



UiT Norges arktiske universitet

Norges fiskerihøgskole

Utvikling av smoltegenskaper og sjøvannstoleranse hos kjønnsellefri atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

Eli Birgithe Jenssen

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

Forord

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

Først og fremst vil jeg takke min veileder Helge Tveiten, for å ha hjulpet meg gjennom dette prosjektet. Din lune humor, tålmodighet og engasjement har vært til stor inspirasjon både ved lange dager med prøveuttak, bearbeidelse av data og under skriving. Jeg vil også takke Helge K. Johnsen og Bjørn-Steinar Sæter med god hjelp gjennom behandling av data og skriving.

Videre vil jeg rette en stor takk til Tina Thesslund for stålkontroll på oppsett og gjennomføring av prøveuttak, Dhivya Thiyagarajan for hjelp og veiledning med real-time qPCR og Jo Espen Tau Strand for godt samarbeid med måling av NKA-aktivitet.

Til slutt vil jeg takke mine medstudenter, da spesielt Marius Aspen og Kristian Karlsen. Jeg har hatt utrolig stor glede og nytte av det tette samarbeidet over alle disse årene- hva skulle jeg ha gjort uten dere! I tillegg vil jeg nevne Maria Heimland og Sofie Krogh Rasmussen som åpnet sitt hjem, og fikset meg kontor plass under Covid-19 lock down.

Eli Birgithe Jensen



Tromsø, juni 2020

Sammendrag

Genetisk påvirkning fra rømt oppdrettslaks på ville laksebestander blir sett på som ett av de største hindrene for økt industriell produksjon av atlantisk laks (*Salmo salar* L.). Samtidig opplever industrien et økende problem med tidlig kjønnsmodning, særlig knyttet til bruk av RAS. Kjønnsmodning hos sette- og produksjonsfisk medfører både velferdsmessige og økonomiske problemer og produksjon av en steril oppdrettslaks vil kunne løse flere av disse utfordringene. Eksisterende steriliseringsmetoder som for eksempel triploidisering krever imidlertid en spesialtilpasset produksjon og resulterer i redusert ytelse hos den sterile fisken og nye metoder for sterilisering av laks er derfor nødvendig. Gjennom å fjerne kjønnscelelinjen på embryonalstadiet har det blitt utviklet en slik ny metode for sterilisering av atlantisk laks. Fjerning av kjønnscelelinjen vil imidlertid potensielt kunne påvirke viktige endokrine og fysiologiske mekanismer, og dermed fiskens produksjonsegenskaper. For at en slik steriliseringsmetode skal kunne benyttes i kommersiell sammenheng må en nøye evaluere eventuelle effekter på viktige fysiologisk systemer og prosesser. Utvikling av smoltegenskaper og sjøvannstoleranse er en slik viktig prosess som innebærer en rekke fysiologiske og morfologiske endringer regulert av det endokrine systemet. I dette forsøket ble en gruppe fisk uten kjønnsceller og en kontrollgruppe fulgt gjennom en smoltifiseringsprotokoll med 8 uker kortdags-behandling (6L:18D) og deretter overført til kontinuerlig lys (24L:0D), der det ble gjennomført tre prøveuttak fordelt over forsøksperioden. Faktorer som er viktige for normal smoltutvikling og god sjøvannstoleranse ble undersøkt. Genuttrykk for ionetransportørene NKA, NKCC og CFTR i gjellene, samt genuttrykkene for kortikotropinfrigjørende faktor (CRF) i hjernen og pro-opiomelanokortin (POMC) i hypofysen ble undersøkt ved hvert uttak. Det ble også gjennomført standard sjøvannstester (SVT) og måling av plasma Cl^- og osmolaritet, samt analyse av NKA-aktivitet, som uttrykk for sjøvannstoleranse hos begge grupper av fisk. Resultatene viste at uttrykket av de undersøkte genene var tilnærmet likt hos kjønnscelelfri og kontrollfisk gjennom smoltifiseringsprosessen, der de observerte endringene sammenfaller med tidligere observasjoner for atlantisk laks. Sjøvannstoleranse målt som NKA-aktivitet i gjellene og plasma Cl^- og osmolaritet etter SVT var også god hos begge grupper. En kan konkludere med at det ikke er forskjeller i utvikling av smoltegenskaper og sjøvannstoleranse mellom individene uten kjønnsceller og kontrollgruppen, og at man ikke får noen prestasjonshekkende effekt på smoltifiseringen ved å fjerne kjønnscellene hos atlantisk laks.

Forkortelser

Behandlingsgrupper

K	Kontroll
S	Steril
SM	Steril hann
SF	Steril hunn
KM	Kontroll hann
KMM	Kontroll hann moden
KUM	Kontroll uten moden hann

11KT	11-ketotestosteron
AC	Accessory cell
ACTH	adrenokortikotrofisk hormone
ADP	Adenosindifosfat
AM	<i>Assay Mixture</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATP	Adenosintrifosfat
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembran Regulator
CRF1	kortikotropinfrigjørende faktor
C _t	terskelsyklus
Dnd	Dead end protein
dsDNA	dobbeltrådig DNA
E	Effekt
EF1- α	elongation factor
etOH	etanol
FV	Ferskvann

GH	veksthormon
GMO	Genmodifisert organisme
GSI	Gonadosomatisk indeks
HPI	Hypothalamus-hypofyse- interrenal
IB-buffer	Imidazol buffer
IGF-1	insulin-lik vekstfaktor-1
LHD	lactic dehydrogenase
Mc2r	melanokortin 2-reseptoren
mRNA	Budbringer-RNA
NKA	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NKCC	Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻ co-transporter
NTC	non-template kontroll
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGC	primordiale kimeceller
PK	pyruvat kinase
POA	Preoptisk område
POMC	pro-opiomelanokortin
RAS	Resirkuleringsanlegg
RT qPCR	<i>real-time</i> PCR
SEI	sodium-EDTA-imidazole
SEM	Standardfeil
SGR	Spesifikk vekstfaktor
ssDNA	enkeltrådig DNA
SV	Sjøvann
SVT	Sjøvannstest
T1	Uttak 1
T2	Uttak 2
T3	Uttak 3

Innholdsfortegnelse

1	Innledning	1
1.1	Introduksjon	1
1.1.1	Fjerning av kjønnsceller – en alternativ metode for sterilisering av laks.....	2
1.2	Kjønnssteroider og vekst	3
1.3	Smoltifisering hos laksefisk.....	4
1.3.1	Morfologiske- og adferdsendringer under smoltifisering.....	4
1.3.2	Fysiologiske endringer under smoltifisering	5
1.3.3	Kloridceller	5
1.3.4	Hypothalamus-hypofyse-interrenal-aksen (HPI-aksen)	6
1.4	Formål med oppgaven	8
2	Materiale og metoder	9
2.1	Forsøksoppsett	9
2.2	Uttak av prøver.....	10
2.3	Beregning av gonadosomatisk indeks, vekstrate og kondisjonsfaktor.....	10
2.4	Analyse av genuttrykk	11
2.4.1	RNA-ekstraksjon fra organer.....	12
2.4.2	cDNA syntese	13
2.4.3	Primere.....	14
2.4.4	Real-time qPCR analyse	15
2.5	Måling av NKA-aktivitet.....	16
2.6	Plasma klorid og osmolaritet	17
2.7	Statistiske analyser og presentasjon av data	18
3	Resultater.....	20
3.1	Vekstutvikling og reproduktiv status	20
3.2	Genuttrykk	22

3.2.1	Gjeller	22
3.2.2	HPI-akse	24
3.3	ATPase aktivitet	26
3.4	Plasma klorid og osmolaritet	26
4	Diskusjon.....	29
4.1	Vekstutvikling og reprodutiv status	29
4.2	Genuttrykk gjeller	30
4.3	Aktivering av HPI-aksen	31
4.4	ATPase aktivitet	32
4.5	Plasma klorid og osmolalitet.....	33
5	Konklusjon	34
	Referanser	35
	Appendiks I. Statistikk	i
	Appendiks II. Na ⁺ /K ⁺ -ATPase løsninger og standardkurve	iii
	Appendiks III. GSI over hannfisk ved T3.....	viii
	Appendiks IV. Kondisjonsfaktor ved T1	viii

1 Innledning

1.1 Introduksjon

Oppdrett av laks har hatt enorm vekst, og er blitt en av Norges største næringer siden oppstarten tidlig på 70-tallet, med en førstehåndsverdi på 64,5 milliarder kroner i 2018 og en sysselsetting på mer en tjue tusen ansatte direkte eller indirekte (SSB, 2019). Selv om det fremdeles er potensial for videre vekst stilles det nå strengere krav til mer bærekraftig produksjon (Nærings- og fiskeridepartementet, 2015). Ved en økning i produksjon er det den genetiske påvirkningen rømt oppdrettslaks har på de ville laksestammene som er identifisert som den største trusselen (Forseth, et al., 2017). Oppdrettslaks har vært gjennom et systematisk avlsprogram og en sterk seleksjon, og genetisk baserte egenskaper skiller den fra ville laksebestander (Norris et al., 1999). Oppdrettslaksen er selektert for økonomisk viktige produksjonstrekk som vekst, forsinket kjønnsmodning, sykdomsresistens og kvalitetsparametere som fettprosent og farge på kjøttet (Glover et al., 2009; Quinton et al., 2005; Gjedrem, 2000). Gjennom seleksjon har også oppdrettslaksen vist flere adferdsmessige forandringer. Bedre tilpasning og økt stressmestring har medført redusert respons på forstyrrelser, og sammen med en høyere aggressivitet har dette bidratt til økt vekst (Solberg et al., 2013). Dette har gitt oppdrettslaksen redusert respons på predasjon fra rovdyr, noe som er et viktig økologisk aspekt ved adferd blant villaks (Einum & Fleming, 1997). Gjentatte interaksjoner med rømt oppdrettslaks i ville bestander vil derfor over tid føre til at lokale laksebestander erstattes av mindre tilpasningsdyktige og mindre genetisk variable hybridbestander (Ferguson, et al., 2007). Dette vil sannsynligvis redusere antall hjemvendte kjønnsmoden laks over tid og redusert overlevelse i sjø (Fleming et al., 2000; McGinty et al., 2003).

For å intensivere produksjonen ytterligere, er det i de senere årene blitt vanlig å manipulere vanntemperatur og fotoperiode. Kontinuerlig lys i kombinasjon med høy temperatur er miljøsignal som stimulerer kjønnsmodning hos juvenil hannfisk, også kalt «Jacking» (Fjelldal et al., 2011; Melo et al., 2014). Kjønnsmodning hos produksjonsfisk skaper økonomiske og velferdsmessige problemer. Dette vil redusere appetitt og vekst, samt en svekket evne til å opprettholde saltbalansen og redusert immunkompetanse, noe som vil gi en negativ effekt på overlevelse. Mindre tiltalende utseende og dårlig kjøttkvalitet gjør fisken mindre attraktiv for forbruker (Taranger et al., 2010; Fraser et al., 2012). Det er påvist tidlig kjønnsmodning på 50-80% blant hannfisk i en gruppe med stor post-smolt, ved en temperatur på 12 °C (Imsland et

al., 2014; Fjellidal et al., 2011; Melo et al., 2014). Dette har vært et betydelig problem i lakseoppdrett på Tasmania, noe som har resultert i bruk av kun hunnfisk i produksjonen (Botwright et al., 2015). Blant nyere studier er det også funnet modning blant hunnfisk, spesielt stor smolt. Modningen ble vist ved økt GSI og forhøyede plasmanivå av Ca^{2+} , og var assosiert med fysiologisk re-smoltifisering (Fjellidal, et al., 2018).

Produksjon av større smolt i resirkuleringsanlegg (RAS) er en økende trend, der tidlig kjønnsmodning kan bli et potensielt stort problem (Anders, 2018; SalmoBreed, 2018). Oppdrett av steril fisk vil kunne løse flere av disse utfordringene. Triploid laks har i flere tiår vært hovedtilnærmingen for å oppnå sterilitet, selv om man ser problemer som skjelettdeformitet, økt følsomhet for høye vanntemperaturer og lave oksygenkonsentrasjoner, samt redusert vekst (O'Flynn et al., 1997; Hansen et al., 2015; Sambraus et al., 2017). Videre ser man at triploid hannfisk har en tilnærmet normal kjønnsmodning med forhøyede nivå av kjønnssteroider, som videre fører til osmoregulatoriske problemer, redusert vekst og økt mottakelighet for sykdommer (Tarangen et al., 2010; Fraser et al., 2012). En annen mulighet for sterilisering er å produsere genmodifiserte organismer (GMO). Produksjon av GMO reiser derimot alvorlige etiske, juridiske og praktiske problemer i havbruksnæringen (Wong & Zoar, 2015). Med tanke på utfordringene knyttet til de forskjellige steriliseringsmetodene og laksens prestasjon, bør det derfor utvikles nye steriliseringsmetoder som resulterer i en robust smolt som har produksjonsegenskaper tilsvarende en vanlig fertil fisk.

1.1.1 Fjerning av kjønnsceller – en alternativ metode for sterilisering av laks

Et mulig alternativ til triploidisering er å fjerne kjønnscellene, slik at fisken ikke danner funksjonelle gonader. Hos teleoster er det antatt at kjønnscellelinjen (primordiale kimceller (PGC)) etableres tidlig i embryogenesen gjennom et koordinert samspill av maternale faktorer, bestående av både proteiner og mRNA som er under nøye translasjonskontroll (Gross-Thebing, et al., 2017). Disse PGCene er forløperne til alle kjønnscellene og migrerer til gonaden hvor de etter hvert differensierer til sperm og eggceller (Raz, 2003; Slanchev et al., 2005). Gjennom funksjonelle studier med zebrafisk (*Danio rerio*) er det identifisert flere gener som er kritiske i reguleringen av PCGenes migrasjon og overlevelse under embryogenesen (Raz, 2003; Weidinger et al., 2003; Slanchev et al., 2005). En slik kritisk faktor er proteinet *Dead end* (*dnd*) (Weidinger, et al., 2003). *Dnd* er (maternalt) deponert i egget som mRNA og i perioden etter befruktning vil dette lokalisere spesifikt til PCGene hvor det etter hvert også vil translateres

(Slanchev et al, 2005). Ved å hemme translasjon av Dnd mRNAet gjennom tidlig utvikling vil man forhindre migrering av PGCene til den fremtidige gonaden (Weidinger et al 2003). Ikke migrerende PGCer vil gå inn i apoptose eller reversere til somatiske celler (Gross-Thebing, et al., 2017), noe som vil resultere i bortfall av kjønnsellelinjen og dermed et sterilt individ med gonader uten kimeceller (Wedinger et al., 2003; Slanchev et al., 2005; Wong & Zoar, 2015). Siden man kun manipulerer genuttrykket på mRNA nivå, vil en steriliseringsmetode basert på en slik metodikk trolig ikke bli underlagt lover og regelverk knyttet til GMO.

Gjennom det nylige avsluttede prosjektet *Salmosterile* (Norges forskningsråd; BIOTEK 2021(2013-18)) hos forskningsinstituttet Nofima AS, har det blitt utviklet en metode for å fjerne kjønnsellelinjen hos Atlantisk laks. Via midlertidig fjerning Dnd mRNAet gjennom tidlige utviklingsstadier, har en fått fullstendig fjernet kimecellene hos ca. 90% av de behandlede individene (H. Tveiten pers. med.). Gjennom histologiske og molekylærbiologiske studier av juvenil fisk (opp til 200g) har en videre fått bekreftet at bortfallet av kjønnsellelinjen med stor sannsynlighet er permanent (H. Tveiten pers. med.) For at en slik steriliseringsmetode skal kunne brukes i en kommersiell sammenheng, er det imidlertid viktig å undersøke hvordan fjerning av kimecellene vil kunne spille inn på viktige endokrine mekanismer og produksjonsegenskaper, slik som smoltkvalitet.

1.2 Kjønnssteroider og vekst

Tidlig i reproduksjonssyklusen vil laksefisk ha en kraftig økning i somatisk vekst, før den stagnerer gjennom senere deler av gonadeutviklingen (Hunt et al., 1982; Aksneset al., 1986; Tveiten et al., 1996). Kjønnssteroider regulerer blant annet sekresjon av GH (Larsen et al., 2004) og den vekstfremmende effekten hos kjønnsmodnende fisk er relatert til lave, men forhøyede kjønnssteroidnivåer i plasma (Hunt et al., 1982; Tveiten et al., 1998). Studier viser at forhøyede nivåer av kjønnssteroider kan endre funksjonen av hypotalamus-hypofyse-interrenal aksene (HPI-aksene), hvor blant annet eksponering av 11-ketotestosteron (11KT) viser en hemmende effekt på nivået av adrenokortikotrofisk hormon (ACTH) og kortisol i plasma (Pottinger et al., 1996). Man kan derfor ikke utelukke at kjønnssteroider har en mulig indirekte effekt på smoltifisering, og man bør se nærmere på mulige konsekvenser ved bortfall av disse.

