



Uit

**NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET**

Norges Fiskerihøgskole

Lys- og saltbehandling av to størrelsesgrupper lakseunger (*Salmo salar* L.)

Smoltifisering i ferskvann og prestasjon i sjøvann

—

Daniel Engen Lauritzen

Masteroppgave i Akvamedisin (60 stp)

Mai 2019



Forord

Arbeidet i denne masteroppgaven ble utført ved Institutt for arktisk og marin biologi ved Fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Universitetet i Tromsø. Oppgaven ble påbegynt i februar 2018 og avsluttet i mai 2019.

Først og fremst rettes en stor takk til min hovedveileder professor Even Hjalmar Jørgensen. Stort engasjement, tett oppfølging og faglige diskusjoner har vært et avgjørende bidrag til god motivasjon i løpet av masterperioden. Takk for latter og gode historier fra da alt var *«vanskeligere og tøffere før i tiden»*. Videre vil jeg takke Anja Striberny som alltid hadde en dør åpen til kontoret. Du har absolutt vært helt avgjørende for at denne oppgaven til slutt fant sin form. God oppfølging på laboratoriet og hjelp med skriveprosessen settes veldig stor pris på.

Takk til Jo Espen Tau Strand, Helge K. Johnsen og Alex West for hjelp med å måle gjelleaktivitet på laboratoriet. Det hadde jeg aldri klart alene. Anja Sjøvoll, tidligere vikariat, har også vært en viktig ressurs ved prøveuttak i forsøksperioden, så tusen takk for ditt gode humør og bidrag ved Havbruksstasjonen i Tromsø.

Til sist, men ikke minst: mine gode klassekamerater. Tusen hjertelig takk for en fantastisk studietid i Tromsø. Dere har vært en viktig grunn til en artig og hyggelig hverdag i fem år. Vi har hatt både gode og dårlige diskusjoner underveis, men det har skapt lærdom og mye latter. Turer, fester, lunsjer og andre sosiale hendelser vil bli husket for alltid. Jeg kommer til å savne dere, men ønsker dere lykke til i fremtiden og håper på det beste for hver og én. Vi møtes garantert ved en annen anledning, faglig eller ikke.

Daniel Engen Lauritzen

Tromsø, mai 2019

Sammendrag

Nye metoder for å smoltifisere lakseunger er stadig vanligere. Den klassiske metoden er å regulere daglengde for å simulere en naturlig sesongrytme, mens det i dag blir vanligere å tilføre salt i ferskvann- og/eller fôr for å stimulere smoltifisering. Samtidig vil aktører ha settefiskperioden lengere slik at smolten er større ved utsett. Bruk av disse metodene anses å bidra til raskere smoltifisering, redusert vekttap og en smolt som er mer robust og mindre mottakelig for sykdom ved utsett. Dette tenkes å redusere svinn i sjø. Det er i dag publisert litteratur med ulike konklusjoner om hvorvidt behandling med saltberiket fôr bidrar til fullstendig smoltifisering, og god nok sjøvannstoleranse for et liv i saltvann.

I dette forsøket ble to størrelsesgrupper av Atlantisk lakseparr (*Salmo salar* L.) med startvekt 40 g og 130 g behandlet med daglengdemanipulasjon og saltberiket fôr for å stimulere smoltifisering, og deretter overført til sjøvann. I ferskvannsfasen var målet å studere utviklingen av sjøvannstoleranse basert på blodprøver fra sjøvannstester og genuttrykk/aktivitet av saltvannspumper i gjelle hos følgende behandlingsgrupper: kontinuerlig lys (LL) og LL avbrutt av et seks ukers opphold på kort daglengde (SP, 18:6t mørke/lys) på kontrollfôr, og samme behandlingsgrupper på saltberiket fôr (LL +salt og SP +salt). Ferskvannsperioden varte i fire måneder (februar – mai) med prøveuttak i februar (T1), mars (T2) og mai (T3). Blod fra fisk på sjøvannstester (24 t) og prøveuttak av gjellevev utgjorde det biologiske materialet for laboratorieanalyser og statistiske beregninger ble basert på resultater fra dette. Resultatene fra enzymaktiviteten, Na^+/K^+ -ATPase (NKA), var noe uforventet ettersom det ikke var noen klar forskjell mellom behandlingsgruppene og heller ingen markant økning i løpet av ferskvannsfasen. Utviklingen av NKA genuttrykk viste at $\alpha 1a$ isoformen (ferskvannsformen) ble redusert hos alle behandlingsgruppene, mens $\alpha 1b$ (saltvannsformen) ble forsterket hos begge saltgruppene hos små fisk, samtidig som det ikke var klare forskjeller og endringer hos stor fisk. Plasma osmolalitet etter sjøvannstestene minket gradvis i løpet av ferskvannsperioden hos alle behandlingsgruppene, mens kloridkonsentrasjonene ikke endret seg vesentlig. Både osmolalitet- og kloridverdier var imidlertid innenfor det som forventes hos sjøvannsadaptert laks.

På tross av få forskjeller mellom behandlingsgruppene i løpet av ferskvannsfasen, var det markante effekter av behandlingene på sjøvannsprestasjon. Gruppene som ikke ble gitt smoltstimulerende behandling i ferskvann (LL kontroll) hadde lav tilvekst mens SP kontroll (standard smoltifiseringsbehandling) hadde 3 til 6 ganger høyere tilvekst enn LL kontroll den første måneden i ferskvann. Tilveksten i LL +salt kom noenlunde likt ut med hensyn til tilvekst

som SP kontrollgruppene, mens gruppene hvor lys- og saltbehandling ble kombinert kom best ut, særlig hos stor fisk. Konklusjonene er at saltberiket fôr gir en god tilvenning til et liv i saltvann mht. hypoosmoregulering, men at lysbehandling stimulerer egenskaper som forbedrer fiskens prestasjon i sjøen. Dette studiet kan ikke gi svar på hvilke, men hormonelle og metabolske tilpasninger kan være mulige kandidater.

Innhold

| | |
|---|-----------|
| 1. Innledning | 1 |
| 1.1 Smoltifisering hos Atlantisk laks | 1 |
| 1.2 Fotoperiode og temperatur | 2 |
| 1.3 Endokrin kontroll | 2 |
| 1.3.1 Ione -og osmoregulering | 3 |
| 1.3.3 Morfologi | 5 |
| 1.4 Produksjon av Atlantisk laksesmolt i oppdrettsnæringen | 6 |
| 1.4.1 Smoltproduksjon ved bruk av salt i føret | 6 |
| 1.5 Hypotese og målsetting | 7 |
| 2. Materiale og metode | 8 |
| 2.1 Forsøksfisk | 8 |
| 2.2 Velferd | 8 |
| 2.3 Forsøksdesign | 8 |
| 2.4 Prøveuttak | 9 |
| 2.5 Analyser | 11 |
| 2.5.1 Klorid | 11 |
| 2.5.2 Osmolalitet | 12 |
| 2.5.3 NKA aktivitet i gjellevev | 12 |
| 2.5.4 Genuttrykk i gjelle | 13 |
| 2.6 Databehandling, statistiske analyser og grafiske fremstillinger | 18 |
| 2.6.1 Utrekninger | 18 |
| 3. Resultater | 21 |
| 3.1 Ferskvannsfasen | 21 |
| 3.1.1 Fisk til prøveuttak | 21 |
| 3.1.2 Genuttrykk i gjeller | 22 |
| 3.1.3 Sjøvannstester | 25 |
| 3.1.4 Floy-merket fisk i ferskvannsfasen | 28 |
| 3.2 Sjøvannsfasen | 31 |
| 3.2.1 Floy-merket fisk | 31 |
| 3.2.2 Fôrutnyttelse | 32 |
| 4. Diskusjon | 35 |
| Referanser | 43 |
| Appendix I – Uttaksdato | 52 |
| I.I – Datooversikt over prøveuttak fra fisk i ferskvann | 52 |
| I.II – Datooversikt over vekt og- lengdemåling av Floy-merket fisk. | 53 |

| | |
|--|-----------|
| Appendix II – Kjemikalier og metode ved analyser..... | 54 |
| II.I NKA aktivitet..... | 54 |
| II.II RNA analyser | 57 |
| Appendix III – Fôrsammensetning | 58 |
| Appendix IV..... | 59 |
| Veksttabell for Atlantisk laks i sjøvann fra Skretting..... | 59 |
| Bildeappendix | 60 |
| Morfologi | 60 |
| Liten størrelsesgruppe ved T3 | 60 |
| Stor størrelsesgruppe ved T3 | 62 |

1. Innledning

1.1 Smoltifisering hos Atlantisk laks

Laksefamilien (*Salmonidae*) består av elleve ulike slekter som alle tilhører klassen Beinfisk (*Teleostei*). Én slekt, særs kjent i norsk oppdrettsnæring, er *Salmo*. Det er innenfor denne slekten vi finner arten *Salmo salar* (Linnaeus, 1758), populært kalt Atlantisk laks eller bare laks. Denne arten er viktigst i norsk oppdrettsnæring. Den ville laksen klekker i ferskvann, hvor den etter ett til syv år, oppholdet avhenger av breddegrad, forlater ferskvannet og migrerer ut i sjøen på jakt etter rikelig med føde (Metcalfé *et al.*, 1990). Når den sjøvannsdyktige unge fisken, smolten, skal forlate ferskvann er det svært avgjørende at dette skjer i et såkalt økologisk smoltvindu (McCormick *et al.*, 1998). Det økologiske aspektet er her basert på at det estuarine miljø, overgangen mellom fersk -og saltvann, har riktig temperatur og god tilgang på næring når smolten migrerer og passerer denne sonen. Et nødvendig utgangspunkt for høy overlevelse er også at fisken er fysiologisk klar for denne overgangen, noe som innebærer at smolten på forhånd har gjennomgått de forandringer som kreves for å blant annet håndtere sjøvannets høye saltinnhold (McCormick *et al.*, 2013). Hvis smolten overlever migrasjonen vil den etter ett til fem års vekst i havet vende tilbake til elven den opprinnelig forlot for å gyte og dermed fullføre sin livssyklus (Thorstad *et al.*, 1987). Det biologiske fenomenet der fisk migrerer til sjøen for å utnytte de rike matforekomstene og deretter vende tilbake til ferskvann for å gyte kalles anadromi (Meek, 1916).

Transformasjonen fra å være en territoriell, aggressiv og stasjonær parr, til å bli en marin, pelagisk karnivor krever en rekke uavhengige, men koordinerte biokjemiske, fysiologiske, morfologiske og atferdsmessige endringer (McCormick *et al.*, 1987; Stefansson *et al.*, 2008). Utviklingen av disse endringene i individet kalles parr-smolt transformasjon (PST), eller smoltifisering. Forandringer i lipidmetabolisme, ione- og osmoregulering, oksygentransport, oppdrift, vekst, farge, form og atferd er alle viktige forberedelser på et marint liv. Endringene synkroniseres av ytre faktorer, spesielt fotoperiode (daglengde, antall timer lys gjennom døgnet) og temperatur, slik at smoltifiseringen er fullført når det økologiske smoltvindu inntreffer (McCormick *et al.*, 2013). På tross av adaptive forandringer vil nedstrøms -og sjøvannsmigreringen allikevel være knyttet til naturlig høy dødelighet (Dempson *et al.*, 2011; Kocik *et al.*, 2009; Lacroix *et al.*, 2005). Ferdslen gjennom områder preget av høyt

predasjonspress og varierende tilgang på næring anses som primære årsaker til denne dødeligheten (Spence *et al.*, 2010).

1.2 Fotoperiode og temperatur

Smoltifisering starter når lakseungen, parren, har nådd en tilstrekkelig størrelse (≈ 10 cm). Den naturlige prosessen er synkronisert av en årlig fotoperiodesyklus med avtagende daglengde på høsten, etterfulgt av kort daglengde på vinteren og deretter økt daglengde på våren (Duston *et al.*, 1992; Skilbrei, 1991; Villarreal *et al.*, 1988). For at smoltifiseringen skal være fullstendig er fisken altså avhengig av å ha vært eksponert for kort daglengde, et vintersignal, før våren kommer (Björnsson *et al.*, 1989; Clarke *et al.*, 1989; Stefansson *et al.*, 1992; Thrush *et al.*, 1994).

Forlenget fotoperiode om våren utløser en robust utvikling av nerveforbindelser mellom retina og det preoptiske nukleus i forhjernen, hvorfra regulatoriske funksjoner i hypotalamus styres (Ebbeson *et al.*, 2007). Plasmanivået av veksthormon (GH), kortisol, og thyroindhormoner øker ved forlenget daglengde. Veksthormon er spesielt responsivt der endringer i plasmanivå kan måles allerede etter noen dager (Björnsson *et al.*, 2011; McCormick *et al.*, 1995). Fotoperiode er altså en sesongbetiget tidsgiver («zeitgeber») som utløser en kompleks rekke av utviklingsmessige prosesser som samtidig synkroniserer det fysiologiske med det økologiske smoltvinduet. Det er tidligere vist at smoltifiseringsprosessen krever ca. 360 døgngader (= antall dager x gjennomsnittlig temperatur) for å bli komplett og økte vanntemperaturer vil derfor bidra til en raskere smoltutvikling (Handeland *et al.*, 2004).

1.3 Endokrin kontroll

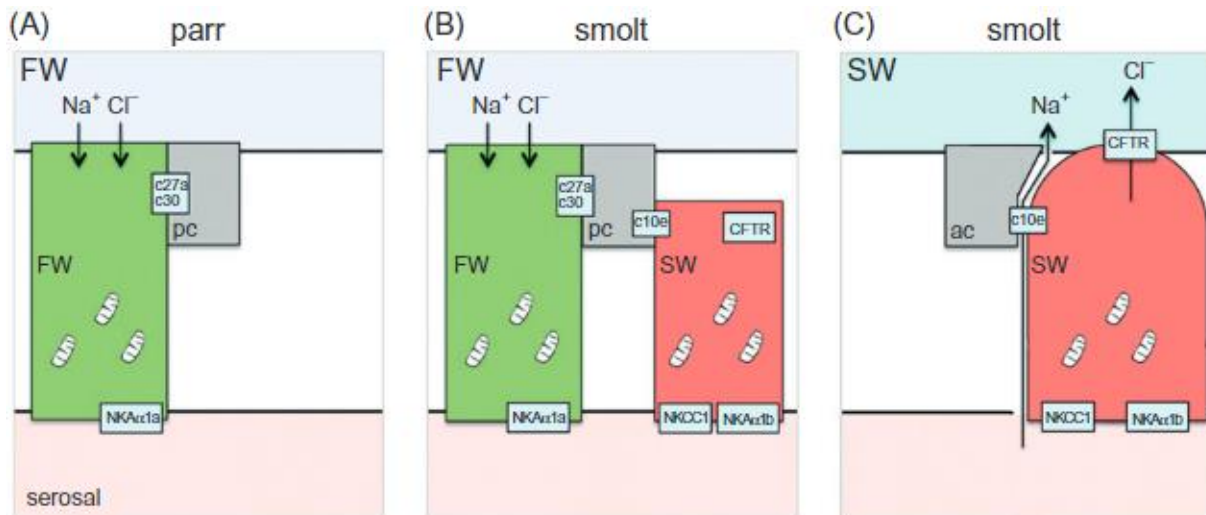
I hypofysen finnes det spesialiserte celler som sørger for produksjon og sekresjon av mange hormoner, blant annet veksthormon, adrenokortikotropt hormon, thyroidea stimulerende hormon og prolaktin, som alle er med på å stimulere og regulere smoltifiseringen (McCormick, 2013b).

Veksthormon og kortisol interagerer for å stimulere utviklingen av hypo-osmoregulatoriske mekanismer i gjelle, mage/tarm og nyre, som igjen resulterer i økt salinitetstoleranse og forandringer i vekst og metabolisme (McCormick *et al.*, 2000). Thyroidhormoner har en viktig rolle i reguleringen av morfologiske forandringer (sølvfarging) og atferd. Det er derimot antatt at prolaktin virker inhiberende på smoltifisering ettersom det er vist at plasmanivået av dette hormonet reduseres under PST (McCormick, 2013b).

1.3.1 Ione -og osmoregulering

God sjøvannstoleranse innebærer at fisken utvikler hypo-osmoregulatorisk kapasitet, funksjonelt relatert til fysiologiske forandringer i gjelle, tarm og nyre (Hoar, 1988). Den unge lakseparren har mekanismer som sørger for et aktivt opptak av natrium (Na) og klorid (Cl) over gjellene i ferskvann for å kompensere det tap av ioner over gjellevevet som skyldes konsentrasjonsgradienten mellom ferskvann (0 mOsmol/kg) og fiskeblod (\approx 330 mOsmol/kg). Samtidig skiller den ut mye, og fortynnet, urin for 1. å kvitte seg med vann som siver inn i fisken og 2. minimalisere passivt tap av ioner til miljøet. I løpet av smoltifiseringen tilegner fisken seg evnen til å aktivt drikke saltvann for å forhindre dehydrering på grunn av passivt tap av vann til miljøet. Det blir avgjørende at laksen skiller ut små mengder iso-osmotisk urin med overflødig innhold av divalente kationer, samt aktivt sekreter Na og Cl over gjellene for å kompensere for en passiv influx av ioner over gjellene, men også for de ionene som følger med sjøvannet når fisken drikker. Dette er nødvendig for å opprettholde den osmotiske gradienten mellom fiskens indre miljø (330 mOsmol/kg) og sjøvannet utenfor (1000 mOsmol/kg) (Edwards *et al.*, 2013; Evans *et al.*, 2005). Grad av sjøvannstoleranse hos fisk i fangenskap er ofte bestemt ved å måle osmolalitet og konsentrasjon av kloridioner i plasma etter direkte overføring fra ferskvann til sjøvann i en bestemt tidsperiode (for eksempel 24 t), kjent som sjøvannstest (Clarke *et al.*, 1996).

Økte nivåer av veksthormon i plasma resulterer også i økte nivåer av insulinliknende vekstfaktor I (IGF-I) (Stefansson *et al.*, 2012). Kortisolnivået vil også øke, og sammen vil disse hormonene stimulere til cellulære og biokjemiske endringer i spesielle ionocytterceller i gjellene, kalt mitokondrierike celler eller kloridceller. Disse finnes i to typer; en som fungerer når fisken er i ferskvann og en annen som fungerer når fisken er i saltvann (Fig. 1).



Figur 1 – Forenklet, skjematisk fremstilling av hvordan kloridcella forandres under smoltifiseringsprosessen ved eksponering for ferskvann (FW) og saltvann (SW). $\text{NKA}\alpha 1a$ dominerer hos parr i ferskvann (A). Under smoltifiseringen vil antallet av $\text{NKA}\alpha 1b$ pumper øke (B). Etter eksponering til sjøvann (C), vil antallet $\text{NKA}\alpha 1b$ pumper øke ytterligere, samtidig som $\text{NKA}\alpha 1a$ forsvinner gradvis. NKA: Na^+/K^+ -ATPase; NKCC: $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter; CFTR: systisk fibriotiske transmembranregulator (McCormick, 2013a)

Sjøvannskloridcella inneholder flere ionepumper. NKCC er lokalisert i den basolaterale membranen og pumper Na^+ , K^+ og Cl^- ioner fra ekstracellulærvæska inn i kloridcella. NKA er også lokalisert i den basolaterale membranen, og denne pumper Na^+ ut av -og K^+ inn i kloridcella og sørger for at Na^+ -gradienten som er nødvendig for at NKCC skal fungere er opprettholdt. Dette fører til økte nivåer av Cl^- ioner i kloridcella som vil følge en positiv elektrokjemisk gradient gjennom en apikalt lokalisert Cl^- kanal, kjent som CFTR, og strømme ut i sjøen. Natriumkonsentrasjonen i ekstracellulærvæska utenfor kloridcella blir også høy etter virkning fra NKAs funksjon og forsvinner fra gjellene via en paracellulær passasje (McCormick, 2013b). NKA pumpas katalytiske enhet hos Atlantisk laks opptrer i to isoformer; $\text{NKA}\alpha 1a$ i ferskvannskloridcella, -og $\text{NKA}\alpha 1b$ i saltvannskloridcella (McCormick *et al.*, 2009). I ferskvann er $\text{NKA}\alpha 1a$ lokalisert i både filamentære- og lamellære kloridceller, mens forekomsten av $\text{NKA}\alpha 1b$ er svært begrenset og kan observeres i mindre filamentære kloridceller som oppholder seg under epidermisk lag og vil av den grunn ikke eksponeres til det ytre miljø, slik som ferskvannskloridcella. Det er først når gjellene eksponeres for sjøvann at sjøvannskloridcella vil foreligge i den apikale overflaten og med dette være kontinuerlig eksponert til det ytre miljø. På dette tidspunktet er uttrykket av $\text{NKA}\alpha 1a$ sterkt redusert. Økt forekomst av $\text{NKA}\alpha 1b$ synes å være avgjørende for saltvannstoleranse hos smolt, da mengden gjelle-mRNA av $\text{NKA}\alpha 1b$ øker under smoltifiseringsprosessen, mens mengden mRNA av $\text{NKA}\alpha 1a$ minker (Bystriansky *et al.*, 2006; McCormick, 2013a; Nilsen *et al.*, 2007; Richards *et*

al., 2003). Smoltifiseringen medfører også økt aktivitet av Na^+/K^+ -ATPase ionepumpa og denne utviklingen er også en mye brukt indikator på om fisken er smoltifisert eller ikke (McCormick *et al.*, 2007).

