



Uit

NORGES  
ARKTISKE  
UNIVERSITET

Norges Fiskerihøgskole

## Betydning av varighet på kort dags (vinter) behandling på parr-smolt transformasjon og vekst etter sjøsetting hos Atlantisk laks.

---

**Børge Gellein Blikeng**

*Masteroppgave i Akvamedisin (60 stp)*

*November 2017*





## Forord

Alle resultater i denne masteroppgaven bygger på arbeid utført ved Norges fiskerihøgskole, Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Universitet i Tromsø – Norges arktiske universitet og Havbruksstasjonene i Kårvika, i perioden januar 2017 til november 2017.

Jeg ønsker å rette en stor takk til min hovedveileder Even Jørgensen for at du introduserte meg for prosjektet. Ditt engasjement og faglige kompetanse har gjort dette til et meget spennende og læringsrikt år.

Videre vil jeg takke mine bi-veiledere Jo Espen Tau Strand og Helge K. Johnsen for deres bidrag på laboratoriet og i skriveprosessen. ATPase, sjøvannstoleranse og de endelige resultatene ville aldri blitt så bra hadde det ikke vært for dere.

Kjære medstudenter tusen takk, uten dere hadde jeg aldri kommet meg gjennom fem og et halvt år her på NFH.

Til slutt har jeg lyst til å takke for meg – *Thank you for me!*

Børge Gellein Blikeng

Tromsø, november 2017



## Sammendrag

Målsetningen i dette forsøket var å studere effekten av ulik varighet på vinterstimuli (kort dag) på smoltutvikling hos Atlantisk laks (*Salmo salar* L.), gjennom å kvantifisere utvikling av sjøvannstoleranse, gjelle  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA) aktivitet og morfometri (endring i kondisjonfaktor) under smoltifiseringen, samt vekst og fôrinntak i et påfølgende opphold i sjøvann.

Parr-smolt transformasjonen, eller smoltifisering, styres av en rekke indre og ytre faktorer. Av miljøfaktorer er det antall timer lys og mørke i løpet av en dag, fotoperioden, som har størst innvirkning på smoltifisering. Fotoperioden påvirker og igangsetter en rekke utviklingselementer som forbereder Atlantisk laks på overgangen fra ferskvann til sjøvann. I kommersiell produksjon av laks blir smolt produsert ved at smoltifiseringen styres gjennom en fotoperiode-behandling. Ved å manipulere frem et kunstig vårsignal kan opprettere igangsette smoltifisereing i perioder som ikke er vanlig i naturen.

I forsøket ble fire grupper med Atlantisk laks utsatt for forskjellig kort dags (vinter) behandling, før tre av de fire gruppene ble overført til sjøvann. Gruppene ble delt opp i to uker (2W), fire uker (4W), åtte uker (8W) og kontinuerlig (SPC) kort dags behandling (8 t lys (L) og 16 t mørke D; 8L:16D 7 °C). Etter kort dags behandlingen ble gruppe 2W, 4W og 8W overført tilbake til lang dag (24L:0D 7 °C) i åtte uker før de ble overført på sjøvann (34 ‰ 7 °C). I løpet av forsøket frem til utsett i sjø ble det utført sjøvannsteter (2x5 fisk fra hver behandlingsgruppe ble overført fra ferskvann til sjøvann (34 ‰ 7 °C) i 24 timer på kontinuerlig lys og uten fôring) med ca. to ukers mellomrom. Etter utført sjøvannstest ble fiken avlivet og blodprøver samt lengde- og vektmaalinger, tatt. Alle gruppene viste en god sjøvannstoleranse før de ble satt på kort dags behandling. Denne sjøvannstoleransen mistet alle gruppene kort tid etter overføring til kort dag, men SPC utviklet på nytt en sjøvannstoleranse etter åtte uker på kort dag. Gruppe 2W, 4W og 8W utviklet alle en god sjøvannstoleranse i løpe av de åtte ukene etter overføring til lang dag. Det ble ikke observert noen utvikling av gjelle NKA aktivitet for SPC og 2W gruppen, mens 4W gruppen viste en liten økning i gjelle NKA aktivitet. 8W gruppen var den eneste som viste en utvikling av gjelle NKA aktivitet som tilsvarte et nivå en venter å finne i en godt smoltifisert Atlantisk laks. Gjennom et 30 dagers langt sjøvannsopphold viste 8W gruppen en bedre tilvekst og en lavere fôrfaktor enn gruppe 2W og 4W.

Dette forsøket har vist at sjøvannstoleranse alene vil være et dårlig mål på smoltutvikling, og at høy gjelle NKA aktivitet i kombinasjon med god sjøvannstoleranse vil være en bedre indikasjon på om fisken er smoltifisert. Denne konklusjonen er også basert på resultatene på tilvekst og fôrutnyttelse etter overføring til sjøvann. Det er etablert en hypotese om at eksponering til kort daglengde igangsetter prosesser som forbereder fisken på å respondere på økt daglengde, og at fisken er avhengig av en viss varighet på oppholdet på kort dag for at disse mekanismene skal utvikles fullt ut styrkes av resultatet i dette forsøket.

## Innholdsfortegnelse

1	Bakgrunn .....	1
1.1	Anadromi hos laksefisk .....	1
1.2	Fysiologiske og morfologiske endringer ved smoltifisering .....	1
1.3	Produksjon av smolt i oppdrettsnæringen .....	3
1.4	Målsetning .....	4
2	Materialer og metoder .....	5
2.1	Forsøksfisk.....	5
2.2	Forsøksoppsett .....	5
2.3	Prøveuttak.....	6
	Analyser på laboratorium .....	7
2.4	Klorid.....	7
2.5	Osmolalitet.....	7
2.6	NKA aktivitet i gjellevev.....	8
2.7	Statistiske analyser og grafiske fremstillinger.....	9
3	Resultater.....	10
	Ferskvannsperiode.....	10
3.1	Klorid.....	10
3.2	Osmolalitet.....	11
3.3	Gjelle NKA aktivitet.....	12
3.4	Kondisjonsfaktor FW .....	13
	Sjøvannsopphold .....	14
3.5	Døgngrader .....	14
3.6	Tilvekst i sjøvannsoppholdet.....	14
3.7	Kondisjonsfaktor SW .....	16
3.8	Fôrintak og fôrfaktor .....	17
4	Diskusjon.....	18
	Ferskvannsperiode.....	18
	Sjøvannsopphold .....	20
5	Konklusjon .....	21
6	Referanser.....	22
7	Appendiks.....	25
7.1	Appendiks 1 - Uttaksdato .....	25
7.2	Appendiks 2 - Kjemikalier brukt ved analyse av NKA aktivitet i gjellevev.....	26

# 1 Bakgrunn

## 1.1 Anadromi hos laksefisk

Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) migrerer fra ferskvann og til det marine miljø hvor den har større tilgang på næring, før den vandrer tilbake til elvene for å gyte. Denne livsstrategien kalles for anadromi og øker muligheten for å unngå predatorer i første del av livet. Dette har vært en viktig faktor for laksens suksesshistorie (Gross, 1987). Lakseyngel, også kalt parr, oppholder seg i elven i 1 til 7 år, avhengig av breddegrad (Metcalf & Thorpe, 1990), før den starter vandringsen ned mot havet. For at den skal ha mulighet til å lykkes i det marine miljø er den avhengig av å gå gjennom en serie fysiologiske, morfologiske og atferdsmessige endringer (McCormick & Saunders, 1987; Hoar, 1988). Denne prosessen kalles for en parr-smolt transformasjon, eller smoltifisering. Smoltifiseringen er et dynamisk fenomen hvor genene uttrykkes ved en gitt tid i fiskens livssyklus, under intern kontroll (endokrinologi) og synkroniseres med ytre faktorer (hovedsakelig fotoperiode og temperatur) (Hoar, 1976; Hoar, 1988; McCormick, 2013).

## 1.2 Fysiologiske og morfologiske endringer ved smoltifisering

Parren har en kroppsvæske som er hyperosmotisk i forhold til ferskvannet i elvene, og på grunn av osmolalitetforskjellen oppstår det et tap av ioner via diffusjon over hud- og gjelleepitel, samtidig som det oppstår et overskudd av vannopptak over gjelleepitelet (Folmar & Dickhoff, 1980). Denne prosessen motvirkes ved en økning i sekresjonen av hypo-osmotisk urea og et aktivt opptak av ioner fra ferskvannet. Bevaring av ioner fra fôr og vann foregår hovedsakelig i tarm og i nyrer, mens det aktive opptaket av ioner foregår i gjellene (Folmar & Dickhoff, 1980).

Den motsatte effekten opplever laksen i sjøvann, da befinner den seg i et hyperosmotisk miljø. En høyere konsentrasjon av ioner i det omkringliggende miljøet vil føre til et tap av vann over skinn og gjeller på grunn av osmose (Folmar & Dickhoff, 1980). Dette vanntapet kompenseres ved at laksen drikker store mengder vann, absorpsjon av vann og salt i tarm og utskilling av ioner via nyrene. Urea som skilles ut av laks i sjøvann er isosmotisk (samme antall oppløst stoff) som blodplasmaet, men inneholder en overflod av divalente ioner (Edwards & Marshall, 2013). Ved å drikke mye sjøvann økes også mengden ioner i blodet, disse skilles ut over gjellene. For å kunne gå fra ferskvann til sjøvann må laksen gjennom en smoltifisering.

## Bakgrunn

Parr er avhengig av å oppnå en viss størrelse, ofte omtalt som et størrelsesrelatert smoltifiseringsvindu (12-13 cm) (McCormick et al., 2007), for at indre og ytre faktorer skal kunne igangsette smoltifisering (Wedemeyer et al., 1980). Av miljøfaktorer er det antall timer lys og mørke i løpet av et døgn, fotoperioden, som har størst innvirkning på smoltifiseringen. Duston & Saunders (1995) viste at ved å øke daglengden eller ved å innføre et lysstimuli som ikke samsvarte med årstiden var det mulig å fremskyve smoltifiseringsprosessen med flere måneder. Dette ga en mulighet for å produsere smolt (nullåringer) på høsten.

Atlantisk laks gyter på høsten, eggene utvikler seg sakte gjennom vinteren før de klekker på våren. Den første perioden lever den på plommesekken før den begynner å spise på levende byttedyr i april-mai. Om parren skal gjennomgå en smolt-transformasjon neste vår avgjøres rett etter midsommeren (Metcalf et al., 1986; Metcalf et al., 1988). Fisk som ikke smoltifiseres neste vår viser en lavere appetitt i perioden juli-august. Dette stagnerer fiskens vekst og reduserer den metabolske raten helt frem til neste vår. Fisk som oppfyller krav for å smoltifisering neste vår opprettholder appetitten gjennom hele sensommeren og høsten (Thorpe et al., 1998). Den økte daglengden på våren stimulerer til en hormonell kaskadereaksjon fra hypofysen (Hoar, 1988) som setter i gang smoltifiseringen.

Stimuleringen av pinealkjertelen og hypotalamus skjer via lys-hjerne aksen. Denne aksen spiller hovedrollen for at laksen skal kunne oppfatte endringer i daglengde (Komourdjian et al., 1976). Lys treffer retina og pinealkjertelen, som videregir informasjonen til sentrale områder i hjernen via nevroner. Her blir informasjonen prosessert og igjen videregitt til hypofysen (Ebbesson et al., 2007). Av de viktigste hormonene som blir stimulert har vi veksthormon og cortisol som skilles ut fra henholdsvis forlappen til hypofysen og hodenyra, begge er sentrale for å starte utviklingen av laksens hypoosmoregulatoriske kapasitet ved å stimulere til utvikling av sjøvanns (SW)-typen kloridceller (ionocytter) i gjellene og til å forandre osmoregulering i tarm. Dette gjør at fisken kan kompensere for osmotisk vanntap i det marine miljø gjennom å drikke vann og skille monovalente ioner ut fra gjellene og divalente ioner ut fra nyrene (McCormick, 2013). Den økte mengden ionocytter i gjellene fører til en oppregulering av  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA) aktiviteten, noe som er essensielt for utskilling av ionene over gjellene (Langdon & Thorpe, 1985; McCormick, 2013; Sundh et al., 2014).

