



UiT Norges arktiske universitet

Norges fiskerihøgskole

Bortfall av kjønnsceller hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.) – effekter på vekst og uttrykk av gener som er sentrale i regulering av hypothalamus-hypofyse-gonade akse

Kristian Karlsen

Masteroppgave i Fiskeri- og havbruksvitenskap, Havbruk (60 stp), oktober 2020

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Norges fiskerihøgskole, Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Universitetet i Tromsø, i samarbeid med Nofima AS.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til min veileder Helge Tveiten for strålende veiledning gjennom hele dette prosjektet. Du har alltid tatt deg tid til å slå av en prat og din faglige kompetanse kombinert med din gode humor har gjort dette til et svært givende og lærerikt år for meg. Jeg vil også takke Helge K. Johnsen og Bjørn-Steinar Sæter for gode samtaler, og for god veiledning med både behandling av data og skriving. Dhivya Thiyagarajan og Tina Thesslund fortjener også en stor takk for veiledning med real-time qPCR og for hjelp med gjennomføring av prøveuttak.

Jeg vil også takke mine medstudenter Marius Aspen og Eli Birgithe Jenssen for et godt samarbeid gjennom alle disse herlige årene på NFH. Til slutt vil jeg rette en stor takk til min samboer Heidi for all hjelp og støtte.

Kristian Karlsen

Tromsø, oktober 2020

Sammendrag

Genetisk innblanding fra rømt oppdrettslaks i ville laksebestander er uønsket - og må så langt mulig begrenses dersom oppdrettsnæringen skal fortsette å vokse. I industrien er kjønnsmodning også et stort økonomi- og velferdsproblem grunnet negative effekter på somatisk vekst, kjøttkvalitet, immunfunksjon og hypo-osmoregulatorisk evne. En løsning på disse utfordringene kan være produksjon av steril fisk. Den eneste steriliseringsmetoden som blir brukt av næringen i dag er triploidisering. Triploidisert laks (*Salmo salar*) viser imidlertid dårligere produksjons-egenskaper enn normal ubehandlet oppdrettslaks og metoden er derfor i liten grad tatt i bruk i næringen i dag. Det er med andre ord behov for å utvikle alternative metoder for sterilisering av laks i oppdrett. Gjennom forskningsprosjektet «Salmosterile» har Nofima AS utviklet en metode for å indusere sterilitet gjennom å hindre etablering av kjønnsellelinjen hos atlantisk laks. For at denne steriliseringsmetoden skal bli aktuell for kommersiell anvendelse er det viktig med studier som vurderer effekten av manglende kjønnseller. Blant annet på uttrykk av gener/faktorer som er viktige for normal funksjon av hypothalamus-hypofyse-gonade aksene, og om produksjonsegenskapene er tilsvarende det en finner hos fertil fisk. I dette forsøket ble laks uten kjønnseller sammenlignet med vanlig fertil laks i forhold til uttrykk av gener, produksjonsytelse og modning. Det ble gjennomført tre prøveuttak fordelt over forsøksperioden der vekt, lengde og gonadevekt ble registrert, samtidig som hjerne, hypofyse og gonade ble prøvetatt. Disse organene ble videre analysert ved bruk av qPCR for å undersøke hvordan bortfall av kjønnseller påvirker uttrykk av gener/faktorer som er sentrale for normal funksjon av hypothalamus-hypofyse-gonade aksene. Resultatene fra dette arbeidet viste at bortfall av kjønnsellene i liten grad påvirket gener som er sentrale i regulering av hypothalamus-hypofyse-gonade aksene hos kjønnsellefri atlantisk laks. Visuell/makroskopisk undersøkelse av gonader, GSI og uttrykk av kjønnsellemarkørene *dnd* og *vasa* (og totalt bortfall av modning hos steril hannfisk) bekreftet sterilitet hos sterilgruppene. I tillegg viste sterilgruppene tilsvarende produksjonsytelse (vekst og kondisjonsfaktor) som fertilgruppene.

Innholdsfortegnelse

1. Innledning.....	1
1.1 Fjerning av kjønnsceller	2
1.2 Reproduksjonssystemet.....	4
1.3 Produksjon av kjønnssteroider hos kjønnscellefri laks	8
1.4 Kjønnsmodning og vekst.....	8
1.5 Formålet med oppgaven	9
2. Materiale og metoder	10
2.1 Forsøksfisk	10
2.2 Forsøksdesign.....	10
2.3 Prøveuttak.....	11
2.4 Beregning av gonadosomatisk indeks, vekstrate og kondisjonsfaktor.....	13
2.5 Analyse av genuttrykk.....	13
2.5.1 RNA ekstraksjon	14
2.5.2 cDNA syntese.....	15
2.5.3 Primere	16
2.5.4 Real-Time qPCR analyse	17
2.6 Statistiske analyser og grafisk framstilling	18
3. Resultat.....	19
3.1 Gonadosomatisk indeks og kjønnsmodning.....	19
3.2 Produksjonsytelse.....	20
3.2.1 Vekt	20
3.2.2 Spesifikk vekstrate (SGR) og kondisjonsfaktor (K)	21
3.3 Genuttrykk.....	23
3.3.1 Hjerne	23
3.3.2 Hypofysen	24
3.3.3 Gonade	26

3.4 Sammenligning av ulike grupper hannfisk ved T3	31
4. Diskusjon.....	34
4.1 Bortfall av kjønnsceller, gonadosomatisk indeks og kjønnsmodning.....	35
4.2 Modning og genuttrykk.....	36
4.2.1 Modnende fertil hannfisk	36
4.2.2 Fertil fisk versus steril fisk	37
4.2.3 «Modnende» steril hannfisk	39
4.3 Produksjonsytelse.....	40
5. Konklusjon	42
Referanser.....	43
Appendiks.....	i

1. Innledning

Oppdrett av atlantisk laks (*Salmo salar*) har blitt en nøkkelindustri i Norge med en førstehåndsverdi for næringen på over 64 milliarder kroner og en direkte sysselsetting på åtte tusen mennesker (Regjeringen, 2019). Fra slutten av 1960-tallet og frem til i dag har næringen gjennomgått en formidabel utvikling der produksjon og verdiskapning har blitt mangedoblet. De siste årene har i midlertidig produksjonsveksten stagnert grunnet miljømessige utfordringer. For å oppnå videre vekst i årene framover må en finne gode løsninger på viktige problemstillinger knyttet til disse utfordringene.

Den største trusselen for videre vekst er ifølge Forseth *et al.* (2017) rømt oppdrettslaks. Med dagens åpne merdsystem kan en ikke utelukke rømming og der genetisk innblanding av oppdrettslaks og villaks er uønsket både av industrien og forvaltningen. I tillegg skapes det et svært dårlig omdømme av oppdrettsnæringen blant befolkningen. For industrien er kjønnsmodning hos oppdrettslaks også et stort økonomi- og velferdsproblem grunnet negative effekter på somatisk vekst, kjøttkvalitet, immunfunksjon og hypo-osmoregulatorisk evne (Taranger *et al.*, 2010). Kjønnsmodning medfører endringer i aktiviteten av ulike hormoner i forbindelse med reproduksjon (som f.eks. kjønnshormoner, kortisol og veksthormon), noe som gjør at immunforsvaret blir «nedprioritert» hos den kjønnsmodne laksen (Taranger *et al.*, 2010). Økt sykdomsmottakelighet og redusert evne til osmoregulering kan derfor føre til redusert velferd og økt dødelighet hos kjønnsmoden laks. Det er spesielt i resirkuleringsanlegg (RAS) at kjønnsmodning kan være en flaskehals, der en ofte bruker høy temperatur og kontinuerlig lys for rask vekst (Terjesen *et al.*, 2013). Disse to miljøsignalene kan også stimulere kjønnsmodning hos laks, spesielt hos juvenil hannfisk (Fjelldal *et al.*, 2011). Forskning gjort av Summerfelt *et al.* (2012) viste at 75% av hannfiskene ble kjønnsmoden gjennom produksjonen til slaktestørrelse i et ferskvanns-RAS. Det tapes i dag store summer på kjønnsmodning, og tapene vil antakelig bli enda større i framtiden med de nye moderne landbaserte anleggene. Produksjon av en velfungerende steril fisk vil både redusere konsekvensen av rømming og bidra til å løse utfordringene relatert til kjønnsmodning.

Den eneste steriliseringsmetoden som blir brukt i praksis i dag er triploidisering, og det er bare noen få aktører som benytter seg av denne metoden. Triploiditet innebærer at fisken har tre sett med kromosomer, istedenfor to som er normalt (Fraser *et al.*, 2012). Det er en generell oppfatning at triploid laks ikke har de samme produksjonsegenskapene som vanlig oppdrettslaks. De har blant annet redusert ytelse under sub-optimale forhold som f.eks. redusert

O₂-konsentrasjoner og høy vanntemperatur, og ofte ser en forekomster av øyekatarakt, skjelett- og hjertedeformiteter (Fraser *et al.*, 2012). En annen steriliseringsmetode som f.eks. ved bruk av genmodifiserte organismer (GMO) er en mulighet, men en vil da møte på andre alvorlige utfordringer hovedsakelig knyttet til det etiske aspektet, men også juridiske og praktiske utfordringer i havbruksnæringen (Wong & Zohar, 2015). Det er med andre ord behov for å utvikle en ny steriliseringsmetode som resulterer i en fisk som har samme produksjonsegenskaper som vanlig fertil fisk.

1.1 Fjerning av kjønnsceller

Kjønnsellelinjen hos teleoster og andre vertebrater defineres tidlig i embryogenesen, og består lenge av et fåtall celler kalt primordiale kimceller (Raz, 2003). De primordiale kimcellene er forløpere til alle kjønnscellene, egg og spermceller, som fisken vil produsere i forbindelse med kjønnsmodning. Maternale faktorer i egget kalt «germ plasm» er avgjørende for etablering av kjønnsellelinjen (Raz, 2003). Germ plasm består av mRNA og proteiner som blir deponert i egget gjennom oogenesis og fungerer som regulatoriske faktorer særlig i perioden etter befruktning (Gross-Thebing *et al.*, 2017). *Dead end (dnd)* og *vasa* er eksempler på maternale faktorer knyttet til germ plasm – *vasa* er i egget (ubefruktet) både som protein og mRNA, mens *dnd* er i form av mRNA (Raz, 2003; Weidinger *et al.*, 2003). *Dead end* er funnet å være kritisk for migrasjon og opprettholdelse av PGCene (Köprunner *et al.*, 2001; Raz, 2003; Weidinger *et al.*, 2003). Arbeid med sebrafisk har vist at bortfall av *dnd* (og *nanos* som er en annen germ plasm komponent) kan forårsake feil i migrasjon og overlevelse hos PGCene, noe som resulterer i en steril fisk (Slanchev *et al.*, 2005). *Dnd* er en kritisk faktor for PGC-spesifikasjon og overlevelse ved å stabilisere andre viktige germ plasm RNA'er. En slik stabilisering/beskyttelse skjer trolig ved at *dnd* binder seg til 3'UTR delen av mRNAet som hindrer at spesifikke miRNA'er initierer mRNA degradering (Kedde *et al.*, 2007). Bortfall av *dnd* hindrer normal migrering og etter hvert tilbakedanning av PGCene hos teleoster (Weidinger *et al.*, 2003), inkludert atlantisk laks (Wargelius *et al.*, 2016).

Gapmer'er er potente antisense-oligonukleotider som baserer seg på å nedbryte spesifikke mRNAs. Gapmer antisensmolekylene består både av RNA og DNA (modifiserte RNA nukleotider på hver flanke med en DNA strekke («Gap») i midten) og ved hybridisering med mål-mRNAet dannes en RNA/DNA hetro-duplex som rekrutterer enzymet RNAaseH til dette komplekset. RNAaseH starter så degradering av target mRNAet (Pauli *et al.*, 2015). En slik

tilnærming til sterilisering der en kun hemmer genuttrykket midlertidig på mRNA-nivå, og ikke gjør noen varige endringer i fiskens DNA, vil sannsynligvis være mer akseptabel for bruk i oppdrettsnæringen. En slik metode vil også være langt mer anvendelig og fleksibel i forhold til utvikling av en stor industriell skala protokoll for sterilisering, sammenlignet med metoder som baserer seg på geneditering eller transgene linjer. Funksjonaliteten til denne metoden er påvist i sebrafisk (Pauli *et al.*, 2015). Bruk av antisensmolekyler, slik som GapmerR, for å hemme genuttrykk blir karakterisert som «gene knockdown» (KD) og er en midlertidig/tidsavgrenset reduksjon/bortfall i genuttrykk og skiller seg fundamentalt fra metoder som baserer seg på å indusere mutasjoner i organismens DNA/genom (karakterisert som «gene knockout» (KO)) som for eksempel ved bruk av CRISPR/cas9 systemet (Wargelius *et al.* 2016) som induserer et livslangt bortfall av genuttrykk.

Gjennom prosjektet «Salmosterile» (NFR 2013-18) har forskningsinstituttet Nofima utviklet en metode for å hindre etablering av kjønnsellelinjen hos atlantisk laks ved bruk av Gapmer antisenssteknologien. Teknologien baserer seg, som nevnt tidligere, på en tidsavgrenset, spesifikk nedbrytning av *dnd* mRNA i tidlige embryonale stadier. Mikroinjeksjon av spesifikke GapmeR'er i befruktete egg har resultert i et tilnærmet fullstendig bortfall av *dnd* mRNA målt 50-60 døgngrader etter befruktning (sen blastula). Bortfall av *dnd* mRNA resulterte i effektiv fjerning av PGCene og utvikling av fiskelarver uten kjønnseller. Gjentatte forsøk hos Nofima har vist at denne metoden gir fullstendig bortfall av kjønnseller hos ca. 90% av individene, mens resterende 10% utvikler normale gonader. Ved bruk av riktige GapmeR'er konsentrasjoner finner en ingen synlige effekter på somatisk utvikling og utviklingstiden til øyerognstadiet (c. 300 DG), klekking (c. 500 DG) og startfôring (c. 900 DG) er den samme i ikke-injiserte kontroll individer og GapmeR-behandlede embryoer / yngel. Senere i utviklingen har fisk uten kjønnseller også vist normal morfologi og vekst sammenlignet med ikke-injiserte kontrollindivider (personlig kommunikasjon, H. Tveiten)

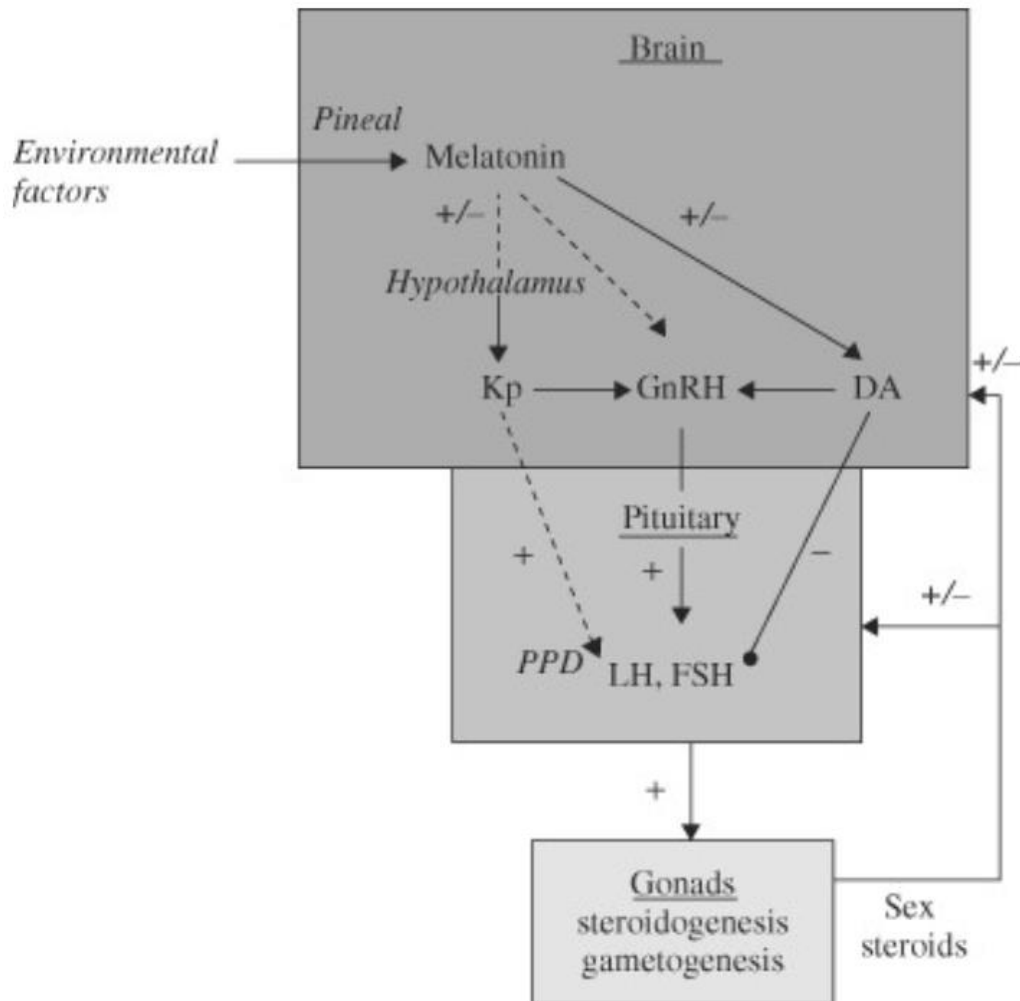
En klar forutsetning for bruk av steril fisk under akvakulturførhold er at deres produksjonsytelse er like god som dagens fertile oppdrettslaks. Selv om sterilisering via fjerning av kjønnsellelinjen må kunne anses som spesifikk i forhold til for eksempel triploidisering, vil en slik behandling imidlertid kunne resultere i endringer i andre endokrine systemer som har betydning for produksjonsegenskapene til oppdrettslaks.

