



UiT Norges arktiske universitet

Fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi – Norges fiskerihøgskole

## **Lagring av ubefruktede egg fra Atlantisk laks (*Salmo Salar* L.)**

Effekter av mediasammensetning og lagringstid på uttrykk av maternale gener og embryooverlevelse

Magnus Øen

Masteroppgave i akvamedisin (60 stp.) September 2020





## Forord

Arbeidet som presenteres i denne mastergradsoppgaven ble utført ved Norges fiskerihøgskole, fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Universitetet i Tromsø - Norges arktiske universitet og stamfiskanlegget som driftes av Salmar Genetics AS i Reistad.

Planleggingsfasen startet høstsemesteret 2019 og varte frem til utførelse av eksperimentelt arbeid, som ble gjennomført i perioden oktober 2019 til desember 2019. Analytisk arbeid ble utført ved laboratoriene som tilhører gruppen for akvakultur og miljø, og varte gjennom perioden fra februar 2020 til mars 2020. Analytisk arbeid og skrivefasen ble gjennomført fra 15.mars og varte gjennom hele sommeren og ble avsluttet i løpet av september 2020.

Jeg ønsker først og fremst å takke min hovedveileder, **Helge Tveiten**, og min bi-veileder, **Helge K. Johnsen**, for at dere introduserte meg for denne oppgaven og ga meg muligheten til å være en del av et såpass fremtidsrettet prosjekt. Jeg sitter igjen med kunnskap og erfaring som vil gjøre meg bedre rustet for mitt kommende arbeidsliv. Døren har alltid vært åpen og dere har aldri feilet til å utvise engasjement og faglig kunnskap. Jeg setter stor pris på all hjelp og veiledning som har bekreftet at dere er i besittelse av eksepsjonell faglig kompetanse. Jeg vil også takke **Gøran Roland** og de andre ansatte ved Salmar Genetics As. Uten deres fasiliteter og samarbeid så ville ikke dette prosjektet ha vært gjennomførbart.

*I would also like to use this opportunity to express my gratitude towards my laboratory leader, **Dhivya Borra Thiyagarajan**, for your patience and support during my time at the laboratory. Without your help, support and knowledge this would have been so much more difficult. From the bottom of my heart, you have my sincere gratitude.*

Til mine medstudenter og venner fra Akvamedisin – jeg kommer til å savne dere alle! Dere har gitt meg mange gode stunder med latter, vennskap og gode minner som jeg kommer til å huske for resten av mitt voksne liv.

Tromsø, september 2020,

Magnus Øen.

## Sammendrag

Norge er i verdenstoppen når det kommer til produksjon av oppdrettslaks der det avsettes betydelige mengder med ressurser til produksjon av rogn. Stamfisk er utvalgte individer som verdsettes på bakgrunn av fiskens egenskaper. For en eggprodusent kan det være ønskelig å kombinere kjønnsceller fra spesifikke individer på bakgrunn av deres kombinasjonspotensial. Dette kan gjennomføres hvis stamfisk er tilstrekkelig klar for gyting, ved samme tidspunkt. Egg- og spermceller fra stamfisk holder imidlertid god kvalitet i en forholdsvis kort periode. Langtidslagring (dager) av ubefruktede egg vil kunne gi oppdretter en mulighet til å utvide perioden for å kunne kombinere gameter fra individer med ønskende egenskaper. Samtidig er det slik at ulike sykdomsagens kan overføres fra stamfisk til avkom via ovarievæske. Fjerning av ovarievæske, samtidig som egg kan lagres fram til at sykdomsstatus er avklart vil kunne hindre at slik smitte spres til andre deler av produksjonen. Hvordan sammensetning av ulike vaske- og lagringsmedier påvirker eggkvalitet over tid er derfor viktig å få undersøkt.

I dette forsøket ble egg fra atlantisk laks (*Salmo salar* L.) behandlet med fire forskjellige medier (1; Ovarievæske, 2; 0,9 % NaCl løsning, 3; Cortland løsning og 4; Cortland løsning uten kalsium) og lagret ved fire forskjellige lagringstider (0, 24, 48 og 96 timer). Formålet med oppgaven var å se på hvordan mediesammensetning og lagring over tid ville påvirke eggkvalitet. Eggkvalitet ble målt som overlevelse til 120 døgngader og til øyerognstadiet. En viktig del av oppgaven var å undersøke om eggkvalitet kunne relateres til uttrykk av maternale gener. Sammenheng mellom maternalt genuttrykk (mRNA i egg) og eggkvalitet ble undersøkt for fem ulike gener (IGF-2, IGF-3, Npm2, Zar11 og Cycklin B1a). Resultatene viste at ovarievæske gir det klart beste miljøet og ivaretar god eggkvalitet over tid (70 % overlevelse etter 96 timer lagring mot 83 % ved 0 timer). Alle medier hadde en relativ høy overlevelse (Ovarievæske; 83 %, NaCl; 64 %, Cortland; 86 % og Cortland uten kalsium; 66%), men der kvalitet gikk klart ned med økende lagringstid (24, 48 og 96 timer). Effekten av lagringstid var spesielt uttalt i egg lagret i NaCl- og Cortland løsning uten kalsium der lagring i 96 timer resulterte lav (2% og 16%) overlevelse. Uttrykk av maternale gener viste ingen klar relasjon til eggkvalitet. Lagring i NaCl løsningen gav gjennomgående det høyeste uttrykket for de fleste genene som ble undersøkt. Samtidig gav lagring i NaCl den klart dårligste eggkvaliteten. Om det finnes en molekylær mekanisme som kan forklare et eventuelt inverst forhold mellom maternalt genuttrykk og eggkvalitet er uklart.

## Forkortelser

%	Prosent	Npm2	Nucleoplasmin 2
g	gram	Zar1L	Zygote Arrest 1 Like
kg	kilogram	CDK	Cyclin-avhengig kinase
FSH	Follikelstimulerende hormon	MTF	Modning Fremmede faktor
LH	Luteiniserende hormon	°C	Grader celsius
Na <sup>+</sup>	Natrium	mg/l	milligram per liter
Cl <sup>-</sup>	Klor	L	Liter
K <sup>+</sup>	Kalium	OF	Ovarievæske
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium	F1-F8	Fisk 1 til Fisk 8
Ca <sup>2+</sup>	Kalsium	NaCl	Natriumklorid
mOsmol/kg <sup>-1</sup>	Milliosmol per kilo	Cort +	Cortland løsning
OF	Ovarievæske	Cort -	Cortland løsning uten Kalsium
H <sub>2</sub> O	Vann	CaCl <sub>2</sub>	Kalsiumklorid
mm	millimeter	mL	Milliliter
DNA	Deoksyribonukleinsyre	NFH	Norges fiskerihøgskole
RNA	Ribonukleinsyre	µl	Mikroliter
mRNA	Messenger RNA	rpm	Omdreingsstyrke
lncRNA	Lang-ikke kodende RNA	min	Minutt
miRNA	micro-RNA	sek	Sekund
MZT	Maternal zygotisk transisjon	nm	Nanometer
PCR	Polymerase kjede reaksjonen	≥	Større enn eller lik
cDNA	Komplementært DNA	>	Større enn
dsDNA	Dobbeltrådig DNA	ng	Nanogram
ssDNA	Enkeltrådig DNA	µM	Mikrometer
IGF	Insulinlignende vekstfaktor	RT-qPCR	Real time kvantitativ PCR
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	ANOVA	Variansanalyse
MAPK	Mitogen-aktivert protein kinase		

# Innholdsfortegnelse

Forord .....	III
Sammendrag .....	IV
Forkortelser .....	V
1. Introduksjon .....	1
1.1 Oppdrett av laks i Norge .....	1
1.2 Den nordatlantiske laksen .....	1
1.3 Laksens naturlige miljø .....	2
1.3.1 Det lotiske miljøet .....	2
1.3.2 Det marine miljøet.....	2
1.4 Reproduksjonsutviklingen hos atlantisk laks .....	2
1.4.1 Ovarievæske .....	3
1.4.2 Egg fra atlantisk laks .....	4
1.4.3 Maternal investering.....	4
1.4.4 Aktivering og tidlig utvikling.....	5
1.4.5 Eggkvalitet .....	7
1.5 RT-qPCR.....	7
1.5.1 Gen .....	7
1.5.2 Insulinlignende vekstfaktor .....	8
1.5.3 Nucleoplasmin 2.....	8
1.5.4 Zygote arrest 1 Like .....	8
1.5.5 Cyclin B1a.....	9
1.6 Formålet med oppgaven .....	10
2. Materialer og metoder .....	11
2.1 Forsøksfisk .....	11
2.2 Prøveuttak.....	11
2.3 Lagringsmedium.....	12

2.4 Lagringstidspunkt.....	12
2.5 Forsøksoppsett.....	13
2.5.1 Estimering av 250 egg.....	13
2.5.2 Lagringsbetingelser for ubefrukta egg .....	14
2.5.3 Egg for genuttrykk .....	14
2.5.4 Befruktning av egg.....	14
2.5.5 Oppbevaring og transport.....	16
2.6 Evaluering av eggkvalitetsdata.....	16
2.6.1 Befruktning.....	16
2.6.2 Beregning av overlevelse til 120 døgngader.....	16
2.6.3 Beregning av overlevelse til øyrerognstadiet .....	17
2.6.4 Databehandling av eggkvalitetsparametere.....	17
2.7 Analyser .....	17
2.7.1 RNA isolering fra egg .....	17
2.7.2 Nanodropp .....	18
2.7.3 DNase behandling .....	19
2.7.4 cDNA syntese.....	19
2.7.5 RT-qPCR.....	20
2.7.6 Primere .....	22
2.7.7 Statistikk og databehandling .....	23
3. Resultater.....	25
3.1 Eggaktivering (Befruktningsrate).....	25
3.2 Overlevelse til 120 døgngader .....	26
3.3 Overlevelse til øyerogn .....	28
3.4 IGF-2 .....	30
3.5 IGF-3 .....	32
3.6 NPM2 .....	33

3.7 Zar1L.....	35
3.8 Cyclin B1a.....	36
4. Diskusjon.....	39
4.1 Effekter av melkeopparbeiding på befruktning.....	40
4.2 Indikatorer på eggkvalitet.....	41
4.3 Effekter av lagring- og inkubasjonsbetingelser.....	41
4.4 Effekter av mediesammensetning og lagringstid på genuttrykk og eggkvalitet .....	42
5. Konklusjon .....	48



# 1. Introduksjon

## 1.1 Oppdrett av laks i Norge

Norge er en oppdrettsnasjon som har opplevd en eventyrlig vekst siden den første laksen ble slaktet i 1971. Eventyret startet tidlig på 60-tallet når brødrene Vik klarte gradvis å tilvenne regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss* W.) over til saltvann (Misund, 2019). Norske fjordsystemer har vist seg å gi gode oppvekstvilkår for oppdrettsfisken og er en av hovedgrunnene til at Norge eksporterte sjømat til en verdi av 107,3 milliarder norske kroner i 2019 (Sjømatrådet, 2020). Behovet for teknologi i oppdrett har ført til utvikling av en fremtidsrettet, nasjonal industri og etablering av lokalbaserte selskap som har kunnet spesialisere seg på ulike faser av fiskens livssyklus. Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) er den desidert viktigste arten og Norge produserer mer enn halvparten av den totale mengde oppdrettslaks (Misund, 2019). Produksjon av norsk oppdrettsfisk starter i et stamfiskanlegg, hvor kjønnsmodne stamfisk blir høstet for uttak av rogn og melke. Rogn fertiliseres og overføres til et settefiskanlegg, hvor eggene klekkes og startfôring av yngel settes i gang. Smolten overføres til et sjøbasert matfiskanlegg, hvor fisken fôres til slakteklar vekt (Havforskningsinstituttet, 2019b).

## 1.2 Den nordatlantiske laksen

Atlanterhavslaksen er en fiskeart som har sin naturlige utbredelse i tempererte- og subarktiske regioner i den nordlige delen av Atlanterhavet (Thorstad et al., 2011). Laksen tilhører laksefamilien *Salmonidae*, og har evnen til å veksle mellom et ferskvanns- og saltvannsbasert miljø. Dette er en evolusjonær tilpasningsevne og laksen kan derfor klassifiseres som en anadrom fiskeart (Vøllestad, 2019). Fisken vil klekkes og begynne sitt liv i ferskvann. I elva vil parren leve i opptil fem år og utviser en territorial adferd, med en bentisk livsstrategi. Som smolt vil laksen derimot etablere en stimende adferd og vandrer ut mot havet, hvor fisken som solitær er på næringssøk i ett til fire år (Vøllestad, 2019). Kjønnsmoden laks vender tilbake til det samme vassdraget der den selv ble klekket og gyter i perioden oktober-januar (Havforskningsinstituttet, 2019a). Nordlige populasjoner gyter gjerne tidligere enn populasjoner lenger sør, da eggets utvikling avhenger av vanntemperatur (Thorstad et al., 2011). Atlantisk laks legger demersale egg som klekkes den påfølgende våren (Rollinson et al., 2010).

## **1.3 Laksens naturlige miljø**

### **1.3.1 Det lotiske miljøet**

Rennende vann klassifiseres som et lotisk miljø og er det fordelaktige miljøet for gyting hos den atlantiske laksen. Rennende vann sørger for en kontinuerlig gjennomstrømming og dette opprettholder tilstrekkelig utveksling av gasser. Elver har en lavere primærproduksjon og dermed også en lavere biodiversitet. Dette fører til at laksen har færre konkurrenter, næringsgrunnlaget er mindre, men dette gjør også at predasjon er mindre sannsynlig.

Vannkjemien i et lotisk miljø har en lavere konsentrasjon av salter, hvor salt kun utgjør 0,0012 % av den totale vannmassen (Williams et al., 2014). De viktigste saltene i ferskvann er bikarbonat, kalsium, sulfat og silikon. Klor, magnesium og natrium finnes i lavere konsentrasjoner (Williams et al., 2014). Konsentrasjonen av salter er større i fisken, enn konsentrasjonen er i det omkringliggende miljøet. På grunn av passiv diffusjon står fisken i fare for å miste ioner til miljøet, men laksen har tilpasset seg til å opprettholde og aktivt ta opp ioner fra ferskvann (Vøllestad, 2019).

### **1.3.2 Det marine miljøet**

I Atlanterhavet har laksen optimal forutsetning for vekst, siden havområdet har høy biodiversitet med tilsvarende høy primærproduksjon. Atlantisk laks utsettes for høyere predasjon i det marine miljøet, men utvandring er fordelaktig på bakgrunn av høyere næringstilgang (Ratikainen, 2014). Saltvann inneholder 34,8 g salt per kg sjøvann.

Natriumklorid og magnesiumsulfat er de viktigste saltene, men det finnes mindre mengder med kalsium, kalium, brom, bor og jodid (Institutt for Biovitenskap, 2011). Konsentrasjonen av salter er høyere i det marine miljøet enn konsentrasjonen er hos fisken. Dette fører til at laksen vil ta opp salt fra miljøet, men arten har gjennomgått fysiologiske og morfologiske endringer gjennom en smoltifiseringsprosess. Smoltifisering gjør at laksen er fysiologisk tilpasset for aktiv utskillelse av overskuddssaltene (McCormick et al., 1998).

## **1.4 Reproduksjonsutviklingen hos atlantisk laks**

Den atlantiske laksen har en sesongbasert reproduksjonssyklus som gjennom en serie av fysiologiske prosesser fører til utvikling og modning av gameter. Reproduksjon trigges av endringer i fotoperiode (fungerer som en zeitgeber) som betraktes som den primære faktoren som styrer reproduksjonssyklusen (Johnsen, 2020). Reproduksjon kan deles inn i tre faser. En

periode etter gyting, hvor gonadene er små og opprettholdes i et hvilende stadium. En periode før gyting, hvor gonadene vokser i størrelse og starter å produsere gameter gjennom en prosess som kalles gametogenese. En gyte periode som stimulerer den endelig modning av gametene, hvor egg- og spermceller frigjøres i miljøet under gyting (Fleming et al., 2011). Ovariene er to sekk lignende strukturer som er hule på innsiden. Ovidukter sammenkobler ovariene og vil degenereres hos salmonider før gyting (Coward et al., 2002). Dette fører til at eggceller frigjøres fra ovariene. Utvikling av eggcellen involverer proliferasjon av kimceller gjennom en serie med mitotiske delinger og resulterer i utviklingen av primære oocytter (Coward et al., 2002).

FSH er et hormon som stimulerer produksjonen av oestradiol som frigjøres i ovariene. Oestradiol stimulerer syntese av plommesekkmasse (vitellogenin) i leveren (Jørgensen, 2018). Vitellogenin frigjøres og transporteres til ovariene via sirkulasjonssystemet (Kunz, 2004). Plommesekkmasse inkorporeres i oocytten og fordeles som to hovedkomponenter, kalt fosvitin og lipovitellin. Leveren syntetiserer i tillegg eggeskall protein som transporteres til oocytten på samme måte (Kunz, 2004). Hormonet oestradiol stimulerer oocytten til å ta opp vitellogenin og eggeskall protein. Dette fører til at oocytten (umoden) utvikles videre og gonadene øker gradvis i størrelse (Kunz, 2004). Kjernemembranen må brytes ned for at oocytten skal kunne modnes. Modning initieres av LH og denne fasen er assosiert med reduserte nivåer av oestradiol. Ovulasjon fører til at veggene til follikkelene sprekker opp og modne egg frigjøres i bukhulen sammen med ovarievæske (Kunz, 2004).

#### **1.4.1 Ovarievæske**

OF frigjøres og omslutter rogn i bukhulen etter ovulasjon (Hajirezaee et al., 2017). Salmonider kan ha en OF som er svakt farget eller klar og det totale volumet utgjør opptil 30 % av den totale eggmassen. OF skilles ut fra overflateepitel som dekker ovarium og er relatert til metabolsk aktivitet i follikulære celler (Zadmajid et al., 2019). Tettheten til overflateepitel og deres sekretoriske aktivitet øker med økende modning av ovariene (Zadmajid et al., 2019). OF produseres ved at væske fra blodplasma blir filtrert. Ionesammensetningen består av blant annet  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  og  $\text{Ca}^{2+}$  (Zadmajid et al., 2019). Andre substanser inkluderer inorganiske ioner, aminosyrer, proteiner og energimetabolitter som glukose og fruktose (Hajirezaee et al., 2017). OF har en viskositet som er tre ganger enn vann, pH på rundt 8,5 og osmolalitet mellom 250- og 290 mOsmol/kg<sup>-1</sup> (Lahnsteiner et al., 1994). Proteiner i OF har en viktig funksjon under gyteperioden og 174 individuelle proteiner er identifisert hos laksefisk

(Johnson et al., 2014). Funksjoner som proteiner er involvert i inkluderer overmodning av egg (Aegerter et al., 2004), lagringstid for egg (Dietrich et al., 2012), fertiliseringsevne (Lahnsteiner, 2002), oocyte kvalitet (Nynca et al., 2014), festeevne (Mansour et al., 2009) og immunrespons (Nynca et al., 2014). Kvaliteten på OF avgjøres av hunnfiskens kondisjon og av generell næringstilgang (Zadmajid et al., 2019). Sammensetning til OF kan variere gjennom gyteperioden og hvert individ ser ut til å fremstille en OF med en unik komposisjon (Rosengrave et al., 2009). OF kan påvirke spermiers evne til å finne og smelte seg sammen med en eggcelle, hvor effekt av økt hastighet for spermier har blitt observert. Studier har vist at spermier fikk økt aktivitet ved aktivering i OF, sammenlignet med aktivering i H<sub>2</sub>O (Zadmajid et al., 2019).

#### **1.4.2 Egg fra atlantisk laks**

Eggcellen hos atlantisk laks er 5-7 mm i diameter og har en rund struktur. Størrelsen til oocytten kan variere mellom individer og øker med hunnfiskens størrelse (Abdoli et al., 2005). Eggcellen har normalt en oransje farge. Oocytten består av et ytre skall, cytoplasma og plommemasse (Laale, 1980). Skallet omslutter en plasmamembran som igjen omslutter oocytten. Det ytre skallet kalles for chorion og har en viktig funksjon med å beskytte embryoet under utvikling (Åbro, 2019). Cytoplasma er lokalisert innenfor cellemembranen og er en viskøs substans som omslutter plommemassen (Biovitenskap, 2011a). Cortikale alveoler eller granuler finnes i cytoplasma og inneholder makromolekyler og enzymer som er nødvendig for at oocytten skal kunne bli aktivert og befruktet (Kjørsvik et al., 2004). Plommemassen består av vann, proteiner og lipiddråper som er lokalisert ved den animale polen. Plommemassen syntetiseres av hunnfisken og består av nødvendige næringsstoffer som er essensielle for tidlig utvikling av embryoet (Kunz, 2004). Mikropylen er en tunnelformet trakt som er lokalisert som en liten åpning ved den animale polen. Gjennom mikropylen kan en spermie ta seg inn til egget. Sammensmelting av gametene resulterer i at oocytten fertiliseres og aktiveres (Coward et al., 2002).

#### **1.4.3 Maternal investering**

Tidlig utvikling av ovipare organismer, deriblant fisk, er avhengig av deponering av maternale komponenter i oocytten (Bizuayehu et al., 2019). Essensielle byggesteiner inkorporeres i oocytten og har en vital rolle for at embryoet skal kunne utvikle seg normalt. Genomet til zygoten aktiveres ikke umiddelbart etter fertilisering og tidlig embryo er derfor avhengig av maternal deponerte molekyler (Lubzens et al., 2016). Maternal investering er

nødvendig for at egget skal kunne aktiveres og fertiliseres, men også for aktivering av zygotisk genom og for tidlig embryonisk utvikling (Lubzens et al., 2016). Tidlig utvikling av embryo består av en serie med hurtige, synkroniserte celledelinger (Sullivan et al., 2015). Dette resulterer i en stor cellegruppe som ikke er differensierte og kalles ved dette stadiet for blastula (Sullivan et al., 2015). Det er utvikling og regulering frem til dette stadiet som er avhengig av faktorer arvet fra den maternale genomet. Faktorene består av biokjemiske molekyler i form av proteiner, mRNA, DNA, lncRNA og miRNA (Sullivan et al., 2015). Molekylene har en viktig rolle for embryoet i å regulere cellulære prosesser som energimetabolisme og strukturelle komponenter som deltar i formasjon av embryoet. DNA gjennom transkripsjon og RNA gjennom translasjon kan gjøre aktive molekyler tilgjengelig (Lubzens et al., 2016). Plommemasse er en viktig kilde for aminosyrer, fosfolipider, karbohydrater, vitaminer og mineraler som alle er essensielle for normal utvikling av embryoet (Lubzens et al., 2016). Maternale transkripter blir maskert av ulike proteiner og dette sørger for at maternalt mRNA ikke blir translatert for tidlig (Sullivan et al., 2015). miRNA har en viktig regulatorisk rolle for tidlig utvikling og er involvert i avmaskering, men også initiering av translasjon av mRNA (Sullivan et al., 2015). Dette er med på å kontrollere selektiv degradering av mRNA og denne prosessen økes mot MZT (Sullivan et al., 2015). Når det tidlige embryoet når MZT vil kontroll over utvikling gradvis overføres til zygotens cellemaskineri gjennom gradvis aktivering av eget genom (Sullivan et al., 2015). På dette tidspunktet skjer det en degradering av flere maternale molekyler, da transkripsjon og translasjon syntetiserer aktive molekyler som er produkter fra det zygotiske genomet (Sullivan et al., 2015).