En økt hormonell utskilling fra thyroidea (tyroksin, T4, og trijodotyronin, T3) til sirkulasjonssystemet (Redding et al., 1984) under smoltifiseringen har blitt påvist som nødvendig for både den morfologiske (sølvfarging) og atferdsmessige (nedstrøms migrasjon) forandringen (Björnsson et al., 2011; McCormick, 2013). I tillegg har deiodinaser nylig blitt



## Bakgrunn

vist å aktivere T4 til T3 på vevs nivå og således utøve en vevs-spesifikk rolle under smoltifiseringen (Lorgen et al., 2015).

En av de mest karakteristiske morfologiske forandringene i parr-smolt transformasjonen er laksenes reduserte kondisjonsfaktor (vekt til lengde ratio). Denne forandringen skyldes økt basal metabolsk rate, økt lengdevekst og en økt forbrenning av lipidlagrene (McCormick & Saunders, 1987). Den reduserte kondisjonsfaktoren øker smoltens svømmeegenskaper og gjøre smolten bedre til å unngå predatorer ved migrasjonen ut i sjøvann (Beeman et al., 1994). De karakteristiske parrmerkene forsvinner til fordel for mørklagte finner og en sølvfarget kropp. Denne sølvfargingen er et resultat av økt deponering av purinene guanin og hypoxanthine i skjell og hud (Johnston & Eales, 1967).

### 1.3 Produksjon av smolt i oppdrettsnæringen

I kommersiell produksjon av laks blir smolt produsert ved at smoltifiseringen styres gjennom en fotoperiode-behandling, der parr holdes på et 24 timers lysregime fra de startføres og frem til det er tre måneder igjen til de skal være ferdig smoltifisert. Da settes fisken på et kort dags (8-12 timer lys: 12-16 timer mørke, varierende regimer i næringen) regime i 6 uker. Deretter blir den igjen satt på kontinuerlig lys. Det er forventet at laksen er ferdig smoltifisert etter 6 uker hvis temperaturen er tilstrekkelig høy. Det er ansett som nødvendig å ha et vinterstimuli på minimum 6 uker for at fisken skal bli godt smoltifisert. Dette er delvis en «tommelfingerregel» som baserer seg på praktisk erfaring i næringa men også på grunnlag av tidligere forsøk som indikerer at 5-7 uker vinterstimuli er nødvendig for at en påfølgende økt daglengde skal gi smolt relaterte forandringer lik de man kan observere i villfisk (Sigholt et al., 1995). Det er imidlertid ingen kunnskap i dag om hvilke prosesser som utøses av eksponeringen til kort daglengde, og hvorfor lengden på dette stimuli har betydning. På denne bakgrunn er det igangsatt et større prosjekt hos forskningsgruppen «Arctic chronobiology and animal physiologi» på Institutt for Arktisk og Marin Biologi. Dette prosjektet har som målsetning å studere mulig preparatoriske mekanismer som utløses av et vinterstimuli, og hvilken betydning disse mekanismene har for fiskens evne til å respondere på en etterfølgende økning i daglengde. Mitt masterprosjekt ble inkludert i dette prosjektet og har følgende målsetning.

## Bakgrunn

### 1.4 Målsetning

Å studere effekten av ulik varighet av vinterstimuli (kort dag) på smoltutvikling hos Atlantisk laks, gjennom å kvantifisere utvikling av sjøvannstoleranse, gjelle NKA aktivitet og morfometri (endring i kondisjonfaktor) under smoltifiseringen, samt vekst og fôrinntak i et påfølgende opphold i sjøvann.

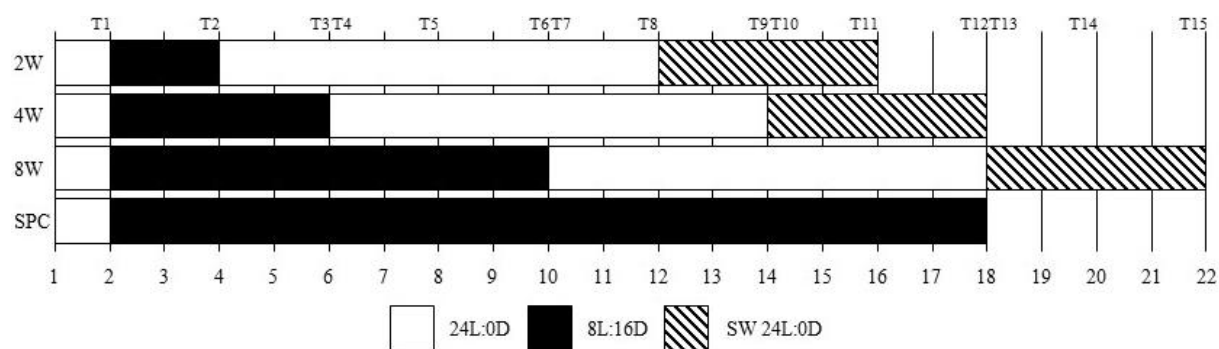
## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Forsøksfisk

Det ble brukt 800 parr i dette forsøket, alle var Atlantisk laks levert som egg av Aqua Gen A/S, avd. Tingvoll, og holdt på Havbruksstasjonen i Kårvika, Tromsø siden klekking i februar, 2016. Ved forsøkstart 05.01.2017 var gjennomsnittsverken 33 g og den hadde frem til da gått på kontinuerlig lys og kontinuerlig fôring *ad libitum* med en kombinasjon av fôringsautomater og appetittfôring i tråd med stasjonens fôringstabeller og rutiner.

### 2.2 Forsøksoppsett

Et totalt antall fisk på 800 ble ved forsøksstart fordelt på 8 stk. 300 l sirkulære kar (n = 100/kar) med ferskvann (7 °C). Disse representerte 4 dupliserte behandlingsgrupper som etter oppstart ble gitt henholdsvis 2, 4 og 8 uker (W) vintersignal [(8 timer lys (L) og 16 timer mørke (D)], samt en gruppe (SPC) som ble holdt på kontinuerlig kort dag frem til forsøksslutt. De tre første gruppene ble umiddelbart etter vinterstimuli overført til kontinuerlig lys i 8 uker og deretter umiddelbart overført til dupliserte, 300 l kar med sjøvann 7 °C i en måned. Disse ble føret *ad libitum* som før med Skretting 2,0 mm. Vanntemperaturen ble målt hver morgen i alle kar og notert ned av ansvarlig røkter på stasjonen. Oksygenmetning ble målt regelmessig og var aldri under 90 %.



Figur 1 Skjematisk framstilling av prøvetakning (T1, T2...), lysbehandlingsregime og vannkvalitet for gruppe 2W, 4W, 8W og SPC. Fargene i søylene representerer fotoperioden; hvit, 24L:0D; svart, 8L:16D; striper, 24L:0D i sjøvann. Antall uker er nummerert fra 1 til 22.

### 2.3 Prøveuttak

Fra hvert kar ble 5 tilfeldige fisk ( $n = 10/\text{behandling}$ ) tatt ut med en håv og avlivet i en overdose Benzocaine (150 ppm). Etter avliving ble fisken veid ( $\pm 0,5$  g) og lengdemålt (gaffellengde;  $\pm 0,1$  cm). Gjelleprøver til analyse av NKA aktivitet ble tatt fra ytterste gjellebue på høyre side. Det ble tatt ut to filamenter på ca. 2-3 mm lengde og overført til et eppendorfrør som inneholdt 100  $\mu\text{l}$  SEI-buffer (Appendiks 2). Prøvene ble holdt på is i maksimalt 30 min før de ble plassert i en biofryser,  $-80$  °C. Prøveuttakene startet rett før fisken ble overført til vinterstimuli (T1) og vedvarte frem til slutten av ferskvannsfasen. Denne prosessen ble gjennomført 4 til 8 ganger for hver gruppe avhengig av hvor lenge gruppen sto på vintersignal.

På de samme tidspunktene ble 2x5 fisk fra hver behandlingsgruppe satt på en sjøvannstest (SWT) som innebar at fisken ble overført til sjøvann (34 ‰; 7 °C) i 24 timer på kontinuerlig lys og uten føring, hvoretter de ble avlivet i en overdose Benzocaine. Før avliving ble det tatt blodprøver fra *Vena caudalis* ved bruk av hepariniserte vacutainer (BD Vacutainer, 2 ml 13x75 mm, BD diagnostics, Preanalytical systems). Prøven ble holdt på is i vacutainerrørene (Clot Activator Tubes) før de ble sentrifugert ved 10000 rpm i 10 min (6000\*g). Plasma ble deretter ført over til et eppendorfrør ved hjelp av en pipette og oppbevart på  $-20$  °C i påvente av analyse av osmolalitet og kloridkonsentrasjon for å følge utvikling av hypoosmoregulatorisk evne (Blackburn & Clarke, 1987).

Etter ferskvannsperioden ble 30 fisk fra gruppene 2W (T10), 4W (T12) og 8W (T15) satt på sjøvann (34 ‰; 7 °C) i 30 dager. Umiddelbart før overføring til sjøvann (34 ‰; 7 °C), etter 15 dager og på slutten av sjøvannsoppholdet, ble alle fiskene håvet ut av karene og bedøvd i Benzocaine (60 ppm), hvoretter de ble veid og lengdemålt som før for å kvantifisere tilvekst i løpet av sjøoppholdet. Alt fôrspill i hvert kar ble hver dag samlet opp av ansvarlig røkter i en spesiell innretning utviklet på stasjonen for å kvantifisere gruppenes daglige fôrinntak. Ved dag 30 i hvert sjøopphold ble fisken avlivet i en overdose Benzocaine rett etter at lengde og vekt ble målt.

Forsøk, handtering og prøvetaking ble gjennomført i henhold til etiske standarder gjeldende i EU og innenfor den blocktillatelsen Havbruksstasjonen er gitt av Mattilsynet for smoltforsøk.

### Analyser på laboratorium

#### 2.4 Klorid

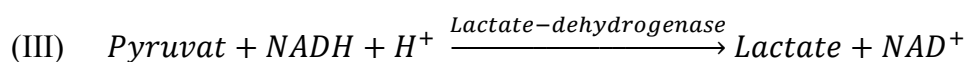
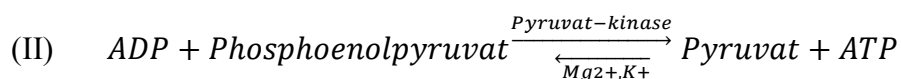
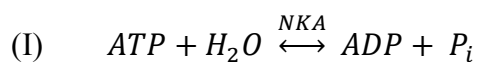
Kloridkonsentrasjonen i plasmaprøvene ble analysert med en Chlorid Analyser (CIBA Corning Diagnostics, Essex, England). Det er endringer i væskens ledningsevne som registreres av maskinen. Dette skjer når kloridioner titreres fra væsken ved dannelse av sølvklorid ( $\text{AgCl}$ ). Søvelektroder som er senket ned i væsken reagerer med kloridet. Nøyaktigheten til instrumentet er på  $\pm 2.2$  mM ved en løsning på 100 mM (CibaCorning, 1980). Ett glassbeger med 14 ml syrebuffer ble plassert slik at søvelektrodene ble suspendert i bufferløsningen. 2 x 20  $\mu\text{l}$  Cl/l standard 100 mM (MultiCal, Bayer HealthCare, Nederland) ble tilført løsningen for kondisjonering av maskinen. Det ble så på nytt tilført 20  $\mu\text{l}$  Cl/l standard før løsningen ble titrert. Dette ga et resultat på 100 ( $\pm 3$ ) og ble gjentatt tre ganger for å utelukke eventuelle avvik. Ny standardprøve ble tatt etter hver tiende plasmaprøve. Etter at kalibreringen var utført ble plasmaprøvene ristet av en vortex maskin i 10 sekunder før 20  $\mu\text{l}$  serumprøve ble tilført løsningen. Hver plasmaprøves kloridinnhold ble målt to til fire ganger avhengig av om resultatet avvek mer enn 3 mM. I resultatet er gjennomsnittet av de to nærmeste verdiene benyttet.