1.3 Smoltifisering hos laksefisk

Atlantisk laks (*salmo salar*) er en anadrom teleost som starter livssyklusen i ferskvann (FV), før den migrerer til sjøvann (SV) som juvenil. Miljømessige signaler (zeitgebers), hovedsakelig fotoperiode starter parr-smolt transformasjonen (smoltifisering) som forbereder fisken for migrasjon til et marint miljø. Dette innebærer en rekke fysiologiske, morfologiske og adferdsmessige endringer som er drevet av det endokrine systemet (Hoar, 1988).

1.3.1 Morfologiske- og adferdsendringer under smoltifisering

I elva svømmer parren (Figur 1) instinktivt mot strømmen (positiv rheotaxi) og har en territorial adferd. Den har en brungrønn farge med flere mørke vertikale flekker langs sidene (parrmerker) (Figur 1) (Heggberget et al., 1992). En rekke adferdsendringer forekommer sammen som en del av migreringen av smolt nedstrøms, inkludert økt negativ rheotaxi, og redusert territoriell adferd, samt økt preferanse til stimdannelse (McCormick, 2013).



Figur 1: Viser de morfologiske forskjellene til Atlantisk laks, som parr (øverst) og smolt (nederst)(McCormick, 2013).

Parr som gjennomgår smoltifisering vil ha en økt lengdevekst og dermed få en slankere kroppsform, noe som kommer til uttrykk ved en lavere kondisjonsfaktor (vekt til lengde rate). Det vil gradvis utvikles en mørkere finnekant som følge av en utvidelse av pigmentceller (melanoforer), og lysreflekterende krystaller (purine guanin og hypoxanthin) vil gi en sølvfarging som gradvis skjuler parr-merkene (Heggberget et al., 1992; McCormick, 2013). Disse morfologiske endringene resulterer i bedre svømmekapasitet og endret utseende, en pre-adapting til en pelagisk livsstil (Sfakiotakis et al., 1999).

1.3.2 Fysiologiske endringer under smoltifisering

1.3.3 Kloridceller

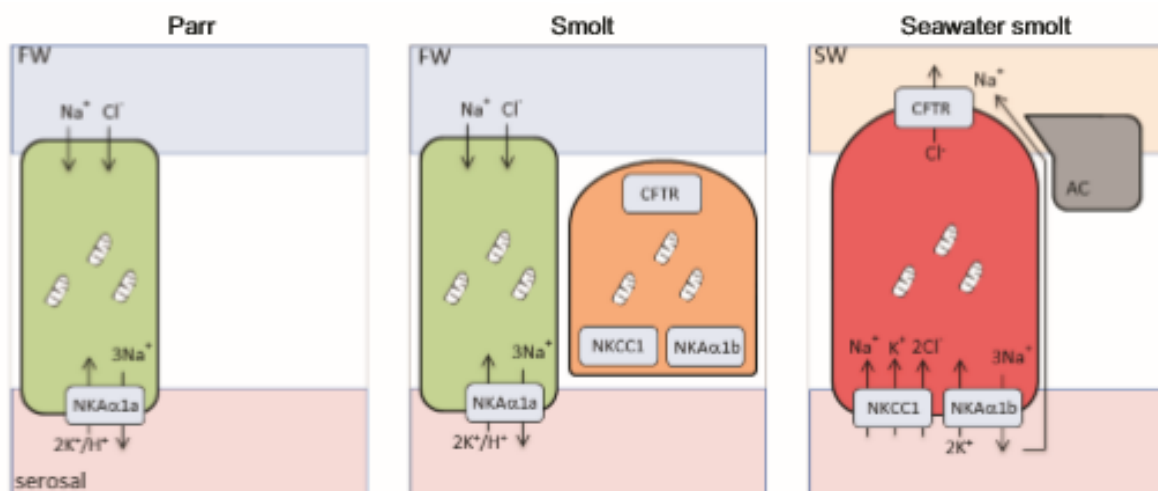
Som alle teleoster må også laksen opprettholde et nesten konstant indre osmotisk miljø på 290-340 mOsm l⁻¹, uavhengig om den oppholder seg i FV (0 mOsm l⁻¹) eller SV (1000 mOsm l⁻¹). Smoltifiseringen krever derfor en reversering fra ioneabsorpsjon (influks) til en ionesekresjon (effluks), ved hjelp av endringer i type og mengde av ionetransporterende proteiner i gjelleepitelet. Økning i spesifikke ionetransportører (Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), Na⁺/K⁺/Cl⁻ co-transporter (NKCC) og Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) i gjellenes kloridceller vil øke kapasiteten for sekresjon av salt, slik at indre salt- og vannbalanse opprettholdes (McCormick, 2013).

Brankial NKA har i oppgave å flytte tre natrium-ioner (Na⁺) ut av cellen mens den pumper inn to kalium-ioner (K⁺). Dette fører igjen til en negativ ladet celle som resultat av et lavt nivå med natrium, og det blir en ionisk/elektrisk gradient over cellemembranen. Som følge av den elektrokjemiske gradienten forlater klorid så cellen via CFTR. Natriumgradienten blir så brukt til å bringe klorid inn i cellen ved hjelp av NKCC. I tillegg til å forsyne den elektrokjemiske gradienten for sekresjon av kloridceller, pumper også NKA natrium til det paracellulære området der det diffunderer ut av gjellene gjennom «leaky junctions», som følge av den elektrokjemiske gradienten mellom kroppsvæska og det ytre miljø (McCormick et al., 2013).

Gjennom smoltifiseringen øker aktiviteten til NKA, og ofte ytterligere etter overgang til SV. Den økende NKA-aktiviteten sammenfaller med utviklingen av sjøvansstoleranse (Zaugg & Wagner, 1973) og den positive sammenhengen gjør det mulig å vurdere den hypoosmoregulatoriske evnen ved å bruke NKA som mål (Zaugg & Wagner, 1973; McCartney, 1976; McCormick, 1993; Stefansson et al., 2005).

Gjelle NKA består av to essensielle underenheter, α og β og (Therien & Blosten, 2000), mens det kun er α -underenheten som er funnet for laks, med fire forskjellige NKA α -isoformer (α 1a, α 1b, α 1c og α 3) (Nilsen, et al., 2007). I anadrom laks ble det i forbindelse med smoltifisering funnet en oppregulering i NKA α 1b samtidig med en nedregulering i NKA α 1a, mens NKA α 1c var uendret. Uttrykket for NKA α 3 er også vist å øke hos anadrom fisk, men ikke i like stor grad som NKA α 1b. På bakgrunn av dette betraktes NKA α 1a og NKA α 1b som de viktigste NKA-isoformene, med tanke på økende gjelle NKA-aktivitet gjennom smoltifiseringen (Nilsen, et al., 2007).

I ferskvann inneholder kloridcellene hovedsakelig $\text{NKA}\alpha 1a$, men forekommer av små $\text{NKA}\alpha 1b$ celler kan også forekomme. Under smoltifiseringen vil celler med $\text{NKA}\alpha 1b$ -isoformer øke i antall, mens det vil være en liten nedgang i $\text{NKA}\alpha 1a$ (McCormick et al., 2013). Disse endringene vil ikke gi store endringer i antall kloridceller. Det er ikke før eksponering for sjøvann at $\text{NKA}\alpha 1b$ blir dominerende blant kloridcellene, og man tror de fleste $\text{NKA}\alpha 1a$ cellene deaktiveres og gjennomgår apoptose (celledød) eller transformeres til celler som uttrykker $\text{NKA}\alpha 1b$. Som vist i Figur 2 er det foreslått at celler som uttrykker $\text{NKA}\alpha 1b$ øker i antall fram mot smoltifisering, men da i en inaktiv form under vevets overflate. Ved eksponering til sjøvann vil $\text{NKA}\alpha 1b$ cellene vokse i størrelse og aktiveres raskt (McCormick et al., 2013). Det er også antatt at NKCC og CFTR er involvert hovedsakelig i ionesekresjon i SV (Evans et al., 2005).

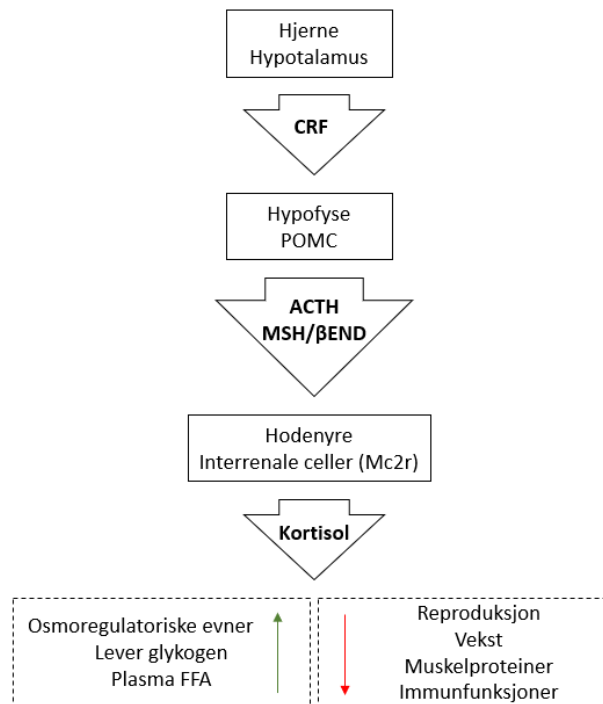


Figur 2: Skjematisert framstilling av antatte virkningsmekanismer for opptak (i ferskvann) og utskillelse (i sjøvann) av ioner under smoltifisering. I ferskvann er det NKA -isoformen $\text{NKA}\alpha 1a$ som er aktiv i kloridcellen til parr, mens det i smolt også er en ekstra form for kloridceller. Disse cellene uttrykker NKA -isoformen $\text{NKA}\alpha 1b$ eller både $\text{NKA}\alpha 1a$ og $\text{NKA}\alpha 1b$, samt ionetransportørene NKCC1 og CFTR som også er viktige for saltsekresjon. Kloridcellene som uttrykker $\text{NKA}\alpha 1b$ er ikke aktiv i ferskvann, men vokser i størrelse og aktiveres raskt etter eksponering til sjøvann, $\text{NKA}\alpha 1a$ celler forsvinner helt. AC: Accessory Cell (McCormick et al., 2013)

1.3.4 Hypothalamus-hypofyse-interrenal-aksen (HPI-aksen)

Endokrin kontroll av kortisol involverer HPI-aksen, med kortikotropinfrigjørende faktor (CRF) og adrenokortikotrofisk hormon (ACTH) som de viktigste forløperne for kortisol (Figur 3). I det preoptiske området i hypothalamus (POA) frigjøres CRF, som ved hjelp av reseptoren CRF-R1 stimulerer syntesen av pro-opiomelanokortin (POMC). Peptidet POMC er en forløper som

splittes til ACTH og melanocyt-stimulerende hormoner (α - MSH, og β -endorfin sett på som de to viktigste) (Castro and Morrison, 1997), og frigis i blodstrømmen. Ved å binde seg til melanokortin 2-reseptoren (Mc2r) i interrenal-kjertelen, vil ACTH stimulere til produksjon og sekresjon av kortisol (Bonga, 1997).



Figur 3: Forenklet fremstilling av HPI-aksen, der stimulerende prosesser er merket med \uparrow og de inhiberte merket med \downarrow . Modifisert etter Bonga (1997)

Aktivering av HPI-aksen oppreguleres ved økt daglengde og kapasiteten disse har til å reagere på økende daglengde kan være en kritisk faktor for smoltutvikling (Hoar, 1988). Kortisol sammen med blant annet veksthormon (GH) er med på å stimulere en rekke endokrine mekanismer under smoltifiseringen, og blir sett på som sjøvannsadapierende hormon, som bidrar til energimobilisering og stimulering av NKA ved oppregulering av kortisolreseptorer i gjellene, samt medvirker til økningen av antall kloridceller (McCormick, 2001). Den preadaptive transformeringen laksen må gjennom for å kunne gå fra FV til SV er en kritisk del av laksens livssyklus, der evnen til å absorbere vann og sekresjon av salt er kritisk for overlevelse i SV. Kortisol og GH øker laksens osmoregulatoriske evne (Mancera &

McCormick, 1999) og manipulering med disse systemene har vist å endre uttrykk (mRNA nivå) og aktiviteten av NKA, samt gitt økt antall kloridceller i gjellene (Seidelin et al., 1999). Økning i spesifikke ionetransportører (NKA, NKCC og CFTR) i gjellenes kloridceller vil øke kapasiteten for sekresjon av salt, slik at indre salt- og vannbalanse opprettholdes (McCormick, 2013). Det er vist at kortisol og GH øker laksens osmoregulatoriske evne (Mancera & McCormick, 1999) og manipulering med disse systemene har vist å endre uttrykk (mRNA nivå) og aktiviteten av NKA, samt gitt økt antall kloridceller i gjellene (Seidelin et al., 1999).

1.4 Formål med oppgaven

Hensikten med denne studien har vært å undersøke om sterilisering gjennom fjerning av kjønnscellene, påvirker utviklingen av smoltegenskaper og sjøvannstoleranse hos atlantisk laks (*Salmo Salar* L.).

Undersøkelsen er gjennomført med to grupper av laks, sterilisert samt ubehandlet, intakt fisk, som begge gjennomgikk en periode med kortdags-behandling (6L:18D), og deretter ble overført til kontinuerlig lys (24L:0D) for indusering av parr/smolt-transformering.

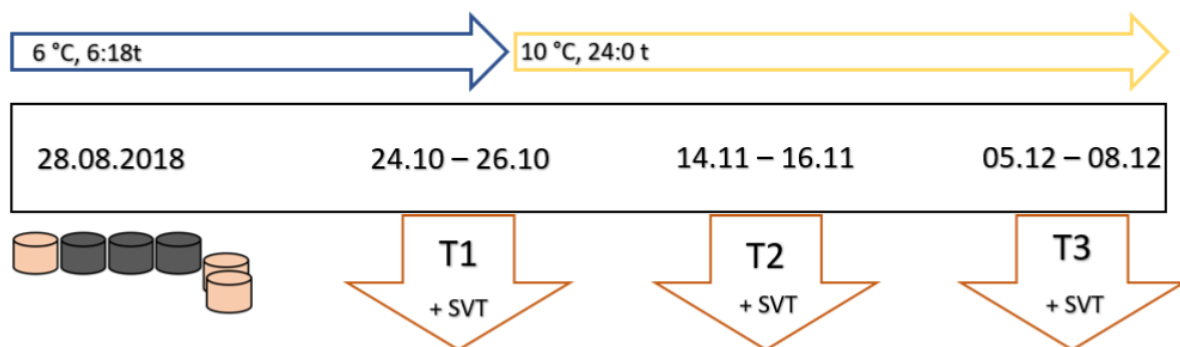
Som ledd i vurderingen av smoltegenskaper ble det gjort målinger av genuttrykkene for ionetransportørene NKA, NKCC og CFTR i gjellene, samt genuttrykkene for kortikotropinfrigjørende faktor (CRF) i hjernen og pro-opiomelanokortin (POMC) i hypofysen (som uttrykk for aktivisering av HPI-aksen). I tillegg ble det utført standard sjøvannstester (SVT) og måling av plasma Cl^- og osmolaritet, samt analyse av NKA-aktivitet, som uttrykk for sjøvannstoleranse hos begge grupper av fisk.

2 Materiale og metoder

2.1 Forsøksoppsett

I forsøket ble det brukt rundt 1000 laks (*Salmo salar* L.) fra AquaGen, der rogn ble levert til Havbruksstasjonen AS (indre Kårvik i Troms fylke) i 2017. Halvparten av de befruktete rognkornene ble sterilisert ved mikroinjisering av spesifikke antisensmolekyler, som resulterer i nedbrytning av mRNA til dnd-genet og dermed bortfall av kjønnsellelinje (se Innledning). Den sterile (S) og den fertile kontrollgruppen (K) ble deretter holdt i separate kar på naturlig vanntemperatur, og kontinuerlig lys (24:0) fram til kortdags-behandling og forsøksstart.