1.3.3 Morfologi

Produksjonen av thyroidhormoner, tyroksin (T4) og triiodothyronine (T3), øker under smoltifiseringen og anses å være involvert i atferdsendringer og morfologiske forandringer (Hoar, 1988). Morfologiske forskjeller mellom en parr og en smolt er svært åpenbare (Fig. 2). Parr har som oftest mørke, tykke striper som er vertikalt anlagt i laksens skinnoverflate. Under smoltifisering vil disse merkene reduseres og gradvis forsvinne, mens den klassiske sølvfargen vil eksponeres adskillig tydeligere, samt at halefinnen, ryggfinnen og bukfinnen blir mørkere. Den tydelige sølvfargen er et resultat av økt deponering av guanin og hypoxanthin i skinn og skjell (Johnston *et al.*, 1967), og sikrer kamuflasje i et pelagisk levesett. Utviklingen av de gradvis mørkere finnene skyldes flere uker med ekspansjon av melanoforer, eller fargelegemer (Mizuno *et al.*, 2004). Smolten er også slankere enn parren. Dette skyldes en økt lineær vekst under PST og smolten vil naturlig ha lavere ratio mellom vekt og lengde, kondisjonsfaktor, enn det parren har. Etersom smoltifiseringen krever betydelig med energi, vil prosessen i stor grad påvirke den generelle metabolske aktiviteten i form av mindre bevegelse og redusert fettprosent (McCormick *et al.*, 1987). Den hurtige lengdeveksten fremmer gode svømmeegenskaper og vil, sammen med de øvrige endringene, øke overlevelsessjansene mot predasjonspress etter sjøvannsmigrasjon.



Figur 2 - Morforlogiske forskjeller mellom en parr (øverst) og en smolt (nederst) av Atlantisk laks (McCormick, 2013b).

1.4 Produksjon av Atlantisk laksesmolt i oppdrettsnæringen

I dag produseres det stort sett smolt som kan sjøsettes både om høsten og om våren. Det er vanlig at det legges inn to grupper med rogn på ulikt tidspunkt slik at de ikke klekker samtidig samme år. Dette hindrer akkumulering av biomasse på et bestemt tidspunkt i anlegget. Rogn som skal bli høstsmolt (1/2 års) legges inn i perioden desember – januar som øyerogn, mens rogn som skal bli vårsmolt (1 års) legges inn i klekkeriene fra februar – mars. Etter klekking holdes yngelen på kontinuerlig lys for å sikre maksimal tilvekst. For høstsmoltproduksjon er det viktig med høy vanntemperatur for å fremskynde utviklingen av individene, og når snittvekten ligger rundt 20 gram i slutten av juni er det vanlig å bruke daglengdemanipulasjon for å stimulere smoltifiseringen. Daglengdemanipulasjon består i å redusere daglengden fra 24 t lys til 12 t lys hvoretter fisken holdes på denne daglengden i 6 uker og deretter overføres tilbake til 24 t lys for å stimulere smoltifiseringen. Laksen har da vært i gjennom komprimert daglengdebehandling og skal være klar for utsett i sjø etter 6 uker på 24 t lys dersom temperaturen er over 10°C i denne perioden (Stefansson *et al.*, 2005). Bruk av lysstyring som etterligner de naturlige lysforhold den ville lakseungen opplever (lang dag → kort dag → lang dag) i naturen, har altså vært den dominerende og sikreste metode for å stimulere og tidfeste smoltutvikling i norsk lakseoppdrett. Heretter blir denne smolten kalt lys-stimulert smolt.

1.4.1 Smoltproduksjon ved bruk av salt i fôret

Tidligere studier viser at saltberiket fôr (ca. 10-11% NaCl) stimulerer til økt tetthet av kloridceller og økt NKA aktivitet i gjella, og dermed forbedret salinitetstoleranse (Basulto, 1976; Jackson, 1977; Perry *et al.*, 2006; Salman *et al.*, 1988; Zaugg *et al.*, 1969; Zaugg *et al.*, 1983). Disse forskningsrapportene har blant annet ført til at kommersielle aktører har utviklet saltberiket fôr til produksjon av smolt uten bruk av lysbehandling (heretter kalt salt-stimulert smolt).

I Norge har firmaet Europharma AS (Leknes, Norge) utviklet et konsept, SuperSmolt, der smoltifisering stimuleres ved at fisken gis et patentert spesialfôr. Patentet hevder at fôret, som inneholder en forhøyet mengde kalsium, magnesium, natrium kloridioner og aminosyrer, vil via kalsium sensitive reseptorer føre til en raskere og mer kontrollert smoltifisering uten bruk av lysstyring. Dette hevdes å være fordelaktig i og med at lysstyringen fører til redusert kroppsvekt i den perioden fisken holdes på kort dag, samt at fisken ikke desmoltifiserer dersom overføring til sjø utsettes (Europharma, 2010). Vi vet at det i gjennomsnitt dør ca. 15-20% av

all smolt som settes ut i sjøen i dagens næring (SSB, 2016), og at smolt som ikke dør kan ha dårlig appetitt og tilvekst. Dette betyr at mange post-smolt har dårlig velferd samtidig som produksjonskostnader øker. En fullverdig smoltifisering i settefiskfasen er altså nødvendig for fullgod vekst og trivsel i sjøfasen. Det finnes imidlertid i dag ingen vitenskapelig dokumenterte resultater for effekten av SuperSmolt konseptet på fiskens smoltutvikling, prestasjon og velferd etter utsett i sjø, slik vi kjenner den hos fullverdig smolt utviklet ved bruk av lysstyring.

1.5 Hypotese og målsetting

Vår hypotese er at saltstimulert smolt utvikler sjøvannstoleranse (evne til å regulere ione -og vannbalansen i sjøvann), men at de mangler mange av de andre egenskapene som lysstimulert smoltifisering medfører, herunder den hormonelle status som etter sjøsetting sørger for høy appetitt og et mage-tarm system som evner å prosessere både store mengder saltvann og fôr, og at de således ikke er en fullverdig smolt.

Dette ble undersøkt ved å sammenligne smoltutvikling i ferskvann og prestasjon i sjøvann hos salt- og/eller lystimulert smolt. Forsøket ble gjennomført på to størrelsesgrupper som tilsvarer 0+ (startvekt = 40 g) og 1+ smolt (startvekt = 130 g). Gjennom behandlingsperioden i ferskvann ble det avlivet fisk for blod- og vevsprøver til analyser av osmolalitet, klorid, genuttrykk og enzymaktivitet. Det ble også gjennomført sjøvannstester for å studere utvikling av sjøvannstoleranse. I tillegg ble en undergruppe i hver behandlingsgruppe individmerket for lengde- og vektmåling gjennom hele ferskvannsfasen. Etter ferskvannsperioden ble den individmerkede fisken overført til sjøvann og holdt der i 2 måneder. Fiskens tilvekst og fôrintak ble studert underveis.

2. Materiale og metode

2.1 Forsøksfisk

Befruktet rogn var levert av AquaGen (Trondheim, Norge) og ble inkubert og klekket ved Havbruksstasjonen i Kårvika, Tromsø, hvor forsøket ble gjennomført. Yngelen gikk på kontinuerlig lysregime etter startfôring (17. mars, 2017) og frem til start av forsøket. Fisken ble fôret kontinuerlig gjennom hele døgnet med fôringsautomater i henhold til stasjonens rutiner og protokoller.

Fiskegruppen ble etter startfôring delt i 2 grupper. Den ene gruppa ble holdt på 10°C ferskvann fra startfôring til september, deretter 4°C ut november og til slutt på 10°C før forsøksstart den 6.februar 2018. Den andre gruppa gikk på 4°C fra startfôring frem til 2 uker før forsøksstart, da temperaturen ble økt med 0,5°C/dag slik at den var 10°C ved start av forsøket. Dette resulterte i 2 forsøksgrupper med fiskevekter på 40 og 130 gram.

2.2 Velferd

Forsøket ble utført i henhold til EU og Norge sitt lovverk for dyreforsøk, og er godkjent av det norske Mattilsynet (Fots id. 13891). Lengde -og vektmåling ble gjennomført etter fisken var bedøvd i 60 ppm Benzokain, mens det før blodprøver og vevsuttak ble brukt overdosering med 160 ppm Benzokain og dekapitering.

2.3 Forsøksdesign

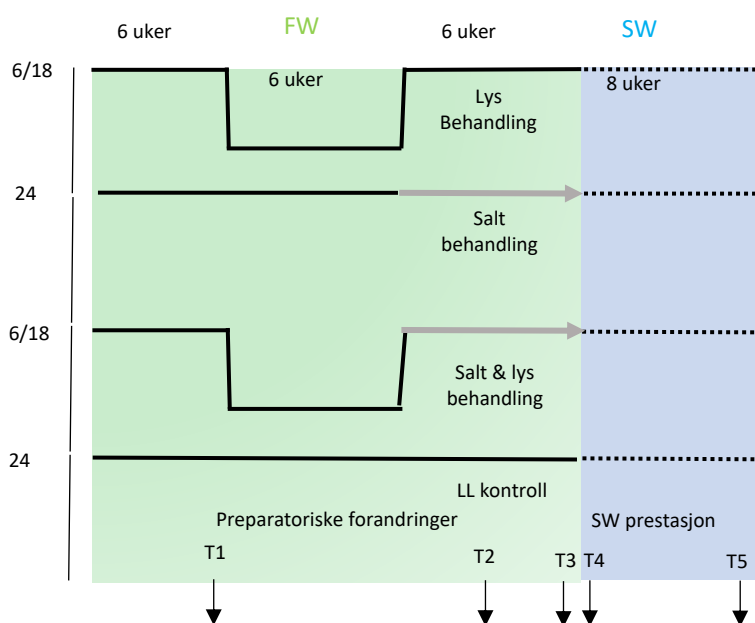
Ved forsøksstart flyttet vi fisk fra sine respektive stamkar til i alt 16 kar på 4 rom i forsøksavdelingen. Totalt 1400 parr på 30 gram ble fordelt på to kar i hvert av de fire rommene; 175 fisk/kar i totalt åtte kar. Totalt 1000 parr av 130 gram størrelse ble også fordelt i åtte kar, altså 125 i hvert. Karene var sirkulært utformet med 300 liters volum og vanninntaket ble justert slik at det ble dannet en sirkulær strøm i karene tilsvarende en vannstrøm på ca 1 kroppslengde i sekundet for å redusere tendensen til dannelse av sosiale hierarkier



Figur 3 - Forsøksfisk merket med Floy Tag.

og for å gi bedre spredning av fôret (Jørgensen *et al.*, 1994). I alt 20 fisk fra hver størrelsesgruppe i alle behandlingsgrupper ble individmerket med «fingerling» Floy-tags (Floy Tag Inc, WA, USA; Fig. 3). Datooversikt over vekt- og lengdemåling for Floy-merket fisk finnes i tabell 2 (Appendix I).

Etter prøveuttak fra stamkaret ved starten av forsøket (Fig. 4, T1) ble to dupliserte behandlingsgrupper i hver størrelsesgruppe (4 kar/størrelsesgruppe) satt over på redusert daglengde (SP; 6-t lys:18-t mørke), mens de resterende behandlingsgruppene ble videreført på kontinuerlig lys (LL). Etter 6 uker ble det gjort et nytt prøveuttak av fisk (T2, Appendix I; tabell 1). Etter prøveuttak ved T2 ble gruppene delt inn i to ulike diettregimer. En gruppe av hver lysbehandling (fire kar/størrelsesgruppe) ble gitt kontrollfôr (heretter kalt SP og LL), mens den andre ble gitt saltfôr (heretter kalt SP +salt og LL +salt). Kontroll- og saltfôret var produsert av Skretting (Stavanger, Norge) og saltfôret var en nær nøyaktig kopi av det saltfôr som brukes i næringen for å produsere smolt uten lysstyring. Sammensetning av kontroll- og saltfôret er gitt i Appendix III, tabell 8. I perioden hvor halvparten av gruppene ble gitt kort dag ble det fôret ut overskudd av pellets med skiveautomat i lysperioden for kortdagsgruppa for alle behandlingsgrupper. Ved avslutning av ferskvannsfasen (15.05.2018) ble alle individmerkede fisk fra duplikatene i hver behandlingsgruppe samlet i et av karene, hvoretter det ble tilført sjøvann (33 ‰, 7°C). Fisken ble holdt på sjøvann i 2 måneder (t.o.m 11.07.2018, Fig 4) og fôret med kommersielt tilvekstfôr fra Skretting.



Figur 4. Skjematisk presentasjon av forsøksdesignet. Gruppene består av yngel i to størrelsesgrupper tilsvarende 0+ og 1+ smolt. Svarte horisontale linjer representerer daglengden, gråe horisontale piler markerer lengden av saltbehandling, og sorte vertikale piler når prøveuttak (T1 – T3) og vekt- og lengdemåling (T1 – T5) ble utført. Alle prøveuttak under ferskvannperioden inkluderer også fisk som har blitt sjøvannstestet. Eksperimentet ble utført ved Havbruksstasjonen i Tromsø.

2.4 Prøveuttak

I ferskvannsfasen ble det gjort uttak av fisk på 3 ulike tidspunkt; T1, T2 og T3 (tabell 1, Appendiks I). Ved T1 ble 10 tilfeldige fisk av hver størrelsesgruppe håvet opp fra stamkaret og anestesert i 160 ppm Benzokain vet. (ACD Pharmaceuticals AS Oslo, Norge). Videre ble fisken veid ($\pm 0,5$ g) og lengdemålt (gaffellengde; $\pm 0,1$ cm). Etter dekapitering ble fiskens venstre gjellelokk fjernet fra hodet og det ble tatt prøver av første gjellebue fra hodets venstre side; gjellefilamentene ble skilt fra brusfestet og delt i to biter. Disse ble videre delt inn i enda to biter, slik at det var fire mindre biter. To og to av disse vevsprøvene ble lagt på sine respektive rør med 1 ml RNAlater (Sigma Aldrich, Darmstadt, Tyskland) og merket med permanent tusj. Av det resterende gjellevevet ble det skåret ut 4-5 korte filamentbiter som ble overført til rør med 100 μ l iskald SEI-buffer (150 mM sucrose, 10 mM EDTA, 50 mM imidazole, pH 7.3) og deretter holdt på is. Alle vevsprøvene på RNAlater ble lagt i kjøleskap (4°C) i 24 timer før de ble overført til fryser (-20°C) inntil analyser av genuttrykk. Gjelleprøvene som lå på SEI-buffer ble også frosset ned på biofryser (-80°C) til lagring for senere analyser av NKA aktivitet. Lagringen av prøver ble gjort etter prøveuttak av hver femte fisk. Samme prosedyre ble gjennomført på 2 x 5 fisk fra hvert duplikat av behandlingsgruppene ved T2 og T3. I tillegg ble alle individmerkede fisk ved hvert prøvetidspunkt håvet ut av karet, anestesert i 60 ppm Benzocaine, veid og lengdemålt før de ble satt tilbake i karet.

Ved prøveuttak (tabell 1, Appendiks I) ble 10 fisk fra stamkaret ved T1 og 5 fisk fra hvert duplikat (N=10) av behandlings- og størrelsesgruppe ved T2 og T3 overført til et 100 L kar med sjøvann (33 ‰, 7°C) i 24-timer på LL (sjøvannstest, SWT), uten fôring. De ble deretter håvet opp og overdosert med 160 ppm Benzokain vet. (ACD Pharmaceuticals AS, Oslo, Norge). Videre ble fisken veid, lengdemålt, tatt blod- og gjelleprøver av og til slutt dekapitert før destruksjon. Individene ble tatt blodprøver av ved å stikke kanyler inn bak bukfinnen til nålen traff *Vena caudalis*. Blodet ble samlet i lithiumtilsatte hepariniserte vacutainere (BD Vacutainer, 2 ml 13x75 mm, BD diagnostics, Preanalytical systems, Berkshire, England) og satt på is. Videre ble prøvene spunnet ned i sentrifuge ved 10,000 rpm i 10 min (6000*g). Plasma ble deretter pipettert over i eppendorfrør og overført til biofryser (-80°C). Veiing, lengdemåling, blod- og gjelleprøver ble også tatt fra 10 umerkede fisk fra hver behandlingsgruppe 7 dager etter overføring til sjø. Dette ble gjort på samme måte som med fisk på 24 timers SWT. Prøvene ble også her lagret og oppbevart på samme måte som tidligere før de ble analysert for osmolalitet- og kloridkonsentrasjon.

En og to måneder etter overføring til sjøvann ble karene tappet ned til halvfullt volum (150-200 liter) og tilsatt en lav dose Benzokain (ca. 20 ppm). Når fisken i karene reagerte lite på håven, ble alle individmerkede fisk overført til en stamp med ferskvann med normaldose av Benzokain (60 ppm). Etter vellykket anestesering ble fisken lengdemålt og veid før den ble lagt tilbake i oppvåkningskar med friskt ferskvann og overført til sine respektive kar. Etter siste vekt- og lengdemåling i sjøfasen ble fisken først anestesert i en overdose Benzokain, lengdemålt og veid og til slutt avlivet ved dekapitering.

Ved hvert prøveuttak ble sølvfarging av fiskens overflate vurdert og gitt en score på skala fra 1 (godt synlige parrmerker), 2 (mindre synligere parrmerker) og 3 (ikke synlige parrmerker).

2.5 Analyser

2.5.1 Klorid

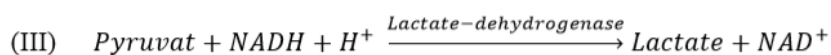
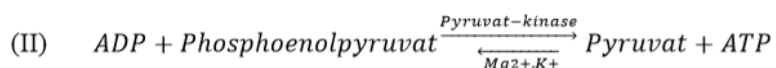
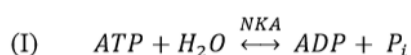
Kloridkonsentrasjonen i plasmaprøvene ble analysert med en Chlorid Analyser M925 (CIBA Corning Diagnostics, Essex, England) der endringer i væskens ledningsevne registreres av maskinen. Et glassbeger med 14 ml syrebuffer ble plassert slik at sølvelektroden ble suspendert i bufferløsningen. 2 x 20 µl Cl⁻/l standard 100 mM (MultiCal, Bayer HealthCare, Nederland) ble tilført løsningen for kondisjonering av maskinen. Det ble så på nytt tilført 20 µl Cl⁻/l standard før løsningen ble titrert. Dette ga et resultat på 100 (± 3) mM og ble gjentatt tre ganger for å utelukke eventuelle avvik. Videre ble plasmaprøvene vortexet i 15 sek og deretter tilsatt 20 µl serumprøve i syrebufferen. Maskinen titrerte automatisk kloridionene ved at de reagerte med sølvionene fra sølvelektroden som er senket ned i bufferen fra maskinen. Underveis som titreringen forekommer oppdateres verdidisplayet på maskinen hvert 0,3 sekund og det er i denne tidsperioden sølvionene reagerer med klorid. Når alle kloridionene er presipitert som sølvklorid, vil frie sølvioner dukke opp i løsningen. Denne forandringen detekteres av maskinens elektroder og verdien fastsettes. Resultatverdien leses som milligram klorid per liter prøve. Nøyaktigheten til instrumentet er på ±2.2 mM ved en løsning på 100 mM (CibaCorning, 1980). 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.

2.5.2 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 ± 4 mOsm kg⁻¹ (H. K. Johnsen, pers. com., 4 juni, 2018). 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 kg⁻¹, Accuref 290, Fiske Associates, MA, USA). Det ble gjennomført en kalibreringstest etter hver tiende prøve. Hver plasmaprøve ble analysert to ganger. I de tilfeller hvor resultat avviker med mer enn fire mOsm kg⁻¹ ble det gjennomført en tredje eller fjerde prøve. I resultatet er gjennomsnittet av de to nærmeste verdiene benyttet.

2.5.3 NKA aktivitet i gjellevev

Til å registrere NKA aktivitet i gjellevev ble en metode skildret av McCormick og Schrock benyttet (McCormick, 1993; Schrock *et al.*, 1994). NKA aktiviteten blir angitt ved å se på hastigheten en gitt mengde enzym hydrolyserer ATP til ADP og Pi. 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 appendiks II. Av hver standard ble 10 μl applisert før det ble tilsatt 200 μl AM–

saltløsning (tabell 4, appendiks II). Dette ble utført i triplikater på mikroplaten. Umiddelbart etter pipettering ble leseplaten plassert inn i plateleser og lest av ved 340 nm i 10 min, med intervaller på 30 sekunder. Dette gir raten NADH blir oksidert til NAD⁺ på. 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 µl 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 *et al.*, 1993). Mikroplata holdes på is under pipetteringa, og settes umiddelbart inn i analysemaskinen for avlesing på 340 nm i 10 min. Enzymaktiviteten blir deretter beregnet etter forskjellen ATP hydrolyse utgjør uten -og med Ouabain. Resterende prøvemateriale fryses for senere å bli brukt til proteinanalyse. Proteinanalysen ble utført ved hjelp av *BCA Protein Assay Reagent Kit* (Pierce, Illinois, USA). Proteinanalysen er nødvendig ettersom vi ønsker å finne ut omsettinga av ADP per mg protein per time. Kittet gir resultatet i mengde protein per volum (µg protein µl⁻¹) og blir brukt til å regne ut endelig enzymaktivitet (tabell 6 i appendiks II).

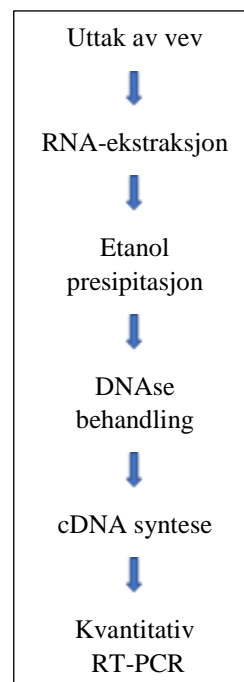
2.5.4 Genuttrykk i gjelle

Real-Time Reverse-Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) analyse ble utført for kvantifisering av mRNA fra NKA-isoformene $\alpha 1a$ og $\alpha 1b$, CFTR I og II og NKCC I i gjellene. 10 fisk fra hver behandlingsgruppe, 5 store og 5 små, i ferskvann ved T1, T2 og T3 (N=140) ble brukt til analyser. Flytskjema for prosessen er presentert i Fig. 5.

