingsgruppene i fôrinntak forskjellen i tilvekst (Fig. 8). Det er også interessant å merke seg at fisk med høy tilvekst i ferskvannsfasen (pga. kontinuerlig lys) vokste saktere etter overføring til sjø enn hos fisken som hadde en lavere tilvekst i ferskvannsfasen (pga. eksponering til kort dag).



Figur 8. Kumulativt fôrintak og gjennomsnittlig vektøkning (\pm SEM) hos all fisk ($n = 48-57$) i de ulike behandlingsgruppene med liten (A) og stor (B) fisk i løpet av sjøfasen. Gule kolonner representerer fisk som i ferskvannsfasen ble holdt på kontinuerlig lys mens blå kolonner representerer fisk som ble lysbehandlet (kontinuerlig lys avbrutt av 6 uker på kort dag). Skraverte kolonner representerer de gruppene som ble diettstimulert, med eller uten lysbehandling. Ulike store bokstaver viser signifikante forskjeller mellom behandlingene.

Forsøket viste at diettbehandlede lakseunger som skal overføres til sjø, uten bruk av lysstimuli, har utviklet sjøvannstoleranse og, på tross av å ikke være en fullverdig smolt, kan ha like god tilvekst i sjøen som de som ble lysstimulert. Vi antar at den gode sjøvannstoleransen hos disse fiskene ved overføring til sjø var årsaken til at disse greide seg så bra. At fisken som både ble diett- og lysstimulert kom ekstra godt ut er antatt å bero på at disse fikk både i 'pose og sekk', dvs. diettstimulering av sjøvannstoleranse og smoltifiserings-relevante hormonelle responser på lysstimuleringen.

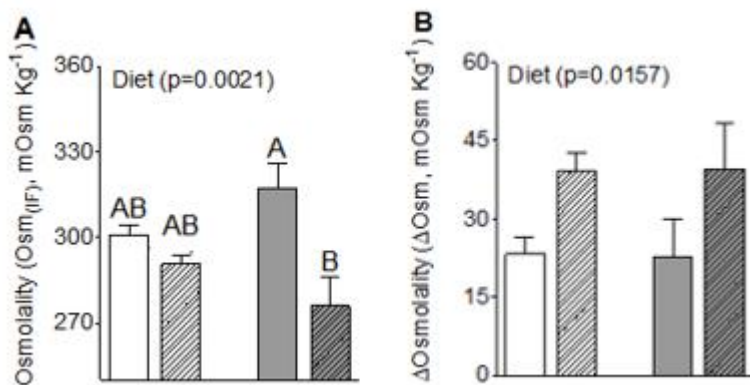
Resultatene fra denne delen av forsøk 1 er publisert i Aquaculture og på Kyst.no (vedlagt). Det ble også produsert en masteroppgave fra dette forsøket, som også er vedlagt.

Forsøk 1b: Behandlingseffekter på tarmfunksjon.

I motsetning til i ferskvann må laksesmolten drikke store mengder (sjø)vann etter at den har kommet ut i sjøen for å erstatte det vanntapet som skjer gjennom passiv diffusjon. Dette vannet må 'avsaltifiseres' før det kan tas opp over tarmveggen. Denne prosessen starter allerede i svelget, hvor det skjer en absorpsjon av Na^+ og Cl^- . Videre absorpsjon av disse dominerende ioner skjer så i tarmen, hvoretter de transporteres til gjella og utskilles der. At disse mekanismene fungerer optimalt er svært viktig for tarmens evne til effektivt å prosessere det fôr som inntas og tilvekst i sjøfasen. Selv om tarmens tilpasning til et liv i sjøvann gjennom smoltifiseringen er studert, er det ennå manglende kunnskap om disse tilpasningene [2]. Det synes heller ikke å ha vært gjort studier på hvordan smoltifiseringsdietten påvirker tarmens tilpasning til, og funksjon etter overføring til sjøvann.

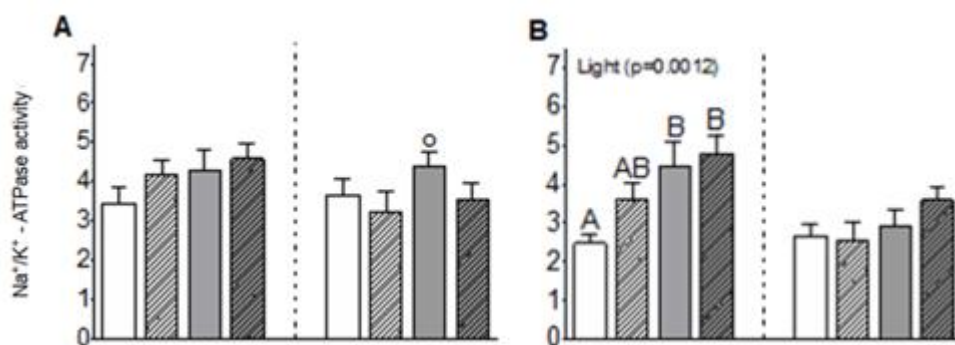
Ione- og osmoregulering

Resultatene fra dette forsøket er under publisering (manuskript vedlagt) og som for forsøk 1 er bare resultater fra gruppen av små fisk presentert, da det ikke var vesentlige forskjeller mellom små og stor fisk.



Figur 9. Osmolalitet i tarmvæske (mOsm Kg⁻¹, A) og differansen i osmolalitet (ΔOsm, B) mellom plasma og tarmvæske 7 dager etter overføring til sjø. Kolonnene representerer gjennomsnittlige verdier ± SEM (n=8-11). Statistiske analyser påviser forskjeller mellom lys- og diettstimulering, samt forskjeller mellom alle behandlingsgruppene (ulike store bokstaver). Hvite kolonner representerer LL-LL grupper uten og med (skravert) diett, mens grå kolonner representerer SP-LL grupper uten og med (skravert) diett. Signifikant betydning for resultatet av de to uavhengige variabler (lys og diett) er notert over figuren. Ulike store bokstaver indikerer statistiske forskjeller mellom behandlingsgrupper (toveis ANOVA og Bonferroni post-hoc test).

Som det fremgår av figuren var osmolaliteten i tarmvæske 7 dager etter overføring til sjø lavere i SP-LL gruppen som hadde fått diett enn i SP-LL gruppen uten diett (Fig. 9A), noe som indikerer at kombinasjonen lys- og diettbehandling kom bedre ut enn gruppen som bare ble lysstimulert. At dietten hadde en positiv effekt på tarmens evne til hypoosmoregulering er også tydelig vist ved at differansen mellom osmolaliteten i plasma og tarmvæske tenderte til å være høyere i de diettstimulerte gruppene enn i de som bare var lysstimulert (Fig. 9B). Differansen var imidlertid høy i alle gruppene, noe som indikerer at det osmotiske opptaket av vann fra tarmen til blod var velfungerende i alle behandlingsgruppene, inkludert i den som hverken ble lys- eller diettstimulert.



Figur 10. Na⁺ K⁺-ATPase aktivitet (NKA, μmol ADP mg protein⁻¹ h⁻¹) i for- (A) og baktarm (B) før utsett (mai, fig. til venstre) og 7 dager etter utsett (fig. til høyre) i sjø. Kolonnene representerer gjennomsnittlige verdier ± SEM (n=7-10). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i NKA aktivitet mellom tidspunkter for prøvetaking. Signifikant betydning for effekten av de to uavhengige variabler (lys og diett) er notert over figuren. Ulike store bokstaver signaliserer signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene (toveis ANOVA og Bonferroni post-hoc test).

NKA aktivitet var like høy før utsett i sjø som 7 dager etter sjøsetting. Dette tyder på at tarmen hadde gjennomgått en økning i hypoosmoreguleringsevne før sjøsetting. I bakre tarmavsnitt var denne evnen bedre utviklet i begge lysstimulerte grupper (med og uten diett) enn i kontrollgruppen (LL-LL). Samme

tendens ble observert i fremre tarmavsnitt, men disse forskjellene var ikke signifikante. Det er interessant, og kanskje ikke tilfeldig, at forskjellene mellom behandlingsgruppene i NKA aktivitet rett før utsett i sjø sammenfaller med forskjellene i tilvekst mellom behandlingsgruppene etter overføring til sjø hvor begge lysstimulerte grupper (med og uten diett) vokste best (Fig. 3B).