#### 2.5 Osmolalitet

Osmolalitet i plasma ble analysert på et Fiske One-Ten Osmometer (Fiske Associates, MA, USA). Instrumentet finner væskens frysepunktsdepresjon (en væskes senking av frysepunkt ved tilstedeværende oppløsning av annen substans) og bruker forholdet frysepunkt/smeltepunkt og konsentrasjon løst stoff til å beregne væskens osmolalitet. Nøyaktigheten til instrumentet er  $\pm 4$  mOsm (H. K. Johnsen, pers. com., 17 februar, 2017). En termistor (probe) blir senket ned i prøven som ligger i en tube (Advanced Instruments, Inc., MA, USA). Kalibrering av maskinen ble gjort ved å teste mot en standardløsning (290 mOsm  $\text{kg}^{-1}$ , Accuref 290, Fiske Associates, MA, USA). Det ble gjennomført en kalibreringstest etter hver tiende prøve. Hver plasma prøve ble analysert to ganger, i de tilfeller hvor resultat avviket med mer enn fire mOsm  $\text{kg}^{-1}$  ble det gjennomført en tredje eller fjerde prøve. I resultatet er gjennomsnittet av de to nærmeste verdiene benyttet.

## 2.6 NKA aktivitet i gjellevev

Til å registrere NKA aktivitet i gjellevev ble en metode skildret av McCormick (1993) og Schrock (1994) brukt. NKA aktiviteten blir angitt ved å se på hastigheten en gitt mengde enzym hydrolyserer ATP til ADP og  $P_i$ . Prinsippet er skjematisk oppdelt i ligning I, II og III.



Hvert mol ATP som blir hydrolysert (I) gir en oksidasjon av 1 mol NADH (III). For å registrere oksidasjon av NADH til  $NAD^+$  både med og uten hemmer, brukes en plateleser (Spectramax plus 384, Molecular Devices Corp., Palo Alto, California, USA). Ved å sette opp en standardkurve og måle mengde protein i hver eneste prøve, er det mulig å regne ut omsettinga av ADP per mg protein per time ( $\mu\text{mol ADP mg protein}^{-1} \text{ time}^{-1}$ ).

For å lage en standardkurve for omdanninga av ATP til ADP ble fire 0,5 ml eppendorfrør merket (0, 5, 10 og 20) og plassert på is. Videre ble det tilsatt Imidazol buffer (IB) og ADP-standard som vist i Tabell 4 i appendiks 2.

Av hver standard ble 10  $\mu\text{l}$  applisert før det ble tilsatt 200  $\mu\text{l}$  AM (Assay Mixture, appendiks 2) –saltløsning. Dette ble utført i triplikater på mikroplaten. Umiddelbart etter pipettering ble leseplaten plassert inn i og lest av ved 340 nm i 10 min, med intervaller på 30 sekunder. Dette gir raten NADH blir oksidert til  $NAD^+$ . Dette vil normalt gi en utflating av raten etter 2 – 5 min. For å få den nødvendige negative lineære kurven plottes de siste registrerte OD-verdiene (Optical Density, absorberingsverdien til lys ved en bestemt bølgelengde av et stoff i en løsning) mot de kjente konsentrasjonene for hver standardløsning. Stigningstallet bør ligge mellom -10 og -16 og brukes til å regne ut enzymaktiviteten.

Gjelleprøvene tines i kjøleskap og homogeniseres med *Pellet pestle motor*, Kontes, New Jersey, USA. Homogenatet sentrifugeres i en kjølesentrifuge ved 3800 rpm i 30 sekunder for å fjerne uløselig materiale. Prøven appliseres ved at det tilsettes 10  $\mu\text{l}$  til de fire brønnene på mikroplata. To av brønnene appliseres med AM med Ouabain (8,1 ml AM-Ouabain + 2,7 ml saltløsning) og de to resterende brønnene appliseres med AM uten Ouabain (8,1 ml AM + 2,7 ml saltløsning). Dette ble gjentatt slik at alle gjelleprøver hadde to brønner med Ouabain og to uten. Ouabain er en spesifikk hemmer av NKA-enzymet (Lehninger, 1993). Mikroplata holdes

## Materialer og metoder

på is under pipetteringa, og settes umiddelbart inn i analysemaskinen for avlesing på 340 nm i 10 min. Resultatene brukes til å regne ut enzymaktiviteten. Resterende prøvemateriale fryses for senere å bli brukt til proteinanalyse.

Proteinanalysen ble utført ved hjelp av *BCA Protein Assay Reagent Kit* (Pierce, Illinois, USA). Dette kittet gir resultatet i mengde protein per volum ( $\mu\text{g protein } \mu\text{l}^{-1}$ ) og blir brukt til å regne ut enzymaktivitet (Appendiks 2).

### 2.7 Statistiske analyser og grafiske fremstillinger

Figurer ble laget i SigmaPlot versjon 13 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) og statistiske analyser ble utført i Systat versjon 13.

Kondisjonsfaktor ble regnet ut ved hjelp av ligningen

$$CF = W * 100/L^3$$

hvor W er vekt i g, og L er gaffellengde i cm.

Den spesifikke vekstsraten (SGR, specific growth rate) (SGR uttrykt som % kroppsvekt dag<sup>-1</sup>) for individuell fisk ble kalkulert ved hjelp av ligningen (Brett & Groves, 1979)

$$SGR = [(\ln W_T - \ln W_t)/(T-t)] * 100$$

hvor  $W_t$  og  $W_T$  er vekt i g ved tid t (start av sjøvannsopphold) og T (slutten av sjøvannsopphold) og T-t er antall dager mellom veiinger.

Fiskegruppens fôrfaktor ble regnet ut ved å dividere total mengde fôr spist med total biomasseøkning i løpet av sjøvannsoppholdet.

Døgngader ble regnet ut ved å multiplisere gjennomsnittlig vanntemperatur med antall dager.

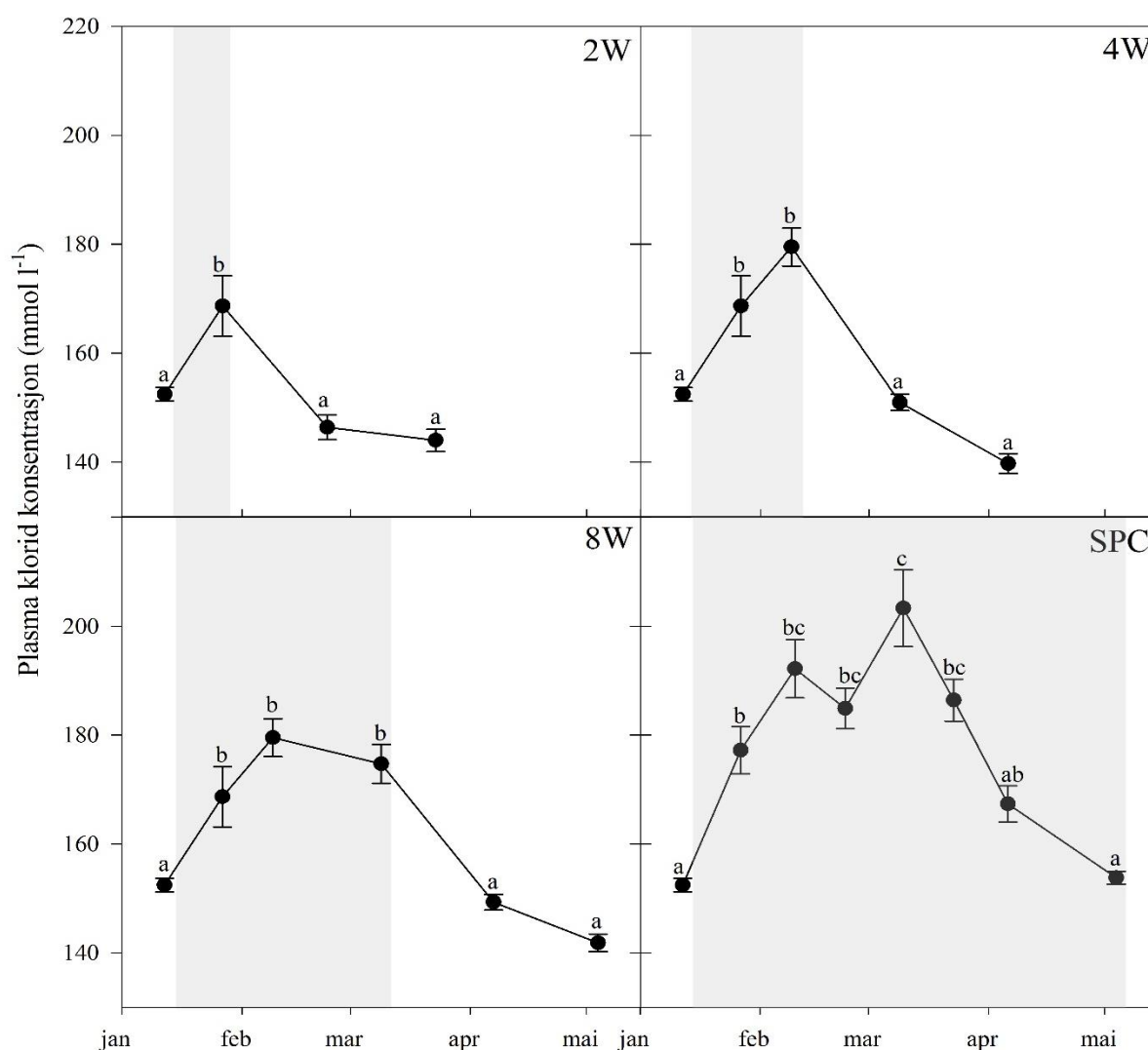
For å undersøke eventuelle signifikante forskjeller mellom uttakene innad i gruppene ble en enveis ANOVA og Tukey HSD post hoc test utført. Resultatet fra de ulike testene i denne oppgaven ble regnet som signifikante hvis  $p \leq 0,05$ .

### 3 Resultater

#### Ferskvannsperiode

##### 3.1 Klorid

Alle gruppene hadde en signifikant økning ( $p \leq 0,05$ ) av plasmakloridkonsentrasjonen ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) etter sjøvannstestene i kortdagsperioden (8L:16D). Fisken i SPC gruppen var den eneste som utviklet en signifikant ( $p \leq 0,05$ ) redusert plasmakloridkonsentrasjonen i løpet av kortdagsperioden. Gruppe 2W, 4W og 8W fikk alle en signifikant ( $p \leq 0,05$ ) redusert plasmakloridkonsentrasjonen etter at de ble flyttet tilbake på sommerstimuli (24L:0D).



