



UiT Norges arktiske universitet

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi – Norges fiskerihøgskole

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

Effekter av medier og lagringstid på indikatorer for eggkvalitet

Camilla Valan Moen

Masteroppgave i akvamedisin (60 stp.) ... juni 2020

Forord

Denne masteroppgaven ble gjort i samarbeid med SalMar Farming AS og SalMar Genetics AS. Arbeidet med denne oppgaven ble utført på Reistad hos SalMar Genetics AS, og ved Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, ved Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø.

Først og fremst ønsker jeg å gi en stor takk til min hovedveileder Helge Tveiten som introduserte dette spennende prosjektet. Din kunnskap, veiledning, tålmodighet og gode humør har man ikke kunne vært foruten. Også vil jeg takke til min bi-veileder Helge K. Johnsen for godt bidrag under skriveprosessen. Takk til Dhivya Borra Thiyagarajan for stor hjelp på laboratoriet med kalsium-assayet da skolen ble stengt for oss studenter pga. corona-krisen.

En stor takk til SalMar Farming AS for finansiering til å kunne utføre dette prosjektet, og takk til SalMar Genetics AS og alle ansatte der for et hyggelig og kunnskapsrikt opphold på Reistad.

Takk til gjengen for det beste oppholdet, og den beste studietida her i Tromsø. Kunne ikke vært foruten all latteren, de hyggelige stundene, etc. Lista er lang. Dere er gull verdt.

Til slutt vil jeg takke min kjære familie og mine nærmeste venner som alltid har stilt opp. En ekstra takk til mamma for at jeg har fått nyt studietida maks. En ekstra takk til pappa som har introdusert meg for interessen av dyr og biologi, og som har påvirket meg til å velge denne yrkesretningen.

Tromsø, juni 2020

Camilla Valan Moen

Sammendrag

Eggkvalitet er definert som evnen et egg har til å bli befruktet og utvikles til et normalt embryo. Dårlig eggkvalitet kan føre til problemer med aktivering/befruktning eller senere stoppe embryonalutviklingen. Eggkvalitet baseres i hovedsak på egenskaper fra moren (maternale faktorer), men ytre faktorer kan påvirke eggkvaliteten.

I kommersiell stamfiskproduksjon av Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) blir ovarievæsken vasket bort før befruktning pga. at den kan smittsomme agens som kan bli med en spermie inn i egget under befruktning.

I dette forsøket ble ubefruktede egg fra Atlantisk laks lagret i ulike medier; ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca²⁺. Oppgavens formål var å se hvordan sammensetning av ioner i medier påvirket embryonalutviklingen (eggkvalitet) etter lagring av ubefruktede egg. Ubefruktede egg ble lagret i de overnevnte mediene i 0, 24, 48 og 96 timer før de ble befruktet. For å se effekten av selve vaskeprosessen ble egg ved 0 timer lagring vasket i de ulike ioneløsningene. Indikatorer på eggkvalitet som ble undersøkt var svellegrad, befruktningsrate, celledeling, og overlevelse ved gastrulasjon og øyerognstadiet. Endring som følge av lagringstid i osmolalitet, pH og kalsiumkonsentrasjon ble også studert i de ulike lagringsmediene.

Ubefruktede egg lagret i ovarievæske hadde høy overlevelse ved øyerognstadiet ved lagringstidene 0-48 timer (78-87%), og noe litt lavere ved 96 timer (64%). Denne høye overlevelsen var som forventet. Lagring av egg i ovarievæske hadde ingen negative påvirkninger på eggkvalitet. Ubefruktede egg vasket i NaCl og Cortland-løsning uten Ca²⁺ hadde lavere overlevelse ved øyerognstadiet (63%) sammenlignet med egg vasket i Cortland-løsning (82%). Ubefruktede egg lagret Cortland-løsning fram til 48 timer hadde høy (68-86%) overlevelse ved øyerognstadiet, og ingen negative påvirkninger på embryonalutvikling. Etter 96 timer lagring av egg i Cortland-løsning var overlevelsen ved øyerognstadiet betydelig lavere. Lagring av ubefruktede egg i NaCl i 24 timer ga nesten ingen overlevende egg ved øyerognstadiet. Lav pH og osmolalitet, og mangelen på ioner har hatt tydelig effekt på befruktningsevnen og embryonalutviklingen for egg lagret i NaCl i 24, 48 og 96 timer. Egg lagret i Cortland-løsning uten Ca²⁺ hadde en jevn nedgang i overlevelse ved øyerognstadiet utover lagringstidene. Fraværet av kalsium hadde påvirkning på embryonalutviklingen for egg lagret i 24, 48 og 96 timer i Cortland-løsning uten Ca²⁺.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Atlantisk laks.....	1
1.1.1	Ovarievæske.....	1
1.1.2	Eggets sammensetning.....	1
1.1.3	Aktivering/befruktning.....	2
1.1.4	Celledeling.....	4
1.1.5	Gastrulasjon.....	5
1.1.6	Organogenese.....	6
1.2	Eggkvalitet.....	7
1.3	Formålet med oppgaven.....	8
2	Materiale og metoder.....	9
2.1	Forsøksfisk.....	9
2.2	Forsøksoppsett.....	11
2.2.1	Lagring av ubefruktede egg.....	11
2.2.2	Befruktning.....	11
2.2.3	Inkubering.....	12
2.3	Evalueringer.....	13
2.3.1	Svellegrad.....	13
2.3.2	Befruktningsrate.....	13
2.3.3	Gastrulasjon.....	13
2.3.4	Øyerogn.....	13
2.3.5	Osmolalitet.....	14
2.3.6	Kalsium Assay Kit.....	14
2.4	Databehandling.....	15
2.4.1	Utregninger.....	15

2.4.2	Statistiske analyser og grafiske fremstillinger	16
3	Resultater.....	17
3.1	Effekter av medier på svellegrad.....	17
3.2	Effekter av medier på befruktningsrate	17
3.3	Effekter av medier på celledeling.....	19
3.4	Effekter av medier på gastrulasjon.....	20
3.5	Effekter av medier på øyerogn	22
3.6	Korrelasjoner mellom parametere for eggkvalitet	24
3.7	Effekter av konsentrasjon av kalsium i medier	24
3.8	Effekter av osmolalitet i medier	25
3.9	Effekter av pH i medier	26
3.10	Embryonalutvikling.....	26
4	Diskusjon.....	29
5	Konklusjon	34
	Referanseliste	35
	Vedlegg I.....	38
	Vedlegg II.....	39
	Vedlegg III	40
	Vedlegg VI.....	41

1 Innledning

1.1 Atlantisk laks

Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) tilhører laksefamilien *Salmonidae*, og er en anadrom fiskeart (Havforskningsinstituttet, 2019). Anadrom fisk klekker og vokser opp i ferskvann før de vandrer ut til havet for næringssøk (Vøllestad, 2019). Laksen lever i elver i ett til fem år før den gjennomgår fysiologiske, morfologiske og atferdsmessige forandringer kalt smoltifisering, som gjør den tilpasset sjøvann. Laksen lever i havet i ett til fire år før den vandrer tilbake til elver for gyting, ofte til den elva den kommer fra. Gyting i elver skjer i perioden fra oktober til januar (Havforskningsinstituttet, 2019). Atlantisk laks har demersale egg som vil si at de synker til bunnen av elva etter gyting (Kunz, 2004). Laksen dekker eggene til med grus og stein, hvor de blir liggende til de klekker om våren (Havforskningsinstituttet, 2019).

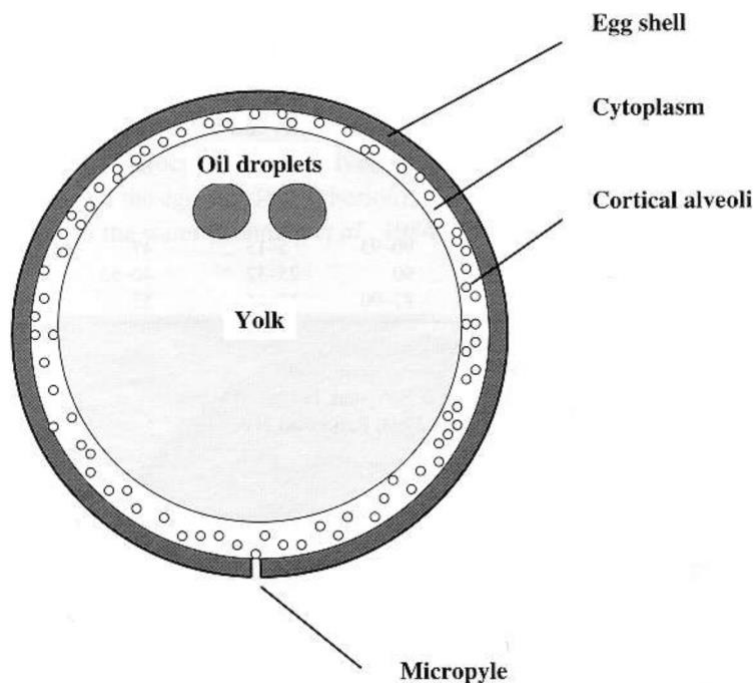
1.1.1 Ovarievæske

Når laksen sluttmodner og ovulerer frigjøres de modne eggene i bukhulen sammen med ovarievæske (Goetz & Coffman, 2000). Ovarievæsken utgjør 10-30% av den totale massen som frigjøres til bukhulen. Ovarievæsken har en ionesammensetning som består av blant annet natrium (Na^+), kalium (K^+), klorid (Cl^-), magnesium (Mg^{2+}) og kalsium (Ca^{2+}) (Zadmajid et al., 2019). Ovarievæskens pH ligger på rundt 8,5, og har en osmolalitet på 256-290 mOsmo kg^{-1} hos arter innenfor laksefamilien (Lahnsteiner et al. 1995). I kunstig miljø har ovarievæsken hos andre arter innenfor laksefamilien vist å ha en effekt på spermier under befruktning. Effektene har vært å forbedre spermiers prestasjon ved å f.eks. øke spermiers hastighet (Zadmajid et al., 2019). Ovarievæsken kan inneholde smittsomme agens, som f.eks. virus, som har høy affinitet til spermiers hode og kan bli med inn i egget under befruktning (Rimstad et al., 2011). Pga. at ovarievæsken kan inneholde smittsomme agens blir den i kommersiell stamfisk-produksjon vasket bort, i all hovedsak med fysiologisk saltvann (0,9% NaCl) (pers. kom. Helge Tveiten).

1.1.2 Eggets sammensetning

Modne, ubefruktede egg hos Atlantisk laks er runde med en oransje farge. Eggene er relativt store og har en diameter på 5-7 mm. En oocyte (eggcelle) består av plommemasse (yolk), cytoplasma og et ytre skall (Figur 1). Plommemassen inneholder vann (60-67%), proteiner (30%) og mange lipiddråper lokalisert ved den animale polen. Plommemassen inneholder alle

de nødvendige næringsstoffene et embryo og en plommesekk-ungel trenger under utviklingen. Plommemassen omslutes av cytoplasma som består en rekke granuler eller cortikale alveoler. Alveolene inneholder enzymer og makromolekyler som er nødvendig for at et egg skal bli aktivert/befruktet (Kjørsvik et al. 2004). Egget er omsluttet av en plasmamembran (Coward et al., 2002), som igjen er omsluttet av et ytre skall kalt chorion. Chorion beskytter embryoet fram til klekking. Ved den animale polen i chorion er det en liten åpning kalt mikropylen som er åpningen der en spermie kommer inn og befrukter egget (Kjørsvik et al., 2004). Mikropylen er formet som en trakt, og dens ytre del har større diameter enn dens indre del. Den indre delen av mikropylen er like bred som hode til en spermie (Kunz, 2004). En spermie består av tre deler: hode, mellomstykke og hale (Nesheim, 2019).



Figur 1 – Skjematisk tegning av et modent ubefruktet fiskeegg. Mikropylen er lokalisert ved den animale polen. Hos Atlantisk laks ligger lipiddråpene like under mikropylen (Kjørsvik et al., 2004).

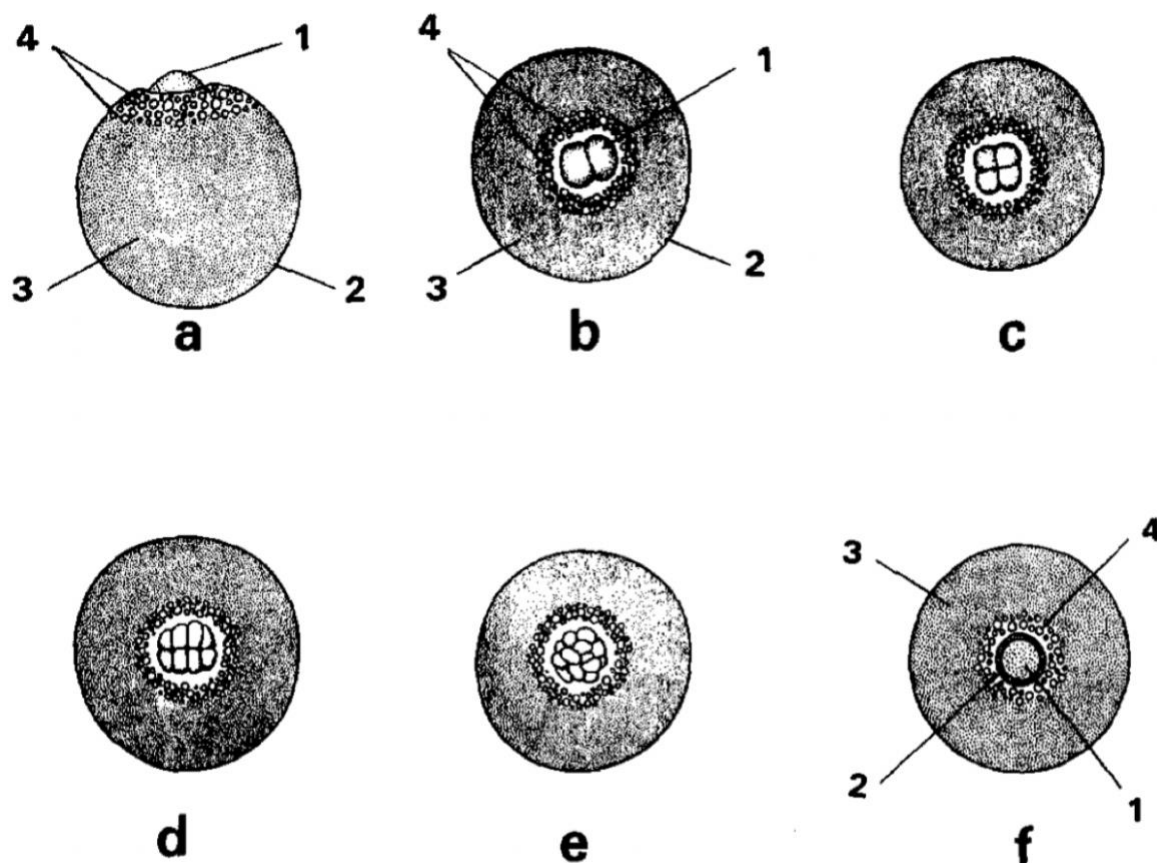
1.1.3 Aktivering/befruktning

I gonadene til kjønnsmoden hannfisk er spermier oppbevart i immobil-form. Spermiers bevegelse (aktivering) starter som respons på endring i osmolalitet, pH, eller konsentrasjon av natrium (Na^+), kalium (K^+) eller kalsium (Ca^{2+}). Disse endringene oppstår når hannfisken gyter, og spermier kommer i kontakt med vann (Kinsey et al., 2007). Når spermier har blitt aktivert svømmer de i ca. to minutter. Energien produseres av en rekke mitokondrier lokalisert i

mellomstykket (Pavlov et al., 2004). Etter to minutter er nesten all aktivitet hos spermene borte (Kunz, 2004).