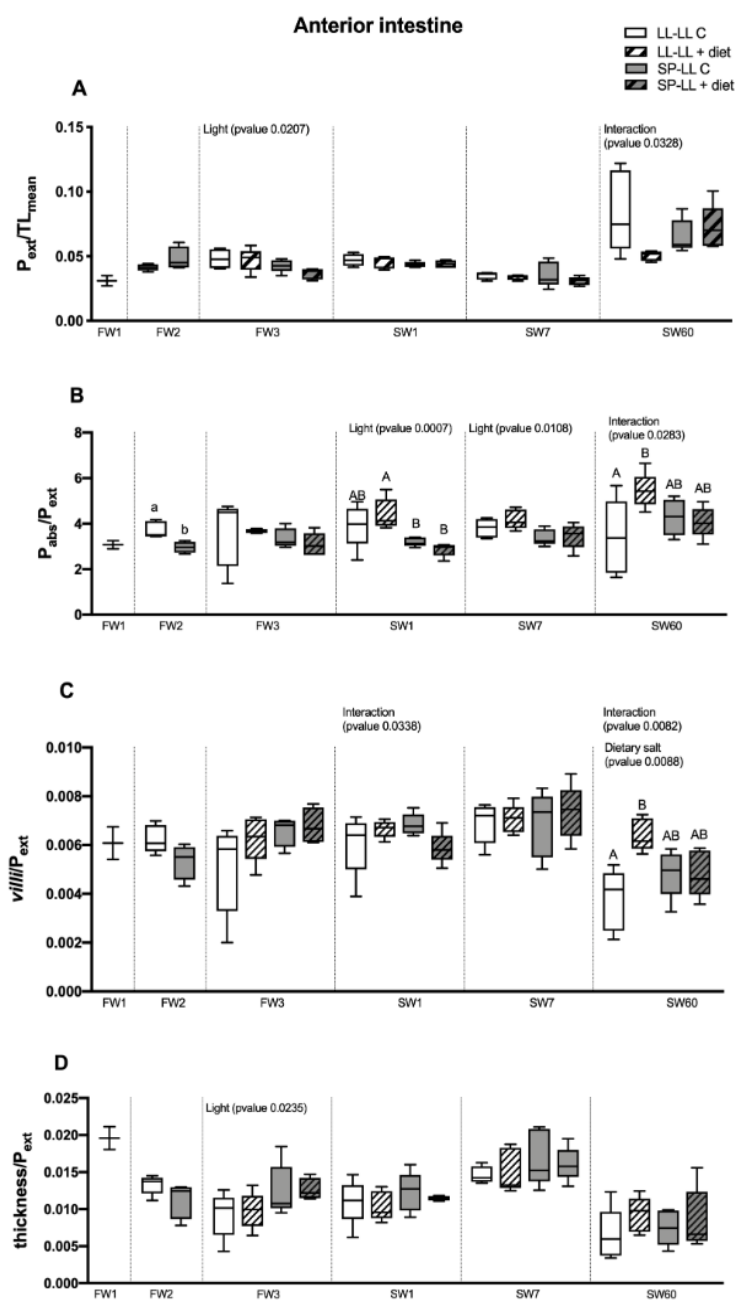
Funnene i dette forsøket støtter konklusjonene i [11] om viktigheten av et 'vintersignal' i forberedelsen til et liv i sjøen. Smoltifiseringsdietten vil være et nyttig redskap om en ikke vil eller kan bruke lysstimulering. For flere resultater og diskusjon mht. tarmens hypoosmoregulatoriske evne henvises til vedlagte manuskript (Gaetano et al.).

Histologi

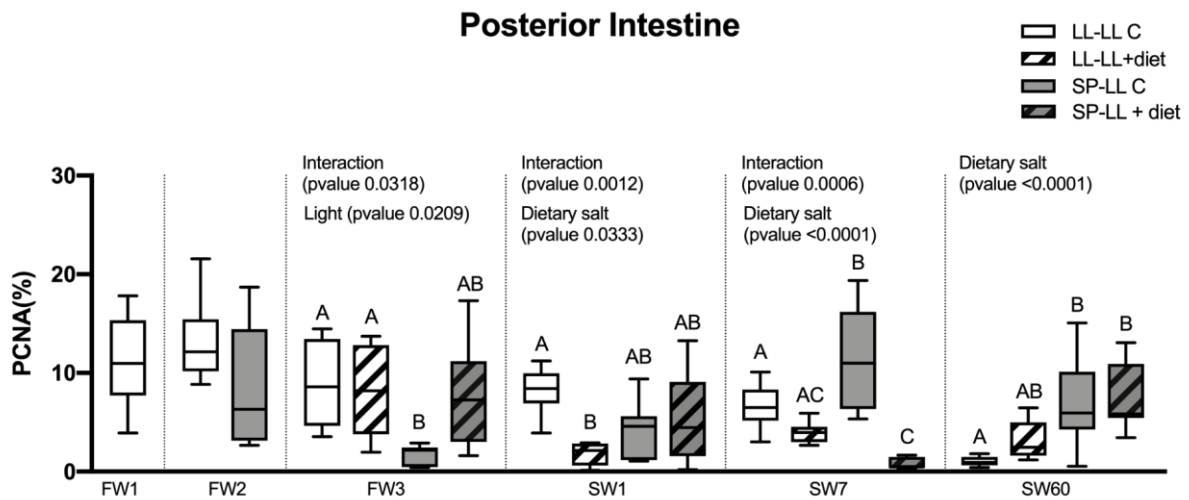
På tross av relativt små forskjeller, indikerte disse data at både lys- og diettstimulering hadde en positiv effekt på absorberende flate, inklusive mengden villi (tarmtotter) og vekst/differensiering i både fremre og bakre (data ikke vist) tarmavsnitt (Fig 11). Resultatene støtter delvis de funn som er presentert i Striberny et al. (2021); den økte tilvekst hos SP-LL behandlet fisk sammenlignet med LL-LL fisk etter overføring til sjø kan, i alle fall delvis, skyldes en bedre evne hos tarmen til å absorbere næringsstoffer. Likeens kan dette også være medvirkende årsak til en høyere tilvekst hos diettstimulert fisk sammenlignet med kontrollfisk. Behandlingsresponsene på tarmhistologi i dette studiet synes imidlertid ikke å ha bidratt til den ekstra vekstgevinsten etter overføring til sjø som ble sett hos fisken som både ble lys- og diettstimulert i forsøket [12].

Mens det ikke ble funnet behandlingseffekter på den prosentvise mengde proliferative celler i forhold til totalantallet celler i villi i fremre tarmavsnitt, var det en tydelig forskjell mellom behandlingsgruppene etter 60 dager i sjøen i det bakre tarmavsnitt (Fig. 12). Den økte prosentandelen i lysstimulerte grupper (med og uten diettstimulering) dag 60 indikerer en større tarmoverflate i bakre tarmavsnitt i disse gruppene, noe som betyr en større flate for opptak av næring. Dette samsvarer med den høye tilveksten hos disse behandlingsgruppene redegjort før (Fig. 3B).

For flere resultater og diskusjon henvises til vedlagte manuskript (Duarte et al.).



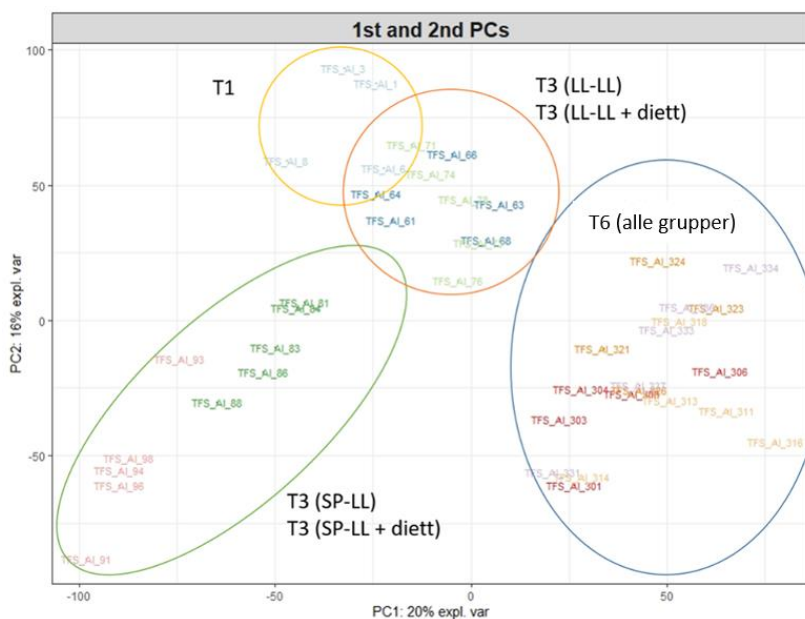
Figur 11. Størrelsesforholdet mellom ytre omkrets av fremre tarmavsnitt og fiskens lengde (A), mellom indre (absorberende flate) og ytre omkrets i fremre tarmavsnitt (B), mellom villi (tarmtøtt) og ytre omkrets i fremre tarmavsnitt og (C) og mellom veggens tykkelse og ytre omkrets i fremre tarmavsnitt hos fisken i de ulike behandlingsgruppene. Hver boks representerer 25. og 75. percentil, linja i midten median mens vertikal linje representerer høyeste og laveste verdi (n = 4-10). Fisken ble prøvetatt ved start av forsøkt (T1), gjennom ferskvannperioden (FW2 og 3) og etter overføring til sjø (SW dag 1, dag 7 og dag 60). Signifikant betydning for resultatet av de to uavhengige variabler (lys og diett) er notert over figuren. Ulike store bokstaver indikerer statistiske forskjeller mellom behandlingsgrupper (toveis ANOVA og Bonferroni post-hoc test).