1.2 Reproduksjonssystemet

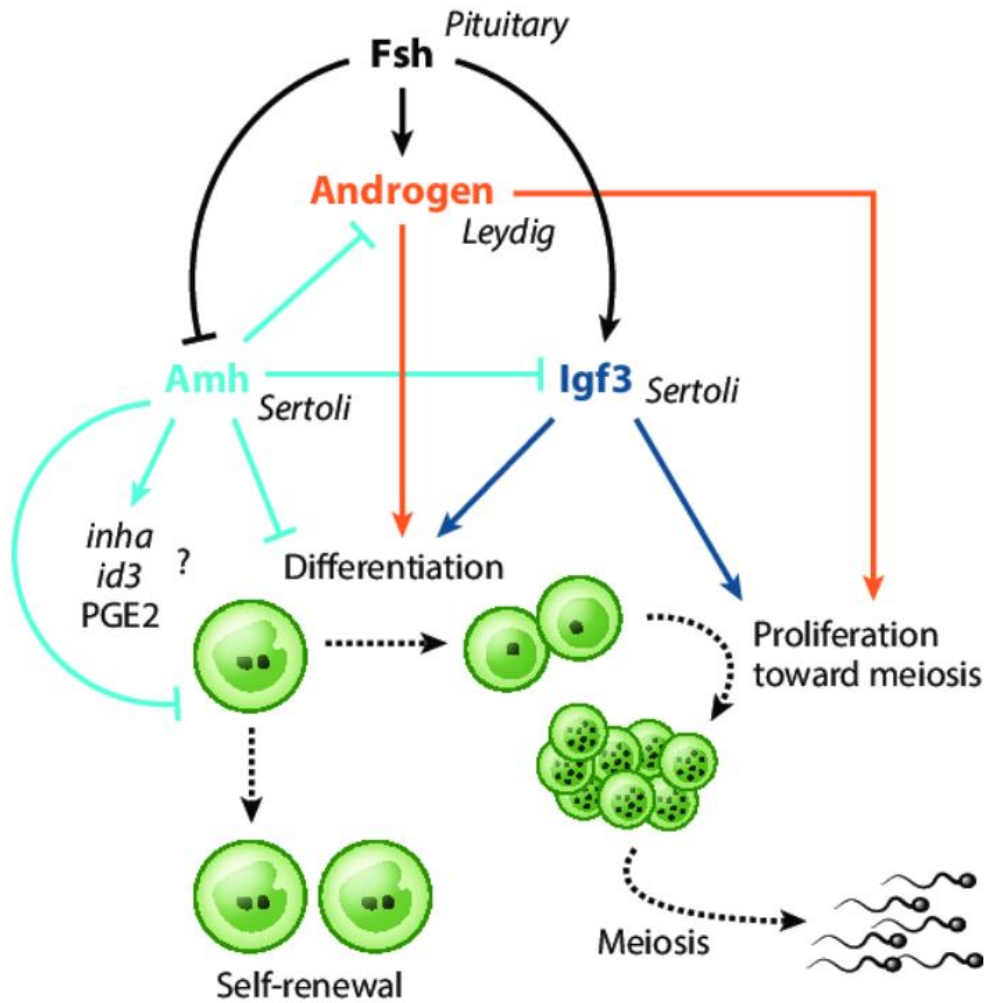
Det har blitt gjort en rekke studier på reproduksjonsfysiologi hos fisk, og det har blitt samlet opp grunnleggende informasjon om endokrin regulering av gonadeutviklingen gjennom 50 år. Reproduksjonsutvikling har blitt undersøkt gjennom bruk av histologiske, biokjemiske og molekylære teknikker (Kagawa, 2013). En sentral del av det endokrine systemet som styrer og regulerer reproduksjonsutviklingen hos fisk er hypothalamus-hypofyse-gonade aksens (HPG-aksen) (Figur 1) (Yaron & Levavi-Sivan, 2011). Gonadotropinfrigjørende hormon (GnRH) er et peptidhormon som frigjøres fra hypothalamus via neurosynapser til hypofysen. Hos teleoster er det to eller tre varianter av GnRH tilstede, avledet fra forskjellige gener (Lethimonier *et al.*, 2004), og avhengig av antall varianter vil enten GnRH1 eller GnRH3 være hypofysiotropisk (Sherwood & Wu, 2005). GnRH1 varianten inkluderer m (mammalian)GnRH, c(chicken)GnRH-I og flere former isolert i fisk. Den andre varianten inkluderer formen som finnes i alle virveldyr, cGnRH-II, mens GnRH3-varianten inkluderer s(salmon)GnRH formen (Ciani, 2018). De tre variantene viser også karakteristisk lokalisering i hjernen, der GnRH1- og GnRH3 nevroner ligger i olfactory bulb, ventral telecephalon og preoptisk område, mens GnRH2 nevroner er begrenset til mellomhjernen tegmentum (González-Martínez *et al.*, 2004). To av disse variantene (GnRH2 og GnRH3) er uttrykt i laksefisk (Okuzawa *et al.*, 1990). En økning i GnRH mRNA i forhjernen sammenfaller med økt gonadosomatisk indeks (GSI) og er assosiert med begynnende modning og sluttmodning hos hannfisk (Amano *et al.*, 1997; Ando *et al.*, 2001; Onuma *et al.*, 2005). Videre har det vist seg at sGnRH er med på å inducere FSH-sekresjon in vitro hos coho-laks (*Oncorhynchus kisutch*) (Dickey & Swanson, 2000). GnRH3 regnes derfor som hovedaktivator for gonadotropinsekresjon hos laksefisk.

Under påvirkning fra GnRH skiller hypofysen ut gonadotropiner (GTH) i form av follikkelstimulerende hormon (FSH) og luteniserende hormon (LH). GTH er sammensatt av en dimer av to protein subenheter; α , som er felles for FSH og LH, og β , som gir spesifisitet til hvert hormon. For både FSH og LH produseres α - og β -subenheter uavhengig av hverandre og blir deretter bundet sammen før de slippes ut i sirkulasjonen. Gonadotropinene transporteres i systemsirkulasjonen til membran-reseptorer på celler i gonadene, henholdsvis FSH-R og LH-R (Yaron & Levavi-Sivan, 2011). FSH og LH regulerer gonadeutviklingen der FSH er ansvarlig for vekst i gonadene, mens LH stimulerer gonadene til å produsere ulike derivater av progesteron (el. ulike typer progestiner). FSH har også en påvirkning på sertolicellene i testis ved å ha en inhiberende effekt på *anti-müllerian hormon* (AMH) (AMH fungerer hemmende både på proliferasjon av spermatogonia (Figur 2) og IGF3 – bortfall av AMH stimulerer til en

prolifisering ved at inhiberingen av IGF3 forsvinner (Figur 2)) og en stimulerende effekt på IGF3 som bidrar til økt spermatogonial proliferasjon via IGF-reseptorer (Nóbrega *et al.*, 2015).

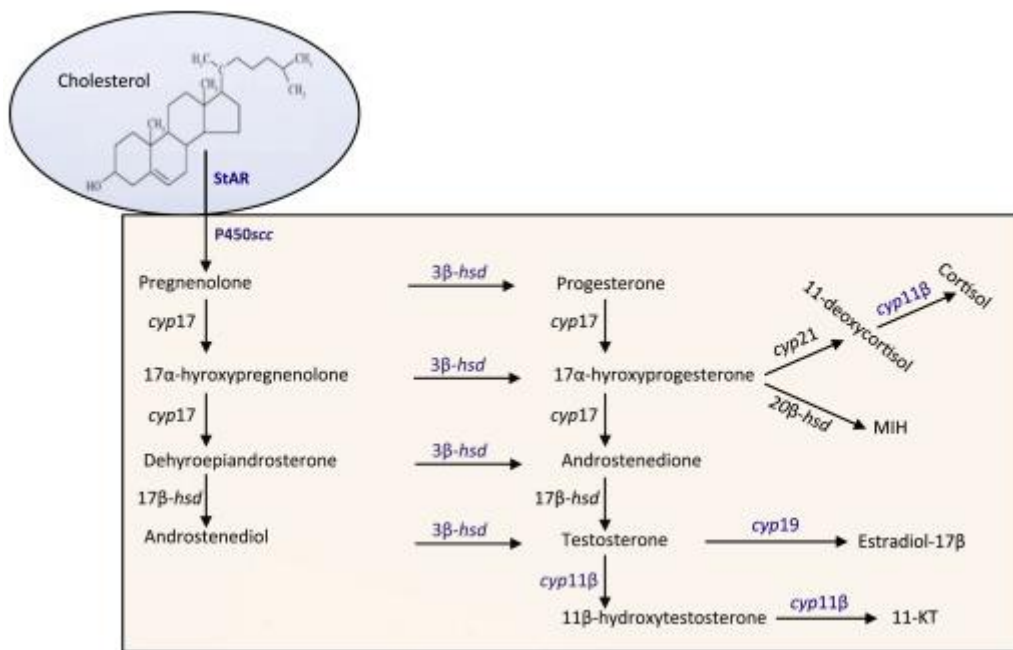


Figur 1. Endokrin kontroll av reproduksjon ved hjerne-hypofyse-gonade (HPG) akse hos teleoster (beinfisk). Gonadotropinfrigjørende hormon (GnRH) stimulerer syntesen og frigjørelsen av follikkelstimulerende- og luteniserende hormon (FSH og LH) i hypofysen, som igjen aktiverer aktivitet i gonadene (gameotogenesen og steroidgenesen). I noen teleoster fungerer dopamin (DA) inhiberende ved å hemme syntesen og frigjøringen av gonadotropiner. Kisspeptin (Kp) regulerer GnRH og gonadotropiner. Kjønnsteroider utøver positiv og negativ feedback på forskjellige nivåer av HPG-aksen. Melatonin medierer effekten av miljøfaktorer på sentralnervesystemet. Figur hentet fra Dufour *et al.* (2010).



Figur 2. Skjematisk oversikt over rollen til FSH, AMH og IGF3 i spermatogenesisen. AMH hemmer de stimulerende effektene av gonadotropiner i spermatogenesisen, både i leydig- og sertoliceller. AMH hemmer gonadotropin-induserte funksjoner til leydig-celler for å skille ut androgener. Androgener stimulerer til spermatogonial proliferasjon. I sertoliceller motvirker AMH effekten av gonadotropin-induserte vekstfaktorer som IGF3 (stimulerende på spermatogenesisen), som igjen vil være hemmende for spermatogenesisen. AMH stimulerer også til produksjon av inhiberende vekstfaktorer i sertolicellene. Summen av disse mekanismene fører til en hemming av prolifisering og differensiering av kimceller. Pilene indikerer stimulering, mens linjene uten pil på slutten indikerer inhibering. Figur hentet fra Adolfi *et al.* (2019).

Det finnes tre klasser kjønnssteroider som gonadene skiller ut; progestagener, androgener og østrogen. Progestinet 17 α ,20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) forbindes blant annet med sluttmodning av oocytten i hunnfisk og spermiering hos hannfisk, mens androgener fungerer som prekursor for produksjon av østrogen (androgener har også egne effekter). Hos teleoster er det antatt at det hannkjønns spesifikke androgenet er 11-ketotestosteron (11-KT), mens det viktigste østrogenet er østradiol-17 β (E2). 11-KT er sentral i reguleringen av spermatogenese og spermiogenesen (Yaron & Levavi-Sivan, 2011). Figur 3 viser en oversikt over hvordan ulike enzymer og deres respektive gener er med på syntesen og konverteringen av ulike steroidhormoner. *Cyp17a1* er involvert i å konvertere pregnenolon til 17-hydroksypregnenolon, progesteron til 17 α -hydroksyprogesteron og 17 α -hydroksyprogesteron til androstenedion (Chishti *et al.*, 2014). Konvertering av disse faktorene er viktige skritt mot androgenproduksjon. *Cyp19a1a* katalyserer omdannelsen av testosteron til østrogen og uttrykkes sterkt i granulosa celler som er en del av ovariefollikkelen og er dermed en pålitelig markør for ovariene (Rodríguez-Marí *et al.*, 2005)



Figur 3. En skjematisk oversikt av steroidgenesen i teleoster. Cyp17 er involvert i viktige konverteringer mot androgenproduksjon, og Cyp19 er viktig for omdannelse av testosteron til østrogen. I tillegg til enzymer som katalyserer syntesen av individuelle steroidhormoner. MIH = modningsinduserende hormon. Figur hentet fra Arukwe *et al.* (2016).

1.3 Produksjon av kjønnssteroider hos kjønnsellefri laks

Det er usikkert hvordan forskjellige celletyper i gonaden kommuniserer ved tidlig pubertet. I følge McNeilly *et al.* (2000) oppregulerer kjønnsellefri mus fortsatt steroidhormonproduksjon i gonaden gjennom pubertet og kjønnsellefri fisk viser sekundære kjønnskarakteristikker (Fujimoto *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015; Slanchev *et al.*, 2005). Dette kan tyde på at kjønnscellene ikke er avgjørende for produksjon av kjønnssteroider i gonaden og videreutviklingen av sekundære kjønnskarakteristikker. Det er ennå ukjent om kjønnsceller påvirker både vekst og modning hos laks.

1.4 Kjønnsmodning og vekst

I tidlig fase av reproduksjonssyklusen er somatisk vekst høy sammenlignet med de senere stadiene av gonadeutviklingen. Fisk som går inn i modningsprosessen har blitt rapportert til å vokse raskere enn umoden i fisk gjennom våren og starten av sommeren før hovedperioden for gonadeveksten (Youngson *et al.*, 1988). De vekstfremmende effektene hos moden fisk har vært relatert til forhøyede kjønnssteroidnivåer tidlig på våren, enten direkte gjennom anabolske effekter, eller indirekte gjennom påvirkning av andre endokrine systemer involvert i vekstreguleringen (Youngson *et al.*, 1988). Hovedregulatoren for vekst i virveldyr er veksthormonet insulin-like growth factor (IGF) (E. J. Vélez *et al.*, 2018), og Fuentes *et al.* (2013) har påvist rollen dette hormonet har i mange fiskearter, inkludert atlantisk laks. Krysskommunikasjonen mellom reproduksjonssystemet GH/IGF og thyreoideahormon (TH) systemet er en sterk indikasjon på at endringer i gonadens aktivitet kan påvirke somatisk vekst på kort og lang sikt (Flood *et al.*, 2013; E. Vélez *et al.*, 2017). Det er derfor viktig å undersøke hvordan bortfall av kjønnscellene vil påvirke syntesen av kjønnssteroider under juvenile og tidlig stadium av gonadeutviklingen, og hvordan produksjon av kjønnssteroider kan relateres til vekstytelse og interaksjon med andre endokrine systemer som regulerer vekst.

1.5 Formålet med oppgaven

Hovedmål

Hovedmålet med denne oppgaven er å evaluere effekten av sterilitet, induisert gjennom fjerning av kjønnsellelinjen, på vekst og uttrykk av gener som er sentrale i regulering av hypothalamus-hypofyse-gonade aksene hos atlantisk oppdrettslaks.

Delmål

Undersøke hvordan bortfall av kjønnseller påvirker uttrykk av viktige gener/faktorer som er viktige for normal funksjon av hypothalamus-hypofyse-gonade aksene.

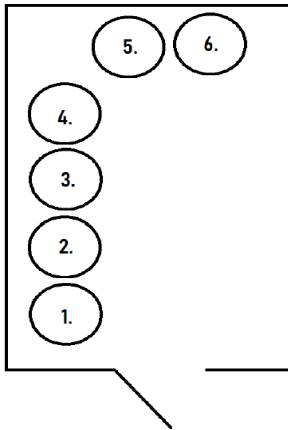
2. Materiale og metoder

2.1 Forsøksfisk

Dette prosjektet ble utført på havbruksstasjonen i Kårvika (HiT; 69°N) i perioden 18. august til 5. desember 2018. Fisken som ble brukt var atlantisk laks levert som rogn fra AquaGen i 2017. Sterilisering og Pit-tag[®]-merking av fisken ble utført av Nofima den 18. august 2018. Fisken ble holdt i ferskvann i sirkulære kar med bruksvolum på 500 liter og fôret med olympic 3.0 mm. Fra startføring til forsøksstart (28.08.18) hadde fisken blitt holdt under kontinuerlig lys (24:00) og naturlig vanntemperatur (6-10 °C). For å indusere smoltifisering ble disse fiskene utsatt for en manipulert fotoperiode; fra forsøksstart ble fiskene eksponert til kort dag (6 timer lys (L):18 timer mørke (D)), redusert vanntemperaturen til 5-6°C i åtte uker. Fra slutten av oktober (26.10.18) ble fotoperioden endret til kontinuerlig lys (24L:0D), samtidig som vanntemperaturen ble økt til 10°C ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) – fotoperiode og temperatur ble holdt slik resten av forsøket.

2.2 Forsøksdesign

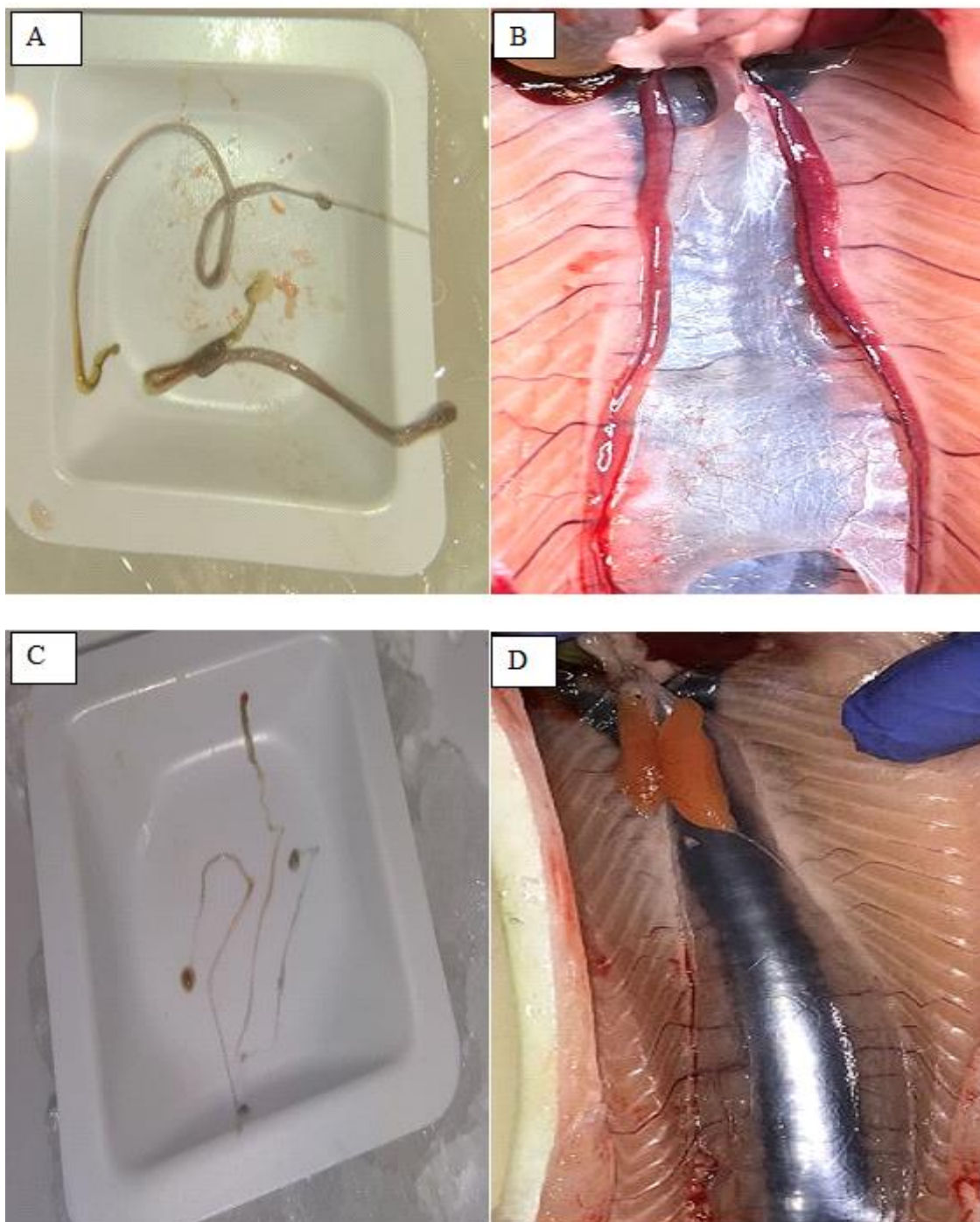
Fisken ble fordelt og sortert jevnt i seks sirkulære kar med et bruksvolum på 500 liter (Figur 4) – ca. 60 fisk i hvert kar. I dette prosjektet ble det brukt triplikate grupper; tre kar med steril fisk og tre kar med fertil fisk. Alle karene befant seg i samme rom (Figur 4) og med tilnærmet identiske miljøforhold i forhold til temperatur (beskrevet over), vannvolum (500 liter), oksygenmetning (>70%) og vannstrøm (40 liter/min). Fra forsøksstart til forsøksslutt høsten 2018 ble det gjort tre uttak av fisken. Første uttak (T1) ble gjennomført den 24.10, andre uttak (T2) den 14.11 og tredje uttak (T3) den 5.12. Fiskene ble kategorisert i fem ulike grupper; steril hunnfisk, steril hannfisk, fertil hunnfisk, fertil hannfisk og modnende fertil hannfisk (ved T3).



