



UiT Norges arktiske universitet

Norges fiskerihøgskole

Stress hos kjønnsellefri atlantisk laks (*Salmo Salar L.*)

Effekter av transport og sjøvannseksponering på sentrale faktorer i hypothalamus-hypofyse-interrenale (HPI)-aksen

Marius Aspen

Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap, Havbruk 60 (stp), Oktober 2020

FORORD

Arbeidet presentert i denne masteroppgaven ble gjennomført ved Norges fiskerihøgskole, fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, UiT Norges arktiske universitet, i samarbeid med Nofima – Norsk institutt for mat, fiskeri og havbruksforskning.

Først og fremst vil jeg takke min veileder Helge Tveiten, for å ha gitt meg mulighet til å være med på et så spennende prosjekt. Ditt engasjement for prosjektet og gode humoristiske sans har bidratt til en morsom og lærerik opplevelse. Jeg vil også takke Helge K. Johnsen for rask tilbakemelding og god hjelp under en hektisk skriveprosess.

Videre vil jeg rette en stor takk til Tina Thesslund fra Nofima med god kontroll på oppsett og gjennomføring av prøveuttak, Dhivya Thiyagarajan for hjelp og veiledning med real-time qPCR.

Til slutt vil jeg takke mine medstudenter, da spesielt Kristian Kornelius Karlsen og Eli Birgithe Jenssen. Jeg føler meg privilegert som fikk oppleve en fantastisk studietid sammen med dere. Vi har delt frustrasjon, glede og holdt ut flere utholdelige eksamensperioder sammen. Uten dere ville nok studietiden ikke vært den samme. Det har vært en ære å bli kjent med dere. Jeg ønsker også å takke min fantastiske kone for all støtte og tålmodighet. Din urokkelige vilje og enorme bidrag med barna under en svært hektisk periode med Covid-19, flytting og oppussing har gjort det mulig for meg å fullføre mastergraden.

Marius Aspen

Harstad, oktober 2020

SAMMENDRAG

Genetisk innblanding fra rømt oppdrettslaks er i dag vurdert av noen som den største trusselen mot ville norske laksestammer. Selv enkelthendelser vil ha en stor risiko for masserømming da en merd kan inneholde opptil 200 000 individ. Samtidig er kjønnsmodning blitt et økende problem særlig knyttet til resirkuleringsanlegg (RAS). Kjønnsmodning bringer med seg en rekke velferdsmessige utfordringer som redusert vekst, immunrespons og osmoregulatorisk kapasitet. Derfor vil en effektiv og velfungerende steriliseringsmetode kunne bidra til å løse flere viktige utfordringer både for miljø, men også for nye og nåværende produksjonsmetoder. Eksisterende steriliseringsmetoder som for eksempel triploidisering krever imidlertid en spesialtilpasset produksjon og resulterer i redusert ytelse hos den sterile fisken. Nye metoder for sterilisering av laks er derfor nødvendig. Gjennom å fjerne kjønnsellelinjen på embryonalstadiet har det blitt utviklet en ny metode for sterilisering av atlantisk laks (*Salmo salar*). Fjerning av kjønnsellelinjen vil imidlertid kunne påvirke viktige endokrine og fysiologiske mekanismer, og dermed fiskens produksjonsegenskaper. For at en slik steriliseringsmetode skal kunne benyttes i kommersiell sammenheng må en nøye evaluere eventuelle effekter på viktige fysiologiske systemer og prosesser. I akvakultur vil en rekke produksjonsrelaterte hendelser (flytting, sortering, vaksinerings, smolt transport, avlusing etc.) kunne resultere i en fysiologisk stressrespons hos fisken. Disse fysiologiske forandringene skjer hyppig i oppdrett hvor svak fisk som oftest dør før produksjonssyklusen er over. I dette forsøket ble laksen holdt ved kontinuerlig lys og varierende temperatur (6-12°C) fra startfôring 06.03.2017 til 28.08.2018. Smoltifisering ble induisert via en standard protokoll brukt ved HiT. Videre ble en gruppe fisk uten kjønnseller og en kontrollgruppe med intakte kjønnseller kjørt gjennom en simulert transport etterfulgt av full sjøvannseksposering i 23 timer. Prøveuttaket ble fordelt over noen dager hvor faktorer som kortisol, osmolalitet, klorid og genuttrykk i HPI-aksen ble undersøkt. Kortisol, osmolalitet og klorid ble målt under alle tre uttakene, mens genuttrykk *crfla* og *crflb* i hjernen, *pomca* og *pomcb* i hypofysen og *gr1*, *gr2*, *mc2r* og *11bhsd2* i hodenyren ble målt pre-stress og post sjøvannseksposering. Resultatene viser med hensyn på plasma kortisol at kjønnsellefri-fisk kanskje presterer enda bedre enn kontrollfisk etter 23 timer på sjøvann. Genuttrykk for steril- og kontrollfisk viser liten til ingen forskjell mellom gruppene, foruten om hannfisken hvor nivåene av *crfla* og *crflb* er signifikant økt hos kontroll pre-stress og *crflb* og *11bhsd2* etter 23 timer med sjøvannseksposering. Resultatene fra dette forsøket viser at det i praksis er små forskjeller i håndtering av stress og sjøvannstoleranse mellom kjønnsellefri og fertil atlantisk laks.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Introduksjon.....	1
1.2	Ny(e) metode(r) for sterilisering av fisk/laks	3
1.2.1	Forhindre eller stoppe pubertet.....	4
1.3	Bakgrunn	5
1.4	Hypotalamus-hypofyse-interrenal aksens (HPI)	5
1.5	Hypotalamus.....	7
1.6	Hypofysen.....	8
1.7	Interrenalt vev.....	8
1.8	Kortisol	9
1.9	Formål med oppgaven	10
2	Materialer og metoder	11
2.1	Forsøksfisken.....	11
2.2	Forsøksfasiliteter	12
2.3	Forsøksoppsett	13
2.4	Prøveuttak.....	13
2.4.1	Organ og bloduttak.....	13
2.4.2	Simulert smolt-transport og sjøvannseksponeering	14
2.4.3	Sjøvannseksponeering.....	15
2.4.4	Plasma klorid og osmolaritet.....	15
2.4.5	Kvantifisering av plasma kortisol	15
2.4.6	Eter ekstraksjon	16
2.4.7	Antistoff	16
2.4.8	Radioaktiv merket steroid (tracer).....	16
2.4.9	Stadardkurve.....	17
2.4.10	Dextran coated charcoal (DCC)	17
2.4.11	RIA	17
2.5	Beregning av gonadosomatisk indeks, vekstrate og kondisjonsfaktor	18
2.6	Analyse av genuttrykk	18
2.6.1	RNA ekstraksjon fra hodenyre, hjerne og hypofyse	18
2.6.2	DNase behandling	19
2.6.3	cDNA syntese.....	19
2.6.4	Kvantitativ real-time PCR.....	20
2.6.5	RT qPCR	21

2.7	Primere.....	21
2.7.1	Behandling av data	22
2.8	Statistisk analyse og grafisk fremstilling.....	23
3	Resultater.....	25
3.1	Gonadosomatisk indeks og vektutvikling.....	25
3.2	Kortisol	26
3.3	Plasma klorid og osmolalitet	29
3.4	Genuttrykk HPI-aksen	33
4	Diskusjon.....	38
4.1	Reproduktiv status	38
4.2	Kortisol	40
4.3	Plasma klorid og osmolalitet	42
4.4	Genuttrykk i HPI – aksen	44
5	Konklusjon	47

1 Innledning

1.1 Introduksjon

Oppdrettsnæringen har de siste 15 årene opplevd eventyrlig vekst og har med tiden blitt en viktig industri i Norge med en førstehåndsverdi på mer enn 64,5 milliarder kroner og en sysselsetting på mer enn 20 000 mennesker, direkte eller indirekte (SSB, 2019). Bærekraftig produksjon har alltid og vil alltid være målet med matproduksjon, og i en næring som stadig er i vekst kan dette fort bli en utfordring. Oppdrettere er stadig under hardt press fra statlige instanser og sosiale media, og aldri har det vært satset så mye på nyskapende teknologi som i dag. For å kunne fortsette med bærekraftig produksjon er det viktig at man finner nye metoder i oppdrettsnæringen som støtter bærekraftsmålet. Genetisk innblanding i ville bestander som følge av rømt oppdrettslaks er uønsket både fra industrien og forvaltningens ståsted. Havbruksnæringen har brukt betydelige ressurser for å hindre rømming, men med slike åpne anlegg som brukes i dag er det nærmest uunngåelig at rømming skjer. Selv enkelthendelser vil ha en stor risiko for masserømming da en merd kan inneholde opptil 200 000 individ (Michelsen et al., 2019). På lang sikt er genetisk innblanding fra rømt oppdrettslaks, vurdert av noen som den største trusselen mot ville norske laksestammer (Glover, 2018). For industrien er kjønnsmodning en utfordring som går ut over både velferd, økonomi og tap av genetisk materiale til konkurrerende lakseprodusenter i andre land (Pike, 1993). Produksjon av en velfungerende steril fisk vil kunne løse flere av disse utfordringene.

Under kjønnsmodning opplever fisken redusert appetitt og vekst samtidig som evnen til å opprettholde normal saltbalanse i sjøvann reduseres (Silverstein et al., 1999). Kjønnsmodningen fører også med seg endringer i fiskens immunsystem hvor den blir mer mottagelig for sykdommer. Redusert filetkvalitet i form av mindre fasthet og svakere orangefarge kommer også som følge av kjønnsmodningen. Samlet sett fører dette til økt dødelighet og redusert velferd (McClure et al., 2007). Norske lakseoppdrettere opplever fortsatt en nedklassing på rundt 4% grunnet kjønnsmodning (Hosteland, 2017). Dette til tross for at sen kjønnsmodning lenge har vært et av de mest uttrykte avlsmålene og på tross av at matfiskelskapene gjør utstrakt bruk av intensive lysstyring for å hindre tidlig kjønnsmodning. Norge hadde i 2018 en lakseproduksjon på 1.282 millioner tonn med en eksportverdi på 99 milliarder norske kroner (Sjømatråd, 2019). Klarer man å redusere utkastet med 3 % som følge

av kjønnsmodning, representerer det alene en økt salgssinntekt for norske matfiskoppdrettere på over 2 milliarder kroner gitt en salgspris på 50 kroner pr. kilo rund fisk (Barson et al., 2015).

Avlsframgang som er oppnådd for norsk laks eksporteres i prinsippet hver gang egg selges til utlandet. Dette betyr at avlsselskapene selger fisk til utlandet som kan kjønnsmodne og brukes i avlsprogrammene til utenlandske selskap. Det er derfor viktig for avlsselskapene å kunne produsere en fisk som ikke kan kjønnsmodne. Konkurranseskraften til norsk laksenæring kan med dette styrkes dersom lakseegg fra norske produsenter steriliseres på en god måte.

Fremtidig smoltproduksjon ser i større og større grad ut til å skje i RAS. Disse anleggene drives under intensive oppdrettsforhold der høy temperatur og rask tilvekst vektlegges. Under slike forhold vil en betydelig andel (opptil 70-80%) av hannfisken kunne kjønnsmodne som små «svart-hanner» før og etter smoltifisering. Dessverre har en del aktører allerede erfart slik tidlig kjønnsmodning som medfører store økonomiske tap og et betydelig fiskevelferdsproblem som redusert vekst, immunrespons og osmoregulatorisk kapasitet. I tillegg benytter næringen i større grad nå enn før store post-smolt anlegg, og RAS-anlegg som skal gjøre det mulig å flytte hele matfiskproduksjonen på land. Dette vil også føre til store utfordringer knyttet til tidlig kjønnsmodning. Den fremtidsrettede RAS-teknologien vil derfor også dra store fordeler av å kunne bruke en steril fisk i produksjonen (SalmoBreed, 2018). En effektiv og velfungerende steriliseringsmetode vil kunne bidra til å løse flere viktige utfordringer både for miljø, men også i forhold til å ta i bruk nye og opprettholde eksisterende produksjonsmetoder. En steril laks vil dermed kunne bidra til å styrke oppdrettsnæringen både nasjonalt og internasjonalt.

Hittil er det bare triploidisering som har vært en praktisk gjennomførbar steriliseringsmetode for laks i oppdrettsnæringen. Triploidisering innebærer at fisken beholder et ekstra sett kromosomer (tre par kromosomer vs. to som er normalt) som følge av en temperatur eller trykkbehandling av eggene i perioden rett etter befruktning (Maxime, 2008). I praktisk oppdrett lages det ofte bare hunnfisk («all female») bestander av triploider ved bruk av sperm fra hormonelt kjønnsreverserte hunnfisk. Grunnen til dette er at triploid hannfisk går gjennom kjønnsmodning selv om de er funksjonelt sterile – triploide hanner av laksefisk produserer spermsceller som resulterer i unormal/dødelig embryonalutvikling. Dette medfører at de ikke produserer levedyktige avkom, og derfor kan ødelegge rogn fra ville laksebestander ved kryssbefruktning etter rømming (Benfey & Sutterlin, 1984; Svåsand et al., 2007). En triploid hunn er steril og gjennomgår ikke de endringene som en normalt ser hos kjønnsmodnende fisk

(Hansen et al., 2012). I tillegg har de redusert ytelse under sub-optimale betingelser. De har svært begrenset toleranse for reduksjon i O₂ konsentrasjon, samtidig som de trenger et spesialtilpasset fôr for å redusere frekvensen av skjelettdeformiteter Fraser et al., 2012; Maxime, 2008). Triploid laks har derfor ikke blitt tatt i bruk i noen stor grad av næringen, og det er en klar oppfatning om at det må utvikles bedre metoder for sterilisering av norsk oppdrettslaks.

1.2 Ny(e) metode(r) for sterilisering av fisk/laks

Spesifiseringen av de primordiale kjønnscellene (PGC) og kjønnsellelinjen i mange organismer, inkludert teleoster/beinfisk, involverer maternale faktorer som legges ned i oocytten/egget i løpet av oogenesen (Raz, 2003). Disse maternale faktorene, ofte i form av mRNA, lokaliserer til et begrenset antall celler (via asymmetrisk deling) gjennom tidlig embryogenese. Dette gir opphav til PGCene som senere under embryogenesen migrerer til det som blir den fremtidige gonaden (Extavour & Akam, 2003; Yoshizaki et al., 2003). Maternale faktorer som *Nanos*, *dead end (Dnd)*, *Dazl* og *Vasa* er alle essensielle for migrering og/eller overlevelse av PGCene (Hashimoto et al., 2004; Köprunner, Thisse et al., 2001; Raz, 2003; Weidinger et al., 2003). Arbeid utført med sebrafisk (*Danio rerio*) og atlantisk laks (Wargelius et al., 2016) har demonstrert at portfall av kun en av disse PGC faktorene kan forårsake redusert overlevelse eller migrering av PGC. Resultatet blir da en steril fisk med ingen tilsynelatende morfologiske forskjeller fra sine fertile artsfrender (Slanchev et al., 2005).

Dnd er en kritisk faktor for spesifisering og overlevelse av PGCene, og har en viktig rolle i å hindre miRNA mediert degradering av andre mRNA som er viktig for utvikling av kjønnsellelinjen (Kedde et al., 2007). Bortfall av *dnd* uttrykk resulterer i tap av PGC i teleoster slik som sebrafisk (Weidinger et al., 2003), sandsmetter (*Cobitidae*) (Fujimoto et al., 2010), gullfisk (*Carassius auratus*) (Goto et al., 2012), atlantisk laks (Wargelius et al., 2016), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Lee et al., 2016), medaka (*Oryzias latipes*) (Hong et al., 2016), gibel karpe (*Carassius gibelio*) (Liu et al., 2015) og stører (*Acipenseridae*) (Pšenička et al., 2015).

Steril fisk kan produseres gjennom bruk av genetisk modifiserte organismer (GMO) enten via geneditering (f.eks. CRISPR/Cas9) eller ved bruk av transgene linjer (Wong & Zohar, 2015). Slik produksjon medfører imidlertid viktige etiske, juridiske og praktiske problemer (Wong & Zohar, 2015). Bruk av en ikke-GMO metode for sterilisering, f.eks. via midlertidig degradering eller blokkering av spesifikke mRNA, vil trolig være mer akseptert i forhold til bruk innenfor

akvakultur. En slik tilnærming vil samtidig være mer allsidig og aktuell for utvikling av en storskala protokoll for sterilisering. Funksjonaliteten av dette systemet har allerede blitt demonstrert i sebrafisk (Pauli et al., 2015). De to metodene som baserer seg på h.h.v. - midlertidig- («knockdown») og permanent («knock out») endring i genuttrykk fungerer på fundamentalt forskjellige måter med hensyn til virkningsmekanismer; Ikke-GMO metoden fungerer bare som en forbigående endring av genuttrykk på mRNA nivå, mens i GMO modellen er det induert en permanent forandring i, eller bortfall av uttrykk i det aktuelle genet.

Gjennom bruk av genredigeringsverktøy CRISPR/cas9 knockout system har *dnd* genet blitt mutert i atlantisk laks noe som resulterte i bortfall av PGCer og en steril fisk,- men der sterilitet bare ble oppnådd hos ca. 30% av de microinjiserte embryoene(Wargelius et al., 2016). Videre ble det dokumentert i et forsøk av Skugor et al., (2014) at midlertidig transalasjonsinhibering av *dnd* induerte signifikante endringer i uttrykk av gener involvert i flere viktige fysiologiske prosesser som lipid- og steroid-metabolisme, inkludert metabolisme av glukokortikoider (f.eks. kortisol) og kjønnssterioider (Škugor et al., 2014). Permanent fjerning av *dnd* kan derfor ha negativ innvirkning på dyrets prestasjon og fysiologi.

Mye av forskningsarbeidet på dette feltet har i all hovedsak dreid seg om ulike steriliseringsmetoder. Hvordan den steriliserte fiskens produksjonsegenskaper er ved bortfall av kjønnsellelinjen er lite kjent. En slik «Knockdown» kan gi ukjente effekter på viktige systemer.

1.2.1 Forhindre eller stoppe pubertet

Gjennom det nylige avsluttede prosjektet «Salmosterile» (Norges forskningsråd; BIOTEK 2021(2013-18)) hos forskningsinstituttet Nofima AS, har det blitt utviklet en metode for å fjerne kjønnsellelinjen hos atlantisk laks. Via en midlertidig knockdown av *Dnd* mRNAet på et tidlig utviklingsstadium, har det blitt påvist fullstendig fjerning av kimcellene hos ca. 90% av de behandlede individene (H. Tveiten pers. med.). Gjennom histologiske og molekylærbiologiske studier av juvenil fisk (opp til 200g) har en videre fått bekreftet at bortfallet av kjønnsellelinjen med stor sannsynlighet er permanent (H. Tveiten pers. med.)

1.3 Bakgrunn

Stress kan påvirke en organisme på alle nivå og blir definert som en forandring i den biologiske tilstanden til organismen. Denne tilstanden utfordrer balansen i kroppen (homeostasen) og representerer derfor en helserisiko for fisken om den blir langvarig (Van Weerd & Komen, 1998). Disse stress-induserte forandringene blir gruppert i primære, sekundære og tertiære responser også referert som general adaptation syndrome (GAS) (Selye, 1946). De to første representerer nervøse, endokrine, metabolske, hematologiske, hydromineral og strukturelle forandringer som er assosiert med akutt stress (Tort, 2010). Disse er regnet som adaptive og er derfor ikke helsefarlige. I det tertiære steget skifter stressresponsen fra å være adaptiv til maladaptive, som etter hvert resulterer i redusert immunforsvar, hemmet reproduksjon, redusert vekst og er assosiert med kronisk stress. (Barton & Iwama, 1991). I akvakultur vil en rekke produksjonsrelaterte hendelser (flytting, sortering, vaksinerings, smolt transport, avlusing etc.) kunne resultere i en fysiologisk stressrespons hos fisken. Disse fysiologiske forandringene skjer hyppig i oppdrett og fisk som ikke tåler en slik røff behandling, dør som oftest før produksjonssyklusen er over.

