

Triploid laks - mottakelighet for smittsomme sykdommer



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute

Triploid laks - mottakelighet for smittsomme sykdommer

Innhold / Content

Sammendrag	3
Summary	4
Innledning	5
Bakgrunn og metode	7
Delprosjekt 1: Mottakelighet for bakterielle sykdommer	7
Delprosjekt 1a): <i>Moritella viscosa</i>	7
Delprosjekt 1b): <i>Tenacibaculum</i> spp.	7
Delprosjekt 2: Mottakelighet for virussykdommer	8
Delprosjekt 2a) IPNV	8
Delprosjekt 2b) SAV	8
Delprosjekt 3: Regulering av immunogener hos triploid og diploid laks	8
Delprosjekt 3a): RRBS og microRNA sekvensering av diploid og triploid hodenyre	8
Delprosjekt 3b): Gen ekspresjons studier av differensielt regulerte immunogener i hodenyre hos infisert laks	9
Resultater og diskusjon	9
Delprosjekt 1 - Mottakelighet for bakterielle sykdommer	9
Delprosjekt 1a): <i>Moritella viscosa</i>	9
Delprosjekt 1b): <i>Tenacibaculum</i> spp.	12
Delprosjekt 2: Mottakelighet for virussykdommer	14
Delprosjekt 2a) IPNV	14
Delprosjekt 2b) SAV	15
Delprosjekt 3: Regulering av immunogener hos triploid og diploid laks.....	16
Delprosjekt 3a). RRBS og microRNA sekvensering av diploid og triploid hodenyre	16
Delprosjekt 3b): Gen ekspresjons studier av differensielt regulerte immunogener i hodenyre hos infisert laks	17
Hovedfunn	19
Major findings	19
Referanser	19

Prosjektgruppe / Forfattere

Veterinærinstituttet:

Hilde Sindre (prosjektleder)

Duncan Colquhoun

Anne Berit Olsen

Hanne Nilsen

Søren Grove

Torunn Taksdal

Saraya Tavornpanich

Havforskningsinstituttet (delprosjekt 3):

Anna Wargelius

Tomasz Furmanek

Rolf Edvardsen

Aquagen (delprosjekt 1 og 2):

Nina Santi

Vibeke Emilsen

Torkjel Bruheim

VESO (delprosjekt 1 og 2):

Marie Løvoll

Anne Ramstad

Christian Wallace

Makoto Inami

Prosjekt 901076

Oppdragsgiver FHF

(Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond)



Design omslag/Design Cover: Reine Linjer

Foto forside / Photo front page: Erling Svendsen

ISSN 1890-3290

© Veterinærinstituttet 2018 / © Norwegian Veterinary Institute 2018

Sammendrag

Produksjon av steril laks er et effektivt tiltak for å redusere genetiske interaksjoner mellom villaks og oppdrettslaks ved rømming. Mange organisasjoner, både norske og internasjonale (NASCO, FAO, ICES, Norske Lakseelver, etc.), er positive til bruk av triploid fisk som et tiltak mot de negative effektene av rømming. Tidligere problemer knyttet til skjelettdeformiteter er redusert, og fullskala utprøving av triploid laks innenfor forsøkskonsesjoner eller såkalte «grønne» konsesjoner pågår. Hvorvidt triploid fisk har samme motstandsdyktighet mot smittsomme sykdommer har imidlertid i liten grad vært undersøkt, og det var derfor et behov for å undersøke mottakelighet for slike sykdommer gjennom kontrollerte smitteforsøk, før triploid laks tas i bruk i større skala. Hvis triploid laks har økt mottakelighet for smittsomme sykdommer vil dette både kunne resultere i økt dødelighet og dessuten mulig økt spredning av smittsomme agens mellom lokaliteter. De økonomiske og velferdsmessige konsekvenser for næringen kan derfor bli store. Målet med dette prosjektet var derfor å undersøke mottakelighet for smittsomme sykdommer hos triploid laks, og dermed generere nødvendig kunnskap om potensielle sykdomsutfordringer som kan oppstå ved bruk av triploid laks i norsk fiskeoppdrett.

Prosjektet besto av tre deler:

- Mottakelighet for bakterielle sykdommer
- Mottakelighet for virussykdommer
- Regulering av immungener hos triploid og diploid laks

I delprosjekt 1 ble mottakelighet for *Moritella viscosa* og *Tenacibaculum* spp. sammenlignet mellom triploid og diploid laks. For *Moritella viscosa*, ga tilsammen 3 smitteforsøk varierende resultater. Det første smitteforsøket viste betydelig større mottakelighet for *Moritella viscosa* i triploid versus diploid laks. Imidlertid hadde den triploid laksen gått på diploid fôr en periode forut for selve smitteforsøket, noe som kunne ha påvirket sykdomsforløpet. Forsøket ble derfor gjentatt. I det repeterte forsøket var det fremdeles en tendens til høyere mottakelighet, selv om forskjellene ikke var signifikante. For rask dødelighet knyttet til forhøyet smittedose kan ha maskert mulige forskjeller mellom gruppene i dette forsøket. Et siste smitteforsøk ble gjennomført, denne gang med både vaksinert og uvaksinert laks. Grunnet manglende tilslag av bakterien i dette forsøket, ble det ikke oppnådd planlagt dødelighet, og resultatene var ikke tolkbare. Resultatene fra det første smitteforsøket gir en indikasjon på at triploid laks kan være mer mottakelig for *Moritella*-smitte enn diploid laks. Som nevnt over ble den triploide laksen i dette forsøket foret med diploid fôr en periode i forkant av smitte, og dette kan ha bidratt til økt dødelighet. Men det ble ikke observert sykdomsproblemer med den triploide laksen i perioden den fikk diploid fôr, og triploid fôr ble deretter tatt i bruk ca. 1 uke før smitte og ble brukt gjennom hele smitteforsøket. I tillegg hadde den triploide gruppen som fikk diploid fôr gjennom hele smitteforsøk 2 ikke høyere dødelighet enn gruppene som fikk triploid fôr. Ukene på diploid fôr forut for smitte kan derfor vanskelig forklare de store forskjellene i dødelighet mellom gruppene alene. Dagens praksis er at laks i sjø er vaksinert mot *Moritella viscosa*, noe som innebærer at en økt mottakelighet for *Moritella viscosa* hos uvaksinert triploid laks ikke nødvendigvis medfører økt mottakelighet også i vaksinert laks. Siden smitteforsøk 3, hvor også vaksinert laks var inkludert ble mislykket, er det ikke mulig å konkludere på den praktiske betydningen i felt av en eventuell økt mottakelighet for *Moritella viscosa* i uvaksinert triploid laks. Smitteforsøket med *Tenacibaculum* spp. viste samlet lav dødelighet, og det var gjennomgående moderat forekomst av sårdannelse i de smittede gruppene. Forsøket viste at den triploide laksen døde noe raskere enn den diploide laksen, og resultatene indikerte også at den triploid laksen kunne være mer utsatt for kohabitantsmitte enn for badsmitte. Imidlertid var det ingen forskjeller i samlet dødelighet mellom triploid og diploid laks.

I delprosjekt 2 ble mottakelighet for Salmonid alphavirus genotype 3 (SAV3) og Infeksiøs pankreas nekrosevirus (IPNV) Sp serotype undersøkt. Smitteforsøket med SAV3 ga lav dødelighet for alle smittede grupper og det var ingen forhøyet dødelighet i gruppene med triploid laks. Gruppene skilte seg heller ikke i virusmengde i hjerte og i produksjon av nøytraliserende antistoffer mot SAV. Et noe lavere antall SAV-positive fisk kunne observeres etter 2 uker i triploide grupper, men senere tidspunkter viste ingen forskjeller. Histopatologiske undersøkelser viste ingen signifikante forskjeller mellom triploid og diploid laks. Konklusjonen fra dette smitteforsøket er at triploid laks ikke er mer mottakelig for SAV3 enn diploid laks.

Smitteforsøket med IPNV viste like høy dødelighet i diploid og triploid IPNV-mottakelig lakseyngel. Det var heller ingen signifikante forskjeller i dødelighet mellom triploid og diploid IPN QTL-laks. Heterozygot triploid lakseyngel hadde like god beskyttelse mot IPNV som den tilsvarende diploid laksen.

I delprosjekt 3 ble regulering av immungener hos triploid og diploid laks undersøkt før og etter smitte med SAV3. Undersøkelsene viste forskjeller i uttrykk av spesifikke immungener mellom frisk triploid og diploid laks. Fisken ble fulgt utover i sykdomsforløpet etter smitte med SAV, og endringer i genuttrykk ble målt. Det ble påvist forskjeller knyttet til viktige immungener mellom triploid og diploid SAV3-smittet laks. Disse forskjellene kunne imidlertid ikke knyttes til forskjeller i sykdomstegn i smitteforsøket, slik at betydningen av funnene for eventuell sykdomsutvikling er uklar.

Det ble også gjennomført RNA-seq analyser på isolerte hvite blodceller fra *Moritella*-smittet diploid og triploid laks for å identifisere ulikt metylerte immungener. Disse ble så sortert og gener som tilhørte ulike «immune pathways» ble identifisert. Resultatene viste at også her ble det funnet forskjeller mellom triploid og diploid laks i respons på smitte. Hvorvidt disse observerte forskjellene kan knyttes til forskjeller i mottakelighet for sykdom må utredes videre.

Summary

Production of sterile salmon is an efficient measure to reduce genetic interactions between wild salmon and escapees from farming. Many organizations ((NASCO, FAO, ICES, Norske Lakseelver, etc.) are positive to using triploid fish to minimize the negative effect of escapes on wild fish populations. Previous problems related to vertebral deformities have been reduced, and fullscale field testing of triploid salmon farming is on-going. However, possible differences between diploid and triploid salmon concerning susceptibility to infectious diseases have not been adequately investigated. Differences in susceptibility to contagious diseases could result in increased mortality and spread of diseases between fish farms. The economic consequences for the fish farming industry could potentially become significant and a higher susceptibility could also negatively affect the welfare of the triploid salmon. The aim of this project was therefore to compare the susceptibility of diploid and triploid salmon to relevant infectious diseases in controlled experimental trials and thereby produce knowledge of importance for both the fish farming industry and the authorities concerning the use of triploid salmon in Norwegian aquaculture.

The project consisted of three parts:

- Susceptibility to bacterial infections
- Susceptibility to virus diseases
- Regulation of immune genes in triploid and diploid salmon

In work package 1, the susceptibility of triploid and diploid salmon to *Moritella viscosa* and *Tenacibaculum* spp. was investigated. For *Moritella*, 3 challenge trials were performed with mixed results. The first experimental trial showed significantly higher susceptibility to *Moritella viscosa* in triploid compared to diploid salmon. However, the triploid salmon had received feed designed for diploid fish for a short period prior to the experimental infection, which could potentially have influenced the result. In a repeated experiment, there remained a tendency towards a slightly higher mortality in the triploid groups, although the differences were not significant in this experiment. However, the increased bacterial dose used in this experiment resulted in rapid increase in mortality for all tanks, and the enhanced infection pressure may have masked differences between diploid and triploid salmon. A final experimental trial was performed, also including a comparison of *Moritella*-vaccinated and un-vaccinated groups. However, as the challenge-model did not work as expected in this experiment, no conclusive data was produced. Taken together, the results from the first experiment indicated a higher susceptibility to *Moritella viscosa* in triploid compared to diploid salmon. The triploid salmon in this experiment were fed diploid feed for a period of time, raising questions whether this could have influenced the results. However, no health issues were observed in the triploid salmon during this period, and feed designated for triploid salmon was introduced prior to the challenge and used for the whole experiment. In addition, a triploid group receiving diploid feed throughout the second experimental trial did not exhibit a higher mortality compared to triploid salmon fed on triploid feed. We therefore consider it very unlikely that the large differences in susceptibility observed in the first experiment could be explained by the period on diploid feed alone. However, salmon used in aquaculture are routinely vaccinated, and a higher susceptibility to *Moritella* infection in unvaccinated triploid salmon does not necessarily imply a higher susceptibility for vaccinated triploid

salmon. As the experiment including vaccinated salmon did not produce results, a conclusion regarding the practical implications for Norwegian aquaculture of a possible higher mortality in unvaccinated triploid salmon cannot be made.