For å kunne befrukte et egg må det oppstå tett kontakt mellom eggceller og sædceller (Kjørsvik et al., 2004). Kun én spermie har muligheten til å befrukte et egg (Kunz, 2004). En spermie kommer inn i egget gjennom mikropylen, og fester seg til eggets plasmamembran (Murata, 2003). Dette fører til en kortvarig økning av intracellulær kalsiumkonsentrasjon, som danner en bølge av kalsium over egget. Denne kalsiumbølgen starter ved den animale polen og forflytter seg nedover eggets overflate til den motsatte enden (vegetative polen). Denne økningen av intracellulært kalsium trigger andre reaksjoner som blant annet hindrer flere spermier å komme inn i egget (Kinsey et al., 2004). Spermien frigjør sitt genetiske materiale i egget som smelter sammen med det genetiske materialet fra oocytten (NMBU, 2017). Penetrering av én spermie inn i et egg, og kalsiumbølgen, setter også i gang en prosess kalt kortikal reaksjonen. (Murata, 2003). Under kortikal reaksjonen løftes chorion opp av cytoplasma, og danner det perivitelline rommet som et resultat av endring i chorions permabilitet og frigjøring av innholdet i alveolene. Endring i chorions permabilitet fører til en innstrømming av vann som får egget til å svulle (Kjørsvik et al. 2004) Under svellingen øker eggets vekt med ca. 20% (Kamler, 1992), og endringene i proteinstrukturen i chorion fører til en forsterkelse slik at chorion blir hard (Robles et al., 2007).

Cytoplasma begynner å oppkonsentreres ved den animale polen av egget, og danner eggets første celle kalt blastodisk (Figur 2a) (Kimmel et al., 1995). Under og rundt blastodisken er det lokalisert flere lipiddråper i varierende størrelse (Velsen, 1980).



Figur 2 – Skjematisk tegning av celledeling hos egg fra Atlantisk laks. **a:** Dannelse av blastodisk (1 = blastodisk, 2 = chorion, 3 = plommemasse, 4 = lipiddråper). **b:** Første celledeling; 2 celler (1 = celle/blastomer, 2-4 = samme som for a). **c:** Andre celledeling; 4 celler. **d:** Tredje celledeling; 8 celler. **e:** Fjerde celledeling; 16 celler. **f:** slutten på celledeling (1 = blastoderm, 2 = germ ring, 3 = plommemasse, 4 = lipiddråper). (Gorodilov, 1996; Kimmel et al., 1995).

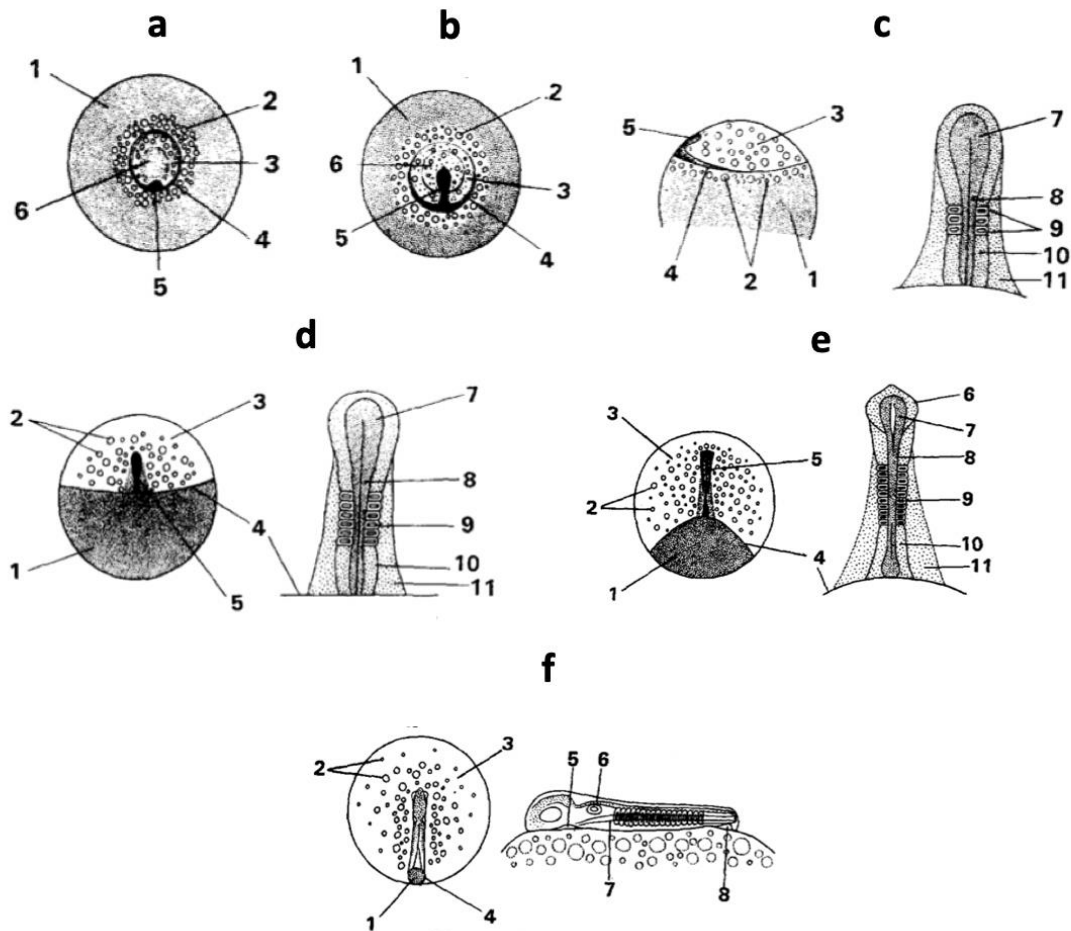
1.1.4 Celledeling

Hos fisk er det kun blastodisken som gjennomgår celledeling, og plommemassen forblir uberørt (Kunz, 2004). Celledeling der kun deler av egget spaltes kalles for meroblastisk celledeling, og når kun den oppkonsentrerte cytoplasma (blastodisken) blir embryo kalles celledelingen for diskodial – som er en undergruppe av meroblastisk celledeling (Gilbert, 2000). De første fem celledelingene skjer i det vertikale planet av blastodisken (Figur 2b-e). Første celledeling klyver blastodiken og danner to celler (Velsen, 1980). De delte cellene kalles for blastomer (Brøgger, 2018). Ved hver celledeling blir blastomerene mindre. Hvor raskt celledelingene skjer avhenger av temperaturen i vannet. Etter femte celledeling begynner cellene å dele seg i det horisontale planet, og antall celler blir dermed vanskelig å identifisere (Velsen, 1980) pga. av at noen celler er helt dekket av andre celler (Kimmel et al., 1995). Det øvre laget av celler (som dekker de andre cellene) kalles for envelope layer, og cellene under kalles for dype eller begravede celler

(NMBU, 2017). Etter utallige celledelinger er det dannet en flercellet topp kalt blastoderm (Kjørsvik et al., 2004). Eggets blastoderm (Figur 2f) består av mange dype celler og et tynt envelope layer (NMBU, 2017). Blastoderm flates ut og dekker større deler av plommemassen. En fortykkelse av celler langs kanten av blastoderm formes. Denne fortykkede kanten kalles for germ ring (Gorodilov, 1996; Kimmel et al., 1995).

1.1.5 Gastrulasjon

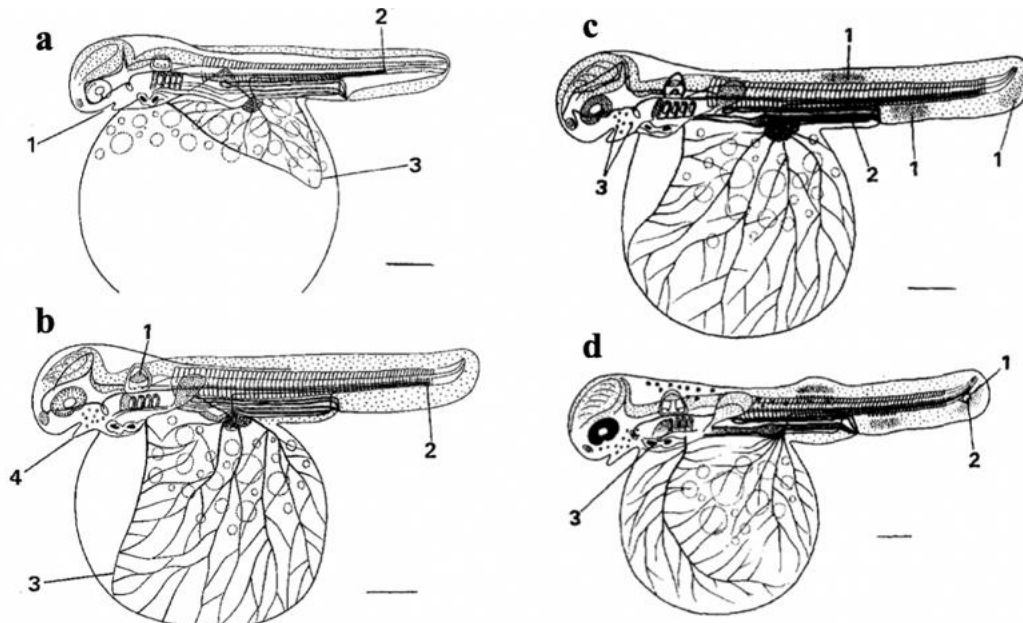
Etter celledeling starter gastrulasjon, som er fasen hvor embryoet formes (Velsen, 1980). Gastrulasjon varer til dannelsen av ryggstrengen er komplett (Gorodilov, 1996). Germ ring begynner å vokse nedover plommemassen (Velsen, 1980), og mot den vegetative polen (Kjørsvik et al., 2004). Denne prosessen kalles epiboly. Den overvokste plommemassen er det som blir plommesekken til plommesekk-ungel, og senere det vevet som omslutter bukhulen hos ungel (Velsen, 1980). Mens germ ring vokser nedover eggets plommemasse, begynner embryoet å formes ut fra germ ring (Figur 3a) Etter hvert som epiboly pågår vokser embryoets akse, og ryggstrengen dannes (Figur 3b). Når epiboly nærmer seg ferdig er det et område under halen som forblir åpent. Denne åpningen vil tilslutt «lukkes» og blir embryoets anus. Under gastrulasjon begynner celler å spesialisere seg for å danne vev som former embryoet (Velsen, 1980). Envelope layer blir ektoderm, og de dype cellene blir endoderm (Gilbert, 2000). Senere vil endoderm deles inn i to lag: mesoderm og endoderm, der mesoderm vil bli laget mellom endoderm og ektoderm (Kjørsvik et al., 2004). På hver side av ryggstrengen dannes det somitt-par (Figur 3c). Antall somitter øker utover gastrulasjon (Figur 3d og 3e) (Gorodilov, 1996). Somitter er mesodermale celleansamlinger (Hock, 2018), som utvikles til å bli blant annet skjelett og muskler (Hock, 2019). Endoderm blir vev og organer, og ektoderm blir blant annet epidermis (Nesheim, 2020). Når gastrulasjon er over, og et virkelig embryo er dannet, vil hodet være ved den animale polen og halen ved den vegetale polen (Figur 3f) (Velsen, 1980).



Figur 3 – Skjematisk tegning av gastrulasjon hos egg fra Atlantisk laks. **a:** Epiboly og dannelse av embryoet begynner (1 = plommemasse, 2 = lipiddråper, 3 = blastoderm, 4 = germ ring, 5 = embryo, 6 = avtrykk av blastodisken). **b:** 1/3 epiboly (1-6 = samme som for a). **c:** Samme stadige som b fra lateral vinkel (1-5 = samme som for a, 7 = endoderm; hjerne, 8 = ryggstreng, 9 = somitter, 10 = usegmentert mesoderm, 11 = ektoderm). **d:** Nesten halvveis i epiboly (1-5 = samme som for a, 7-11 = samme som for c). **e:** 3/4 epiboly (1-5 = samme som for a, 6 = vev som danner optisk vesikkel, 7-11 = samme som for c). **f:** Virkelig embryo (1-4 = samme som for a, 5 = perikardialt hulrom, 6 = otisk vesikkel, 7 = ryggstreng, 8 = Kupffers vesikkel). (Gorodilov, 1996; Kimmel et al., 1995).

1.1.6 Organogenese

Etter gastrulasjon er et virkelig embryo dannet (Figur 3f). Videre begynner utviklingen av vitale organer (Figur 4) som blant annet blodkarssystemet og hjerte, munn (over- og underkjeve), gjeller, hjerne og øyne (Gorodilov, 1996; Kimmel et al., 1995).



Figur 4 – Utvikling av virkelig embryo fram til øyerognstadiet. **a:** Vitellin plexus begynner å vokse (1 = overkjeve, 2 = bedre ende av caudal arterie, 3 = vitelline vene). **b:** Vitellin plexus dekker 3/4 av plommemassens overflate, og øyet har begynt å få pigment (1 = anlegg for semisirkulær kanal, 2-3 = samme som for a, 4 = underkjeve). **c:** Vitellin plexus dekker 5/6 av plommemassens overflate (1 = konsentrasjoner av mesenkym i området for prospektiv anal, dorsal og caudal finner, 2 = gul-grønt gallepigment i mage, 3 = klekkekjertler). **d:** Fult pigmentert øye (1 = caudal finnestråler, 2 = kapillærlope, 3 = operculum). (Gorodilov, 1996; Kimmel et al., 1995).

1.2 Eggkvalitet

Eggkvalitet defineres som evnen et egg har til å bli befruktet og senere utvikles til et normalt embryo. Eggkvalitet er bestemt av eggets egne egenskaper som dets gener og næringsstoffer i plommemassen, som er levert av moren (maternale faktorer) (Brooks et al., 1997). Egg med dårlig kvalitet kan føre til problemer med befruktningsevnen (Bobe, 2015). Parameterer eller stadier i utviklingen som kan undersøkes for å vurdere eggkvalitet er blant annet befruktningssrate og antall celledelinger, og overlevelse ved øyerognstadiet (Bobe, 2015). Eggkvalitet er påvirket av flere omgivende faktorer (Bobe & Labbè, 2010). pH og osmolalitet i ovarievæske er to faktorer som er korrelert med egg-kvalitet (Samarin et al., 2015). Miljø eller inkuberingsforhold etter befruktning er også en faktor som kan påvirke egg-kvaliteten (Brooks et al., 1997).

1.3 Formålet med oppgaven

Ubefruktede egg er mindre utsatt for å bli ødelagt og har en større toleranse for mekanisk sjokk (Ginatullina et al., 2018). Studier har vist at sammensetningen av et lagringsmedium påvirker eggkvaliteten hos (Erdahl et al., 1987; Goetz & Coffman, 2000). Lagring av ubefruktede egg vil gi tid til å undersøke rognen for ulike sykdomsagens før de i det heletatt blir befruktet og legges inn i klekkeriet. Dette vil både være praktisk og smittehygienisk.

Formålet med oppgaven var å se hvilke effekter medier med ulike ionesammensetninger hadde på stadier i embryonalutviklingen (parameterer for eggkvalitet) etter lagring av ubefruktede egg fra Atlantisk laks.

Som delmål ble det lagt vekt på hvilke effekter osmolalitet, pH og kalsium hadde på parameterer for eggkvalitet hos egg fra Atlantisk laks etter lagring i ulike medier.

