



Fakulteten för samhälls- och livsvetenskaper

Monica Gottmarsson

Effekt av födotillgång på smoltifieringsprocessen hos öring

Effect of food availability on the smoltification
process in brown trout

Examensarbete 20 p
Biologi

Datum/Termin: 2007-05-24
Handledare: Larry Greenberg
Examinator: Eva Bergman
Löpnummer: 07-94

Sammanfattning

Populationer av öring består av både migrerande och stationära individer, och det tycks vara både genetiska och miljömässiga faktorer som påverkar en individs beslut att vandra eller ej. Syftet med denna studie var att testa vilken effekt tillgång på föda har på tillväxt och smoltifieringsprocess hos öring (*Salmo trutta*). Min hypotes var att öring med hög tillförsel av mat växer bättre och smoltifieras därmed inte till samma grad som öring med låg tillförsel av mat. Som en konsekvens av skillnader i mattillgång förväntades att ATPas-aktiviteten, vilken indikerar smoltstatus, var lägre vid god tillförsel av mat än vid låg tillförsel. Experimentet utfördes från november 2003 till april 2004 vid fiskeodlingen i Brattfors, Värmland, där 2+ Klarälvsöringar utsattes för tre olika födonivåer, med fyra replikat av varje födonivå. Var 4-5 vecka fångades fisken för att vägas och mätas och slutligen togs biopsi på öringens gälar för en analys av Na^+ , K^+ -ATPas aktivitet. I slutet av experimentet klassificerades fiskarna som parr eller smolt.

Parr hade en signifikant lägre Na^+ , K^+ -ATPas aktivitet än smolt i de tre olika födonivåerna. Na^+ , K^+ -ATPas aktiviteten visade dock ingen signifikant skillnad mellan födonivåerna. Parr hade ökat sin vikt och längd mest i samtliga födonivåer och störst skillnad var det i den lägsta födonivån, parr hade ökat i genomsnitt 17 g och 3,5 mm mer än smolt. Av de två högsta födonivåerna var andelen klassificerade som smolt 37 % och vid den lägsta födonivån var andelen smolt 76 %.

Abstract

Populations of brown trout consist of both migratory and resident individuals, and it is likely that both genetic and environmental factors influence the decision to migrate. The purpose of this study was to test the effect of food availability on growth and the smolting process in brown trout (*Salmo trutta*). My hypothesis was that brown trout subjected to a high food supply grows better and smoltifies to a lesser degree than brown trout subjected to a low food supply. As a consequence of differences in food supply I expected that ATPase-activity, which indicates smoltification status, would be lower with a high food supply than with a low supply. The experiment was run from November 2003 until April 2004 in a fish hatchery in Brattfors, Värmland, where 2+ brown trout from the river Klarälven were exposed to three food levels, each replicated four times. Every 4-5 weeks the fish were weighed and measured and a biopsy was taken from the gills for analysis of Na^+ , K^+ -ATPase activity at the end of the experiment. At the end of the experiment the fish were classified as parr or smolt.

Parr had a significantly lower Na^+ , K^+ -ATPase activity than smolt for the three different food treatments. Na^+ , K^+ -ATPase activity did not differ significantly between food levels. Parr grew faster (both weight and length) than smolt at all food levels, and the largest difference between parr and smolt was observed at the lowest food level, where parr increased on average 17 g and 3,5 mm more than smolt. At the two highest food levels the proportion classified as smolt was 37 % and at the lowest foodlevel the proportion of smolt was 76 %.