#### **1.4.4 Aktivering og tidlig utvikling**

Aktivering av egg fra atlantisk laks kan skje i kontakt med vann, men også ved fertilisering (Velsen, 1980). Egget fertiliseres når en spermie smelter sammen med en eggcelle og det dannes en diploid zygote (Coward et al., 2002). Fertilisering av egget krever tilstedeværelse av divalente ioner som  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Mg}^{2+}$ . En spermie kan passere gjennom en tunnelformet struktur som kalles for mikropylen (Velsen, 1980). Mikropylen er smal og kun en spermie får muligheten til å passere. Fertilisering fører til at konsentrasjonen av intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$  øker (Velsen, 1980). Aktivering av egget skjer ved at en kalsiumbølge beveger seg gjennom egget fra den animale polen. Dette fører til at en prosess som kalles for cortikal reaksjon initieres (Velsen, 1980). Chorion separeres fra cytoplasma og dette danner det perivitelline rommet.

Permeabiliteten til chorion endres og innholdet i alveolene frigjøres. Endringen i permeabiliteten til chorion fører til at åpningen til mikropylen blokkeres og innstrømming av vann gjør at egget begynner å svulle (Velsen, 1980).

Embryoisk utvikling etter fertilisering og aktivering kan deles inn i tre faser. Celledeling (cleavage) er den første fasen som initieres etter fertilisering- og aktivering av egget. Cytoplasma beveger seg mot den animale polen og det dannes en halvkuleformet kuppel (Coward et al., 2002). Denne strukturen kalles for en blastodisk og er eggets første celle. Celledeling og differensiering fører til at embryo utvikles fra blastodisken (Coward et al., 2002). De første celledelingene initieres i det horisontale planet, men fra og med 64-celle stadiet kan celledeling også skje i det vertikale planet (Coward et al., 2002). Cellene som deles kalles for blastomerer og blir mindre ettersom celledelingen fortsetter (Brøgger, 2018). Temperaturen i vannet dikterer hvor raskt celledelingen utfolder seg. Etter hvert som celledelingen fortsetter så vil noen celler bli fullstendig dekket av andre celler. Det øvre cellelaget kalles for envelope layer, mens cellene under kalles for dype celler (Kjørsvik et al., 2004). Etter flere runder med celledeling er det blitt dannet en multicellulær topp som kalles for blastoderm (Kjørsvik et al., 2004). Kantene begynner å fortykke, disken flater ut og danner blastula (Coward et al., 2002). Fortykkelsen langs kanten kalles for en germring og det fremtidige embryoet er synlig på den ene siden av disken som en fortykkelse langs kanten (Kimmel et al., 1995). Denne fasen avsluttes med proliferasjon av cellene (Coward et al., 2002).

Gastrulasjon er den andre fasen i embryoisk utvikling etter fertilisering. Celler som ble dannet tidligere begynner å spesialisere seg. Germringen ekspanderer og begynner å vokse nedover mot plommemassen i retning av den vegetative polen. Dette er en prosess som kalles for epiboly (Velsen, 1980). Yolken som formes av germringen utvikler seg til å bli plommesekken og seinere vevet som omslutter kroppshulen. Et område som kalles for blastopore vil ved fullføring av epiboly minke i størrelse og lukkes, hvor området etter hvert vil utvikle seg til anus (Velsen, 1980). Plommemassen blir fullstendig omsluttet av den ekspanderende blastodisken. Celler spesialisere seg til vev som vil utgjøre fundamentet til det utviklende embryoet. Det skjer en omforming av blastula til gastrula og dannelse av to primære kimblader som klassifiseres som ektoderm og endoderm (Holck, 2020). Det øverste cellelaget blir ektoderm og de dype cellene blir endoderm. De dype cellene blir videre delt inn i to lag som kalles for mesoderm og endoderm, hvor mesoderm vil være mellom de to

primære kimbladene (Kjørsvik et al., 2004). Ektoderm utvikler seg til hudceller og endoderm utvikler seg til organer. Den tredje og siste fasen kalles for organogenese og er karakterisert av endelig formasjon av embryoet. Dette inkluderer dannelse av finner, sirkulasjonssystem og andre vitale organer (Velsen, 1980).

#### **1.4.5 Eggkvalitet**

Eggkvalitet kan defineres som evnen et egg har for å bli fertilisert og i ettertid utvikle seg til et normalt embryo (Bobe, 2015). Kvaliteten til egget påvirkes av morfologiske, biologiske og biokjemiske forhold. Dårlig eggkvalitet blir assosiert med økt dødelighet og en lavere toleranse. Eggkvalitet kan vurderes ved ulike stadier og utviklingssuksess kan bestemmes i forhold til fertiliseringsrate, overlevelse til øyerognstadiet, genuttrykk og evaluering av enzymatisk aktivitet (Bobe, 2015).

### **1.5 RT-qPCR**

Kvantitativ real time PCR er et diagnostisk verktøy som anvendes ved amplifisering av små mengder med DNA (Biovitenskap, 2011b). Teknikken er basert på vanlig PCR, men reaksjonen følges i nåtid. Et fluoriserende fargestoff benyttes for bestemmelse av mengde kvantifisert uttrykk, hvor fargen øker proporsjonalt med mengde produkt etter hver syklus.  $C_t$  er overstigning av threshold når amplifiseringssyklusen fører til en signifikant økning. En lav  $C_t$ -verdi betyr at det er mye cDNA i prøven og genuttrykket overstiger threshold etter få amplifiseringssykluser. En amplifiseringssyklus består av tre trinn. Denaturering fører til at dsDNA separeres til ssDNA. Amplifikasjon fører til syntese av cDNA. DNA polymerase starter deretter syntese av en ny DNA tråd i 5'-3' retning (Biovitenskap, 2011b). Fargestoff bundet til dsDNA gir sterkere fluorescensen enn i ubundet form. PCR produktene dissosierer ved økt temperatur, amplifisering avsluttes og dette endrer fluorescensen. Endringen detekteres og fremstilles grafisk. Smeltekurver for utrykkede gener kan deretter sammenlignes opp mot hverandre (Biovitenskap, 2011b).

#### **1.5.1 Gen**

En DNA-tråd er en lang, dobbeltrådig streng som består av fire biokjemiske forbindelser kalt nukleotider (Martinsen, 2019). Enkelte regioner av DNA kan avleses og fungerer som en oppskrift for ulike egenskaper. Det er sekvensene som koder for slike egenskaper som klassifiseres som et gen (Martinsen, 2019). Hvert gen har sin avgrensede region på DNA-

tråden og kalles for et lokus. Det er arveanlegget som bestemmer oppbygningen til en organisme og dens evolusjonære tilhørighet i miljøet (Martinsen, 2019).

### **1.5.2 Insulinlignende vekstfaktor**

IGF utgjør en viktig komponent i et sentralt signalsystem og har gjennom evolusjonen blitt høyt konservert hos vertebrater (Eivers et al., 2004). IGF-familien består av to utskilte ligander, kalt IGF-1 og IGF-2. Teleost fisk har i tillegg en tredje ligand som kalles for IGF-3 (Berishvili et al., 2010). IGF har en essensiell rolle for normal embryoiske vekst og utvikling ((Hartnett et al., 2010), men også for differensiering, reproduksjon og regulering av vekst (Berishvili et al., 2010). IGF-1 og IGF-2 produseres i leveren og distribueres via sirkulasjonssystemet, mens IGF-3 er spesifikt for gonadene og er trolig involvert i embryogenese hos fisk (Berishvili et al., 2010). IGF klassifiseres som et pre hormon og er i utgangspunktet inaktivt. Ligand blir biologisk aktiv ved binding til reseptor og når enzym fjerner peptidfragment fra begge ender til hormonet (Åsvold, 2018). En reseptor kalt IGF-1R er assosiert med IGF og er essensiell for normal utvikling hos tidlig embryo. En fosforylering trigges ved reseptor-ligand binding og to signaliseringsveier aktiveres. Signalisering via MAPK og PI3K/Akt-1 er essensielt for promotering av vekst under embryoiske utvikling (Eivers et al., 2004). Forsøk på sebrafisk (*Danio rerio* H.) har rapportert redusert hode- og øyestruktur ved fravær av IGF-1R (Eivers et al., 2004).

### **1.5.3 Nucleoplasmin 2**

Npm2 er et protein kodende gen og stammer fra det maternale genomet. Genet uttrykkes i ovariet hos hunnfisk og er kritisk for tidlig embryonal suksess (Bouleau et al., 2014). Nucleoplasminer er involvert i formasjon av kjernelignende legemer, cellekløyving, utvikling til to-celle stadiet, aktivering av zygotisk genom og utviklingssuksess etter blastula stadiet. Fravær av mRNA har blitt assosiert med høyere embryonal dødelighet (Cheung et al., 2018). Npm2 er en viktig molekylær faktor som indikator for eggkvalitet. Molekylær analyse av ufertiliserte egg hentet fra regnbueørret avslørte en positiv korrelasjon mellom utviklingspotensialet og mengde med maternalt mRNA. Utviklingspotensialet er eggets egenevne for embryoiske utvikling (Bouleau et al., 2014).

### **1.5.4 Zygote arrest 1 Like**

Zar1 er et protein kodende gen og var blant de første maternale faktorene som ble identifisert hos vertebrater (Rong et al., 2019). Genet er spesifikt for oocytten og overfører maternale



faktorer som er av stor betydning for prosesser etter ovulasjon (Rong et al., 2019). Zar1 har en sentral rolle i overgangen fra oocyt til embryo. Oocytten vil fullføre meiose I etter ovulasjon og fører til at det første polarlegemet avgis. Oocytten går videre til metafasestadiet i meiose II, som fullføres ved befruktning (Wu et al., 2003). Dette initierer den påfølgende dannelsen av encellet embryo (Wu et al., 2003). Embryoet inneholder en haploid pronukleus som stammer fra hver av foreldrene, som forblir i et inaktivt stadium til initiering av zygotisk gen aktivering (Wu et al., 2003). Zygotisk genuttrykk og de første celledelingene er derfor avhengige av et reservoar med maternalt mRNA som lagres i egget (Wu et al., 2003). Nivået av mRNA er høyere i oocytten under vekst og forsvinner gradvis mot MZT (Rong et al., 2019). Zar1 har trolig en betydning for initiering av embryogenese, men også for tidlig utvikling (Wu et al., 2003). Genet har en rolle i modning av oocytten og forsøk har vist at aktivering av zygotisk genom feilet hvor zar1 var fraværende. Det spekuleres i at fraværelse av zar1 får konsekvenser for meiotisk modning (Rong et al., 2019). Zar1 er viktig for fertilitet hos hunnkjønnnet, kritisk for overgangen mellom oocyte og embryo, og essensiell for RNA regulering i tidlig embryoer (Rong et al., 2019).

### **1.5.5 Cyclin B1a**

CCNB1 er et proteinkodende gen og transkriberer mRNA som kan translateres til cyclin B1. Proteinet er kritisk for kontroll og regulering av progresjon gjennom celledelingen, hvor cellen initierer overgang mellom G2- og M fasen under mitotisk celledeling (Nakayama et al., 2013). Cyclin B1 er en maternal faktor som deponeres i oocytten under modningsprosessen. mRNA kan transkriberes og være aktiv før zygotens eget genom aktiveres (Nakayama et al., 2013). Cyclin er en gruppe med proteiner som gjennom periodiske konsentrasjonsendringer kontrollerer og regulerer progresjon gjennom celledelingen (Fossum, 2019). Regulering skjer ved at proteinet binder seg til og aktiverer enzymer som kalles for CDK (Fossum, 2019). Cyclin B1 binder seg til og danner kompleks med cdk1 og det nye komplekset kalles for MTF (Nakayama et al., 2013). MTF er involvert i tidlige prosesser under mitose. Dette inkluderer kondensering av kromosomene, nedbrytning av kjernemembran og sammenkobling av spindel pol (Nakayama et al., 2013). Komplekset påvirker også om cellen skal initiere forpliktelse til mitose eller ikke og kontrollerer overgangen mellom G2- og M fasen i celledelingen (Nakayama et al., 2013).

## **1.6 Formålet med oppgaven**

Lagring av egg fram til at sykdomsstatus er avklart kan hindre at smitte spres til andre deler av produksjonen. Hvordan sammensetning av ulike vaske- og lagringsmedier påvirker eggkvalitet over tid er derfor viktig å få undersøkt.

Formålet med denne oppgaven var å se på hvordan mediesammensetning og lagring over tid ville påvirke eggkvalitet etter lagring av ubefruktede egg fra atlantisk laks. En viktig del av oppgaven var å undersøke om eggkvalitet kunne relateres til uttrykk av maternale gener.

## 2. Materialer og metoder

### 2.1 Forsøksfisk

Forsøket ble gjennomført ved stamfiskanlegget som tilhører SalMar Genetics As. Anlegget er landbasert og befinner seg i Rauma kommune i Møre og Romsdal. Fisken ble holdt i sirkulære kar og hadde blitt eksponert for en naturlig photoperiode gjennom hele produksjonssyklusen (pers. med. Gøran Roland, SalMar Genetics As). Fisken stod på naturlig ferskvann som holdt en temperatur på ca. 4 °C. Oksygenmetningen var på 102,22 % og oksygennivået ble målt til 12,87 mg/L. Stamfisken hadde en vekt mellom 12-14 kg for hunnfisken og 14-16 kg for hannfisken. Stamfiskene var ca. 4 år gamle og forsøket ble gjennomført i perioden 04.11.2019 - 16.11.2019. Dette var innenfor hovedperioden for sluttmodning og ovulasjon for denne fiskegruppen (pers. med. Gøran Roland, SalMar Genetics As). Stamfisk ble under all håndtering først beroliget med *Aqua-s vet* (Crop & Food Research). Dosering ble gjort etter produsentens anvisning. Før avlivning og stryking ble fisken beroliget. En dødelig dose med *tricaine* (PHARMAQ) ble administrert, hvor fisken deretter ble hengt opp og bløgget. En typisk dødelig dose er 100 g *tricaine* per 100 L vann.

### 2.2 Prøveuttak

Etter avlivning så ble stamfisken hengt opp etter halen og spylt med vann, deretter ble fisken tørket. Fisken ble sendt videre via et takmontert transportsystem for uttak av egg og testis. Buken til hunnfisken ble snittet opp med en kniv, hvor egg og OF ble manuelt ekstrahert ut og overført til svarte plastkasser. Melke (spermie og seminalvæske) fra hannfisken ble hentet ved bruk av to metoder. Den første metoden involverte bedøvelse av hannfisken og melke ble deretter manuelt strøket (fersk melke). Melken ble overført til celledyrkingsflasker og oppbevart i et kjøleskap som holdt ca. 4 °C. Melkelaget var 2-3 mm høyt og ble brukt samme dag som fisken ble strøket. Den andre metoden ble gjennomført ved at hannfisken ble avlivet. Gonadene ble tatt ut, kvernet, filtrert og deretter fortynnet med et lagringsmedium kalt *AquaBoost Spermcoat* (Cryogenetics, 2014). Melk ble lagret ved ca. 4 °C og brukt dagen etter. Fortynning med lagringsmedium ble gjennomført da dette muliggjør at et maksimalt antall rogn kan befruktes ved gonadeekstraksjon og hannfisken benyttes derfor mer effektivt (Cryogenetics, 2016).

## 2.3 Lagringsmedium

Det ble benyttet fire medier i dette forsøket (Tabell 1). Et naturlig medie i form av OF, som ble hentet fra hver hunnfisk (F1-F8). Egg ble inkubert i OF fra sin respektive hunnfisk. NaCl som var en vanlig saltløsning (0,95 %). Cort + som var en modifisert, kunstig Cortland løsning og er ment til å etterligne naturlig OF fra laksefisk (Wolf et al., 1969). Cort - som var identisk med Cort +, men hvor CaCl<sub>2</sub> ikke hadde blitt tilsatt (Tabell 1). Kunstig løsning ble fremstilt ved bruk av H<sub>2</sub>O som var ionefritt og hadde blitt *Milli-Q* behandlet (Millipak Express 20, Millipore).

Tabell 1: Viser sammensetning av kunstige lagringsmedier som ble fremstilt og benyttet for vasking, og lagring av ubefrukta egg hentet fra F1-F8.

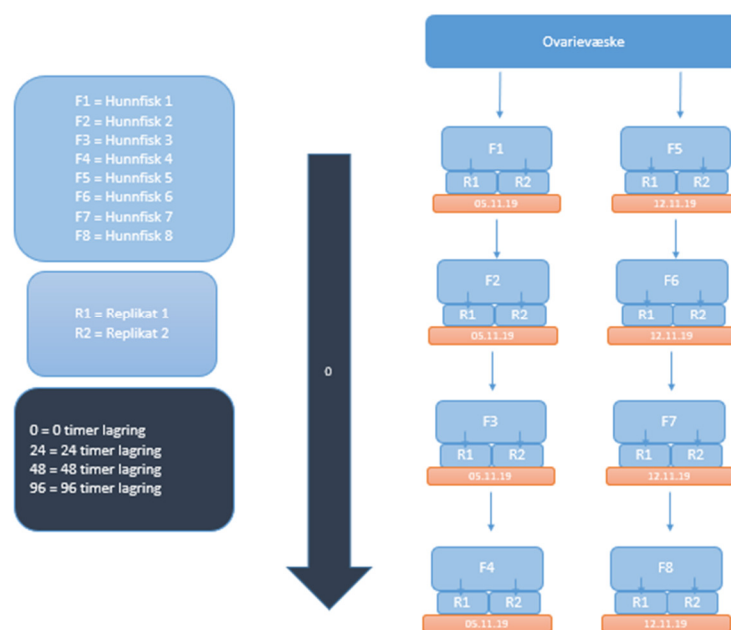
Lagringsmedium	Stoff	g/L	pH
NaCl	NaCl	9,001	7,5
Cort +	NaCl	7,25	8,4
	KCl	0,381	
	MgSO <sub>4</sub>	0,121	
	CaCl <sub>2</sub>	0,33	
	Glukose	1,077	
	Hepes	5,01	
Cort -	NaCl	7,253	8,4
	KCl	0,381	
	MgSO <sub>4</sub>	0,121	
	Glukose	1,077	
	Hepes	5,01	

## 2.4 Lagringstidspunkt

Effekten av lagringstid på eggkvalitet og genuttrykk var et sentralt aspekt som skulle undersøkes. I forsøket ble egg lagret i fire intervaller. Det første intervallet var 0 timer. Egg ble ikke lagret og kun vasket. OF ble fjernet av de eggene som skulle lagres i kunstige medier. Det andre intervallet var 0-24 timer, det tredje var 0-48 timer og det fjerde intervallet var 0-96 timer.

## 2.5 Forsøksoppsett

Det ble utlevert egg fra åtte hunnfisk (F1-F8) og melke fra flere hannfisk. Egg fra hunnfisk (F1-F4) ble behandlet den første uken (05.11.19) og egg fra hunnfisk (F5-F8) ble behandlet den andre uken (12.11.19). Ulike lagringsgrupper ble fordelt i forhold til hunnfisk (F1-F8), lagringsmedium; OF, NaCl, Cort + og Cort -, lagringsintervall; 0, 24, 48 og 96 timer, og replikat (R1-R2) (Figur 1). Egg fra ulike hunnfisk, lagringsintervall og medier ble fordelt på to replikater, hvor hvert replikat bestod av 250 egg. For hvert medie og tidsintervall ble det lagret egg fra åtte ulike hunnfisk i duplikat. Fra hver hunnfisk så ble det altså hentet 250 egg x 2 replikat x 4 lagringsmedium x 4 lagringstidspunkt (Figur 1).



Figur 1: Skjematisk presentasjon av oppsett for lagring av ubefrukta egg hentet fra F1-F8 ved 0 timer lagring. Samme prosedyre ble fulgt for 24, 48 og 96 timer lagring, og for NaCl, Cort + og Cort - mediene.

### 2.5.1 Estimering av 250 egg

For å beregne vekten av 250 egg, som var antallet som skulle benyttes i hvert replikat, så ble 25 egg plukket ut fra hver hunnfisk (F1-F8) og vekten ble notert. Denne prosedyren ble gjentatt tre ganger og gjennomsnittet av målingene ble satt inn i formel 1. Dette gjorde at man fikk kalkulert vekten som var nødvendig for å oppnå 250 egg for F1-F8.

$$\text{Vekt (g) for 250 egg} = \frac{25 (\text{antall egg})}{\text{Vekten (telte egg)}} \times 250 (\text{Formel 1})$$

### 2.5.2 Lagringsbetingelser for ubefrukta egg

Firkantede begerglass med et totalt volum på 300 ml som målte 67,5 mm (bredde) x 67,5 mm (lengde) x 94 mm (høyde) ble brukt ved lagring av ubefrukta egg. Egg ble lagret i 2-3 lag. Egg som ble lagret i OF fikk i tillegg 10 - 15 ml av egen OF tilsatt slik at eggene var godt dekket. Egg som skulle lagres i kunstige løsninger fikk OF vasket bort. Egg ble vasket med den samme løsningen som de skulle lagres på og deretter overført til begerglasset som inneholdt 120 ml av denne løsningen. Begerglass ble oppbevart i et kjøleskap som holdt ca.  $4 \pm 1$  °C (Figur 2). Et lokk delvis forseglet begerglasset og hindret dermed fordampning, men sørget også for fri tilgang på oksygen.



Figur 2: Ubefrukta egg lagret i kjøleskap før fertilisering. Foto: Magnus Øen.

### 2.5.3 Egg for genuttrykk

Egg som skulle undersøkes for genuttrykk ble lagt direkte på *RNAlater* (*RNAlater*<sup>TM</sup> RO901, Sigma). Fra hver hunfisk (F1-F8) ble 12 egg tilfeldig valgte ut fra hvert replikat (R1-R2) og overført til et prøverør (15 ml) og tilsatt 10 ml *RNAlater*. Prøverør ble deretter lagret over natta i kjøleskap ved  $4 \pm 1$  °C. Dagen etter ble prøvene overført til en fryser og lagret ved -80 °C. Ved lagringstidspunkt 0 timer ble det kun tatt egg fra OF. Ved lagringstidspunkt 24, 48 og 96 timer ble det tatt egg fra alle fire lagringsmedier.

### 2.5.4 Befruktning av egg

Egg ble befruktet i begerglass (300 ml) som fikk tilsatt 100 µl melke og 50 ml aktivatorløsning. Aktivatorløsningen gir ekstra energi til spermene (Cryogenetics, 2014). Egg fra F1-F4 ble befruktet med melke fra gonader som hadde blitt kvernet. Egg fra F5-F8 ble befruktet med melke som hadde blitt behandlet på forskjellige måter. Egg lagret ved 0 timer

ble befruktet med fersk melk som hadde blitt strøket. Egg lagret i 24 timer ble befruktet med melke som hadde blitt kvernet. Egg lagret i 48 timer ble befruktet med melke som hadde blitt lagret i 48 timer. Lav aktivitet til spermene førte til at dosen ble doblet til 200  $\mu$ l melke. Egg lagret i 96 timer ble befruktet med melke som hadde blitt strøket og lagret i 24 timer i kjøleskap ved  $4 \pm 1$  °C. Før befruktning ble spermie evaluert under mikroskop. Aktivitet, hastighet og bevegelse ble vurdert (subjektivt) ved at objektglass med melke fikk tilsatt aktivatorløsning. To minutter etter befruktning ble eggene helt over en sil og vasket med vann. Dette ble gjort for å fjerne rester av aktivatorløsning og melke. Egg ble overført tilbake til begerglasset der 100 ml med vann var tilsatt. Begerglasset ble plassert i et kjøleskap slik at eggene kunne svulle. Egg ble hentet etter 2 timer med svelling og ble desinfisert med *buffodin* (Figur 3). Dette ble gjort for å forhindre spredning av smitte. En dosering på 100 mg/L ble benyttet.