2 Materiale og metoder

2.1 Forsøksfisk

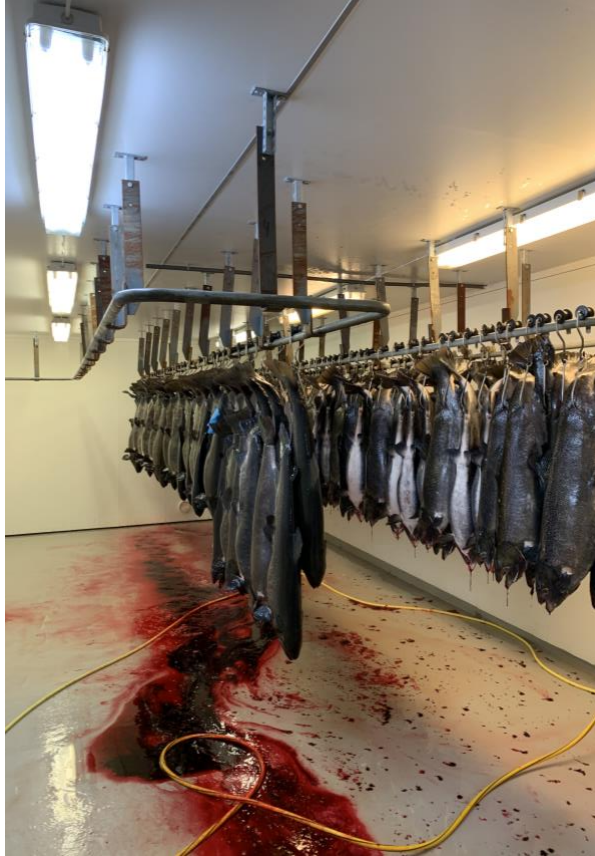
I perioden 04.11.19 – 16.11.19, under stryke- og befruktningssesongen hos SalMar Genetics AS (lokalitet 12842) på Reistad i Møre og Romsdal, ble det utlevert egg fra åtte hunnfisk og melke fra flere hannfisk. De kjønnsmodne fiskene hadde en alder på 3 til 4 år.

Før og under all håndtering av stamfisk ble det benyttet Aqui-S for å berolige fisken. Det ble benyttet to metoder for å få tak i melke fra kjønnsmoden hannfisk. Ved den ene metoden ble fisken beroliget før den ble gitt en overdose med Tricain Pharmaq. Etter overdosen ble fisken hengt opp etter halen og deretter bløgget (Figur 5). Gonadene ble tatt ut, kvernet og fortynnet med et lagringsmedium kalt AquaBoost SpermCoat levert av Cryogenics. Melke fra denne metoden ble lagret i kjøleskap og brukt neste dag. Ved den andre metoden ble fisken beroliget før den ble strøket.



Figur 5 – Viser opphengt, bløgget, kjønnsmoden hann-fisk. Foto: Camilla Valan Moen

All kjønnsmoden hunnfisk ble avlivet før uttak av egg. Fisken ble først beroliget før den ble håvet over i et kar med dødelig dose av Tricaine Pharmaq. Fisken ble deretter hengt opp etter halen og tilslutt bløgget (Figur 6). Etter bløggingen ble de spylt med vann og tørket, før de ble sendt videre til uttak av egg. Uttak av egg ble gjort ved å snitte opp buken.



Figur 6 – Viser opphengt, bløgget og spylt kjønnsmoden ho-fisk. Foto: Camilla Valan Moen

2.2 Forsøksoppsett

Det ble benyttet fire medier for lagring av ubefruktede egg: ovarievæske, natriumklorid (NaCl), Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca²⁺ (Vedlegg II). I hvert medium ble ubefruktede egg lagret i 0, 24, 48 og 96 timer. For hvert lagringstidspunkt innenfor et medium ble det benyttet to replikater. Hvert replikat inneholde ca. 250 egg. Dvs. 250 egg * 2 replikater * 4 lagringsmedier * 4 lagringstider for hver fisk. Prosedyren var lik for alle åtte fiskene. Det ble jobbet med egg fra fire fisk per uke, og kun egg fra én fisk om gangen.

Stamfiskanlegget var delt inn i fire soner; strykerom, befruktningsrom, rognavdeling og klekkeri. Strykerom og befruktningsrom lå i ett bygg, og rognavdeling og klekkeri i et annet bygg. Mellom hver sone ble klær og sko byttet, og hendene vasket og desinfisert.

Ved forsøksstart (05.11.19) ble det utlevert fire plastbakker med egg fra én fisk per bakke. Det samme ble gjort 12.11.19 med egg fra fire nye fisk.

2.2.1 Lagring av ubefruktede egg

Ubefruktede egg ble lagret i 300 ml firkantede flasker, hvor de ubefruktede eggene ble liggende i 2-3 lag. Der ubefruktede egg ble lagret i ovarievæske ble det tilsatt 10-15 ml ovarievæske, nok til at eggene ble dekket. Før lagring av ubefruktede egg i ioneløsning ble ovarievæsken vasket bort. Vasking ble gjort med den ioneløsningen de ubefruktede eggene skulle lagres i. Flaskene var fylt 120 ml ioneløsning. Ubefruktede egg ble lagret i kjøleskap som hadde en temperatur på $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.2.2 Befruktning

Det ble benyttet melke fra ny fisk etter hvert lagringstidspunkt. Ved befruktning av egg lagret i 0 timer ble det også benyttet fire behandlinger. I en behandling ble egg befruktet med ovarievæske tilstede. For å se effekten av vaskeprosessen ble ubefruktede egg vasket i de ulike ioneløsningene (NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca²⁺) før befruktning. Eggene ble befruktet med 100 µl melke og 50 ml aktivatorløsning. Aktivatorløsning er en løsning som skal gi ekstra energi til spermier (Cryogenetics, 2014). To minutter etter befruktning ble eggene vasket med vann for å fjerne resterende spermier og aktivatorløsning. Flaskene ble fylt med 100 ml vann, og eggene ble lagt tilbake i flaskene og satt i kjøleskapet for svelling.

Etter 24, 48 og 96 timer lagring ble eggene befruktet. Før befruktning av egg lagret i ovarievæske ble 10-15 ml av ovarievæsken fjernet. For egg lagret i ioneløsningene ble løsningen silt av før befruktning. Eggene ble befruktet med 100 µl melke og 50 ml aktivatorløsning. To minutter etter befruktning ble eggene vasket med vann, og lagt tilbake i flasken som var fylt med 100 ml vann. Flaskene ble satt i kjøleskap for svelling av egg.

Egg fra fisk nr. 1-4 ble befruktet med melke fra gonader som var kvernet. Egg fra fisk nr. 5-8 ble befruktet med melke som hadde vært behandlet på forskjellige måter. Ved befruktning av egg lagret i 0 timer ble det benyttet fersk melke fra fisk som ble strøket. Disse fiskene hadde blitt avlivet (usikker grunn). Ved befruktning av egg lagret i 24 timer ble det benyttet melke fra kvernet gonader. Ved befruktning av egg lagret i 48 timer ble det benyttet melke fra kvernet gonader som hadde stått 24 timer lengre (tilsammen 48 timer lagret i kjøleskap). Pga. lav spermieaktivitet ved dette tidspunktet ble dosen med melke doblet; fra 100 µl til 200 µl. Ved befruktning av egg lagret i 96 timer ble det benyttet melke fra strøket fisk som hadde vært lagret 24 timer i kjøleskap. Aktiviteten til spermier ble sjekket før hver befruktning, utenom befruktning av egg fra fisk nummer 5-8 etter 24 timer lagring. Aktiviteten ble sjekket i mikroskop ved å ta melke på et objektglass og tilsette aktivatorløsning.

2.2.3 Inkubering

To timer etter befruktning (etter svelling) ble de befruktete eggene desinfisert med buffodin og inkubert i et klekkeskap. Klekkeskapet besto av åtte skuffer, hvor hver skuffe var delt inn i to bakker. Hver bakke besto av 36 rom som hadde en størrelse på 75 mm * 75 mm * 50 mm. Én bakke besto av egg fra fire fisk fra et lagringstidspunkt, der ett rom besto av ett replikat (250 egg). Skuffene hadde en konstant forsyning av vann med en temperatur på $8 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$. Vannforsyningen ble overvåket daglig av oss, eller av de ansatte på anlegget da vi ikke var tilstede. På et tidspunkt frøs vannet i røret som forsynte vann ned til bygget der strykeavdelingen var. Pga. arbeid med tining av rør ble vannet der egg lå inkubert veldig gromsete på et tidspunkt, og vannforsyningen inn i skuffene gikk ned. Vannforsyningen måtte derfor sjekkes og justeres oftere.

2.3 Evalueringer

Vurderinger av eggkvalitet ble gjort ved disse parameterne/stadiene i embryonalutviklingen: svellegrad, befruktningsrate (andel aktiverte egg), celledeling, overlevelse ved gastrulasjon, og overlevelse ved øyerognstadiet.

2.3.1 Svellegrad

Før befruktning ved hvert lagringstidspunkt ble 20 egg fra hvert replikat plukket ut. Ovarievæsken eller ioneløsningen ble tørket bort og eggene veid. Etter veiing ble eggene befruktet med 60 µl melke og 30 ml aktivatorløsning i en petriskål. To minutter etter befruktning ble aktivatorløsningen silt av og eggene vasket i vann. Etter vaskingen ble eggene lagt tilbake i petriskålen som var blitt fylt med vann, og satt i kjøleskapet for svelling. Minst to timer etter befruktning ble eggene veid på nytt. Før siste veiing ble vannet tørket bort fra eggene.

Befruktning av egg fra Fisk 5-8 etter lagring i 48 timer fikk økt dose melke; fra 60 µl til 100 µl.

2.3.2 Befruktningsrate

Ca. 24 timer etter befruktning ble 50 egg fra hvert replikat plukket ut og fiksert i ca. to minutter i eddiksyre. Formålet med fikseringen var å stoppe celledelingen (Aslaksen, 2016). Etter fikseringen ble eggene lagt over på Cortland-løsning og inkubert i kjøleskap fram til evaluering av befruktningsrate og celledeling. Evalueringen ble gjort i mikroskop der det ble undersøkt om eggene var blitt aktiver, og antall celledelinger eggene hadde gjennomført.

2.3.3 Gastrulasjon

Femten dager (120 døgngader) etter befruktning ble 50 egg fra hvert replikat plukket ut, og mikroskopert. Ved mikroskoperingen ble det undersøkt hvor mange som hadde dannet ryggstreng.

2.3.4 Øyerogn

Trettiåtte dager (300 døgngader) etter befruktning av Fisk 1-4 og trettien dager (248 døgngader) etter befruktning av Fisk 5-8, ble 50 egg fra hvert replikat plukket ut, og

mikroskopert. Ved mikroskoperingen ble det undersøkt hvor mange som hadde nådd øyerognstadiet. Etter denne evalueringen ble forsøket på Reistad avsluttet.

2.3.5 Osmolalitet

Fra hvert lagringsmedium ble det tatt ut 1 ml væskeprøve før befruktning. Disse ble lagret i -80°C fryser på Reistad før de ble sendt til Tromsø og videre lagret ved -20°C før analysering.

For analysering av osmolalitet ble det benyttet et Fiske One-Ten Osmometer (Fiske Associates, MA, USA). 15 µl av prøven ble overført til et rør og satt i maskinen. En termistor ble senket ned i prøverøret. Osmometeret benytter seg av frysepunktdepresjon som innebærer senkning av en væskes frysepunkt som finner sted når en substans løses i den (Pedersen, 2018). Maskinen måler smeltepunktet i prøven. Ved å måle fryse-/smeltepunktet kan det beregne nøyaktig konsentrasjon av løste stoffer (væskens osmolalitet) (Johnsen, 2020). Før analysering av prøvene ble osmometeret sjekket med en standardløsning (290 mOsm kg⁻¹, Accuref 290, Fiske Associated, MA, USA). Hver prøve ble analysert minst to ganger. Avviket resultatene mellom de to første målingene med mer enn 4 mOsm kg⁻¹, ble prøven analysert en tredje og evt. en fjerde gang. Sjekking av osmometeret ble gjort for hver 36. prøve for ioneløsningene (mellom hvert lagringstidspunkt for fire fisker) og hver for 10. prøve for ovarievæskene.

2.3.6 Kalsium Assay Kit

Væskeprøvene av lagringsmediene (1 ml) ble også benyttet til å sjekke konsentrasjonen av kalsium i hvert replikat. Det ble benyttet et Kalsium Assay Kit for sjekking av kalsiumkonsentrasjonen i de ulike mediene (Vedlegg III).

2.4 Databehandling

2.4.1 Utregninger

I hvert replikat ble det benyttet ca. 250 egg. For å beregne 250 egg ble først en liten mengde egg plukket ut, veid og antallet telt. Deretter ble Formel 1 benyttet. Dette ble gjort med egg fra hver fisk.

$$\text{Vekten (g) på 250 egg} = \frac{\text{antall telte egg}}{\text{vekten til de telte eggene}} * 250 \text{ (Formel 1)}$$

Svellegraden (prosent vektøkning) ble regnet ut ved bruk av Formel 2.

$$\% \text{ vektøkning} = \frac{\text{vekt etter svelling} - \text{vekt før svelling}}{\text{vekt før svelling}} * 100 \text{ (Formel 2)}$$

For å finne ut hvor mange dager det tok fra befruktning til evaluering av gastrulasjon (120 døgngader) og øyerognstadige (248 og 300 døgngader) ble døgngader dividert på gjennomsnittstemperaturen på vannet (8°C).

I statistiske analyser for de ulike evalueringene; svellegrad, befruktningsrate, overlevelse ved gastrulasjon og øyerogn, konsentrasjon av kalsium og osmolalitet, og pH, ble gjennomsnittet av replikatene for et lagringsmedium (behandling) ved et lagringstidspunkt for hver fisk benyttet. Dette ble regnet ut ved bruk av Formel 3.

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2}{n} \text{ (Formel 3)}$$

\bar{X} = gjennomsnittet av begge replikatene for én fisk, x_i = replikatene og n = antall replikater.

Utregninger med Formel 2 og Formel 3 ble utført i Excel for Mac (Microsoft, Redmond, WA, USA).

2.4.2 Statistiske analyser og grafiske fremstillinger

Grafiske fremstillinger (figurer) av data ble laget i Prism versjon 8 for Mac (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

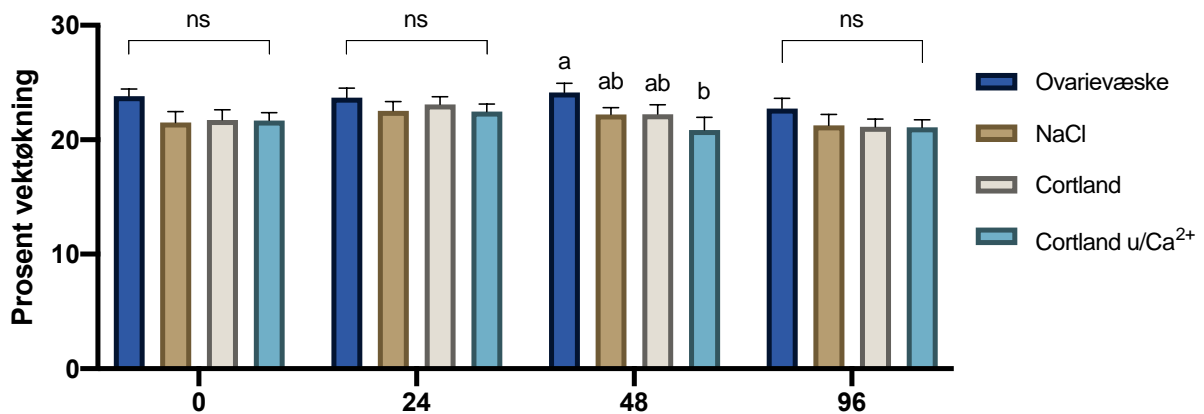
For å undersøke eventuelle signifikante forskjeller mellom lagringsmedier innenfor en lagringstid, eller mellom lagringstider innenfor et medie ble en to-veis ANOVA og Turkey post hoc test utført i Sigmaplot versjon 13 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Pga. store variasjoner med høye og lave prosentener innenfor gastrulasjon og øyerogn, ble det valgt å arcsin-transformere dataene før det ble utført en to-veis ANOVA og Turkey post hoc test. Ved å arcsin-transformere ble dataene normalfordelt. Hvis $p < 0,05$ var det signifikante forskjeller mellom behandlingene innenfor et lagringstidspunkt, eller mellom tid innenfor en behandling.

For å undersøke om det var signifikante korrelasjoner mellom stadier i embryonalutviklingen ble det utført en Pearson korrelasjonsanalyse i Sigmaplot versjon 13 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Pearson korrelasjonskoeffisient, r , kan variere fra -1 til +1 og beskriver henholdsvis sterk positiv eller sterk negativ korrelasjon. Denne koeffisienten måler graden av sammenheng mellom to variabler. Hvis $p < 0,05$ var det signifikant korrelasjon mellom parameterne.