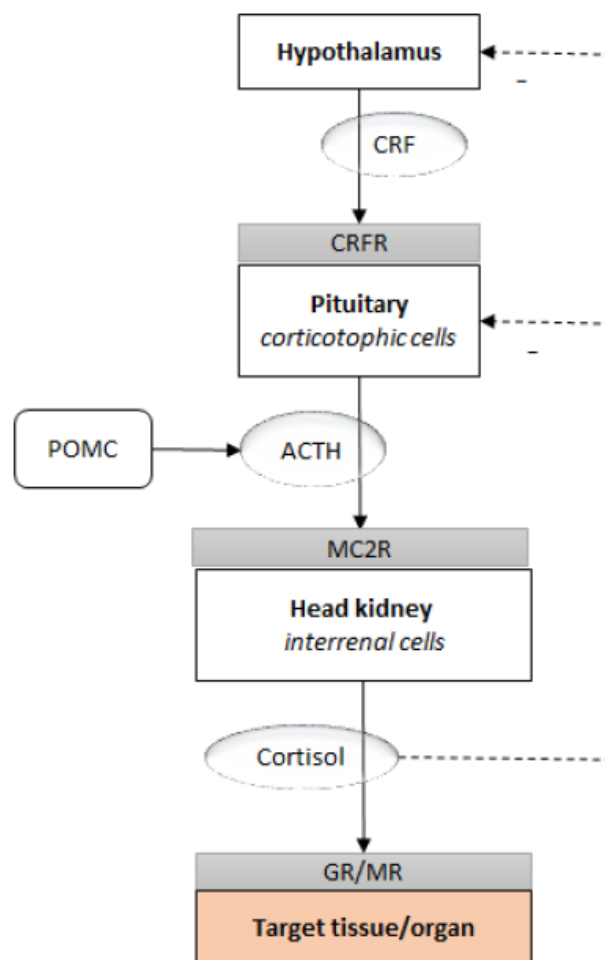
1.4 Hypotalamus-hypofyse-interrenal aksens (HPI)

Responsene i hypotalamus-hypofyse-interrenal aksens (HPI-aksens) som følge av stress har blitt studert inngående og er sammenfattet av Madara et al. (2015). Hypotalamus-hypofyse-interrenal aksens opereres på tre ulike endokrine nivå som vist i figur 1, der hormonet kortisol spiller en viktig fysiologisk rolle ved påvirkning av stress (Mommsen et al., 1999). Stressresponsen starter ved at ytre stimuli integreres i og trigger hypotalamus til å frigjøre kortikotropin-relising faktor (CRF). CRF stimulerer til sekresjon av adrenokortikotropisk hormon (ACTH) via kortikotropin celler i fremre del av hypofysen. ACTH frigjøres da i sirkulasjonssystemet og stimulerer de interrenale cellene i hodenyren til å produsere og sekretere kortikosterioder, hovedsakelig kortisol i teleost fisk (Melo et al., 2014; Mommsen et al., 1999). Sekresjon av kortisol har en forsinkelse (minutter) sammenlignet med frigjørelse av katekolaminene som tar sekunder (Barton & Iwama, 1991; Madara et al., 2015). Hovedrollen til kortisol er å mobilisere energi i krevende situasjoner ved å omorganisere metabolismen for å beskytte kroppen mot videre skade.

Økte nivåer av kortikosterioder som følge av stress kan a), redusere immunkompetanse ved å påvirke antall lymfocytter og kapasiteten rundt produksjonen av antistoffer og b), påvirke reproduksjon gjennom forandringer av nivået til hormoner knyttet til kjønnsmodning. Stress

kan også føre til forandringer i metabolismen som igjen påvirker vekst, delvis som et resultat av katabolske og glukoneogeniske effekter av kortikosteroidene (Van Weerd & Komen, 1998).

Varigheten av disse stressorane er med på å bestemme om responsen er adaptiv eller maladaptiv. Er stressoren kortvarig og sjeldent repetert, representerer det ikke noen fare for fisken og responsen regnes som adaptiv. Om stressoren er av en forlenget natur og ofte repeterende kan det føre til kronisk stress som igjen leder til kontinuerlig tap av homeostasen. Dette betyr at det ikke lengre er mulighet for tilpasning noe som fører til at stress responsen skifter fra å være adaptiv til å bli maladaptiv (Van Weerd & Komen, 1998). Høy eksponering av stress over en lengre periode kan som nevnt tidligere resultere i en rekke uheldige konsekvenser for fiskens velferd og har ringvirkninger som økonomisk tap for bedriften. Gode evne til stresshandtering er derfor viktige i oppdrettsfisk, både med hensyn til fiskevelferd, men også for en bærekraftig og økonomisk produksjon.



Figur 1. HPI-aksen og kaskaden av hormoner som leder til sekresjon av kortisol. Det primære trinnet i HPI-aksen er frigjøring av corticotropin-releasing factor (CRF) fra hypothalamus som svar til en stressor. CRF

induserer signaler til proopiomelanocortin (POMC) i hypofysen. Denne protein forløperen er proteolytisk spaltet til adrenocorticotrop hormone (ACTH), som blir sluppet i sirkulasjonssystemet, sammen med andre biologisk aktive peptider, inkludert melanocortin-stimulerende hormoner. ACTH aktiverer melanocortin-2-reseptor (MC2R) i det interrenale vev for å stimulere produksjonen til kortisol. Kortisol entrer så målcellen/organ ved diffusjon og bindes til GR og MR, som mitigerer handlingen av kortisol ved å modifisere genuttrykk i cellen. Forhøyede nivå av kortisol har en negativ feedback på hypothalamus og hypofyse. Figuren er tilpasset etter Wendelaar Bonga (1997) og Van Weerd og Komen (1998).

1.5 Hypotalamus

Når en stressor oppfattes, stimulerer nervøse signaler i hypothalamus aktivering av sympatiske nervefibre som igjen stimulerer kromafincellene i hodeneyren til å frigjøre katekolaminene adrenalin og noradrenalin i blodstrømmen (Wendelaar Bonga, 1997). Katakolaminene forbereder fisken på en “fight or flight” respons ved å øke en rekke metabolske prosesser i kroppen. Hypotalamus integrerer informasjon fra ulike deler av det sentrale og perifere nervesystemet. Om hypothalamus tolker et miljømessig eller homeostatisk signal som stressfullt (figur 1), blir CRF sekret fra nucleus preopticus (NPO) i hypothalamus (Alderman et al., 2012). Denne sekresjon spiller en viktig rolle i koordinering av det neuroendokrine, autonome nervesystemet og adferdsmessige reaksjonen til stress som endret svømmemønstre. Aksoner av nerveceller i NPO som inneholder CRF projiserer direkte inn i den fremre delen av hypofysen og frigjøres via en synapse, eller inn i sirkulasjonen via nevrosekresjon i pars nervosa (Wendelaar Bonga, 1997). I tillegg til CRF er CRF-binding protein (CRFBP) og CRF reseptorer (CRFR1 og R2) involvert i regulering av stressresponsen ved å modulere effekten av CRF (Madaro et al., 2015). Flere av de CRF-relaterte neuropeptidene som urotensin I (UI) og urokortin 2 og 3, kontrollerer også HPI aksene hos teleostere gjennom aktivering av urotensin og CRF reseptorer, likhet med andre vertebrater (Wendelaar Bonga, 1997). Kortikotropin frigjørende faktor er en familie av peptider som aktiverer flere ulike deler av hjernen assosiert med regulering av neurale og endokrine stressresponser. Stimulering via CRF₁ leder til endring i aktivitet av HPI aksene ved oppregulering av GR (genet for glukokortikoid reseptoren). Corticotropin-releasing hormone receptor 1 blir uttrykt i hele det sentrale og perifere nervesystemet (Hillhouse & Grammatopoulos, 2006).

I laksegeneomet er det flere paraloge gener av CRF (CRF_{1A} og CRF_{1B}, CRF_{2A} og CRF_{2B}) Disse paralogene stammer fra et opprinnelig CRF gen som følge av genduplisering (Hillhouse & Grammatopoulos, 2006). I de fleste vev binder CRF₁ til en G-protein koblet reseptor som aktiverer signaloverføring via adenylyl cyclase som trigger og forårsaker økte nivåer av cAMP i cellen (Hillhouse & Grammatopoulos, 2006).

1.6 Hypofysen

Proteinet kjent som pro-opiomelanocortin (POMC) inneholder forløperne til flere biologiske aktive peptider inkludert ACTH, β -lipotropin, β -endorphin og α -MSH. Disse peptidene blir frigjort fra POMC gjennom proteolytisk spalting av en såkalt «proprotein convertases» (de Souza et al., 2005). POMC uttrykt i kortikotrofe celler i hypofysen er viktig for funksjoner i binyren (hodenyren for fisk) via ACTH. Neuroner i hjernen som uttrykker POMC er eksempelvis involvert i kontrollering av smerte, gjennom formasjonen av β -endorphin i pattedyr. POMC har som nevnt en bred biologisk funksjon og i teleoster eksisterer det to paraloger av POMC genet, kalt *pomca* og *pomcb* (de Souza et al., 2005).

1.7 Interrenalt vev

I det interrenale vevet i hodeneyren induserer syntese av ACTH og frigjørelse av kortisol via MC2R som uttrykkes spesifikt i kortisol produserende celler. Aktivering av melanokortin reseptor 2 (*mc2r*) resulterer i en aktivering av «steriodogenic acute regulatory protein» (StAR) som er kritisk i syntese av steroidhormoner og er ansvarlig for transport av kolesterol til membranen i mitokondrien, der den blir konvertert til kortikosterioder som kortisol (Arends et al., 1999).

Effekten av kortisol i ulike vev kommer til uttrykk gjennom aktivering av glukokortikoid-reseptorer. Omfanget og evt. skader dette påfører organismen vil være avhengig av mengden kortisol og intensiteten og varigheten av stressoren (Tort, 2010). I de fleste arter fisk er det blitt beskrevet tre ulike reseptorer for kortisol, glukokortikoid-reseptor 1 (*gr1*), glukokortikoid-reseptor 2 (*gr2*) og mineralkortikoid-reseptor (*mr*). Mineralkortikoid- og glukokortikoid-reseptorer er transkripsjonsfaktorer som bidrar til aktivering eller inhibering av genuttrykk og har vist å ha ulik affinitet for kortisol (Teles et al., 2013).

Kortisol er nødvendig under stress, men kan gjøre mye skade om den vedvarer i sirkulasjonen. Dette blir løst gjennom uttrykk av genet 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 (*11bhsd2*) som omgjør kortisol til inaktivt kortison og samtidig beskytter MR mot glukokortikoider, men også den utviklende hjernen hos embryo, hvor den beskytter cellene mot vekst hemmende faktorer og eller pro-apoptisk effekter av kortisol (Tomlinson et al., 2004).

1.8 Kortisol

Kortisol bidrar til å regulere både glukosenivå , energimobilisering og mineralbalanse hos teleoster (Wendelaar Bonga, 1997). En av hovedoppgavene til kortisol er å aktivere GR i leveren som spiller en viktig metabolsk rolle når det kommer til å mobilisere energi under en stressrespons. Forstyrrelsen av homeostasen som følge av stress resulterer i en oppregulering av energi krevende prosesser. I fisk stimulerer kortisol omsetningen (metabolismen) av karbohydrater. Kortisol og GR virker i leveren og skjelettmuskulaturen ved at de bryter ned glykogen og ved å øke nydannelsen av glukose slik at blodsukkeret økes (Alderman et al., 2012; Fevolden et al., 1991). Aktiveringen av GR som følge av kortisol regulerer også andre prosesser som osmoregulering, protein-metabolisme, immunrespons, vekst, reproduksjon og adferd (Barton & Iwama, 1991). Kortisol utøver en negativ feedback på syntesen til CRF i hypothalamus og ACTH-sekresjon i hypofysen (Alderman et al., 2012) og er mediert via- GR og MR som er uttrykt i disse organene (Madaro et al., 2015).

Det er påvist et samspill mellom HPI-aksen og hypothalamus-hypofyse-gonade (HPG)-aksen hvor disse to aksene «fin-tuner» hverandre for å integrere miljømessige, psykologiske, reproduktive og genetiske faktorer (Fuzzen et al., 2011; Oyola & Handa, 2017; Schreck, 2010; Schreck et al., 2001). Homeostasen blir opprettholdt via det neuroendokrine-systemet, som kontinuerlig overvåker nivået av kjønnssteroider i gonadene. Dette skjer via østrogen- og androgene-reseptorer lokalisert i hypothalamus, som er viktig for riktig regulering av HPI- og HPG-aksene (Oyola & Handa, 2017). Muligheten for en uforutsigbar reaksjon på stress kan derfor være en konsekvens dersom en av disse systemene svikter. I et studie ble det undersøkt effekter på svingninger i kjønnssteroider hos gnagere (Oyola & Handa, 2017), der estradiol-17 β og progesteron under kjønnsmodning trolig var ansvarlig for effekten på hjerneaktiviteten i hun gnagere. Dette vil kunne påvirke adferds-mønster og psykologiske tilstand i møte med en stressor. Kjønnssteroider regulerer blant annet sekresjon av veksthormon (GH) (Chellakooty et al., 2004) og tilvekst hos kjønnsmodnende fisk (Hunt et al., 1982; Tveiten et al., 1998) . Ifølge Pottinger, Carrick, Hughes og Balm (1996) kan endring i funksjonene av HPI-aksen oppstå ved oppregulerte nivåer av kjønnssteroider i plasma. Dette skjer blant annet via eksponering av 11-ketotestosteron (11KT) som viser hemmende effekt på nivå av ACTH og da også påfølgende sekresjon av kortisol. Hvordan dette vil påvirke prestasjon til en kjønnskellefri-fisk (KFC)-fisk med hensyn på produksjonsrelatert stress gjenstår å se.

1.9 Formål med oppgaven

For at en ny steriliseringsmetode skal kunne brukes i kommersiell sammenheng, er det nødvendig å se på hvordan bortfall av kjønnsellelinjen påvirker andre produksjonsegenskaper som vektlegges av oppdrettsnæringen. En slik prosess er både tid- og pengekrevenne men helt nødvendig for å sikre at produksjonsegenskapene til den sterile laksen er gode nok i kommersiell sammenheng.

Denne masteroppgaven er en del av et større prosjekt «Salmosterile» hvor ulike produksjonsegenskaper hos KFC-laks testet opp mot vanlig fertil oppdrettslaks. I denne delen av forsøket er stressresponsen undersøkt i form av en simulert transport etterfulgt av sjøvannseksponering i 23 timer. Kortisolnivå, klorid, osmolalitet og gener tilhørende HPI-aksen ble analysert og kartlagt. Målet med oppgaven er se på om bortfall av kjønnseller har noen effekt på produksjonsrelatert stress i form a transport og sjøvannseksponering.

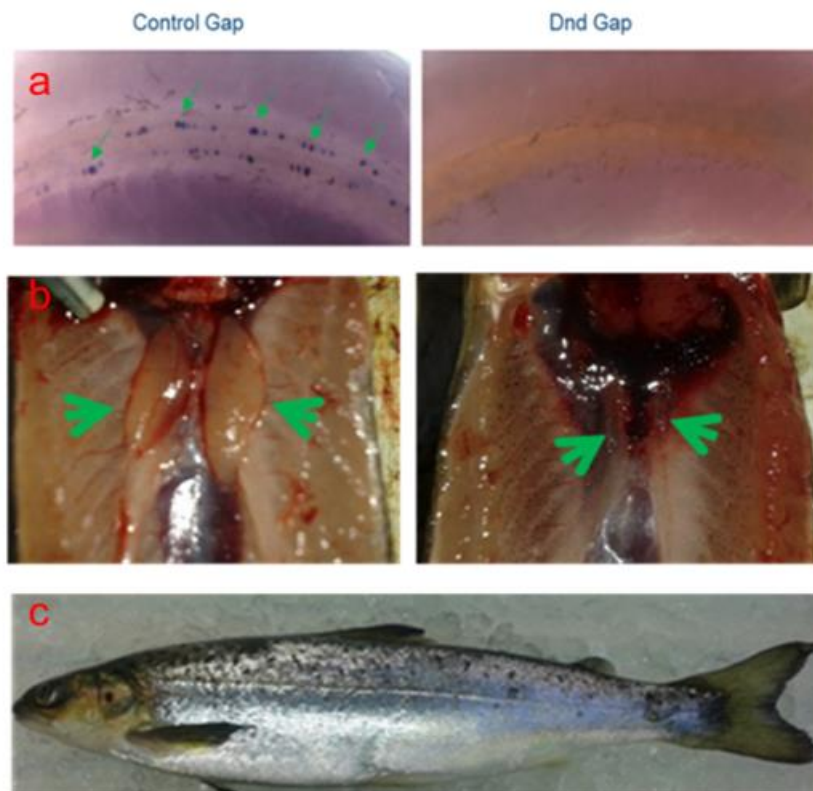
2 Materialer og metoder

2.1 Forsøksfisken

Laksen ble holdt ved kontinuerlig lys og varierende temperatur (6-12°C) fra startføring 06.03.2017 til 28.08.2018. Smoltifisering ble induisert via en standard protokoll brukt ved HiT. Fra 28.08 til 01. 11 ble alle grupper holdt ved 8 timer lys og 16 timer mørke (L8:16D) og temperatur 5-6°C (vintersignal). Fra 01.11 ble alle gruppene eksponert for kontinuerlig lys (24:0) og temperatur 10°C (sommersignal). Etter seks uker under disse betingelsene (ca. 400 døgngrader ved lang dag etter vintersignal) er det forventet at fisken vil ha god sjøvannstoleranse (Björnsson et al., 2000). God sjøvannstoleranse ved start av dette forsøket ble bekreftet både hos fertil og steril fisk gjennom et annet forsøk med fisk fra de samme gruppene (Jenssen, 2020)

Sterilisering av forsøksfisken er basert på en «NON-GMO» metode som benytter seg av spesifikk degradering av *dnd* mRNA under tidlig utvikling. Før å få KFC ble «egg» på en-cellestadiet mikroinjisert med antisensmolekyler (GapmeR: Pauli et al. (2015) spesifikt rettet mot *dnd* mRNAet. Gapmers danner en sekvensspesifikk DNA-mRNA hetero-duplex som gjør at cellen induserer degradering av mål mRNA via RNase H komplekset (Pauli et al., 2015). Behandlingen resulterte i tilnærmet bortfall av *dnd* mRNA ved midt/sen gastrula stadiet (H. Tveiten per.kom)). Degraderingen av det spesifikke mål mRNAet resulterte i en effektiv fjerning av PGCene i 90-92% av de injiserte individene (H. Tveiten pers. med) (Fig. 2a, b). Bortfall av kjønnsceller ble verifisert ved å undersøke uttrykk av kjønnscellemarkøren *vasa* (Raz, 2003). Med bruk av *in situ* hybridisering (WISH)- ved klekking (Fig 2a) og senere som juveniler (Fig 2b). Ved begge stadier var gonadene hos GapmeR behandlet fisk negativ for kjønnscellemarkøren *vasa*. Undersøkelsene av juvenil fisk viste ingen effekt av kjønn på behandling, men der størrelsen av gonadene hos den behandlede hunnfisken var sterkt redusert.

De fertiliserte embryoene hadde god toleranse for GapmeRs og ingen synlige effekter ble observert senere i utviklingen (Fig. 2c). Til sammen ble det produsert mer enn 1600 juvenile fisker. Den juvenile sterilmisken viste normal morfologi og vekstrate opp til 50g sammenlignet med ikke-injiserte kontroller.



Figur 2. Påvirkning av GapmeRs *dnd* mRNA på PGC ved (a -høyre side) 490 døgngader av utvikling (nær klekking) og utvikling av eggstokkene (b-høyre side) i juvenile atlantisk laks. Antisens ble injisert ved 1-celle stadiet. Figur c viser morfologi av sterilisert fisk (Foto: Krasimir Slanchev og Helge Tveiten)

Gjennomsnittsvekten for kontrollfiskene var $356 \pm 2,5$ gram, gjennomsnittslengden på 30 cm og kondisjonsfaktor på 1,32. For sterilgruppen var gjennomsnittsvekten $332,9 \pm 2,3$ gram, gjennomsnittslengde var på 29,5 cm og kondisjonsfaktor 1,30. Modning ble også kartlagt ved bruk av visuell kontroll og gonadosomatisk indeks (GSI). I følge Melo et al. (2014); Aksnes et al., (1986) er en GSI på over 0,05 % hos atlantisk laks i denne delen av livssyklusen et tegn på igangsatt kjønnsmodning.

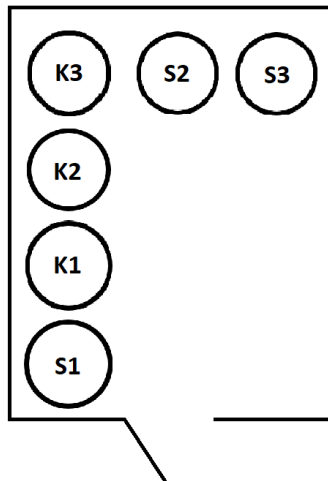
Ett individ fra kontrollgruppen døde under transport (T_2), fisk som hadde deformiteter eller skader ble notert under dissekering/blodprøvetaking. Fisk med eventuelle avvik ble utelatt fra videre analyse.

2.2 Forsøksfasiliteter

Forsøket ble gjennomført ved Havbruksstasjonen i Tromsø (HiT), i desember 2018. I forsøket ble det brukt 247 smolt av arten atlantisk laks. Det ble totalt benyttet 142 individer med kontrollfisk og 155 individer som var sterilisert.

2.3 Forsøksoppsett

Fisken ble holdt i to triplikate grupper, totalt 6 sirkulære kar, som hver hadde bruksvolum på 500l vann. Tettheten pr. kar var $\pm 32,9\text{g/l}$ og fisken gikk på 48t syklisk fôringsregime. Tildelt fôrmengde ble beregnet ut fra tabell som tar hensyn til fiskens størrelse og temperaturforhold. Temperaturen var $10 \pm 2^\circ\text{C}$ og karene var strømsatt med en sirkulær strøm. Karplasseringen i rommet var randomisert og kar S1, S2 og S3 inneholdt KFC fisk (S) og kar K1, K2 og K3 kontrollfisk (K) illustrert i figur 3.