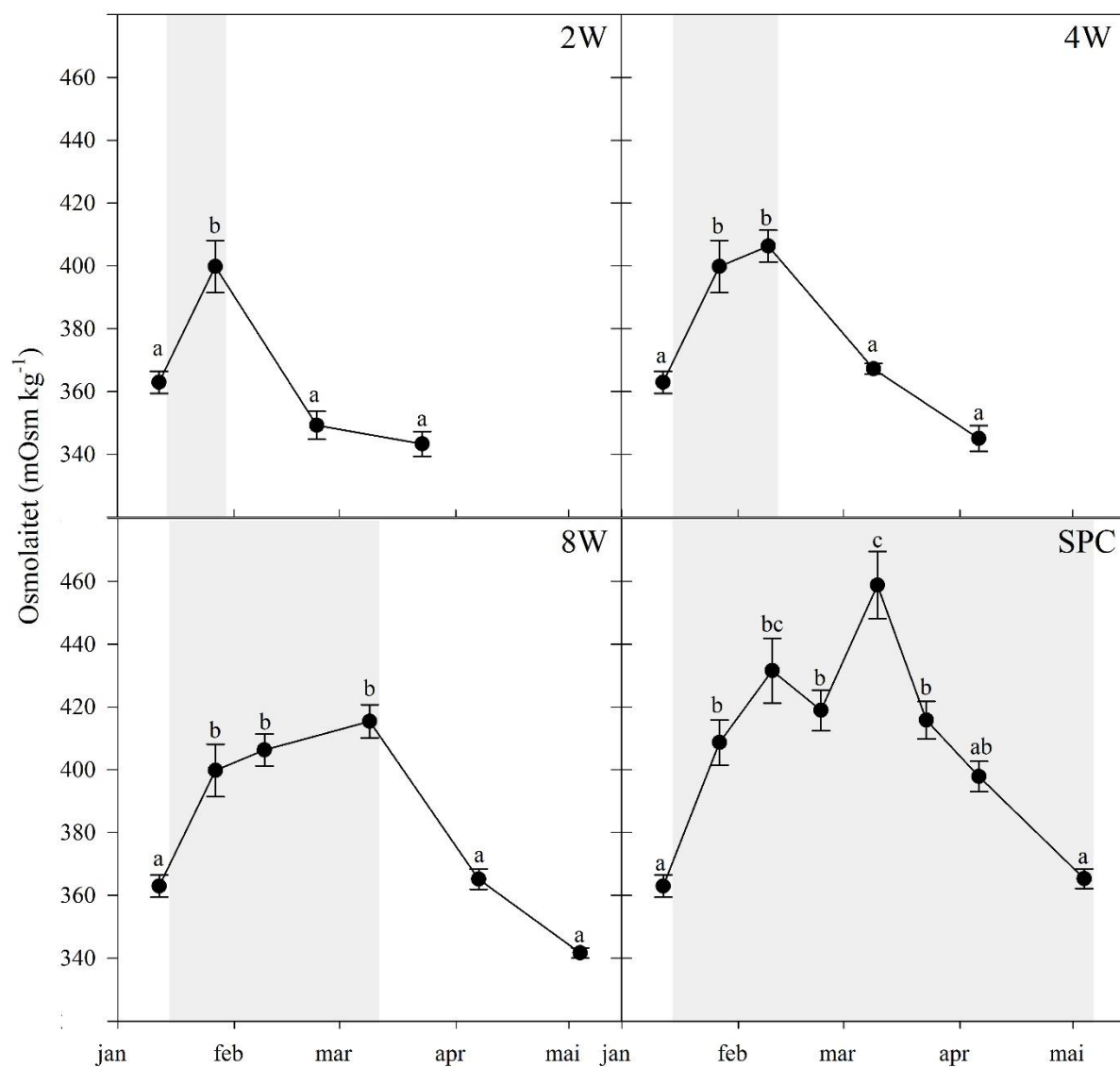
Figur 2 Gjennomsnittlig ( $\pm$  SEM) plasma konsentrasjon av klorid ( $n=10$ ) for de ulike gruppene etter en 24 timers sjøvannstest gjennom forsøket inntil overføring til sjøvann. Grått område illustrerer periode med kort dag (8L:16D). 2W (14 dager vintersignal), 4W (28 dager vintersignal), 8W (56 dager vintersignal), SPC (112 dager vintersignal). Forskjellige bokstaver indikerer signifikante forskjeller innad i de forskjellige gruppene.



## Resultater

### 3.2 Osmolalitet

Alle gruppene hadde en signifikant økning ( $p \leq 0,05$ ) av osmolalitetskonsentrasjon ( $\text{mOsm kg}^{-1}$ ) etter sjøvannstestene i kortdagsperioden (8L:16D). Fisken i SPC gruppen var den eneste som utviklet en signifikant ( $p \leq 0,05$ ) redusert plasmaosmolalitetskonsentrasjon i løpet av kortdagsperioden. Gruppe 2W, 4W og 8W fikk alle en signifikant ( $p \leq 0,05$ ) redusert plasmaosmolalitetskonsentrasjon etter at de ble flyttet tilbake på sommerstimuli (24L:0D).

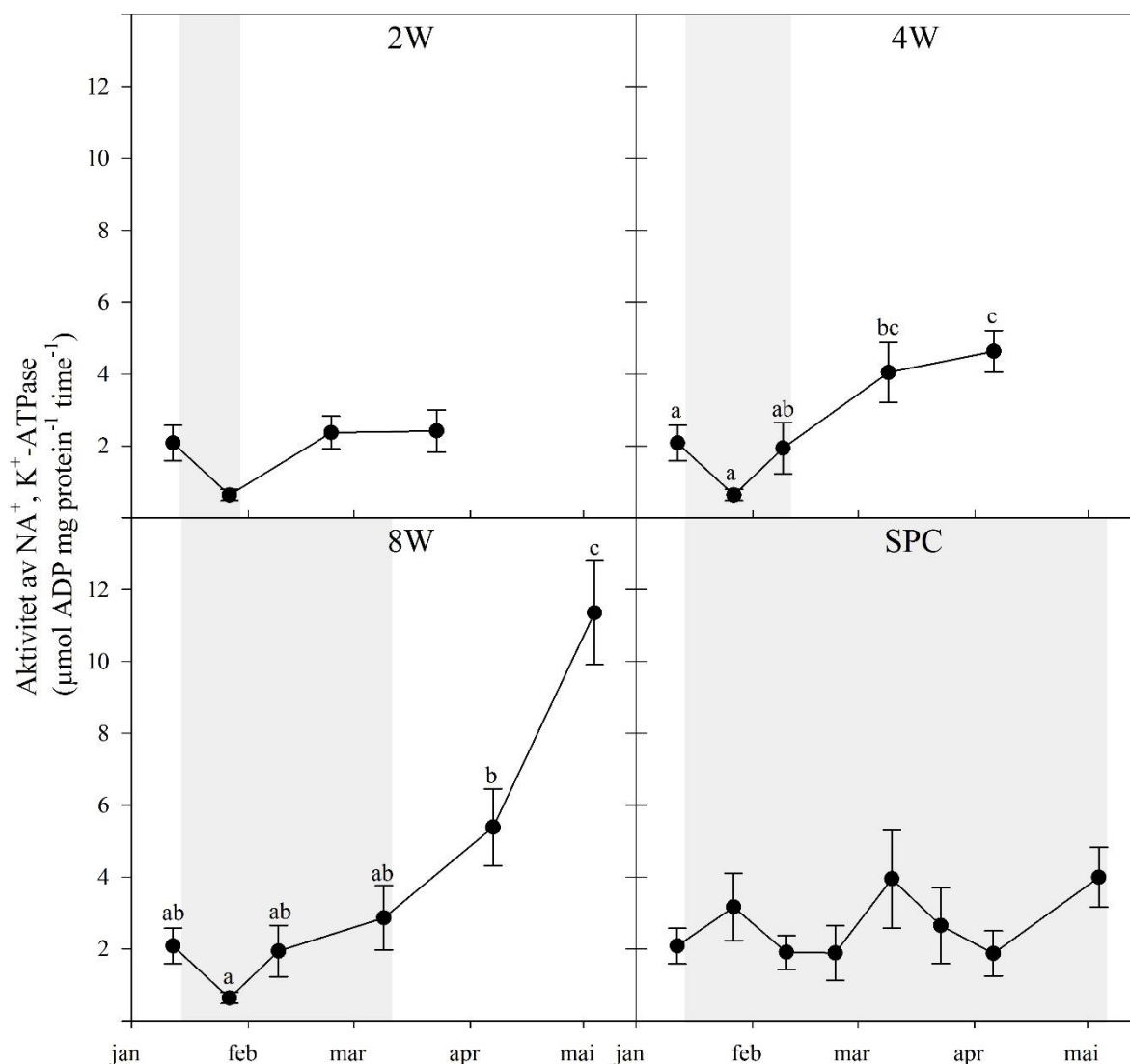


Figur 3 Gjennomsnittlig ( $\pm$  SEM) plasma konsentrasjon av osmolalitet ( $n=10$ ) for de ulike gruppene etter en 24 timers sjøvannstest gjennom forsøket inntil overføring til sjøvann. Grått område illustrerer periode med kort dag (8L:16D). 2W (14 dager vintersignal), 4W (28 dager vintersignal), 8W (56 dager vintersignal), SPC (112 dager vintersignal). Forskjellige bokstaver indikerer signifikante forskjeller innad i de forskjellige gruppene.

## Resultater

### 3.3 Gjelle NKA aktivitet

Gruppe 2W viste ingen signifikant ( $p \leq 0,05$ ) økning i gjelle NKA aktivitet etter overføring til kontinuerlig lys. Gruppe 4W og 8W viste en signifikant ( $p \leq 0,05$ ) økning i gjelle NKA aktivitet etter overføring til kontinuerlig lys. Gruppe 8W viste ved siste sjøvannstest en gjelle NKA aktivitet på over  $11 \mu\text{mol ADP mg protein}^{-1} \text{ time}^{-1}$ , dette er signifikant ( $p \leq 0,05$ ) forskjellig fra verdiene som ble observert ved siste måling for gruppe 2W og 4W. Fisken i SPC gruppen ble holdt på kort dag gjennom hele forsøket og det ble ikke observert noen signifikant ( $p \leq 0,05$ ) endring i gjelle NKA aktiviteten.