The challenge trial with *Tenacibaculum* spp. showed a low mortality with moderate skin ulcerations in all infected groups. The experiment indicated that the triploid group died earlier than the diploid groups. The results also indicated that the triploid salmon may be more susceptible to fish to fish transmission compared to bath challenge. However, there were no differences in total mortality between triploid and diploid salmon.

In work package 2, the susceptibility for triploid and diploid salmon to Salmonid alphavirus genotype 3 (SAV3) and Infectious pancreas necrosis virus (IPNV) Sp serotype was compared. The challenge trial with SAV3 produced low mortality in all infected tanks, and no enhanced mortality was observed in the triploid groups. Histopathological examinations of the heart and pancreas revealed no difference between the triploid and diploid groups, and the amount of neutralizing antibodies in serum were comparable. A slight lag in the number of SAV-positive fish in the triploid groups could be observed early in the infection, this effect disappearing later on. The results from our experimental trial support a similar susceptibility in triploid and diploid salmon to SAV3.

The challenge trial with IPNV showed no differences in mortality between diploid and triploid IPNV-susceptible non-QTL salmon fry. For the QTL-salmon, our experiment showed that heterozygote IPNV-QTL triploid salmon were equally resistant to IPN disease as the equivalent diploid salmon. The same trend was shown for homozygotes. Taken together, our results show that there are no apparent differences in the susceptibility for salmon fry to IPNV, and we also demonstrate that heterozygote triploid IPN-QTLs retain their resistance to IPN disease.

In work package 3 the regulation of immune genes in triploid and diploid salmon was investigated following SAV3 challenge. Our results showed differences in expression of specific immune genes when comparing healthy and diseased fish. There were also differences in the expression of important genes in triploid compared to diploid fish. However, these differences could not be related to differences in disease development between the groups, and the significance of the findings are therefore unclear. RNA-seq analysis was performed on isolated leukocytes from the different groups in the first experimental *Moritella* trial. These investigations also identified differences regarding the expression of genes involved in various immune pathways in response to *Moritella viscosa*-challenge. Further studies need to be performed to evaluate whether these differences can be related to disease development and mortality.

Innledning

Hvert år rømmer det laks fra oppdrettsanlegg og rømt oppdrettslaks kan blande seg med ville fiskebestander. Siden villaks og oppdrettslaks er tilpasset ulike miljøer, og det er forskjeller i vekstrate, tidspunkt for kjønnsmodning og sykdomsmotstand, kan dette innvirke negativt på villaksbestanden. Norsk havbruksnæring jobber aktivt for å redusere rømming, men selv med gode driftsrutiner vil det kunne oppstå uhell. For eksempel har de senere års ekstremvær medført skade og anleggshavari med rømming av oppdrettsfisk som resultat.

Produksjon av steril laks er et effektivt tiltak for å redusere genetiske interaksjoner mellom villaks og oppdrettslaks ved rømming [1]. Det er i prinsippet flere måter å sterilisere fisk på, men per i dag er triploidisering den eneste kommersielt tilgjengelige metoden. Triploidisering gjennomføres ved å utsette lakserogna for høyt trykk rett etter befruktning, og denne behandlingen resulterer i fisk med tre sett kromosomer (og ikke to som vanlig, diploid fisk). Triploidi kan oppstå spontant hos laksefisk [2, 3], og metodikken for produksjon av triploid laks er basert på forskning utført på 1980-tallet. Innen EU-regelverket anses ikke triploid fisk som genmodifiserte organismer (Direktiv 90/220/CEE av 23. april 1990), og det produseres allerede triploid laksefisk i akvakultur. Ca. 30 % av en produksjon på 33.000 tonn (2010) atlantisk laks i Tasmania er triploid (Brad Evans, SALTAS, pers.med.). Produksjonen av triploid regnbueørret i Europa er på ca. 15.000 tonn [4]. Motivasjonen for denne triploid-produksjonen er ikke rømmingsproblematikk, men å redusere problemer med tidlig kjønnsmodning. Mange organisasjoner, både norske og internasjonale (NASCO, FAO, ICES, Norske Lakseelver, etc.), er positive til triploidisering som et tiltak mot de negative effektene av rømming,

Når det gjelder vekstegenskaper viser tidligere forskning liten eller ingen forskjell mellom diploid og triploid laks, særlig før fisken når slaktemoden alder [4]. Den viktigste innvendingen mot triploid laks har vært at den har større innslag av skjellettdeformiteter og katarakt enn diploid laks [4]. Dette gjør at oppdrettsindustrien i Norge har en skeptisk holdning til bruk av triploid fisk, samt at det kan reises spørsmål omkring de dyrevelferdsmessige sidene ved slik produksjon. Nyere forskning har imidlertid vist at forekomsten av deformiteter kan reduseres ved å inkubere rogn på lavere temperaturer og gi ekstra tilskudd av fosfor i dietten tidlig i settefiskfasen [5, 6]. Tilsvarende vil ekstra tilskudd av histidin gi redusert forekomst av katarakt [7].

Den forskningsbaserte kunnskapen tilsier at det nå er forsvarlig å gjennomføre kontrollert uttesting av storskala produksjon av triploid laks under kommersielle forhold [5-12]. Men produksjonen av slik fisk er så spesiell at den må uttestes og læres gjennom hele produksjonssyklus og under ulike drifts- og miljøforhold. Flere oppdrettselskaper er derfor i gang med fullskala utprøving av triploid laks innenfor forsøkskonsesjoner eller såkalte «grønne» konsesjoner.

Hvorvidt triploid fisk har samme motstandsdyktighet mot ulike smittsomme sykdommer har i liten grad vært undersøkt. Noen av studiene som er tilgjengelige, antyder at triploid fisk kan ha en redusert evne til å motstå sykdom. Weber et al. fant små forskjeller i mottakelighet mellom diploid og triploid regnbueørret for *Vibrio anguillarum*, dog med noe høyere overlevelse hos diploid fisk [13]. Jhingan et al. rapporterte lavere resistens mot *Vibrio anguillarum*-infeksjon i transgenisk triploid Coho laks [14]. Ozerov et al. viste at triploid Atlantisk laks var mer mottakelig for *Gyrodactylus salaris* [2]. Chalmers et al. fant derimot at ploiditet ikke påvirket alvorlighetsgrad av AGD patologi [15]. En studie som sammenlignet beskyttelse etter vaksinerings med kommersiell furunkulosevaksine viste at både triploid og diploid laks hadde god beskyttelse mot eksperimentell infeksjon med *Aeromonas salmonicida* [16]. Ching et al. [17] studerte gentranskripsjon i diploid kontra triploid Chinook laks (*Oncorhynchus tshawytscha*) og konkluderte med at triploid fisk viste samme nivå av gentranskripsjon som diploid fisk, med unntak av når fisken ble stresset, hvor triploid fisk viste dårligere transkripsjon. I triploider av laksefisker gir de ekstrakromosomale kopierne ikke en signifikant additiv effekt i studier i Chinook og Atlantisk laks [17-19]. Det må foreligge en kompensatorisk mekanisme hos triploide individer som sørger for at transkripsjonen nedreguleres til et diploid nivå. I planter er ploidisering en vanlig foredlingsmetode. I flere studier i planter har man også sett at ploidisering ikke er additivt på genekspresjon [20]. Her har man vist til at dette fenomenet er avhengig av epigenetiske mekanismer. Dette inkluderer hypermetylering av DNA, histone acetylering og oppregulering av microRNA. Vi har sett på CpG metyleringen med hjelp av RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) av triploid/diploid DNA i startforingsyngel av laks (720 døgngader). Disse studiene viser at triploider har høyere nivå av CpG metylering enn diploider som tyder på at metylering er en mekanisme som bidrar til kompensasjon av genekspresjon hos triploider [21]. I tillegg er det ikke kjent om det er et av morens eller farens kromosomer som inaktiveres, eller om det er litt fra begge, og om dette varierer fra vev til vev. For sykdommer hvor genetisk resistens spiller en viktig rolle, som feks IPN, er det av avgjørende betydning å vite hvordan resistensen påvirkes. Hvis en mottakelig hunnfisk pares med en resistent hann, vil det triploide avkommet ha høy resistens mot IPN, slik det observeres hos diploid fisk? Eller inaktiveres resistensallelet fra faren? Bør triploid fisk produseres fra hunnfisk med minst ett resistensallel for IPN for å ha sikker motstandsdyktighet mot IPN?

Triploid fisk har 1,5 ganger mer genmateriale enn diploid fisk, og de har derfor en større cellekjerne, mer cytoplasma og større celler. Dette gjør det blant annet mulig å identifisere triploid fisk ved å mikroskopere røde blodlegemer. Det er kjent at triploid Atlant laks er mer sensitiv for lav oksygenmetning i vannet [6]. Dette kan skyldes flere faktorer, blant annet er det vist at triploid Atlantisk laks har redusert gjelleoverflate [22]. Kanskje er det også slik at større erytrocytter fører til redusert gjennomstrømningshastighet i perifere kapillærer sammenlignet med diploid fisk. Dette kan i så fall føre til at triploid fisk har redusert sårheling, som vil være en viktig problemstilling ved produksjon av triploid fisk i Nord-Norge.

De studier som foreligger gir ikke entydige svar på om moderne triploid Atlantisk laks er mer, like eller mindre mottakelig for sykdommene som er aktuelle for norsk lakseoppdrett enn diploid fisk. De økonomiske konsekvensene for oppdrettsnæringen ved bruk av triploid laks, knyttet til eventuell økt dødelighet ved sykdomsutbrudd på den enkelte lokalitet og mulig økt spredning av smittsomme agens mellom lokaliteter, kan bli store. Økt sykdomsforekomst vil også påvirke smittepresset i miljøet og oppdrettslaksens velferd negativt.

Målet med dette prosjektet har vært å avklare om triploid laks har samme motstandsdyktighet som diploid laks mot sykdommer av stor relevans for norsk oppdrettsnæring. Vi valgte å fokusere på to bakterier av stor betydning for sårdannelse, *Moritella Viscosa* og *Tenacibaculum* spp., og to svært utbredte virussykdommer, IPN og PD. Utvalget ble foretatt ut fra kriterier om at sykdommen må være utbredt i norsk fiskeoppdrett, være en trussel for det geografiske området hvor triploid fisk er tenkt brukt og at det må være tilgjengelig smitte modeller som kan benyttes. For å kunne besvare problemstillingen best mulig, var det viktig å inkludere mer enn et smittestoff i hver gruppe. *Moritella Viscosa* og *Tenacibaculum* spp. gir begge sårdannelse hos laks. *Moritella* gir en systemisk infeksjon, mens infeksjonen med *Tenacibaculum* er begrenset til sårområdet. Dette antyder at samspillet mellom laks og bakterie skiller seg mellom disse to bakterietypene. Også for virus er det forskjeller i interaksjon mellom virus og vert avhengig av virustype. IPNV er et nakent dobbelttrådet RNA virus [23], mens SAV er enkelttrådet og membrankledt [24]. Dette har betydning for hvilke responser infeksjonen utløser hos laksen, forløpet av sykdommen, og vertsfaktorer av betydning for beskyttelse varierer derfor mellom ulike virus. Det er tidligere vist at forskjeller i motstandsdyktighet mot virusinfeksjon mellom laksestammer kan korreleres med forskjeller i uttrykk av immungener, både før og under infeksjonen [25]. Derfor ønsket vi å undersøke hvordan genomet i en triploid fisk reguleres i forhold til diploid fisk og hvordan triploidisering dermed kunne påvirke immunsystemet hos laks. Målet var å identifisere immungener som reguleres ulikt hos triploider og diploider gjennom reguleringsstudier, og på sikt bidra med forklaringsmodeller for ulikt immunforsvar hos diploider og triploider. Prosjektet besto av 3 deler hvor både mottakelighet mot bakterier, virus og endring i genuttrykk mellom diploid og triploid laks skulle undersøkes.