Figur 3: Desinfisering av egg med *buffodin* etter to timer med svelling. Foto: Magnus Øen.

Etter desinfisering så ble egg flyttet til inkubering. Dette ble gjort i et annet bygg som hadde et rom med klekkeskap. Hvert skap hadde åtte skuffer, hvor hver skuff ble delt inn i to bakker og hver bakke (Figur 4) hadde 36 rom som målte 75 mm (bredde) x 75 mm (lengde) x 50 mm (høyde). Vann ble kontinuerlig tilført og holdt ca.  $8 \pm 0,3$  °C.



Figur 4: En av åtte bakker i klekkeskap med egg fordelt i 36 rom. Egg i en bakke stammet fra fire ulike fisk (F1-F4 eller F5-F8), men hadde samme lagringstid (0, 24, 48 eller 96 timer). Ett inkubasjonsrom representerer et replikat. Foto: Magnus Øen.

### **2.5.5 Oppbevaring og transport**

Prøvene ble lagret ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  etter endt prøvetaking. Fra Reistad ble prøver sendt via ekspress post til NFH, ved Universitetet i Tromsø. Under transport ble prøvene lagret i isolerte isoporkasser med fryseelement. Ved mottakelse på NFH ble prøvene overført til en fryser og lagret ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **2.6 Evaluering av eggkvalitetsdata**

### **2.6.1 Befruktning**

Tjuefire timer etter befruktning ble 50 tilfeldig utvalgte egg hentet fra hvert replikat. Deretter ble egg fiksert i eddiksyre (5 % eddiksyre i 0,9 % NaCl løsning) i to minutter. Fiksering i eddiksyre ville stoppe celledelingen (Aslaksen, 2016). Egg ble deretter lagt på Cort + og inkubert i kjøleskap ved  $4 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  frem til evaluering. Befruktningsrate og celledeling ble evaluert under mikroskop. Befruktningsrate ble evaluert i forhold til om egget hadde blitt aktivert med udelt blastodisk, en celle.

### **2.6.2 Beregning av overlevelse til 120 døgngader**

Femti egg ble tilfeldig plukket ut fra hvert replikat etter inkubasjon i 120 døgngader og evaluert i forhold til antall individer som hadde utviklet ryggstreng. Evaluering ble gjort under mikroskop og antall levende egg ble notert ned (Vedlegg 1). Prosentvis overlevelse til gastrulasjon ble kalkulert ved bruk av formel 2.



### 2.6.3 Beregning av overlevelse til øyerognstadiet

Femti egg ble tilfeldig utvalgt fra hvert replikat. Tre hundre døgngader etter befruktning for egg hentet fra F1-F4 og 248 døgngader etter befruktning for egg hentet fra F5-F8. Egg ble evaluert under mikroskopering i forhold til vellykket utvikling til øyerognstadiet. Antall egg ved øyerognstadiet ble notert ned (Vedlegg 2). Prosentvis overlevelse til øyerognstadiet ble kalkulert ved bruk av formel 2.

### 2.6.4 Databehandling av eggkvalitetsparametere

Antall dager fra befruktning til gastrulasjon (120 dg) og øyerogn (248- og 300 dg) ble funnet ved at døgngader ble dividert på den gjennomsnittlige temperaturen i vannet (8 °C). Statistisk analyse ble gjennomført ved å bruke gjennomsnittet for replikatene ved et lagringstidspunkt, for et lagringsmedium, for hver fisk og satt inn i formel 2.

$$\bar{X} = \frac{R1 + R2}{n} \text{ (Formel 2)}$$

$\bar{X}$  = gjennomsnitt av begge replikatene for en fisk, R1 = replikat 1 og R2 = replikat 2, n = antall replikater.

## 2.7 Analyser

### 2.7.1 RNA isolering fra egg

RNA ble isolert ved bruk av trizol metoden (Vedlegg 3). Prøvene ble tint på is. Fra hver hunnfisk (F1-F8), hvert medie og lagringstidspunkt ble det isolert RNA fra 10 egg. Fem egg fra hvert replikat. Eggene ble overført til et eppendorfrør (homogeniseringstube) på 2 ml. Grunnet ekstraksjonstekniske utfordringer måtte egg fra hvert replikat fordeles på to eppendorfrør. Tre egg ble overført til eppendorfrør 1, og to egg ble overført til eppendorfrør 2. Individuelle egg ble punktert ved at en steril nål ble ført gjennom egget.

To keramiske kuler ble overført til hvert rør. Kulene ville male opp vevsprøvene til en homogen væske. 1000 µl med Trizol (Trizol reagent ambion) ble overført til hvert prøverør. Prøvene ble deretter plassert i en homogenisator (Tissuelyser II, Qiagen) og homogenisert. Prøvene ble homogenisert med en rpm på 12 000 x 1 min x fem runder. Prøvene ble deretter blandet godt i en vortex (REAX 2000, Heidolph) i 15 sek. Prøvene ble sentrifugert (Centrifuge 5418R, eppendorf) ved 12 000 rpm x 10 min ved 4 °C. Supernatan fra de fire

ekstraksjonsrørene ble overført og blandet i et større eppendorfrør (15 ml). 1 ml av denne supernatanten ble overført til et eget eppendorfrør (2 ml). Resterende supernatanten ble lagt på lagring ved -80 °C.

Fem hundre µl kloroform (Sigma-Aldrich) ved 4 °C ble overført til hvert eppendorfrør med 1 ml supernatant. Prøvene ble vortexet i 15 sek, etterfulgt av inkubering i 5 min ved romtemperatur. En ny runde med sentrifugering ble gjennomført ved 12 000 rpm x 15 min ved 4 °C. Prøven bestod nå av tre faser, hvor den øverste vannfasen ble overført til et nytt eppendorfrør. Fem hundre µl med trizol og 200 µl med kloroform ble tilsatt. Tuben ble deretter plassert i en vortex i 15 sek.

Prøven ble inkubert i 5 min ved romtemperatur. Prøven ble deretter sentrifugert ved 12 000 rpm x 15 min ved 4 °C. Den øverste vannfasen ble pipettert ut og overført til et nytt prøverør (DNA low-bind tube). 500 µl med isopropanol (2-propanol, VWR) ved -20 °C ble tilsatt. Prøven ble deretter inkubert over natta ved -20 °C. Dagen etter ble prøven tatt ut fra inkubering og sentrifugert ved 12 000 rpm x 10 min ved 4 °C. Isopropanol ble fjernet og eksponerte en hvitt RNA pellet. Pelleten ble vasket med 1 ml etanol (Ethanol absolute, VWR) fortynnet til 80 %. Prøven ble sentrifugert ved 10 000 rpm x 5 min ved 4 °C. Pelleten ble vasket på nytt med etanol og sentrifugert ved 10 000 rpm x 5 min ved romtemperatur.

Etanol ble deretter pipettert ut og resten ble fordampet ved å tørke pelleten ved 37 °C. Pelleten ble løst opp i 30 µl vann (DEPC (RNAse inhibitor)-treated water, Ambion) og inkubert i et varmeskap i 10 min ved 55 °C. Prøven ble deretter lagret ved -80 °C.

### **2.7.2 Nanodropp**

En fullskjermet UV spektrofotometer (Thermo Scientific<sup>TM</sup>, Nanodropp 2000) ble brukt til å bestemme renheten til RNA (Vedlegg 4). Nanodropp behandling ville avsløre eventuell DNA kontaminering. Spektrofotometeret måler konsentrasjonen til RNA i prøven og måler mengde RNA mot mengde DNA ved å måle absorbanse ved henholdsvis 260/280 nm. En verdi som  $\geq 2,0$  tilsier at prøven ikke er kontaminert.

Analysen ble gjennomført ved at isolert RNA ble tint på is. Spektrofotometeret ble rengjort og en null prøve ble gjennomført for å undersøke om vannet var kontaminert. 1,1 µl med vann (nukleasefritt) ble pipettert og analysert. Spektrofotometeret ble stilt inn slik at prøvene ble avlest som RNA.

Et filterpapir ble brukt til å fjerne vannrester fra instrumentet. Deretter ble 1,1 µl med prøve pipettert og analysert. Pippetespiss ble byttet mellom hver prøve og instrumentet ble rengjort med et filterpapir mellom hver analysering.

Analysering ble gjennomført for 104 individuelle prøver og viste at RNA var kontaminert med DNA. Prøvene hadde en gjennomsnittlig verdi på 1,49 for 260/280 og 142,71 ng/µg RNA. En DNase behandling ble derfor gjennomført.

### **2.7.3 DNase behandling**

DNase behandling ble utført ved å bruke et TURBO DNA-free™ kit fra Thermofisher Scientific (Vedlegg 5). Prøver som hadde en RNA-konsentrasjon som var større enn > 200 ng per µl ble fortynnet. 15 µl RNA og 15 µl H<sub>2</sub>O ble pipettert over til et nytt prøverør. En rutine DNase behandling ble valgt på bakgrunn av at de fleste prøvene hadde en konsentrasjon som var mindre enn 200 ng.

RNA prøvene fikk tilsatt 3 µl med 10X TURBO DNase™ buffer og 2 µl med TURBO DNase™ enzym. Prøven ble blandet forsiktig. Deretter fulgte en inkubasjonsperiode som varte i 20-30 min ved 37 °C. 3 µl med DNase inaktiverings reagent ble tilsatt og prøverøret ble mikset i vortex. Prøven ble inkubert i 5 min ved romtemperatur. Under inkubasjon ble prøven omdispersert ved 3 anledninger.

Prøven ble deretter sentrifugert ved 10 000 rpm x 1,5 min. Supernatanten med RNA ble pipettert ut og overført til en ny tube. En ny nanodropp behandling ble gjennomført og viste at konsentrasjonen hadde gått ned til 69,80 ng/µl og renheten for 260/280 var på 1,50. Kvaliteten på RNA ble ansett som god nok for alle prøver (pers. med. Dhivya Borra Thiyagarajan, Universitetet i Tromsø). RNA prøvene ble lagret ved -20 °C.

### **2.7.4 cDNA syntese**

Det ble brukt et High-capacity RNA-to-cDNA™ kit (appliedbiosystems) for syntese av cDNA (Vedlegg 6). 200 ng med RNA ble brukt fra hver prøve. 10 µl med 2X RT Buffer mix, 1 µl med 20X RT Enzyme mix (Invitrogen), 9 µl med RNA + H<sub>2</sub>O ble blandet sammen til et totalt reaksjonsvolum på 20 µl for hver brønn. En 96-brønns plate (Semi skirted 96 well plate) ble benyttet som reaksjonsbeholder.

Platen ble forseglet med plast og plassert i en sentrifuge og spunnet ned. cDNA ble syntetiser ved bruk av Applied Biosystems 2720 Thermal cycliner. Platen ble først inkubert i 10 min ved 25 °C, deretter 30 min ved 50 °C og avsluttet med 5 min ved 95 °C.

Ett hundre og fire prøver ble fordelt på to plater. Hver plate hadde to kontroller. En NTC kontroll og en NORT (-RT) kontroll. NTC kontrollen bestod av 10 µl RT buffer, 1 µl RT enzym og 9 µl vann. NORT kontrollen bestod av 9 µl med tilfeldig RNA og 11 µl med vann. NTC kontrollen skulle sjekke om mastermix var kontaminert, mens NORT kontrollen skulle undersøke om RNA var kontaminert. En plateinndeling er oppgitt i Tabell 2 og 3.

Tabell 2: Prøve 1-52. Ufortynnet cDNA.

NTC	NTC	NORT	NORT	1	2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
45	46	47	48	49	50	51	52				

Tabell 3: Prøve 53-104. Ufortynnet cDNA.

53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
101	102	103	104	NTC	NTC	NORT	NORT				

### 2.7.5 RT-qPCR

Prøvene med cDNA ble fortynnet 1:10 (5 µl cDNA med 45 µl H<sub>2</sub>O). Fortynnet cDNA ble overført til en egen 96-brønn plate (MicroAmp Fast Optical 96-well, Life Technologies). Ett hundre og fire prøver ble fordelt over to plater. Ufortynnet cDNA ble lagret ved -20 °C og fortynnet cDNA ble lagret ved 4 °C. Reaksjonsvolumet for en brønn var på 15 µl. Fem µl med fortynnet cDNA, 7,5 µl med sybr green (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix,

appliedbiosystems) og 2,5 µl med primer. Primer var spesifikk for hvert gen. Primer hadde en bruksløsning på 5 µM og tilsvarte 0,25 µM per reaksjon. En oversikt over primere er gitt i vedlegg 8. Tabell 4 viser reaksjonsvolumet for hver brønn.

Tabell 4: Reaksjonsvolum for en RT-qPCR reaksjon.

<b>Reaksjons volum (RT-qPCR)</b>	
cDNA	5 µl
Fast Sybr green	7,5 µl
Reverse primer	1,25 µl
Forward rimer	1,25 µl

En multikanalpipette (8-kanalpipette 5-50 µl med 100 µl pipettespiss) ble brukt til å tilsette 5 µl cDNA i hver brønn. En mastermix ble fremstilt som beskrevet ovenfor og tilsatt i hver brønn med cDNA. Hver 96-brønnplate ble testet for et gen. Hver prøve ble fordelt på to duplikater. For å analysere 104 forskjellige prøver, ble duplikatene fordelt på tre plater. Plate nummer 1 fikk tilsatt prøve 1-47 (Tabell 5), plate nummer 2 fikk tilsatt prøve 48-94 (Tabell 6) og plate nummer 3 fikk tilsatt prøve 95-104 (Tabell 7). De to siste brønner på hver plate fikk tilsatt H<sub>2</sub>O for å avdekke uspesifikk binding. Fremgangsmåten ble gjentatt for hvert gen.

Tabell 5: Prøve 1-47.

1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12
13	13	14	14	15	15	16	16	17	17	18	18
19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	24	24
25	25	26	26	27	27	28	28	29	29	30	30
31	31	32	32	33	33	34	34	35	35	36	36
37	37	38	38	39	39	40	40	41	41	42	42
43	43	44	44	45	45	46	46	47	47	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

Tabell 6: Prøve 48-94.

48	48	49	49	50	50	51	51	52	52	53	53
54	54	55	55	56	56	57	57	57	58	59	59
60	60	61	61	62	62	63	63	64	64	65	65
66	66	67	67	68	68	69	69	70	70	71	71
72	72	73	73	74	74	75	75	76	76	77	77
78	78	79	79	80	80	81	81	82	82	83	83
84	84	85	85	86	86	87	87	88	88	89	89
90	90	91	91	92	92	93	93	94	94	H2O	H2O

Tabell 7: Prøve 95-104.

95	95	96	96	97	97	98	98	99	99	100	100
101	101	102	102	103	103	104	104	H2O	H2O		

Plater ble analysert i en 7500 Fast Real-Time PCR systems maskin (Applied biosystems, CA, USA). En datamaskin med programmet 7500 programvare v2.3 ble benyttet. Reaksjonsvolum per brønn ble satt til 15 µl. Se vedlegg 7 for inkubasjonsprogram.

### 2.7.6 Primere

β-aktin og elongeringsfaktor-1α ble brukt som referansegener. De har vist seg å ha et genuttrykk som er stabilt og ble derfor valgt som referansegener (Ingerslev et al., 2006). Primer-blast ble brukt til å designe primerne (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Det ble laget en firefolds fortyningsserie, med seks fortyninger. Ultra pure vann ble brukt til fortyning. Det ble så kjørt RT-qPCR av hver fortyning. Ct-verdiene for hvert gen ble så brukt til å lage en standardkurve og stigningstallet (slope) ble beregnet. Denne kan settes direkte inn i formel 3 for utregning av primereffektiviteten (E). Den matematiske modellen er beskrevet av Pfaffl (2001). Alle primere hadde en bruksløsning på 5 µm med brukskonsentrasjon på 0,25 µm. Effektiviteten for primere varierte mellom 88-103 % (Vedlegg 8).

$$E = 10^{[-1/\text{slope}]} \text{ (Formel 3)}$$

### 2.7.7 Statistikk og databehandling

Grafisk fremstilling av data og utregninger ble utført med Excel©, 2010 (Microsoft Corporation, NM, USA). Statistiske undersøkelser for genuttrykk ble utført på delta Ct-verdier (dCt) og prosentvis overlevelse for eggkvalitetsdata. En to-veis variansanalyse ble valgt for å teste for eventuelle effekter av lagringsmedie og lagringstid på genuttrykk og eggkvalitetsdata (Frøslie, 2017). Testing ble gjort ved bruk av programmet SigmaPlot 14.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Signifikante forskjeller mellom grupper ble betegnet som signifikant dersom  $P < 0,05$ .

En forutsetning ved ANOVA er at datasettene som ligger til grunn for analysen er normalfordelt (Mackenzie, 2018). Genuttrykk og eggkvalitetsdata ble testet for normalitet ved bruk av Kolmogorov-Smirnov og Shapiro-Wilk's metode for normalitetstesting (Kirkman, 1996, Upton et al., 2008). Normalitetstesting ble gjennomført ved bruk av SigmaPlot. Det var store variasjoner i datasettet for overlevelse- til 120 døgngrader og øyerognstadiet. Derfor ble det valgt å gjennomføre en arcsin-transformering (Warton et al., 2011) og dette gjorde at man fikk normalfordeling av data.

Den statistiske analysen ble tolket på bakgrunn av tre P-verdier. Den første P-verdien avslører om det er en signifikant effekt av tid. Egg ble lagret ved 0, 24, 48 og 96 timer. Den andre P-verdien sier noe om det er en signifikant effekt i forhold til lagringsmedium (OF, NaCl, Cort + og Cort -). En tredje P-verdi avslører om det er signifikant interaksjon mellom variablene (Lagringstid mot lagringsmedie). Hvis det er en signifikant interaksjon så betyr dette at den avhengige variabelen, som i dette tilfellet er genet eller eggkvalitetsparameter som undersøkes, endrer seg forskjellig mellom en eller flere medier over tid (Mchugh, 2011).

En ANOVA test vil imidlertid ikke avsløre hvor imellom hvilke medier ved hvilke tidspunkter denne forskjellen befinner seg. Derfor ble det gjennomført en post hoc test som ville avsløre hvor denne forskjellen befinner seg (Mahajan, 2016). En Bonferroni t-test ble valgt på bakgrunn av at n varierte noe mellom gruppene som ble sammenlignet for genuttrykk (Mchugh, 2011). En Tuckey test ble valgt for eggkvalitet siden  $n = 8$  (Abdi et al., 2010).

En Pearson-korrelasjonsanalyse ble gjennomført for å undersøke om det var signifikante korrelasjoner mellom overlevelse- til 120 døgngrader mot øyerognstadiet og mellom

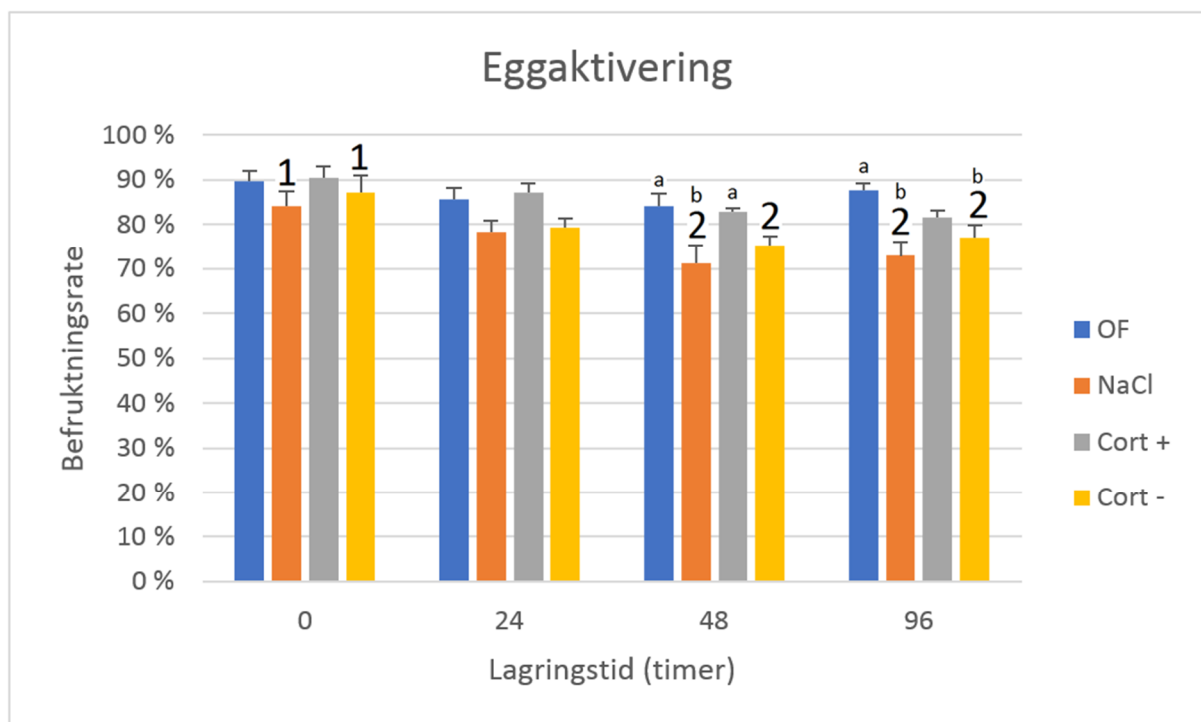
overlevelse til 120 døgngrader mot aktivering av egg. Analysen ble gjennomført i SigmaPlot. Koeffisienten for Pearson korrelasjonsanalyse,  $r$ , varierer mellom -1 og +1 og vil beskrive sterk negativ eller sterk positiv korrelasjon. Det er graden av sammenheng mellom variablene som måles av  $r$ . Signifikant korrelasjon påvises hvis  $p < 0,05$  (Vedlegg 10a og 10b).



### 3. Resultater

#### 3.1 Eggaktivering (Befruktingsrate)

Egg ble evaluert 24 timer etter befruktning i forhold til andel aktiverte egg (befruktingsrate). Gjennomsnittlig befruktingsrate over alle lagringsintervallene var høy for alle lagringsmedier. Befruktingsraten hos egg lagret i OF, NaCl, Cort + og Cort - var på henholdsvis 86 %, 76 %, 85 %, og 79 %. Det ble påvist en signifikant effekt ( $P < 0,001$ ) av lagringstid og lagringsmedium, men det ble ikke påvist en signifikant effekt av interaksjon mellom variablene (Figur 5).



Figur 5: Eggaktivering etter lagring av ubefruktede egg i ulike medier (OF = ovarievæske, NaCl = 0,9 % natriumkloridløsning, Cort + = modifisert Cortlandløsning og Cort - = Cortlandløsning uten  $Ca^{2+}$ ) og ulike lagringstider (0-96 timer etter stryking fra donorfisk). Data er presentert som gjennomsnitt + SEM, hvor  $n = 8$  for hvert medie for hver lagringstid. Ulike tall indikerer at det er signifikante forskjeller mellom lagringstider for et lagringsmedium og ulike små bokstaver indikerer at det er signifikante forskjeller mellom lagringsmedier som gjelder for en lagringstid.