Figur 4. Illustrasjonsbilde av rommet hvor fiskekarene befant seg. I kar 1,5 og 6 var det steril fisk, og i kar 2,3 og 5 var det fertil fisk (kontrollfisk).

2.3 Prøveuttak

I uttakene ble det tatt ut 10-12 fisker fra hvert 500 liters kar med en håv. Dette ble gjort raskt slik at det var mulig å måle basalnivået av kortisol. Plasma kortisol øker raskt (3-4 min) som følge av håndtering (Bonga, 1997). Fisken ble overført til et bedøvelseskar (sylinderformet med et bruksvolum på 130 liter, transportert i 50 liter vann) og avlivet med en overdose av Benzoak 5 x vanlig dose (50 ml / 50 liter vann). All fisk hadde mistet likevekt innen 2 min etter at håvingen hadde startet og alle blodprøver var tatt innen 5 min. Blodprøvene ble tatt fra den kaudale vaskulaturen ved hjelp av 2 ml vakumrør (Vacutainer[®]) tilsatt litium-heparin. Programmet og utstyret som ble brukt for å skanne pit-tagen i fisken var Biomark tag manager program, Biomark skanner (2001F-ISO antenna, destron fearing) og Biomark display (portable transceiver system; modell 2001F-ISO). Fisken ble målt (gaffel-lengde; cm+/- til nærmeste millimeter) og veid til nærmeste halve gram på en analysevekt (Mettler Toledo). Blodprøvene ble sentrifugert i 10 minutter og plasma ble pipettert til nye eppendorfrør ved hjelp av engangspipetter. Prøvene ble merket og fryst ned ved -20°C. Gjeller, lever, gonader, hodenyre, muskel, hypofyse og hjerne ble dissekert med fisken liggende på is. Disseksjonen av 10-12 individer tok maksimalt 30 minutter (3-4 personer deltok i operasjonen). Analysevekt (Metler Toledo) ble brukt for å veie gonadene til nærmeste milligram. Den ene gonaden ble satt i PFA-løsning for histologiske undersøkelser, mens den andre gonaden og de øvrige organene som skulle analyseres for genuttrykk ble overført til forhåndsmerkede eppendorfrør som inneholdt RNAlater[®] (InVitrogen AM7021). Disse prøvene ble satt i kjøleskap i 24timer før de ble fryst ned på -80 grader.



Figur 5. Uttak av gonadene viste morfologiske forskjeller mellom fertil- og sterilgruppen. Testis fra sterilgruppen (A) og fertilgruppen (B), og ovariene fra sterilgruppen (C) og fertilgruppen (D).

2.4 Beregning av gonadosomatisk indeks, vekstrate og kondisjonsfaktor

Gonadosomatisk indeks (GSI)

GSI er gonadevekt uttrykt i prosent av kroppsvekt. Beregnes ved bruk av følgende formel, der G er gonadevekt og W er kroppsvekt oppgitt i gram:

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

Spesifikk vekstrate (SGR)

SGR er et uttrykk for daglig tilvekst (i % av kroppsvekt) og beregnes ved bruk av følgende formel, der V1 og V2 er vekt oppgitt i gram ved uttak T1 og T2, og T2-T1 er antall dager mellom de ulike måletidspunktene.

$$SGR = \left(\frac{\ln V2 - \ln V1}{T2 - T1} \right) * 100$$

Kondisjonsfaktor (K-faktor)

Kondisjonsfaktoren er et uttrykk for sammenhengen mellom vekt og lengde og beregnes ved bruk av følgende formel, der W er kroppsvekten oppgitt i gram og L er fiskens lengde oppgitt i cm:

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

2.5 Analyse av genuttrykk

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er en anerkjent teknikk innen molekylær biologi. Ved bruk av PCR kan en kopiere eller amplifisere spesifikke sekvenser i en DNA eller cDNA templat millioner av ganger. For å måle genuttrykk i «real-time» i celler, blod eller vev brukes kvantitativ real-time polymerase kjedereaksjon (RT qPCR). RT qPCR kvantifiserer mengde uttrykk av et spesifikk gen ved bruk av et fluoriserende fargestoff (SYBR[®] Green). Fargestoffet bindes til DNA og etter hver amplifiseringssyklus øker fargen proporsjonalt med mengde PCR-produkter generert. En amplifiseringssyklus består av tre forskjellige steg; 1) denaturering, 2)

amplifisering og 3) ekstensjon. I første steg blir dobbeltråd DNA (dsDNA) separert til enkeltråd DNA (ssDNA) ved hjelp av høy temperatur. I andre steg fører en reduksjon i temperatur til at komplementære DNA-sekvenser binder seg til ønskelig gen. I tredje steg vil enzymet DNA-polymerase starte syntesen av en ny DNA-tråd i 5-3 retning. For å finne ut om det er noe uttrykk av gener må en se på terskelsyklusen (C_T -terskelsyklus). En lav C_T -verdi betyr at genuttrykket i prøven overstiger terskelen etter noen amplifiseringskurver, noe som vil si at det er en høy konsentrasjon av komplementær cDNA i prøven. En liten konsentrasjon av cDNA vil gi en høy C_T -verdi, noe som betyr at genuttrykket i prøven er mindre (LifeTechnologies, 2012). I analysen av genekspressjon (qPCR) måtte en først isolere RNA, transkribere om RNA til cDNA (revers transkripsjon) og deretter fortsette med qPCR.

2.5.1 RNA ekstraksjon

RNA ble ekstrahert fra hjerne-, hypofyse- og gonadevev ved bruk av TrizolTM Reagent (15596018, Thermo Fisher Scientific). Vevsprøvene fra de ulike organene ble homogenisert i 1000 μ l trizol sammen med en magnetisk kule ved bruk av Tissue Lyzer II (Qiagen). Etter homogenisering ble lysatet sentrifugert (12000rpm/10 min/4°C) og supernatanten pipettert i nye 1,5 ml eppendorfrør. 500 μ l nedkjølt kloroform (4°C) ble tilsatt og blandet ved hjelp av vortex (15 sek). Etter 5 min inkubering i romtemperatur ble prøvene sentrifugert (12000rpm/15min/4°C). Kloroformen forårsaker en fase-separasjon i løsningen, der protein ekstraheres til den organiske fasen, DNA løses i mellomfasen (interface), og RNA i den vandige fasen. På denne måten kan RNA, DNA og protein renses fra en prøve. Vannfasen (500 μ l) ble pipettert i nye rør, og for å være sikker på å unngå kontaminasjon ble denne prosessen gjort to ganger. Det betyr at en tilsatte trizol og kloroform (h.h.v. 500 μ l og 200 μ l) med påfølgende sentrifugering (12000rpm/15min/4°C). Vannfasen ble denne gang pipettert i nye DNA Lobind tube hvor 500 μ l isopropanol ble tilsatt og inkubert på -20°C i 30 minutter eller lengere. Da en tok opp prøvene ble de sentrifugert (12000rpm/10min/4°C) og isopropanolen ble fjernet. Pelleten ble vasket med 1 ml 80% etanol (etOH) og sentrifugert (10000rpm/5min) – denne prosessen ble gjort to ganger for å oppnå et resultat med minst mulig kontaminering. Da etanolet var fordampet løste en pelleten i 30 μ l nukleasefritt vann. Prøvene ble så inkubert på 55°C i 10 minutter.

Isolert RNA ble deretter behandlet med TURBO DNA-freeTM kit (AM1907, Thermo Fisher Scientific) for å fjerne resterende spormengder av kontaminerende DNA. En tilsatte 3 μ l av «10X TURBO DNase»-buffer og 1 μ l «TURBO DNase»-enzym til RNA-prøvene. Dette ble

inkubert på 37°C i 20-30 minutter for å katalysere reaksjonen mellom buffer og enzym. Etter inkubering ble det tilsatt 3 µl av «DNase *Inactivator Reagent*» for å stoppe reaksjon mellom buffer og enzym. Deretter ble prøvene sentrifugert (10000rpm/2min/20°C) og supernatanten som inneholdt RNA ble pipettert i nye DNA Lobind-rør. Det ble brukt 1 µl RNA til nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer) for sjekk av RNA-konsentrasjon. I denne maskinen måles absorbansen ved 260 og 280nm samt DNA-, RNA- og protein innhold. Hvis prøven har en verdi på mer enn 1,79 betyr det at prøven ikke er kontaminert med protein og DNA. 30 µl ren RNA ble fryst i -80 grader for videre analyse.

2.5.2 cDNA syntese

Resultatet fra RNA ekstraksjonen (nanodrop) inneholdt forskjellige konsentrasjoner av RNA. De prøvene som hadde for høy konsentrasjon ble fortynnet (1;2, 1:5, 1:10, 1:25 eller 1:50) med vann til en total RNA-konsentrasjon på 200 ng. Syntesen av cDNA ble utført ved hjelp av kittet High-capacity RNA-to-cDNA™ Kit (4387406, Thermo Fisher Scientific). Prøvene med RNA ble tint og holdt på is gjennom hele prosessen. Maks 9 µl RNA fra hver prøve ble fordelt over 96-brønners brett, og tilsatt 11 µl mastermiks som bestod av 20x RT Buffer og 2x RT Enzym Mix for 100 reaksjoner (et brett) i gangen. I hvert brett var det også en positiv og en negativ kontroll. Hensikten med disse kontrollene var å sjekke kvaliteten på prøvene og kontrollere at det ikke var spor av genomisk DNA-kontaminering i prøvene (-RT kontroll). Før en satt brettet i PCR-maskinen (Applied Biosystems GeneAmp® PCR systems 2700) ble de forsegleet og spinnert ned. Prøvene ble inkubert på 37 °C i 60 min, 95 °C i 5 min, og til slutt avkjølt til 4 °C eller lavere. Prøvene ble lagret på -20 °C.

2.5.3 Primere

Ved bruk av primer blast ble spesifikke primere designet for hvert gen. En stamløsning på 100 µm ble laget og fortynnet med vann til en bruksløsning på 5 µm (lagres ved -20°C). 5 µm primer ble testet opp mot en miks av cDNA i en fortyningsserie på fem med tre duplikater – dette ble gjort for å teste effektivitet og spesifikke egenskaper til primerne. Videre ble det laget en standardkurve ved å plote Ct-verdiene mot fortyningens log-verdi (stigningstallet (slope) ble også beregnet). Primerens effekt (Tabell 1) ble beregnet ved hjelp av en formel beskrevet av (Pfaffl, 2001).

$$E = 10\left(\frac{1}{slope}\right)$$

Tabell 1: Primersekvens der F; forover, R; revers, og E; effektivitet

Gen (tilgangsnummer)	Primer	Primer sekvens (5'-3')	Effektivitet
<i>EF1-α</i> (AF321836)	FP	CGCCAACATGGGCTGG	2,021
	RP	TCACACCATTGGCGTTACCA	
<i>β-actin</i> (BT059604)	FP	CAGCCCTCCTTCCTCGGTAT	2,031
	RP	CGTCACACTTCATGATGGAGTTG	
<i>Sal_18S</i> (AJ427629)	FP	TGTGCCGCTAGAGGTGAAATT	1,948
	RP	CGAACCTCCGACTTTCGTTCT	
<i>Dnd</i> (JN712911)	FP	GCACAAGGAGGGGAGCAACTG	1,840
	RP	TCTCAGGGACACGCCCTCTA	
<i>Vasa</i> (JN712912)	FP	CCAGTACAGAAGCATGGCATTG	1,927
	RP	CCGTTTTCCCAGATCCAGTCT	
<i>Igf3</i> (XM_014146080.1)	FP	GACCGACCGACAAGATGCA	1,956
	RP	GCAAGGCACAATATGGAGTACA	
<i>Amh</i> (NM_001123585.1)	FP	CAGTCACTCTCTGCAGCCTTACAA	2,019
	RP	CAACATTGAATCTCCATTTCAGTTTAC	
<i>Cyp19a1a</i> (XM_014175249.1)	FP	TCAAACAGAACCCTGACGTAG	2,197
	RP	GCTCCCTTTCACCTATAGCAGTGT	
<i>Cyp17a1</i> (XM_014154002.1)	FP	TCCCATGGCTACAGGTCTTC	2,168
	RP	CTGCTTTAGGAGACGCAGGT	
<i>Fshb</i> (XM_014126341.1)	FP	TCACGGAGGCATCACCATCA	1,747
	RP	GCTCTTGGCAACGGGTATGA	
<i>Lhb</i> (XM_014179976.1)	FP	TACAGTGAGCACGCCATCGA	2,025
	RP	CCAGCTGCAAGGCATGAGTT	
<i>GnRH3a</i> (XM_014206827.1)	FP	GAGAGGCTGAGACCATAT	1,833
	RP	ATGTTGATAGTGATGCTGAA	
<i>GnRH3b</i> (NM_001123667.1)	FP	GAGAAAGTATCTCCCATGGATCTTA	1,764
	RP	TACGACCAGTGCTGAGAGAGA	

2.5.4 Real-Time qPCR analyse

cDNA-prøvene (1:40 fortynnet) ble sammen med forward (F) og revers (R) primer tint på is. Mastermiks bestående av primer (F og R) og *Fast Sybr Green* ble laget for en 96-brønnsplate (MicroAmp Fast Optical 96-well, Thermo Fisher Scientific) av gangen. En reaksjon inneholdt 7,5 µl *Fast Sybr Green* og 1,25 µl av både F og R-primer – til sammen 10 µl mastermiks i en brønn. I tillegg til dette ble det brukt 5 µl av cDNA-prøvene i reaksjonen slik at de totale volumet i en brønn utgjorde 15 µl. Multikanalpipette (8-kanalpipette 5-50 µl med 100 µl filterspiss) ble brukt til pipetteringen, og hver prøve ble pipettert i duplikat som ble satt horisontalt. I to brønner ble cDNA erstattet med vann for å avdekke uspesifikk binding. Prøvene ble forseglet og analysert ved bruk av 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, CA, USA). Tabell 2 viser syklusparametere som ble brukt i maskinen.

Tabell 2: Syklusparametere som prøvene gikk gjennom ved bruk av 7500 Fast Real-Time PCR system

	Hold-fasen		PCR-fasen		Smeltekurv-fasen		
Temperatur	50°C	95°C	95°C	60°C	95°C	60°C	95°C
Tid (min:sek)	02:00	10:00	00:15	01:00	00:15	01:00	00:15
Total repetisjoner			40x				
Temperatur	1.6°C/s	1.6°C/s	-	1.6°C/s	1.6°C/s	1.6°C/s	0.075°C/s

Data fra RT qPCR ble analysert ved å beregne målgenets ($E_{mål}$) relative endring i forhold til referanseggen (E_{ref}) i henhold til formel beskrevet av (Pfaffl, 2001). β -actin, elongation factor 1 alfa (EF1- α) og 18S ble brukt som referanseggen, der utregning av genenes effektivitet ble basert på et geometrisk gjennomsnitt av disse.

$$Ratio = \frac{(E_{mål})^{\Delta ct} * mål^{(kontroll-prøve)}}{(E_{ref})^{\Delta ct} * ref^{(kontroll-prøve)}}$$

2.6 Statistiske analyser og grafisk framstilling

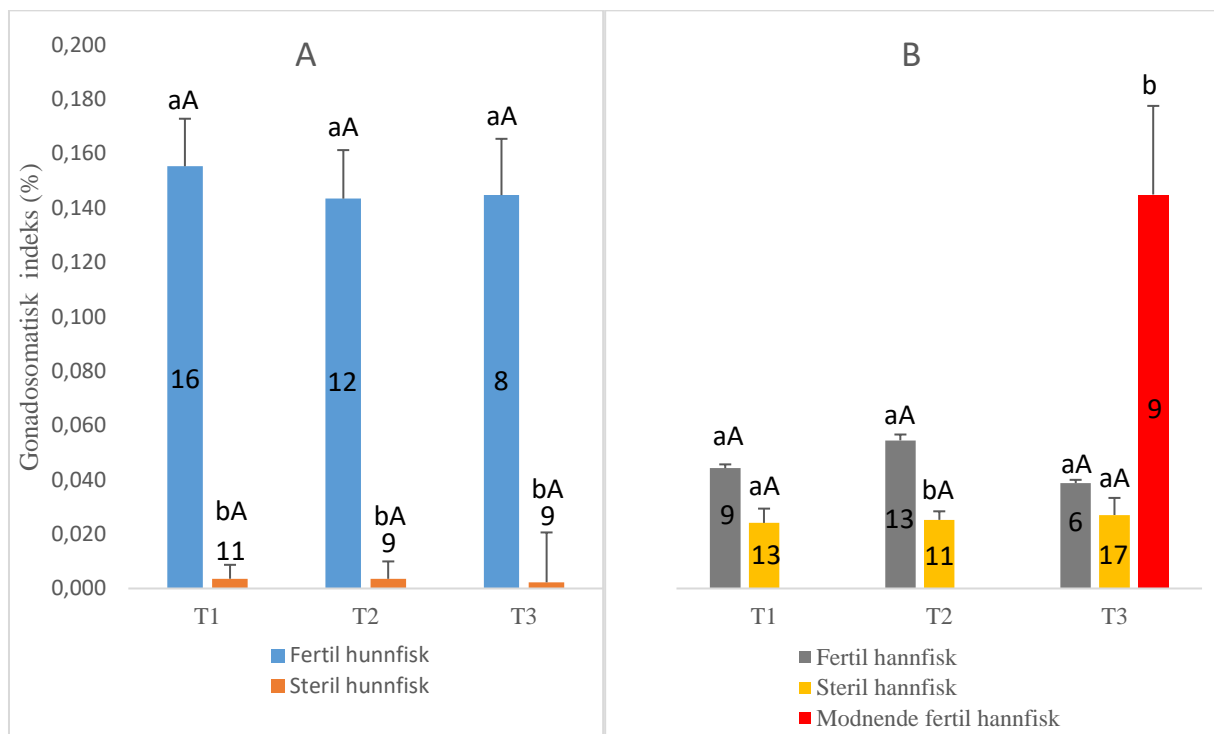
Alle statistiske analyser ble utført ved hjelp av SYSTAT 13 (Systat Software). Microsoft Excel 2013 ble brukt for å beregne, strukturere og kategorisere data, samt lage figurer/grafar. De ulike datasettene ble testet for normalfordeling ved hjelp av en Shapiro-Wilk normalitetstest. Et avvik fra normalfordeling ble ansett som signifikant når $P < 0,05$.

Toveis ANOVA og Post-hoc med Bonferroni test ble brukt for å avgjøre om det var statistisk signifikante forskjeller mellom uttak/tid og grupper for alle de ulike datasettene (GSI, SGR, K, vekt, *GnRH3a*, *GnRH3b*, *lhb*, *fhsb*, *cyp19a1a*, *cyp17a1*, *igf3*, *amh*, *vasa* og *dnd*). Forskjeller mellom gruppene eller tidspunkt ble ansett som signifikante når $P < 0,05$. For qPCR datasettene ble verdiene log-transformert for å oppnå normalfordeling og mest mulig homogen varians, noe som ble bekreftet med en Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) test. For å klargjøre presentasjonen er likevel figurer/grafar for qPCR datasettene presentert som originaldata uten log-transformasjon. Alle data er presentert som gjennomsnitt +standard avvik. For å lette lesbarheten til figurene er standard avvik angitt en vei (oppover).

