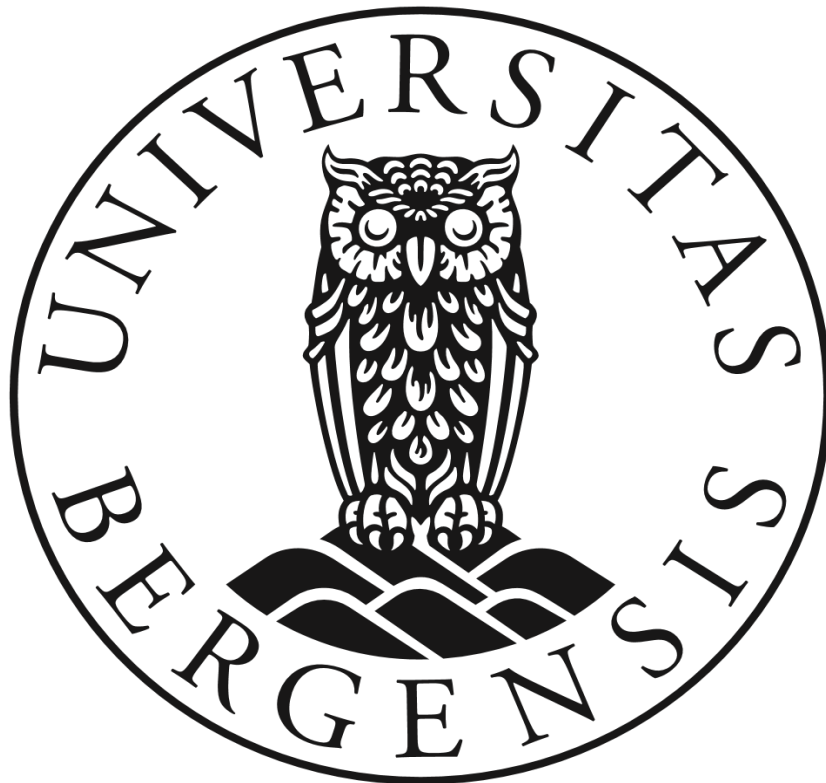


Brakkvannstoleranse hos ulike stammer av lakselus
(*Lepeophtheirus salmonis*)

Glenn Krossøy



Masteroppgave i fiskehelse

Institutt for biovitenskap

Universitetet i Bergen

Juni 2024

Forord

Denne masteroppgaven ble gjennomført på Sea Lice Research Centre (SLRC) og Institutt for Biovitenskap (BIO) ved Universitetet i Bergen i perioden august 2023 til juni 2024.

Jeg vil takke veileder Frank Nilsen og medveileder Andreas Borchel for god hjelp til planlegging av prosjektet og veiledning i prosessen med å skrive og ferdigstille oppgaven. En spesiell takk går til Borchel for sin tålmodighet med meg, og for god opplæring og assistanse i forbindelse med eksperimentene som ble gjennomført. Jeg vil også takke Per Gunnar Espedal og Lars Are Hamre fra SLRC for hjelp med planlegging av forsøk, samt uttak av eggstrenger, kopepoditter og fisk som ble benyttet. Videre vil jeg også takke Christiane Trösse for grundig opplæring på lab, og for hjelp til analysearbeidet i etterkant. Jeg vil også takke Lerøy Vest sin lokalitet Skorpo Vest og fiskehelsebiolog Anne Moberg Vossgård for at jeg fikk muligheten til å komme ut og gjøre uttak av lakselus til prosjektet.

Jeg vil takke mine medstudenter for tiden vi har hatt sammen på fiskehelsestudiet. Det har vært fem veldig fine år, og jeg er takknemlig for å ha fått så mange gode venner i løpet av studiet. Til slutt vil jeg også takke min far Bjørn, som var den som inspirerte meg til å velge fiskehelse, både for hjelp med oppgaven og for god oppfølging gjennom hele studiet.

Bergen, 3. juni 2024

Glenn Krossøy

Sammenheng

Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) er en marin ektoparasitt som lever på laksefisk. Den skaper sykdoms- og velferdsproblemer hos både vill og oppdrettet laksefisk i Norge, og påfører oppdrettsnæringen store økonomiske kostnader. Det benyttes både forebyggende tiltak og behandling mot parasitten for å beskytte oppdrettsfisken, men også for å begrense forekomsten av lakselus på vill fisk. På grunn av økende resistens mot legemidler har bruken av medikamentfrie behandlinger blitt mer vanlig de siste årene, og denne typen behandling representerer nå den vanligste avlusningsmetoden i næringen. Mekanisk og termisk behandling er de mest brukte, men de siste årene er også ferskvannsbehandlinger benyttet som avlusningsmetode i økende grad. På bakgrunn av dette er det av interesse å kartlegge lakselusens toleranse for brakkvann og ferskvann, og om det kan ha oppstått variasjoner i denne toleransen hos ulike populasjoner av lakselus.

Tidligere studier har vist redusert aktivitet hos kopepoditter i brakkvann sammenlignet med sjøvann. Det er vist at eksponering av lakselus for vann med lavere saliniteter enn fullt sjøvann fører til en kraftig oppregulering av transkripsjonen til flere gener, spesielt ved saliniteter under 27 ppt. I tillegg er det funnet at lakselus-copepoditter overlever eksponering for 21,1 ppt brakkvann i minst 24 timer, uten at dette ødelegger copepodittene sin infektive evne i fullt sjøvann.

I dette masterprosjektet ble fire stammer benyttet for å undersøke brakkvannstoleranse hos lakselus-copepoditter. Tre av disse stammene (*LsAlta*, *LsGulen* og *LsOslofjorden*) har vært i lab i mange år, og den fjerde stammen (*LsBjørnafjorden*) ble hentet fra et oppdrettsanlegg i 2023. Tre ulike typer forsøk ble utført. Observasjoner av copepoditter fra de fire ulike stammene over en 24 timers periode der de ble inkubert i vann med ulik salinitet indikerte at luselarvene øker aktiviteten etter en tilpasningsperiode ned til 21,1 ppt. De tre genene *LsP5CS*, *LsP5CR* og *LsK⁺-kanal*, som trolig er involvert i osmoregulering ble oppregulert i alle de fire lusestammene 6 timer etter eksponering for 21,1 ppt brakkvann. For to av lab-stammene var det også en oppregulering av *LsHSP70* etter eksponering i 21,1 ppt brakkvann, som indikerer ulik stressrespons hos copepoditter fra de forskjellige stammene. To ulike typer smitteforsøk ble gjennomført. De viste blant annet at pre-inkubasjon i brakkvann i ett døgn ikke reduserer copepodittenes smittesuksess i sjøvann, og at copepoditter fra alle de fire stammene var i stand til å smitte laks ved 21,1 ppt etter pre-inkubasjon i brakkvann.

Forkortelser

ANOVA	Analysis of Variance
BW	Brakkvann
cDNA	Komplementær DNA
Ct	Terskelverdi
DNA	Deoksyribonukleinsyre
EC₅₀	Effektiv konsentrasjon (salinitet som gir 50 % dødelighet hos lakselus)
EIF1A	Eukaryotisk translasjon initieringsfaktor 1A
F1	Første generasjons avkom
FC	Fold Change
SW	Sjøvann
H₀ og H₁	Nullhypotese og forskningshypotese
Lab	Laboratorium
LsAlta	Lakselus som avstammer fra Alta i Finnmark
LsBjørnafjorden	Lakselus som avstammer fra Bjørnafjorden i Vestland fylke
LsGulen	Lakselus som avstammer fra Gulen i Vestland fylke
LsOslofjorden	Lakselus som avstammer fra Oslofjorden
LsHSP70	Varmesjokk-protein 70 hos lakselus
LsK⁺-kanal	Kalium-kanal hos lakselus
LsP5CR	<i>Pyrroline-5-carboxylase reduktase</i> hos lakselus
LsP5CS	<i>Pyrroline-5-carboxylase syntetase</i> hos lakselus
PCR	Polymerasekjedereaksjon
ppt	Points per thousand (promille)
qPCR	Sanntids polymerasekjedereaksjon

RNA	Ribonukleinsyre
RT	Revers transkriptase

Innholdsfortegnelse

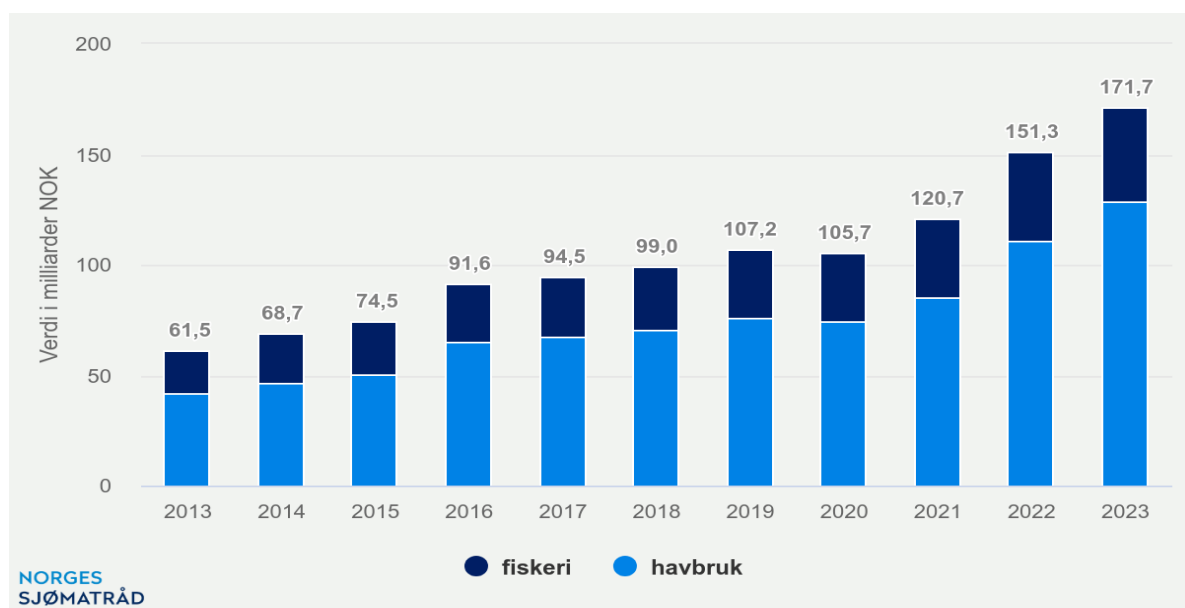
Forord	I
Sammendrag	II
Forkortelser	III
1.0 Introduksjon	1
1.1 Generell bakgrunn	1
1.2 Lakselus	3
1.3 Livssyklus og spredning av lakselus	4
1.5 Bekjempelse av lakselus	6
1.6 Salinitet og osmoregulering	9
1.7 Transkriptomisk respons på ulike saliniteter hos lakselus.....	11
1.8 Mål med masterprosjektet	13
2.0 Material og metode.....	14
2.1 Lusestammer og uttak av kopepoditter og eggstrenger	14
2.2 Observasjonsforsøk av kopepoditter i ulike saliniteter.....	15
2.3 Rensing av RNA	16
2.4 Syntese av komplementær DNA (cDNA)	17
2.5 Sanntids PCR (qPCR).....	18
2.6 Undersøkelse av infektiv evne hos brakkvannsinkuberte kopepoditter	20
2.6.1 Smitteforsøk i fullt sjøvann.....	20
2.6.2 Smitteforsøk i brakkvann	21
2.7 Databehandling og statistisk analyse	22
3.0 Resultater.....	23
3.1 Inkubasjon av kopepoditter i ulike saliniteter.....	23
3.2 Genuttrykk for <i>LsPC5R</i> , <i>LsP5CS</i> , <i>LsHSP70</i> og <i>LsK⁺kanal</i> hos kopepoditter i sjøvann og brakkvann	25
3.3 Smitteforsøk.....	27
3.3.1 Smitteforsøk i fullt sjøvann.....	27

3.3.2 Smitteforsøk i brakkevann	29
4.0 Diskusjon.....	31
4.1 Frittlevende kopepoditter fra alle stammer tilpasser seg til en viss grad brakkevann etter 24 timer.....	31
4.2 Genuttrykkene for <i>LsP5CR</i> , <i>LsP5CS</i> , <i>LsHSP70</i> og <i>LsK⁺-kanal</i> øker hos kopepoditter fra alle stammer i brakkevann	33
4.3 Effekt av brakkevann på smitte hos lakseluscopepoditter	36
5.0 Konklusjon	40
5.1 Videre studier	40
6.0 Referanser.....	41

1.0 Introduksjon

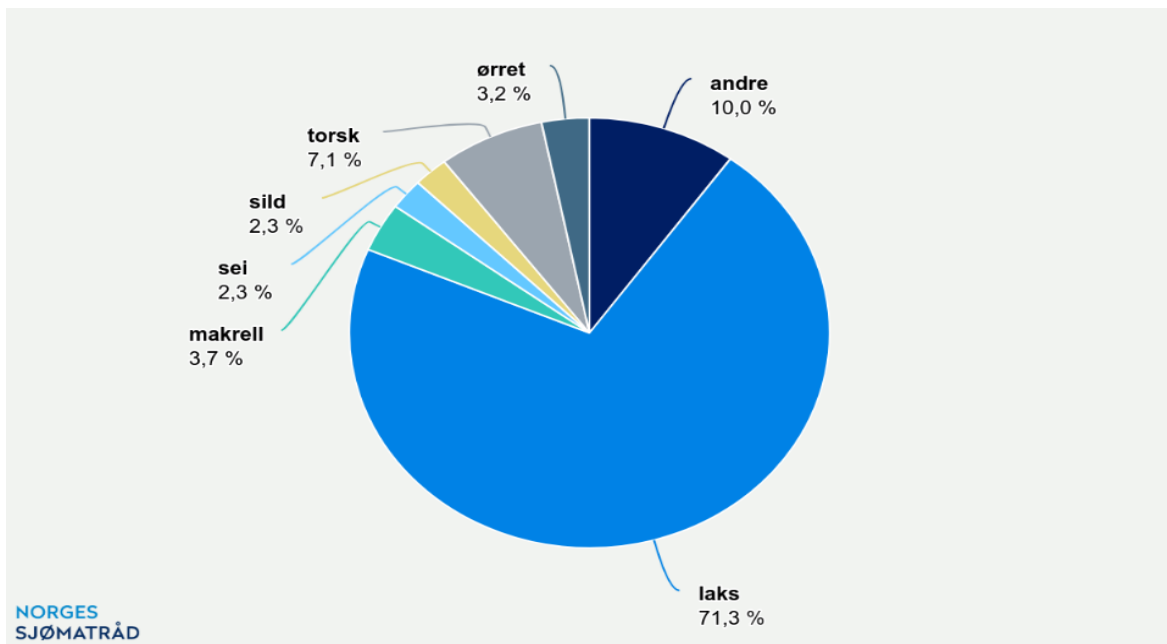
1.1 Generell bakgrunn

Siden starten på 1970-tallet har oppdrettsnæringen i Norge vokst seg til å bli blant landets største og viktigste næringer. Med en enorm vekst opp gjennom årene er sjømat den nest største eksportvaren i landet etter olje og gass. I 2023 eksporterte Norge sjømat til 153 land til en verdi av i underkant av 172 milliarder norske kroner (figur 1). Totalt ble det eksportert 2,8 millioner tonn sjømat i 2023, noe som tilsvarer 39 millioner måltider hver eneste dag (*Norges Sjømatråd, 2024*).



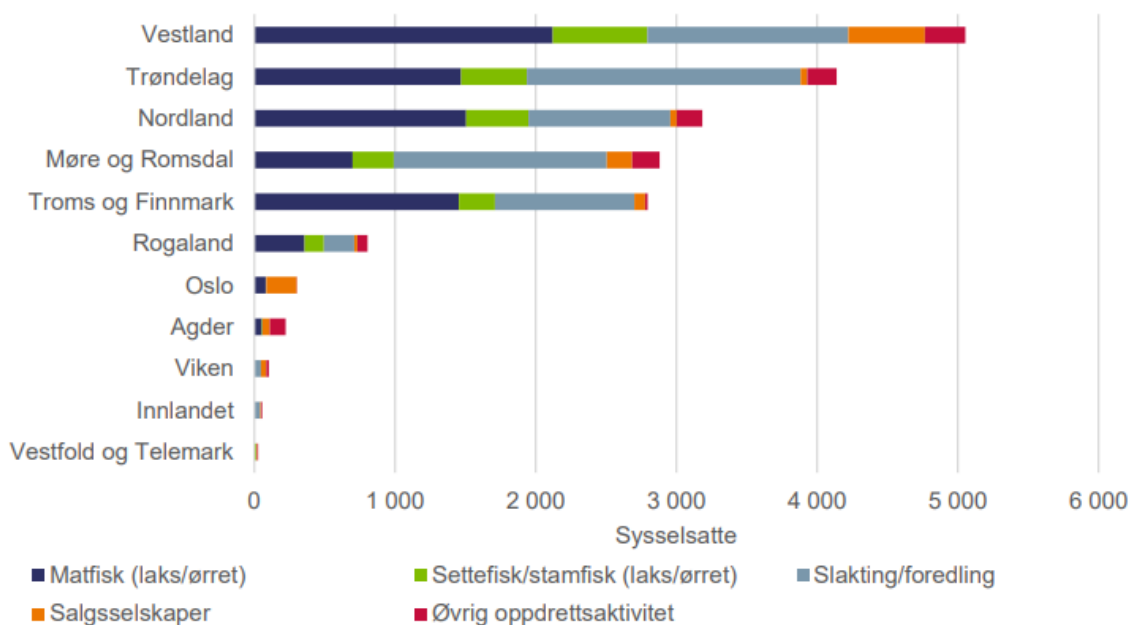
Figur 1. Eksport av norsk sjømat i 2023 fordelt på fiskeri og havbruk (*Norges Sjømatråd, 2024*).

Den viktigste arten for oppdrettsnæringen i Norge er Atlantisk laks (*Salmo salar*, Linnaeus 1758), der Norge er verdens største produsent. I 2023 ble 1,2 millioner tonn laks tilsvarende 16 millioner måltider daglig eksportert til en verdi av 122,5 milliarder kroner (*Norges Sjømatråd, 2024*), noe som utgjorde 71,3 % av den totale verdien for sjømateksporten (figur 2).



Figur 2. Verdi av norsk sjømateksport i 2023 fordelt på art (Norges Sjømatråd, 2024).

I tillegg til å være en bidragsyter når det gjelder å dekke verdens matbehov, bidrar akvakulturnæringen i Norge også i sysselsetting av tusenvis av mennesker landet rundt (figur 3), og har gjennom mange tiår vært en viktig næring i mange lokalsamfunn i Distrikts-Norge.



Figur 3. Sysselsetting i havbruksnæringen i 2022 fordelt på fylker og type aktivitet (Nyrud et al., 2023).