Befruktingsraten endret seg lite med økende lagringstid for egg behandlet i OF og Cort +, men egg som hadde blitt lagret i NaCl og Cort - hadde en lavere befruktingsrate med økende lagringstid. Det var signifikante forskjeller for befruktingsrate ( $P < 0,05$ ) mellom 0- mot 48 timer, og mellom 0- mot 96 timer lagring for egg behandlet i både NaCl og Cort - (Figur 5).

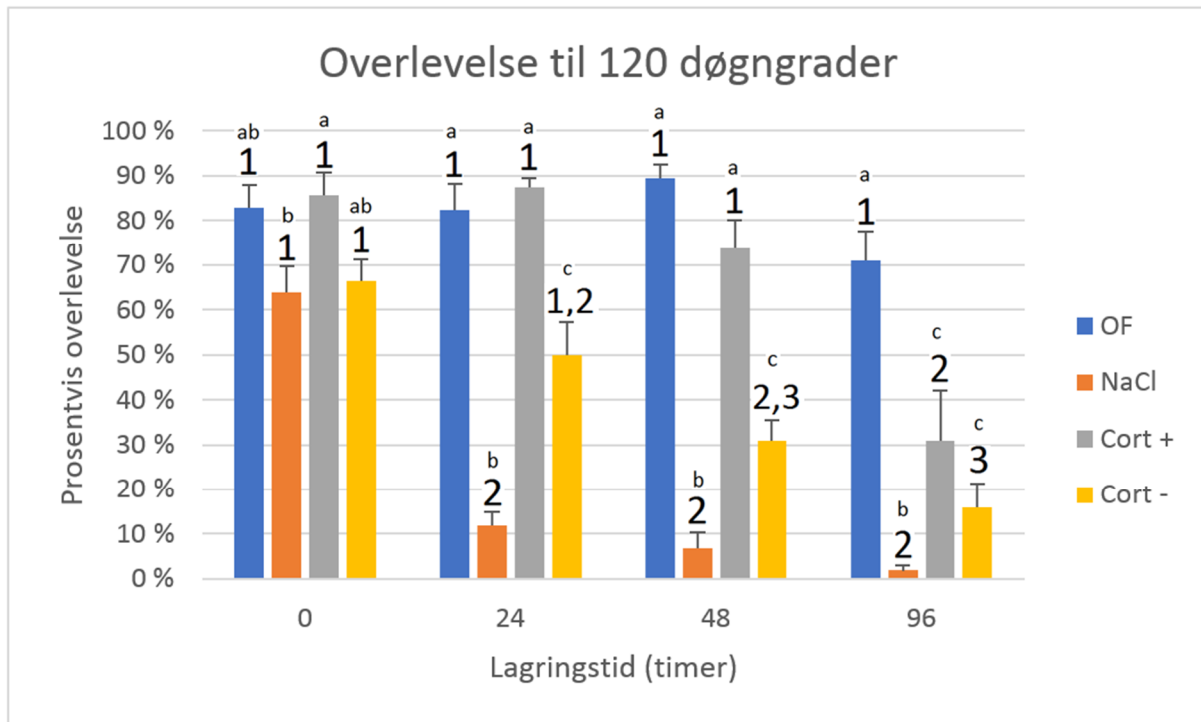
For egg som hadde blitt befruktet etter 0 timer lagring var befruktningsraten for egg behandlet i OF, NaCl, Cort + og Cort - på henholdsvis 89 %, 84 %, 90 % og 87 %. Dette tilsvarer en forskjell på 6 % mellom høyest- og lavest befruktningsrate. Befruktningsraten for egg lagret i 24 timer var noe lavere. Egg lagret i 24 timer før befruktning hadde en befruktningsrate på henholdsvis 85%, 78 %, 87 % og 79 % mellom de ulike mediene. Forskjellen mellom høyest- og lavest befruktningsrate var noe høyere med 9 % (Figur 5).

Egg lagret i 48 timer før befruktning hadde en befruktningsrate som var noe lavere for alle lagringsmedier i forhold til 24 timer lagring. Det ble påvist signifikant forskjell ( $P < 0,05$ ) i befruktningsrate mellom egg som hadde blitt behandlet med OF mot NaCl, og mellom egg behandlet med Cort + mot NaCl. Befruktningsraten for egg behandlet med OF, NaCl, Cort + og Cort - var på henholdsvis 84 %, 71 %, 82 % og 75 %. Forskjellen mellom høyest- og lavest befruktningsrate var på 13 % (Figur 5).

Etter lagring i 96 timer før befruktning hadde befruktningsraten blitt høyere for alle lagringsmedier, utenom Cort +. Lagring i 96 timer var det eneste intervallet hvor OF hadde en tydelig høyere befruktningsrate enn Cort + (Figur 5). Det ble påvist signifikant forskjell ( $P < 0,001$ ) i befruktningsrate mellom egg som hadde blitt behandlet med OF mot NaCl, og signifikant forskjell ( $P < 0,05$ ) mellom egg behandlet med OF mot Cort -. Befruktningsraten for egg behandlet med OF, NaCl, Cort + og Cort - var på henholdsvis 87 %, 72 %, 81 % og 77 % (Figur 5).

### **3.2 Overlevelse til 120 døgngader**

Overlevelse ved gastrulasjon ble evaluert etter en inkubasjonsperiode på 120 døgngader etter befruktning. Gjennomsnittlig overlevelse over alle lagringsintervallene for egg lagret i OF, NaCl, Cort + og Cort - var på henholdsvis 82 %, 21 %, 70 %, og 41 %. Det ble påvist en signifikant effekt ( $P < 0,001$ ) av lagringstid, lagringsmedium og effekt av interaksjon mellom variablene (Figur 6).



Figur 6: Prosentvis overlevelse til 120 døgngader etter lagring av ubefruktede egg i ulike medier (OF = ovarievæske, NaCl = 0,9 % natriumkloridløsning, Cort + = modifisert Cortlandløsning og Cort - = Cortlandløsning uten Ca<sup>2+</sup>) og ulike lagringstider (0-96 timer etter stryking fra donorfisk). Data er presentert som gjennomsnitt + SEM, hvor n = 8 for hvert medie for hver lagringstid. Ulike tall indikerer at det er signifikante forskjeller mellom lagringstider for et lagringsmedium og ulike små bokstaver indikerer at det er signifikante forskjeller mellom lagringsmedier som gjelder for en lagringstid.

Egg befruktet etter 0 timer lagring hadde høy overlevelse blant gruppene som hadde blitt behandlet med OF og Cort +, på henholdsvis 83 % og 86 %. Egg vasket med NaCl og Cort - hadde en noe lavere overlevelse med 64 % og 66 %. Det var nesten 22 % forskjell mellom høyest- og lavest overlevelse. Signifikant forskjell ( $P < 0,05$ ) ble påvist mellom Cort + mot NaCl (Figur 6).

Egg lagret i 24 timer før befruktning førte til at det var store forskjeller mellom lagringsmediene i forhold til overlevelse (Figur 6). Egg som hadde blitt vasket og lagret i OF eller Cort + hadde en overlevelse på henholdsvis 82 % og 88 %. Behandling med NaCl eller Cort - resulterte i en lavere overlevelse med 12 % og 50 % respektivt. Det var forskjeller som var signifikante. Signifikans ( $P < 0,001$ ) ble påvist mellom OF mot NaCl, OF mot Cort -, Cort + mot Cort - og mellom Cort - mot NaCl.

Etter 48 timer lagring så var overlevelse redusert i alle lagringsmedier, utenom OF (Figur 6). Overlevelse hos egg etter lagring i OF, NaCl, Cort + og Cort - var på henholdsvis 90 %, 7 %, 74 % og 31 %. Dette var første lagringsintervall hvor Cort + ikke hadde den høyeste

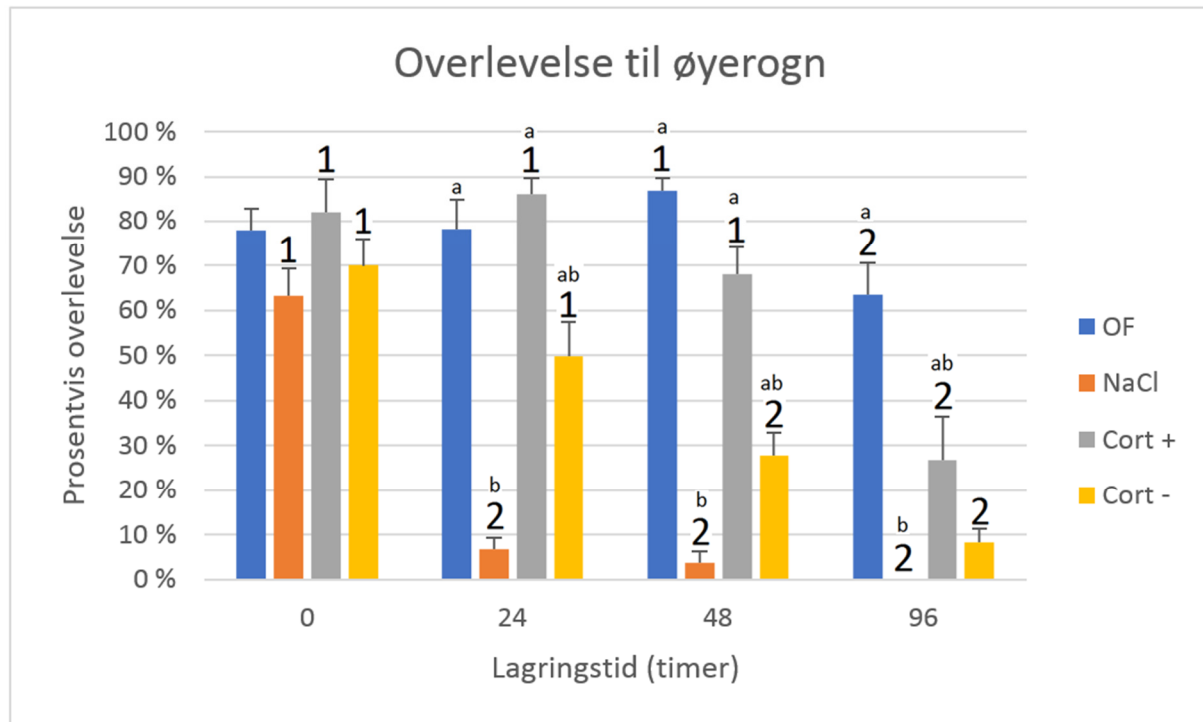
overlevelsen. Det ble påvist signifikante forskjeller ( $P < 0,001$ ) mellom OF mot NaCl, OF mot Cort -, Cort + mot NaCl, Cort + mot Cort - og signifikant forskjell ( $P < 0,05$ ) mellom Cort - mot NaCl (Figur 6).

Egg som hadde blitt befruktet etter 96 timer lagring hadde stor variasjon for overlevelse mellom lagringsmedier. Overlevelse hos egg som hadde blitt lagret i OF, NaCl, Cort + og Cort - var på henholdsvis 71 %, 2 %, 31 % og 16 %. OF hadde den høyeste overlevelsen blant alle lagringsmedier, mens NaCl fremdeles hadde den svakest overlevelsen (Figur 6). Det var signifikante forskjeller ( $P < 0,05$ ) for overlevelse mellom alle lagringsmedier, men ikke for egg som hadde vært lagret i Cort + mot Cort - og mellom Cort - mot NaCl.

Egg som hadde blitt lagret i OF hadde ingen tydelige forskjeller mellom lagringstidspunkt i forhold til overlevelse. Egg som ble lagret i NaCl fikk påvist signifikante forskjeller ( $P < 0,001$ ) for overlevelse mellom 0- mot 24-, 48- og 96 timer lagring. Det ble observert en betydelig redusert overlevelse fra og med 24 timer lagring for behandling med NaCl. Egg som hadde blitt behandlet med Cort + hadde en høy overlevelse frem til 48 timer lagring. Det var en signifikant forskjell for egg behandlet med Cort + mellom 96- mot 0-, 24- og 48 timer lagring ( $P < 0,001$ ). Egg som hadde blitt lagret i Cort - hadde en negativ utvikling for overlevelse fra og med 24- til 96 timer lagring. Det var signifikante forskjeller mellom egg behandlet med Cort - og ble påvist mellom 0- mot 48 timer ( $P < 0,05$ ), 0- mot 96 timer ( $P < 0,001$ ) og mellom egg som hadde blitt lagret i 24- mot 96 timer ( $P < 0,05$ ) (Figur 6).

### **3.3 Overlevelse til øyerogn**

Embryo overlevelse til øyerogn ble evaluert etter en inkubasjonsperiode på 248- og 300 døgngrader etter befruktning. Resultatet vist at overlevelse for egg behandlet med OF og Cort + var relativt høy, mens overlevelse for egg behandlet med NaCl og Cort - var betydelig lavere (Figur 7). Gjennomsnittlig overlevelse over alle lagringsintervallene for egg lagret i OF, NaCl, Cort + og Cort - var på henholdsvis 77 %, 19 %, 66 % og 39 %. Det ble påvist en signifikant effekt ( $P < 0,001$ ) av lagringstid, lagringsmedium og interaksjon mellom de to variablene (Figur 7).



Figur 7: Prosentvis overlevelse til øyerognstadiet etter lagring av ubefruktede egg i ulike medier (OF = ovarievæske, NaCl = 0,9 % natriumkloridløsning, Cort + = modifisert Cortlandløsning og Cort - = Cortlandløsning uten  $Ca^{2+}$ ) og ulike lagringstider (0-96 timer etter stryking fra donorfisk). Data er presentert som gjennomsnitt + SEM, hvor n = 8 for hvert medie for hver lagringstid. Ulike tall indikerer at det er signifikante forskjeller mellom lagringstider for et lagringsmedium og ulike små bokstaver indikerer at det er signifikante forskjeller mellom lagringsmedier som gjelder for en lagringstid.

Egg befruktet etter 0 timer lagring hadde en relativ høy overlevelse for behandling med alle lagringsmedier. Overlevelse for egg behandlet med OF, NaCl, Cort + og Cort - var på henholdsvis 77 %, 63 %, 82 % og 70 %. Dette tilsvarte en forskjell på 19 % mellom høyest- og lavest overlevelse. Det ble ikke påvist signifikant forskjell, men det ble observert en lav p-verdi mellom Cort + mot NaCl ( $P = 0,091$ ) og ble betegnet som marginalt ikke signifikant effekt.

Tjuefire timer lagring før befruktning førte til at det var store forskjeller mellom lagringsmediene i forhold til overlevelse (Figur 7). Overlevelse var fremdeles høyest blant gruppene som hadde blitt behandlet med OF og Cort + med 78 % og 86 % respektivt. Lagring i NaCl og Cort - ga en lavere overlevelse med henholdsvis 6 % og 49 %. Signifikant forskjell ( $P < 0,001$ ) ble påvist mellom alle lagringsmedier, utenom egg som hadde blitt lagret i Cort + mot OF (Figur 7).

Etter 48 timer lagring så var overlevelse lavere for alle lagringsmedier, utenom OF (Figur 7). OF og Cort + hadde høyest overlevelse med henholdsvis 86 % og 68 %, mens NaCl og Cort -

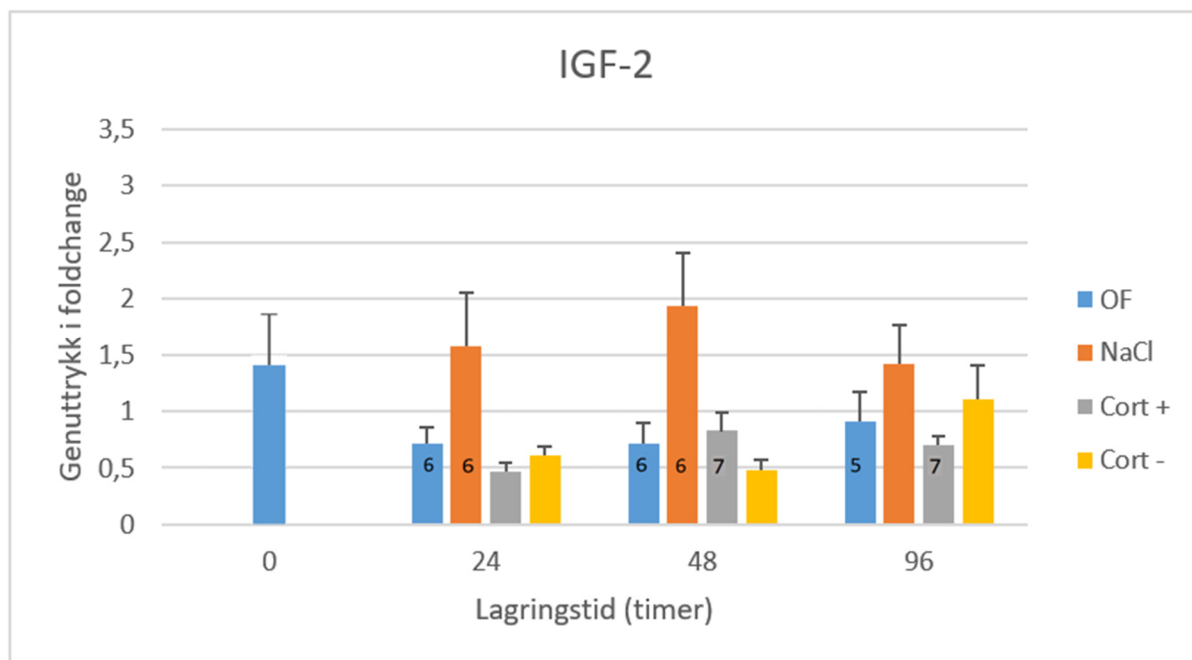
hadde en lavere overlevelse med 3 % og 27 % respektivt. Forskjellen mellom høyest- og lavest overlevelse var på 83 %. Det ble påvist signifikante forskjeller ( $P < 0,001$ ) mellom alle lagringsmedier, utenom egg som hadde blitt lagret i OF mot Cort + (Figur 7).

For egg som hadde blitt befruktet etter 96 timer lagring så var overlevelse høyest for gruppene som hadde blitt lagret i OF og Cort + med henholdsvis 63 % og 26 %. NaCl og Cort - hadde en lavere overlevelse med 0 % og 8 % respektivt. Det ble påvist signifikante forskjeller ( $P < 0,001$ ) mellom OF mot alle andre lagringsmedier (Figur 7). Det ble også påvist signifikans mellom Cort + mot NaCl ( $P < 0,01$ ). Det ble i tillegg observert en lav p-verdi mellom Cort + mot Cort - ( $P = 0,098$ ) og ble betegnet som marginalt ikke signifikant effekt.

Overlevelse for egg lagret i OF hadde liten endring over tid, men var noe høyere ved 48 timer lagring i forhold til de tre andre lagringsintervallene (Figur 7). signifikans ( $P < 0,05$ ) for OF ble påvist mellom 48- og 96 timer lagring. Overlevelse for egg lagret i NaCl hadde stor variasjon over tid. Det var en betydelig signifikant ( $P < 0,001$ ) nedgang i overlevelse fra 0 timer lagring mot alle andre lagringsintervaller (Figur 7). Egg behandlet med Cort + hadde en høy overlevelse fra 0- til og med 48 timer lagring. Signifikant forskjell ( $P = 0,001$ ) ble påvist mellom 24- mot 96 timer, 0- mot 96 timer og mellom 48- mot 96 timer. Det ble i tillegg observert en lav p-verdi mellom 24- mot 48 timer ( $P = 0,113$ ) og ble betegnet som marginalt ikke signifikant effekt. Overlevelse for egg behandlet med Cort - hadde en jevn nedgang med økende lagringsintervall. Signifikans ( $P < 0,001$ ) ble påvist mellom 0- mot 96 timer, 0- mot 48 timer, 24- mot 96 timer og mellom 24- mot 48 timer ( $P < 0,05$ ) (Figur 7). Det ble i tillegg påvist lave p-verdier mellom 0- mot 24 timer ( $P = 0,060$ ) og mellom 48- mot 96 timer ( $P = 0,073$ ). Observasjonene ble betegnet som marginalt ikke signifikant effekt.

### **3.4 IGF-2**

Resultatet viser at egg som var lagret i NaCl hadde høyest uttrykk av IGF-2 ved alle lagringstidspunkt (Figur 8). Gjennomsnittlig uttrykk over alle lagringsintervallene for egg lagret i OF, NaCl, Cort + og Cort - var på henholdsvis 0,78, 1,64, 0,66 og 0,73. Uttrykket økte med økende lagringstid for de fleste lagringsmedier, men med noen variasjoner. Det ble ikke påvist signifikans for effekt av lagringstid eller effekt av interaksjon mellom variablene. Det ble imidlertid påvist signifikans ( $P < 0,05$ ) for lagringsmedium (Figur 8).



Figur 8: Uttrykk (fold change) av IGF-2 i ubefruktede egg etter lagring i ulike medier (OF = ovarievæske, NaCl = 0,9 % natriumkloridløsning, Cort + = modifisert Cortlandløsning og Cort - = Cortlandløsning uten Ca<sup>2+</sup>) og lagringstider (0-96 timer) etter stryking av stamfisk. Data er presentert som gjennomsnitt + SEM, hvor n = 8, bortsett fra der tall på stolpe indikerer ny n. Ved lagringstid 0 ble uttrykket bare bestemt i egg holdt i OF.

Signifikans ble påvist for lagringsmedium, men en Bonferroni t-test avslørte ikke mellom hvilke lagringsmedier. Det ble observert lave P-verdier ved sammenligning av OF mot alle andre lagringsmedier, Cort + (P = 0,056), NaCl (P = 0,072) og Cort - (P = 0,060). Forskjellen mellom OF mot alle andre lagringsmedier ble evaluert til å være marginalt ikke signifikant effekt.

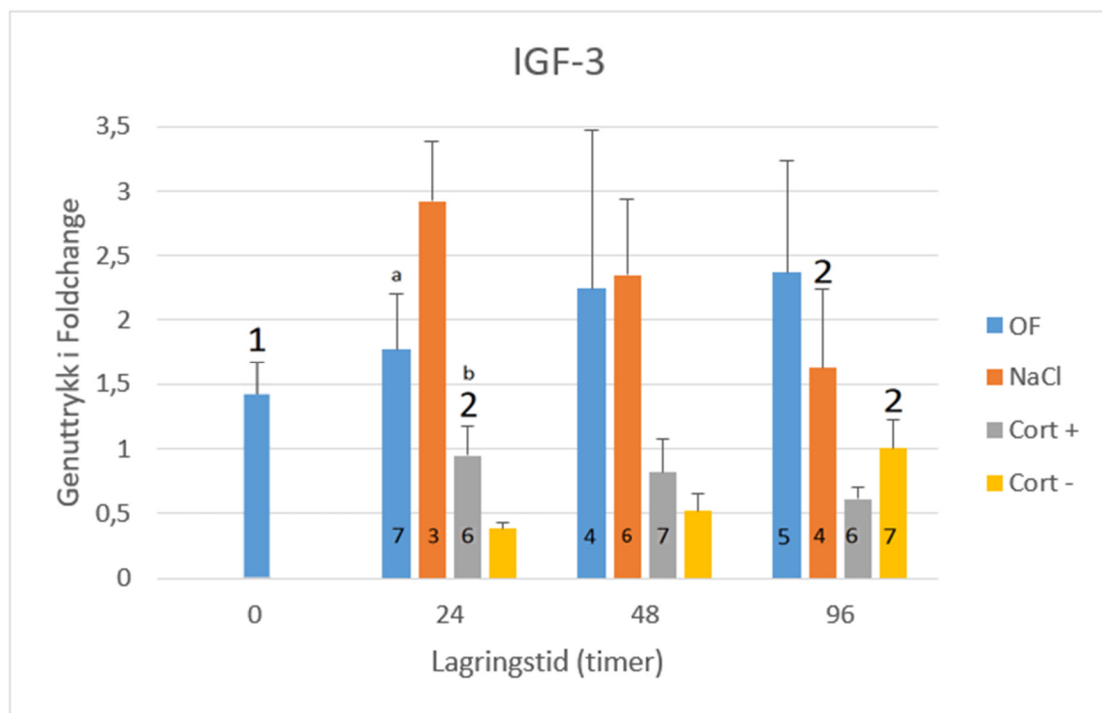
Etter 24 timer lagring så var uttrykket høyest hos egg behandlet med NaCl. Variasjonen var lav blant de resterende lagringsmediene. Uttrykk fra ubefrukta egg behandlet med OF, NaCl, Cort + og Cort - var på henholdsvis 0,71, 1,57, 0,47 og 0,61. Dette tilsvarte en forskjell på over 1 mellom høyest- og lavest uttrykk av IGF-2. Cort + hadde lavest uttrykk av alle lagringsmedier uten at det var noen signifikante forskjeller mellom noen av gruppene ved dette lagringstidspunktet (Figur 8).