Bakgrunn og metode

Delprosjekt 1: Mottakelighet for bakterielle sykdommer

Sårutvikling er en av de mest tapsbringende sykdomstilstander i norsk lakseoppdrett. Flere bakterietyper, blant annet *Moritella viscosa* og *Tenacibaculum* sp. er knyttet til forskjellige varianter av tilstanden.

Delprosjekt 1a): *Moritella viscosa*

Typisk "vintersår" som er beskrevet fra sent 80-tall er knyttet hovedsakelig til infeksjon med bakterien *Moritella viscosa* og forekommer langs hele norskekysten, men særlig i nord. Selv om vaksiner mot *M. viscosa* er utbredt i norsk akvakultur, er sykdommen fortsatt utbredt, noe som kan indikere et sammensatt årsaksforhold eller/og ikke optimale vaksinebeskyttelse. Gode badsmitte modeller for *M. viscosa* er utviklet av flere kommersielle aktører. I dette prosjektet skulle en smitte modell fra VESO Viken benyttes. I denne modellen kunne sykdommens forløp kontrolleres gjennom temperaturregulering dvs sykdom kunne etableres, forløp kontrolleres og avsluttes ved skifte i vanntemperatur [26, 27]. Sårutvikling, dødelighet og sårheling i diploid og triploid fiskepopulasjoner skulle sammenlignes. Sårutvikling (hastighet og grad) skulle studeres både visuelt (scoring av antall sår, plassering, omfang osv) og ved histologi og dødeligheten registreres under første fasen av smitten. Prøver skulle også hentes inn molekylærundersøkelse av fiskens immunrespons (Delprosjekt 3). Deretter skulle infeksjonen avsluttes ved å heve temperaturen og sårheling studert (som for utvikling) i begge typer fisk.

Delprosjekt 1b): *Tenacibaculum* spp.

Infeksjon i sår med *Tenacibaculum* har vært påvist hos laks i oppdrett i sjø siden 1980-tallet og Veterinærinstituttet har senere vist at 60-70 % av «vintersår» er infisert med disse bakteriene enten sammen med *Moritella viscosa* eller som dominerende eller eneste bakterielle funn [28]. De siste 3-4 årene har infeksjoner med *Tenacibaculum* fått mer oppmerksomhet og det ser ut til å ha vært en økning i sårtilfeller der disse bakteriene dominerer. Dette gjelder særlig når fisken har ulcerasjoner i hoderegionen og det kan se ut som om det er Nord-Norge som har de største utfordringene, og spesielt ved lave sjøtemperaturer.

Genetisk karakterisering utført av Veterinærinstituttet og i et samarbeidsprosjekt bl.a. med INRA i Frankrike, viser at *Tenacibaculum* isolert fra sår hos fisk i marint miljø ikke er helt ensartet, men deler seg i tre-fire hovedgrupper. Sårutvikling hos laks under eksperimentelle forhold er tidligere vist for en av disse gruppene. I smitteforsøk gjennomført av Veterinærinstituttet i samarbeid med Havforskningsinstituttet og Nofima ble det vist at *Tenacibaculum*-bakterier ga sårutvikling, hvis fisken

allerede hadde en skade i huden, men hvis fisken ble eksponert for mange bakterier over lengre tid ble det også utviklet hudsår uten at huden var skadet på forhånd. Bakteriene infiserte også øyets hornhinne. I tillegg til å ha et potensiale som primærpatogen, er en sannsynlig og viktig effekt av disse bakteriene å vedlikeholde sår og å hemme sårheling. Det er stort behov for forskning på denne bakterien, ikke minst under eksperimentelle forhold. Smittemodellen som er brukt tidligere for de norske bakteriene, er tilpasset fra en bademodell tidligere utviklet for *Tenacibaculum maritimum*. Det gjensto imidlertid å tilpasse og å teste reproduktibilitet under norske forhold. Det ble derfor gjennomført en liten smittepilot før hovedforsøket. Også for *Tenacibaculum* skulle det gjennomføres smitteforsøk på VESO Vikan, og sårutvikling, dødelighet og sårheling i diploid og triploid fiskepopulasjoner skulle sammenlignes.

Delprosjekt 2: Mottakelighet for virussykdommer

En rekke ulike virussykdommer er svært utbredte i norsk lakseoppdrett. Potensialet for spredning mellom ulike lokaliteter er stort, og selv mindre endringer i mottakelighet kan ha store konsekvenser.

Delprosjekt 2a) IPNV

IPN har tidligere vært svært utbredt i norsk fiskeoppdrett, både i settefiskfase og sjøfase. Bruk av IPN QTL-laks har ført til betydelig reduksjon i dødelighet av denne sykdommen, men viruset er likevel svært utbredt. En eventuell økt følsomhet hos triploid laks for dette viruset vil derfor kunne medføre store økonomiske konsekvenser for norsk fiskeoppdrett. Det er i tillegg utarbeidet gode, dokumenterte smittemodeller for IPNV på VESO Vikan. Viruset var derfor et naturlig valg for å undersøke mottakelighet mot virussykdommer.

Smitteforsøket skulle utføres på VESO Vikan.

Delprosjekt 2b) SAV

PD er en meldepliktig sykdom som de senere år har vist en økt forekomst med spredning til nye områder. Dødelighet har til nå vært forholdsvis lav, spesielt i tilknytning til utbrudd forårsaket av genotypen SAV2. Imidlertid viser viruset stort potensiale for horisontal spredning, og viser en økt utbredelse nordover. Inntil nå har det vært utfordrende å etablere gode smittemodeller for PD-virus (SAV), spesielt har det vært vanskelig å oppnå dødelighet. Veterinærinstituttet hadde, i samarbeid med VESO Vikan, gjennomført et stort smitteforsøk finansiert av FHF (FHF 900799) med godt resultat, og modellen som ble etablert skulle benyttes [29]. Med tanke på at konsesjoner for bruk av triploid fisk er tildelt i Nord Norge, et område som er definert som PD-fritt, men som opplever sporadiske PD-utbrudd, var det viktig å inkludere PD-virus i prosjektet. Økt mottakelighet for PD-virus kunne gi svært uønskede effekter på dødelighet og spredning av dette viruset inn i til nå PD-frie områder.

Smitteforsøket skulle utføres på VESO Vikan.

Delprosjekt 3: Regulering av immunogener hos triploid og diploid laks

Havforskningsinstituttet har i et pågående prosjekt (NFR Prosjektnr: 900723) sett at triploidisering virker non-additivt på genekspresjon i Atlantisk laks [30]. Dataene viser også at noe av mekanismen bak den non-additive genekspresjonen hos triploider skyldes økt metylering av genomet, noe som bidrar til normalisert genekspresjon. I dette prosjektet ønsket vi å studere videre disse epigenetiske mekanismene hos diploid og triploid laks for å komme ned på det enkelte immunogen-nivå. Hvis det ble påvist forskjeller mellom diploid og triploid laks i regulering av immunogener, kunne dette ha betydning for mottakelighet for infeksjonssykdommer. Med en multifaktoriell tilnærming var målet å kunne avdekke ikke bare om det er forskjeller i mottakelighet mellom de to gruppene, men også antyde hvorfor. Resultatene fra delprosjekt 3 ville derfor kunne tilføre viktig kunnskap om genetiske forskjeller mellom diploid og triploid laks og denne informasjonen kunne knyttes sammen med kunnskap om respons på bakterie og virusinfeksjoner fra delprosjekt 1 og 2.

Delprosjekt 3a): RRBS og microRNA sekvensering av diploid og triploid hodenyre

Vi har tidligere kjørt RRBS på embryo for å identifisere differensielt metylerte gener i genomet hos diploid og triploid embryo av laks [21]. Imidlertid var ikke dette materialet sekvensert dypt nok til å identifisere enkeltgener, og vi hadde bare ett replikat per ploid. I tillegg består embryo av flere forskjellige vev, noe som ikke er gunstig siden metyleringsmønster er forskjellig mellom ulike vev. Det skulle derfor

gjennomføres en ny RRBS med større dypde og med tre replikater av immunvevet (hodenyre). Dette ville med større sannsynlighet identifisere ulikt metylerte immungener. En metode for analyse av denne type data var allerede utviklet [21]. Differensielt metylerte gener kunne siden sorteres på KEGG tilhørighet, og dermed kunne gener som tilhører immunologiske "pathways" identifiseres [31, 32].

Delprosjekt 3b): Gen ekspresjons studier av differensielt regulerte immungener i hodenyre hos infisert laks

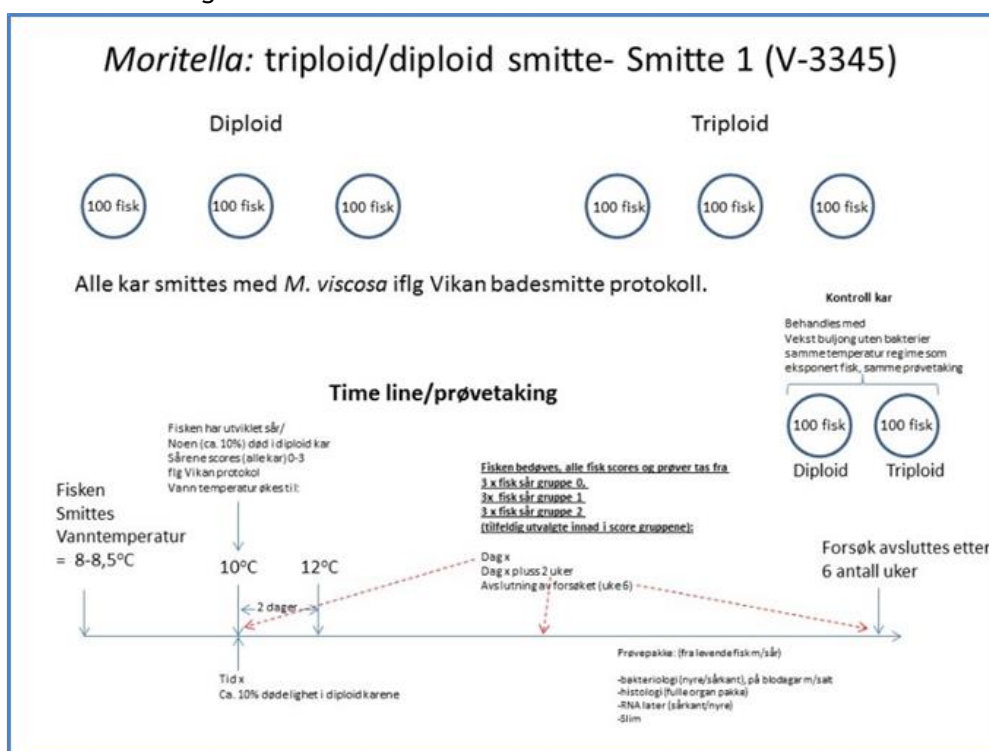
Opprinnelig plan inkluderte undersøkelser av uttrykk av immungener ved smittforsøk for IPNV. Imidlertid var dette et yngelforsøk, og det ville være vanskelig å innhente tilstrekkelig materiale fra smittforsøket. Det ble derfor valgt å inkludere Moritella-smittforsøket i stedet, spesielt siden foreløpige resultater tydet på forskjeller mellom gruppene. I dette delprosjektet skulle genekspresjon i hodenyre av immungener som er differensielt regulert i diploid og triploid laks (fra delprosjekt 3a) undersøkes. Dette ble dels gjort på materiale fra Moritella-smittforsøket (HI) og dels gjort på materiale fra SAV-smittforsøket (VI). Ulike tilnærminger ble benyttet.