Ved forsøksstart (28.08.18) ble 310 fisk fordelt over 6 sirkulære gjennomstrømningskar med bruksvolum på 500 liter, der 3 av karene inneholdt steril laks (kar 1, 5 og 6) og 3 kar med fertil laks (kar 2, 3 og 4), alle karene var plassert i samme forsøksrom. Hver enkelt fisk ble i forbindelse med flyttingen bedøvet (Benzoacain) og merket med Pit Tag®. Vekt og lengde ble deretter registrert sammen med pittaggens følgenummer. Smoltifiseringsprosessen ble styrt ved hjelp av en smoltifiseringsprotokoll som innebar lys og temperaturmanipulering. Det ble justert til kort dag (vinterstimuli) før forsøksstart som innebar en reduksjon i temperatur fra rundt 10°C til en jevn temperatur på 5-6°C, og 6 timer lys og 18 timer mørke (Figur 4). Kortdags-behandlingen varte i 8 uker. Fra slutten av oktober (26.10.18) ble temperaturen gradvis økt til 10°C og kontinuerlig lys (24:0) som fortsatte ut forsøket. Det ble i forsøksperioden fra august 2018 til desember 2018 gjennomført tre prøveuttak (T1, T2 og T3, se Figur 4).



Figur 4: Skjematisk fremstilling av prøvetaking, lysregime og temperatur for steril (lys kar) og kontroll (mørk kar). For hvert uttakstidspunkt (T) ble det også gjennomført sjøvannstest (SVT). Lysregime besto av 6t lys og 18t mørke (6:18) og 24t lys og 0t mørke (24:0)

2.2 Uttak av prøver

Det ble håvet ut 8-12 fisk fra hvert kar, som ble gitt en dødelig dose bedøvelse (benzocain). Deretter ble det tatt blodprøver (i løpet av en periode på under 5 min) fra caudal-årene ved hjelp av 2 ml vakumrør (Vacutainer®) tilsatt litium-heparin. Blodet ble spunnet i en sentrifuge (STORVALL RC 5B plus) på 4500 RPM i 10 min, før plasma ble pipetert over i 1,5 ml eppendorfrør og lagret ved -20°C til senere analyser. Det ble også registrert kroppsvekt (g) og lengde (gaffel-lengde; cm).

Det ble videre gjennomført uttak av hjerne, hypofyse, gjelle og gonader (gonadene ble veid til nærmeste mg). Hjerne og hypofyse ble lagret hel, mens det ble tatt ut en liten seksjon av andre gjelle-bue på venstre side, alt dette lagret på RNAlater® i kjøleskap over natten, og deretter i -20°C fram til analyse. Det ble også tatt ut en liten seksjon av andre gjelle-bue på høyre side, lagret på sodium-EDTA-imidazole (SEI-buffer) i 1,5mL eppendorfrør og fryst på -80°C fram til analyse. Alle gjelleprøvene på SEI-buffer fra T2 forsvant under lagring, og disse mangler i resultatene. Ved samme uttaksdatoer ble det gjennomført en standardisert 24 timers sjøvannstest (SVT) (Blackburn & Clarke, 1987), der rundt 8 fisk fra hvert kar ble håvet over i egne sirkulære kar på rent sjøvann (33‰ salinitet) og en temperatur på rundt 10°C. I disse karene fikk fisken ikke fôr. Etter at sjøvannstesten var over ble alle fiskene håvet opp og avlivet med en dødelig dose benzocain. Blodprøver ble gjennomført som beskrevet over, kroppsvekt og lengde målt og kjønn registrert.

Målinger av fisk og gonadevekt ble registrert for hvert individ, og ble senere brukt til å beregne gonadosomatisk indeks (GSI), spesifikk vekstrate (SGR) og kondisjonsfaktor (K-faktor).

2.3 Beregning av gonadosomatisk indeks, vekstrate og kondisjonsfaktor

Gonadosomatisk indeks (GSI)

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

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

Spesifikk vekstrate (SGR)

SGR er uttrykk for den daglige vektøkningen, der V1 og V2 er vekt oppgitt i gram ved tidspunktene T1 og T2. Beregnes ved hjelp av følgende formel:

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

Kondisjonsfaktor (K-faktor)

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

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

2.4 Analyse av genuttrykk

Polymerase chain reaction (PCR) er et ledende verktøy for påvisning og kvantifisering av DNA eller RNA, der man ved kvantitativ *real-time* PCR (RT qPCR) kan bestemme mengden et bestemt gen er til uttrykk i prøven. Dette ved hjelp av fluoriserende fargestoff som binder seg til dobbeltrådig DNA (dsDNA) og har en proporsjonal økning med mengde PCR-produkt som produseres etter hver amplifiseringssyklus. I dette forsøket ble det brukt *Fast SYBR Green* som fluoriserende fargestoff, som gir en sterkere fluorescens dersom den er bundet til dsDNA. En terskelverdi (*threshold*) vil settes når det er en signifikant økning i fluorecens, sammenlignet med bakgrunnsstøy. Amplifiseringssyklusen som fører til overstigning av terskelverdien kalles terskelsyklus (C_t), og med en kjent C_t -verdi kan man beregne mengden genuttrykk i prøven (LifeTechnologies, 2012).

En amplifiseringssyklus består av de tre fasene: denaturering, amplifisering og ekstensjon. Ved denaturering benyttes høy temperatur for å separere dsDNA til enkelttrådig DNA (ssDNA), slik

at tilsatte primere kan feste seg til spesifikt ønskelig gen og dens komplementær DNA. Dette skjer i amplifiseringsfasen, der temperaturen er tilpasset primerens optimaltemperatur. I ekstensjonsfasen syntetiserer enzymet DNA polymerase en ny DNA-tråd, i 5'-3'-retning, og temperaturen øker til enzymets optimaltemperatur. For at polymerasen skal festes til de komplementære ssDNA-trådene kreves det en forover og en revers primer. Etter avsluttet amplifisering, vil man ha mulighet for å utelukke eventuelle uspesifikk binding av SYBR Green ved bruke av en smeltepunktanalyse. Dette ved å øke temperatur vil PCR produktene dissosiere og fargestoffet løsne, og fluorescensen endres. Ved grafisk framstilling av disse endringene og sammenligning av smeltekurver, vil man kunne oppdage uspesifikk binding (LifeTechnologies, 2012).

For å analysere uttrykk av et gen, fra vev eller organ behøver man å ekstrahere RNA, syntetisere cDNA og utføre real-time qPCR.

2.4.1 RNA-ekstraksjon fra organer

Vevsprøver fra hjerne, hypofyse og gjelle, ble lagret på RNAlater® i -20°C ble tint på is, og overført til 2mL eppendorfrør (TURBO DNA-free tubes) med 1000µl Trizol reagent (Invitrogen- 15596026) og keramisk kule. Prøvene ble homogenisert (Tissue Lyzer II, qiagen) i 2 min på en hastighet (30I/s med 30 sek på/av), før de ble spunnet i en sentrifuge på 12000 rpm i 10 min ved 4°C slik at det uløste vevet skilte seg fra supernatant og la seg på bunnen. Supernatanten ble pipettert over i 1,5 mL eppendorfrør, og 500 µl nedkjølt kloroform (4°C) tilsatt og blandet godt ved hjelp av vortex i 15 sek. Etter 5 min inkubering i romtemperatur, ble prøven sentrifugert (12000 rpm/15 min/4°C) slik at prøven delte seg inn i tre faser (vannfase, interfase og bunnfase). Vannfasen ble så pipettert til en ny eppendorfrør før 500 µl Trizol og 200 µl kloroform ble tilsatt. Samme prosedyre som tidligere ble gjennomført, med 15 sek. vortex, 5 min. inkubering (romtemperatur) og 15 min. spinn (12000 rpm ved 4°C) slik at prøven igjen delte seg inn i tre faser. Trizol og kloroform renses prøven for DNA og protein som vil samle seg i bunnfasen, mens RNA i vannfasen blir tatt med videre. Den RNA-holdige vannfasen ble pipettert over i nytt 1,5 mL eppendorfrør før 500 µl nedkjølt (-20 °C) isopropanol (2-propanol) ble tilsatt for å bidra med utfelling av RNA. Prøven blandet ved hjelp av vortex og inkubert på -20 °C i 30 min. eller lengre (mellom 30 min. og 24t.). Etter inkubering ble prøven sentrifugert i 12000 rpm/ 10 min/ 4 °C slik at RNA samlet seg i bunnen av røret som en pellet. Alt av isopropanol ble så fjernet, og gjenværende pellet ble vasket med 1 mL etanol

(80% etOH- 0821), sentrifugert ved 10000 rpm i 5 min, før etanol ble fjernet og det kun var pellet tilbake. Dette ble gjennomført to ganger, før prøve ble tørket (rundt 20 min) i romtemperatur slik at alt av etanol fordampet. Pelleten ble så løst opp i 30 µl nuklease-fritt vann og inkubert på 55°C i 10 min, klar til DNase behandling. Ved analysering av genuttrykk ble det kun brukt nukleasefritt vann, dette for å unngå kontaminering.

Til DNase behandling ble det brukt TURBO DNA-free™ Kit (ThermoFisher scientific - AM1907), der 3 µl med «10X TURBO DNase»-buffer og 1 µl «TURBO DNase»-enzym ble tilsatt og blandet forsiktig ved å knipse, før prøven ble inkubert på 37°C i 20-30 min. Etter inkubering ble 3 µl «DNase Inactivator Reagent», blandet godt og inkubert ved romtemperatur (rundt 22°C) i 5 min. Gjennom inkubering ble det knipset i rørene (2-3 ganger) for at DNase inaktiveringsreagensen skulle spres godt i prøven. Prøven ble deretter sentrifugert i 10000 rpm i 1,5 min. slik at eventuelle rester av DNA og protein dannet en pellet på bunnen. Væsken med prøvens RNA-konsentrasjon ble pipettert over i nytt eppendorfrør, mens pelleten ble unngått. RNA-konsentrasjonen i hver prøve ble så målt ved bruk av Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, Savee Werner). Den totale mengde RNA blir målt ved 260/280 nm, der det ved verdi på over 1,8 indikerer rent RNA. Mengde protein og DNA kontaminering er lest ved 230/260 nm. Prøvene ble fryst på -80 °C fram til cDNA syntese.

2.4.2 cDNA syntese

Syntesen av cDNA ble gjennomført ved hjelp av kittet High-capacity RNA-to-cDNA™ fra Applied Biosystems (4387406), og behandlet på is til enhver tid. Resultatene etter Nanodrop viste en stor variasjon mellom RNA-konsentrasjonen i de forskjellige prøvene, der flere prøver hadde for høy konsentrasjon. De prøvene som krevde det, ble dermed fortynnet (1:5, 1:10, 1:20 eller 1:40) med vann til en total RNA-konsentrasjon på 200ng. 9 µl RNA fra hver prøve ble fordelt over to 96-brønners brett og tilsatt 11 µl mastermix (10 µl 20X RT Buffer Mix og 1 µl RT Enzyme Mix). Hvert brett inneholdt også kontroller (positiv og negativ). Prøvene fordelt på brettet forseglet og spunnet ned, før de ble inkubert (Applied Biosystems GeneAmp® PCR systems 2700) ved 37 °C i 60 min, 95 °C i 5 min, og deretter kjølt ned til 4 °C ∞. Prøvene ble lagret på -20 °C fram til senere bruk.

2.4.3 Primere

De spesifikke primerne ble designet for hvert gen (ved bruk av primer blast) og 100µM stamløsning ble laget. Stamløsningen ble videre fortennet med vann, til en bruksløsning på 5µM og lagret ved -20°C.

Tabell 1: Viser primersekvens. F; forover, R; revers, E; effektivitet

Gen (Tilgangsnummer)	Primer	Primer sekvens (5'-3')	E (E%)
<i>Efl-a</i> (AF321836)	FP	CGCCAACATGGGCTGG	102,12
	RP	TCACACCATTGGCGTTACCA	(2,02)
<i>β-actin</i> (BT059604)	FP	CAGCCCTCCTTCCTCGGTAT	103,14
	RP	CGTCACACTTCATGATGGAGTTG	(2,03)
<i>18S</i> (AJ427629)	FP	TGTGCCGCTAGAGGTGAAATT	94,76
	RP	CGAACCTCCGACTTTCGTTCT	(1,95)
<i>Pomca-a1</i> (AB462418)	FP	TGGAAGGGGGAGAGGGAG	81,64
	RP	CAGCGGAAGTGGTTCATCTTG	(1,82)
<i>Pomc-b</i> (AB462419)	FP	ACTAAGGTAGTCCCCAGAACCCTC	83,2
	RP	GCTACCCCAGCGGAAGTGA	(1,83)
<i>nkcc</i> (AJ417890)	FP	CAACACTCTGGTGATTGG	78,39
	RP	ATCTGGATGTAGGTCTCAA	(1,78)
<i>Nka-a1a</i> (XM_014209857.1)	FP	CCAGGATCACTCAATGTCACTCT	94,06
	RP	GCTATCAAAGGCAAATGAGTTTAATATCATTGTAAAA	(1,94)
<i>Nka-a1b</i> (XM_014152156.1)	FP	GCTACATCTCAACCAACAACATTACAC	109,97
	RP	TGCAGCTGAGTGCACCAT	(2,10)
<i>Cftr1</i> (NM_001123533.1)	FP	CCTTCTCCAATATGGTTGAAGAGGCAAG	137
	RP	GAGGCACTTGATGAGTCAGCAG	(2,37)
<i>Cfr1a</i> (NM_001141590)	FP	ACTTGATCCATTCCACAATCTTCAG	79,22
	RP	GCGAATTTTGATTGGAGTTGTCA	(1,58)
<i>Crf 1b</i> (Ikke publisert)	FP	GTCCATCCATCCCACGATCTA	104,76
	RP	AAGTACTCCTCTCCTAGTCGCAGG	(2,10)

For å teste primerens effektivitet og spesifikke egenskaper, ble 5µM primerne testet opp mot en miks av cDNA (fra samme organer med tilsvarende samme konsentrasjon som brukt i dette forsøket) i fortyningsserie på 5 med tre duplikater. Disse ble kjørt i qPCR som beskrevet under. Ved å plote C_t-verdiene mot fortyningens log-verdi ble det laget en standardkurve, og stigningstallet (slope) beregnet. Primerens effekt (E)(Tabell 1:) ble beregnet ved bruk av formelen beskrevet av Pfaffl (2001).

$$E = 10^{(-\frac{1}{slope})}$$

2.4.4 Real-time qPCR analyse

Kvantitativ *real-time* qPCR ble gjennomført med cDNA fortynnet 1:40 med vann i et 96-brønners brett (346907 Thermoscientific) og lest av i 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystem, CA, USA). Hver reaksjon inneholder 5 µl av fortynnet cDNA og 10 µl mastermix, bestående av 7 µl *Fast SYBR Green* (4385612 Applied Biosystem) og 7,5 µl primer (1,25 µl FP og 1,25 µl RP). Prøvene til hvert gen ble fordelt over 4 brett (96-brønner) i duplikater, der det for hvert brett også ble inkludert duplikater av non-template kontroll (NTC). Følgende syklusparametere ble brukt: 50°C i 2 min og 95°C i 10 min i hold-fasen, 95°C i 15 sek og 60°C i 1 min i PCR-fasen, dette gjentatt 40 ganger. For å kunne se smeltekurven til hver amplicom ble det også kjørt et trinn med 95°C i 15 sek, 60°C i 1 min og 95°C i 15sek.

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

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

2.5 Måling av NKA-aktivitet

Gjelle NKA-aktivitet ble analysert ved en standard mikroanalyseprosedyre som angir hvor raskt en gitt mengde enzym hydrolyserer adenosine 5'-triphosphate (ATP) til adenosine 5'-diphosphate (ADP) + Pi. Dette er enzymatisk koblet til oksidasjon av nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) til NAD^+ , og leses av på en plateleser (Molecular Devices, SPECTRAMax PLUS, 384) som endring i absorbans (optisk tetthet, OD) ved en bølglengde på 340 nm (McCormick, 1993).

Alle løsninger som var nødvendig for måling av NKA-aktivitet i gjellefilamentene ble laget på forhånd. Na^+ -Acetate buffer, samt SEI-buffer, 0,5% SEID, imidazol buffer (IB-buffer), saltløsning og ouabain, ble oppbevart i kjøleskap ved 4°C, og phosphoenolpyruvat (PEP) samt ADP standard ble oppbevart i biofryser ved -80°C (Se appendiks II.1). I forbindelse med analysering ble det laget et *Assay Mixture* (AM)-medium bestående av IB-buffer, pyruvat kinase (PK), lactic dehydrogenase (LHD), NADH, PEP og ATP (Appendiks II.2). Videre ble AM-mediumet blant annet brukt til å lage positiv (AM) og negativ bruksløsning (AM-O) (appendiks II.3).