3. Resultat

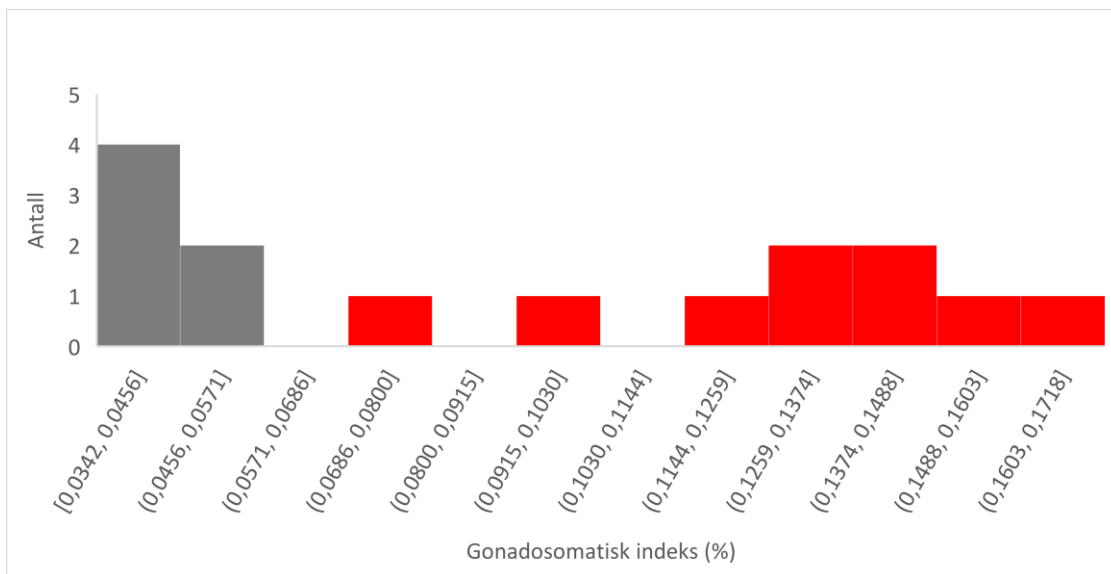
3.1 Gonadosomatisk indeks og kjønnsmodning

Gonadosomatisk indeks (GSI) for uttak T1-T3 viser at det var forskjell mellom sterilgruppene og fertilgruppene (Figur 6A og B). I sterilgruppen var gjennomsnittlig GSI på ca. 0,003 % hos hunnfisken og ca. 0,023 % hos hannfisken, mens i fertilgruppen var GSI på ca. 0,147 % hos hunnfisken og ca. 0,042 % hos hannfisken i løpet av forsøksperioden. Modnende fertil hannfisk hadde en gjennomsnittlig GSI på ca. 0,130 %. Det var signifikant forskjell i GSI mellom fertil og steril hunnfisk (Figur 6A), mens mellom fertil og steril hannfisk var det ingen signifikante forskjeller, bortsett fra ved T2 (Figur 6B). Det var ingen signifikant endring i GSI hos hverken steril hann- eller hunnfisk, eller fertil hunnfisk i løpet av forsøksperioden (Figur 6A og B).



Figur 6. Gonadosomatisk indeks (gonadevekt i % av kroppsvekt) (gjennomsnitt +standard avvik) ved uttak T1-T3 hos fertil- og steril hunnfisk (Figur A), og fertil-, steril- og modnende hannfisk (Figur B). Ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe. Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom gruppene innenfor et måletidspunkt. Tallet på/over søylene angir antall fisk i de respektive gruppene.

Ved T3 ble det oppdaget (visuelt/makroskopisk) begynnende kjønnsmodning (økt vaskularisering og størrelse av testis) hos en del individer i gruppen av fertile hannfisk. Et frekvensplott ved dette uttaket viste en klar bimodal GSI fordeling hos den fertile hannfisk der den øvre modalen («cut-off» ved $GSI > 0,07\%$) inneholdt ni individer med GSI som indikerte begynnende kjønnsmodning (Figur 7). Dette utgjorde 60% av totalt antall fertil hannfisk ved T3. Denne gruppen hadde en signifikant høyere GSI enn både fertil- og steril hannfisk og ble i de videre analysene behandlet som en egen gruppe («modnende fertil hannfisk») ved uttak T3. Tilsvarende frekvensplott viste ingen slik bimodalitet i GSI ved T1 og T2 (Appendiks).

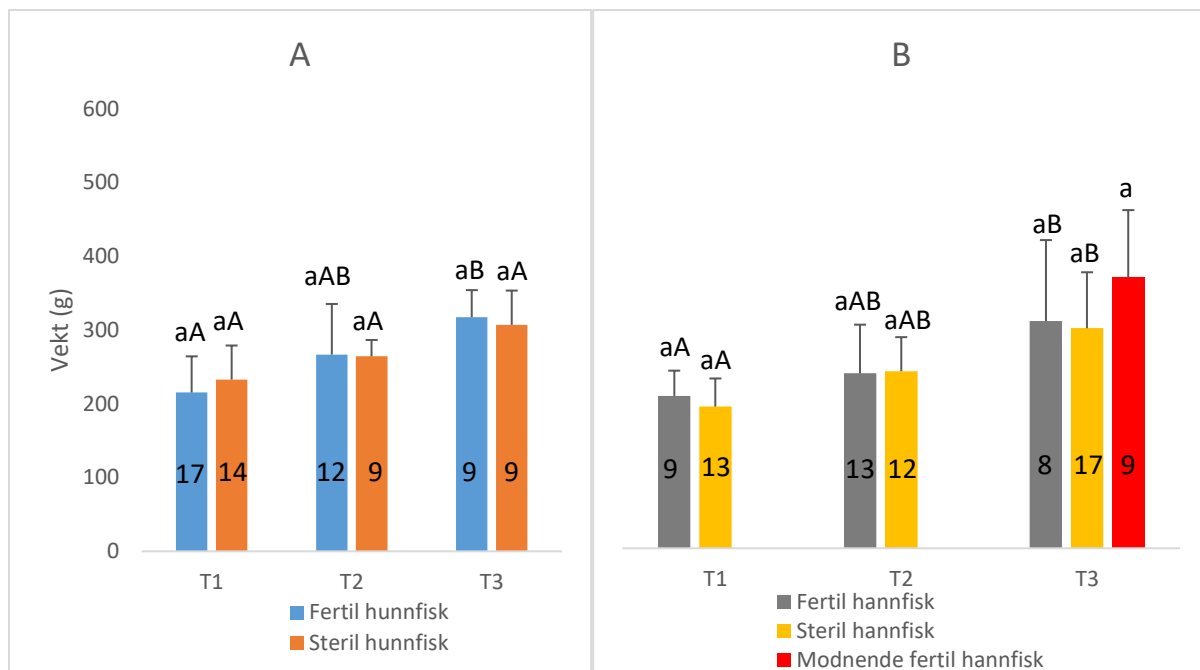


Figur 7. Frekvensplott av gonadosomatisk indeks hos fertil hannfisk ved T3 (n=15). Øvre modal $GSI > 0,07\%$ (søyler markert i rødt) indikerer individer med begynnende kjønnsmodning.

3.2 Produksjonsytelse

3.2.1 Vekt

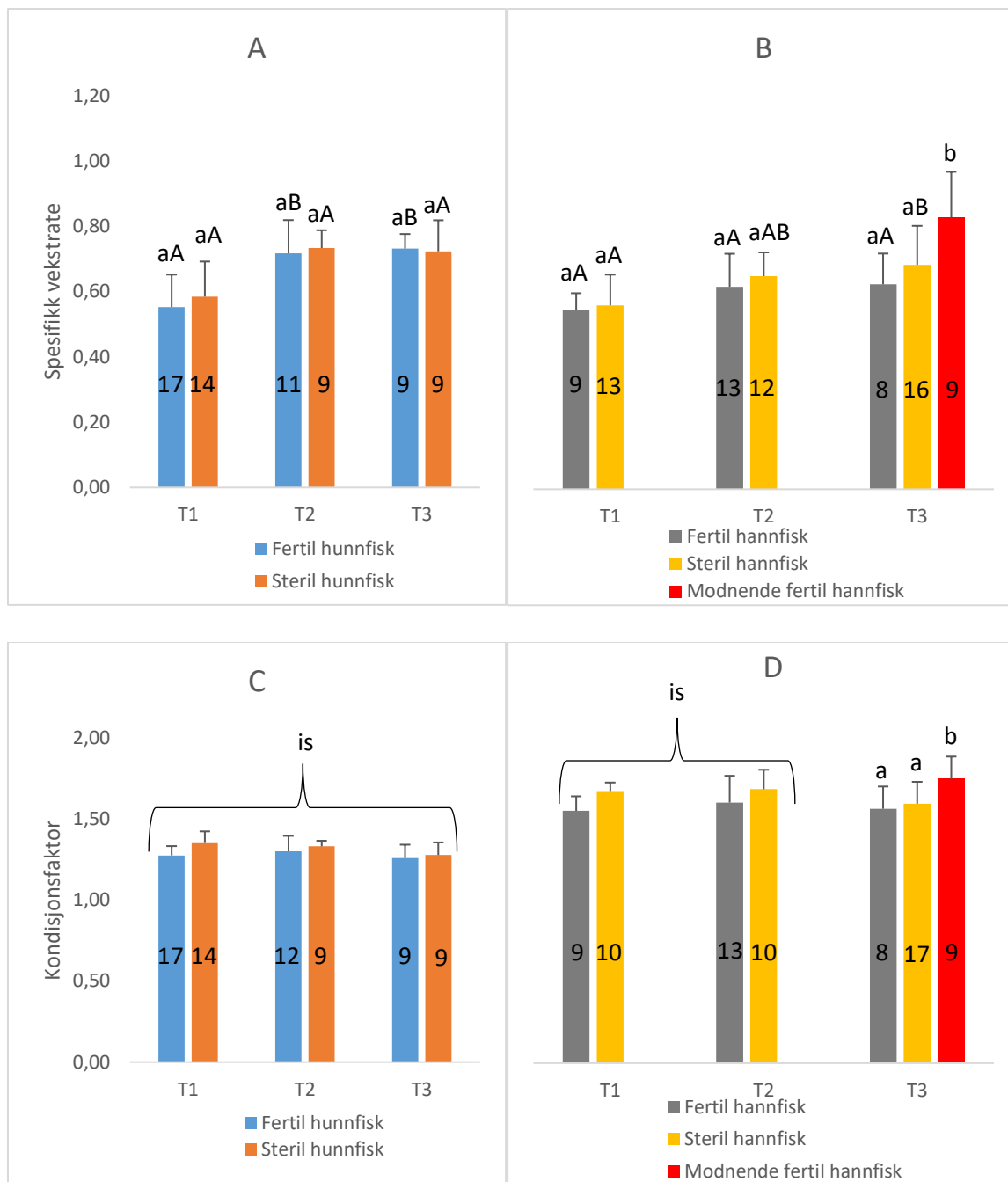
I steril- og fertilgruppene økte gjennomsnittsvekten fra ca. 220 til ca. 315 g hos hunnfisken og fra ca. 220 til ca. 340 g hos hannfisken i løpet av forsøksperioden (Figur 8). Kjønn hadde ingen signifikant effekt på gjennomsnittlig vekt og det var heller ingen forskjell i vekt mellom noen av gruppene steril- og fertil fisk ved noen av uttakene (Figur 8). Fertil- og sterilgruppene (hunn og hannfisk) hadde lik vektutvikling i perioden T1-T2, mens vektøkningen i perioden T1-T3 var signifikant for fertil hunnfisk, fertil- og steril hannfisk. Modnende fertil hannfisk skilte seg ut med en høyere gjennomsnittlig vekt sammenlignet med fertil- og steril hannfisk ved T3, med gjennomsnittsvekter på h.h.v. 415,5 gram, 348 gram og 337 gram – forskjellene var ikke statistisk signifikante (Figur 8A).



Figur 8. Vekt (g) (gjennomsnitt +standard avvik) ved uttak T1-T3 hos fertil- og steril hunnfisk (Figur A), og fertil-, steril- og modnende hannfisk (Figur B). Ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe. Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom gruppene innenfor et måletidspunkt. Tallet på/over søylene angir antall fisk i de respektive gruppene.

3.2.2 Spesifikk vekstrate (SGR) og kondisjonsfaktor (K)

Det var ingen effekt av kjønn på vekst i hverken fertil- eller sterilgruppene. I steril- og fertilgruppene økte SGR fra ca. 0,50 til ca. 0,74 hos hunnfisken og fra ca. 0,59 til ca. 0,75 hos hannfisken i løpet av forsøksperioden (SGR beregnet for T1 er fra kortdagsperioden med redusert temperatur) (Figur 9A og B). Modnende fertil hannfisk hadde en SGR på ca. 0,91 (Figur 9B) – noe som var signifikant høyere sammenlignet med steril- og fertil hannfisk. For perioden T1-T2 var det en signifikant økning i SGR hos fertil hunnfisk (Figur 9A) sammenlignet med T1 og for perioden T1-T3 var det en signifikant økning i SGR hos steril hannfisk (Figur 9B) sammenlignet med T1. Gjennomsnittlig K varierte mellom ca. 1,28 til ca. 1,36 for fertil- og steril hunnfisk, og ca. 1,24 til ca. 1,34 for fertil- og steril hannfisk (Figur 9C og D). Modnende fertil hannfisk hadde en gjennomsnittlig K på ca. 1,40 (Figur 9D). Det var ingen signifikant forskjell i gjennomsnittlig K mellom fertil- og sterilgruppene ved måletidspunktene (T1-T3), mens hos modnende fertil hannfisk var det en signifikant høyere K sammenlignet med alle de andre gruppene (Figur 9).

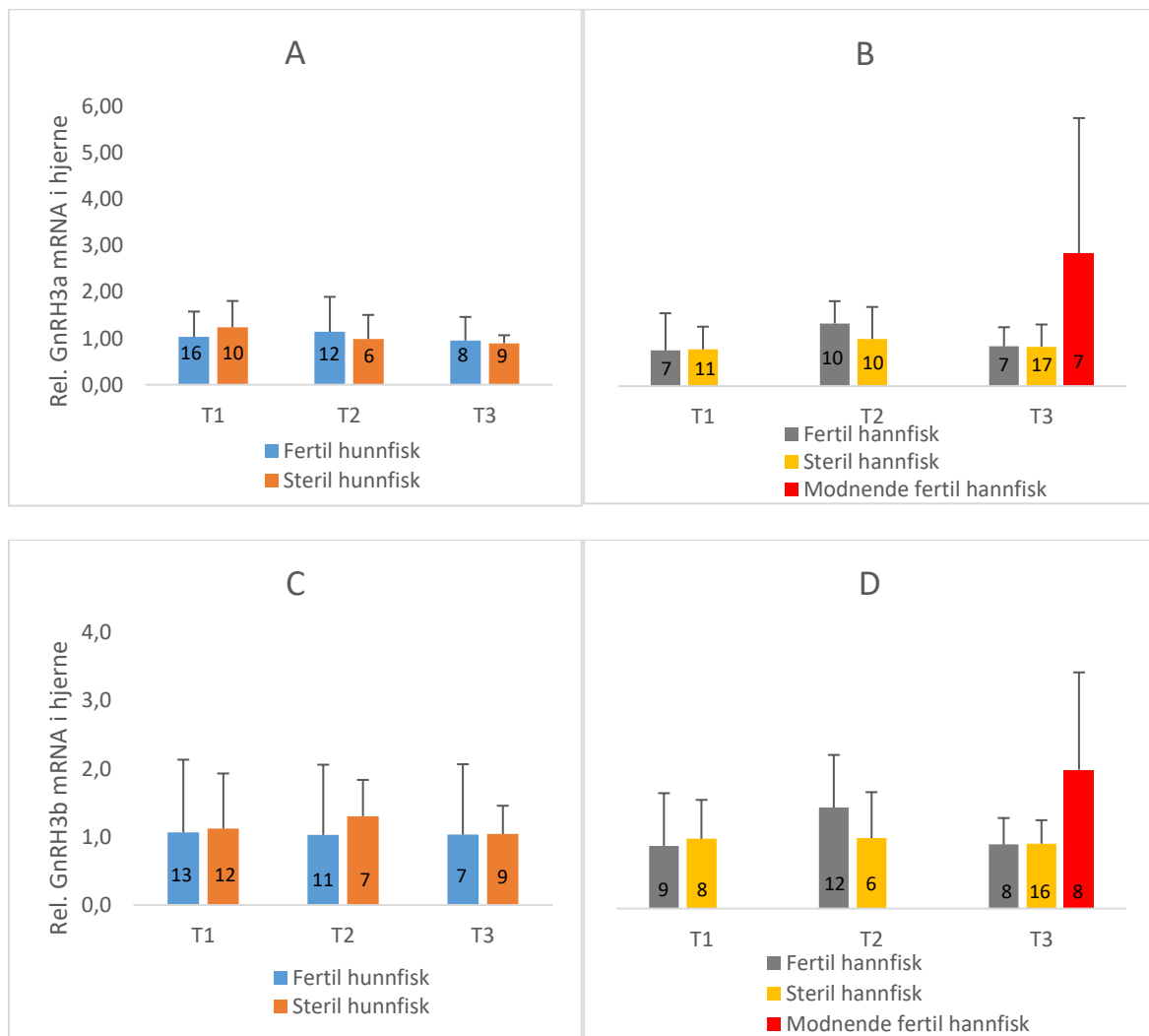


Figur 9. Spesifikk vekstrate (daglig tilvekst i % av kroppsvekt) og kondisjonsfaktor (gjennomsnitt +standard avvik) ved uttak T1-T3 hos fertil- og steril hunnfisk (Figur A og C), og fertil-, steril- og modnende fertil hannfisk (Figur B og D). Ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe. Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom gruppene innenfor et måletidspunkt. **Is** indikerer; ingen signifikant forskjell mellom grupper, hverken innad for et måletidspunkt eller mellom måletidspunkter ($P > 0,05$). Tallet på søylene angir antall fisk i de respektive gruppene.

3.3 Genuttrykk

3.3.1 Hjerne

Uttrykk av *GnRH3a* og *GnRH3b* hos hunnfisken (steril- og fertilgruppene) var rundt ca. 1,0 (Figur 10A og C) – det var ingen signifikant forskjell mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe eller mellom gruppene innenfor et måletidspunkt. Hos hannfisken var det akkurat samme trend som for hunnfisken i uttrykk av *GnRH3a* og *GnRH3b* (ca. 1,0 i gjennomsnittsverdi og ingen signifikante forskjeller), bortsett fra hos modnende fertil hannfisk som hadde en gjennomsnittsverdi på ca. 3,0 for *GnRH3a* og ca. 2,0 for *GnRH3b*. Det var imidlertid ingen statistisk signifikant forskjell når en sammenlignet modnende fertil hannfisk med resten av gruppene.