Resultater og diskusjon

Delprosjekt 1 - Mottakelighet for bakterielle sykdommer

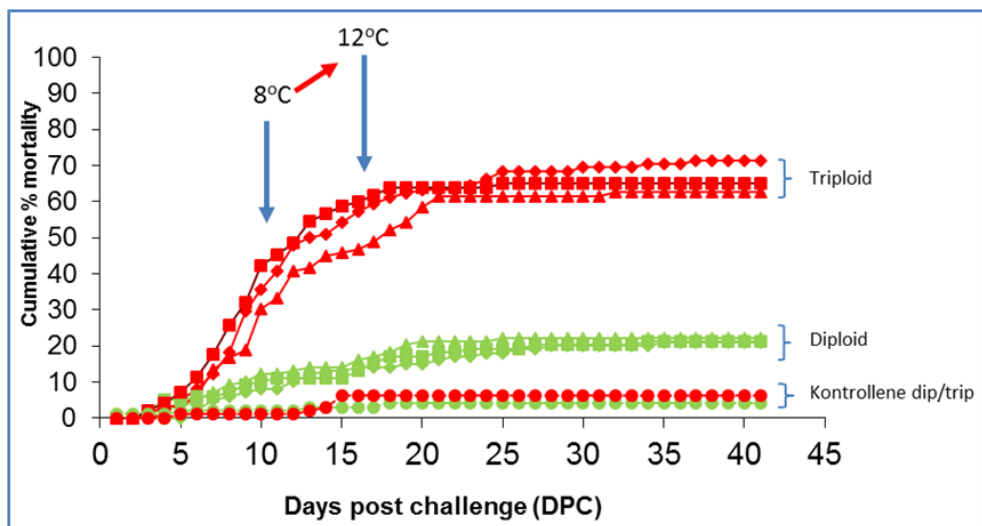
Delprosjekt 1a): *Moritella viscosa*

Det ble gjennomført 3 smittforsøk ved VESO Viken. I samtlige forsøk ble diploid og triploid laks fra samme familiegruppe benyttet. Til de to første forsøkene ble det levert laks fra AquaGen, mens det for det siste av forsøkene ble levert vaksinert og uvaksinert laks fra Nordlaks. Oppsett for første smittforsøk er vist under i Figur 1.



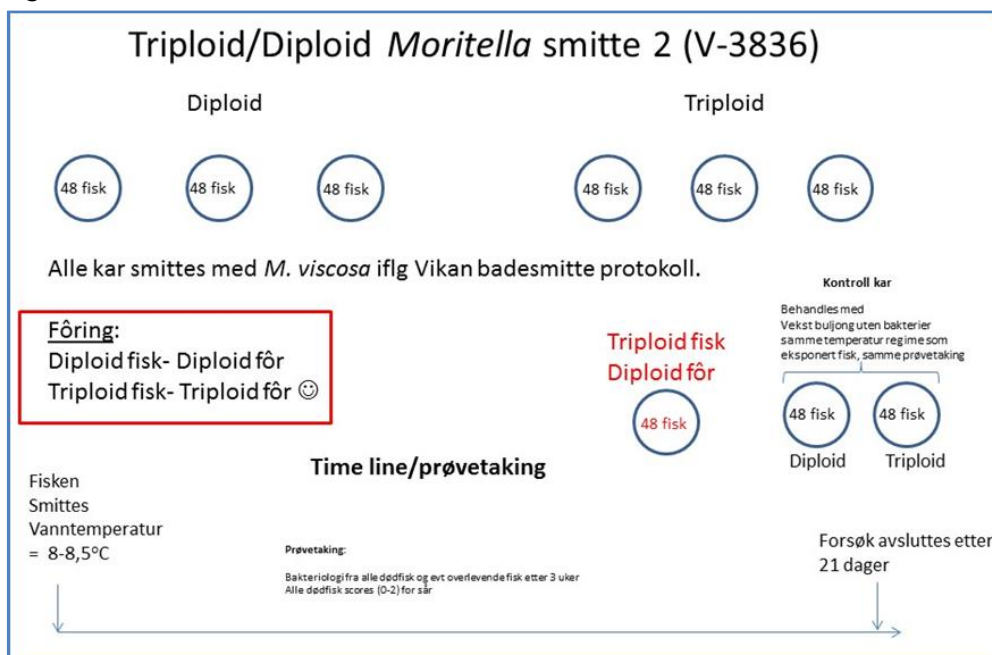
Figur 1: Forsøksoppsett *Moritella* første smittforsøk (V-3345)

Forsøk 1 viste klar forskjell i dødelighet mellom triploid og diploid laks som vist i Figur 2 under.



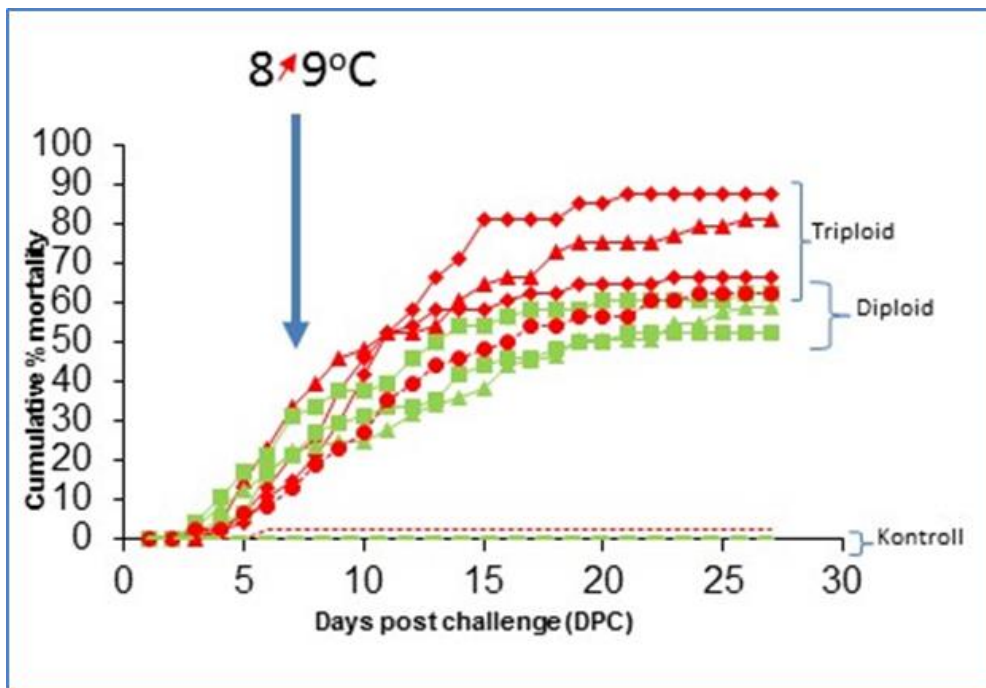
Figur 2: Akkumulert dødelighet etter smitte med *Moritella* (V-33455)

Imidlertid ble den triploide fisken foret med diploid fôr i ca. 1 måned etter ankomst VESO Viken før den ble satt over på fôr dedikert til triploid laks før selve forsøket. Da man ikke kunne utelukke at dette hadde innvirket negativt på den triploide laksens helsesituasjon og dermed også motstandsdyktighet mot sykdom, ble det besluttet å gjenta dette forsøket. Forsøksoppsett i smitteforsøk nr. 2 med *Moritella* er vist under i Figur 3.



Figur 3: Forsøksoppsett smitteforsøk 2 med *Moritella* (V-3836)

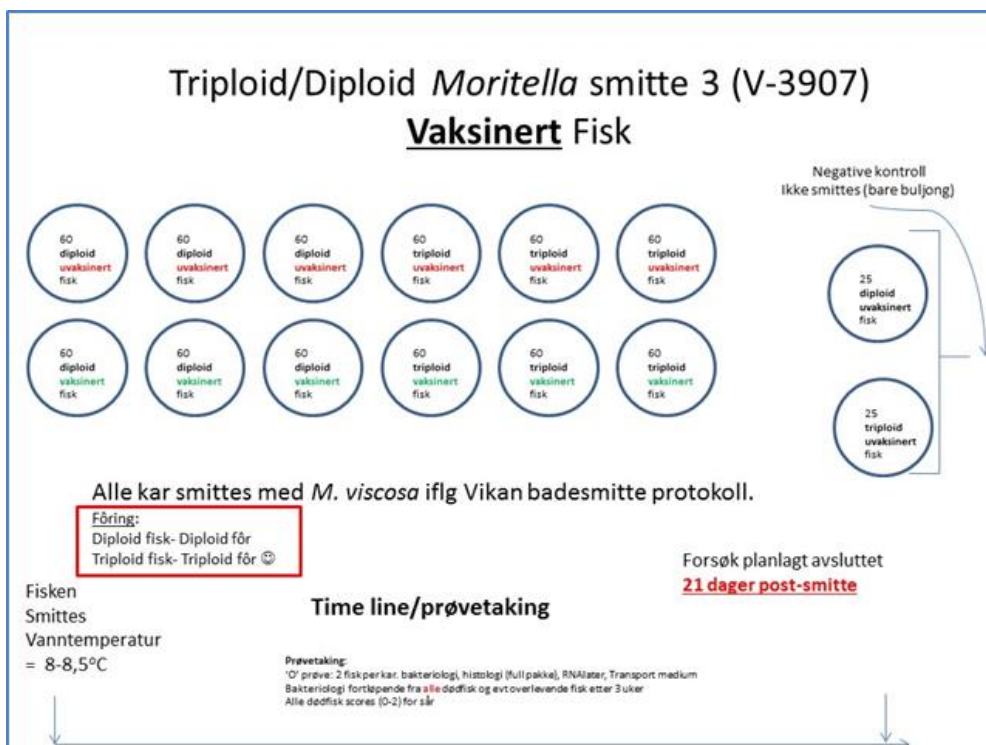
Planen for dette forsøket var å utelukkende konsentrere seg om dødelighet og ikke sårheling, på grunn av de store forskjellene som ble observert i forrige forsøk. Sykdomsutviklingen skulle derfor ikke stoppes ved å øke temperaturen etter en gitt tid som i forsøk 1. Imidlertid fikk man raskt en uønsket forhøyet dødelighet i forsøket, forårsaket av 3-5x høyere smittedose enn normalt. For å hindre 100% dødelighet tidlig i forsøket, måtte derfor temperaturen økes etter bare 8 dager, men hindret likevel ikke høy dødelighet i alle grupper. Forsøket viste likevel en tendens til ca. 10% høyere dødelighet i den triploide kontra den diploid gruppen (Figur 4).



Figur 4: Akkumulert dødelighet smitteforsøk 2 *Moritella*

På grunn av stor variasjon mellom karene var denne forskjellen ikke signifikant. Det er verdt å merke seg at karet med triploid laks som hadde gått på diploid før hele forsøket, hadde lavest dødelighet mellom de triploide gruppene, noe som gir støtte til at diploid før ikke innvirker negativt på overlevelsen av triploid laks etter *Moritella*-smitte, iallfall ikke i de tidsrammer som er undersøkt her.

Et siste smitteforsøk med *Moritella* (Figur 5), hvor også vaksinert laks var inkludert, ble så gjennomført. Laksen som er i bruk i akvakultur er vaksinert, og det var derfor viktig å undersøke om en eventuell forhøyet mottakelighet for *Moritella* hos triploid laks også kunne påvises etter vaksinering.