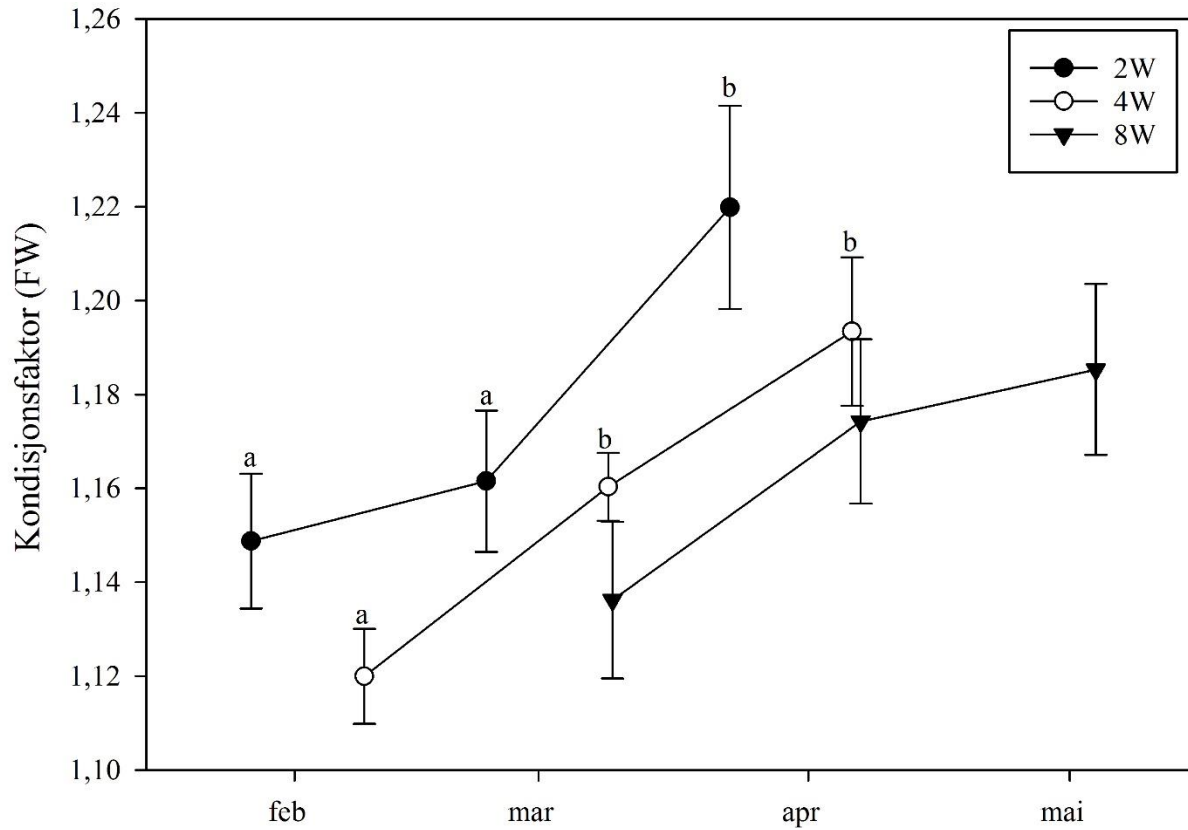


Figur 4 Gjennomsnittlig ( $\pm$  SEM) i gjelle  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-aktivitet ( $n=10$ ) for de ulike gruppene etter en 24 timers sjøvannstest gjennom forsøket inntil overføring til sjøvann. Grått område illustrerer periode med mørke. 2W (14 dager vintersignal), 4W (28 dager vintersignal), 8W (56 dager vintersignal), SPC (112 dager vintersignal). Forskjellige bokstaver indikerer signifikante forskjeller innad i de forskjellige gruppene.

## Resultater

### 3.4 Kondisjonsfaktor FW

Gruppe 2W og 4W viste en signifikant ( $p \leq 0,05$ ) økning i kondisjonsfaktor i løpe av åtte uker etter overføring tilbake til kontinuerlig lys. Gruppe 8W viste ingen signifikant ( $p \leq 0,05$ ) forandring kondisjonsfaktor i løpe av åtte uker etter overføring tilbake til kontinuerlig lys.



Figur 5 Gjennomsnittlig ( $\pm$  SEM) utviklingen i gruppe 2W, 4W og 8W ( $n=30$ ) kondisjonsfaktor i løpe av åtte uker etter de bli satt tilbake på kontinuerlig lys (24L:0D) i ferskvannspanperioden. Forskjellige bokstaver indikerer signifikante forskjeller innad i de forskjellige gruppene.

## Resultater

### Sjøvannsopphold

#### 3.5 Døgngrader

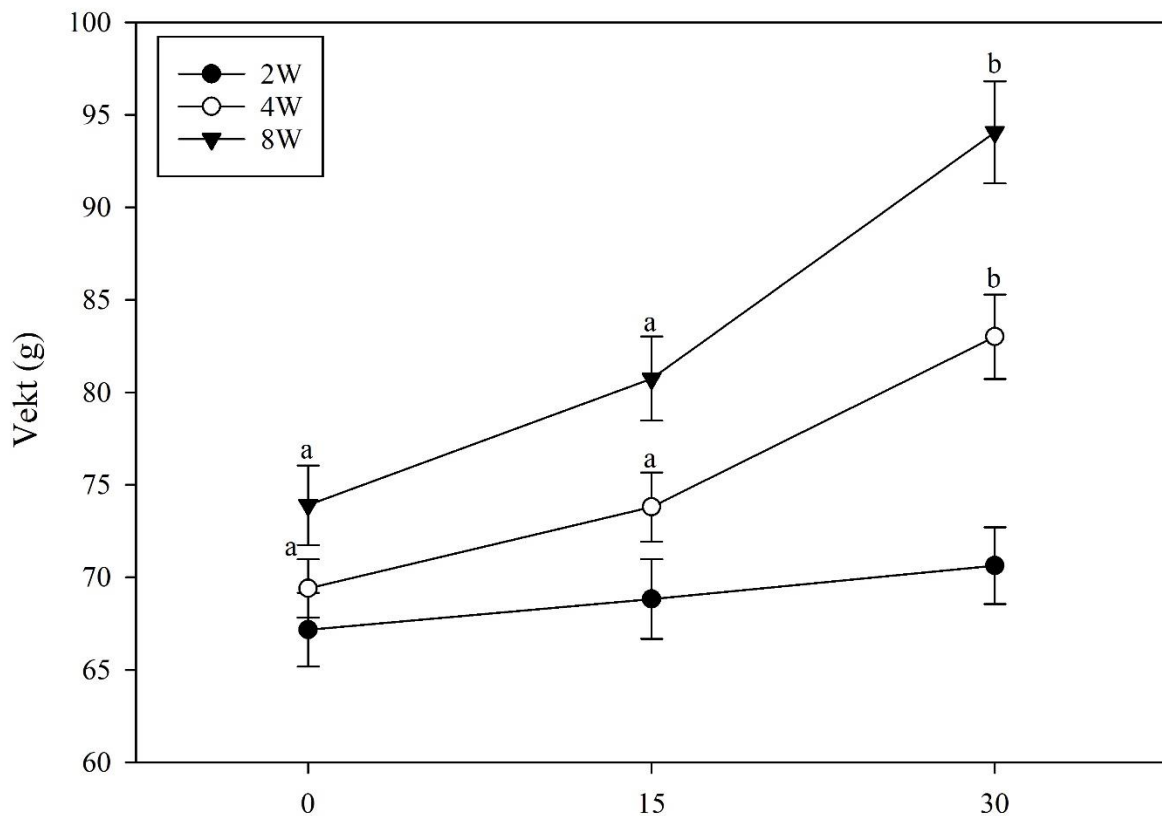
Tabell 1 Antall døgngrader i sjøvannsoppholdet for gruppe 2W, 4W og 8W.

	2W	4W	8W
<b>Døgngrader</b>	205,9	199,4	208,2

Tabell 1 viser antall døgngrader for gruppe 2W, 4W og 8W gjennom sjøvannsoppholdet.

#### 3.6 Tilvekst i sjøvannsoppholdet

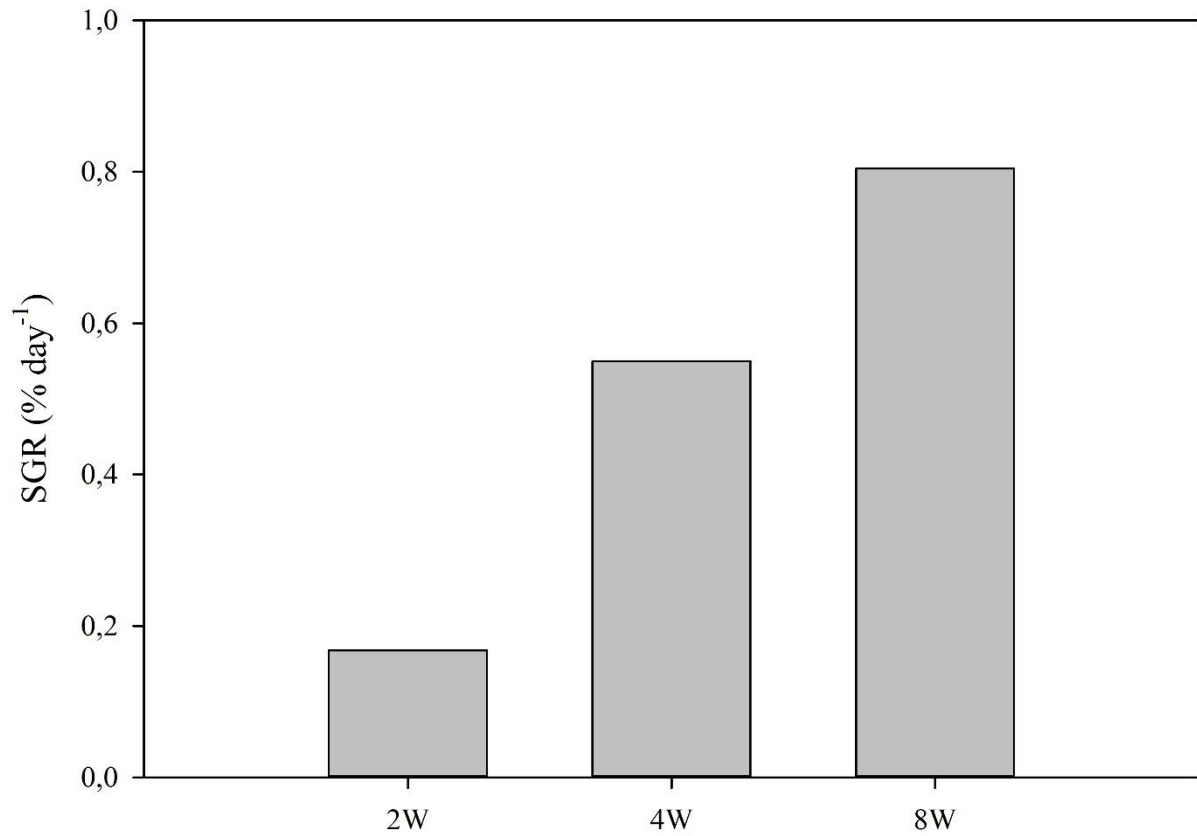
Etter at gruppene ble re-introdusert til sommerstimuli (24L:0D), og deretter holdt i sjøvann (34 %) i 30 dager viser Figur 6 at gruppe 2W hadde ingen signifikant ( $p \leq 0,05$ ) økning. Vekten til fisk i gruppe 4W og 8W hadde en signifikant ( $p \leq 0,05$ ) økning i løpet av de 30 dagene.



Figur 6 Gjennomsnittlig ( $\pm$  SEM) vekt hos fisken i 2W, 4W og 8W gruppene ( $n=30$ ) gjennom sjøvannsoppholdet (34 %) i 30 dager. Forskjellige bokstaver indikerer signifikante forskjeller innad i de forskjellige gruppene.

## Resultater

I løpet av sjøvannsoppholdet hadde 8W gruppen en total vektøkning på 67,22 % og en SGR på 0,80 %. Fisk i 4W gruppen hadde 41,47 % i vektøkning og en SGR på 0,55 % mens 2W gruppen hadde den laveste vektutviklingen på 11,56 %, og en SGR på 0,17 %.