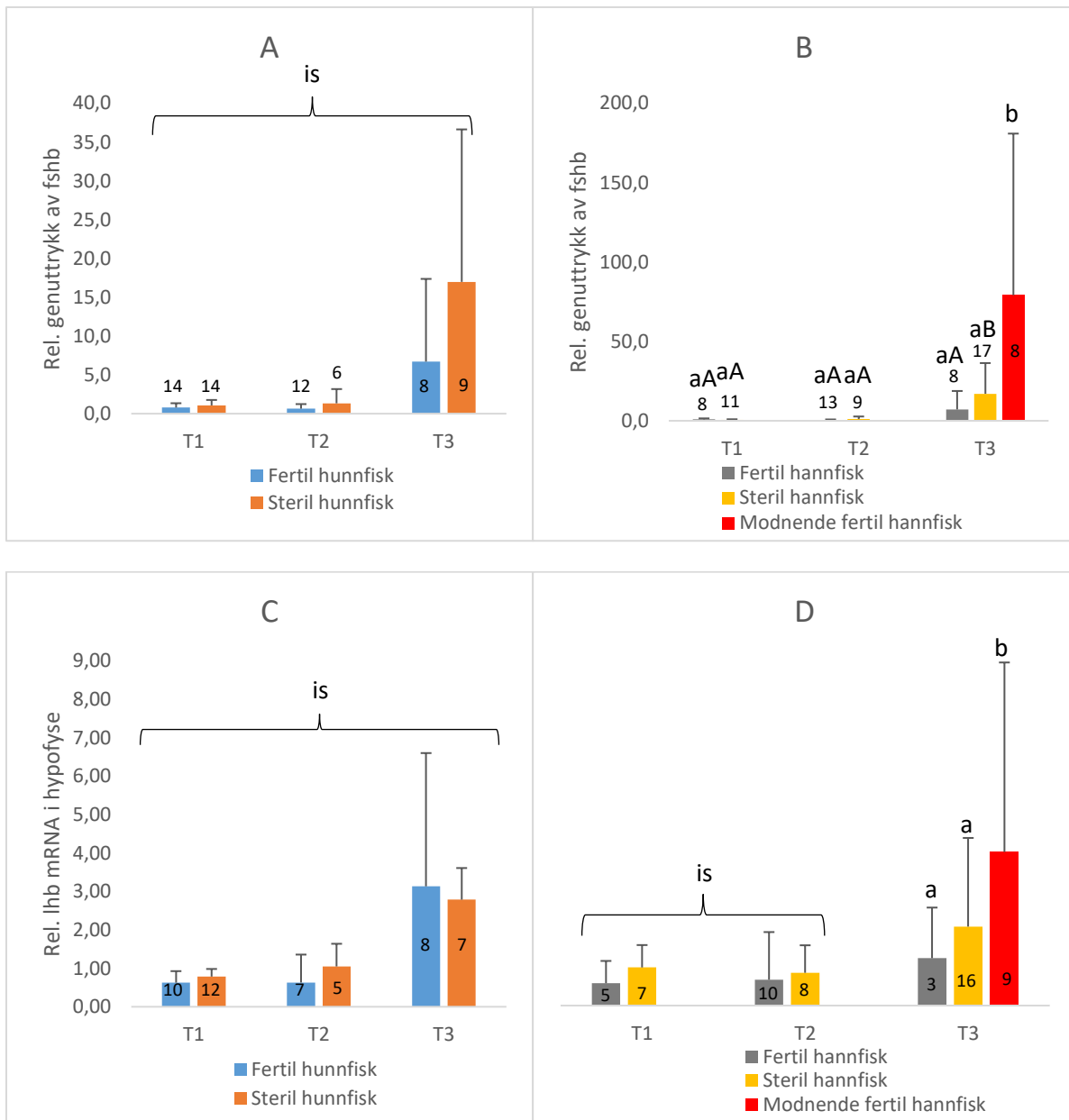


Figur 10. Relativt genuttrykk for *GnRH3a* og *GnRH3b* (gjennomsnitt +standardavvik) ved uttak T1-T3 hos fertil- og steril hunnfisk (Figur A og C), og fertil-, steril- og modnende fertil hannfisk (Figur B og D). Det var ingen forskjeller mellom gruppene eller innen gruppene over tid og for å bedre presentasjonen er bokstavangivelse av signifikante forskjeller utelatt. Tallet på søylene angir antall individer som ble analysert i de respektive gruppene.

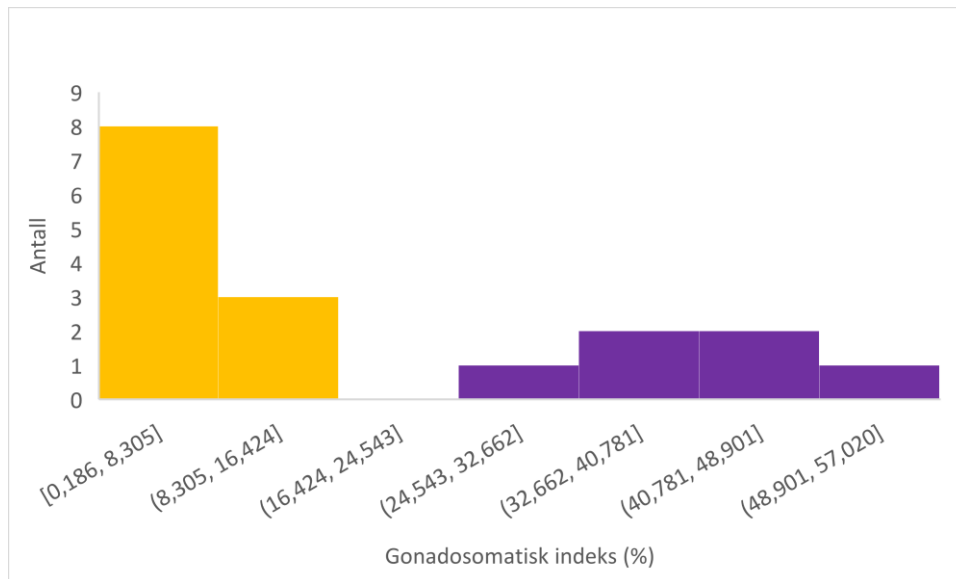
3.3.2 Hypofysen

I fertilgruppene (hunn- og hannfisk) økte det gjennomsnittlige uttrykket av *fshb* fra ca. 0,8 til ca. 7,1, og i sterilgruppene (hunn- og hannfisk) fra ca. 0,6 til ca. 17 i løpet av forsøksperioden (Figur 11A og B). Hos modnende fertil hannfisk var gjennomsnittlig uttrykk av *fshb* på ca. 79,1. I perioden T1-T2 var det ingen endring i uttrykk av *fshb* i noen av gruppene, men økte signifikant i perioden T2-T3 i alle gruppene, bortsett fra hos fertil hannfisk (Figur 11B). Modnende fertil hannfisk hadde et signifikant høyere uttrykk enn de andre gruppene. Det var ingen forskjell mellom steril- og fertil hunnfisk, og steril- og fertil hannfisk. Et frekvensplott av steril hannfisk ved T3 viste imidlertid at det var en undergruppe på seks individer (35%) som hadde signifikant høyere uttrykk av *fshb* enn resten av den sterile hannfisken (Figur 12).

Gjennomsnittlig uttrykk av *lhb* økte fra ca. 0,63 til ca. 3,13 hos fertilgruppene (hunn- og hannfisk) og fra ca. 0,58 til ca. 2,06 hos sterilgruppene (hunn- og hannfisk). Hos modnende fertil hannfisk var uttrykket av *lhb* på ca. 4,0 (Figur 11D). Det var ingen signifikant endring i uttrykk av *lhb* i perioden T1-T2 for noen av gruppene (Figur 11C og D). Det var imidlertid en signifikant oppregulering av *lhb* i perioden T2 til T3 hos fertil- og steril hunnfisk. Hos steril- og fertil hannfisk var det ingen statistisk signifikant økning av *lhb* i løpet av forsøksperioden. Modnende fertil hannfisk hadde et signifikant høyere uttrykk av *lhb* enn steril- og fertil hannfisk ved T1 og T2 (Figur 11D).



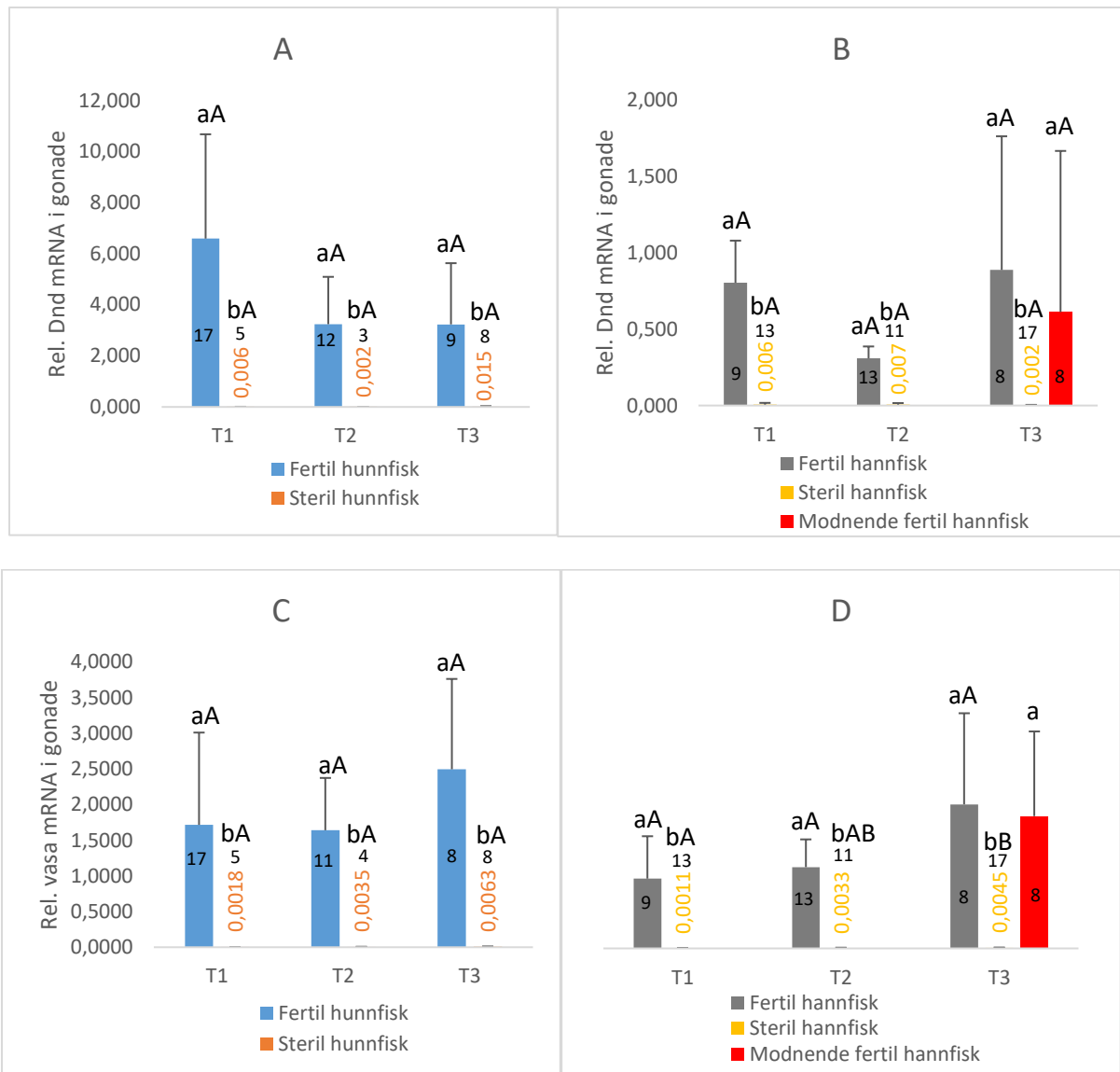
Figur 11. Relativt genuttrykk for *fshb* og *lhb* (gjennomsnitt +standardavvik) ved uttak T1-T3 hos fertil- og steril hunnfisk (Figur A og C), og fertil-, steril- og modnende hannfisk (Figur B og D). Ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe. Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom gruppene innenfor et måletidspunkt. **Is** indikerer; ingen signifikant forskjell mellom grupper, hverken innad for et måletidspunkt eller mellom måletidspunkter ($P > 0,05$). Tallet på søylene angir antall individer som ble analysert i de respektive gruppene. Skala på y-aksen varierer mellom figur A og B grunnet store forskjeller i uttrykk.



Figur 12. Frekvensplott av relativt genuttrykk for *fshb* hos steril hannfisk (n=17) ved måletidspunkt T3 viser en undergruppe på seks individer (søylar markert i lilla) som har verdier tilsvarende modnende fertil fisk.

3.3.3 Gonade

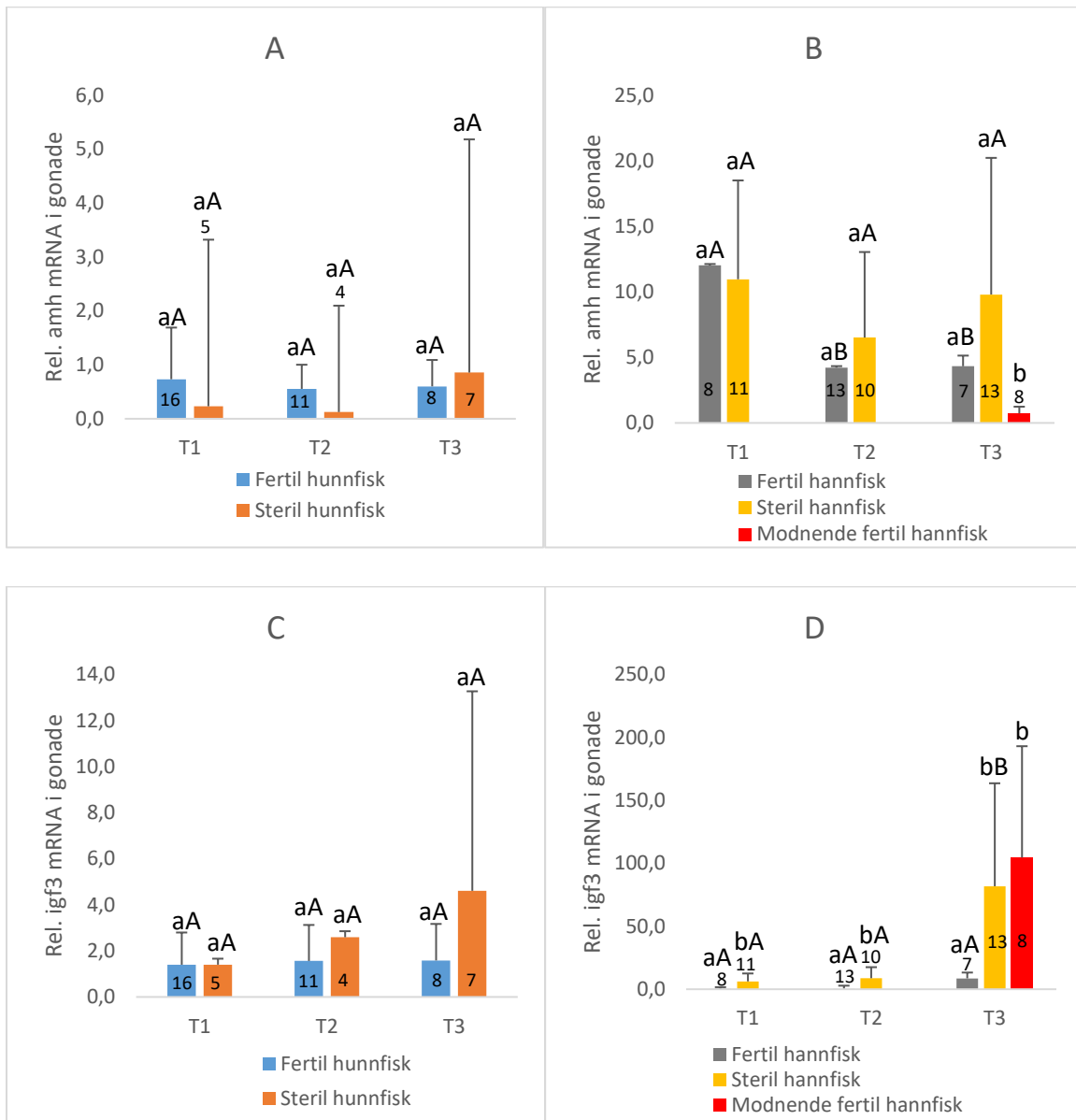
Gjennomsnittlig relativt genuttrykk av *dnd* og *vasa* var signifikant forskjellig mellom fertil- og sterilgruppene ved måletidspunktene (T1-T3) (Figur 13). Utrykk av *dnd* var fra ca. 0,002 til ca. 0,015 hos steril hunnfisk og fra ca. 0,002 til ca. 0,007 hos steril hannfisk i løpet av forsøksperioden (Figur 13A og B). Utrykk av *vasa* var fra ca. 0,0018 til ca. 0,0063 hos steril hunnfisk og fra ca. 0,0011 til ca. 0,0045 hos steril hannfisk i løpet av forsøksperioden (Figur 13C og D). Utrykk av *dnd* og *vasa* var fra ca. 0,3 til ca. 1,5 hos fertil hannfisk, og fra ca. 1,1 til ca. 6,5 hos fertil hunnfisk. Hos modnende fertil hannfisk var uttrykket av *dnd* og *vasa* h.h.v. på 0,6 og 1,4. Det var ingen signifikant endring i uttrykk av hverken *dnd* eller *vasa* ved T1-T3 innenfor gruppene - bortsett fra steril hannfisk som hadde en signifikant økning av *vasa* i perioden T1-T3 (uttrykket er fremdeles veldig lavt; fra 0,0011 ved T1 til 0,0045 ved T3). Hos sterilgruppene var det ingen signifikante kjønnsforskjeller i uttrykk av *dnd* og *vasa*, mens det hos fertilgruppene var en signifikant forskjell mellom kjønnene der hunnfisken hadde et høyere uttrykk av *dnd* enn hannfisken.



Figur 13. Relativt genuttrykk for *dnd* og *vasa* (gjennomsnitt +standardavvik) ved uttak T1-T3 hos fertil- og steril hunnfisk (Figur A og C), og fertil-, steril- og modnende hannfisk (Figur B og D). Ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe. Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom gruppene innenfor et måletidspunkt. Tallet på/ovenfor søylene angir antall individer som ble analysert i de respektive gruppene, og tall plassert vertikalt indikerer gjennomsnittlige uttrykkverdier hos steril hunn- og hannfisk. Skala på y-aksen varierer mellom figur A og B grunnet store forskjeller i uttrykk.