2.5.4.1 RNA ekstraksjon

Etter protokoll (Qiagen, 2014) ble RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Alameda, CA, USA) brukt for RNA ekstraksjon av gjelleprøvene. Omtrent 30-50 mg gjelleprøve i 2 ml mikrosentrifugerør ble homogenisert i 900 µl QIAzol lysis agent sammen med en 5 mm kule i rustfritt stål ved bruk av Tissuelyser II systemet (25Hz, 2,5min). Etter homogenisering sto rørene på benken i romtemperatur (20-25°C) i 5 minutter. Så ble lysatet overført til nye 1,5ml mikrosentrifugerør, tilsatt 100 µl gDNA Eliminator løsning og vortexet i 15 sek. Videre ble det tilført 180 µl kloroform til løsningen, vortexet i 15 sek og deretter sentrifugert i 15 min ved 4 °C. Dette førte til at løsningen deltes inn i 3 faser; en transparent øvre vannfase med RNA, en hvit mellomfase og en nedre lyserød organisk fase. Vannfasen (580 µl) ble pipettert over i nye mikrosentrifugerør og blandet med 580 µl 70% etanol. Videre ble 700 µl av løsningen pipettert over i 2 ml samlingsrør med filterpellet og sentrifugert ved 13,000 rpm i 15 sekunder ved romtemperatur (20-25°C).

Løsningen som ble spunnet gjennom filterpelleten ble kastet og det ble videre tilført henholdsvis 700 µl Buffer RWT og 2 x 500 µl Buffer RPE som ble spunnet ned ved 13,000 rpm i 15 sekunder ved 20-25°C. Igjen ble løsningen som hadde blitt filtrert gjennom pelleten kastet. Til slutt ble det pipettert 30 µl RNase-fritt vann gjennom pelleten i røret og sentrifugert ved 13,000 rpm i 30 sekunder i nytt 1,5ml eppendorfrør. Stikkprøver av konsentrasjonen og kvaliteten til RNAet i rørene ble undersøkt ved å pipettere over 2 µl løsning til Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Nanodrop måler absorbans av bølgelengde til nukleinsyrekonsentrasjon (A_{260}) og proteinkonsentrasjon (A_{280}). Ratioen (A_{260}/A_{280}) vil ved optimal renhet være $\geq 2,0$. Alle prøver ble rensert etter protokoll til etanol presipitasjon (Appendix II). Prøvene ble lagret på -80°C i biofryser.



Figur 5. Flytskjema over hovedsteg i genuttryksanalyse.

2.5.4.2 Fjerning av genomisk DNA

TURBO DNase Treatment and Removal Reagents, TURBO DNA-free™ kit (AM1907, Ambion, Life technologies, CA, USA) ble brukt for DNase behandling av RNA, for fjerning av genomisk DNA (gDNA) og divalente kationer. gDNA i en prøve vil påvirke måltranskriptet og

effektiviteten i reaksjonen, og vil derfor kunne medføre ugyldige resultater (LifeTechnologies, 2012). Med bakgrunn i RNA-konsentrasjonen målt med NanoDrop® ble det nødvendige volum av RNA-løsning og RNase-fritt vann beregnet i Excel for å oppnå en konsentrasjon på 8 µg RNA. Etter utregning ble det laget en Mastermix som bestod av 1 µl TURBO DNase + 0,1 volum 10x TURBO DNase-buffer. RNA, vann og MasterMix skulle til sammen utgjøre et volum på 30 µl i eppendorfrørene, slik at det ble avgjørende å lese riktig av beregninger som ble utført på forhånd. Etter pipettering ble rørene inkubert på varmeplate (37°C) i 30 minutter. Etter inkubering ble det tilsatt 0,1 volum (= 3µl) DNase-inaktiveringsbuffer i hver prøve. Påfølgende ble prøvene inkubert på romtemperatur 20-25°C i 20 minutter med tidvis knipsing på rørende for å forhindre bunnfall og dårlig reaksjon mellom inaktiveringsbufferen og løsningen. Deretter ble prøvene satt i sentrifuge i 3 minutter ved 10,000 rpm ved 20°C for å danne to lag: øverste med RNA uten gDNA, og nederste med inaktiveringsreaktanten. Det ble til slutt pipettert 27 µl supernatant over til nye 1,5 ml eppendorfrør med påfølgende måling av konsentrasjon av NanoDrop®. DNase behandlet RNA ble lagret på biofryser ved -80°C i påvente av videre analysering.

2.5.4.3 Revers transkripsjon

Hensikten med revers transkripsjon er å lage komplementær DNA (cDNA) fra ssRNA. Prosessen krever mRNA, revers transkriptase enzym, primer og deoxynukleotid (dNTP). Det ble først beregnet hvor mye RNA templat som var nødvendig å bruke for å oppnå en konsentrasjon på 1000 ng RNA. Etter beregning av vannmengde og mengde RNA løsning for alle prøvene, ble det forberedt Mastermix (tabell 7 i appendix II) ved bruk av RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Litauen). Det ble også forberedt NO-RT kontroll (NO-revers transcriptase kontroll), en løsning laget på samme vis som Mastermix, men uten RevertAid Revers transcriptase.

9 µl mastermix ble overført til de ferdig merkede eppendorfrørene, sammen med variable volum av nuklease-fritt vann og RNA templat. Det totale volumet i hvert enkelt rør ble 20 µl. Utførelsen ble gjort på is. Alle prøvene ble inkubert i Thermal Cycler (2720; Applied Biosystems, Forster City, California, USA) med syklusen: 5 min ved 25°C, revers transkripsjon i 60 min ved 42°C, etterfulgt av termineringsreaksjon i 5 min ved 70°C, og holdt på 4°C. Etter endt inkubering ble prøvene lagret på -20°C frem til det ble laget fortykningsserie. Fortykningsseriene med cDNA ble laget i to omganger, én for liten -og én for stor

størrelsesgruppe. 5 prøver, fra ulike individer av samme størrelse, med 20 µl cDNA ble samlet i rør. Dette utgjorde to rør med 100 µl cDNA. Disse ble fortynnet 1:10. Til slutt ble det laget en tofolds fortynningsserie med seks fortynninger for begge størrelsesgrupper.

2.5.4.4 Real Time PCR

Primere ble først testet for effektivitet og spesifisitet. Det ble laget en tofolds fortynningsserie med seks fortynninger (fortynnet i Ultra pure vann). Det ble så kjørt tre duplikater av hver fortynning for hver primer i RT qPCR. C_t-verdiene for hvert gen ble så brukt til å lage en standardkurve. Effektivitet ble estimert av programvaren CFX Manager 3.0 (Biorad, CA, USA).

Hvert enkelt gen ble videre analysert ved å bruke RT qPCR. Det ble lagd MasterMix (0,5 µl 250 nmol Primer (se tabell 2 for primerliste), 10 µl SYBR (Sybr HI-Rox Mix, SensIFAST™, Bioline, MA, USA), 5,5 µl dH₂O pr reaksjon). I hver brønn (Hard Shell PCR plates 96 well white clear Catalog no. HSP9601, Biorad, CA, USA) ble det tilsatt 16 µl MasterMix og 4 µl cDNA templat (20 ng). Prøvene ble fordelt på to plater (A og B) for begge størrelsesgrupper og analysert i duplikater. NO-RT, No Template-Control (NTC) og cDNA fortynningsserie, med to tekniske replikater som standard, ble også inkludert i sine respektive brønner på platene. Fortynningsserien med cDNA fungerte som intern kontroll. NTC ble inkludert for å kontrollere at primere, vann eller SYBR ikke var kontaminert med cDNA eller DNA under analysen

Platene ble forseglet og sentrifugert i 20 sekunder i Labnet mini plate reader mps 1000, ved 1000 rpm og kjørt i CFX96 Real-Time PCR Detection system (Biorad, CA, USA) med programvaren CFX Manager 3.0 (Biorad, CA, USA) (se tabell 1 for PCR program). Etter at analysen var fullført, ble resultatet lest av og dataene eksportert til Microsoft Excel 2013.

Tabell 1 - RT - PCR program med steg, temperatur og varighet.

| Steg | Temperatur (°C) | Varighet |
|----------|---|---------------|
| 1 | 50 | 10 min |
| 2 | 95 | 5 min |
| 3 | 95 | 10 sek |
| 4 | 60 | 30 sek |
| 5 | Plateavlesning. Steg 3, 4 og 5 gjentas 39 ganger. | |
| 6 | 95 | 10 sek |
| 7 | Smeltekurve: temperatur går fra 65 (0,5 sek) – 95 (0,5 sek.) Plateavlesning. | |

Metoden fungerer ved å benytte et fluorescerende fargestoff til deteksjon av mengde gentranskript gjennom syklisk amplifisering av en bestemt gensekvens. Det er som regel 40 sykluser i en PCR-analyse (tabell 1), og disse syklusene er delt inn i 1) denatureringsfasen: hvor høy temperatur (95°C) separerer dobbeltrådig DNA (dsDNA) til enkeltrådig DNA (ssDNA), 2) amplifiseringsfasen: hvor primere binder til ssDNA ved 60°C og 3) elongeringsfasen, der komplementærtråden syntetiseres av DNA-polymerase ved 60°C og ny DNA-tråd er resultatet. Hvis primere og polymeraser er effektive vil fordobling av amplicon (produkt) forekomme ved hver syklus. Dette fører til eksponentiell økning av DNA-mengde.

Tabell 2 - Gensymbol, primersekvens, genbank nummer, effektivitet og R² for genene brukt i RT-qPCR.

| | | Sequence (5'-3') | Accession number | Effektivitet (%) | R ² |
|---------|---|---------------------------------------|------------------|------------------|----------------|
| NKA α1a | F | CCAGGATCACTCAATGTCCTCT | XM_014209857.1 | 101 | 0.991 |
| | R | TCTATCAAAGGCAAATGAGTTTAATATCATTGTAAAA | | | |
| NKA α1b | F | GAGGTTGGGTGGAACAGGAG | XM_014150738.1 | 104 | 0.989 |
| | R | AGCTGAGTGCACCATCACAG | | | |
| CFTR I | F | CCTTCTCCAATATGGTTGAAGAGGCAAG | NM_001123533.1 | 102 | 0.995 |
| | R | GAGGCACTTGGATGAGTCAGCAG | | | |
| CFTR II | F | GCCTTATTTCTTCTATTTGTATGCACTT | AF161070.1 | 105 | 0.992 |
| | R | GCCACCATGAAAACTAAAGAGTACCTCAG | | | |
| NKCC I | F | GAGACTCATCCAAGCCCTCG | AJ417890.1 | 101 | 0.988 |
| | R | GGCTTTGCGTTCATCATCGT | | | |
| EF-1a | F | TGCCCTCCAGGATGTCTAC | SY190236396 | 103 | 0.997 |
| | R | CACGGCCCACAGGACTG | | | |

Smeltekurve brukes for å validere at primerne bindes spesifikt og ikke danner «primerdimers», der to PCR-primere bindes til hverandre i stedet for målet. Smeltekurven viser så endringen i fluorescens som observeres når dobbeltrådig DNA dissosierer til enkeltrådig DNA når temperaturen i reaksjonen økes (LifeTechnologies, 2012).

Genet elongeringsfaktor-1a (EF-1a) ble brukt som referansegene i denne studien, ettersom dette genet har vist seg å være stabilt uttrykt i Atlantisk laks (Ingerslev *et al.*, 2006; Olsvik *et al.*, 2005). Det ble brukt relativ kvantifisering for å beregne mengde RNA av de ulike gen i prøven.

2.6 Databehandling, statistiske analyser og grafiske fremstillinger

Figurer og statistiske analyser ble laget og utført i Prism versjon 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

For å undersøke eventuelle signifikante forskjeller mellom de ulike behandlingsgruppene ved T3 ble en toveis ANOVA og Tukey HSD post hoc test utført. Det ble også kjørt uparet T-test ved T2 etter lysbehandling, samt mellom behandlingsgruppene ved ulike tidspunkter. Forskjeller i data i denne oppgaven ble regnet som signifikante hvis $p \leq 0,05$.

2.6.1 Utregninger

Kondisjonsfaktor

K-faktor er et mål på sammenhengen mellom lengde og vekt og er definert ut fra formelen:

$$V = a * L^b$$

der V er vekta til fisken i gram, L er fiskens lengde i cm, *a* er en konstant og *b* er eksponenten som uttrykker sammenhengen mellom lengde og vekt. Eksponenten *b* ligger som oftest i området fra 2,5 til 3,5. Dersom en setter $b = 3$, som er et uttrykk for isometrisk vekt, og $a = K/100$, hvor K er lik kondisjonsfaktor har man Fultons formel for KF (Weatherley *et al.*, 1987)

$$KF = \frac{V}{L^3} * 100$$

Dersom fisken har en nedgang i vekt per lengdemål, eller økning i lengde, vil det medføre en reduksjon i kondisjonsfaktor.

Na⁺, K⁺-ATPase-aktivitet i gjellevev

Na⁺, K⁺-ATPase-aktivitet i hver prøve ble regnet ut med følgende formel:

$$\frac{\text{Reaksjonshastighet (mOD } \mu\text{l}^{-1} \text{ min}^{-1})}{\text{Stign. tall (mOD nmol ADP}^{-1})} = \text{nmol ADP } \mu\text{l}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

$$\frac{\text{nmol ADP } \mu\text{l}^{-1} \text{ min}^{-1}}{\text{Mengde protein (} \mu\text{g protein } \mu\text{l}^{-1})} = \text{nmol ADP mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

$\text{nmol ADP mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1} * 60 \text{ min time}^{-1} * 1000 = \mu\text{mol ADP mg protein}^{-1} \text{ time}^{-1}$

Resultater fra hver gjelleprøve er gitt i $\text{nmol ADP mg protein}^{-1} \text{ time}^{-1}$.

Spesifikk vekstrate

Den spesifikke vekstraten (SGR, specific growth rate) mellom to tidspunkt ble kalkulert ved hjelp av ligningen (Brett. *et al.*, 1979):

$$\text{SGR} = \frac{(\ln VT - \ln Vt)}{(T-t)} * 100$$

der V_t er vekt i g ved start, og V_T er vekt i g ved slutt. $T-t$ er antall dager mellom veiinger. Resultater fra SGR hos behandlingsgruppene er gitt i % kroppsvekt dag^{-1} .

Kumulativt fôrinntak og fôrfaktor

Kumulativt fôrinntak og fôrfaktor ble kun regnet ut for den andre måneden i sjøvannsfasen ettersom målingen i den første uka av sjøvannsfase sannsynligvis ble feil pga. bruk av feil sil. Ettersom det ikke ble registrert fôrinntak for alle dager innen hver uke i perioden 11.juni – 9.juli (ikke målt i helgene), var det nødvendig å beregne kumulativt fôrinntak for hver uke pr behandlingsgruppe. Dette ble gjort trinnvis med formler 1-4.

Kumulativt fôrinntak for UKE_x :

1. $\text{Fôr spist pr fisk} = \frac{\text{Mengde spist fôr pr registrerte datoer}}{\text{Antall fisk}}$
2. $\text{Fôr spist pr fisk pr dag} = \frac{\text{Fôr spist pr fisk}}{\text{Antall registrerte dager}}$
3. $\text{Gjennomsn. spist fôr pr uke} = \frac{\text{Antall fisk}}{\text{Fôr spist pr fisk pr dag}} * 7$

Produktet i formel 3 ble gjeldene for dager uten registrert fôrinntak. Derfra ble anslått en total mengde tørrvekt spist for hver uke med formel 4:

4. $\text{Total mengde tørrvekt spist} = \text{Sum av total anslått fôrinntak pr uke.}$

Registrering av fôrinntak for hvert kar i sjøvannsfasen ble gjort etter Havbruksstasjonens protokoller.

Basert på disse data ble det mulig å beregne fôrfaktor. Fôrfaktor for fisk i de ulike behandlingsgruppene i sjøvannsfasen (11.juni – 9.juli) ble beregnet med formelen:

$$\frac{\text{Total mengde tørrvekt spist (g)}}{\text{Vektøkning fra 11.juni–9.juli (g)}}$$

Ettersom det var ulik fordeling av fisk i de respektive forsøkskar, var biomassen i karene forskjellig. Dette ble tatt hensyn til i utregningene.

Gjennomsnittlig tilvekst

Det ble beregnet gjennomsnittlig tilvekst for alle behandlingsgrupper av fisk som var Floymerket i perioden 11.juni – 9.juli ved å bruke formelen:

$$\text{Gjennomsnittlig tilvekst} = VT - Vt = Vn = \frac{Vn}{\text{Antall fisk}}$$

der VT = Vekt ved T (9.juli), Vt = vekt ved t (11.juni) og Vn = Netto vekt fra 11.juni til 9.juli.

Genuttrykk

Data fra RT qPCR ble analysert ved bruk av ΔC_t metode med et referansegen (Bio-Rad, 2006). Dette er en variasjon av Livak metoden (Livak *et al.*, 2001). For å kalkulere relativt genuttrykk brukes følgende fremgangsmåte:

1. $2^{(C_t(\text{EF-1a}) - C_t(\text{målgen}))} = \text{Normalisert uttrykk}$
2. $\text{Uttrykk for kontrollgruppa} = \text{Normalisert uttrykk for målgen kontroll} / \text{normalisert uttrykk for målgen kontroll} = 1$
3. $\text{Uttrykk for behandlingsgruppa} = \text{Uttrykk normalisert målgen behandlingsgruppe} / \text{uttrykk kontroll} = \text{normalisert uttrykk}$

Resultatet er altså normalisert mot en kontroll og viser hvor mange ganger lavere -eller høyere målgenet er uttrykt i forhold. Målgenene var i dette tilfellet isoformene $\alpha 1a$ -og $\alpha 1b$ av Na^+/K^+ -ATPase enzymet, Cystisk Fibrose Transmembran Conductance Regulator I og II (CFTR I- og II) og $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ kotransporter I (NKCC I).

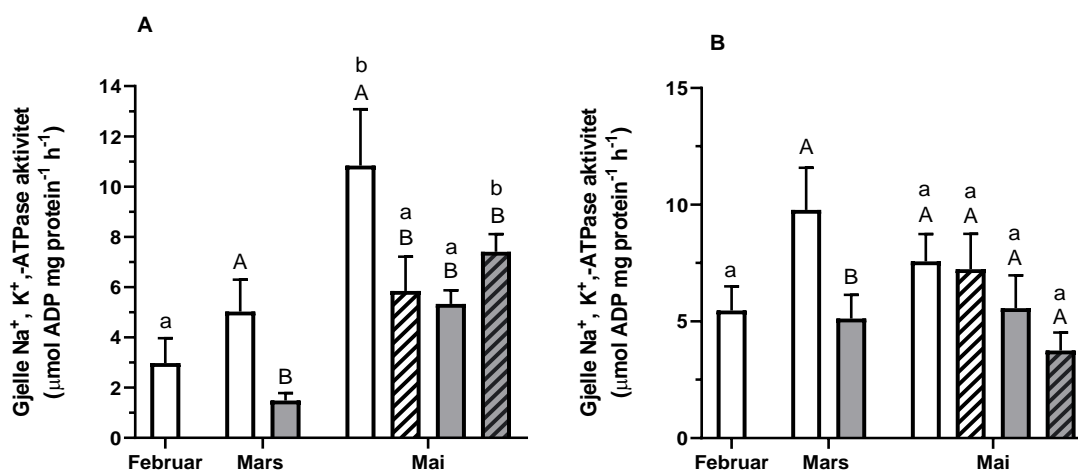
3. Resultater

3.1 Ferskvannsfasen

3.1.1 Fisk til prøveuttak

Tabell 3 - Kroppsvekt og kondisjonsfaktor til gruppene med stor og liten Atlantisk laks prøvetatt i løpet av ferskvannsfasen i februar, mars og mai. n = 7-10. Data er presentert som gjennomsnitt ± SEM.

| | Tidspunkt | Behandling | Vekt (g) | K-faktor |
|--------------|--------------|-------------|---------------|-------------|
| Liten | Februar (T1) | LL | 42,2 ± 2,03 | 1,16 ± 0,01 |
| | Mars (T2) | LL | 74,1 ± 1,73 | 1,20 ± 0,01 |
| | | SP | 58,8 ± 1,96 | 1,24 ± 0,01 |
| | Mai (T3) | LL Kontroll | 126,0 ± 6,37 | 1,23 ± 0,01 |
| | | LL + Salt | 122,6 ± 5,63 | 1,22 ± 0,02 |
| | | SP Kontroll | 101,5 ± 7,84 | 1,05 ± 0,04 |
| | | SP + Salt | 82 ± 5,48 | 1,07 ± 0,01 |
| Stor | Februar (T1) | LL | 131,8 ± 5,9 | 1,26 ± 0,02 |
| | Mars (T2) | LL | 215,3 ± 6,10 | 1,35 ± 0,01 |
| | | SP | 182,9 ± 11,4 | 1,30 ± 0,02 |
| | Mai (T3) | LL Kontroll | 366,8 ± 17,65 | 1,22 ± 0,02 |
| | | LL + Salt | 331,6 ± 21,32 | 1,25 ± 0,03 |
| | | SP Kontroll | 220,5 ± 31,43 | 1,10 ± 0,04 |
| | | SP + Salt | 258 ± 30,59 | 1,12 ± 0,05 |

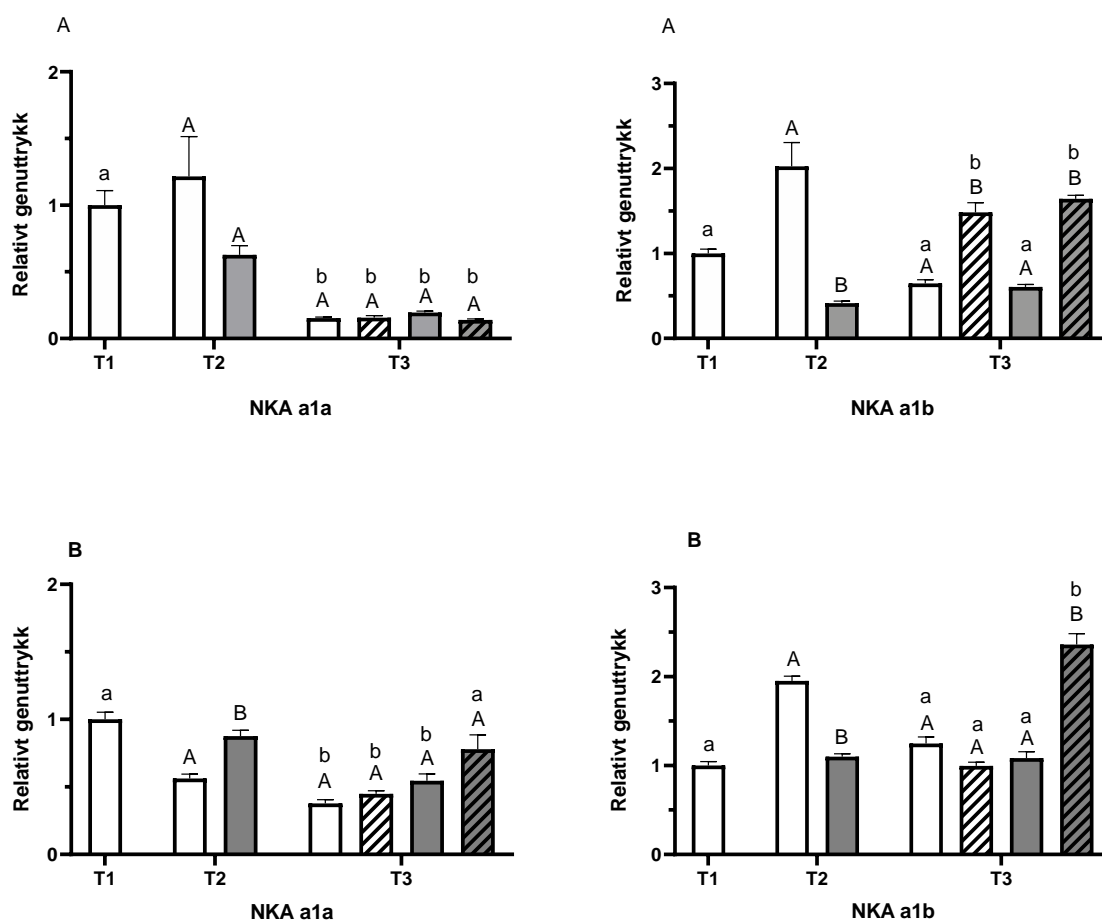


Figur 6 - Na⁺, K⁺-ATPase aktivitet hos Atlantisk laks med startvekt 40 g (A) og 130 g (B) under ferskvannsfasen fra februar til mai. Hvite søyler: LL, grå søyler: SP, ordinære søyler: kontroll fôr fra mars til mai, mønstret søyler: saltberiket fôr fra mars til mai. Data er presentert som gjennomsnitt ± SEM. Ulike store bokstaver viser signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper innen tidspunkter; små bokstaver viser signifikante forskjeller mellom T1 og T3 i behandlingsgruppene (p < 0.05).