3 Resultater

3.1 Effekter av medier på svellegrad

Svellegraden ble undersøkt ved å veie 20 egg før og etter svelling hvor egg hadde vært lagret i ulike lagringsmedier i forskjellige tider (Figur 7). Ved alle lagringstidspunkt hadde alle eggene i de ulike lagringsmediene en gjennomsnittlig vektøkning på over 20%. Egg lagret i ovarievæske hadde høyest vektøkning ved alle lagringstidene. Det var liten forskjell i vektøkning mellom ovarievæske og ioneløsningene, og mellom de ulike ioneløsningene. Det var kun signifikant forskjell ($p < 0,05$) i vektøkning mellom egg som hadde vært lagret i ovarievæske og Cortland-løsning uten Ca^{2+} .



Figur 7 – Svellegrad (prosent vektøkning) hos egg etter lagring i ulike medier ved ulike lagringstider. Data presentert som gjennomsnitt + SEM ($n=8$). Små bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom lagringsmedier innenfor et lagringstidspunkt. ns indikerer ingen signifikante forskjeller mellom lagringsmedier innenfor et lagringstidspunkt.

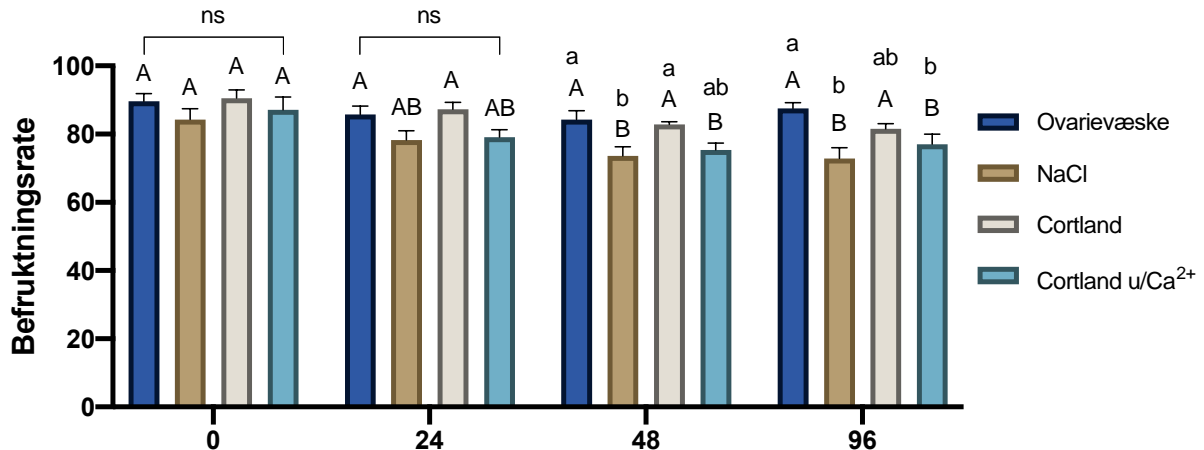
3.2 Effekter av medier på befruktningsrate

Befruktningssraten (prosent aktiverte egg) ble evaluert 24 timer etter befruktning. Etter lagring av ubefruktede egg i de ulike mediene ved alle lagringstidene, var befruktningsraten høy (Figur 8). Egg lagret i ovarievæske og Cortland-løsning hadde ingen nedgang i befruktningsrate utover lagringstidene. Egg som hadde vært lagret i NaCl og Cortland-løsning uten Ca^{2+} hadde litt lavere befruktningsrate ved alle lagringstidene, sammenlignet med de to andre mediene. Det var signifikant forskjell i befruktningsrate ($p < 0,05$) mellom 0 og 48 timer, og mellom 0 og 96 timer lagring av egg i både NaCl og Cortland-løsning uten Ca^{2+} .

Etter 0 timer lagring av egg var befruktningsraten for egg lagret i ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca²⁺ på henholdsvis 90%, 84%, 91% og 87%. Etter 24 timer lagring av egg var befruktningsraten i de ulike mediene på henholdsvis 86%, 78%, 87% og 79%.

Etter 48 timer lagring av egg var det blitt en liten nedgang i befruktningsrate i noen av mediene. Dette ga en signifikant forskjell ($p < 0,05$) i befruktningsrate mellom egg som hadde vært lagret i ovarievæske og NaCl, og mellom egg som hadde vært lagret i Cortland-løsning og NaCl. Befruktningsraten hos egg etter lagring i ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca²⁺ i 48 timer var på henholdsvis 84%, 74%, 83% og 75%.

Etter 96 timer lagring av egg i de ulike mediene var befruktningsraten omentrent lik befruktningsraten ved 48 timer. Befruktningsraten for egg lagret i ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca²⁺ i 96 timer var på henholdsvis 88%, 73%, 82% og 77%. Etter 96 timer lagring var det kun signifikant forskjell ($p < 0,05$) i befruktningsrate mellom egg som hadde vært lagret i ovarievæske og NaCl, og mellom egg som hadde vært lagret i ovarievæske og Cortland-løsning uten Ca²⁺.



Figur 8 – Befruktningsrate (prosent aktiverte egg) hos egg etter lagring i ulike medier ved ulike lagringstider. Data presentert som gjennomsnitt + SEM (n=8). Små bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom lagringsmedier innenfor et lagringstidspunkt. ns indikerer ingen signifikante forskjeller mellom lagringsmediene innenfor et lagringstidspunkt. Store bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom lagringstider innenfor et lagringsmedie.

3.3 Effekter av medier på celledeling

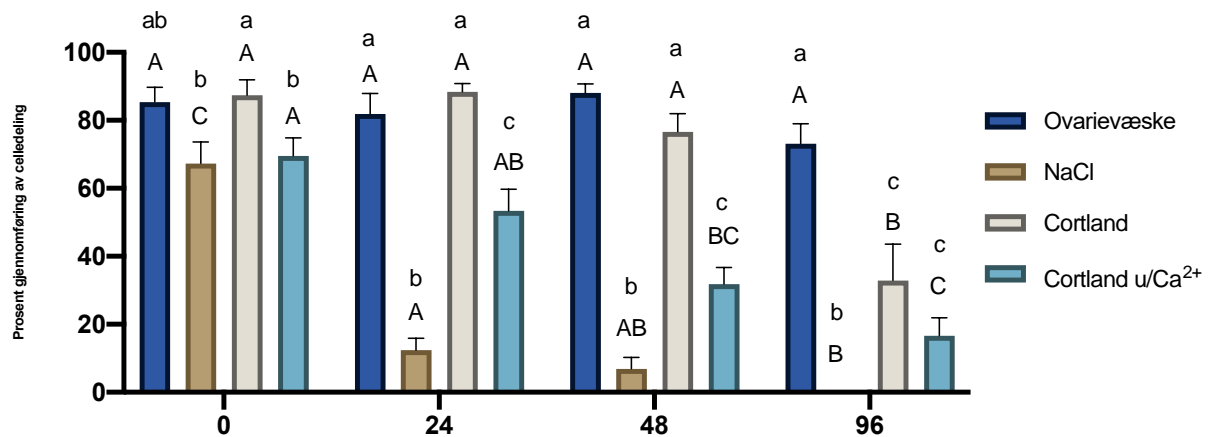
Ved evaluering av befruktningsrate ble det i tillegg registrert andel egge som hadde gjennomført celledelinger ca. 24 timer etter befruktning (Figur 9). Hos egg lagret i ovarievæske var andelen egg med celledelinger høy ved alle lagringsmediene. Egg som hadde vært lagret i NaCl hadde en kraftig og signifikant ($p < 0,001$) nedgang i andel egg som hadde gjennomført celledelinger fra 0 timer lagring til de andre lagringstidene (24-96 timer). Egg lagret i Cortland-løsning hadde høy prosentandel som hadde gjennomført celledelinger fra 0 til 48 timer lagring (Figur 9). Ved 96 timer lagring falt prosentandelen som hadde gjennomført celledelinger betydelig, og det var signifikante forskjeller ($p < 0,001$) mellom de tre første lagringstidene og 96 timer lagring av ubefruktede egg. Egg lagret i Cortland-løsning uten Ca_{2+} hadde en jevn nedgang i prosentandel som hadde gjennomført celledelinger fra 70% ved 0 timer lagring til 17% ved 96 timer lagring (Figur 9). Mellom lagringstidene 0 og 48 timer, 0 og 96 timer og 24 og 96 timer var det signifikant forskjell ($p < 0,001$) i andel egg som hadde gjennomført celledelinger etter lagring i Cortland-løsning uten Ca_{2+} .

Ved 0 timer lagring av egg ble ubefruktede egg vasket i de ulike ioneløsningene før befruktning. Egg behandlet med ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca_{2+} hadde en prosentandel på henholdsvis 85%, 67%, 87% og 70% som hadde gjennomført celledelinger. Ved dette lagringstidspunktet var det signifikante forskjeller mellom Cortland-løsning og NaCl, og mellom Cortland-løsning med og uten kalsium (Figur 9).

Etter 24 timer lagring av ubefruktede egg i ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca_{2+} var prosentandelen for andel egg som hadde gjennomført celledelinger på henholdsvis 82%, 12%, 88% og 53%. Ved dette lagringstidspunktet var det signifikante forskjeller ($p < 0,05$) mellom alle lagringsmediene, utenom mellom egg lagret i ovarievæske og Cortland-løsning. Etter 48 timer lagring av ubefruktede egg var det de samme signifikante forskjellene som ved 24 timer lagring. Prosentandelen som hadde gjennomført celledelinger etter 48 timer lagring i ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca_{2+} var på henholdsvis 88%, 7%, 77% og 32% (Figur 9).

Etter 96 timer lagring av ubefruktede egg var andel egg som hadde gjennomført celledelinger lav for alle tre ioneløsningene, men fremdeles høy i ovarievæske. Prosentandelene etter lagring av ubefruktede egg i ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca_{2+} var på henholdsvis 75%, 0%, 33% og 17% (Figur 9). Det var signifikante forskjeller ($p < 0,001$) i

prosentandel som hadde gjennomført celledeling mellom alle lagringsmediene, utenom mellom Cortland-løsningene etter lagring av ubefruktede egg i 96 timer.



Figur 9 – Prosent egg som har gjennomgått minst to celledelinger 24 timer etter befruktning, etter lagring i ulike medier ved forskjellige tider. Data presentert som gjennomsnitt + SEM (n=8). Små bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom lagringsmedier innenfor et lagringstidspunkt. Store bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom lagringstider innenfor et lagringsmedie

3.4 Effekter av medier på gastrulasjon

Overlevelse ved gastrulering ble evaluert 120 døgngrader etter befruktning (Figur 10). Egg befruktet etter 0 timer lagring hadde høy overlevelse etter behandling med ovarievæske og Cortland-løsning med henholdsvis 83% og 86% overlevelse ved gastrulasjonsfasen. Etter vasking av egg i NaCl og Cortland-løsning uten Ca²⁺ var overlevelsen noe lavere sammenlignet med de to overnevnte mediene. Prosent overlevelse for egg lagret i NaCl og Cortland-løsning uten Ca²⁺ var på henholdsvis 64% og 66%. Det var 22% som skilte høyeste (Cortland-løsning) og laveste (NaCl) overlevelsesprosent på dette tidspunktet. Mellom disse to løsningene var signifikant forskjell ($p < 0,05$).

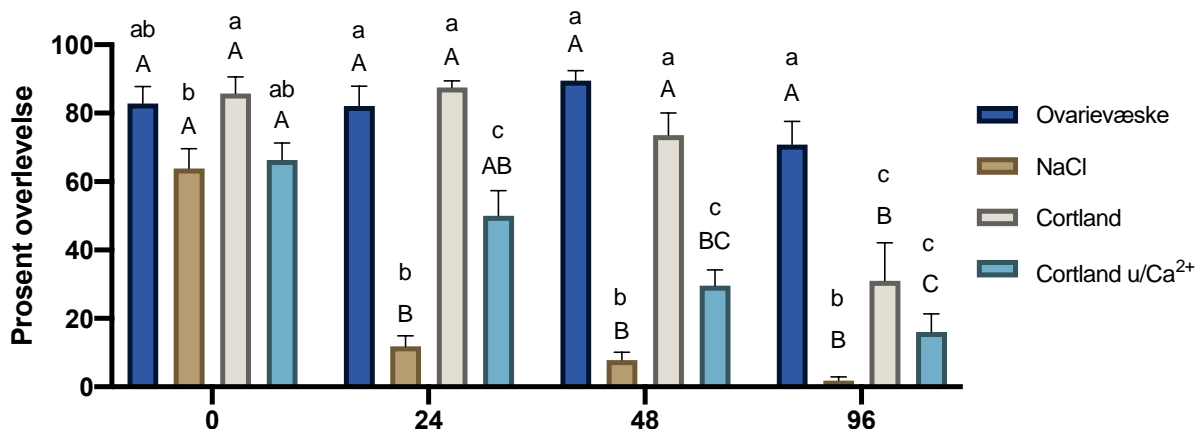
Etter 24 timer lagring av ubefruktede egg var det store forskjeller i overlevelse mellom flere av lagringsmediene (Figur 10). Overlevelsen hos egg etter lagring i ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca²⁺ i 24 timer var på henholdsvis 82%, 12%, 88% og 48%. Også ved dette tidspunktet var høyeste overlevelsesprosent hos egg lagret i Cortland-løsning, og like bak var egg lagret i ovarievæske. NaCl hadde også her lavest prosent overlevelse, men var betydelig lavere sammenlignet med overlevelsesprosenten ved 0 timer lagring. Det var signifikant forskjell ($p < 0,001$) i overlevelse mellom egg lagret i ovarievæske og NaCl, og

mellom egg lagret i ovarievæske og Cortland-løsning uten Ca^{2+} . Det var signifikant forskjell ($p < 0,001$) i overlevelse mellom egg lagret i Cortland-løsning og NaCl, og mellom egg lagret i Cortland-løsning med og uten kalsium.

Etter 48 timer lagring av egg i ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca^{2+} var overlevelsen på henholdsvis 90%, 8%, 74% og 30% (Figur 10). Egg lagret i ovarievæske hadde på dette tidspunktet høyest overlevelse. Egg som hadde vært lagret i NaCl hadde fremdeles lavest overlevelsesprosent. Ved dette lagringstidspunktet var det de samme signifikante forskjellene som ved 24 timer lagring av ubefruktede egg.

Etter 96 timer lagring av egg var det blitt større forskjeller i overlevelse. Overlevelsen hos egg lagret i ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca^{2+} i 96 timer var på henholdsvis 71%, 2%, 31% og 16% (Figur 10). Det var signifikante forskjeller ($p < 0,05$) i overlevelse mellom alle lagringsmediene, utenom mellom egg som hadde vært lagret i Cortland-løsning med og uten kalsium.

Lagring av ubefruktede egg i ovarievæske hadde ingen tydelige forskjeller i overlevelse mellom de ulike lagringstidene. Egg som hadde vært lagret i NaCl hadde signifikant forskjell ($p < 0,001$) i overlevelse mellom 0 og de andre lagringstidene (24-96 timer). Det var en kraftig nedgang i overlevelse etter 24 timer lagring av egg. Fra 24 til 96 timer lagring av egg i NaCl forble overlevelsen veldig lav og nesten uendret. Egg som hadde vært lagret i Cortland-løsning hadde høy overlevelse fram til 48 timer lagring. Det var signifikant forskjell ($p < 0,001$) i overlevelse mellom 96 timer lagring av egg og de andre lagringstidene (0-48 timer) i Cortland-løsning. Egg lagret i Cortland-løsning uten Ca^{2+} hadde en jevn nedgang i overlevelse fra 0 og 96 timer. Det var signifikant forskjell i overlevelse mellom egg lagret i 0 og 48 timer ($p < 0,05$), 0 og 96 timer ($p < 0,001$), og 24 og 96 timer ($p < 0,05$).



Figur 10 – Prosent overlevelse ved gastrulasjon hos egg etter lagring i ulike medier ved ulike lagringstider. Data presentert som gjennomsnitt + SEM (n=8). Små bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom lagringsmedier innenfor et lagringstidspunkt. Store bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom lagringstider innenfor et lagringsmedium.