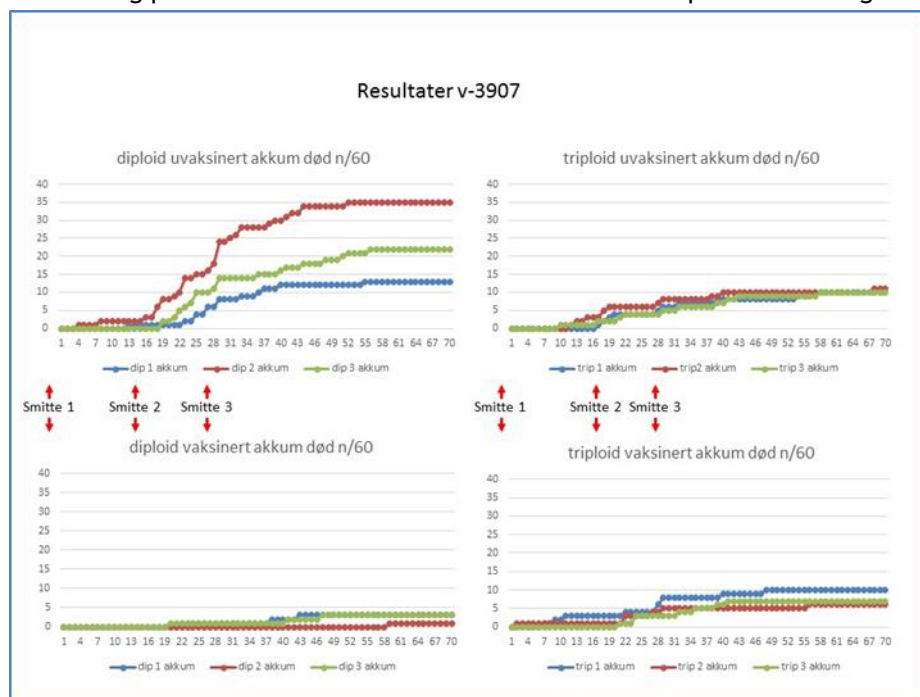


Figur 5: Forsøksoppsett smitteforsøk 3 - *Moritella* (V-3907)

Forsøksoppsettet for Forsøk 3 er vist i Figur 5 over. I forkant av forsøket ble det klart at VESO Vikan hadde problemer med sin *Moritella*-smittemodell. Det ble jobbet intensivt med å løse problemet, men det viste

seg etter første smittedose at det dessverre var svært lav dødelighet i forsøket. For å bøte på dette ble smitte gjentatt 2 ganger; dag 15 og dag 20 etter første smittedose, og forsøksperioden ble forlenget fram til dag 70 etter smitte mot planlagt avslutning dag 21 etter smitte.

I dette siste forsøket viste uvaksinert diploid *Moritella*-infisert laks forhøyet dødelighet sammenlignet med vaksinert diploid laks. For de triploide laksegruppene var det for lavt anslag i alle kar og ingen signifikant effekt av vaksinerings. De store problemene med å oppnå anslag av *Moritella* i dette siste forsøket gjør det dessverre umulig å konkludere verken på mottakelighet av *Moritella* i triploid laks eller effekt av vaksinerings på denne laksen. Oversikt over resultater er presentert i Figur 6.



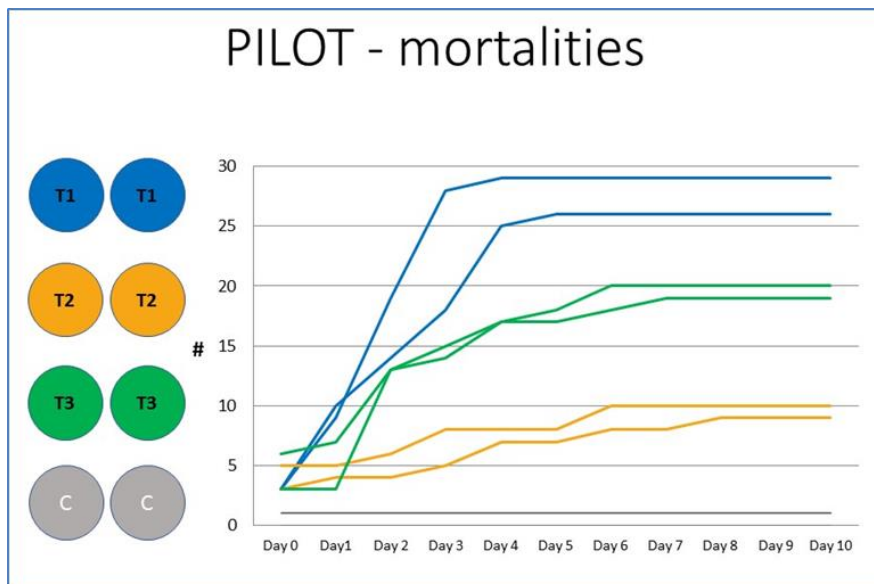
Figur 6: akkumulert dødelighet smitteforsøk 3 *Moritella* (V-3907)

Samlede konklusjoner for *Moritella*-smitteforsøkene:

Første smitteforsøk tyder på at triploid laks er betydelig mer mottakelige for *Moritella viscosa* enn diploid laks. Den triploid laksen i dette forsøket ble foret med diploid fôr en periode i forkant av smitte, og dette er et avvik fra opprinnelig plan. Fôr til triploid laks er sammensatt for å utnytte det høye tilvekstpotensialet og samtidig hindre misdannelser og kataraktutvikling, og har forhøyede nivåer av mineraler og aminosyrer (info fra BioMar, EWOS). Men det ble ikke observert sykdomsproblemer med den triploide laksen i perioden den fikk diploid fôr i forkant av forsøksstart, og triploid fôr ble deretter tatt i bruk ca 1 uke før smitte og ble brukt gjennom hele smitteforsøket. I tillegg hadde den triploide gruppen som fikk diploid fôr gjennom hele smitteforsøk 2 ikke høyere dødelighet enn gruppene som fikk triploid fôr. Ukene på diploid fôr forut for smitte kan derfor vanskelig alene forklare de store forskjellene i dødelighet mellom gruppene. Forsøk 2 indikerer også økt mottakelighet, men det er umulig å konkludere for forsøk 3 på grunn av problemer med bakteriens anslag.

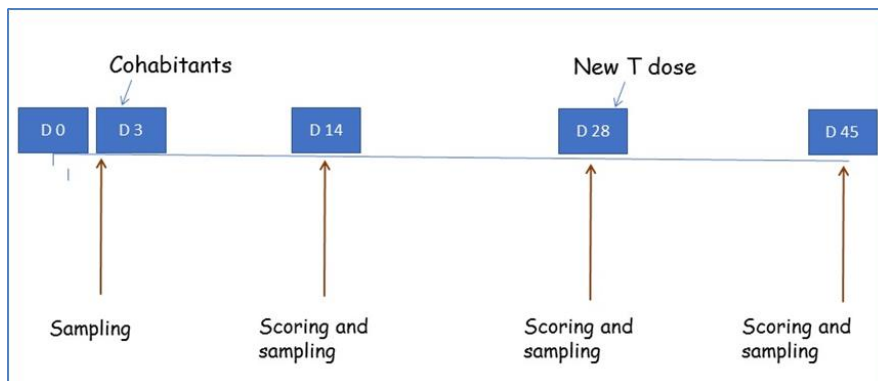
Delprosjekt 1b): *Tenacibaculum* spp.

Planen var å først gjennomføre en pilot for å etablere smitte modellen for *Tenacibaculum*. Piloten ble gjennomført på vanlig diploid laks og 3 utvalgte bakteriesterammer fra Veterinærinstituttet Bergen. Utvalget ble gjort på basis av genotype og virulens. Resultat av smittepiloten er vist under i Figur 7.



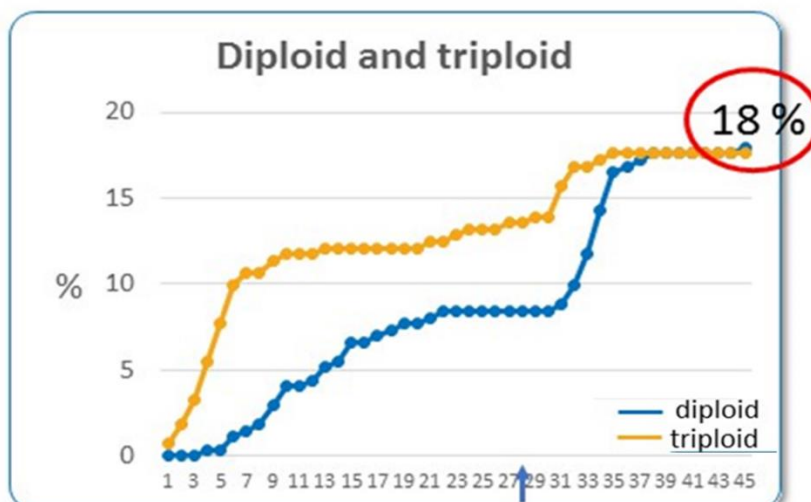
Figur 7: Akkumulert dødelighet smittepilot *Tenacibaculum*, tre ulike bakteriestammer.

Utfra erfaringene i piloten ble oppsett bestemt for hovedforsøket. Figur 8 under viser planlagt tidslinje for forsøket.



Figur 8: Tidslinje smitteforsøk *Tenacibaculum*

Resultatene fra hovedforsøket viste gjennomgående lavere dødelighet enn ønsket og moderat forekomst av sår. Selv om den samlede dødeligheten til slutt i smitteforsøket var den samme for begge grupper, viste resultatene av den triploid laksen døde raskere enn den diploide. Det var også forskjeller mellom triploid og diploid laks når det gjaldt badsmitte versus kohabitantsmitte. Triploid laks virket mindre utsatt for badsmitte, mens de var mer følsomme for kohabitantsmitte. Figur 9 viser den totale akkumulerte dødeligheten i forsøket.



Figur 9: Akkumulert dødelighet smitteforsøk *Tenacibaculum* spp.

Konklusjoner:

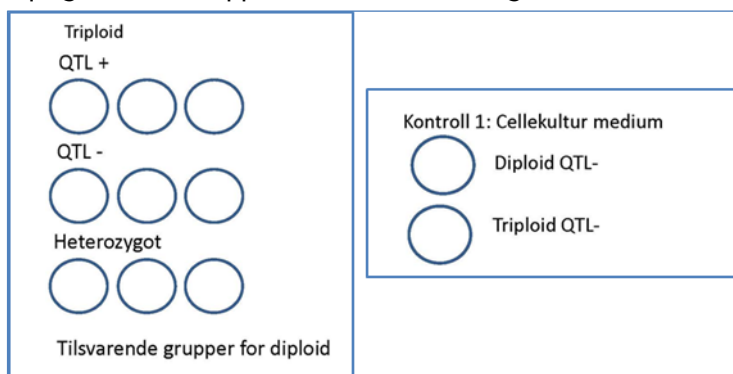
Tenacibaculum spp. forårsaker dødelighet og sårskader i Atlantisk laks, og det er forskjeller i virulens mellom ulike arter/genotyper. Håndtering har betydelig effekt på dødelighet og bakterien kan påvises opptil 4 uker etter smitte.

Det er ingen forskjell mellom totaldødelighet eller sårutvikling mellom triploid og diploid laks, men resultatene kan tyde på at triploide kohabitanter er mer mottakelige enn diploide.