Gjelle NKA aktivitet

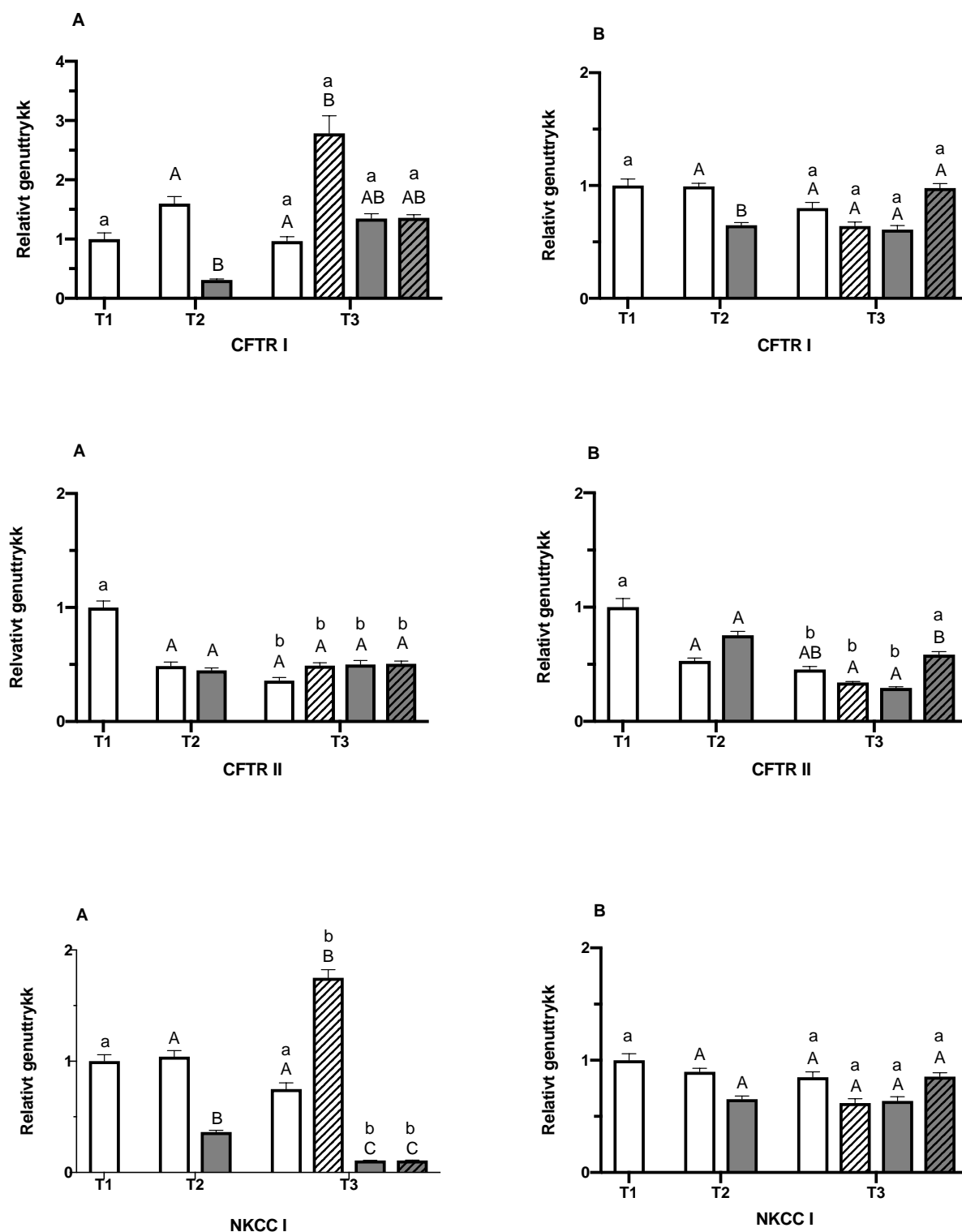
Etter lysbehandling (T2) hadde fisken i SP gruppen lavere gjelle NKA aktivitet enn fisken i LL gruppen i begge størrelsesgruppene (alle $p < 0,05$, Fig. 6). I mai hadde liten fisk i LL kontroll høyest aktivitet, og var forskjellig fra de andre gruppene. Hos stor fisk var det ingen forskjell mellom fisk i mai. Ved T3 var NKA aktiviteten mellom 5 og 10 $\mu\text{mol ADP mg protein}^{-1} \text{h}^{-1}$ i gruppen med liten mens den hos stor fisk var mellom 3,5 og 8 $\mu\text{mol ADP mg protein}^{-1} \text{h}^{-1}$. Hos liten fisk var det gruppene LL og SP +salt ved T3 som var forskjellig fra LL ved T1 ($p < 0,01$). Hos stor fisk var det ingen forskjell mellom T1 og T3.

3.1.2 Genuttrykk i gjeller



Figur 7 – Relativt genuttrykk (målt ved RT qPCR) for subenhetene alpha 1a og alpha 1b av NKA hos Atlantisk laks med startvekt 40 g (A) og 130 g (B) i ferskvannsfasen. Hvite søyler: LL, grå søyler: SP, ordinære søyler: kontroll for fra mars til mai, mønstret søyler: saltberiket for fra mars til mai. Data er presentert som gjennomsnitt \pm SEM. Store bokstaver viser signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper innen tidspunkter; små bokstaver viser signifikante forskjeller mellom T1 og T3 i behandlingsgruppene ($p < 0.05$).

Resultater



Figur 8 – Relativt genuttrykk (målt ved RT qPCR) for CFTR I, CFTR II og NKCC I hos Atlantisk laks med startvekt 40 g (A) og 130 g (B) i ferskvannsfasen. Hvite søyler: LL, grå søyler: SP, ordinære søyler: kontroll fôr fra mars til mai, mønstret søyler: saltberiket fôr fra mars til mai. Data er presentert som gjennomsnitt \pm SEM. Store bokstaver viser signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper innen tidspunkter; små bokstaver viser signifikante forskjeller mellom T1 og T3 i behandlingsgruppene ($p < 0.05$).

Relativt genuttrykk

Na⁺/K⁺-ATPase

Genuttrykk hos behandlingsgruppene med liten og stor fisk er presentert i Fig. 7, A og B. Trenden for subenheten $\alpha 1a$ er lik for alle behandlingsgruppene ved T3 for fisk med startvekt 40 g. Gruppene er ikke forskjellige fra hverandre ved T3, men er det fra T1. Hos fisk med startvekt 130 g var salt- og lysgruppene forskjellige fra hverandre ved T3. Begge lysgruppene var ikke forskjellig fra T1, mens saltgruppene var det (alle $p < 0,05$). For NKA $\alpha 1b$ viser resultatene ingen forskjell mellom behandlingsgruppene ved T3 ($p < 0,01$), samtidig som det kun var SP +salt som var forskjellig fra T1 for fisk med startvekt 40 g ($p < 0,01$). Det fremgår også en forskjell mellom lysgruppene ved T2 ($p < 0,001$) for denne størrelsesgruppa. For større fisk var LL-SP +salt både forskjellige fra de andre gruppene ved T3, og T1 ($p < 0,001$).

CFTR I

Genuttrykk hos behandlingsgruppene med liten og stor fisk er presentert i Fig. 8, A og B. Hos fisk med startvekt 40 g var det kun forskjell mellom fisk som hadde fått salt og fisk i kontrollgruppa for kontinuerlig lysbehandling ved T3 ($p < 0,05$). Ingen av gruppene var forskjellige fra T1. Hos stor fisk var det hverken forskjell mellom gruppene ved T3, eller fra T1. For begge størrelsesgrupper var det forskjell mellom gruppene etter lysbehandling (T2) (begge $p < 0,01$).

CFTR II

Genuttrykk hos behandlingsgruppene med liten og stor fisk er presentert i Fig. 8, A og B. Hos fisk med startvekt 40 g var det ingen forskjell mellom behandlingsgruppene ved T3, men disse var forskjellig fra T1. Hos større fisk var LL-SP +salt forskjellig fra de andre gruppene (begge $p < 0,01$), med unntak av kontrollgruppa på kontinuerlig lys ved T3. Gruppene, med unntak av LL-SP +salt, var ved T3 forskjellige fra T1 ($p < 0,05$).

NKCC I

Genuttrykk hos behandlingsgruppene med liten og stor fisk er presentert i Fig. 8, A og B. Hos fisk med startvekt 40 g var det forskjell mellom fisk på kontinuerlig lysbehandling, uavhengig av fôrtype, samt at disse også var forskjellige fra fisk utsatt for vintersignal ved T3 (alle $p < 0,001$). Det var kun kontrollgruppa på kontinuerlig lys som ikke var forskjellig fra T1. Hos større fisk var det ingen forskjell mellom behandlingsgrupper, eller tidspunkt.

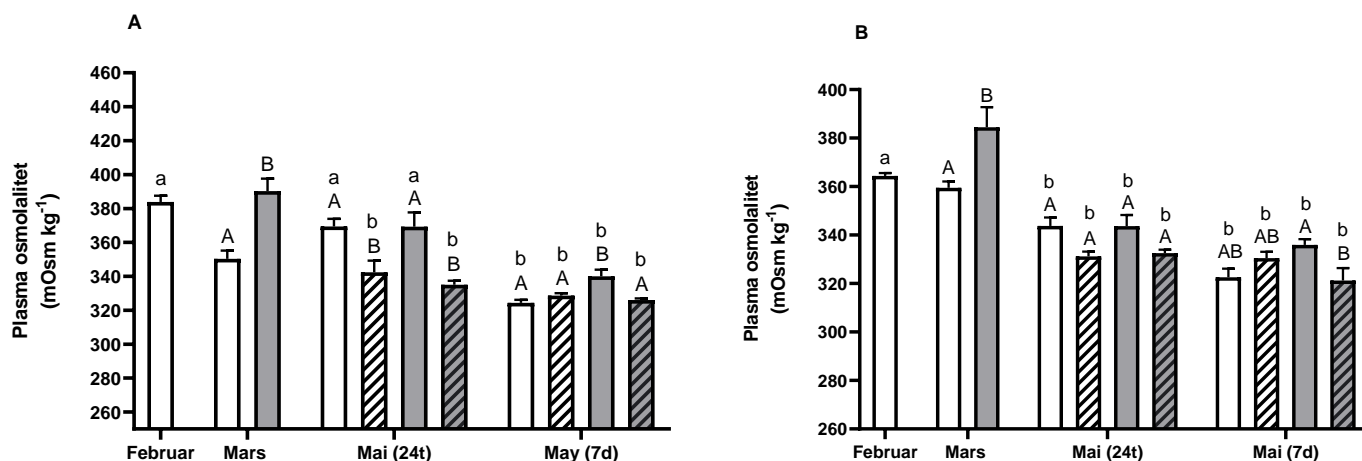
Resultater

3.1.3 Sjøvannstester

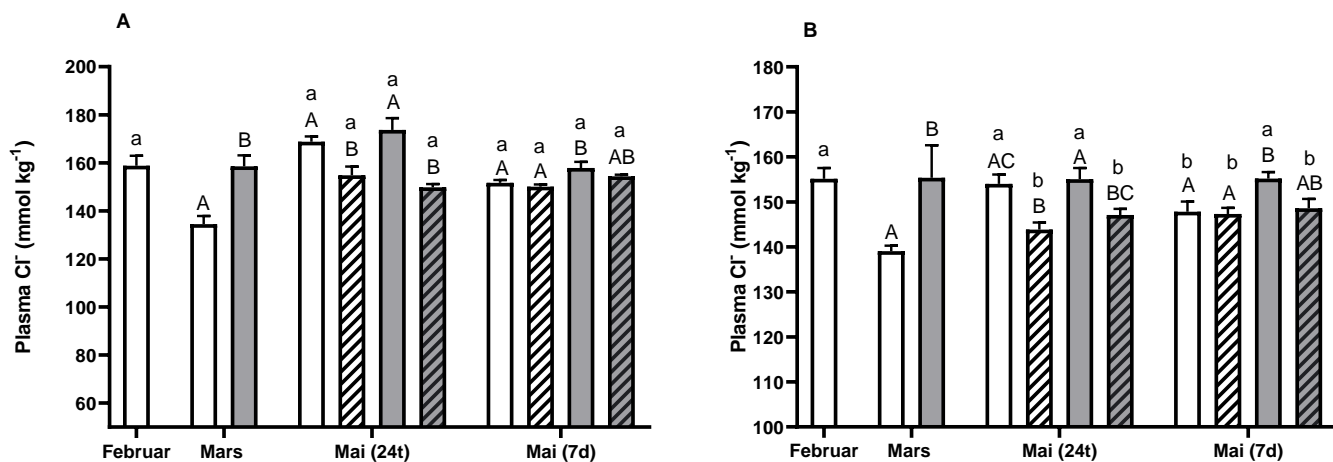
Tabell 4 – Kroppsvekt, kondisjonsfaktor og dødelighet i gruppene med stor og liten Atlantisk laks brukt i 24 t sjøvannstest i februar, mars og mai og etter 7 dager i sjøvann i Mai. n = 7-10. Data er presentert som gjennomsnitt ± SEM

| | Tidspunkt | Behandling | Vekt (g) | K-faktor | Dødelighet (n) | |
|---------------|----------------|----------------|---------------|--------------|----------------|---|
| Liten | Februar (24 t) | LL | 42,2 ± 1,6 | 1,2 ± 0,1 | 0 | |
| | Mars (24 t) | LL | 67,6 ± 1,7 | 1,1 ± 0,03 | 0 | |
| | | SP | 54,8 ± 6,36 | 1,2 ± 0,01 | 0 | |
| | Mai (24 t) | LL Kontroll | 122,2 ± 13,18 | 1,2 ± 0,02 | 2 | |
| | | LL + Salt | 121,4 ± 13,50 | 1,1 ± 0,03 | 0 | |
| | | SP Kontroll | 84,2 ± 4,08 | 1,2 ± 0,04 | 3 | |
| | | SP + Salt | 78,8 ± 8,55 | 1,0 ± 0,10 | 0 | |
| | Mai (7 dager) | LL Kontroll | 135,8 ± 15,46 | 1,1 ± 0,12 | 0 | |
| | | LL + Salt | 127,1 ± 5,65 | 1,0 ± 0,01 | 1 | |
| | | SP Kontroll | 85,0 ± 4,70 | 1,0 ± 0,02 | 2 | |
| | | SP + Salt | 85,0 ± 4,23 | 1,1 ± 0,02 | 0 | |
| | Stor | Februar (24 t) | LL | 125,9 ± 3,1 | 1,2 ± 0,02 | 0 |
| | | Mars (24 t) | LL | 177,3 ± 6,5 | 1,2 ± 0,02 | 0 |
| | | | SP | 176,9 ± 8,6 | 1,2 ± 0,02 | 0 |
| | | Mai (24 t) | LL Kontroll | 330,8 ± 17,8 | 1,3 ± 0,03 | 0 |
| | | | LL + Salt | 334,9 ± 21,5 | 1,3 ± 0,03 | 0 |
| SP Kontroll | | | 285,3 ± 12,3 | 1,2 ± 0,03 | 0 | |
| SP + Salt | | | 241,9 ± 18,5 | 1,1 ± 0,04 | 0 | |
| Mai (7 dager) | | LL Kontroll | 351,9 ± 19,9 | 1,2 ± 0,02 | 0 | |
| | | LL + Salt | 339,1 ± 13,5 | 1,2 ± 0,01 | 0 | |
| | | SP Kontroll | 285,8 ± 22,6 | 1,2 ± 0,03 | 0 | |
| | SP + Salt | 221,6 ± 17,0 | 1,0 ± 0,02 | 0 | | |

Resultater



Figur 9 – Plasma osmolalitet hos Atlantisk laks med startvekt 40 g (A) og 130 g (B) etter 24 t sjøvannstest i februar, mars og mai, og etter 7 dagers sjøvannstest i mai. Hvite søyler: LL, grå søyler: SP, ordinære søyler: kontroll fôr fra mars til mai, mønstret søyler: saltberiket fôr fra mars til mai. Data er presentert som gjennomsnitt \pm SEM. Forskjellige store bokstaver viser til signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper innen tidspunkter; små bokstaver viser signifikante forskjeller mellom T1 og T3 i behandlingsgruppene ($p < 0.05$).



Figur 10 - Plasma klorid hos Atlantisk laks med startvekt 40 g (A) og 130 g (B) etter 24 t sjøvannstest i februar, mars og mai, og etter 7 dagers sjøvannstest i mai. Hvite søyler: LL, grå søyler: SP, ordinære søyler: kontroll fôr fra mars til mai, mønstret søyler: saltberiket fôr fra mars til mai. Data er presentert som gjennomsnitt \pm SEM. Forskjellige store bokstaver viser til signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper innen tidspunkter; små bokstaver viser signifikante forskjeller mellom T1 og T3 i behandlingsgruppene ($p < 0.05$).

Osmolalitet

Osmolalitet hos behandlingsgruppene med liten og stor fisk er presentert i Fig. 9, A og B. Etter lysbehandling ved T2 hadde fisken i SP gruppen høyere osmolalitet enn fisken i LL gruppen i begge størrelsesgruppene (alle $p < 0,05$). Etter saltbehandling (T3) og 24 t SWT i mai var plasma osmolalitet lavere hos begge saltgruppene enn hos lysgruppene ($p < 0,01$) hos liten fisk, mens samme tendens ble sett hos stor fisk, men forskjellene var ikke signifikante. Etter 7 dager i sjøvann var plasma osmolalitet høyere hos SP kontrollgruppen enn hos de andre gruppene ($p < 0,01$) hos liten fisk. Denne gruppa hadde signifikant høyere plasma osmolalitet enn SP +salt hos stor fisk ($p < 0,05$). Etter 7 dager SWT lå plasma osmolalitet fra 340 mOsm kg^{-1} og lavere hos fisken i alle gruppene for denne størrelsesgruppen. Det var kun forskjell mellom T1 og T3 for liten fisk som var saltbehandlet etter 24 t SWT ($p < 0,05$), samtidig som alle behandlingsgruppene var forskjellig fra T1 ved T3 etter 7 dager SWT.

Klorid

Plasma kloridkonsentrasjon hos behandlingsgruppene med liten og stor fisk er presentert i Fig. 10, A og B. Etter lysbehandling (T2) hadde fisken i SP gruppen høyere kloridnivå enn fisken i LL gruppen i begge størrelsesgruppene (alle $p < 0,05$). Etter behandling med saltfôr (T3) var nivåene i begge saltgruppene lavere ($p < 0,01$) enn hos de andre to gruppene hos liten fisk. Samme trend gjaldt for stor fisk med unntak av SP +salt og LL hos stor fisk. Etter 7 dager i sjøvann var forskjellen mellom gruppene mindre, og alle gruppene både hos liten og stor fisk lå fra 160 mmol L^{-1} og lavere. Hos stor fisk var det forskjell mellom T1 og T3 for fisk som var saltbehandlet etter 24 t SWT, samt at det var forskjell mellom T1 og T3 for samme grupper pluss LL etter 7 dagers SWT.