Figur 3. Illustrasjon av kar-plassering under forsøket.

2.4 Prøveuttak

2.4.1 Organ og bloduttak

Før uttak av organer og/eller blod fra fisken ble den avlivet med en overdose av Benzoak (Felleskatalogen, 2020) (50 ml/50 l sjøvann). Én til to ml blod ble så tappet fra den kaudale vaskulaturen, ved bruk av BD Vacutainer nåler (0,7 x 25 mm og 0,7 x 32 mm), og samlet på rør inneholdende natriumheparin. Sodium Heparin Tubes fra BD Vacutainer for analyse av plasma kortisol, klorid og osmolalitet. Blodet ble spunnet i en sentrifuge (STORVALL RC 5B plus) på 4500 RPM i 10 min, før plasma ble pipettert over i 1,5 ml eppendorfrør og lagret ved -20°C til senere analyser. For å unngå stressrelaterte endringer i plasma kortisol i forbindelse med uttak, ble fisken raskt (innen 1 min 30 sek.) hovet ut av karet og overført direkte til en overdose Benzoak. All fisk hadde mistet likevekt innen 2 min etter at hovingen hadde startet og alle blodprøver var tatt innen 5 min. Tap av likevekt/død innen 3-4 minutter gir ikke utslag i forhøyede nivåer av kortisol (Iversen et al., 2003). Det ble utført uttak av 12 individer ved avsluttet transport- fra hver replikat. Fra disse ble det tatt blodprøve, vekt, lengde, kjønn og gonadevekt av, men ikke organuttak.

Ved organuttak ble hele hjernen og hypofysen tatt ut hver for seg samtidig som vev fra den sentrale delen av hodenyren ble prøvetatt. De ulike vevene ble overført til rør med RNAlater® (Ambion Inc., Austin, Texas). Disse ble lagret ved 4-8°C ca. et døgn før videre langtidslagring ved -20°C. 23 timer etter overføring til sjøvann ble 8 individer fra hvert replikat dissekert for organuttak, hvor kjønn, vekt (g ± målenøyaktighet), lengde (til nærmeste mm) og gonadevekt (mg ±) også ble målt. Blodprøver, kjønn, vekt, lengde og gonadevekt ble utført på gjenværende 12 fisk. Sampling til kortisolanalyse ble utført pre-stress (T₀), etter transport (T₂) og etter sjøvannseksposering (T₂₄).

2.4.2 Simulert smolt-transport og sjøvannseksposering

Først ble det samlet 8-12 individer fra T₀ som representerte baseline kortisol. Så ble fisk overførte fra hvert kar med en hov opp i 400l transporttank som inneholdt 100l ferskvann. Kar S1, K1 og K2 ble gjennomført på samme dag ved ulike tider og K3, S2 og S3 dagen etter (figur 3). Transporttanken ble i faste tidsintervaller i 2 timer (15 min pause og 15 min gange) Siste 15 min av transporten var alltid gange og ikke pause. Oksygenering var nødvendig under transporten og ble nøye overvåket (tabell 1). Det var totalt 32 individer i tanken under transportetappene, tettheten var 112g/l vann. 12 individer ble tatt til sampling, alle individ fikk gonadene målt og blodprøvesampling ble utført på de 8 første fiskene. Siden fisken ble testet over 2 dager er det uvisst om noe eller noen kunne ha påvirket/påført fisken utilsiktet stress eller lignende over natten, før neste uttak ble påbegynt.

Tabell 1. Tid for transport av fisk fra ulike replikater i kontroll- (K1-K3) og steriltfisk (S1-S3) gruppene. Minimum (min) og maksimum (max) O₂ metning (%) i løpet av transporten.

	Start – Slutt	Min O ₂	Max O ₂
S1	09 ¹⁵ – 11 ¹⁰	71%	103%
K1	11 ⁵⁰ – 14 ⁰⁰	68%	111%
K2	14 ⁵⁰ – 17 ⁰⁰	68%	105%
K3	08 ⁴⁵ – 10 ⁴⁵	68%	106%
S2	12 ⁰⁵ – 14 ¹⁰	68%	125%
S3	14 ⁵⁰ – 16 ⁵⁵	73%	130%

2.4.3 Sjøvannseksponering

Ved avsluttet transport ble de resterende 20 individene (fra hver replikat) fra transportetappen hovel ut til et strømsatt kar (de samme karet som fisken var hentet fra) og eksponert for fullt sjøvann (35 ‰) i 23 timer kontinuerlig belysning. Etter gjennomgått sjøvannseksponering ble all fisk avlivet og undersøkt som beskrevet under.

2.4.4 Plasma klorid og osmolaritet

Blodplasma fra hvert individ ble tint på is og blandet ved hjelp av en vortexer i ca. 5 sek før analysering. Klorid ble målt ved hjelp av en Corning 925 chloride titrator (CIBA Corning Diagnostics, Essex, England) som baserer seg på en kjemisk reaksjon mellom sølv-ioner (Ag^+) fra en sølvelektrode og kloridioner (Cl^-) fra plasmaprøven (20 μl). Dannelse av sølvklorid gjør at Cl^- titreres ut av løsningen og endrer væskens ledningsevne, som analyseinstrumentet 18 registrerer. Instrumentet har en nøyaktighet på $\pm 2,2 \text{ ng ml}^{-1}$ i en 100 ng ml^{-1} løsning (CibaCorning, 1980), og det ble gjennomført to analyser av hver prøve for å oppdage eventuelle feilmålinger. I de tilfellene der det var avvik på mer enn 10 ng ml^{-1} mellom parallellene, ble flere prøver analysert. Verdiene er presentert som gjennomsnittet av minst to målinger. Det ble også gjennomført målinger av osmolaritet i blodplasma ved hjelp av et FiskeOne-Ten Osmometer (Fiske Associates, MA, USA). Målingene baserer seg på frysepunktdepresjon (nedsenkning av frysepunkt grunnet oppløste substanser) i en væske, der den absolutte temperaturen ved fryse-/smeltepunktet er direkte korrelert til konsentrasjonen (ng ml^{-1}) av løste stoffer i væska. Før oppstart av målinger, og etter hver tiende prøve, ble instrumentet sjekket opp mot en standardløsning (Accuref 290, Fiske Associates, MA, USA) som har en kjent verdi på 290 ng ml^{-1} . Det ble gjennomført minimum tre slike målinger, slik at man skulle være sikker på at verdiene hadde stabilisert seg på 290 ng ml^{-1} , ± 3 . Alt av standardløsning og prøver som ble analysert ble pipettert i en spesiallaget tube (Advanced Instruments, Inc., MA, USA), plassert i maskinen. Det ble utført to målinger av hver prøve for å oppdage eventuelle feilmålinger. I de tilfellene der det var avvik på mer enn 10 ng ml^{-1} mellom parallellene, ble flere analyser utført. Verdiene presentert i resultatene er gjennomsnittet av minst 2 paralleller.

2.4.5 Kvantifisering av plasma kortisol

Som analyseverktøy ble det brukt Radioimmunoassay (RIA) i hendhold til protokoll utarbeidet fra Schulz (1985) og validert av Tveiten et al. (2010). Metoden er basert på en immunologisk analysemetode som bruker radiomerkede molekyler i en trinnvis dannelse av

immunkomplekser. Metoden kan brukes til å bestemme små konsentrasjoner av hormoner, medikamenter og smittestoffer i blod og urin (Schulz, 1985).

2.4.6 Eter ekstraksjon

Kortisol er et steroidehormon som løser seg godt i organiske løsemidler og ble derfor ekstrahert fra plasma ved bruk av dietyleter (DEE) før RIA analysen (Daughaday, 1959). Prøvene med plasma ble tint, vortexet og 300 μ l ble overført til 16x125 mm glassrør. Hvert rør ble tilført 4 ml 16 DEE for så å sette de på 4 minutter spinn vortexet ved 1200 rpm i avtrekkskap. Etter vortexing ble prøvene satt i stativ i rundt 2-3 minutter slik at vannfasen ble separert fra den organiske (DEE) fasen. Steroidene vil da være igjen i etheren slik at man kan fryse vannfasen (plasmaet) ved hjelp av flytende nitrogen. Etter 15-20 sek i flytende nitrogen var vannfasen fryst, fasen med de fettløselige steroidene (etheren) ble så dekantert over til 12x75 mm glassrør. Rørene med DEE fasen ble så satt i vannbad (45°C) i ca. 20-30 minutter. Dette får etheren til å fordampe slik at glassrørene inneholder kun steroider. For å sikre at all DEE var fordampet ble rørene blåst med N₂. Når prøvene var helt tørre ble en RIA bufferløsning tilsatt (900 μ l) som inneholdt (1L: 1,0 g gelatin, 4,38 g NaH₂PO₄ + H₂O, 21,84 g Na₂HPO₄, 9 g NaCl, 1 ml Na-azid (5 %), i MilliQvann). Deretter ble prøvene vortexet i ca. 15 sek og satt på nytt i varmebad (45 grader) i ca. fem minutter. Etter varmebadet ble prøvene vortexet på nytt i ca. 15 sekunder før de ble overført til 2 ml eppendorfrør og oppbevart ved -20°C til analysen ble gjennomført.

2.4.7 Antistoff

Antistoffet rettet mot kortisol er karakterisert av Tveiten et al 2010. Lagringstemperatur var -80°C og løsningen var fortyntet 1:9 med RIA buffer. Like før bruk ble antistoffet tint, og fortyntet videre til bruksløsning. Bruksløsningen gav ca. 50 % binding (4000x fortynting) av det radioaktivt merkede steroidet (i fravær av ikke radioaktivt merket steroidet).

2.4.8 Radioaktiv merket steroid (tracer)

Radioaktiv kortisol var merket med tritium (3H) som er en radioaktiv isotop av hydrogen med halveringstid på 12,3 år. Radioaktiv kortisol ble løst i etanol og oppbevart i kjøleskap på 4 °C som mellomløsning. En passe mengde radioaktiv kortisol (c. 4500 counts per minute (c.p.m)/per 50 μ l) ble fortyntet med RIA buffer like før analyse. Denne løsningen gav en «total count» (TC) c. 4500 cpm/50 μ l for analyse av kortisol. Til kontroll av radioaktivitet ble 600 μ l RIA-buffer, 50 μ l løsning (3H) og 7 ml tellervæske (Ultima Gold XR scientillasjonsvæske) tilsatt i to tellerør. Rørene ble forseglet, vortexet og målt for β -stråling i scintillasjonsteller.

2.4.9 Standardkurve

Til standardkurven ble det laget fra en stamløsning av kortisol løst i etanol (500µg/ml). Stammløsningen ble fortynnet i RIA-buffer til 40 ng/ml og merket S9. Standardkurven ble generert ved å seriefortynne S9 (1:1) til S1 – 1ml fra S9 ble overført et nytt rør merket S8 som inneholdt 1ml RIA-buffer og blandet godt. På tilsvarende måte ble S8 fortynnet til S7 osv. til S1.

2.4.10 Dextran coated charcoal (DCC)

DCC er laget av kull vasket i syre og dextran. DCC har som hensikt å absorbere frie antigen som ikke er bundet til antistoff i analysevæsken «gamma counter» (NUGENT, MAYES & Morrett, 1966). Løsningen lages ved å blande aktivt kull (1,00g) og Dextran T70 (0,1g) med 100 ml RIA-buffer. Blandingen røres på is i ca. en time ved førstegangsbruk og deretter i 15 minutter med magnetrører om den blir stående.

2.4.11 RIA

Selve analysen ble utført av en ansatt ved Universitetet i Tromsø, totalt ble det kjørt 7 assay fordelt på 148 prøver. Hvis prøvene hadde for høye verdier til at de kom inn på standardkurven, ble de fortynnet og analysert på nytt. Totalt 80 rør (borosilikaglass) ble merket på forhånd og deretter tilsatt løsning i henhold til tabell 2, med to paralleller for hver prøve. Rørene ble deretter forsiktig ristet, dekket med aluminiumsfolie og inkubert ved 4°C over natten i kjøleskap.

Tabell 2. Viser tilsetninger til de ulike prøvene i et assay. TC, Total count, TB, Total bound, NSB, Non specific bound, STD, standardløsninger, Prøver.

	Buffer	Standard	Prøve	3H	Antistoff
TC	600	-	-	50	-
TB	100	-	-	50	200
NSB	300	-	-	50	-
Std. S1-S9	50	50	-	50	200
Prøve 1-30	-	-	100	50	200

Etter minst 16 timers inkubering ble 300 µl DDC tilsatt alle rør for å binde opp fritt antigen i løsningen. Etter inkubering i fem minutters ble rørene sentrifugert (4200rpm i fem minutter). Dette resulterer i pelletering av kullet som inneholder det frie antigenet slik at supernatanten (med antigen bundet til antistoff) kan dekanteres over i tellerør. Når dette var gjort ble 7 ml Ultima Gold telleveske tilsatt for å gjøre avlesning av radioaktiviteten i løsningen mulig. Tellingen ble utført ved hjelp av av scintillasjonteller for β- stråling (Tri-Carb 2900TR, Perkin

Elmer, Illinois). Resultatet fra målingene ble lagt inn i regneark (Excel), Konsentrasjoner ble beregnet med basis i standardkurven.

2.5 Beregning av gonadosomatisk indeks, vekstrate og kondisjonsfaktor

Gonadosomatisk indeks (GSI)

GSI er uttrykk for gonadens prosentvise andel i forhold til kroppsvekt, der G er gonadevekt oppgitt i gram og W er kroppsvekten i gram. Beregnes ved hjelp av følgende formel:

$$GSI = \left(\frac{G}{W}\right) * 100$$

Kondisjonsfaktor (K-faktor)

K-faktor er uttrykk for sammenhengen mellom lengde og kroppsvekt, der W er kroppsvekten i gram og L er fiskens lengde i cm. Beregnet ved hjelp av følgende formel:

$$K = \left(\frac{W}{L^3}\right) * 100$$

2.6 Analyse av genuttrykk

2.6.1 RNA ekstraksjon fra hodenyre, hjerne og hypofyse

Til ekstraksjon av RNA ble det brukt Trizol metoden. Stoffer brukt var trizol, isopropanol (2-propanol), kloroform, nuclease free vann og etanol (80%). Vevsprøver lagret på RNAlater® ved -80 °C ble tint og ca. 30 mg vev fra hodenyren ble overført til 1,5ml tubes som inneholdt 1ml trizol. Hele hypofysen ca. 5 mg ble overført på samme måte som hodenyren. Hjernen måtte deles i 2 og legges i hver sin 1,5ml tubes som inneholdt 1ml trizol. Rørene inneholdt keramiske kuler fra en steril beholder som ved sentrifugering vil male opp vevsprøven til en homogen væske. Homogeniseringen ble satt til 2 minutter i en Tissuelizer II. Prøvene ble så sentrifugert ved 12000 rpm/10 min/ 4°C. Supernatanten ble så pipettert over i nye rør og tilsatt 500 µl kloroform på 4°C. Prøvene ble så satt på vortex i 15 sekunder og inkubert på romtemperatur i 5 minutter. Etter inkuberingen skulle prøvene sentrifugeres på nytt ved 12000 rpm/15 min/ 4°C. I påfølgende steg ender man med tre faser i reagensrøret (vannfase (RNA), interfase (DNA,

protein) og bunnfase (DNA, protein)). Pippeterte så ut vannfasen ca. 500 µl til nye rør og fortsatte med dette. Denne prosessen skulle repeteres en gang for å få renere prøver. 500 µl Precooled (-20°C) Isopropanol (2 propanol) ble så tilført, vortexet (ca. 15 sek.) og satt på inkubering i 30 min ved -20°C. I neste steg skulle prøvene sentrifugeres ved 12000 rpm/10 min/ 4°C slik at pelleten ble festet til bunden av røret, dette var for å gjøre den mer synlig og hindre faren for at den ble ekstrahert ut med isopropanolen. 1ml Etanol (80%) ble så tilsatt for å vaske pelleten og sentrifugert ved 10000 rpm/5 min/ 4°C. Etanolen ble fjernet og steget ble repetert en gang fordi det viser seg å gi bedre resultater og renere RNA. Prøvene skulle så tørke i ca. 20-30 min etter etanolen var fjernet for å være sikker på at det ikke var etanol igjen i prøvene. Pelleten skulle så oppløses i 30 µl Nuclease free vann (ThermoFisher Science) og settes til inkubering ved 55°C i ti minutter for å denaturere eventuelle proteiner i prøven.

2.6.2 DNase behandling

Til DNase behandling ble det brukt TURBO DNA-free™ Kit fra Invitrogen. Prøvene fra ekstraksjonssteget ble tilført 3 µl 10x TURBO DNase™ buffer og 1 µl TURBO DNase™ enzym. Så ble miksen forsiktig blandet sammen og satt på inkubering ved 37°C i 20-30 minutter. Deretter skulle det tilføres 3 µl av DNase inaktiverings reagent for å stoppe reaksjonen. Prøvene skulle så inkuberes i romtemperatur i 5 minutter og flikkes 2-3 ganger underveis for å spre inaktiverings enzymet. Etter dette skulle prøvene sentrifugeres på 10000 rpm i 2 minutter for å fange genomisk DNA i bunden av røret. Supernatanten som inneholdt RNA ble så overført i en ny 1ml DNA lobind tube. Nanodrop metoden (ND-1000 Spectrophotometer, Saveen Werner) ble brukt for å måle RNA-konsentrasjonen i prøven. Maskinen måler mengde RNA mot mengde protein ved å måle absorbansen ved 260 og 280 nm. En verdi på $\geq 1,8$ tilsier at prøven ikke er kontaminert med protein. RNA prøvene ble fryst ved -80°C.

2.6.3 cDNA syntese

Til syntese av cDNA ble det brukt High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit fra Applied Biosystems. Mengden som skulle inn i reaksjonen var 200ng RNA. Prøvene ble derfor fortynnet avhengig av konsentrasjon etter DNase behandlingen. Eksempelvis ble prøver som inneholdt 1000 ng/µL fortynnet med 1/10 og prøver med 4000 ng/µL ble fortynnet 1/40. RNA-prøven skulle ikke overstige 9 µl, dette betød at RNA volumet kunne være mindre dersom mengden var nok til å få 200 ng/µl, resterende mengde ble da erstattet med vann slik at RNA + dH₂O til sammen ble 9 µl. Til denne reaksjonen skulle det være en mastermix på totalt 11 µl (10 µl 20X RT Buffer Mix og 1 µl 2X RT Enzyme Mix). Totalvolum i brønnen skulle til sammen være 20

µl. 96-wellpalte ble så forseglet med lokkstrips for at vesken ikke skulle fordampe under inkubering. Rørene ble så inkubert ved 37°C i 60 minutter og avsluttet på 95 °C i 5 minutter (Applied Biosystems GeneAmp® PCR Systems 2700). Rørene ble nedkjølt til 4 °C før prøvene med cDNA ble overført til lagring ved – 20°C.

2.6.4 Kvantitativ real-time PCR

Polymerase chain reaction (PCR) er et veldig nyttig verktøy for oppforming av spesifikke DNA-sekvenser. Kvantitativ real-time PCR (RT qPCR) baserer seg på denne metoden og kvantifiserer samtidig mengde uttrykk av et spesifikt gen ved bruk av et fluoriserende fargestoff. Fargestoffet vil binde til dobbeltrådig DNA (dsDNA) og øke i farge proporsjonalt med mengde PCR-produkter som produseres etter hver amplifiseringssyklus. Når det er signifikant økning i fluorescens sammenlignet med bakgrunnsstøyen vil en terskelverdi (threshold) settes. Den signifikante økningen av amplifiseringssyklusen fører til en overstigning av thresholdet og kalles for tresholdsyklusen (Ct, treshold cycle). Betydningen av denne overstigningen avgjør om det er lite eller mye komplementært DNA (cDNA) i prøven. En lav Ct-verdi betyr at genuttrykk i prøven overstiger tresholdet etter få amplifiseringskurver, prøven inneholder da mye cDNA. En høy Ct-verdi vil bety mindre cDNA i prøven og dermed mindre uttrykk av genet. Metoden er et effektivt verktøy for å måle genuttrykk i ”real-time” i vev, blod eller celler (Applied biosystems, 2010).

En amplifiseringssyklus er delt i tre deler, den første er denaturering etterfulgt av amplifisering og den siste reaksjonen er ekstensjon. Ved denaturering benyttes høy temperatur for å separere dsDNA til enkeltrådig DNA (ssDNA). Amplifisering gjøres for å gi komplementære DNA-sekvenser og tilsatte primere, optimale forhold for å feste seg til det ønskede genet. Ved ekstensjon økes temperaturen til optimal temperatur for enzymet DNA polymerase som påbegynner syntese av en ny DNA-tråd i 5'- 3' retning (Applied biosystems, 2010). Én forover og én revers primer er nødvendig for tilfesting av polymerasen til de komplementære ssDNA-trådene (Kubista, 2007).