Figur 12. Prosentvis mengde proliferative celler i forhold til totalantallet celler i viller (tarmtotter) i bakre tarmavsnitt. Fisken ble prøvetatt ved start av forsøkt (T1), gjennom ferskvannsperioden (FW2 og 3) og etter overføring til sjø (SW dag 1, dag 7 og dag 60). Hver boks representerer 25. og 75. percentil, linja i midten median mens vertikal linje representerer høyeste og laveste verdi (n = 4-10). Signifikant betydning for resultatet av de to uavhengige variabler (lys og diett) er notert over figuren. Ulike store bokstaver indikerer statistiske forskjeller mellom behandlingsgrupper (toveis ANOVA og Bonferroni post-hoc test).

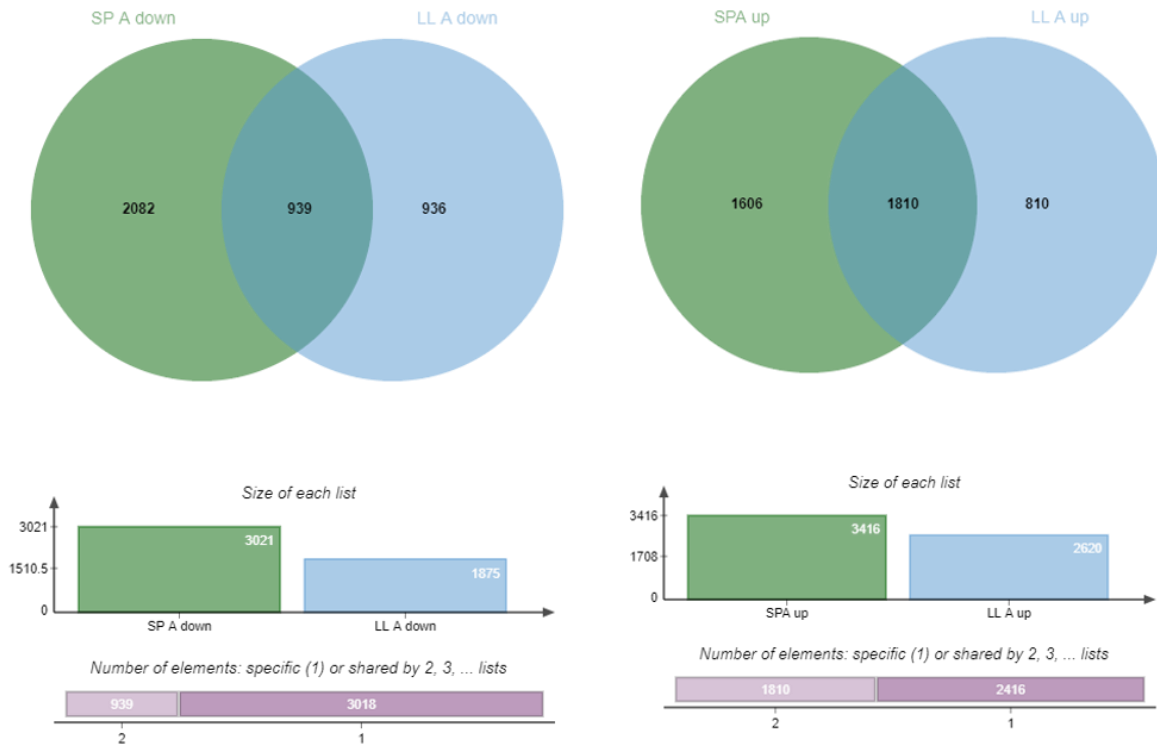
Tarmtranskriptomikk

Foreløpige resultater fra tarmtranskriptomikk analyser viser en tydelig endring av tarmtranskriptomet fra ferskvann til sjøvann. I ferskvannsfasen påvirket lysbehandling transkriptomet sterkere enn diettbehandling (PCA, Fig.13). Etter 60 dager i sjøen var det ingen synlige effekter på transkriptomet fra tidligere lys- og diettbehandling.



Figur 13. Prinsippal komponentanalyse av tarmtranskriptom data. N = 5 per behandlingsgruppe og tidspunkt. T1: starten av eksperiment (FV), T3: prøvetaking etter smoltifisering, før overføring til sjøen. T6: Etter 60 dager i sjøen.

I samsvar med prinsipal komponentanalyse ble det funnet signifikante endringer over tid i ferskvann i alle behandlingsgrupper. Endringene i ferskvann over tid var større, med flere opp- og ned regulerte gener i lysbehandlingsgruppe enn i LL gruppe med kontrollfôr (Venn diagram figur 14). I videre analyser skal de funksjonelle betydninger av disse endringene/forskjellene avdekkes.



Figur 14. Venn diagram som sammenligner ned- og oppregulerte gener fra T1 til T3 i den anteriore delen av tarmen i kortdagsbehandlede (SPA) og ned- og oppregulerte fra T1 til T3 gener i langdagsgruppe (LLA). Begge gruppene ble føret med kontrollfôr.

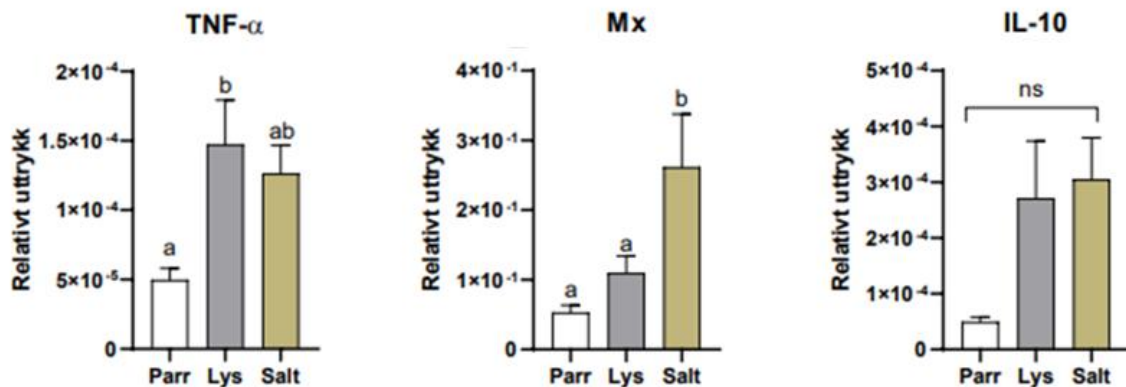
Forsøk 2: Effekter av diett- og lysstimulering på immunkompetanse og mottakelighet for infeksiøs lakseanemi.

Resultater med hensyn til tilvekst, smoltutvikling og prestasjon i sjø for fisken som ble brukt i dette forsøket er sammenfallende med de resultater en fant i forsøk 1 og blir ikke presentert her.

Vaksinasjonsforsøket

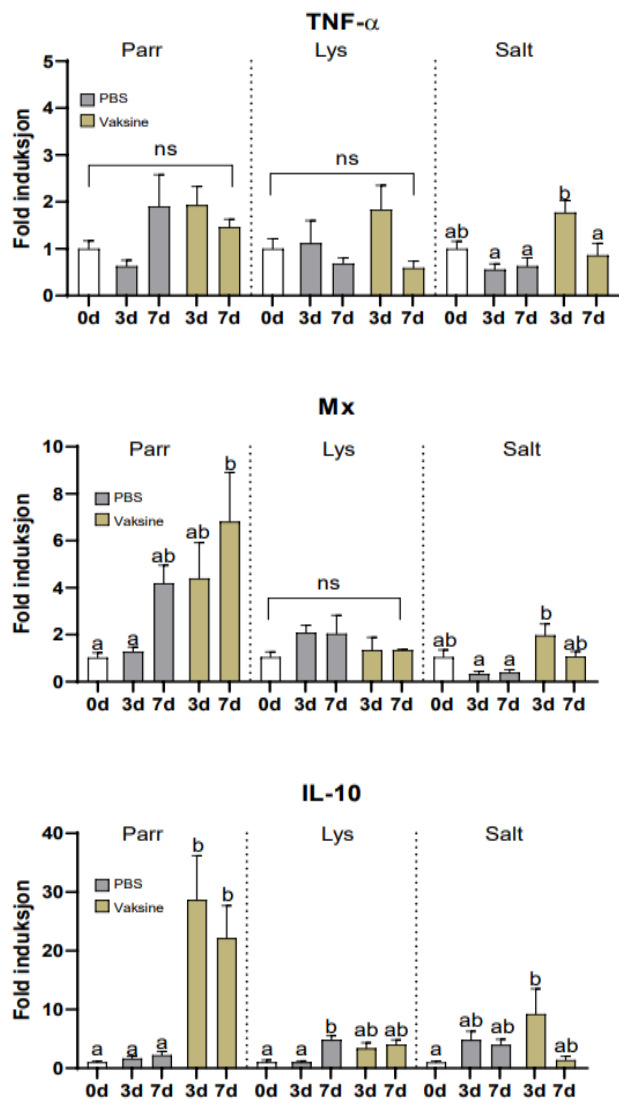
Et utvalg av relevante gener vil bli presentert i denne rapporten. Genene som her er målt representerer ulike funksjoner som er viktige deler av det medfødte immunforsvaret. Resultatene viste samme trend for alle genene, med lavest basaluttrykk i parr sammenliknet med de to smoltgruppene (Fig. 15). Det var kun Interferon-indusert GTP-bindende protein Mx som var forskjellig uttrykt mellom de to behandlingsgruppene. Det var generelt høy variasjon i genuttrykk innad i smoltgruppene sammenliknet med parrgruppen. 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

[13]. Dette er i motsetning til andre studier som har sett en massiv suppressjon av immunforsvaret gjennom smoltifiseringen [14]. Resultatene i vår studie viser at fisken som hadde vært gjennom smoltifiseringen (uavhengig av smoltifiseringsregime) hadde en tendens til oppregulert medfødt immunforsvar sammenlignet med parrgruppen, og er således i samsvar med konklusjonen i [13].