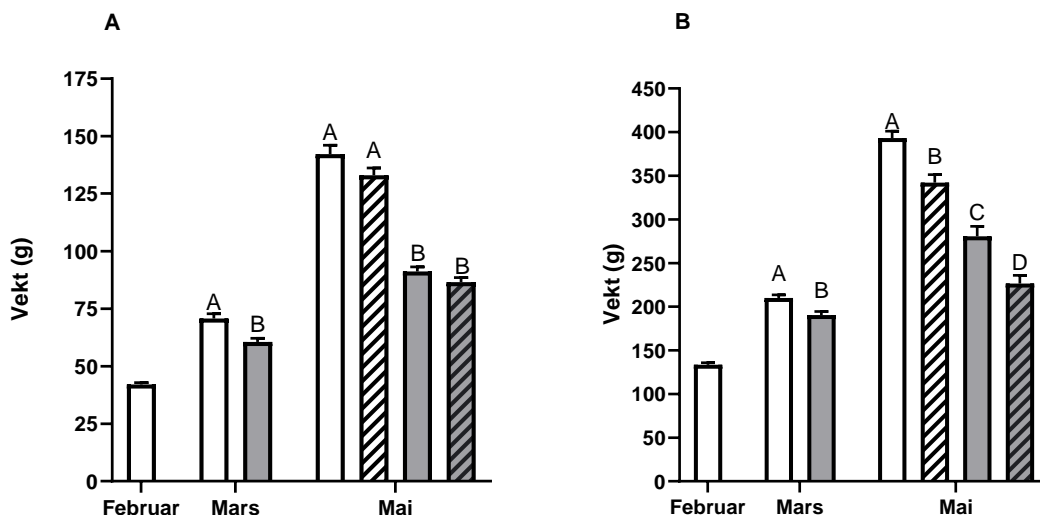
Morfologi (Bildeappendix).

T1: Fisk i liten størrelsesgruppe ble scoret til 1, og stor størrelsesgruppe til 2.

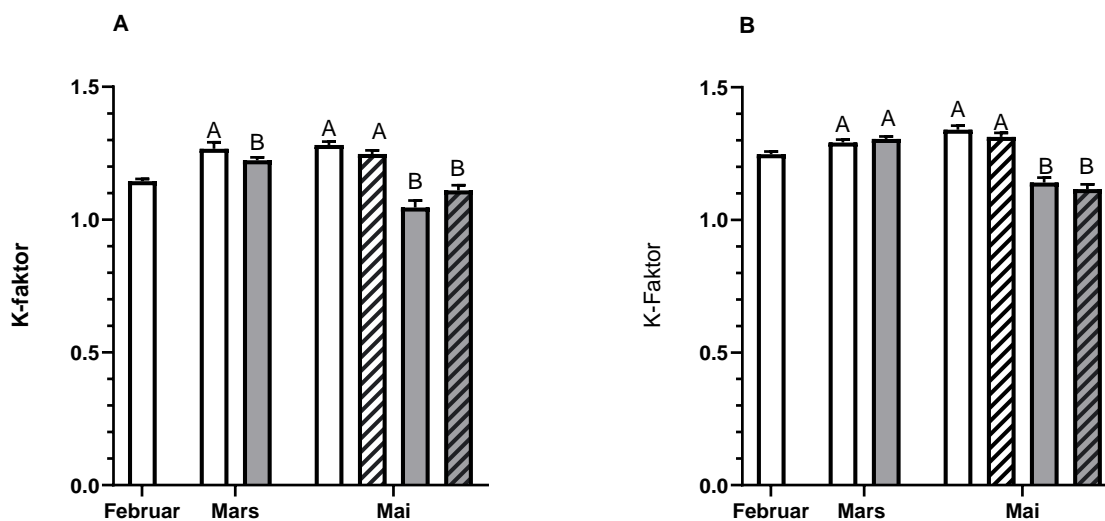
T2: Fisk i liten størrelsesgruppe ble scoret til 2, og stor størrelsesgruppe til 3.

T3: Fisk i liten størrelsesgruppe ble scoret til 3, og stor størrelsesgruppe til 3.

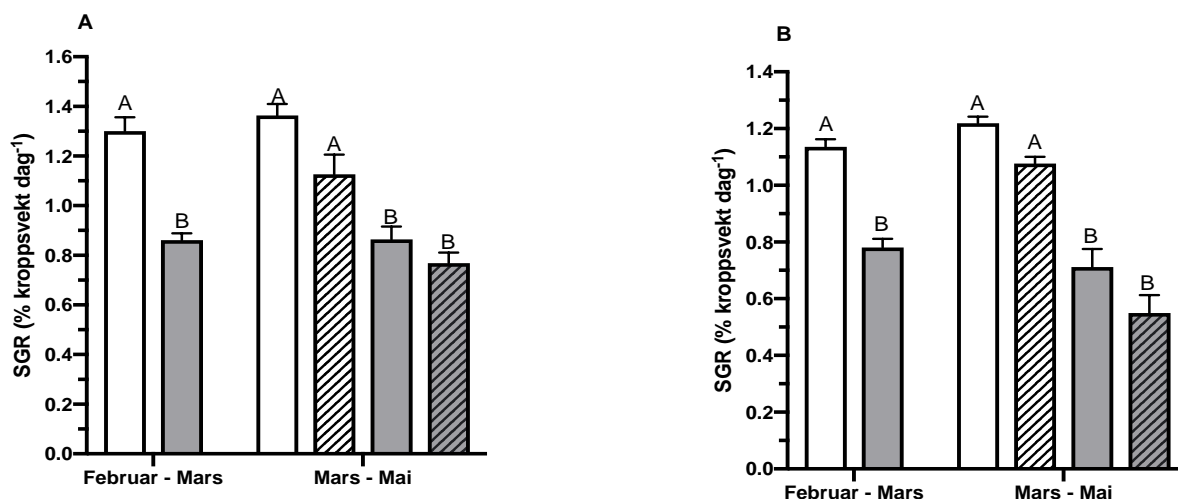
3.1.4 Floy-merket fisk i ferskvannsfasen



Figur 11 – Kroppsvekt hos Floy-merket Atlantisk laks med startvekt 40 g (A) og 130 g (B) under ferskvannsfasen. Hvite søyler: LL, grå søyler: SP, ordinære søyler: kontroll fôr fra mars til mai, mønstret søyler: saltberiket fôr fra mars til mai. Data er presentert som gjennomsnitt ± SEM. Store bokstaver viser til signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper innen tidspunkter ($p < 0.05$).



Figur 12 – Fultons kondisjonsfaktor, (K-faktor) hos Floy-merket Atlantisk laks med startvekt 40 g (A) og 130 g (B) under ferskvannsfasen. Hvite søyler: LL, grå søyler: SP, ordinære søyler: kontroll fôr fra mars til mai, mønstret søyler: saltberiket fôr fra mars til mai. Data er presentert som gjennomsnitt ± SEM. Store bokstaver viser til signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper innen tidspunkter ($p < 0.05$).



Figur 13 - Spesifikk vekstrate (SGR) hos Floy-merket Atlantisk laks med startvekt 40 g (A) og 130 g (B) i ferskvannsfasen. Hvite søyler: LL, grå søyler: SP, ordinære søyler: kontroll fôr fra mars til mai, mønstret søyler: saltberiket fôr fra mars til mai. Data er presentert som gjennomsnitt \pm SEM. Store bokstaver viser signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper innen tidspunkter ($p < 0.05$).

Vekt

Vektutvikling hos behandlingsgruppene med liten og stor fisk er presentert i Fig. 11, A og B. Etter lysbehandling (T2) hadde fisken i SP gruppen lavere vekt enn fisken i LL gruppen i begge størrelsesgruppene, uavhengig av fôrtype (alle $p < 0,05$), mens det hos stor fisk i tillegg var en vektreduserende effekt av saltbehandlingen for SP gruppen (alle $p < 0,01$). Hos begge størrelsesgrupper var det 2 til 4 ganger økning i fiskevekt i løpet av ferskvannsfasen. Vekten til fisken som ble brukt til prøveuttak samsvarte med de som ble funnet hos Floy-merket fisk (Tabell 3).

Kondisjonsfaktor

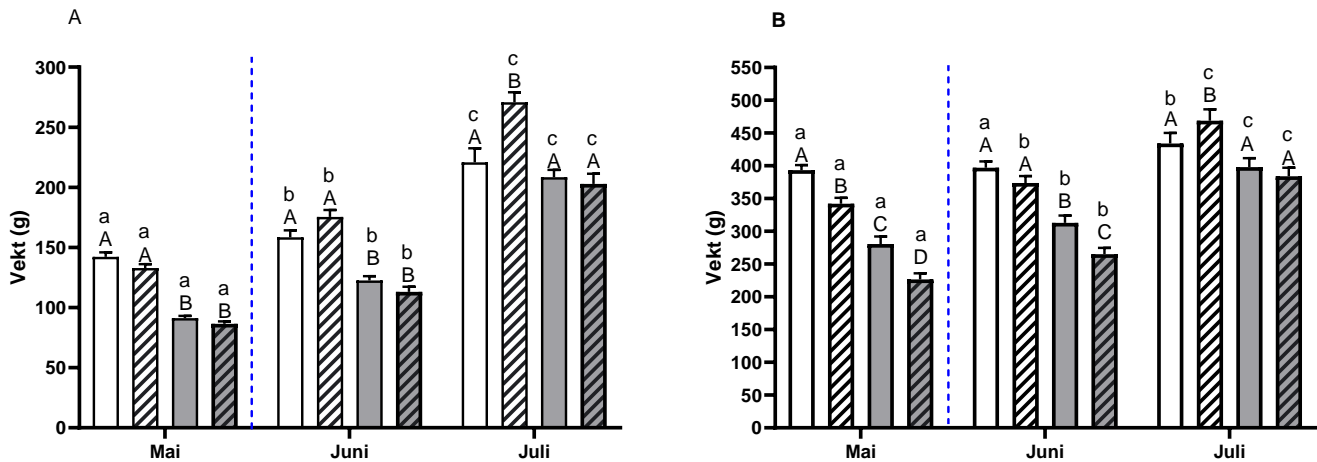
Utvikling i KF hos behandlingsgruppene med liten og stor fisk er presentert i Fig. 12, A og B. Gruppen med små fisk som ble eksponert til kort dag hadde en lavere k-faktor ved T2 enn fisken som hadde blitt holdt på LL ($p < 0,05$). Denne forskjellen ble ikke observert hos gruppene med stor fisk. Ved T3 var KF hos begge SP gruppene, uavhengig av fôrtype, lavere enn i LL gruppene (begge $p < 0,0001$) i begge størrelsesgruppene. KF til fisken som ble brukt til prøveuttak samsvarte med de som ble funnet hos Floy-merket fisk (Tabell 3).

Spesifikk vekstrate

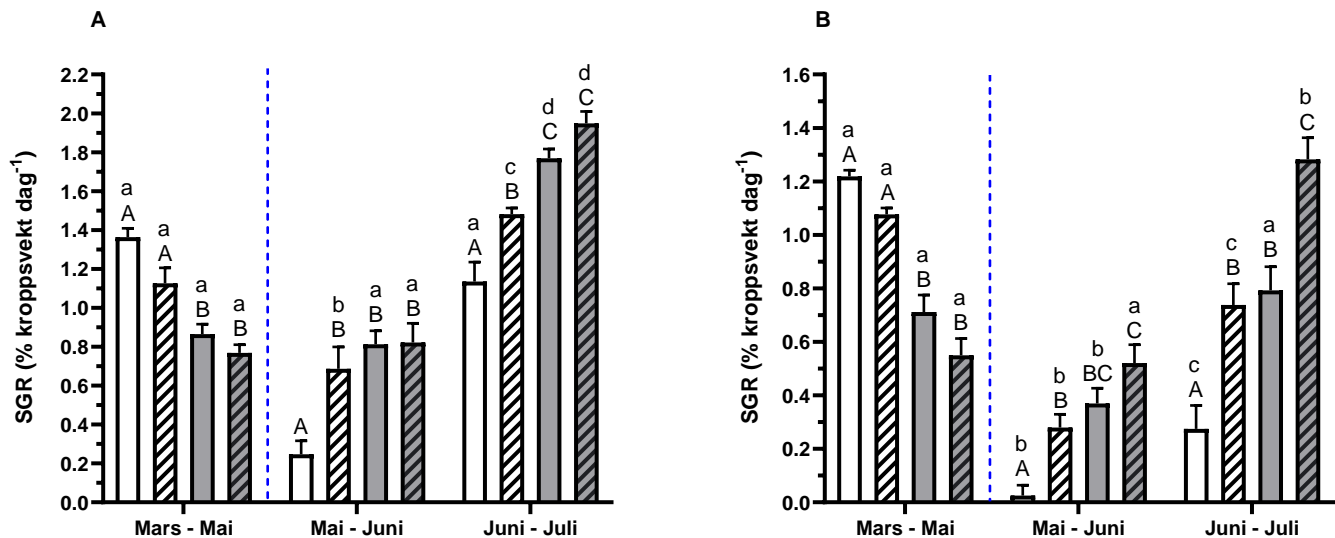
Spesifikk vekstrate hos alle gruppene i ferskvannsfasen er presentert i Fig. 13, A og B. Hos begge størrelsesgruppene var det en lavere SGR hos SP gruppen enn hos LL gruppen fra T1 til T2 ($p < 0,05$) og fra T2 til T3 (alle $p < 0,0001$). Fra T2 til T3 hadde fisken lavere SGR i gruppene gitt kort fotoperiode, uavhengig av fôr, enn de som var gitt kontinuerlig lys, uavhengig av fôr (alle $p < 0,0001$), hos begge størrelsesgrupper.

3.2 Sjøvannsfasen

3.2.1 Floy-merket fisk

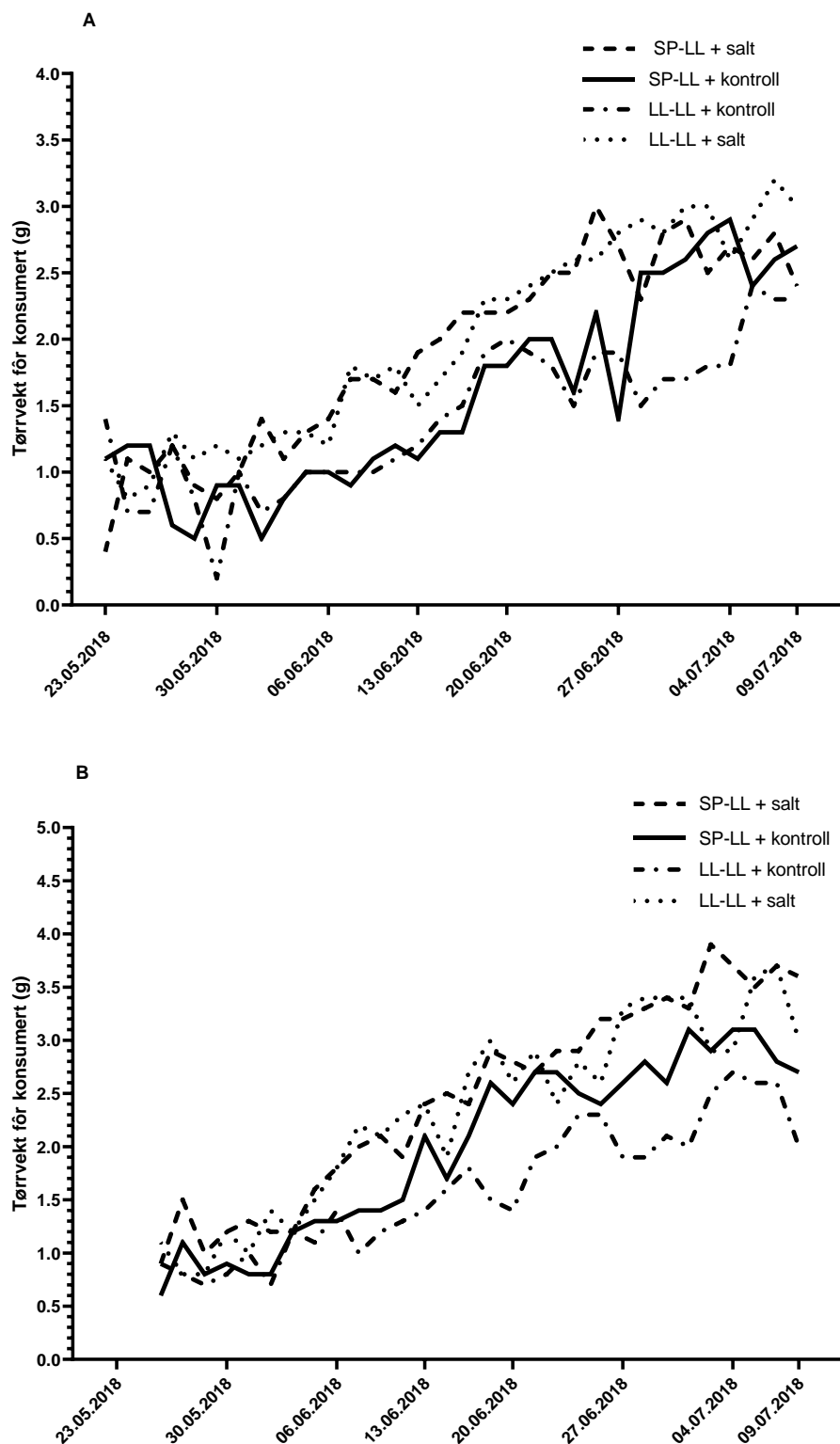


Figur 14 – Kroppsvekt hos Floy-merket Atlantisk laks med startvekt 40 g (A) og 130 g (B) ved slutten av ferskvannsfasen i mai, samt gjennom sjøvannsfasen fra juni til juli. Stiplet linje markerer sjøvannsoverføring. Hvite søyler: LL, grå søyler: SP, ordinære søyler: kontroll fôr fra mars til mai, mønstret søyler: saltberiket fôr fra mars til mai. Data er presentert som gjennomsnitt ± SEM. Store bokstaver viser signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper innen tidspunkter; små bokstaver viser signifikante forskjeller ved ulike tidspunkter innad i behandlingsgruppene ($p < 0.05$).

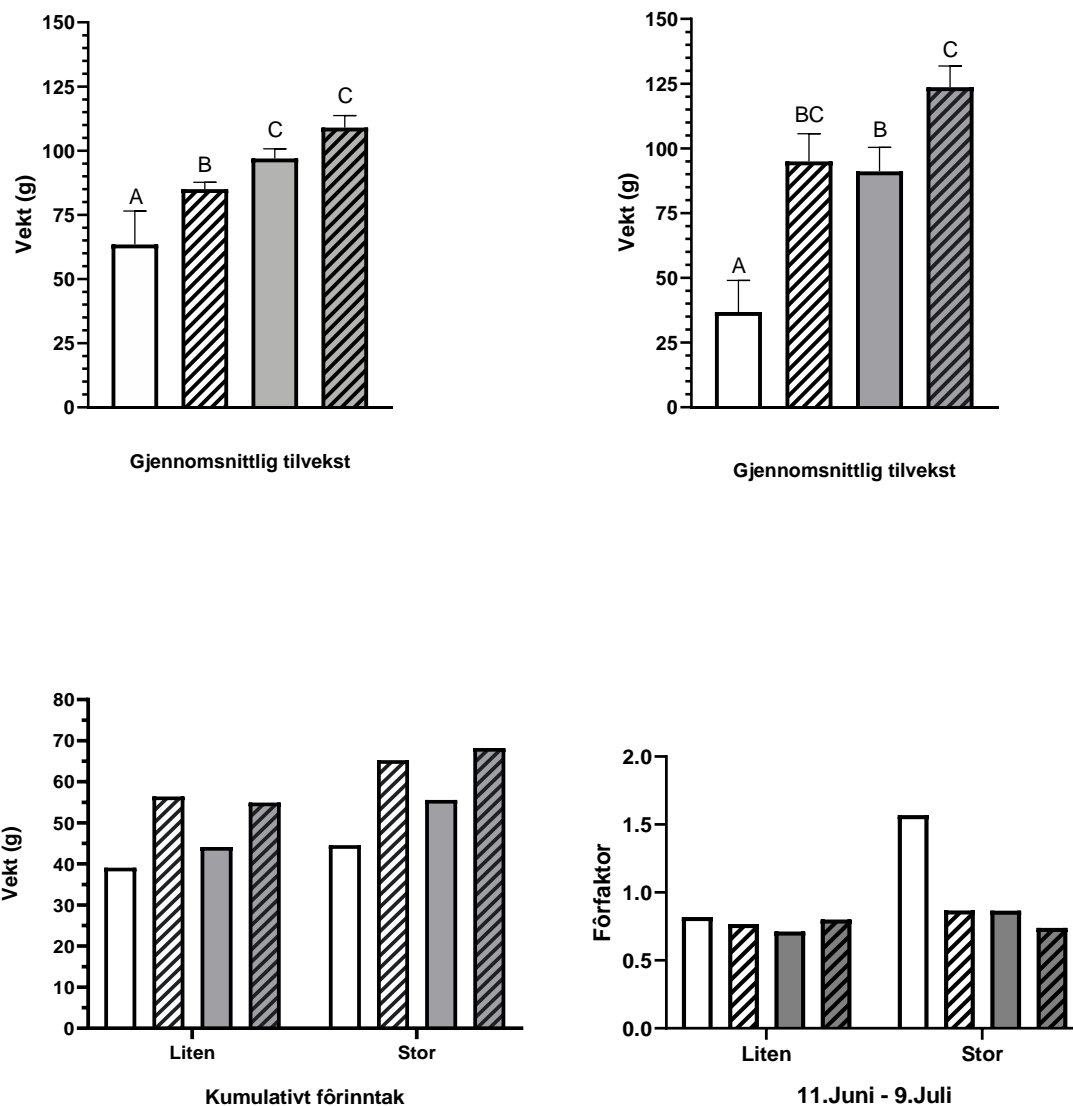


Figur 15 - Spesifikk vekstrate (SGR) hos Floy-merket Atlantisk laks med startvekt 40 g (A) og 130 g (B) ved slutten av ferskvannsfasen samt gjennom sjøvannsfasen fra juni til juli. Stiplet linje markerer sjøvannsoverføring. Hvite søyler: LL, grå søyler: SP, ordinære søyler: kontroll fôr fra mars til mai, mønstret søyler: saltberiket fôr fra mars til mai. Data er presentert som gjennomsnitt ± SEM. Store bokstaver viser signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper innen tidspunkter; små bokstaver viser signifikante forskjeller ved ulike tidspunkter innad i behandlingsgruppene ($p < 0.05$).