1.2 Lakselus

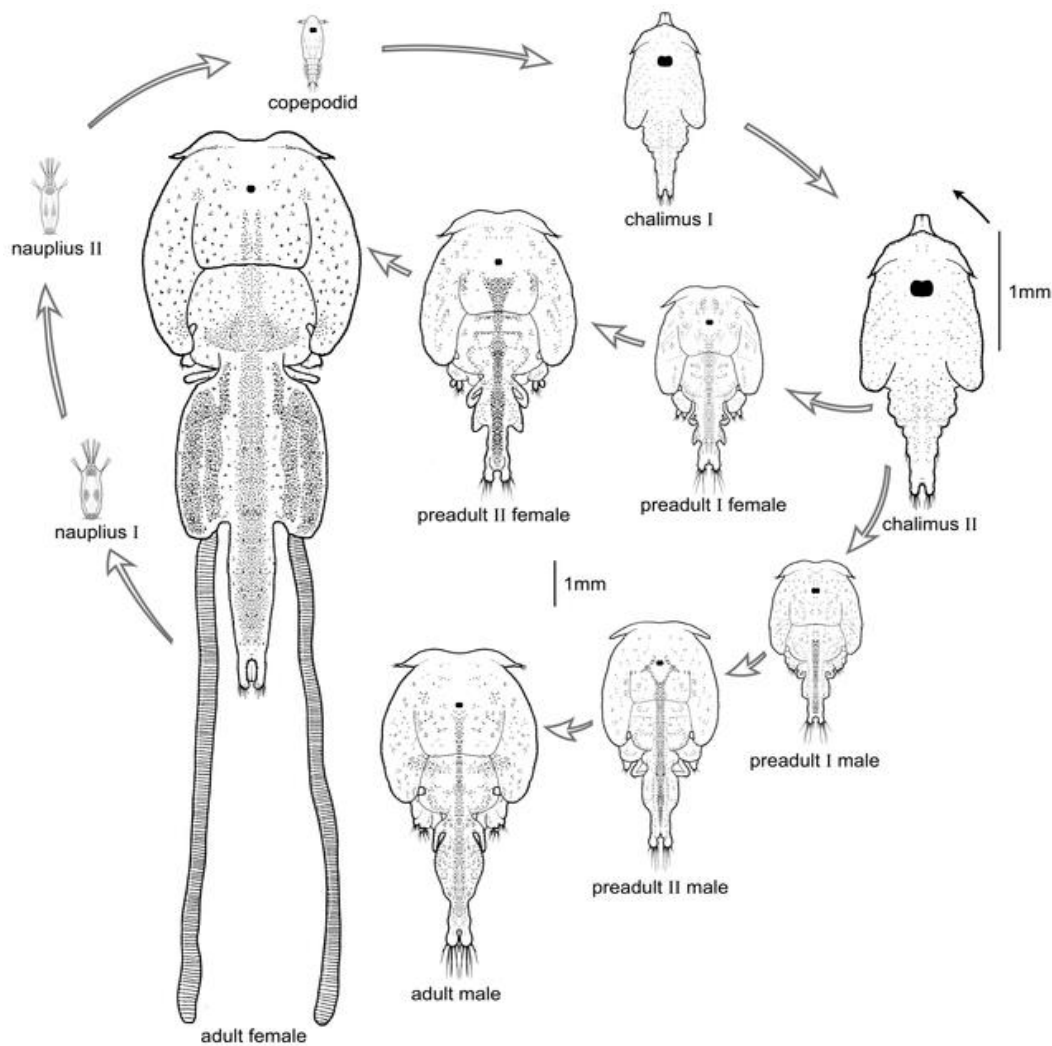
Lakselus, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837) er en marin ektoparasitt på laksefisk. Lakselus er et krepsdyr, og nærmere bestemt tilhører den klassen *Copepoda* (hoppekreps) og familien *Caligidae* (Artsdatabanken, 2023). Lakselus finnes naturlig i havet på den nordlige halvkule, og lusen som finnes i Stillehavet og Atlanterhavet kan videre deles inn i to underarter, henholdsvis *L. salmonis salmonis* og *L. salmonis oncorynchi* (Skern-Mauritzen *et al.*, 2014). Den har den største økonomiske påvirkningen av alle parasitter i oppdrett av laksefisk og er i tillegg en trussel mot vill laksefisk (Birkeland, 1996; Costello, 2006; Torrissen *et al.*, 2013). Laksefisk inkluderer i norsk sammenheng viktige arter som Atlantisk laks (*S. salar* L), ørret (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) og regnbueørret (*Onchorynchus mykiss* Walbaum, 1792). Sistnevnte art finnes ikke vilt i Norge. Det er vist at lakselus fra oppdrettsanlegg kan spre seg til vill fisk og ha en negativ påvirkning (Kristoffersen *et al.*, 2018; Krkošek *et al.*, 2013; Serra-Llinares *et al.*, 2020). Høyt smittepotensial kombinert med et stort antall tilgjengelige verter er en viktig årsak til at lakselus er blant de mest alvorlige problemene i dagens oppdrettsnæring. Økende resistens mot medikamenter er også en stor årsak til bekymring (Aaen *et al.*, 2015). Ved å sammenligne data er det funnet at den estimerte virkningen av hydrogenperoksid, pyretroider og azametifos har gått ned i 2017-2020 sammenlignet med data fra 2011-2014. Vedvarende resistens er en viktig grunn til dette (Helgesen *et al.*, 2022; Aldrin *et al.*, 2023) .

Lakselus spiser slim, hud og blod fra verten og påfører på denne måten fisken skader (Kabata, 1974). Lusens har en munntubule med en strigil struktur med tenner. Denne strukturen skraper av fiskens vev ved bevegelse, og vevet plukkes deretter opp av mandiblene som starter passasjen inn i munnhulen. Transporten hjelpes av sammentrekninger av labral muskulatur, som er i stand til å skape en drivende, peristaltisk bølge (Kabata, 1974). I utgangspunktet begynner ikke lusens å suge blod fra fisken før den blir mobil og pre-adult, men dersom den er festet til fiskens gjeller kan den begynne med dette allerede i chalimus I-stadiet (Heggland *et al.*, 2020). At kopepoditter fester seg på gjellene er vanlig ved smitte i kar i laboratorium men ellers relativt uvanlig (Treasurer og Wadsworth, 2004), og det normale er at den fester seg til fiskens finner og deler av kroppen som er dekket med skjell (Bron *et al.*, 1991). Lusens kan gi økt dødelighet hos fisken ved å sørge for store sår og skjelltap, blødninger og for at fiskens barrierer mot omgivelsene brytes ned. Dette gjør fisken mer sårbar for bakterier, virus og sopp, i tillegg til å påvirke fiskens osmoregulering negativt ved at den reduserer evnen til saltregulering (Finstad *et al.*, 2000; Grimnes og Jakobsen, 1996; Jónsdóttir *et al.*, 1992; Takle *et al.*, 2015). Fastsittende kopepoditter og chalimus I kan føre til huderrosjoner, irritasjon og

kløe, men det er de bevegelige stadiene pre-adult I, II og adult som fører til mest skade (Grimnes & Jakobsen, 1996). Skadeomfanget er i tillegg avhengig av antall lus og størrelsen på fisken, og høyere tetthet av lakselus øker skadene og dermed risiko for sykdom og eventuell dødelighet. Den vanligste dødsårsaken knyttet til lakselus i norsk oppdrett er likevel dødelighet i forbindelse med avlusninger med medikamentfrie metoder. I en spørreundersøkelse gjennomført av Veterinærinstituttet rettet mot fiskehelsepersonell svarte kun 2 av 102 at beiteskader fra lakselus var en årsak til dødelighet, mens hele 81 valgte skader etter avlusning (Sommerset *et al.*, 2023). Hvor alvorlig skadene etter behandling blir avhenger av en rekke faktorer som størrelsen til fisken, helsetilstanden og temperatur (Overton *et al.*, 2019) i tillegg til selve behandlingsmetoden.

1.3 Livssyklus og spredning av lakselus

Lakselusens livssyklus består av åtte stadier separert av skallskifter (figur 4) (Hamre *et al.*, 2013). De frittlevende stadiene er de tre første: nauplius I, nauplius II og kopepoditt-stadiet. I disse stadiene er lusen planktonisk, og som kopepoditt blir den infektiv. De siste fem livsstadiene er lusen parasittisk på laksefisk i sjø. Dette inkluderer chalimus I og chalimus II stadiene der lusen er fastsittende, og pre-adult I, pre-adult II og voksen lus som er bevegelige og vandrer rundt på fisken (Hamre *et al.*, 2013; Johnson og Albright, 1991a; Schram, 1993). Lakselus vokser ved instar vekst, og har skallskifte mellom hvert av stadiene (Johnson og Albright, 1991b; Eichner *et al.*, 2015). Utvikling og vekst til lusen er temperaturavhengig. Ved 10 °C tar det å gå fra fertilisering til kjønnsmodne lus ca. 40 dager for hanner og 52 for hunner (Johnson og Albright, 1991b), og henholdsvis 38 og 44 for de raskeste hanner og hunner (Hamre *et al.*, 2019). Livssyklusen går som normalt på temperaturer mellom 6-21°C, der syklusens hastighet øker med høyere temperatur (Dalvin *et al.*, 2020; Hamre *et al.*, 2019; Samsing *et al.*, 2016). Studier har vist at overlevelsen til lusen reduseres kraftig ved 3 °C og 24 °C (Hamre *et al.*, 2019). I tillegg til temperatur er salinitet (Rittenhouse *et al.*, 2016) og lys (Szetey *et al.*, 2021) viktige miljøfaktorer som påvirker lusens livssyklus. Lakselus er positivt fototaktiske, som vil si at de søker dit det er mest lys i vannsøylen. Atferden i forbindelse med disse faktorene kan likevel variere mellom stadiene, da strategiene til lus i nauplius I og II (overleve og spre seg) og kopepoditter (finne en vert) er ulike. Studier indikerer at kopepoditter i motsetning til tidligere stadier beveger seg opp og ned i vannsøylen uavhengig av tilstedeværelsen av lys (Szetey *et al.*, 2021).



Figur 4. Lakselusens livssyklus (Sea Lice Research Centre, 2020). Det første stadiet etter klekking fra eggstrengen er nauplius I, og hvert stadium er skilt med ett skallskifte. Når lusen når copepodittstadiet blir den infektiv, og er klar for å infisere fisk. Etter Chalimus II-stadiet deles pre-adult stadiet inn i han- og hunnkjønn, og derfra går utviklingen litt ulikt for de to kjønnene. Hannen er mindre enn hunnen størrelsesmessig, og bruker kortere tid (døgngrader) fra pre-adult til adult.

Formeringen til lakselusen er kjønnnet, og fruktbarheten og hastigheten til reproduksjonen øker i takt med temperaturen (Hamre *et al.*, 2019; Samsing *et al.*, 2016). En adult hunnlus har normalt to eggstrenger med fertiliserte embryoer. Disse eggstrengene er festet og sikret av kroken på den proksimale enden av eggstrengen (Schram, 2000). Hunnlusen kan produsere minst 11 par eggstrenger i løpet av livet, og hver streng kan inneholde fra 70 til over 290 egg (Heuch *et al.*, 2000). Hvor mange eggstrenger som produseres, tiden produksjonen av hver eggstreng tar og raten på utviklingen av embryoene er temperaturavhengig (Hamre *et al.*, 2019; Samsing *et al.*, 2016; Stien *et al.*, 2005). Normalt klekker nauplier fra eggstrengene mens de fremdeles er festet til hunnlusen, men stress kan resultere i at hunnen slipper eggstrengene (Schram, 2000). Dette

har ingen skadelig effekt for embryoene, som fortsatt kan utvikle seg normalt inne i eggstrengene som er sluppet (Heuch *et al.*, 2000).

Eggstrengene kan i teorien transporteres fra 250 meter til ca 6 km før klekking, avhengig av synkehastigheten (Eisenhauer *et al.*, 2020). I de planktoniske stadiene nauplius I, nauplius II og kopepoditt kan lusen spre seg over flere kilometer ved hjelp av havstrømmer, og på denne måten spre seg mellom oppdrettslokaliteter (Eisenhauer *et al.*, 2020; Kristoffersen *et al.*, 2018). Temperatur vil også være en viktig faktor for hvor langt de transporteres. I disse stadiene lever lusen av energi den har med seg i egget, og kopepodittene er helt avhengig av å finne en vert før energilageret tømmes (Johnson og Albright, 1991a). Studier har vist at energinivået (og dermed evnen til å finne en vert) til fritt svømmende kopepoditter faller markant 5-7 dager etter skallskifte sammenlignet med etter 1-2 dager, noe som understreker viktigheten av å finne en vert i løpet av kort tid (Tucker *et al.*, 2000). Når lusen infiserer fisk kryper den først litt rundt for å finne egnet sted til å feste seg. Som kopepoditt fester den seg til fisken med 2. antenne (Hamre *et al.*, 2019). Ved temperatur på 10 °C vil det ta 5-6 dager før lusen går fra kopepoditt til chalimus I (Hamre *et al.*, 2019). På dette stadiet fester den seg til epidermis med et elongert frontalfilament (Bron *et al.*, 1991; Gonzalez-Alanis *et al.*, 2001), og der blir den sittende frem til den når de bevegelige stadiene (Johnson og Albright, 1991a). I mellomtiden lever den på næring den får fra fiskens slim, epitelceller fra huden og blod (Brandal *et al.*, 1976; Heggland *et al.*, 2020).

Når lusen når de bevegelige stadiene pre-adult I, pre-adult II og adult er den ikke lenger festet med frontalfilamentet, og kan bevege seg fritt rundt på verten. Den kan da holde seg festet på fisken ved hjelp av trykk mellom overflaten på fisken og marginalmembranen som danner et vakuum, og forflytte seg ved å endre på dette trykket og bruke maxillipeder, 2. antenne og den sekundære maxille (Johnson og Albright, 1991a; Jónsdóttir *et al.*, 1992).

1.5 Bekjempelse av lakselus

I akvakulturnæringen har sykdommer hos fisk ulik alvorlighetsgrad, og det skilles derfor mellom listeførte og ikke-listeførte sykdommer. Om en sykdom er listeført eller ikke baseres på skaden den kan påføre fisken og/eller økonomien, miljøet eller samfunnet. At en sykdom blir listeført betyr at den er blant de viktigste sykdommene, og en av dem som kan påføre næringen store skader. Basert på alvorlighetsgraden blir sykdommene som er listeført plassert i ulike kategorier. Kategori A, B, C, D og E er sykdommer som gjelder for hele EU/EØS, og inndelingen av listeføringen er det EU selv som har laget. Norge har også de nasjonale

kategoriene F og G, da dyrehelseforskriften gir landet mulighet til å listeføre sykdommer som kan gi store konsekvenser nasjonalt. Lakselus er i Norge listeført i kategori F (*Forskrift om dyrehelse (dyrehelseforskriften) - Kapittel II § 6, 2022*). Dette betyr i utgangspunktet at sykdommen skal overvåkes, forebygges og at det skal iverksettes tiltak ved infeksjoner. For lakselus gjelder egne regelverk i trafikklyssystemet og luseforskriften.

Produksjonsområdeforskriften, mer kjent som *trafikklyssystemet*, er et system innført av Nærings- og fiskeridepartementet i 2017 (tatt i bruk i 2018-19) som benyttes til å styre veksten til oppdrett av laks, ørret og regnbueørret. Formålet med systemet er å sørge for forutsigbar og bærekraftig vekst i næringen ved å redusere smittepresset (*Forskrift om produksjonsområder for akvakultur av matfisk i sjø av laks, ørret og regnbueørret (produksjonsområdeforskriften), 2017*). Systemet deler landet inn i 13 produksjonsområder, og annethvert år gis hvert område grønn, gul eller rød farge basert på lakselusens påvirkning på vill laksefisk i området. Per nå er det dødelighet av vill laksesmolt på grunn av lakselus som er den eneste indikatoren. Ved grønn farge får oppdretterne i området tillatelse til å øke produksjonskapasiteten sin med 6 %. Ved gul farge tillates ingen vekst, mens rød farge fører til at oppdretternes produksjonskapasitet må reduseres med 6 %. Hvilken farge hvert område får bestemmes av Nærings- og fiskeridepartementet, og avgjørelsen tas basert på faglige vurderinger gjort av en styringsgruppe som består av en representant fra Veterinærinstituttet (VI), Havforskningsinstituttet (HI) og Norsk institutt for naturforskning (NINA), samt en ekspertgruppe. Eventuelle samfunnsøkonomiske konsekvenser spiller også inn i en samlet vurdering til Departementet (“Trafikklyssystemet,” 2024).

I tillegg til trafikklyssystemet kommer Nærings- og fiskeridepartementets Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg (luseforskriften). Forskriften har som mål å redusere forekomsten av lakselus for å minimere skade på både vill og oppdrettet laksefisk, i tillegg til å hindre resistensutvikling hos lusen (*Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg § 1, 2013*). Forskriften gjelder for akvakulturanlegg med laksefisk i sjø (*Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg § 2, 2013*).

Det stilles i forskriften krav om telling av lakselus hver 7. dag hvis temperaturen i sjø er 4 °C eller høyere på tre meters dybde, mens det ved lavere temperatur skal telles minst hver 14. dag. Generelt er kravet for telling 10 tilfeldige fisk per merd. I Nord-Trøndelag og sørover skal det telles 20 tilfeldige fisk per merd fra uke 14 til og med uke 21, mens det i Nordland, Troms og Finnmark skal telles 20 fisk per merd fra uke 19 til og med uke 26 (*Forskrift om endring i forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg, 2017*). Kravet gjelder ikke for stamfisk

ved temperatur lavere enn 4 °C, og heller ikke for akvakulturanlegg der all fisk skal slaktes ut innen 14 dager etter at sist telling skulle blitt gjennomført (*Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg § 6*, 2013). Et generelt krav er at det til enhver tid skal være færre enn 0,5 kjønnsmodne hunnlus i snitt per fisk på akvakulturanlegget. I tillegg stilles det periodevis strengere krav. I Nord-Trøndelag og sørover fra og med mandag i uke 16 til og med søndag i uke 21 er kravet færre enn 0,2 kjønnsmodne hunnlus per fisk. I Nordland, Troms og Finnmark stilles tilsvarende krav fra og med mandag i uke 21 til og med søndag i uke 26 (*Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg § 8*, 2013).

Dersom kravene er i ferd med å overskrides må behandling vurderes basert på en totalvurdering av luseforekomst og fiskens helse. Mot slutten av produksjonssyklusen må det også vurderes om det er mer hensiktsmessig med utslaktning enn behandling. Tidligere har bruk av legemidler vært det viktigste tiltaket mot lakselus, men på grunn av økende resistens mot flere av disse midlene har medikamentfrie behandlinger blitt brukt i større grad, både som et forebyggende tiltak og ved behandling. Selv om det i 2023 ble dokumentert en liten nedgang i medikamentfrie behandlinger fra året før (figur 2), er medikamentfrie behandlinger fortsatt den vanligste avlusningsmetoden (Sommerset *et al.*, 2023). Termisk avlusning ved bruk av varmt vann, mekanisk avlusning ved bruk av spyling og/eller børsting er de vanligste av disse. I tillegg kommer ferskvann både som en behandlingsmetode i seg selv og som en del av en kombinasjonsbehandling der flere av de nevnte metodene kombineres. Forebyggende tiltak inkluderer blant annet renseskjørt og laser.

Tabell 1. Antall innrapporterte medikamentfrie behandlinger mot lakselus fra 2012 til 2023. Antallet er uker der lokaliteter har gjennomført behandling mot lakselus. Behandlingene er delt inn i kategoriene termisk, mekanisk, ferskvann og annet. Dataen er innrapportert til Mattilsynet (Sommerset *et al.*, 2023).

Kategori	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Termisk (TERM)	0	0	3	36	685	1245	1327	1447	1723	1456	1357	888
Mekanisk (MEK)	4	2	37	34	311	236	423	674	823	862	1074	980
Ferskvann (FV)	0	1	1	28	73	75	84	148	220	286	225	186
TERM + MEK	0	0	0	0	12	42	35	56	59	30	47	59
TERM + FV	0	0	0	0	16	21	17	27	20	63	141	227
MEK + FV	0	0	0	0	7	1	7	7	24	56	153	151
TERM + MEK + FV	0	0	0	0	0	0	1	0	1	5	9	12
Annet	132	107	136	103	75	52	69	87	92	72	139	106
Sum uker	136	110	177	201	1179	1672	1963	2446	2962	2830	3145	2609

1.6 Salinitet og osmoregulering

Salinitet er en svært viktig miljøfaktor for alle akvatiske organismer (Kültz, 2015). Endringer i saliniteten i havet forekommer naturlig. Nedbør, fordampning, issmelting og tilførsel av ferskvann fra elver og med havstrømmer er eksempler på faktorer som bidrar til variasjoner i salinitet. Mens noen akvatiske dyr tåler et bredt spekter av saliniteter (euryhaline), er det andre som kun overlever et smalere spekter (stenohaline). Lakselus er stenohaline, og er dermed avhengig av at saliniteten ligger innenfor et visst område for å kunne overleve. Laksen er en anadrom art, og når den vandrer opp i elven svømmer den først gjennom brakkvann ved elvemunningen før den når ferskvannet i elven. Slike endringer i saliniteten er utfordrende for å opprettholde homeostasen i blodet/hemolymfen til lusen, og etter en tid i ferskvann dør den. Osmoregulering er den viktigste fysiologiske mekanismen for å opprettholde hydromineral homeostase hos krepsdyr (Thabet *et al.*, 2017). Den er avgjørende for å kunne håndtere forandringer i salinitet, og dette er en energikrevende prosess (Rivera-Ingraham og Lignot, 2017). Videre kan dyr deles inn i osmokonformere eller osmoregulering basert på måten de håndterer salinitetsendringer (Rivera-Ingraham og Lignot, 2017). Mange marine invertebrater er osmokonformere, blant annet lakselus (Hahnenkamp og Fyhn, 1985), som betyr at de har en indre osmolalitet tilsvarende den i omgivelsene (Rivera-Ingraham og Lignot, 2017). De fleste osmokonformere er stenohaline og normalt sett begrenset til marint miljø (Lignot og Charmantier, 2015). Årsaken til dette er en manglende evne til osmotisk regulering av ekstracellulær væske, og de er dermed avhengig av isosmotisk intracellulær regulering (Rivera-Ingraham og Lignot, 2017). I motsetning til osmokonformere regulerer osmoreguleringe organismer det osmotiske trykket til kroppsvæskene til et spesifikt nivå uavhengig av omgivelsene.