Figur 15. Genuttrykk i hodenyre av TNF- α , Mx og IL-10 for kontrollfisk (hverken PBS- eller vaksineinjisert) i de to behandlingsgruppene ved start av forsøket (parr) og etter avsluttet smoltstimulering med lys- og diett (her betegnet salt). Relativt uttrykk er beregnet ved bruk av Δ 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 (enveis ANOVA og Tukey's multiple sammenlikningstest).

Effekten av vaksinerings på uttrykk av de samme genene er presentert i Fig. 16. For TNF- α ble det ikke sett forskjeller i respons på vaksine og PBS, eller parr og smolt, mens det var en tendens til høyere respons på vaksine i parr enn i smolt for Mx. For IL-10 ble det derimot påvist en klart høyere respons hos parr enn hos smolt. Disse resultatene antyder en høyere evne hos parr enn hos smolt til å mobilisere immunforsvaret. Dette resultatet er litt i motstrid til resultatene fra målingene av basaluttrykk for disse genene, og mer som forventet om det er slik at smoltifiseringen fører til en suppressjon av immunforsvaret [14].

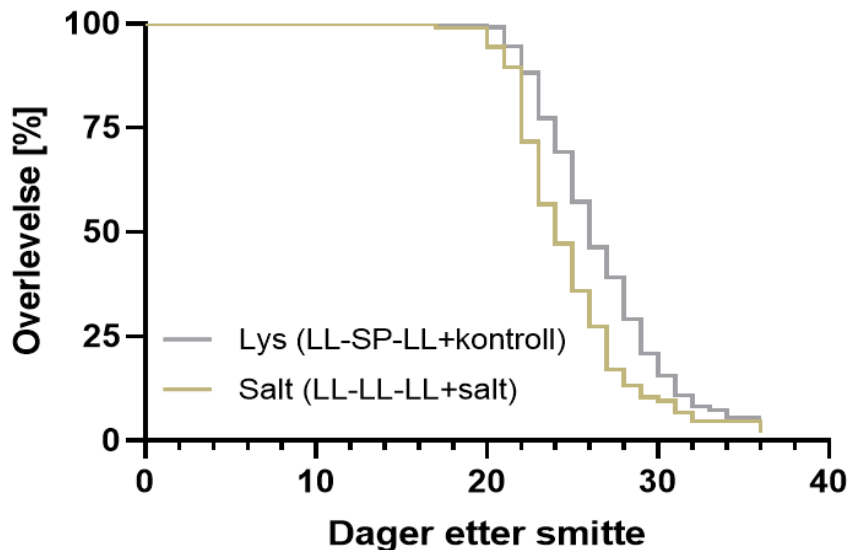


Figur 16. Relativ endring av genuttrykk av TNF- α , Mx og IL-10 i hodenyre hos parr og etter lys- og diettstimulering. Fisken ble injisert med PBS eller vaksine og prøvetatt ved 3 og 7 dager etter injeksjon. Genuttrykk hos injisert fisk ble sammenliknet med ikke-injisert kontroll (dag 0) for hver gruppe. Verdiene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM (n= 4-7). Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller innad i gruppene, ns = ikke-signifikante forskjeller (enveis ANOVA og Tukey's multiple sammenlikningstest).

Hovedsmittforsøket

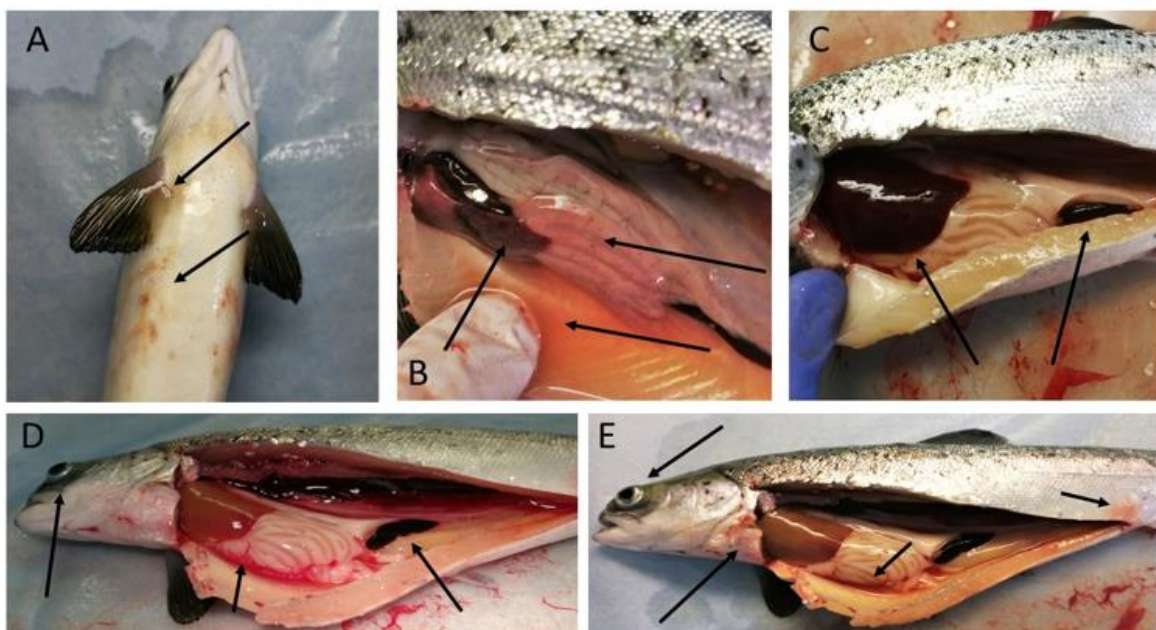
Trenden for dødelighet var lik i begge gruppene (Figur 17), med høy dødelighet i den akutte fasen som varte ca. en uke. Etter den akutte fasen avtok dødeligheten frem til avslutningen av forsøket i begge gruppene. Diettgruppen viste en forsinket dødelighet sammenliknet med lysgruppen, og den relative overlevelsen var 1,9% i lysgruppen og 5,5% i saltgruppen ved avslutningen av forsøket. Det var signifikante forskjeller mellom gruppene i overlevelseskurven, noe som betyr at dødeligheten hadde en liten forskjell i temporær utvikling mellom gruppene. Forskjellen i total dødelighet var imidlertid så liten at det ble konkludert med at det ikke var forskjell mellom behandlingsgruppene i motstandsdyktighet mot ILAV. Denne konklusjonen er imidlertid noe usikker da den høye dødeligheten

også betyr at det ble brukt en for stor dose av ILAV, på tross av at vi halverte dosen i forhold til den som ble brukt i presmitteforsøket. Ved undersøkelse av mottakelighet for sykdom er det viktig å bruke en smittedose som ikke gir for lav overlevelse i fiskegruppene.



Figur 17. Kumulativ overlevelse i hos lysstimulert (n=106) og diettstimulert (n=110) etter i.p injeksjon med 0,1 mL ILAV (PHARMAQ ALV 321) og overført til sjøvann (10 °C). Begge gruppene ble injisert med en dose på $1,6 \times 10^2$ TCID₅₀/fisk. 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). Diettbehandling er i figuren betegnet 'salt'. Mulige forskjeller i kurveforløp ble testet med en Mantel-Cox test (log-rank) og Gehan-Breslow-Wilcoxon test.

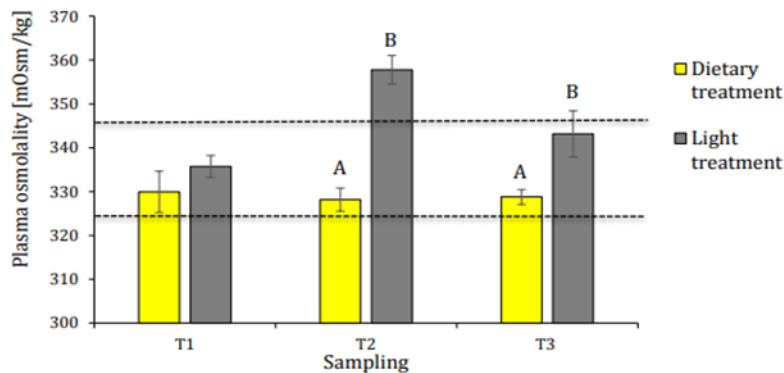
At fisken døde av ILAV ble dokumentert med genuttrykkmålinger av ILAV-RNA (data ikke vist) og patologi (Fig. 18).