3.2.2 Fôrutnyttelse



Figur 16 – Fôrinntak hos Floy-merket Atlantisk laks med startvekt 40 g (A) og 130 g (B) i sjøvannsfasen. Fôrinntak er presentert som gjennomsnittlig konsumert tørrvekt fôr per fisk i hver behandlingsgruppe.



Figur 17 - Gjennomsnittlig tilvekst, kumulativt fôrinntak og fôrfaktor hos Floy-merket Atlantisk laks med startvekt 40 g (A) og 130 (B) i sjøvannsfasen fra juni til juli. Tilvekst og kumulativt fôrinntak er presentert som total vektøkning og mengde konsumert fôr i tørrvekt per fisk i hver behandlingsgruppe. Hvite søyler: LL, grå søyler: SP, ordinære søyler: kontroll fôr, mønstret søyler: saltberiket fôr fra juni til juli. Data er presentert som gjennomsnitt ± SEM. Forskjellige store bokstaver viser til signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper i løpet av sjøvannsfasen ($p < 0.05$).

Vekt

Vektutvikling under sjøvannsfasen hos behandlingsgruppene med liten og stor fisk er presentert i Fig. 14, A og B. Fisken i alle behandlingsgruppene i begge størrelsesgruppene økte i vekt gjennom sjøvannsfasen fra mai til juni (alle $p < 0,05$). Hos begge størrelsesgruppene av fisk ble vektforskjellen mellom behandlingsgruppene før utsett i mai (høyere vekt i begge LL gruppene

enn i begge SP gruppene) bibeholdt frem til forsøkslutt i juli, foruten fisken i LL kontrollgruppene som ved slutten av forsøket hadde lavere vekt enn LL +salt (begge $p < 0,0001$).

Spesifikk vekstrate

Spesifikk vekstrate under sjøvannsfasen hos behandlingsgruppene med liten og stor fisk er presentert i Fig. 15, A og B. Etter sjøvannsoverføring sank SGR for fisk i LL kontroll markant hos liten- (alle $p < 0,01$) og hos stor fisk (alle $p < 0,05$) i den første måneden. Hos liten fisk var det også en reduksjon i SGR hos LL +salt i den første måneden etter overføring ($p = 0,0064$), men ikke hos SP gruppene. Hos stor fisk var det også en redusert SGR hos LL +salt ($p = 0,0083$) og hos SP kontrollgruppen ($p = 0,0003$), men ikke hos SP +salt. I løpet av den siste måneden i sjøvann økte SGR hos fisken i alle behandlingsgruppene og i begge størrelsesgrupper (alle $p < 0,01$). Hos liten fisk ble den høyeste SGR målt hos begge SP gruppene. Disse hadde en høyere SGR enn LL +salt (begge $p < 0,01$), som igjen hadde høyere SGR enn LL kontrollgruppen ($p = 0,0007$). Hos stor fisk hadde SP +salt høyere SGR enn LL +salt ($p < 0,0001$) og SP kontrollgruppe ($p = 0,0002$). Fisken i SP og LL +salt hadde ikke forskjellig SGR, men de hadde en høyere SGR enn fisken i LL kontrollgruppen. I denne perioden varierte SGR hos liten fra $1.1 \% \text{ dag}^{-1}$ i LL kontrollgruppa til $2 \% \text{ dag}^{-1}$ i SP +salt og hos stor fisk fra $0,25 \%$ til $1.3 \% \text{ dag}^{-1}$ i de samme behandlingsgruppene.

Fôrinntak, tilvekst og fôrutnyttelse

Fisken i alle gruppene hadde et stigende fôrinntak gjennom perioden i sjøvann (Fig. 16). Trenden for begge størrelsesgrupper er at fisk fôret med saltindusert pellets har høyere fôrinntak i sjøvannsfasen enn det kontrollgruppene har. Tilvekst og kumulativt fôrinntak i løpet av siste måned i sjøen er presentert i Fig. 17. Fisk i LL har dårligst tilvekst og er forskjellig fra de andre behandlingsgruppene. På grunnlag av disse data ble det beregnet fôrfaktor for alle gruppene. Fôrfaktoren hos liten fisk er under 1 for alle behandlingsgruppene. Det samme gjelder for stor fisk, med unntak av LL som hadde en svært høy fôrfaktor fra juni til juli.

4. Diskusjon

Utvikling av sjøvannstoleranse hos prøvetatt fisk.

Gjelle NKA er et nøkkelenzym involvert i osmoregulering og er sentral i reguleringen og opprettholdelsen av den intracellulære elektrokjemiske gradienten. Enzymet er en del av plasmamembranen i kloridcella hovedsakelig i gjelle, nyre og lever i beinfisk (Lin *et al.*, 2003; Scheiner-Bobis, 2002). Det har tidligere blitt vist sammenheng mellom økt gjelle NKA aktivitet og behandling med saltberiket fôr hos fisk i ferskvann (Fontainhas-Fernandes *et al.*, 2001; Salman *et al.*, 1987; Zaugg *et al.*, 1983). For eksempel viste Salman & Eddy (1987) at regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) fôret med høyt innhold av salt (12%) utviklet et høyt antall kloridceller og økt NKA aktivitet. I denne studien ble det observert økende NKA aktivitet hos liten fisk holdt på LL, men ikke for SP. Hos større fisk var det ingen utvikling for noen av gruppene (Fig. 6. A, B). Verdier på ca. 10 $\mu\text{mol ADP/mg protein per time}$ kan indikere at fisken er smoltifisert (Noble *et al.*, 2018). Noe paradoksalt er det at forventet aktivitet hos smolt kun ble funnet hos liten fisk holdt kontinuerlig på LL ved T3. Samme trend så vi ikke LL kontroll stor fisk ettersom disse ikke hadde noen økning i gjelle NKA aktivitet mellom T2 og T3. Sistnevnte var mellom 250 og 300 g ved T3, og det er vist at større post-smolt kan regulere kroppsvæsken med lavere NKA aktivitet sammenliknet med mindre smolt (Calabrese *et al.*, 2017; Nilsen *et al.*, 2007; Stefansson *et al.*, 2012). I denne studien hadde ikke saltfôr noen effekt på NKA aktivitet, og samsvarer ikke med tidligere forskning som viser at saltberiket diett fører til økt NKA aktivitet (Salman *et al.*, 1987; Trombetti *et al.*, 1996). Det er ingen god sammenheng mellom sjøvannstoleranse og NKA aktivitet ved T3 i hverken stor eller liten fisk i dette forsøket, og spørsmålet om hvorvidt NKA aktivitet er en god indikator på smoltstatus og prestasjon i sjøvann er relevant å stille. Det har lenge vært kjent at NKA er en gruppe enzymer som er essensielle for ionetransporten inn og ut av gjellene, og dermed livsviktig for at smolten å kunne skille ut overflødig salter som følger med vannet den drikker. At dette er en viktig indikator å ta hensyn til ved definering av smoltifiseringsstatus i settefiskproduksjon er relevant, selv om det ikke var en god indikator i dette forsøket.

Som ventet hos smoltifiserende laks var gnuttrykket av NKA $\alpha 1a$, den isoformen som regnes som dominant i ferskvann (McCormick *et al.*, 2009; Nilsen *et al.*, 2007), redusert hos liten fisk i SP sammenlignet med LL ved T2. Det var også lavere uttrykk av denne isoformen ved T3 enn ved T1 hos både salt- og lysgruppene (Fig. 7, A). Det ble observert reduksjon i NKA $\alpha 1a$ fra T1 til T3 hos stor fisk, utenom fisk holdt på SP +salt. Uttrykket av NKA $\alpha 1b$ var redusert hos

liten fisk holdt på SP sammenlignet med fisken holdt på LL ved T2. Dette var forventet respons for fisk utsatt for kort dag (Nilsen *et al.*, 2007). Derimot ble det observert en økning i NKA $\alpha 1b$ fra T1 til T3 hos saltgruppen, uavhengig av lysregime hos mindre fisk. Dette viser at saltberiket fôr, per se, stimulerer sjøvannsisoformen i ferskvannsfasen, og støtter tidligere studier som viser at laksefamilien kan modulere gjelle NKA aktivitet etter eksponering til endret salinitet (Bystriansky *et al.*, 2006; Mackie *et al.*, 2005; Richards *et al.*, 2003). Det var forventet at fisk i SP kontrollgruppen skulle utvikle økende $\alpha 1b$ uttrykk under ferskvannsfasen, men dette var ikke tilfellet (Fig. 7). Samtidig korresponderer dette godt med lav NKA aktivitet i ferskvannsfasen (Fig. 6). Hos stor fisk var det kun økning i NKA $\alpha 1b$ hos SP +salt.

Ettersom CFTR anion kanaler primært regnes å være involvert i sekresjon av ioner (Evans *et al.*, 2005), var det til noen grad overraskende at isoformene CFTR I -og II hadde lav utvikling fra februar til mai da smoltifisering i større grad regnes å føre til økt uttrykk av disse (Nilsen *et al.*, 2007). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom T1 og T3 for noen av størrelsesgruppene for CFTR I. Derimot var det forskjell mellom gruppene ved T2 som igjen antyder at dette var effekt av lysregime. Hos liten fisk var det kun økning i gruppen LL +salt, noe som stemmer med tidligere studier (Perry *et al.*, 2006). Hos stor fisk var det ingen markant økning i uttrykk av CFTR I, noe som var uforventet. Det var derimot forskjell mellom relativt genuttrykk av CFTR II ved T1 og T3 for liten størrelsesgruppe, og stor gruppe med unntak SP +salt. Resultatene viste negativt utvikling noe som igjen var uforventet.

Det har blitt vist at Atlantisk laks eksponert til sjøvann får forøket genuttrykk av gjelle CFTR I, og at uttrykket av CFTR II øker betydelig etter 24 t sjøvannstest (Singer *et al.*, 2002). Dette korresponderer godt med resultater vi fikk etter 24 t SWT. Data fra dette er ikke presentert i resultatdelen ettersom forskjellen mellom 24 t SWT og ferskvannsfasen ikke utgjorde store forskjeller for de andre genene. Forutsatt at begge CFTR isoformene er en del av den apikale membranen som funksjonelle Cl^- kanaler, kan det tenkes at høyt uttrykk av CFTR II er viktig for hurtig aktivering av CFTR ved eksponering til høyere salinitet. Det kreves flere studier for å si noe konkret om utviklingen og betydningen av CFTR under smoltifisering og etter eksponering til salt i form av sjøvann eller fôr.

I likhet med CFTR regnes også basolaterale NKCC anion kanaler å være primært involvert i sekresjon av ioner (Evans *et al.*, 2005). Igjen var resultatene i dette forsøket uventet ettersom det bare var én gruppe (LL +salt) hos mindre fisk som hadde signifikant positiv utvikling sammenlignet med LL kontrollgruppa. Hos større fisk var det ingen forskjell mellom gruppene, eller mellom ulike tidspunkter. Samme trend ble funnet ved analyser av fisk på 24 t SWT for

begge størrelsesgrupper. Dette avviker fra tidligere studier som viser at NKCC har en positiv utvikling i genuttrykk under smoltifiseringen og at dette er en del av forberedelsene til sjøvannsopphold (Nilsen *et al.*, 2007; Pelis *et al.*, 2001; Tipsmark *et al.*, 2002). Ettersom det har blitt funnet to sekretoriske isoformer av NKCC, 1a og 1b, i Europeisk ål, hvorav bare NKCC1a er oppregulert etter sjøvannsoverføring (Cutler *et al.*, 2002), kan man ikke ekskludere muligheten om at disse finnes i Atlantisk laks og at de kan være forskjellig regulert. Om dette er grunnlag nok for å hevde at våre analyser ikke var spesifikke nok for å måle den ‘hypotetiske’ oppregulerte isoformen i laks er diskutabelt og kan ikke fastsettes i denne studien.

Plasma osmolalitet ved start av forsøket var 380 og 360 mOsm kg⁻¹ hos henholdsvis liten og stor fisk (Fig. 9). Hverken stor eller liten fisk hadde full sjøvannstoleranse på dette tidspunkt. Ved T2 kommer det tydelig frem at sjøvannstoleransen var bedre hos fisk holdt på LL enn de holdt på SP. Årsaken kan være at fisk i LL var i ferd med å utvikle spontan sjøvannstoleranse, og at denne utviklingen ble avbrutt ved eksponering til kort dag. Spontan utvikling av sjøvannstoleranse hos lakseunger holdt på LL som har nådd en tilstrekkelig størrelse er beskrevet før (Handeland *et al.*, 2013), men denne utviklingen representerer ikke nødvendigvis fullverdig smoltifisering (Sigholt *et al.*, 1998). Ved slutten av ferskvannsfasen var osmolaliteten for fisk i begge størrelsesgrupper redusert hos LL og SP, men fortsatt noe høy sammenliknet med hva som estimeres til normalt (290 – 340 mOsm/kg) for beinfisker i saltvann (McCormick *et al.*, 1987). De relativt lavere verdiene hos stor fisk enn hos mindre fisk kan være relatert til forskjeller i størrelse, fordi fiskestørrelse og plasma osmolalitet etter sjøvannstester er vist å være omvendt proporsjonal (Arnesen *et al.*, 1998).

Plasma klorid nivåene holdt seg på noenlunde samme nivå gjennom ferskvannsfasen og var høyere enn forventet etter 24 t sjøvannstest i mai hos begge størrelsesgruppene (Fig.10). I følge tidligere studier er plasmaklorid nivåer under 150 mmol/l i post-smolt nødvendig for å vokse og overleve i sjøvann (Blackburn *et al.*, 1990; Finstad *et al.*, 1988). Dette tyder altså på at kloridresultatene for alle behandlingsgruppene fra 24 t sjøvannstest i perioden april-mai (3-4 måneder ut i forsøket) er i det øvre sjiktet av hva laksesmolt kan tåle. Samme trend vises også etter 7 dagers sjøvannstest.

Ved slutten av ferskvannsperioden hadde fisken i saltgruppene hos begge størrelsesgrupper best sjøvannstoleranse med henhold til osmolalitet og klorid etter 24 t sjøvannstest. Dette korresponderer godt med tidligere studier som viser at saltberiket fôr stimulerer til økt sjøvannstoleranse (Salman, 1993; Zaugg *et al.*, 1983). Etter 7 dagers sjøvannstest var verdiene

innenfor det som forventes av smolt i sjøvann hos alle gruppene, samtidig som SP kontroll viste noe dårligere toleranse. At denne gruppen ikke presterte bedre enn fisk i saltgruppene var ikke nødvendigvis overraskende, men derimot forbausende når en sammenlikner med LL. Det er verdt å nevne at det under prøveuttak tok forholdsvis lang tid å håve ut umerket fisk ettersom vi i tillegg hadde Floy-merket- og tatovert fisk til et smitteforsøk i samme kar. Dette ser ut til å ha påført unødvendig stress på fisken og kan ha gitt en akutt reduksjon i sjøvannstoleranse.

Tilvekst og kondisjonsfaktor hos Floy-merket fisk i ferskvannsfasen.

Den reduserte tilveksten mellom T1 og T2 hos fisken i kortdagsgruppene sammenlignet med de på LL hos både stor og liten fisk (Fig. 11) korresponderer godt med resultater i tidligere studier om at vintersignal begrenser vektøkning, og at redusert daglengde fører til nedsatt appetitt (McCormick *et al.*, 1987; Skilbrei *et al.*, 1997; Solbakken *et al.*, 1994; Strand *et al.*, 2018). Den lavere tilveksten hos fisken i SP gruppene etter overføring til lang dag (mellom T2 og T3) sammenlignet med fisken i LL gruppene antas å reflektere en økt lengdevekst, samt fettmobilisering, som er vist å skje hos smoltifiserende lakseunger etter overføring fra kort til lang dag. Dette regnes å være styrt av økte plasmanivåer av veksthormon (GH) og kortisol (Dickhoff *et al.*, 1997; Folmar *et al.*, 1980; Hoar, 1988). Dette korresponderer godt med våre funn på KF som gikk ned hos SP gruppene mellom T2 og T3. Dette var ikke tilfellet for fisk i LL gruppene (Fig. 12). En reduksjon i KF er et mye brukt tegn på at fisken gjennomgår en smoltifisering (Folmar *et al.*, 1980; Hoar, 1988). Basert på våre resultater fra utvikling av KF hadde ikke i fisk i LL gruppene (inklusive de som fikk saltfôr) gjennomgått en fullverdig smoltifisering.

Det ble også funnet en tendens til lavere tilvekst hos fisken i gruppene som ble gitt saltfôr enn i gruppene som ble gitt kontrollfôr innad i lysgruppene. Dette gjaldt for begge størrelsesgrupper (Fig.13). Disse forskjellene var ikke signifikante, men konsistent i alle gruppene og kan tyde på at saltberiket fôr reduserte fôrutnyttelsen, slik det er vist i tidligere forsøk (Duston, 1993). Tidligere ferskvannsforsøk med arter som ørnefisk, karpe og havabbor viser at optimalt saltinnhold i fôr varierer fra 1 – 4 % for best vekstrate (Eroldogan *et al.*, 2005; Gatlin *et al.*, 1992; Nandeeshha *et al.*, 2000). På bakgrunn av det kan det tenkes at saltinnholdet i fôret i vårt forsøk (7% NaCl) var for høyt til å gi optimal vekst i ferskvann.

Det er derimot verdt å nevne at noen studier viser at saltberiket fôr fører til god vekst hos euryhalin fisk i ferskvann (Appelbaum *et al.*, 2009; Eroldogan *et al.*, 2005; Gatlin *et al.*, 1992;

Harpaz *et al.*, 2005; Nandeeshha *et al.*, 2000). En teoretisk årsak til forbedret vekstrate kan være relatert til osmoregulatoriske fordeler i euryhalin fisk. Moderat salterstatning i fôr kan tenkes å spare mye av den energien som brukes til osmoregulering i ferskvann, og fisken vil kunne bruke denne energien til vekst istedenfor (Gatlin *et al.*, 1992; Zaugg *et al.*, 1983). I kontrast til dette indikerer andre studier på at fisk fôret med saltberiket diett viser ingen, men også negativ utvikling i vekst (Murray *et al.*, 1979; Shaw *et al.*, 1975). Desto høyere saltinnhold (9 - 12%) i dietten, desto dårligere vekst (Salman *et al.*, 1990b). Årsaken til dette kan være at NaCl interfererer med andre essensielle komponenter («*nutrient dilution effect*»), og dermed påvirker fôropptak negativt (Salman *et al.*, 1988). En noe redusert energitetthet i saltfôret sammenlignet med kontrollfôret i dette forsøket vil sannsynligvis også ha en effekt på tilvekst.

Det har blitt publisert ulike resultater om hva slags effekt saltindusert fôr har på vekst de siste årene. Årsaken til dette er relatert til bruk av forsøksfisk med ulikheter i osmoregulatoriske egenskaper og bruk av forskjellige fiskearter med varierende toleranse til salinitet. En annen årsak kan være mangelen på standardisering av fôringsstrategier i forsøk; fôrmengde, saltinnhold i diett og evaluering av fiskens livsstadie (størrelse og kjønnsmodning).

Smoltutvikling i relasjon til salt- og lysbehandling.

Fisk behandlet med kort daglengde fikk redusert k-faktor etter overføring til lang dag, noe som tyder på økt GH nivå, og aktiv smoltifisering. Derimot er det ingen konsistente resultater på NKA aktivitet og genuttrykk av tilhørende ionocytter som skulle tilsi dette. Etter 7 dagers sjøvannstest tyder resultatene på at fisken i alle gruppene hadde tilstrekkelig sjøvannstoleranse til å opprettholde ione -og osmoregulatorisk homeotase. Fisk fôret med saltberiket diett, uavhengig av lysbehandling, viste god sjøvannstoleranse basert på resultater fra osmolalitet og klorid etter sjøvannstester. Liten fisk på LL +salt viste noe høyere genuttrykk for NKCC I og CFTR I, men bortsett fra det var det ingen resultater som utartet seg veldig forskjellig mellom stor og liten størrelsesgruppe, eller mellom lys- og saltbehandling, da det gjelder genuttrykk.

Utfordringen med morfologi i form av sølvfarging er at observasjonene var subjektive under prøveuttak, samt at det var individuell variasjon mellom fisk i samme gruppe. Fisken i alle gruppene hadde utviklet smoltdrakt ved T3 (bildeappendix), men hadde ikke optimal sjøvannstoleranse. Visuell smoltkarakter (sølvfarging) synes ikke å være tilfredsstillende kriterie for bevis av smoltifisering i dette forsøket. Visuell smolt er ikke nødvendigvis en fysiologisk funksjonell smolt, og mange forandringer av visuell karakter kan forklares som

variasjoner i fiskens vekstmønster (Finstad *et al.*, 1995). En slik størrelsesrelatert sølvfarging er blitt rapportert hos Atlantisk laks og sølv laks (*Oncorhynchus kisutch*) (Johnston *et al.*, 1970; McMahon *et al.*, 1988).