Fluorokromet brukt i dette forsøket var Fast SYBR™ Green Master Mix (science, 2020). Fargestoffet avgir sterkere fluorescens når det er bundet til dsDNA, enn i ubundet form. For å utelukke uspesifikk binding av SYBR® Green kan en smeltepunktsanalyse benyttes. Etter avsluttet amplifisering økes temperaturen slik at PCR produktene dissosierer og fargestoffet løsner. Dette endrer fluorescensen. Endringen kan detekteres og framstilles grafisk slik at man

kan sammenligne smeltekurver mot hverandre for å sammenligne uttrykte gener og utelukke uspesifikke bindinger (Applied biosystems, 2010). RT qPCR består av RNA rensing, cDNA syntese og real-time qPCR.

2.6.5 RT qPCR

Prøvene med cDNA ble fortynnet 1:40 med Nuclease free vann. Primerne hadde en bruksløsning på 5 µM, som tilsvarer 0,25 µM per reaksjon. Mastermix ble blandet tilsvarende følgende per reaksjon:

- 7,5 µl Buffer (inneholder Fast [®]SYBR[®] Green fra Applied Biosystems)
- 1,25 µl Primer F
- 1,25 µl Primer R

10 µl av mastermix ble tilsatt hver brønn i en 96-brønnsplate (MicroAmp Fast Optical 96-well, Life Technologies) sammen med 5 µl cDNA, slik at totalvolumet per brønn var 15 µl. Det ble brukt én plate per målgen, og hver prøve ble analysert i duplikater. I to brønner ble cDNA erstattet med vann for å avdekke uspesifikk binding. Prøvene ble analysert ved bruk av 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, CA, USA). Program for RT qPCR foreligger i Tabell 3

Tabell 3: Program Fast SYBR[®] Green Reagents for RT qPCR.

Steg	Temperatur (°C)	Varighet	Syklusantall
Pre-PCR avlesning	50	2 min	Hold
Denaturering	95	10 min	Hold
Denaturering	95	15 sek	40
Amplifisering og ekstraksjon	60	1 min	40
Smeltekurve	95	15 sek	kontinuerlig
	60	1 min	
	95	15 sek	

2.7 Primere

Som referansegene ble Actin, Elongeringsfaktor og 18s brukt. Disse har vist seg å ha mest stabilt genuttrykk og er derfor godt egnet som referansegener for atlantisk laks (Lock et al., 2010). Primereffektivitet ble testet etter metoder beskrevet av Pfaffl (2001).

Tabell 4. Primersekvenser, genbanknumre og primereffektivitet. Tabellen viser informasjon om primere brukt i forsøket. Alle primere hadde en bruksløsning på 5µM med brukskonsentrasjon på 0,25µM.

Gen	Primers	Sekvens (5'-3')	Genbank nr.	Effektivitet
Efl-α	FP	CGCCAACATGGGCTGG	AF321836	2.0212
	RP	TCACACCATTGGCGTTACCA		
β-actin	FP	CAGCCCTCCTTCCTCGGTAT	BT059604	2.0314
	RP	CGTCACACTTCATGATGGAGTTG		
Sal_18S	FP	TGTGCCGCTAGAGGTGAAATT	AJ427629	1.9476
	RP	CGAACCTCCGACTTTCGTTCT		
POMC A1	FP	TGGAAGGGGAGAGGGAG	AB462418	1.8164
	RP	CAGCGGAAGTGGTTCATCTTG		
POMC B	FP	ACTAAGGTAGTCCCCAGAACCCTC	AB462419	1.832
	RP	GCTACCCAGCGGAAGTGA		
11βhsd2	FP	GCTGCCTATACTCTGCCA	Ikke spesifisert	1.8211
	RP	GCCTGTGATGAAGACAGC		
GR1	FP	ACCGCAGCAGAACCAACAG	GQ179974	1.7835
	RP	TGGATCGATTCAAATCTGCAAT		
GR2	FP	TGTCCATGAGGACGGAGACA	salmon_genome	1.8681
	RP	CCAATGTACCCTTCCTGATCCA		
MC2R	FP	Ikke oppgitt	Ikke oppgitt	Ikke oppgitt
	RP	Ikke oppgitt	Ikke oppgitt	Ikke oppgitt
CRF1a	FP	ACTTGATCCATCCACAATCTTCAG	NM_001141590	1.7922
	RP	GCGAATTTTGATTGGAGTTGTCA		
CRF1b	FP	GTCCATCCATCCCACGATCTA	Ikke publisert	2.0476
	RP	AAGTACTCCTCTCCTAGTCGCAGG		

2.7.1 Behandling av data

Eliminering av uteliggere.

Et økt nivå av plasma kortisol som følge av gjennomgått smoltifisering er forventet (McCormick et al. 2007; McCormick et al. 2019), men ved T₀ hadde to av replikatene, K3 og S3, plasma kortisol konsentrasjoner (c. 100 ng/ml) på et nivå som ikke er assosiert med smoltifisering, men tilsier at fisken i disse karene allerede var stresset. Kortisolverdiene fra disse

to replikatene (ved T₀) ble derfor utelatt fra den statistiske behandlingen og grafiske framstillingen av data for plasma kortisol. Det var imidlertid ingen indikasjoner på at kortisolnivået hos fisk fra disse replikatene var systematisk forskjellig fra de øvrige replikatene ved uttakene etter transport (T₂) og etter 23 timer sjøvannseksposering (T₂₄). Ved disse uttakene er derfor data fra alle replikatene inkludert i de statistiske analysene og den grafiske fremstillingen. Tilsvarende evaluering/sammenligning av uttrykksdata tilsa at det ikke var noen systematisk effekt på genuttrykk hos fisk fra K3 og S3 ved noen av uttakene. Følgelig ble data fra alle replikater og alle uttak inkludert i de statistiske analysene og den grafiske fremstillingen av genuttrykk. Se Resultater for ytterligere detaljer.

Data fra RT qPCR ble analysert ved bruk av metode utarbeidet av Pfaffl (2001). Den matematiske modellen er avhengig av effektiviteten til et gitt referansegene (E_{ref}) og effektiviteten til et spesifikt målgen (E_{mål}). Ligning 3 brukes til utregning av et målgens relative endring i forhold til et referansegene. ΔCt er differansen mellom gjennomsnittet av Ct-verdiene for referansegene eller målgenet, og Ct-verdiene for hvert enkelt individ. ΔCt settes inn i ligning 3 sammen med primereffektiviteten og man kan regne ut ratio for endring av genuttrykk av målgenet i forhold til referansegene (Pfaffl, 2001).

Formel 1. Ligning 3 (Pfaffl, 2001)

$$Expression\ Ratio = ER = \frac{(E_{target})^{\Delta Ct_{target}(calibrator-test)}}{(E_{reference})^{\Delta Ct_{reference}(calibrator-test)}}$$

2.8 Statistisk analyse og grafisk fremstilling

All data fra forsøket ble bearbeidet i Microsoft Excel fra 2011

Statistisk analyse ble utført ved hjelp av IMB SPSS Statistics (ver. 1.0.0) for Windows. En Shapiro-Wilk test ble brukt for å teste data for normalfordeling, og en Brown-Forsyth test for å teste lik varians. Signifikansnivå 0,05 ble brukt. Om nødvendig ble data log-transformert for å møte forutsetningene om normalfordelte data for å kjøre en parametriske ANOVA (*analysis of varianc*) (Girden, 1992; Miller Jr, 1997; Tabachnick & Fidell, 2007). Normalfordeling ble testet ved en treveis ANOVA for å avgjøre statistisk signifikans mellom tid, behandling (S/K) og kjønn. *Backward elimination* ble brukt for å fjerne de faktorene som ikke var signifikant i

ANOVA, for å styrke eventuelle signifikante forskjeller (Dunkler, Plischke, Leffondré & Heinze, 2014). Dersom p-verdiene indikerte signifikante forskjeller, ble en Bonferroni post hoc test kjørt for å avgjøre hvor det var forskjeller mellom gruppene og tidspunktene. Om ikke data tilfredstilte kravene til parametrisk statistikk, ble en Kruskal-Wallis faktor ANOVA og en Dunn´s post hoc test brukt, med signifikansnivå 0,05. Replikatene for T₀ og genuttrykk *crf1b* og *11bhsd2* besto ikke Brown-Forsyth test for lik varians. Det ble testet for statistisk signifikans mellom behandling (steril og kontroll) og kjønn. Data blir fremstilt som gjennomsnitt ± SEM.

3 Resultater

3.1 Gonadosomatisk indeks og vektutvikling

Gjennomsnittlig lengde (cm), vekt (g), kondisjonsfaktor og gonadosomatisk indeks (GSI) for kontroll (K) og steril (S) fisk før stress (T₀) og etter stress (T₂ og T₂₄), er presentert i Tabell 5.

Tabell 5. Gjennomsnittlig vekt (g) ± SEM, lengde (cm), Kondisjonsfaktor og gonadosomatisk indeks (GSI) fra både kontroll (n=8-30) og steril (n=8-28) ved uttak T₀, T₂ og T₂₄. Ulike små og store bokstaver angir signifikant (P<0,05) forskjeller mellom ulike kategorier (steril, kontroll og moden kontroll) hos henholdsvis hann (små bokstaver)- og hunnfisk (STORE bokstaver) innenfor ett måletidspunkt (h.h.v T₀, T₂ og T₂₄). Verdiene er presentert som gjennomsnitt ±SEM. M: hannfisk Steril og kontroll/umoden, F: hunnfisk steril og kontroll og MM: kjønnsmoden han (n=30) og UM: umoden hann (n=24) totalt mellom alle uttakene.

	Gruppe	Lengde (cm)	Vekt (g)	Kondisjon	GSI %
T ₀	Kontroll MM:	30,6 ± 0,76	415,2 ± 0,03	1,41 ± 0,1	0,14c ± 0,01
	Kontroll MU:	30,1 ± 0,51	356,0 ± 0,03	1,28 ± 0,1	0,05b ± 0,01
	Steril M:	29,6 ± 0,47	337,2 ± 0,02	1,29 ± 0,1	0,02a ± 0,03
	Kontroll F:	29,3 ± 0,65	317,5 ± 0,03	1,30 ± 0,1	0,14B ± 0,04
	Steril F:	28,7 ± 0,61	305,1 ± 0,03	1,30 ± 0,1	0,02A ± 0,03
	T ₂	Kontroll MM:	30,9 ± 0,2	404 ± 2,4	1,37c ± 0,1
Kontroll MU:		30,6 ± 0,2	367,8 ± 2,6	1,17b ± 0,1	0,04b ± 0,05
Steril M:		30,0 ± 0,2	356,3 ± 2,3	1,34a ± 0,1	0,03a ± 0,03
Kontroll F:		29,3 ± 0,2	314,2 ± 2,1	1,21 ± 0,1	0,14B ± 0,06
Steril F:		29,3 ± 0,2	325,9 ± 1,8	1,28 ± 0,1	0,01A ± 0,07
T ₂₄		Kontroll MM:	30,0 ± 0,2	396,1 ± 2,5	1,40c ± 0,1
	Kontroll MU:	29,1 ± 0,3	311,0 ± 2,4	1,18b ± 0,1	0,05b ± 0,03
	Steril M:	29,8 ± 0,2	351,9 ± 2,0	1,29a ± 0,1	0,03a ± 0,06
	Kontroll F:	29,7 ± 0,2	322,6 ± 2,0	1,23 ± 0,1	0,13B ± 0,08
	Steril F:	29,5 ± 0,2	320,9 ± 1,5	1,24 ± 0,1	0,01A ± 0,06

Gjennomsnittlig vekt og lengde viste ikke signifikant forskjell mellom uttakene (T₀, T₂ og T₂₄) for kontroll og steril, og det var heller ingen effekt av kjønn (SM vs. Kontroll hann umoden (KMU) og kontroll hann moden (KMM), SF vs. KS og M vs. F) på disse parameterne. Det ble også testet for forskjeller i GSI mellom SM, KMM og KMU og SF vs. KS samt for interaksjoner

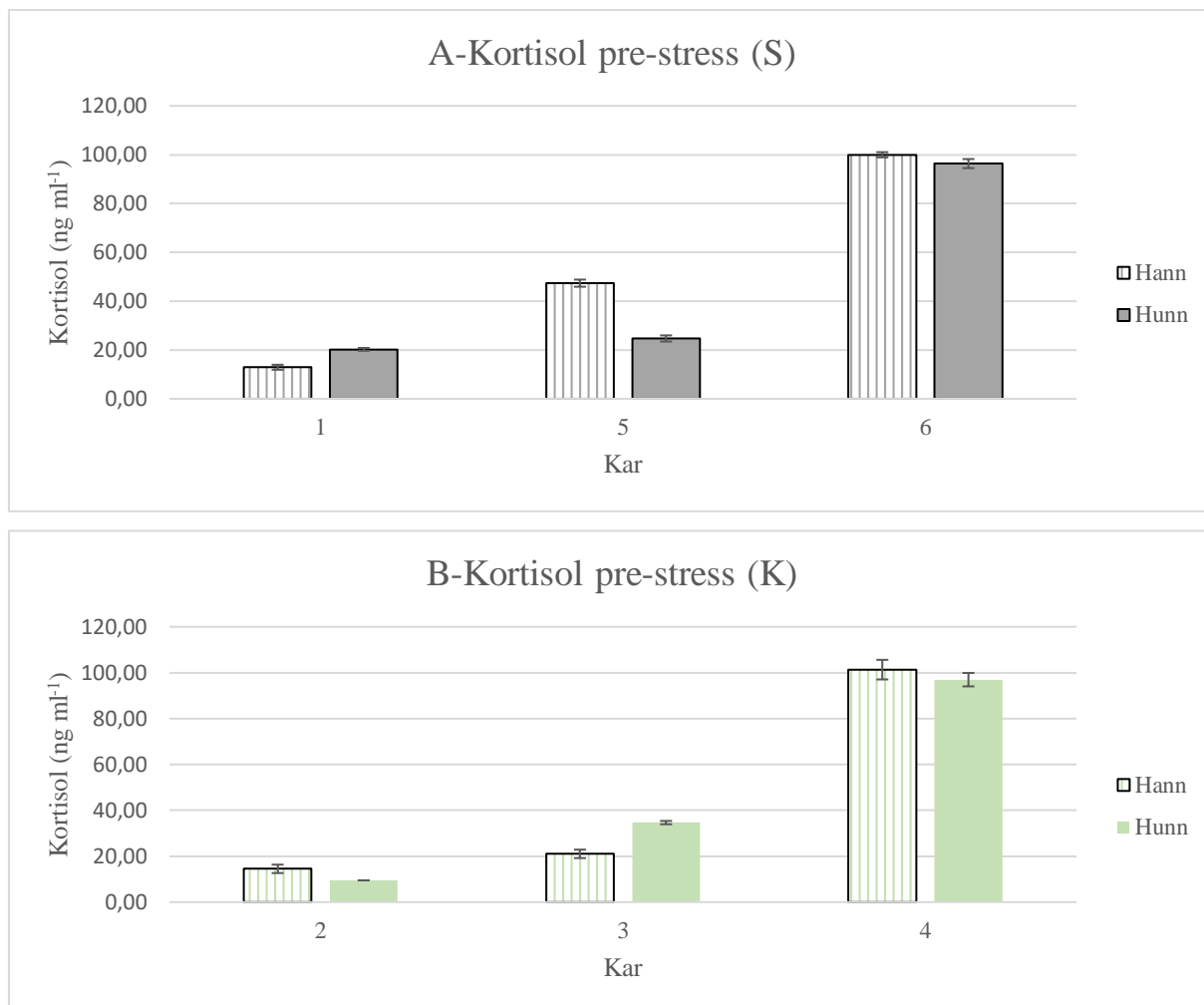
mellom uttak og behandling, hvor GSI var signifikant lavere for S sammenlignet med K hos begge kjønn og ved alle uttak (tabell 5).

Ved T₀, T₂ (transport) og T₂₄ ble det observert til sammen 30 hannfisk med begynnende kjønnsmodning (KMM) i kontrollgruppen av totalt 154 hannfisk tilsvarende 19,5 %. Gonadosomatisk indeks for S var signifikant lavere sammenlignet med K hos begge kjønn og ved alle uttak (Tabell 5). KMM hadde et samlet snitt på 0,13 i GSI for alle uttakene som var signifikant høyere enn KMU som hadde en GSI på 0,05 (tabell 5). Sett alle uttakene under ett var kondisjonsfaktoren hos KMM signifikant høyere enn hos resten av hannfiskene. Ved T₀ var kondisjonsfaktoren for S ikke signifikant forskjellig fra K og ikke påvirket av kjønn. Det var derimot en signifikant forskjell i kondisjonsfaktor etter T₂ og T₂₄ mellom KM og SM. KM hadde en kondisjonsfaktor på 1,17 etter T₂ transport mot 1,34 for SM. For 24t var KSF 1,18 for KM mot tilsvarende 1,29 for SM (tabell 5).

Av alle registrerte KMM var det ved en tilfeldighet få individer som ble samlet til analyse. KMM hadde derfor ingen statistisk «power» og er derfor med som en del av KM.

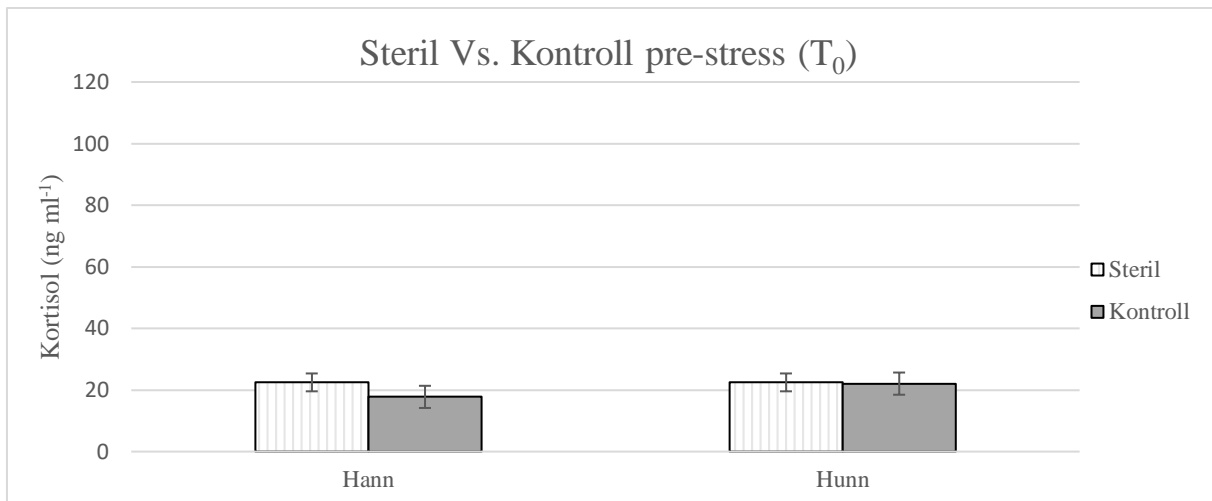
3.2 Kortisol

Plasma kortisol var signifikant forhøyet (c 100ng/ml) i to av replikantene, en i kontrollgruppen (K3) og en i sterilgruppen (S3), pre-stress (figur 4). Slike plasma kortisol konsentrasjoner er klart assosiert med fisk som er stresset og det ble derfor valgt å utelate kortisolverdiene for disse to replikantene fra den statistiske analysen da det er lite trolig at de representerer et reelt pre-stress nivå av kortisol (se materialer og metoder for ytterligere detaljer).



Figur 3. Plasma kortisol ng ml⁻¹ for A) Steril hann og hunnfisk og B) Kontroll hann og hunnfisk ved måletidspunkt T₀ (pre-stress). Replikat S1 (n = 8), S2 (n=8), S3 (n=8), K1 (n=8), K2 (n=9) og K3 (n=9). Oppgitt antall er angitt som en total for hvert replikatene i en gruppe. Verdiene er presentert som gjennomsnitt ± SEM.

Det var ingen signifikant forskjell i konsentrasjon av plasma kortisol mellom S og K pre-stress selv med replikatene K3 og S3 inkludert. Ekskluderer man dem var plasma kortisol på h.h.v (22,5 ng ml⁻¹ for S) og K (20,0 ng ml⁻¹ for K). Forskjellene mellom kjønn og gruppe var heller ikke signifikante (figur 5). Hverken kjønn eller gonadestatus hadde noen signifikant effekt på plasma kortisol konsentrasjon ved T₀ (pre-stress); SM (22,5 ± 2,9 ng ml⁻¹), KM (17,8 ± 3,3 ng ml⁻¹), SF (22,5 ± 2,9 ng ml⁻¹) og KF (22,1 ± 2,7 ng ml⁻¹) var heller ikke signifikante (figur 5). For KMM så det ut til at kortisol var forhøyet (84,5 ± 3,6 ng ml⁻¹) men ble kun målt på 2 individer (ikke vist i figur 5).