For å kunne overleve i vann med lavere salinitet er det avgjørende å ha evnen til å få tak i essensielle ioner i fortynnete miljøer (Lee *et al.*, 2011). I alle celler er enzymer og ionekanaler ansvarlig for å regulere ionekonsentrasjoner over cellemembranen. Regulering av saltbalansen og inntak og ekskresjon av disse ionene er energikrevende, og for krepsdyr drives reguleringen av en rekke enzymer (Lee *et al.*, 2011). Dette inkluderer Na^+/K^+ -ATPaser, V-type H^+ -ATPaser, karbonsyreanhydrase, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -utvekslere, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -kotransportere og Na^+/H^+ utvekslere (Lee *et al.*, 2011). Ionetransport gjennom Na^+/K^+ -ATPaser, H^+ -ATPaser og diverse ionekanaler bidrar til å opprettholde stabile intracellulære ionekonsentrasjoner (Lee *et al.*, 2011), og dermed opprettholde cellevolumet.

I sjøvann er ionekonsentrasjonen i omgivelsene høyere enn i epitelcellene, slik at ioner som Na^+ kan diffundere inn i cellen. Gjennom den basolaterale membranen transporterer Na^+/K^+ -ATPaser Na^+ fra cellen og inn i hemolymfen (Lee *et al.*, 2011). Dette er en prosess som er mer kostbar energimessig for virvelløse dyr i saline miljøer enn i ferskvann fordi hemolymfens ionekonsentrasjon ofte er høyere i miljøer med høy salinitet. For Cl^- ioner gjelder passiv transport fra epitelcellene til hemolymfen (Lee *et al.*, 2011).

I ferskvann er ionekonsentrasjonen i omgivelsene lavere enn i sjøvann. Ioner må derfor transporteres inn til cellen mot en bratt konsentrasjonsgradient (Lee *et al.*, 2011). Utfordringen da er ioneopptaket fra vannet inn til cellen gjennom den apikale membranen, og her sørger V-type H^+ -ATPaser for at H^+ pumpes ut av cellen. Denne protongradienten driver videre transporten av Na^+ inn i cellen via andre transportere, og siden ionekonsentrasjonen i hemolymfen er lav i ferskvann er denne ionetransporten mindre energikrevende enn i saline miljøer (Lee *et al.*, 2011).

Det første detaljerte studiet på osmoreguleringen til lakselus i overgangen fra sjøvann til ferskvann via brakkvann (37 % sjøvann) ble gjort allerede i 1985 (Hahnenkamp og Fyhn, 1985). I tillegg til å vise at lakselusen er osmokonformer, ble det vist at den benytter hyperosmotisk regulering i vann med lav salinitet. Her ble det også vist at toleransen til frittstående lus og lus festet på fisk var forskjellig, og at de fastsittende overlevde lenger fordi de klarte å beholde en stabil hemolymf osmolalitet og Cl^- ionekonsentrasjon over en lengre periode. Mens frittstående lus begynte å dø etter 8 timer i ferskvann, kunne en fastsittende overleve i over en uke. En mulig årsak til dette var de ulike osmotiske forholdene lusen muligens ble eksponert for avhengig om den var fastsittende eller frittstående. De fastsittende ble grunnet mindre kroppsoverflate mot omgivende vann mindre eksponert for hyposalint ferskvann, i tillegg til å muligens kunne utveksle (via beiting) vann og ioner med verten. På den andre siden kunne de frittstående kun utveksle disse ionene med vannet rundt.

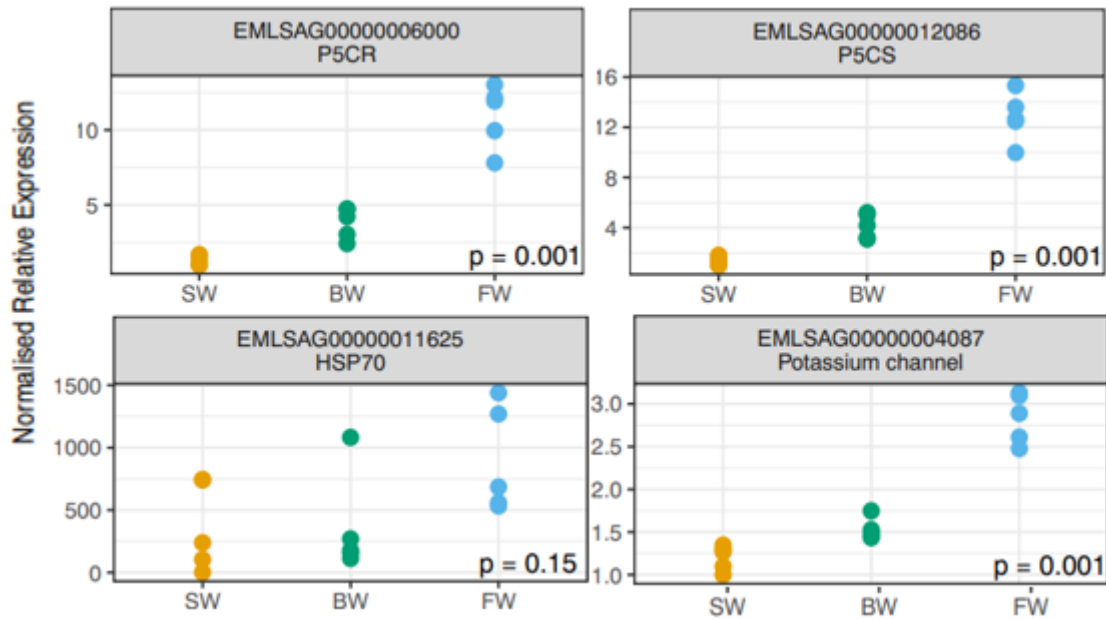
Senere studier har satt søkelys på lusens evne til overlevelse i brakkvann og ferskvann, og resultatene har variert. Hvor mye kopepoditter tåler av lavere saliniteter har blitt studert, blant annet undersøkte Bricknell *et al.* (2006) overlevelse, smitteevne og atferd hos kopepoditter som ble eksponert for vann med lav salinitet gjennom korttidsinkubasjoner i brakkvann. Resultatene viste at kopepoditters overlevelsessevne ble negativt påvirket ved saliniteter under 29 ppt, og at redusert salinitet også reduserte lusens evne til å holde seg festet til verten. Inkubasjonsforsøk viste videre at kopepoditter unngikk saliniteter under 27 ppt, både ved å endre svømmeatferd og ved passiv vertikal synking. Studier gjennomført av Sievers *et al.* (2019) viste også at

fritt svømmende kopepoditter hadde en lavere toleranse for brakkevann enn fastsittende, og at dødeligheten økte til over 50 % etter 3 timer i 12 ppt. I 19 ppt tok det også bare 6,3 timer før dødeligheten nådde 50 % hos de fritt svømmende kopepodittene. Resultatene antydde også at overlevelsesraten økte betraktelig dersom kopepodittene fikk utvikle seg til chalimus I før eksponering for brakkevann. En mulig forklaring på det var basert på forskning av Wright *et al.* (2016), som foreslo at lusen i chalimus-stadiene i motsetning til kopepoditter kan benytte ioner fra verten til å erstatte de som tapes til det hypoosmotiske miljøet. Tidligere hadde Hahnenkamp og Fyhn, (1985) foreslått at hverken kopepoditter eller chalimus hadde denne evnen.

Videre har også Andrews og Horsberg, (2020) gjennomført eksperimenter der overlevelsen til kopepoditter og pre-adult II i lavere saliniteter har blitt testet. Studiet benyttet fire geografisk separerte stammer som ble eksponert for saliniteter fra 35 ppt og ned til 0 ppt, der målet var å finne den saliniteten der overlevelsen ble redusert til 50 % (EC₅₀) etter 24 timer. Resultatene viste signifikante forskjeller mellom kopepoditter fra de ulike stammene, der den minst tolerante stammen hadde EC₅₀ på 17,5 ppt, mens den mest tolerante hadde en EC₅₀ på 11,3 ppt. De to øvrige stammene fikk overlevelsen etter 24 timer redusert til 50 % ved 13,9 og 13,7 ppt. For begge stadiene som ble testet ble det funnet høyere toleranse for lavere saliniteter enn i tidligere studier (Andrews og Horsberg, 2020).

1.7 Transkriptomisk respons på ulike saliniteter hos lakselus

Hele genomet til lakselus har blitt sekvensert, og omtrent 13 000 gener har blitt identifisert (Skern-Mauritzen *et al.*, 2021). Det er til nå ikke gjort omfattende studier på de molekylære reaksjonene som skjer under osmoregulering hos lakselus, men enkelte studier er gjort. Hahnenkamp og Fyhn, (1985) identifiserte noen aminosyrer som muligens fungerer som osmolytter hos lakselus, deriblant prolin som det tidligere har blitt vist at fungerer som osmolytt i andre arter. Det er blant annet vist at prolin virker som en osmolytt i planter som fenikkel (*Foeniculum vulgare*) (Gholami Zali og Ehsanzadeh, 2018). Videre har Borchel *et al.* (2021) gjennomført forsøk med mål om å identifisere gener som er involvert i lusens tilpasning til lavere saliniteter ved hjelp av RNA-sekvensering og sanntids PCR. Blant genene som hadde økt genuttrykk i lavere saliniteter var prolinsyntesegenene pyrroline-5-carboxylate reductase (*P5CR*) og pyrroline-5-carboxylate synthase (*P5CS*), hetesjokkproteinet *HSP70* (kun oppregulert i ferskvann) og en K⁺-kanal (figur 5).



Figur 5. Genuttrykk av utvalgte gener fra adulte hannlus etter behandling i ulike saliniteteter. Lusen var festet på Atlantisk laks som ble inkubert i sjøvann (SW), brakkvann (BW) eller ferskvann (FW) i 24 timer. Hvert datapunkt representerer måling av en individuell lus. EMLSAGXXXXXXXXXXXX er Ensembl stabile IDer. Modifisert figur fra Borchel *et al.*, (2021).

Varmesjokkproteiner blir sett på som stressproteiner (Benjamin og McMillan, 1998), og fungerer som molekylære chaperoner som bidrar til å folde proteiner som har blitt foldet feil eller denaturert som følge av stress. Et eksempel på slikt stress er varmesjokk, men det er vist at varmesjokkproteiner også forekommer under andre stresstilstander, deriblant osmotisk stress (Spees *et al.*, 2002). Varmesjokkproteinet som etter forsøk av Borchel *et al.* (2018) er vist å gi den sterkeste responsen på lavere saliniteter er *HSP70*. To K^+ ionekanaler ble også oppregulert ved lave saliniteter. Den ene av disse, en innoverrettet ionekanal (EMLSAG000000005790, ikke vist i figur 5), ble oppregulert under alle eksperimentelle forhold (Borchel *et al.*, 2021). At den er innoverrettet vil si at den er mer effektiv når det gjelder å transportere ioner inn i cellen enn ut av den. Den andre K^+ -kanalen (EMLSAG000000004087, figur 5) var også en innoverrettet ionekanal, men forskjellen fra den andre var at denne kun viste en signifikant oppregulering når lusen var fastsittende. Hvilken rolle slike transportere spiller for osmoreguleringen er ikke helt kjent. For å unngå misforståelser og identifisere relativt like gener benyttes Ensembl stabile id'er (EMLSAGXXXXXXXXXXXX). Slike IDer forblir stabile ved eventuelle oppdateringer av genomet (Howe *et al.*, 2020).

Sutherland *et al.* (2012) har også gjennomført studier på frittlevende kopepoditter. Målet var å karakterisere subletale stressreaksjoner ved 24 timers eksponering i suboptimale salinitets-

(30-10 ppt) eller temperaturforhold (16-4 °C). Resultatene viste at lav salinitet førte til en sterkere oppregulering i genuttrykk enn temperatur. Ingen signifikant oppregulering skjedde før saliniteten var lavere enn en grense på 27 ppt, og den aller største responsen ble målt i 25 ppt. Studiet indikerte også at kopepoditter har to ulike strategier for å håndtere kortvarig hyposalint stress. En primærrespons som benytter molekylære chaperoner og katabolske prosesser ned til 27 ppt, og en sekundær respons under 27 ppt der det skjer en oppregulering av ionepumper, transportere, andre chaperoner og apoptose-relaterte transkripter (Sutherland *et al.*, 2012). I likhet med Borchel *et al.* (2021) ble det i dette studiet også funnet oppregulering av *P5CS* ved lavere saliniteter (20 ppt og 10 ppt). Dette indikerer at prolinsyntesen er viktig for lusens osmoregulering i flere stadier, og at det fungerer som en respons på lav salinitet. *P5CR* var ikke blant genene som ble vist at oppreguleres her. Forsøk av Bergaas (2023) på å nedregulere genuttrykk for de to prolinsyntese-katalyserende genene *P5CR* og *P5CS* ved hjelp av RNA-interferens førte ikke til redusert overlevelse hos brakkvannsinkuberte lakselus-copepoditter. Viktigheten av prolin for osmoreguleringen er derfor uavklart.

1.8 Mål med masterprosjektet

Det overordnede målet med denne masteroppgaven har vært å studere brakkvannstoleransen til ulike stammer med lakselus på frittlevende copepoditter. Dette er gjort ved å benytte tre labstammer og en ny stamme hentet inn fra felt i 2023 og sammenligne disse i flere ulike eksperimenter:

- 1) Observasjon av aktivitetsnivået til copepoditter i forskjellige saliniteter på ulike tidspunkter.
- 2) Kartlegging og sammenligning av genuttrykkene for *LsP5CR*, *LsP5CS*, *LsHSP70* og *LsK⁺-kanal* hos copepoditter etter inkubasjon i brakkvann.
- 3) Smitteforsøk med Atlantisk laks i både fullt sjøvann (34,2 ppt) og brakkvann (21,1 ppt) etter pre-inkubasjon av copepoditter i brakkvann.

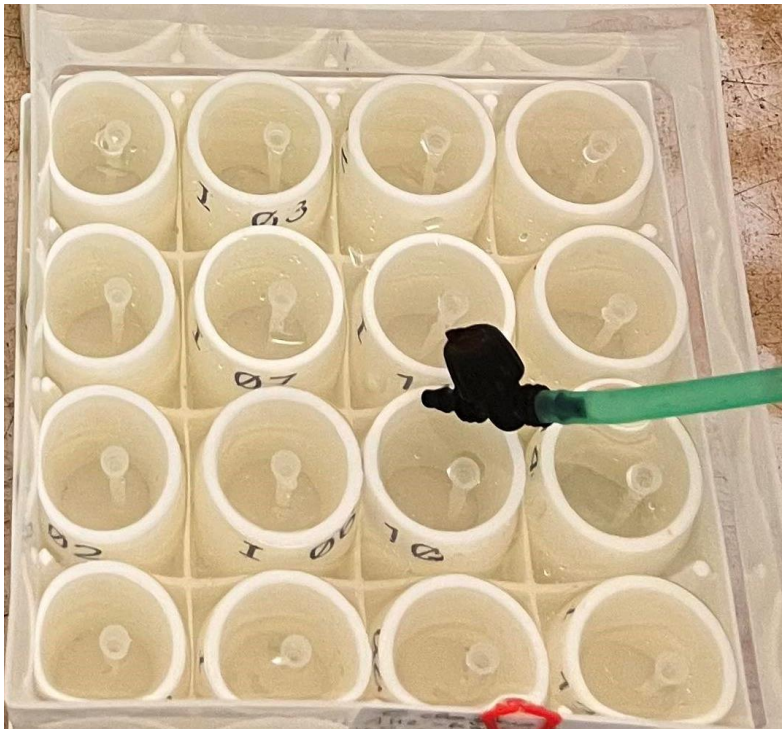
H₀: Copepoditter bevarer ikke sin infektive evne i brakkvann (21,1 ppt) og det finnes ikke stammevariasjoner for brakkvannstoleransen.

H₁: Copepoditter bevarer sin infektive evne i brakkvann (21,1 ppt) etter pre-inkubasjon i brakkvann, og brakkvannstoleransen påvirkes av stammevariasjoner.

2.0 Material og metode

2.1 Lusestammer og uttak av kopepoditter og eggstrenger

I prosjektet ble det benyttet fire ulike lusestammer. *LS Gulen*, *LS Oslofjorden* og *LS Alta* avles opp på Atlantisk laks (*Salmo salar*) på Lakselussenteret (Sea Lice Research Centre) ved Universitetet i Bergen. *LsGulen* og *LsOslofjorden* har begge vært i laboratorium der siden 2006, mens *LsAlta* ble tatt inn i 2013. I tillegg ble en fjerde stamme, *LsBjørnafjorden*, benyttet ved å hente inn ca. 30 kjønnsmodne hunnlus med eggstrenger fra Lerøy sitt anlegg Skorpo Vest i Bjørnafjorden i oktober 2023. Dette ble gjort i forbindelse med lusetelling i en merd der lusen ble plukket av fisken ved hjelp av pinsett, før den ble plassert i termos med sjøvann og fraktet til SLRC sitt laboratorium på Universitetet i Bergen. Der ble eggstrengene plukket av lusen og inkubert i klekkebrønner (Figur 6), som er en kultiveringsmetode introdusert av Hamre *et al.* (2009). Etter klekking av P-generasjon ble kopepodittene fra disse satt på fisk for å avle frem generasjon F1 fra nye eggstrenger. Kopepoditter fra *LsBjørnafjorden* generasjon F1 ble benyttet i dette prosjektet.



Figur 6. Klekkebrønner. Et Brett besto av 4x4 brønner som fikk tilført sjøvann via den grønne tuben. Vannet ble fordelt på alle brønnene, og hver brønn inneholdt ca. 2 eggstrenger.

Fisken i merden som *LsBjørnafjorden* ble hentet fra hadde på dette tidspunktet et lusetall på 0,65 kjønnsmodne hunnlus per fisk. Miljømålt på lokaliteten ble målt i uken før henting av lus

(tabell 2). Oksygen målt i prosent, salinitet i promille og temperatur (°C) ble målt på 3,8 og 15 meters dybde. Fisken hadde i månedene før vært gjennom tre behandlinger; salmosan 05.04.23 og ferskvann kombinert med thermolicer 28.05.23 og 14.07.23.

Tabell 2. Målinger av oksygen [%], salinitet [‰] og temperatur [°C] på 3, 8 og 15 meter på Lerøy sin lokalitet Skorpo Vest i Bjørnafjorden i uken før uttak av lus med eggstrenger.