Gjennomsnittlig relativt genuttrykk for *anti-müllerian hormon (amh)* og *insulin-like growth faktor 3 (igf3)* hos fertil hunn- og hannfisk, steril hunn- og hannfisk og modnende fertil hannfisk ved uttak T1-T3 er vist i Figur 14. Kjønn hadde en signifikant effekt på uttrykk av begge genene (Figur 14A, B og C, D). Hos hunnfisken var hverken *amh* eller *igf3* forskjellig uttrykt mellom steril- og fertilgruppene, og det var heller ingen effekt av tid (T1-T3) på uttrykket av disse genene. Uttrykket av *amh* var ikke forskjellig mellom steril- og fertil hannfisk, mens modnende

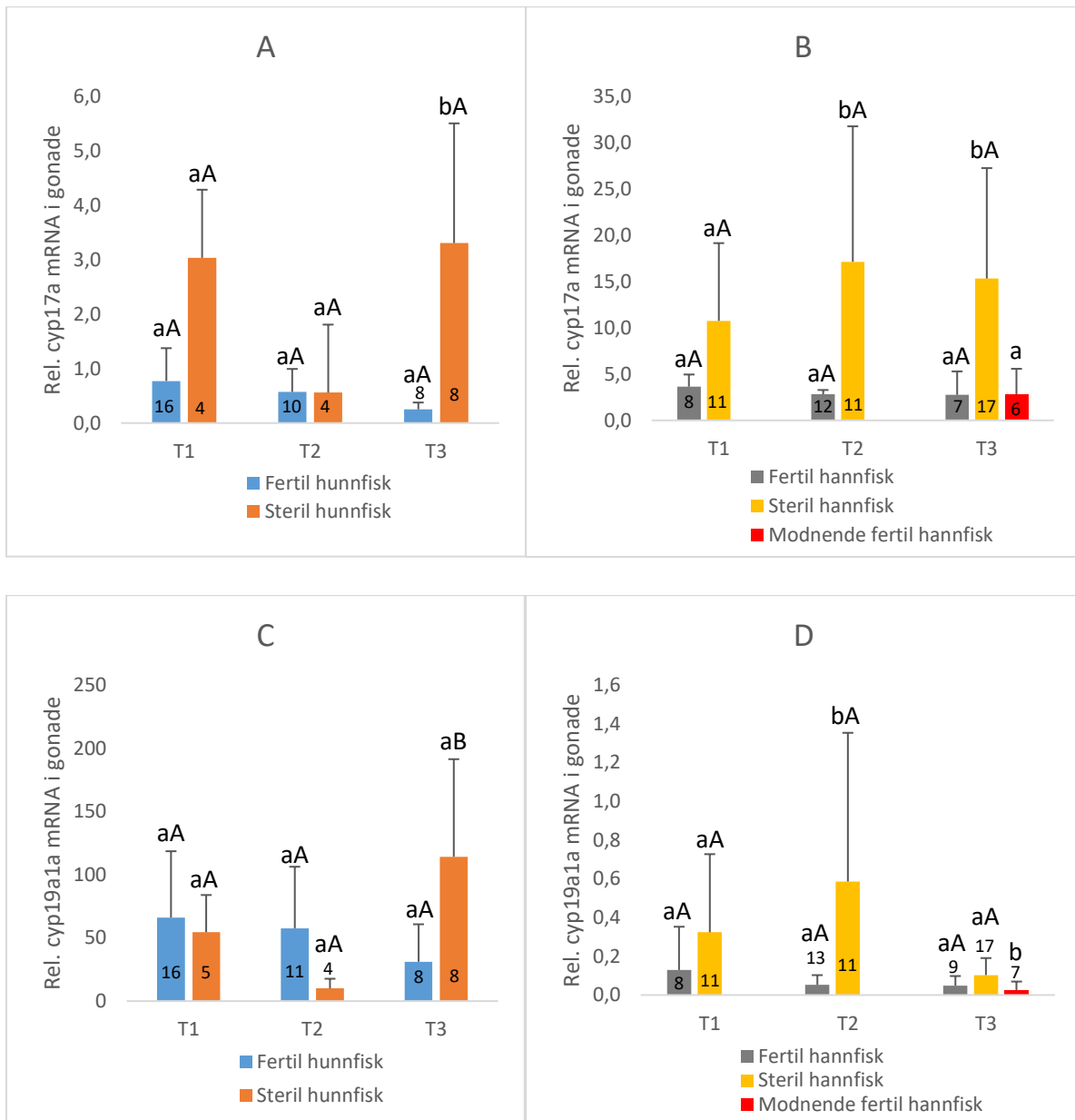
hannfisk hadde et signifikant lavere uttrykk sammenlignet med de andre gruppene (Figur 14B). Hos fertil hannfisk var det en signifikant nedgang i *amh* uttrykk i perioden T1-T2, mens det hos steril hannfisk var ingen effekt av tid (T1-T3) på uttrykket av dette genet. Gjennomsnittlig uttrykk av *igf3* hos hannfisken var signifikant høyere i sterilgruppene enn fertilgruppene ved alle måletidspunkter (Figur 14D). Det var en effekt av tid der sterilgruppen hadde en signifikant økning i perioden T2-T3 (Figur 14D).



Figur 14. Relativt genuttrykk for *amh* og *igf3* (gjennomsnitt +standardavvik) ved uttak T1-T3 hos fertil- og steril hunnfisk (Figur A og C), og fertil-, steril- og modnende hannfisk (Figur B og D). Ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller (P<0,05) mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe. Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller (P<0,05) mellom gruppene innenfor et måletidspunkt. Tallet på/ovenfor søylene angir antall individer som ble analysert i de respektive gruppene. Skala på y-aksen varierer mellom Figur A og B og Figur C og D grunnet store forskjeller i uttrykk.

For genet *cyp17a1* var det ingen endring i uttrykk over tid hverken hos hunn- eller hannfisken i løpet av forsøksperioden (Figur 15A og B). Hos hunnfisken var det en signifikant forskjell mellom steril- og fertilgruppen ved T3, der gjennomsnittsverdien var på h.h.v. 3,3 og 0,3 (Figur 15A). Steril hannfisk hadde også et signifikant høyere uttrykk av *cyp17a1* enn fertilgruppen ved T2 og T3, samtidig som uttrykket også var høyere enn modnende hannfisk ved T3 (Figur 15B). Det var også en signifikant forskjell mellom steril hunn- og hannfisk, og mellom fertil hunn- og hannfisk – det var konsistente kjønnsforskjeller der hunnfisken hadde et lavere uttrykk enn hannfisken.

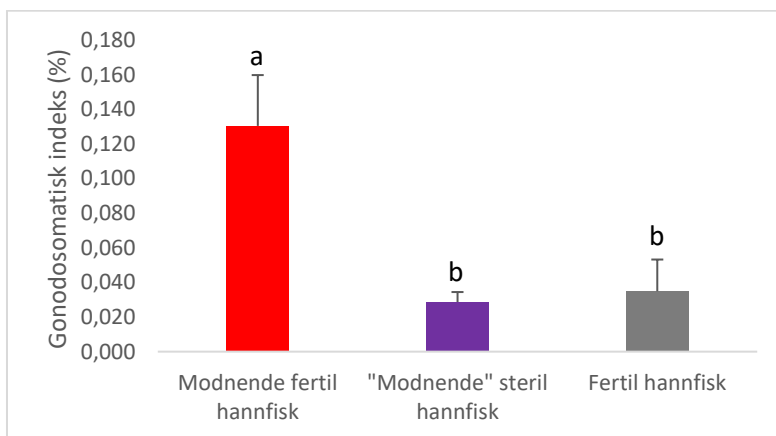
Det var store kjønnsforskjeller i uttrykket av *cyp19a1a*, der hunnfisk hadde en signifikant høyere gjennomsnittsverdi enn hannfisk. Det var ingen endring av *cyp19a1a* hos fertil hunnfisk i løpet av forsøksperioden, mens det hos steril hunnfisk var en signifikant oppregulering i perioden T2-T3 (Figur 15C). Det var ingen signifikant forskjell mellom steril- og fertil hunnfisk i løpet av forsøksperioden. Hos hannfisken var det ingen endring av *cyp19a1a* i løpet av hele forsøksperioden. Ved T2 hadde den sterile hannfisken et signifikant høyere nivå av *cyp19a1a* enn den fertile hannfisken, mens ved T3 var det bare en signifikant forskjell mellom steril hannfisk og modnende hannfisk (Figur 15D).



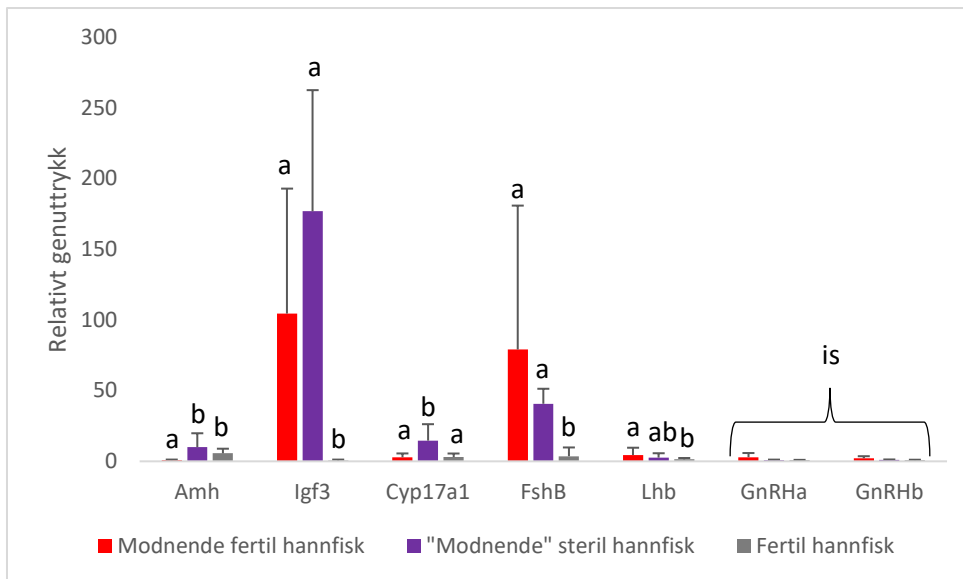
Figur 15. Relativt genuttrykk av *cyp17a1* (*cytochrome p450 17a1*) og *cyp19a1a* (*p450 aromatase*) (gjennomsnitt + standardavvik) ved uttak T1-T3 hos fertil- og steril hunnfisk (Figur A og C), og fertil-, steril- og modnende hannfisk (Figur B og D). Ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom måletidspunkt innenfor samme gruppe. Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom gruppene innenfor et måletidspunkt. Tallet på/ovenfor søylene angir antall individer som ble analysert i de respektive gruppene. Skala på y-aksen varierer mellom Figur A og B og Figur C og D grunnet store forskjeller i uttrykk.

3.4 Sammenligning av ulike grupper hannfisk ved T3

Basert på frekvensplottet i Figur 12 viste det seg å være undergruppe/modalitet på 35% i uttrykk av *fshb* hos steril hannfisk ved T3. En sammenligning av genuttrykk som indikerer modning mellom denne undergruppen (heretter kalt «modnende» steril hannfisk), modnende fertil hannfisk og fertil hannfisk ble derfor undersøkt. Det var ingen signifikant forskjell i GSI mellom «modnende» steril hannfisk og fertil hannfisk der gjennomsnittet var på h.h.v. ca. 0,03 og ca. 0,04, men der GSI hos modnende fertil var signifikant høyere (ca. 0,13) (Figur 16). Uttrykket av *fshb* og andre modningsrelaterede gener hos denne undergruppen var ikke forskjellig fra det en finner hos modnende fertil fisk. Uttrykket av *fshb* var signifikant høyere hos modnende fertil- og «modnende» steril hannfisk sammenlignet med fertil hannfisk (Figur 17). Uttrykket av *lhb* var signifikant høyere hos modnende fertil hannfisk sammenlignet med fertil hannfisk. «Modnende» steril hannfisk hadde et uttrykk av *lhb* som ikke var signifikant forskjellig fra noen av de andre gruppene (modnende fertil- og fertil hannfisk). For genet *cyp17a1* hadde «modnende» steril hannfisk et signifikant høyere uttrykk sammenlignet med de to andre gruppene. Uttrykket av *igf3* var høyest hos «modnende» steril hannfisk etterfulgt av modnende fertil hannfisk – gjennomsnittet var på h.h.v. ca. 177 og ca. 105, og disse to gruppene hadde et signifikant høyere uttrykk enn fertil hannfisk (Figur 17). For genet *amh* var uttrykket signifikant lavere hos modnende fertil hannfisk sammenlignet med «modnende» steril hannfisk og fertil hannfisk (Figur 17).

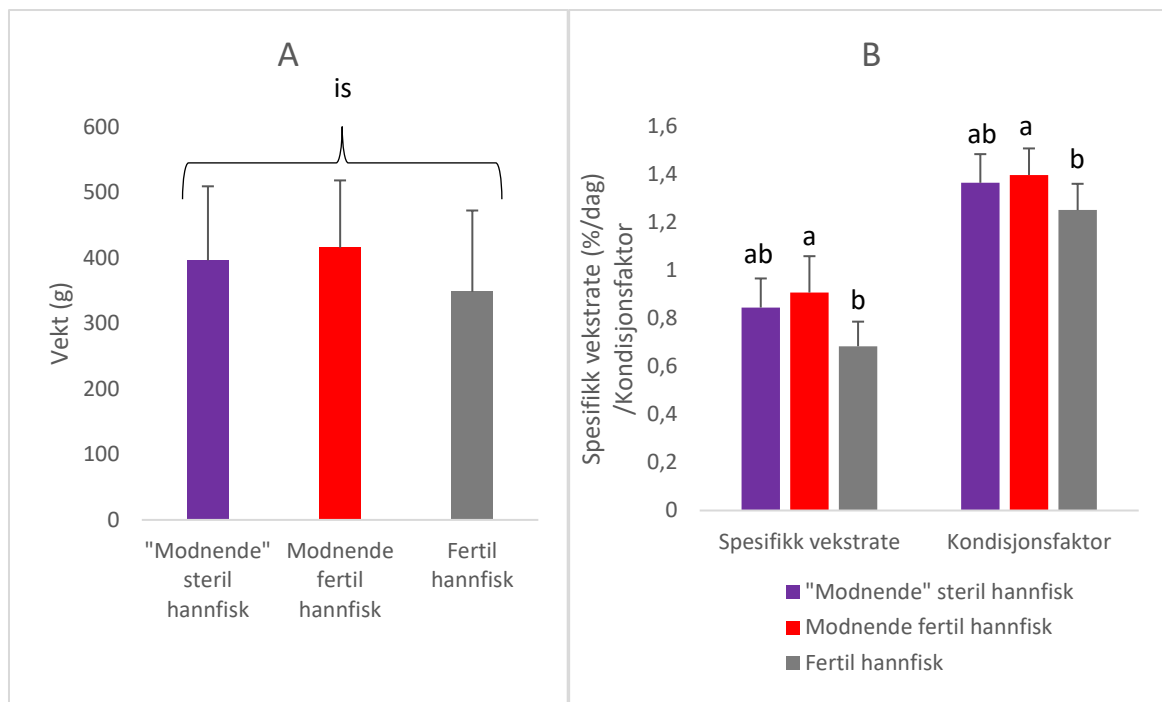


Figur 16. Gjennomsnittlig (+standard avvik) gonadosomatisk indeks ved uttak T3 hos modnende fertil-, «modnende» steril- og fertil hannfisk. Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom gruppene innenfor et måletidspunkt.



Figur 17. Relativt genuttrykk av *amh*, *igf3*, *cyp17a1*, *fshb*, *lhb*, *GnRH3a* og *GnRH3b* (gjennomsnitt +standardavvik) ved uttak T3 hos modnende fertil-, «modnende» steril- og fertil hannfisk. Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom gruppene innenfor de respektive gener. Is indikerer; ingen signifikant forskjell mellom grupper ($P > 0,05$).

Det var ingen signifikant vektforskjell mellom «modnende» steril hannfisk, modnende fertil hannfisk og fertil hannfisk ved T3. Gjennomsnittlig vekt var på 396 g («modnende» steril hannfisk), 415 g (modnende fertil hannfisk) og 348 g (fertil hannfisk) (Figur 18A). Det var heller ingen signifikant forskjell i SGR og K mellom «modnende» steril hannfisk og modnende fertil hannfisk (Figur 18B). Fertil hannfisk var imidlertid signifikant forskjellig fra modnende fertil hannfisk med hensyn på SGR og K, men ikke fra «modnende» steril hannfisk (Figur 18B). Gjennomsnittlig SGR for «modnende» steril hannfisk, modnende fertil hannfisk og fertil hannfisk var på h.h.v. 0,84%, 0,91% og 0,68%, mens gjennomsnittlig K var på 1,36 («modnende» steril hannfisk), 1,40 (modnende fertil hannfisk) og 1,25 (fertil hannfisk) (Figur 18B).



Figur 18. Vekt (g), Spesifikk vekstrate (daglig tilvekst i % av kroppsvekt) og kondisjonsfaktor (gjennomsnitt + standard avvik) ved uttak T3 hos «modnende» steril-, modnende fertil- og fertil hannfisk. Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom gruppene. **Is** indikerer; ingen signifikant forskjell mellom grupper ($P > 0,05$). Skala på y-aksen varierer mellom Figur A og B.

4. Diskusjon

Det er et klart behov for steril fisk i oppdrettsnæringen - med dagens åpne merdssystem har næringen et stort miljøproblem knyttet til uønskede rømminger av oppdrettslaks som fører til genetisk innblanding med villaks. Det har imidlertid ikke blitt utviklet noen gode steriliseringsmetoder så langt – den eneste steriliseringsmetoden som benyttes i kommersiell produksjon i dag er triploidisering. Triploid laks, som har et ekstra sett av kromosomer, har imidlertid store utfordringer knyttet til opprettholdelse av akseptable produksjonsegenskaper. En ny fungerende steriliseringsmetode som gir en fisk med tilsvarende eller bedre produksjonsytelse enn vanlig fertil fisk kan derfor bidra til bærekraftig vekst i oppdrettsnæringen.

Det har opp gjennom tiden blitt gjort flere forsøk på å utvikle nye steriliseringsmetoder. Studier gjort på andre virveldyr har vist at fullstendig bortfall av kjønnscellene har resultert i sterilitet, samtidig som gonadens evne til å produsere kjønnssteroider har vært intakt (McNeilly *et al.*, 2000).

Hos sebrafisk er det blant annet vist at ved å hindre dannelsen av PGCer på tidlig stadium i embryogenesen vil dette føre til utvikling av gonader uten kjønnsceller senere i ontogenesen, og dermed et sterilt individ (Weidinger *et al.*, 2003). Sebrafisken til Weidinger *et al.* (2003) og arbeid gjort av Slanchev *et al.* (2005) viste at slik kjønnsellefri fisk produserer kjønnssteroider og har normal reproduktiv atferd. Gjennom forskningsprosjektet «Salmosterile» har det blitt utviklet en tilsvarende metode for å fjerne PGCene hos atlantisk laks (se innledningen). Varigheten til dette prosjektet har imidlertid ikke vært lang nok til å bekrefte funksjonell sterilitet ved det som er antatt å være naturlig alder for kjønnsmodning (3+ år under oppdrettsbetingelser) hos denne arten. I dette arbeidet er det imidlertid to forhold som ytterligere underbygger at metoden som er benyttet resulterer i varig sterilitet; evaluert via uttrykk av (bortfall av) kjønnsellemarkørene *vasa* og *dnd* ble gonadene hos både steril hann og hunnfisk dokumentert fri for kjønnsceller. Bortfall av viktige kjønnsellemarkører indikerer at det ikke er noen re-etablering av kjønnsellelinjen selv ved dette stadiet (ca. 2 år etter befruktning) i utviklingen. Disse observasjonene indikerer at bortfallet av kjønnsellelinjen er permanent. Videre ble det i dette arbeidet registrert en relativt høy andel individer med økt GSI, som indikerer begynnende naturlig testisutvikling/kjønnsmodning, hos fertil hannfisk. En slik økning i GSI ble ikke observert hos noen sterile hannfisk. Manglende initiering av gonadevekst indikerer derfor også at disse individene er funksjonelt sterile ved det som er å anse som

«naturlig» alder for kjønnsmodning hos laks holdt under gode vekstbetingelser (Melo *et al.*, 2014). Den overordnede hensikten med dette prosjektet var å undersøke hvordan bortfall av kjønnsceller påvirker uttrykk av viktige gener/faktorer som er viktige for normal funksjon av HPG-aksen.