En ADP standardkurve ble laget av fire forskjellige standarder, bestående av ulike konsentrasjoner med IB-buffer og ADP standard (appendiks II.4). 10 µl av hver standard ble pipettert ut på en 96-brønnsplate i triplikater og 700 µl saltløsning (2,1 ml AM og 700µl saltløsning) ble tilsatt hver brønn. Platene ble kjørt i 10 min på 25°C og lest av i programmet SOFT MAX PRO. De avleste OD-verdiene plottes mot den kjente konsentrasjonen i de forskjellige standardene, og det negative stigningstallet ble senere brukt til å beregne enzymaktiviteten.

Gjelleprøvene ble tint på is og tilsatt 25 µl SEID til hvert rør. Gjelleprøvene ble deretter homogenisert ved hjelp av en Pestel motor før den ble sentrifugert (3800 rpm, 4°C) i 30 sekunder for å bunnslå uløselig materiale. 10µl av hver prøve ble pipettert over i 96-brønns plate, tilsatt 200µl bruksløsning og lest av tilsvarende som for ADP standardkurven. Det ble laget en parallell med AM og en parallell med AM-O for hver gjelleprøve. Brønnene som inneholder AM-løsning indikerer den totale mengden ADP i prøven, mens AM-O viser ADP fra andre metabolske aktivitet. AM minus AM-O vil derfor være mengden ADP generert spesifikt av gjelle NKA, og forbruket av NADH som en funksjon av tilstedeværende ADP.

Til proteinanalysen ble 10 µl av homogenisert gjelleprøve pipettert ut på en 96-brønns plate i triplikater med 200 µl arbeidsløsning. Arbeidsløsningen ble laget ved hjelp av BCA Protein Assay Kit (Prod# 23227) fra PIERCE og bestod av reagens A og reagens B (50:1). Hver plate inneholdt også triplikater av fire forskjellige standarder (appendiks II.5), brukt til å lage en standardkurve. Platen ble ristet forsiktig og inkubert ved 37°C i 60 min, før den ble lest av på plateleseren ved 540 nm. Mengde protein i prøven beregnet ved hjelp av standardkurvens stigningstall.

Beregningen an enzymaktivitet tar hensyn til ADP-standardkurve og proteinnivåer i henhold til Bradford-metoden (Bradford, 1976). Den endelige verdien av NKA aktiviteten regnes ut i tre steg, og presentert som µmol ADP*mg protein⁻¹*time⁻¹.

$$\frac{mOD/10\mu l/min}{mOD/mole - ADP} = mmoles/10\mu l/min$$

$$\frac{2mmoles - ADP/10\mu l/min}{\mu g - protein/10\mu l} = \mu moles ADP/mg protein/min$$

$$3\mu moles ADP/mg protein/min * 60 = \mu mol ADP mg Protein^{-1}time^{-1}$$

2.6 Plasma klorid og osmolaritet

Blodplasma fra hvert individ ble tint på is og blandet ved hjelp av en vortexer i ca 5 sek før analysering. Klorid ble målt ved hjelp av en Corning 925 chloride titrator (CIBA Corning Diagnostics, Essex, England) som baserer seg på en kjemisk reaksjon mellom sølv-ioner (Ag⁺) fra en sølvelektrode og kloridioner (Cl⁻) fra plasmaprøven (20 µl). Dannelse av sølvklorid gjør at Cl⁻ titreres ut av løsningen og endrer væskens ledningsevne, som analyseinstrumentet

registrerer. Instrumentet har en nøyaktighet på $\pm 2,2$ mM i en 100 mM løsning (CibaCorning, 1980), og det ble gjennomført to analyser av hver prøve for å oppdage eventuelle feilmålinger. I de tilfellene der det var avvik på mer enn 3 mM mellom parallellene, ble flere prøver tatt. Verdiene er presentert i resultatet som gjennomsnittet av minst 2 målinger.

Det ble også gjennomført målinger av osmolaritet i blodplasma ved hjelp av et FiskeOne-Ten Osmometer (Fiske Associates, MA, USA). Målingene baserer seg på frysepunktdepresjon (nedsenkning av frysepunkt grunnet oppløste substanser) i en væske, der den absolutte temperaturen ved fryse-/smeltepunktet er direkte korrelert til konsentrasjonen (mOsm l^{-1}) av løste stoffer i væska. Før oppstart av målinger, og etter hver tiende prøve, ble instrumentet sjekket opp mot en standardløsning (Accuref 290, Fiske Associates, MA, USA) som har en kjent verdi på 290 mOsm l^{-1} . Det ble gjennomført minimum tre slike målinger, slik at man skulle være sikker på at verdiene hadde stabilisert seg på $290 \text{ (mOsm l}^{-1}, \pm 3)$. Alt av standardløsning og prøver som ble analysert ble pipettert i en spesiallaget tube (Advanced Instruments, Inc., MA, USA), plassert i maskinen. Det ble utført to målinger av hver prøve for å oppdage eventuelle feilmålinger. I de tilfellene der det var avvik på mer enn 3 mOsm l^{-1} mellom parallellene, ble flere analyser utført. Verdiene presentert i resultatene er gjennomsnittet av minst 2 paralleller.

2.7 Statistiske analyser og presentasjon av data

Data ble behandlet i Sigmaplot for Windows versjon 13.0 (Systat Software). En Shapiro-Wilk test ble brukt for å teste data for normalfordeling, og en Brown-Forsyth test for å teste lik varians. Signifikansnivå 0,05 ble brukt.

Normalfordelte data ble testet ved en treveis ANOVA (*Analysis of variance*) for å avgjøre statistisk signifikans mellom tid, behandling (S/K) og kjønn. *Backward elimination* ble brukt for å fjerne de faktorene som ikke var signifikant i ANOVA, for å styrke eventuelle signifikante forskjeller. Ved signifikante interaksjoner ble det kjørt en Holm-Sidak (Post-hok test). Transformasjon av data ble brukt ved behov for å tilfredsstillte krav om normalfordeling og

variens. Dersom kavene for parametrisk statistikk ikke ble møtt, ble en Kruskal-Wallis faktor ANOVA og en Dunn's post hoc test brukt, med signifikansnivå 0,05.

Data fra genuttrykkene *nka-1b* og *pomc-1* besto ikke Brown-Forsyth test for lik variens, og *cftr1* var kun normalfordelt dersom man fjernet tre fisk fra datasettet. Etter undersøkelse av residualer, og med tanke på at ANOVA er en robust mot outliere og variasjon i datasettet (Whitlock & Schluter, 2015), ble det kjørt treveis ANOVA på disse (appendiks I).

Toveis ANOVA ble brukt for å teste gruppen med begynnende modning i kontrollgruppen ved T3. Det ble testet for statistisk signifikans mellom behandling og kjønn.

3 Resultater

3.1 Vekstutvikling og reproduktiv status

Gjennomsnittlig lengde (cm), vekt (g), spesifikk vekstrate (SGR) og gonadosomatisk indeks (GSI) for både kontroll (K) og steril (S) i perioden T1-T3 er presentert i Tabell 2.

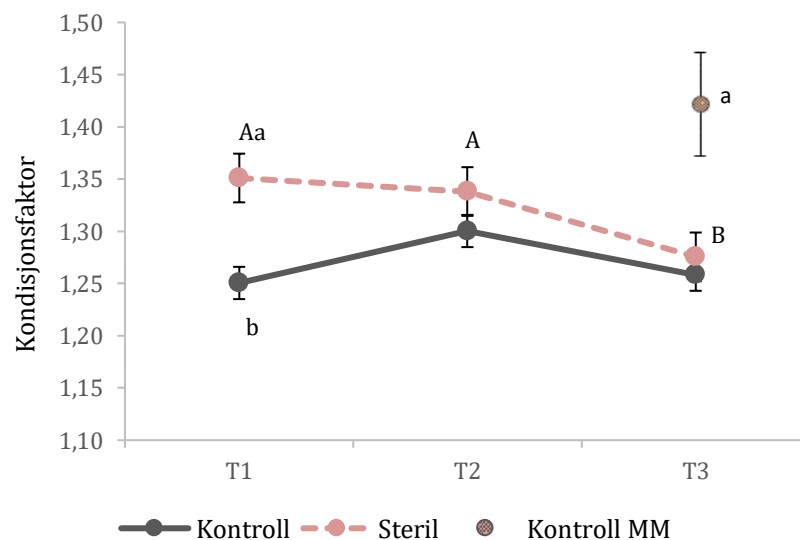
Tabell 2: Gjennomsnittlig vekt (g), lengde (cm), spesifikk vekstrate (SGR) og gonadosomatisk indeks (GSI) fra både kontroll (n=24-30) og steril (n=24-28) ved uttak T1, T2 og T3. Tall angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom steril og kontroll innenfor kjønn ved et måletidspunkt. Verdiene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM. M: hannfisk, F: hunnfisk og MM: kjønnsmoden hann (n=8) og UM: umoden hann (n=9).

Grupper	Lengde (cm)	Vekt (g)	SGR (%)	GSI (%)	
T1	Kontroll M:	26,67 \pm 0,61	239,00 \pm 0,03	0,59 \pm 0,03	0,04 \pm 0,05
	Steril M:	26,67 \pm 0,54	239,00 \pm 0,03	0,59 \pm 0,03	0,02 ¹ \pm 0,03
	Kontroll F:	25,16 \pm 0,43	205,78 \pm 0,02	0,54 \pm 0,02	0,14 \pm 0,02
	Steril F:	25,57 \pm 0,50	230,03 \pm 0,02	0,58 \pm 0,03	0,01 ¹ \pm 0,03
T2	Kontroll M:	27,39 \pm 0,54	268,04 \pm 0,03	0,68 \pm 0,03	0,05 \pm 0,03
	Steril M:	26,97 \pm 0,54	267,04 \pm 0,03	0,71 \pm 0,03	0,02 ¹ \pm 0,03
	Kontroll F:	27,23 \pm 0,56	266,88 \pm 0,03	0,73 \pm 0,03	0,15 \pm 0,03
	Steril F:	27,26 \pm 0,58	268,09 \pm 0,03	0,75 \pm 0,03	0,03 ¹ \pm 0,03
T3	Kontroll MM:	30,60 \pm 0,76	415,19 \pm 0,03	0,95 \pm 0,06	0,14 \pm 0,01
	Kontroll MU:	30,11 \pm 0,51	356,00 \pm 0,03	0,70 \pm 0,02	0,05 \pm 0,01
	Steril M:	29,61 \pm 0,47	337,21 \pm 0,02	0,75 \pm 0,03 ¹	0,02 ¹ \pm 0,03
	Kontroll F:	29,30 \pm 0,65	317,56 \pm 0,03	0,73 \pm 0,04	0,14 \pm 0,04
	Steril F:	28,77 \pm 0,61	305,05 \pm 0,03	0,72 \pm 0,01	0,02 ¹ \pm 0,03

Gjennomsnittlig vekt og lengde, viste en signifikant økning både i perioden T1 - T2 og i perioden T2-T3. Vekt- og lengdeutvikling var ikke signifikant påvirket av behandling (S vs. K) eller kjønn (M vs. F). Vekstraten målt ved T2 og T3 var ikke signifikant forskjellige. Det ble også testet for forskjeller i SGR mellom K og S, samt for interaksjoner mellom uttak, behandling og kjønn, uten at noen av disse var statistisk signifikante. Ved T3 ble det observert åtte hannfisk i kontrollgruppen med begynnende kjønnsmodning (KMM), GSR hos disse skilte seg signifikant fra resten av hannfiskene i kontrollgruppa (KUM).

Gonadosomatisk indeks for S var signifikant lavere sammenlignet med K hos begge kjønn og ved alle uttak (Tabell 2). Ved T3 hadde KMM en GSI på 0,14, signifikant høyere enn KUM med en GSI på 0,05 (Tabell 2).

Kondisjonsfaktoren til S var signifikant høyere enn K ved første uttakstidspunkt, men ikke ved T2 og T3 (Figur 5). Både S og K hadde en nedgang i kondisjonsfaktor mellom T1 og T3, om en ser bort fra KMM ved T3. Kondisjonsfaktoren til KMM var signifikant høyere enn både KUM og S (Figur 5).

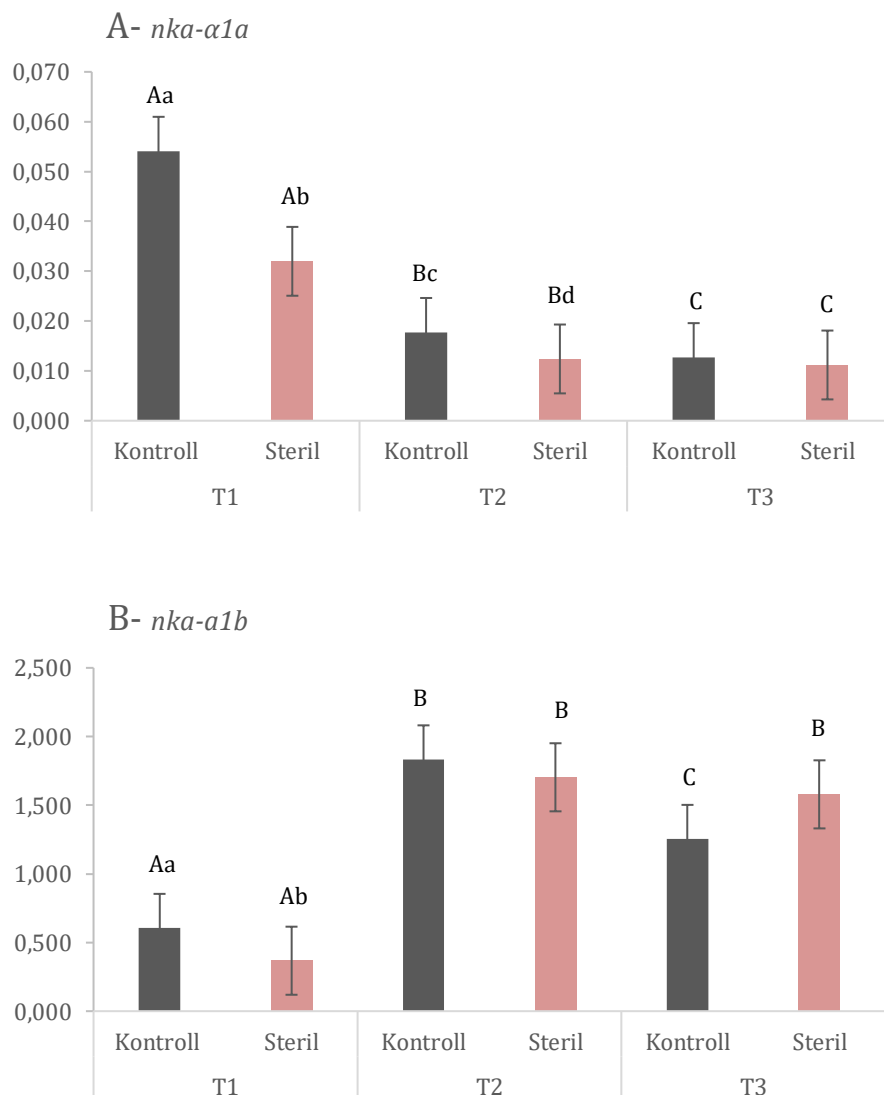


Figur 5: Gjennomsnittlig kondisjonsfaktor ved måletidspunkt T1, T2 og T3 for kontroll (n=24-30), steril (n=24-28) og kontroll modne hann (MM)(n=8). Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom grupper (steril, kontroll og kontroll MM) innenfor et måletidspunkt og ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom måletidspunkter innen grupper (steril og kontroll). Verdiene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM

3.2 Genuttrykk

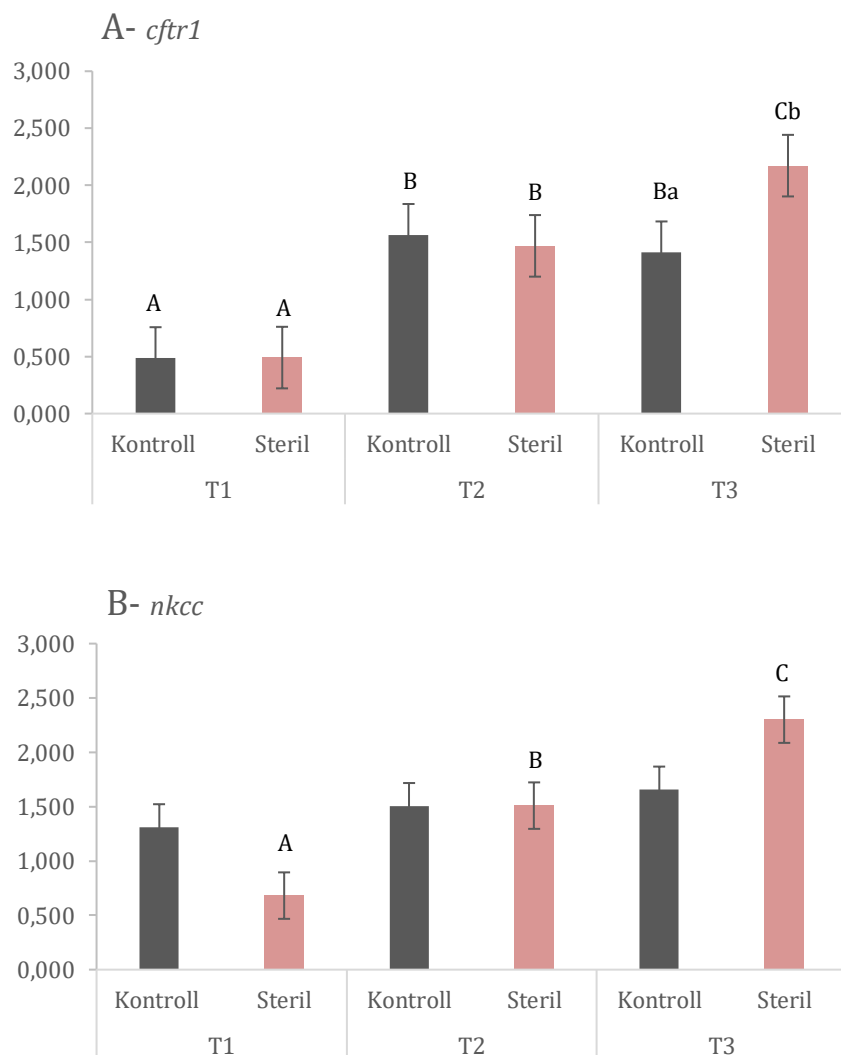
3.2.1 Gjeller

For genene *nka-a1a* og *nka-a1b* var det signifikante forskjeller mellom alle uttakstidspunktene, der genuttrykket for *nka-a1a* ble mer enn halvert for både K og S (Figur 6a). Genuttrykket for *nka-a1b* hadde jevnt over et motsatt forløp og viste en signifikant økning fra T1 til T2, mens det fra T2 til T3 var en signifikant nedgang i genuttrykk (Figur 6b). Man så også signifikante forskjeller mellom S og K i genuttrykk for *nka-a1a* ved T1 og T2 og for *nka-a1a* ved T1.



Figur 6: Relativt genuttrykk for A) *nka-a1a* og B) *nka-a1b* ved måletidspunkt T1, T2 og T3 for kontroll (n=24-30), steril (n=24-28). Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom grupper (steril og kontroll) innenfor et måletidspunkt og ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom måletidspunkter innen grupper (steril og kontroll). Verdiene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM

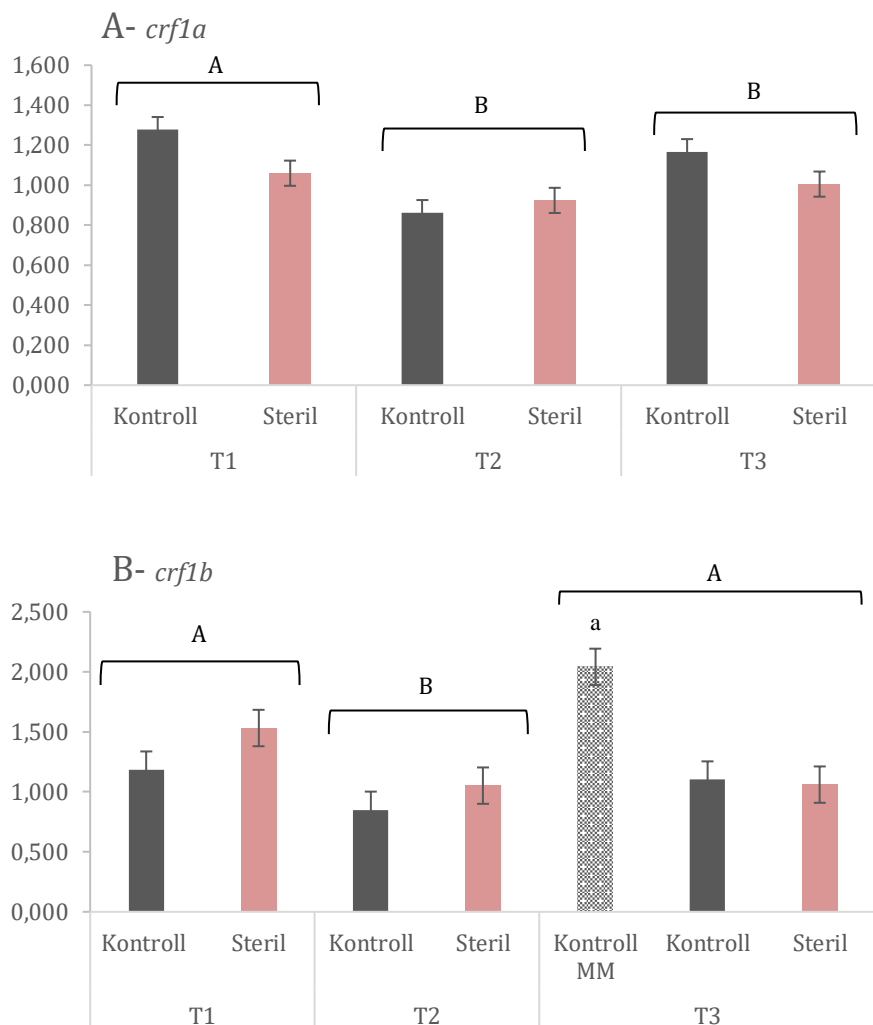
Genuttrykket for *cftr1* var signifikant høyere ved andre og tredje uttak, og mer enn dobbelt så høyt sammenlignet med T1 for både S og K. Forskjellene mellom uttakene var størst for S, der det også var signifikant forskjell mellom T2 og T3. Mellom S og K var nivåene tilnærmet lik ved T1 og T2, mens S var signifikant høyere enn K ved T3 (Figur 7a). For *nkcc* var det kun en signifikant økning av genuttrykk mellom første og siste uttak. Også her var den sterile gruppen ved T3 signifikant høyere sammenlignet med den fertile kontrollgruppen ved samme uttak (Figur 7b). Alle genene ble også testet for forskjeller mellom kjønn, men det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller. Det ble heller ikke funnet noen effekt av begynnende modning, da KMM ikke skilte seg signifikant fra KUM og S ved T3.



Figur 7: Relativt genuttrykk for A) *cftr1* og B) *nkcc* ved måletidspunkt T1, T2 og T3 for kontroll (n=24-30), steril (n=24-28). Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom grupper (steril og kontroll) innenfor et måletidspunkt og ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom måletidspunkter innen grupper (steril og kontroll). Verdiene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM

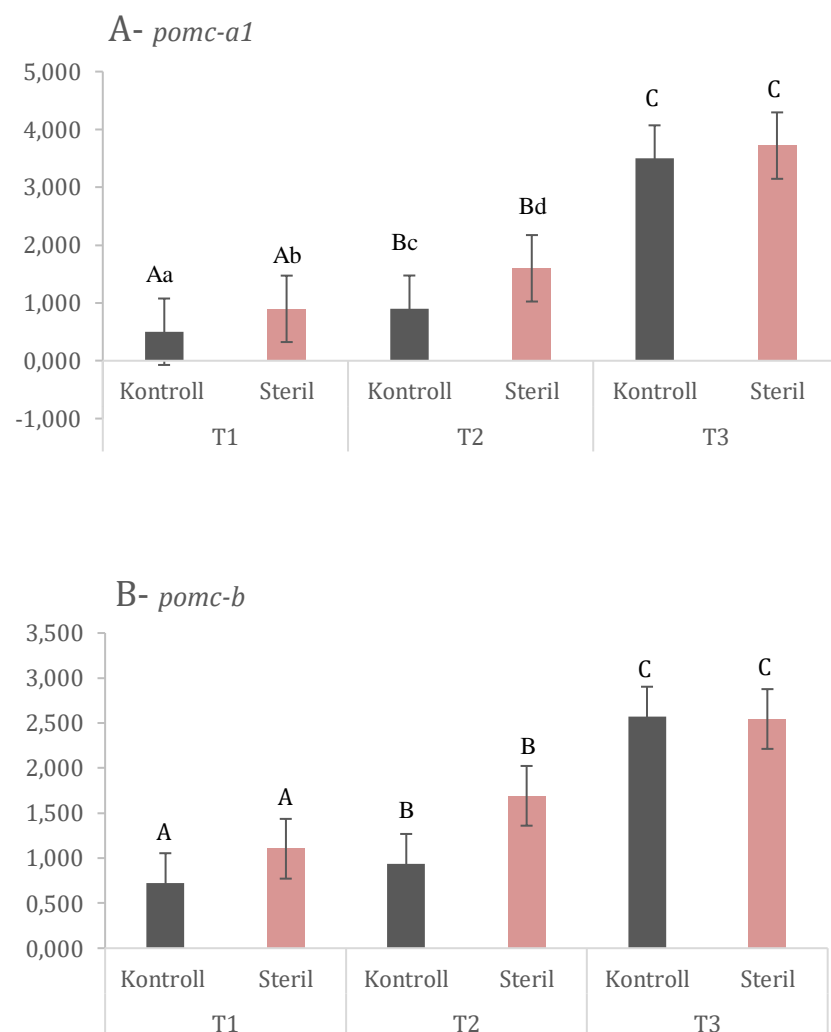
3.2.2 HPI-akse

I perioden mellom T1 og T2, var det en liten, men signifikant nedgang i uttrykket av *crfla* og *crflb* i hjernen, mens det fra T2 til T3 var en signifikant økning for *crflb* med en tilsvarende klar trend for *crfla* (P=0.052). Forskjellen i uttrykk mellom T1 og T3 var imidlertid ikke signifikant for verken *crfla* eller *crflb*. Det var ikke noe signifikante forskjeller mellom S og K, og man kan heller ikke finne signifikante forskjeller i nivå mellom verken uttak eller kjønn for noen av genene (Figur 8). Det ble også testet om gruppen med KMM skilte seg fra KUM og S i samme uttak, der KMM hadde et signifikant høyere uttrykk av *crflb* sammenlignet med begge disse (Figur 8b).



Figur 8 Relativt genuttrykk for A) *crfla* og B) *crflb* ved måletidspunkt T1, T2 og T3 for kontroll (n=24-30), steril (n=24-28) og kontroll modne hann (MM)(n=8). Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller (P<0,05) mellom grupper (steril, kontroll og kontroll MM) innenfor et måletidspunkt og ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller (P<0,05) mellom måletidspunkter innen grupper (steril og kontroll). Verdiene er presentert som gjennomsnitt ±SEM

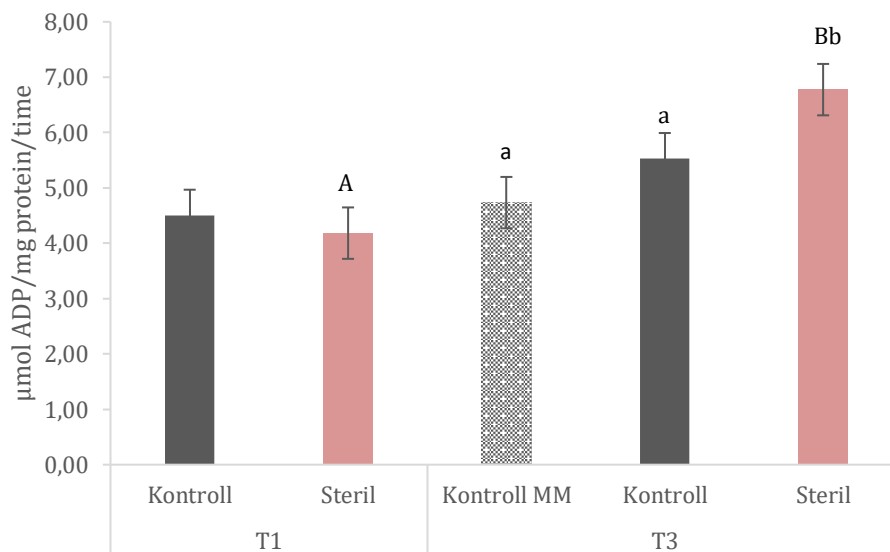
I hypofysen er det signifikante økninger i uttrykket av *pomc-a1* gjennom hele forsøket. Både K og S har en liten, men signifikant økning mellom T1 og T2, før det er en ytterligere økning mellom T2 og T3. Det var også forskjeller mellom S og K, der S hadde signifikant høyere uttrykk av *pomc-a1* både ved T1 og T2, sammenlignet med K i samme uttak (Figur 9a). Gjennomsnittlig genuttrykk av *pomc-b* viste en signifikant økning mellom alle uttakene. Den signifikante forskjellen mellom S og K er ikke avhengig av tid, og det er derfor ingen signifikant interaksjon mellom uttakstidspunkt, S og K (Figur 9b). Det ble testet for signifikante forskjeller mellom KMM, KUM og S, uten at det ble effekt av begynnende modning ved T3, for verken *pomc-a1* eller *pomcb*. Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom kjønn.



Figur 9: Relativt genuttrykk for A) *pomc-a1* og B) *pomc-b* ved måletidspunkt T1, T2 og T3 for kontroll (n=24-30), steril (n=24-28). Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom grupper (steril og kontroll) innenfor et måletidspunkt og ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom måletidspunkter innen grupper (steril og kontroll). Verdiene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM

3.3 ATPase aktivitet

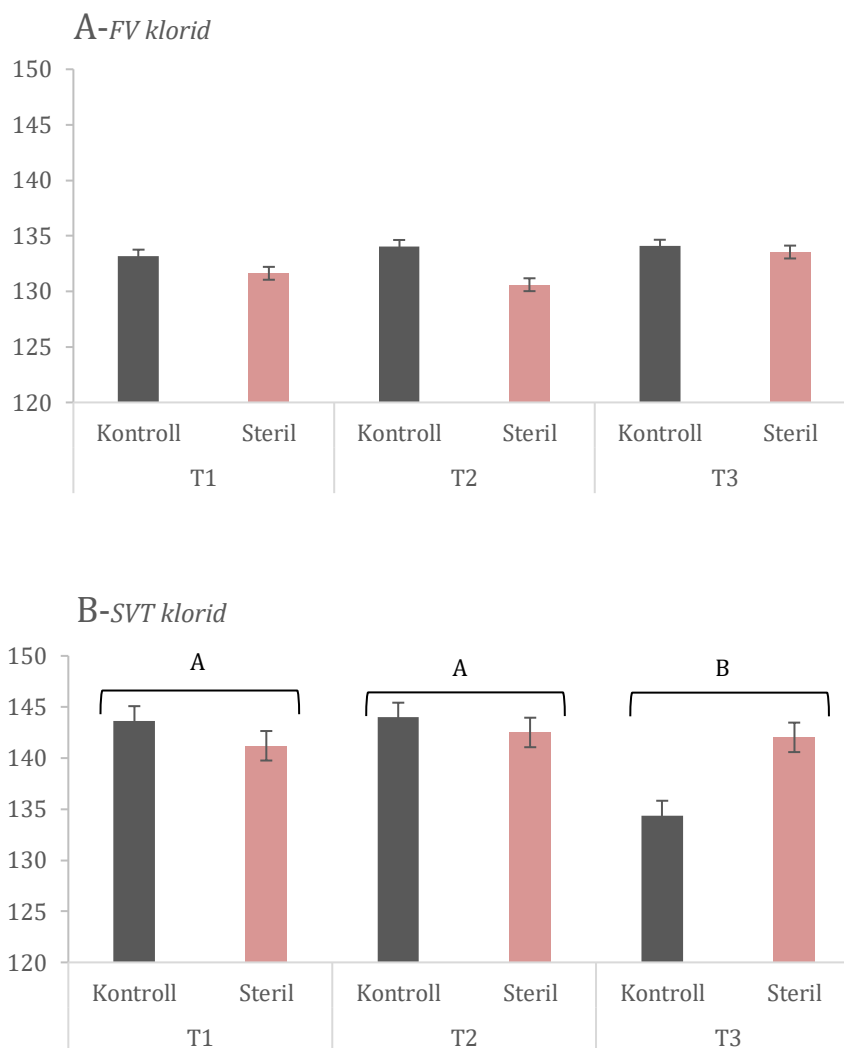
For S er det en signifikant økning i gjelle NKA-aktivitet fra første ($4,18 \pm 1,74$) til siste ($6,78 \pm 2,12$) uttakstidspunkt, og er signifikant høyere enn KMM og KUM ved T3. For K var det ikke signifikante endringer i nivået mellom T1 og T3, med en økning på $1,3 \mu\text{mol ADP/mg protein/time}$ (Figur 10). Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom S og K, heller ikke mellom kjønn innenfor behandling (S og K) ved de to uttakene registrert.