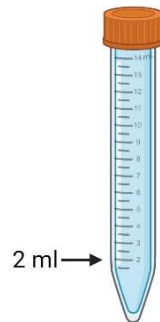
Dato	23.10.2023	24.10.2023	25.10.2023	26.10.2023	27.10.2023
Oksygen 3m [%]	98	96	101,3	100,6	109
Oksygen 8m [%]	99,7	99,7	102,3	102,3	106,2
Oksygen 15m [%]	100,7	100,4	100	101,3	106
Salinitet 3m [‰]	27,27	27,55	29,2	29,4	29,3
Salinitet 8m [‰]	28,05	28,73	29,9	30,1	30,1
Salinitet 15m [‰]	30,31	31,07	31,3	30,4	30,7
Temperatur 3m [°C]	12,7	12	11,8	12,3	11,9
Temperatur 8m [°C]	11,9	12,10	12	12	12,3
Temperatur 15m [°C]	12,5	12,5	12,4	12	12

Etter klekking ble naupliene holdt videre i klettebrønnene ved $9,5 \pm 0,5$ °C. Det tok ca. 7 dager før lusen ble kopepoditter, men for å gi dem tid til å bli fullt utviklet ble de benyttet til forsøk 9-10 dager etter klekking. Dette var tilfellet for alle forsøk med alle de fire stammene.

2.2 Observasjonsforsøk av kopepoditter i ulike saliniteter

Målet med dette eksperimentet var å undersøke hvilken effekt ulike saliniteter hadde på aktiviteten til kopepoditter fra de ulike stammene på ulike tidspunkt innenfor 24 timer, og om eventuelle signifikante forskjeller kunne observeres mellom stammene.

I eksperimentet ble 15 ml Falcon/sentrifuge rør benyttet (figur 7). 14 ml vann ble tilsatt rørene og temperaturen på vannet var $9,5 \pm 0,5$ °C. Salinitetene som ble brukt var 34,2 (100 % sjøvann) 21,1, 18, 15, 13,8 og 10 ppt. Saliniteten ble beregnet ved blanding av sjøvann og ferskvann i et desilitermål og deretter målt med salinitetsmåler. Det ble satt opp 3 paralleller per salinitet med 10 kopepoditter i hvert rør, som ga 18 rør totalt med 30 kopepoditter per salinitet.



Figur 7. 15ml Falcon rør/sentrifugerør benyttet til observasjonsforsøk av kopepoditter i ulike saliniteter med en markert 2 ml grense. Created with BioRender.com

Etter inkubering ble hvert rør med kopepoditter observert i ca. to minutter etter 2, 4, 6 og 24 timer ved hjelp av lys og lupe. Antall kopepoditter over og under 2 ml-merket og i bunn av røret ble registrert, og i tillegg ble aktivitetsnivået vurdert subjektivt ved observasjon. Ved avslutning av eksperimentene ble dødelighet registrert.

2.3 Rensing av RNA

Før rensing ble kopepoditter inkubert i sjøvann (34,2 ppt, kontrollgruppe) og brakkevann (21,1 ppt, testgruppe) i 6 timer. Etter endt inkubasjon ble kopepodittene pipettert til petrisskåler. Vannet ble så sugd ut av skålene, og RNA-later ble tilsatt. Videre ble kopepodittene pipettert tilbake til rør med RNA-later for lagring. På grunn av planlagt korttidslagring før rensing ble prøvene lagret i kjøleskap på -4 °C.

RNA ble isolert og rensset fra kopepoditter fra de fire stammene. Dette ble gjort ved fase separering, og protokollen fra Direct-Zol™ MicroPrep (Zymo Research) ble benyttet.

Homogenisering og fase separering med TRIzol: Prøvene med ca. 50 kopepoditter i hver prøve ble pipettert over i 2 ml rør med 1,4 mm store kjeramiske kuler av zirconium-oksid (Precellys 14), og RNA-later ble sugd ut. Deretter ble 800 µl TRIzol tilsatt, og prøvene ble homogenisert med TissueLyser II (Qiagen) i tre minutter med 30 rist per sekund (30 Hz). Prøvene ble så hvilt i fem minutter.

Videre ble 160 µl kloroform tilsatt, prøvene ble ristet i 15-20 sekunder før de ble hvilt i to til tre minutter på romtemperatur. Deretter ble de sentrifugert på 12 000 xG i 15 minutter (4°C) ved bruk av Fresco 21-sentrifuge (Thermo Fisher).

Isolering av RNA: Supernatanten (350 µl) ble overført til nye rør, og en lik mengde 95 % Etanol ble tilsatt. Blandingen ble overført til Zymo-Spin IC kolonner plassert i samlerør, og deretter vasket og sentrifugert i henhold til protokoll. Kolonnene ble så plassert i nye samlerør. En 40 µl DNase-miks bestående av 35 µl DNA Digestion Buffer og 5 µl DNase 1 ble mikset for hver prøve. Miksen ble tilsatt hver kolonne og inkubert i 15 minutter på romtemperatur. Videre ble kolonnene vasket med RNA PreWash og RNA vaskebuffer i samsvar med protokoll. De ble deretter plassert i nye 1,5 ml rør, eluert i 15 µl RNase-fritt vann og etter inkubasjon i en til to minutter ble prøvene sentrifugert i henhold til protokoll.

Måling av RNA: En spektrofotometrisk analyse av rensset RNA fra hver prøve ble utført ved hjelp av NanoDrop One (Thermo Fisher). Her ble konsentrasjonsmålinger av RNA gjort, og renheten ble testet med A260/280 og A260/230 verdier. Disse verdiene lå med få unntak mellom 2,2 og 1,9. Etter måling ble prøver med rensset RNA lagret ved -80 °C.

2.4 Syntese av komplementær DNA (cDNA)

Formålet med å produsere cDNA var å benytte det som templat i sanntids PCR-reaksjoner (qPCR). cDNA ble syntetisert fra prøver med rensset RNA fra frittlevende kopepoditter ved å benytte AffinityScript qPCR cDNA syntese-kit (Agilent Technologies).

Det ble laget 10 µl med reaksjonsmiks for hver RNA-prøve (tabell 3). Før RT/Rnase block enzyme mix ble tilsatt ble det tatt ut og tilført 6,5 µl i et nytt PCR-rør til bruk i en negativ revers transkriptase (-RT) kontroll. Hensikten med denne var å kontrollere at ikke genomisk DNA ble amplifisert i qPCR-reaksjonen, da dette ikke skal være til stede i templat med rensset RNA.

For hver 10 µl reaksjon var mengden RNA 200 ng, og avhengig av mengden RNA som ble tilsatt hver prøve ble det tilsatt RNase-fritt H₂O for å få et reaksjonsvolum på 10 µl per reaksjon. For -RT kontroll ble det benyttet RNA fra prøven med høyest konsentrasjon.

Tabell 3. Reagenser som ble brukt til å lage reaksjonsmiks for én reaksjon. AffinityScript RT/Rnase block enzyme mix ble ikke tilsatt i -RT kontroll.

Reagenser	Volum per reaksjon (µl)
First strand master mix (2x)	5
Oligo(dT) primer (0,1µg/µl)	1
Random primers (0,1µg/µl)	0,5
AffinityScript RT/Rnase block enzyme mix	0,5
RNA-templat	x
RNase-fritt H ₂ O	3-x
Sum	10

For produksjon av cDNA ble de to trinnene i prosessen med revers transkripsjon (RT) prosessert med en Mini Amp Thermal Cycler (Applied Biosystems). Prosessen for cDNA-syntese inkluderte en initial annealing ved 25 °C i 5 minutter, etterfulgt av en cDNA-syntese ved 42 °C i 30 minutter, og til slutt terminering av syntesen ved 95 °C i fem minutter. Deretter ble reaksjonene avkjølt til 4 °C.

Til slutt ble cDNA fortynt 1:5 ved at 40 µl med RNase-fritt vann ble tilført til hvert rør.

2.5 Sanntids PCR (qPCR)

For å kvantifisere genuttrykket til de utvalgte genene ble sanntids kvantitativ polymerasekjedereaksjon benyttet. Dette er en molekylærbiologisk metode som tillater overvåking av DNA-mengden som produseres etter hver syklus. Fluoriserende fargestoffer som SYBR Green binder seg til DNA som produseres i løpet av PCR-syklusene, og disse fargestoffene blir registrert.

Til qPCR ble Power Up SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher) protokoll benyttet. Det ble for hvert gen laget reaksjonsmiks, og for hver reaksjon ble det laget 10 µl. Reaksjonsmiksen besto av reagensene i tabell 4, inkludert 500 nM forward- og reverse primere. Primerne har tidligere blitt testet av Borchel *et al.* (2021).

Tabell 4. Reagenser som ble benyttet til å lage 10 µl med reaksjonsmiks per reaksjon som skulle analyseres med qPCR.

Reagenser	Volum per prøve (µl)
2x SYBR Green Master Mix	5
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
RNase-fritt H ₂ O	2
Templat (cDNA)	2
Sum	10

I eksperimentene ble det analysert genuttrykk for *LsP5CR*, *LsP5CS*, *LsHSP70* og *LsK⁺kanal* samt referansegenene *Eukaryotisk translasjon initieringsfaktor 1A (EIF1A)* og *Ribosomalt protein 13 (RPS13)*. *EIF1A* har ved forsøk vist større stabilitet som referansegen enn *Elongeringsfaktor 1a (Efla)* som ble benyttet til lignende forsøk av Bergaas (2023) (Borchel *et al.*, 2023). I tillegg til disse genene ble det benyttet negative kontroller i form av -RT kontroll med cDNA fra prøven med høyest RNA-konsentrasjon, og Non Template Control (NTC) med RNase-fritt vann.

Tabell 5. Forward og reverse primere med tilhørende sekvenser oppgitt i 5' til 3' ende. Primerne ble benyttet i qPCR reaksjoner for de ulike genene med *EIF1A* og *RPS13* som referansegener.

Gen (assay)	Forward primer med sekvens	Reverse primer med sekvens
<i>LsP5CR</i>	GGGACGCGTCTATAAGGTGA	GGTAACCCCTGCCTTACTCC
<i>LsP5CS</i>	GGAAGCCGCTCATACGAATA	AACAAATCTCCAACGGCTTC
<i>LsHSP70</i>	ACAGTGGAAAAGGATGAGTTTAAG	ATACGAGTTGAGCCTCAATTTCTT
<i>LsK⁺kanal</i>	GATATGGTGGACGAGCTACGA	TTCCTTGGCGTTGAGAAGGT
<i>EIF1A</i>	CCCTCTTCGCCAAAAGTGAC	CAGACGAGGCTCGCAACTTA
<i>RPS13</i>	GCCGGTGTTTAACAATCATCAA	GGGCTTCGAGTCCTTGTATGC

Polymerasekjedereaksjonene ble kjørt på QuantStudio 3 Real-Time PCR maskiner (Applied Biosystems) ved bruk av MicroAmp Optical 96-wells (Applied Biosystems) brønnplater på følgende program: initiering på 50°C i to minutter, denaturering på 95°C i to minutter, 40

sykluser med 95°C i 15 sekunder og 60°C i ett minutt etterfulgt av en avsluttende smeltekurve (95°C). Terskelverdien (Ct) for videre utregning av genuttrykket ble satt til 0,2.

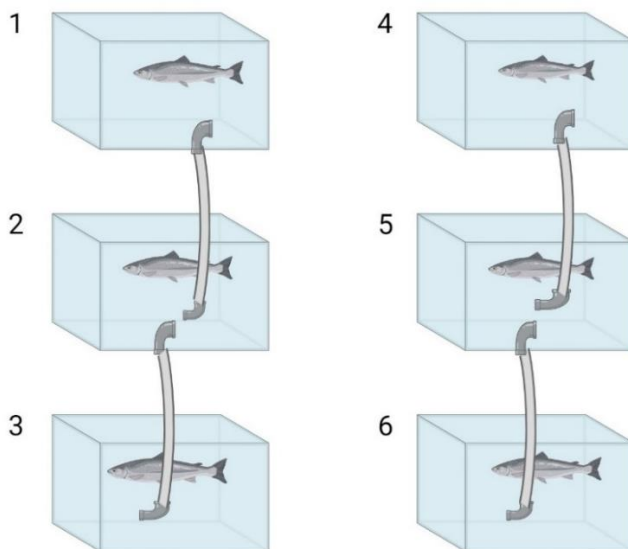
2.6 Undersøkelse av infektiv evne hos brakkvannsinkuberte kopepoditter

Målet med disse smitteforsøkene var å undersøke om inkubering av frittlevende kopepoditter i brakkvann (21,1 ppt) ville påvirke infeksjonsevnen til luselarvene, og om det finnes signifikante variasjoner i brakkvannstoleransen hos de fire lusestammene. Smitteforsøkene ble gjennomført med én stamme av gangen, og de ble ikke blandet på noe tidspunkt.

2.6.1 Smitteforsøk i fullt sjøvann

I dette forsøket ble anslagsvis 300 kopepoditter fra tre ulike replikater av stammen inkubert i brakkvann (21,1 ppt) i 24 timer, og en kontrollgruppe med et tilsvarende antall kopepoditter fra like mange replikater ble inkubert over like lang tid i fullt sjøvann (34 ppt).

Ved endt inkubering ble kopepodittene satt ut i enkeltkar med atlantisk laks (figur 8). Vannstanden ble senket, og vannstrømmen ble redusert til ca. to liter per minutt før den ble tilbakestillt etter ca. tre timer. Fiskens vekt varierte fra 245 g på det laveste til 499 g på det høyeste, og ble 48 timer før smittetidspunkt satt i enkeltkarene for å akklimatiseres. Temperaturen i karene med fisk var under forsøksperioden $9 \pm 0,5$ °C.



Figur 8. Oppsett fra smitteforsøk i fullt sjøvann. Enkeltkarene var av plast med én fisk per kar i 2 kolonner á 3 kar. Vannet fra kar 1 og 4 gikk ned til kar 2 og 5 osv. Anslagsvis 100 kopepoditter ble tilsatt hvert kar med nedsenket vannstand til en kolonne med én fisk per kar. Kopepoditter fra testgruppe (brakkvannsinkuberte kopepoditter) og kontroll (sjøvannsinkuberte kopepoditter) ble tilsatt henholdsvis kar 1-3 og kar 4-6. Created with BioRender.com.

Etter 16 dager ble fisken bedøvet i et bad med 10 liter sjøvann tilsatt 1,3 gram med anestesimiddelet 1000 mg/g Finquel (MSD Animal Health) pulver. Virkestoffet i middelet er trikainmesilat. Etter bedøving ble fisken tatt ut av karet og avlivet ved slag mot hodet. Deretter ble antall fastsittende chalimus II lus telt opp på hver fisk ved hjelp av lys og lupe.

Unntak fra dette var forsøket med *LsAlta* som ble avsluttet på dag 19. Der ble også pre-adulte hanner observert og telt opp. På grunn av logistiske utfordringer ble forsøket med *Ls Bjørnafjorden* gjennomført i to større kar (450 liters kar), der ett kar inneholdt testgruppen og det andre inneholdt kontrollgruppen. Det ble i dette forsøket benyttet fire fisk per gruppe, da et lavere antall i disse karene har vist seg å påvirke fiskens atferd (P.G Espedal, personlig kommunikasjon). I disse karene ble 400 kopepoditter fra fire ulike eggstrengpar av *LsBjørnafjorden* tilsatt.

2.6.2 Smitteforsøk i brakkvann

I dette eksperimentet ble anslagsvis 800 kopepoditter fra åtte ulike eggstrengpar av stammen inkubert i brakkvann (21,1 ppt) i 24 timer, og en kontrollgruppe med et tilsvarende antall kopepoditter fra like mange replikater ble inkubert over like lang tid i fullt sjøvann (34 ppt).

Etter inkubering ble de brakkvannseksponeerte kopepodittene satt ut i 450 liters kar med fisk der vannet hadde en forhåndsinnstilt salinitet på 21,1 ppt, og kontrollgruppen ble satt ut i et kar med fullt sjøvann. Vannstanden ble senket, og vannstrømmen ble redusert til ca. to liter per minutt før den ble tilbakestilt etter tre timer. Mengden sjøvann inn i karene ble også justert opp igjen etter tre timer, samtidig som at ferskvannskranen ble stengt igjen. Dette førte til en gradvis økning i salinitet opp til fullt sjøvann. Hvert kar inneholdt åtte atlantiske laks med en gjennomsnittsvekt på 449 gram, varierende fra 310 til 630 gram. Temperaturen i karene var $9,5 \pm 0,5$ °C. En justering av inntaksvannet hos ILAB førte til et unntak fra dette de siste tre dagene av eksperimentene på *LsGulen* og *LsAlta*, da vannet holdt en temperatur på $8,3 \pm 0,2$ °C.

Avslutningen av disse eksperimentene ble gjennomført på samme måte som eksperimentene i seksjon 2.6.1.

2.7 Databehandling og statistisk analyse

For beregning av det relative genuttrykket ble en metode utviklet av Livak og Schmittgen (2001) benyttet. Metoden ble først brukt til utregning av genuttrykk hos lakselus av Frost og Nilsen (2003). Dataen ble behandlet i Microsoft Excel. Først ble de geometriske gjennomsnittlige Ct-verdiene (kalibratorverdiene) til referansegenene *EIF1A* og *RPS13* for hver prøve regnet ut. ΔCt for hver prøve ble så beregnet ved å trekke Ct-verdiene fra kalibratorverdiene til referansegenene.

$$\Delta Ct = [Ct \text{ kal av referansegener}] - [Ct \text{ av målggen}]$$

Videre ble Fold Change for de fire målggenene regnet ut:

$$FC = 2 - (\Delta Ct \text{ kal} - \Delta Ct) = 2[\Delta Ct] - [\Delta Ct \text{ kal}] = 2 - \Delta \Delta Ct$$

Etter utregning av Fold Change for hver prøve ble dataen plottet i GraphPad Prism 10, en programvare for statistisk analyse og grafisk presentasjon av vitenskapelige data. I dette programmet ble standardavviket for hver gruppe beregnet. Videre ble det også benyttet en «Two-Way Anova (Analysis of Variance)»-test for å regne ut eventuelle statistiske variasjoner mellom test- og kontrollgruppene. Her ble en alfaverdi lik 0,05 brukt for alle analyser. I analysen av smitteforsøkene ble det testet for signifikans for faktorene stamme, salinitet og interaksjon mellom dem. For relativt genuttrykk ble det testet for stamme, genuttrykk og interaksjon. Ved statistisk signifikans på noen av disse faktorene ble Šídák's multiple comparisons test kjørt for å sjekke for statistisk signifikans mellom kontroll og testgrupper.

For utregning av fiskens overflateareal (cm^2) ble følgende formel benyttet:

$$13,9W^{0,61}$$

der W = fiskens vekt i gram.

Formelen ble utviklet av Frederick *et al.* (2017) for å estimere overflatearealet til Atlantisk laks mellom 21,83 og 1115,84 gram. Utregningen ble gjort for å utelukke at fiskens størrelse hadde en signifikant påvirkning på resultatene, og dataen ble presentert med egne resultatfigurer.

Resultatfigurene ble produsert med GraphPad Prism 10, og disse figurene inkluderer standardavvik og statistisk variasjon i de forskjellige eksperimentene.