3.5 Effekter av medier på øyerogn

Overlevelse ved øyerognstadiet ble evaluert 300 døgngader etter befruktning av egg fra fisk nr. 1-4, og 248 døgngader etter befruktning av egg fra fisk nr. 5-8. Egg lagret i 0 timer hadde relativt høy overlevelse for alle behandlingene. Egg lagret i ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca²⁺ hadde en overlevelse på henholdsvis 78%, 63%, 82% og 70% (Figur 11). Egg vasket i Cortland-løsning hadde høyest overlevelse, og egg vasket i NaCl hadde lavest overlevelse ved øyerognstadiet.

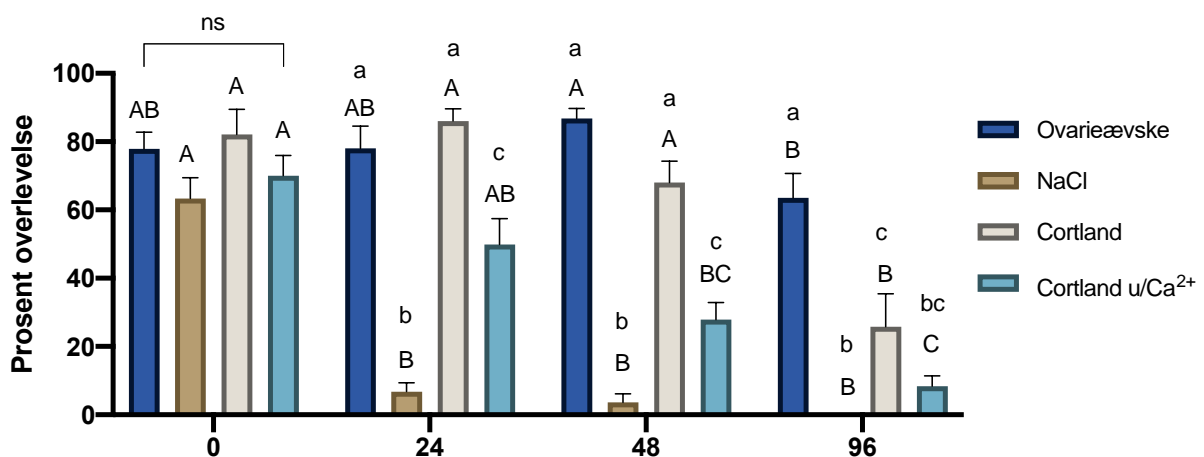
Det var store forskjeller i overlevelse mellom flere av lagringsmediene etter lagring i 24 timer (Figur 11). Overlevelsen hos egg i ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca²⁺ var på henholdsvis 78%, 7%, 86% og 50%. Det var signifikante forskjeller ($p < 0,05$) i overlevelse hos egg mellom alle lagringsmediene, utenom mellom egg som hadde vært lagret i ovarievæske og Cortland-løsning i 24 timer.

Etter 48 timer lagring av egg i ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca²⁺ var overlevelsen på henholdsvis 87%, 4%, 68% og 28% (Figur 11). Ved dette tidspunktet var det de samme signifikante forskjellene som ved 24 timer lagring av ubefruktede egg.

Etter 96 timer lagring av egg var det klar signifikant forskjell ($p < 0,001$) i overlevelse mellom egg lagret i ovarievæske og ioneløsningene (Figur 11). Overlevelsen for egg lagret i

ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca²⁺ var på henholdsvis 66%, 0%, 27% og 8%. Det var også signifikant forskjell ($p < 0,001$) i overlevelse mellom egg som hadde vært lagret i Cortland-løsning og NaCl i 96 timer.

Lagring av ubefruktede egg i ovarievæske hadde liten endring i overlevelse som følge av tid. Etter 48 timer lagring av egg var overlevelsen noe høyere sammenlignet med de to tidligere lagringstidene, og etter 96 timer lagring av egg i ovarievæske var overlevelsen litt lavere sammenlignet med 48 timer lagring (Figur 11). Det var da signifikante forskjeller ($p < 0,05$) i overlevelse mellom 96 timer lagring av egg og de andre lagringstidene (0-48 timer) i ovarievæske. Egg lagret i Cortland-løsning hadde høy overlevelse fra 0 til 48 timer lagring av ubefruktede egg. Etter 96 timer lagring fikk egg en betydelig lavere overlevelsesprosent. Egg lagret i Cortland-løsning hadde de samme signifikante forskjellene mellom lagringstidene som for egg lagret i ovarievæske. For egg lagret i NaCl var det en kraftig og signifikant ($p < 0,001$) nedgang i overlevelse fra 0 timer lagring til de andre lagringstidene (24-96 timer). Mellom 24 og 96 timer lagring av ubefruktede egg i NaCl forble overlevelsen veldig lav. Egg lagret i Cortland-løsning uten Ca²⁺ hadde en jevn nedgang i overlevelse fra 0 til 96 timer lagring. Det var signifikant forskjell i overlevelse mellom egg lagret i 0 og 48 timer ($p < 0,05$), mellom egg lagret i 0 og 96 timer ($p < 0,001$), og mellom egg lagret i 24 og 96 timer ($p < 0,05$).



Figur 11 – Prosent overlevelse ved øyerognstadige hos egg etter lagring i ulike medier ved ulike lagringstider. Data presentert som gjennomsnitt + SEM (n=8). Små bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom lagringsmedier innenfor et lagringstidspunkt. ns indikerer ingen signifikante forskjeller mellom lagringsmediene innenfor et lagringstidspunkt. Store bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom lagringstider innenfor et lagringsmedium.

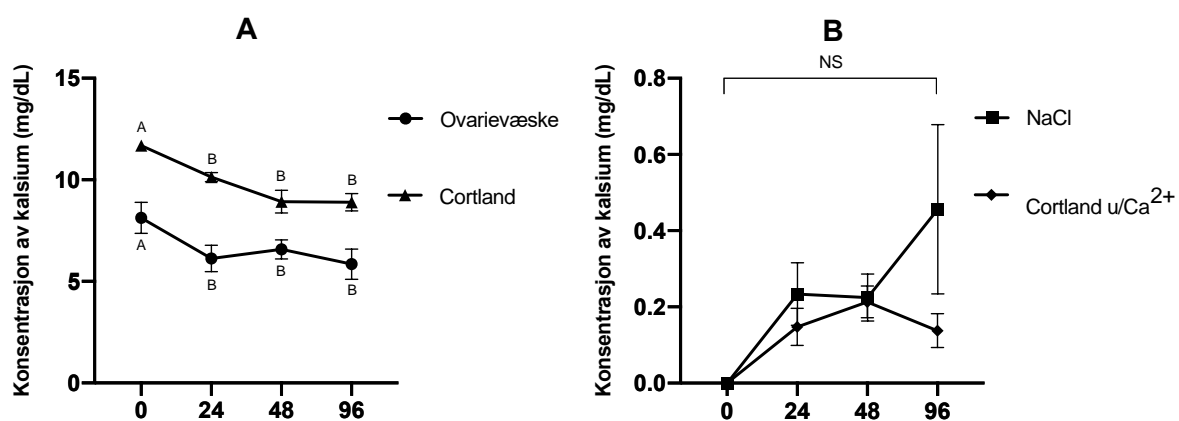
3.6 Korrelasjoner mellom parametere for eggkvalitet

Korrelasjoner mellom parametere mellom parametere for eggkvalitet undersøkt. Det var gjennomgående få signifikante korrelasjoner mellom befruktningsrate og de andre stadiene i utviklingen både når det gjelder medier og lagringstidspunkt (Vedlegg VI). Mellom celledeling, gastrulasjon og øyerogn var det signifikante korrelasjoner ved nesten alle behandlingene uavhengig lagringstid.

3.7 Effekter av konsentrasjon av kalsium i medier

Cortland-løsning var det lagringsmediet som hadde høyest konsentrasjon av kalsium (Figur 12A). Både ovarievæske og Cortland-løsning hadde signifikant forskjell i kalsiumkonsentrasjon ($p < 0,05$) mellom 0 og de andre lagringstidene (24-96 timer). Cortland-løsning hadde en liten nedgang i kalsiumkonsentrasjon fra 24 til 48 timer lagring av ubefruktede egg. Etter 48 timer lagring av ubefruktede egg i Cortland-løsning forble kalsiumkonsentrasjonen uendret. Fra 24 til 96 timer lagring av ubefruktede egg i ovarievæske var det nesten ingen endring i kalsiumkonsentrasjon.

Både NaCl og Cortland-løsning uten Ca^{2+} var kalsiumfrie lagringsmedier og begge hadde en konsentrasjon av kalsium på 0 mg dl⁻¹ ved start (0 timer lagring). For begge disse kalsiumfrie lagringsmediene var det en liten økning i kalsiumkonsentrasjon over tid med en konsentrasjon i området 0,1-0,8 mg dl⁻¹ (Figur 12B).



Figur 12 – Konsentrasjon av kalsium i lagringsmediene ved ulike lagringstidspunkt. Data presentert som gjennomsnitt \pm SEM ($n=8$). Store bokstaver indikerer signifikante forskjeller i lagringstid for et lagringsmedie/behandling. NS indikerer ingen signifikante forskjeller mellom lagringstidspunktene innenfor et lagringsmedie. **A:** Kalsiumkonsentrasjon i ovarievæske og Cortland-løsning etter lagring av egg i 0, 24, 48 og 96 timer. **B:** Kalsiumkonsentrasjon i NaCl og Cortland-løsning uten kalsium etter lagring av egg i 0, 24, 48 og 96 timer.

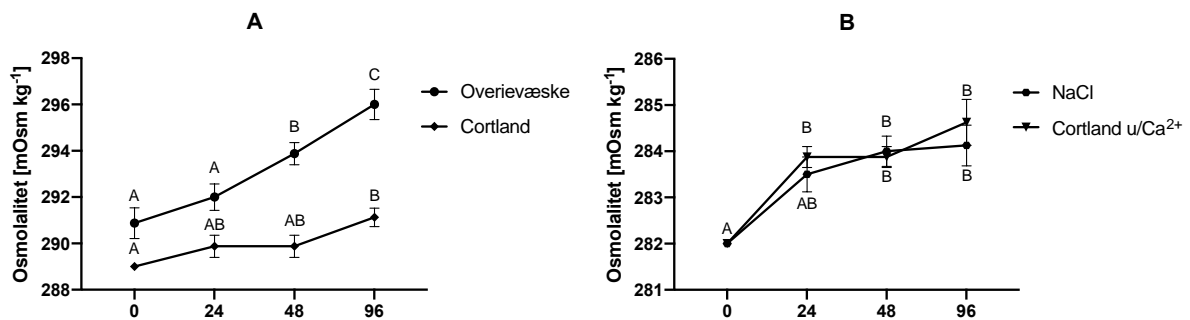
3.8 Effekter av osmolalitet i medier

Ovarievæske var det mediet med høyest osmolalitet, og i tillegg det mediet med størst økning i osmolalitet fra 0 til 96 timer lagring av egg (Figur 13A). Det var signifikant forskjell ($p < 0,05$) i osmolalitet i ovarievæske mellom alle lagringstidene, utenom mellom 0 og 24 timer lagring av ubefruktede egg.

Cortland-løsning var det medie med nest høyest osmolalitet. Fra 0 til 96 timer lagring av ubefruktede egg var det en liten økning i osmolalitet. Cortland-løsningen hadde en osmolalitet på 289 mOsm kg⁻¹ ved 0 timer, og 291 mOsm kg⁻¹ ved 96 timer lagring av ubefruktede egg. Eneste signifikant forskjellen ($p < 0,05$) i osmolalitet i Cortland-løsning var mellom 0 og 96 timer lagring av ubefruktede egg.

NaCl og Cortland-løsning uten Ca₂₊ var de mediene med lavest osmolalitet. Ved 0 timer lagring hadde begge mediene en osmolalitet på 282 mOsm kg⁻¹ ved 0 timer lagring av egg (Figur 13B). Det var en økning i osmolalitet i NaCl fra 0 til 96 timer lagring av ubefruktede egg. Det var kun signifikante forskjeller i osmolalitet mellom 0 og de andre lagringstidene (24-96 timer).

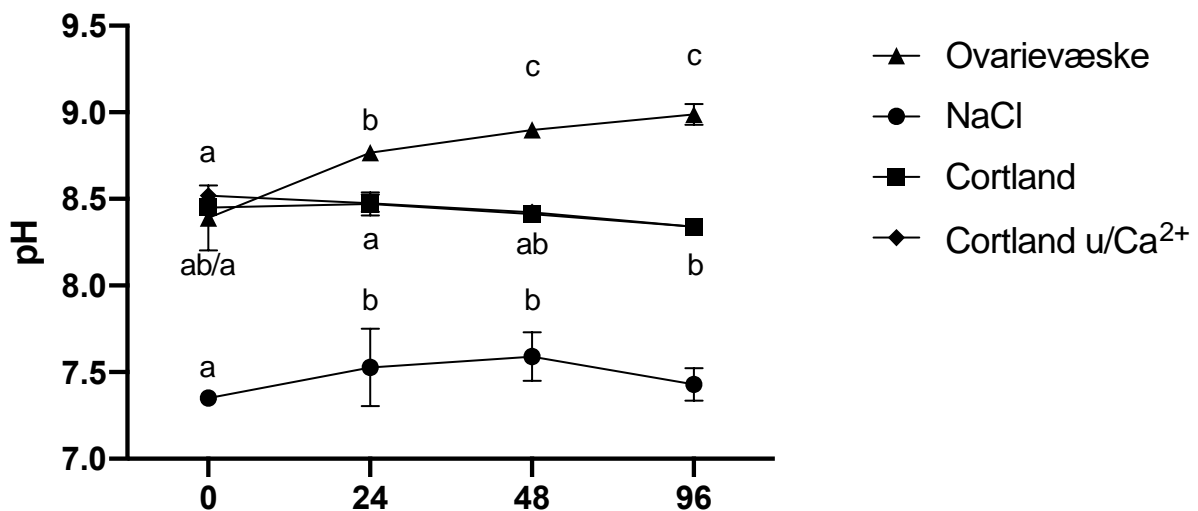
I Cortland-løsning uten Ca₂₊ var det en økning i osmolalitet etter 24 timer lagring av ubefruktede egg. Det var signifikant forskjell i osmolalitet mellom 0 og 24 timer lagring av ubefruktede egg. Mellom 24 og 96 timer lagring av ubefruktede egg forble osmolaliteten i Cortland-løsning uten Ca₂₊ uendret.



Figur 13 – Osmolalitet i lagringsmediene ved ulike lagringstidspunkt. Data presentert i gjennomsnitt \pm SEM ($n=8$). Store bokstaver indikerer signifikante forskjeller i lagringstid for et lagringsmedie. **A:** Osmolalitetkonsentrasjon i ovarievæske og Cortland-løsning etter lagring av egg i 0, 24, 48 og 96 timer. **B:** Osmolalitetkonsentrasjon i NaCl og Cortland-løsning uten kalsium etter lagring av egg i 0, 24, 48 og 96 timer.