Figur 10: Gjelle Na⁺/K⁺-ATPase ved måletidspunkt T1 og T3 for kontroll (n=24-30), steril (n=24-28) og kontroll modne hann (MM)(n=8). Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller (P<0,05) mellom grupper (steril, kontroll og kontroll MM) innenfor et måletidspunkt og ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller (P<0,05) mellom måletidspunkter innen grupper (steril og kontroll). Verdiene er presentert som gjennomsnitt ±SEM

3.4 Plasma klorid og osmolaritet

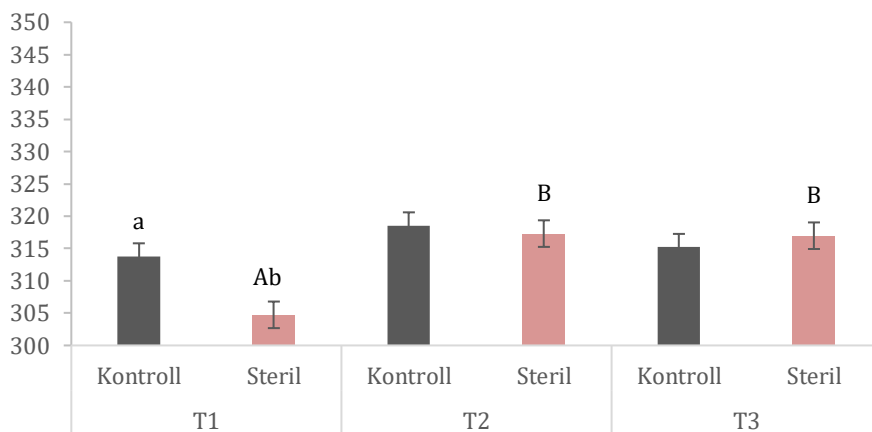
Ferskvannsfisken viste små endringer i plasma kloridnivå, og det er ingen signifikante forskjeller over tid. Det var heller ikke signifikans mellom S og K, verdiene som skilte mellom S (132 mM) og K (134 mM) var tilnærmet lik (Figur 11a). Sett bort fra det signifikant lavere kloridnivået for K (134 mM) ved T3 er det heller ingen signifikante forskjeller mellom S (142 mM) og K (144 mM) fisk etter SVT (Figur 11b). Mens det gjennomsnittlige kloridnivået mellom T1 og T3 etter SVT var tilnærmet uendret for S, var det en nedgang fra 144,0 mM til 134,4 mM for K. Det var ingen signifikante forskjeller mellom KMM, KUM og S ved T3 verken på FV eller etter SVT, heller ingen signifikante forskjeller mellom kjønn.



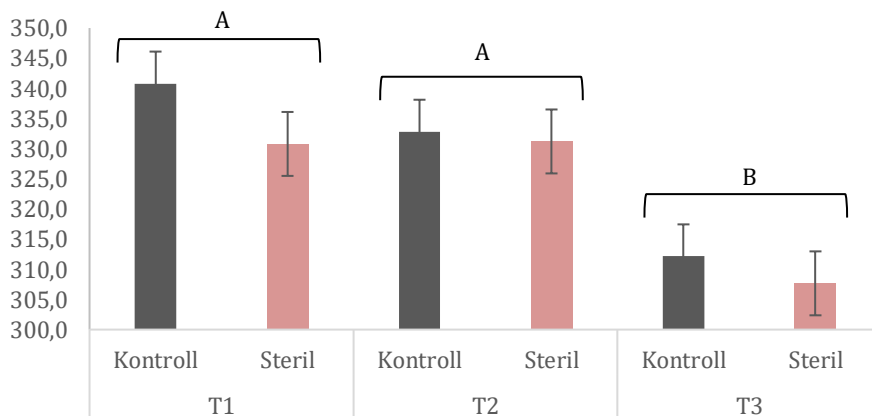
Figur 11: Gjennomsnittlig kloridnivå (mM) i plasma for A) ferskvann (FV) og B) sjøvannstest (SVT) ved måletidspunkt T1, T2 og T3 for kontroll (n=24-30), steril (n=24-28). Ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller ($P < 0,05$) mellom måletidspunkter. Verdiene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM

Gjennomsnittlig plasma osmolaritet hos K på FV viste små forskjeller mellom måletidspunktene. Verdien for plasma osmolaritet hos S på FV ved T1 (305 mOsm l^{-1}) er signifikant lavere enn K i samme uttak, samt de sterile gruppene ved T2 og T3 (begge 317 mOsm l^{-1}) (Figur 12a). Etter SVT var gjennomsnittlig plasma osmolaritet ved T1 og T2 tilnærmet lik ($335,8$ og $332,0 \text{ mOsm l}^{-1}$), med en signifikant nedgang til T3 (309 mOsm l^{-1}) (Figur 12b). Det var også en signifikant forskjell i plasma osmolaritet mellom S og K på SVT. Forskjeller mellom kjønn, samt effekt KMM ved T3 ble testet på både ferskvann og etter SVT, men det ble ikke funnet noe signifikante forskjeller.

A-FV osmol



B-SVT osmol



Figur 12: Gjennomsnittlig osmolaritet (mOsm l⁻¹) i plasma for A) ferskvann (FV) og B) sjøvannstest (SVT) ved måletidspunkt T1, T2 og T3 for kontroll (n=24-30), steril (n=24-28). Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller (P<0,05) mellom grupper (steril og kontroll) innenfor et måletidspunkt og ulike store bokstaver angir signifikante forskjeller (P<0,05) mellom måletidspunkter. Verdiene er presentert som gjennomsnitt ±SEM

4 Diskusjon

Ved spesifikt å hindre dannelsen av de primordiale kimcellene (PGCer) gjennom tidlig utvikling hos zebrafisk, vil dette senere i ontogenesen resultere i utvikling av gonader uten kjønnsceller og et sterilt individ (Wedinger et al., 2003; slanchev et al., 2005). Gjennom forskningsprosjektet *Salmosterile* har det blitt utviklet en tilsvarende metode for å fjerne PGCene hos Atlantisk laks (se innledning), og en antar at et bortfall av kjønnscellelinjen også hos denne arten vil resultere i sterilitet. Atlantisk laks som har blitt behandlet på denne måten har imidlertid ikke blitt holdt fram til vanlig kjønnsmoden alder (3 år) og en kan derfor ikke formelt si at fisken som har blitt brukt i dette forsøket er funksjonelt steril. I oppgaven er derfor «steril» brukt under forutsetning om at bortfall av kjønnscellelinjen resulterer i sterilitet. Den overordnede hensikten med det gjeldende forsøket var å undersøke om steril fisk ville utvikle normale smoltetegenskaper og osmoregulatorisk kapasitet etter å ha blitt eksponert for en vanlig smoltifiseringsprotokoll.

4.1 Vekstutvikling og reproduktiv status

I forsøket følges S og K gjennom en standardisert smoltifisering protokoll på 24 timer lys og 10°C, med tre prøveuttak etter 8 uker vinterstimuli (6 timer lys, 6°C). Resultatene i Tabell 2 viser en signifikant forskjell i gonadosomatisk indeks mellom K og S både hos hann- og hunnfisk. Hos KM er GSI om lag det dobbelte av SM, mens hos KF er GSI rundt det femdobbelte av det en finner hos SF. En slik forskjell i GSI hos begge kjønn indikerer bortfall av kjønnsceller hos den sterile fisken. Tidligere studier viser at bortfall av kimceller, bekreftet både molekylært og histologisk, resulterer i en GSI hos begge kjønn slik som det ble observert i dette forsøket (H. Tveiten pers. med.). Bortfall av kjønnscellelinjen ble i tillegg underbygget i en annen del av forsøket, ved å undersøke uttrykk av de kjønnselle spesifikke genene (såkalte kjønnsellemarkører) *Dnd* og *Vasa* (for kjønnsellemarkører se Raz, 2003). Manglende uttrykk av *Dnd* og *Vasa* i gonader hos både hann og hunnfisk i sterilgruppen indikerer sterkt at fisken som ble undersøkt var uten kjønnsceller.

Makroskopiske observasjoner av gonadene ved T3 viste klare tegn på begynnende modning hos en del av KM. Et frekvensplot av GSI hos denne fisken viste en klar øvre modal med en nedre «cut off» ved en GSI på c. 0.07%. (appendiks III) Halvparten av hannfiskene hadde GSI i den øvre modalen, og gjennomsnittlig GSI hos fisk klassifisert som KMM var 0,14%, det tredobbelte sammenlignet med KUM. En slik GSI er i overensstemmelse med tidlige modningsstadier hos annen atlantisk laks og viser at kjønnsmodning kan starte samtidig som smoltifiseringen pågår (Fjelldal, et al., 2018). Den tidlige kjønnsmodningen blant KM kan man også se igjen på fiskens vekst, der kondisjonsfaktoren til KMM viser en økende kondisjonsfaktor gjennom forsøket. For S ser man en nedadgående trend, noe man normalt kan forvente gjennom en smoltifisering (Heggberget et al., 1992; McCormick, 2013). Ved T3 kan man se at kondisjonsfaktoren til KMM på 1,42 er signifikante høyere enn både KF på 1,28 og de resterende hannene i KUM på 1,26 (Figur 5) Både KF og KUM er tilnærmet lik, og er innenfor forventet kondisjonsfaktor som normalt ligger litt over 1 ved smoltifisering (Nobel et al., 2018; Stien et al., 2013). Det er vanskelig å forklare den signifikante forskjellen mellom K og S ved T3, spesielt med tanke på at K er tilnærmet lik S ved både T2 og T3 (KUM). Et frekvensplot av kondisjonsfaktor ved T1 viste ingen enkeltindivid som skilte seg bemerkelsesverdig ut (appendiks IV), og en systematisk feil ved registrering av lengde hos K ved T1 kan ikke helt utelukkes som årsak til denne forskjellen.

4.2 Genuttrykk gjeller

Osmoregulatorisk evne øker under smoltifiseringen hos atlantisk laks, noe som gjør at fisken kan tåle overgangen til SV med minimale forstyrrelser i ione- og væskebalansen (Hoar, 1988). Flere viktige ione-transporterende protein er identifisert i gjelleepitelet, NKA (deriblant underenheten α med isoformen $-\alpha 1a$ og $-\alpha 1b$), *nkcc* og *cftr1* (Nilsen et al., 2007; McCormick et al., 2013). I forsøket viser ikke S store forskjeller fra K, med noen få unntak (Figur 6 og Figur 7). Uttrykkene av gjelle *nka- $\alpha 1a$* mRNA for både K og S viste en signifikant nedgang gjennom forsøket, mens det for *nkcc* og *cftr1* var en signifikant økning. Målt genuttrykk for *nka- $\alpha 1b$* viste en signifikant økning fra T1 til T2, etterfulgt av en negativ trend ved T3. De overordnende trendene i genuttrykk er i overensstemmelse med resultater fra tidligere studier av atlantisk laks, der det er en jevn reduksjon av *nka- $\alpha 1a$* mRNA, mens det for *nka- $\alpha 1b$* , *nkcc* og *cftr1* er økning i genuttrykk gjennom smoltifisering (Nilsen, et al., 2007). Disse resultatene underbygges også av andre studier som viser tilsvarende for *nka- $\alpha 1a$* og *nka- $\alpha 1b$* (McCormick et al., 2013), samt

nkcc (Christensen et al., 2018). Selv om den relative endringen i genuttrykk av f.eks. *nka- α 1a* og *nka- α 1b* ikke er like store som ved tidligere funn, ser man klart at de samme trendene går igjen (Figur 6). Graden av endringer er vist å variere avhengig av laksestamme som benyttes, oppdrettsforhold eller temperatur (Nilsen et al., 2007; Christensen et al., 2018). Målt genuttrykk for *cftr1* viser signifikant høyere verdier for S sammenlignet med K ved T3, og både *nka- α 1b* og *nkcc* viser en lignende trend (Figur 6b og Figur 7). Selv om det i dette forsøket ikke ble funnet noen signifikante forskjeller mellom KMM og KUM, vet man at kjønnssteroider har negativ effekt på salinitetstoleranse og smoltutvikling (Ikuta et al., 1987).

4.3 Aktivering av HPI-aksen

Det er tidligere vist at økende daglengde bidrar til økt nivå av kortisol hos smolt, og at kortisol er med å trigge mange av de fysiologiske forandringene som skjer under smoltifisering (Hoar, 1988; McCormick et al., 2007). Normal aktivering av HPI-aksen i forbindelse med smoltifisering er derfor antatt å være av stor betydning for utvikling av tilfredsstillende osmoregulatoriske egenskaper. Resultatene viser imidlertid ingen klare endringer i uttrykk av verken *crf1a* eller *crf1b* i løpet av smoltifiseringsperioden (Figur 8). Det var heller ingen forskjell i uttrykket av *crf1a* mellom K og S. Bortsett fra en liten, men signifikant, forskjell mellom K og S ved T3, er det også små og ikke konsistente forskjeller i genuttrykk for *crf1b*. Disse resultatene sammenfaller godt med tidligere studier med atlantisk laks der det heller ikke ble funnet noen uttalte endringer uttrykk av *crf* gjennom smoltifiseringsprosessen (McCormick et al., 2019), selv det ikke blir oppgitt hvilken av *crf* paralogene som analyseres. Det ser derfor ikke ut til at *crf1a* eller *crf1b* har noen sentral rolle i aktivering av HPI-aksen i forbindelse med smoltifisering. Det er imidlertid viktig å understreke at regulering av *pomc* uttrykk ikke nødvendigvis vil reflekteres gjennom endret uttrykk av *crf* direkte, men for eksempel heller via endring mengden av CRF-reseptorer i hypofysen (Pohl et al., 2001). Ved T3 var i midlertidig det gjennomsnittlige genuttrykket for *crf1b* signifikant høyere hos KMM, sammenlignet med KMU og S ved samme uttak. En slik oppregulering hos modnende individer støttes av tidligere funn som viser at kjønnssteroider spiller en rolle i etablering, aktivering og regulering av HPI-aksen hos pattedyr (Oyola & Handa, 2017).

Selv om *crf1* endret seg lite, viste både *pomc- α 1* og *pomc- β* en klar og signifikant økning i genuttrykk gjennom smoltifiseringen, der uttrykket mer enn doblet seg fra T1 til T3 (Figur 9).

En oppregulering av *pomc-a1* og *pomc-b* viser klart at HPI-aksen ble aktivert både hos S og K fisk, noe som samsvarer med tidligere observasjoner hos atlantisk laks (McCormick et al., 2019).