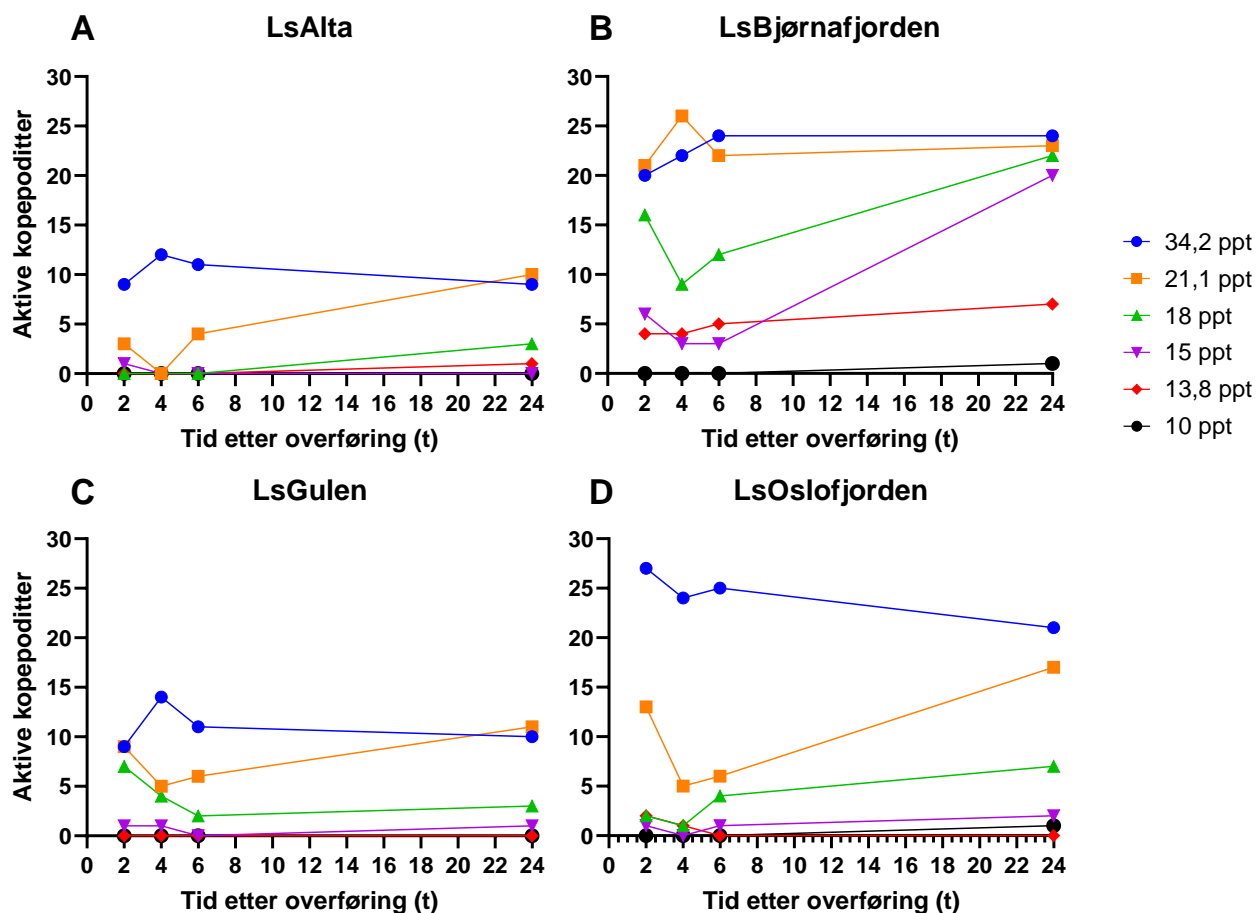
3.0 Resultater

3.1 Inkubasjon av kopepoditter i ulike saliniteter

Eksperimentet viste variasjoner i atferden til kopepoditter av lakselus fra de fire ulike stammene, basert på fordelingen av individer over en 2 ml terskel i et 15 ml sentrifugerør med 14 ml vann over tid ved forskjellige saliniteter. Antallet kopepoditter som befant seg over 2 ml-grensen i sentrifugeringsrørene ble talt opp etter 2, 4, 6 og 24 timer (figur 9). Dette antallet var totalantallet fra de tre parallellene med 10 kopepoditter per replikat.

For *LsAlta* (figur 9A) ble det observert en generell tendens til at et høyere antall kopepoditter befant seg over 2 ml-merket i rørene med høyere salinitet (34,2 ppt). Antallet aktive kopepoditter fra denne stammen i fullt sjøvann var på under 50 % gjennom hele observasjonsperioden, noe som er tydelig lavere enn for *LsBjørnafjorden* (figur 9B) og *LsOslofjorden* (figur 9D). Ved lavere saliniteter var det et lavt antall kopepoditter over 2 ml-merket ved alle tidsintervallene. I rørene med 21,1 ppt viser resultatene at flere kopepoditter beveget seg over grensen etter 6 timer, og i enda større grad etter 24 timer.

LsBjørnafjorden (figur 9B) viste et generelt høyt antall kopepoditter over 2 ml-merket med unntak av de som var inkubert i 10 ppt. Spesielt for denne stammen var at det var omtrent like mange aktive kopepoditter blant de som ble inkubert i 21,1 som de i sjøvann gjennom hele eksperimentet. For kopepodittene i 21,1 ppt kan en se et tilnærmet likt antall aktive kopepoditter fra første til siste observasjon. I tillegg ser man av resultatene (figur 9B) at kopepodittene i 18 og 15 ppt var mer aktive etter 24 timer. Antallet kopepoditter over grensen er i disse salinitetene mer enn doblet sammenlignet med antallet etter 4 timer. I 13,8 ppt kan en se en marginal økning etter 24 timer sammenlignet med etter to. I 10 ppt ble det observert én aktiv kopepoditt etter 24 timer, men ingen på de andre tidspunktene.



Figur 9. Atferdsekspertiment med kopepoditter fra LsAlta, LsBjørnafjorden, LsGulen og LsOslofjorden. Antall aktive kopepoditter over 2 ml i et 15 ml sentrifugeringsrør ble telt opp etter 2, 4, 6 og 24 timer. Tidspunktene for telling er vist ved punkter på linjene. Antallet kopepoditter var lik 30 i hvert eksperiment, og grafene viser kun kopepoditter som befant seg over 2 ml-grensen. Hver linje i figuren representerer én salinitet. A: Observasjon av LsAlta. B: Observasjon av LsBjørnafjorden. C: Observasjon av LsGulen. C: Observasjon av LsOslofjorden.

LsGulen-copepodittene (figur 9C) hadde sammen med LsAlta det laveste antallet kopepoditter over 2 ml-grensen blant de fire stammene, inkludert sjøvannsinkuberte kopepoditter. Ved første observasjon etter 2 timer var antallet likt i sjøvann og 21,1 ppt, men etter fire og seks timer hadde færre av kopepodittene i brakkvann gått over grensen. Etter 24 timer hadde derimot antallet over grensen i 21,1 ppt økt igjen, og tallet var på dette tidspunktet høyere enn i fullt sjøvann.

LsOslofjorden (figur 9D) viste en økning i antall kopepoditter under 2 ml-merket ved 21,1 ppt fra to til seks timer, men i likhet med de andre stammene en nedgang etter 24 timer. Ved laveste salinitetsnivå (10 ppt) var det et generelt lavt antall kopepoditter over grensen gjennom hele observasjonsperioden.

Disse resultatene indikerer at kopepodittene uavhengig av stamme holder seg høyere i vannsøylen ved høyere salinitet. Etter 24 timer står flere kopepoditter fra alle stammene høyere i vannsøylen, spesielt for kopepoditter i 21,1 ppt. I saliniteten 18 ppt er også denne tendensen lik for alle stammer, men i langt mindre grad. Et unntak her var *LsBjørnafjorden*, der endringen etter 24 timer var stor i både 18 og 15 ppt.

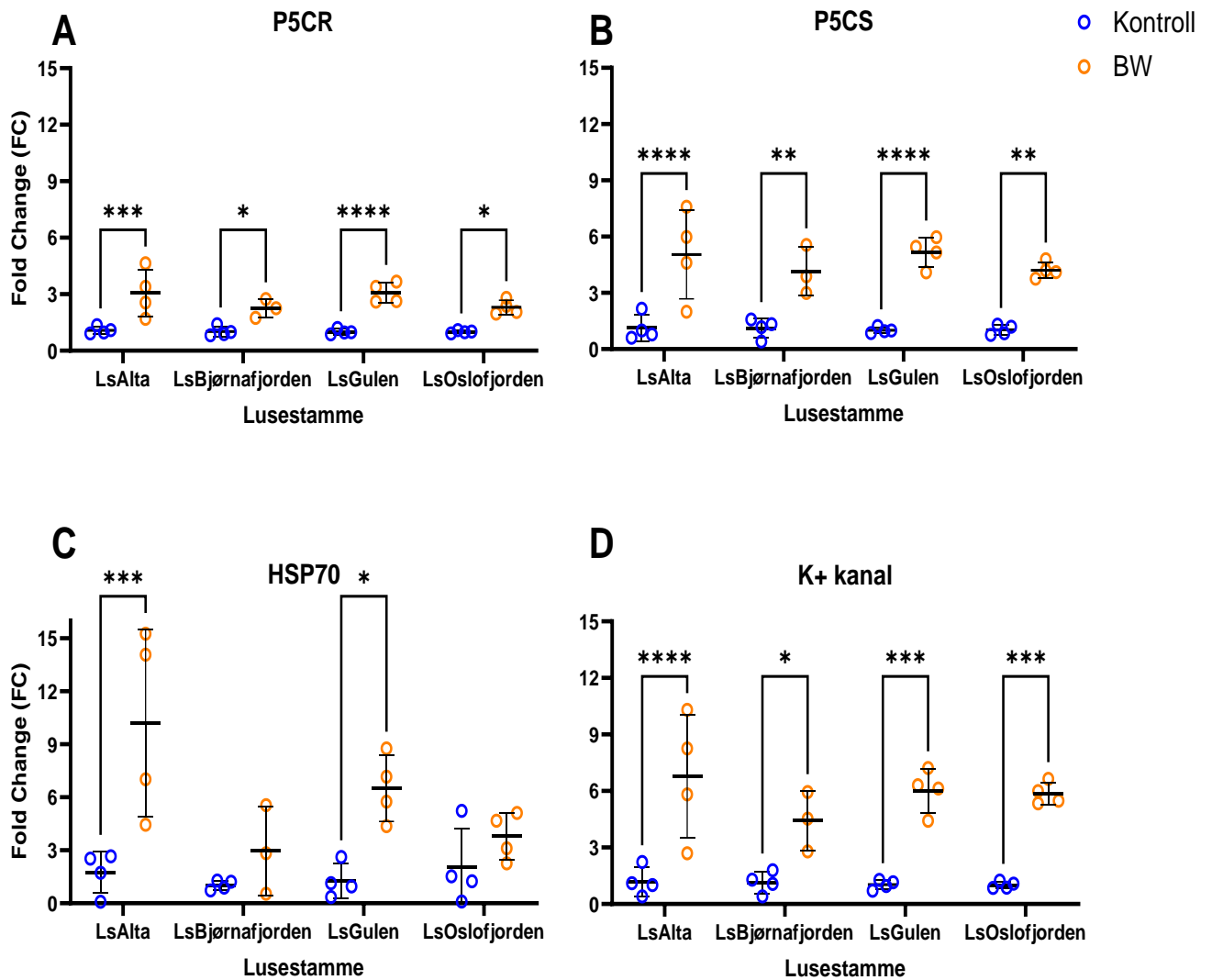
Ved hjelp av lys og lupe ble til slutt aktivitet og dødelighet hos inaktive kopepoditter observert. Noen inaktive kopepoditter (kopepoditter under 2 ml merket) var i tydelig bevegelse under lupe, mens andre kun viste tegn til liv ved sporadiske bevegelser. Ingen av disse ble registrert som døde. Det ble ikke observert døde kopepoditter på 13,8 ppt eller høyere hos noen av stammene. Ved 10 ppt ble det funnet at *LsAlta* (26,6 %) hadde høyest dødelighet, etterfulgt av *LsGulen* (23,3 %), *LsOslofjorden* (23,3 %) og *LsBjørnafjorden* (20 %).

3.2 Genuttrykk for *LsPC5R*, *LsP5CS*, *LsHSP70* og *LsK⁺kanal* hos kopepoditter i sjøvann og brakkvann

I dette eksperimentet ble frittlevende kopepoditter inkubert i 21,1 ppt i seks timer. Videre ble genuttrykket til målgenene *LsP5CR*, *LsP5CS*, *LsHSP70* og *LsK⁺kanal* målt ved sanntids PCR (qPCR) med *EIF1A* og *RPS13* som referansegener. Dette ble gjort for alle de fire lusestammene. Genuttrykket til kopepodittene som var inkubert i brakkvann ble så sammenlignet med sjøvann (negativ kontroll).

For *P5CR* ble det i alle de undersøkte gruppene observert en tydelig økning i genuttrykket for de brakkvannsinkuberte kopepodittene (figur 10A). *LsAlta* (FC = 1,99) og *LsGulen* (FC = 2,07) hadde de største og signifikant oppregulerte genuttrykkene. *LsBjørnafjorden* (FC = 1,23) og *LsOslofjorden* (FC = 1,3) viste også en signifikant oppregulering.

Signifikant oppregulering av *P5CS* genuttrykk ble observert sammenlignet med kontrollen for alle grupper (Figur 10B). Også her er det *LsAlta* (FC = 3,9) og *LsGulen* (FC = 4,16) som hadde den mest signifikante oppreguleringen ($p < 0,0001$), mens de to øvrige stammene også hadde en klar og signifikant oppregulering i forhold til kontrollen ($p < 0,01$). *LsGulen* hadde den høyeste observerte foldendringen blant de undersøkte gruppene med ca 4. De laveste foldendringene ble registrert hos *LsOslofjorden* (FC = 3,19), og *LsBjørnafjorden* med en transkripsjonsøkning på ca. 3.



Figur 10. Relativt genuttrykk (Fold Change) for fire genetiske markører hos brakkvannseksponeerte kopepoditter fra ulike stammer.. Kontrollgruppen og brakkvannsgroppene (BW) ble inkubert i henholdsvis 34,2 ppt og 21,1 ppt i 6 timer. Hvert enkelt datapunkt plottet som sirkler indikerer individuelle biologiske replikater for hver gruppe. De horisontale linjene viser gjennomsnittet for hver gruppe med standardavvik. Statistisk signifikans er markert ved at antall stjerner representerer forskjellige nivåer av signifikans, der: * indikerer $p < 0,05$, ** indikerer $p < 0,01$, *** indikerer $p < 0,001$ og **** indikerer $p < 0,0001$. Der det ikke er stjerner er det ingen statistisk signifikans. A: Genuttrykk for LsP5CR. B: Genuttrykk for LsP5CS. C: Genuttrykk for LsHSP70. D: Genuttrykk for LsK⁺kanal.

For HSP70 viser figur 10C at LsAlta hadde en svært høy foldendring på omtrent 8,5 når kontrollen trekkes fra. Dette genet viser en større variasjon i genuttrykket mellom stammene enn de tre andre genene. De andre stammene hadde lavere, men fortsatt betydelige økninger i uttrykk av HSP70. LsGulen har en endring på ca. 5,3, mens endringen for LsOslofjorden (FC = 1,76) og LsBjørnafjorden (FC = 1,95) er noe lavere. En kan se (figur 10C) at testgruppen til

LsOslofjorden i utgangspunktet har høyere gjennomsnittlig genuttrykk enn *LsBjørnafjorden*, men siden kontrollgruppen til førstnevnte har høyere uttrykk er endringen mellom gruppene større hos *LsBjørnafjorden*.

Når det gjelder genuttrykket til K⁺ kanalen ble det observert signifikant oppregulering hos alle stammene. *LsAlta* viste (figur 10D) den høyeste økningen (FC = ca. 5,5). De andre stammene hadde også økninger, men disse var mindre markante.

Den observerte variasjonen i genuttrykk var generelt lavere for K⁺ kanalgenet sammenlignet med *HSP70*, men standardavviket indikerer fortsatt betydelig spredning innenfor hver gruppe.

Disse funnene demonstrerer en tydelig og signifikant effekt av brakkvannseksponering på transkripsjonsnivåene av de undersøkte genene sammenlignet med kontrollgruppen som bare var eksponert for sjøvann. Den spesielt høye foldendringen i *HSP70*-genuttrykket til *LsAlta* kan tyde på en sterk og spesifikk respons på brakkvann som krever videre analyser.

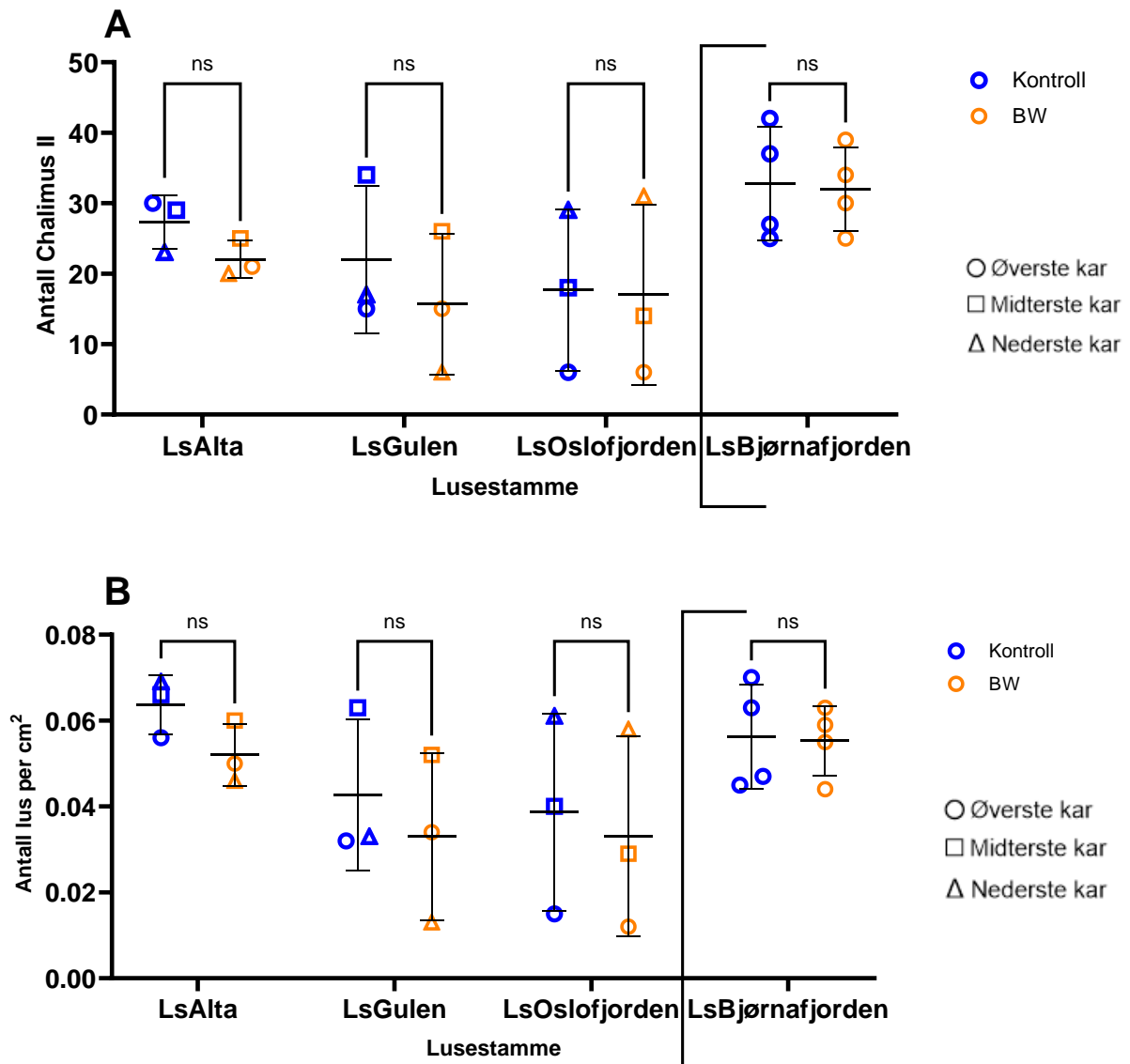
3.3 Smitteforsøk

I disse eksperimentene ble kopepoditter fra de fire ulike stammene inkubert i 24 timer i 21,1 ppt brakkvann og så benyttet i smitteforsøk i fullt sjøvann (34,2 ppt) eller brakkvann (21,1 ppt).

3.3.1 Smitteforsøk i fullt sjøvann

Forsøket viste at det ikke var statistisk signifikante forskjeller mellom kontroll- og testgruppene hos noen av stammene, markert med «ns» (figur 11A og 11B). Variasjonen innad i gruppene var små og overlappende, noe som indikerer at antallet lus i chalimus II-stadiet ikke endret seg vesentlig etter en 24 timers inkubasjon i brakkvann (21,1 ppt).

Gjennomsnittet for hver gruppe viser en svak forskjell hos *LsAlta* (5,3 %) og *LsGulen* (6,3 %) der kontrollgruppen har en marginalt høyere smittesuksess uten at den er signifikant, mens det for *LsOslofjorden* (0,7 %) og *LsBjørnafjorden* (0,75 %) ikke observeres merkbare forskjeller mellom gruppene. Mellom stammene kan en se at *LsBjørnafjorden* har et høyere antall lus enn de andre, men forsøket er utført noe annerledes og ikke direkte sammenlignbart med de øvrige stammene (se avsnitt 4 i seksjon 2.6.1). Analysen viser ingen signifikans på interaksjon mellom stammer og salinitet, men at forsøket viser en signifikant forskjell (p-verdi = 0,0175 (*)) mellom stammene. Salinitet gir ikke en statistisk signifikant variasjon.