Inledning

Öring (*Salmo trutta*) finns i både sötvatten och saltvatten och det är få andra fiskarter i Europa som utnyttjar så pass olika miljöer (Klemetsen m fl 2003). Populationer av öring består av både migrerande och stationära individer. Vissa individer stannar hela livet i vattendraget medan andra migrerar och vanligtvis återvänder till samma vattendrag som vuxna för reproduktion (Jonsson & Jonsson 1993, Olsson & Greenberg 2004). Fördelarna med migration är ökad möjlighet till tillväxt och reproduktion men innebär också kostnader som ökad risk för predation och en ökad energiförbrukning. Det är en avvägning mellan fördelen att växa och bli stor och risken för predation. Särskilt honor får en fördel av att migrera eftersom både äggstorlek och mängden ägg är kopplad till kroppsstorleken (Klemetsen m fl 2003). Både stationära och vandrande individer i en population kan producera avkomma av båda typerna (Jonsson & Jonsson 1993, Ugedal m fl 1998). Vandrigen från uppväxtområdet i ett vattendrag till havet eller en sjö sker under en relativt kort period under våren (Bohlin m fl 1996, Nielsen m fl 2003, Ugedal m fl 1998).

Öringen förändras både morfologiskt och fysiologiskt innan migrationen till havet initieras. Processen kallas smoltifiering och är en anpassning till ett liv i saltvatten (Nielsen m fl 2006). Troligen har insjööring utvecklats på liknande sätt av samma anledning som havsöring (Olsson & Greenberg 2004). Innan transformationen kallas fisken parr och kännetecknas av stort huvud, mörk kroppsfärg och mörka fläckar längs sidorna. Ett tydligt tecken hos öring att den utvecklats till smolt är att kroppen blir silvrig (Tanguy m fl 1994, Jonsson & Jonsson 1993), fenspetsarna svartnar, tillväxten ökar och kroppen smalnar av (Degerman m fl 2001).

Fysiologiskt sker flera processer innan öringen kan migrera, och detta inkluderar att fiskens osmoregulatoriska förmåga förändras genom utveckling av större och fler kloridceller och högre ATPas aktivitet i gälarna (Soivio 1989, Ugedal m fl 1998, Tanguy m fl 1994). Na^+ , K^+ -ATPas aktiviteten används ofta som en indikator på smoltifieringsprocess hos laxfiskar (McCormick 1993, Nielsen m fl 2004, Tanguy m fl 1994), och det finns ett samband mellan ATPas-aktiviteten i öringens gälar och migration. Genom att mäta Na^+ , K^+ -ATPas aktiviteten i gälarna kunde Nielsen m fl (2004) identifiera en stor andel av individerna som senare migrerade. Det var dock viktigt att proverna togs under rätt period på våren för att det skulle finnas ett samband.

Ljus, temperatur (Nielsen m fl 2004) och diet (Zaugg 1982) är faktorer som har stor betydelse för öringens utveckling till smolt. Öring som har en snabb tillväxt behöver mer energi och begränsas tidigare av tillgången på föda än individer som tillväxer långsamt och bör därmed vara mer benägna att vandra. Migrationen av snabbt växande fiskar sker vid lägre ålder och vid mindre storlek än långsamt växande individer (Jonsson & Jonsson 1993, Forseth m fl 1999).

Syftet med den här studien är att undersöka om tillgången på föda påverkar smoltifieringsprocessen och Na^+ , K^+ ATPas-aktiviteten i gälarna hos öring. Jag använder begreppet smoltifiering, som är en process hos havsvandrande laxfiskar, eftersom liknande process även sker hos insjööring. En annan aspekt på födotillgången är hur den påverkar längd- och viktutvecklingen hos individerna. Min hypotes är "*öring med god tillförsel av mat växer bättre och smoltifieras inte till samma grad som öring med låg tillförsel av mat. Därmed förväntas att ATPas-aktiviteten är låg hos icke-smoltifierad fisk*".

Metod

För att testa vilken effekt tillgång på föda har på tillväxt och utvecklingen till smolt gjordes en studie vid Brattfors fiskeodling i Värmland med avkomma från öring fångad i Klarälven. Femtio 2+ öringar med en medelvikt på 147,3 ($\pm 29,9$) g sattes ut i vardera 12 st 2 x 2 m stora kar med in- och utflöde av vatten. Varje individ märktes individuellt med Floy-tags (T-bar anchor tags, Floy Tag & Manufacturing Inc.). Öringen utfodrades dagtid med pellets (Aller Aqua) via en automatisk fodertank som erbjöd mat i 40 sekunder var 30:e minut mellan kl. 6.00 och 18.00. Födottillgången indelades i tre olika nivåer där fyra kar fick den högsta nivån 46,4 $\pm 4,8$ g dag tank, anpassad till fiskens vikt och omgivande vattentemperatur. De andra födonivåerna fick 63 % (29,3 $\pm 1,8$ g dag tank) respektive 15 % (7,2 $\pm 1,7$ g dag tank) av den högsta nivån.