3.9 Effekter av pH i medier

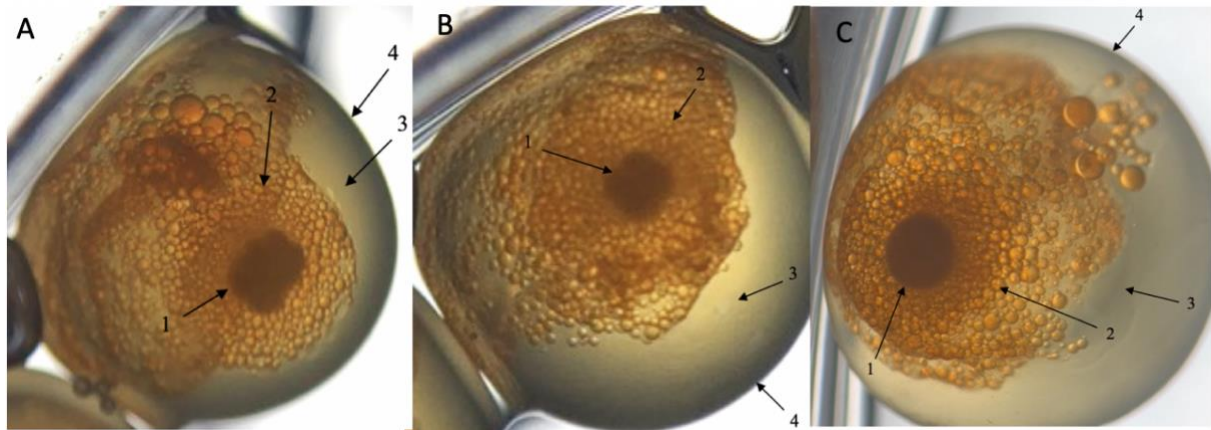
Før befruktning av egg ble pH målt i lagringsmediene ved alle lagringstidspunkt (Figur 14). pH i ovarievæske ved 0 timer lagring lå på 8,39. Etter lagring av ubefruktede egg i ovarievæske hadde pH en jevn økning utover lagringstidene. Det var signifikante forskjeller ($p < 0,05$) i pH i ovarievæske mellom alle lagringstidene, utenom mellom 48 og 96 timer lagring av ubefruktede egg. NaCl var det lagringsmediet med lavest pH. Fram til 48 timer lagring av ubefruktede egg hadde pH i NaCl økt, men etter 96 timer lagring hadde pH en liten nedgang. Det var signifikant forskjell ($p < 0,05$) i pH i NaCl mellom lagringstidene 0 og 24 timer, mellom 0 og 48 timer, og mellom 48 og 96 timer. pH i Cortland-løsningene var relativt like ved alle lagringstidspunktene. Ved 0 timer var pH i Cortland-løsning 8,45, og pH i Cortland-løsning uten Ca^{2+} 8,52. I Cortland-løsning var det signifikant forskjell ($p < 0,05$) i pH mellom 24 og 96 timer lagring av ubefruktede egg. I Cortland-løsning uten Ca^{2+} var det signifikant forskjell ($p < 0,05$) mellom 0 og 96 timer, og mellom 24 og 96 timer lagring av ubefruktede egg.



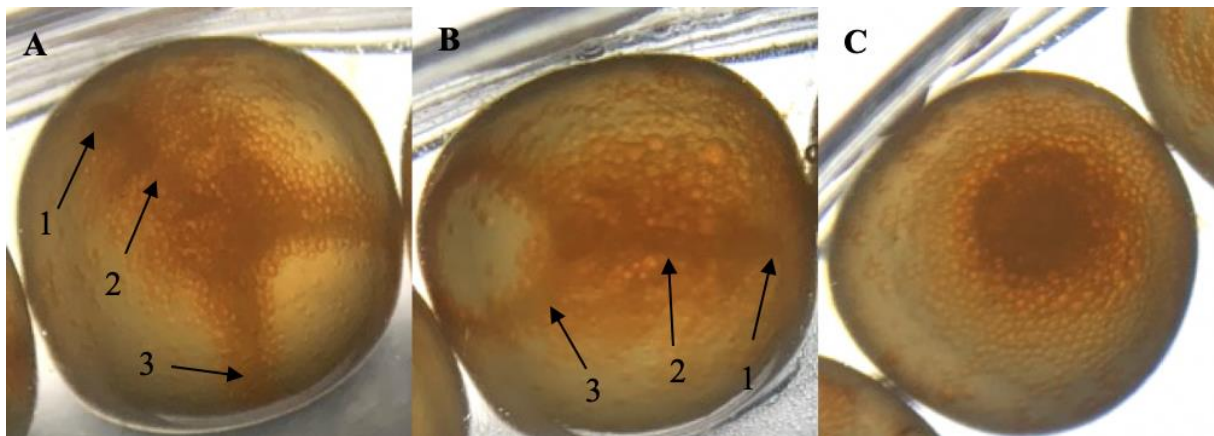
Figur 14 – pH i lagringsmediene ved ulike lagringstidspunkt. Data presentert i gjennomsnitt \pm SEM ($n=8$). Små bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom lagringstidene innenfor et lagringsmedium.

3.10 Embryonalutvikling

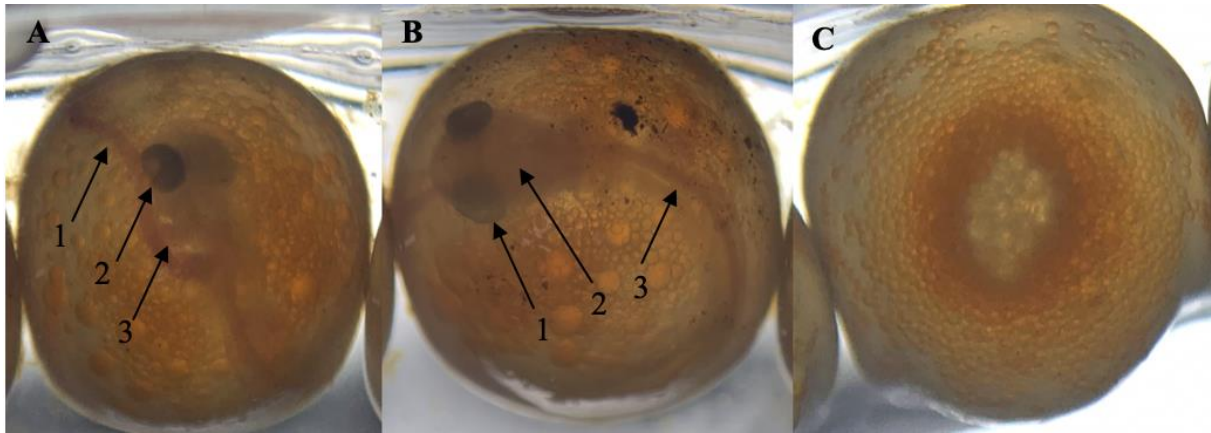
Figur 15, 16, 17 og 18 viser hvordan det så ut da evalueringer av befruktningrøre, celledeling og overlevelse ved gastrulasjon og øyerogn så ut.



Figur 15 – Bilder fra evaluering av befruktningsrate og celledeling 24 timer etter befruktning. **A:** Egg lagret i ovarievæske i 24 timer; 8 celler (1 = celler/blastomer, 2 = lipiddråper, 3 = plommemasse, 4 = chorion). **B:** Egg lagret i Cortland-løsning i 48 timer; 4 celler (1-4 = samme som for a). **C:** Egg vasket i NaCl; 1 celle (1 = blastodisk, 2-4 = samme som for a). Foto: Camilla Valan Moen.



Figur 16 – Dannelse av ryggstreng hos embryo under gastrulasjonsfasen. **A:** Egg fra Fisk 6 vasket i Cortland-løsning før befruktning etter 0 timer lagring. Tydelig dannelse av ryggstreng; 3/4 epiboly (1 = hode/hjerne, 2 = ryggstreng, 3 = germ ring). **B:** Egg fra Fisk 5 lagret i ovarievæske i 24 timer før befruktning. Tydelig dannelse av ryggstreng; epiboly nærmer seg slutten (1-3 = samme som i A). **C:** Egg fra Fisk 5 lagret i NaCl i 24 timer. Ingen dannelse av ryggstreng. Utviklingen av egget har stoppet opp og egget er dødt. Foto: Camilla Valan Moen.



Figur 17 – Øyerognstadiene ved 300 døgngader. **A:** Egg fra Fisk 1 lagret i Cortland-løsning i 24 timer før befruktning (1 = vitellin plexus, 2 = pigmentert øye, 3 = hjertet). **B:** Egg fra Fisk 1 vasket i Cortland-løsning før befruktning etter 0 timer lagring (1 = pigmentert øye, 2 = hjerne, 3 = dorsal aorta). **C:** Egg med ovarievæske fra Fisk 5 befruktet etter 0 timer lagring. Utvikling av egget har stoppet opp og egget er dødt. Foto: Camilla Valan Moen.



Figur 18 – Øyerognstadiet ved 248 døgngader. Egg fra Fisk 6 lagret i Cortland-løsning i 48 timer. (1 = vitellin plexus, 2 = begynnelse på pigmenterte øyne). Foto: Camilla Valan Moen.

4 Diskusjon

I kommersiell produksjon av laks er det viktig å vurdere egg-batchene sin levedyktighet. Ved å evaluere ulike indikatorer for eggkvalitet er det mulig å si noe om utviklingspotensialet til de ulike batchene. Evalueringer av eggkvalitet gjøres i tidlige stadier i utviklingen for å unngå å kaste bort verdifulle ressurser på en gruppe som har dårlig potensiale (Pavlov et al., 2004). For å estimere eggkvaliteten gjennom overvåkning av utviklingssuksess, er det viktig å ha gode markører for eggkvalitet som på en forutsigbar måte kan si noe om utviklingspotensialet (Bobe, 2015). Befruktningsrate og overlevelse til øyerogn er indikatorer for eggkvalitet som kan bli evaluert ved kommersielle stamfisk-anlegg (Pavlov et al., 2009).

I dette forsøket ble egg befruktet med melke som var behandlet på forskjellige måter, inkludert bruk av fersk melke. Ved befruktning av egg fra fisk nr. 5-8 var det ikke ordinær stryking ved SalMar Genetics AS og den vanlig brukte melken var derfor ikke tilgjengelig. SalMar Genetics AS benytter seg av melke fra kvernede gonader lagret kjølig over natt i et kommersielt lagringsmedium med ukjent sammensetning. I gonadene er spermier oppbevart i immobil form (Kinsey et al., 2007). Når spermier vandrer gjennom gonadene under gyting oppstår det en endring i pH som gir spermier potensialet for anskaffelse av bevegelse (Bobe & Labbè, 2010). Lagringsmediet som kvernede gonader ble oppbevart i før bruk skulle gi en tilsvarende pH-endring som den som oppstår naturlig i gonadene når hannfisken modner (pers. kom. Gøran Roland, SalMar Genetisc AS). Melke behandlet på denne måten gir normalt ingen begrensning i befruktning (pers. Kom. Gøran Roland, SalMar Genetics As). Spermiers aktivitet kan enkelt sjekkes i mikroskop og andel bevegelige spermier, samt svømmehastighet- og mønster, etter aktivering kan benyttes som indikatorer på spermieaktivitet (Bobe & Labbè, 2010). I dette eksperimentet var det evaluering som nevnt over kun ved ett lagringstidspunkt (48 timer for egg fra fisk nr.- 5-8) at spermier hadde lav bevegelsesaktivitet, men dette ble kompensert med å øke dosen melke ved befruktning for å sikre oss at eggene ble befruktet. Ved befruktning av egg fra fisk nr. 5-8 etter lagring i 24 timer ble det glemt å undersøke spermieaktiviteten, men ingen av resultatene tyder på at det var dårlig spermiekvalitet målt som befruktningssrate. Mengden melke brukt ved befruktning er også å anse som i overskudd, tilsvarende minimum det dobbelte av det som var nødvendig for å få full befruktning (pers. kom. Helge Tveiten). Det var ingenting som tydet på at de forskjellige behandlingsmåtene av melke hadde noen påvirkning på befruktning av egg.

Befruktingsrate er en av parameterne som ble benyttet for vurdering av eggkvalitet. I dette forsøket ble befruktingsrate brukt som mål for andel aktiverte egg. Egg aktiveres imidlertid i kontakt med vann (Rosengrave et al., 2008) og kan gjennomgå en rekke steg i utviklingen før det stopper opp (Lee et al., 1999). For å evaluere eggets faktiske utviklingspotensiale er det derfor viktig å undersøke hvor stor andel av eggene som faktisk initerer celledeling. Evaluering av befruktingsrate ble gjort ca. 24 timer etter befruktning. Hastigheten på embryonalutviklingen hos fisk er temperaturavhengig (Velsen, 1980). Når vanntemperaturen er 8°C skal et befruktet lakseegg ha gjennomgått minst to celledelinger 24 timer etter befruktning (Vedlegg I). Befruktingsrate bør dermed heller angi andel egg med blastodisk som har gjennomgått celledeling, og ikke bare andel aktiverte egg. En slik tilnærming er i overensstemmelse med resultatene i dette forsøket der det ble funnet svært få korrelasjoner mellom befruktingsrate og videre utviklingspotensialet. Det var derimot signifikante korrelasjoner mellom andel som hadde gjennomgått minst to celledelinger og overlevelse ved gastrulasjon og øyerognstadiet. Andel overlevelse til øyerogn er en sikker indikator for eggkvalitet (Pavlov et al., 2009), da et egg som har nådd dette stadiet er robust og tåler mye (Jensen & Alderdice, 1989). Et befruktet egg når øyerognstadiet rundt 250 døgngrader etter befruktning (Velsen, 1980). I kommersiell stamfisk-produksjon av Atlantisk laks blir eggene ved dette stadiet shocket. Shocking av egg er en prosess som gjør at de ubefruktede eggene blir hvite, og kan lett plukkes ut fra eggbatchen (Leitritz & Lewis, 1980).

I dette forsøket ble ubefruktede egg fra Atlantisk laks lagret i 0, 24, 48 og 96 timer i ovarievæske, NaCl, Cortland-løsning og Cortland-løsning uten Ca²⁺. Egg ble lagret i kjøleskap med en temperatur på 4 ± 1°C. For lagring av ubefruktede egg bestemte vi oss for å benytte firkantete 300 ml flasker. I disse flaskene lå 250 egg fordelt på 2-3 lag. Komrakova & Holtz (2011) viste at egg fra Regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) som lå lagret i dekkete polyetylenposer hadde lavere befruktningsevne da egg lå i fire lag kontra to lag. Under svelling øker eggets vekt med omtrent 20%, og hvis det blir for mange lag med egg kan det resultere i at de nedre lagene dør pga. presset fra de øvre lagene (Leitritz & Lewis, 1980). Ved lagring av ubefruktede egg i kjøleskap ved denne temperaturen var det ingen stor forskjell i temperatur på vannet stamfisken var oppholdt (4 °C) i og lagringstemperaturen. Jensen & Alderdice (1984) viste at egg fra Ketalaks (*Oncorhynchus keta*) lagret ved 3°C forlenget levedyktigheten i opptil 125 timer sammenlignet med høyere temperaturer.

Overlevelse ved øyerognstadiet etter lagring av ubefruktede egg i ovarievæske hadde i dette forsøket et jevnt over bra resultat (Figur 11). Det var kun signifikant forskjell mellom 48 og 96 timer lagring av egg i ovarievæske pga. at ved 48 timer var det høyest overlevelse. Lagring av ubefruktede egg i ovarievæske ble som forventet høy da tidligere studier har vist at ubefruktede egg kan lagres i ovarievæske i flere dager uten å miste befruktningsevnen (Jensen & Alderdice, 1984; Withler & Morley, 1968). I vårt forsøk hadde ovarievæsken en liten, men signifikant økning i osmolalitet (Figur 14). En slik økning kan skyldes fordamping, men det kan også bety at egg har frigjort ioner eller andre substanser. Ovarievæske inneholder mye proteiner (Zadmajid et al., 2019), og en degradering av disse kan skyldes en større økning i osmolalitet i dette lagringsmediet. Fra 0 til 96 timer lagring av ubefruktede egg i ovarievæske økte osmolalitet med 1,7%. Osmolalitet i ovarievæske hos laksefisk ligger naturlig i området 252-290 mOsm kg⁻¹ (Lahnsteiner et al., 1995), og det var dermed ingen grunn til å tro at osmolalitet har påvirket eggkvalitet.