Figur 18. 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).

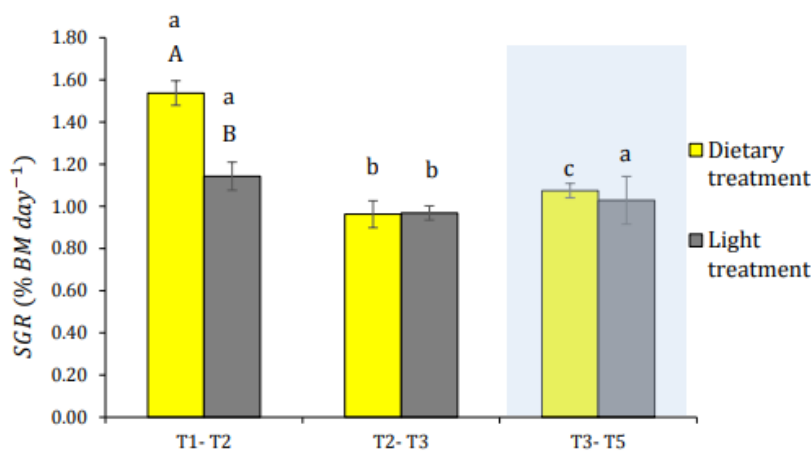
Forsøk 3: Effekter av lys- og diettstimulering på smoltutvikling og prestasjon etter overføring til sjø, appetitt regulering, tarmmikrobiota og genuttrykk i gjelle

Resultatene fra dette forsøk, med hensyn på smoltutvikling og tilvekst i sjø var nærmest identisk med de resultatene vi fikk i forsøk 1, og foruten data på tilvekst, fôrinntak og plasma osmolalitet etter sjøvannstester, gjentas ikke disse her.



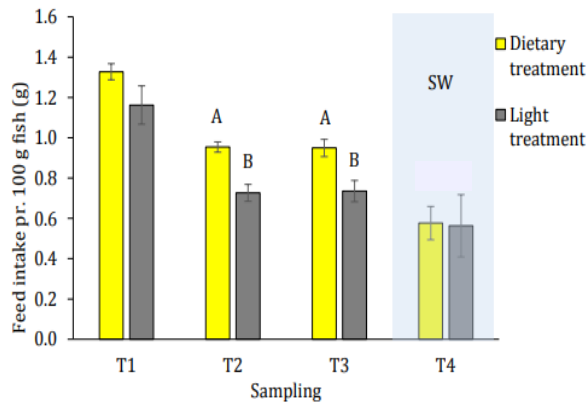
Figur 19. Gjennomsnittlig (\pm SEM) plasma osmolalitet etter 24 timers sjøvannstester hos lys- og diettstimulert laks i ferskvannsfasen. De skraverte linjene representerer rangen av plasma osmolalitetsverdier hos sjøvannsadapterte lakseunger. Ulike store bokstaver representerer forskjeller mellom behandlingsgrupper ved hvert tidspunkt (t-test).

Begge gruppene hadde lave plasma osmolalitetsverdier (Fig. 19) etter sjøvannstesten ved start av forsøket (T1), noe som sannsynligvis skyldes spontan utvikling av sjøvannstoleranse, sett før i mange forsøk [6]. Denne sjøvannstoleransen ble, som forventet, betydelig svekket etter at den lysstyrte gruppen ble overført til kort dag, hvorefter den økte igjen etter overføring til kontinuerlig lys. En lavere plasma osmolalitet hos diettstimulert fisk enn hos lysstimulert fisk ved dag 3 korresponderer med de funn som ble gjort i forsøk 1a, og tidligere studier som har vist at økt saltinnhold stimulerer sjøvannstoleranse hos lakseunger [7].



Figur 20. Gjennomsnittlig spesifikk vekstrate (SGR; \pm SEM) hos lys- og diettstimulert laks i ferskvannsfasen og sjøfasen (skravert blå). Ulike store bokstaver representerer signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper innen hvert prøvetidspunkt, mens ulike små bokstaver indikerer signifikante forskjeller i tilvekst over tid innen behandlingsgrupper (t-test).

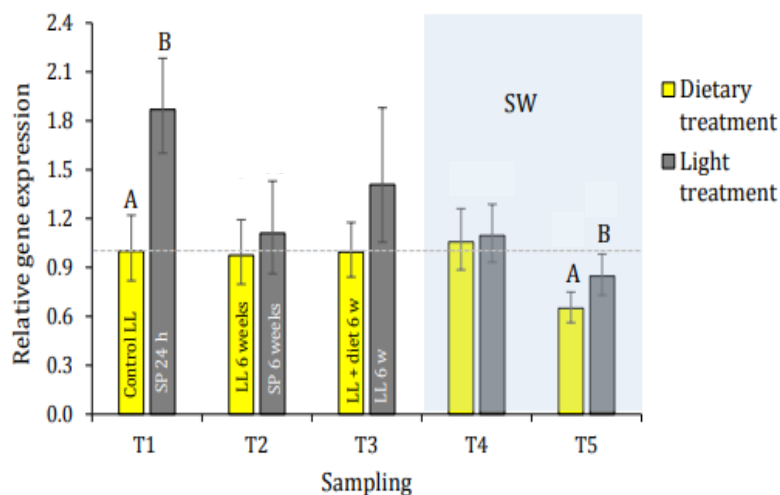
Som forventet var det en lavere tilvekst hos den lysstimulerte gruppen i perioden da den ble holdt på kort dag (T1-T2), som også vist i forsøk 1a. Etter det ble det ikke observert forskjeller i tilvekst mellom behandlingsgruppene i løpet av den resterende forsøksperioden. En fullstendig sammenfallende tilvekst hos lys- og diettstimulert fisk etter overføring til sjø (Fig. 20) støtter konklusjonene fra forsøk 1, at lys- og diettstimulering sannsynligvis virker gjennom ulike mekanismer, men at disse gir samme vekstprestasjon etter overføring til sjø.



Figur 21. Gjennomsnittlig fôrintak (\pm SEM) hos lysstimulerte laks, med og uten diettstimulering, i ferskvannsfasen og sjøfasen (skravert blå). Ulike store bokstaver representerer signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper innen hvert prøvetidspunkt (t-test).

Det ble observert et signifikant lavere fôrintak hos den lysstimulerte gruppen mens den ble holdt på kort dag (T1-T2) enn i gruppen som gikk på kontinuerlig lys. Dette støtter opp om tidligere konklusjon om at en kort daglengde fører til redusert appetitt og derved lavere tilvekst [6]. At den lysstyrte gruppa også hadde et lavere fôrintak også etter at den ble overført til lang dag (Fig. 21) var noe overraskende i lys av at den hadde lik tilvekst som den diettstimulerte gruppen (Fig 20). Dette tror vi skyldes en lavere fordøyelighet av dietten enn av kontrollfôret, pga. et høyt saltinnhold, som vist før [16]. Fôrintaket var likt hos de to behandlingsperiodene etter overføring til sjø, noe som er i samsvar med konklusjonen i forsøk 1a om at samsvar i tilvekst er kombinert med samsvar i fôrintak.

Appetittregulerende mekanismer hos fisk er mye studert, men foreløpig lite forstått. En utfordring i slike studier er å finne fiskemodeller som naturlig oppviser endringer i appetitt som følge av endringer i miljøet. Tidligere studier har påvist en reduksjon i appetitt og tilvekst hos laks når daglengden blir kortere [6], en respons som også ble sett i dette forsøket (Fig. 3B og 21). Vi analyserte uttrykk av gener som hos pattedyr både er orexigene (stimulerer appetitt; NPY, AgRP, gherlin) og anorexigene (hemmer appetitt; POMC, CCK, PYY). Her presenterer vi resultater bare for NPY, som hos pattedyr er regnet for å være den sterkeste stimulator av appetitt [17]

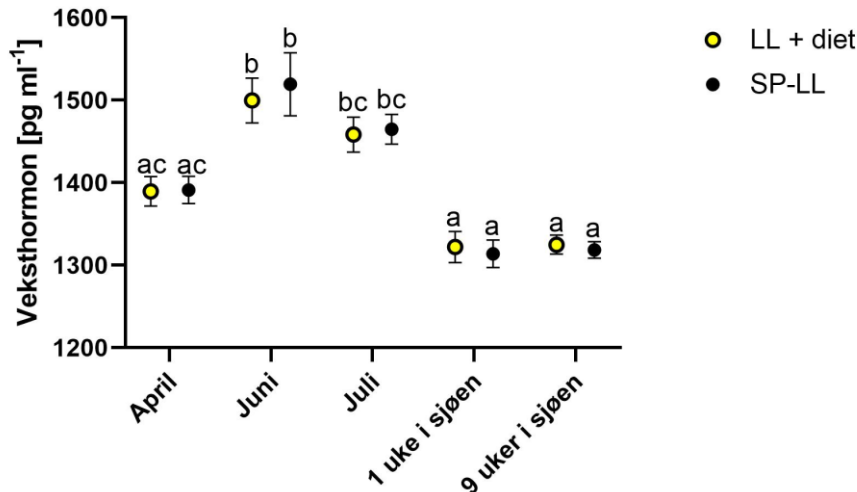


Figur 22. Relativt genuttrykk i forhold til T1 (genuttrykk hos diettbehandlet gruppe T1 satt = 1) av NPY i hjerne hos lys- og diettstimulert laks. Kolonnene representerer gjennomsnitt \pm SEM og det blå feltet tiden da fisken var i sjøvann. Ulike store bokstaver indikerer signifikante forskjeller i genuttrykk mellom behandlingsgrupper innen hvert tidspunkt (t-test).