Prestasjon i sjøvann.

Det har blitt vist at saliniteten i vannet har påvirkning på fiskens matkonsum. Studier antyder at fôrintaket til regnbueørret holdt i saltvann (salinitet 28 ‰) øker samtidig som vekstraten synker og at dette er en konsekvens av redusert fôrutnyttelse (Jurss *et al.*, 1985; MacLeod, 1978). I euryhaline arter påvirkes vekst negativt av økt salinitet i vann og maksimal vekstrate blir nødvendigvis ikke oppnådd under isosmotiske forhold i brakkvann (Brett, 1979). Våre resultater motstrider dette. Vi så en økning i SGR fra ferskvann til sjøvann hos fisken i både SP kontroll og SP +salt i løpet av sjøvannsperioden hos små fisk i motsetning til LL kontroll. Dette var derimot ikke tilfellet for stor fisk (Fig. 15). I dette forsøket ble tilvekst i sjøfasen påvirket både av lysbehandling og type fôr ($p < 0,0001$ for begge) i begge størrelsesgrupper. Tilvekstforskjellen mellom SP kontroll og SP +salt hos stor fisk avviker fra det Staurnes *et al* (2000) viste i regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*). Her ble den ene gruppa utsatt for naturlig fotoperiode og gitt saltberiket diett (1,5 % NaCl og 9,5 % NaCl), mens den andre gruppa også ble behandlet med naturlig fotoperiode og gitt kontrollfôr uten salt, hvoretter fisken gikk på sjøvann i 8 uker. Her ble det ikke vist noen signifikante forskjeller mellom gruppene på tilvekst etter utsett i sjø (Staurnes *et al.*, 2000).

Tilvekst i sjø (Fig. 15) må i dette forsøket vurderes i forhold til effekten av behandling i ferskvann på smoltstatus ved utsett i sjø. SP kontroll hadde bedre tilvekst i sjø enn hva LL +salt hadde for liten fisk. Paradoksalt nok gav kombinasjonen av lys- og saltstimulering en mye bedre vekst i sjøvann sammenlignet med de andre behandlingene i stor fisk, men bare i mindre grad hos små fisk. På tross av store forskjeller i tilvekst mellom behandlingsgruppene i sjøvann var forskjeller i fiskevekt ved avslutning av sjøvannsoppholdet ikke stor (Fig. 14). Dette gjenspeiles av ulik tilvekst i ferskvannsfasen i de ulike behandlingsgruppene, dvs. bedre tilvekst i gruppene som gikk på kontinuerlig lys sammenlignet med de som ble gitt en kortdagsperiode (Fig. 11).

Forsøket påviste en lavere tilvekst hos begge størrelsesgrupper den første måneden i sjø enn i den andre måneden (Fig. 15). Dette er å forvente på grunn av at fisken stresses ved utsett, samtidig som at individene trenger tid til å tilpasse seg sjøvann. Ifølge tilgjengelig veksttabell (Appendix IV) for post-smolt i sjøvann på 7 °C er det forventet at prosentvis økning i

kroppsvekt dag⁻¹ er $\approx 1,28$ og $\approx 1,03$ for fisk med en vekt på henholdsvis 125 og 300 gram, altså de fiskestørrelser som henholdsvis den lille og store fisken i dette forsøket hadde ved overføring til sjø. Den mindre fisken som var behandlet med kort lysperiode og salt i dette forsøket hadde i andre måned av sjøoppholdet en tilvekst på nesten 2 %, hvilket er betydelig mer enn forventet, mens samme behandling i gruppa med stor fisk hadde en tilvekst på 1,25 %, hvilket også er over det som er forventet. Dette kan tyde på at kombinasjonen lys- og saltstimulering kan øke tilvekst etter sjøutsett i norsk laksenæring. Flere forsøk med lengere opphold i sjøvann er nødvendig dersom en skulle få godt datagrunnlag for langtidseffekter av behandlingene.

De fleste studier viser til at saltberiket fôr ikke har noen negativ effekt på appetitt eller fôrinntak hverken hos regnbueørret eller Coho-laks (MacLeod, 1978; Zaugg *et al.*, 1969). For eksempel ble ikke fôrinntak og appetitt negativt affektet av saltberiket diett, og fôring til full mettelse medførte forøket vekst i ferskvann (Salman *et al.*, 1988). Det ble derimot ikke vist noen forskjeller i vekstrate mellom kontroll -og saltfôr. I likhet med dette ble det heller ikke observert forskjeller i forutnyttelse og fôrinntak i tilapia (*Oreochromis niloticus*) på kontroll -og saltfôr (Fontainhas-Fernandes *et al.*, 2000). I sjøvannsrelaterte forsøk har det også blitt vist at fôrinntaket til regnbueørret på saltdiett var høyere enn de som fikk kontrollfôr. Grunnen til at fisken spiser mer saltfôr kan være at den kompenserer mot at saltet har en næringsfortynnende effekt på andre komponenter i fôret (Salman *et al.*, 1990a). Dette korresponderer godt med vårt forsøk, der det ble målt høyest fôrinntak for fisk på saltdiett i sjøvannsfasen (Fig. 17. A, B), noe som også bekreftes etter beregning av kumulativt fôrinntak for alle gruppene i perioden 11.juni - 9.juli (Fig. 18). Det ble også beregnet gjennomsnittlig tilvekst for forsøksfisken i denne perioden. Resultatene viste at LL hadde dårlig vekst i sjø sammenlignet med SP. Derimot hadde LL +salt god prestasjon i sjø, men også noe dårligere enn SP. Åpenbart kom kombinasjonen av lys og salt best ut, det vil si at lysbehandling gav best prestasjon i sjøvann og ble ytterligere forbedret av salt i fôret.

Oppsummering

I denne studien ble det avdekket uforventede resultater med hensyn til NKA aktivitet, genuttrykk, plasma osmolalitet og kloridkonsentrasjon etter sjøvannstester ved slutten av ferskvannsdelen som ikke viser en fullverdig smoltifisering hos lysstimulert smolt, ei heller klare forskjeller mellom behandlingsgruppene. Ettersom dette er faktorer som er mye brukt i oppdrettsnæringen for å bestemme smoltifiseringsstatus og derved prestasjon etter sjøutsett var det avgjørende og høyst relevant å basere oppgaven rundt disse biologiske indisiene. Grunnen

til varierende resultater tenkes å skyldes ulike størrelsesgrupper, ettersom dette kunne gi ulike smoltifiseringsstatus på fisken under forsøksperioden. Det anbefales fortsatt at faktorer som enzymaktivitet i gjeller, genuttrykk og plasmaverdier tas hensyn til i settefiskfasen for å avgjøre smoltstatus, da litteraturen gir godt vitenskapelig grunnlag for at utviklingen av disse er avgjørende under smoltifiseringen. I dette forsøket, derimot, var ikke disse gode indikatorer totalt sett.

Resultater fra tilvekst og fôrutnyttelse i sjø ga derimot meget klare svar. Fisk behandlet med kort daglengde og saltberiket fôr presterte best, samtidig som det ble vist at eksponering til kort dag gav en ekstra god preadaptasjon til sjøvann. Resultatene fra dette forsøket gav ikke grunnlag for å si hvilken ekstra dimensjon lysstyringen gav, men det er grunn til å anta at dette har å gjøre med hormonelle og metabolske tilpasninger som styres av en midlertidlig eksponering til kort dag. Kombinasjonen av lys- og saltbehandling bør derfor vurderes som meget aktuell for lakseoppdrettere med hensyn på tilvekst og velferd i sjøfasen. God vekst og velferd etter sjøutsett er særdeles viktig både av hensyn til fiskens liv og for oppdretterens økonomi.

Referanser

- Appelbaum, S., & Jesuarockiaraj. (2009). Salt incorporated diets for enhancing growth performance and survival in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles reared in low saline brackish water. *Advances in early life history study of fish*, 213-217.
- Arnesen, A. M., Johnsen, H. K., Mortensen, A., & Jobling, M. (1998). Acclimation of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts to 'cold' sea water following direct transfer from fresh water. *Aquaculture*, 168, 351-367
- Basulto, S. (1976). Induced saltwater tolerance in connection with inorganic salts in the feeding of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 8, 45-55.
- Björnsson, B. T., Stefansson, S. O., & McCormick, S. D. (2011). Environmental endocrinology of salmon smoltification. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170, 290-298
- Björnsson, B. T., 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* L.) during parr-smolt transformation. *Aquaculture* 82, 77-91.
- Blackburn, J., & Clarke, W. C. (1990). Lack of density effect on growth and smolt quality in zero-age coho salmon. *Aquaculture. Eng.* 9, 121-130.
- Brett, J. R. (1979). Environmental factors and growth. In *Fish Physiology vol. VIII* (pp. 599-675). New York: Academic Press.
- Brett., J. R., & Groves, T. D. D. (1979). Physiological energetics. *Fish Physiology.* 8, 280 – 352.
- Bystriansky, J. S., Richards, J. G., Schulte, P. M., & Ballantyne, J. S. (2006). Reciprocal expression of gill Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit isoforms α 1a and α 1b during seawater acclimation of three salmonid fishes that vary in their salinity tolerance. *Journal of Experimental Biology* 209, 1848-1858.
- Calabrese, S., Nilsen, T. O., Kolarevic, J., Ebbesson, L. O. E., Pedrosa, C., Fivelstad, S., Handeland, S. O. (2017). Stocking density limits for post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with emphasis on production performance and welfare. *Aquaculture.* 468, Part 1, 363-370.
- CibaCorning. (1980). 925 Chloride Analyzer Intruction Manula. Retrieved from Massachusetts, USA:
- Clarke, W. C., Saunders, R. L., & McCormick, S. D. (1996). Smolt Production. *Principles of Salmonid Culture, vol. 29*, 517–567.

- Clarke, W. C., Shelbourn, J. E., Ogasawara, T., & Hirano, T. (1989). Effect of initial day length on growth, seawater adaptability and plasma growth hormone levels in underyearling coho, chinook, and chum salmon. *Aquaculture*, 82, 51-62.
- Cutler, C. P., & Cramb, G. (2002). Two isoforms of the Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter are expressed in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1566, 92-103.
- Dempson, J. B., Robertson, M. J., Pennell, C. J., Furey, G., Bloom, M., Shears, M., Robertson, G. J. (2011). Residency time, migration route and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar*, in a Canadian fjord. *J. Fish. Biol.* 78, 1976-1992.
- Dickhoff, W. W., Beckman, B. R., Larsen, D. A., Duan, C., & Moriyama, S. (1997). The role of growth in endocrine regulation of salmon smoltification. *Fish Physiol. Biochem.* 17 231–236.
- Duston, J. (1993). Effects of dietary betaine and sodium chloride on seawater adaptation in atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology.* 105, 673-677.
- Duston, J., & Saunders, R. L. (1992). Effect of 6-, 12.. and 18-month photoperiod cycles on smolting and sexual maturation in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49, 2273-2280.
- Ebbeson, L. O. E., Ebbeson, S. O. E., Nilsen, T. O., Stefansson, S. O., & Holmqvist, B. (2007). Exposure to continuous light disrupts retinal innervation of the preoptic nucleus during parrismolt transformation in Atlantic salmon. *Aquaculture* 273, 345-349. .
- Edwards, S. L., & Marshall, W. S. (2013). Principles and patterns of osmoregulation and euryhalinity in fishes. *Fish Physiology. Vol. 32*, 1-44.
- Eroldogan, O. T., Kumlu, M., Kir, M., & Kiris, G. A. (2005). Enhancement of growth and feed utilization of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed supplementary dietary salt in freshwater. *Aquaculture Res* 36, 361-369.
- Europharma. (2010). Norge Patent No.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews* 85, 97–177.
- Finstad, B., & Iversen, M. (1995). Testing av smoltkvaliteten hos laks og sjøørret på smoltproduksjonsanleggene i Eidfjord, Eikesdalen og Lundamo. *NINA Oppdragsmelding*, 341, 1-21.

- Finstad, B., Staurnes, M., & Reite, O. B. (1988). Effect of low temperature on sea-water tolerance in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 72(3-4), 319-328.
- Folmar, L. C., & Dickhoff, W. W. (1980). The parr-smolt transformation (smoltification) and seawater adaptations in salmonids. *Aquaculture* 21, 1–37
- Fontainhas-Fernandes, A., Monteiro, M., Gomes, E., Reis-Henriques, M. A., & Coimbra, J. (2000). Effect of dietary sodium chloride acclimation on growth and plasma thyroid hormones in tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) in relation to sex. *Aquacult Res* 31, 507-517.
- Fontainhas-Fernandes, A., Russell-Pinto, F., Gomes, E., Reis-Henriques, M. A., & Coimbra, J. (2001). The effect of dietary sodium chloride on some osmoregulatory parameters of the teleost, *Oreochromis niloticus* after transfer from freshwater to seawater. *Fish Physiol. Biochem.* 23, 307-316.
- Gatlin, D. M., Mackenzie, D. S., Craig, S. R., & Naill, W. H. (1992). Effects of dietary sodium chloride on red drum juveniles in waters of various salinities. *Prog Fish Cult* 54, 220-227
- Handeland, S. O., Imsland, A. K., Björnsson, B. T., & Stefansson, S. O. (2013). Long-term effects of photoperiod, temperature and their interaction on growth, gill Na⁺, K⁺-ATPase activity, seawater tolerance and plasma growth-hormone levels in Atlantic salmon *Salmo salar*. *J. Fish Biol.*, 83(5), 1197-1209.
- Handeland, S. O., Wilkinson, E., Sveinsbø, B., McCormick, S. D., & Stefansson, S. O. (2004). Temperature influence on the development and loss of seawater tolerance in two fast-growing strains of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 233, 513–529.
- Harpaz, S., Hakim, T. Y., Slosman, Y., & Eroldogan, O. T. (2005). Effects of adding salt to the diet of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) reared in fresh or salt water re-circulating tanks, on growth and brush border enzyme activity. *Aquaculture*, 248, 315-324
- Hoar, W. S. (1988). The physiology of smolting salmonids. *Fish physiology*, Vol. XIB. , 275-343.
- Ingerslev, H. C., Pettersen, E. F., Jakobsen, R. A., Petersen, C. B., & Wergeland, H. I. (2006). Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Immunology*, 43 (8), 1194-1201.
- Jackson, A. J. (1977). Reducing trout mortalities after seawater transfer. *Fish Farming Int.* 4, 31-32.

- Johnston, C. E., & Eales, J. G. (1967). Purines in the integument of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during parr-smolt transformation. *J. Fish. Res. Board Can.* 24, 955-964.
- Johnston, C. E., & Eales, J. G. (1970). Influence of body size on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during parr-smolt transformation. *J. Fish. Res. Board Canada*, 24, 955-964.
- Jurss, K., Bittorf, T. H., & Vokler, T. H. (1985). Influence of salinity and ratio of lipid to protein in diets on certain enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) *Comp Biochem Physiol* 81B, 73-79
- Jørgensen, E. H., & Jobling, M. (1994). Feeding and growth of exercised and unexercised juvenile Atlantic salmon in freshwater, and performance after transfer to seawater. *Aquaculture International* 2, 154-164
- Kocik, J. F., Hawkes, J. P., Sheehan, T. F., Music, P. A., & Beland, K. F. (2009). Assessing estuarine and coastal migration and survival of wild Atlantic salmon smolts from the Narraguagus River, Maine using ultrasonic telemetry. *Am. Fish. Soc. Symp* 69, 293-310.
- Lacroix, G. L., Knox, D., & Stokesbury, M. J. W. (2005). Survival and behaviour of post-smolt Atlantic salmon in coastal habitat with extreme tides. *J. Fish. Biol.* 66, 485-498.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (1993). Principles of biochemistry. *Second edition Worth Publishers, Inc., New York 1013.*
- LifeTechnologies. (2012). *Life Technologies Real-Time PCR handbook. 2.utg.* .
- Lin, Y. M., Chen, C. N., & Lee, T. H. (2003). The expression of gill Na, K-ATPase in milk fish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and fresh water. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol Integr. Physiol.*, 489-497.
- Linnaeus. (1758). Systema Natuae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. *Edito decima, reformata. Laurentius Salvius: Holmiae*, 824.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods Volume 25, Issue 4,*, 402-408.
- Mackie, P. M., Wright, P. A., Glebe, B. D., & Ballantyne, J. S. (2005). Osmoregulation and gene expression of Na⁺/K⁺-ATPase in families of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 2661-2672.
- MacLeod, M. G. (1978). Relationships between dietary sodium chloride, food intake and food conversion in the rainbow trout. *J. Fish Biol* 13, 73-78.
- McCormick, S. D. (1993). Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺-ATPase activity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 656-658.

- McCormick, S. D. (2013a). Smolt physiology and endocrinology. *Euryhaline Fishes: Volume 32. FISH PHYSIOLOGY*, 211-212.
- McCormick, S. D. (2013b). Smolt physiology and endocrinology. *Euryhaline Fishes: Volume 32. FISH PHYSIOLOGY*, 219.
- McCormick, S. D., Björnsson, B. T., Sheridan, M., Eilertson, C., Carey, J. B., & O'Dea, M. (1995). Increased daylength stimulates plasma growth hormone and gill Na⁺,K⁺-ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Comp. Physiol.* 165, 245–254
- McCormick, S. D., Hansen, L. P., Quinn, T. P., & Saunders, R. L. (1998). Movement, migration, and smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol 55. Suppl. 1.
- McCormick, S. D., J.M, S., Moriyama, S., & Björnsson, B. T. (2007). Differential hormonal responses of Atlantic salmon parr and smolt to increased daylength: a possible developmental basis for smolting. *Aquaculture* 273, 337-344
- McCormick, S. D., Moriyama, S., & Björnsson, B. T. (2000). Low temperature limits photoperiod control of smolting in Atlantic salmon through endocrine mechanisms. *Am. J. Physiol. – Reg. Integr. Comp. Physiol.* 278, 1352-1361.
- McCormick, S. D., Regish, A. M., & Christensen, A. K. (2009). Distinct freshwater and seawater isoforms of Na⁺/K⁺-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, 211-219.
- McCormick, S. D., Sheehan, T., Björnsson, T. B., 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.*, 3553-3560.
- McMahon, T. E., & Hartman, G. F. (1988). Variations in the degree of silvering of wild coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), smolts migration seaward Camation Creek, British Columbia. *J. Fish. Biol.* 32, 825-833.
- Meek, A. (1916). *The migrations of fish*. Retrieved from London:
- Metcalfe, N. B., & Thorpe, J. E. (1990). Determinants of Geographical Variation in the Age of Seaward Migrating Salmon, (*Salmo salar* L.). *Journal of Animal Ecology*, 59(1), 135-145. doi:Doi 10.2307/5163

- Mizuno, S., Misaka, N., Ando, D., Torao, M., Urabe, H., & Kitamura, T. (2004). Quantitative changes of black pigmentation in the dorsal fin margin during smoltification in masu salmon, *Onchorhynchus masou*. *Aquaculture* 229, 433-450.
- Murray, M. W., & Andrews, J. W. (1979). Channel catfish: the absence of an effect of dietary salt on growth. *Prog. Fish. Cult* 4, 155-156.
- Nandeesh, M. C., Gangadhar, B., Keshavanath, P., & Varghese, T. J. (2000). Effect of dietary sodium chloride supplementation on growth, biochemical composition and digestive enzyme activity of young *Cyprinus carpio* (Linn.) and *Cirrhinus mrigala* (Ham.). *J. Aqua. Trop.*, 15, 135-144.
- Nilsen, T. O., Ebbesson, L. E., Stefansson, S. O., Madsen, S. S., McCormick, S. D., Bjornsson, B. T., & Prunet, P. (2007). Differential expression of gill Na⁺,K⁺-ATPase α - and β -subunits, Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter and CFTR anion channel in juvenile anadromous and landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Exp. Biol.* 210, 2885–2896.
- Noble, C., Nilsson, J., Stien, L. H., Iversen, M. H., Kolarevic, J., & Gismervik, K. (2018). Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd., 328.
- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Jordal, A. E. O., Nilsen, T. O., & Hordvik, I. (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*, 6, 21.
- Pelis, R. M., Zydlewski, J., & McCormick, S. D. (2001). Gill Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter abundance and location in Atlantic salmon: effects of seawater and smolting. *Am. J. Physiol.* 280, 1844-1852.
- Perry, F. S., Lopez, L. R., McNeill, B., & Wilson, J. (2006). Fooling a freshwater fish: how dietary salt transforms the rainbow trout gill into a seawater gill phenotype. *The Journal of Experimental Biology* 209, 4591-4596.
- Richards, J. G., Semple, J. W., Bystriansky, J. S., & Schulte, P. M. (2003). Na⁺/K⁺-ATPase α isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. *Journal of Experimental Biology* 206, 4475-4486.
- Salman, N. A. (1993). The use of salt feeding for mariculture. *J. Fish Resources* 13, 78-80.
- Salman, N. A., & B., E. F. (1990a). Increased seawater adaptability of non-smolting rainbow trout by salt feeding. *Aquaculture* 86, 259-270.
- Salman, N. A., & Eddy, F. B. (1987). Response of chloride cell numbers and gill Na⁺-K⁺ATPase activity of fresh water rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to salt feeding. *Aquaculture* 61, 41-48.