I kommersiell stamfisk-produksjon benyttes hovedsakelig fysiologisk saltløsning (0,9% NaCl) for å vaske ovarievæske bort fra egg, da den kan inneholde smittsomme agens som kan bli med en spermie inn i egget under befruktning (Rimstad et al., 2011). Hovedårsaken til at NaCl ble brukt som et lagringsmedium var for å undersøke hvilken effekt vasking av ubefruktede egg i dette mediet påvirket embryonalutviklingen, sammenlignet med vasking av ubefruktede egg i andre ioneløsninger: Cortland-løsning med og uten kalsium. Erdahl et al. (1987) har vist at ubefruktede egg lagret i 5-10 minutter i fysiologisk saltløsning ikke mistet befruktningsevnen. Resultater av vaskeprosessen i dette forsøket viste en høy befruktningssrate, og en litt lavere overlevelse ved øyerognstadiet – men fremdeles relativt høy overlevelses prosent. Ved evaluering av overlevelse etter vaskeprosessen var det egg vasket i Cortland-løsning som hadde høyest overlevelse, og skilte seg fra NaCl og Cortland-løsning uten Ca₂₊ med rundt 20%. Etter 24 timer lagring av ubefruktede egg i NaCl var det en kraftig nedgang i overlevelse ved øyerognstadiet. NaCl hadde en pH på rundt 7,5 som var langt lavere enn pH observert i ovarievæske hos laksefisk (Lahnsteiner et al., 1995). Aegerter & Jalabert (2004) sier at de fleste egg med dårlig kvalitet blir assosiert med der pH ovarievæske har vært på under 8. Denne forskjellen i pH mellom NaCl og de andre lagringsmediene er en faktor som ser ut til å ha påvirket eggkvaliteten for egg lagret i NaCl i 24 timer og lengre negativt.

Cortland-løsning er et medium som er basert på bestanddeler av serum fra ferskvanns-teleoster (Wolf & Quimby, 1969). Cortland-løsning inneholder de samme ionene som i ovarievæske (Zadmajid et al., 2019), men mangler blant annet ovarievæskeproteiner. Goetz & Coffman

(2000) benyttet Cortland-løsning med Hepes-buffer som et lagringsmedium for ubefruktede egg, og viste at egg beholdte sin befruktningsevne og embryonalutviklingen forble upåvirket etter lagring i opp til 48 timer. I tillegg viste de at proteiner i ovarievæsken ikke var nødvendig for å opprettholde befruktningsevnen til egg etter lagring i opp til flere dager i Cortland-løsning. Resultater fra vårt forsøk beviste også at ubefruktede egg kunne lagres i Cortland-løsning i opp til 48 timer og fremdeles beholde befruktningsevnen. Goetz & Coffman (2000) antar at lagring av ubefruktede egg i Cortland-løsning lengre enn 48 timer er mulig siden deres medium inneholder antibiotika. Antibiotika har vist å ha en forbedrende levedyktighet på lagrede egg, siden en bakteriell infeksjon kan være en begrensende faktor for lagring av ubefruktede egg i ovarievæske (Jensen & Alderdice, 1984). I vårt tilfelle ble det ikke benyttet antibiotika i ioneløsningene, da ioneløsningene ble laget med milliQ-vann (ionefritt/dH₂O). Overlevelse ved øyerognstadiet etter lagring av ubefruktede egg i 96 timer var betydelig lavere sammenlignet med overlevelse ved de tidligere lagringstidene. Egg lagret i 96 timer i Cortland-løsning hadde en gjennomsnittlig overlevelsesprosent på 27% ved øyerognstadiet, og var betydelig lavere sammenlignet med overlevelsesprosentene ved de tidligere lagringstidspunktene. I hovedsak er eggkvalitet knyttet til maternale faktorer (Brooks et al., 1997), og dermed var det nødvendig for oss å benytte egg fra flere fisk. I dette forsøket ble det observert relativt store variasjoner i overlevelse ved øyerognstadiet mellom egg fra de ulike hunnfiskene innenfor samme behandling. For egg lagret i Cortland-løsning var det en lavere overlevelse allerede ved 48 timer sammenlignet med egg fra de andre fiskene. Inkuberingsforhold er også en faktor som kan påvirke eggkvalitet (Brooks et al., 1997). Arbeid med tining av rør førte til at vannforsyningen inn i skuffene i klekkeskapet gikk ned pga. urenheter/grums. Arbeid med tining av rør ble gjort på det tidspunktet vi evaluerte overlevelse ved gastrulasjon. Siden det var korrelasjoner mellom egg som hadde gjennomgått celledeling og overlevelse ved gastrulasjon for alle mediene, var det ingen tegn på at denne kortvarige perioden der vannet var gromsete hadde negativ påvirkning på embryonalutviklingen.

Cortland-løsning uten kalsium (Ca²⁺) ble brukt som lagringsmedium i all hovedsak for å se hvilken betydning kalsium ville ha på embryonalutvikling hos egg fra Atlantisk laks. Kalsium er et viktig ion når det kommer til befruktning av egg (Lee et al., 1999). Før forsøket vårt var en av hypotesene at manglende kalsium i medier kunne ha effekter på svellegrad, spesielt i forhold til lagringstid. Svellegrad er også en parameter hvor eggkvalitet kan evalueres (Lahnsteiner & Patzner, 2002). Eggets svellegrad er knyttet til cortical reaksjonen. Egg fra Regnbueørret med høy kvalitet hadde et høyere vannopptak pga. fullstendig frigjøring av

innholdet i alveolene til det perivitelline rommet (Samarin et al., 2015). Når et egg aktiveres skjer det en rask økning i konsentrasjon av intracellulært kalsium, som er med på å sette i gang cortikal reaksjon (Murata, 2003). Egg aktiveres av penetrering av spermie, men egg kan også aktiveres i fravær av spemier (Lee et al., 1999) – da egg aktiveres i direkte kontakt med vann (Rosengrave et al., 2008). Selv om overlevelse ved øyrerognstadiet ble redusert utover lagringstidene, ble egg lagret i kalsiumfrie medier likevel aktivert og svelte. Lagring av ubefruktede egg i NaCl og Cortland-løsning uten Ca_{2+} over tid førte til økning i kalsiumkonsentrasjon i disse mediene (Figur 13). Denne økningen av kalsium tyder på at det har vært en «lekkasje» av kalsium fra eggens indre lager.

I ovarievæske og Cortland-løsning skjer det motsatte. Konsentrasjonen av kalsium i disse to lagringsmediene går ned, til tross for en økning i osmolalitet. Kalsiumkonsentrasjonen i ovarievæske er lavere sammenlignet med Cortland-løsning. Kalsiumkonsentrasjonen i ovarievæske flater ut etter 24 timer, mens for Cortland-løsning flater kalsiumkonsentrasjonen ut etter 48 timer lagring av ubefruktede egg. Disse utflatingene etter endring i kalsiumkonsentrasjoner kan spekuleres i at kalsium i egget er i et likevektsforhold med kalsium i det omgivende mediet.

Økningen i osmolalitet i NaCl og Cortland-løsning uten Ca_{2+} kan ha sammenheng med utskillelsen av kalsium fra eggene. Osmolalitet er en faktor som kan påvirke eggkvaliteten. Lav osmolalitet og lav pH i ovarievæske kan føre til lav befruktningsevne hos egg (Zadmajid et al., 2019). I Cortland-løsning uten Ca_{2+} var ikke lav pH et tilfelle da pH på forhånd var justert til 8,52, og var lik pH i ovarievæske hos laksefisk (Lahnsteiner et al., 1995). Forskjellen i osmolalitet mellom Cortland-løsning med og uten kalsium skyldes at det ikke ble kompensert med NaCl for fraværet av kalsium. Selv om osmolalitet og fraværet av kalsium er likt for NaCl og Cortland-løsning uten Ca_{2+} , så skilte Cortland-løsning uten Ca_{2+} seg fra NaCl med en høyere overlevelsesprosent over tid. Om disse forskjellene i overlevelse skyldes høyere pH og/eller innhold av andre ioner i Cortland-løsning uten Ca_{2+} er imidlertid ikke klart.

5 Konklusjon

Forsøket har vist at ubefruktede egg fra Atlantisk laks kan lagres i ovarievæske i opp til 96 timer uten å miste befruktningsevnen. Ubefruktede egg lagret i Cortland-løsning kunne lagres i opp til 48 timer uten å miste befruktningsevnen.

Det var klar sammenheng mellom celledeling 24 timer etter befruktning og overlevelse til gastrulasjon og øyerogn. Celledeling ved dette stadiet

Vask og lagring av egg i de ulike ioneløsningene viste at bortfall av kalsium i lagringsmediet hadde negativ effekt på embryonalutviklingen. Effekter av evt. andre spesifikke ioner, pH og osmolalitet kan også være faktorer som har påvirket eggkvalitet og utviklingspotensial under lagring.

Selv om det ikke var mulig i dette forsøket, ville en undersøkelse av sammensetningen av lagringsmediene med hensyn på ionesammensetning, proteiner og andre biomolekyler etter lagring av ubefruktede egg være interessant.

Referanseliste

- Aegerter, S., & Jalabert, B. (2004). Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 231: 59-71.
- Aslaksen, P. (2016, Desember 2). Fiksering. Hentet fra Store norske leksikon: <https://snl.no/fiksering>
- Bobe, J. (2015). Egg quality in fish: Present and future challenges. *Animal Frontiers*, 5: 66-72.
- Bobe, J., & Labbè, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative*, 165: 535-548.
- Brøgger, A. (2018, februar 20). Blastomerer. Hentet fra Store norske leksikon: <https://snl.no/blastomerer>
- Brooks, S., Tyler, C., & Sumpter, J. (1997). Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7: 387-416.
- Coward, K., Hibbitt, O., & Parrington, J. (2002). Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Fish Biology and Fisheries*, 12: 33-58.
- Cryogenetics. (2014, Januar). Hentet fra <http://s13704.pcdn.co/wp-content/uploads/2014/05/Januar-2014-Argang-1-Utgave-1-norsk.pdf>
- Erdahl, A., Cloud, J., & Graham, E. (1987). Fertility of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Gametes: Gamete Viability in Artificial Media*. *Aquaculture*, 60: 323-332.
- Gilbert, S. F. (2000). *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Ginatullina, E., Komrakova, M., & Holtz, W. (2018). Chilled storage of unfertilized and fertilized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs in sealed polyethylene bags at different temperatures. *Aquaculture*, 484: 214-218.
- Goetz, F. W., & Coffman, M. A. (2000). Storage of unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in artificial media. *Aquaculture*, 184: 267-276.
- Gorodilov, Y. N. (1996). Description of the early ontogeny of the Atlantic salmon, *Salmo salar*, with a novel system of interval (state) identification. *Environmental Biology of Fishes*, 47: 109-127.
- Havforskningsinstituttet. (2019, Mars 28). Tema: Laks. Hentet fra Havforskningsinstituttet: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/laks>
- Hock, P. (2018, september 11). Somitter. Hentet fra Store norske leksikon: <https://sml.snl.no/somitter>

- Hock, P. (2019, september 5). Mesoderm. Hentet fra Store norske leksikon:
<https://sml.snl.no/mesoderm>
- Jensen, J., & Alderdice, D. (1984). Effect of temperature on short-term storage of egg and sperm of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Aquaculture*, 37: 251-265.
- Jensen, J., & Alderdice, D. (1989). Comparison of Mechanical Shock Sensitivity of Eggs of Five Pacific Salmon (*Oncorhynchus*) Species and Steelhead Trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 78: 163 - 181.
- Johnsen, H. K. (2020, april 10). Osmometer. (C. V. Moen, Intervjuer)
- Kamler, E. (1992). *Early Life History of Fish: An energetics approach*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Kimmel, C., Ballard, W., Kimmel, S., Ullmann, B., & Schilling, T. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203: 253-310.
- Kinsey, W. H., Sharma, D., & Kinsey, S. C. (2007). Chapter 13: Fertilization and egg activation on fishes. P. Babin, J. Cerdà, & E. Lubzens, *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*, pp. 397-409. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Kjørsvik, E., Pittman, K., & Pavlov, D. (2004). Chapter 6: From Fertilisation to the End of Metamorphosis - Functional Development. E. Moksness, E. Kjørsvik, & Y. Olsen, *Culture of Cold-water Marine Fish*, pp. 204-278. Oxford: Blackwell publishing.
- Komrakova, M., & Holtz, W. (2011). Storage of unfertilized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg inn sealed polyethylene (PE) bags. *Aquaculture*, 313: 65-72.
- Kunz, Y. W. (2004). *Developmental Biology of Teleost Fishes*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Lahnsteiner, F., & Patzner, R. (2002). Rainbow trout egg quality determination by the relative weight increase during hardening: a practical standardization. *J. Appl. Ichthyol.*, 18: 24-26.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., & Patzner, R. (1995). Composition of the ovarian fluid in 4 salmonid species: *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta lacustris*, *Salvelinus alpinus* and *Hucho hucho*. *Reprod. Nutr. Dev.*, 35, 465-474.
- Lee, K. W., Webb, S. E., & Miller, A. L. (1999). A Wave of Free Cytosolic Calcium Traverses Zebrafish Eggs on Activation. *Developmental Biology*, 214: 168-180.
- Leitritz, E., & Lewis, R. (1980). *Trout and Salmon Culture (Hatchery Methods)*. California: UCANR Publication.
- Murata, K. (2003). *Blocks to Polyspermy in Fish: A Brief Review*. Davis.
- Nesheim, B.-I. (2019, mars 29). Sædcelle. Hentet fra Store norske leksikon:
<https://sml.snl.no/sædcelle>

- Nesheim, B.-I. (2020, mars 16). Ektoderm. Hentet fra Store norske leksikon:
<https://sml.snl.no/ektoderm>
- NMBU. (2017, juli 1). Zebrafish embryo development animation. Hentet fra Youtube:
<https://www.youtube.com/watch?v=8TsIJr8kQLc>
- Pavlov, D. A., Emel'yanova, N. G., & Novikov, G. G. (2009). Reproductive Dynamics. T. Jakobsen, M. J. Fogarty, B. A. Megrey, & E. Moksness, *Fish Reproductive Biology*, pp. 48-90. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Pavlov, D., Kjørsvik, E., Refsti, T., & Andersen, Ø. (2004). Chapter 5: Brood Stock and Egg Production. E. Moksness, E. Kjørsvik, & Y. Olsen, *Culture of Cold-Water Marine Fish*, pp. 129-203. Oxford: Blackwell Publishing.
- Pedersen, B. (2018, februar 20). Depresjon - fysikk. Hentet fra Store norske leksikon:
https://snl.no/depresjon_-_fysikk
- Rimstad, E., Dalsgaard, I., Hjeltnes, B., & Håstein, T. (2011). *Risikovurdering - stamfiskovervåkning og vertikal smitteoverføring*. Vitenskapskomiteen for mattrygghet.
- Robles, V., Cabrita, E., de Paz, P., & Herràez, M. (2007). Studies in chorion hardening inhibition and dechorionization in trout embryos. *Aquaculture*, 262, 535-540.
- Rosengrave, P., Taylor, H., Montgomerie, R., Metcalf, V., McBride, K., & Gemmell, N. (2008). Chemical composition of seminal and ovarian fluid of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility trails. I *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 152(1): 123-129.
- Samarin, A. M., Policar, T., & Lahnsteiner, F. (2015). Fish Oocyte Ageing and its Effect on Egg Quality. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23(3): 302-314.
- Vøllestad, A. (2019, Desember 3). Anadrom. Hentet fra Store norske leksikon:
<https://snl.no/anadrom>
- Velsen, F. (1980). *Embryonic Development in Eggs of Sockeye Salmon, Oncorhynchus nerka*. Ottawa: Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 49: 19 p.
- Withler, F., & Morley, R. (1968). Effects of chilled storage on viability of stored ova and sperm of sockeye and pink salmon. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, 25: 2695-2699.
- Wolf, K., & Quimby, M. (1969). Fish cell and tissue culture. *Fish Physiology*, 3: 253-305.
- Zadmajid, V., Myers, J. N., Sørensen, S. R., & Butts, I. E. (2019). Ovarian fluid and its impacts on spermatozoa performance in fish: A review. *Theriogenology*, 132: 144-152.

Vedlegg I

Tabell 1 – Embryonalutvikling i Sockeye lakse egg. Tiden det tar for å nå de ulike utviklingsfasene; celledeling, gastrulasjon og organogenese ved ulike temperaturer (Velsen, 1980).