Egg som hadde blitt lagret i 48 timer hadde i likhet med tidligere lagringstidspunkt høyest uttrykk fra egg lagret i NaCl (Figur 8). Uttrykk etter behandling med OF, NaCl, Cort + og Cort - var på henholdsvis 0,72, 1,93, 0,83 og 0,48. Det ble ikke påvist signifikans mellom gruppene ved 48 timer lagring, men lav p-verdi (P = 0,093) mellom OF mot Cort + ble observert og evaluert som marginalt ikke signifikant effekt.

Etter 96 timer lagring så var det fremdeles NaCl som hadde høyest uttrykk av IGF-2. Behandling med OF, NaCl, Cort + og Cort - ga uttrykk på henholdsvis 0,91, 1,42, 0,70 og 1,10. Variasjon mellom alle lagringsmedier var lavere i forhold til tidligere lagringsintervaller (Figur 8). Cort + hadde lavest uttrykk av alle lagringsmedier uten at det var noen signifikante forskjeller mellom noen av gruppene ved dette lagringstidspunktet (Figur 8). Det ble ikke påvist signifikans, men lav p-verdi ( $P = 0,142$ ) mellom OF mot Cort - ble observert og klassifisert som marginalt ikke signifikant effekt.

### 3.5 IGF-3

Resultatet viser at egg som var lagret i NaCl hadde høyest uttrykk av IGF-3 ved alle lagringstidspunkt, utenom ved 96 timer lagring hvor OF hadde høyest uttrykk (Figur 9). Gjennomsnittlig uttrykk over alle lagringsintervallene for egg lagret i OF, NaCl, Cort + og Cort - var på henholdsvis 2,12, 2,30, 0,79 og 0,63. Det ble påvist signifikans for lagringstid ( $P < 0,001$ ) og for lagringsmedium ( $P < 0,05$ ), men ikke for effekt av interaksjon mellom variablene (Figur 9).



Figur 9: Uttrykk (fold change) av IGF-3 i ubefruktede egg etter lagring i ulike medier (OF = ovarievæske, NaCl = 0,9 % natriumkloridløsning, Cort + = modifisert Cortlandløsning og Cort - = Cortlandløsning uten  $Ca^{2+}$ ) og lagringstider (0-96 timer) etter stryking av stamfisk. Data er presentert som gjennomsnitt + SEM, hvor  $n = 8$ , bortsett fra der tall på stolpe indikerer ny  $n$ . Ved lagringstid 0 ble uttrykket bare bestemt i egg holdt i OF.



Tjuefire timer lagring av ubefruktede egg resulterte i forskjeller mellom lagringsmediene i genuttrykk (Figur 9). Genuttrykket var høyest blant gruppen som hadde blitt lagret i NaCl. Behandling med OF, NaCl, Cort + og Cort - ga uttrykk på henholdsvis 1,77, 2,92, 0,94 og 0,37. Det var en betydelig forskjell mellom grupper med høyest- og lavest genuttrykk (Figur 9). Det ble påvist signifikans mellom OF mot Cort + ( $P < 0,05$ ).

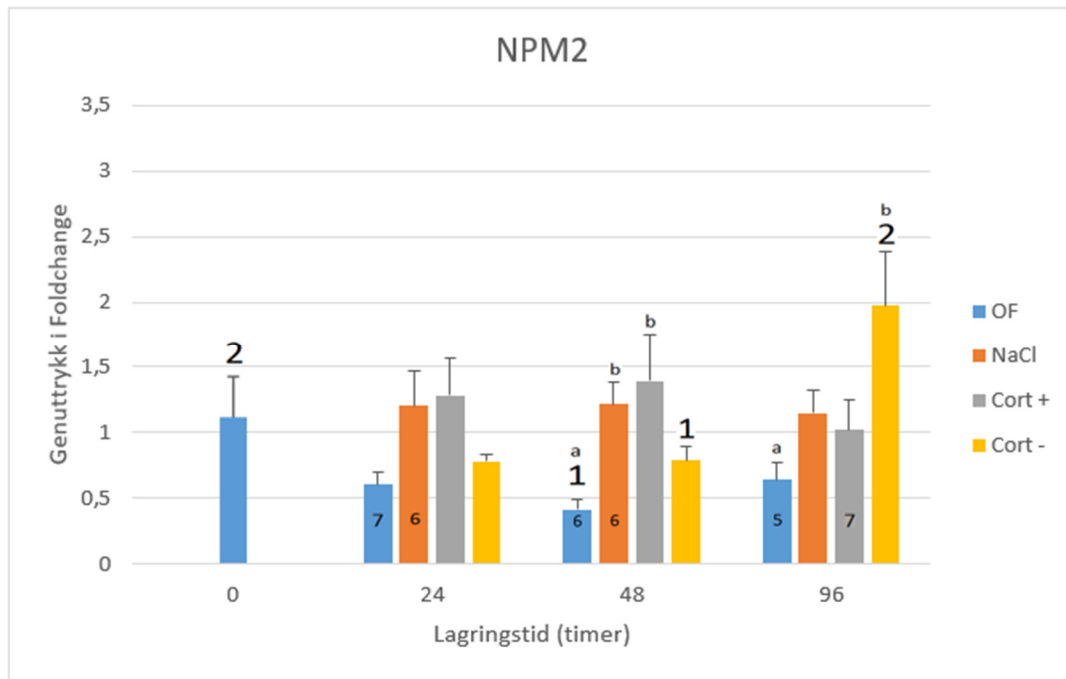
Etter 48 timer lagring så var genuttrykk lavere for alle lagringsmedier, utenom OF og Cort - (Figur 9). Variasjon mellom lagringsmedier var noe mindre ved dette lagringstidspunktet. Behandling med OF, NaCl, Cort + og Cort - ga uttrykk på henholdsvis 2,24, 2,35, 0,81 og 0,52. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller mellom lagringsmedier (Figur 9).

Ubefrukta egg lagret i 96 timer resulterte i at genuttrykk var høyere for grupper lagret i OF og Cort-, mens genuttrykk var lavere for egg lagret i NaCl og Cort + (Figur 9). Forskjellen mellom lagringsmedier var noe høyere ved dette lagringsintervallet. Behandling med OF, NaCl, Cort + og Cort - ga uttrykk på henholdsvis 2,36, 1,65, 0,61 og 1,00. Det ble ikke påvist signifikans mellom lagringsmedier (Figur 9).

I dette eksperimentet så kan det rapporteres at genuttrykk av IGF-3 forandrer seg over tid for hvert lagringsmedie. For ubefrukta egg lagret i NaCl og Cort - kunne det påvises signifikant effekt av lagringstid mellom 0- og 96 timer lagring. Det ble også påvist signifikant effekt av lagringstid for egg lagret i Cort + mellom 0- og 24 timer lagring.

### **3.6 NPM2**

Resultatet viser at ubefrukta egg som ble lagret i Cort + hadde høyest uttrykk av NPM2 ved alle lagringstidspunkt, utenom ved 96 timer lagring hvor Cort - hadde høyest uttrykk (Figur 10). Gjennomsnittlig uttrykk over alle lagringsintervallene for egg lagret i OF, NaCl, Cort + og Cort - var på henholdsvis 0,56, 1,19, 1,24 og 1,19. Genuttrykk variere over lagringstid for de fleste lagringsmediene (Figur 10). Det ble påvist signifikans for lagringsmedium ( $P < 0,001$ ) og for interaksjon mellom de to variablene ( $P < 0,05$ ), men det ble ikke påvist signifikans for lagringstid (Figur 10).



Figur 10: Uttrykk (fold change) av NPM2 i ubefruktede egg etter lagring i ulike medier (OF = ovarievæske, NaCl = 0,9 % natriumkloridløsning, Cort + = modifisert Cortlandløsning og Cort - = Cortlandløsning uten Ca<sup>2+</sup>) og lagringstider (0-96 timer) etter stryking av stamfisk. Data er presentert som gjennomsnitt + SEM, hvor n = 8, bortsett fra der tall på stolpe indikerer ny n. Ved lagringstid 0 ble uttrykket bare bestemt i egg holdt i OF.

For ubefrukta egg som hadde blitt lagret i 24 timer så ga lagring i Cort + det høyeste genuttrykket, mens lagring i OF ga lavest uttrykk (Figur 10). Behandling med OF, NaCl, Cort + og Cort - ga uttrykk på henholdsvis 0,60, 1,28, 0,94 og 0,78. Det var dobbel så stor forskjell mellom genuttrykk for egg lagret i Cort + mot OF, uten at det var noen signifikante forskjeller mellom gruppene ved dette lagringstidspunktet (Figur 10). Det ble ikke påvist signifikans, men lav p-verdi ble observert mellom OF mot NaCl ( $P = 0,173$ ) og evaluert som marginalt ikke signifikant effekt.

Lagring i 48 timer førte til at genuttrykk var høyere for alle lagringsmedier, utenom OF (Figur 10). Variasjonen var høyere mellom lagringsmediene for dette lagringstidspunktet. Cort + hadde høyest uttrykk, mens OF hadde fremdeles lavest genuttrykk. Behandling med OF, NaCl, Cort + og Cort - ga uttrykk på henholdsvis 0,42, 1,21, 1,39 og 0,79. Signifikans ( $P < 0,05$ ) ble påvist mellom OF mot NaCl og mellom OF mot Cort + (Figur 10).

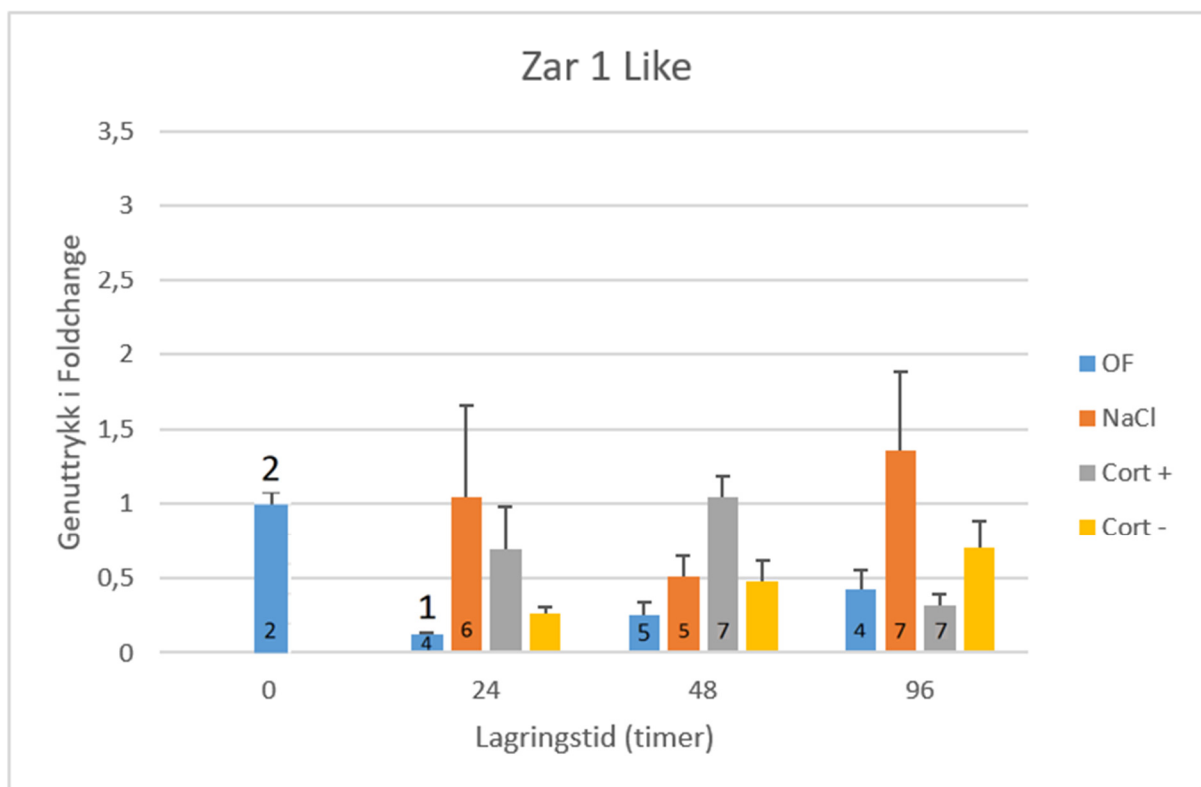
Ubefrukta egg lagret i 96 timer resulterte i at genuttrykk var høyest for gruppen som hadde blitt lagret i Cort -, mens egg lagret i OF hadde fremdeles lavest genuttrykk (Figur 10). Variasjon var høy mellom Cort - og alle andre lagringsmedier ved dette lagringstidspunktet.

Behandling med OF, NaCl, Cort + og Cort - ga uttrykk på henholdsvis 0,64, 1,14, 1,02 og 1,97. Det ble påvist signifikans mellom OF mot Cort - ( $P < 0,05$ ) (Figur 10).

Egg som hadde blitt lagret i OF hadde en signifikant effekt ( $P < 0,05$ ) av lagringstid, mellom 48- og 0 timer lagring. Det ble også påvist en signifikant effekt av lagringstid for egg behandlet med Cort -, hvor det ble påvist signifikant effekt ( $P < 0,05$ ) mellom 48- mot 96 timer lagring (Figur 10).

### 3.7 Zar1L

Resultatet viser at ubefrukta egg som ble lagret i NaCl hadde høyest uttrykk av Zar1L ved alle lagringstidspunkt, utenom ved 48 timer lagring hvor Cort + hadde høyest genuttrykk (Figur 11). Uttrykk varierte for de fleste lagringsmediene med økende lagringstid. Gjennomsnittlig uttrykk over alle lagringsintervallene for egg behandlet med OF, NaCl, Cort + og Cort - var på henholdsvis 0,26, 0,87, 0,69 og 0,48. Det ble påvist signifikans for lagringstid ( $P < 0,05$ ), men ikke for lagringsmedier eller for interaksjon mellom variablene (Figur 11).



Figur 11: Uttrykk (fold change) av Zar1L i ubefruktede egg etter lagring i ulike medier (OF = ovarievæske, NaCl = 0,9 % natriumkloridløsning, Cort + = modifisert Cortlandløsning og Cort - = Cortlandløsning uten  $Ca^{2+}$ ) og lagringstider (0-96 timer) etter stryking av stamfisk. Data er presentert som gjennomsnitt + SEM, hvor  $n = 8$ , bortsett fra der tall på stolpe indikerer ny  $n$ . Ved lagringstidspunkt 0 ble uttrykket bare bestemt i egg holdt i OF.

For egg som ble lagret i 24 timer så hadde lagring i NaCl det høyeste uttrykket, mens lagring i OF hadde det laveste genuttrykket. Det var stor forskjell mellom høyest- og lavest genuttrykk, uten at det var signifikant forskjell mellom disse gruppene ved dette lagringstidspunktet (Figur 11). Behandling med OF, NaCl, Cort + og Cort - ga uttrykk på henholdsvis 0,12, 1,04, 0,69 og 0,26. Det ble ikke påvist signifikans, men det ble observert lave p-verdier mellom OF mot NaCl ( $P = 0,164$ ), og mellom OF mot Cort + ( $P = 0,131$ ). Observasjonen ble evaluert som marginalt ikke signifikant effekt.

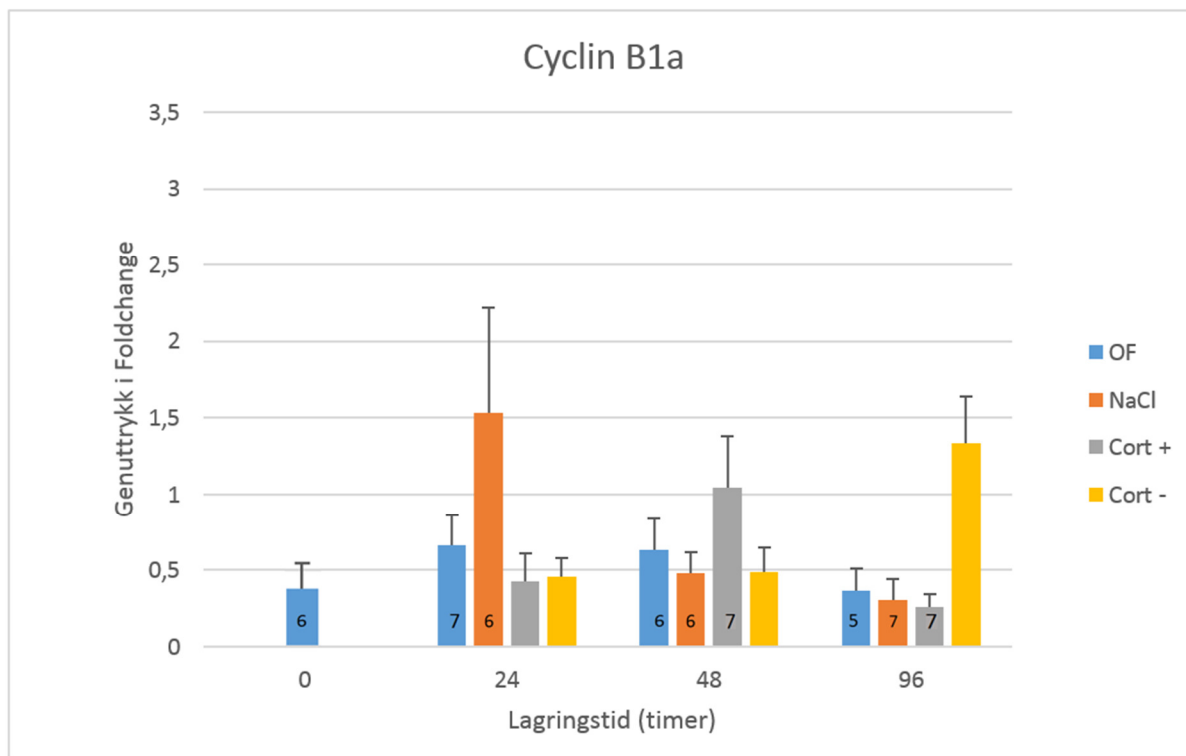
Lagring i 48 timer førte til at genuttrykk var høyere for alle lagringsmedier, utenom NaCl (Figur 11). Variasjonen mellom lagringsmedier var noe lavere enn observert ved tidligere lagringstidspunkt. Egg lagret i Cort + hadde høyest genuttrykk, mens OF hadde fremdeles lavest genuttrykk. Behandling med OF, NaCl, Cort + og Cort - ga uttrykk på henholdsvis 0,25, 0,5, 1,04 og 0,48. Det ble ikke påvist signifikans (Figur 11).

Ubefrukta egg lagret i 96 timer resulterte i at genuttrykk var høyest for gruppen som hadde blitt lagret i NaCl, mens egg lagret i Cort + hadde lavest genuttrykk (Figur 11). Det var stor forskjell mellom genuttrykk fra egg lagret i NaCl og Cort +, uten at det var signifikant forskjell mellom disse gruppene ved dette lagringstidspunktet. Behandling med OF, NaCl, Cort + og Cort - ga uttrykk på henholdsvis 0,42, 1,36, 0,32 og 0,71. Det ble ikke påvist signifikans, men en p-verdi på 0,157 ble påvist mellom Cort + mot NaCl og ble evaluert som marginalt ikke signifikant effekt (Figur 11).

Det ble påvist signifikans for lagringstid, hvor en Bonferroni t-test avslørte at det var en signifikant effekt mellom 24- mot 0 timer lagring ( $P < 0,05$ ). Det ble ikke påvist signifikans for behandling, men en p-verdi på 0,166 ble observert mellom OF mot NaCl og kan betegnes som en marginal signifikant effekt.

### **3.8 Cyclin B1a**

Resultatet viser at høyest genuttrykk varierte mellom flere lagringsmedier ved alle lagringstidspunkt, men at variasjon mellom de resterende lagringsmediene var lav (Figur 12). Gjennomsnittlig uttrykk over alle lagringsintervallene for egg behandlet i OF, NaCl, Cort + og Cort - var på henholdsvis 0,55, 0,77, 0,57 og 0,76. Det ble ikke påvist signifikans for hverken lagringstid, lagringsmedie eller interaksjon mellom variablene (Figur 12).



Figur 12: Uttrykk (fold change) av Cyclin B1a i ubefruktede egg etter lagring i ulike medier (OF = ovarievæske, NaCl = 0,9 % natriumkloridløsning, Cort + = modifisert Cortlandløsning og Cort - = Cortlandløsning uten Ca<sup>2+</sup>) og lagringstider (0-96 timer) etter stryking av stamfisk. Data er presentert som gjennomsnitt + SEM, hvor n = 8, bortsett fra der tall på stolpe indikerer ny n. Ved lagringstidspunkt 0 ble uttrykket bare bestemt i egg holdt i OF.

Lagring i 24 timer førte til at lagring i NaCl hadde den høyeste genuttrykk. Det var lav variasjon mellom de resterende lagringsmediene. Lagring i OF, NaCl, Cort + og Cort - ga uttrykk på henholdsvis 0,66, 1,53, 0,43 og 0,46. Det ble ikke påvist signifikans (Figur 12).

For egg som ble lagret i 48 timer så var genuttrykk høyere for alle lagringsmedier, utenom NaCl. Egg lagret i Cort + hadde høyest genuttrykk og det var lav variasjon mellom de andre lagringsmediene. Lagring i OF, NaCl, Cort + og Cort - resulterte i genuttrykk på henholdsvis 0,63, 0,48, 1,05 og 0,49. Ingen signifikans ble observert (Figur 12).

Etter 96 timer lagring førte til at egg lagret i Cort - hadde høyest uttrykk og var betydelig høyere enn genuttrykk fra egg lagret i de andre lagringsmediene. Variasjonen var lav mellom egg lagret i OF, NaCl og Cort + (Figur 12). Lagring i OF, NaCl, Cort + og Cort - resulterte i uttrykk på henholdsvis 0,37, 0,31, 0,26 og 1,33. Det ble ikke påvist signifikans, men de ble påvist enkelte lave p-verdier mellom NaCl mot Cort - (P = 0,059), og mellom NaCl mot OF (P = 0,116). Observasjonene ble evaluert som marginalt ikke effekt (Figur 12).