Experimentet startades den 12 november 2003 och avslutades 28 april 2004. Var 4-5 (17dec, 3 feb, 9 mars) vecka fångades och bedövades (MS-222) fisken för vägning och längdmätning. I slutet av april togs biopsi på öringens gälar för en senare analys av gälarnas Na^+, K^+ -ATPas aktivitet. SEI-buffert (150 mM sucrose, 10 mM EDTA, 50 mM imidazole, pH 7,3) tillsattes och proverna förvarades i -80°C .

Vid provtagningen den 28 april bedömdes smoltifieringsprocessen enligt Tanguy m fl (1994) och öringen klassificerades som parr eller smolt. Eftersom vissa individer hade intermediära karaktärer gick det inte att klassificera dem som smolt eller parr, och dessa individer uteslöts från alla analyser.

ATPas aktiviteten i öringens gälar mättes i en spektrofotometer och metoden finns beskriven i McCormick (1993). Inledningsvis blandades två olika lösningar kallade lösning A och B. Båda innehöll 4U lactate dehydrogenase (LDH) $\cdot \text{ml}^{-1}$, 5U pyruvate kinase (PK) $\cdot \text{ml}^{-1}$, 2,8 mM phosphoenolpyruvate (PEP), 0,7 mM adenosine triphosphate (ATP), 0,22 mM nicotinamide adenine dinucleotide (reducerad NADH) och 50 mM imidazole (pH 7,5). Na^+, K^+ -ATPas är ett jontransporterande enzym som kräver energi och genom att tillsätta 0,5 mM Oubain som har en hämmande effekt i lösning B så uteblir jontransporten. Blandningen var stabil 2-3 dagar i 4°C . En saltlösning förbereddes innehållande 189 mM NaCl, 10,5 mM MgCl_2 , 42 mM KCl och 50 mM imidazole (pH 7,5). Lösningen var stabil i flera veckor. Lösning A och B späddes med saltlösning 3:1 i varsin mörk flaska och förvarades på is. Några minuter före användning placerades lösningarna i 25°C vattenbad. Innan proverna analyserades gjordes inför varje dags mätningar en standardkurva från 0-20 nmol Adenosindifosfat (ADP).

ATPas aktiviteten beräknades som en skillnad i ATP-hydrolyt i närvaro och avsaknad av ouabain. Till gälprovet tillsattes 25 μl SEID (0,5 g sodium deoxycholate i 100 ml SEI), därefter homogeniserades provet med en mixer och centrifugerades i 30 sek vid 5000 g. 50 μl supernatant pipetterades i två kyvetter, homogenatet som var kvar frystes in. Vid en temperatur på 25°C tillsattes 1 ml av lösning A till den ena kyvetten och 1 ml av lösning B till den andra. Proverna inkuberades 1 minut i 25°C innan de placerades i varsin spektrofotometer som höll en temperatur på 25°C och absorbansens förändring mättes vid 340 nm mot luft i 4 minuter. Differensen i absorbans mellan A och B räknades om till motsvarande mängd ADP.

För att kunna uttrycka resultatet i mikromol ADP per mg av protein per timme genomgick varje gälprov också en proteinanalys. Metoden BCA (bicinchoninic acid) analys innebär att Cu^{2+} protein komplex bildas under alkaliska förhållanden. Därefter sker en reduktion av Cu^{2+} till Cu^+ . Mängden av reducerat koppar är proportionell mot proteininnehållet i provet. Reagens blandades enligt produktbeskrivningen för BCA (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit). Proteinstandard (Bovine Serum Albumin - BSA) användes för att göra en standardkurva. Proverna från ATPas-analysen tinades upp och skakades, centrifugerades sedan i 30 sek vid 5000g. 300 μl vatten och 100 μl supernatant tillsattes i eppendorfrör och gav en spädning 1: 4. Provet skakades och 50 μl fördes över till ett nytt eppendorfrör. Därefter tillsattes 1 ml av BCA-reagensen i eppendorfröret. Provet inkuberades 30 min i 37 °C vattenbad innan det fördes över till en kyvett och avlästes inom 10 min vid 562 nm i spektrofotometer.