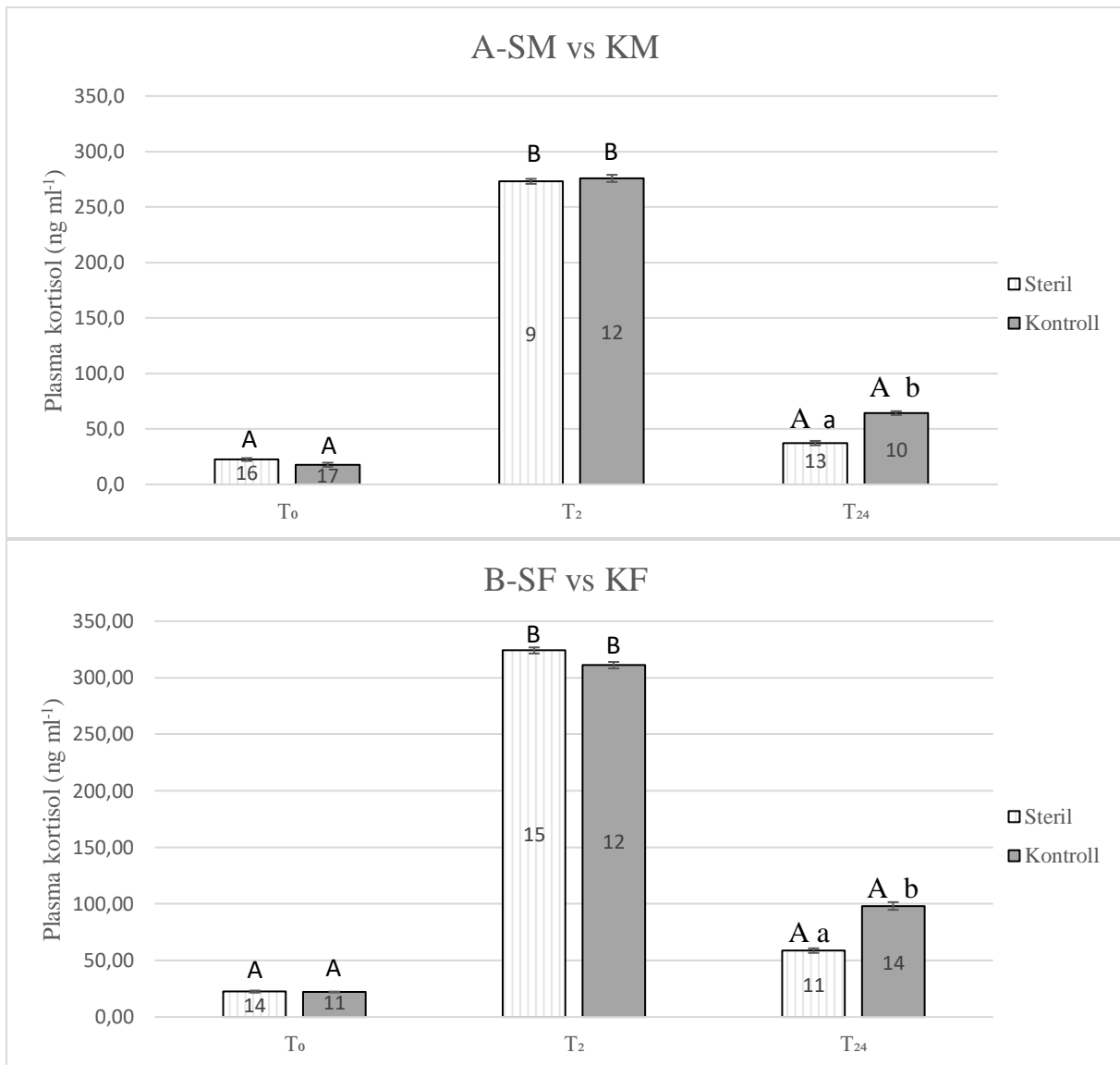


Figur 4. Plasma kortisol (ng ml⁻¹) for steril (S) og kontroll (K) hann og hunnfisk ved måletidspunkt T₀ (pre-stress) Verdiene fra K3 og S3 er utelatt (se M&M for ytterligere detaljer). Verdiene er representert som gjennomsnitt ±

Undersøkelse av kortisolnivået i de ulike replikatene ved T₂ transport og T₂₄ sjøvannseksponering ble det imidlertid ikke funnet noen systematiske forskjeller i kortisolnivå hos fisk som hadde sin opprinnelse fra disse to replikatene. Etter T₂₄ var det noen mer variasjon mellom replikatene for hunnfisk, men disse er valgt å ta med da slike nivåer kan forventes etter påfølgende sjøvannseksponering. Kortisolverdier fra alle replikatene er derfor inkludert ved disse uttakene.

Etter transport (T₂) hadde kortisolnivået økt signifikant fra pre-stress hos alle kategorier fisk (figur 6). Videre var det heller ingen signifikant forskjell mellom SM (270,2 ng ml⁻¹) og KM (275,8 ng ml⁻¹), SF (324,1 ng ml⁻¹) og KF (311,1 ng ml⁻¹) etter T₂ transport (figur 6A, B). Både SF og KF hadde høyere plasma kortisol enn SM og KM, men det ble ikke funnet noe signifikant effekt av kjønn. Dette uttaket hadde flest modne hanner (gjennomsnittlig GSI på 0,12%) på totalt 10 individer. Modningen hadde ingen signifikant effekt på plasma kortisol og var (255,8 ± 3,1 ng ml⁻¹ hos KMM).

Etter sjøvannseksponering T₂₄ var kortisolnivået redusert signifikant fra T₂ for S og K. Både SM (37,3 ng ml⁻¹) og SF (58,7 ng ml⁻¹) hadde signifikant lavere plasma kortisol enn h.h.v KM (64,3 ng ml⁻¹) og KF (98,2 ng ml⁻¹) etter T₂₄ (figur 6A, B). Her var det også en del KM med begynnende modning. Totalt 15 individ med en gjennomsnittlig GSI på 0,13. Det ble ved en tilfeldighet utført RIA på kun en kjønnsmoden hannfisk fra dette uttaket med plasma kortisolnivå på 70,48 ng ml⁻¹.



Figur 6. Plasma kortisol (ng ml⁻¹) for A) steril hannfisk (SM) vs. Kontroll hannfisk (KM) og B) steril hunnfisk (SF) vs. kontroll hunnfisk (KF) ved måletidspunkt T₀, T₂ og T₂₄ for kontroll (n=63), steril (n=75). Ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller (P<0,05) mellom måletidspunktene innenfor samme gruppe. Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller (P<0,05) mellom gruppene innenfor måletidspunkt. Tall i søylene representerer antall individ fra hvert uttak. Verdiene er presentert som gjennomsnitt ± SEM.

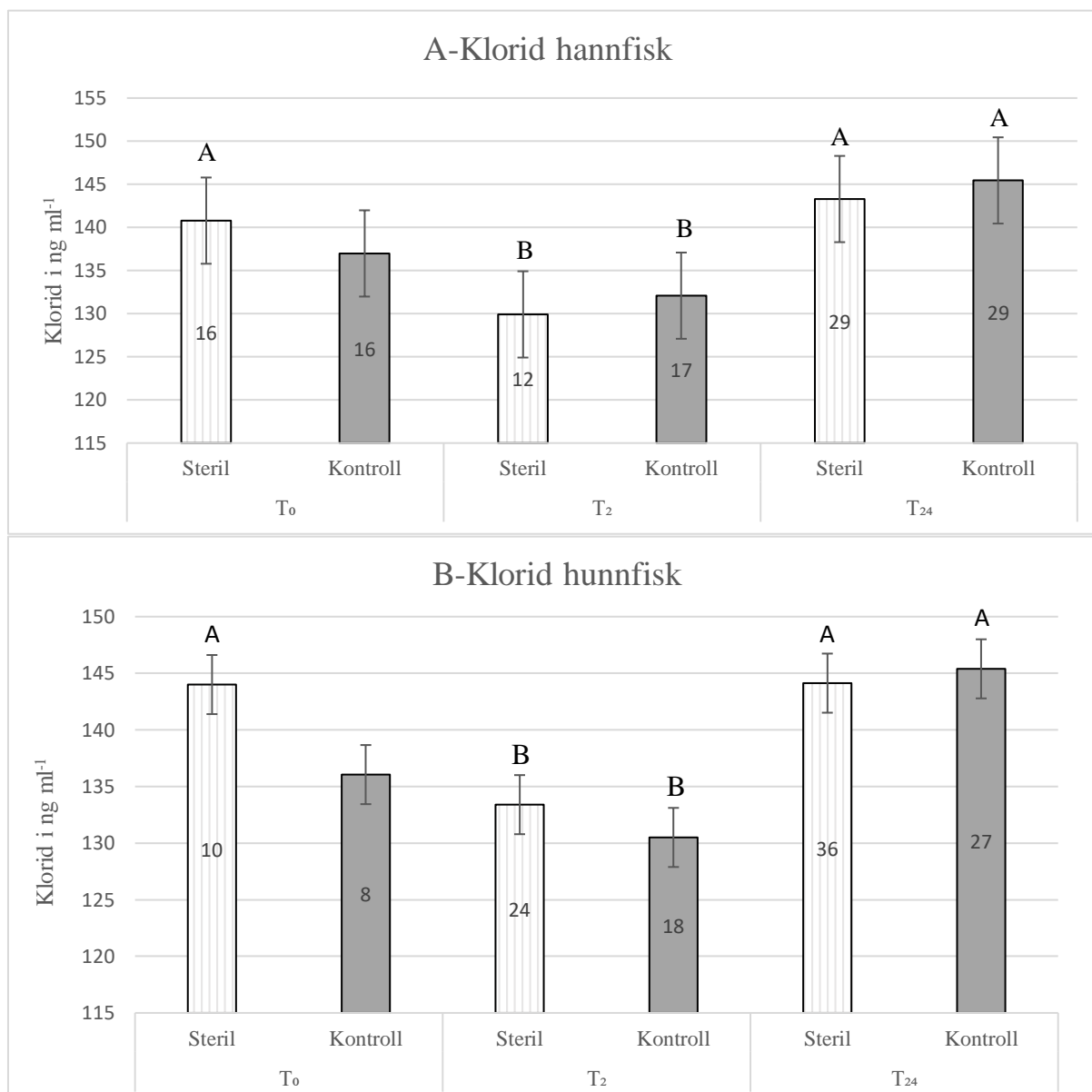
3.3 Plasma klorid og osmolalitet

Fisken viste ingen signifikante forskjeller i plasma klorid mellom S og K ved uttak T₀ (figur 7A, B). Begge gruppene lå mellom 136 og 144 ng ml⁻¹ ved T₀. Videre undersøkelse viste ingen signifikante forskjeller hverken mellom replikater eller kjønn i gruppene (figur 7A, B) ved dette uttaket.

Noe mer variasjon var å finne etter T₂, SM og SF hadde en signifikant reduksjon i plasma klorid, h.h.v (141 ng ml⁻¹ til 130 ng ml⁻¹) for SM (figur 7A) og (144 ng ml⁻¹ til 133 ng ml⁻¹) for SF (figur 7B). Kontrollgruppen hadde ingen signifikant reduksjon i plasma klorid etter T₂, h.h.v (137 ng ml⁻¹ til 132 ng ml⁻¹) for KM (figur 7A) og (136 ng ml⁻¹ til 131 ng ml⁻¹) for KF (figur 7B).

Sammenligning av plasma klorid fra T₂ viste ingen signifikant forskjell mellom gruppene (S og K), kjønn eller replikater.

Variasjon var også å finne etter T₂₄ der signifikante forskjeller ble målt i plasma klorid hos SM og KM sammenlignet med målingen fra T₂. SM plasma klorid (130 ng ml⁻¹ til 144 ng ml⁻¹) og KM (132 ng ml⁻¹ til 145 ng ml⁻¹), (Figur 7B). Forskjellen mellom SM, og KM var ikke signifikant forskjellig fra hverandre og heller ikke mellom replikatene etter T₂₄. Hos SF og KF var det også en signifikant økning i plasma klorid etter T₂₄ sammenlignet med måling gjort ved T₂, h.h.v (133 ng ml⁻¹ til 144 ng ml⁻¹) for SF og (130 ng ml⁻¹ til 145 ng ml⁻¹) (figur 7B). Sammenligning av plasma klorid fra T₂₄ viste ingen signifikant forskjell mellom gruppene (S og K), kjønn eller replikater.



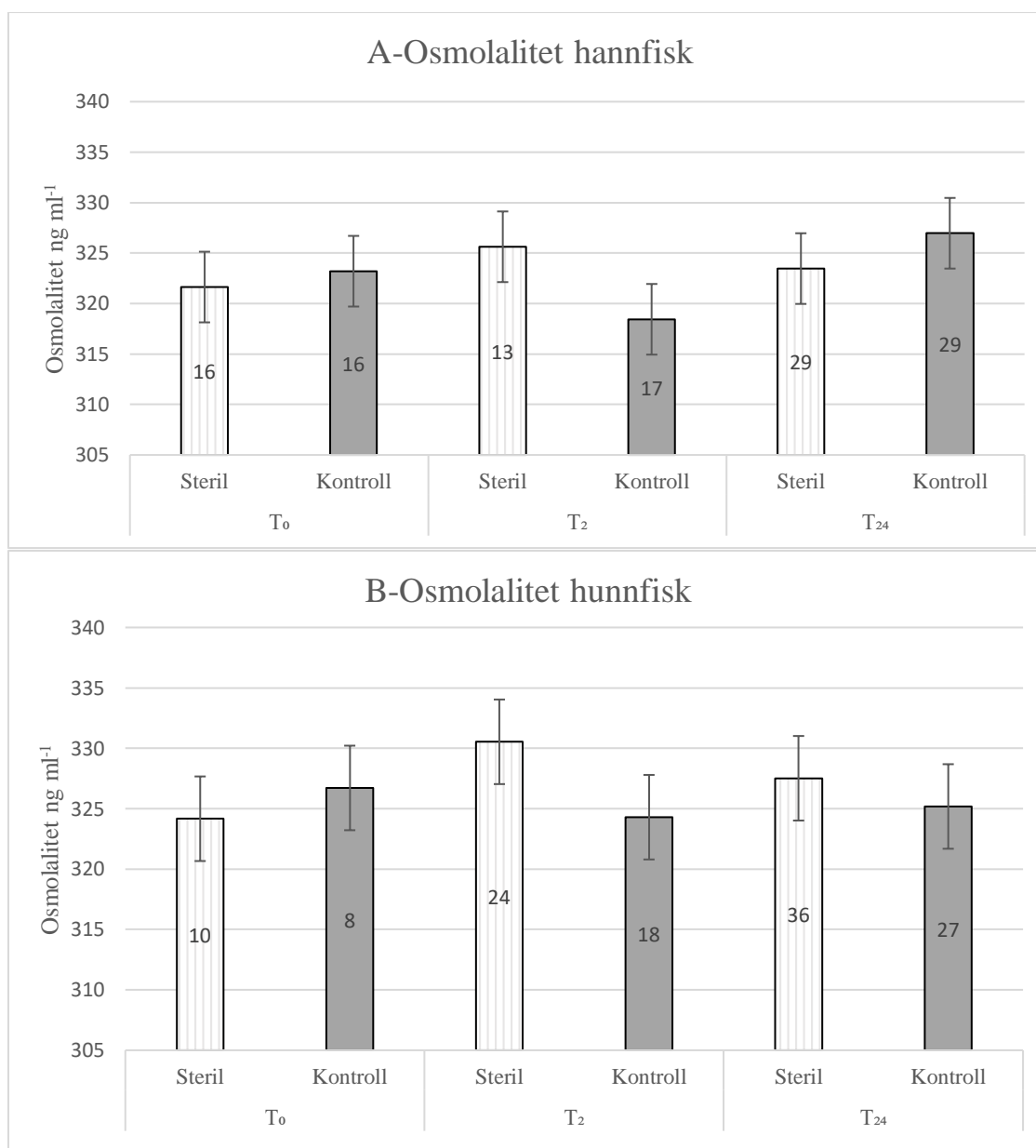
Figur 7. Plasma klorid (ng ml⁻¹) for A) hannfisk og B) hunnfisk ved måletidspunkt T₀, T₂ og T₂₄. Ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller (P<0,05) mellom måletidspunktene innenfor samme gruppe. Tall i søylene representerer antall individ fra hvert uttak. Verdiene presentert som gjennomsnitt ± SEM.

Plasma osmolalitet viste ingen signifikante forskjeller mellom S og K ved uttak T₀ (figur 8A, B). Begge grupper lå mellom 321 og 316 ng ml⁻¹. Videre undersøkelse viste ikke signifikante forskjeller hverken mellom replikater eller kjønn i gruppene (figur 8A, B).

Det var ingen signifikante forskjeller i plasma osmolalitet for S og K etter T₂ (figur 8A, B). Sammenligning av plasma osmolalitet viste heller ingen signifikant forskjell mellom gruppene (S og K), kjønn eller replikater (figur 8A, B). Fra T₀ til T₂ var det ingen signifikante endringer i plasma osmolalitet for hverken S eller K. Hos SM (321,6 ng ml⁻¹ til 325,6 ng ml⁻¹), KM (323,2

ng ml⁻¹ til 318,4 ng ml⁻¹), SF (324,2 ng ml⁻¹ til 330,5 ng ml⁻¹) og KF (326,7 ng ml⁻¹ til 324,3 ng ml⁻¹) (figur 8A, B).

Etter T₂₄ var det ingen signifikant forskjell i plasma osmolalitet sammenlignet med målingene fra T₂ h.h.v 323,5 ng ml⁻¹ hos SM, 327 ng ml⁻¹ hos KM, 327,5 ng ml⁻¹ hos SF og 325,2 ng ml⁻¹ hos KF. Ingen signifikante forskjeller ble målt mellom replikatene for S og K. Forskjeller mellom kjønn, samt effekt av kjønnsmodning ved begge uttak (T₂ og T₂₄) ble testet, men ga ikke signifikante resultater.



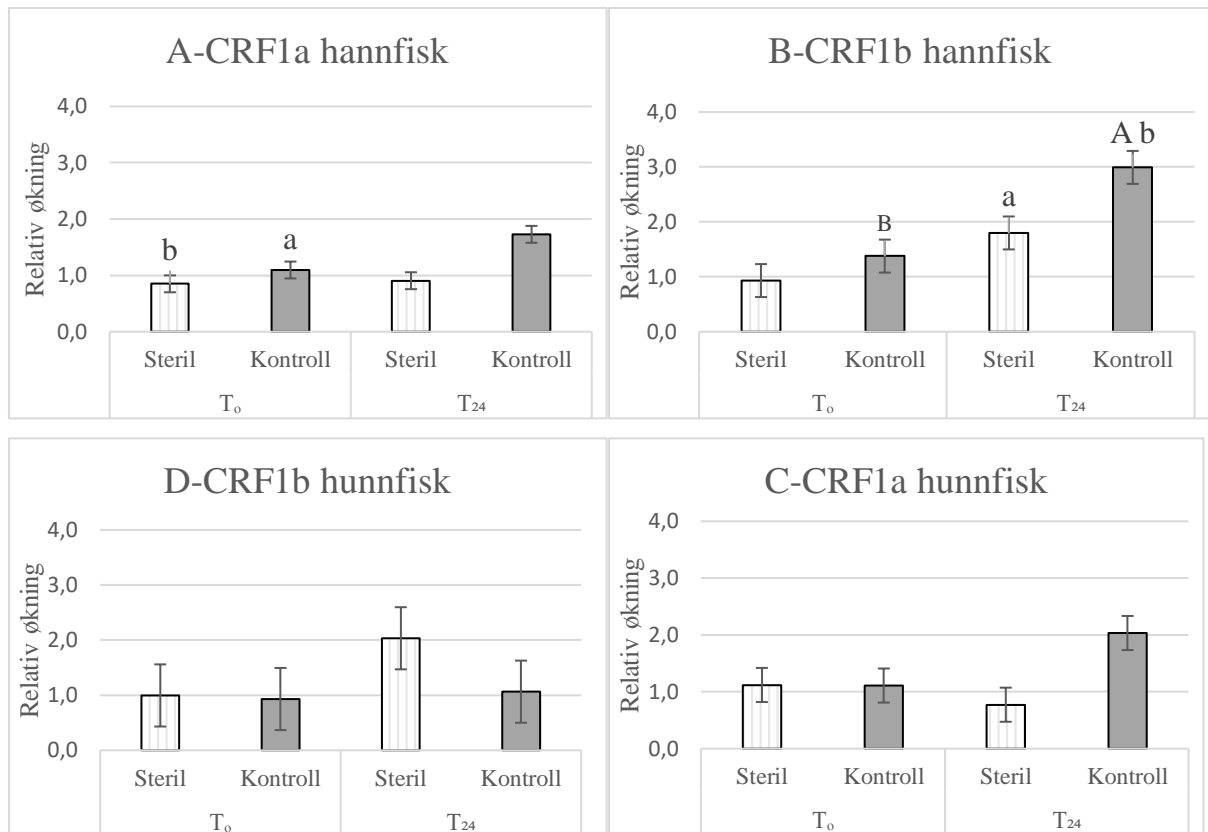
Figur 8. Gjennomsnittlig osmolalitet (ng ml⁻¹) i plasma for A) hannfisk og B) hunnfisk ved måletidspunkt T₀, T₂ og T₂₄. For kontroll M (n=46) og kontroll F (n=53), steril M (n=41) og steril F (n=70). Tall i søylene representerer antall individ målt ved hvert uttak. Verdiene presentert som gjennomsnitt ± SEM.