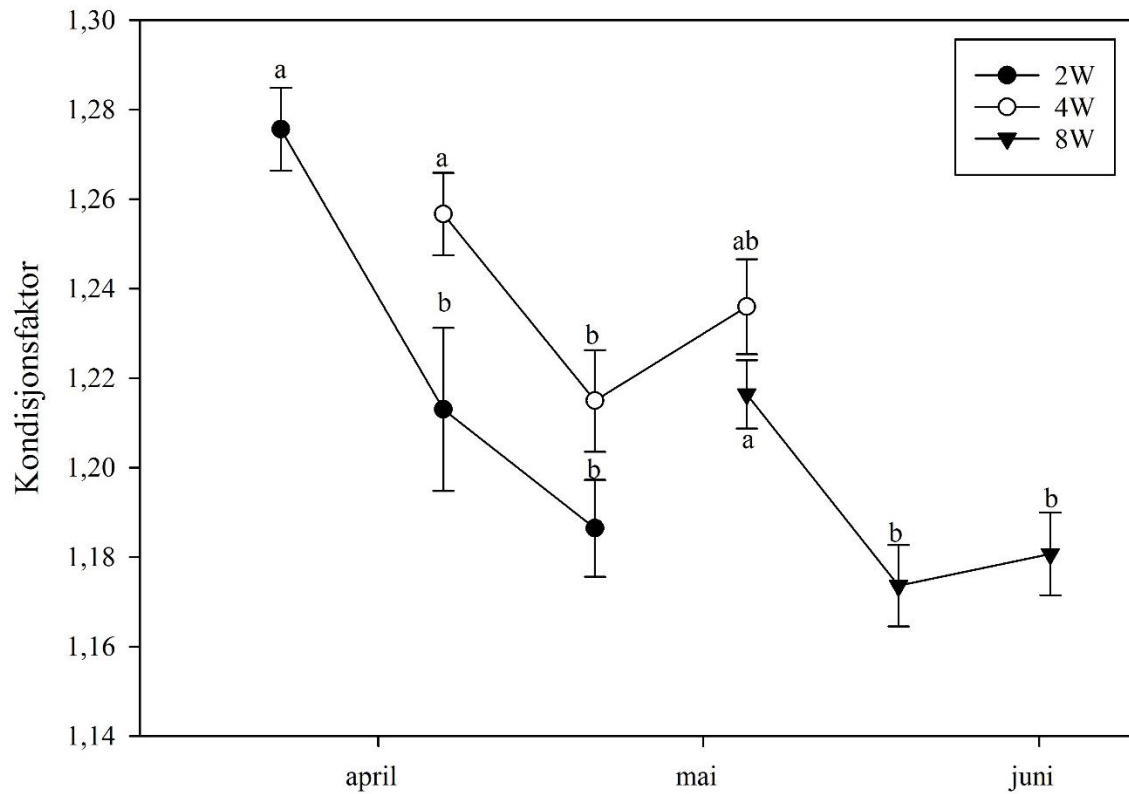


Figur 7 Spesifikk vekstrate (% kroppsmasse \* day<sup>-1</sup>) hos fisk i 2W, 4W og 8W gruppene (n=30) i løpe av sjøvannsoppholdet (34 ‰, 30 dager).

## Resultater

### 3.7 Kondisjonsfaktor SW

Etter at gruppene ble re-introisert til sommerstimuli (24L:0D), og holdt i sjøvann (34 %) sank kondisjonsfaktoren signifikant ( $P \leq 0,05$ ) for alle gruppene. 4W gruppen er den eneste som ikke viser en signifikant forskjell mellom dag 1 og dag 30.

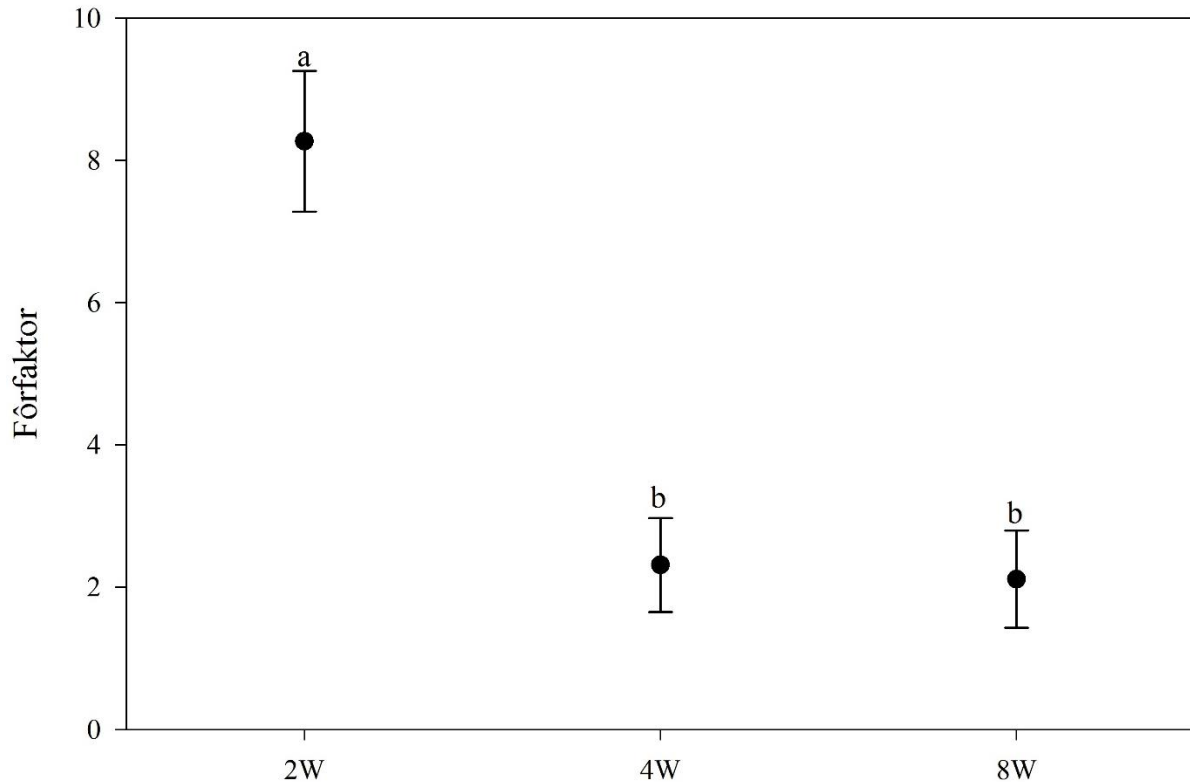


Figur 8 Gjennomsnittlig ( $\pm$  SEM) utviklingen i gruppe 2W, 4W og 8W ( $n=30$ ) kondisjonsfaktor i løpe av 30 dagers sjøvannsopphold. Forskjellige bokstaver indikerer signifikante forskjeller innad i de forskjellige gruppene.

## Resultater

### 3.8 Fôrinntak og fôrfaktor

I løpet av sjøvannsoppholdet hadde 2W gruppen en fôrfaktor på 8,3. Dette var en signifikant høyere ( $p \leq 0,05$ ) fôrfaktor enn gruppe 2W (2,3) og 8W (2,1).



Figur 9 Fôrfaktor ( $\pm$  SEM) for gruppene 2W, 4W og 8W i prosent av kroppsvekt i en periode på 30 dager ( $n=30$ ) i løpet av sjøoppholdet. Småbokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom de forskjellige gruppene.

Tabell 2 viser totalt fôrinntak (g), biomasse økning (g) og fôrfaktor for gruppe 2W, 4W og 8W gjennom sjøvannsoppholdet.

Tabell 2 Viser totalt fôrinntak (g), biomasse økning (g) og fôrfaktor for gruppe 2W, 4W og 8W kroppsvekt i en periode på 30 dager ( $n=30$ ) i løpet av sjøvannsoppholdet.

	2W	4W	8W
<b>Fôr spist (g)</b>	860	944	1277
<b>Biomasse økning (g)</b>	104	408,5	605
<b>Fôrfaktor</b>	8,27	2,31	2,11

## 4 Diskusjon

### Ferskvannsperiode

I dette forsøket ble det observert en god sjøvannstoleranse for alle gruppene (Figur 2 og Figur 3) etter første 24 timers SWT. Fisk i de forskjellige gruppene hadde en gjennomsnittlig vekt på 36,1 g og en lengde på 14,8 cm, en størrelse hvorved de har nådd et størrelsesmessig eller ontogenetisk smoltvindu. Det har i tidligere forsøk blitt vist en spontanutvikling av sjøvannstoleranse hos Atlantisk laks, uavhengig av lysstimuli (Staurnes et al., 1994), men da som en følge av en naturlig økning i vanntemperatur om våren. Det er ikke kjent om en spontan økning i sjøvannstoleranse er vist før hos Atlantisk laks som ikke har vært eksponert til endring i fotoperiode eller vanntemperatur. Første SWT (T1) gav i mitt forsøk et gjennomsnittlig plasma kloridnivå på 152 mM og en osmolalitet på 362 mOsm kg<sup>-1</sup>. Litteraturen sier at normale plasma konsentrasjoner for laksefisk i sjøvann skal ligge i området 130-150 mM og 320-350 mOsm kg<sup>-1</sup> (Heggberget, 1992). Verdiene i fisken i dette forsøket var noe høyere, men det er å forvente siden akutt overføring til sjøvann gir en midlertidig økning i plasma klorid konsentrasjon og osmolalitet, uansett smoltstatus (Blackburn & Clarke, 1987). Vurdert ut fra plasma osmolalitet og kloridkonsentrasjon etter 24 timers SWT var fisken i dette forsøket klar til overføring til sjøvann (Clarke et al., 1996).

Fiskene mistet sjøvannstoleransen (Figur 2 (T2) og Figur 3 (T2)) da de ble satt på kort dag (8L:16D). Dette var kanskje forventet i og med at god sjøvannstoleranse normalt er assosiert med lang dags eksponering. Det som ikke var forventet var at SPC gruppen etter hvert utviklet en god sjøvannstoleranse uten å bli overført tilbake på lang dag (24L:0D). Tre meget interessante verdier (SWT1 (T1), SWT5 (T7) og SWT8 (T12)) for SPC gruppa kan leses fra Figur 2 og Figur 3. Her har fisken ved første SWT utviklet en god sjøvannstoleranse. Åtte uker senere, ved SWT 5 den 10. mars, blir de høyeste gjennomsnittsverdiene for klorid og osmolalitet registrert, på henholdsvis 203 mM og 459 mOsm kg<sup>-1</sup>. Åtte uker senere, ved den 8 SWT den 4 mai, ble det registrert gjennomsnittsverdier på 154 mM og 365 mOsm kg<sup>-1</sup>, dette er verdier som viser at fisken i SPC gruppen igjen har utviklet god sjøvannstoleranse. Dette resultatet var svært overraskende og har, etter min beste vitende, ikke tidligere blitt observert. Denne re-utviklingen av sjøvannstoleranse indikerer at kort dag ikke automatisk er et hinder for utvikling av sjøvannstoleranse og det er ikke kjent hvilken faktor som stimulerte utviklingen av god sjøvannstoleranse. Resultatet viser imidlertid at parr som er i et størrelsesmessig



## Diskusjon

smoltvindu spontant kan utvikle smoltkarakterer uavhengig av endringer i fotoperiode, som tidligere vist av Eriksson & Lundqvist (1982).

Gruppe 2W, 4W og 8W utviklet alle en signifikant økning i sjøvannstoleranse etter at de ble satt tilbake på lang dag (Figur 2 og Figur 3), og denne økningen var åpenbart stimulert av økningen i daglengden, ettersom økningen startet umiddelbart etter at daglengden ble endret. Økningen i sjøvannstoleranse var like sterk hos alle gruppene uavhengig av varigheten på kortdagsperioden. Dette er resultater som stemmer overens med tidligere forsøk, hvor Duncan & Bromage (1998) viste en like god utvikling av sjøvannstoleranse hos fisk som hadde gått på 1, 2 og 3 måneder kort dag før de ble overført tilbake på lang dag.