Resultat

I genomsnitt hade smolt 0,5 μmol högre Na^+ , K^+ -ATPas än parr i samtliga tre födonivåer (Fig. 1). Enzymaktiviteten skiljer 0,4 μmol för parr respektive 0,9 μmol för smolt mellan lägsta och högsta födonivån. Skillnaden i Na^+ , K^+ ATPas aktivitet mellan parr och smolt är signifikant (två vägs ANOVA, $F_{1,18}=5,27$, $p = 0,033$) men ingen skillnad mellan de olika födonivåerna (två vägs ANOVA, $F_{2,18}=2,19$, $p = 0,14$), eller för interaktionen (två vägs ANOVA, $F_{2,18}=0,29$, $p = 0,75$) fanns.

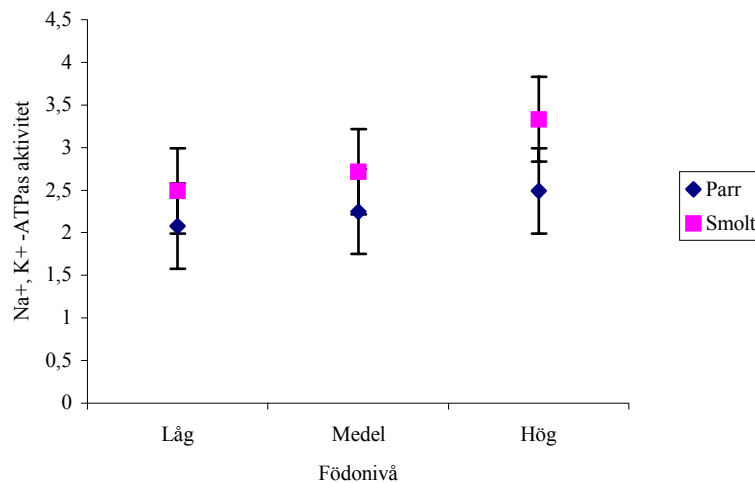


Fig. 1. Na^+ , K^+ -ATPas aktiviteten i gälarna mätt i $\mu\text{mol ADP}\cdot\text{mg prot}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Biopsi togs den 28 april 2004. Varje punkt representerar ett medelvärde för parr respektive smolt.

Viktutvecklingen påverkas naturligtvis av tillgången på föda och i samtliga födonivåer har parr ökat mer i genomsnitt än smolt. Vid den låga födonivån var skillnaden i tillväxt som störst och

parr vägde i genomsnitt nästan 17 g mer än smolt medan i den högsta födonivån var skillnaden bara 4 g (Fig. 2). Två-vägs ANOVA visade en effekt av födonivå (två vägs ANOVA, $F_{2,18}=90,54$, $p < 0,01$) och fisktyp (parr mot smolt) (två vägs ANOVA, $F_{1,18}=19,91$, $p = 0,0003$) men den differensen mellan parr och smolt varierade ganska mycket mellan födonivåerna och detta syns i en nästintill signifikant interaktion (två vägs ANOVA, $F_{2,18}=3,55$, $p=0,0501$).