I dette eksperimentet så kan det rapporteres at uttrykket for Cyclin B1a ikke forandret seg over lagringstid, over lagringsmedier eller for en interaksjon mellom de to. Det var relativ stor

forskjell mellom medie med høyest amplifikasjon og alle andre lagringsmedier innenfor hver lagringstid.

## 4. Diskusjon

Produksjonssyklusen til oppdrettslaks består av flere kritiske faser. Stamfisk og eggproduksjon er en slik kritisk fase og foregår ved spesialiserte anlegg, hvor produsert biomasse skal kunne imøtekomme næringens fremtidige etterspørsel for egg/embryo. Norsk oppdrettslaks må håndtere en rekke utfordringer i løpet av produksjonen og det er derfor ønskelig at et individ skal ha de beste forutsetningene til å ende opp som en slakteklar matfisk. Evaluering av levedyktighet er derfor av kritisk betydning og bør vurderes i et så tidlig stadium under produksjonsforløpet som mulig. På denne måten kan man sikre seg mot unødvendig bruk av ressurser på en batch som har lavt utviklingspotensial. Levedyktighet kan evalueres ved å se på indikatorer for eggkvalitet som videre kan relateres til potensiale til en batch (Bobe, 2015). Gode markører er nødvendig som på en fornuftig måte kan evaluere potensiale (Bobe, 2015). Aktivering av egg og overlevelse til øyerogn er gode markører og kan brukes ved et stamfiskanlegg for å vurdere eggkvalitet (Bobe, 2015). Dette er ikke en ideell evaluering, da slik verifisering er avhengig av at man overvåker utviklingen etter at egg har blitt fertilisert. En ny fremgangsmåte har fått mer oppmerksomhet i løpet av de siste årene der en ser på uttrykket av spesifikke mRNA i egget (maternale mRNA) som markører i relasjon til eggkvalitet. Aegerter et al. (2004) viste for eksempel at ved å studere egg som var utsatt for post-ovulatorisk aldring var det mulig ved bruk av RT-qPCR å identifisere flere (mRNA transkript) som var relatert til embryoets eggkvalitet. Dette er produkter fra maternale gener som har vist seg å være essensielle for normal utvikling, og er involverte i cellulære prosesser som cellyklus, proteinsyntese, fosforylering, degradering og lipidmetabolisme der alle er viktig for tidlig utvikling av et fiskeembryo (Sullivan et al., 2015). Nyere forskning har imidlertid vist at det trolig er vanskelig å evaluere eggkvalitet kun basert på mengde med mRNA transkripsjoner (Bizuayehu et al., 2019).

I denne oppgaven ble det undersøkt om lagring av egg over tid (0- 96 timer) i medier med ulike ionesammensetning (OF, NaCl, Cort + og Cort -) hadde en effekt på genuttrykk og eggkvalitet. Fem gener ble valgt for å evaluere hvordan maternalt genuttrykk ble påvirket av behandling og i hvilken grad slike endringer var relatert til ulike indikatorer for eggkvalitet. Gener som ble plukket ut var IGF-2, IGF-3, NPM2, Zar1L og Cycklin B1a. Eggkvalitet ble evaluert i forhold til aktivering av egg (befruktningsrate), overlevelse til 120 døgngader og overlevelse til øyerognstadiet (248- og 300 døgngader). Resultatene vil gi et bedre grunnlag og øke forståelsen av hvilke effekter mellomlagring og mediesammensetning kan ha på

ubefrukta egg hos atlantisk laks. Etablering av eventuelle sammenhenger mellom maternale genprodukter og embryoets utviklingspotensiale kan videre gi en indikasjon om det biologiske grunnlaget som muliggjør kortidslagring av ubefrukta egg. Dette vil kunne gi oppdretter ved et stamfiskanlegg flere alternativer. En forlenget oppbevaring av ubefrukta egg kan føre til bedre utnyttelse av gameter som har et foretrukket kombinasjonspotensiale.

#### **4.1 Effekter av melkeopparbeiding på befruktning**

I dette forsøket ble egg befruktet med melke som hadde blitt behandlet på forskjellige måter. SalMar Genetics AS befrukter vanligvis egg med melke fra gonader som har blitt kvernet og filtrert. Filtratet får deretter tilsatt en modningsløsning og lagres kjølig over natta før bruk. Befruktning med melke som er blitt behandlet på denne måten gir vanligvis ingen begrensning i antall egg som kan befruktes og man får utnyttet gonaden fra hannfisk i størst mulig grad (pers. kom. Gøran Roland, SalMar Genetics AS). Melke vil normalt oppbevares i gonadene hos hannfisk og spermiecellene vil være inaktive i denne perioden (Cosson, 2019). Når spermcellene passerer gjennom sædleder under gyting vil de der bli eksponert for en endring i pH og denne endringen fører til at spermcellene får potensialet aktivitet (Cosson, 2019). Kverning og tilsatt av modningsløsning skal etterligne en tilsvarende pH-endring som naturlig utspiller seg i gonadene hos en gyteklar hannfisk (pers. kom. Gøran Roland, SalMar Genetics AS). Aktiviteten til spermcellene kan verifiseres ved mikroskopering, hvor andelen bevegelige celler, svømmehastighet og svømmemønster kan gi en indikasjon for spermieaktivitet (Vijayalakshmy et al., 2018). Lav aktivitet hos spermcellene ble kun observert ved et lagringstidspunkt (Egg fra F5-F8, 48 timer lagring). Aktiviteten var trolig lav på grunn av at melke hadde blitt lagret i 48 timer, hvor vanlig lagringsperiode er 24 timer (pers. kom. Gøran Roland, SalMar Genetics AS). Denne gruppen ble derfor befruktet med en dobbel dose (200 µl melke) og dette tiltaket ble vurdert som tilstrekkelig (pers. kom. Helge Tveiten). Egg fra F5-F8 lagret i 24 timer ble befruktet med melke, hvor aktivitet ikke hadde blitt undersøkt på forhånd. Melke som ble brukt hadde blitt kvernet, filtrert, tilsatt modningsløsning og lagret i 24 timer ved  $4 \pm 1$  °C. Tidligere evaluering hadde bekreftet god aktivitet og melke hadde blitt behandlet på samme måte. Resultatene fra aktivering tydet på at spermie kvaliteten var tilfredsstillende og det var ingen tegn til at befruktningen var avhengig av type melke som ble benyttet (Figur 5).



## 4.2 Indikatorer på eggkvalitet

Aktivering av egg var en av parameterne som ble valgt som en indikator for eggkvalitet. Evaluering ble gjennomført 24 timer etter fertilisering. Dette ble gjort siden en da kan evaluere om celledelingen er initiert (Coward et al., 2002). Egg som aktiveres på denne måten kan danne en blastodisk før utviklingen stopper opp (Coward et al., 2002). For å skille mellom egg som kun har blitt aktivert i vann og egg som har blitt fertilisert så burde befruktningsraten bestemmes som andel egg som har dannet blastodisk og initiert celledeling. Et fertilisert egg som inkuberes ved 8 grader over 24 timer burde minst ha gjennomgått to celledelinger (Vedlegg 9). Da andelen aktiverte egg (her egg med udelt blastodisk) som indikator på befruktningsrate kan derfor være misvisende. Bruk av denne parameteren for å predikere utviklingskapasitet vil derfor også kunne gi varierende resultat. Resultatene i dette forsøket viste da også at det var dårlig sammenheng mellom aktiveringsrate og overlevelse til 120 døgngader (Vedlegg 10a). Samtidig ble det vist i et annet arbeid med det samme materialet at befruktningsrate, målt som andel egg med initiert celledeling (2-4 celler), forklarte en vesentlig del av variasjonen i overlevelse til 120 døgngader (Valan Moen, 2020). Overlevelse til 120 døgngader ble derfor valgt som en indikator for utviklingskapasitet i forhold til den videre diskusjonen om sammenhenger mellom maternalt genuttrykk, medier og lagringstid. Et slikt valg er videre begrunnet i en svært god korrelasjon mellom overlevelse til 120 døgngader og overlevelse til øyerogn (Vedlegg 10b). Egg som har nådd øyerognstadiet er robust og har en høy toleranse for ulike typer miljøpåvirkning, som for eksempel transport (Tucker, 1998). Overlevelse til 120 døgngader ser derfor ut til å være en god kvalitetsindikator, samtidig som det vil være liten forskjell i tolkning av sammenhenger mellom genuttrykk og overlevelse fram til de to utviklingsstadiene. Basert på Valan Moen (2020) sine observasjoner ser det likevel ut som at effekten av medier og lagringstid på eggkvalitet i hovedsak er knyttet til initiering av celledeling. Kvaliteten på de embryoene som faktisk starter utvikling ser imidlertid ut til å være god med liten dødelighet etter initiert celledeling.

## 4.3 Effekter av lagring- og inkubasjonsbetingelser

Ubefrukta egg ble lagret ved fire lagringsintervallet i henholdsvis 0, 24, 48 og 96 timer. Egg ble videre lagret i fire lagringsmedier i form av OF, NaCl, Cort + og Cort -. Egg ble oppbevart i firkantede flasker som målte 67,5 mm (bredde) x 67,5 mm (lengde) x 94 mm (høyde) på 300 ml under lagring og fordelt over 1-2 lag. Dette var viktig siden egg som sveller vil øke i vekt

og dette kan føre til at egg langs bunnen blir klemt (Lahnsteiner, 2002). Tidligere forsøk har vist at egg fra regnbueørret som ble lagret i 4 lag hadde en lavere eggkvalitet i forhold til egg som ble lagret i 2 lag (Komrakova et al., 2010). Basert på disse opplysningene er det liten grunn til å tro at antall lag med egg har påvirket den generelle kvaliteten. Antallet lag med egg var det samme i alle flaskene og en slik eventuell effekt ville i tilfellet være den samme for alle behandlingene. Flaskene ble lagret ved  $4 \pm 1$  °C i et kjøleskap og temperaturen avveik derfor i liten grad fra vanntemperaturen som stamfisken ble utsatt for (4 °C). Atlantisk laks er poikiloterm og kroppstemperaturen samsvarer derfor med temperaturen i det omkringliggende vannet (Biovitenskap, 2019). Ginatullina et al. (2017) har vist at ubefrukta egg fra regnbueørret kan tolerere temperatursvingninger fra 2- til 10 °C så lenge endringene ikke skjer for fort. Under prøvetaking og vasking varierte temperaturen hos eggene mellom 3-6 °C. Endringene må kunne anses som relativ små og å være i et område som lakseeegg tolererer godt (Ginatullina et al., 2017). Effekten av temperatur på de oppnådde resultatene er derfor antatt å være liten.

#### **4.4 Effekter av mediesammensetning og lagringstid på genuttrykk og eggkvalitet**

Både mediesammensetning og lagringstid hadde en klar effekt på genuttrykk (Figur 8 til 12) og eggkvalitet målt som overlevelse til 120 døgngader og øyerogn (Figur 6 og 7), mens aktiveringsrate i mindre grad var påvirket (Figur 5).

Overlevelse til 120 døgngader ved lagring av ubefruktede egg i OF var høy for alle lagringstidene, noe som trolig kan forklares med at OF er den naturlige løsningen som omslutter eggene etter ovulasjon (Lahnsteiner et al., 1994). OF filtreres fra blodplasma og vil dermed ha den naturlige ionesammensetningen som er i henhold til individets gen. I tillegg består OF av viktige energisubstrat som glukose og fruktose, men også inorganiske ioner, aminosyrer og proteiner (Hajirezaee et al., 2017). Det er blant annet blitt identifisert 174 proteiner i OF hos laksefiske (Johnson et al., 2014) og tidligere studier har vist at flere av disse er relatert til blant annet overmodning (Aegerter et al., 2004), lagringstid (Dietrich et al., 2012), egg kvalitet (Nynca et al., 2014) og fertiliseringsevne (Lahnsteiner, 2002). OF var den eneste løsningen som inneholdt proteiner, da ingen av de kunstige løsningene hadde fått tilsatt protein. Basert på dette så kan det være grunnlag for at man observerte veldig høy overlevelse til 120 døgngader for egg som hadde blitt lagret i OF og dette var spesielt tydelig for den

lengste lagringsperioden (Figur 6). Egg som hadde blitt lagret i OF hadde ingen signifikante forskjeller mellom lagringstidspunkt i forhold til overlevelse. Det ble imidlertid observert en nedgang i overlevelse etter 96 timer lagring og dette kan indikere at det skjer et forbruk av metabolsk substrat eller en akkumulering av metabolitter som kan påvirke kvaliteten til egget. Mommens et al. (2015) viste at laksefisk kan holde tilbake modne oocytter i bukhulen over en periode fra 1 til 3 uker og man kan spekulere om opprettholdelse av en god kvalitet over lengre tid når egg ligger i bukhulen kan ha med tilførsel eller fjerning av nødvendige forbindelser via morderet. Nivået av maternale transkripter (IGF-2, Npm2, Cyclin B) er blitt koblet til eggkvalitet hos regnbueørret, men også til utviklingspotensial hos sebrafisk (Bizuayehu et al., 2019). Uttrykket ble endret med økende post ovulatorisk aldring (Bizuayehu et al., 2019). Dette er en observasjon som er i samsvarer med de observerte effektene på genuttrykk i dette forsøket, der uttrykket endret seg over tid for alle gener i begge retninger. For genuttrykk ble det observert varierende endringer (foldchange) i forhold til gen over lagringstid. Noen gen gikk opp, mens andre gikk ned og enkelte hadde begge effekter ved forskjellig tidspunkt, men selv om ubefrukta egg hadde blitt lagret i OF så var det ingen klar sammenheng mellom høy overlevelse og genuttrykk. Genuttrykket i denne studien er målt som relativ mengde mRNA, men sier lite om i hvilken grad disse blir translatert til protein. Ulike mRNA degenereres i forbindelse med translasjon og et lavt uttrykk kan reflektere at det har vært en proteinsyntese (Shyu et al., 2008). Egg lagret i OF som ble assosiert med høy overlevelse var genuttrykket forholdsvis lavt i forhold til de andre lagringsmediene for de fleste genene. En økning i mRNA over tid kan kanskje heller forklares med at maternale mRNA er lagret i ulike proteinkomplekser (disse vil trolig fjernes under ekstraksjon) og et observert økt uttrykk med økt lagringstid kan derfor være et resultat av økt dissosiering av mRNA fra disse, uten at de blir translatert (Winata et al., 2018). Dette var tilfellet for Zar1like og IGF-3 som hadde samme trend, men her var genuttrykket veldig høyt (Figur 9). I tillegg var standardavviket for IGF-3 høyt over alle lagringstider og kan indikere at metabolismen, degradering og muligens translasjon av mRNA som har blitt negativt påvirket (Shyu et al., 2008). For Npm2 ble det påvist signifikant effekt av lagringstid, som samsvarer med lavt uttrykk ved 48 timer i forhold til 24 timer lagring (Figur 10). Zar1L hadde en lavt uttrykk som økt jevnt med økende lagringstid (Figur 11). Cyclin B1a hadde motsatt effekt, da genuttrykk var høyt og ble lavere med økende lagringstid (Figur 12). IGF-2 hadde noe høyere uttrykk, men en forventet utviklende trend med høyest uttrykk ved lang lagringstid (Figur 8).

I norske stamfiskanlegg vaskes egg med fysiologisk saltvann (0,9 % NaCl) før befruktning. Dette blir gjort for å fjerne smittsomme patogener i OF som kan overføres til egget under befruktning via spermie (Ghittino, 2009). I dette forsøket ble NaCl benyttet som medie da det var ønsket å observere hvilken effekt som vasking og lagring med NaCl ville ha på utviklingen, i forhold til effekt av andre løsninger (OF, Cort + og Cort -). Resultatet fra vaskeprosessen viste at aktiveringsraten var høy for alle lagringsmedier, men at overlevelse hos egg vasket i NaCl var noe lavere enn hos egg vasket med ionebaserte løsninger. Forskjellen mellom de andre lagringsmediene var minimale (Figur 5). Vasking og lagring med ulike medier hadde imidlertid en større effekt på overlevelse (Figur 6). Overlevelse hos egg vasket med NaCl var betydelig lavere enn hos egg som ble vasket med Cort +, men forskjellen var mindre mellom NaCl og Cort -. Vasking med Cort + ble evaluert til å gi best resultat ved bruk av alle indikatorene for eggkvalitet og var ikke forskjellig fra det som ble funnet for OF. Disse observasjonene indikerer også sterkt at vaskeprosessen i seg selv ikke har hatt noen effekt på eggkvalitet. Osmolalitet i de ulike løsningene var tilnærmet lik (280-290mOsm/kg<sup>-1</sup>) og godt innenfor det en finner i naturlig ovarievæske og i et område som er urelatert til eggkvalitet (Lahnsteiner et al., 1994) Ionesammensetning i vaske- og lagringsløsningene ser derfor ut til å være av vesentlig betydning for god eggkvalitet. Når det gjelder de spesifikke løsningene så hadde NaCl løsningen en pH som var på ca. 7,5, mens Cort + og Cort - hadde begge en pH på omtrent 8,4 (Tabell 1). En lav pH kan være en faktor som forårsaker at vasking og lagring med NaCl gir lavere overlevelse, siden pH i OF fra laksefisk vanligvis er høyere enn 8 (Rosengrave et al., 2009). En slik pH samsvarer i tillegg bedre med den som ble brukt i Cort + og Cort - løsningene. NaCl løsningen mangler også viktige forbindelser som er identifisert i OF fra laksefisk, noe som samsvarer bedre med sammensetningen til de andre ionebaserte løsningene. Ubefrukta egg som hadde blitt lagret i NaCl ble assosiert med lav overlevelse (Figur 6). Høyt uttrykk av de fleste genene i NaCl gruppen kan som tidligere nevnt være relatert lav translasjon, men dette er spekulativt. Dette samsvarer med observert uttrykk hos de fleste gen, da høyt uttrykk fra NaCl lagrede egg kan rapporteres (Figur 8 til 12). NaCl hadde høyt uttrykk i forhold til de fleste andre lagringsmedier. Det er en tydeligere sammenheng med lav overlevelse og genuttrykk, men sammenhengen er ikke gjensidig for alle. Cyclin hadde høyt uttrykk ved kort lagringstid, mens uttrykket ble lavere med økende (Figur 12). For IGF-3 ble det påvist signifikans og samsvarer med lavere uttrykk ved 0 timer lagring mot 96 (Figur 9).

Cort + er et medie som er basert på OF fra teleost fisk (Goetz, 1999). Den ioniske sammensetningen, osmolalitet, energisubstrat (glukose) og pH er tilnærmet lik som identifisert i OF hos salmonider (Goetz, 1999). Det er imidlertid flere substanser som finnes i OF og som ikke er blitt tilsatt Cort +. Dette inkluderer blant annet aminosyrer (Hajirezaee et al., 2017), proteiner (Jensen et al., 1984) samtidig som den har høyere viskositets (Rosengrave et al., 2009). Tidligere studier har vist at det er mulig å lagre ubefrukta egg fra regnbueørret i kunstig medie (modifisert Cortlandløsning) og at lagring i kunstig medie har faktisk gitt bedre resultater enn lagring i naturlig OF (Goetz, 1999). Det viste seg at det var en høyere overlevelse til øyerognstadiet hos egg som hadde blitt lagret i modifisert Cortlandløsning, i forhold til overlevelse hos egg som hadde blitt lagret i OF (Goetz, 1999). Dette tyder på at det er mulig for egg å utvikle seg, selv om lagringsmediet mangler substanser som er funnet i OF. Dette samsvarer med resultatene fra denne undersøkelsen, hvor overlevelse var høyere for egg lagret i Cort + frem til og med 48 timer lagring (Figur 6). Det at Cort + mangler substanser som er identifisert hos naturlig OF har trolig påvirket lagringskapasiteten til egg over 48 timer. Andre forsøk har vist at kunstig løsning kan være bedre enn OF, men at OF ofte er bedre ved lengre lagring (Bahabadi et al., 2011) og dette samsvarer med funn som er gjort fra denne undersøkelse. Bahabadi et al. (2011) har imidlertid også vist at OF har vært bedre enn kunstig løsning ved lagring av ubefrukta egg. I dette tilfellet ble den kunstige løsningen basert på Wolf and Quimby (1969), men natriumfosfat og bikarbonat hadde blitt utelatt. I tillegg hadde løsningen fått tilsatt antibiotika (penicillin og streptomycin). Behandling med Cort + resulterte ikke i en klar sammenheng mellom genuttrykk og eggkvalitet. Genuttrykk varierer i stor grad mellom de ulike gen, men i likhet med OF så resulterte lagring i Cort + med et relativt lavt genuttrykk for de fleste gen. IGF-3 hadde en uventet utvikling fra hva som ble spekulert, da Cort + har blitt assosiert med god eggkvalitet frem til 48 timer lagring (Figur 6). IGF-3 hadde et veldig høyt genuttrykk ved kort lagringstid, med lavere utvikling av genuttrykk med økende lagringstid (Figur 9). For IGF-3 ble det påvist en signifikant effekt av lagringstid, som samsvarte med lavt uttrykk ved 24 timer mot 0 timer lagring (Figur 9).