Ved T3 ble plasma kortisol målt som en del av et annet forsøk. Ustresset S og K fisk hadde ved dette uttaket et plasma kortisol nivå på henholdsvis. $50,26 \pm 41,26$ ng/ml og $43,15 \pm 42,78$ ng/ml, noe som ikke var forskjellig mellom behandlingene. Et slikt kortisolnivå er vanlig observert ved slutten av smoltifiseringsperioden (McCormick et al., 2007) og viser samtidig at HPI aksen aktiveres normalt hos S fisk også i form av kortisolfrigjøring. Dette er forøvrig i god overensstemmelse med den observerte oppreguleringen av *pomc-a1* og *pomc-b*, og en stimulerende effekt av disse faktorene på sirkulerende kortisol (McCormick et al., 2019; se også Figur 3)

4.4 ATPase aktivitet

Smoltifisering hos laks er assosiert med en preadaptiv oppregulering av gjelle NKA-aktivitet, for å oppleve minimalt med ioneforstyrrelser etter overgang til SV (Hoar, 1988). En rekke studier har vist at NKA-aktivitet i gjellene er godt egnet til å bestemme smoltstatus, da enzymaktiviteten stiger opp til mellom 10-20 $\mu\text{mol ADP/mg protein/time}$ gjennom smoltifisering (Stefansson et al., 2007; Handeland et al., 2003; McCormick et al., 2007; McCormick, 2013). Ved første uttakstidspunkt skiller det ikke stort mellom S og K, der gjennomsnittlig enzymaktivitet lå mellom 4-5 $\mu\text{mol ADP/mg protein/time}$ for begge behandlingsgruppene. Begge gruppene har som forventet en økning i enzymaktiviteten ved T3, der K har en økende trend med en NKA-aktivitet på 5,28, er denne økning signifikant for S, med en NKA-aktivitet 6,78. Na^+/K^+ -ATPase-aktiviteten for S er signifikant høyere enn K, men disse forskjellene er små, og begge gruppene har lavere NKA-aktivitet enn tidligere rapporteringer hos smolt før utsett til SV (Christensen et al., 2018; McCormick et al., 2007; McCormick, 2013; Stefansson et al., 2007). Selv om S har signifikant høyere NKA er den absolutte forskjellen ikke særlig stor og begge gruppene ser ut til å ha et nivå som støtter normal osmoregulering, der det også rapportert om lignende lav enzymaktivitet på Tasmansk stamme av atlantisk laks (van Rijn, et al., 2020). Selv om det er sannsynlig at populasjonsbaserte forskjeller i gjelle Na^+/K^+ -ATPase-aktivitet eksisterer må direkte sammenligninger mellom studier på enzymaktivitet gjennomføres med forsiktighet, pga. potensiell teknisk variasjon

mellom forskjellige laboratorier (van Rijn, et al., 2020). Den signifikante forskjellen i Na^+/K^+ -ATPase-aktivitet mellom S og K ved T3 (Figur 10), viser en tilsvarende trend som observert for uttrykkene av *nka-1b*, *cftr1* og *nkcc* ved samme uttak.

4.5 Plasma klorid og osmolalitet

Gjennomsnittlig kloridnivå i plasma for S viser ingen forskjell fra K, der begge gruppene ligger mellom 130 og 135 mM ved alle tre uttakstidspunktene. Etter sjøvannstest ligger begge gruppene tett opp mot 145 mM ved T1 og T2, ved T3 holder S samme nivå som tidligere, mens K på er på 135 mM. Bortsett fra K ved T3, ligger kloridnivåene til både FV og SVT innenfor forventede verdier (Heggbergget et al., 1992), og mye kan tyde på en begynnende hypoosmoregulatisk evne allerede ved T1. Gjennomsnittlig plasma osmolaritet på FV er rundt 320 mOsm l^{-1} sett bort små ulikheter ved T1, med minimale forskjeller mellom S og K. Den sterile gruppen skiller seg heller ikke bemerkelsesverdig fra kontrollgruppen etter SVT, og begge gruppene har en reduksjon i osmolaritet utover i smoltifiseringen. Ved starten av forsøket ligger behandlingsgruppene på henholdsvis 340 og 330 mOsm l^{-1} , mens begge gruppene er rundt 310 mOsm l^{-1} det ved T3. Både S og K har en osmolaritet innenfor hva man kunne forvente på SV (Heggberget et al., 1992), noe som underbygger tegnene på hypoosmotisk evne fra målt kloridnivå ved T1. Det ble observert kjønnsmodning blant KM fra SVT ved T3, men disse ble ikke registrert. Med tanke på at kjønnssteroider kan ha negativ effekt på blant annet sjøvannstoleranse hos masu laks (Ikuta et al., 1987), vil man kunne forvente en høyere verdi blant K. Dette motstrider resultatene som viser lavere klorid- og osmolaritetsnivå for både K og S etter SVT ved T3.

5 Konklusjon

Resultatene fra undersøkelsen viser at det er små og i praksis ingen forskjeller i utvikling av smoltegenskaper og sjøvannstoleranse mellom S og K, og at man ikke får noen prestasjonshemmende effekt på smoltifiseringen ved å fjerne kjønnsceller hos atlantisk laks. Genuttrykkene for ionetransportørene NKA, NKCC og CFTR i gjellene viste en overordnet trend som samsvarer med tidligere studier (Nilsen et al., 2007; McCormick et al., 2013; Christensen et al., 2008), noe man også kunne se på målingene av NKA-aktivitet i gjellene (Christensen et al., 2018; McCormick et al., 2007; McCormick, 2013; Stefansson et al., 2007). Den hypoosmoregulatoriske kapasiteten bekreftes ved analysering av plasma etter SVT, der klorid og osmolaritet for både S og K var innenfor normale verdier (Heggberget et al., 1992). Selv om det ikke var noen uttalte endringer i uttrykk av verken *crfla* eller *crflb*, viser oppregulering av *pomc-a1* og *pomc-b* at HPI-aksen hos S ble aktivert gjennom smoltifiseringen, parallelt med K. Denne trenden er lik det man tidligere har observert gjennom smoltifisering (McCormick et al., 2019), og bekreftes av de forhøyede verdiene av sirkulerende kortisol målt ved T3.

Referanser

- Aksnes, A., Gjerde, B., & Roald, S. (1986). Biological, chemical and organoleptic changes during maturation of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 53, ss. 7-20.
- Anders , F. (2018, oktober 16). Slik er trendene i RAS-markedet. Hentet fra <https://fiskeribladet.no/teknisk/nyheter/?artikkel=62642> (accessed 30.04.20)
- Blackburn, J., & Clarke, W. C. (1987). Revised procedure for the 24 hour seawater challenge test to measure seawater adaptability of juvenile salmonids. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, s. 35.
- Bonga, S. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77, ss. 591-625.
- Botwright, N., Evans, B., Lubienieck, K., Davidson, W., & Cook, M. (2015, Mars 2). Sex determination in Tasmanian Atlantic salmon. Hentet fra <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/sex-determination-tasmanian-atlantic-salmon/> (accessed 30.04.20)
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, ss. 248-254.
- Christensen, A. K., Regish, A. M., & McCormick, S. D. (2018, Mars). Shifts in the relationship between mRNA and protein abundance of gill ion-transporters during smolt development and seawater acclimation in Atlantic salmon (*salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 221, ss. 63-73.
- CibaCorning. (1980). *925 Chloride Analyzer Instruction Manual*. Essex, England: Ciba Corning.
- Einum, S., & Fleming, I. A. (1997). Genetic divergence and interactions in the wild among native, farmed and hybrid Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, 50, 634-651.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological Reviews*, 85, ss. 97-177.
- Ferguson, A., Fleming, I. A., Hindar, K., Skaala, Ø., McGinnity, P., Gross, T. F., & Prodöhl, P. (2007). Farm escapes. I E. Verspoor, *The Atlantic salmon. Genetick, conservation and management* (ss. 357-398). Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- 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, ss. 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, s. N/a.
- Fleming, I. A., Hindar, K., Mjølnerød, I. B., Jonsson, B., Balstad, T., & Lamberg, A. (2000). Lifetime success and interactions of farm salmon invading a native population. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 267, ss. 1517-1523.
- Forseth, T., Barlaup, B. T., Finstad, B., Fiske, P., Gjøsæter, H., Falkegård, M., . . . Wennevik, V. (2017). The major threats to Atlantic salmon in Norway. *ICE Journal of Marine Science*, ss. 1496-1513.

- Fraser, T. W., Fjelldal, P. G., Schulz, R. W., & Norberg, B. (2019). Termination of puberty in out-of-season male Atlantic salmon smolts. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 232, ss. 60-66.
- Fraser, T. W., Fjelldal, P., Hansen, T., & Mayer, I. (2012). Welfare considerations of triploid fish. *Reviews in Fisheries Sciences*, ss. 192-211.
- Gjedrem, T. (2000). Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquaculture Research*, 31, ss. 25-33.
- Glover, K. A., Otterå, H., Olsen, R. E., Slinde, E., Taranger, G. L., & Skaala, Ø. (2009). A comparison of farmed, wild and hybrid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared under farming conditions. *Aquaculture*, 286, ss. 203-210.
- Gross-Thebing, T., Yigit, S., Pfeiffer, J., Reichman-Fried, M., Bandemer, J., Ruckert, C., . . . Raz, E. (2017). The Vertebrate Protein Dead End Maintains Primordial Germ Cell Fate by Inhibiting Somatic Differentiation. *Developmental Cell*, 43, ss. 651-78.
- Handeland, S., Arnesen, A., & Stefansson, S. (2003). Seawater adaptation and growth of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) of wild and farmed strains. *Aquaculture*, 220, ss. 367-384.
- Hansen, T. J., Olsen, R. E., Stien, L., Oppedal, F., Torgersen, T., Breck, O., . . . Fjelldal, P. G. (2015). Effect of water oxygen level on performance of diploid and triploid Atlantic salmon post-smolts reared at high temperature. *Aquaculture* 435, ss. 354-360.
- Heggberget, T. G., Staurnes, M., Strand, R., & Husby, J. (1992). *Smoltifisering hos laksefisk*. Trondheim: NINA.
- Hoar, W. S. (1988). The physiology of smolting salmonids. *Fish Physiology*, vol XIB, ss. 275-343.
- Hunt, S. M., Simpson, T. H., & Wright, R. S. (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, ss. 105-119.
- Ikuta, K., Aida, K., Okumoto, N., & Hanyu, I. (1987). Effects of Sex Steroids on the Smoltification of Maw Salmon, *Oncorhynchus masou*. *General and Comparative Endocrinology*, 65, ss. 99-110.
- Imsland, A. K., Handeland, S. O., & Stefansson, S. O. (2014). Photoperiod and temperature effects on growth. *Aquacult Int*, 22, ss. 1331-1345.
- Larsen, D., Shimizu, M., Cooper, K., Swanson, P., & Dickhoff, W. (2004). Androgen effects on plasma GH, IGF-I, and 41-kDa IGFBP in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and Comparative Endocrinology*, 139, ss. 29-37.
- LifeTechnologies. (2012). Real-time PCR Handbook. Hentet fra: <https://www.genequantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf> (accessed 08.04.20)
- Mancera, J. M., & McCormick, S. D. (1999). Influence of cortisol, growth hormone, insulin-like growth factor I and 3,3',5-triiodo-L-thyronine on hypoosmoregulatory ability in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 21, ss. 25-33.
- McCartney, T. (1976). Sodium-potassium dependent adenosine triphosphatase activity in gills and kidneys of atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiolog*, 53A, ss. 351-353.
- McCormick, S. D. (1993). Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺-ATPase activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 50, ss. 656-658.

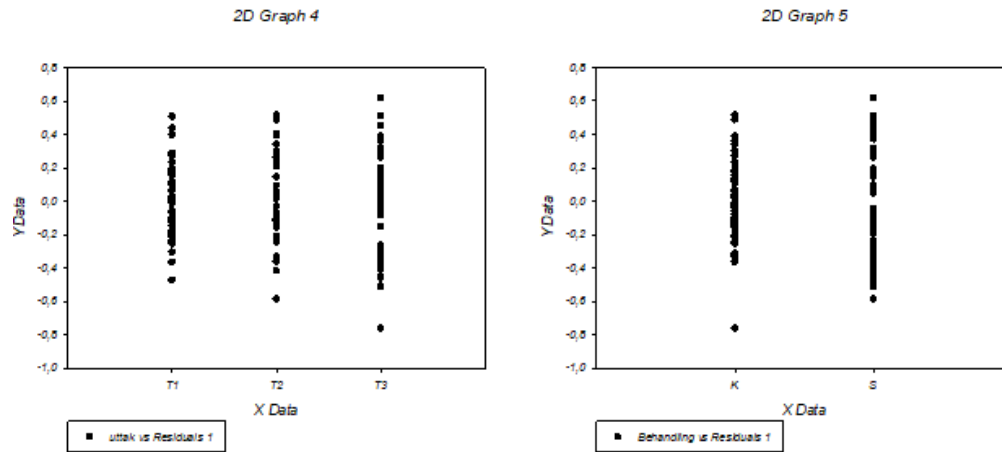
- McCormick, S. D. (2001). Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish. *American Zoologist*, 41, ss. 781-794.
- McCormick, S. D. (2013). Smolt Physiology and Endocrinology. I A. P. In Farrell, *Euryhaline Fishes* (ss. 199-251). Amsterdam: Academic Press.
- McCormick, S. D., Regish, A. M., Christensen, A. K., & Björnson, B. T. (2013). Differential regulation of sodium-potassium isoforms during smolt development and seawater exposure of Atlantic salmon. *The Journal of Experimental Biology*, 216, ss. 1142-1151.
- McCormick, S. D., Regish, A., Ardrey, W., Björnsson, B. T., & Bernier, N. J. (2019). The evolutionary consequences for seawater performance and its hormonal control when anadromous Atlantic salmon become landlocked. *Scientific Reports*, 9, s. 968.
- McCormick, S. D., Shrimpton, J. M., Moriyama, S., & Björnsson, B. T. (2007). Differential hormonal responses of Atlantic salmon parr and smolt to increased daylength: a possible developmental basis for smolting. *Aquaculture*, 273, ss. 337-344.
- McGinty, P., Jennings, E., deEyto, E., Allott, N., Samuelsson, P., Rogan, G., . . . Cross, T. (2003). Impact of naturally spawning captive-bred Atlantic salmon on wild populations: depressed recruitment and increased risk of climate-mediated extinction. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 1673, ss. 3601-3610.
- Melo, M. C., Andersson, E., Fjellidal, P. G., Bogerd, J., Franca, L., Taranger, G. L., & Schulz, R. W. (2014). Salinity and photoperiod modulate pubertal development in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Endocrinology*, 229, ss. 319-332.
- Nilsen, T. O., Ebbesson, L., Madsen, S. S., McCormick, S. D., Andersson, E., Björnsson, B. T., . . . Stefansson, S. O. (2007). Differential expression of Gill Na⁺,K⁺-ATPase α - and β -subunits, Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter and CFTR anion channel in juvenile anadromous and landlocked Atlantic salmon *Salmo salar*. *The Journal of Experimental Biology*, 210, ss. 2885-2896.
- Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H., & Turnbull, J. F. (2018). *Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: Tools for assessing fish welfare*. Nofoma, Havforskningsinstituttet, veterinærinstituttet, NORO universitet og University of Stirling.
- Norris, A. T., Bradley, D. G., & Cunningham, E. P. (1999). Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon *Salmo salar* populations. *Aquaculture* 180, ss. 247-264.
- Nærings- og fiskeridepartementet. (2015). Bærekraftig og forutsigbar vekst for laks. Hentet fra <https://www.regjeringen.no/no/aktuelt/barekraftig-og-forutsigbar-vekst-for-laks/id2401801/> (accessed 30.04.20)
- O'Flynn, F. M., McGeachy, S. A., Friars, G. W., Benfey, T. J., & Bailey, J. K. (1997). Comparisons of cultured triploid and diploid Atlantic salmon. *ICES Journal of Marine Science*, 54, ss. 1160-1165.
- Oyola, M. G., & Handa, R. J. (2017). Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress, The International Journal on the Biology of Stress*, 20, ss. 476-494.
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, s. E145.