Figur 11. Lusetall på laks etter inkubasjon i brakkvann og smitte i sjøvann. Viser antall fastsittende chalimus II lus som ble talt opp fra 3 fisk per gruppe, med unntak av LS Bjørnafjorden + kontroll der 4 fisk ble benyttet. LsBjørnafjorden + kontroll er skilt fra de andre med en skillelinje. Gruppene ble smittet med 100 kopepoditter per fisk, og kopepodittene var på forhånd inkubert i henholdsvis 21,1 ppt og 34,2 ppt (kontroll) i 24 timer før smitte. Hvert enkelt datapunkt plottet som sirkler indikerer individuelle fisk for hver gruppe. For de tre stammene LsAlta, LsGulen og LsOslofjorden markerer sirkel det øverste karet, firkant karet i midten og sirkel det nederste karet. Figuren er markert med horisontale linjer som viser gjennomsnittet for hver gruppe, og de vertikale linjene viser standardavvik. Markering med ns betyr «non-significant» og betyr at det ikke finnes statistisk signifikans mellom kontroll – og testgruppe. A: Antall opptelte chalimus II per fisk. B: Antall opptelte chalimus II basert på overflatearealet (cm²) til hver fisk.

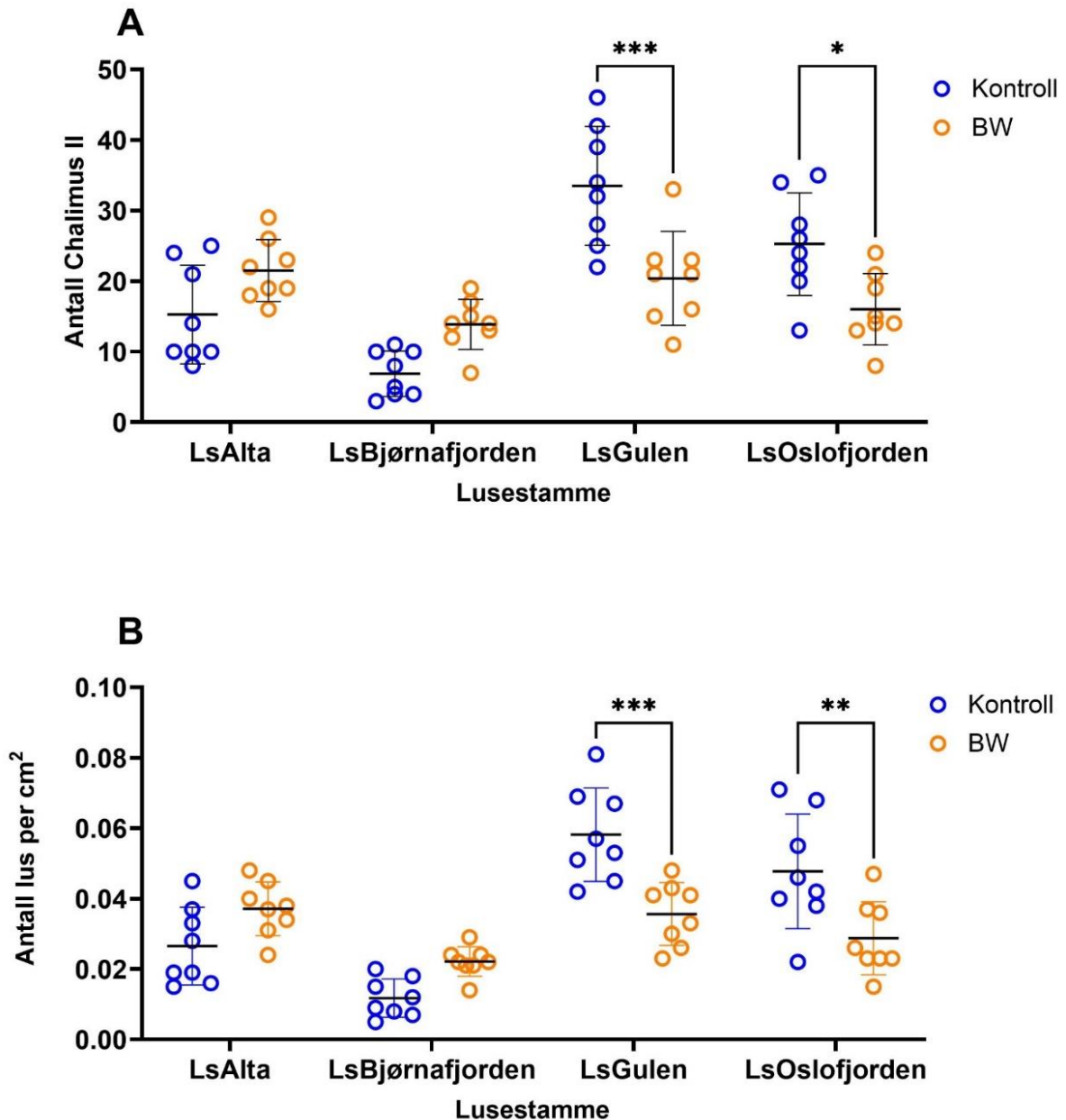
3.3.2 Smitteforsøk i brakkvann

Smittesuksess er målt som antall fastsittende chalimus II på laksen, og sammenlignet mellom de fire stammene. For hver stamme vises data for to forskjellige behandlingsgrupper: kontrollgruppen inkubert og smittet i 34,2 ppt og en gruppe inkubert og smittet i 21,1 ppt.

Den statistiske analysen av eksperimentet viser at kildene til signifikante forskjeller er stamme ($p < 0,0001$) og interaksjon mellom stamme og salinitet ($p < 0,0001$). Analysen indikerer også at salinitet i seg selv ikke gir en statistisk signifikant variasjon ($p > 0,05$).

Resultatene (figur 12A, 12B) viser statistisk signifikante forskjeller mellom gruppene hos *LsGulen* (13,1 %) og *LsOslofjorden* (9,3 %). For *LsGulen* observeres en lavere p-verdi ($p < 0,001$) enn for *LsOslofjorden* ($p < 0,05$). Når overflatearealet til fisken tas med i betraktningen er signifikansnivået (**) høyere for *LsOslofjorden*. Kontrollgruppene har for begge stammene et tydelig høyere gjennomsnittlig antall lus per fisk enn brakkvannsgruppene (BW).

For *LsAlta* og *LsBjørnafjorden* ble det ikke en statistisk signifikans i dette forsøket. Gjennomsnittlig har kontrollgruppen hos *LsAlta* 15,3 registrerte lus per fisk, mens gruppen som ble inkubert i og smittet i brakkvann har 21,5 lus per fisk. Det gir omtrent 29 % mer lus per fisk hos brakkvannsgruppen.



Figur 12. Lusetall på laks etter inkubasjon og smitte i brakkvann. Viser antall fastsittende chalimus II lus som ble talt opp fra 8 fisk per gruppe. Gruppene ble smittet med 100 kopepoditter per fisk, og kopepodittene ble på forhånd inkubert i henholdsvis 21,1 ppt og 34,2 ppt (kontroll) i 24 timer. Smittegruppene ble satt i kar med fisk og smittet i 21,1 ppt og kontrollgruppene smittet fisk i 34,2 ppt. Hvert enkelt datapunkt plottet som sirkler indikerer individuelle fisk for hver gruppe. Figuren er markert med horisontale linjer som viser gjennomsnittet for hver gruppe, og de vertikale linjene viser standardavvik. Statistisk signifikans er markert ved at antall stjerner representerer forskjellige nivåer av signifikans, der: * indikerer $p < 0,05$, ** indikerer $p < 0,01$ og *** indikerer $p < 0,001$. A: Antall opptelte Chalimus II lus per fisk. B: Antall opptelte Chalimus II lus basert på overflatearealet (cm^2) til hver fisk.

4.0 Diskusjon

I dette masterprosjektet er tre lab-stammer og en stamme hentet fra et oppdrettsanlegg benyttet for å undersøke brakkvannstoleranse hos lakselus kopepoditter. Tre ulike typer forsøk er utført. Observasjoner av kopepoditter fra de fire ulike stammene over en 24 timers periode der de ble inkubert i vann med ulik salinitet indikerer at luselarvene øker aktiviteten etter en tilpasningsperiode ned til en saltholdighet på 21,1 ppt. Tre gener som sannsynligvis er involvert i osmoregulering ble oppregulert i alle de fire lusestammene seks timer etter eksponering for 21,1 ppt brakkvann. For to av lab-stammene var det også en oppregulering av *LsHSP70* etter eksponering i 21,1 ppt brakkvann. To ulike typer smitteforsøk ble gjennomført og de viste blant annet at kopepoditter fra alle de fire stammene var i stand til å smitte laks ved saltholdighet på 21,1 ppt.

4.1 Frittlevende kopepoditter fra alle stammer tilpasser seg til en viss grad brakkvann etter 24 timer

Tidligere studier har vist redusert overlevelse og aktivitet hos kopepoditter i brakkvann sammenlignet med sjøvann. Ved korttidsinkuberinger gjennomført av Bricknell *et al.* (2006) ble det blant annet funnet at overlevelsen til kopepoditter ble redusert med 50 % etter åtte timer i 23 ppt og seks timer i 19 ppt. Ikke alle studier har fått resultater som samsvarer med disse funnene til Bricknell *et al.* (2006). Sievers *et al.* (2019) gjentok det eksperimentelle designet til Bricknell *et al.* (2006), og resultatene viste at kopepodittene hadde høyere brakkvannstoleranse enn i 2006 i alle testede saliniteter. Mulige årsaker var at kopepodittene var mer tolerante på grunn av større fenotypisk plastisitet, økt toleranse for redusert salinitet med årene (kanskje som et resultat av ferskvannsbehandling) og/eller ulikheter i forsøksmodellen (Sievers *et al.*, 2019). Studier av Andrews og Horsberg, (2020) viste redusert overlevelse hos brakkvannsinkuberte kopepoditter fra fire forskjellige geografiske stammer, men toleransen var likevel høyere enn i tidligere studier. I tillegg fant de signifikante forskjeller i toleranse mellom stammene som de brukte. Den minst tolerante stammen hadde EC_{50} på 17,5 ppt etter 24 timer, som er høyere toleranse enn funnene til Bricknell *et al.* (2006). Forsøk av Bergaas, (2023) viste også at en gruppe med kopepoditter fra *LsGulen* (lab-stamme) overlevde en 24 timers inkubering i brakkvann med 14 ppt. Dette indikerer at kopepodittene som har blitt benyttet til studier i senere tid tåler hyposalint sjøvann i større grad enn de som ble benyttet i 2006. På bakgrunn av dette ble det utført forsøk der aktiviteten til frittlevende kopepoditter fra labstammene *LsGulen* (også benyttet av Bergaas, (2023)), *LsAlta*, *LsOslofjorden* og feltstammen *LsBjørnafjorden* ble målt i ulike saliniteter på ulike tidspunkter. Årsaken til at

aktiviteten hovedsakelig ble målt var for å kartlegge om inkubasjonstiden kunne være en faktor for kopepodittenes infektive evne ved senere smitteforsøk.

I dette eksperimentet ble kopepoditter fra de fire stammene observert etter 2, 4, 6 og 24 timer i seks ulike saliniteter (34,2 ppt, 21,1 ppt, 18 ppt, 15 ppt, 13,8 ppt og 10 ppt). Observasjonene viste generelt mindre aktive kopepoditter ved lavere saliniteter. Etter 24 timer ble det observert en tydelig økning i aktiviteten til kopepoditter inkubert i 21,1 ppt fra alle stammene sammenlignet med de tidligere tidspunktene. Det ble også funnet høyere aktivitet blant kopepodittene fra feltstammen (*LsBjørnafjorden*) som var inkubert i 18 og 15 ppt enn de øvrige labstammene. Denne stammen har tidligere vært gjennom avlusning med ferskvann, som kanskje kan ha gjort den mer motstandsdyktig mot eksponering for lavere saliniteter. Saltholdighet er en viktig miljøfaktor, og ved gjentatt eksponering for vann med lav salinitet kan man få en seleksjon som fører til at lusepopulasjoner utvikler økt toleranse mot brakkevann og ferskvann. En slik retningsbestemt seleksjon vil være til stor fordel for lusens evne til å overleve og reprodusere. Årsaken til økningen av medikamentfrie behandlinger fremfor behandlinger med medikamenter er at en slik resistensutvikling allerede er oppdaget mot en rekke medikamenter (Aaen *et al.*, 2015; Helgesen *et al.*, 2022; Aldrin *et al.*, 2023). Det er derfor mulig at en tilsvarende økt toleranse kan utvikle seg mot hyposalint sjøvann.

En overraskende observasjon var at kopepodittene i kontrollen fra to av stammene viste et tydelig lavere aktivitetsnivå enn de to andre stammene ved å legge seg lavere i vannsøylen. *LsAlta*-kopepodittene hadde en klar nedgang i aktivitet fra første (2t) til andre observasjon (4t), og denne trenden vedvarte til en viss grad helt til siste observasjon. *LsGulen* hadde også et lavere aktivitetsnivå enn *LsBjørnafjorden* og *LsOslofjorden* i sjøvann under hele observasjonsperioden. Stammevariasjoner kan være en mulig forklaring på forskjellen, men spesielt *LsGulen* har vært i lab i mange år og burde vært tilpasset forholdene i lab i stor grad. Denne stammen har vært en lab-stamme i flere år før ferskvann ble tatt i bruk som avlusningsmetode, og ingen seleksjon er gjort etter dette.

Det er også noen mulige svakheter med forsøksmodellen. Observasjonstiden per rør var på ca. ett minutt, og ved lengre observasjonstid kan det hende at variasjonen mellom stammene hadde blitt jevnet ut. En annen mulighet hadde vært å gjennomføre et pilotforsøk der kopepoditter fra alle stammene ble inkubert i fullt sjøvann, og deretter observert i et tilsvarende tidsrom for å avklare eventuelle forskjeller før gjennomføring av selve eksperimentet. Hvert eksperiment inneholdt tre replikater med 10 kopepoditter i hvert rør, som ga totalt 30 kopepoditter per salinitet for hver stamme. Det ble gjort en feil når observasjonene ble registrert der det kun var

antall aktive kopepoditter av totalantallet (30) som ble registrert. Det vil si at det ikke foreligger data fra hvert enkelt replikat, og det finnes dermed ikke datagrunnlag for å beregne standardavvik og andre statistiske analyser mellom stammene. Dette betyr at resultatene kun kan fungere som en indikasjon på kopepodittenes aktivitetsnivå på de forskjellige tidspunktene.

Funnene samsvarer godt med resultatene fra tidligere studier av Andrews og Horsberg, (2020) og Bergaas, (2023), der det ble funnet høyere toleranse for brakkvann blant kopepoditter enn det som ble observert av Bricknell *et al.* (2006). Det ble i likhet med førstnevnte studie funnet variasjoner mellom stammene i dette forsøket, men siden atferdsforskjellen var stor også i sjøvann er det usikkert om stammevariasjoner i toleranse av hyposalint sjøvann var hovedårsaken til all variasjonen i dette forsøket. Det er mulig at en eller flere av de nevnte feilene (avsnittet over) med forsøket har hatt effekt på resultatene. Alle stammene viste imidlertid en klar økning i aktivitet for kopepodittene som ble inkubert i 21,1 ppt, noe som peker på en reell effekt og tilpasning til endringen i saltholdighet. Dette indikerer at kopepodittene har tilpasset seg til det nye miljøet ved osmoregulering, og for *LsBjørnafjorden* viser resultatene (med forbehold om nevnte feil) at også kopepodittene i vann ned til 15 ppt er i stand til å osmoregulere etter 24 timer.

4.2 Genuttrykkene for *LsP5CR*, *LsP5CS*, *LsHSP70* og *LsK⁺-kanal* øker hos kopepoditter fra alle stammer i brakkvann

Tidligere studier har vist at eksponering av lakselus for vann med lavere salinitet enn fullt sjøvann (spesielt under 27 ppt) fører til en kraftig oppregulering av genuttrykket til flere gener (Sutherland *et al.*, 2012; Borchel *et al.*, 2018; Borchel *et al.*, 2021; Bergaas, 2023). På bakgrunn av disse studiene ble genuttrykkene for *LsP5CR*, *LsP5CS*, *LsHSP70* og *LsK⁺-kanal* (EMLSAG00000005790) målt etter en korttidsinkubasjon (6 timer) av kopepoditter fra alle de fire stammene i brakkvann (21,1 ppt). Årsaken til at 21,1 ppt ble benyttet i dette studiet er at det i tidligere forsøk er funnet at kopepoditter som er inkubert i denne saliniteten i 24 timer fremdeles er aktive, samtidig som at genuttrykkene for blant andre *LsP5CR* og *LsP5CS* tydelig oppreguleres (Bergaas, 2023).

Det ble i dette forsøket funnet signifikante oppreguleringer for *LsP5CR* og *LsP5CS* i brakkvann hos alle de fire stammene. Dette er gener som koder for enzymer involvert i prolinsyntesen (Fichman *et al.*, 2015), og som også har vist oppregulering i lav salinitet i tidligere studier (Borchel *et al.*, 2021). *LsP5CS*-genet er også funnet oppregulert av Sutherland *et al.* (2012). Oppreguleringen er en indikasjon på at prolin kan fungere som en osmolytt i osmoreguleringen

til lakselus. Det er tidligere vist at mengden prolin endres som en respons på salinitetsendringer i bakterier, planter og noen invertebrater (Fichman *et al.*, 2015). Vanligvis er det for de fleste av disse artene funnet en økning av prolin ved økt salinitet. Et eksempel er at det ble funnet nesten fire ganger så høyt prolininnhold i 75 % sjøvann som i 50 % sjøvann i kopepoden *Tigriopus californicus* innen 3 dager ved forsøk der den ble flyttet mellom de to salinitetene (Burton, 1991). Derfor var det overraskende at det i et annet studie ble funnet oppregulering av *P5CS* og *P5CR* hos denne arten i lav salinitet, men ikke i høy salinitet (DeBiasse *et al.*, 2018). Det som er overraskende med funnet er at en økning i transkripsjonen av gener som syntetiserer prolin burde ha ført til høyere mengder prolin, mens studiet indikerer det motsatte. Det samme virker å være tilfellet for lakselus. Resultater (blant annet fra denne oppgaven) viser en oppregulering i transkripsjonen av *LsP5CS* og *LsP5CR* i brakkvann sammenlignet med sjøvann, mens det tidligere er vist reduserte konsentrasjoner av prolin i cephalotorax hos voksne lakselus festet på fisk i lavere saliniteter (Hahnenkamp og Fyhn, 1985). Mekanismen som er årsaken til dette er ikke kjent, men en mulig forklaring kan være at lusene produserer en økt mengde prolin i lave saliniteter for så å sekretere den fra cellene og inn i hemolymfen (Borchel *et al.*, 2021). Dette vil øke osmolariteten i hemolymfen, og dermed redusere forskjellen i intra- og ekstracellulær osmolaritet. Denne mekanismen har tidligere blitt foreslått for brakkvannsrur (*Balanus improvisus*) som tåler lavere saliniteter bedre enn andre rankefotinger (Sundell *et al.*, 2019). Det er så langt vi vet ikke gjort studier på prolinnivået i hemolymfen hos lakselus i ulike saliniteter. Ettersom overlevelsen til kopepoditter ikke ble påvirket av en RNAi-mediert knock-down av *LsP5CR*, *LsP5CS* og *LsTAT* tyder det på at økt transkripsjon av prolinsyntesegener ikke er nødvendig for at lusene skal osmoregulere og overleve i brakkvann (Bergaas, 2023).