4.1 Bortfall av kjønnsceller, gonadosomatisk indeks og kjønnsmodning

I dette forsøket er steril- og fertilgruppene delt inn i fem ulike grupper (steril hunn- og hannfisk, fertil hunn- og hannfisk og modnende fertil hannfisk). Årsaken til inndelingen var at de ulike gruppene skiller seg ut med forskjellig GSI, genuttrykk (og gener) og tid for modning mellom kjønn. Resultatene vist i Figur 6 viste at steril hunnfisk hadde en signifikant lavere GSI sammenlignet med fertil hunnfisk (0,003 % (steril) og 0,147% (fertil)). Hos steril hannfisk var GSI ca. det halve av det som ble observert hos fertil hannfisk, uten at GSI var signifikant forskjellig mellom de to kategoriene. Grunnen til at det var større forskjeller hos hunnfisken kan være fordi hannfisken utvikler tilsynelatende vanlige kjønnsorganer (uten spermceller), mens hunnfisken utvikler bare en liten rognpose (uten eggceller). Eggcellene er mye større og utgjør en større del av gonaden sett i forhold til somatisk vev. I perioden T1-T3 var det ingen økning i GSI hverken for steril hunn- og hannfisk eller fertil hunn- og hannfisk, noe som indikerer at ingen av disse gruppene var i ferd med å modne. En slik observasjon indikerer sterkt at, i det minste hannfisken er funksjonelt steril på et stadium i utviklingen der fertil hannfisk initierer kjønnsmodning. Tilsvarende GSI-verdier hos sterilgruppene ble også funnet i Kleppe *et al.* (2017) sin studie på kjønnsellefri atlantisk laks.

Hos den fertile hannfisken viste makroskopiske undersøkelser tegn til begynnende modning hos en del individer ved T3. Et frekvensplott av fertil hannfisk ved uttak T3 viste en bimodalfordeling («cut-off» ved $GSI > 0,07\%$) (Figur 7). En slik bimodal fordeling av GSI har i tidligere forsøk indikert begynnende modning hos fisk tilhørende den øvre modalen (Fjelldal *et al.*, 2018; Melo *et al.*, 2014; Middleton *et al.*, 2019). Det var 60% ved dette uttaket (T3) som var i den øvre modalen (modnende fertil hannfisk), og med en gjennomsnittlig GSI på 0,13 mot 0,035 (nedre modalen; fertil (ikke modnende) hannfisk) var det en signifikant forskjell sammenlignet med fertil hannfisk.

4.2 Modning og genuttrykk

Et delmål med dette forsøket var å undersøke hvordan bortfall av kjønnsceller påvirker uttrykk av gener/faktorer som er viktige for normal funksjon av HPG-aksen. De respektive genene som ble undersøkt var *GnRH3a*, *GnRH3b*, *fshb*, *lhb*, *cyp19a1a*, *cyp17a1*, *igf-3*, *amh*, *dnd* og *vasa*.

4.2.1 Modnende fertil hannfisk

Det var totalt ni individer (60%) som ble karakterisert som modnende fertil hannfisk basert på en forhøyet GSI hos fertil hannfisk ved T3 (se over). For å ytterligere avgjøre om disse fiskene var i ferd med å modne ble uttrykket av gener som kan indikere begynnende modning undersøkt.

Ved uttak T3 var det en tydelig økning av både *GnRH3a* og *GnRH3b* hos modnende fertil hannfisk (Figur 10B og D). Forskjellene var imidlertid ikke statistisk signifikante fra steril- og fertilgruppene. En mulig årsak til dette kan være at en Bonferroni test er konservativ (Materiale og metoder), og derfor vil mindre forskjeller, lavt n-tall og stor variasjon i datasettet ikke gi utslag med denne testen. Både uttrykkene av *fshb* og *lhb* var signifikant høyere hos modnende fertil hannfisk sammenlignet med fertil- og steril hannfisk (Figur 11B og D). I tillegg hadde modnende fertil hannfisk et signifikant lavere *amh* uttrykk og et signifikant høyere *igf3* uttrykk sammenlignet med alle de andre gruppene (Figur 14). Dette indikerer sterkt at fisken har hatt sirkulerende FSH – noe som bekrefter sammenheng mellom genuttrykk og biologisk funksjon. Et forhøyet uttrykk av *fshb* og *lhb* (spesielt førstnevnte) i hypofysen (via sirkulerende FSH) har stimulert sertolicellene til å hemme produksjon av *amh*, og øke produksjon av *igf3*. *Amh* hemmer spermatogonial proliferasjon (Miura *et al.*, 2002), mens *igf3* stimulerer til spermatogonial proliferasjon (Nóbrega *et al.*, 2015). Resultatene samsvarer også med andre arbeider som sier at det nettopp er dette som skjer ved modning (Middleton *et al.*, 2019; Schulz *et al.*, 2019).

I tillegg stemmer uttrykksprofilen av *igf3* og *amh* hos modnende fertil hannfisk godt overens med forskning som viser en klar sammenheng mellom et høyt *igf3* uttrykk og et lavt *amh* uttrykk i modnende testis (Kleppe *et al.*, 2017; Wargelius *et al.*, 2016). Et slikt forhold kan muligens også forklare den signifikante nedgangen i *amh* uttrykk i perioden T1-T2 hos fertil hannfisk som ble observert i denne undersøkelsen (Figur 14B). Noe som videre indikerer at endringer i genuttrykk og regulatoriske faktorer sannsynligvis vil komme til uttrykk før en vil kunne observere en utvikling og vekst i gonaden.

Basert på disse resultatene har en også molekylærbiologisk bekreftet at disse individene i gruppen modnende fertil hannfisk faktisk er i ferd med å modne. Dette er i overensstemmelse med bimodaliteten/cut-off i GSI som lå til grunn for grupperingen innledningsvis. Resultatene betyr at en kan benytte GSI som en proxy for modning allerede på dette stadiet/nivået i utviklingen. Ved å undersøke frekvensfordelingen av GSI slik som i mitt forsøk har smoltleverandører mulighet til å vite andelen som vil gå inn i tidlig modning lenge før det er mulig å se dette på ytre trekk.

4.2.2 Fertil fisk versus steril fisk

For genene *GnRH3a* og *GnRH3b* var uttrykket lavt gjennom hele forsøksperioden. Det var ingen signifikante forskjeller mellom steril- og fertilgruppene. Uttrykk av *fshb* og *lhb* viste heller ingen signifikante forskjeller mellom fertil- og sterilgruppene. Disse resultatene indikerer at bortfall av kjønnscellene ikke har noen påvirkning på hjerne- og hypofysenivå i HPG-aksen når det gjelder uttrykk av disse genene hos juvenile individer.

Uttrykket av *amh* i testis har blitt funnet å blokkere androgenindusert spermatogenese (Miura *et al.*, 2002), hemme differensiering av spermatogonia og FSH-stimulert steroidsyntese (Skaar *et al.*, 2011). I tillegg er uttrykket av *amh* kjent for å være lavt under naturlig pubertet og ved stimulering av testis med gonadotropiner (Maugars & Schmitz, 2008; Miura *et al.*, 2002). Uttrykk av *igf3* har vist seg å være en motsetning til *amh* ved å stimulere til proliferasjon av kimeceller (Loir, 1999), og i tillegg være en nødvendig faktor for androgenstimulert spermatogenese (Nader *et al.*, 1999). På denne måten er disse genene gode markører for umoden og moden testis (Kleppe *et al.*, 2017). Mine funn i denne oppgaven samsvarer godt med forskning av *amh* og *igf3* som beskrevet over – umoden fisk har høyt uttrykk av *amh* (høy inhibering), og en nedregulering via FSH er nødvendig for initiering av modning, samtidig med en oppregulering av steroidsyntese og *igf3* (Se modnende fertil hannfisk for en slik respons). Hos fertil hannfisk var det, som nevnt tidligere, en signifikant nedgang i *amh* uttrykk i perioden T1-T2 – noe som kan indikere begynnende modning på molekylært nivå, mens hos steril hannfisk var det ingen effekt av tid (T1-T3). Hos den fertile fisken må en se om nedgangen av *amh* uttrykk i perioden T1-T2 har sammenheng med uttrykk av andre modningsrelaterte gener. Uttrykket av *igf3* hos hannfisken viste at det var forskjell mellom steril- og fertilgruppene – signifikant lavere hos fertilgruppen ved alle måletidspunkt (Figur 14). Steril hannfisk viste også en signifikant økning i perioden T2-T3, mens hos fertil hannfisk var det ingen signifikant

endring i uttrykk av *igf3*. Økning i uttrykk av *igf3* hos steril hannfisk betyr trolig at sertolicellene i testis har respondert på økt utskillelse av FSH. I en studie gjort av Kleppe *et al.* (2017) var også transkripsjonsnivåene av *igf3* signifikant høyere i kjønnscelefrie-testikler sammenlignet med testikler fra umoden fertil fisk, noe som også samsvarer svært godt med mine funn i denne oppgaven. Dette kan bety at sertoliceller i kjønnscelefrie hannfisk viser en viss grad av modning uten at gonaden vokser, grunnet manglende kjønnsceller. På individnivå var det generelt sett stor variasjon i genuttrykk, noe som gjør at det blir relativt store avvik, spesielt hos sterilgruppene. En slik observasjon kan indikere at noen av uttrykkene har manglende feedback hos fisk uten kjønnsceller eller at flere av fiskene er i en begynnende modningsprosess som nevnt tidligere.

For genet *cyp17a1* var det også en trend at sterilgruppene hadde et høyere uttrykk enn fertilgruppene (Figur 15A og B). Det var også en signifikant forskjell mellom steril hunn- og hannfisk, og mellom fertil hunn- og hannfisk. Det var konsistente kjønnsforskjeller der hunnfisken hadde et lavere uttrykk enn hannfisken. Steril hannfisk hadde signifikant høyere uttrykk enn fertil hannfisk ved T2 og T3. Hos hunnfisken var det en signifikant forskjell mellom steril- og fertilgruppen ved T3, der gjennomsnittsverdien var på hhv. 3,3 og 0,3 (Figur 15A). Som nevnt i innledningen er *cyp17a1* involvert i viktige konverteringer mot androgenproduksjon. Resultatene viste en oppregulering av *cyp17a1* hos steril fisk, noe som kan bety at den er i stand til å produsere kjønnssteroider. Det betyr mest sannsynlig at i dette trinnet av steroidgenesen (mot androgenproduksjon) var det ingen inhibering hos steril fisk. Tidligere arbeid på kjønnscelefrie fisk har vist at det var en kjønnsforskjell i oppregulering av *cyp17a1*, der hannfisk hadde en mye lavere evne til oppregulering enn hunnfisken (Kleppe *et al.*, 2017).

For genet *cyp19a1a* var det hunnfisken som hadde et signifikant høyere uttrykk enn hannfisken (Figur 15C og D). Hos hunnfisken var det varierende resultater i perioden T1-T3, men i perioden T2-T3 hadde steril hunnfisk en signifikant økning, og ved T3 hadde sterilgruppen et høyere uttrykk enn fertilgruppen. Hos hannfisken var det et svært lavt uttrykk sammenlignet med hunnfisken, men også her var uttrykket høyest hos sterilgruppene. Cyp19 er viktig for omdannelse av testosteron til østrogen (Rodríguez-Marí *et al.*, 2005) og derfor var det ikke overraskende at det var hunnfisken som hadde et høyere uttrykk enn hannfisken. Uttrykket av *cyp19a1a* hos steril hunnfisk tyder på at de mest sannsynlig vil være i stand til å produsere østradiol.

Flere studier har vist at *cyp19a1a* er høyt uttrykt i ovariene sammenlignet med testis som mangler uttrykk av dette genet (Fujimoto *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014; Weidinger *et al.*, 2003). I tillegg fant Wargelius *et al.* (2016) at *Dnd* mutert fisk (uten kjønnsceller) hadde et høyere uttrykk av *cyp19a1a* sammenlignet med «vanlig» fertil hunnfisk. Resultatene av *cyp19a1a* fra denne oppgaven samsvarer godt med forskningen beskrevet over.

Uttrykk av genene på gonadenivå (*amh*, *igf3*, *cyp17a1* og *cyp19a1a*) viste en trend med at den sterile fisken hadde et høyere uttrykk enn den fertile fisken. En slik oppreguleringen på gonadenivå kan skyldes en manglende lokal negativ feedback. Det kan være en mulighet for at kjønnscellene produserer en faktor som nedregulerer de nevnte genene og at denne faktoren da mangler i sterile gonader. En annen mulighet kan være at tettheten av somatiske celler (der uttrykket foregår) i gonadevevet er høyere hos steril fisk enn fertil fisk fordi kjønnscellene er borte hos den sterile.

4.2.3 «Modnende» steril hannfisk

En interessant observasjon i denne oppgaven var at steril hannfisk hadde en signifikant økning av *fshb* i perioden T2-T3, og et frekvensplott av steril hannfisk ved T3 (Figur 12) viste at det var en undergruppe på 35% med signifikant høyere nivå enn resten av den sterile hannfisken. En slik økning som dette ble også funnet hos modnende fertil fisk, og kan indikere en begynnende modningsprosess hos den sterile fisken uten at selve gonadene vokser. For å underbygge indikasjon om begynnende modning ble det derfor sett på endringer hos denne undergruppen i forhold til *GnRH3a*, *GnRH3b*, *cyp17a1* *amh* og *igf3* (i forhold til modnende- og fertil hannfisk).

Undersøkelsen av «modnende» steril hannfisk, modnende fertil hannfisk og fertil hannfisk kan indikere at en modningsprosess hos den sterile fisken hadde blitt initiert hos en del individer og i deler av HPG-aksen. På hjernenivå (*GnRH3a* og *GnRH3b*) var det ingen signifikante forskjeller mellom de tre ulike gruppene – noe som indikerer at bortfall av kjønnscellene ikke har påvirkning på hjernenivå av HPG aksens hos «modnende» steril hannfisk (Figur 17). Gjennomsnittsverdien var imidlertid høyere hos modnende fertil hannfisk sammenlignet med de to andre gruppene som hadde tilsynelatende lik gjennomsnittsverdi – ca. 2,5 hos modnende fertil hannfisk og ca. 0,9 hos «modnende» steril hannfisk og fertil hannfisk. På hypofysenivå (*fshb* og *lhb*) var det ingen signifikant forskjell mellom modnende fertil hannfisk og «modnende» steril hannfisk. (også her var gjennomsnittsverdien høyere hos modnende fertil hannfisk). Det kan derfor tenkes at det kan være en forsinket eller delvis aktivering av HPG

aksen på hjerne- og hypofyse nivå i forhold til uttrykk av *GnRH3a*, *GnRH3b*, *fshb* og *lhb* hos «modnende» steril hannfisk. På gonadenivå hadde «modnende» steril hannfisk et signifikant høyere uttrykk av *cyp17a1* og *amh* sammenlignet med modnende fertil hannfisk, og for uttrykk av *igf3* var det ingen signifikant forskjell mellom de to gruppene («modnende» steril hannfisk og modnende fertil hannfisk). Den fertile hannfisken hadde et signifikant lavere uttrykk av *igf3* sammenlignet med de to andre gruppene. GSI for «modnende» steril hannfisk var imidlertid lavere enn fertil hannfisk (selv om forskjeller ikke var signifikant), og ikke minst, betydelig mindre gonader enn modnende fertil. Det kan bety at den somatiske delen av gonaden responderer delvis (fortrinnsvis til FSH) i forhold til uttrykk av regulatoriske faktorer, men at *amh* ikke blir tilstrekkelig nedregulert, slik at den eventuelt ville ha utviklet seg videre (*amh* hos «modnende» steril var på tilsvarende samme nivå som det en finner hos ikke modnende fertil). Et slikt forhold kan skyldes manglende syntese av kjønnssteroider da en viktig funksjon hos *amh* er å hemme androgensyntese (Schulz *et al.*, 2019). Selv om det var en klar oppregulering av *igf3* hos «modnende» steril kan det videre tenkes at en eventuell stimulerende effekt av *igf3* blokkeres av høyt *amh* uttrykk som hemmer både steroidesyntese og *igf3* (Melo *et al.*, 2014). Spesielt reguleringen av *igf3* og *cyp17a1* virket å være påvirket av manglende kjønnsceller – dette underbygges av resultater fra hunnfisken som også viste en oppregulering av *igf3* og *cyp17a1*, noe som igjen kan indikere manglende lokal feedback. En analyse av plasma kjønnssteroider ville vært hensiktsmessig for å ytterligere belyse disse forholdene da det er bekreftet i tidligere arbeid at pubertal aktivering av androgen- og østrogen produksjon i testis og ovariene krever tilstedeværelse av kjønnsceller hos atlantisk laks (Kleppe *et al.*, 2017).

4.3 Produksjonsytelse

En forutsetning for å kunne produsere steril fisk i storskala er at den har tilsvarende eller bedre produksjonsytelse enn «vanlig» fertil oppdrettslaks. I dette forsøket var spesifikk vekstrate, vekt og kondisjonsfaktor ikke signifikant forskjellig mellom steril- og fertilgruppene. Det kan indikere at bortfall av kjønnscellene ikke har noen effekt på produksjonsytelsen hos steril fisk. Modnende fertil hannfisk hadde imidlertid en høyere SGR og K enn både fertil hannfisk og steril hannfisk. Raskere vekst og energiakkumulering hos laksefisk som er i tidlige stadier av modning er kjent fra tidligere arbeid (Kadri *et al.*, 1996). Årsaken til dette ligger sannsynligvis i at laksen trenger å være i god ernæringsmessig tilstand for å kunne starte modningen (Kadri *et al.*, 1996) og økt vekst og energiakkumulering er knyttet til økte, men relativt lave, nivåer av

steroide kjønns hormoner (Hunt *et al.*, 1982; Tveiten *et al.*, 1998; Youngson *et al.*, 1988). Kommersielt sett vil det være vanskelig for oppdrettsaktørene å utnytte denne «vekstboosten» i fare for tidlig modning. I mitt forsøk ble det observert lignende «vekstboost» hos steril fisk som hadde et forhøyet nivå av *fhsb*. «Modnende» steril hannfisk var hverken signifikant forskjellig fra modnende fertil hannfisk eller fertil hannfisk i vekt, SGR og K, men hadde en høyere gjennomsnittsverdi enn fertil hannfisk i alle kategoriene (Figur 18). Hvis «modnende» steril hannfisk er «forsinket» i «modningsprosessen» i forhold modnende fertil hannfisk (som antyd det tidligere), kan det tenkes at denne «vekstboosten» ville blitt enda større i forhold til fertil hannfisk. Det kan også bety at det er en mulighet for at individene i «modnende» steril hannfisk produserer kjønnssteroider eller at vekstaksen stimuleres direkte på hypofysenivå.

Det er en mulighet for at den sterile fisken allokere sin energi til vekst (istedenfor utvikling av gonadene slik som hos fertil fisk). Dette kan indikere at steril fisk vil ha like god, om ikke bedre vekst enn fertil fisk. Det kreves imidlertid mer forskning på dette området før en kan gi en konklusjon. En annen fordel er at man kan bruke høy temperatur og kontinuerlig lys gjennom hele produksjon uten fare for kjønnsmodning, noe som gjør at en kan produsere fisken enda raskere enn i dag (så fremst en ikke behøver fotoperiode for smoltifisering).