3.4 Genuttrykk HPI-aksen

Ved å undersøke genuttrykket hos fisk fra de ulike replikatene fra alle uttakene (T₀, og T₂₄) ble det oppdaget systematiske forskjeller i genuttrykk hos fisk på replikatene fra samme kar som hos kortisol (K3 og S3), disse ble derfor utelatt

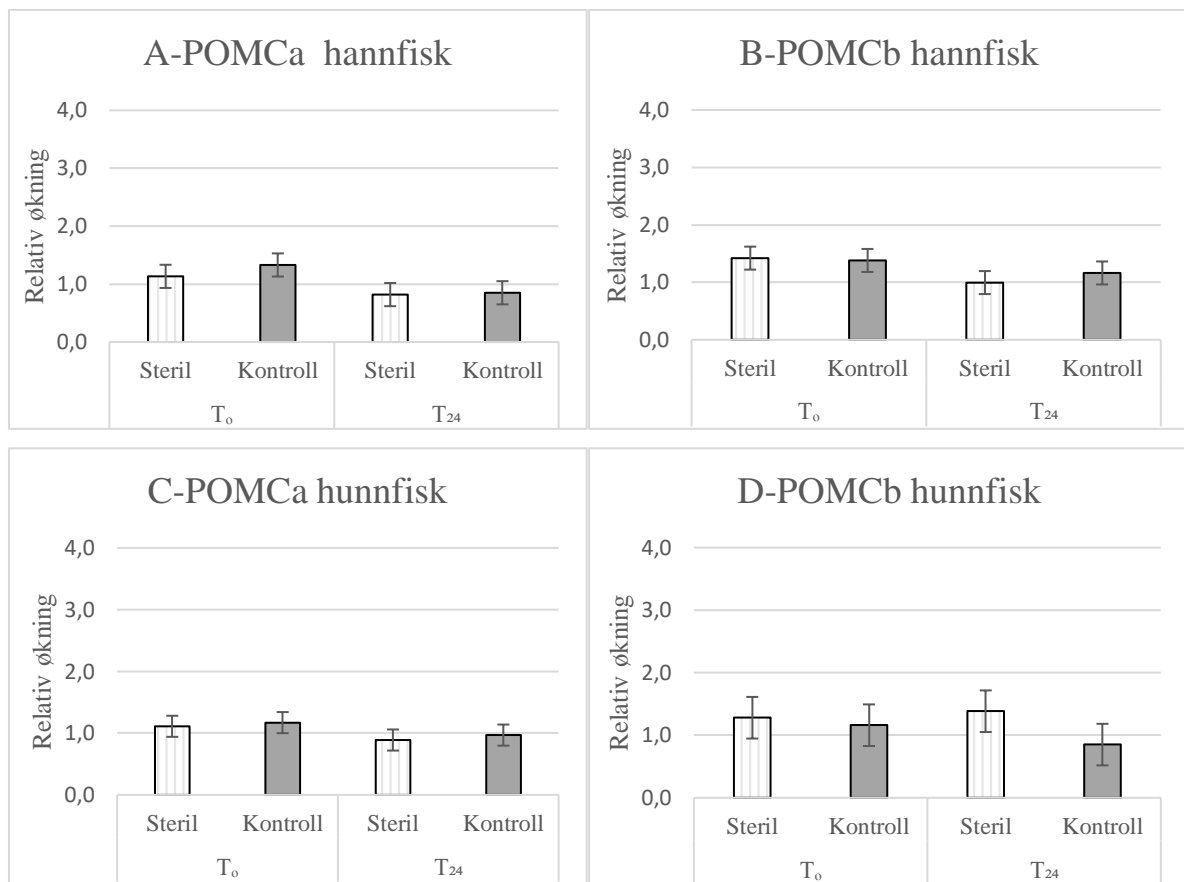
Pre-stress (T₀) var det kun en signifikant forskjell mellom S og K i uttrykk i hjernen. Utrykk av *crfla* var signifikant høyere hos KM sammenlignet med SM (figur 9A). Videre ble ingen signifikant forskjell målt mellom gruppene (S og K), kjønn eller replikater.

I perioden mellom T₀ og T₂₄, var det en liten økning i uttrykket av *crfla* i hjernen for SM og KM, uten noen signifikans (Figur 9A, B). Det var derimot en signifikant økning i uttrykket av *crflb* for KM etter T₂₄ (figur 9B), mens økning ikke var signifikant for SM. For uttrykket av *crfla* og *crflb* for SF og KF var det ingen signifikans mellom uttakene eller gruppene. *Crfla* har en liten nedgang i uttrykk for SF fra T₀ til T₂₄ mens for KF er det en liten økning (figur 9C). Utrykket av *crflb* økte i begge hunnfisk (S og K) fra T₀ til T₂₄ (figur 9D). Det var ingen signifikant forskjell mellom S og K, og man kan heller ikke finne signifikante forskjeller mellom hverken uttak eller kjønn for noen av genene (Figur 9).



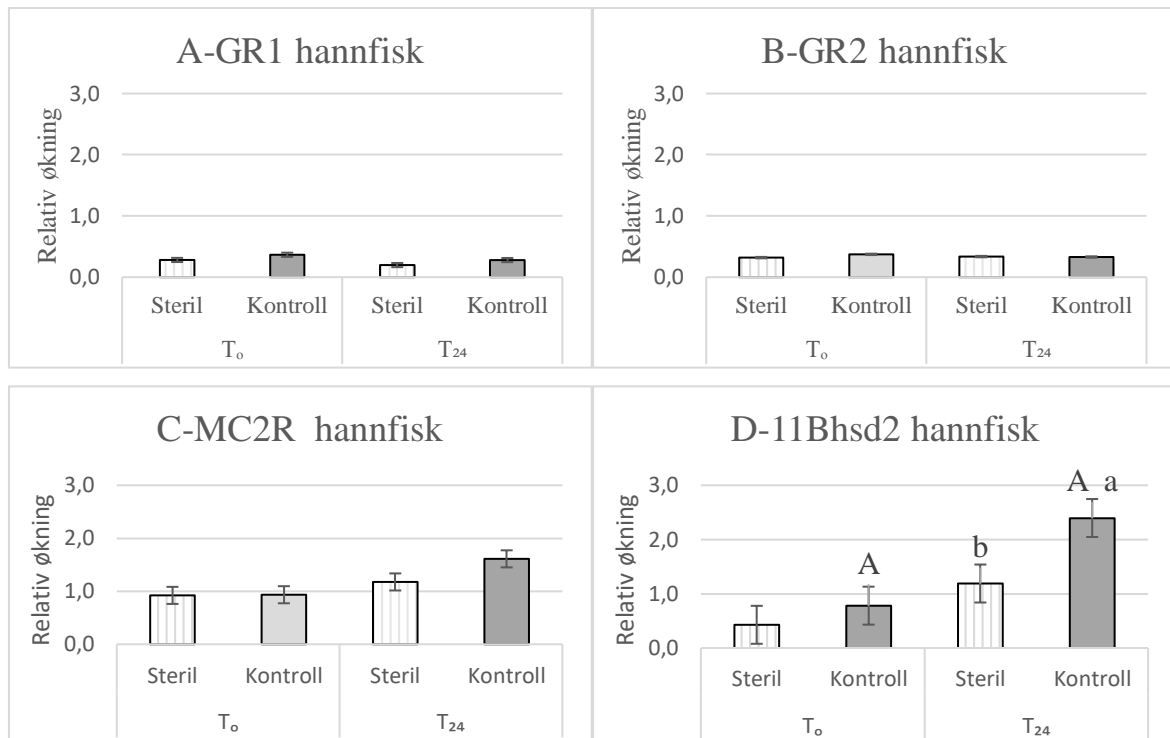
Figur 9. Relativt genuttrykk for A) *crf1a* hannfisk, B) *crf1b* hannfisk, C) *crf1a* hunnfisk og D) *crf1b* hunnfisk ved måletidspunkt T₀ og T₂₄. For kontroll M (n=20-22), kontroll F (n=17-19), Steril M (n=25-30) og steril F (n= 14-18). Ulike store bokstaver angir signifikant forskjeller (P<0,05) mellom måletidspunktene innenfor samme gruppe. Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller (P<0,05) mellom gruppene innenfor måletidspunkt. Verdiene er presentert som gjennomsnitt ± SEM.

I hypofysen var det en liten nedgang i uttrykk av *pomca* og *pomcb* fra T₀ til T₂₄ for SM og KM. Her var det ingen signifikant økning mellom måletidspunkt eller gruppene (figur 10A, B). For uttrykk av *pomca* var det også en liten nedgang både hos SF og KF, men ikke signifikant hverken mellom måletidspunktene eller gruppene (figur 10C). Når det gjaldt uttrykket av *pomcb* var det mer variasjon mellom SF og KF. SF viste en liten økning i *pomcb* fra T₀ til T₂₄, mens for KF var det en liten reduksjon i uttrykket i samme periode, uten at forskjellen var signifikant (figur10D).



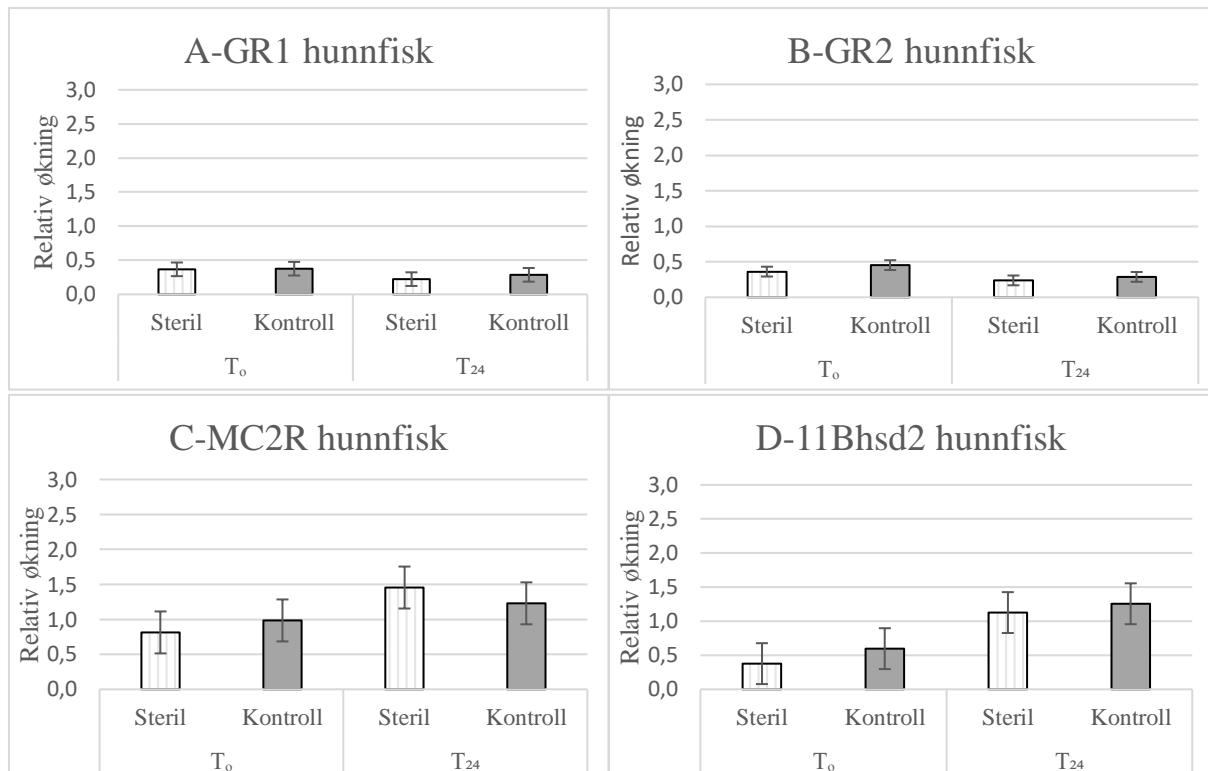
Figur 10. Relativt genuttrykk for A) *pomca* hannfisk, B) *pomcb* hannfisk, C) *pomca* hunnfisk og D) *pomcb* hunnfisk ved måletidspunkt T₀ og T₂₄ for kontroll M (n=20-22), kontroll F (n=17-19), Steril M (n=25-30) og steril F (n= 14-18). Det var ingen signifikant forskjell hverken mellom måletidspunkt eller steril og kontroll for *pomca* og *pomcb*. Verdiene er presentert som gjennomsnitt ± SEM.

Utrykket av *gr1* i hodenyren hos SM og KM varierte lite både mellom gruppene og måletidspunktene, og er presentert i figur 11A. Det samme gjaldt for uttrykket av *gr2* i begge gruppene, liten til ingen endring mellom måletidspunktene (figur 11B). *Mc2r* var mer utrykt og hadde en liten økning både hos SM og KM fra T₀ til sluttmåling etter T₂₄, presentert i figur 11C. En signifikant økning ble derimot observert for uttrykket av *11bhsd2* i KM fra start til sluttmåling etter T₂₄ (figur 11D). Etter T₂₄ var det en signifikant forskjell mellom uttrykk av *11bhsd2* hos SM og KM (figur 11D). Videre ble ingen signifikant forskjell målt mellom S og K, kjønn eller replikater.



Figur 11. Relativt genuttrykk for hannfisk i hodenyre A) *gr1*, B) *gr2*, C) *mc2r* og D) *11bhsd2* ved måletidspunkt T₀ og T₂₄. for kontroll M (n=20-22), kontroll F (n=17-19), Steril M (n=25-30) og steril F (n= 14-18). Ulike store bokstaver angir signifikant forskjeller (P<0,05) mellom måletidspunktene innenfor samme gruppe. Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller (P<0,05) mellom gruppene innenfor måletidspunkt. Verdiene er presentert som gjennomsnitt ± SEM.

For FS og FK var det en liten nedgang i uttrykk av *gr1* i hodenyren etter T₂₄. Det ble ikke målt noen signifikant endring hverken mellom gruppene eller måletidspunktene (figur 12A). Det samme gjaldt uttrykket av *gr2*, med en liten nedgang fra T₀ til T₂₄ (figur 12B). *Mc2r* var mer uttrykt og hadde en liten, men ingen signifikant økning både hos SF og KF fra T₀ til sluttmåling etter T₂₄ (figur 12C). For *11bhsd2* ble det også målt økning mellom måletidspunkt T₂ og T₂₄, men det var hverken signifikant forskjell mellom måletidspunktene, gruppene (S og K) eller replikater (figur 12D).



Figur 12. Relativt genuttrykk for hunnfisk i hodenyre A) *gr1*, B) *gr2*, C) *mc2r* og D) *11bhsd2* ved måletidspunkt T₀ og T₂₄ for kontroll F (n=17-19) og steril F (n= 14-18). Det var ingen signifikant forskjell hverken mellom måletidspunkt eller steril og kontroll for hunnfisk i hodenyren. Verdiene er presentert som gjennomsnitt ± SEM.

4 Diskusjon

En oppdrettsfisk må i løpet av livssyklusen klare å håndtere flere utfordrende behandlinger som transport, miljøforandring, predator, sortering, avlusning, daglig røkting m.m. Gjennom avl har det blitt selektert ut individer for å forbedre produksjonsegenskaper som er fordelaktig under oppdrettsbetingelser slik som sykdomsresistens, sen kjønnsmodning og stresstoleranse for å nevne noen (Fevolden et al., 1991; Friars et al., 1995; Storset et al., 2007).

Hos pattedyr er det godt dokumentert at deler av HPG-aksen kan påvirke aktiviteten i HPA-aksen (HPI-aksen for fisk) (Chellakooty et al., 2004; Fuzzen et al., 2011; Maeda & Tsukamura, 2006; Solomon & Herman, 2009). Selv om lite forskning har blitt utført på effekter av GnRH eller GTHs på HPI-aksen, er det funnet som nevnt innledningsvis at kjønnssteroider kan ha en effekt på HPI-aksen, hvor blant annet eksponering til 11KT viser en hemmende effekt på nivået av ACTH og kortisol i plasma (Pottinger et al., 1996; Tveiten et al., 2010).

Gjennom forskningsprosjektet «Salmosterile» har det blitt utviklet en atlantisk laks, hvor en forutsetter at bortfall av kjønnsellelinjen resulterer i et sterilt individ. Siden fisken ikke har blitt holdt til «vanlig» alder (3+ år) for kjønnsmodning kan man ikke formelt si at fisken i dette forsøket er funksjonelt steril. Ordet «steril» er derfor brukt i denne oppgaven under forutsetningen om at bortfallet av kjønnsellelinjen resulterer i sterilitet. I denne sammenhengen kan det legges til at i denne oppgaven ble begynnende modning ved «vanlig» alder (ca. 2 år under oppdrettsbetingelser) observert c. 20 % av hannfisk i kontrollgruppen. Tilsvarende verdier i sterilgruppen var 0%, noe som underbygger forutsetningen om at bortfall av kjønnsellelinjen gir varig sterilitet frem til «vanlig» alder for kjønnsmodning. Hvordan laks uten kjønnseller blir påvirket av produksjonsrelatert stress er interessant fra et vitenskapelig ståsted med hensyn på interaksjoner og integrering av fysiologiske signaler mellom HPI- og HPG-aksene, men også i en fremtidig produksjonssammenheng for oppdrettsnæringen.

4.1 Reproduktiv status

Gjennom et annet forsøk/i forkant av transport testen ble de samme gruppene med fisk S og K fulgt gjennom en standardisert smoltifisering protokoll med 8 uker vinterstimuli (6 timer lys, 6°C) med påfølgende 6 uker med på 24 timer lys og 10°C. Fisken var smoltifisert og osmoregulerte godt ved starten av forsøket (Jenssen, 2020).

Resultatene i Tabell 5 viser en signifikant forskjell i gonadosomatisk indeks mellom K og S både hos hann- og hunnfisk. Hos KM er GSI om lag det dobbelte av SM, mens hos KF er GSI

rundt det femdobbelte av det en finner hos SF. Forskjellen er signifikant og GSIen indikerer et bortfall av kjønnsceller hos den sterile fisken for begge kjønn. Tidligere studier viser at bortfall av kimceller, bekreftet både molekylært og histologisk (figur 2, materialer og metoder), resulterer i en GSI hos begge kjønn slik som det ble observert i dette forsøket (H. Tveiten pers. med.). I en annen del av forsøket ble bortfallet av kjønnscellelinjen undersøkt ved å se på genuttrykk av kjønnscellemarkørene (*Dnd* og *Vasa*) (Raz, 2003). Manglende uttrykk av *Dnd* og *Vasa* i gonader hos både hann og hunnfisk i sterilgruppen underbygger oppfatningen om at den undersøkte fisken var uten kjønnsceller.

Av totalt 247 makroskopiske observasjoner av gonadene ved T₀, T₂ og T₂₄, var det visuelle tegn på begynnende modning hos 30 individer av KM, men om man ser på GSI ut i fra Melo et al. (2014) beskrivelse, er det 41 KM med en GSI over 0,5. Alle individene fra kontroll hannfisk blir som nevnt i resultatdelen referert som KM, da det ikke var noen statistisk «power» i så få samplede individer med registrert kjønnsmodning. De enkeltindividene som ble samlet til blodprøve og organuttak med begynnende kjønnsmodning, hadde ingen signifikant forskjell fra KM i noen av de undersøkte parameterne, bortsett fra 2 tilfeller ved T₀ og et fra T₂₄ hvor plasma kortisol var signifikant forskjellig fra KMU og SM. I tilfelle kjønnsmodning er det flere studier som beskriver hvordan dette kan ha negative effekter på fisken, hvor Fjelldal et al. (2018) og Oppedal et al. (2003) refererer til en negativ effekt på osmoregulering, samtidig som Fuzzen et al. (2011) og Tveiten et al. (2010) beskriver mulige effekter på HPI-aksen under kjønnsmodning. Datagrunnlaget i dette forsøket ble for lite til å konkludere noe med hensyn på virkningsgrad av kjønnsmodning under stress.

Kondisjonsfaktoren i atlantisk laks er i flere studier funnet til å kunne variere avhengig av årstid og status (smolt/kjønnsmodning) (Bolger & Connolly, 1989; Nash et al., 2006), med høyere kondisjonsfaktor om sommeren/høsten når vannet er varmet og veksten stor, sammenlignet vinter/vår (Juell et al., 1994). Fisk med påvist kjønnsmodning ga uttrykk i høyere kondisjonsfaktor og økt vekt blant KMM noe som er forventet (Bolger & Connolly, 1989). Kondisjonsfaktoren var 1,4 for KMM og signifikant høyere enn KMU og KF på 1,2 og h.h.v S med 1,3. Etter T₀ var ikke kondisjonsfaktoren for S signifikant forskjellig fra K.