Lagring av egg i Cort - ble gjennomført for å undersøke betydningen som  $Ca^{2+}$  har for normal utvikling hos egg fra atlantisk laks. Kalsium er et viktig mineral og deltar i flere viktige prosesser som fertilisering/aktivering (Velsen, 1980) og fungerer som et viktig signalmolekyl som deltar i initiering av blant annet embryonal utvikling ved befruktning (Créton et al., 1998). Tidligere studier har vist at konsentrasjonen av intracellulært  $Ca^{2+}$  er vanligvis lav,

men at mengde  $\text{Ca}^{2+}$  fluktuierer og kan gjennom ulike intracellulære kaskadereaksjoner aktivere ulike cellulære prosesser (Créton et al., 1998). Forsøk på sebrafisk har rapportert at en kalsiumbølge aktiverer egget, men at aktivering ikke nødvendigvis må skje ved interaksjon med en spermie (Lee et al., 1999). Fertilisering er også avhengig av tilstedeværelse av divalente ioner som  $\text{Ca}^{2+}$ . I dette forsøket kan det rapporteres at aktivering av egg som hadde blitt lagret i Cort - var relativt høy ved alle lagringstidspunkt (Figur 5). I likhet med Cort + så mangler Cort - flere viktige substanser som er blitt identifisert hos OF, men en viktig forskjell er at Cort - i tillegg mangler tilsettelse av  $\text{Ca}^{2+}$ . Aktivering ved lagring i Cort - var noe lavere, men det var ingen tydelige forskjeller (Figur 5). Overlevelse til 120 døgngader og øyerogn avslørte at vasking og lagring i Cort - førte til en betydelig redusert evne til å opprettholde en høy overlevelse. Denne effekten ble tydelig over lagringstid (Figur 6 og 7). En mulig effekt er at egg har tapt  $\text{Ca}^{2+}$  til løsningen, da konsentrasjon av  $\text{Ca}^{2+}$  på innsiden av egg var høyere enn konsentrasjon av  $\text{Ca}^{2+}$  i miljøet utenfor. Denne effekten i tillegg til effekt av manglende substanser har trolig ført til redusert overlevelse.  $\text{Ca}^{2+}$  er et viktig signalmolekyl som deltar i kaskadereaksjoner som er med på å aktivere cellulære prosesser (Velsen, 1980) og en av disse er celledeling (Créton et al., 1998). Gitt den sterke sammenhengen mellom begynnende celledeling og overlevelse til 120 døgngader (Valan Moen, 2020) er det grunn til å anta at manglende  $\text{Ca}^{2+}$  i Cort - og NaCl løsningene har bidratt sterkt til den reduserte overlevelsen som ble observert for disse mediene. Cort - var den eneste behandlingen som hadde en utvikling på genuttrykk som passet med spekulasjon om redusert translasjon og denne utviklingen var gjensidig for alle genuttrykk. Behandling med Cort - ble assosiert med lavere overlevelse over tid, men hadde noe høyere overlevelse ved kort lagring. Cort - var det eneste mediet hvor antallet var 8, for de fleste andre genuttrykk så var antallet lavere. For Cort - ble det påvist signifikans for IGF-3 for lagringstid mellom 96- mot 0 timer lagring og samsvarer med lavere uttrykk observert ved 96 timer (Figur 9). Det ble i tillegg påvist signifikans for Npm2, hvor uttrykket var betydelig høyere ved 96- mot 48 timer lagring (Figur 10). Uttrykket av maternale gener som en indikator for embryonalt utviklingspotensial har i den senere tid fått et større fokus. Enkelte genuttrykk har vist seg å potensielt kunne være markører for eggkvalitet, men for å virkelig kunne gi forutsigbare data så må en molekylær markør bli validert på et stort antall biologiske prøver (Lubzens et al., 2016). Spesielt når det meldes om at uttrykk viser en dynamisk trend for som følge av post ovulatorisk aldring (Bizuyehu et al., 2019). Dette var også en observasjon som kan rapporteres fra denne undersøkelsen, da varierende genuttrykk ble rapportert over lagringstid. Det er viktig å poengtere ut at maternale

deponerte mRNA kan ha forskjellig mengde under modning av oocytten og at økning i uttrykk kan være relatert til varierende innhold i individuelle egg (Bizuayehu et al., 2019). Et individuelt egg representerer en unik enhet og at egg tatt fra samme hunnfisk ikke nødvendigvis har identisk komposisjon av maternalt mRNA. Relasjon til genuttrykk av utvalgte gener mot eggkvalitet har i den senere tid fått et større fokus, men rapporterte funn så langt viser at det er foreløpig vanskelig å avgjøre eggkvalitet kun basert på mengde med transkripsjoner (Bizuayehu et al., 2019). Dette er en observasjon som også samsvarer med denne undersøkelse, da ingen klare, sammenhengende trender kunne rapporteres, utenom Cort - som hadde tilsvarende trend for alle gener.

## 5. Konklusjon

Forsøket har vist at ubefrukta egg fra atlantisk laks kan lagres i opp til 96 timer i OF uten å miste befruktningsevne. Egg lagret i Cort + hadde godt befruktningsevne frem til 48 timer lagring. Egg lagret i Cort - hadde kraftig redusert befruktningsevne etter 24 timer lagring. Egg lagret i NaCl hadde en dramatisk redusert befruktningsevne etter 24 timer lagring. Resultatene viste at OF gir det klart beste miljøet og ivaretar god eggkvalitet over tid. Vasking med NaCl og Cort - hadde en negativ effekt på embryonalutvikling. Uttrykk av maternale gener viste ingen klar relasjon til eggkvalitet. Lagring i NaCl løsningen gav gjennomgående det høyeste uttrykket for de fleste genene som ble undersøkt. Samtidig gav lagring i NaCl den klart dårligste eggkvaliteten. Om det finnes en molekylær mekanisme som kan forklare et eventuelt inverst forhold mellom maternalt genuttrykk og eggkvalitet er uklart.



## Referanser

- Abdi, H. & Williams, L. J. 2010. Newman-Keuls Test and Tukey Test.
- Abdoli, A., Pont, D. & Sagnes, P. 2005. Influence of female age, body size and environmental conditions on annual egg production of the bullhead. 67. Available: <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00829.x> [Accessed 02.09.2020].
- Aegerter, S. & Jalabert, B. 2004. Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. 231. Available: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.08.019> [Accessed 08.06.2020].
- Aslaksen, P. 2016. *Fiksering* [Online]. Store Norske Leksikon: Universitetet i Oslo. Available: <https://snl.no/fiksering> [Accessed 10.08.2020 2020].
- Bahabadi, M. N., Shoaie, A. & Lokman, P. M. 2011. Effects of storage time, sex steroids and media composition on egg viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 315. Available: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.026> [Accessed 03.08.2020].
- Berishvili, G., Baroiller, J.-F., Eppler, E. & Reinecke, M. 2010. Insulin-like growth factor-3 (IGF-3) in male and female gonads of the tilapia: Development and regulation of gene expression by growth hormone (GH) and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2). 167. Available: DOI: 10.1016/j.ygcen.2010.01.023 [Accessed 03.06.2020].
- Biovitenskap, I. F. 2011a. *Cytoplasma* [Online]. <https://www.mn.uio.no>: Universitetet i Oslo. Available: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/c/cytoplasma.html> [Accessed 20.08 2020].
- Biovitenskap, I. F. 2011b. *PCR* [Online]. Online: Institutt for biovitenskap. Available: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html> [Accessed 14.06.2020 2020].
- Biovitenskap, I. F. 2019. *Kroppstemperatur* [Online]. Institutt for biovitenskap: Universitetet i Oslo. Available: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/k/kroppstemperatur.html> [Accessed 02.09.2020 2020].
- Bizuayehu, T., Mommens, M., Sundaram, A. Y. M., Dhanasiri, A. K. S. & Babiak, I. 2019. Postovulatory maternal transcriptome in Atlantic salmon and its relation to developmental potential of embryos. 20. Available: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5667-4> [Accessed 14.08.2020].
- Bobe, J. 2015. Egg quality in fish: Present and future challenges. Available: Doi:10.2527/af.2015-0010 [Accessed 21.08.2020].
- Bouleau, A., Desvignes, T., Traverso, J. M., Nguyen, T., Chesnel, F., Fauvel, C. & Bobe, J. 2014. Maternally Inherited npm2 mRNA Is Crucial for Egg Developmental Competence in Zebrafish. 91. Available: DOI: 10.1095/biolreprod.114.119925 [Accessed 08.06.2020].
- Brøgger, A. 2018. *Blastomerer* [Online]. Store Norske Leksikon. Available: <https://snl.no/blastomerer> [Accessed 20.08.2020 2020].
- Cheung, C. T., Pasquier, J., Bouleau, A., Nguyen, T., Chesnel, F., Guiguen, Y. & Bobe, J. 2018. Double maternal-effect: duplicated nucleoplasmic 2 genes, npm2a and npm2b, with essential but distinct functions are shared by fish and tetrapods. 18. Available: DOI: 10.1186/s12862-018-1281-3 [Accessed 09.06.2020].

- Cosson, J. 2019. Fish Sperm Physiology: Structure, Factors Regulating Motility, and Motility Evaluation. Available: DOI: 10.5772/intechopen.85139.
- Coward, K. & Parrington, J. 2002. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. 12. Available: DOI: 10.1023/A:1022613404123 [Accessed 10.08.2020].
- Créton, R., Speksnijder, J. E. & Jaffe, L. F. 1998. Patterns of free calcium in zebrafish embryos. 111. Available: <https://jcs.biologists.org/content/111/12/1613.long> [Accessed 11.06.2020].
- Dietrich, M., Dabrowski, K., Arslan, M. & Ware, K. 2012. Quantifying quality attributes of walleye eggs prior to fertilization—Impact of time of ovulation and gametes storage. 38. Available: DOI: 10.1016/j.jglr.2012.06.009 [Accessed 09.06.2020].
- Eivers, E., McCarthy, K., Glynn, C., Nolan, C. M. & Byrnes, L. 2004. Insulin-like growth factor (IGF) signalling is required for early dorso-anterior development of the zebrafish embryo. 48. Available: DOI: 10.1387/ijdb.041913ee [Accessed 04.05.20].
- Fleming, I. A. & Einum, S. 2011. Reproductive Ecology: A Tale of Two Sexes. In: AAS, Ø., EINUM, S., KLEMETSEN, A. & SKURDAL, J. (eds.) *Atlantic Salmon Ecology*. Blackwell Publishing Ltd.
- Fossum, S. 2019. *Syklín* [Online]. Store Norske Leksikon: Universitetet i Oslo. Available: <https://sml.snl.no/syklín> [Accessed 22.08.2020 2020].
- Frøslie, K. F. 2017. *Variansanalyse* [Online]. Store Norske Leksikon: NMBU - Norges Miljø- og Biovitenskapelig Universitet. Available: <https://snl.no/variansanalyse> [Accessed 12.08.2020 2020].
- Ghittino, P. 2009. The present and the future for artificial fertilization in fish-farming. 47. Available: <https://doi.org/10.1080/1125000800943869> [Accessed 02.09.2020].
- Ginatullina, E. & Komrakova, M. H., Wolfgang. 2017. Chilled storage of unfertilized and fertilized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs in sealed polyethylene bags at different temperatures. 484. Available: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.028> [Accessed 07.07.2020].
- Goetz, F. C., Margaret. 1999. Storage of unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in artificial media. 184. Available: DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00327-0 [Accessed 08.07.2020].
- Hajirezaee, S., Khara, H., Elmdoust, A. A., Rafieepour, A. & Rahimi, R. 2017. Effects of egg aging on the metabolites of ovarian fluid in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Available: <https://doi.org/10.1111/are.13438> [Accessed 14.06.].
- Hartnett, L., Glynn, C., Nolan, C. M., Grealy, M. & Byrnes, L. 2010. Insulin-like growth factor-2 regulates early neural and cardiovascular system development in zebrafish embryos. 54. Available: DOI: 10.1387/ijdb.092922lh
- Havforskningsinstituttet. 2019a. *Laks* [Online]. Havforskningsinstituttet Available: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/laks> [Accessed 07.07.2020 2020].
- Havforskningsinstituttet. 2019b. *Laks i oppdrett* [Online]. Havforskningsinstituttet. Available: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/laks/laks-i-oppdrett> [Accessed 07.07.2020 2020].
- Holck, P. 2020. *Ektoderm* [Online]. Store Norske Leksikon: Universitetet i Oslo. Available: <https://sml.snl.no/ektoderm> [Accessed 20.08.2020 2020].
- Ingerslev, H. J., Pettersen, E. F., Jakobsen, R., Aakre, & Petersen, C. B. 2006. Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (*Salmo salar* L). 43. Available: DOI: 10.1016/j.molimm.2005.07.009 [Accessed 30.08.20].
- Institutt for Biovitenskap. 2011. *Saltvann* [Online]. Online: Det matematisk-naturvitenskapelig fakultet. Available:

- <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/s/saltvann.html>  
[Accessed 14.06.20 2020].
- Jensen, J. O. T. & Alderdice, D. F. 1984. Effect of temperature on short-term storage of eggs and sperm of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). 37. Available:  
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90158-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90158-3) [Accessed 02.09.2020].
- Johnsen, H. K. 2020. Zeitgeber. In: ØEN, M. (ed.).
- Johnson, S. L., Villarroel, M., Rosengrave, P., Carne, A., Kleffmann, T., Lokman, P. M. & Gemmell, N. J. 2014. Proteomic Analysis of Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) Ovarian Fluid. Available: DOI: 10.1371/journal.pone.0104155 [Accessed 01.07.2020].
- Jørgensen, A. P. 2018. *Follikelstimulerende hormon* [Online]. Store Medisinske Leksikon: Oslo Universitetssykehus. Available: [https://sml.snl.no/follikelstimulerende\\_hormon](https://sml.snl.no/follikelstimulerende_hormon) [Accessed 30.08 2020].
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. [Accessed 20.08.2020].
- Kirkman, T. W. 1996. *Statistics to Use: Kolmogorov-Smirnov test* [Online]. GraphPad: <http://www.physics.csbsju.edu/stats/KS-test.html>. Available: [https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/interpreting\\_results\\_kolmogorov-smirnov\\_test.htm](https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/interpreting_results_kolmogorov-smirnov_test.htm) [Accessed 10.02.2010 2010].
- Kjørsvik, E., Pittman, K. & Pavlow, D. 2004. *From Fertilisation to the End of Metamorphosis - Functional Development* Online, Blackwell publishing.
- Komrakova, M. & Holtz, W. 2010. Storage of unfertilized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs in sealed polyethylene (PE) bags. 313. Available: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.01.009> [Accessed 20.05.2020].
- Kunz, Y. W. 2004. *Developmental biology of Teleost Fishes*, Springer Netherlands, Dordrecht.
- Laale, H. W. 1980. The Perivitelline Space and Egg Envelopes of Bony Fishes: A Review 2. Available: DOI: 10.2307/1443999 [Accessed 02.09.2020].
- Lahnsteiner, F. 2002. The influence of ovarian fluid on the gamete physiology in the Salmonidae., 27. Available: <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000021792.97913.2e>.
- Lahnsteiner, F. W., T & Patzner, R. A. 1994. Composition of the ovarian fluid in 4 salmonid species: *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta flacustris*, *Salvelinus alpinus* and *Hucho hucho*. 35. Available: DOI: 10.1051/rnd:19950501 [Accessed 20.07.20].
- Lee, K. W., Webb, S. E. & Miller, A. L. 1999. A Wave of Free Cytosolic Calcium Traverses Zebrafish Eggs on Activation. 214. Available: <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9396> [Accessed 14.06.2020].
- Lubzens, E., Bobe, J. & Sullivan, C. V. 2016. Maternal investment in fish oocytes and eggs: The molecular cargo and its contributions to fertility and early development. Available: DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.10.029 [Accessed 15.08.2020].
- Mackenzie, R. J. 2018. One-Way vs Two-Way ANOVA: Differences, Assumptions and Hypotheses. Available: <https://www.technologynetworks.com/informatics/articles/one-way-vs-two-way-anova-definition-differences-assumptions-and-hypotheses-306553>.
- Mahajan, A. 2016. Post hoc tests in analysis of variance. 20. Available: DOI: 10.4103/0019-5278.197552 [Accessed 12.08.2020].
- Mansour, N., Lahnsteiner, F. & Patzner, R. A. 2009. Ovarian fluid plays an essential role in attachment of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* eggs. 71. Available: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.039> [Accessed 05.07.2020].

- Martinsen, L. 2019. *Gener* [Online]. Store Norske Leksikon: Universitetet i Oslo. Available: <https://snl.no/gener> [Accessed 01.06.2020 2020].
- Mccormick, S. D., Hansen, L. P., Quinn, T. P. & Saunders, R. L. 1998. Movement, migration, and smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*). 55. Available: <https://doi.org/10.1139/d98-011> [Accessed 02.09.2020].
- Mchugh, M. L. 2011. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. 21. Available: 10.11613/BM.2011.029 [Accessed 13.08.2020].
- Misund, B. 2019. *Fiskeoppdrett* [Online]. Store Norske leksikon. Available: <https://snl.no/fiskeoppdrett> [Accessed 30.03.2020 2020].
- Mommens, M., Storset, A. & Babiak, I. 2015. Some quantitative indicators of postovulatory aging and its effect on larval and juvenile development of Atlantic salmon (*Salmo salar*). 84. Available: DOI: 10.1186/s12864-019-5667-4 [Accessed 02.09.2020].
- Nakayama, Y. & Yamaguchi, N. 2013. *Role of Cyclin B1 Levels in DNA Damage and DNA Damage-Induced Senescence* [Online]. International Review of Cell and Molecular Biology: Elsevier Inc. Available: DOI: 10.1016/B978-0-12-407695-2.00007-X [Accessed 20.08.2020 2020].
- Nynca, J., Arnold, G. J., Fröhlich, T. & Ciereszko, A. 2014. Shotgun proteomics of rainbow trout ovarian fluid. 27. Available: DOI: 10.1071/RD13224 [Accessed 08.06.20].
- Ratikainen, I. I. 2014. *evolusjonær økologi* [Online]. Store Norske Leksikon: NTNU - Norges Tekniske-Naturvitenskapelige Universitet. Available: [https://snl.no/evolusjon%C3%A6r\\_%C3%B8kologi](https://snl.no/evolusjon%C3%A6r_%C3%B8kologi) [Accessed 19.08.20 2020].
- Rollinson, N. & Hutchings, J. 2010. Why does egg size increase with maternal size? Effects of egg size and egg density on offspring phenotypes in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). 12. Available: <https://www.researchgate.net/publication/228484737> [Accessed 19.08.2020].
- Rong, Y., Ji, S.-Y., Zhu, Y.-Z., Wu, Y.-W., Shen, L. & Fan, H.-Y. 2019. ZAR1 and ZAR2 are required for oocyte meiotic maturation by regulating the maternal transcriptome and mRNA translational activation. 47. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31598710/> [Accessed 10.06.2020].
- Rosengrave, P., Taylor, H., Montgomerie, R., Metcalf, V., McBride, K. & Gemmell, N. J. 2009. Chemical composition of seminal and ovarian fluids of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility traits. 152. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18835457/> [Accessed 20.06].
- Shyu, A. B., Wilkinson, M. F. & Hoof, A. V. 2008. Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. 27. Available: doi:10.1038/sj.emboj.7601977.
- Sjømatrådet. 2020. *Sjømateksport for 107,3 milliarder kroner i 2019* [Online]. <https://seafood.no>: Norges sjømatråd. Available: <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sjomateksport-for-1073-milliarder-kroner-i-2019/> [Accessed 03.03.2020 2020].
- Sullivan, C. V., Chapman, R. W., Reading, B. J. & Anderson, P. E. 2015. Transcriptomics of mRNA and egg quality in farmed fish: Some recent developments and future directions. 221. Available: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.02.012> [Accessed 02.08.2020].
- Thorstad, E. B., Whoriskey, F., Rikardsen, A. H. & Aarestrup, K. 2011. Aquatic Nomads: The Life and Migrations of the Atlantic Salmon. In: AAS, Ø., EINUM, S., KLEMETSEN, A. & SKURDAL, J. (eds.) *Atlantic Salmon Ecology*. 1 ed.: Blackwell Publishing Ltd.
- Tucker, J. W. 1998. Handling and Transporting Marine Fish. Available: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4911-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4911-6_12).
- Upton, G. & Cook, I. 2008. *A Dictionary of Statistics*, Oxford University Press.

- Velsen, F. P. J. 1980. Embryonic Development in Eggs of Sockeye Salmon, *Oncorhynchus nerka*. 49. [Accessed 19.08.20].
- Vijayalakshmy, K., Pradeep, K. & Dharmendra, K. 2018. Different Methods of Assessing Semen Quality. 5. [Accessed 02.09.2020].
- Vøllestad, A. 2019. *Laks* [Online]. Online: Store Norske Leksikon. Available: <https://snl.no/laks> [Accessed 06.06.20 2020].
- Warton, D. I. & Hui, F. K. C. 2011. *The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology* [Online]. Ecology. Available: DOI: 10.2307/29779568 [Accessed 30.08.2020 2020].
- Williams, W. D. & Mann, K. H. 2014. *Inland water ecosystem* [Online]. Online: Encyclopædia Britannica, inc. Available: <https://www.britannica.com/science/inland-water-ecosystem> [Accessed 08.06.20 2020].
- Winata, C. L. & Korzh, V. 2018. The translational regulation of maternal mRNAs in time and space. 592. Available: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13183> [Accessed 04.09.2020].
- Wolf, K. & Quimby, M. C. 1969. 5 Fish Cell and Tissue Culture. 3. Available: [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60115-6](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60115-6) [Accessed 05.10.2020].
- Wu, X., Wang, P., Brown, C. A., Zilinski, C. A. & Matzuk, M. M. 2003. Zygote Arrest 1 (Zar1) Is an Evolutionarily Conserved Gene Expressed in Vertebrate Ovaries. 69. Available: DOI: 10.1095/biolreprod.103.016022 [Accessed 18.06.2020].
- Zadmajid, V., Myers, J. N., Sørensen, S. R. & Ernest Butts, I. A. 2019. Ovarian fluid and its impacts on spermatozoa performance in fish: A review. Available: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.021> [Accessed 20.05.20].
- Åbro, A. 2019. *Chorion* [Online]. Store Norske Leksikon. Available: <https://snl.no/chorion> [Accessed 20.08 2020].
- Åsvold, B. O. 2018. *insulinliknende vekstfaktorer* [Online]. Store Medisinske Leksikon: Norges teknisk-Naturvitenskapelig Universitet. Available: [https://sml.snl.no/insulinliknende\\_vekstfaktorer](https://sml.snl.no/insulinliknende_vekstfaktorer) [Accessed 07.06.2020 2020].

## Vedlegg 1

Tabell 8: Overlevelse til 120 døggrader for F1 - F8.

F1	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
<b>0</b>	50	49	39	41	50	49	38	42
<b>24</b>	47	48	2	1	48	43	3	16
<b>48</b>	50	49	0	0	34	35	31	6
<b>96</b>	38	48	0	0	0	3	3	2

F2	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
<b>0</b>	47	45	38	23	49	50	46	13
<b>24</b>	46	48	1	0	48	43	6	12
<b>48</b>	50	48	0	0	24	22	1	5
<b>96</b>	21	18	0	0	0	0	0	0

F3	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
<b>0</b>	47	49	38	32	46	49	35	32
<b>24</b>	26	19	7	17	42	48	36	39
<b>48</b>	47	49	6	5	43	43	28	11
<b>96</b>	35	37	0	0	12	10	3	5

F4	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
<b>0</b>	42	41	17	29	45	43	37	18
<b>24</b>	39	46	9	8	40	48	25	25
<b>48</b>	37	42	10	4	22	40	11	32
<b>96</b>	21	25	4	0	3	7	0	1

F5	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
0	30	34	19	34	36	26	17	30
24	44	45	3	5	47	42	33	23
48	47	47	0	0	30	24	11	6
96	45	46	0	0	8	4	14	8

F6	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
0	30	32	14	27	31	39	32	26
24	43	48	11	7	47	38	36	29
48	36	43	1	1	46	46	15	19
96	39	35	0	3	43	41	28	16

F7	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
0	38	40	44	31	43	37	40	39
24	38	36	10	9	44	31	29	30
48	44	41	14	13	44	46	14	25
96	33	39	7	1	25	30	14	12

F8	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
0	46	43	45	40	45	48	38	48
24	43	42	4	1	45	46	27	31
48	46	40	1	0	50	40	14	18
96	42	45	0	0	19	43	14	8

## Vedlegg 2

Tabell 9: Overlevelse til øyerognstadiet for F1 - F8.