For varmesjokkproteinet *LsHSP70* ble det i dette studiet oppdaget signifikant oppregulering hos to av de fire stammene (*LsAlta* og *LsGulen*) etter inkubasjon i brakkvann (21,1 ppt) i seks timer. Varmesjokkproteiner er involvert i refolding av misfoldete og denaturerte proteiner, og i tillegg til å bli produsert ved varmesjokk er det også vist at osmotisk stress er en stressfaktor som øker produksjonen av slike proteiner. Dette kan fungere begge veier. For eksempel fører redusert salinitet til høyere genuttrykk av *HSP70* hos amerikansk hummer (*Homarus americanus*) (Spees *et al.*, 2002), mens økt salinitet fører til det samme hos krabbarten *Scylla paramamosain* (Yang *et al.*, 2013). Varmesjokkproteinene i lakselus er tidligere karakterisert (Borchel *et al.*, 2018), og det er også vist en oppregulering av varmesjokkproteiner hos kopepoditter i brakkvann (25-26 ppt) (Sutherland *et al.*, 2012). I forsøket til Sutherland *et al.* (2012) ble det blant annet funnet at *LsHSP70* ble uttrykt 8 ganger høyere i brakkvann (25 ppt)

enn i sjøvann. Forsøk er også gjort på adult lus av Borchel *et al.* (2018), men her ble det bare funnet oppregulering i ferskvann og ikke brakkvann. Dette kan trolig forklares med at frittsvømmende kopepoditter har lavere toleranse for brakkvann enn adult lus, og at det dermed induseres en større stressrespons hos kopepoditter. I denne oppgaven ble det kun funnet signifikant oppregulering for to av de fire stammene. Feltstammen *LsBjørnafjorden* er en av stammene det ikke ble funnet en signifikant oppregulering av *LsHSP70*, men siden én av de fire prøvene fra denne stammen var kontaminert og derfor ikke tatt med legges det noe mindre vekt på dette resultatet. Årsaken er at verdien til den fjerde prøven er ukjent, og den kunne både ha endret den gjennomsnittlige oppreguleringen til å bli signifikant, uendret eller gjort den lavere. *LsOslofjorden* fikk heller ikke signifikant oppregulering, og dette kan tyde på stammevariasjoner i kopepodittenes stressrespons. Siden *LsHSP70* er et stressprotein kan det tyde på at hyposalint sjøvann stresser kopepodittene fra de fire stammene i ulik grad. Det ble ikke gjort funn i atferdsekperimentet eller i smitteforsøkene som tyder på at forskjellene i genuttrykk av *LsHSP70* i brakkvann har hatt målbar effekt på kopepodittenes aktivitetsnivå eller evne til å smitte fisk. Brakkvannsinkubasjonen før måling av genuttrykk varte i seks timer, mens inkubasjonen før smitteforsøkene var på 24 timer. Det kan derfor ikke utelukkes at en hadde gjort funn som kunne knyttet dem sammen dersom inkubasjonstiden var lik i begge forsøk.

For *LsK⁺-kanal* ble det i denne oppgaven funnet signifikant oppregulering hos alle stammer når de ble eksponert for brakkvann. Dette er en innoverrettet K^+ kanal, og det er tidligere vist at slike kanaler reguleres hos ål ved endringer i salinitet (Suzuki *et al.*, 1999). I ål er det funnet høyere mRNA-nivåer av K^+ -kanaler i sjøvann enn i brakkvann. I motsetning til dette viser resultatene fra denne oppgaven (figur 10D) oppregulering i brakkvann, som er i samsvar med tidligere funn av Borchel *et al.* (2021). Resultatene viser også at denne kaliumkanalen er involvert i responsen på hyposalint sjøvann hos alle de fire stammene. Det er tidligere vist at forskjellige transportkanaler (blant annet for aminosyrer og kalsium) kan gi både ned- og oppregulering ved å eksponere kopepoditter for hyposalint sjøvann (Sutherland *et al.*, 2012). Hos adult lakselus er det også vist at ulike kanaler kan både oppreguleres og nedreguleres ved lav salinitet, og trolig er dette fordi kanalene transporterer ulike aminosyrer (Borchel *et al.*, 2021). For å få en mer komplett forståelse av hvilken funksjon forskjellige ionekanaler har i osmoreguleringen til lakselus trengs videre forskning. Resultatene fra denne oppgaven bekrefter at den innoverrettede ionekanal *LsK⁺-kanal* (EMLSAG00000005790) oppreguleres

signifikant hos fritt svømmende kopepoditter i brakkvann, som samsvarer med det Borchel *et al.* (2021) fant i sine studier på adult lakselus.

Ekperimentet i denne oppgaven viste at kopepoditter fra alle stammene hadde en tydelig transkripsjonsøkning for de testede genene etter seks timer, noe som samsvarer med funn fra tidligere studier (Bergaas, 2023; Borchel *et al.*, 2018; Sutherland *et al.*, 2012). Unntaket var for *LsHSP70* der kun to av stammene ga signifikant oppregulering, som muligens kan forklares av variasjoner i lusestammens stressrespons. En annen observasjon er at *LsAlta* for alle gener hadde en større spredning mellom replikatene enn de øvrige stammene, spesielt for testgruppene der de laveste verdiene overlapper verdiene til de andre stammene. Et interessant funn er at prøven som har gitt den høyeste oppreguleringen er den samme for alle de fire genene, og prøven som har hatt den laveste oppreguleringen har også det for alle genene. De fire prøvene som er benyttet fra *LsAlta* (og de øvrige stammene) kommer fra åtte ulike eggstrenger (to eggstrenger per prøve) og er ikke blandet. Den store spredningen mellom prøvene, samtidig som at referansegenene var stabile for alle prøver indikerer at kopepodittene fra de forskjellige eggstrengene, altså de ulike familiene har hatt ulike transkripsjonsnivåer i brakkvann. Denne spredningen finnes ikke i kontrollen. Dette kan bety at det innad i *LsAlta* finnes individuelle variasjoner i hvordan fritt svømmende kopepoditter responderer på brakkvann når det gjelder genuttrykk for alle de testede genene (*LsP5CR*, *LsP5CS*, *LsHSP70* og *LsK⁺-kanal*).

4.3 Effekt av brakkvann på smitte hos lakselus kopepoditter

Det er tidligere både i denne oppgaven og av (Bergaas, 2023) vist at lakselus kopepoditter overlever eksponering for 21,1 ppt brakkvann i minst 24 timer. To smitteforsøk ble derfor gjennomført for å se hvordan den reduserte saliniteten (21,1 ppt) påvirket den infektive evnen til lakselus kopepoditter. Ved å benytte kopepoditter fra fire ulike stammer får man også testet i hvor stor grad dette er en mer generell eller en eventuell stammespesifikk egenskap. I første forsøk ble kopepodittene inkubert i 24 timer ved 21,1 ppt og smittet i fullt sjøvann, mens man i det andre forsøket smittet pre-inkuberte kopepoditter i 21,1 ppt brakkvann. I begge forsøkene ble det benyttet en kontrollgruppe som kun var eksponert for fullt sjøvann.

I det første forsøket der kopepoditter fra *LsAlta*, *LsBjørnafjorden*, *LsGulen* og *LsOslofjorden* ble inkubert i brakkvann og brukt til å smitte laks i sjøvann ble det ikke funnet en signifikant reduksjon i antall kopepoditter som klarte å smitte fisken og overleve frem til chalimus II (sammenlignet med kontrollen). I det andre forsøket der de pre-inkuberte kopepodittene smittet i brakkvann (21,1 ppt) klarte alle de fire stammene å smitte fisk og overleve til chalimus II. Det

ble funnet signifikant reduksjon i antall chalimus II som ble talt opp per fisk hos to av stammene.

De to forsøkene ble ikke gjennomført på lik måte, og er derfor ikke sammenlignbare. For å få et bedre grunnlag for sammenligning burde de to forsøkene helst blitt gjennomført likt, men det var ikke praktisk mulig. Logistikk i forhold til tilgjengelighet på kar og kopepoditter var hovedårsaken til dette. Det var ikke nok tilgjengelige kar til å teste flere paralleller samtidig i de to forsøkene, som hadde gitt et sterkere kvantitativt grunnlag for å måle smittesuksess og se etter variasjon blant stammene. Smitteforsøkene i brakkvann kunne heller ikke gjennomføres i enkeltkar på grunn av utfordringer med å holde saliniteten stabil. Det måtte derfor benyttes to ulike oppsett, et med enkeltkar og et med større kar med flere fisk. At den infektive evnen til de fire stammene ikke ble redusert signifikant i det første forsøket i sjøvann er det ingen tvil om, men forsøksmodellen har gjort det vanskelig å sammenligne mellom stammene. I forsøket med *LsBjørnafjorden* ble 400 kopepoditter satt ut i ett kar med fire fisk istedenfor enkeltkar med 100 kopepoditter på én fisk, og utgangspunktet var derfor helt annerledes. Forsøksmodellen med enkeltkar der vannet fra det øverste karet går ned til karet i midten, for så å gå videre til det nederste karet gir også en usikkerhet knyttet til resultatene. Dersom oppsettet hadde vært likt for alle stammene ville det gitt sammenlignbare resultater, men replikatene til stammene ble ulike. For å redusere graden av tilfeldige effekter kunne man benyttet flere kar med fisk, men dette var som nevnt ikke mulig i dette studiet. Resultatet av forsøket (figur 11) viser en stor spredning mellom replikatene. Spesielt for *LsOslofjorden* (begge grupper) er det tydelig at fisken i det nederste karet ble smittet med flest lus, mens fisken i det øverste karet hadde minst. I forsøket med *LsGulen* var det fisken i det midterste karet som fikk størst påslag av lus. Denne trenden ble ikke observert hos *LsAlta*, der antallet lus var jevnere fordelt på de tre karene. Forsøkene med disse tre stammene ble gjennomført likt, og det hadde derfor vært naturlig at en lignende trend ble observert også med *LsAlta*. Det kan derfor se ut som at andre, ukjente effekter har vært sterkere. En mulig årsak er individuelle forskjeller i fiskens atferd. En aktiv fisk kommer muligens i kontakt med flere kopepoditter enn en som er mer stillestående, og vil dermed kanskje få større påslag av lus. Det ble ikke gjort observasjoner av fiskens aktivitet i karene underveis i smitteprosessen, men før hvert forsøk ble hver fisk gitt like lang akklimatiseringstid i karene.

I det andre forsøket der kopepoditter ble inkubert i brakkvann (21,1 ppt) og benyttet i smitteforsøk på laks i brakkvann (21,1 ppt) klarte alle de fire stammene å smitte fisk og overleve til chalimus II. I dette forsøket var gjennomføringen lik for alle de fire stammene, og det er

derfor bedre forutsetninger for sammenligning. Likevel er smittesuksess vanskelig å måle, og det må tas sterke forbehold. Forsøkene i dette studiet har gitt noen kvalitativt gode resultater, men det er vanskelig å måle smittesuksessen uten flere fisk og flere paralleller for de ulike stammene. Ved å benytte få kar og få grupper med kopepoditter i hvert forsøk øker sjansen for at tilfeldige effekter påvirker resultatene. Slike effekter kan være ulikheter i miljøforholdene i hvert enkelt kar, forskjeller mellom fiskeindividene (for eksempel adferdsforskjeller) eller andre ukjente effekter.

Resultatene fra smittforsøket i fullt sjøvann samsvarer ikke med Bricknell *et al.* (2006). sine funn. Etter en 3 timers inkubasjon i 26 ppt ble smitten redusert til 45 % av det den var etter tilsvarende inkubasjon i fullt sjøvann (34 ppt). I studiet til Bricknell *et al.* (2006) ble selve smitteprosessen på fisk gjennomført i tilsvarende salinitet som pre-inkubasjonen, før saliniteten ble skrudd opp mot fullt sjøvann igjen etter 3 timer. På grunn av ulik salinitet og pre-inkubasjon er forsøket i denne oppgaven ikke direkte sammenlignbart med Bricknell *et al.* (2006). Det er likevel av interesse at overlevelsen til fritt svømmende kopepoditter ble redusert med 50 % etter inkubering i 23 ppt i 8 timer (Bricknell *et al.*, 2006), mens kopepodittene fra alle de fire stammene i dette studiet overlevde en inkubasjon i 24 timer i 21,1 ppt, samtidig som at smitten ikke ble signifikant redusert sammenlignet med kontrollgruppene. Dette underbygger funnene til Bergaas (2023), som heller ikke fant en signifikant reduksjon i smitte ved samme forsøksmodell. Her ble riktignok også *LsGulen* benyttet som eneste stamme. En mulig årsak til at det ikke ble funnet en signifikant reduksjon i kopepodittenes infektive evne (i motsetning til (Bricknell *et al.*, 2006)) er at lusen med tiden har bygget opp en høyere toleranse for hyposalint sjøvann, og at de derfor har blitt mer robust enn de var for en del år tilbake. Dette argumentet kan bare brukes om feltstammen *LsBjørnafjorden* og *LsAlta* (labstamme siden 2013). *LsGulen* og *LsOslofjorden* har vært i lab siden 2006 uten at det har vært en seleksjon for lavere saliniteter, som gjør dette scenariet mindre relevant for dem. En mulighet er at stammene som har blitt avlet på lab over tid har fått bedre forutsetninger for å lykkes i labforsøk sammenlignet med ville stammer. En annen mulig årsak kan ligge i selve forsøksmodellen. I studiet til (Bricknell *et al.*, 2006) ble kopepodittene kun pre-inkubert i tre timer før smitte, mens de i dette studiet ble pre-inkubert i 24 timer. Av resultatene fra atferdseksperimentet (seksjon 3.1) ble det observert at det totalt sett var flere aktive kopepoditter etter inkubasjon i 21,1 ppt i 24 timer sammenlignet med etter to og fire timer. Dette kan som nevnt (seksjon 4.1) indikere at kopepodittene etter 24 timer har fått tid til å tilpasse seg saliniteten, og at den infektive evnen kanskje hadde blitt redusert i større grad ved en kortere inkubasjon. Det er derfor mulig at det

kunne oppstått signifikante forskjeller i dette forsøket dersom pre-inkubasjonen hadde vært kortere enn 24 timer. Ved å måle genuttrykk over tid viste Bergaas (2023) at uttrykkene for prolinsyntesegenene *LsTAT*, *LsP5CS* og *LsP5CR* økte betraktelig i brakkvann (21,1 ppt) de første 6-9 timene avhengig av hvilket gen, før uttrykkene for alle tre genene deretter ble redusert. Etter 24 timer var genuttrykkene nede igjen på omtrent samme nivå som i sjøvann, som kan tyde på at det har skjedd en tilpasning som senker transkripsjonsnivået til noen gener.

Som nevnt klarte alle de fire stammene å smitte fisk og overleve til chalimus II i det andre smitteforsøket i brakkvann. Hvis en sammenligner med tidligere studier av Bricknell *et al.* (2006) der kun 50 % av kopepodittene overlevde inkubering i 23 ppt i åtte timer er resultatene overraskende. For å kunne overleve 24 timer i 21,1 ppt, infisere fisk og deretter utvikles til chalimus II kreves en tydelig høyere toleranse for brakkvann enn kopepodittene fra studiet i 2006 hadde. I smitteforsøk gjennomført av Bricknell *et al.* (2006) ble det også funnet signifikant reduksjon i smittesuksess i 26 ppt (55 % reduksjon fra 34 ppt) etter en pre-inkubasjon i 26 ppt i tre timer. Dette understøtter at kopepodittene benyttet i denne oppgaven har høyere brakkvannstoleranse enn de Bricknell *et al.* (2006) brukte. En annen faktor som kan ha påvirket resultatene er pre-inkubasjonen. Forsøksmodellen til Bricknell *et al.* (2006) er relativt lik som modellen brukt i denne oppgaven, men en viktig forskjell er at pre-inkubasjonen til Bricknell *et al.* (2006) varte i tre timer, mot 24 timer i dette studiet.

Resultatene fra denne oppgaven samsvarer bedre med senere studier (Andrews og Horsberg, 2020; Bergaas, 2023; Sievers *et al.*, 2019), som alle beskriver større toleranse for hyposalint sjøvann enn blant andre Bricknell *et al.* (2006). Riktignok ble det funnet signifikant reduksjon i antall chalimus II som ble talt opp per fisk sammenlignet med kontrollen hos to av stammene. En mulig årsak til dette er at stammene har ulik toleranse for hyposalint sjøvann. Studier har vist eksempler på at stammevariasjoner har oppstått hos marine kopepoder. Det er for eksempel funnet egne populasjoner av hoppekrepsene *Acartia tonsa* og *Oithona davisae* som har tilpasset seg i estuarier med lav salinitet (Gubanova *et al.*, 2014). I tillegg har kopepoden *Eurytemora affinis* gått fra å være en marin art til å leve i ferskvannshabitat (Lee *et al.*, 2012), noe som viser at det er mulig å øke evnen til osmoregulering. Når det gjelder lakseluscopepoditter fant et annet studie signifikante forskjeller på overlevelsen til forskjellige genetiske stammer i brakkvann, som indikerte genetisk variasjon for brakkvannstoleranse (Ljungfeldt *et al.*, 2017). Signifikant forskjell er også funnet på overlevelsen i brakkvann til kopepoditter fra ulike geografiske stammer (Andrews og Horsberg, 2020). Når det finnes eksempler på variasjon i

overlevelse i brakkvann mellom stammer, er det ikke usannsynlig at slike variasjoner kan forekomme også for kopepodittenes infektive evne.

5.0 Konklusjon

Målet med dette masterprosjektet var å studere brakkvannstoleransen til kopepoditter fra ulike stammer, og undersøke om det var variasjon. De ulike eksperimentene har vist at kopepoditter fra alle de fire stammene *LsAlta*, *LsBjørnafjorden*, *LsGulen* og *LsOslofjorden* overlever inkubering i 24 timer ned til 10 ppt, men at aktiviteten avtar merkbart under 18 ppt. Kopepoditter som ble inkubert i 21,1 ppt klarte uavhengig av stamme å oppjustere aktivitetsnivået sitt etter 24 timer, noe som indikerer at de på et døgn klarer å osmoregulere og tilpasse seg brakkvann. Det ble også vist at transkripsjonen av *LsP5CR*, *LsP5CS* og *LsK⁺-kanal* øker signifikant hos alle stammer i brakkvann sammenlignet med sjøvann. Transkripsjonen av *LsHSP70* var kun signifikant oppregulert i brakkvann hos to av stammene, og det kan indikere at brakkvann gir ulik stressrespons hos kopepoditter fra forskjellige stammer. Videre viste smitteforsøkene at kopepoditter som ble pre-inkubert i 21,1 ppt i 24 timer bevarte sin smitteevne både ved smitte i fullt sjøvann (34,2 ppt) og i brakkvann (21,1 ppt). Smitteforsøket i sjøvann viste ingen signifikant reduksjon i smittesuksess hos noen av stammene sammenlignet med kontrollen. Resultatene viser dermed at pre-inkubasjon i brakkvann i ett døgn ikke reduserer kopepodittenes smittesuksess i sjøvann. Det kan også konkluderes med at kopepoditter beholder sin infektive evne i brakkvann etter pre-inkubasjon i 21,1 ppt i ett døgn, da alle stammer klarte å smitte fisk i denne saliniteten. I brakkvann ble det funnet signifikant reduksjon i smittesuksess hos to av stammene, som tyder på varierende toleranse for hyposalint sjøvann mellom stammene som ble benyttet i studiet.

Forskningshypotesen (H_1) kan delvis bekreftes. Kopepoditter bevarer sin infektive evne i brakkvann (21,1 ppt) etter pre-inkubasjon i brakkvann, men basert på dette studiet kan en ikke slå fast at stammevariasjoner påvirker brakkvannstoleransen signifikant.

5.1 Videre studier

Det finnes grunn til å tro at lakselus kan utvikle toleranse mot en miljøfaktor som lav salinitet på samme måte som den har blitt resistent mot en rekke legemidler. Oppdrettsnæringen bør derfor følge Mattilsynets anbefalinger om å utføre regelmessige tester på lakselusens følsomhet på ferskvann, og ytterligere forskning på lakselusens toleranse for ferskvann er viktig.

Videre vil det være interessant å utføre smitteforsøk med kopepoditter i brakkvann med lavere saliniteter enn 21,1 ppt for å fortsette arbeidet med å kartlegge lusens toleranse for brakkvann.