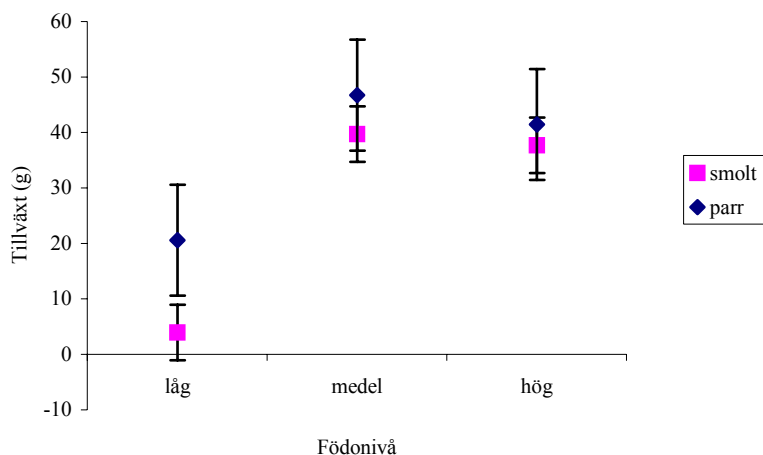


Fig.2 Viktökning (g) för parr och smolt från nov 2003 - apr 2004. Varje punkt representerar ett medelvärde för parr respektive smolt vid olika födonivåer.

Tillväxten i längd mellan parr och smolt skiljer sig relativt lite vid de två högsta födonivåerna men skillnaden är större vid den lägsta födonivån (Fig. 3) Detta återspeglas i en två-vägs ANOVA där interaktionen var signifikant (två vägs ANOVA, $F_{2,18}=3,80$, $p=0,042$). Födonivån var också signifikant (två vägs ANOVA, $F_{2,18}=34,67$, $p < 0,01$) men inte fisktyp (parr mot smolt, två vägs ANOVA, $F_{1,18}=3,13$, $p=0,093$), men dessa resultat underordnas av den signifikanta interaktionen.

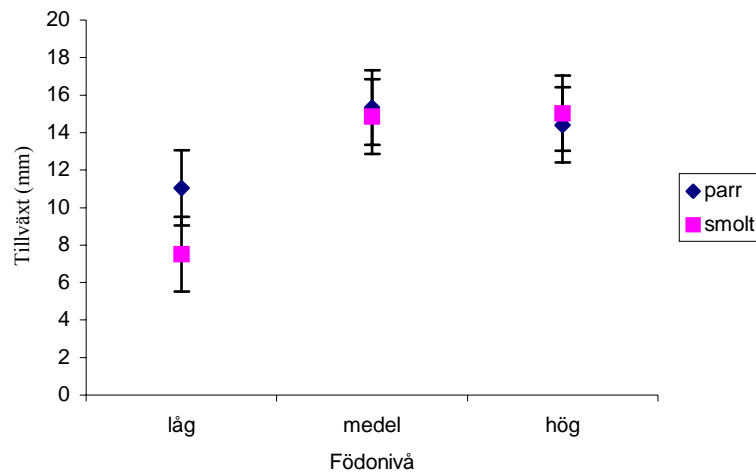


Fig. 3. Tillväxt i längd (mm) från nov-apr för parr och smolt i respektive födonivå. Varje punkt representerar ett medelvärde för gruppen.

I födonivå hög och medel var antalet öringar klassificerade som parr 83 respektive 84 individer och antalet smolt 59 respektive 38 individer (Fig. 4). Den största skillnaden i antal individer parr och smolt kunde urskiljas ur den lägsta födonivån med 33 individer parr och 106 smolt. Studien visar tydligt att tillgången på föda påverkar antalet parr och smolt i respektive födonivå (chi 2-test $\chi^2 = 73,5, p < 0,001$).

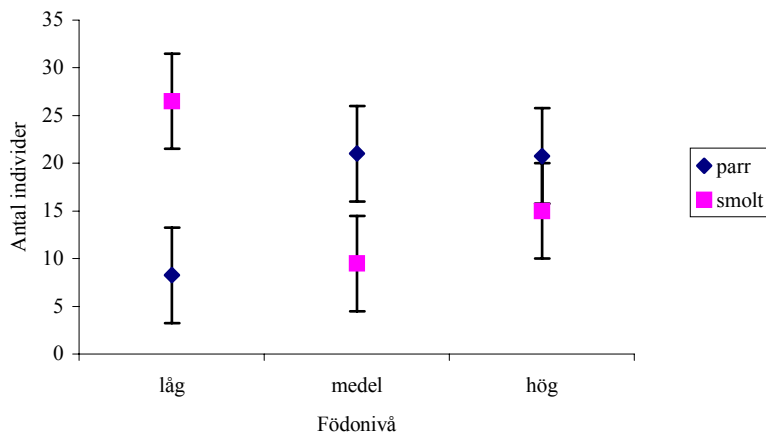


Fig. 4. Medelvärde för antal individer per kar i respektive födonivå som klassificerats som parr respektive smolt.