Stage	Characteristics	Time to reach stage																					
		5°C		6°C		7°C		8°C		9°C		10°C		11°C									
		Hours	Degree-days	Hours	Degree-days	Hours	Degree-days	Hours	Degree-days	Hours	Degree-days	Hours	Degree-days	Hours	Degree-days								
1	Fertilized egg, no cell division	15	0.6	3	1.3	0.6	3	12	0.5	3	10	0.4	3	9	0.4	3	8	0.3	3	7	0.3	3	
2	Two cells	25	1.0	5	21	0.9	5	18	0.7	5	15	0.6	5	13	0.5	5	11	0.5	5	10	0.4	5	
3	Four cells	30	1.3	6	26	1.1	7	23	1.0	7	21	0.9	7	18	0.7	7	15	0.6	6	14	0.6	6	
4	Eight cells	39	1.6	8	33	1.4	8	29	1.2	8	25	1.0	8	21	0.9	8	18	0.8	8	16	0.7	7	
5	Sixteen cells	46	1.9	10	40	1.7	10	35	1.5	10	31	1.3	10	26	1.1	10	22	0.9	9	19	0.8	9	
6	Thirty-two cells	56	2.3	12	49	2.1	12	42	1.8	12	38	1.6	12	32	1.3	12	27	1.1	11	23	1.0	11	
7	Early morula, numerous visible cells	64	2.7	13	56	2.3	14	49	2.0	14	43	1.8	14	38	1.6	14	33	1.4	14	30	1.2	14	
8	Late morula	120	5.0	25	100	4.2	25	84	3.5	24	71	2.9	24	61	2.5	23	52	2.2	22	45	1.9	21	
9	Start of blastodisc expansion	185	7.5	38	153	6.4	38	128	5.3	37	108	4.5	37	(94)	3.9	35	(80)	3.3	33	(68)	3.7	41	
10	Blastula	(260)	9	46	200	8.3	50	179	7.5	52	160	6.7	53	(132)	5.5	49	(110)	4.6	46	(113)	5.8	64	
11	Terminal caudal bud	(310)	10	52	250	10	62	205	8.5	60	190	7.9	63	(164)	6.8	61	(133)	5.5	55	No data			
12	Rough outline of embryo	380	16	79	325	13	81	285	12	83	245	10	82	205	8.5	77	175	7.3	73	150	6.2	69	
13	1/3 epiboly, embryo clearly visible	550	23	115	450	19	112	380	16	111	310	13	103	280	12	105	235	9.8	98	212	8.8	97	
14	1/2 epiboly, first somites	600	25	125	515	21	129	440	18	128	345	14	115	320	13	120	280	12	117	233	9.7	107	
15	2/3 epiboly	630	26	131	550	23	137	470	20	137	375	16	125	340	14	127	290	12	121	250	10	115	
16	3/4 epiboly	670	28	140	580	24	145	505	21	147	390	16	130	375	16	141	328	14	137	280	12	128	
17	Blastopore closed																						
	<u>Organogenesis</u>																						
18	Caudal bud free	780	32	160	660	27	162	550	23	160	425	18	142	395	16	148	340	14	142	298	12	137	
19	Parts of brain district (metencephalon, myelencephalon)	805	33	165	670	28	167	(590)	25	172	455	19	152	(400)	17	150	(350)	15	146	325	13	149	
20	Heart beats	825	34	170	680	28	170	(625)	26	182	485	20	162	(440)	18	165	(365)	15	152	338	14	155	
21	Just eyed, 1/4 yolk vascularization	940	39	196	790	33	198	670	28	195	550	23	184	485	20	182	415	17	173	358	15	164	
22	2/3 yolk vascularization	1150	48	240	950	40	240	800	33	233	665	28	224	570	24	214	475	20	198	428	18	196	
23	Return of caudal blood supply to heart via only the cardinal veins																						
24	"Eyed", 3/4 yolk vascularization	1170	49	244	1030	43	258	895	37	261	780	32	256	740	31	277	645	27	269	530	22	243	
25	Caudal flexing, anal fin started	1280	53	265	1100	46	275	965	40	281	820	34	272	(740)	31	277	(650)	27	271	575	24	264	
26	Operculum covers part of first branchial arch, dorsal fin started	1500	62	310	1260	52	315	1060	44	309	910	38	304	(800)	33	300	(700)	29	292	740	31	339	
27	Myotome buds in dorsal fin, operculum covers first branchial arch	1680	70	350	1330	55	332	1160	48	338	990	41	328	(880)	37	330	(770)	32	321	820	34	374	
28	pelvic fin buds, indentation in embryonic finfold marks start of caudal fin	1720	72	360	1490	62	372	(1250)	52	365	1105	46	368	(950)	40	356	(780)	32	325	870	36	396	
29	Operculum covers second branchial arch, rays in caudal fin differentiating	(2040)	85	425	1620	67	405	(1650)	69	481	1210	50	400	(1200)	50	450	(1030)	43	429	910	38	418	
30	Hatching, operculum covers all arches 50% hatch	2510	105	523	2250	94	562	(1810)	75	528	1300	54	433	(1340)	56	502	(1170)	49	487	1030	43	472	
		2856	119	595	2550	106	636	2200	92	642	1920	80	640	1700	71	637	1500	62	625	1368	57	627	

Vedlegg II

Reagens	Konsentrasjon/innhold
Aqui-S	
Buffodin	
Eddiksyre	5% glacial eddiksyre i 0,9% NaCl
Etanol	70%: EtOH (100%) fortynnet med milliQ-vann
Cortland-løsning	NaCl: 36,26 g KCl: 1,90 g MgSO ₄ : 0,60 g CaCl ₂ : 1,66 g Glukose: 5,38 g Hepes: 25,05 g milliQ-vann: 5 liter
Cortland-løsning uten Ca²⁺	NaCl: 36,26 g KCl: 1,90 g MgSO ₄ : 0,60 g Glukose: 5,38 g Hepes: 25,05 g milliQ-vann: 5 liter
NaCl	0,95%: 45g NaCl i 5 liter milliQ-vann
Tricaine Pharmaq	

QuantiChrom™ Calcium Assay Kit (DICA-500) Quantitative Colorimetric Calcium Determination at 612nm

DESCRIPTION

CALCIUM is measured to monitor diseases of the bone or calcium regulation disorders. Increased calcium levels in serum are reported in hyperparathyroidism, metastatic bone lesions and hypervitaminosis, while decreased levels are observed in hypoparathyroidism, nephrosis, rickets, steatorrhea, nephritis and calcium-losing syndromes. Urinary calcium levels aid the clinician in understanding how the kidneys handle calcium in certain diseases of the parathyroid gland. Urinary calcium levels are also essential in the medical evaluation of kidney stones.

Simple, direct and automation-ready procedures for measuring calcium concentration in biological samples are becoming popular in Research and Drug Discovery. BioAssay Systems' calcium assay kit is designed to measure calcium directly in biological samples without any pretreatment. A phenolsulphonphthalein dye in the kit forms a very stable blue colored complex specifically with free calcium. The intensity of the color, measured at 612 nm, is directly proportional to the calcium concentration in the sample. The optimized formulation minimizes any interference by substances such as magnesium, lipid, protein and bilirubin.

KEY FEATURES

Sensitive and accurate. Use as little as 5 µL samples. Linear detection range 0.08 mg/dL (20µM) to 20 mg/dL (5mM) Ca²⁺ in 96-well plate assay. **Simple and high-throughput.** The procedure involves addition of a single working reagent and incubation for 3 min. Can be readily automated as a high-throughput assay for thousands of samples per day. **Improved reagent stability and versatility.** The optimized formulation has greatly enhanced reagent and signal stability. **Low interference in biological samples.** No pretreatments are needed. Assays can be directly performed on raw biological samples i.e., in the presence of lipid, protein and minerals such as magnesium, iron and zinc.

APPLICATIONS

Direct Assays: Ca²⁺ in blood, urine, saliva etc.
Drug Discovery/Pharmacology: effects of drugs on calcium metabolism.
Food and Beverages: calcium determination.
Environment: calcium determination in water and soil.

KIT CONTENTS (500 tests in 96-well plates)

Reagent A: 50 mL Reagent B: 50 mL Calcium Standard: 1 mL 20 mg/dL Ca²⁺

Storage conditions. The kit is shipped at room temperature. Store Reagent and Standard at 4°C. Shelf life: 12 months after receipt.

Precautions: reagents are for research use only. Normal precautions for laboratory reagents should be exercised while using the reagents. Please refer to Material Safety Data Sheet for detailed information.

PROCEDURES

Matrix in certain samples (e.g. whole blood) may interfere with the assay. For internal standard protocols, please see "Product FAQ" for this product at www.bioassaysys.com.

Procedure using 96-well plate:

- Dilute standards as follows. Transfer 5 µL diluted standards and samples into wells of a clear bottom 96-well plate. Store diluted standards at 4°C for future use.

No	STD + H ₂ O	Vol (µL)	Ca (mg/dL)
1	100µL + 0µL	100	20
2	80µL + 20µL	100	16
3	60µL + 40µL	100	12
4	40µL + 60µL	100	8
5	30µL + 70µL	100	6
6	20µL + 80µL	100	4
7	10µL + 90µL	100	2
8	0µL + 100µL	100	0

- Prepare enough working reagent by combining equal volumes of Reagent A and B. Add 200 µL working reagent and tap lightly to mix.
- Incubate 3 min at room temperature and read optical density at 570-650nm (peak absorbance at 612nm).

Procedure using cuvette:

- Set up test tubes for diluted standards and Samples. Transfer 15 µL diluted Standards and samples to appropriately labeled tubes.
- Add 1000 µL working reagent and vortex to mix. Incubate 3 min. Transfer to cuvet and read optical density at 612nm.

CALCULATION

Subtract blank OD (water, #8) from the standard OD values and plot the OD against Ca²⁺ standard concentrations. Determine the slope using linear regression fitting. Calcium concentration of the sample is calculated as

$$= \frac{OD_{\text{SAMPLE}} - OD_{\text{BLANK}}}{\text{Slope}} \quad (\text{mg/dL})$$

OD_{SAMPLE} and OD_{BLANK} are OD_{612nm} values of sample and sample blank (water or buffer in which the sample was diluted).

Conversions: 1 mg/dL Ca²⁺ equals 250 µM, 0.001% or 10 ppm.

MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

Pipeting devices and accessories (e.g. 5 µL).

Procedure using 96-well plate:

Clear bottom 96-well plates (e.g. Corning Costar) and plate reader.

Procedure using cuvette:

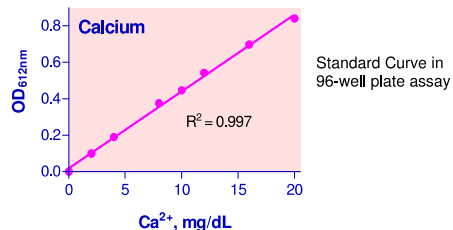
Cuvets and Spectrophotometer for measuring OD_{612nm}.

GENERAL CONSIDERATIONS

EDTA and other Ca²⁺ chelators interfere with this assay. This assay can not be applied to plasma samples obtained with EDTA.

EXAMPLES

Samples were assayed in duplicate using the 96-well plate protocol. The Ca²⁺ values (mg/dL) were 8.5 ± 0.4 (rat serum), 6.5 ± 0.3 (human serum), 7.6 ± 0.1 (goat serum), 11.1 ± 1.0 (Invitrogen fetal bovine serum), 2.5 ± 0.4 (fresh human urine), 41.3 ± 0.5 (Kirkland 2% reduced fat milk), 5.0 ± 0.0 (tap water, Hayward, CA), 0.86 ± 0.07 (tap water, San Bruno, CA), 1.8 ± 0.1 (Crystal Geyser natural alpine spring water), 2.3 ± 0.1 (Coca-cola® classic coke), 0.04 ± 0.01 (Lipton Lemon iced tea), 0.52 ± 0.07 (soil extract. 5.6 g of Hayward, CA soil was extracted with 10 mL MilliQ water. The supernatant was centrifuged to remove any insoluble particles. Clear supernatant was assayed).



PUBLICATIONS

- Carmela, T.M. et al. (2007). Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing staphylococcus aureus cells. *Antibacterial Agents and Chemotherapy* 51 (12): 4255–4260.
- Hernandez, L. (2007). The antiproliferative role of ERG K+ channels in rat osteoblastic cells. *Cell Biochem Biophys* 47:199–208.
- Meggan, E. et al. (2007). Vitamin D receptor-dependent inhibition of mammary tumor growth by EB1089 and ultraviolet radiation *in vivo*. *Endocrinology* 148(10):4887–4894.

Vedlegg VI

Tabell 1 – Befruktningsrate og celledeling

	Ovarievæske		NaCl		Cortland-løsning		Cortland-løsning u/ Ca ²⁺	
	r	p-verdi	r	p-verdi	r	p-verdi	r	p-verdi
0	0,68	0,06	0,32	0,45	0,75	0,03	-0,04	0,93
24	0,06	0,88	< 0,001	0,99	0,60	0,11	-0,56	0,15
48	0,90	0,002	0,34	0,40	-0,24	0,56	-0,13	0,77
96	0,46	0,25	0,01	0,98	0,34	0,40	-0,40	0,32

Tabell 2 – Befruktningsrate og gastrulasjon

	Ovarievæske		NaCl		Cortland-løsning		Cortland-løsning u/ Ca ²⁺	
	r	p-verdi	r	p-verdi	r	p-verdi	r	p-verdi
0	0,68	0,059	0,27	0,52	0,73	0,04	-0,07	0,86
24	0,01	0,97	-0,003	0,99	0,58	0,12	-0,65	0,084
48	0,79	0,02	0,32	0,42	-0,26	0,51	-0,01	0,97
96	0,45	0,25	0,06	0,88	0,38	0,35	-0,41	0,3

Tabell 3 – Befruktningsrate og øyerogn

	Ovarievæske		NaCl		Cortland-løsning		Cortland-løsning u/ Ca ²⁺	
	r	p-verdi	r	p-verdi	r	p-verdi	r	p-verdi
0	0,51	0,20	0,32	0,43	0,76	0,03	0,01	0,98
24	0,25	0,54	0,12	0,78	0,62	0,09	-0,58	0,13
48	0,63	0,09	0,76	0,03	-0,21	0,61	-0,22	0,6
96	0,34	0,41	-	0,49	0,41	0,31	-0,46	0,25

Tabell 4 – Celledeling og gastrulasjon

	Ovarievæske		NaCl		Cortland-løsning		Cortland-løsning u/ Ca ²⁺	
	r	p-verdi	r	p-verdi	r	p-verdi	r	p-verdi
0	0,99	< 0,001	0,97	< 0,001	0,99	< 0,001	0,99	< 0,001
24	0,99	< 0,001	0,98	< 0,001	0,96	< 0,001	0,96	< 0,001
48	0,97	< 0,001	0,98	< 0,001	0,97	< 0,001	0,97	< 0,001
96	0,97	< 0,001	0,95	< 0,001	0,99	< 0,001	0,98	< 0,001

Tabell 5 – Celledeling og øyerogn

	Ovarievæske		NaCl		Cortland-løsning		Cortland-løsning u/ Ca ²⁺	
	r	p-verdi	r	p-verdi	r	p-verdi	r	p-verdi
0	0,88	0,003	0,99	< 0,001	0,89	0,003	0,99	< 0,001
24	0,95	< 0,001	0,96	< 0,001	0,98	< 0,001	0,88	0,003
48	0,83	0,009	0,44	0,28	0,95	< 0,001	0,94	< 0,001
96	0,91	0,002	-	0,66	0,96	< 0,001	0,91	0,001

Tabell 6 – Gastrulasjon og øyerogn

	Ovarievæske		NaCl		Cortland-løsning		Cortland-løsning u/ Ca ²⁺	
	r	p-verdi	r	p-verdi	r	p-verdi	r	p-verdi
0	0,89	0,003	0,95	< 0,001	0,88	0,004	0,99	< 0,001
24	0,96	< 0,001	0,92	0,001	0,94	< 0,001	0,78	0,02
48	0,88	0,003	0,31	0,46	0,89	0,003	0,89	0,003
96	0,81	0,01	-	0,67	0,96	< 0,001	0,89	0,002