Forsøk med kortere pre-inkubasjonstider for å undersøke kopepodittenes evne til osmoregulering, og om den påvirker infeksjonsevnen vil også være av interesse. Det bør hentes inn og benyttes flere lusestammer til diverse salinitetsforsøk. Dette kan bidra til å få klarhet i omfanget av stammevariasjoner i brakkvannstoleranse, og noen av disse stammene bør tidligere ha vært gjennom behandlinger med ferskvann for å undersøke effekten behandlingene har for toleransen.

6.0 Referanser

- Aaen, S.M., Helgesen, K.O., Bakke, M.J., Kaur, K., Horsberg, T.E., 2015. Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture. *Trends in Parasitology* 31, 72–81.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.006>
- Aldrin, M., Huseby, R.B., Stige, L.C., Helgesen, K.O., 2023. Estimated effectiveness of treatments against salmon lice in marine salmonid farming. *Aquaculture* 575, 739749.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739749>
- Andrews, M., Horsberg, T.E., 2020. Sensitivity towards low salinity determined by bioassay in the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Aquaculture* 514, 734511. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734511>
- Artsdatabanken - *Lepeophtheirus salmonis* [WWW Document], n.d. . Artsdatabanken. URL https://artsdatabanken.no/taxon/_/16071 (accessed 3.1.24).
- Benjamin, I.J., McMillan, D.R., 1998. Stress (Heat Shock) Proteins: Molecular Chaperones in Cardiovascular Biology and Disease. *Circulation Research* 83, 117–132.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.83.2.117>
- Bergaas, A., 2023. Prolin sin rolle i osmoregulering hos lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) (Masteroppgave). University of Bergen, Bergen.
- Birkeland, K., 1996. Consequences of premature return by sea trout (*Salmo trutta*) infested with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer): migration, growth, and mortality. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 2808–2813. <https://doi.org/10.1139/f96-231>
- Borchel, A., Eichner, C., Øvergård, A.-C., 2023. Mining *Lepeophtheirus salmonis* RNA-Seq data for qPCR reference genes and their application in *Caligus elongatus*. *Experimental Parasitology* 248, 108511.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108511>
- Borchel, A., Hegglund, E.I., Nilsen, F., 2021. The transcriptomic response of adult salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) to reduced salinity. 100778.
<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2020.100778>

- Borchel, A., Komisarczuk, A.Z., Rebl, A., Goldammer, T., Nilsen, F., 2018. Systematic identification and characterization of stress-inducible heat shock proteins (HSPs) in the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*). *Cell Stress and Chaperones* 23, 127–139. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0830-9>
- Brandal, P., Egidins, E., Romslo, I., 1976. Host blood: a major food component for the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis* Kroyeri, 1838 (Crustacea: *Caligidae*).
- Bricknell, I.R., Dalesman, S.J., O’Shea, B., Pert, C.C., Luntz, A.J.M., 2006. Effect of environmental salinity on sea lice *Lepeophtheirus salmonis* settlement success. *Diseases of Aquatic Organisms* 71, 201–212. <https://doi.org/10.3354/dao071201>
- Bron, J.E., Sommerville, C., Jones, M., Rae, G.H., 1991. The settlement and attachment of early stages of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: *Caligidae*) on the salmon host, *Salmo salar*. *Journal of Zoology* 224, 201–212. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1991.tb04799.x>
- Burton, R.S., 1991. Regulation of proline synthesis during osmotic stress in the copepod *Tigriopus californicus*. *Journal of Experimental Zoology* 259, 166–173. <https://doi.org/10.1002/jez.1402590204>
- Costello, M.J., 2006. Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends in Parasitology* 22, 475–483. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.006>
- Dalvin, S., Are Hamre, L., Skern-Mauritzen, R., Vågseth, T., Stien, L., Oppedal, F., Bui, S., 2020. The effect of temperature on ability of *Lepeophtheirus salmonis* to infect and persist on Atlantic salmon. *Journal of Fish Diseases* 43, 1519–1529. <https://doi.org/10.1111/jfd.13253>
- DeBiasse, M.B., Kawji, Y., Kelly, M.W., 2018. Phenotypic and transcriptomic responses to salinity stress across genetically and geographically divergent *Tigriopus californicus* populations. *Molecular Ecology* 27, 1621–1632. <https://doi.org/10.1111/mec.14547>
- Eichner, C., Hamre, L.A., Nilsen, F., 2015. Instar growth and molt increments in *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: *Caligidae*) chalimus larvae. *Parasitology International* 64, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.10.006>
- Eisenhauer, L., Solvang, T., Alver, M., Franklin Krause, D., Hagemann, A., 2020. Dispersal of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer, 1837) egg strings from open-cage salmon farming: A neglected source for infestation dynamics. *Aquaculture research* 51, 4595–4601. <https://doi.org/10.1111/are.14805>
- Fichman, Y., Gerdes, S.Y., Kovács, H., Szabados, L., Zilberstein, A., Csonka, L.N., 2015. Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and

- transcriptional regulation. *Biological Reviews* 90, 1065–1099.
<https://doi.org/10.1111/brv.12146>
- Finstad, B., Bjørn, P.A., Grimnes, A., Hvidsten, N.A., 2000. Laboratory and field investigations of salmon lice [*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)] infestation on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts. *Aquaculture Research* 31, 795–803.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00511.x>
- Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg - Lovdata [WWW Document], n.d. URL <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2012-12-05-1140> (accessed 3.25.24).
- Forskrift om dyrehelse (dyrehelseforskriften) - Kapittel II. Utfyllende nasjonale bestemmelser for akvatiske dyr – listeføring og meldeplikt - Lovdata [WWW Document], n.d. URL https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2022-04-06-631/KAPITTEL_2#%C2%A77 (accessed 4.15.24).
- Forskrift om endring i forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg - Lovdata [WWW Document], n.d. URL <https://lovdata.no/dokument/LTI/forskrift/2017-03-06-275> (accessed 3.25.24).
- Forskrift om produksjonsområder for akvakultur av matfisk i sjø av laks, ørret og regnbueørret (produksjonsområdeforskriften) - Lovdata [WWW Document], n.d. URL <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2017-01-16-61> (accessed 4.29.24).
- Frederick, C., Brady, D.C., Bricknell, I., 2017. Landing strips: Model development for estimating body surface area of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 473, 299–302. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.026>
- Frost, P., Nilsen, F., 2003. Validation of reference genes for transcription profiling in the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis*, by quantitative real-time PCR. *Veterinary Parasitology* 118, 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.09.020>
- Gholami Zali, A., Ehsanzadeh, P., 2018. Exogenous proline improves osmoregulation, physiological functions, essential oil, and seed yield of fennel. *Industrial Crops and Products* 111, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.020>
- Gonzalez-Alanis, P., Wright, G.M., Johnson, S.C., Burka, J.F., 2001. Frontal Filament Morphogenesis in the Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis*. para 87, 561–574. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0561:FFMITS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0561:FFMITS]2.0.CO;2)
- Grimnes, A., Jakobsen, P. j., 1996. The physiological effects of salmon lice infection on post-smolt of Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 48, 1179–1194.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1996.tb01813.x>

- Gubanova, A., Altukhov, D., Stefanova, K., Arashkevich, E., Kamburska, L., Prusova, I., Svetlichny, L., Timofte, F., Uysal, Z., 2014. Species composition of Black Sea marine planktonic copepods. *Journal of Marine Systems, Assessing and modelling ecosystem changes in the Mediterranean and the Black Sea pelagic ecosystem - SESAME 135*, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2013.12.004>
- Hahnenkamp, L., Fyhn, H.J., 1985. The osmotic response of salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: *Caligidae*), during the transition from sea water to fresh water. *J Comp Physiol B* 155, 357–365. <https://doi.org/10.1007/BF00687479>
- Hamre, L.A., Bui, S., Oppedal, F., Skern-Mauritzen, R., Dalvin, S., 2019. Development of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* parasitic stages in temperatures ranging from 3 to 24°C. *Aquaculture Environment Interactions* 11, 429–443. <https://doi.org/10.3354/aei00320>
- Hamre, L.A., Eichner, C., Caipang, C.M.A., Dalvin, S.T., Bron, J.E., Nilsen, F., Boxshall, G., Skern-Mauritzen, R., 2013. The Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: *Caligidae*) Life Cycle Has Only Two Chalimus Stages. *PLOS ONE* 8, e73539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073539>
- Hamre, L.A., Glover, K.A., Nilsen, F., 2009. Establishment and characterisation of salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1837)) laboratory strains. *Parasitology International* 58, 451–460. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.08.009>
- Heggland, E.I., Dondrup, M., Nilsen, F., Eichner, C., 2020. Host gill attachment causes blood-feeding by the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) chalimus larvae and alters parasite development and transcriptome. *Parasites & Vectors* 13, 225. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04096-0>
- Helgesen, K.O. *et al.* (2022) ‘The surveillance programme for resistance in salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) in Norway 2022’. Surveillance program report. Veterinærinstituttet 2023. © Norwegian Veterinary Institute, copy permitted with citation
- Heuch, P.A., Nordhagen, J.R., Schram, T.A., 2000. Egg production in the salmon louse [*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)] in relation to origin and water temperature: Egg production in *L. salmonis* P A Heuch et al. *Aquaculture research* 31, 805–814. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00512.x>
- Howe, K.L., Contreras-Moreira, B., De Silva, N., Maslen, G., Akanni, W., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Barba, M., Bolser, D.M., Cambell, L., Carbajo, M., Chakiachvili, M., Christensen, M., Cummins, C., Cuzick, A., Davis, P., Fexova, S., Gall, A., George, N.,

- Gil, L., Gupta, P., Hammond-Kosack, K.E., Haskell, E., Hunt, S.E., Jaiswal, P., Janacek, S.H., Kersey, P.J., Langridge, N., Maheswari, U., Maurel, T., McDowall, M.D., Moore, B., Muffato, M., Naamati, G., Naithani, S., Olson, A., Papatheodorou, I., Patricio, M., Paulini, M., Pedro, H., Perry, E., Preece, J., Rosello, M., Russell, M., Sitnik, V., Staines, D.M., Stein, J., Tello-Ruiz, M.K., Trevanion, S.J., Urban, M., Wei, S., Ware, D., Williams, G., Yates, A.D., Flicek, P., 2020. Ensembl Genomes 2020—enabling non-vertebrate genomic research. *Nucleic Acids Research* 48, D689–D695. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz890>
- Johnson, S.C., Albright, L.J., 1991a. The developmental stages of *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837) (Copepoda: *Caligidae*). *Can. J. Zool.* 69, 929–950. <https://doi.org/10.1139/z91-138>
- Johnson, S.C., Albright, L.J., 1991b. Development, Growth, and Survival of *Lepeophtheirus Salmonis* (Copepoda: *Caligidae*) Under Laboratory Conditions. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 71, 425–436. <https://doi.org/10.1017/S0025315400051687>
- Jónsdóttir, H., Bron, J.E., Wootten, R., Turnbull, J.F., 1992. The histopathology associated with the pre-adult and adult stages of *Lepeophtheirus salmonis* on the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 15, 521–527. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1992.tb00684.x>
- Kabata, Z., 1974. Mouth and Mode of Feeding of *Caligidae* (Copepoda), Parasites of Fishes, as Determined by Light and Scanning Electron Microscopy. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 31, 1583–1588. <https://doi.org/10.1139/f74-199>
- Kristoffersen, A.B., Qviller, L., Helgesen, K.O., Vollset, K.W., Viljugrein, H., Jansen, P.A., 2018. Quantitative risk assessment of salmon louse-induced mortality of seaward-migrating post-smolt Atlantic salmon. *Epidemics* 23, 19–33. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2017.11.001>
- Krkošek, M., Revie, C.W., Gargan, P.G., Skilbrei, O.T., Finstad, B., Todd, C.D., 2013. Impact of parasites on salmon recruitment in the Northeast Atlantic Ocean. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280, 20122359. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2359>
- Kültz, D., 2015. Physiological mechanisms used by fish to cope with salinity stress. *Journal of Experimental Biology* 218, 1907–1914. <https://doi.org/10.1242/jeb.118695>

- Lee, C.E., Kiergaard, M., Gelembiuk, G.W., Eads, B.D., Posavi, M., 2011. Pumping ions: Rapid parallel evolution of ionic regulation following habitat invasions. *Evolution* 65, 2229–2244. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01308.x>
- Lee, C.E., Posavi, M., Charmantier, G., 2012. Rapid evolution of body fluid regulation following independent invasions into freshwater habitats. *J Evol Biol* 25, 625–633. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02459.x>
- Lignot, J.-H., Guy, C., 2015. Osmoregulation and Excretion. pp. 249–284.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ljungfeldt, L.E.R., Quintela, M., Besnier, F., Nilsen, F., Glover, K.A., 2017. A pedigree-based experiment reveals variation in salinity and thermal tolerance in the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis*. *Evolutionary Applications* 10, 1007–1019. <https://doi.org/10.1111/eva.12505>
- Norges Sjømatråd (2024). *Prisvekst og svak krone ga eksportrekord for norsk sjømat i 2023*. Available at: <https://www.mynewsdesk.com/no/seafood/pressreleases/prisvekst-og-svak-krone-ga-eksportrekord-for-norsk-sjoemat-i-2023-3295360> (Accessed: 19 April 2024).
- Nyrud *et al.* (2023). *Havbruksnæringens ringvirkninger - Verdiskaping og sysselsetting i 2022*. 32/2023. Nofima.
- Overton, K., Dempster, T., Oppedal, F., Kristiansen, T.S., Gismervik, K., Stien, L.H., 2019. Salmon lice treatments and salmon mortality in Norwegian aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture* 11, 1398–1417. <https://doi.org/10.1111/raq.12299>
- Rittenhouse, M.A., Revie, C.W., Hurford, A., 2016. A model for sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) dynamics in a seasonally changing environment. *Epidemics* 16, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2016.03.003>
- Rivera-Ingraham, G.A., Lignot, J.-H., 2017. Osmoregulation, bioenergetics and oxidative stress in coastal marine invertebrates: raising the questions for future research. *Journal of Experimental Biology* 220, 1749–1760. <https://doi.org/10.1242/jeb.135624>
- Samsing, F., Oppedal, F., Dalvin, S., Johnsen, I., Vågseth, T., Dempster, T., 2016. Salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) development times, body size, and reproductive outputs follow universal models of temperature dependence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 73, 1841–1851. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2016-0050>

- Schram, T., 1993. Supplementary descriptions of the developmental stages of *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer, 1837) (Copepoda: *Caligidae*).
- Schram, T.A., 2000. The egg string attachment mechanism in salmon lice *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: *Caligidae*). *Contributions to Zoology* 69, 21–29.
<https://doi.org/10.1163/18759866-0690102002>
- Sea Lice Research Centre, (2020) ‘SLRC - Life cycle of the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*)’. DataverseNO. Available at: <https://doi.org/10.18710/GQTYYL>.
- Serra-Llinares, R.M., Bøhn, T., Karlsen, Ø., Nilsen, R., Freitas, C., Albrechtsen, J., Haraldstad, T., Thorstad, E.B., Elvik, K.M.S., Bjørn, P.A., 2020. Impacts of salmon lice on mortality, marine migration distance and premature return in sea trout. *Marine Ecology Progress Series* 635, 151–168. <https://doi.org/10.3354/meps13199>
- Sievers, M., Frode, O., Ellen, D., Wright, D.W., 2019. The effectiveness of hyposaline treatments against host-attached salmon lice. *Scientific Reports (Nature Publisher Group)* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43533-8>
- Skern-Mauritzen, R., Malde, K., Eichner, C., Dondrup, M., Furmanek, T., Besnier, F., Komisarczuk, A.Z., Nuhn, M., Dalvin, S., Edvardsen, R.B., Klages, S., Huettel, B., Stueber, K., Grotmol, S., Karlsbakk, E., Kersey, P., Leong, J.S., Glover, K.A., Reinhardt, R., Lien, S., Jonassen, I., Koop, B.F., Nilsen, F., 2021. The salmon louse genome: Copepod features and parasitic adaptations. *Genomics* 113, 3666–3680.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.08.002>
- Skern-Mauritzen, R., Torrissen, O., Glover, K.A., 2014. Pacific and Atlantic *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer, 1838) are allopatric subspecies: *Lepeophtheirus salmonis salmonis* and *L. salmonis oncorhynchi* subspecies novo. *BMC genetics* 15, 32–32.
<https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-32>
- Sommerset, I., Wiik-Nielsen, J., Moldal, T., Oliveira, V., Svendsen, J.C., Haukaas, A., Brun, E., 2023. Fiskehelserapporten 2023 (No. 8a/2024).
- Spees, J.L., Chang, S.A., Snyder, M.J., Chang, E.S., 2002. Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the lobster *Homarus americanus*. *The Biological Bulletin* 203, 331–337.
- Stien, A., Bjørn, P., Heuch, P., Elston, D., 2005. Population dynamics of salmon lice *Lepeophtheirus salmonis* on Atlantic salmon and sea trout. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 290, 263–275. <https://doi.org/10.3354/meps290263>

- Sundell, K., Wrangé, A.-L., Jonsson, P.R., Blomberg, A., 2019. Osmoregulation in Barnacles: An Evolutionary Perspective of Potential Mechanisms and Future Research Directions. *Front. Physiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00877>
- Sutherland, B.J.G., Jantzen, S.G., Yasuike, M., Sanderson, D.S., Koop, B.F., Jones, S.R.M., 2012. Transcriptomics of coping strategies in free-swimming *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda) larvae responding to abiotic stress. *Molecular ecology* 21, 6000–6014. <https://doi.org/10.1111/mec.12072>
- Suzuki, Y., Itakura, M., Kashiwagi, M., Nakamura, N., Matsuki, T., Sakuta, H., Naito, N., Takano, K., Fujita, T., Hirose, S., 1999. Identification by Differential Display of a Hypertonicity-inducible Inward Rectifier Potassium Channel Highly Expressed in Chloride Cells*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 11376–11382. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.16.11376>
- Szetey, A., Wright, D.W., Oppedal, F., Dempster, T., 2021. Salmon lice nauplii and copepodids display different vertical migration patterns in response to light. *Aquaculture Environment Interactions* 13, 121–131. <https://doi.org/10.3354/aei00396>
- Takle, H.R., Ytteborg, E., Nielsen, K.V., Karlsen, C.R., Nilsen, H.K., Sveen, L., Colquhoun, D.J., Olsen, A.B., Sørum, H., Nilsen, A., 2015. Sårproblematikk og hudhelse i laks- og regnbueørrettoppdrett, 5.
- Thabet, R., Ayadi, H., Koken, M., Leignel, V., 2017. Homeostatic responses of crustaceans to salinity changes. *Hydrobiologia* 799, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3232-1>
- Torrissen, O., Jones, S., Asche, F., Guttormsen, A., Skilbrei, O.T., Nilsen, F., Horsberg, T.E., Jackson, D., 2013. Salmon lice – impact on wild salmonids and salmon aquaculture. *J Fish Dis* 36, 171–194. <https://doi.org/10.1111/jfd.12061>
- Trafikklyssystemet [WWW Document], 2024. URL <https://trafikklyssystemet.no/Trafikklyssystemet> (accessed 4.29.24).
- Treasurer, J.W., Wadsworth, S.L., 2004. Interspecific comparison of experimental and natural routes of *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongatus* challenge and consequences for distribution of chalimus on salmonids and therapeutic screening. *Aquaculture Research* 35, 773–783. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.1100.x>
- Tucker, C.S., Sommerville, C., Wootten, R., 2000. An Investigation into the Larval Energetics and Settlement of the Sea Louse, *Lepeophtheirus salmonis*, an Ectoparasitic Copepod of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Fish Pathology* 35, 137–143. <https://doi.org/10.3147/jsfp.35.137>

Wright, D.W., Oppedal, F., Dempster, T., 2016. Early-stage sea lice recruits on Atlantic salmon are freshwater sensitive. *Journal of Fish Diseases* 39, 1179–1186.

<https://doi.org/10.1111/jfd.12452>

Yang, Y., Ye, H., Huang, H., Li, S., Liu, X., Zeng, X., Gong, J., 2013. Expression of Hsp70 in the mud crab, *Scylla paramamosain* in response to bacterial, osmotic, and thermal stress. *Cell Stress and Chaperones* 18, 475–482. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0402-6>