F1	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
<b>0</b>	48	46	45	40	45	50	44	45
<b>24</b>	50	47	2	0	49	50	20	22
<b>48</b>	49	47	0	0	32	33	14	8
<b>96</b>	48	23	0	0	1	1	0	1

F2	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
<b>0</b>	40	41	39	23	48	46	42	18
<b>24</b>	46	44	1	0	46	46	4	6
<b>48</b>	48	42	0	0	32	23	0	0
<b>96</b>	20	7	0	0	0	0	0	0

F3	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
<b>0</b>	44	39	36	39	46	49	40	30
<b>24</b>	20	21	8	11	41	47	35	40
<b>48</b>	49	50	6	13	44	36	23	10
<b>96</b>	37	37	0	0	21	8	6	6

F4	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
<b>0</b>	39	43	18	27	41	43	33	29
<b>24</b>	42	44	2	4	38	45	29	25
<b>48</b>	33	40	8	2	19	34	13	27
<b>96</b>	17	41	0	0	2	2	0	0



F5	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
0	25	26	26	29	16	18	13	33
24	48	40	0	0	43	46	30	12
48	39	49	0	0	20	21	10	6
96	44	43	0	0	6	0	4	7

F6	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
0	37	26	7	28	32	46	30	26
24	43	38	9	4	41	43	38	33
48	44	38	0	0	46	45	16	19
96	33	32	0	0	28	32	12	13

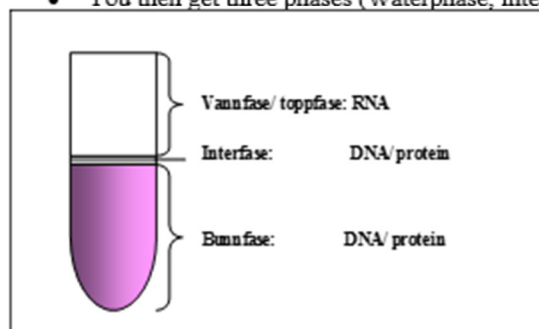
F7	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
0	39	42	41	34	40	41	44	41
24	25	34	6	7	39	25	21	17
48	40	42	0	0	34	37	16	22
96	15	28	0	0	18	39	5	4

F8	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
0	42	46	38	37	48	48	44	48
24	37	46	0	0	44	45	36	31
48	45	39	0	0	49	39	18	21
96	39	44	0	0	18	39	5	4

## Vedlegg 3

### Trizol method:

- Magnetic beads in 2ml tube
- Add organ/egg and 1000  $\mu$ l Trizol (non-filtered tips)
- Homogenize and vortex
- Centrifuge at 12000 rpm/ 10 min/ 4 °C
- Pipette the supernatant (non-filtered tips) to new tube and continue with this.
- Add 500  $\mu$ l pre-cooled chloroform (4 °C)
- Vortex 15 sec
- Incubate for 5 min. at room temp.
- Centrifuge at 12000 rpm/ 15 min/ 4 °C
- You then get three phases (Waterphase, interphase and bottom phase)



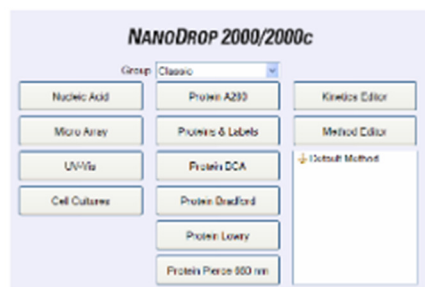
- Transfer the water phase (500  $\mu$ l if possible) to new tube and go on with this. **Avoid the interphase!** (filtered tips)
- Add 500  $\mu$ l Trizol and 200  $\mu$ l chloroform
- Vortex 15 sec
- Incubate for 5 min. at room temp.
- Centrifuge at 12000 rpm/ 15 min/ 4 °C
- You then get three phases (Waterphase, interphase and bottom phase)
- Transfer the water phase (500  $\mu$ l if possible) to new tube (DNA Lobind tube) and go on with this. **Avoid the interphase!** (filtered tips)
- Add 500  $\mu$ l precooled (-20 °C) isopropanol (2-propanol).
- Vortex
- Incubate at -20° C/ 30 min or longer (over night is ok)
- Centrifuge at 12000 rpm/ 10 min/ 4 °C
- Remove the isopropanol. **Do not lose the pellet!** (non-filtered tips)
- Wash the pellet in 1 ml 80% etOH (use nuclease free water for the dilution)
- Centrifuge at 10000 rpm / 5 min
- Remove the etOH. **Do not lose the pellet!** (non-filtered tips)
- Dry the pellet (it is important to evaporate all etOH)
- Dissolve pellet in 30  $\mu$ l Nuclease free water
- Incubate at 55 °C for 10 min
- Continue with DNase treatment /Freeze at -80 °C (Mark the samples so you know they are not DNase treated yet).
- Nanodrop after DNase treatment.

## Vedlegg 4

### Thermo Scientific NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometers

#### Quick Start

1. Double click on the desktop NanoDrop™ 2000 software icon and select the application of interest. Follow the prompts for instrument initialization.
2. Ensure **Add to report** is selected in the left pane to automatically include all measurements in the saved report.
3. Establish a Blank using the appropriate buffer. Pipette 1-2 ul of the blanking buffer onto the bottom pedestal, lower the arm and click the **Blank** button. The blank solution is generally the same buffer that the molecule of interest is suspended or dissolved in.
  - For the NanoDrop 2000c model, select the **Use cuvette** box to make measurements with a cuvette.
  - Insert the cuvette noting the direction of the light path indicated by the etched arrow.
  - The arm must be down for all measurements-including measurements made with cuvettes.
  - The optical path is directed 8.5 mm above the bottom of the cuvette. Refer to the manufacturer for volume recommendations.
4. Wipe away the blank and enter the sample ID in the appropriate field. Pipette 1-2 ul of sample and hit **Measure**.
  - It is recommended that a fresh aliquot of sample be used for each measurement.



Pedestal measurement



Cuvette measurement

#### After a measurement:

- Wipe both measurement pedestals using a dry, lint-free laboratory wipe and the instrument is ready for the next sample.
- When using the cuvette option, remove the cuvette, rinse thoroughly and dry between samples.

#### Blanking Cycle

It is generally recommended that an aliquot of the blanking buffer be measured as if it were a sample. This will confirm that the instrument is working well and that any sample dried down from previous measurements is not a concern. To run a blanking cycle, perform the following:

1. Load an aliquot of the blank onto the lower measurement pedestal and lower the sampling arm into the down position.
2. Click on the **Blank** button to store the blank reference.
3. Analyze a fresh replicate of the blank as though it were a sample by selecting **Measure**. The result should be a spectrum that varies no more than 0.04 A (10 mm absorbance equivalent).
4. Wipe the blank from both measurement pedestal surfaces and repeat the process until the spectrum is within 0.04 A (10 mm path).

Although it is not necessary to blank between each sample, it is recommended that a new blank be taken every 30 minutes when measuring many samples.

For Technical Support contact us at 302-479-7707 or send an email to [nanodrop@thermofisher.com](mailto:nanodrop@thermofisher.com).

**TURBO DNA-free™ Kit****TURBO DNase™ Treatment and Removal Reagents**

Catalog Number AM1907

Pub. No. 1907M Rev. H

**Product information****Product description**

TURBO DNA-free™ DNase Treatment and Removal Reagents are designed to remove contaminating DNA from RNA preparations, and subsequently remove DNase and divalent cations from the sample. The TURBO DNase™ enzyme is an engineered version of wild type DNase I with 350% greater catalytic efficiency and a markedly higher affinity for DNA than conventional DNase I, making it more effective in removing trace quantities of DNA contamination. TURBO DNase™ enzyme is also capable of maintaining up to 50X greater activity than DNase I in solutions at physiological salt concentrations.

The enzyme is expressed in an animal-free system, and extensively purified in a bovine-free process. It is guaranteed to lack contaminating RNase activity. The kit includes DNase reaction buffer containing a small molecule enhancer to extend the activity of the TURBO DNase™ enzyme by 100-fold or more.

Using TURBO DNA-free™, contaminating DNA is digested to levels below the limit of detection by routine PCR (See Fig. 1, page 4). The DNase is subsequently removed using a novel method which does not require phenol/chloroform extraction, alcohol precipitation, heating, or the addition of EDTA (See Tab. 1, page 4). In addition to removing the DNase enzyme, DNase Inactivation Reagent also removes divalent cations, such as magnesium and calcium, which can catalyze RNA degradation when RNA is heated with the sample (See Fig. 2, page 5).

TURBO DNA-free™ treated RNA is suitable for endpoint or real-time RT-PCR, microarray analysis, RPAs, northern blot, and all other RNA analysis methods.

**How much RNA can be treated with TURBO DNA-free™ reagents?**

This protocol is designed to remove trace to moderate amounts of contaminating DNA (up to 50 µg DNA/mL RNA) from purified RNA to a level that is mathematically insignificant by RT-PCR. No RNA isolation method can extract RNA that is completely free from DNA contamination; in fact, RNA isolated from some tissues, such as spleen, kidney, or thymus, often contain relatively high levels of DNA. Other potential sources of DNA contamination include carryover of the interface during organic extractions, and overloaded glass-fiber filters during RNA purification.

**Contents and storage**

Reagents are provided for 50 TURBO DNA-free™ treatments (up to 100 µL each).

Component	Amount	Storage
TURBO DNase™ Enzyme (2 Units/µL)	120 µL	-20°C
10X TURBO DNase™ Buffer	600 µL	
DNase Inactivation Reagent	600 µL	
Nuclease-free Water	1.75 mL	-20°C, 4°C, or room temperature

Store the TURBO DNA-free™ Kit at -20°C in a non-frost-free freezer for long-term storage. For convenience, the 10X TURBO DNase™ Buffer and the DNase Inactivation Reagent can be stored at 4°C for up to 1 week.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC



### Perform routine DNase treatment

1. Add 0.1 volume 10X TURBO DNase™ Buffer and 1  $\mu$ L of TURBO DNase™ Enzyme to the RNA, then mix gently.
2. Incubate at 37°C for 20–30 minutes.
3. Resuspend the DNase Inactivation Reagent by flicking or vortexing the tube before use.

**Note:** The DNase Inactivation Reagent may become difficult to pipette after multiple uses due to depletion of fluid from the interstitial spaces. If this happens, add a volume of Nuclease-free Water (supplied with the kit) equal to approximately 20–25% of the bed volume of the remaining DNase Inactivation Reagent, and vortex thoroughly to recreate a pipettable slurry.

4. Add resuspended DNase Inactivation Reagent (2  $\mu$ L or 0.1 volume, whichever is greater), then mix well.  
For example, if the RNA volume is 50  $\mu$ L, and 1  $\mu$ L of TURBO DNase™ was used in the previous step, add 5  $\mu$ L of DNase Inactivation Reagent.

---

**IMPORTANT!** Always use at least 2  $\mu$ L of DNase Inactivation Reagent, even if it is more than 0.1 volume.

---

5. Incubate the sample for 5 minutes at room temperature. Flick the tube 2–3 times during the incubation period to redispense the DNase Inactivation Reagent.

**Note:** If room temperature cools below 22–26°C, move the tubes to a heat block or oven to control the temperature. Cold environments can inhibit inactivation of the TURBO DNase™ Enzyme, leaving residual DNase in the RNA sample.

6. Centrifuge the samples, then carefully transfer the supernatant containing the RNA to a fresh tube. Do not disturb the pellet of DNase Inactivation Reagent.
  - Centrifuge microcentrifuge tubes at 10,000  $\times$  g for 1.5 minutes.
  - Centrifuge 96-well plates at 2000  $\times$  g for 5 minutes.

Avoid introducing the DNase Inactivation Reagent into solutions that may be used for downstream enzymatic reactions, because it can sequester divalent cations and change the buffer conditions.

### Perform rigorous DNase treatment

1. Dilute the sample to 10  $\mu$ g nucleic acid/50  $\mu$ L of total sample if possible.
2. Add 0.1 volume 10X TURBO DNase™ Buffer to the RNA, then mix gently.
3. Add TURBO DNase™ Enzyme to the RNA, then mix gently.

- Use 1  $\mu$ L of TURBO DNase™ Enzyme for diluted samples.
- Use 2–3  $\mu$ L (4–6 U) of TURBO DNase™ Enzyme for samples that cannot be diluted.

*(Optional)* DNase treatment can be enhanced by performing a two-step incubation. To perform two-step incubation, add half the amount of TURBO DNase™ Enzyme to the sample.

4. Incubate samples at 37°C for 20–30 minutes.

*(Optional)* If performing two-step incubation, incubate at 37°C for 30 minutes, then add the remaining half of the TURBO DNase™ Enzyme from the previous step, and incubate for another 30 minutes.

5. Resuspend the DNase Inactivation Reagent by flicking or vortexing the tube before use.

**Note:** The DNase Inactivation Reagent may become difficult to pipette after multiple uses due to depletion of fluid from the interstitial spaces. If this happens, add a volume of Nuclease-free Water (supplied with the kit) equal to approximately 20–25% of the bed volume of the remaining DNase Inactivation Reagent, and vortex thoroughly to recreate a pipettable slurry.

6. Add 0.2 volumes of resuspended DNase Inactivation Reagent, then mix well.
7. Incubate the sample for 5 minutes at room temperature. Flick the tube 2–3 times during the incubation period to redispense the DNase Inactivation Reagent.

**Note:** If room temperature cools below 22–26°C, move the tubes to a heat block or oven to control the temperature. Cold environments can inhibit inactivation of the TURBO DNase™ Enzyme, leaving residual DNase in the RNA sample.

8. Centrifuge the samples, then carefully transfer the supernatant containing the RNA to a fresh tube. Do not disturb the pellet of DNase Inactivation Reagent.
  - Centrifuge microcentrifuge tubes at 10,000  $\times$  g for 1.5 minutes.
  - Centrifuge 96-well plates at 2000  $\times$  g for 5 minutes.

Avoid introducing the DNase Inactivation Reagent into solutions that may be used for downstream enzymatic reactions, because it can sequester divalent cations and change the buffer conditions.

## Vedlegg 6


appliedbiosystems

PRODUCT INFORMATION SHEET

### High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit

Catalog Numbers 4387406 (50 reactions), 4388950 (500 reactions)

Pub. No. 4387949 Rev. D

 **WARNING!** Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support).

#### Contents and storage

Upon receipt, store the kit at -25°C to -15°C for maximum shelf life.

Contents	50 reactions	500 reactions	Storage
2X RT Buffer Mix (50 × 20-µL reactions)	500 µL	5 × 1000 µL	Store at 2°C to 8°C for up to 6 months, or -25°C to -15°C for long term storage.
20X RT Enzyme Mix (50 × 20-µL reactions)	50 µL	500 µL	Store at -25°C to -15°C.

#### Method

1. Use up to 2 µg of total RNA per 20-µL reaction.
2. Allow the kit components to thaw on ice.
3. Referring to the table below, calculate the volume of components needed to prepare the required number of reactions.

Component	Volume per reaction	
	+RT reaction	-RT control
2X RT Buffer Mix	10.0 µL	10.0 µL
20X RT Enzyme Mix	1.0 µL	—
RNA sample	up to 9 µL	up to 9 µL
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	Q.S. <sup>(1)</sup> to 20 µL	Q.S. <sup>(1)</sup> to 20 µL
Total per reaction	20.0 µL	20.0 µL

<sup>(1)</sup> Quantity Sufficient

4. Aliquot the RT reaction mix into a plate or tubes.
5. Seal the plates or tubes with the appropriate seal or caps.
6. Briefly centrifuge the plate or tubes to spin down the contents and to eliminate any air bubbles.
7. Place the plate or tubes on ice until you are ready to start the reverse transcription reaction.
8. Incubate the reaction for 37°C for 60 minutes. Stop the reaction by heating to 95°C for 5 minutes and hold at 4°C. For convenience, the incubation may be performed in a thermal cycler.
9. The cDNA is ready for use in real-time PCR applications or long-term storage in a freezer (-25°C to -15°C).

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

## Vedlegg 7

Tabell 10: Inkubasjonsprogram

<b>Steg</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Varighet</b>	<b>Antall sykluser</b>
Pre-PCR avlesning	50	2 min	Hold
Denaturering	95	4 min	Hold
Denaturering	95	15 sek	40
Amplifisering og ekstensjon	60	30 sek	40
Smeltekurve	95	15 sek	Kontinuerlig
	60	60 sek	
	95	30 sek	
	60	15 sek	

## Vedlegg 8

Tabell 11: Primer effektivitet

Gen	Sekvens (5'-3')	Genbank nr.	Effektivitet
$\beta$ -aktin - FP	CAGCCCTCCTTCCTCGGTAT	BT059604	2,03
$\beta$ -aktin - RP	CGTCACACTTCATGATGGAGTTG		
Ef1- $\alpha$ -FP	CGCCAACATGGGCTGG	AF321836	2,02
Ef1- $\alpha$ - RP	TCACACCATTGGCGTTACCA		
IGF2 - FP	GGAAAACACAAGAATGAAGGTCAA	EF432854	1,92
IGF2 - RP	CCACCAGCTCTCCTCCACATA		
IGF3 - FP	GACCGACCGACAAGATGCA	JN635414	1,95
IGF3 - RP	GCAAGGCACAATATGGAGTACA		
NPM2 - FP	AGAGAAGAGGCATAGGATTG	XM_014193616.1	1,88
NPM2 - RP	CAGAGGGTGAAAGGGAAA		
Zar 1 Like - FP	TTGAGTTACGAAGGAGATTGC	XM_014122963.1	1,98
Zar 1 Like - RP	GAGAATGCCAGAGAATGTAGAC		



# Vedlegg 9

Tabell 12: Embryonalutvikling i Sockeye lakse egg. Estimater for utvikling i forhold til døgngrader for celledeling, gastrulasjon og organogenesis (Velsen, 1980).

Stage	Characteristics	Time to reach stage																					
		5°C			6°C			7°C			8°C			9°C			10°C			11°C			
		Hours	Days	Degree-	Hours	Days	Degree-	Hours	Days	Degree-	Hours	Days	Degree-	Hours	Days	Degree-	Hours	Days	Degree-	Hours	Days	Degree-	
<b>Stages of development</b>																							
<b>Cleavage</b>																							
1	Fertilized egg, no cell division	15	0.6	3	13	0.6	3	12	0.5	3	10	0.4	3	9	0.4	3	8	0.3	3	7	0.3	3	
2	Two cells	25	1.0	5	21	0.9	5	18	0.7	5	15	0.6	5	13	0.5	5	11	0.5	5	10	0.4	5	
3	Four cells	30	1.3	6	26	1.1	7	23	1.0	7	21	0.9	7	18	0.7	7	15	0.6	6	14	0.6	6	
4	Eight cells	39	1.6	8	33	1.4	8	29	1.2	8	25	1.0	8	21	0.9	8	18	0.8	8	16	0.7	7	
5	Sixteen cells	46	1.9	10	40	1.7	10	35	1.5	10	31	1.3	10	26	1.1	10	22	0.9	9	19	0.8	9	
6	Thirty-two cells	56	2.3	12	49	2.1	12	42	1.8	12	38	1.6	13	32	1.3	12	27	1.1	11	23	1.0	11	
7	Early morula, numerous visible cells	64	2.7	13	56	2.3	14	49	2.0	14	43	1.8	14	38	1.6	14	33	1.4	14	30	1.2	14	
8	Late morula	120	5.0	25	100	4.2	25	84	3.5	24	71	2.9	24	61	2.5	23	52	2.2	22	45	1.9	21	
9	Start of blastodisc expansion	185	7.5	38	153	6.4	38	128	5.3	37	108	4.5	37	94	3.9	35	80	3.3	33	68	3.7	41	
10	Blastula																						
<b>Gastrulation</b>																							
11	Terminal caudal bud	1260	9	46	200	8.3	50	179	7.5	52	166	6.7	53	132	5.5	49	110	4.6	46	113	5.8	64	
12	Rough outline of embryo	1310	10	52	250	10	62	205	8.5	60	190	7.9	63	164	6.8	61	133	5.5	55	150	6.2	69	
13	1/3 epiboly, embryo clearly visible	380	16	79	325	13	81	285	12	83	245	10	82	205	8.5	77	175	7.3	73	150	6.2	69	
14	1/2 epiboly, first somites	550	23	115	450	19	112	380	16	111	310	13	103	280	12	105	235	9.8	98	212	8.8	97	
15	2/3 epiboly	600	25	125	515	21	129	440	18	128	345	14	115	320	13	120	280	12	117	233	9.7	107	
16	3/4 epiboly	630	26	131	550	23	137	470	20	137	375	16	125	340	14	127	290	12	121	250	10	115	
17	Blastopore closed	670	28	140	580	24	145	505	21	147	390	16	130	375	16	141	328	14	137	280	12	128	
<b>Organogenesis</b>																							
18	Caudal bud free	780	32	160	660	27	162	550	23	160	425	18	142	395	16	148	340	14	142	298	12	137	
19	Parts of brain distinct (metencephalon, myelencephalon)	805	33	165	670	28	167	590	25	172	455	19	152	400	17	150	350	15	146	325	13	149	
20	Heart beats	825	34	170	680	28	170	625	26	182	485	20	162	440	18	165	365	15	152	338	14	155	
21	Just eyed, 7/4 yolk vascularization	940	39	195	790	33	198	670	28	195	550	23	184	485	20	182	415	17	173	358	15	164	
22	2/3 yolk vascularization	1150	48	240	950	40	240	800	33	233	665	28	224	570	24	214	475	20	198	428	18	196	
23	Return of caudal blood supply to heart via only the cardinal veins																						
24	"Eyed", 3/4 yolk vascularization	1170	49	244	1030	43	238	895	37	261	780	32	256	740	31	277	645	27	269	530	22	243	
25	Caudal finray, anal fin started	1280	53	265	1100	46	275	965	40	281	820	34	272	740	31	277	650	27	271	575	24	264	
26	Operculum covers part of first branchial arch, dorsal fin started	1500	62	310	1260	52	315	1060	44	309	910	38	304	800	33	300	700	29	292	740	31	339	
27	Myotome buds in dorsal fin, operculum covers five branchial arch	1580	70	350	1330	55	332	1160	48	338	990	41	328	880	37	330	780	32	321	820	34	374	
28	Pelvic fin buds, indentation in caudal fin	1720	72	360	1490	62	372	1250	52	365	1105	46	368	950	40	356	820	32	325	870	36	396	
29	Operculum covers second branchial arch, rays in caudal fin																						
30	Hatching, operculum covers all arches	12040	85	425	1620	67	405	1450	69	401	1210	50	400	1080	50	450	1030	43	429	910	38	418	
	50% hatch	2510	105	523	2250	94	562	1810	75	528	1300	54	433	1140	56	502	1170	49	487	1030	43	472	
	50% hatch	2856	119	595	2550	106	636	2200	92	642	1920	80	640	1700	71	637	1500	62	625	1368	57	627	

## Vedlegg 10a

Tabell 13: Korrelasjon mellom overlevelse til 120 døgngader mot overlevelse til øyerognstadiet.

	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	r-verdi	P-verdi	r-verdi	P-verdi	r-verdi	P-verdi	r-verdi	P-verdi
<b>0</b>	0,69	0,06	0,27	0,52	0,74	0,04	-0,07	0,87
<b>24</b>	0,01	0,99	-0,004	0,99	0,59	0,12	-0,74	0,04
<b>48</b>	0,79	0,02	0,39	0,34	-0,27	0,52	-0,07	0,88
<b>96</b>	-0,46	0,25	0,06	0,88	0,38	0,35	-0,41	0,31

## Vedlegg 10b

Tabell 14: Korrelasjon mellom overlevelse til 120 døgngader mot aktivering av egg.

	OF		NaCl		Cort +		Cort -	
	r-verdi	P-verdi	r-verdi	P-verdi	r-verdi	P-verdi	r-verdi	P-verdi
<b>0</b>	0,89	0,003	0,95	< 0,001	0,88	0,004	0,99	< 0,001
<b>24</b>	0,95	< 0,001	0,92	0,001	0,94	0,001	0,78	0,022
<b>48</b>	0,88	0,004	0,31	0,461	0,89	0,003	0,89	0,003
<b>96</b>	0,81	0,015	-	-	0,96	< 0,001	0,90	0,002