Gjelle NKA aktivitet er normalt sterkt korrelert med utviklingen av sjøvannstoleranse hos Atlantisk laks, og blir ofte brukt som en indikator på smoltutvikling (McCormick et al., 1995). I dette forsøket viste 8W gruppen (Figur 4) en kraftig økning i gjelle NKA aktivitet, til et nivå som er vanlig å se hos fullt utviklet smolt (Zaugg & Wagner, 1973; Boeuf et al., 1985; McCormick, et al., 2009a). Til tross for at både 2W og SPC gruppen viste en utvikling av sjøvannstoleranse, viste de ingen økning i gjelle NKA aktivitet. 4W gruppen viste et signifikant høyere nivå av gjelle NKA aktivitet etter at de ble re-introduisert til lang dag, men verdiene var bare halvparten av de som ble observert i 8W gruppen. Det har i tidligere studier blitt vist at det ikke «bestandig» er en korrelasjon mellom utvikling av sjøvannstoleranse og gjelle NKA aktivitet. Resultat fra forsøk utørt av Handeland & Stefansson (2001) (Atlantisk laks) og Johnsen et al. (2000) (Arktisk røye, *Salvelinus alpinus*) viser at en sesongbasert variasjon i sjøvannstoleranse er kontrollert av en indre døgnrytme som er «entrained» (faseinnstilt) av økt daglengde om våren. De viste videre at utviklingen av sjøvannstoleranse er uavhengig av utviklingen av gjelle NKA aktivitet. En korrelasjon mellom sjøvannstoleranse og relativ størrelse på fisk ble vist av Duston & Saunders (1990) uavhengig av en gjelle NKA utvikling, men størrelsesendringen på fisken i mit forsøk var ikke stor nok til å kunne forklare endringene i sjøvannstoleranse.

Atlantisk laks har to hoved NKA- $\alpha$  isoformer tilstede i ionosyttene som sitter i gjellene. I ferskvann har laksen et høyt antall NKA $\alpha$ 1a, mens i sjøvann dominerer NKA $\alpha$ 1b (McCormick, et al., 2009b). Gjennom smoltifisering øker mengden av gjelle mRNA for NKA $\alpha$ 1b, samtidig som mengden mRNA for NKA $\alpha$ 1b reduseres (Nilsen et al., 2007). En forandring i forholdet mellom NKA $\alpha$ 1a og NKA $\alpha$ 1b i gjellene hos fisk i gruppe 2W, 4W og SPC kan være en av mekanismene som forklarer hvorfor fisken utviklet en god sjøvannstoleranse uten at NKA

## Diskusjon

aktiviteten økte. Det ble ikke gjennomført undersøkelser i dette forsøket som kan bekrefte eller avkrefte dette.

For SPC gruppen ble det ikke observert noen forandring i NKA aktivitet (Figur 4) i løpet av de 16 ukene fisken ble holdt på kort dag. Dette indikerer at et vinterstimuli etterfulgt av et sommerstimuli er nødvendig for at det skal igangsettes produksjon av NKA enzymer i gjellene.

Det kan også fastslås at SPC gruppens manglende økning i gjelle NKA aktivitet tyder på at den økte sjøvannstoleransen som utviklet seg i denne gruppa ikke var et resultat av en uoppdaget feil i lysstyringen (for eksempel en dag med 24 t lys) ved forsøksstasjonen.

De resultatene som ble observert for gjelle NKA aktivitet hos de forskjellige gruppene i dette forsøket indikerer at gjelle NKA aktivitet gir et bedre mål for om fisk er fullverdig smoltifisert enn det man kan få ved å bare se på sjøvannstoleranse, slik det er blitt fremholdt tidligere (Handeland & Stefansson, 2001).

Det har tidligere blitt vist en sammenheng mellom redusert kondisjonsfaktor og økt daglengde gjennom smoltifisering (McCormick & Saunders, 1987; Hoar, 1988). I dette forsøket ble det observert en økning i kondisjonsfaktor for gruppe 2W og 4W i ferskvannsperioden (Figur 5). Dette kan indikere at gruppe 2W og 4W ikke ble fullstendig smoltifisert. Det ble derimot ikke registrert noen signifikant økning i kondisjonsfaktor for 8W gruppen, noe som var forventet men som kan være et resultat av at det ble tatt ut et tilfeldig utvalg av fisk ved hver prøvetakning.

### Sjøvannsopphold

Forskjellen i tilvekst som ble observert mellom gruppene (Figur 6) var ikke et resultat av vesentlig variasjon i døgngader (Tabell 1). Dette betyr at antall døgngader ikke kan forklare forskjellene i tilvekst som ble observert mellom gruppene. Gruppe 4W og 8W hadde en signifikant økning i tilvekst gjennom sjøvannsperioden (Figur 6) mens det ikke ble observert noen signifikant utvikling for fisk i gruppe 2W. Vektutviklingen i dette forsøket syntes å være positivt korrelert til varighet av vinterstimuli. Dette bekrefter resultatene i SGR (Figur 7), som viste at 8W gruppen hadde en daglig tilvekst på 0,80 %, gruppe 4W 0,55 % mens fisken i gruppe 2W kun hadde en daglig tilvekst på 0,17 %. Tilvekst er avhengig av et økt fôrinntak eller en bedre fôrutnyttelse. Fôrintak (Tabell 2) og fôrfaktor (Figur 9) registret i dette forsøket viser at gruppe 2W har hatt et lavere fôrinntak og et betydelig høyere energiforbruk. Dette stemmer overens med forsøk tidligere utført av Metcalfe et al. (1988) som viser at ufullstendig smoltifisert fisk har en lavere appetitt og høyere energiforbruk. Det er mulig at forskjellen er

## Konklusjon

større mellom gruppene enn det tallene viser, ettersom fisken i 8W gruppen var større ved begynnelsen av sjøvannsoppholdet enn det fisken i 2W gruppen var. Allometriske forhold skulle ha gitt en lavere tilvekst for fisk i 8W gruppen enn for fisk i 2W gruppen, gitt at de ellers var like.

Dette forsøket viser en nedgang i kondisjonsfaktoren (Figur 8) for gruppe 2W og 8W i løpe av sjøvannsoppholdet. Gruppe 4W viser en signifikant nedgang mellom dag 1 og 15 men ikke en nedgang mellom dag 1 og 30. Det var ingen klare forskjeller mellom behandlingsgruppene og reduksjonen i kondisjonsfaktor i den første fasen av sjøvannsoppholdet.

Tidligere forsøk (Björnsson et al., 1989) har observert en ufullstendig smoltifisering ved for kort vinterstimuli, men hvilke mekanismer som spiller inn har ikke blitt kartlagt. Resultatene kan imidlertid spekuleres å vise at vintersignalet trigger mekanismer som forbereder fisken på å respondere på påfølgende langdags behandling og at en gitt vinterlengde er nødvendig for at disse mekanismene skal utvikles fullstendig.

## 5 Konklusjon

Atlantisk laks har en evne til å utvikle en spontan sjøvannstoleranse når fisken kommer inn i et størrelsesmessig smoltvindu. Sjøvannstoleranse har blitt brukt i oppdrettsnæringen som et mål på om fisk er klar for sjøvannssetting. Dette forsøket har vist at sjøvannstoleranse alene vil være et dårlig mål på smoltutvikling, og at høy gjelle NKA aktivitet i kombinasjon med god sjøvannstoleranse vil være en bedre indikasjon på om fisken er smoltifisert. Denne konklusjonen er også basert på resultatene på tilvekst og fôrutnyttelse etter overføring til sjøvann. Det er etablert en hypotese om at eksponering til kort daglengde igangsetter prosesser som forbereder fisken på å respondere på økt daglengde, og at fisken er avhengig av en viss varighet på oppholdet på kort dag for at disse mekanismene skal utvikles fullt ut.

## 6 Referanser

- Beeman, J. W., Rondorf, D. W. & Tilson, M. E. (1994). Assessing smoltification of juvenile spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) using changes in body morphology. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 836-844.
- Björnsson, B. Th., Thorarensen, H., Hirano, T., Ogasawara, T. & Kristinsson, J. B. (1989). Photoperiod and temperature affect plasma growth hormone levels, growth, condition factor and hypoosmoregulatory ability of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation. *Aquaculture*, 82, 77-91.
- Björnsson, B. Th., Stefansson, S. O. & McCormick, S. D. (2011). Environmental endocrinology of salmon smoltification. *Gen. Comp. Endo.* 170, 290-298.
- Blackburn, J. & Clarke, W. C. (1987). Revised procedure for the 24 hour seawater challenge test to measure seawater adaptability of juvenile salmonids *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1515, 1-35.
- Boeuf, G., Le Roux, A., Gaignon, J. L. & Harache, Y. (1985). Gill (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-ATPase activity and smolting in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in France. *Aquaculture*, 45, 73-81.
- Brett, J. R. & Groves, T. D. D. (1979). Physiological energetics. *Fish Physiology*. 8, 280-352. New York: Academic Press.
- CibaCorning. (1980) 925 Chloride Analyzer Instruction Manula. Massachusetts, USA, Ciba Corning.
- Clarke, W. C., Saunders, R. L. & McCormick, S. D. (1996). Smolt Production. In *Principles of Salmonid Culture*, vol. 29 (eds. W. Pennel and B. A. Barton), 517-567. Amsterdam: Elsevier.
- Duncan, N. J. & Bromage, N. (1998). The effect of different periods of constant short days on smoltification in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 168, 369-386.
- Duston, J. & Saunders, R. L. (1990). The entrainment role of photoperiod on hypoosmoregulatory and growth-related aspects of smolting in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Zoo.* 68, 707-715.
- Duston, J. & Saunders, R. L. (1995). Advancing smolting to autumn in age 0+ Atlantic salmon by photoperiod, and long-term performance in sea water. *Aquaculture*, 135, 295-309.
- Ebbesson, L. O. E., Ebbesson, S. O. E., Nilsen, T. O., Stefansson, S. O. & Holmqvist, B. (2007). Exposure to continuous light disrupts retinal innervation of the preoptic nucleus during parr-smolt transformation in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 273, 345-349.
- Edwards, S. L. & Marshall, W. S. (2013). Principles and patterns of osmoregulation and euryhalinity in fishes. In *Fish Physiology*, vol. 32, *Euryhaline Fishes* (eds. D. D. McCormick, C. J. Brauner & A. P. Farrell). Amsterdam: Academic Press, pp. 1-44.
- Eriksson, L.-O. & Lundqvist, H. (1982). Circannual rhythms and photoperiod regulation of growth and smolting in Baltic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 28, 113-121.
- Folmar, L. C. & Dickhoff, W. W. (1980). The parr-smolt transformation (smoltification) and seawater adaptation in salmonids: A review of selected literature. *Aquaculture*, 21, 1-37.
- Gross, M. R. (1987). Evolution of diadromy in fishes. *Am. Fish. Soc. Symp.* 1, 14-25.
- Handeland, S. O. & Stefansson, S. O. (2001). Photoperiod control and influence of body size on off-season parr-smolt transformation and post-smolt growth. *Aquaculture*, 192, 291-307.
- Heggberget, T., Staurnes, M., Strand, R & Husby, J. (1992). Smoltifisering hos laksefisk. *NINA forskningsrapport*, 31.
- Hoar, W. S. (1976). Smolt transformation: evolution, behavior, and physiology. *J. Fish. Res. Board Can.* 33, 1233-1252.