En kondisjonsfaktor under 0,9 er en indikasjon på avmagret fisk (Noble et al., 2018; Stien et al., 2013). Laks kan bli avmagret av ulike grunner som sykdom (Hjeltnes et al., 2016), ufullstendig smoltifisering (Heggberget et al., 1992), lakselus (Tveiten et al., 2010) og stress (Tort, 2010). I et studiet av Vindas et al. (2016) ble det oppdaget at hjernes serotoninproduksjon

er forhøyet i utmagret fisk noe som fører til at fisken ikke responderer på ytterligere stress. Videre mener Vindas et al. (2016) at dette indikerer en depresjonslignende tilstand hos fisken. Selv om kondisjonsfaktoren var signifikant forskjellig mellom SM og KM etter transport (T_2) og etter sjøvannseksponering (T_{24}) er det ingen studier som påpeker at disse verdiene skal gi utslag på dårligere evne til stresshåndtering. Som nevnt over er Bolger og Connolly (1989) beskrivelse av varierende kondisjonsfaktor som følge av temperatur, årstid og status en faktor å ta i betraktning hvor 1,6 ofte er å finne i slakteklar fisk og en reduksjon mot 1,2 i smoltifiseringsprosessen.

4.2 Kortisol

Oppdrettsfisk blir etter endt smoltifisering transportert fra settefiskanlegg til matfiskproduksjon på hav via brønnbåt. Dette er en av de største utfordringene laksen utsettes for gjennom sin livssyklus. Transportetappen varierer i lengde avhengig av avstand til oppdrettsanlegget og med dette også varigheten av stressoren. En god evne til å håndtere denne utfordringen er med andre ord viktig for å lykkes med et liv i sjø. En slik etappe ble simulert i dette forsøket hvor T_0 var pre-stresset fisk, T_2 var selve transporten og T_{24} var etter sjøvannseksponering.

Målet med forsøket var å se på effekten av ulike typer stressbehandling med hensyn til plasma kortisol hos steril og kontroll fisk. Stress skulle påføres i form av en simulert transport påfølgende av et utsett på sjø, lik det som skjer ved et vanlig smoltutsett. Pre-stresset (T_0) plasma kortisol ble målt før oppstart av forsøket og lå innenfor hva man betegner som normalt hvilenivå hos smoltifiserende laksefisk (Iversen & Eliassen, 2009; McCormick et al., 2007), gitt fjerning av «uteliggerne» replikat K3 og S3.

Det kunne se ut som det var en sammenheng mellom kar-plassering og tidspunkt for uttak med hensyn på kortisolnivå. Kar plassert lengst inn i rommet (figur 3) hadde totalt sett et høyere plasma kortisol nivå og ble samlet dagen etter kar 1-3. I perioden forsøket pågikk ble strømmen brutt mellom uttakene fra T_0 , noe som trolig har påført fisken stress (Oppedal et al., 2003). De økte plasma kortisolnivåene kan være en påfølgende konsekvens av strømburddet, men uforutsette faktorer som temperaturfall eller utilsiktet håndtering/forstyrrelser i rommet kan heller ikke utelukkes.

Som nevnt tidligere kan man ikke si noe om kjønnsmodning ved T_0 da det var for få individer i denne kategorien. For de to individene som ble målt var plasma kortisol på h.h.v 115,87 ng ml^{-1} og 53,21 ng ml^{-1} , hvor sistnevnte viste nivåer en kan forvente under smoltifisering (Arnesen

et al., 1998; Heggberget et al., 1992). Ut ifra resultatene pre-stress (T_0) er det liten til ingen forskjell mellom kortisolnivåene hos S og K. Begge grupper har verdier ifølge Heggberget et al. (1992); McCormick et al. (2007) et kortisolnivå under det som kan forventes av smoltifiserende laksefisk.

Etter endt T_2 (transport) viste både S og K en signifikant økning i plasma kortisol som følge av en påført stressor, noe som indikerer en allostatisk belastning på fisken og en påfølgende primær stressrespons (Madaro et al., 2015; Wendelaar Bonga, 1997). Kortisolnivåene hos begge grupper var nesten 10x så høye sammenlignet med T_0 , men ingen signifikant forskjell ble registrert mellom S og K. Som nevnt innledningsvis er stressrespons en naturlig endokrin mekanisme som hjelper organismen med håndtering av en potensiell livstruende situasjon, og så lenge den er adaptiv har den evne til å gjenopprette homeostase (Barton & Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). Utføringen av en slik simulert transport (T_2) er svært relevant sett i en kommersiell sammenheng, og gir en fin indikator på stresstoleransen hos steriltfisk sammenlignet mot kommersiell oppdrettsfisk. Flere studier påpeker de negative konsekvensene kortisolsekresjon kan påføre som blant annet sjøvannstoleranse (Tort, 2010), vekst (Mommsen et al., 1999), og overlevelse (Barton & Iwama, 1991; Mommsen et al., 1999; Wendelaar Bonga, 1997). Hos S og K var det ikke signifikant forskjell i plasma kortisol etter T_2 og verdiene er betraktet som forventet ved en slik behandling. Samtidig styrkes disse forventningene av flere tidligere studier som viser samme resultater (Erikson et al., 1997; Iversen et al., 2005; Sandodden et al., 2001).

Siste delen av forsøket var et simulert utsett på sjø referert som T_{24} . Her var resultatene noe mer interessante. I enkelte replikater var det store forskjell hos SF og KF, men ikke for SM og KM. Både SF og KF hadde et kar hvor kortisolnivået skilte seg ut fra resten. Siden dette ikke ga utslag på hannfisken i samme kar skyldes dette mest sannsynlig tilfeldig variasjon og/eller såkalte «high responders» (Iversen et al., 2005; Madaro et al., 2015; Tort, 2010). Flere studier påpeker muligheten for at stressrelaterte signaler, enten via alarm feromoner eller kortisol som frigjøres via gjellene, urin eller faeces kan overføres mellom individene (Ruane & Komen, 2003; Scott & Ellis, 2007). Siden kun ett kar i hver gruppe (og kun for hunnfisk) ble observert med forhøyede nivåer av plasma kortisol er det ikke usannsynlig at såkalte «high responders» påvirker plasma kortisol hos resten av fisken i karet.

En stressrespons er som nevnt tidligere naturlig, og i utgangspunktet adaptiv så lenge stressoren er midlertidig og ikke vedvarende. Steril og kontroll viser signifikant reduksjon i plasma kortisol etter T_{24} , hvor observasjonene viste signifikant lavere plasma kortisol for steril- kontra

kontrollgruppen (figur 6A, B). Steril hannfisk (SM) var den fisken med lavest plasma kortisol både mellom kjønn og gruppe. Siden sterilfisken (SM og SF) hadde signifikant lavere plasma kortisol etter T₂₄ sammenlignet med kontrollfisken (KM og KF), kan det se ut til at et bortfall av kjønnsceller ikke fratår fisken evne til å håndtere stress etter sjøvannseksponering, men kanskje styrker den. Om dette skyldes en manglende evne til interaksjon/integrering av fysiologiske signaler mellom HPI og HPG-aksen gjenstår å se. Påfølgende funn har som nevnt tidligere vist at sirkulerende 11KT (Tveiten et al., 2010) og estradiol-17 β viser mulig hemmende effekt på HPI-aksen (Fuzzen et al., 2011). I et forsøk av Kleppe et al. (2017) ble det sett på pre-pubertale interaksjoner/effekter av manglende kjønnsceller mellom HPI og HPG-aksene. Hvor det ble observert at ingen KFC-fisk havnet i «puberteten», hvorav 66,7 % av hannene og 30% av endte opp som juvenil fisk (Kleppe et al., 2017). Her ble det vist for første gang at kjønnscellene er nødvendig for å aktivere somatiske steroideproduserende celler under puberteten, hvor blant annet manglende oppregulert syntese av kjønnssteroider hos GCF hann- og hunnfisk (KFC), var reflektert i lave eller ikke målbare nivåer av plasma kjønnssteroider (11KT, estradiol-17 β og testosteron) (Kleppe et al., 2017). Ytterligere positive/negative effekter hos sterilfisken kan ikke utelukkes og er fortsatt ukjent, men med hensyn på sirkulerende plasma kortisol i etterkant av sjøvannseksponering vil en laks uten kjønnsceller kunne respondere og tolerere stress på tilsvarende måte som vanlig fertil fisk. Videre tyder resultatene fra osmolalitet og klorid på at både (S og K) hadde gode smoltegenskaper etter T₂₄ (Björnsson et al., 2011; Heggberget et al., 1992; McCormick, 2011). I en annen del av forsøket «Salmosterile» ble smoltifisering utført på sterilfisken gjennom flere uttak som pågikk over 5-6 måneder (T₁, T₂ og T₃) (Jenssen, 2020). Både kontroll og sterilfisken etablert tegn på smoltifisering allerede ved T₁, noe som er flere måneder før forsøkstart T₀ (tilsvarende T₃ i smoltforsøket) (Jenssen, 2020). Nivåene av plasma kortisol etter sjøvannseksponering (T₂₄) underbygger evnen til god hypoosmotisk regulering både for S og K og er innenfor det som kan forventes av smoltifiserende laksefisk (Arnesen et al., 1998; Heggberget et al., 1992; Jenssen, 2020).

4.3 Plasma klorid og osmolalitet

Gjennomsnittlig plasma klorid og osmolalitet for S viser ingen signifikant forskjell fra K, der begge gruppene viste god hyperosmotisk evne pre-stress (T₀). Begge nivåer i plasma ligger innenfor det som blir beskrevet som forventet i en smoltifiserende laksefisk (Arnesen et al., 1998; Heggberget et al., 1992; Jenssen, 2020). Ut ifra resultatene Pre-stress (T₀) var det ingen indikasjon på dårligere hyperosmotisk evne hos sterilfisken.

Simuleringen av transport (T_2) ble utført med ferskvann selv om dette ikke er helt likt transport med brønnbåt, hvor det blir brukt brakkvann/sjøvann (Iversen et al., 2005). Observasjoner viser en signifikant reduksjon i plasma klorid for sterilfisken etter T_2 , men ikke for kontrollfisken (figur 7A, B). Dårligere hyperosmotisk regulering som følge av håving og transport har vist å forårsake alvorlige fysiologiske stressresponser hos anadrome laksearter (Erikson et al., 1997; Finstad & Iversen, 1996; Iversen & Eliassen, 2009; Iversen et al., 2005). Primære og sekundære fysiologiske stressresponser som skjer under påvirkning av ulike stressorer medfører bl.a. en økning i plasmakortisol konsentrasjonen og hjelper til å bestemme «graden» av stress hos fisken (Madaro et al., 2015; Sandodden et al., 2001; Wendelaar Bonga, 1997). Det var ingen signifikant forskjell i plasma klorid mellom S og K etter T_2 og heller ikke ingen signifikant forskjell i plasma kortisol. I tillegg ble det observert av Finstad og Iversen (1996) at plasma klorid var på mellom 110 og 119 ng ml⁻¹ etter transport (T_2), noe som indikerer at fisken mister sin evne til å osmoregulerte i sjøvann. Dette er signifikant lavere enn det som ble observert hos S og K etter T_2 (figur 7A og B). Samtidig styrker det antagelsen om at S og K i dette forsøket håndterer transportetappen godt, hvor fisken på samme tid klarer å opprettholde evnen til osmoregulering i sjøvann (Arnesen et al., 1998; Heggberget et al., 1992). Årsaken til variasjon mellom T_0 og T_2 for S og K skyldes trolig naturlig variasjon mellom individene pre-stress, da nivåene etter T_2 var tilnærmet lik. Det var heller ingen signifikant endring i plasma osmolalitet etter T_2 for S og K (figur 8A, B). Arnesen et al. (1998); McCormick & Saunders (1987) viser til at fisk vil, uthenging av salinitet i miljøet rundt forsøke å opprettholde en osmolalitet mellom 290 og 340 ng ml⁻¹ og har typiske nivåer i ferskvann på rundt 320 ng ml⁻¹. Etter T_2 kan en med trygghet si basert disse resultatene at sterilfisken osmoregulerte like godt som fertilfisken etter en påført stressor.

Etter siste uttak ved endt sjøvannseksponering (T_{24}) økte plasma klorid signifikant sammenlignet med uttaket fra T_2 for S og K. Begge gruppene viste en god evne til å håndtere overgangen fra ferskvann til sjøvann. Verdier av plasma klorid mellom 140 og 145 ng ml⁻¹ tyder på god evne til hypoosmotisk regulering og blir beskrevet av flere (Arnesen et al., 1998; Fjelldal et al., 2018; Heggberget et al., 1992; Jenssen, 2020; McCormick & Saunders, 1987) som nivåer en kan forvente ved overgang fra ferskvann til sjøvann. Osmolalitet viste ingen signifikant forskjell mellom S og K, og resultatene fra plasma kortisol etter sjøvannseksponering (T_{24}) (figur 6A, B) underbygger antagelsen om god hypoosmotisk evne.

4.4 Genuttrykk i HPI-aksen

Steril- og kontrollfisk hadde ved T_0 en kortisol konsentrasjon på h.h.v $22,5 \text{ ng ml}^{-1} \pm 2,9 \text{ ng ml}^{-1}$ og $19,9 \text{ ng ml}^{-1} \pm 3,0 \text{ ng ml}^{-1}$ og viser til et basalnivå for ustresset fisk (Baker & Vynne, 2014; Fevolden et al., 1991; Mommsen et al., 1999). For *crfla* og *crflb* uttrykt i hypothalamus ved T_0 var uttrykket signifikant forskjellig for SM og KM. Hos KM var begge genene (*crfla* og *crflb*) høyere uttrykt enn hos SM. Mest sannsynlig skyldes dette naturlig variasjon mellom individene, da begge (S og K) faller innenfor det som betegnes som normale uttrykk under smoltifisering (Madaro et al., 2016). Basalnivået for kortisol hos SM og KM er som nevnt ikke forskjellig fra hverandre pre-stress (T_0) (figur 5) og forskjellen i uttrykk av *crfla* og *crflb* er derfor tenkelig å ikke være stressrelatert. De økte nivåene av *crfla* og *crflb* skyldes kanskje det som Madaro et al. (2016) beskriver som naturlige endringer i POA (preoptic area) i hypothalamus under smoltifiseringprosessen, hvor økt aktivitet av CRF skyldes endring i fotoperiode i form av økt daglengde mot våren. For SF og KF var det ingen signifikant forskjell mellom uttrykkene i hypothalamus og stemmer overens med det som blir beskrevet over. Med andre ord trenger ikke økte nivåer av *crfla* og *crflb* være relatert til stress under en smoltifiseringsprosess, når fisken ellers er i en tilsynelatende ustresset tilstand.

Ingen signifikante forskjeller ble målt av uttrykk *pomca* og *pomcb* mellom S og K etter T_0 og stemmer for øvrig med verdier presentert på kortisol pre-stress (figur 5). Som nevnt innledningsvis er POMC en precursor for ACTH som via sine reseptorer i hodenyren stimulerer *mc2r* til å sekretere kortisol (Wendelaar Bonga, 1997). Under pre-stress (T_0) er det derfor ikke forventet å se en oppregulering av POMC for S og K (Alderman et al., 2012; Madaro et al., 2016; Nardocci et al., 2014). Det skal nevnes at de signifikant økte nivåene av *crfla* og *crflb* fra T_0 hos KM, ikke nødvendigvis vil reflekteres gjennom POMC direkte, men heller via eksempelvis endring i mengden av CRF-reseptorer i hypofysen (Pohl et al., 2001). Dette sammenfaller godt med funnene til Madaro et al. (2016) som beskriver at de økte nivåene av CRF har en mulig forbindelse med smoltifiserende laksefisk og dens reaksjon på endring i fotoperiode.

I det interrenale vevet i hodenyren kommer effekten av kortisol til uttrykk via oppregulert nivåer av *gr1*, *gr2* og *mc2r* (Teles et al., 2013). Etter T_0 var ingen av disse genene uttrykt forskjellig mellom S og K. Med hensyn til kortisol pre-stress er det heller ikke her forventet en oppregulering av disse genene. Igjen sammenfaller resultatene godt med funnene gjort av Madaro et al. (2016) hvor GR er mindre aktiv etter anadrom smolt oppnår sjøvannstoleranse,

noe fisken allerede viste tegn til i ved T₁ i en annen del av forsøket «Salmosterile» utført av Jenssen (2020).

Som nevnt tidligere ble det observert replikate forskjeller for både kortisol og genuttrykk i kar S3 og K3 ved T₀ for SF og KF. Verdiene for disse parameterne korrelerer med hverandre og viser en klar positiv sammenheng mellom plasma kortisol og uttrykk av *11bhsd2* i dette forsøket (Alderman et al., 2012; Nardocci et al., 2014; Robinson et al., 2019). Etter fjerning av disse replikatene er uttrykket for *11bhsd2* som forventet ikke spesielt uttrykt ved T₀ da oppgaven til enzymet blant annet er å omgjøre kortisol til inaktivt kortison. (Wendelaar Bonga, 1997).

Etter T₂₄ hadde fisken stått på sjøvann i 23 timer. *Crfla* og *crflb* hadde en liten, ikke signifikant, økning i uttrykk for SM med noe mer markant oppregulering for KM, hvor *crflb* hadde en signifikant oppregulering fra T₀. Som nevnt tidligere kan forskjellen i *crflb* skyldes pre/pubertal interaksjoner/effekter av manglende kjønnsceller, hvor KFC reflekterte i lave eller ikke målbare nivåer av plasma kjønnssteroider (11KT, estradiol-17 β og testosteron) (Kleppe et al., 2017). Fuzzen et al. (2011) viser til potensielle effekter av 11KT og andre kjønnssteroider på HPI-aksen, hvor disse kan ha en form for feedback loop til CRF. Siden kortisolnivåene også var signifikant høyere hos KM, kan dette indikere en slik interaksjon. Overordnede effekter på sterilitet (SM og KF) ble ikke observert og sterilfisken ser tilsynelatende ut til å ha samme uttrykk i hypothalamus som fertilfisken (K).

Uttrykk av *pomca* og *pomcb* i hypofysen som følge av forhøyede nivåer av *crfla* og *crflb* ga ingen utslag hos KM, og som nevnt tidligere trenger ikke endringer i uttrykk av POMC nødvendigvis å reflekteres i endret uttrykk av CRF (Pohl et al., 2001). I hodenyren var den ingen signifikant endring i uttrykk av *gr1*, *gr2* eller *mc2r* mellom T₀ og T₂₄ mellom S og K, og som nevnt tidligere viser GR en mindre aktivitet etter anadrom smolt oppnår sjøvannstoleranse (Madaro et al., 2016). Interessant nok er det en signifikant oppregulering av *11bhsd2* for KM etter T₂₄. Oppreguleringen kan skyldes de økte nivåene av kortisol hos KM etter sjøvannseksposering (figur 6A), da *11bhsd2* fungerer som kortisolblokker (Alderman et al., 2012; Wendelaar Bonga, 1997). Et annen interessant funn ble observert i et lignende forsøk hvor basalnivå av *11bhsd2* viste seg å være oppregulert i post-smolt (Madaro et al., 2016). Da både S og K hadde et oppregulert uttrykk av *11bhsd2* etter T₂₄, kan dette implisere et naturlig økt nivå av genet hos smoltifiserende laksefisk. For øvrig var det ingen signifikant forskjell mellom SF og KF før (T₀) eller etter sjøvannseksposering (T₂₄), til tross signifikant forskjell i kortisol. Hadde det blitt testet for genuttrykk etter T₂ er det nok mer sannsynlig at en ville sett endringer i uttrykk av disse genene (Alderman et al., 2012; Björnsson et al., 2000; Nardocci et

al., 2014). SM viser ingen signifikante endringer på noen av genene nevnt ovenfor etter T₂₄. Dette kan tyde på en lite stresspåvirket fisk etter 23 timer sjøvannseksponering. Resultatene viser dessuten at sterilfisken i stor grad håndterer overgangen til sjøvann like godt om ikke bedre enn kontrollfisken, spesielt med hensyn på plasma kortisol (Boeuf et al., 1989; McCormick, 2011; Wendelaar Bonga, 1997). Videre viser resultatene på klorid og osmolalitet en god sjøvannstoleranse for begge testgrupper (S og K), og er lik resultatene i et tilsvarende forsøkt utført av Olsen et al. (1993) for smoltifiserende laksefisk. For SF og KF var det ingen signifikant forskjell i genuttrykk fra T₀ til T₂₄ i hypothalamus, hypofysen eller hodenyren.

5 Konklusjon

Om fjerning av kjønnscellene skal bli en steriliseringsmetode som kan brukes i kommersiell sammenheng, er det nødvendig å se på hvordan slike endringer påvirker andre produksjonsegenskaper som vektlegges av oppdrettsnæringen. En slik prosess er både tid- og pengekrevene, men helt nødvendig. På en slik måte kan man være sikre på at den sterile laksen har tilfredsstillende ytelse i kommersiell sammenheng.