Delprosjekt 2: Mottakelighet for virussykdommer

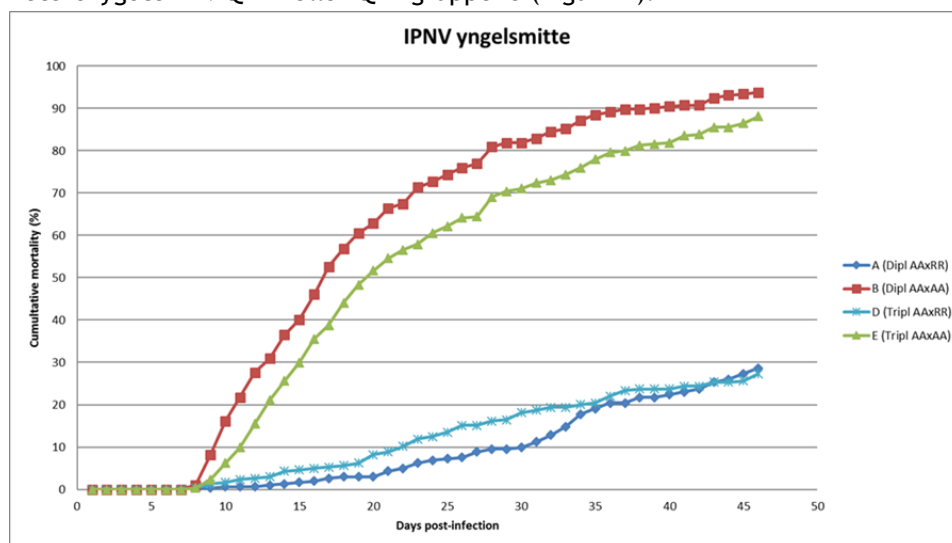
Delprosjekt 2a) IPNV

Yngelsmitteforsøk med IPNV ble gjennomført på VESO Viken i mai-juli 2016. Forsøksfisken ble levert fra Aquagen. Forsøksoppsett er vist under i Figur 10.



Figur 10: Forsøksoppsett smitteforsøk yngel IPNV

Smitteforsøket viste ingen forskjeller mellom diploid og triploid laks i mottakelighet for IPNV for de heterozygote IPN-QTL+ eller QTL gruppene (Figur 11).



Figur 11: Akkumulert dødelighet IPNV yngelsmitte diploid og triploid laks.

Det ble påvist infeksjon med *costia* i smitteforsøket som ga noe høyere bakgrunnsdødelighet i alle grupper. For de 2 homozygote gruppene av diploid og triploid QTL+ laks ble det påvist store mengder *costia*, og disse gruppene er derfor ekskludert fra figuren. Men selv om dødeligheten for disse gruppene var høyere enn normalt, var det ingen signifikant forskjell i dødelighet mellom triploid og diploid homozygot QTL+ laks. Det ble heller ikke påvist noen forskjeller når det gjelder virusmengde eller patologiske endringer mellom triploid og diploid laks.

Konklusjon: Våre resultater tyder på at triploid laks ikke er mer mottakelig for IPNV enn diploid laks, og at heterozygot triploid IPN QTL+ laks er like beskyttet mot sykdommen som heterozygot diploid IPN QTL+ laks.

Delprosjekt 2b) SAV

Mottakelighet for SAV3 skulle undersøkes i diploid og triploid SAV QTL-laks fra AquaGen. Smitteforsøket ble gjennomført som et kohabitantforsøk hvor vanlig SAV-mottakelig diploid laks av VESO Vikans egen produksjon ble injisert med SAV3 og deretter overførte smitte til de kohabiterende gruppene.

Smitteforsøk Triploid/PD FHF

Mål: Kartlegge forskjeller i mottakelighet for PD-virus (SAV) mellom triploid og diploid laks.

Design: kohabitant-smitte med 20% injiserte fisk

Antall kar: 14 (SAV3, 2 diploid grupper, 2 triploid grupper = 6 kar x 3 parallelle kar) + 1 kontrollkar diploid og 1 kontrollkar triploid)

SAV3 Diploid PD sterk/mod	SAV3 Triploid PD sterk/mod	SAV3 Triploid PD svak	SAV3 Diploid PD svak	Kontroll Diploid PD svak + sterk/mod	Kontroll Triploid PD svak + sterk/mod
X3	x3	x3	x3	x1	x1

Fisk:

2040 nylig smoltifisert laks fordelt mellom følgende grupper:

420 PD sterk/moderat diploid – levert fra AquaGen

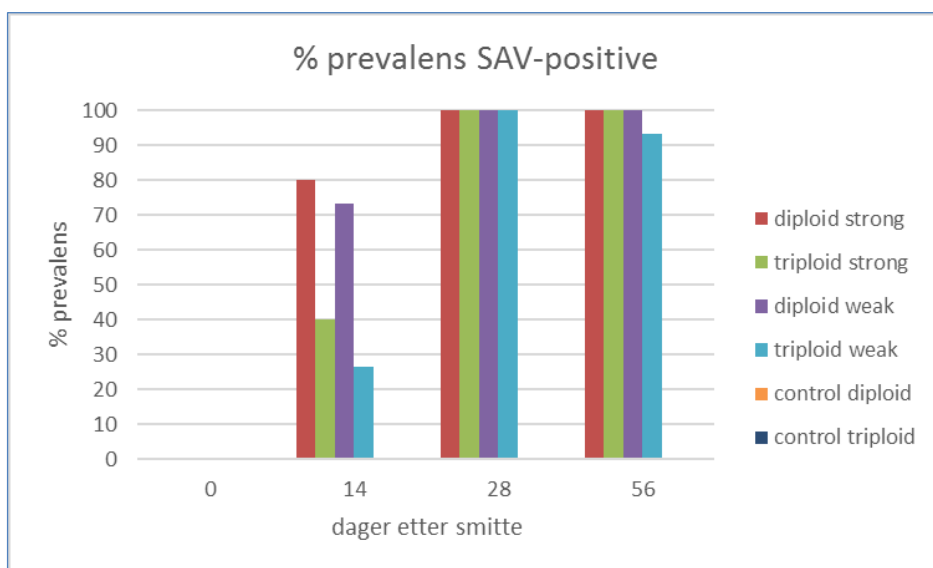
420 PD sterk/moderat triploid – levert fra AquaGen

420 PD svak diploid – levert fra AquaGen

420 PD svak triploid – levert fra AquaGen

360 vanlig nylig smoltifisert laks – VESOs egen?

Som forventet i kohabitantforsøk med SAV, ble det ikke påvist dødelighet av betydning i forsøket, heller ikke i de triploide gruppene. Siden dødeligheten var så lav ble det heller ikke funnet signifikante forskjeller mellom dødelighet for de ulike smittede gruppene. Analyser av virusmengde mellom ulike grupper viste tilsvarende mengder virus i alle infiserte grupper og histopatologiske undersøkelser viste heller ingen forskjeller av betydning. Produksjon av nøytraliserende antistoffer mot SAV i blodplasma ble også undersøkt mellom de smittede gruppene. Heller ikke her ble det funnet forskjeller mellom diploide og triploide grupper. Den triploide laksen hadde samme prevalens og mengde av antistoffer i blodet etter smitte som de diploide laksegruppene. Den eneste forskjellen som kunne påvises mellom diploid og triploid laks var en lavere forekomst av viruspositive kohabiterende triploide laks to uker etter ip-smitte sammenlignet med diploide laks (Figur 12). Denne forskjellen var borte etter 4 uker, og er i samsvar med nylig publisert resultater på SAV3 [33]. Resultater fra et yngelsmitteforsøk med SAV1 støttes også konklusjonen om at triploid laks ikke er mer mottakelig for SAV enn diploid laks [34].



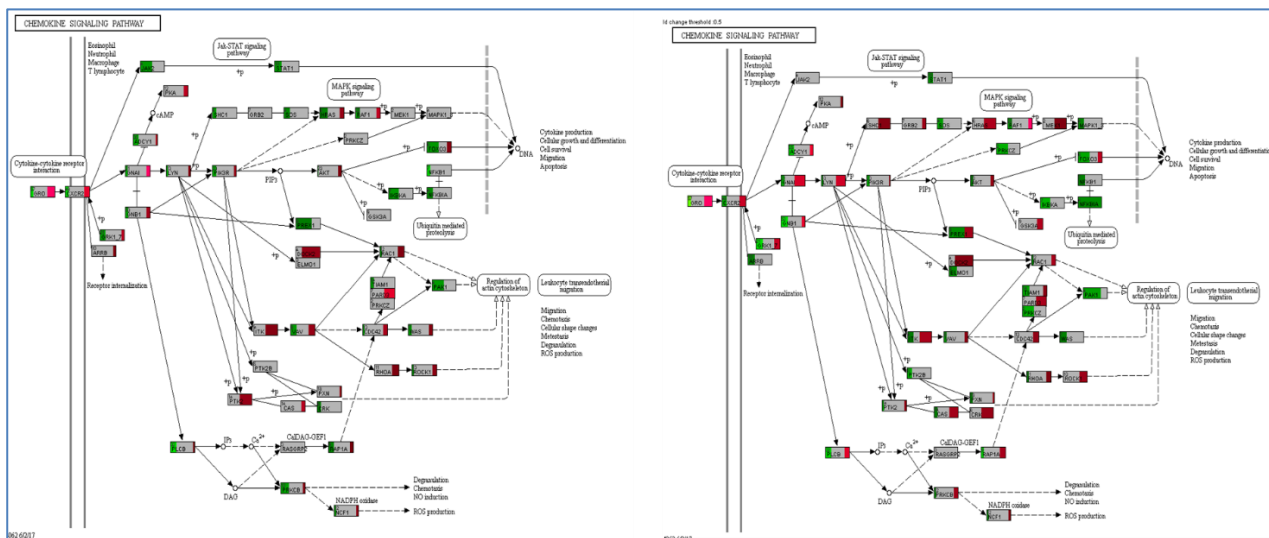
Figur 12: Prevalens SAV-positive - smitteforsøk SAV3

Konklusjon: Våre resultater og andre publiserte funn tyder på at triploid laks ikke er mer mottakelig for SAV enn diploid laks.

Delprosjekt 3: Regulering av immunogener hos triploid og diploid laks

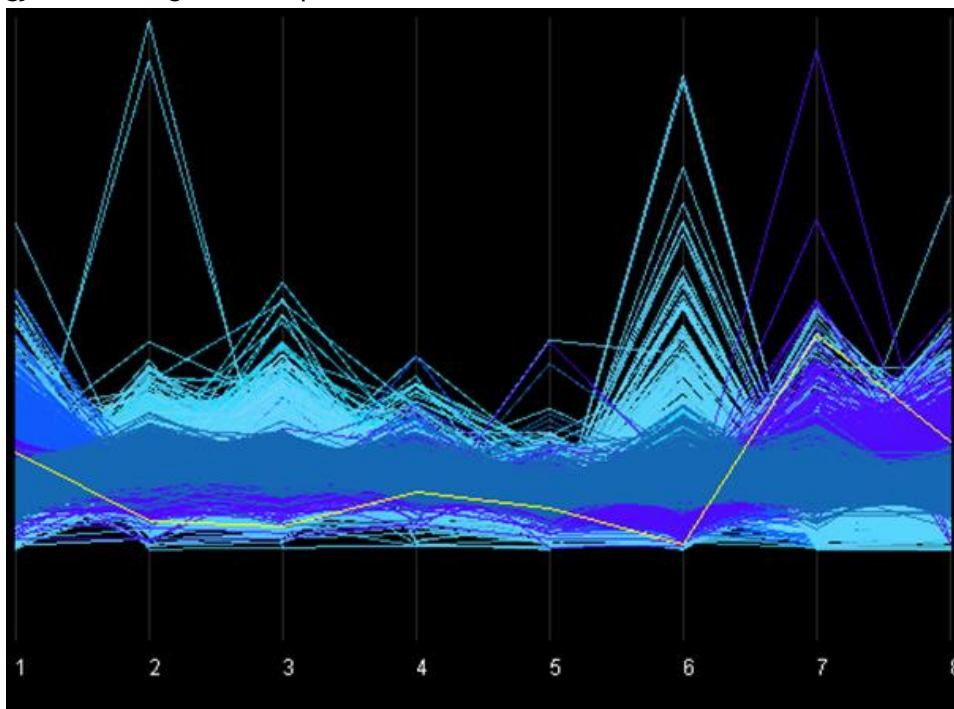
Delprosjekt 3a). RRBS og microRNA-sekvensering av diploid og triploid hodenyre

Resultater fra andre prosjekter viser at RRBS er vanskelig å tolke, spesielt uten RNA-seq data. Det samme gjelder til en viss grad for microRNA. Grunnet dette ble det gjennomført RNA-seq istedenfor. Fra det første *Moritella*-smittforsøket ble det rensset total-RNA fra leukocyter fra triploid og diploid individer med ingen, moderat og høy sår dannelse. I tillegg ble det rensset RNA fra triploid og diploid kontrollfisk. Dette materialet ble så sendt til Norwegian Sequencing Centre i Oslo for sekvensering. Stranded RNA-seq libraries ble sekvensert på Illumina HiSeq-4000. Gjennomsnittlig 36 millioner reads fra hver prøve ble mapnet mot siste versjon av referanse genomet (gjennomsnittlig mapping ~80%). Lister med normaliserte genuttryksverdier for alle gener ble produsert og disse ble så brukt til analyser av variasjoner i metabolske signalveier gjennom KEGG. I tillegg ble k-means analyser gjennomført. Analysene er ikke ferdige, men viser klart signalveier differensielt påvirket av smitten (Figur 13).