- Salman, N. A., & Eddy, F. B. (1988). Effects of dietary sodium chloride on growth, food intake and conversion efficiency in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture* 86, 259-270.
- Salman, N. A., & Eddy, F. B. (1990b). Increased seawater adaptability of non-smolting rainbow trout by salt feeding. *Aquaculture* 86, 259-270.
- Scheiner-Bobis, G. (2002). The sodium pumps—its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur. J. Biochem.* 269, 2424 – 2433.
- Schrock, R. M., Beeman, J., Rondorf, D., & Haner, P. (1994). A microassay for gill sodium, potassium- activated ATPase in juvenile pacific salmonids. *Trans. Am. Fish. Soc.* 123, 223-229.
- Shaw, H. M., Saunders, R. L., Hall, M. C., & Henderson, E. B. (1975). Effect of dietary sodium chloride on growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Fish. Res. Bd. Can.* 32, 1813-1819.
- Sigholt, T., Åsgård, T., & Staurnes, M. (1998). Timing of parr-smolt transformation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effects of changes in temperature and photoperiod. *Aquaculture*, 160(1), 129-144.
- Singer, T. D., Clements, K. M., Semple, J. W., Schulte, P. M., Bystriansky, J. S., Finstad, B., . . . McKinley, R. S. (2002). Seawater tolerance and gene expression in two strains of Atlantic salmon smolts. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 125 -135.
- Skilbrei, O. T. (1991). Importance of threshold length and photoperiod for the development of bimodal lengthfrequency distribution in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 2163-2172.
- Skilbrei, O. T., Hansen, T., & Stefansson, S. O. (1997). Effects of decreases in photoperiod on growth and bimodality on Atlantic samon (*Salmo salar* L) *Aquaculture Research*. Vol. 28, 43-49.
- Solbakken, V. A., Hansen, T., & Stefansson, S. O. (1994). Effects of photoperiod and temperature on growth and parr-smolt transformation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and subsequent performance in seawater. *Aquaculture*. Volume 121, 13-27.
- Spence, B. C., & Hall, J. D. (2010). Spatiotemporal patterns in migration timing of Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, smolts in North America. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 67(8), 1316-1334.
- SSB. (2016). Akvakultur. Beholdning av levende matfisk, etter region, fiskeslag, statistikkvariabel og år. Statistikkbanken, from Statistisk sentralbyrå <https://www.ssb.no/statbank/table/09259/tableViewLayout1/>

- Staurnes, M., & Finstad, B. (2000). The effects of dietary NaCl supplement on hypoosmoregulatory ability and sea water performance of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) smolts. *Aquacult Res* 31, 737-743
- Stefansson, O. S., Björnsson, B. T., Ebbeson, L. O., & McCormick, S. D. (2008). Smoltification. *The Anadromous Life History Strategy*, 640-641.
- Stefansson, O. S., Bæverfjord, G., Handeland, S. O., Hansen, T., Nygård, S., Rosseland, B. O., Havardsson, B. (2005). Fiskevelferdsmessig vurdering av produksjon av 0-års smolt, 18-30.
- Stefansson, S. O., Berg, A. E., Hansen, T., & Saunders, R. L. (1992). The potential for development of salinity tolerance in underyearling Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *World Aquaculture*, 23(2), 52-55.
- Stefansson, S. O., Haugland, M., Björnsson, B. T., S.D, M., Holm, M., Ebbesson, L. O. E., Nilsen, T. O. (2012). Growth, osmoregulation and endocrine changes in wild Atlantic salmon smolts and post-smolts during marine migration. *Aquaculture* 36, 127-136.
- Strand, J. E. T., Hazlerigg, D., & Jørgensen, E. H. (2018). Photoperiod revisited: is there a critical day length for triggering a complete parr-smolt transformation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Fish Biology*. Volume 93, Issue 3, 440-448.
- Thorstad, E. B., Whoriskey, F., Rikardsen, A., & Aarestrup, K. (1987). *Aquatic Nomads: The Life and Migrations*. Retrieved from London:
- Thrush, M. A., Duncan, N. J., & Bromage, N. R. (1994). The use of photoperiod in the production of out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, 121, 2944. .
- Tipsmark, C. K., Madsen, S. S., Seidelin, M., Christensen, A. S., Cutler, C. P., & Cramb, G. (2002). Dynamics of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter and Na⁺,K⁺-ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Exp. Zool.* 293, 106-118.
- Trombetti, F., Ventrella, V., Pagliarani, A., Ballestrazzi, R., Galeotti, M., Trigari, G., Borgatti, A. (1996). Response of rainbow trout gill (Na⁺⁺K⁺)-ATPase and chloride cells to T3 and NaCl administration. *Fish Physiol Biochem* 15, 264-275.
- Villarreal, C. A., Thorp, J. E., & Miles, M. S. (1988). Influence of photoperiod on growth changes in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *J. Fish. Biol.* Vol.33, 15-30.
- Weatherley, A. H., & Gill, H. S. (1987). The biology of fish growth. *Academic Press., London*, 443.

- Zaugg, W. S., & McLain, L. R. (1969). Inorganic salt effects on growth, salt water adaption and gill ATPase of Pacific salmon. *Fish in Research. Academic Press*, 293-306.
- Zaugg, W. S., Roley, D. D., Prentice, E. F., X, G. K., & Waknitz, F. W. (1983). Increased seawater survival and contribution to the fishery of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by supplemental dietary salt. *Aquaculture* 32, 183-188.

Appendix I – Uttaksdato

I.I – Datooversikt over prøveuttak fra fisk i ferskvann.

Tabell 1 - Behandlingsgrupper er presentert med størrelse, fôr og lysregime ved ulike tidspunkter for prøveuttak

| Tidspunkt 1 (T1) | <u>Størrelse</u> | <u>Lysstyring</u> | <u>Fôr</u> |
|------------------------------------|------------------|-------------------|------------|
| Uke 6 2018 | Liten | LL-LL-LL | Kontroll |
| | Stor | | |
| Tidspunkt 2 (T2) Uke 12 2018 | Liten | LL-LL-LL | Kontroll |
| | Stor | | |
| | Liten | LL-SP-LL | |
| | Stor | | |
| Tidspunkt 3 (T3) Uke 19 2018 | Liten | LL-LL-LL | Kontroll |
| | Stor | | |
| | Liten | LL-SP-LL | |
| | Stor | | |
| | Liten | LL-LL-LL | Salt |
| | Stor | | |
| | Liten | LL-SP-LL | |
| | Stor | | |

Appendix I – Uttaksdato

I.II – Datooversikt over vekt og- lengdemåling av Floy-merket fisk.

Tabell 2 - Datooversikt over vekt- og lengdemåling av Floy-merket fisk.

| Vekt- og lengdemåling av Floy-merket fisk | | | |
|---|------------------|-------------------|-----------------|
| Dato | Størrelsesgruppe | Behandlingsgruppe | Fôr |
| 07.02.2018 (T1) | Liten | LL-LL-LL | A |
| | | LL-SP-LL | |
| 09.02.2018 (T1) | Stor | LL-LL-LL | A |
| | | LL-SP-LL | |
| 19.03.2018 (T2) | Liten | LL-LL-LL | A/B |
| 20.03.2018 (T2) | Liten | LL-SP-LL | A/B |
| 20.03.2018 (T2) | Stor | LL-SP-LL | A |
| 21.03.2018 (T2) | Stor | LL-LL-LL | A/B |
| | | LL-SP-LL | B |
| 07.05.2018 (T3) | Liten | LL-LL-LL | B |
| | | LL-SP-LL | A |
| 10.05.2018 (T3) | Liten | LL-LL-LL | A |
| | | LL-SP-LL | B |
| 11.05.2018 (T3) | Stor | LL-LL-LL | A/B |
| | | LL-SP-LL | A |
| 12.05.2018 (T3) | Stor | LL-SP-LL | B |
| 11.06.2018 (T4) | Liten | LL-LL-LL | Kommersielt fôr |
| | | LL-SP-LL | |
| | Stor | LL-LL-LL | Kommersielt fôr |
| | | LL-SP-LL | |
| 09.07.2018 (T5) | Liten | LL-LL-LL | Kommersielt fôr |
| | Stor | | |
| 10.07.2018 (T5) | Liten | LL-LL-LL | Kommersielt fôr |
| | | LL-SP-LL | |
| | Stor | LL-SP-LL | |
| | | LL-LL-LL | |
| 11.07.2018 (T5) | Liten | LL-SP-LL | Kommersielt fôr |
| | Stor | | |

Appendix II – Kjemikalier og metode ved analyser.

II.I NKA aktivitet

SEI Buffer

- 26,76 g Sucrose x
- 1,86 g Na₂EDTA/Titripex III
- 1,70 g Imidazol

Løses i 475 ml dH₂O.
pH justeres til 7,3 ved hjelp av HCl.
Volumet justeres til 500 ml med dH₂O.

0,5 % SEID

- 0,1 g Natriumdeoksyholate

Løses i 20 ml SEI-buffer.

Imidazol buffer

- 3,404 g Imidazol

Løses i 950 ml dH₂O.
pH justeres til 7,5 med HCl.
Volum justeres til 1000 ml med dH₂O.

Saltløsning

- 5,52 g NaCl
- 1,07 g MgCl₂·6H₂O
- 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 dH₂O. 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)

AM-medium

Tabell 3 - Reagentene som inngår i Assay-miks til proteinanalyse

| Løsning | 2 mikroplater |
|----------------------------------|---------------|
| Startvolum Imidazol-buffer (IB) | 20 ml |
| Pyruvatekinase (PK) | 24 µl |
| Lactic dehydrogenase (LDH) | 31 µl |
| NADH | 5 mg |
| Phosphoenolpyruvat (PEP) | 5 ml |
| Adenosine 5' -triphosphate (ATP) | 0,0145 g |
| Sluttvolum justert 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 12,000 rpm i 8 min. Supernatanten fjernes og pelleten resuspenderes i IB før den overføres til begerglass med IB.
3. Løser NADH i IB og tilsettes i begerglasset.
4. Tilsett tint PEP til begerglasset.
5. Vei ut ATP og tilsett IB til det løser seg. Tilsettes i begerglasset.
6. Løsningen i begerglasset overføres til en målesylinder og justeres til sluttvolumet med IB

Bruksløsninger (AM og AM-O)

Tabell 4 - 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 50 ml sentrifugerør merkes med henholdsvis AM og AM-O. AM-O røret kles med aluminiumsfolie da ouabain er svært lyssensitiv. Løsningene blandes i henhold til tabellen over. Løsningene oppbevares på is.

Fortynning av ADP standard

Tabell 5 - Fortynning av ADP standard til konstruksjon av standardkurve

| nMol 10 μl^{-1} | Imodiazol-buffer (μl) | ADP standard (μl) |
|--|--|--|
| 0 | 200 | 0 |
| 5 | 175 | 25 |
| 10 | 150 | 50 |
| 20 | 100 | 100 |

Proteinanalyse

Bruker BCA Protein Assay Kit, PIERCE.

Tabell 6 - Konsentrasjonsoversikt over albumin proteinstandard i ulike fortynningsserier med H₂O og BSA.

| Std ($\mu\text{l}/10 \mu\text{l}$) | 2 mg/ml BSA std (μl) | dH₂O (μl) |
|--|---|---|
| Blank | 0 | 100 |
| 5 | 25 | 75 |
| 10 | 50 | 50 |
| 20 | 100 | 0 |

1. Tinte prøvene på is.
2. Lagde arbeidsløsning: 20 ml reagens A + 400 μl reagens B (50:1)
3. Lagde standarder til standardkurven etter tabell x (over)
4. Sentrifugerte prøvene i kjølesentrifuge ved 3800 rpm i 30 sekunder for å fjerne uløselig materiale.
5. Appliserte 10 μl av hver standard på platen i triplikat.
6. Appliserte 10 μl av hver prøve på platen i triplikat.
7. Tilsatte så 200 μl arbeidsløsning til hver brønn og ristet platen forsiktig.
8. La lokk på platen og pakket den inn i aluminiumsfolie.
9. Inkuberte platen ved 37 °C i 60 min.
10. Leste av platen på plateleseren ved 540 nM i 12 sekunder.
11. Brukte Excel til å beregne mengde protein i hver prøve, og satt resultatene i et oversiktsark og regnet aktivitet pr time.

II.II RNA analyser

Etanol presipitasjonDag 1.

1. Tilsett 0,1 volum (= 3µl) 3 M Natrium Acetat og bland.
2. Tilfør videre 3 volum (= 90µl) 100% etanol.
3. Inkuber prøvene på -20°C over natten.

Dag 2.

1. Spinn ned RNA på 13,000 rpm ved 4°C i 30 minutter.
2. Fjern supernatanten forsiktig og vask deretter RNA pelleten ved å tilføre 500 µl 80% etanol og la pelleten bløtes i dette 2 minutter på is.
3. Sentrifuger prøvene på 13,000 rpm i 5 minutter og fjern deretter all etanol.
4. La pelleten tørke med åpent lokk i 5 min – 1 time (kortest tid mulig) i romtemperatur 20-25°C. Løs opp RNA ved å tilsette 30 µl H₂O.

Revers transkripsjon

Tabell 7 – Komponenter som inngår pr prøve ved revers transkripsjon.

| Reagenter | 1 reaksjon (9 µl) |
|--|------------------------------|
| <i>Random hexamer primers</i> | 1 |
| <i>5x reaction buffer</i> | 4 |
| <i>Ribolock RNase inhibitor</i> | 1 |
| <i>10 mM dNTP Mix</i> | 2 |
| <i>RevertAid Reverse transcriptase</i> | 1 |
| + <i>Template</i> | X |
| + <i>Water</i> | X |
| Totalt | 20 |

Appendix III – Fôrsammensetning

Tabell 8 - Sammensetning av kontroll- og saltfôr brukt i forsøket.

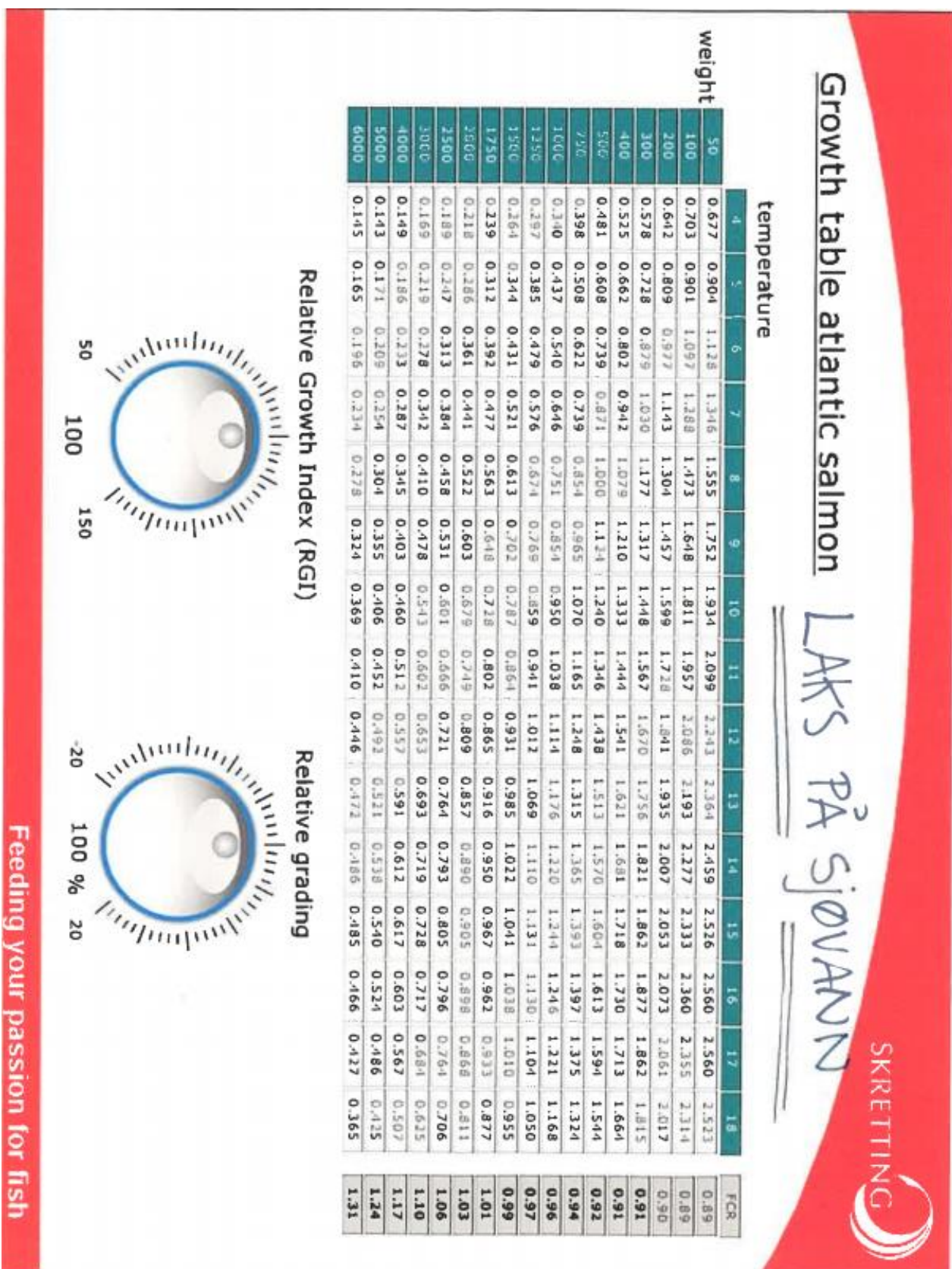
Diets: 4 mm pellets, 100 % sinking pellets, 175 kg pr diet

| DietName | A | B |
|----------------------------|---------------|---------------|
| Diet description | Control diet | Salt diet |
| Wheat | 15.0 | 9.9 |
| Wheat gluten | 10.0 | 12.0 |
| Sunflower meal | 5.0 | 2.0 |
| Soy Protein Concentrate | 15.5 | 15.0 |
| Fababean dehulled | 4.8 | 2.0 |
| Fish meal | 31.3 | 32.3 |
| Rapeseed oil | 8.5 | 8.6 |
| Fish oil | 8.5 | 8.6 |
| Water | 0.3 | 1.0 |
| Vitamin & Mineral premixes | 1.1 | 1.1 |
| Salt NaCl | 0 | 6 |
| Calcium chloride | 0 | 0.75 |
| L-Tryptophan | 0 | 0.4 |
| Magnesium chloride | 0 | 0.25 |
| Total: | 100.00 | 100.00 |

| | | |
|-------------------|-------|-------|
| V MOIST % | 8.30 | 8.30 |
| C PROT % | 43.55 | 43.24 |
| C FAT % | 21.99 | 21.99 |
| ASH % | 6.98 | 13.36 |
| Gross energy (MJ) | 22.17 | 21.21 |

Appendix IV

Veksttabell for Atlantisk laks i sjøvann fra Skretting



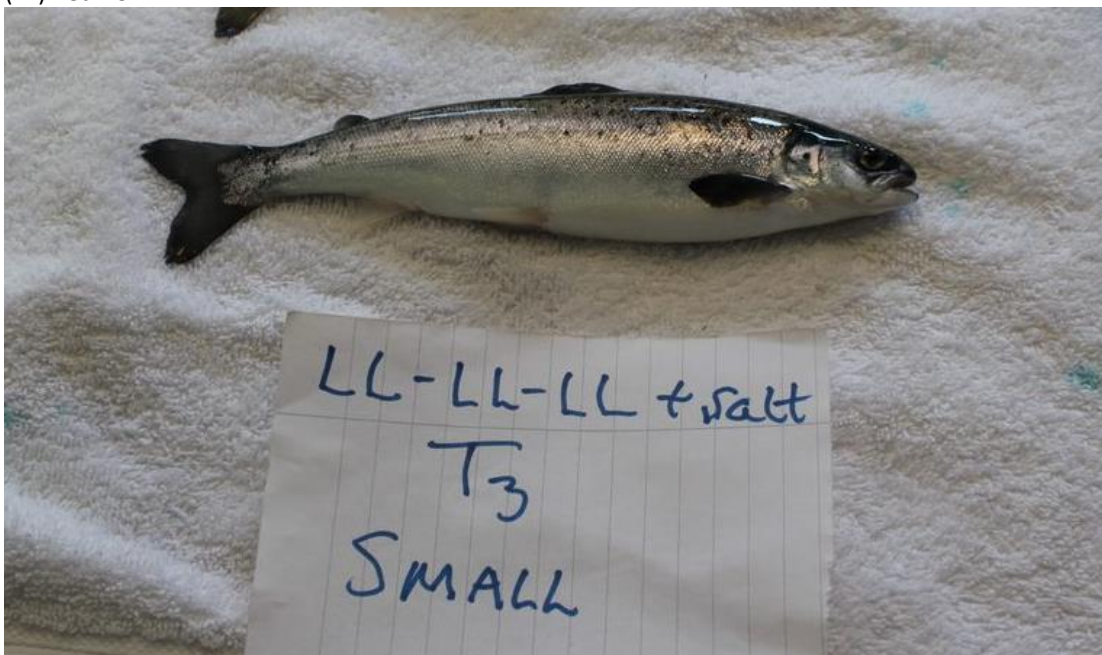
Bildeappendix

Morfologi

Liten størrelsesgruppe ved T3



Figur 1 - Bildet viser sølvfarging og generelle morfologiske smoltindisier hos fisk i liten størrelsesgruppe (LL) ved T3



Figur 2 - Bildet viser sølvfarging og generelle morfologiske smoltindisier hos fisk i liten størrelsesgruppe (LL + salt) ved T3.



Figur 3 - Bildet viser sølvfarging og generelle morfologiske smoltindisier hos fisk i liten størrelsesgruppe (SP) ved T3.



Figur 4 - Bildet viser sølvfarging og generelle morfologiske smoltindisier hos fisk i liten størrelsesgruppe (SP +salt) ved T3.

Stor størrelsesgruppe ved T3



Figur 5 - Bildet viser sølvfarging og generelle morfologiske smoltindisier hos fisk i stor størrelsesgruppe (LL) ved T3.



Figur 6 - Bildet viser sølvfarging og generelle morfologiske smoltindisier hos fisk i stor størrelsesgruppe (LL +salt) ved T3.



Figur 7 - Bildet viser sølvfarging og generelle morfologiske smoltindisier hos fisk i stor størrelsesgruppe (SP) ved T3.



Figur 8 - Bildet viser sølvfarging og generelle morfologiske smoltindisier hos fisk i stor størrelsesgruppe (SP +salt) ved T3.