- Hoar, W. S. (1988). The physiology of smolting salmonids. In *Fish physiology*, vol. XIB (eds. W. S. Hoar & D. Randall), pp. 275-343. New York: Academic Press.
- Johnsen, H. K., Eliassen, R. A., Sæther, B.-S. & Larsen, J. S. (2000). Effects of photoperiod manipulation on development of seawater tolerance in Arctic charr. *Aquaculture*, 189, 177-188.
- Johnston, C. E. & Eales, J. G. (1967). Purines in the integument of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation. *J. Fish. Res. Board Can.* 24, 955-964.
- Komourdjian, M. P., Saunders, R. L. & Fenwick, J. C. (1976). Evidence for the role of growth hormone as a part of a 'light-pituitary axis' in growth and smoltification of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Zoo.* 54, 544-551.
- Langdon, J. S. & Thorpe, J. E. (1985). The ontogeny of smoltification: Developmental patterns of gill Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, SDH, and chloride cells in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 45, 83-95.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. & Cox, M. M., (1993). Principles of biochemistry. Second edition Worth Publishers, Inc., New York 1013.
- Lorgen, M., Casadei, E., Krol, E., Douglas, A., Birnie, M. J., Ebbesson, L. O., Nilsen, T. O., Jordan, W. C., Jorgensen, E. H., Dardente, H., Hazlerigg, D. G. & Martin, S. A. (2015). Functional divergence of type 2 deiodinase paralogs in the Atlantic salmon. *Curr Biol.* 25, 936-941.
- McCormick, S. D. (1993). Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 656-658.
- McCormick, S. D., Björnsson, B. Th., Sheridan, M., Eilerlson, C., Carey, J. B. & O'Dea, M. (1995). Increased daylength stimulates plasma growth hormone and gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Comp. Physiol.* 165, 245-254.
- McCormick, S., Lerner, D. T., Monette, M. Y., Nieves-Puigdoller, K., Kelly, J. T. & Björnsson, B. Th. (2009a). Taking it with you when you go: How perturbations to the freshwater environment, including temperature, dams, and contaminants, affect marine survival of salmon. *Am. Fish. Soc. Symp.* 69, 195-214.
- McCormick, S. D., Regish, A. M. & Christensen, A. K. (2009b). Distinct freshwater and seawater isoforms of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon. *J. Exp. Biol.* 212, 3994-4001.
- McCormick, S. D. & Saunders, R. L. (1987). Preparatory physiological adaptations for marine life in salmonids: osmoregulation, growth, and metabolism. *Am. Fish. Soc. Symp.* 1, 211-229.
- McCormick, S. D., Sheehan, T., Björnsson, B. Th., Lipsky, C., Kocik, J., Regish, A. M. & O'Dea, M. F. (2013). Physiological and endocrine changes in Atlantic salmon smolts during hatchery rearing, downstream migration and ocean entry. *Can. J. Exp. Biol.* 205, 3553-3560.
- McCormick, S. D., Shrimpton, J. M., Moriyama, S. & Björnsson, B. Th. (2007). Differential hormonal responses of Atlantic salmon parr and smolt to increased daylength: A possible developmental basis for smolting. *Aquaculture*, 273, 337-344.
- Metcalfe, N. B., Huntingford, F. A. & Thorpe, J. E. (1986). Seasonal changes in feeding motivation of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Zoo.* 64, 2439-2446.
- Metcalfe, N. B., Huntingford, F. A. & Thorpe, J. E. (1988). Feeding intensity, growth rates, and the establishment of life-history patterns in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. An. Eco.* 57, 463-474.
- Metcalfe, N. B. & Thorpe, J. E. (1990). Determinants of geographical variation in the age of seaward-migrating salmon, *Salmo salar*. *J. An. Eco.* 59, 135-145.
- Nilsen, T. O., Ebbesson, L. O. E., Stefansson, S. O., Madsen, S. S., McCormick, S. D., Björnsson, B. Th. & Prunet, P. (2007). Differential expression of gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$

## Referanser

- and  $\beta$ -subunits,  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  cotransporter and CFTR anion channel in juvenile anadromous and landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Exp. Biol.* 210, 2885-2896.
- Redding, J. M., Schreck, C. B., Birks, E. K. & Ewing, R. D. (1984). Cortisol and its effects on plasma thyroid hormone and electrolyte concentrations in fresh water and during seawater acclimation in yearling coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56, 146-155.
- Schrock, R. M., Beeman J. W., Rondorf D. W. & Haner P. V., (1994). A microassay for gill sodium, potassium- activated ATPase in juvenile pacific salmonids. *Trans. Am. Fish. Soc.* 123, 223-229.
- Sigholt, T., Staurnes, M., Jakobsen, H. J. & Åsgård, T. (1995). Effects of continuous light and short-day photoperiod on smolting, seawater survival and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 130, 373-388.
- Staurnes, M., Sigholt, T. & Gulseth, O. A. (1994). Effects of seasonal changes in water temperature on the parr-smolt transformation of Atlantic salmon and anadromous Arctic char. *Trans. Am. Fish. Soc.* 123, 408-415.
- Sundh, H., Nilsen, T. O., Lindström, J., Hasselberg-Frank, L., Stefansson, S. O., McCormick, S. D. & Sundell, K. (2014). Development of intestinal ion-transporting mechanisms during smoltification and seawater acclimation in Atlantic salmon *Salmo salar*. *J. Fish. Bio.* 85, 1227-1252.
- Thorpe, J. E., Mangel, M., Metcalfe, N. B. & Huntingford, F. A. (1998). Modelling the proximate basis of salmonid life-history variation, with application to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Evo. Eco.* 12, 581-599.
- Wedemeyer, G. A., Saunders, R. L. & Clarke, W. C. (1980). Environmental factors affecting smoltification and early marine survival of anadromous salmonids. *Mar. Fish. Rev.* 42, 1-14.
- Zaugg, W. S. & Wagner, H. H. (1973). Gill ATPase activity related to parr-smolt transformation and migration in steelhead trout (*Salmo gairdneri*): influence of photoperiod and temperature. *Comp. Bioc. Phy. P. B: Comp. Bioc.* 45, 955-965.

## 7 Appendiks

### 7.1 Appendiks 1 - Uttaksdato

Det ble tatt ut prøver av fisk ved 15 forskjellige tidspunkt i perioden 12 januar til 2 juni 2017, Tabell 3.

Tabell 3 Oversikt over uttaksdato. SW = sjøvannssopphold.

Uttak	Dato	Gruppe
T1	12.01.2017	2W, 4W, 8W, SPC
T2	27.01.2017	2W, 4W, 8W, SPC
T3	09.02.2017	4W, 8W
T4	10.02.2017	SPC
T5	23.02.2017	2W, SPC
T6	09.03.2017	4W, 8W
T7	10.03.2017	SPC
T8	23.03.2017	2W, SPC, 2SW
T9	06.04.2017	4W, SPC
T10	07.04.2017	8W, 2SW, 4SW
T11	21.04.2017	2SW, 4SW
T12	04.05.2017	8W, SPC
T13	05.05.2017	4SW, 8SW
T14	19.05.2017	8SW
T15	02.06.2017	8SW

## Appendiks

### 7.2 Appendiks 2 - Kjemikalier brukt ved analyse av NKA aktivitet i gjellevev

#### SEI Buffer

---

- 26,76 g Sucrose
  - 1,86 g Na<sub>2</sub>EDTA/Titripex III
  - 1,70 g Imidazol
- Løses i 475 ml dH<sub>2</sub>O. pH justeres til 7,3 ved hjelp av HCl. Volumet justeres til 500 ml med dH<sub>2</sub>O.

#### O,5 % SEID

---

- 0,1 g Natriumdeoksyholate
- Løses i 20 ml SEI-buffer.

#### Imidazol buffer

---

- 3,404 g Imidazol
- Løses i 950 ml dH<sub>2</sub>O. pH justeres til 7,5 med HCl. Volum justeres til 1000 ml med dH<sub>2</sub>O.

#### Saltløsning

---

- 5,52 g NaCl
  - 1,07 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O
  - 1,57 g KCl
- Løses i 500 ml Imidazol buffer

#### PEP (Phosphoenolpyruvat)

---

- 0,491 g Phosphoenylpyruvat
- Løses i 100 ml Imidazol buffer. Ferdig løsning fordeles i reagensrør på 5 eller 10 ml. Oppbevares i biofrys (-80 °C).

#### Ouabain

---

- 0,382 g Ouabain
- Løses i 50 ml Imidazole buffer i kokende vannbad i avtrekksskap. Oppbevares mørkt i kjøleskap (4 °C).

#### Na-acetat-buffer

---

- 0,767 g Na-acetat-thrihydrat
- Løses i 100 ml dH<sub>2</sub>O. pH justeres til 6,8.

#### ADP standard

---

- 0,0489 g ADP
- Løses i 25 ml Na-acetat-buffer. Ferdig løsning fordeles i eppendorfrør på 300 µl. Oppbevares i biofrys (-80 °C)



## Appendiks

### Fortynning av ADP standard

Tabell 4 Sammensetning av ADP standard brukt for å lage standardkurve.

nmol 10 $\mu\text{l}^{-1}$	Imidazol-buffer ( $\mu\text{l}$ )	ADP standard ( $\mu\text{l}$ )
0	200	0
5	175	25
10	150	50
20	100	100

### AM-medium

Tabell 5 Sammensetning av Assay-miks til bruk ved proteianalyse

Løsning	2 mikroplater
Startvolum Imidazol-buffer (IB)	20 ml
Pyruvatekinase (PK)	24 $\mu\text{l}$
Lactic dehydrogenase (LDH)	31 $\mu\text{l}$
NADH	5 mg
Fosfofenolpyruvat (PEP)	5 ml
Adenosin 5'triphospate (ATP)	0,0145 g
Sluttvolum justeres med IB	35 ml

1. Et begerglass settes på is og tilsettes startvolumet med IB.
2. PK og LDH pipetteres til 2 ml eppendorfrør og sentrifugeres ved 12000 rpm i 8 min. Supernanten fjernes og pelleten resuspenderes i IB før den overføres til begerglasset med IB.
3. Løs NADH i IB og tilsett i begerglasset.
4. Tilsett tint PEP til begerglasset.
5. Vei ut ATP og tilsett IB så det løser seg. Overføres til begerglasset.
6. Løsningen i begerglasset overføres til en målesylinder og justeres til sluttvolumet med IB.

### Bruksløsninger (AM og AM-O)

Tabell 6 Bruksløsninger av AM og AM-O

Løsning	AM	AM-O
AM medium	17,5 ml	17,5 ml
Oubain	0 ml	1,25 ml
Imidazol buffer (IB)	1,25 ml	0 ml

To sentrifugerer merkes med henholdsvis AM og AM-O. På grunn av Oubains lyssensitivitet kles AM-O-røret med aluminiumsfolie.

Bland løsningen i henhold til Tabell 6 og oppbevar løsningen på is.

## Appendiks

### Løsning til proteinanalyse

Tabell 7 Løsning av albumin protein standard som brukes for å vise relevans mellom absorbans og proteinmengde. Konsentrasjon av fortynt albumin standard vises i siste rad.

2 mg/ml BSA standard (µl)	dH <sub>2</sub> O (µl)	Proteinstandard (µg/10µl)
0	100	0
25	75	5
50	50	10
100	0	20

BCA Protein Assay Kit, PIERCE.

1. Working solution (WR) ble klargjort: 20 ml reagens A + 400 µl reagens B, (50:1). 28 prøver + standard på en mikroplate. Prøvene og standarden ble applisert tre ganger.
2. Standard ble laget i henhold til Tabell 7.
3. Prøvene ble sentrifugert på 5000 rpm i 30 sekunder.
4. Appliserte 10 µl av standard, tre ganger, på platen.
5. Appliserte 200 µl WR i hver brønn, inkubert ved 37 °C i 60 minutter.
6. Platen ble avkjølt i romtemperatur før den ble lest av i plateleser ved 540 nm i 12 sekunder.