- Pohl, S., Darlison, M. G., Clarke, W. C., Lederis, K., & Richter, D. (2001). Cloning and functional pharmacology of two corticotropin-releasing factor receptors from a teleost fish. *European Journal of Pharmacology*, 430, ss. 193-202.
- Pottinger, T. G., Carrick, T., Hughes, S. E., & Balm, P. H. (1996). Testosterone, 11-Ketotestosterone, and Estradiol-17 β Modify Baseline and Stress-Induced Interrenal and Corticotropic Activity in Trout. *General and Comparative Endocrinology*, 104, ss. 284-295.
- Quinton, C. D., McMillan, I., & Glebe, B. D. (2005). Development of an Atlantic salmon (*Salmo salar*) genetic improvement program: Genetic parameters of harvest body weight and carcass quality traits estimated with animal models. *Aquaculture*, 211-217.
- Raz, E. (2003). Primordial germ-cell development: The zebrafish perspective. *Nature Reviews of Genetics*, 4, ss. 690-700.
- SalmoBreed. (2018). Er det behov for genetiske tilpasninger for landbasert oppdrett og RAS-systemer? Hentet fra <https://www.kyst.no/advertisement/er-det-behov-for-genetiske-tilpasninger-for-landbasert-oppdrett-og-ras-systemer/> (accessed 30.04.20)
- Sambraus, F., Olsen, R. E., Remen, M., Hansen, T. J., Torgersen, T., & Fjellidal, P. G. (2017). Water temperature and oxygen: The effect of triploidy on performance and metabolism in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*L.) post-smolts. *Aquaculture*, 473, ss. 1-12.
- Seidelin, M., Madsen, S. S., Byrialsen, A., & Kristiansen, K. (1999). Effects of insulin like growth factor-I and cortisol on NA⁺, K⁺-ATPase expression in osmoregulatory tissues of brown trout (*salmo trutta*). *General and Comparative Endocrinology*, 113, ss. 331-342.
- Sfakiotakis, M., Lane, D., & Davies, J. (1999). Review of fish swimming modes for aquatic locomotion. *IEEE Journal of Oceanic Engineering*, 24, ss. 237-253.
- Slanchev, K., Stebler, J., De La Cueva-Méndez, G., Raz, E., & Hopkins, N. (2005). Development without germ cells: The role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(11), ss. 4074-4079.
- Solberg, M. F., Skaala, Ø., Nilsen, F., & Glover, K. A. (2013). Does Domestication Cause Changes in Growth Reaction Norms? A Study of Farmed, Wild and Hybrid Atlantic. Hentet fra PLOS One, 8: e54469 : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054469>
- SSB. (2019). Akvakultur. Hentet fra: <https://www.ssb.no/fiskeoppdrett> (accessed 30.04.20)
- Stefansson, S. O., Bæverfjord, G., Handeland, S. O., Hansen, T., Nygård, S., Rosseland, B. O., . . . Toften, H. (2005). *Fiskevelferdsmessig vurdering av produksjon av 0-års smolt*. Oslo: Vitenskapskomiteen for matvaretrygghet.
- Stefansson, S. O., Ebbesson, T. O., Wargelius, A., Madsen, S. S., Björnsson, B. T., & McCormick, S. D. (2007). Molecular mechanisms of continuous light inhibition of Atlantic salmon parr-smolt transformation. *Aquaculture*, 273, ss. 235-245.
- Stien, L. H., Marc, B. M., Folkedal, O., Nilsson, J., Oppedal, F., Torgersen, T., . . . Kristiansen, T. S. (2013). Salmon Welfare Index Model (SWIM 1.0): a semantic model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon: review of the selected welfare indicators and model presentation. *Reviews in Aquaculture*, 5, ss. 33-57.
- Taranger, G. L., Carrillo, M., Schulz, R. W., Fontaine, P., Zaury, S., Felip, A., . . . Hansen, T. (2010). Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165, ss. 483-515.
- Therien, A. G., & Blosten, R. (2000). Mechanisms of sodium pump regulation. *Journal Of Physiology-Cell Physiology*, 279, ss. C541-C566.

- Tveiten, H., Johnsen, H. K., & Jobling, M. (1996). Influence of maturity status on the annual cycles of feeding and growth in Arctic charr reared at constant temperature. *Journal of Fish Biology*, *48*, ss. 910-924.
- Tveiten, H., Mayer, I., Johnsen, H. K., & Jobling, M. (1998). Sex steroids, growth and condition of Arctic charr broodstock during an annual cycle. *Journal of Fish Biology*, *53*, ss. 714–727.
- van Rijn, C. A., Jones, P. L., Evans, B. S., Huynh, C., McCormick, S. D., & Afonso, L. O. (2020). Characterization of smoltification in the Tasmanian strain of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in recirculation and flow-through systems. *Aquaculture*, *512*, ss. 1-10.
- 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)*, ss. 1429-1434.
- Whitlock, M. C., & Schluter, D. (2015). Assumptions and alternatives. I M. C. Whitlock, & D. Schluter (Red.), *The Analysis of Biological Data* (ss. 470-471). New York: Macmillan education.
- Wong, T.-T., & Zoar, Y. (2015). Production of reproductively sterile fish by a non-transgenic gene silencing technology. *Scientific Reports*, *5*, s. 15822.
- Zaugg, W., & Wagner, H. (1973). Gill atpase activity related to parr-smolt transformation and migration in steelhead trout (*Salmo gairdneri*): Influence of photoperiod and temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *45B*, ss. 955-965.

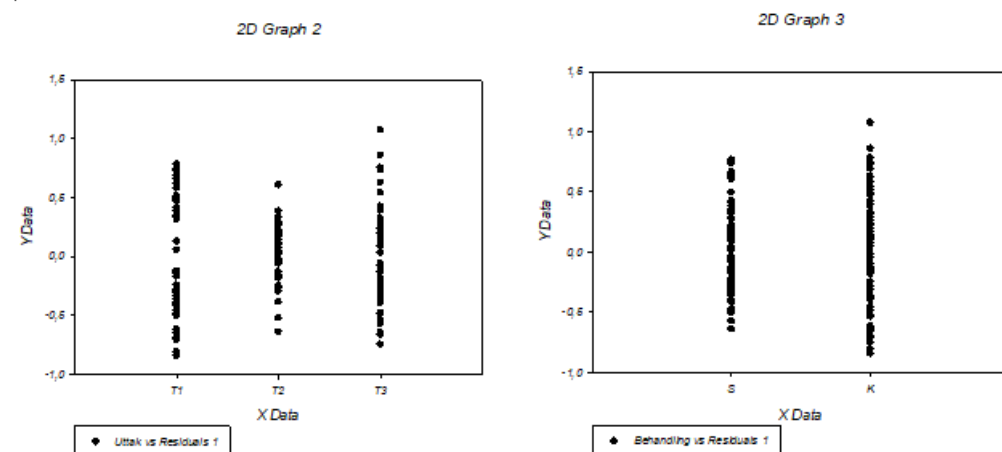
Appendiks I. Statistikk

I.1 Residualer POMCA1



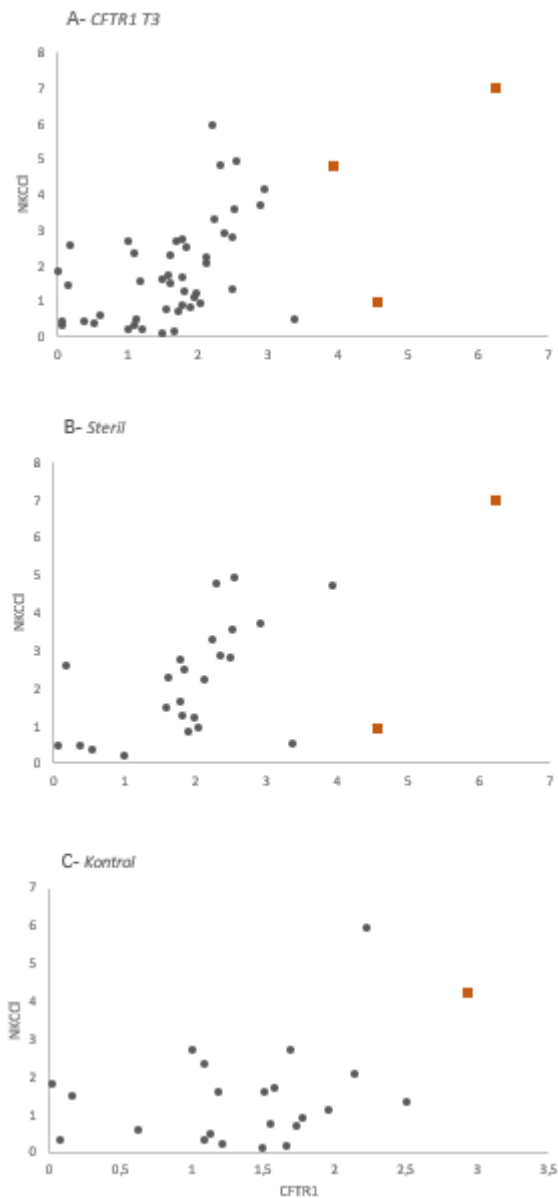
Figur 13: Visuel framstilling av residualplott for *pomc-a1* ved tid og behandling. Selv om variasjonstesten feilet ble det med tanke på at ANOVA er robust ovenfor variasjon

I.2 Residualer CRF1a



Figur 14: Visuel framstilling av residualplott for *crf1a* ved tid og behandling. Selv om variasjonstesten feilet ble det med tanke på at ANOVA er robust ovenfor variasjon

I.2 Punktdiagram CFTR1



Figur 15: Punktdiagram over *cftr1* ved T3, der firkant er de fiskene som var nødvendig å fjerne for å få normalfordelt datasett. Disse fiskene skilte seg ikke ut som outliers, og med tanke på at ANOVA er robust mot nettopp dette, ble det kjørt treveis ANOVA på datasettet. A: alle individer ved T3t, B: steril og C: kontroll

Appendiks II. Na⁺/K⁺-ATPase løsninger og standardkurve

II.1 Løsninger laget i forkant av analyse

SEI-buffer

26,67 g sukrose (Cas nr. 57-50-1)

1,86 g Na₂EDTA/Titriplex III (Cas nr. 6381-92-6)

1,70 g Imidazol (Cas nr. 288-32-4)

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

Volumet justeres til 500 ml med dH₂O.

Ferdig løsning oppbevares i kjøleskap (4°C). Holdbar i 3 mnd.

0,5% SEID

0,1 g Natriumdeoksyholate (Cas nr. 302-95-4)

Løses i 20 ml SEI-buffer.

Ferdig løsning oppbevares i kjøleskap (4°C)

Imidazol buffer (IB-buffer)

3,404 g Imidazol (Cas nr. 288-32-4).

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

Volum justeres til 1 liter med dH₂O. Oppbevares i kjøleskap (4°C). Holdbar i 3 mnd.

Saltløsning

5,52 g NaCl (Cas nr. 7647-14-5)

1,07 g MgCl₂·6H₂O (Cas nr. 7791-18-6)

1,57 g KCl (Cas nr. 7447-40-7)

Løses i 500 ml Imidazol buffer.

Oppbevares i kjøleskap (4°C). Holdbar i 3 mnd.

PEP

0,491 g Phosphoenolpyruvate (Cas nr. 5541-93-5)

Løses i 100 ml Imidazol buffer.

Ferdig løsning fordeles i reagensrør à 5 eller 10 ml.

Oppbevares i biofryser (-80°C).

Ouabain

0,382 g Ouabain (Cas nr. 11018-89-6)

Løses i 50 ml Imidazole buffer i kokende vannbad med røring.

I avtrekkskap. Oppbevares mørkt, i kjøleskap (4°C).

Na Acetate buffer

0,767 g Na Acetate trihydrate (Cas nr. 6131-90-4).

Løses i 100 ml dH₂O.

pH justeres til 6,8.

ADP standard

0,0489 g ADP (Cas nr. 20398-34-9)

Løses i 25 ml Na-Acetate buffer.

Ferdig løsning fordeles i eppendorfrør à 300 µl. Oppbevares i biofryser (-80°C).

II.2 Løsninger laget i forbindelse med analyse

AM- medium (Assay Mixture)

Startvolum IB	40 ml
Pyruvat kinase (PK)	48 µl (350 IU)
Lactic dehydrogenase (LDH)	62 µl (388 IU)
NADH 5 mg, 10 mg Phosphoenolpyruvat (PEP)	10 ml
Adenosine 5'-triphosphate (ATP)	0,0290 g
Sluttvolum justert med IB	70 ml

Sett et begerglass på is og tilsett startvolumet med IB.

Pipetter PK og LDH over i et eppendorfrør og sentrifuger ved 12000 rpm i 8 min. Fjern supernatanten og resuspender pelleten i litt IB. Overfør alt til begerglasset og vaske eppendorfrøret etter med IB for å få med eventuelle rester.

Løs NADH i litt IB og tilsett i begerglasset.

Tilsett tint PEP i begerglasset.

Vei ut ATP, løs dette i litt IB og tilsett begerglasset.

Overfør løsningen i begerglasset til en målesylinder og juster til sluttvolumet med IB.

Bruksløsninger (AM og AM-O)

Merk to 50 ml sentrifugerør med hhv AM og AM-O og kle aluminiumsfolie rundt røret merket med AM-O (ouabain er svært lysfølsom).

Bland løsningene etter forholdene vist under. Dette er bruksløsning til 2 mikroplater, så beregn mengde etter behov.

	<u>AM</u>	<u>AM-O</u>
AM-medium	17,5 ml	17,5 ml
Ouabain	-	1,25 ml
IB	1,25 ml	-

Oppbevar løsningene på is.

II.3 ADP standardkurve

Merk 4 stk 0,5 ml eppendorfrør (0, 5, 10 og 20).

Pipetter ut IB og ADP standard som vist under.

<u>Epp.rør (nmole/10μl)</u>	<u>IB (μl)</u>	<u>ADP std (μl)</u>
0	200	0
5	175	25
10	150	50
20	100	100

Oppbevar løsningene på is.

II.4 Standardkurve proteinanalyse

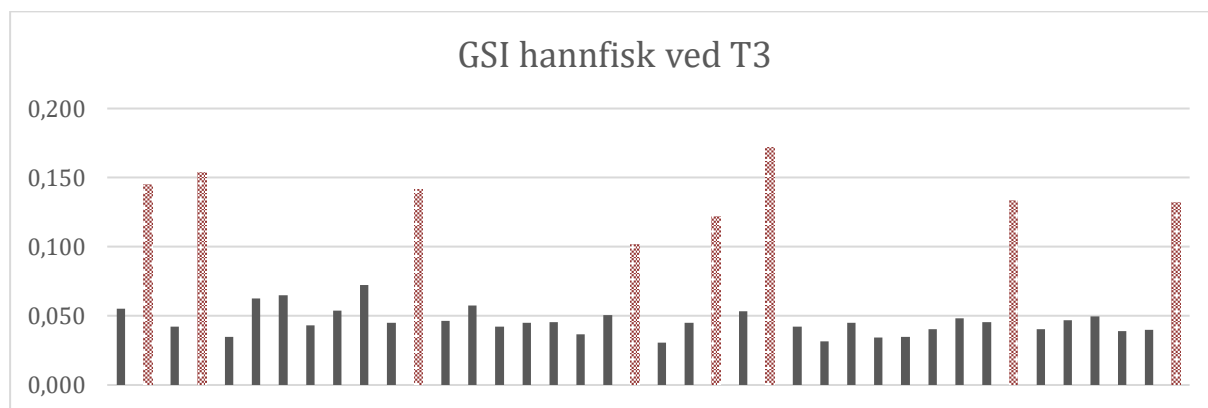
Merk 4 stk eppendorfrør (0, 5, 10 og 20).

Pipetter ut IB og ADP standard som vist under.

<u>Std (μg/10μl)</u>	<u>2mg/ml BSA std (μl)</u>	<u>dH₂O (μl)</u>
Blank	0	100
5	25	75
10	50	50
20	100	0

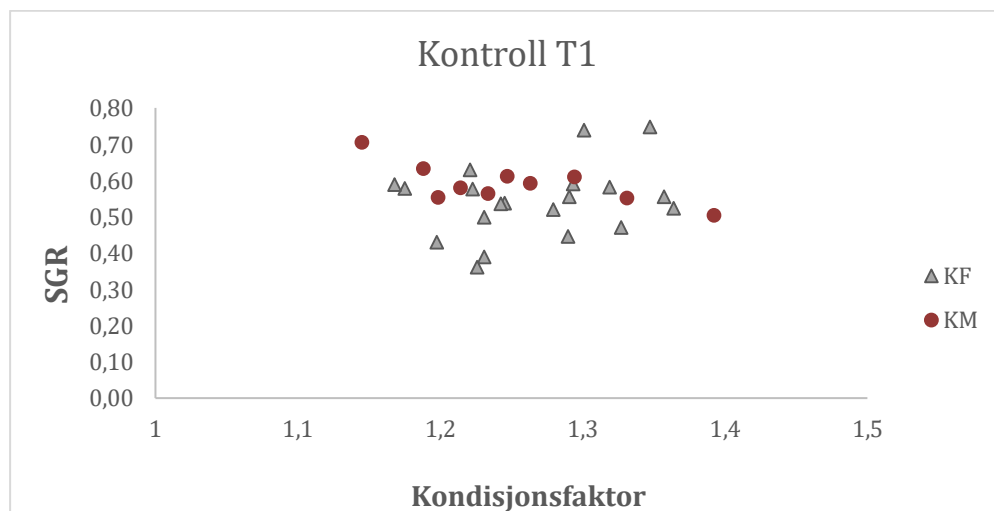
Oppbevar løsningene på is.

Appendiks III. GSI over hannfisk ved T3



Figur 16: Gonadosomatisk indeks (GSI) over hannfiskene ved T3. De lyse søylene vise fiskene med GSI >0,1, og de som viste begynnende kjønnsmodning, og går under benevnelsen kontroll moden hann (KMM)

Appendiks IV. Kondisjonsfaktor ved T1



Figur 17: Oversikt over kondisjonsfaktor for kontrollgruppen ved T1. Runding viser kontroll hann og trekant viser kontroll hunn.