Diskussion

Tidigare studier har visat ett samband mellan Na^+ , K^+ -ATPas aktivitet i öringens gälar och migration samt saltvattentolerans (Nielsen m fl 2006). Därför väntade jag att Na^+ , K^+ -ATPas aktiviteten skulle vara lägre hos individer som klassats som parr. Denna förväntning bekräftades då parr hade en lägre Na^+ , K^+ -ATPas aktivitet än smolt i de olika födonivåerna. Skillnaden var dock inte så stor om man jämför med liknande studier som gjorts under smoltperioden (Nielsen m fl 2003, Sundell m fl 1998, Tanguy m fl 1994, Nielsen m fl 2006). I nämnda studier så har smolt en flerfaldigt högre Na^+ , K^+ -ATPas aktivitet än parr. Mina analyser visar att smolt endast har i genomsnitt 20 % högre enzymaktivitet än parr.

Varför blev inte skillnaden i Na^+ , K^+ -ATPas aktivitet större? I McCormicks (1993) metod användes en temperaturreglerad spektrofotometer och många prov analyserades samtidigt (96-well microplate) medan jag använde värmeblock och analyserade ett prov i taget. Det får dock avfärdas som osannolikt att det skulle ha påverkat resultaten i studien. I stället kan det handla om faktorer i miljön som håller tillbaka den naturliga utvecklingen hos odlad öring. I en studie av Sundell m fl (1998), har man jämfört frilevande och odlad smolt och resultatet visade att den odlade öringen hade en lägre Na^+ , K^+ -ATPas aktivitet än den vilda under smoltperioden. I samma studie visades också att Na^+ , K^+ -ATPas aktiviteten steg vid ökad temperatur samt det omvända när temperaturen sjönk under parr-smolt transformationen för odlad och frilevande öring. När vattentemperaturen åter började stiga ökade Na^+ , K^+ -ATPas aktiviteten hos fisken. Biopsi på öringens gälar i den här studien utfördes vid ett tillfälle. Na^+ , K^+ -ATPas aktiviteten hos smolt hade kanske blivit högre om biopsi tagits vid en högre vattentemperatur eller en annan tidpunkt.

Av den öring som fick de två högsta födonivåerna var andelen smolt ungefär 37 %. En stor andel har inte smoltifierats och en trolig anledning kan vara den goda tillgången på mat. Det kan jämföras med den lägsta födonivån där 76 % klassades som smolt. Det överensstämmer med andra studier som visar att förbättrad föda tenderar att ge en högre andel stationär öring (Jonsson&Jonsson 1993). Att det är så många som utvecklats till smolt skulle kunna vara en möjlighet för öringen att under begränsade förhållanden försöka optimera sin tillväxt genom att migrera till ett habitat med bättre förutsättningar. Utvecklingen till smolt påverkas uppenbarligen av tillgången på föda och går att knyta an till min hypotes att *”öring med hög tillförsel av mat växer bättre och smoltifieras inte till samma grad som öring med låg tillförsel av mat”*.

Effekten av födonivåer på tillväxt visar att parr ökat sin vikt i samtliga tre nivåer. I de två högsta födonivåerna skiljer en millimeter i längd mellan parr och smolt vilket kan jämföras med andra studier där det inte visas någon skillnad i längd (Tanguy m fl 1994, Nielsen m fl 2006). Den största skillnaden i tillväxt visas i den kraftigt reducerade födonivån. Parr hade ökat sin längd med i genomsnitt 3,5 mm och vikten med 17 g mer än smolt. Det behöver inte betyda att intaget av mat skiljer sig mellan grupperna. Morinville & Rasmussen (2003) visar i sin studie på bäckroding att migrerande individer kräver mer mat för att uppnå samma tillväxt. Om smolt har en högre ämnesomsättning krävs mer mat för att uppnå samma tillväxt som individer klassificerade som parr. Under dessa begränsade förhållanden gynnas troligen smolt av att söka sig till områden med bättre förutsättningar.