Resultatene fra dette forsøket viser at det i praksis er små forskjeller i håndtering av stress og sjøvannstoleranse mellom S og K atlantisk laks. Bortfall av kjønnscelelinjen resulterte ikke i noen prestasjonshemmende effekt i forhold til stresstoleranse målt som endret genuttrykk i HPI-aksen, plasma kortisol og osmoregulatorisk kapasitet. Plasma kortisol gjennom hele forsøket viste tydelig tegn på at sterilfisken håndterte den simulerte transporten og påfølgende sjøvanstest like godt som (om ikke bedre enn) kontrollfisken. Den osmoregulatoriske kapasiteten (både hypoosmotisk og hyperosmotisk- siden transporten gikk i ferskvann) bekreftes ved analysering av plasma etter T₂₄, der klorid og osmolalitet for både S og K var innenfor normale verdier (Arnesen et al., 1998; Heggberget et al., 1992; McCormick & Saunders, 1987). Genuttrykk relatert til HPI-aksen viste varierende resultater i uttrykk av *crfla* og *crflb* i hypothalamus og *11bhsd2* i hodenyren mellom SM og KM. Tilsvarende forsøk viser til at disse uttrykkene kan være naturlig oppregulert under smoltifisering/post-smolt og at naturlig variasjon i oppregulering forekommer (Madaro et al., 2016). Samtidig beskriver både Fuzzen et al. (2011), Kleppe et al. (2017) og Tveiten et al. (2010) mulige effekter av kjønnssterioder på HPI-aksen hvor blant annet 11KT og estradiol-17 β virker hemmende på HPI-aksen. Kleppe et al. (2017) fant blant annet ut i sitt forsøk at pre/pubertal interaksjoner/effekter av manglende kjønnsceller, viste seg å reflektere i lave eller ikke målbare nivåer av plasma kjønnssteroider (11KT, estradiol-17 β og testosteron).

Referanser

- Alderman, S. L., McGuire, A., Bernier, N. J. & Vijayan, M. M. (2012). Central and peripheral glucocorticoid receptors are involved in the plasma cortisol response to an acute stressor in rainbow trout. *General and comparative endocrinology*, 176(1), 79-85.
- Applied biosystems. (2010). *Relative Quantitation Using Comparative CT Getting Started Guide*. <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-instruments/7500-fast-real-time-pcr-system.html>: ThermoFisher Scientific.
- Arends, R., Mancera, J., Munoz, J., Bonga, S. W. & Flik, G. (1999). The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology*, 163(1), 149.
- 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(1-4), 351-367.
- Baker, M. & Vynne, C. (2014). Cortisol profiles in sockeye salmon: sample bias and baseline values at migration, maturation, spawning, and senescence. *Fisheries Research*, 154, 38-43.
- Barton, B. A. & Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of fish diseases*, 1, 3-26.
- Benfey, T. J. & Sutterlin, A. M. (1984). Growth and gonadal development in triploid landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41(9), 1387-1392.
- Björnsson, B. T., Hemre, G.-I., Bjørnevik, M. & Hansen, T. (2000). Photoperiod regulation of plasma growth hormone levels during induced smoltification of underyearling Atlantic salmon. *General and comparative endocrinology*, 119(1), 17-25.
- Björnsson, B. T., Stefansson, S. O. & McCormick, S. D. (2011). Environmental endocrinology of salmon smoltification. *General and comparative endocrinology*, 170(2), 290-298.
- Boeuf, G., Le Bail, P.-Y. & Prunet, P. (1989). Growth hormone and thyroid hormones during Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolting, and after transfer to seawater. *Aquaculture*, 82(1-4), 257-268.
- Bolger, T. & Connolly, P. (1989). The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. *Journal of Fish Biology*, 34(2), 171-182.
- Chellakooty, M., Vangsgaard, K., Larsen, T., Scheike, T., Falck-Larsen, J., Legarth, J., ... Juul, A. (2004). A longitudinal study of intrauterine growth and the placental growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis in maternal circulation: association between placental GH and fetal growth. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(1), 384-391.
- Daughaday, W. H. (1959). Steroid protein interactions. *Physiological reviews*, 39(4), 885-902.
- de Souza, F. S., Bumashny, V. F., Low, M. J. & Rubinstein, M. (2005). Subfunctionalization of expression and peptide domains following the ancient duplication of the proopiomelanocortin gene in teleost fishes. *Molecular biology and evolution*, 22(12), 2417-2427.
- Dunkler, D., Plischke, M., Leffondré, K. & Heinze, G. (2014). Augmented backward elimination: a pragmatic and purposeful way to develop statistical models. *PLoS One*, 9(11), e113677.

- Erikson, U., Sigholt, T. & Seland, A. (1997). Handling stress and water quality during live transportation and slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 149(3-4), 243-252.
- Extavour, C. G. & Akam, M. (2003). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*, 130(24), 5869-5884.
- Felleskatalogen. (2020). Benzoak vet. ACD Pharmaceuticals AS. Hentet fra <https://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/benzoak-vet-acd-pharmaceuticals-as-546770>
- Fevolden, S. E., Refstie, T. & Røed, K. H. (1991). Selection for high and low cortisol stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 95(1-2), 53-65.
- Finstad, B. & Iversen, M. (1996). Smoltifisering hos laks og sjøørret: effekt av ulike produksjonsregimer og transport. *NINA Oppdragsmelding*, 455, 1-16.
- Fjellidal, P. G., Schulz, R., Nilsen, T. O., Andersson, E., Norberg, B. & Hansen, T. J. (2018). Sexual maturation and smoltification in domesticated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)—is there a developmental conflict? *Physiological Reports*, 6(17), e13809.
- Fraser, T. W., Fjellidal, P. G., Hansen, T. & Mayer, I. (2012). Welfare considerations of triploid fish. *Reviews in Fisheries Science*, 20(4), 192-211.
- Friars, G., Bailey, J. & O'Flynn, F. (1995). Applications of selection for multiple traits in cage-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 137(1-4), 213-217.
- Fujimoto, T., Nishimura, T., Goto-Kazeto, R., Kawakami, Y., Yamaha, E. & Arai, K. (2010). Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17211-17216.
- Fuzzen, M. L., Bernier, N. J. & Van Der, K. G. (2011). Stress and reproduction. I *Hormones and reproduction of vertebrates* (s. 103-117). Elsevier.
- Girden, E. R. (1992). *ANOVA: Repeated measures* Sage.
- Glover, K. (2018). Naturen prøver å stå imot genetisk påvirkning. Hentet fra <https://www.hi.no/hi/nyheter/2018/mars/genetisk-pavirkning-laks>
- Goto, R., Saito, T., Takeda, T., Fujimoto, T., Takagi, M., Arai, K. & Yamaha, E. (2012). Germ cells are not the primary factor for sexual fate determination in goldfish. *Developmental biology*, 370(1), 98-109.
- Hansen, T., Wargelius, A., Taranger, G. L. & Fjellidal, P. G. (2012). Oppdrett av steril fisk.
- Hashimoto, Y., Maegawa, S., Nagai, T., Yamaha, E., Suzuki, H., Yasuda, K. & Inoue, K. (2004). Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation. *Developmental biology*, 268(1), 152-161.
- Heggberget, T., Staurnes, M., Strand, R. & Husby, J. (1992). Smoltifisering hos laksefisk. *NINA forskningsrapport*, 31, 1-42.
- Hillhouse, E. W. & Grammatopoulos, D. K. (2006). The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocrine reviews*, 27(3), 260-286.
- Hjeltnes, B., Walde, C., Bang Jensen, B. & Haukaas, A. (2016). Fiskehelserapporten 2015. *Veterinærinstituttets rapportserie*, (3-2016).
- Hong, N., Li, M., Yuan, Y., Wang, T., Yi, M., Xu, H., ... Hong, Y. (2016). Dnd is a critical specifier of primordial germ cells in the medaka fish. *Stem cell reports*, 6(3), 411-421.
- Hosteland, L. T. S. (2017). Dokumenterer ny teknologi for steril oppdrettsfisk. Hentet fra <https://www.kyst.no/article/dokumenterer-ny-teknologi-for-steril-oppdrettsfisk/>
- Hunt, S., Simpson, T. & Wright, R. (1982). Seasonal changes in the levels of 11-oxotestosterone and testosterone in the serum of male salmon, *Salmo salar* L., and

- their relationship to growth and maturation cycle. *Journal of Fish Biology*, 20(1), 105-119.
- Iversen, M. & Eliassen, R. A. (2009). The Effect of AQUI-S® Sedation on Primary, Secondary, and Tertiary Stress Responses during Salmon Smolt, *Salmo salar* L., Transport and Transfer to Sea. *Journal of the world aquaculture society*, 40(2), 216-225.
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R. S. & Eliassen, R. A. (2003). The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, 221(1-4), 549-566.
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R. S., Eliassen, R. A., Carlsen, K. T. & Evjen, T. (2005). Stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts during commercial well boat transports, and effects on survival after transfer to sea. *Aquaculture*, 243(1-4), 373-382.
- Jenssen, E. B. (2020). *Utvikling av smoltegenskaper og sjøvannstoleranse hos kjønnsellefri atlantisk laks (Salmo salar L.)* UiT The Arctic University of Norway.
- Juell, J. E., Fernö, A., Furevik, D. & Huse, I. (1994). Influence of hunger level and food availability on the spatial distribution of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in sea cages. *Aquaculture Research*, 25(4), 439-451.
- Kedde, M., Strasser, M. J., Boldajipour, B., Vrieling, J. A. O., Slanchev, K., le Sage, C., ... Ørom, U. A. (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell*, 131(7), 1273-1286.
- Kleppe, L., Andersson, E., Skaftnesmo, K. O., Edvardsen, R. B., Fjellidal, P. G., Norberg, B., ... Wargelius, A. (2017). Sex steroid production associated with puberty is absent in germ cell-free salmon. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- Kubista, M. (2007). The prime technique real-time PCR data analysis. *GIT Laboratory Journal Europe*, 11(9/10), 33.
- Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B. & Raz, E. (2001). A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes & development*, 15(21), 2877-2885.
- Lee, S., Katayama, N. & Yoshizaki, G. (2016). Generation of juvenile rainbow trout derived from cryopreserved whole ovaries by intraperitoneal transplantation of ovarian germ cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 478(3), 1478-1483.
- Liu, W., Li, S.-Z., Li, Z., Wang, Y., Li, X.-Y., Zhong, J.-X., ... Gui, J.-F. (2015). Complete depletion of primordial germ cells in an all-female fish leads to sex-biased gene expression alteration and sterile all-male occurrence. *BMC genomics*, 16(1), 971.
- Lock, E. F., Ziemiecki, R., Marron, J. & Dittmer, D. P. (2010). Efficiency clustering for low-density microarrays and its application to QPCR. *BMC bioinformatics*, 11(1), 386.
- Madaro, A., Olsen, R. E., Kristiansen, T. S., Ebbesson, L. O., Flik, G. & Gorissen, M. (2016). A comparative study of the response to repeated chasing stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr and post-smolts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 192, 7-16.
- Madaro, A., Olsen, R. E., Kristiansen, T. S., Ebbesson, L. O., Nilsen, T. O., Flik, G. & Gorissen, M. (2015). Stress in Atlantic salmon: response to unpredictable chronic stress. *Journal of Experimental Biology*, 218(16), 2538-2550.
- Maeda, K.-i. & Tsukamura, H. (2006). The impact of stress on reproduction: are glucocorticoids inhibitory or protective to gonadotropin secretion? *Endocrinology*, 147(3), 1085-1086.
- Maxime, V. (2008). The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish and Fisheries*, 9(1), 67-78.

- McClure, C. A., Hammell, K. L., Moore, M., Dohoo, I. R. & Burnley, H. (2007). Risk factors for early sexual maturation in Atlantic salmon in seawater farms in New Brunswick and Nova Scotia, Canada. *Aquaculture*, 272(1-4), 370-379.
- McCormick, S. D. (2011). The hormonal control of osmoregulation in teleost fish. *Life Sciences*, 1, 1466-1473.
- McCormick, S. D. & Saunders, R. L. (1987). Preparatory physiological adaptations for marine life of salmonids: osmoregulation, growth, and metabolism. *Am. Fish. Soc. Symp* (s. 1-229).
- McCormick, S. D., Shrimpton, J. M., 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(2-3), 337-344.
- Melo, M. C., Andersson, E., Fjelldal, P. G., Bogerd, J., França, L. R., Taranger, G. L. & Schulz, R. W. (2014). Salinity and photoperiod modulate pubertal development in Atlantic. *Journal of Endocrinology*, 220, 1-15.
- Michelsen, F. A., Klebert, P., Broch, O. J. & Alver, M. O. (2019). Impacts of fish farm structures with biomass on water currents: A case study from Frøya. *Journal of Sea Research*, 154, 101806.
- Miller Jr, R. G. (1997). *Beyond ANOVA: basics of applied statistics* CRC press.
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M. & Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9(3), 211-268.
- Nardocci, G., Navarro, C., Cortés, P. P., Imarai, M., Montoya, M., Valenzuela, B., ... Fernández, R. (2014). Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(2), 531-538.
- Nash, R. D., Valencia, A. H. & Geffen, A. J. (2006). The origin of Fulton's condition factor—setting the record straight. *Fisheries*, 31(5), 236-238.
- Nicola J. Barson, T. A., Kjetil Hindar, Matthew Baranski, Geir H. Bolstad, Peder Fiske, Céleste Jacq, Arne J. Jensen, Susan E. Johnston, Sten Karlsson, Matthew Kent, Thomas Moen, Eero Niemelä, Torfinn Nome, Tor F. Næsje, Panu Orell, Atso Romakkaniemi, Harald Sægvog, Kurt Urdal, Jaakko Erkinaro, Sigbjørn Lien & Craig R. Primmer (2015). Sex-dependent dominance at a single locus maintains variation in age at maturity in salmon. Hentet fra <https://www.nature.com/articles/nature16062>
- Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H. & Turnbull, J. F. (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare.
- NUGENT, C. A., MAYES, D. M. & Morrett, S. (1966). Plasma corticosteroids determined by use of corticosteroid-binding globulin and dextran-coated charcoal. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 26(10), 1116-1122.
- Oppedal, F., Taranger, G. L. & Hansen, T. (2003). Growth performance and sexual maturation in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater tanks exposed to continuous light or simulated natural photoperiod. *Aquaculture*, 215(1-4), 145-162.
- Oyola, M. G. & Handa, R. J. (2017). Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress*, 20(5), 476-494.
- Pauli, A., Montague, T. G., Lennox, K. A., Behlke, M. A. & Schier, A. F. (2015). Antisense oligonucleotide-mediated transcript knockdown in zebrafish. *PLoS One*, 10(10).
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.

- Pike, K. (1993). Multinational Companies and genetic resources. *WORLD BANK TECHNICAL PAPER*, 51-51.
- Pohl, S., Darlison, M. G., Clarke, W. C., Lederis, K. & Richter, D. (2001). Cloning and functional pharmacology of two corticotropin-releasing factor receptors from a teleost fish. *European journal of pharmacology*, 430(2-3), 193-202.
- Pottinger, T., Carrick, T., Hughes, S. & Balm, P. (1996). Testosterone, 11-ketotestosterone, and estradiol-17 β modify baseline and stress-induced interrenal and corticotropic activity in trout. *General and comparative endocrinology*, 104(3), 284-295.
- Pšenička, M., Saito, T., Linhartová, Z. & Gazo, I. (2015). Isolation and transplantation of sturgeon early-stage germ cells. *Theriogenology*, 83(6), 1085-1092.
- Raz, E. (2003). Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nature Reviews Genetics*, 4(9), 690-700.
- Robinson, N. A., Johnsen, H., Moghadam, H., Andersen, Ø. & Tveiten, H. (2019). Early developmental stress affects subsequent gene expression response to an acute stress in Atlantic salmon: An approach for creating robust fish for aquaculture? *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 9(5), 1597-1611.
- Ruane, N. M. & Komen, H. (2003). Measuring cortisol in the water as an indicator of stress caused by increased loading density in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 218(1-4), 685-693.
- SalmoBreed. (2018). Er det behov for genetiske tilpasninger for landbasert oppdrett og RAS-systemer? Hentet fra <https://www.kyst.no/advertisement/er-det-behov-for-genetiske-tilpasninger-for-landbasert-oppdrett-og-ras-systemer/>
- Sandodden, R., Finstad, B. & Iversen, M. (2001). Transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): anaesthesia and recovery. *Aquaculture Research*, 32(2), 87-90.
- Schreck, C. B. (2010). Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 549-556.
- Schreck, C. B., Contreras-Sanchez, W. & Fitzpatrick, M. S. (2001). Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. I *Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture* (s. 3-24). Elsevier.
- Schulz, R. (1985). Measurement of five androgens in the blood of immature and maturing male rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Steroids*, 46(2-3), 717-726.
- science, T. (2020). Fast SYBR™ Green Master Mix. Hentet fra <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4385612#/4385612>
- Scott, A. P. & Ellis, T. (2007). Measurement of fish steroids in water—a review. *General and comparative endocrinology*, 153(1-3), 392-400.
- Selye, H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *The journal of clinical endocrinology*, 6(2), 117-230.
- Silverstein, J. T., Shearer, K. D., Dickhoff, W. W. & Plisetskaya, E. M. (1999). Regulation of nutrient intake and energy balance in salmon. *Aquaculture*, 177(1-4), 161-169.
- Sjømatråd, N. (2019). Sjømateksport for 99 milliarder i 2018. Hentet fra <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sjomateksport-for-99-milliarder-i-2018/>
- Škugor, A., Tveiten, H., Krasnov, A. & Andersen, Ø. (2014). Knockdown of the germ cell factor Dead end induces multiple transcriptional changes in Atlantic cod (*Gadus morhua*) hatchlings. *Animal reproduction science*, 144(3-4), 129-137.
- Slanchev, K., Stebler, J., de la Cueva-Méndez, G. & Raz, E. (2005). Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(11), 4074-4079.
- Solomon, M. B. & Herman, J. P. (2009). Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness. *Physiology & behavior*, 97(2), 250-258.
- SSB. (2019). Akvakultur. Hentet fra <https://www.ssb.no/fiskeoppdrett>

- Stien, L. H., Bracke, M. B., Folkedal, O., Nilsson, J., Oppedal, F., Torgersen, T., ... Øverli, Ø. (2013). Salmon Welfare Index Model (SWIM 1.0): a semantic model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon: review of the selected welfare indicators and model presentation. *Reviews in Aquaculture*, 5(1), 33-57.
- Storset, A., Strand, C., Wetten, M., Kjøglum, S. & Ramstad, A. (2007). Response to selection for resistance against infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 272, S62-S68.
- Svåsand, T., Crosetti, D., García-Vázquez, E. & Verspoor, E. (2007). Genetic impact of aquaculture activities on native populations. *Genimpact final scientific report (EU contract n. RICA-CT-2005-022802)*.
- Tabachnick, B. G. & Fidell, L. S. (2007). *Experimental designs using ANOVA* Thomson/Brooks/Cole Belmont, CA.
- Teles, M., Tridico, R., Callol, A., Fierro-Castro, C. & Tort, L. (2013). Differential expression of the corticosteroid receptors GR1, GR2 and MR in rainbow trout organs with slow release cortisol implants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 164(3), 506-511.
- Tomlinson, J. W., Walker, E. A., Bujalska, I. J., Draper, N., Lavery, G. G., Cooper, M. S., ... Stewart, P. M. (2004). 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocrine reviews*, 25(5), 831-866.
- Tort, L. (2010). Stress in farmed fish. Its consequences in health and performance. *Recent Advances in Aquaculture Research. Transworld Research Network, Trivandrum, Kerala, India. ISBN, 978-981*.
- Tveiten, H., Bjørn, P., Johnsen, H., Finstad, B. & McKinley, R. (2010). Effects of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* on temporal changes in cortisol, sex steroids, growth and reproductive investment in Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *Journal of Fish Biology*, 76(10), 2318-2341.
- Tveiten, H., Mayer, I., Johnsen, H. & Jobling, M. (1998). Sex steroids, growth and condition of Arctic charr broodstock during an annual cycle. *Journal of Fish Biology*, 53(4), 714-727.
- Van Weerd, J. & Komen, J. (1998). The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 120(1), 107-112.
- Vindas, M. A., Johansen, I. B., Folkedal, O., Höglund, E., Gorissen, M., Flik, G., ... Øverli, Ø. (2016). Brain serotonergic activation in growth-stunted farmed salmon: adaption versus pathology. *Royal Society open science*, 3(5), 160030.
- Wargelius, A., Leininger, S., Skaftnesmo, K. O., Kleppe, L., Andersson, E., Taranger, G. L., ... Edvardsen, R. B. (2016). Dnd knockout ablates germ cells and demonstrates germ cell independent sex differentiation in Atlantic salmon. *Scientific reports*, 6(1), 1-8.
- Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., ... Raz, E. (2003). Dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Current Biology*, 13(16), 1429-1434.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77(3), 591-625.
- Wong, T.-T. & Zohar, Y. (2015). Production of reproductively sterile fish: A mini-review of germ cell elimination technologies. *General and comparative endocrinology*, 221, 3-8.
- Yoshizaki, H., Ohba, Y., Kurokawa, K., Itoh, R. E., Nakamura, T., Mochizuki, N., ... Matsuda, M. (2003). Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *The Journal of cell biology*, 162(2), 223-232.