Som det fremgår av figur 22, var det et høyere uttrykk av NPY i hjerne hos lysstimulert fisk ved T1, mens uttrykket var likt ved T2, samtidig med at lysstimulert fisk hadde et lavere fôrinntak enn diettstimulert fisk. Ved T5 var forinntaket likt mens uttrykket av NPY var høyere hos lysstimulert enn hos diettstimulert fisk. Samme type mismatch mellom genets forventede effekt og faktiske funn ble også gjort for de andre appetittregulatorene. Dette kan bety at disse ikke har samme effekt på appetitt hos fisk som hos pattedyr, at genuttrykk ikke er representativ for endringer i det protein som mRNA koder for eller at analyser må gjøres i det spesifikke hjerneavsnitt hvor appetitt reguleres, og ikke i et homogenat av hel hjerne.

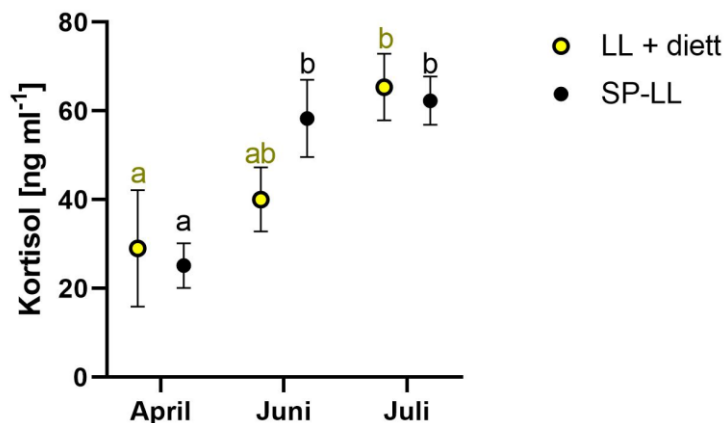
For mage/tarm ble det heller ikke funnet forskjeller mellom behandlingsgrupper i appetittregulatorer, md unntak av ghrelin, som 7 dager etter overføring til sjø var signifikant høyere hos den lysstyrte gruppa enn i diettgruppa. Det var forventet å finne en vekstfremmende effekt av et høyere ghrelinuttrykk i den lysstyrte gruppa, men det var ikke tilfelle.

Vi fant både i dette forsøket, og i forsøk 1a (Fig. 4), at kun den lysstyrte fisken gjennomgikk den reduksjon i kondisjonsfaktor etter overføring til kontinuerlig lys som kjennetegner en ekte smoltifisering. Denne reduksjonen er vist å skyldes en økning i plasmanivå av veksthormon og kortisol, som stimulerer lengdevekst og fettforbrenning [15]. Det var derfor forventet å finne en økning i disse to hormonene i den lysstyrte gruppa etter at den ble overført til kontinuerlig lys (T2-T3), mens en slik økning ikke var forventet i den diettstimulerte gruppa. Overføring til sjøvann av en 'ekte' smolt er dessuten vist å medføre en reduksjon i plasmanivåene av veksthormon, noe som skyldes en økning i insulin-like growth factor 1 (IGF-1) og en derav hemmende effekt på sekresjon av veksthormon. En slik reduksjon i veksthormon/IGF-1 ratio er vist å ha en vekstfremmende effekt [15].



Figur 23. Gjennomsnittlig (\pm SEM) konsentrasjon av veksthormon i plasma hos fisken i de to behandlingsgruppene i løpet av forsøksperioden. Ulike små bokstaver viser signifikante forskjeller mellom tidspunkter innenfor behandlingsgruppe (enveis ANOVA).

Våde data påviste en økning i plasmanivå av veksthormon fra T1 (april) til T2 (juni) i begge behandlingsgruppene, mens den lysstimulerte gruppa enda var på kort dag. Økningen var imidlertid liten (ca. 7%) og sannsynligvis relatert til andre faktorer enn behandlingen. Vi så heller ingen respons på overføring til kontinuerlig lys i den lysstimulerte gruppen (juni - juli), noe som var svært overraskende i lys av den kraftige reduksjon i kondisjonsfaktor som ble funnet i denne gruppa i dette tidsrommet (data ikke vist) og i forsøk 1 (Fig.4). Den signifikante, dog beskjedne, reduksjon i plasmanivåene av veksthormon etter overføring kan være relatert til en oppregulering av IGF-1.



Figur 24. Gjennomsnittlig (\pm SEM) konsentrasjon av konsentrasjon av kortisol i plasma hos fisken i de to behandlingsgruppene i løpet av forsøksperioden. Ulike små bokstaver viser signifikante forskjeller mellom behandling og tidspunkter (enveis ANOVA).

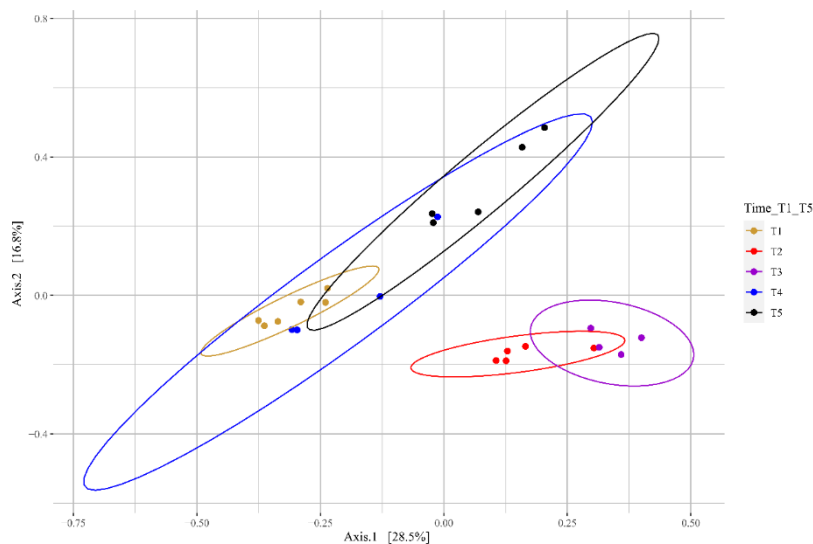
Plasma kortisolnivå økte fra april til juni i SP-LL gruppa og mellom april og juli i fisken i LL + diet gruppa Fig. 24). Dette var også overraskende i og med at en økning i plasma konsentrasjon hos smoltifiserende fisk normalt er sett etter at lysstimulert fisk er overført fra kort dag til kontinuerlig lys mens våre data på den lysstyrte fisken ble tatt dagen før de ble overført til kontinuerlig lys i juni [2]. Kortisol er vist å ha en viktig funksjon i å stimulere gjellas evne til å skille ut ioner og således, fiskens

evne til å hypoosmoregulere. Det er umulig å si hvilken faktor som har bidratt til den kraftige økningen i kortisol i begge behandlingsgruppene, men økningen er parallell med økningen i veksthormon og muligens et resultat av det. Alternativt kunne økningen i plasma kortisol konsentrasjon være relatert til økningen i biomassen i karene, som var 50 og 60 kg/m³ på slutten av ferskvannsfasen i henholdsvis lys- og diettstyrte grupper.

Tarm mikrobiota

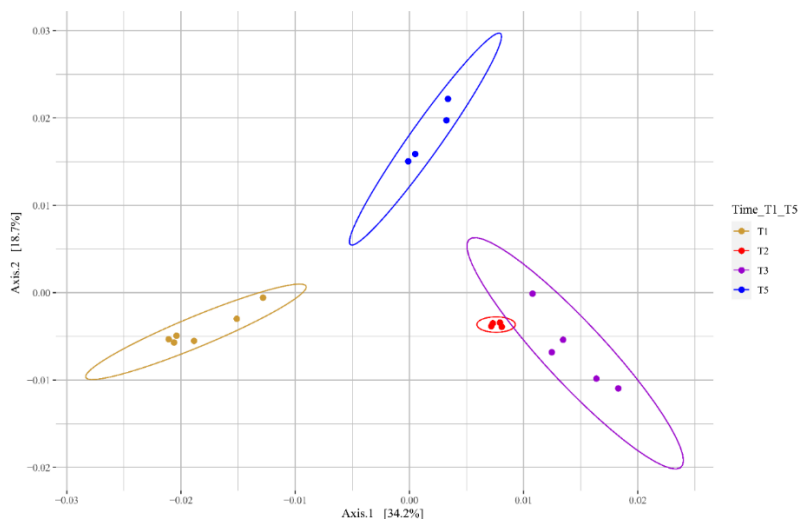
Det ble funnet signifikante endringer over tid i mikrobiota sammensetningen under smoltifiseringen i ferskvann og etter overføring til sjøvann i begge behandlingsgrupper (Bray-Curtis index testet med pairwise Permanova) (Fig. 25 A, B). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper på de respektive tidspunkter, noe som indikerer at salt og tryptophan i smoltdietten påvirket mikrobiotasammensetningen i svært liten grad.