5. Konklusjon

Oppgaven har vist at bortfall av kjønnscellene resulterer i små endringer i uttrykk av gener som er sentrale i regulering av hypothalamus-hypofyse-gonade aksene hos kjønnscefri atlantisk laks (*Salmo salar* L.). Visuell/makroskopisk undersøkelse av gonader, GSI og uttrykk av kjønnscellemarkørene *dnd* og *vasa* (og totalt bortfall av modning hos steril hannfisk) bekreftet sterilitet hos sterilgruppene. Sterilgruppene viste tilsvarende produksjonsytelse (SGR og K) som fertilgruppene. Analyser av uttrykksdata viste at bortfall av kjønnsceller (og sterilitet) i liten grad påvirket gener som er sentrale i regulering av HPG-aksene. Resultatene viste også at en del av den sterile fisken var i stand til å endre uttrykk av gener som er viktig for å initiere kjønnsmodning, men uten at selve gonadene vokser. Basert på de undersøkte genene førte ikke bortfall av kjønnscellene og sterilitet til noen vesentlige endringer i reguleringen av HPG-aksene på hjerne- og hypofyseenivå. På gonadenivå var det imidlertid et gjennomgående et høyere genuttrykk hos fisken uten kjønnsceller; *igf3*, *amh*, *cyp17a1* og *cyp19a1a* var alle uttrykt høyest hos sterilgruppene. Om dette vil ha noen innvirkning på videre utvikling av HPG-aksene eller andre endokrine systemer senere i produksjonssyklusen er imidlertid uklart.

Resultatet fra disse analysene har stor betydning for videre undersøkelse av den sterile laksen. Dette forsøket har bekreftet at steriliseringsmetoden som har blitt brukt fungerer i praksis. Det gjenstår fortsatt mer forskning og analyser før en kan starte produksjon av denne fisken i større skala. Dette innebærer blant annet testing gjennom en hel produksjonssyklus for å undersøke videre utvikling av endokrin regulering på HPG aksene (spesielt interessant på gonadenivå), produksjonsytelsen og ikke minst immunologiske undersøkelser.

Referanser

- Adolfi, M. C., Nakajima, R. T., Nóbrega, R. H. & Scharl, M. (2019). Intersex, Hermaphroditism, and gonadal plasticity in vertebrates: evolution of the müllerian duct and Amh/Amhr2 signaling. *Annual review of animal biosciences*, 7, 149-172.
- Amano, M., Urano, A. & Aida, K. (1997). Distribution and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the teleost brain. *Zoological science*, 14(1), 1-11.
- Ando, H., Sasaki, Y., Okada, H. & Urano, A. (2001). Prepubertal increases in the levels of two salmon gonadotropin-releasing hormone mRNAs in the ventral telencephalon and preoptic area of masu salmon. *Neuroscience letters*, 307(2), 93-96.
- Arukwe, A., Carteny, C. C., Möder, M., Bonini, A., Maubach, M. A. & Eggen, T. (2016). Differential modulation of neuro- and interrenal steroidogenesis of juvenile salmon by the organophosphates-tris (2-butoxyethyl)- and tris (2-chloroethyl) phosphate. *Environmental Research*, 148, 63-71.
- Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77(3), 591-625.
- Chishti, Y. Z., Feswick, A. & Martyniuk, C. J. (2014). Progesterone increases ex vivo testosterone production and decreases the expression of progesterin receptors and steroidogenic enzymes in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) ovary. *General and comparative endocrinology*, 199, 16-25.
- Ciani, E. (2018). Neuroendocrine regulation of pituitary gonadotropins during puberty in Atlantic salmon parr with focus on melatonin and GnRH systems (8257517704). Hentet fra <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/2652748> (accessed 20.03.20)
- Dickey, J. T. & Swanson, P. (2000). Effects of salmon gonadotropin-releasing hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and comparative endocrinology*, 118(3), 436-449.
- Dufour, S., Sebert, M. E., Weltzien, F. A., Rousseau, K. & Pasqualini, C. (2010). Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. *Journal of Fish Biology*, 76(1), 129-160.
- Fjelldal, P. G., Hansen, T. & Huang, T.-s. (2011). Continuous light and elevated temperature can trigger maturation both during and immediately after smoltification in male Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 321(1-2), 93-100.
- Fjelldal, P. G., Schulz, R., Nilsen, T. O., Andersson, E., Norberg, B. & Hansen, T. J. (2018). Sexual maturation and smoltification in domesticated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)— is there a developmental conflict? *Physiological Reports*, 6(17), e13809.
- Flood, D. E., Fernandino, J. I. & Langlois, V. S. (2013). Thyroid hormones in male reproductive development: evidence for direct crosstalk between the androgen and thyroid hormone axes. *General and comparative endocrinology*, 192, 2-14.
- Forseth, T., Barlaup, B. T., Finstad, B., Fiske, P., Gjørseter, H., Falkegård, M., . . . Thorstad, E. B. (2017). The major threats to Atlantic salmon in Norway. *ICES Journal of Marine Science*, 74(6), 1496-1513.
- Fraser, T. W., Fjelldal, P. G., Hansen, T. & Mayer, I. (2012). Welfare considerations of triploid fish. *Reviews in Fisheries Science*, 20(4), 192-211.
- Fuentes, E. N., Valdés, J. A., Molina, A. & Björnsson, B. T. (2013). Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone–insulin-like growth factor system. *General and comparative endocrinology*, 192, 136-148.
- Fujimoto, T., Nishimura, T., Goto-Kazeto, R., Kawakami, Y., Yamaha, E. & Arai, K. (2010). Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17211-17216.

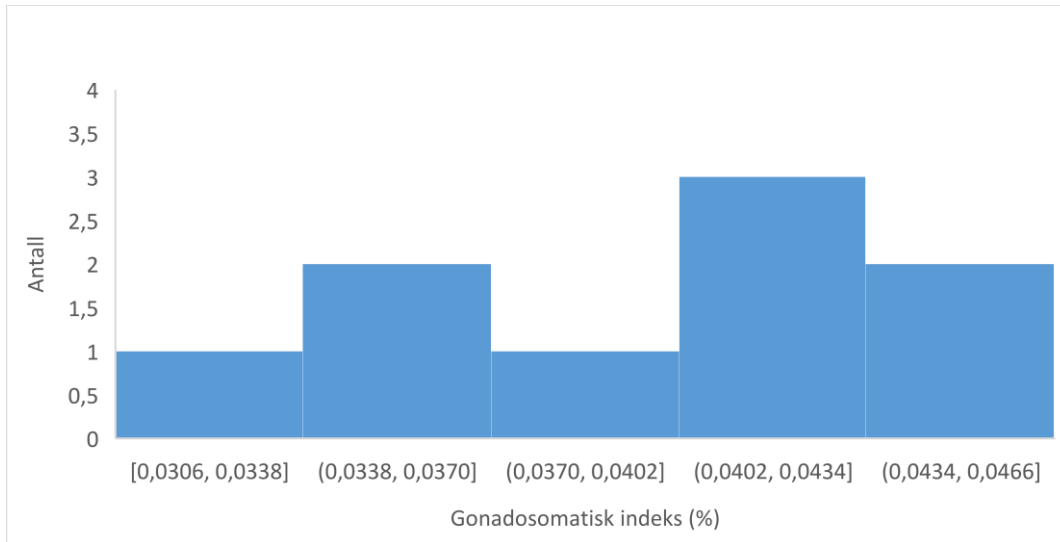
- González-Martínez, D., Madigou, T., Mañanos, E., Cerdá-Reverter, J. M., Zanuy, S., Kah, O. & Muñoz-Cueto, J. A. (2004). Cloning and Expression of Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor in the Brain and Pituitary of the European Sea Bass: An In Situ Hybridization Study. *Biology of Reproduction*, 70(5), 1380-1391. doi: 10.1095/biolreprod.103.022624
- Gross-Thebing, T., Yigit, S., Pfeiffer, J., Reichman-Fried, M., Bandemer, J., Ruckert, C., . . . Tarbashevich, K. (2017). The vertebrate protein dead end maintains primordial germ cell fate by inhibiting somatic differentiation. *Developmental cell*, 43(6), 704-715. e705.
- Hunt, S., Simpson, T. & Wright, R. (1982). Seasonal changes in the levels of 11-oxotestosterone and testosterone in the serum of male salmon, *Salmo salar* L., and their relationship to growth and maturation cycle. *Journal of Fish Biology*, 20(1), 105-119.
- Kadri, S., Mitchell, D. F., Metcalfe, N. B., Huntingford, F. A. & Thorpe, J. E. (1996). Differential patterns of feeding and resource accumulation in maturing and immature Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 142(3-4), 245-257.
- Kagawa, H. (2013). Oogenesis in teleost fish. *Aqua BioSci Monogr* 6: 99 – 127.
- Kedde, M., Strasser, M. J., Boldajipour, B., Vrielink, J. A. O., Slanchev, K., le Sage, C., . . . Ørom, U. A. (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell*, 131(7), 1273-1286.
- Kleppe, L., Andersson, E., Skafnesmo, K. O., Edvardsen, R. B., Fjellidal, P. G., Norberg, B., . . . Wargelius, A. (2017). Sex steroid production associated with puberty is absent in germ cell-free salmon. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B. & Raz, E. (2001). A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes & development*, 15(21), 2877-2885.
- Lethimonier, C., Madigou, T., Muñoz-Cueto, J.-A., Lareyre, J.-J. & Kah, O. (2004). Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *General and comparative endocrinology*, 135(1), 1-16.
- Li, M., Yang, H., Zhao, J., Fang, L., Shi, H., Li, M., . . . Zhou, L. (2014). Efficient and heritable gene targeting in tilapia by CRISPR/Cas9. *Genetics*, 197(2), 591-599.
- LifeTechnologies. (2012). Real-time PCR handbook. Hentet fra <https://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf> (accessed 20.03.20)
- Liu, W., Li, S.-Z., Li, Z., Wang, Y., Li, X.-Y., Zhong, J.-X., . . . Gui, J.-F. (2015). Complete depletion of primordial germ cells in an all-female fish leads to sex-biased gene expression alteration and sterile all-male occurrence. *BMC genomics*, 16(1), 971.
- Loir, M. (1999). Spermatogonia of rainbow trout: II. in vitro study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 53(4), 434-442.
- Maugars, G. & Schmitz, M. (2008). Gene expression profiling during spermatogenesis in early maturing male Atlantic salmon parr testes. *General and comparative endocrinology*, 159(2-3), 178-187.
- McNeilly, J., Saunders, P., Taggart, M., Cranfield, M., Cooke, H. & McNeilly, A. (2000). Loss of oocytes in Dazl knockout mice results in maintained ovarian steroidogenic function but altered gonadotropin secretion in adult animals. *Endocrinology*, 141(11), 4284-4294.
- Melo, M. C., Andersson, E., Fjellidal, P. G., Bogerd, J., França, L. R., Taranger, G. L. & Schulz, R. W. (2014). Salinity and photoperiod modulate pubertal development in Atlantic. *Journal of Endocrinology*, 220, 1-15.

- Middleton, M. A., Larsen, D. A., Dickey, J. T. & Swanson, P. (2019). Evaluation of endocrine and transcriptomic markers of male maturation in winter-run steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and comparative endocrinology*, 281, 30-40.
- Miura, T., Miura, C., Konda, Y. & Yamauchi, K. (2002). Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Development*, 129(11), 2689-2697.
- Nader, M. R., Miura, T., Ando, N., Miura, C. & Yamauchi, K. (1999). Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates all stages of 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, in vitro. *Biology of Reproduction*, 61(4), 944-947.
- Nóbrega, R. H., Morais, R. D. V. d. S., Crespo, D., De Waal, P. P., De França, L. R., Schulz, R. W. & Bogerd, J. (2015). Fsh stimulates spermatogonial proliferation and differentiation in zebrafish via Igf3. *Endocrinology*, 156(10), 3804-3817.
- Okuzawa, K., Amano, M., Kobayashi, M., Aida, K., Hanyu, I., Hasegawa, Y. & Miyamoto, K. (1990). Differences in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in discrete brain areas of male and female rainbow trout according to age and stage of maturity. *General and comparative endocrinology*, 80(1), 116-126.
- Onuma, T., Higa, M., Ando, H., Ban, M. & Urano, A. (2005). Elevation of gene expression for salmon gonadotropin-releasing hormone in discrete brain loci of prespawning chum salmon during upstream migration. *Journal of neurobiology*, 63(2), 126-145.
- Pauli, A., Montague, T. G., Lennox, K. A., Behlke, M. A. & Schier, A. F. (2015). Antisense oligonucleotide-mediated transcript knockdown in zebrafish. *PLoS One*, 10(10).
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Raz, E. (2003). Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nature Reviews Genetics*, 4(9), 690-700.
- Regjeringen. (2019). NOU 2019: 18. Hentet fra <https://www.regjeringen.no/no/dokumenter/nou-2019-18/id2676239/?ch=4> (accessed 23.03.20)
- Rodríguez-Marí, A., Yan, Y.-L., BreMiller, R. A., Wilson, C., Canestro, C. & Postlethwait, J. H. (2005). Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (*amh*) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. *Gene Expression Patterns*, 5(5), 655-667.
- Schulz, R. W., Taranger, G. L., Bogerd, J., Nijenhuis, W., Norberg, B., Male, R. & Andersson, E. (2019). Entry into puberty is reflected in changes in hormone production but not in testicular receptor expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1), 48.
- Sherwood, N. M. & Wu, S. (2005). Developmental role of GnRH and PACAP in a zebrafish model. *General and comparative endocrinology*, 142(1-2), 74-80.
- Skaar, K., Nobrega, R., Magaraki, A., Olsen, L., Schulz, R. & Male, R. (2011). Proteolytically activated, recombinant Anti-Müllerian hormone inhibits androgen secretion, proliferation, and differentiation of spermatogonia in adult zebrafish testis organ cultures. *Endocrinology*, 152(9), 3527-3540.
- Slanchev, K., Stebler, J., de la Cueva-Méndez, G. & Raz, E. (2005). Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(11), 4074-4079.
- Summerfelt, S., Waldrop, T., Davidson, J., Good, C., Kenney, P. B., Terjesen, B. F. & Wolters, W. (2012). *Atlantic salmon growout trials in freshwater closed-containment systems at The Conservation Fund Freshwater Institute*. Hentet fra https://0104.nccdnet/1_5/036/3ab/271/13-Summerfelt---Atlantic-salmon-growout-trials-at-TCFFI.pdf (accessed 20.03.20)

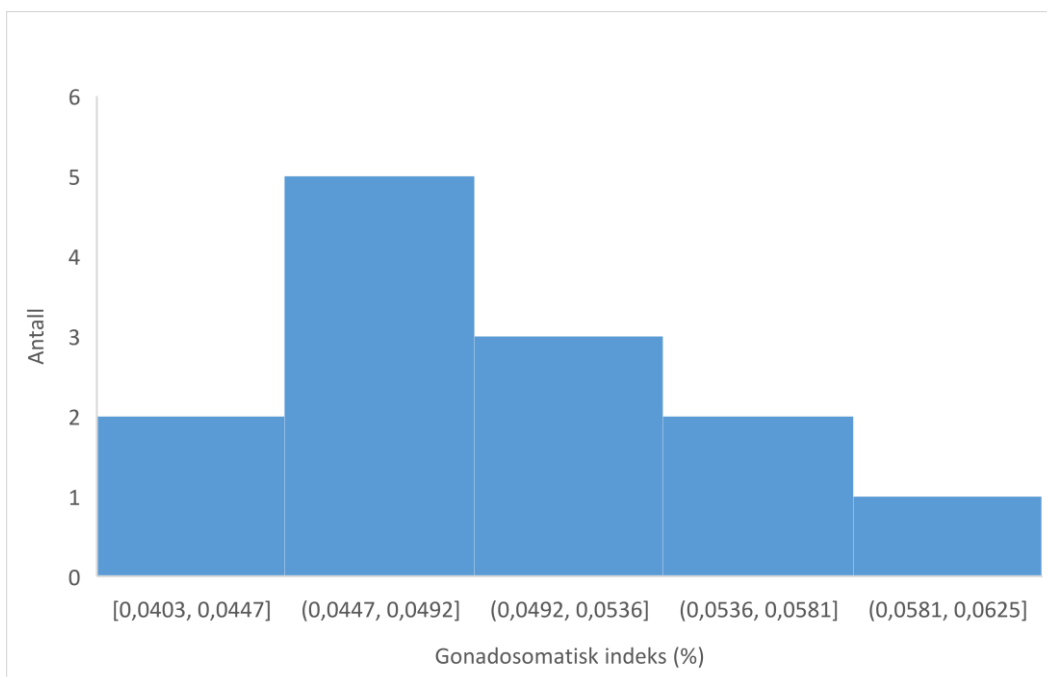
- Taranger, G. L., Carrillo, M., Schulz, R. W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., . . . Norberg, B. (2010). Control of puberty in farmed fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 483-515.
- Terjesen, A. B. F., Rosten, T. W., Ulgenes, Y., Henriksen, K., Aarhus, I. J. & Winther, U. (2013). Betydning av vannmiljøet ved produksjon av laksefisk i lukkede systemer i sjø. Hentet fra https://vannforeningen.no/wp-content/uploads/2015/06/2013_872560.pdf (accessed 20.03.20)
- Tveiten, H., Mayer, I., Johnsen, H. & Jobling, M. (1998). Sex steroids, growth and condition of Arctic charr broodstock during an annual cycle. *Journal of Fish Biology*, 53(4), 714-727.
- Vélez, E., Lutfi, E., Azizi, S., Perelló, M., Salmerón, C., Riera-Codina, M., . . . Capilla, E. (2017). Understanding fish muscle growth regulation to optimize aquaculture production. *Aquaculture*, 467, 28-40.
- Vélez, E. J., Perelló, M., Azizi, S., Moya, A., Lutfi, E., Pérez-Sánchez, J., . . . Fernández-Borràs, J. (2018). Recombinant bovine growth hormone (rBGH) enhances somatic growth by regulating the GH-IGF axis in fingerlings of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *General and comparative endocrinology*, 257, 192-202.
- Wargelius, A., Leininger, S., Skaftnesmo, K. O., Kleppe, L., Andersson, E., Taranger, G. L., . . . Edvardsen, R. B. (2016). Dnd knockout ablates germ cells and demonstrates germ cell independent sex differentiation in Atlantic salmon. *Scientific reports*, 6(1), 1-8.
- Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., . . . Raz, E. (2003). Dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Current Biology*, 13(16), 1429-1434.
- Wong, T.-T. & Zohar, Y. (2015). Production of reproductively sterile fish by a non-transgenic gene silencing technology. *Scientific reports*, 5, 15822.
- Yaron, Z. & Levavi-Sivan, B. (2011). Endocrine regulation of fish reproduction. *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*, 2, 1500-1508.
- Youngson, A., McLay, H., Wright, R. & Johnstone, R. (1988). Steroid hormone levels and patterns of growth in the early part of the reproductive cycle of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 69(1-2), 145-157.

Appendiks

Frekvensplott av GSI-fordeling hos fertil hannfisk ved T1 (Figur 1) og T2 (Figur 2).



Figur 1. Frekvensplott av gonadosomatisk indeks (%) hos fertil hannfisk ved T1 (n=9)



Figur 2. Frekvensplott av gonadosomatisk indeks hos fertil hannfisk ved T2 (n=13)