Födans effekt på parr-smolt transformationen visar en tydlig skillnad i den lägsta födonivån med 76 % av individerna klassificerade som smolt. En undersökning av (Forseth m fl 1999) visar att ämnesomsättningen hos migrerande öring är fem gånger högre än hos stationär öring. En högre ämnesomsättning kräver mer energi och det borde uppstå en konkurrenssituation när tillgången på mat är begränsad. Resultatet i min studie visar att det finns en stark tendens för en interaktion och att bristen på mat tyder på att smolt får svårare att klara sig.

Avslutningsvis, benägenheten att vandra varierar mellan populationer och ofta finns både migrerande och stationära individer i samma population. Genetisk variation och öringens plasticitet påverkar förmodligen öringens beslut att vandra och är ett sätt att hantera en miljö där tillgång på födoresurser varierar över tid och plats.

Referenser

- Bohlin, T., Dellefors, C., Faremo, U., 1996. Date of smolt migration depends on body-size but not age in wild sea-un brown trout. *Journal of fish biology* 49:157-164
- Degerman, E., Nyberg, P., Sers, B., 2001. Havsöringens ekologi. *Fiskeriverket informerar* 2001:10
- Forseth, T., Naesje, Tor F., Jonsson, B., Hårsaker, K., 1999. Juvenile migration in brown trout: a consequence of energetic state. *Journal of Animal Ecology* 68:783-793
- Jonsson, B., Jonsson, N., 1993. Partial migration: niche shift versus sexual maturation in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 3:348-365
- Klemetsen, A., Amundsen P.-A., Dempson, J.B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M.F., Mortensen, E. 2003. Atlantic salmon *Salmo salar* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish* 12:1-59
- McCormick, S.D., 1993. Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na^+ , K^+ , -ATPase activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50:656-658
- Morinville, G.R., Rasmussen, J.B. 2003. Early juvenile bioenergetic differences between anadromous and resident brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60:401-410
- Nielsen, C., Aarestrup, K., Nørum, U., Madsen, S.S. 2003. Pre-migratory differentiation of wild brown trout into migrant and resident individuals. *Journal of Fish Biology* 63:1184-1196
- Nielsen, C., Aarestrup, K., Nørum, U., Madsen, S.S, 2004. Future migratory behavior predicted from premigratory levels of gill Na^+/K^+ -ATPase activity in individual wild brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of Experimental Biology* 207:527-533

Nielsen, C., Aarestrup, K., Madsen, S.S. 2006. Comparison of physiological smolt status in descending and nondescending wild brown trout (*Salmo trutta*) in a Danish stream. Ecology of Freshwater Fish 15:229-236

Olsson, I.C., Greenberg, L.A. 2004. Partial migration in a landlocked brown trout population. Journal of Fish Biology 64:1-16

Soivio, A., Muona, M., Virtanen, E. 1989. Smolting of two populations of *Salmo trutta*. Aquaculture 82:147-153

Sundell, K., Dellefors, C., Björnsson, B.T., 1998. Wild and hatchery-reared brown trout, *Salmo trutta*, differ in smolt related characteristics during parr-smolt transformation. Aquaculture 167:53-65

Tanguy, J.M., Ombredane, D., Baglinière, J.L., Prunet, P. 1994. Aspects of parr-smolt transformation in anadromous and resident forms of brown trout (*Salmo trutta*) in comparison with Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 121:51-63

Ugedal, O., Finstad, B., Damsgård, B., Mortensen, A. 1998. Seawater tolerance and downstream migration in hatchery-reared and wild brown trout. Aquaculture 168:395-405

Zaugg, W.S. 1982. A simplified preparation for adenosine triphosphate determination in gill tissue. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 39:215-217