A

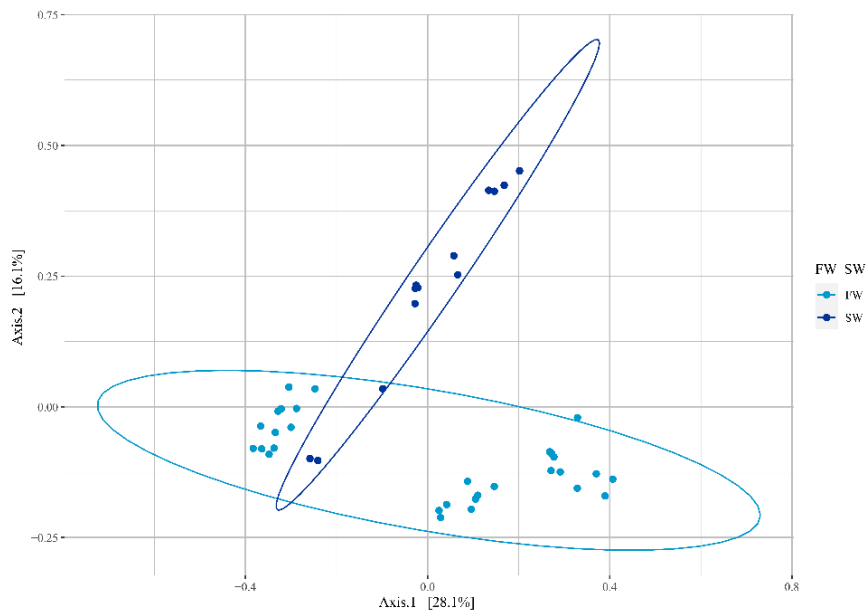


Figur 25. Beta diversitet tarmmikrobiota (Bray-Curtis Indeks) over tid i lysstimulert (A) og i diettstimulert (B) gruppe.

B



De store endringer i mikrobiota sammensetning etter overføring til sjøvann (Fig. 26) samsvarer med tidligere forsøk på laks [18]. Den funksjonelle betydningen av disse endringene for laksens fysiologi gjenstår å avdekkes.

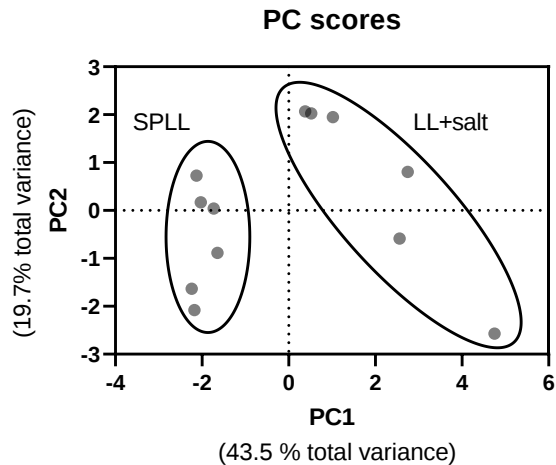


Figur 26. Beta diversitet tarmmikrobiota (Bray-Curtis Indeks) i ferskvann (alle tidspunkter) og sjøvann (alle tidspunkter).

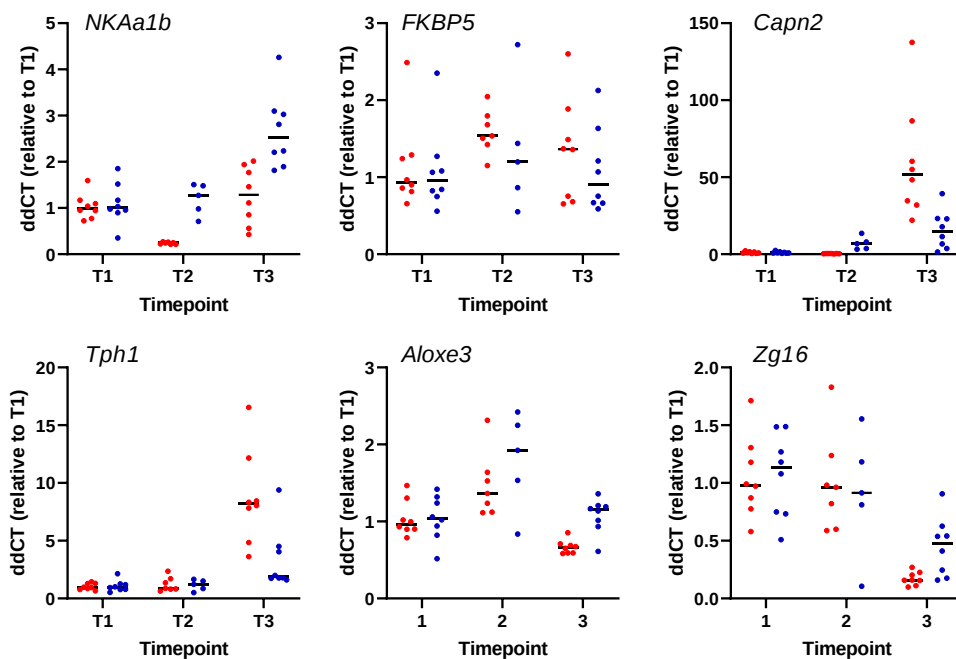
Gjellechipen

Resultater fra analyser av 13 gener som var selektert fra publisert litteratur og våre bestrebelser på å identifisere gener som er gode markører for smoltutvikling og god prestasjon etter overføring til sjø [19, 20] er presentert i Fig. 27 og 28.

Fig. 27 viser resultater av en PCA analyse som oppsummerer endringer i genuttrykk mellom T2 og T3 (i.e. i perioden hvor diettgruppa fikk smoltfiseringsfôret og lysgruppa etter overføring til kontinuerlig lys). Hvert punkt representerer uttryksprofilen hos hvert individ av de 13 genene som ble analysert. Som det fremgår av figuren ble det funnet en klar forskjell i uttryksprofilen mellom de to behandlingsgruppene, med et mer homogent uttrykk hos den lysstimulerte fisken.



Figur 27. PCA analyse av endringen av uttrykk hos 13 gjellemarkører hos de to behandlings-gruppene mellom T2 og T3.



Figur 28. Endring i genuttrykk av 6 selekterte gener hos lysstimulert (røde symboler) og diettstimulert fisk (blå symboler) fra T1 til T3.

Økning i NKA a1b genuttrykk er brukt som en indikator på utvikling av sjøvannstoleranse [2]. Vi fant det høyeste uttrykket hos diettstimulert fisk ved T3 og det laveste uttrykket hos lysstimulert fisk ved T2, da disse ble holdt på kort dag. Det er imidlertid viktig å merke seg at vi fant et høyt uttrykk av dette genet ved T1, altså før smoltstimuli var igangsatt. Uttrykk av *FKBP5* er tidligere funnet hos vill smolt av coho *salmon* (*Oncorhynchus kisutch*) før og etter utvandring til sjø [21], men det ble ikke funnet forskjeller i uttrykk av dette genet mellom behandlingsgruppene i vårt forsøk. *Capn2* og *Tph1* ble identifisert i en studie av gener som var påvirket av tidligere fotoperiode behandling [19], og viser i dette forsøket en

strek respons på overføring fra kort dag til kontinuerlig lys hos den lysstimulerte gruppa fra T2 til T3. En økning i uttrykket av dette genet ble også observert i den diettstimulerte gruppa fra T2 til T3, men denne økningen var mindre. *Aloxe3* og *zg16* er markører hvis genuttrykk minker hos lysstimulerte smolt (upubliserte resultater). I dette forsøket så vi en reduksjon hos begge behandlingsgruppene, dog i mindre grad hos den diettstimulerte fisken enn i den lysstimulerte fisken.

5. HOVEDFUNN

- Både lys- og diettstimulering er i to forsøk funnet å stimulere preparatoriske endringer som er adaptive for et liv i sjøen.
- Kombinasjonen av lys- og diettstimulering gav den beste appetitt og vekstprestasjon etter overføring til sjø, noe som antyder separate lys- og diettstimulerte mekanismer med additiv effekt.
- Lys- og diettstimulering gav ingen forskjell i motstandsdyktighet overfor infeksjøs lakseanemi etter overføring til sjø, men patogendosen kan ha vært for stor.
- Lik temporær endring i plasmanivå av veksthormon og kortisol ble funnet hos lys- og diettstimulert fisk under smoltifiseringen. Forskjeller relatert til separate lys- og diettstimulerte mekanismer er foreløpig ikke funnet.
- Tarmpermeabilitet ble i liten grad påvirket av diett samtidig som det var en tilsynelatende positiv effekt av dietten på fiskens evne til å hypoosmoregulere. Foreløpige resultater fra transkriptomikk analyser tyder på store endringer i tarmtranskriptomet i ferskvann i lysstimulert laks. Overføring til sjøvann fører til en tydelig omforming av tarmtranskriptomet.
- Det ble funnet markante endringer i sammensetning av tarmmikrobiota over tid med størst endringer sett etter overføring til sjøen. Om og hvordan tarm mikrobiota påvirker endringene i tarmtranskriptomet og *vice versa* er et forskningsområde som burde utvikles videre i fremtidig forskning.
- Det at vi her var i stand til å finne resultater som støtter tidligere funn av genmarkører i gjelle som predikerer god prestasjon etter overføring til sjø er oppmuntrende. Dette er en god bakgrunn for det videre arbeid som skal gjennomføres med en slik gjellemarkør gjennom vårt nye prosjekt «Synchrosmolt» (FHF-901589)).
- Det er også av stor interesse å se at genuttrykk i gjelle var forskjellig i de to behandlingsgruppene, samtidig som begge gruppene vokste svært godt etter utvandring til sjø. Dette indikerer at det er 'flere veier til Rom', og danner et godt utgangspunkt for videre mekanistiske studier.

6. LEVERANSER

Vitenskapelige og populærvitenskapelige publikasjoner

Striberny, A., Kauritzen, D.E., Fuentes, J., Campinho, M.A., Gaetano, P., Duarte, V., Hazlerigg, D.G., Jørgensen, E.H. 2021. More than one way to smoltify a salmon? Effects of dietary and light treatment on smolt development and seawater growth performance in Atlantic salmon. *Aquaculture* 532, 736044.

Gaetano, P., Duarte, V., Striberny, A., Hazlerigg, D.G., Jørgensen, E.H., Camphino, M.A., Fuentes, J. Photoperiod and dietary stimulation of smolting modulate the short-term intestinal response to seawater in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Under ferdigstilling.

Duarte, V., Gaetano, P., Striberny, A., Hazlerigg, D.G., Jørgensen, E.H., Fuentes, J., Campinho, M.A. Intestinal growth and differentiation is modulated differently by photoperiod and dietary stimulation of smolting in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) but achieve a similar capacity for osmoregulation. Under ferdigstilling.

Kyst.no. <https://www.kyst.no/profile/magazines/138526/46>

Masteroppgaver

Fôrbasert kontra lysstimulert smoltifisering av Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) - Effekten av smoltifiseringsregime på smoltutvikling og immunstatus i ferskvann, samt vekst og mottakelighet for infeksjøs lakseanemi (ILA) etter sjøsetting. Masteroppgave Bjørn Ellingsen. Vår 2019.

Lys- og saltbehandling av to størrelsesgrupper lakseunger (*Salmo salar* L.) Smoltifisering i ferskvann og prestasjon i sjøvann. Masteroppgave Bjørn Ellingsen. Vår 2019.

Dietary vs. light stimulated smoltification: effects on smolt development and appetite regulation in pre- and post-smolts. Masteroppgave Melissa Jansen. Vår 2020.

Foredrag/presentasjoner

Jørgensen: Møte hos Skretting: Foredrag, presentasjon av resultater, Stavanger 28. mai 2019.

Jørgensen: Seminar om robust smolt og smoltifisering (FHF). Foredrag Gardemoen 28.november 2019.

Jørgensen: Settefisk, Texet. Foredrag Trondheim 11.-12. februar 2020.

Jørgensen: Settefiskforum, Norwegian Centres of Expertice. Foredrag Bodø 11.-12. Mars, 2020.

Jørgensen: Settefiskforum, Norwegian Centres of Expertice. Foredrag Bodø 26. Januar 2021.

Prosjektomtale

<https://www.tekfisk.no/havbruk/han-undersoker-hvordan-postsmolten-har-det/8-1-59026>

<https://www.kyst.no/advertisement/supersmolt-motbeviste-negativ-hypotese/>

Gjenstående analyser:

Døgnrytme i appetittregulatorer (Forsøk 3), hjernetranscriptomikk (Forsøk 1).

7. SLUTTKOMMENTAR

Det har vært et dogme at lakseungen i oppdrettsnæringen skal være en fullt utviklet smolt og at dette er en forutsetning for at fisken skal prestere på topp og ha optimal velferd etter utsett i sjø. Produksjon av større og større smolt (> 300 gram) kan bety at de fleste laksunger som settes i sjøen i fremtiden ikke er en fullverdig smolt selv om den lysstimuleres før utsett. Disse har sannsynligvis spontant utviklet sjøvannstoleranse på et eller annet tidspunkt før igangsetting av smoltstimuli, og vi vet i dag ikke hvorvidt smoltstimuli da fører til at fisken utvikler full smoltstatus. Økende produksjon i RAS anlegg kan medføre problemer mht. lysstimulering på grunn av store kar med 'grumsete' vann. Det viktigste (både for laksen og for oppdretteren) er at fisken presterer godt etter utsett i sjø og at den har god velferd. Kanskje burde prestasjon og velferd etter sjøsetting være det viktigste vurderingskriteriet for hvorvidt en har lykket med å produsere en fisk som er klar for utsett i sjø? Produksjon av større og større smolt i RAS anlegg kan komme til å medføre utfordringer og forskningsmiljøene burde kanskje i større grad forske på status hos lakseungene i kommersielle anlegg?

En konklusjon på disse funn er at diettbehandling synes å være en trygg måte å produsere en sjødyktig lakseunge på, men at kombinasjonen diett- og lysbehandling vil kunne gi en enda bedre prestasjon etter overføring til sjø.

REFERANSER

- [1] B. Hjeltnes m fl. Fiskehelse rapporten 2018, Veterinærinstituttet, 2019.
- [2] S.D. McCormick, Smolt Physiology and Endocrinology, in: Euryhaline Fishes; Fish Physiology, 2013.
- [3] L.A. Norbeck et al. (2007). Gen Comp Endocrinol 151, 332-41.
- [4] M. Iversen et al. (2020). PLoS ONE 15(4): e0227496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227496>
- [5] G. Boeuf & P.-Y. Le Bail (1999). Does light have an influence on fish growth? Aquaculture 177, 129-152.

- [6] J.-E. T. Strand et al. (2018). Photoperiod revisited: is there a critical day length for triggering a complete parr-smolt transformation in Atlantic salmon *Salmo salar*? J. Fish Biol. 93, 440-448.
- [7] S. Basulto, 1976. Induced saltwater tolerance in connection with inorganic salts in feeding of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture 8, 45-55.
- [8] C. Noble et al. (2018). Welfare indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare. Nofima rapport (ISBN 978-82-8296-556-9)
- [9] T. Sigholt et al. (1995). Effects of continuous light and short-day photoperiod on smolting, seawater survival and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 130, 373-388.
- [10] M. Jobling, (1983). Growth studies with fish – overcoming the problems of size variation. J. Fish Biol. 22, 153-157.
- [11] M. Iversen et al. Photoperiod-dependent developmental reprogramming of the transcriptional response to seawater entry in Atlantic salmon (*Salmo salar*). PLoS ONE 15(4): e0227496.
- [12] A. Striberny et al. (2021). More than one way to smoltify a salmon? Effects of dietary and light treatment on smolt development and seawater growth performance in Atlantic salmon. Aquaculture 532, 736044.
- [13] H.C. Ingerslev et al. (2006). Cloning and expression of TNF- α , IL-1 β and COX-2 in an anadromous and landlocked strain of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during the smolting period. Fish & Shellfish Immunology 20, 450-461.
- [14] L.H. Johansen et al. (2016). Differences in gene expression in Atlantic salmon parr and smolt after challenge with Piscine orthoreovirus (PRV). Molecular Immunology 73, 138-150.
- [15] B.Th. Björnsson et al. (2011). Environmental endocrinology of salmon smoltification. Gen. Comp. Endocrinol 170, 290-298.
- [16] N.A. Salman and Eddy F.B. (1987). Effect of dietary sodium chloride on growth, food intake and conversion efficiency in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R). Aquaculture 51, 41-48.
- [17] C. Eva et al. (2006). Physiology and gene regulation of the brain NPY1 receptor. Front. Neurophysiol. 27, 308-339.
- [18] C.E. Dehler et al. (2017). Seawater transfer alters the intestinal microbiota profiles of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Sci Rep* 7, 13877 (2017).
- [19] M. Iversen et al. (2020). RNA profiling identifies novel, photoperiod-history dependent markers associated with enhanced seawater performance in juvenile Atlantic salmon. PLOS ONE 15 (4): e0227496.
- [20] M. Iversen et al. (2021). Photoperiod-dependent developmental reprogramming of the transcriptional response to seawater entry in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *G3*, 11(4), jkab072.
- [21] A.L.S. Houde et al. (2019). Transcriptional shifts during juvenile Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) life stage changes in freshwater and early marine environments. Conservation Physiology 29, 32-42.