Figur 13: KEGG analyser viser at blant annet at «chemokine signalling pathway» er påvirket av smitte. Til venstre er triploidsmittet mot triploid kontroll. Til høyre diploid smittet mot diploid kontroll.

K-means-analyser viser at det også er forskjeller mellom triploid og diploid (Figur 14) blant annet når det gjelder innslag av blod i prøvene.



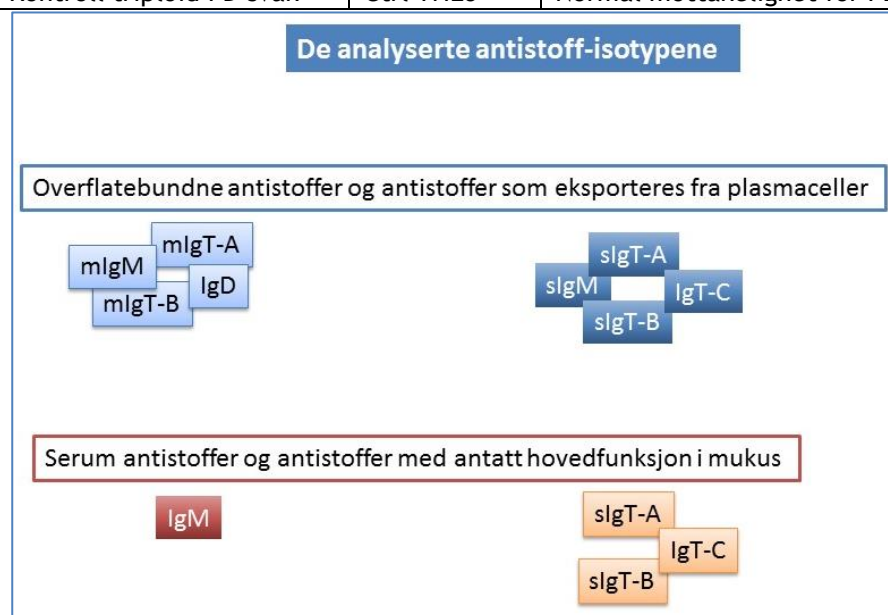
Figur 14: K-means analyse. Prøver 1,2,3 er diploid med økende sår mengde. 4,5,6 er triploid med økende sår mengde. 7 og 8 er diploid og triploid kontroll. Gul linje viser relativt hemoglobin nivå i prøvene

Delprosjekt 3b): Genekspresjonsstudier av differensielt regulerte immungener i hodenyre hos infisert laks

Nøytraliserende, SAV-spesifikke antistoffer er vist å være 100% beskyttende mot eksperimentell infeksjon med SAV (Houghton & Ellis 1996), og det er allerede vist at uttrykk fra genet for serum IgM varierer mellom ulike laksestammer med ulik mottakelighet for SAV. Triploid laks sin evne til å uttrykke immungener, kan derfor være avgjørende for motstandsdyktighet mot smittsomme sykdommer.

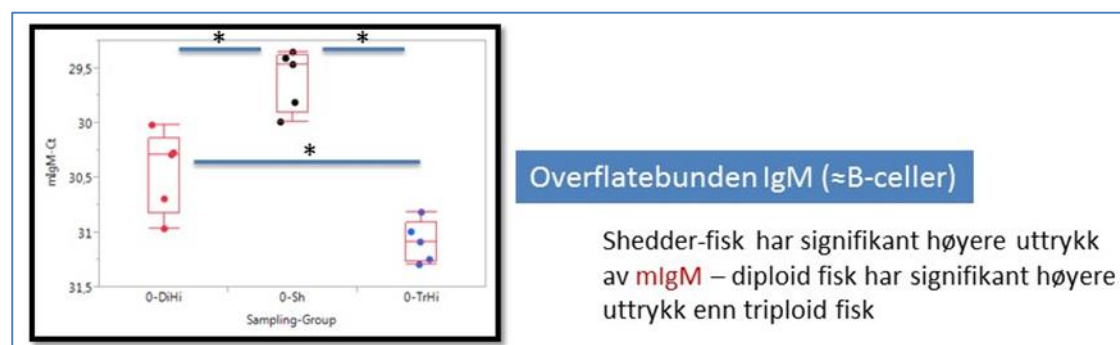
Hodenyreprøver samlet inn fra smittforsøk beskrevet i 2b) ble undersøkt for genuttrykk fra både antistoff- og antivirale gener etter 0, 2, 4 og 8 uker post-infeksjon med SAV3. Oversikt over undersøkte grupper og kortnavn på disse er angitt i tabellen og Figur 15 under:

Undersøkte grupper	kortnavn	forklaring	kohabitantsmitte
Diploid PD sterk/moderat	DiHi	Selektert for resistens mot PD	SAV3
Diploid PD svak	DiLo	Normal mottakelighet for PD	SAV3
Triploid PD sterk/moderat	TriHi	Selektert for resistens mot SAV	SAV3
Triploid PD svak	TriLo	Normal mottakelighet for PD	SAV3
Kontroll diploid PS svak	Ctrl DiLo	Normal mottakelighet for PD	Usmittet kontroll
Kontroll triploid PD svak	Ctrl TriLo	Normal mottakelighet for PD	Usmittet kontroll

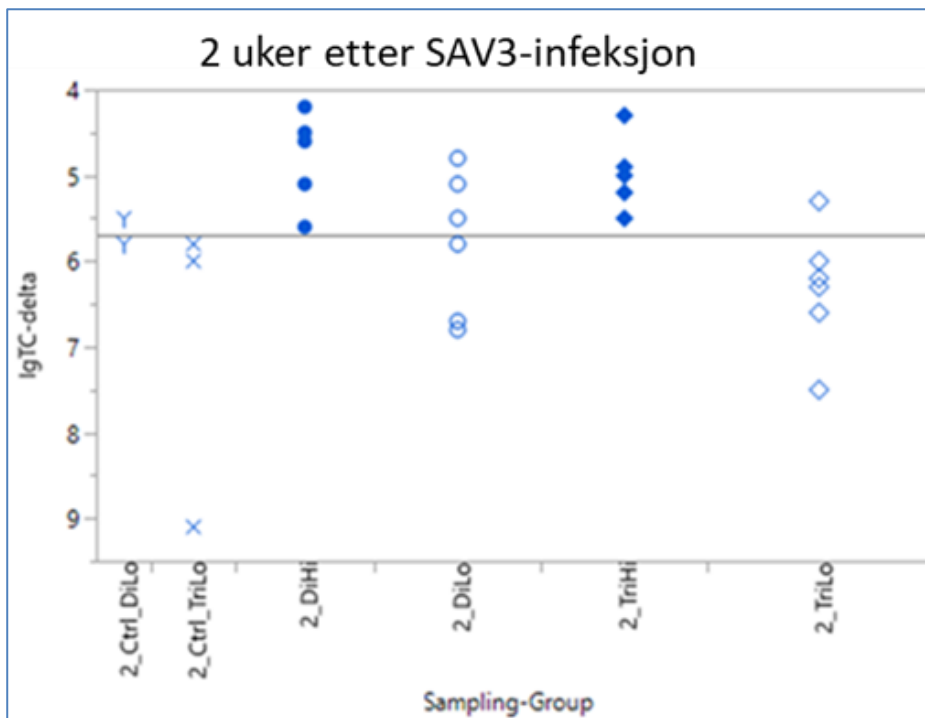


Figur 15: Oversikt over hvilke antistoff-isotyper som har blitt undersøkt for uttrykk i diploid og triploid kontroll-laks og SAV3-infisert laks.

Gjennomgående viser resultatene at det ikke uventet er forskjeller mellom SAV3-infisert laks og uinfisert laks for de fleste av genene vi har undersøkt. Analyserte data viser at før infeksjon med SAV3 har diploid laks signifikant høyere uttrykk av overflatebundet IgM (knyttet til B-celler) sammenlignet med triploid laks (Figur 16 under).

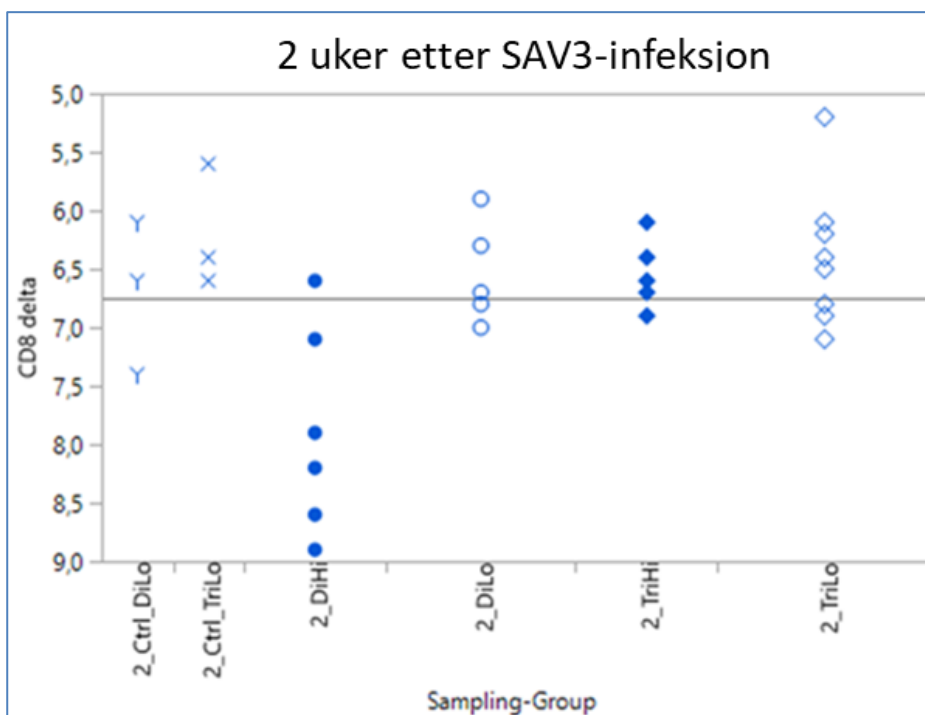


Til sammenligning har den diploide laksen lavere uttrykk av IgTC enn den triploid laksen før infeksjon med *Moritella*. Uttrykk av IgTC 2 uker etter infeksjon er vist i Figur 17 under.



Figur 17: X by Y and Wilcoxon non-parametric for IgTC genuttrykk.

Resultatene viser at både diploid og triploid mer SAV-resistent laks (Hi), har høyere uttrykk av IgTC enn den mindre resistente laksen (Lo) og de uinfiserte kontrollgruppene. Det er ingen signifikante forskjeller mellom diploid og triploid laks. For en del andre immungener, som TLR8, Vip, IgD var trenden at DiHi-gruppen hadde høyere uttrykk enn de andre gruppene ved 2 uker. For uttrykk av CD8 er trenden motsatt. Der finner vi signifikant nedregulert uttrykk hos DiHi-gruppen sammenlignet både med DiLo, TriHi/TriLo og uinfiserte kontrollgrupper etter 2 uker (Figur 18).



Figur 18: X by Y and Wilcoxon non-parametric for CD8 genuttrykk.

Trendene etter 2 ukers infeksjon med SAV3 var også synlige etter 4 uker. I tillegg viste analysene våre at det var en sammenheng mellom titer av nøytraliserende antistoff i plasma og uttrykk av både slgTB, slgTS, mlgM, IgD og slgM i hodenyre hos samme fisk.

Konklusjoner: Samlet viser resultatene fra delprosjekt 3: «Regulering av immungener hos triploid og diploid laks» at det er forskjeller mellom diploid og triploid laks når det gjelder uttrykk fra immungener. Disse forskjellene kan ha betydning for hvordan triploid og diploid laks vil håndtere infeksjoner og eventuelt også responderer på vaksiner. Men det er viktig å merke seg at selv om det ble observert signifikante forskjeller, viste den triploide laksen ingen forøket dødelighet eller økt patologi sammenlignet med diploid laks i kontrollerte smitteforsøk med SAV3 i løpet av de 8 ukene smitteforsøket varte. Det er derfor vanskelig å vurdere hvilke konsekvenser slike forskjeller i genuttrykk kan ha for mottakelighet for smittsomme sykdommer.

Hovedfunn

- Infeksjon av triploid Atlantisk laks med IPNV, SAV3, *Moritella viscosa* og *Tenacibaculum* spp. forårsaker sykdom med samme kliniske og patologiske funn som hos diploid laks.
- Ingen forskjeller i mottakelighet for IPN og PD mellom triploid og diploid laks, målt ved dødelighet/patologi/virusmengde
- Ingen forskjeller i samlet dødelighet ved infeksjon med *Tenacibaculum* spp. mellom diploid og triploid laks i smitteforsøket, men kan være forskjeller knyttet til smittemåte (bad- og kohabitant)
- Tre gjennomførte smitteforsøk med *Moritella viscosa* ga varierende utfall. Det er derfor ikke mulig å konkludere angående mottakelighet for denne bakterien.
- Uttrykk av gener involvert i immunresponser er ulikt regulert mellom triploid og diploid laks. Effektene kunne ikke knyttes til endring i sykdom i våre studier, men kan likevel ha betydning for sykdomsutvikling. Betydning av disse funnene bør derfor undersøkes videre.

Major findings

- Infection of triploid Atlantic salmon with IPNV, SAV3, *Moritella viscosa* and *Tenacibaculum* spp. causes disease with the same clinical and pathological findings as for diploid salmon.
- No observed differences in susceptibility to IPN and PD for triploid compared to diploid salmon, measured by mortality/pathology/virus amount
- No observed differences in total mortality following *Tenacibaculum* spp. infection in triploid compared to diploid salmon, may be some differences connected to exposure route (bath/cohabitant)
- 3 experimental challenge trials comparing the susceptibility of triploid and diploid salmon to *Moritella viscosa* produced varying results. No final conclusion could therefore be made regarding possible differences in susceptibility between triploid and diploid salmon to *Moritella viscosa*.
- Differences in expression of genes involved in immune responses were found when comparing triploid and diploid salmon. We were not able to connect these effects directly to disease development in our studies. However, the differences may still be of importance for the susceptibility to infectious diseases and therefore need to be investigated further.

Referanser

1. Wilkins, N.P., D. Cotter, and N. O'Maoileidigh, *Ocean migration and recaptures of tagged, triploid, mixed-sex and all-female Atlantic salmon (Salmo salar L.) released from rivers in Ireland*. *Genetica*, 2001. **111**(1-3): p. 197-212.
2. Ozerov, M.Y., et al., *High Gyrodactylus salaris infection rate in triploid Atlantic salmon Salmo salar*. *Dis Aquat Organ*, 2010. **91**(2): p. 129-36.
3. Aegerter, S., B. Jalabert, and J. Bobe, *Messenger RNA stockpile of cyclin B, insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor II, insulin-like growth factor receptor Ib, and p53 in the rainbow trout oocyte in relation with developmental competence*. *Mol Reprod Dev*, 2004. **67**(2): p. 127-35.
4. Piferrer, F., et al., *Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment*. *Aquaculture*, 2009. **293**(3-4): p. 125-156.
5. Fjelldal, P.G. and T. Hansen, *Vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (Salmo salar L.) underyearling smolts*. *Aquaculture*, 2010. **309**(1): p. 131-136.

6. Hansen, T.J., et al., *Effect of water oxygen level on performance of diploid and triploid Atlantic salmon post-smolts reared at high temperature*. Aquaculture, 2015. **435**(0): p. 354-360.
7. Leclercq, E., et al., *Comparative seawater performance and deformity prevalence in out-of-season diploid and triploid Atlantic salmon (Salmo salar) post-smolts*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2011. **158**(1): p. 116-25.
8. Fraser, T.W.K., et al., *Welfare Considerations of Triploid Fish*. Reviews in Fisheries Science, 2012. **20**(4): p. 192-211.
9. Fraser, T.W.K., et al., *Triploidy alters brain morphology in pre-smolt Atlantic salmon Salmo salar: possible implications for behaviour*. Journal of Fish Biology, 2012. **81**(7): p. 2199-2212.
10. Fraser, T.W., et al., *The prevalence of vertebral deformities is increased with higher egg incubation temperatures and triploidy in Atlantic salmon Salmo salar L.* J Fish Dis, 2015. **38**(1): p. 75-89.
11. Fraser, T.W.K., et al., *The effect of triploidy on the culture performance, deformity prevalence, and heart morphology in Atlantic salmon*. Aquaculture, 2013. **416-417**: p. 255-264.
12. Frenzl, B., et al., *Triploid and diploid Atlantic salmon show similar susceptibility to infection with salmon lice Lepeophtheirus salmonis*. Pest Manag Sci, 2014. **70**(6): p. 982-8.
13. Weber, G.M., et al., *Comparison of disease resistance between diploid, induced-triploid, and intercross-triploid rainbow trout including trout selected for resistance to Flavobacterium psychrophilum*. Aquaculture, 2013. **410-411**: p. 66-71.
14. Jhingan, E., R.H. Devlin, and G.K. Iwama, *Disease resistance, stress response and effects of triploidy in growth hormone transgenic coho salmon*. Journal of Fish Biology, 2003. **63**(3): p. 806-823.
15. Chalmers, L., et al., *A comparison of disease susceptibility and innate immune response between diploid and triploid Atlantic salmon (Salmo salar) siblings following experimental infection with Neoparamoeba perurans, causative agent of amoebic gill disease*. Parasitology, 2017. **144**(9): p. 1229-1242.
16. Chalmers, L., et al., *A comparison of the response of diploid and triploid Atlantic salmon (Salmo salar) siblings to a commercial furunculosis vaccine and subsequent experimental infection with Aeromonas salmonicida*. Fish & shellfish immunology, 2016. **57**: p. 301-308.
17. Ching, B., et al., *Transcriptional differences between triploid and diploid Chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha) during live Vibrio anguillarum challenge*. Vol. 104. 2009. 224-34.
18. Fjelldal, P.G., et al., *Increased dietary phosphorous prevents vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. 2016. **22**(1): p. 72-90.
19. Johnson, R.M., et al., *Dosage effects on heritability and maternal effects in diploid and triploid Chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha)*. Heredity (Edinb), 2007. **98**(5): p. 303-10.
20. Hegarty, M.J., et al., *Changes to gene expression associated with hybrid speciation in plants: further insights from transcriptomic studies in Senecio*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2008. **363**(1506): p. 3055-69.
21. Wargelius, A. *Global and local methylation pattern in triploid and diploid Atlantic salmon in Genomics in Aquaculture 2013*. Bodø, Norway.
22. Sadler, J., P.M. Pankhurst, and H.R. King, *High prevalence of skeletal deformity and reduced gill surface area in triploid Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. Aquaculture, 2001. **198**(3-4): p. 369-386.
23. Dobos, P., et al., *Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes*. J Virol, 1979. **32**(2): p. 593-605.
24. Weston, J., et al., *Comparison of two aquatic alphaviruses, salmon pancreas disease virus and sleeping disease virus, by using genome sequence analysis, monoclonal reactivity, and cross-infection*. J Virol, 2002. **76**(12): p. 6155-63.
25. Grove, S., et al., *Immune parameters correlating with reduced susceptibility to pancreas disease in experimentally challenged Atlantic salmon (Salmo salar)*. Fish Shellfish Immunol, 2013. **34**(3): p. 789-98.
26. Karlsen, C., et al., *Host specificity and clade dependent distribution of putative virulence genes in Moritella viscosa*. Microb Pathog, 2014. **77**: p. 53-65.
27. Karlsen, C., et al., *Host specificity and clade dependent distribution of putative virulence genes in Moritella viscosa*, in Microb Pathog. 2014. p. 53-65.
28. Olsen, A.B., et al., *Tenacibaculum sp. associated with winter ulcers in sea-reared Atlantic salmon Salmo salar*. Dis Aquat Organ, 2011. **94**(3): p. 189-99.
29. Taksdal, T., et al., *Mortality and weight loss of Atlantic salmon, Salmon salar L., experimentally infected with salmonid alphavirus subtype 2 and subtype 3 isolates from Norway*. J Fish Dis, 2015. **38**(12): p. 1047-61.
30. Fjelldal, P.G., et al., *Increased dietary phosphorous prevents vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. Aquaculture Nutrition, 2015.

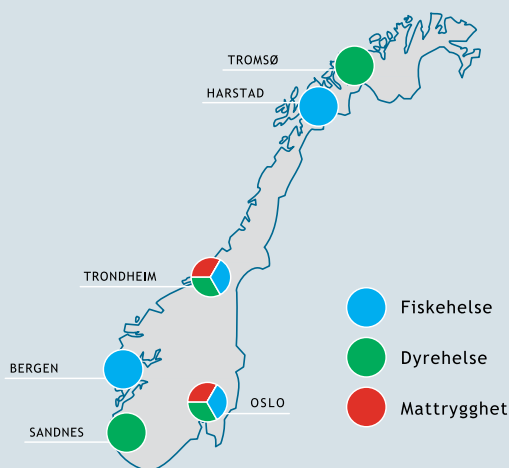
31. Kleppe, L., et al., *Global transcriptome analysis identifies regulated transcripts and pathways activated during oogenesis and early embryogenesis in Atlantic cod*. Mol Reprod Dev, 2014. **81**(7): p. 619-35.
32. Wang, S., et al., *Transcriptome sequencing of Atlantic salmon (Salmo salar L.) notochord prior to development of the vertebrae provides clues to regulation of positional fate, chordoblast lineage and mineralisation*. BMC Genomics, 2014. **15**: p. 141.
33. Moore, L.J., et al., *Triploid atlantic salmon (Salmo salar L.) post-smolts accumulate prevalence more slowly than diploid salmon following bath challenge with salmonid alphavirus subtype 3*. PLoS one, 2017. **12**(4): p. e0175468-e0175468.
34. Herath, T.K., et al., *Impact of Salmonid alphavirus infection in diploid and triploid Atlantic salmon (Salmo salar L.) fry*. PLoS One, 2017. **12**(9): p. e0179192.

Faglig ambisiøs, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!

Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og fôrhygiene med uavhengig kunnskapsutvikling til myndighetene som primæroppgave.

Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene. Produkter og tjenester er resultater og rapporter fra forskning, analyser og diagnostikk, og utredninger og råd innen virksomhetsområdene. Veterinærinstituttet samarbeider med en rekke institusjoner i inn- og utland.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium og administrasjon i Oslo, og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø.



Fiskehelse



Dyrehelse



Mattrygghet



Oslo
postmottak@vetinst.no

Trondheim
vit@vetinst.no

Sandnes
vis@vetinst.no

Bergen
post.vib@vetinst.no

Harstad
vih@vetinst.no

Tromsø
vitr@vetinst.no

www.vetinst.no



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute