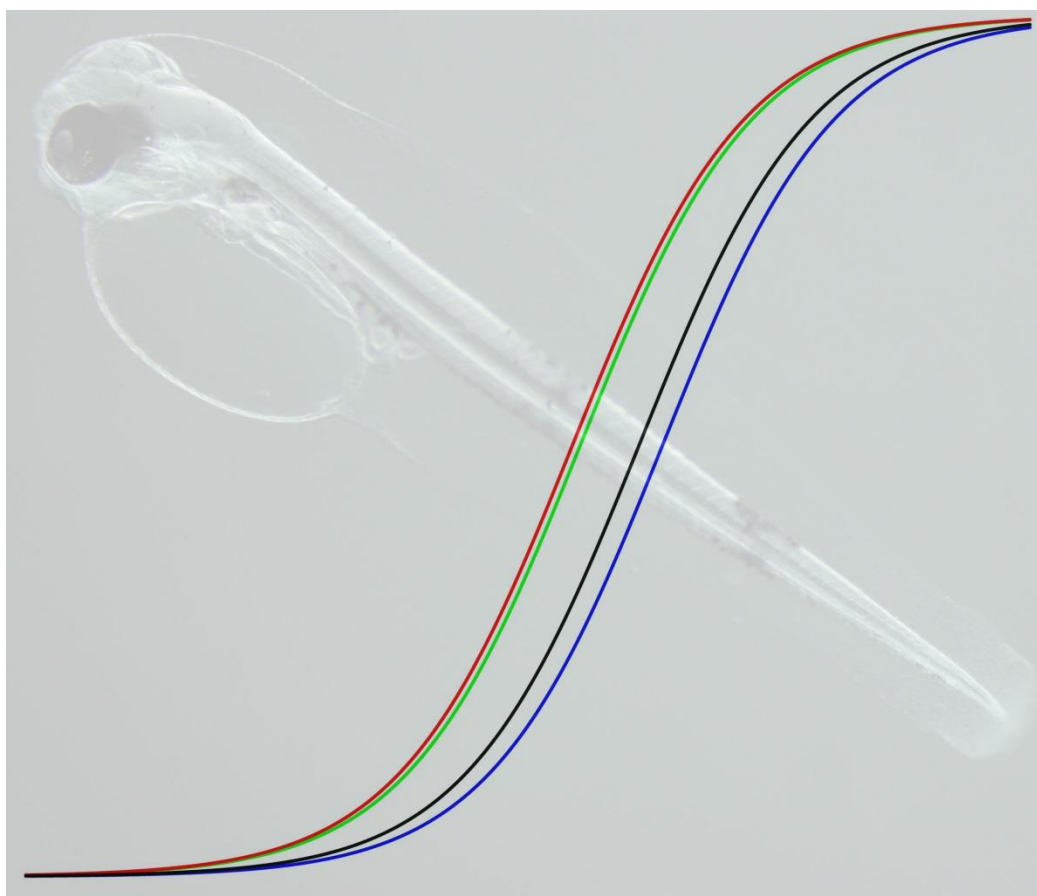


Triploidisering av Atlantisk torsk (*Gadus morhua*); effekt av varierende hydrostatisk trykk og trykktidspunkt på triploiditet, samt konsekvenser for utvikling.



Av
Benedicte Nordhus



Master i Havbruksbiologi
Institutt for Biologi
UNIVERSITETET I BERGEN
Oktober 2013

Forside: Grafisk framstilling av sannsynligheten for triploiditet i torsk, ved økende trykk og ulike tider etter befruktning samt bilde av torskelarve rett etter klekking (foto: Trine Haugen).

Forord

Først og fremst ønsker jeg takke mine tre veiledere, professor Jon Vidar Helvik, Dr. Trine Haugen og Dr. Anders Mangor Jensen. Takk for en spennende og utfordrende oppgave samt god veiledning underveis. En spesiell takk rettes også til ansatte ved forskningsstasjon Austevoll (Havforskningsinstituttet) og forskningsstasjon Parisvatnet (Havforskningsinstituttet) for lån av utstyr og hjelp under stryking av stamfisk.

Videre vil jeg takke mine medstudentene på lesesalen for godt selskap gjennom hele masterstudiet. En spesiell takk rettes til Ida og Charlotte for gode stunder med mye latter og kaffepauser, som har gitt et avbrekk i en ellers hektisk hverdag. Vil også takke Catrine og Lene, som fast inventar i frokostgjengen, for lange samtaler og en god start på dagen.

Spesiell takk til Knut Helge Jensen (UiB) for gode råd og programmering med R og Craig Morton (Havforskningen) for super veiledning ved bruk av flowcytometri og for din måte og forklare kompliserte ting enkelt. En takk rettes også til Lene Kleppe (Havforskningen) for råd innenfor oppsett av celledeling og Ragnhild Valen for *in situ* hybridisering av larver samt gode råd på labben.

Takk til Janne Håland for gjennomlesing av innledning samt Ida-Katrin Gjerstad Nerbøvik og Charlotte Finstad Asserson for korrektur lesning av oppgaven.

Takker også min samboer Stig for god støtte og datasupport. Du betyr alt for meg og din støtte har vært uvurderlig! Sist men ikke minst vil jeg takke mamma og pappa for ros og flybilletter hjem til Stavanger.

Sammendrag

Flere av utfordringene i norsk torskeoppdrett, er direkte eller delvis knyttet opp mot fiskens kjønnsmodningsfase. Kjønnsmodning fører blant annet til redusert appetitt og vekt, dårligere filetkvalitet samt høyere dødelighet. I tillegg er kjønnsmodningsfasene knyttet til velferdsmessige problemer som gytespreng. En annen utfordring er genetisk spredning, enten via rømming eller direkte gyting i merd. Produksjonen av steril fisk kan derfor være et effektivt middel for å unngå problemer knyttet til kjønnsmodning og for å hindre genetisk spredning ved rømming. Produksjon av triploider er så langt den mest praktiske, økonomiske og effektive metoden for storskala produksjon av steril fisk.

Det foreliggende arbeidet har undersøkt effekten av trykk og tid etter befruktning på triploidisering. I tillegg er det blitt undersøkt om disse parameterene har en effekt på dødelighet, celledeling, epiboli og antallet fotoreseptorer i retina ved klekking. Triploidiseringseksperimentet ble bygget opp som en matrise bestående av 24 grupper som ble indusert for trykk-sjokk av ulik styrke og ved ulike tidspunkt etter befruktning. Gruppene trykket med 1 bar, fungerte som kontrollgruppe. Behandlingstiden tilsvarte 5 min for alle gruppene og temperaturen ble holdt stabil (6 °C), under hele det praktiske forsøket. Alle eggene ble inkubert ved identiske miljøforhold fram til klekking.

Flowcytometrianalyser av ploiditet viste en signifikant effekt av både trykk og tid etter befruktning, hvor tiden spilte en betydelig rolle ved 400 bar, men viste ingen effekt når trykket økte til 600 bar. Studier av cellemorfologi ved fjerde til åttende celledelingsstadiet viste en signifikant effekt av trykk, hvor økt trykk resulterte i en større andel asymmetri og ubefruktede egg. Utviklingshastigheten (celledeling) ser ikke ut til å påvirkes av trykket eller ploiditet, da gjennomsnittlig antall blastomerer i hver gruppe ikke gav noen signifikant forskjell. Generelt ser det ut som at utviklingshastigheten av embryo, målt som dekningsgraden av epiboli ved 95 timer etter befruktning heller ikke er påvirket av trykk og triploidisering, men gruppene som ble trykket 10 og 40 minutter etter befruktning viste en redusert utviklingshastighet ved økende trykk. I tillegg ble det målt en signifikant mindre eggdiameter når trykket økte. Analyser i larvefasen viste at triploide larver rett etter klekking hadde en signifikant effekt av ploiditetsstatusen, hvor de triploide individene var representert med færre fotoreseptorceller enn diploide.

Studiet viser at hydrostatisk trykk på 600 bar er en effektiv metode for å triploidisere torsk, men våre data indikerer også at dette høye trykket kan ha negative effekter på tidlig celledeling og dødelighet. Siden høyt trykk ser ut til å ha en negativ effekt på utviklingen, bør dette tas hensyn til ved optimalisering av trykkbehandling. Den beste strategien vil være å bruke lavest mulig trykk, som fremdeles gir fullverdig triploid status. Fra vår modell kan vi predikere at et trykk mellom 400 og 500 bar og et tidspunkt på ca 26 minutter etter befruktning vil gi en høy grad av triploiditet og mindre negativ effekt på utvikling. Siden våre forsøk brukte helsøsken egg vet vi ikke hvordan genetisk variasjon vil påvirke dette vinduet. Videre forskning vil derfor være nødvendig for å verifisere om dette er optimal trykkbehandling for torsk.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	5
1. Innledning	9
1.1 Torskens generelle biologi	9
1.2 Torsk i oppdrett	9
1.3 Problematikk og konsekvenser knyttet til kjønnsmodning i oppdrett	10
1.4 Triploidisering	11
1.4.1 Metoder benyttet for triploidisering	12
1.4.2 Induksjon av triploiditet hos fisk (fig. 1).....	12
1.4.3 Bestemmelse av polyploiditets nivå (antall kromosom sett)	14
1.4.4 Konsekvensen av å være triloid.....	14
1.5 Meiose og oogenese	16
1.5.1 Oogenese	17
1.5.2 Polarlegemet.....	17
1.5.3 Trykkpåvirkning på mikrotubuler	18
1.6 Utvikling av embryo.....	19
1.6.1 Øyet	21
1.7 Mål med prosjektet (hypotese utvikling):.....	22
2. Material og Metode:	23
2.1 Forsøk 1; Triploidisering:.....	23
2.1.1 Eksperimentell design	23
2.1.2 Prøveuttak (fra inkubering frem til klekking).....	26
2.1.3 Flowcytometri analyse:	31
2.1.4 Celledelings analyse:.....	32
2.1.5 Epibololi analyse	33
2.1.6 <i>In situ</i> hybridiserings analyse	34
2.1.7 Statistiske analyser	35
2.2 Forsøk 2; polarlegemets utskillelse:	36
2.2.1 Eksperimentell design	36
3. Resultater:.....	38
3.1 Befruktningsprosent i egg-gruppen i perioden trykkforsøkte varte.....	38
3.2 Dødelighet i inkuberingsfasen	39
3.3 Celledeling.....	40

3.3 Epiboli	43
3.4 Flowcytometri	45
3.5 Utskillelse av polarlegemet.	48
3.6 Farging av fotoreseptorer i retina:	50
4. Diskusjon.....	51
4.1 Diskusjon av material og metode.	51
4.2 Diskusjon av resultater	55
4.3 Konklusjon og fremtidsperspektiver:	62
Referanser:.....	64
6. Vedlegg:	69
Vedlegg 1. Beskrivelse av statistikk.....	69
Vedlegg 2. Data fra flowcytometri analyse	72
Vedlegg 3. Estimering av befruktningsprosent:	73
Vedlegg 4. Data fra måling av dødelighet.....	74
Vedlegg 5. Data fra celledeling.	75
Vedlegg 6. Data over eggdiameter og epiboli	76
Vedlegg 7. Omgjøring av enheter	83
Vedlegg 8. Oppskrifter på løsninger benyttet i dette masterarbeidet	86
Vedlegg 9. Protokoll for <i>In situ</i> hybridisering.....	87

1. Innledning

1.1 Torskens generelle biologi

Atlantisk torsk (*Gadus morhua*) har et stort utbredelsesområde fra den nordamerikanske kystlinjen, Øst og vestkysten av Grønland, Island, samt hele kysten av Nord-Europa. Miljøet er variabelt og faktorer som temperatur kan variere fra under 0 °C til 20 °C. Tross store temperaturvariabler, finner man vanligvis torsk ved temperaturer mellom 1-12 °C. (Taranger *et al.*, 2010).

Torskens livssyklus kan deles in i fire stadier: egg- og larvestadiet, det pelagiske yngelstadiet, perioden fra bunnslåing til kjønnsmodning og det kjønnsmodne stadiet. Eggene gytes porsjonsvis med ca. 2-3 dagers mellomrom (Thorsen, 2005) fordelt på ca. 15-20 porsjoner per fisk (Kjesbu *et al.*, 2005). Eggene er pelagiske og flyter rundt i de øvre vannlagene. Selve klekkingen skjer vanligvis etter 10 dager ved 7 °C, men er sterkt temperaturavhengig, og ved 2,5 °C vil prosessen ta opptil fire uker. De første ukene av yngelstadiet ernærer larven seg av plommesekken. Deretter lever den på dyreplankton, eksempelvis hjuldyr og copepoder. Yngelen søker mot bunnen først i juni og videre utover året, alt etter miljø og næringsforhold (Øiestad, 2005). Kjønnsmodning er også sterkt påvirket av næringstilgang og miljøforhold. Det er derfor en stor variasjon i både vekst og alder ved kjønnsmodning for torsk. Vanligvis starter hunntorskens modning allerede på høsten og gytetiden er vanligvis mellom januar og april (Brander, 2005).

1.2 Torsk i oppdrett

Den Atlantiske torsken er en av de viktigste kommersielle fiskeartene i Nord-Atlanteren (Bekkevold *et al.*, 2006) og kyst-Norge har vært avhengig av dens tilstedeværelse i generasjoner. Norge har lange tradisjoner innen fangst, bearbeiding og omsetting av torsk og dette har vært med på å prege bosettingsmønster, infrastruktur og sysselsetting langs kysten (Øiestad, 2005). En sterk nedgang i torskefiske i 1870 førte til et oppsiktsvekkende arbeid med klekking av torskerogn og utsetting av larver langs kysten. Ideen ble utarbeidet av sjøkaptein Gunnar M. Dannevig som støttet seg til en av datidens store havforskere, Georg O. Sars og viste til lignende forsøk som var satt i gang i USA. Dette arbeidet dannet grunnlaget for torskeoppdrett, slik vi kjenner den i dag. (Øiestad, 2005).

Oppdrett av torsk har vært preget av opp- og nedturer. I tillegg til lav og ustabil yngelproduksjon, har næringen vært plaget av sykdomsutbrudd (vibriose og francicella), massedød i anlegg, dårlig kvalitet på fisk, tap på grunn av rømming, predatorer i form av sel

mink og oter, samt relativt lave markedspriser (Norges forskningsråd og Innovasjon Norge, 2006).

Det er likevel gjort store fremskritt med tanke på kommersialisering av intensiv yngelproduksjon av torsk. Det er imidlertid slik at etterspørsel og pris for oppdrettstorsk delvis er styrt av kvotene på villfanget torsk. For å sikre langsiktig torskeoppdrettsnæring, er det derfor helt nødvendig å løse utfordringene som er knyttet opp mot produksjonskostnadene. Dette innebærer utfordringer som rømming, deformiteter, tidlig kjønnsmodning og sykdommer. Tross finanskrisen og økonomiske utfordringer hadde likevel «Stoltenberg 2 regjeringen» fortsatt tro på torskeoppdrett som en del av Norges fremtidige verdiskapning langs kysten. I den forbindelse foreligger det en plan frem til 2020 som innbefatter næringens fremtid. Ifølge Plan for koordinert satsing på torsk trengs en effektivisering og nytenkning om torskens fremtid skal være sikret (Norges forskningsråd Innovasjon Norge og Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond, 2009).

1.3 Problematikk og konsekvenser knyttet til kjønnsmodning i oppdrett

Flere av utfordringene som er relatert til norsk torskeoppdrett per i dag, er direkte eller delvis knyttet opp mot fiskens kjønnsmodningsfase. Kjønnsmodning kan ha store konsekvenser for viktige produksjonsparametere, som blant annet appetitt, vekst, filet kvalitet, overlevelse, men også innenfor helse og velferd (Taranger *et al.*, 2010).

Nesten en måned før gyting er det naturlig at torsk mister appetitten, eller reduserer forinntaket kraftig i $\frac{3}{4}$ av gytesesongen (Fordham og Trippel, 2002, Skjæraasen *et al.*, 2004). Energi som brukes for å opprettholde adferd og gonadeutvikling er drevet av lagret energi fra muskler og lever (Dambergs, 1964). Resultatet er en vektreduksjon på 30-35 prosent og kroppsmassen som måles i januar vil vanligvis ikke gjenvinnes før i juni. (Karlsen *et al.*, 2006a, Taranger *et al.*, 2006). Energien torsk bruker under reproduksjon kan også resultere i en betydelig reduksjon i filetkvaliteten, hvor flere studier har registrert et lavere innhold av både fett og proteiner, samtidig med en parallell økning av vann under gyting (Dambergs, 1964, Kjesbu *et al.*, 1991, Kjesbu, 1991, Karlsen *et al.*, 2006a).

Dødeligheten i forbindelse med gyting er varierende, men ser ut til å ramme hunnfisk hardere enn hannfisk. Dette skyldes ofte problemer som uregelmessig gyting. Hunnen investerer mye energi i reproduksjonsprosessen uavhengig av hennes egen tilstand. Det betyr at hvis den generelle tilstanden er dårlig, er det også en høyere risiko for at påkjenningene fra

reproduksjonen vil få dødelighet utfall (Lambert og Dutil, 2000). Torsk som er vokst opp i fangenskap får ofte problemer med gyterytmene (irregulære gytere). Hvis hunntorsken ikke klarer å frigjøre eggene til riktig tid, vil modne egg samle seg opp i gonadene (gytespreng) og fisken blir da svært oppsvulmet (Árnason og Björnsson, 2012). Eventuelle egg fra disse individene vil stort sett være ubrukelige og overmodne egg (Kjesbu, 1989). En del av disse individene vil da dø i løpet av gytingen, som en følge av gytespreng. Hva årsakene er til at hunntorsk utvikler irregularitet i gytingen er ikke klarlagt (Árnason og Björnsson, 2012), men man tror stress er en viktig faktor (Thorsen *et al.*, 2003).

Tidlig kjønnsmodning kan også øke risikoen for genetisk spredning via rømming, ved at oppdrettstorsken kan gyte med ville stammer. Innblanding av rømt oppdrettslaks (*Salmo salar* L.) i vill-laks bestander vil føre til en introgresjon hybridisering, som kan føre til en fitness reduksjon i den ville bestanden (McGinnity *et al.*, 2003, Araki *et al.*, 2007). Det er derfor en risiko for at også rømt oppdrettstorsk kan skape en uønsket introgresjon i ville lokale bestander (Bekkevold *et al.*, 2006). Et tilleggsproblem med torsk, er at de gyter i merden og kan dermed frigjør befruktet og overlevelsesdyktig avkom til omgivelsene utenfor merden (Jørstad *et al.*, 2008).

1.4 Triploidisering

Steril fisk kan være et effektivt middel for å unngå problemer som er knyttet opp mot for tidlig kjønnsmodning, eksempelvis ved å unngå negative effekter på produksjonsresultatet, men også med tanke på fiskens helse og velferd. I tillegg vil man også kunne unngå genetisk innblanding fra fiskeoppdrett på ville populasjoner både ved rømming eller ved direkte gyting i merd (Taranger *et al.*, 2010, Ghigliotti *et al.*, 2011). Indusert triploidisering er en bredt akseptert metode for sterilisering av fisk og er foreløpig den eneste effektive metoden som er praktisk tilgjengelig i akvakultur (Benfey, 1999, Taranger *et al.*, 2010). Triploider har et ekstra kromosom sammenlignet med diploid fisk. Dette fører til komplikasjoner ved celledeling når foreldrefiskens tre kromosomer skal fordeles på kjønnsceller under reduksjonsdeling. Triploide er derfor funksjonelt sterile fordi de ikke kan produsere et balansert sett med kromosomer i celledelingen (Hansen *et al.*, 2012). Triploid hunnfisk vil vanligvis utvikle små gonader og unngår utvikling av kjønnskarakterer. Hannfisk kan derimot utvikle store gonader og vise utvikling av sekundære kjønnskarakterer som produksjon av inaktive spermiceller. Det er derfor fordelaktig å kombinere en triploid steril fisk med en «all female» populasjon (Taranger *et al.*, 2010), fordi man på denne måten kan

unngå problematikk som er knyttet til kjønnsmodning og fisken kan benytte all sin energi på vekst fremfor kjønnsmodning og reproduksjon.

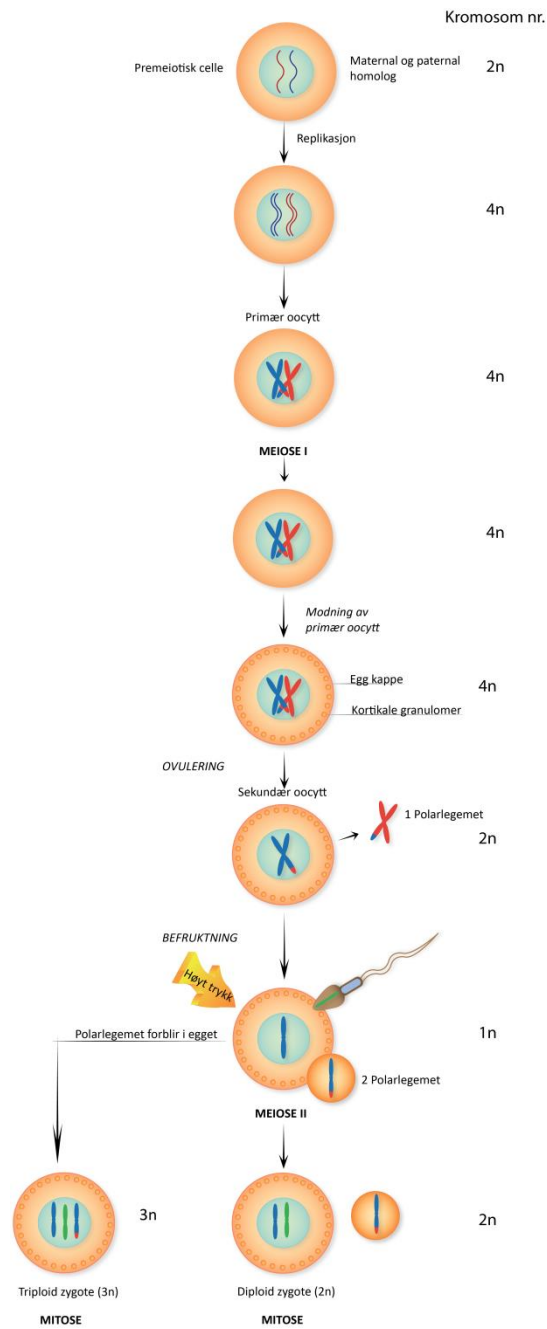
Bruk av triploidisering er først og fremst utbredt på planter (steinfri frukt) som banan, eple, sitrusfrukt og sukkerroe. Hovedgrunnen til dette, er at polyploide planter er assosiert med større celledørrelse eller bedre sykdomsresistens og kan dermed benyttes til å øke produktiviteten (Piferrer *et al.*, 2009). Metoden er også utbredt på flere ulike skjell og fiskearter (hovedsakelig ferskvannsfisk, men også flere marine arter) i oppdrett. Den ytre befruktningen og frigjøringen av eggceller i vannet, gjør dem spesielt velegnet for triploid induksjon (Taranger *et al.*, 2010). Selv om mange marine pelagiske gytende fisk er funnet egnet for triploidisering, ser man at avkommets størrelse og sårbarhet kan gjøre prosessen mer krevende enn for ferskvannsfisk (Planas og Cunha, 1999).

1.4.1 Metoder benyttet for triploidisering

Det finnes flere ulike måter å gjøre fisk triploid. Fysiske metoder inkluderer bruk av temperatursjokk (varme, kulde) eller hydrostatisk trykk (Piferrer *et al.*, 2009), men behandling med ulike kjemikalier har også vært benyttet. Hensikten med de ulike metodene er å påvirke mikrotubulene og dermed celledeling og forstyrre polar legemets utskillelse. Av disse metodene er det temperatursjokk og hydrostatisk trykk som praktiseres mest, ettersom de gir best resultater og kan brukes i store kvanta uten for store kostnader (Taranger *et al.*, 2010). Flere studier har vist at hydrostatisk trykk på nybefruktede egg er den beste metoden for triploidisering av Atlantisk torsk (Trippel *et al.*, 2008) og er derfor benyttet i dette studiet. De underliggende mekanismene for triploidisering via trykkbehandling er ennå lite forstått, men kan trolig skyldes trykkets effekt på eggets plasma membran (oolemma/zona pellucida), som igjen øker motstanden for polarlegemets utskillelse og/eller påvirke det meiotiske spindelets formasjon i egget (Piferrer *et al.*, 2009)

1.4.2 Induksjon av triploiditet hos fisk (fig. 1)

Ved gyting er eggene arrestert i metafasestadiet av andre meiose (meiose II). Når eggene kommer i kontakt med vann, vil det skje en kortikal reaksjon som fører til eggene vil svelle. Ved befruktning vil et spermatozoon passere gjennom mikropylen og føre til en gjenopptagelse av andre meiose, hvor en del av morfiskens arvemateriale vanligvis skilles ut i form av det andre polarlegemet. Induksjon av hydrostatisk trykksjokk i denne perioden kan bidra til å undertrykke celledeling og forhindre ekstrudering av polarlegemet. Dette resulterer i to kromosomsett fra mor og ett fra far (XXX eller XXY).



Figur 1: Illustrasjon over mekanismene bak triploid induksjonen sammenlignet med «normal» diploid meiose. (Laget i Illustrator CS6) modifisert fra (Lodish *et al.*, 2007)

Det er tre hovedvariabler som er viktig med tanke på effektiviteten av trykkbehandling. Disse er tiden fra befruktning til induksjon, intensiteten og varigheten av trykksjokket (Felip *et al.*, 1997).

Biologiske variabler kan også spille en sentral rolle for utfallet av trykkbehandling, hvor for eksempel kvaliteten på eggene kan ha en stor betydning (Piferrer *et al.*, 2009). Komen og Thorgaard (2007) viste at noen faktorer i eggene, som fettsyresammensetningen i marin fisk kan forbedre befruktning og overlevelsen i yngel og kan derfor også ha en effekt på

overlevelse etter temperatur- eller trykksjokk. Tid for ovulering er også en viktig faktor, hvor gyting utenfor det optimale vinduet kan føre til gyting av umodne eller overmodne egg. Overmodne egg kan blant annet føre til konsekvenser som ustabile meiotiske spindler (Komen og Thorgaard, 2007) og kan dermed også påvirke utfallet av en triploidisering.

1.4.3 Bestemmelse av polyploiditets nivå (antall kromosom sett)

Det er brukt ulike metoder for bestemmelse av antall kromosomer. Metodene kan være direkte i form av bestemmelse av karyotype, måling av DNA innhold, genotypisk bestemmelse av mikrosatellitt DNA markører eller Nucleolar-Organising Region (NOR) analyser. De kan også være indirekte ved i måling av kjerne eller cellestørrelse. Denne indirekte formen for måling lar seg gjøre på grunn av at triploide celler er utstyrt med et ekstra maternalt kromosom hvor både cellen og cellekjernen er større sammenlignet med diploide celler (Ihssen *et al.*, 1990). En enkel og billig indirekte metode som har vært utbredt ved ploiditets bestemmelse, er derfor måling av erytrocyttens volum (Benfey og Sutterlin, 1984b, a, Benfey, 1999). Ved en mer presis bestemmelse, trenger man en mer direkte metode som måling av DNA innholdet ved å bruke flowcytometri (Allen, 1983) og det er denne metoden som er benyttet i dette studiet.

1.4.4 Konsekvensen av å være triloid

Det har blitt utført en rekke fysiologiske og adferdsmessige undersøkelser på effekten av triploidisering hos fisk og er blant annet omtalt i Benfey (1999). Oppdaterte resultater innenfor reproduksjon, overlevelse, vekst, adferd, er blant annet å finne i Piferrer *et al.* (2009). deformitet, hematologi (læren om blodet), kropp og filetkvalitet, og immunologi mfl. (Benfey, 1999, Tiwary *et al.*, 2004, Maxime, 2008, Piferrer *et al.*, 2009). I teksten vil det kun bli lagt vekt på dokumenterte ulikheter i triploid og diploid fisk som har relevans for resultatene som er presentert i denne oppgaven. Det er viktig å ta hensyn til at ytelsen til triploider er vel dokumentert innenfor laboratorisk skala, men ikke like utfyllende når det gjelder produksjons nivå (Piferrer *et al.*, 2009). Likevel er det blitt gjort noen fullskala prosjekt på laks som for eksempel EU-prosjektet AIR CT942216 og SALMOTRIP prosjektet, hvor det er blitt gjennomført flere fullskalaforsøk. I tillegg pågår det storskala utprøving av triploide familier i det nasjonale torskeavlprogrammet ved Nofima i Tromsø og ved forskningsstasjonen Parisvatnet i Øygarden (Havforskningen) som skal bli fulgt opp til slakting i merder i kommersielle torskeanlegg (Hansen *et al.*, 2012).

Dødelighet/ overlevelse

Det er rapportert om høyere dødelighet hos triploider i både kommersielle og eksperimentelle studier på Atlantisk laks (McGeachy *et al.*, 1995). Likevel er den registrerte dødeligheten ofte innenfor kommersielt akseptable nivåer, med høyeste dødelighet ved embryo- og larvestadiet før første fôring (Johnson *et al.*, 2004). Liknende resultater er også presentert for andre arter som regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Chourrout, 1984) og havabbor (*Moronidae*) (Peruzzi *et al.*, 2004). Det har også vært registrert motsatte resultater, eksempelvis thailandsk sølv karpe (*Barbus choloensis*), hvor studier ikke viste noen forskjell på dødelighet mellom diploide og triploider (Koedprang og Na-Nakorn, 2000). Enkelte arter, som triploid piggvar (*Psetta maxima*), kan til og med vise til en bedre overlevelsesprosent etter kjønnsmodning i forhold til den diploide kontrollen (Cal *et al.*, 2006). Studier av triploid Atlantisk torsk viste en signifikant høyere overlevelse i inkubasjonsfasen (egg- og plommesekkfasen), men en signifikant lavere overlevelse ved startfôring og de neste 87 dagene. Etter sortering (dag 87) etter størrelse samt ploiditet og overføring til individuelle tanker, var det derimot minimal differanse i overlevelsesrate mellom triploide og diploide grupper (Opstad *et al.*, 2013).

Vekst

En gjennomgang av flere ulike vekst-studier, gjort av Quillet *et al.* 1988 og senere av Pandian og Koteeswaran 1998 viser at triploide individer generelt har lavere vekst enn diploide. Etter kjønnsmodning derimot kan de triploide individene ta fordel av sin sterilitet og nesten alle arter vil da vokse 10-30 % raskere enn den diploide kontrollgruppen. Det er også en generell tendens til at triploider vokser raskere når de oppdrettes alene, sammenlignet med triploider som oppdrettes i felleskap med diploide individer (Maxime, 2008). Forsøk gjort med Atlantisk torsk, viste at diploid fisk hadde en signifikant lavere vekst enn triploide ved dag tre etter klekking. Etter sortering 53 dager etter klekking og videre i tidlig vekstfase, ble det ikke observert noen signifikant vekstforskjell (Opstad *et al.*, 2013).

Deformiteter og morfologi

Det er blitt rapportert om flere forskjellige deformiteter og morfologiske ulikheter ved produksjon av triploid fisk som tilapia (*Oreochromis mossambicus*), karpe (*Cyprinus carpio*artsnavn) og malle (*Silurus glanis*) (Varadaraj og Pandian, 1990, Gomelsky *et al.*, 1992, Váarkonyi *et al.*, 1998) mfl. Forsøk gjort på Atlantisk torsk viser signifikant økt antall

av triploid fisk med deformitet, 53 dager etter klekking, hvor det ble påvist en høyere utbredelse av lordose i triploid- enn i diploid fisk (Opstad *et al.*, 2013). Deformitetsproblemer er et svært viktig tema innenfor oppdrett av triploider (Piferrer *et al.*, 2009), med tanke på velferd og aksept fra det kommersielle marked, og er kanskje hovedgrunnen til at storskala produksjon av triploide salmonider ikke har blitt innført (Taranger *et al.*, 2010).

1.5 Meiose og oogenese

For videre forklaring av triploidisering og hva dette innebærer, er det nødvendig å se nærmere på utviklingsbiologien i torsk. Alder ved kjønnsmodning hos torsk varierer og er sterkt avhengig av vekstrate, næringstilgang og miljøforhold. Torsk fra Barentshavet gyter vanligvis i en alder av 6-8 år, mens kysttorsk fra vestlige deler av Norge oppnår kjønnsmodning i en alder av 4-6 år (Godø og Moksness, 1987, Berg og Albert, 2003). Disse forskjellene finner man ikke igjen i oppdrett hvor fisken ofte gyter rundt 2 års alder ved normale vekstforhold og oppnår en kroppsvekt på rundt 1.5-2 kg ved gyting (Godø og Moksness, 1987, Karlsen *et al.*, 2006b, Taranger *et al.*, 2006).

Tidlig kjønnsmodning er et kjent problem i dagens fiskeoppdrett (Taranger *et al.*, 2010) og utgjør et hovedproblem, ved oppdrett av torsk (Karlsen *et al.*, 2006b). Livshistoriemodeller viser at alder ved kjønnsmodning er forsinket når vekstbetingelsene blir mindre gunstige (Stearns, 2000), mens størrelsen ved kjønnsmodning avhenger av en rekke faktorer som dødelighet, økt fruktbarhet og kvalitet på avkom (Olsen *et al.*, 2005). I oppdrett er vanligvis vekstbetingelsene og fôrtilgjengeligheten forbedret sammenlignet med situasjonen i naturlige økosystemer. Det gir generelt fisk med høyere kondisjon og større energilagre, noe som sannsynligvis er hovedgrunnen til tidlig kjønnsmodning hos flere oppdrettsarter (Taranger *et al.*, 2010).

Kjønnsmodning innebærer en funksjonell kompetanseutvikling av hjerne- hypofyse- gonade (brain-pituitary-gonad) aksens. Samtidig foregår det en aktivering av to hovedfunksjoner i gonadene, som innbefatter produksjon av kjønnsceller og syntesen av reproduksjonshormoner. Dette gjelder særlig kjønnssteroider som er nødvendig for kjønnscelleutvikling for både hunn (eks. østrogen og vitelogenese) og hann (eks. androgener og spermatogenese; (Schulz *et al.*, 2010)) og generell reproduktiv kompetanse (Taranger *et al.*, 2010).

1.5.1 Oogenese

Oogenese omfatter utviklingen fra primordiale kjønnsceller (PGC) til egg klare for befruktning. Denne prosessen starter allerede i embryo og fullføres ved kjønnsmodning. Første fase starter tidlig embryonalt ved dannelsen av PGC fra maternalt overført RNA. Siden vandrer PGC gjennom embryoet under utvikling og samler seg ved området som senere skal bli ovariet. Et utvalg PGC celler modnes, og utvikler seg videre til primære oocytter som arresteres i meiose I frem til kjønnsmodning. Fram mot ovulering vil oocyttene gjennomgå en vekstperiode og en meiotisk reduksjonsdeling (meiose I). Deretter arresteres oocyttene i forstadiet til meiose II. Den siste reduksjonsdelingen med utskillelse av det andre polarlegemet (meiose II) vil først skje etter befruktningen, når egget har blitt aktivert av spermie via mikropylen (Lodish *et al.*, 2007).

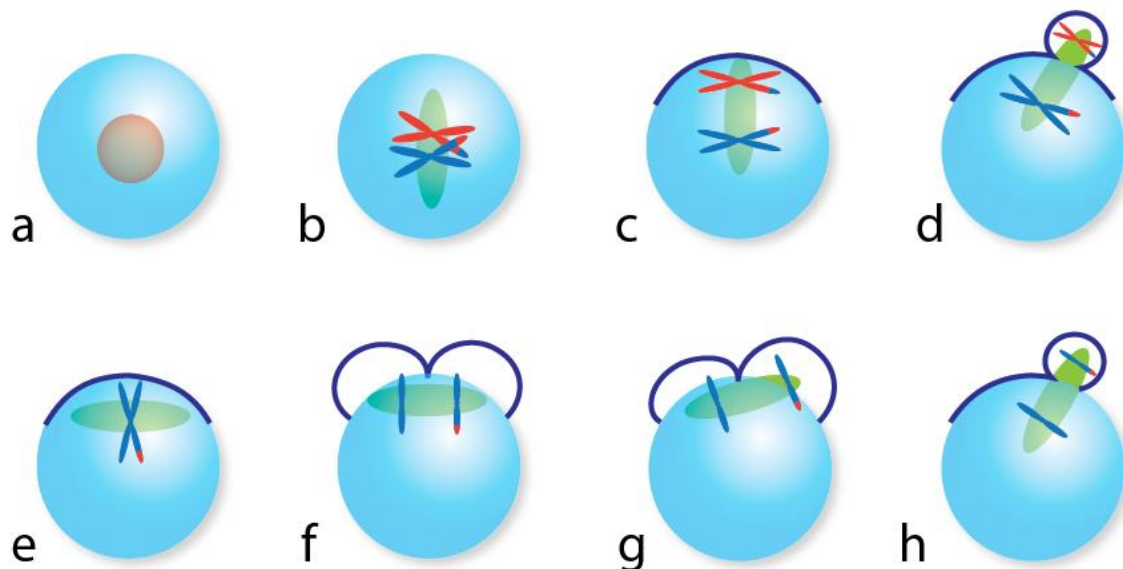
1.5.2 Polarlegemet

Eggcellen (oocytten) gjennomgår to runder med asymmetrisk celledeling for å danne en haploid kjønnselle og to polarlegemer som er designet for apoptose (en mekanisme for celledød) (Wang *et al.*, 2011).

Den første meiotiske delingen er en unik reduserende hendelse som deles inn i to faser, anafase og metafase. Ved forstadiet til meiosen (profasen i meiose I) vil det skje en rekombinering mellom maternale og paternal kromatider som danne en synapsis av to homologe foreldrekromosomer. Ved metafasen vil kromatidene fra hvert replikert kromosom krysskobles av cohensin komplekser (Rec8). Disse kløyver kromosomene fra hverandre, men opprettholder knyttingspunktet i centromerene og sikrer dermed at de homologe kromosomene deler seg mens bindingen mellom søster-kromatidene opprettholdes (Lodish *et al.*, 2007). Denne asymmetriske celledelingen forekommer rett etter at spindelet, som har blitt formet i midten av oocytten, har nådd cellens cortex. Dette trigger metafase-anafase overgangen slik at det første polarlegemet støtes ut (Maro og Verlhac, 2002). Den andre meiotiske delingen skjer ved at centromerisk Rec8 kløyver kromosomet til to identiske individuelle kromatider. Denne hendelsen trigges først etter befruktningen og fører til en ny asymmetrisk celledeling, etterfulgt av utskillelsen av det andre polarlegemet (Maro og Verlhac, 2002). I tillegg, ved den andre meiotiske celledelingen, må spindelet rotere for at kløyvingen skal skje og gjøre prosessen komplett (fig. 2).

Polarlegemet bidrar således til å eliminere en halvdel av det diploide kromosomsettet som produseres ved meiosedeling i egget, og danner en haploid oocytt (Maro og Verlhac, 2002). Tidlige studier har vist at interaksjoner mellom kromosomer og kortikalt cytoskjelett spiller

en viktig rolle i polarlegemets utskillelse (Maro *et al.*, 1986, Van Blerkom og Bell, 1986). Selv om polarlegemets utskillelse ved hunnlig meiose har vært kjent lenge, vet man fortsatt lite om de bakenforliggende mekanismene, hvor oocytter oppnår en spesiell asymmetrisk deling. Mekanismen for spindel rotasjon, cytokinese, er også lite kjent (Wang *et al.*, 2011). Kunnskap om temaet er først og fremst rettet mot pattedyr og data fra fisk er mangelfull.



Figur 2. En enkel modell fra mus, som skildrer polarlegemets utskillelse. (a) Oocytten «arresteres» i et meiotisk forstadium hvor arvematerialet lagres i en stor kjerne kalt germinal vesikkel (Lys Rød). (b) Når meiosen gjenopptas vil det skje en nedbryting av den germinale vesikkelen og en meiotiske spindelformasjon vil dannes (Grønn). (c) Spindelet migrerer langs lengdeaksen mot det nærliggende cortex. På samme tid vil området over spindelet danne en struktur som er fri for mikrovilli og beriket med aktin mikrofilamenter (Lilla). (d) Når spindelet når cortex vil dette trigge en anafase-metafase overgang og fører til at første polar legemet støtes ut. (e) Spindelet befinner seg parallelt med overflaten idet oocytten arretteres i meiose II. (f) I det kortikale domene, bestående av mikrofilamenter, dannes det en kløyvings-fure. (g) Etter befruktning vil denne furen separere til to utvekster, lokalisert over de to gjenværende kromatidene. (h) Den ene av disse utvekstene vil forstørres mens den andre reduseres og fører til rotasjon av spindelet. (h) Når spindelet har rotert ca. 180° vil det andre polarlegemet støtes ut (modifisert fra: Maro og Verlhac (2002)).

1.5.3 Trykkpåvirkning på mikrotubuler

De prosessene som vanligvis skjer med kromosomene etter befruktning er avhengig av et funksjonelt spindelapparat (Hansen *et al.*, 2012). Mikrotubuler er utbredte strukturer av cytoskjelettet som er bygget opp av selvforenelige $\alpha\beta$ -tubulin subenheter (Lodish *et al.*, 2007). Mikrotubulene er trådformede strukturer som er termodynamisk ustabile, hvor polarisering og depolarisering av tubulinmolekylene bestemmer lengdeveksten på tråden (Inoué og Salmon, 1995). De dynamiske egenskapene er sterkt påvirket av fysiske betingelser som temperatur og hydrostatisk trykk. Sistnevnte har vist seg å starte en depolariserende organisering av mikrotubulene, som fører til en reduksjon fra begge polendene (Nishiyama *et al.*, 2010). Når trykket stiger vil dette føre til en spesifikk og midlertidig oppløsning av

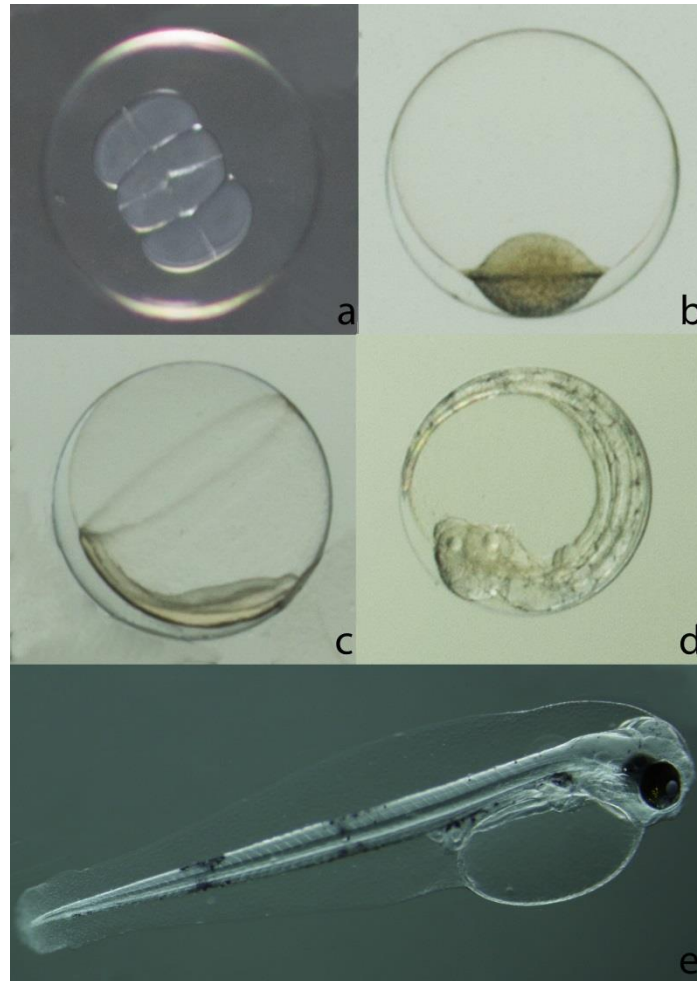
spindelen og gjør at de normale prosessene stopper opp. Når trykket senkes igjen, vil de påfølgende celledelingene forløpe normalt fordi spindelapparatet er reetablert og igjen fungerer ved den første normale celledelingen i det nydannede embryoet (Hansen *et al.*, 2012).

1.6 Utvikling av embryo

Triploide individer inneholder ett ekstra kromosom sammenlignet med diploide individer, noe som resulterer i større men færre celler i ulike vev og organer (Benfey, 1999). Dette kan tenkes å ha en effekt på utvikling i embryo. Ved sammenligning av diploider og triploier i embryogenese er det derfor en fordel og vite mer om den normale embryogenese utviklingen i torsk.

Den embryologiske utviklingen starter med selve befruktningen. En enkel spermie trenger gjennom mikropyleen i eggskallet og et paternalt kromatid frigjøres inni egget. Sammen med det maternale kromatidet danner disse zygotens kjerne. Når befruktningsreaksjonen er ferdig vil egget gå inn i en zygoter periode (300-335 minutter etter befruktning, ved 7 °C). Cytoplasma fra området rundt plommen starter en akkumulering mot den animale polen og danner en plateformet utbuling (blastodisk). Omtrent 335 minutter etter befruktning vil en fure dannes i blastodisken og danne to separate celler. Dette markerer starten på kløyvingsstadiet (335 minutter etter befruktning-22 timer etter befruktning, ved 7 °C), hvor blastodisken kløyves i stadig flere celler (fig. 3a). Rundt den syvende delingen (64-128 minutter etter befruktning) foregår kløyvingen stadig mer usynkronisert og embryo går inn i blastula stadiet (22-56 timer etter befruktning, ved 7 °C). Etter 36 timer etter befruktning vil blastodisken bestå av en solid ball (blastula) av ~500 celler. Cellene deler seg nå fullstendig uavhengig av hverandre og transkriberer sitt eget mRNA. Blastomerene som ligger inn mot plommemassen smelter sammen til plommecytoplasma og danner et lag (yolk syncytial layer; YSL) av fritt flytende cellekjerne mellom plommemassen og blastodisken. Celler fra blastodisken ledet av det periferte YSL fortsetter å spre seg under blastodisken og kan observeres som en ringstruktur som omgir blastula. Det er YSL-laget som separerer de «virkelige» blastomerene fra plommemassen. Cellene i blastodisken fortsetter å dele seg. Dette fører til et økt trykk i retning plommemassen (fig. 3b). Etter en stund vil trykket igjen reduseres og blastula vil igjen være plassert oppå plommen. Fra undersiden av blastodisken er det nå mulig å se en dannelse av en ring med kimceller («germ ring»). Dette markerer også innledningen til neste fase, gastrula perioden som foregår 56-113 timer etter befruktning, ved 7 °C. En involusjon starter, hvor perifere celler beveger seg inn under blastodisken og former

et sekundært lag (hypoblast) mellom YSL og den gjenværende delen av blastodisken (epiblast). Ektodermale lag med celler begynner å migrere over og rundt plommemassen mot den vegetale polen på egget (epiboli). Prosentvis dekke av epiboli er med på å karakterisere ulike utviklingshendelser som vil spille en viktig rolle for videre utvikling. Ved 10-25 % epiboli vil det oppstå en asymmetrisk hule under blastodisken bestående av plommemasse. Cellemassen er tykkere langs den ene siden og indikerer embryos posisjon. Ved 50 % epiboli (fig. 3c) kan man se starten på notokord rudimenter, første somitt fure og en utbuling som markerer øye anlegget. Ved 75 % epiboli vil en se videre utvikling av somitter og den optiske vesikkelen er nå skilt fra den nevralt platen. Involusjonen fortsetter frem til 100 % epiboli og lukking av bladoporen. Videre vil ferdigstilling av epiboli, fører til dannelsen av ektoderm fra cellene i epiblasten. Ektodermen vil senere gi opphav til epidermis og nevralt vev. Hypoblasten gir opphav til mesodermen som henholdsvis former vev og muskler, og endodermen som gir opphav til mage, tarm og lever. Videre går embryo gjennom en segmenterings periode (113-256 timer etter befruktning, ved 7 °C), som hovedsakelig består av ulik organutvikling (organogenese) som notokorden (*chorda dorsalis*), somitter, øyne, ører, mage og lever, nyre og hjerte samt videreutviklingen av finnestrukturen. Siste delen av embryogenesen foregår frem til ca. 256 timer etter befruktning og dekker klekking av egget og de tidligste larvestadiene. Etter at siste somitt er dannet og pigmenteringen i øyet er på plass vil embryo ligge sammenkrøllet inne i eggskallet (fig. 3d). De fleste organer er utviklet, med unntak av kjeve og hørselssansen. Eggskallet blir gradvis svekket av klekkeenzymmer fra klekkekjertelen. En økende muskelkontraksjon og bevegelse inni egget fører til at eggskallet revner og larven frigjøres (fig. 2e). Larven lever av plommesekken de første dagene, men vil etter hvert utvikle kjeve- og fordøyelses system for å kunne ta til seg føde. Også strukturer som svømmeblære og urinblære blir utviklet i embryo etter klekking. (Hall *et al.*, 2004)



Figur 3. Viser noen av de ulike stadiene i torskens embryoutvikling. (a) celledeling, ~10 timer etter befruktning (b) blastula, ~49 timer etter befruktning (c) gastrula; epiboli, ~95 timer etter befruktning (d) segmentering; like før klekking ~264 timer etter befruktning, (e) larve; plommesekk yngel.

1.6.1 Øyet

Funksjonelle sanseorgan som optiske reseptorer er avgjørende for larvens oppfattelse av bytte. Utviklingen av øyet starter i gastrula perioden (50 % epiboli) og kan observeres som en utbuling, hvor det optiske primordia (forstadiet til den optiske vesikkel) er presentert. Videre fortsetter øyet sin utvikling gjennom segmenteringsperioden. Ved klekking er ikke øyet ferdig utviklet, men blir funksjonelt mellom dannelsen av blære (rett etter klekking) og baktarm (2 dager etter klekking). Pigmentering av øyet oppstår samtidig som første fôring (Hall *et al.*, 2004). Pelagiske larver har en netthinne (retina) hovedsakelig bestående av tapper som trenger høy lysintensitet for en visuell oppfattelse og for fargesyn. Staver dannes først i forbindelse med metamorfosen. Likevel dannes det visuelle bilder som overføres som nevrale impulser, selv om resten av retina er ikke fullstendig differensiert før begynnelsen av metamorfose (Kjørsvik *et al.*, 2004).

1.7 Mål med prosjektet (hypotese utvikling):

Målet for oppgaven er å kartlegge effekten av trykk og tidspunkt etter befruktning på triploidisering og ut fra dette, predikere optimal behandling for å triploidisere torsk. Videre blir det gjort sammenligninger av triploide og diploide individer i forhold til tidlige eggstadier. Dette ble gjort for å redegjøre for visuelle ulikheter allerede i de tidligste fasene i embryogenesen, og da særlig innenfor utviklingshastighet. Ulike fysiologiske prosesser som skjer ved polarlegemets utskillelse er også behandlet.

Forsøket ble basert på følgende alternative hypoteser:

H_{A1}: Økt trykk vil resultere i økt mengde i triploide individer.

H_{A2}: Tid etter befruktning vil påvirke triploidiserings effektiviteten.

H_{A3}: Økt trykk vil påvirke celledelingshastighet, delingssymmetri og eggoverlevelse

H_{A4}: Triploide individer inneholder et ekstra kromosom og vil derfor utvikles langsommere enn diploide.

H_{A5}: Ploiditet vil påvirke antall fotoreseptorer i retina.

2. Material og Metode:

2.1 Forsøk 1; Triploidisering:

2.1.1 Eksperimentell design

Det praktiske prosjektet foregikk ved Havforskningsinstituttet; Austevoll havbruksstasjon fra 09.04.2012 til 29.04.2012. Stamfisken som ble benyttet i forsøket er representanter fra årsklassen 2009.

Triploidiseringseksperimentet ble bygget opp som en matrise bestående av 4x6 grupper (Tabell 1), som representerte trykkbehandling på 4 ulike tidspunkt etter befruktning (10, 20, 30 og 40 min) og 6 ulike hydrostatiske trykk (1, 50, 100, 200, 400, 600 bar, henholdsvis 1, 5, 10, 20, 40 og 60 mega pascal (MPa)). Alle gruppene ble utsatt for trykk i 5 min, samt tiden det tar for å oppnå ønsket trykk i trykk kammeret. Gruppe 1 fungerte som kontroll grupper, fordi 1 bar (ingen trykkendring) ikke vil påvirke utstøting av polar legemet ved andre meiose, og derfor fungere som en negativ kontroll.

Tabell 1: Matrise over de 24 gruppene representert i prosjektet, inndelt etter trykk og tidspunkt etter fertilisering.

Tid etter befruktning / Trykk:	1 bar	50 bar	100 bar	200 bar	400 bar	600 bar
10 min.	1a	2a	3a	4a	5a	6a
20 min.	1b	2b	3b	4b	5b	6b
30 min.	1c	2c	3c	4c	5c	6c
40 min.	1d	2d	3d	4d	5d	6d

Det praktiske befruktnings- og trykkbehandlingsforsøket (Tabell 2) med startet 09.04.2012, klokken 09:40 (Tid=0). En 5 ml plast pipette ble benyttet til å fordele 4 ml egg (ca. 2400 individer ut fra et gjennomsnitt på 600 000 egg pr. liter (Aglen, 2002)) ut i 24 falcon rør (50 ml). Hver egg-gruppe ble så befruktet med 40 ml spermie-vann (250 ml sjøvann (5.1 °C) + 0,5 ml sperm), rett før befruktning av den aktuelle egg-gruppen. Både egg og sperm ble oppbevart ved konstante temperaturer i vannbadet under hele forsøket. Videre ble falcon rørene fylt opp med 5.1 °C saltvann, slik at det dannet seg en menisk like over kanten på røret. På menisken ble det plassert et parafilm for å forhindre luft bobler mellom vannet og korken, noe som kan skape en gassovermetning i vannet, og dannelse av gassbobler inni

eggene. Korken ble skrudd godt på og de tette reagensrørene ble satt i vannbad (5.1 °C), for lagring frem til trykkbehandling. Etter 40 min var gruppe 1 komplett (1a, 1b, 1c, 1d) og ble trykket samtidig på 1 bar. De neste gruppene kom i påfølgende rekkefølge, med intervaller på 10 min. Alle egg-gruppene ble eksponert for hydrostatisk trykk med et elektrisk/hydraulisk apparat (TRC-APV™, TRC hydraulics Inc.) (fig. 4). Apparatet består av en sylinder som rommer 2,7 l væske, og en hydraulisk pumpe som virker på et stempel for å øke trykket i sylindern. De tette sentrifugerørene med befruktete egg ble senket ned i sylinder-rommet som på forhånd var fylt opp med ferskvann (5.1 °C). Trykket ble målt ved hjelp av en trykkmåler. Det tok noen sekunder for å oppnå ønsket trykk i kammeret, behandlingstiden ble derfor beregnet fra trykkmåleren viste ønsket trykk til nøyaktig 5 minutter var gått.

Det ble i tillegg tatt seks befruktningsprøver (B) etter 0, 20, 40, 60 og 80 min. Dette ble gjort for å sjekke at kvaliteten på egg og sperm ikke tapte seg over tid og dermed fikk en negativ effekt på befruktningsprosenten for de siste prøveuttakene.

Tabell 2: Matrise over befruktnings- og trykkbehandlingsforsøk av de ulike gruppene per tidsenhet.

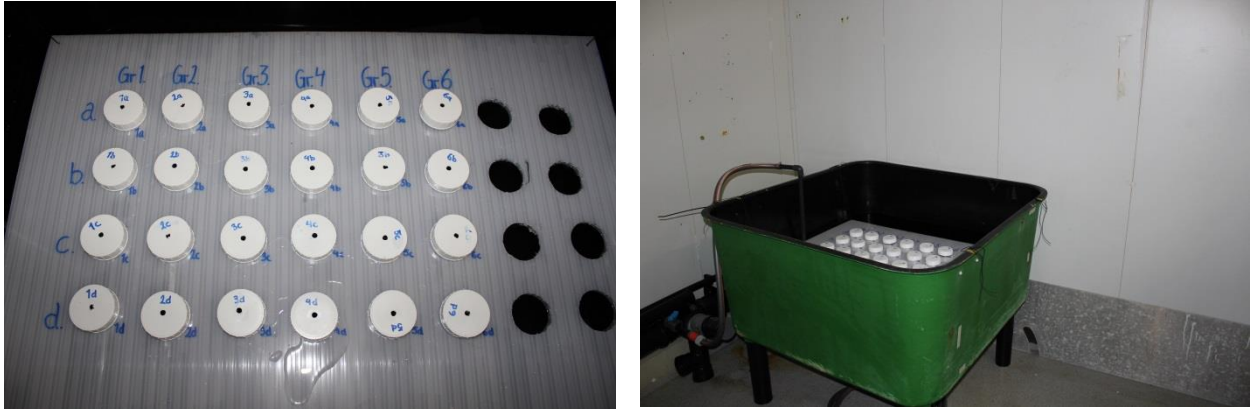
Kl:	Tid etter fertilisering (min):	Befruktnings prøver:	Gr. Befruktet:	Gr. Trykkbehandlet:	Trykk:	Trykk periode:
09.40	0 min	B ₀	1d,			
09.50	10 min		1c,2d,			
10.00	20 min	B ₂₀	1b,2c,3d,			
10.10	30 min		1a,2b,3c,4d,			
10.20	40 min	B ₄₀	2a,3b,4c,5d,	1a,1b,1c,1d	1 bar	5 min
10.30	50 min		3a,4b,5c,6d	2a,2b,2c,2d	50 bar	5 min
10.40	60 min	B ₆₀	4a,5b,6c	3a,3b,3c,3d	100 bar	5 min
10.50	70 min		5a,6b	4a,4b,4c,4d	200 bar	5 min
11.00	80 min	B ₈₀	6a	5a,5b,5c,5d	400 bar	5 min
11.10	90 min			6a,6b,6c,6d	600 bar	5 min



Figur 4. TRC-APV™, TRC hydraulics Inc

Inkubering:

Etter trykkbehandling ble eggene fraktet inn til inkuberingstanken og skånsomt overført til en brønn som var merket med gruppens navn. Brønnene hadde en diameter på ca. 5,5 cm og var utstyrt med tett planktonduk (maskestørrelse 500 μm) i bunnen. Den åpne bunnen sikret god vanngjennomstrømning samtidig som eggene ble holdt på plass i brønnen. Alle de 24 gruppene med egg ble holdt i samme tank for å oppnå like forhold for alle gruppene (Fig. 5). Inkubator-tanken var utstyrt med en kvadratisk flat bunn (1x1 meter) med en kubisk sluk i bunnen. Vanddybden i karet var ca. 0,3 m, hvor total vann-volum tilsvarte rundt 300 l. Det ble gjort temperaturmålinger hver time for gjennomsnittlig vanntemperatur i kar, luft, avløpsvann og i inkubatorbrønn. Resultatet av målingene viste stabile gjennomsnittsverdier gjennom hele perioden (tabell 3). For å oppnå optimal vannutskifting, ble vann tilført gjennom et u-formet rørsystem i bunnen av karet, hvor flere hull i rørene skapte en jevn vannsirkulering.



Figur 5. Bidet til venstre viser oppsett av inkuberingsbrønner og til høyre vises inkuberingskar brukt til inkubering av eggene.

Tabell 3. Gjennomsnittlig temperatur og standardavvik i °C fra 13-25 april, ved elektronisk måling.

	Gjennomsnitts temp. (°C)	Standardavvik (°C)
Temp. i kar	6,03	± 0,10
Temp. i luft	10,45	± 0,70
Temp. i avløp	6,05	± 0,10
Temp. i brønn	5,99	± 0,09

Klekking

Første observasjon av klekking ble gjort den 20/4-2012, rundt 68 døgngader (d°), men en fullstendig klekking for sluttsampling ble først observert den 25/4-2012, ved 96 døgngader.

2.1.2 Prøveuttak (fra inkubering frem til klekking)

Prøveuttak fra trykkbehandlede egg fant sted i perioden 9-25 april 2012 (tabell 4). Utviklingen i eggene ble overvåket vha fotografering med speilrefleks kamera (Nikon d3100) og ved miroskop (Olympus sz30 med Leica DFC295 kamera), med unntak av den siste fotograferingen hvor det ble benyttet lupe (Leica Wild M38, Leica microsystems) med et olympus kamera (modell SZX2ILLT, Tokyo, Japan)).

Tabell 4. Oversikt over prøveuttak, fotografering og dødelighet fra forsøk 1 og 2.

Dato:	Klokken:	Tid etter befruktning:	min°/t°*	Prøveuttak for->
09.04.2012	09:40- 11:00	0-80 min	0-480min°	Befruktningsprøver
	20:59	11,32 t	~68 t°	Fotografering av celledeling
10.04.2012	10:00	24,33 t	~146 t°	Beregning av befruktningsprøver
11.04.2012	10:00	48,33 t	~290 t°	Dødelighet
13.04.2012	09:17	95,62 t	~574 t°	Epiboli fotografering
14.04.2012	10:00	120,33 t	~722 t°	Dødelighet
19.04.2012	10:00	216,33 t	~1298 t°	Dødelighet
24.04.2012	09:40	336 t	2016 t°	Flowcytometri prøveuttak, gruppe 1abcd, 2abcd, 3abcd, 4abcd, 5abcd og 6abcd.
25.04.2012	09:40	360 t	2160 t°	Flowcytometri prøveuttak, gruppe 1 og 2.
	12:00	362,33 t	~2174 t°	Slutt Fiksering
25.04.2013	16:30- 19:37	0-187 min	0-1122 min°	Fotografering av polarlegemet,

* Minuttgrader og timegrader (en kvotient av temperatur og tid etter befruktning)

Befruktningsprosent

Befruktningsprøver ble tatt parallelt med trykkforsøket og representerer prosentvis befruktete egg 0, 20, 40, 60 og 80 min etter forsøksstart. Prøvene ble plassert separat i inkuberingskaret, med resten av eggene, over natten og undersøkt neste morgen. De flytende eggene (antatt levende egg) ble tatt ut, ved hjelp av en 10 ml automatpipette (IBS Integra Biosciences Pipetboy acu) og overført til et rent litermål. Et representativt utvalg egg (ca. 500 stk.) ble deretter plassert på et tellebrett. Eggene ble talt ved hjelp av en lupe (Leica Wild M38, Leica Microsystem) og sortert etter normal- eller unormal celledeling. Etter telling ble de gjenværende flytende eggene fra litermålet og eggene fra tellebrettet helt ned i en sil, før de ble overført til en petriskål med ferskvann. Eggene ble videre overført til en 50 ml kolbe med ml mål, for å kunne beregne den totale mengden av de flytende eggene. Eggene som fortsatt befant seg i inkubator brønnen (bunnfall) ble tatt opp av inkubatorbrønnen, skylt ut med

ferskvann og overført til en separat kolbe og representerte den totale mengden døde egg. Når eggene ble eksponert for ferskvann sank de til bunnen som følge av ferskvannets lavere tetthet. Overlevelse av de befruktede eggene ble plottet mot befruktningsprosent for hele gruppen som resulterte i et tall for den reelle befruktningsprosenten. Det er vanlig å forvente omkring 600 000 torskkeegg per liter (Aglén, 2002). Diameter på eggene tilsvarer gjennomsnittlig 1,4 mm og ved å benytte formel 1. ble egg per ml beregnet til å være 490~500 egg per ml. Dette ble benyttet i ved estimering av befruktningsprosenten for å finne det totale antallet egg og dermed prosentandel egg befruktet av totalen (formel 2, 3 og 4).

Formel for antall egg per ml, hvor N er antall egg og D er diameter på eggene (Aglén, 2002):

$$(1) N = 1222 * D^{-2.71}$$

Formler for estimering av befruktningsprosent hvor det er ~500 egg/ml:

$$(2) \text{Befruktningprosent av flytende egg} = \frac{\text{Befruktede egg} \times 100}{\text{tot. ant. talte egg}}$$

$$(3) \text{Ant. befruktede egg}$$

$$= \frac{\text{Befruktningprosent av flytende egg} \times \text{tot ant. flytende egg}}{100}$$

$$(4) \text{Endelig Befruktningprosent} = \frac{\text{ant. befruktede egg} \times 100}{\text{inkubert totalt}}$$

Dødelighet

For å måle antall døde egg ble det brukt en automatpipette (IBS Integra Biosciences Pipetboy acu) for å få sugd opp bunnfelte egg i brønnen. Siden antall døde egg var vanskelig å telle, ble beregninger av døde egg, basert på volum. Eggene ble overført til 15 ml falconrør, utstyrt med milliliterskala. Etter at målerørene hadde stått uberørt en stund, slik at eggene pakket seg i bunnen av røret, ble mengden egg lest direkte av milliliterskalaen på sentrifugerørene. Denne metoden gav tilstrekkelig oversikt over differansen mellom gruppene, selv om nøyaktig antall egg ikke ble talt.

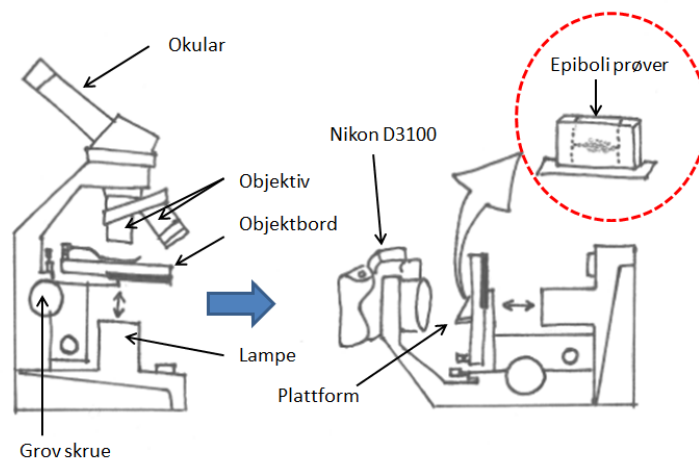
Celledeling

Den 09/04-2012 ble det tatt en bildeserie av alle de representerte gruppene i forsøket (1a-6d). Bilde seriene ble utført både med Nikon D3100 kamera og Olympus lupe med Leica DFC295

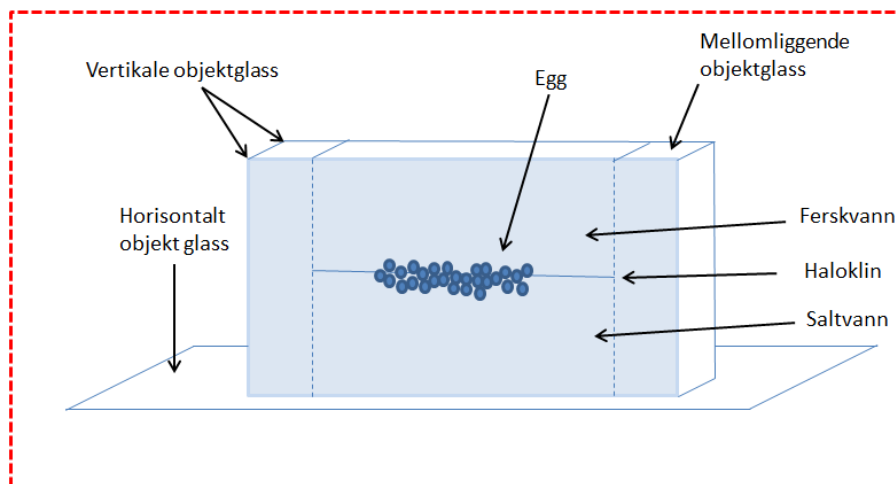
kamera. Eggene var da i gjennomsnitt 58,3 timegrader (t°) etter befruktning, og standardavviket mellom de ulike gruppene, fra befruktning (T_0) til fotografering varierte med $\mp 0,025$ timer (ca. 1,5 min). Eggene ble pipettert direkte fra inkubatorbrønnen over i en petriskål. Det ble forsøkt å holde et jevnt antall med ca. 50 egg fra hver gruppe.

Epiboli

For fotografisk dokumentasjon av epiboli ble det benyttet et Nikon D3100 speilrefleks kamera med 60mm macro objektiv. Stativ til fotografering ble laget ved å benytte et gammelt mikroskop (Nikon Japan), hvor objektiv og okular ble fjernet og erstattet med et kamera. En plattform ble deretter laget på objektivet, slik at når mikroskopet befant seg i liggende stilling kunne plattformen benyttes til fotografering (fig. 6). Objektivglass ble satt sammen for å lage en vanntett kløft slik at eggene kunne fotograferes fra siden (fig. 7). For bedre plassering av eggene ved fotografering ble det benyttet en haloklin grenseovergang, med saltvann i bunn og ferskvann på toppen slik at eggene ble liggende i overgangen mellom vannlagene. Et representativt antall på ca. 50 egg ble benyttet til fotograferingen. Fotograferingen ble gjort etter gjennomsnittlig 95 timer etter befruktning ($570 t^\circ$) hvor standardavviket mellom de ulike gruppene, fra befruktning frem til fotografering, varierte ∓ 30 min.



Figur 6. Illustrert figur over kameraoppsettet for fotografering av epibolistadiet.



Figur 7. Oppsett for fotografering av epiboli (videre forklaring fra fig. 6).

Flowcytometri

Klekking av eggene startet natt til 22/4-12 (78 døgngader (d°)), men det tok noen dager før klekkingen var fullstendig. Den 25/4-2012 (96 d°) ble det gjort prøveuttak av 1200 larver med 50 individer fra hver gruppe. Hver inkubatorbrønn ble overført til et 100 ml begerglass, hvor 50 larver blir plukket ut og overført til bedøvelsesbad (8 dråper Finquel dødelig dose, per 50 ml vann) som var utstyrt med en sil. Når larvene var tilstrekkelig bedøvet (adferdsmessige tegn til fullstendig bedøving), ble silen overført til et ferskvannsbad slik at mest mulig av saltet ble fjernet. Vannbadet ble byttet regelmessig for å sikre minimal overføring av salt videre i prøvene. Hvert enkelt individ ble fortløpende pipettert opp i et eppendorfrør (0,5 ml), med en enkel dråpe ferskvann, og lagret ved -80°C .

Slutfiksering

Resten av larvene i inkubatorbrønnen ble bedøvet (0,5l vann + 10 dråper bedøvelse) ved å senke inkubator brønnen direkte ned i et bedøvelsesbad. Når fisken var bedøvet ble de fraktet inn i avtrekkskapet på laboratoriet hvor de ble overført til en sil og skylt ut med paraformaldehyd fiksering (Vedlegg nr. 5). Fra petriskålen ble larvene og de uklekte eggene pipettert over i sentrifugerør som ble etterfylt med mer paraformaldehyd og lagt direkte på is i avtrekkskap. Innen 24 timer ble fikseringen fjernet og erstattet med buffer (1xPBS) (Vedlegg nr. 8). For å dehydrere larvene ble prøvene overført til 70 % metanol, 90 % og 100 %. Dette ble gjort gradvis for ikke å skade vevet.

2.1.3 Flowcytometri analyse:

Flowcytometri er en metode for analyse og sortering av celler i væske (Morton, 2013). Det er en indirekte metode som er svært utbredt i forhold til bestemmelse av ploiditetsnivå i fisk og er uten tvil den raskeste og mest nøyaktige teknikken som er tilgjengelig (Maxime, 2008).

Når en prøve i en løsning injiseres i flowcytometeret vil partiklene være tilfeldig fordelt i et tre-dimensjonalt rom. De må derfor organiseres inn i en rekke av enkelt celler for at de skal kunne registreres av maskinens detektorsystem. Strømmen av partikler blir deretter ført forbi en lysstråle (vanligvis laserstråle), hvor lysbryting, spredning eller fluorescens gir informasjon om partiklenes egenskaper. Cellene sprer laserlyset idet de passerer analysepunktet i flowcytometeret og kunnskapen om ulik lysspredning gjør det mulig å kartlegge og skille ulike celletyper. Flere parametere som fluorescens samt grad og retning av lysspredningen kan måles på samme tid. Lavvinkel lysspredning (FSC) gir informasjon om cellens størrelse, mens høyvinkel lysspredning informerer om cellens kompleksitet. Det er også mulig å benytte fluoriserende fargestoff (fluorokromer), hvor cellene som passerer laserstrålen lager lys som fanges opp av et linse- og filtersystem. Informasjonen kan da oversettes til numeriske verdier, ved hjelp av en elektronisk detektor (Morton, 2013).

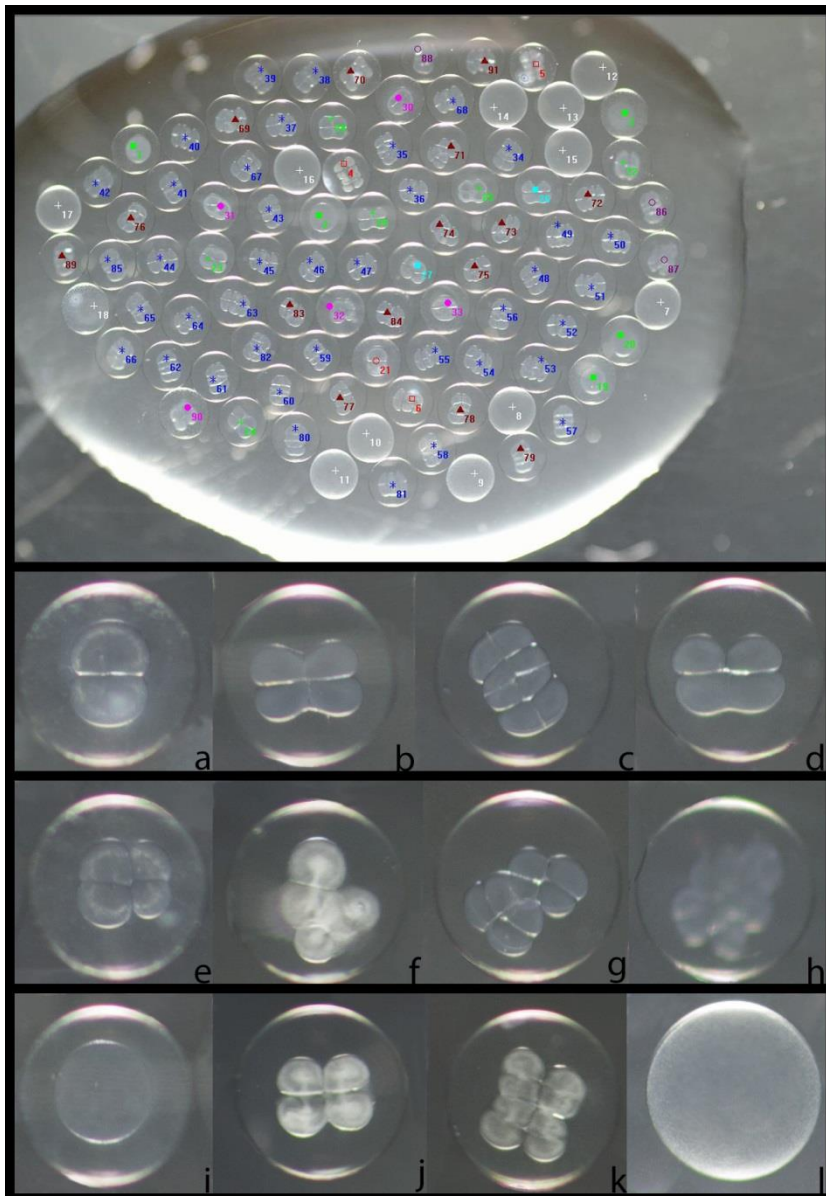
En Propidiumiodid (PI) buffer ble tilberedt om morgenen (tabell 5). Omtrent 70 prøver ble hentet opp fra -80 °C frys og plassert direkte på is. Hver av prøvene med frosne larver ble tilsatt 400-500 µl PI buffer, hvor den bindes spesifikt og proporsjonalt til DNA i cellene ved å danne en interkalering mellom baseparene. Prøvene ble deretter homogenisert ved å pumpe PI buffer med et individ opp og ned i 1 ml sprøyte med kanyle ca 10 ganger til prøven var homogen. Prøvene ble deretter lagret i tre timer i et mørkt rom, før FSC skanning (BD FACSCalibur flow cytometer). Etter at fargestoffet hadde bundet seg til nukleinsyrene ble fluorescenspulsen målt i flowcytometeret. Pulsen som blir registrert, ettersom cellene passert laserlyset, representerer mengde DNA per celle og kan dermed fortelle om fisken er triploid eller ikke.

Tabell 5. Oversikt over de ulike komponentene i PI bufferen som ble brukt ved flowcytometri analyse.

Per 10 ml:	
PBS	9 ml
RNAse	0,5 ml
PI	0,5 ml
Tliegon 20	30 µl

2.1.4 Celledelings analyse:

Triploide cellekjerner inneholder 50 % mer DNA enn diploide cellekjerner. I dette studiet skulle vi se nærmere på om dette, i tillegg til trykk, kunne ha noe å si for celledelingshastigheten, delingssymmetrien og eggoverlevelse i triploide individer. Analyse av eggcelle- og blastomer morfologi ble gjennomført for å undersøke om celledeling skjer hurtigere i diploide egg enn triploide, siden triploide individer har 50 % mer arveanlegg. For bilderedigering og analyse ble dataprogrammet Image Pro benyttet. Metoden for inndeling ble modifisert fra Avery *et al.* (2009), Kraeussling *et al.* (2011) og Kleppe (2013). Celledelingen ble delt opp i 13 kategorier (tabell 6): Symmetrisk deling 2 celler (S2), symmetrisk deling 4 celler (S4), symmetrisk deling 8 celler (S8), asymmetrisk deling 3 celler (AS3), asymmetrisk deling 4 celler (AS4), asymmetrisk deling 5 celler (AS5), asymmetrisk deling 8 celler (AS8), udefinerbare (er befruktet men uklart om det er symmetrisk eller asymmetrisk pga posisjon, klarhet i bilde osv) (UD), ubefruktet (UB), utvidet akse 4 celler (egg som er vanskelig å kategorisere som enten symmetriske eller usymmetriske på grunn av en utvidet akse som ser ut til å separere blastomerene mer enn det som anses som normalt) (UA 4), utvidet aksial akse 8 celler (UA 8), arrestert utvikling (egget har stoppet opp på 1 cellestadiet evt 2 celler, også kalt «solegg») (AU). Hver av cellene ble fordelt i en av de nevnte gruppene og merket med ulike farger og tegn (fig. 8). Alle bildene ble tatt ved gjennomsnittlig 58,30 t° etter befruktning, med et standardavvik på (1,52 min).



Tabell 6. Oversikt over symbol fordelingen i de ulike kategorier for celledelings analyser.

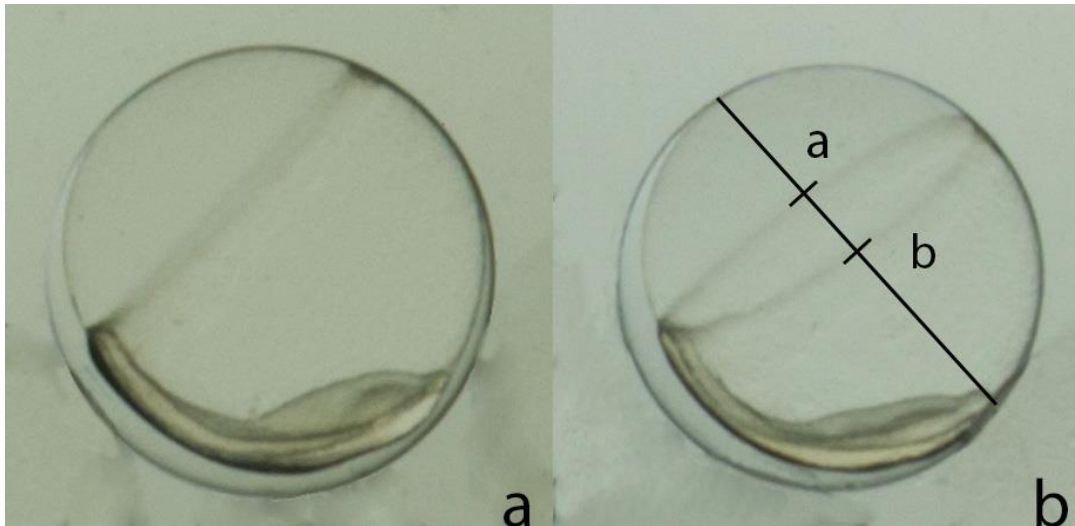
Navn:	Symbol:
S2	Rød sirkel
S4	Grønt kryss
S8	Blå Sjerne
AS3	Turkis firkant
AS4	Rosa prikk
AS5	Blågrønn Triangel
AS8	Mørk rødt Triangel
UD	Lilla sirkel
UB	Hvitt Kryss
UA4	Svart stjerne
UA8	Rød firkant
AU	Grønn firkant

Figur 8. Torskegg i første til tredje delingsfase. Øverst ser man et oversiktsbilde over et ferdig analysert bilde. Bilder under viser; (a) S2, (b) S4, (c) S8, (d) AS3, (e) AS4, (f) AS5, (g) AS8, (h) UD, (i) UB, (j) UA4, (k) UA8, (l) AU.

2.1.5 Epibololi analyse

Bildene fra gastruleringsperioden, ble overført fra kameraets minnebrikke til pc, og konvertert fra NEF til JPG fil. Bilderedigeringsprogrammet Image Pro Plus ble benyttet for lengdemåling av eggene. Et variabelt antall individer per gruppe (minst 10-30 individer), ble tatt med i målingen. For å kunne måle prosentvis epiboli, måtte egget plasseres på en slik måte at epiboli linjen fra den ene siden var parallell med den andre siden (fig. 9 a). Det viste seg å være vanskelig å oppnå den ønskelige posisjonen på eggene, og det ble derfor ofte nødvendig å måle de to linjene separat i a og b. Hvor a, tilsvarer linjen med lengst avstand fra

den animale polen og b den korteste (fig. 9b). Videre ble lengdemålet a og b addert og dividert på 2 for gjennomsnittsverdi. Gjennomsnittsverdien ble videre brukt til å regne prosentvis dekke av den målte eggdiameteren. Alle bildene ble tatt \mp 30 min etter befruktning.



Figur 9. Viser torskeegg i epiboli (~95 timer etter befruktning) stadiet, sett fra siden. Bilde (a) viser et egg i perfekt posisjon for måling av epiboliprosent, mens bildet (b) demonstrerer målepunkter (a, b) for en gjennomsnittsberegning $(a+b/2)$ av epiboli linjen.

2.1.6 *In situ* hybridiserings analyse

In situ hybridisering ble benyttet for å påvise mRNA fra blåsensitivt synspigment ved hjelp av komplementære prober av gensekvenser.

Metoden ble utført av Ragnhild Valen, doktorgradsstipendiat ved Biologisk institutt (metode se vedlegg nr. 9). Larvene som ble benyttet ble fiksert i forbindelse med sluttsampling og representerte individer fra kontrollgruppene som ble trykket på 1 og 600 bar, henholdsvis diploide og triploide individer. I hybridiseringen ble det brukt en probe for blåsensitivt synspigment hos torsk (proben ble designet på grunnlag av kjente gensekvenser fra (Ensemble GB: ENSGMOG00000018045) som er uttrykt i noen fotoreseptorer i retina. Proben detekteres videre med antistoffer og fargereaksjon slik at de fotoreseptorene som uttrykker blåsensitivt synspigment blir fiolett farget. Før *in situ* hybridiseringen ble øynene bleket med 3 % H_2O_2 / 0,5 % KOH for å hindre at pigmenteringen i øyet skulle skygge for *in situ* innmerkningen (pers. com. Ragnhild Valen). Øynene ble dissekert ut og overført til 70 % glyserol. For å kartlegge antall celler i øyet ble det benyttet et Leica DMLB mikroskop sammen med speilokular (Camera lucida). Øynene ble overført til et objektglass og plassert riktig (med linsen

pekende nedover) ved hjelp av en dråpe 100 % glyserol. De blå-opsin markørene ble tegnet manuelt ved å fokusere skarpt fra de øvrige lagene til de nederste. Totalt 8 individer ble benyttet i forsøket, hvor fire individer var representanter fra gruppe 1c (Diploid kontroll) og de neste fire fra gruppe 6c (triploide individer). Både høyre og venstre øye som ble talt tre ganger, hvor gjennomsnittet for hvert øye ble brukt for videre beregning. Videre ble alle cellene talt opp og analysert ved hjelp av en statistisk modell.

2.1.7 Statistiske analyser

Statistiske analyser av dataene ble gjort i programmet R (v. 2.13.2, The R Foundation for Statistical Computing, 2013) som er programmeringsspråk og et system for statistiske beregninger og grafikk.

Andelen triploide og diploide individer fra hver forsøksgruppe ble analysert med generalisert lineær modell med en polynomisk regresjonsanalyse. Variablene brukt i analysen var responsvariabelen «triploid» (binomisk fordelt) og forklaringsvariablene (prediktorvariablene) «tid etter befruktning» og «trykk» (behandlet som kontinuerlige variabler). Analysen ble gjennomført ved bruk av glm funksjonen i R.

Utviklingen av eggene ved hvert celledelingsstadium ble også analysert ved hjelp av en generalisert lineær modell med en polynomisk regresjonsanalyse. Variablene som ble brukt var responsvariablene «asymmetri», «ubefruktet», «arrestert utvikling», «utvidet aksial» (binomisk fordelt) og «antall blastomerer» (poisson fordelt). Forklaringsvariablene «tid etter befruktning» og «trykk» ble behandlet som kontinuerlige variabler. Analysen ble gjennomført ved bruk av glm funksjonen i R.

Utviklingen i eggene ved epibolistadiet ble analysert med en lineær modell for analyse av eggdiameter og en generalisert lineær modell for analyse av epiboli, begge med polynomisk regresjons. Variablene som ble benyttet var responsvariablene «diameter» (poisson fordeling) og dekningsgrad av egget («epiboli») (binomisk fordeling). Forklaringsvariablene «tid etter befruktning» og «trykk» ble behandlet som kontinuerlige variabler. Begge responsvariablene ble testet separat for effekten av trykk og tid. Analysene ble henholdsvis gjennomført ved bruk av lm og glm funksjon i R.

Ved alle analyser nevnt i tidligere avsnitt ble startet med en full modell inkludert interaksjon mellom de to forklaringsvariablene, og utføring av en «backward» eliminering. Starter med en full modell og foretar en eliminering av termer i modellen (om noen), som ikke er signifikant.

Deretter gjentas om nødvendig prosessen til ytterligere forenkling ikke lenger er mulig. R-syntaks for analysene er beskrevet i vedlegg 1.

For sammenligning av gjennomsnittlig antall fotoreseptorer i triploide og diploide individer ble det først brukt en generalisert lineær mikset modell for å teste effekt av hvilken side øyet befant seg på. Denne modellen er å foretrekke når det er flere avhengige data innenfor et individ og tar dermed hensyn til individuelle målinger fra både høyre og venstre øye. Variablene som ble benyttet var responsvariabelen «antall fotoreseptorer» og forklaringsvariablene «side» og «ploiditetsstatus». Siden det ikke ble funnet noen effekt for «side» ble det laget et nytt datasett hvor denne forklaringsvariabelen ble fjernet. Med det nye datasettet ble det brukt en generalisert lineær modell for å teste om ploiditetsstatusen hadde en effekt på antall fotoreseptorer i retina. Analysen ble gjennomført ved bruk av glm funksjoner i R.

2.2 Forsøk 2; polarlegemets utskillelse:

2.2.1 Eksperimentell design

En ny egggruppe for å studere ekstrudering av polarlegemet ble skaffet 25/4-2013 ved å stryke stamfisk, (villfanget kysttorsk, fanget utenfor Havøysund i november 2010) ved Havforskningsinstituttets feltstasjon, Parisvatnet, Øygarden. Siden forsøket ble utført mot slutten av eggseasonen kunne en forvente overmodne egg. Det ble derfor lagt vekt på å få egg og sperm fra flere individer som ble lagret separat i 50 ml falconrør, pakket inn i avispapir og lagt på is i en isoporboks før det ble fraktet til Høyteknologisenter i Bergen (HIB).

I forkant av befruktning ble det gjort en saltvannstest på de ulike egg-gruppene for å kunne gi en indikasjon på egg-gruppens kvalitet. Saltvannstesten ble utført ved å overføre eggene til egne falconrør med saltvann for så å observere mengden egg som fløt og mengden egg som sank til bunnen. Egg som sank ble klassifisert som dårlige egg. I etterkant av saltvannstesten ble to porsjoner med egg fra de to antatt beste egg-gruppene befruktet og observert i mikroskop. Begge grupper viste høy befruktningsprosent og neste del av forsøket ble startet.

Befruktning

Ved befruktning ble det brukt 20 ml egg blandet med 250 ml spermvann (0,5 ml sperm 250 ml saltvann som forklart i kap. 2.1). Befruktningen foregikk i et klimarom med konstant temperatur på ca. 6 °C og vann temperatur på 6 °C.

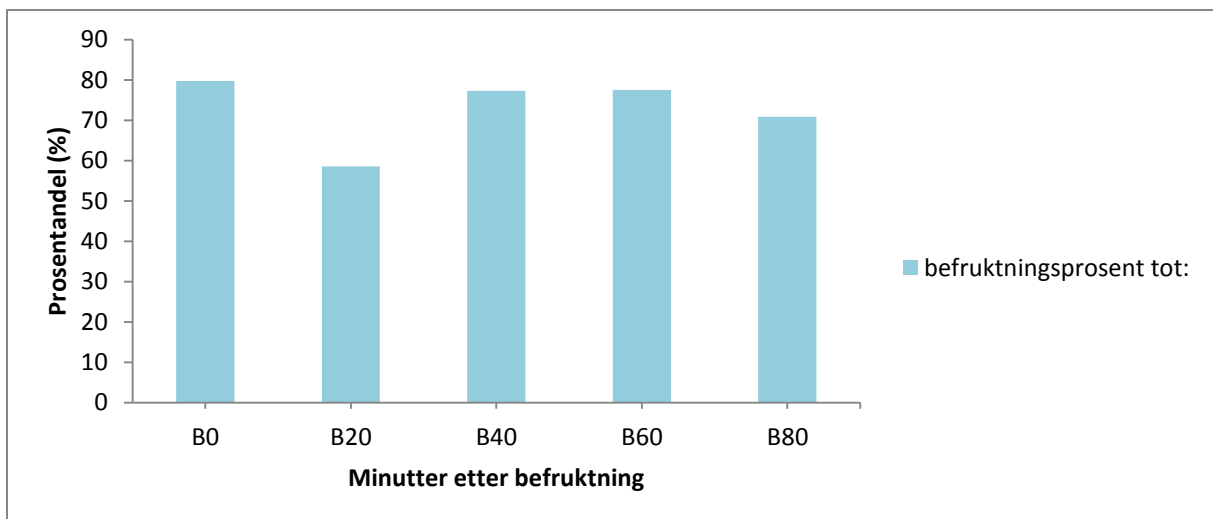
Polarlegemet

Fotografering av polarlegemet foregikk rett etter befruktning, ved at et enkelt diploid egg ble plassert i en petriskål. Nylig befruktede egg fra samme egg-gruppe ble overført til et inkuberingskar for å følge utviklingen i egget. Bildene ble tatt med jevne mellomrom, med et Nikon D3100 kamera og 60 mm makroobjektiv. Bildeserien startet ved befruktning 16:30 og ble avsluttet 19:37 (0-1122 min° etter befruktning). Bildene ble tatt i et klimarom med jevn temperatur (6 °C).

3. Resultater:

3.1 Befruktningprosent i egg-gruppen i perioden trykkforsøkte varte

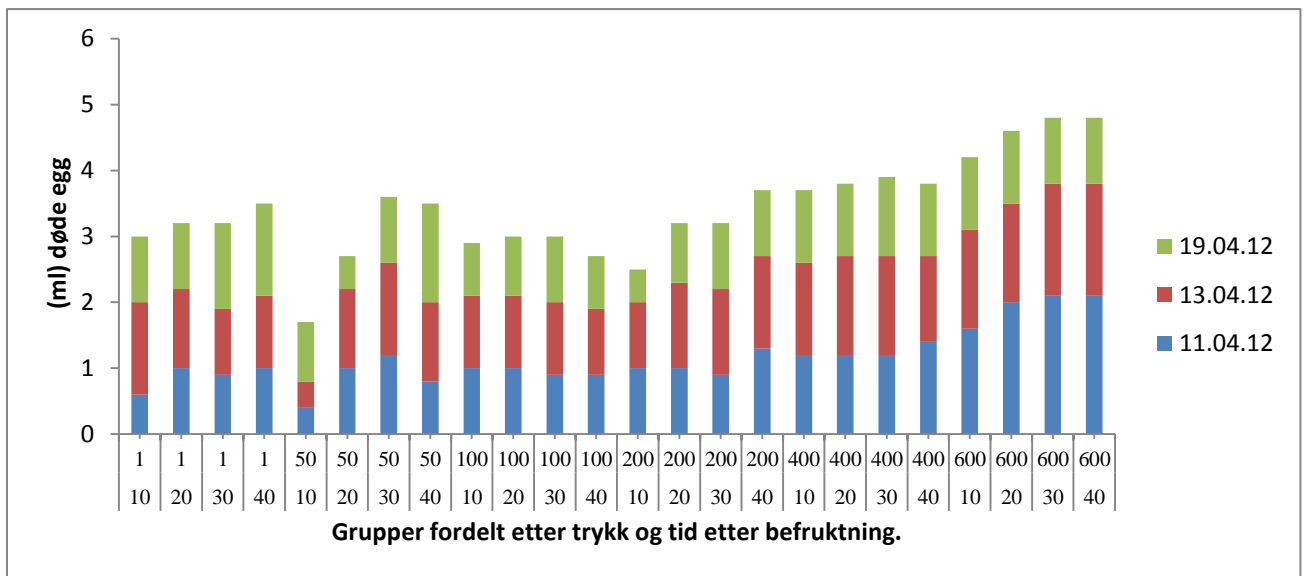
Befruktningprosenten i egg-gruppene ble estimert dagen etter induksjon av hydrostatisk trykk og varierte mellom 58-79 % (vedlegg 3). Resultatene av befruktningstesten (fig. 8) viser en relativt høy befruktningprosent for alle gruppene. Den laveste verdien er registrert 20 minutter etter befruktning og tilsvarer 58,6 %. Det ble også observert en mindre nedgang i befruktningprosenten fra 60-80 minutter etter befruktning. Gjennomsnittlig befruktningprosent for alle gruppene lå på 72,8 %.



Figur 8. Befruktningprosent i de ulike befruktningssprøvene, fra forsøksstart startet (B_0) fram til 80 min etter befruktning (B_{80}).

3.2 Dødelighet i inkuberingsfasen

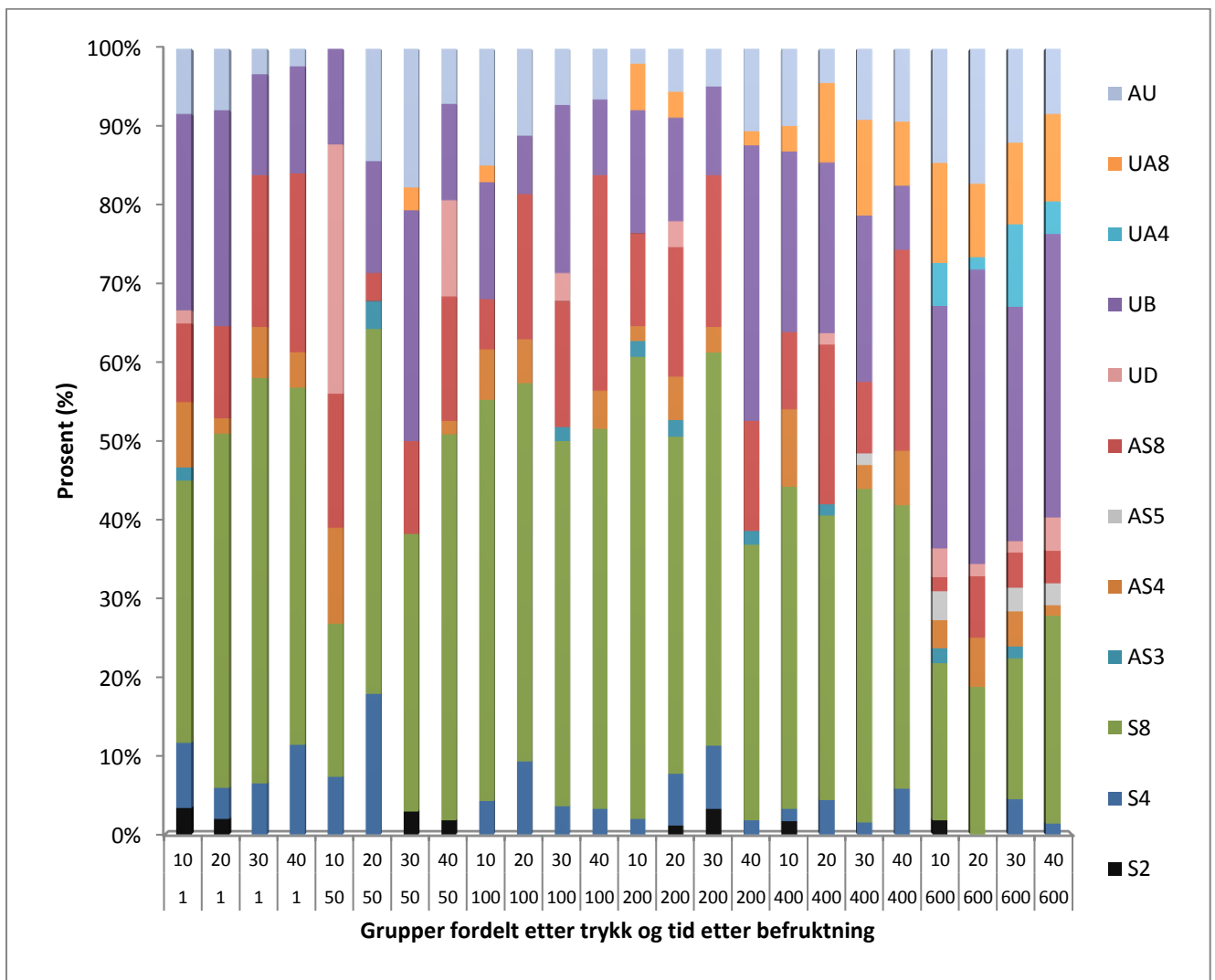
Dødeligheten ble registrert tre ganger i løpet av forsøket ved å måle eggvolumet (ml) (vedlegg 4). Mengden døde egg i inkuberingsperioden beregnet som kumulativ frekvens (fig. 9) viste at, dødeligheten økte i grupper som inneholdt triploide individer. Fra gruppe 4d (200 bar, 40 minutter etter befruktning) kunne man se dødelighetskurven øke jevnt ettersom trykket steg fra 400-600 bar. Under 400 bar derimot viste gruppene en generelt lavere dødelighet, men med en større variasjon innad i trykk-gruppene (tabell 4) med en minimums verdi på 1,7 ml og maks verdi på 3,7 ml.



Figur 9. Uttak for dødelighet ved tre ulike datoer (19.04.12, 13.04.12, 11.04.12). Hver stolpe viser kumulativ eggdødelighet ved inkubasjonsstadiet (ml). Tallene på y-aksen viser trykk (bar) (øverste rad) og minutter etter befruktning (nederste rad).

3.3 Celledeling

Alle eggene ble karakterisert via et system beskrevet av (Avery *et al.*, 2009, Kraeussling *et al.*, 2011, Kleppe, 2013), med noen modifikasjoner. Analyser av egg-gruppene ble gjort med bildebehandlingsprogrammet Image Pro Plus, hvor hvert egg ble klassifisert innenfor en av de 12 kategoriene i oppsettet (fig. 11, mer info i vedlegg 5). Alle fotografiene inneholdt et gjennomsnitt på ~60 egg.



Figur 10. Fordelingen av egg etter 12 ulike kategorier, hvor hver kategori er representert med en fargekode som viser prosentandel fordeling innad i hver gruppe. Kategoriene er fordelt etter symmetrisk celledeling ved 2, 4, 8 celle stadiet (S2, S4, S8), asymmetrisk celledeling med 3, 4, 5, 8 celler (AS3, AS4, AS5, AS8), udefinerte egg (UB) ubefruktede egg (UB), egg med utvidet akse ved 4 og 8 cellestadiet (UA4, UA8) og egg i «arrestert utvikling».

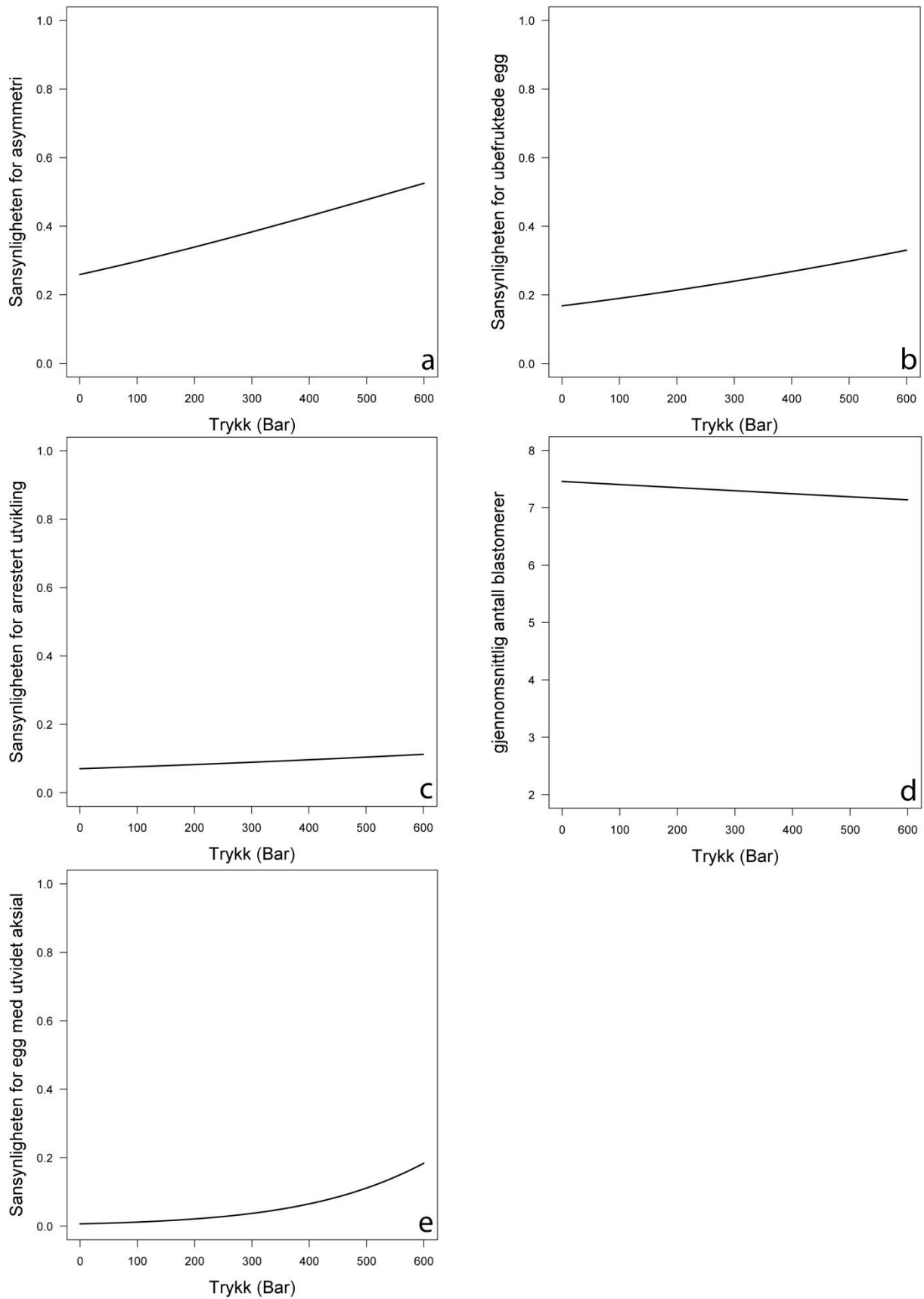
For å forenkle oppsettet til en statistisk analyse ble de 12 ulike kategoriene delt inn i asymmetri/symmetri, ubefruktet/befruktet, «arrestert utvikling», antall blastomerer og egg med utvidet aksial. Hver av disse gruppene ble deretter systematisk testet for en eventuell effekt av trykk (bar) og minutter etter befruktning.

Sannsynligheten for asymmetriske egg (fig. 11a), viser ingen interaksjon mellom trykk og tid ($p = 0,2930$) eller effekt av tid ($p = 0,4038$). Derimot er det signifikant effekt av trykk ($p = 3,44 * 10^{-9}$), som viser at sannsynligheten for asymmetri øker ved økende trykk.

Sannsynligheten for ubefruktede egg (fig. 11b) viste samme trender som asymmetri, hvor det ble observert en effekt av trykk ($p = 2,083 * 10^{-6}$), men ingen interaksjon mellom trykk og tid ($p = 0,7225$) eller signifikant effekt av tid etter befruktning ($p = 0,5927$). Også her kan man se at sannsynligheten for ubefruktede egg øker med økt trykk.

Verken antall egg i arrestert utvikling (Fig. 11c) eller gjennomsnittlig antall blastomerer per egg (11d), viste effekt av trykk eller tid (trykk: $p = 0,05197$, $p = 0,2213$ tid: $p = 0,77191$, $p = 0,2879$). Heller ingen interaksjon mellom de to sistnevnte variablene ble observert ($p = 0,79406$, $p = 0,8541$). Variasjoner i disse dataene kan derfor ikke forklares som effekter av tid eller trykk. Gjennomsnittlig antall blastomerer per trykkgruppe viser en jevn fordeling, hvor gjennomsnittsverdi per egg viser $7,33 (\pm 0,19)$ blastomerer (fig. 11c og 11d).

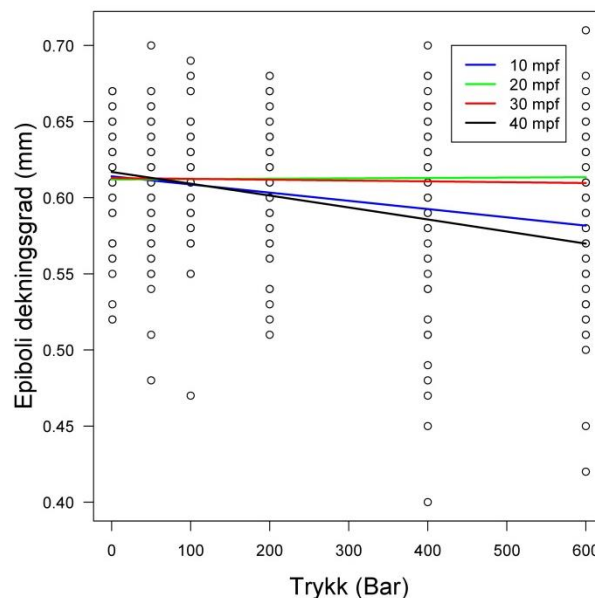
Kun få observasjoner ble gjort av fenomenet «utvidet aksial» i fjerde og åttende cellediet, men den statistiske analysen viser høy signifikant effekt av trykk ($p = 2,2 * 10^{-16}$). Heller ikke her ble det vist effekt av tid ($p = 0,9932$) eller noen form for interaksjon ($p = 0,6515$) mellom trykk og tid etter befruktning. Figuren viser at sannsynligheten for utvidet aksial øker ved økende trykk (fig. 11e).



Figur 11. Effekten av trykk og tid etter befruktning på egg i celledelingsstadiet; (a) Sannsynligheten for asymmetriske celler ved økende hydrostatisk trykk, (b) Sannsynligheten for ubefruktede egg ved økende hydrostatisk trykk, (c) Sannsynligheten for arrestert utvikling ved økende hydrostatisk trykk, (d) Gjennomsnittlig antall blastomerer per egg ved økende hydrostatisk trykk, (e) Sannsynligheten for egg med utvidet aksial ved økende hydrostatisk trykk.

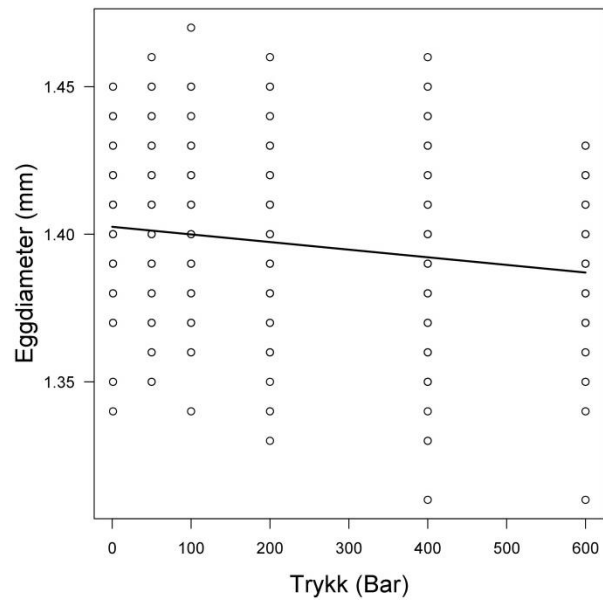
3.3 Epiboli

Beregning av dekningsgrad ble gjort ved å måle lengdeaksen fra den animale delen av egget til kanten av det ektodermale laget, som tilsvarer punktene a og b (material og metode, fig. 9). Gjennomsnittsverdier for epiboli ble målt til 61 %. Statistisk analyse viser en signifikant interaksjon mellom trykk og tid ($p = 0,003970$). Det ble også målt en signifikant effekt av både trykk ($p = 0,000137$) og tid etter befruktning ($p = 0,038334$). Dette viser at, det mest sannsynlig er en biologisk effekt av trykk hvor effekten er avhengig av tid etter befruktning. Det ble derfor gjort en videre analyse hvor det ble testet for hvilke linje(r) som er påvirket av trykk (har et stigningstall som er signifikant forskjellig fra null). Gruppene som er trykket 10 og 40 minutter etter befruktning viste en signifikant effekt av trykket (tidsfaktor10: $p = 0,00815$, tidsfaktor40: $p = 2,06 \cdot 10^{-5}$) og dermed en lavere dekningsgrad av epiboli. Gruppene som er trykket 20 og 30 min etter befruktning derimot, viste ingen signifikant effekt av det økende trykket (tidsfaktor20: $p = 0,5150$, tidsfaktor30: $p = 0,79530$). Gruppene som er trykket ved 10 og 40 min etter befruktning utpreger seg derfor som mindre gunstige (fig. 12). Likevel må det nevnes at den biologiske effekten ikke er stor og at det finnes en høy variasjon i data (se vedlegg 6).



Figur 12. Dekningsgraden av blastodermen over plommemassen (epiboli), målt i mm.

I tillegg til epiboli ble det også gjort lengdemål for eggets diameter, hvor beregning av gjennomsnittlig diameter i eggene, viser en verdi på 1,4 mm og ligger dermed innenfor standardverdiene for befruktete torskeegg (Aglen, 2002). Det ble bevist en signifikant effekt av bar (trykk) på eggets diameter, hvor økende trykk førte til en generelt lavere eggdiameter (fig. 13).

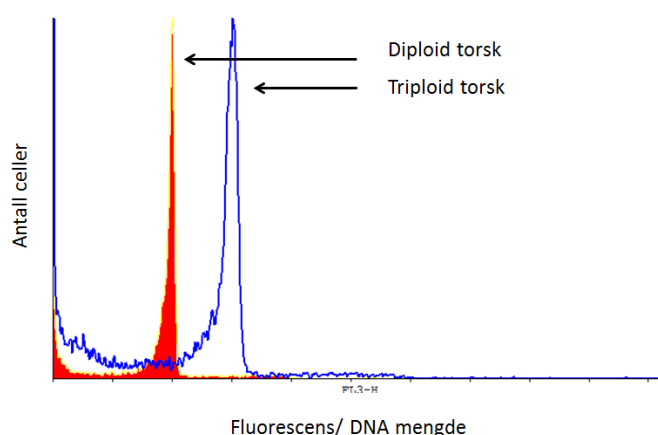


Figur 13. Effekten av trykk (bar) på eggetsdiameter (mm).

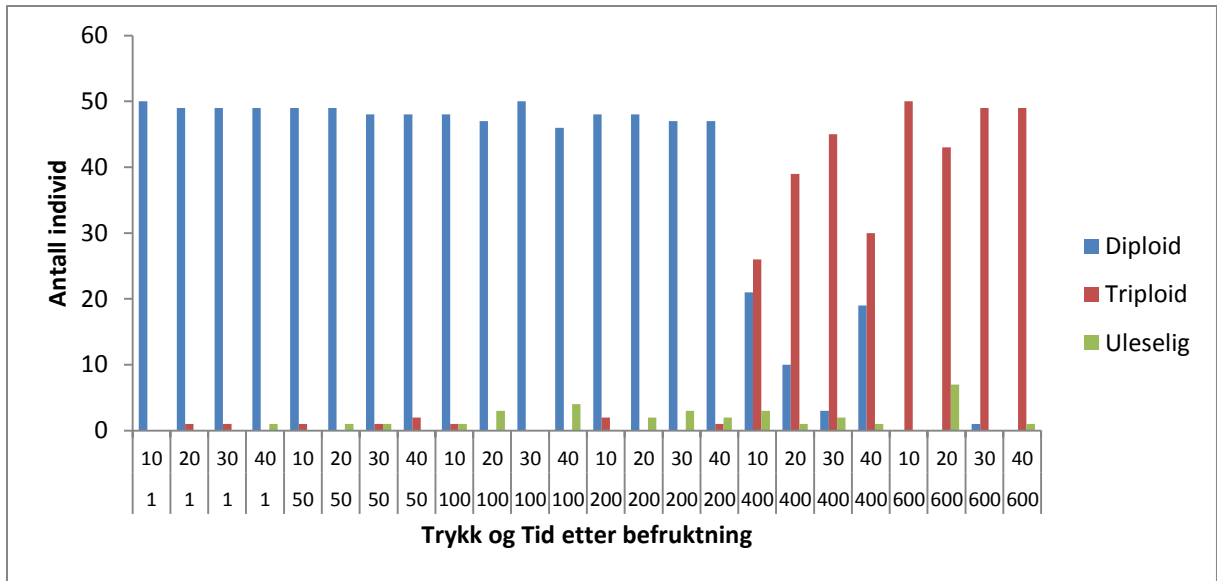
3.4 Flowcytometri

For å beregne mengde DNA pr celle fra flowcytometri ble programmet Cyflogic (v. 1.2.1, CyFlo Ltd., 2008) benyttet. Hver gruppe ble representert med 50 individer og hver enkelt prøve ble analysert og kategorisert som diploid, triploid eller uleselige prøver (fig. 14, se også vedlegg 2). Fordelingen mellom triploide og diploide individer (fig. 15) viser at egg som ble behandlet med 1, 50, 100 og 200 bar inneholdt minimalt triploide individer, verken for ulikt trykk eller for ulike tider etter befruktning. Ved 400 bar derimot ser man en klar fordeling av både triploide- og diploide individer, hvor en større prosentandel er triploide. Det ble også observert en tydelig sammenheng med tid etter befruktning, hvor den optimale tiden etter befruktning (størst representativt antall triploide individer) ser ut til å ligge mellom 20 og 30 min, mens tidene før og etter (10 min og 40 min) viste lavere andel triploide individer. Ved 600 bar var nær alle observerte individer triploide uavhengig av tid etter befruktning.

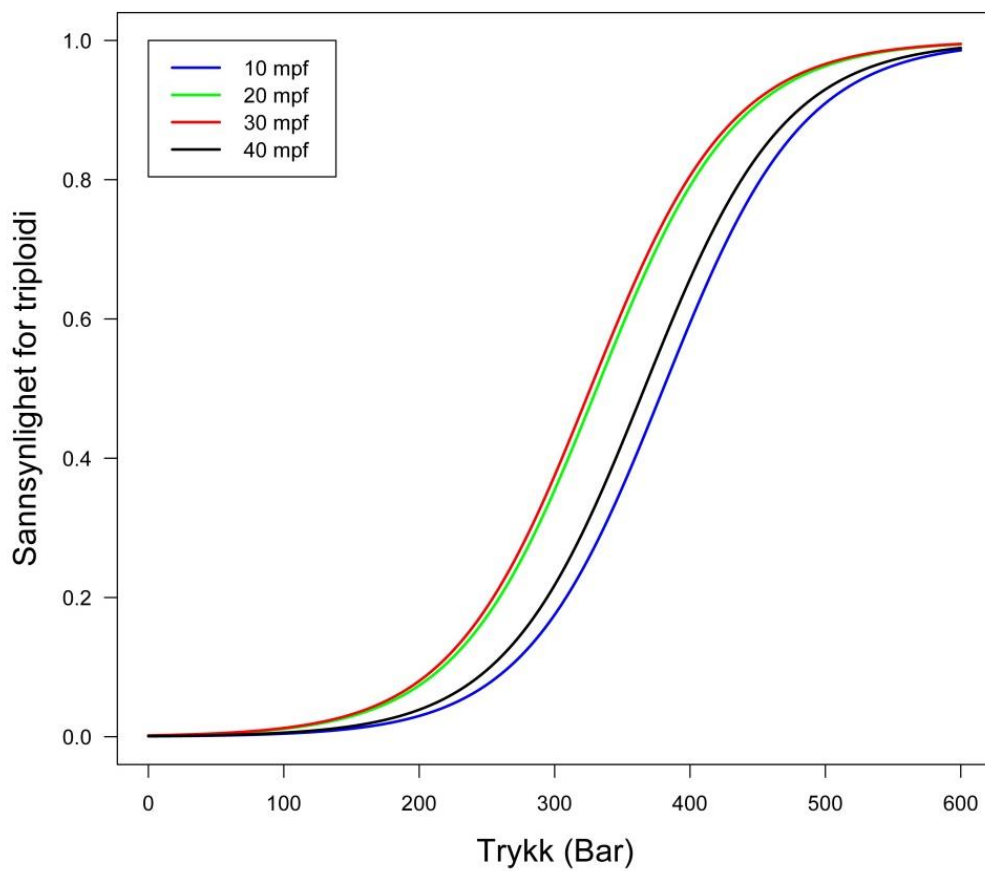
Testing av data i R, viste en signifikant effekt av både trykk ($p = 2,2 \cdot 10^{-16}$) og tid ($p = 0,006705$) etter befruktning på triploidisering, men ingen interaksjoner mellom trykk og tid ($p = 0,121968$). Modellen ble derfor forenklet til kun å ta hensyn til variablene tid og trykk, hvor begge ble behandlet som kontinuerlige variabler. Videre ble det brukt en generalisert lineær modellering med en binær logistisk regresjons analyse. Resultatene viser en økning av triploider når trykket øker, hvor andelen triploider ved 600 bar, er tilnærmet lik 100 % (fig. 16). Videre viser dataene at best status for triploidisering ved 400, 450 og 500 bar, skjer ved ~26 minutter etter befruktning, illustrert med stiplet linje i fig. 17.



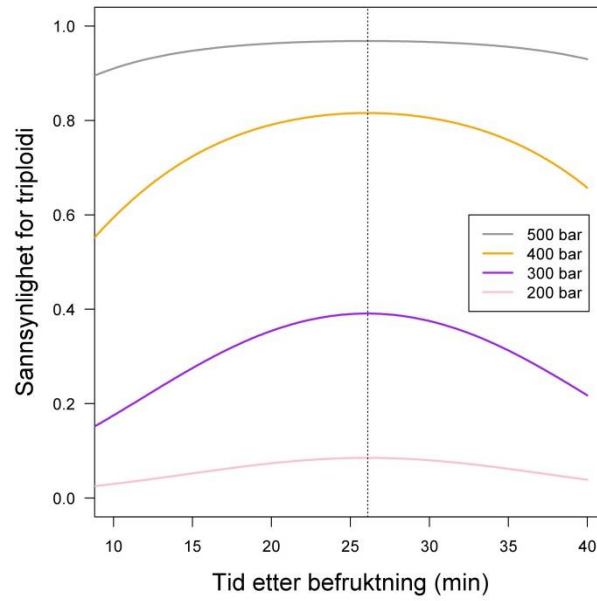
Figur 14. Eksempel på histogram plott over et diploid og et triploid individ.



Figur 15. Fordelingen av diploide (blå søyler) og triploide (røde søyler) individer ved økende trykk. Grønne data tilsvarer prøver som av ukjent grunn ikke lar seg kategorisere.



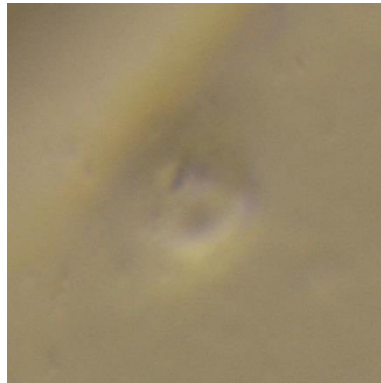
Figur 16. Sannsynligheten for triploidi ved 10-, 20-, 30-, 40 minutter etter befruktning, fordelt på trykk (1-600 bar). Fordelingen er basert på en binomisk fordeling hvor diploide individer tilsvarer verdien 0 mens triploider er representert med verdien 1.



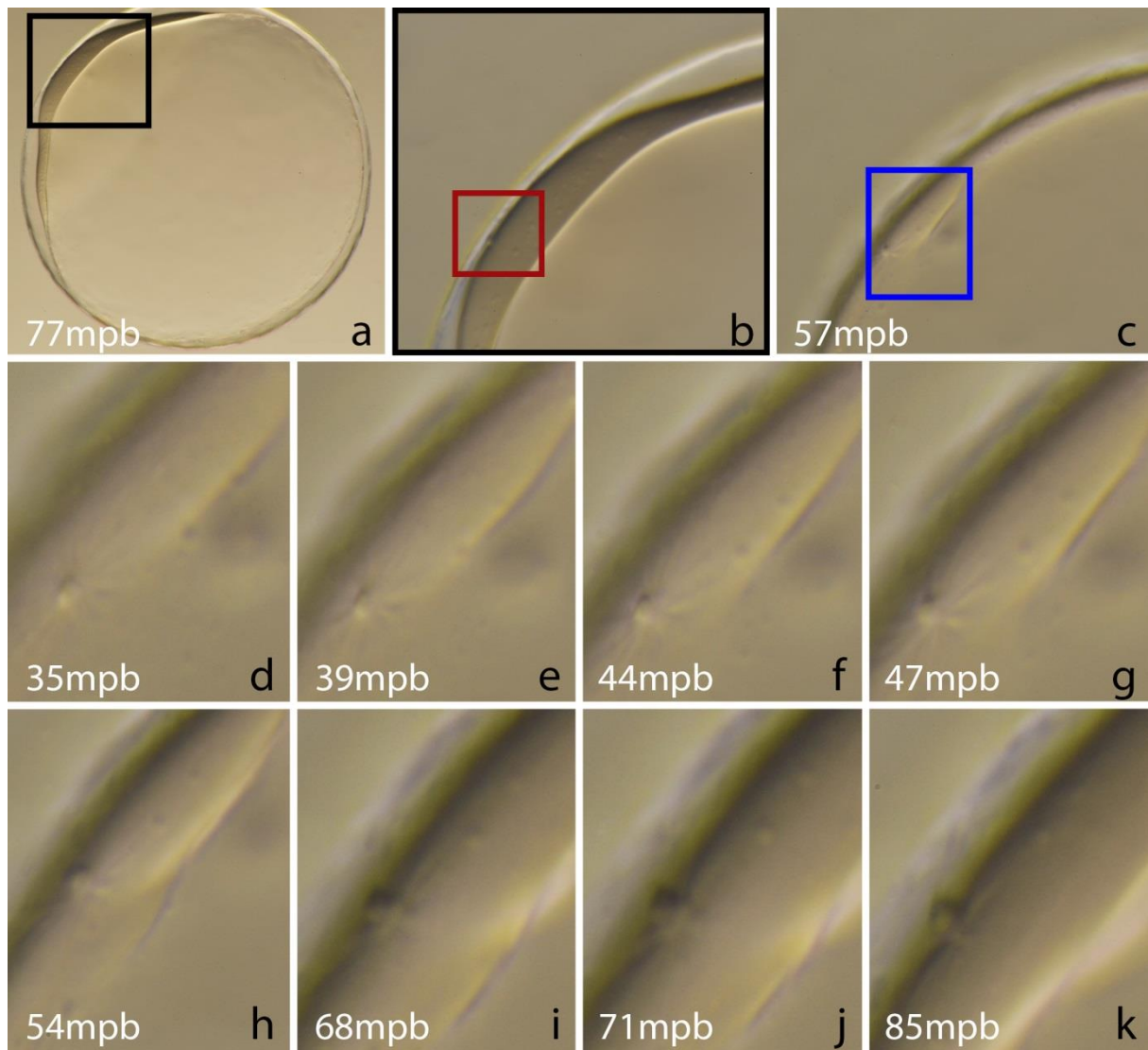
Figur 17. Sannsynligheten for triploidi ved 200, 300, 400 og 500 bar fordelt på tid etter befruktning. Hvor stiplet linje representerer den tiden etter befruktning (ved 400 bar), som gir høyest sannsynligheten for triploiditet. Denne tiden vil dermed også fungere som den optimale tiden for induksjon av hydrostatisk trykk.

3.5 Utskillelse av polarlegemet.

Polarlegemet ble først observert 35 minutter etter befruktning, som en kuleformet utvekst mellom eggeskallet og eggcellen. Ved høyre side av polarlegemet ble det observert en ringstruktur som kan være en mikropyle (Fig. 18). Det var umulig å få begge strukturene i fokus på et bilde, derfor kan mikropylen kun sees som en rund utheving på samtlige bilder i bildeserien (fig. 19c-f). Rundt polarlegemet synes det å danne seg folder i eggets overflate, som følger den gradvise avsnevringen av polarlegemet. Etter ~50min etter befruktning er det ikke lenger tegn til disse foldestrukturene rundt polarlegemet og man antar derfor at det er fullstendig utskilt på dette tidspunktet.



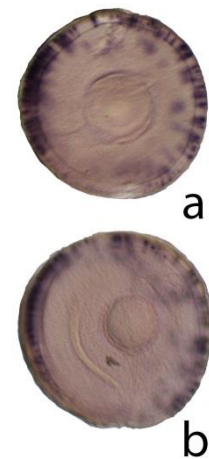
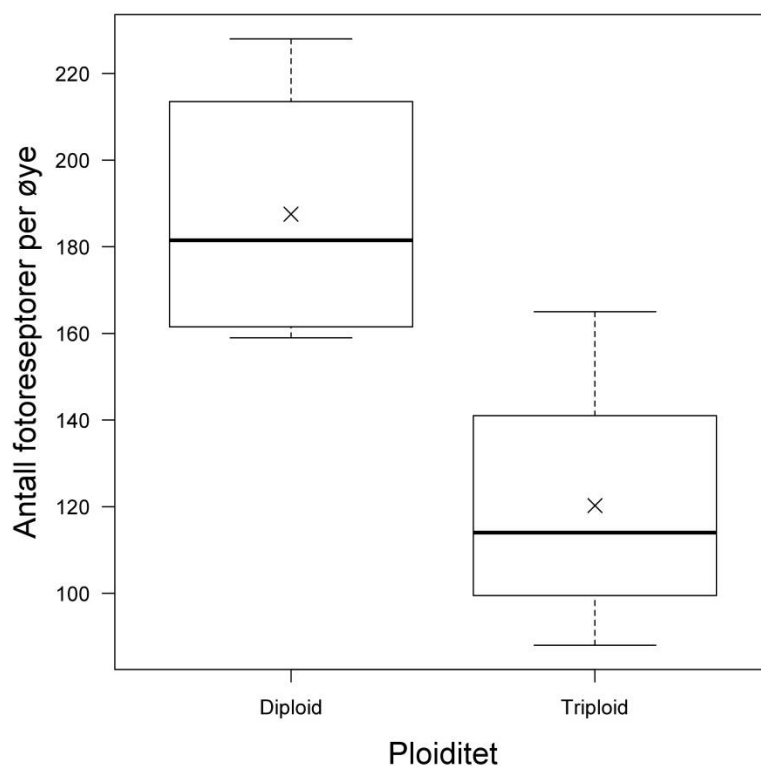
Figur 18. Mikropylestruktur observert under blastodisken etter befruktning.



Figur 19. Utskillelsen av polarlegemet i et befruktet torskkeegg. Bilde (a) viser egget 77 minutter post befruktning (mpb) og plasseringen for utskillelse av polarlegemet. Bilde (b) er et utklipp fra området som er merket med en svart boks i bilde (a) og viser en tydeligere plasseringen for utskillelse. Bilde (c) (57 mpb) fungerer som et standardbilde og viser fokuset i den kommende bildeserien (bilde d-k). Her kan en se tydelig polarlegemet på venstre side som en knoppformet struktur omgitt av forgreininger. Til venstre i bilde kan en se en mindre tydelig struktur, som i sterkere fokus ser ut som en mikropyle. Bildeserien i minutter etter befruktning: (d) 35-, (e) 39-, (f) 44-, (g) 47-, (h) 54-, (i) 68-, (j) 71-, (k) 85 mpb.

3.6 Farging av fotoreseptorer i retina:

Antall blåsensitive fotoreseptorceller hos diploide og triploide individer ble kartlagt ved hjelp av *in situ* hybridisering (fig 20). Det fantes ingen signifikant effekt av hvilken side øyet befant seg på ($p = 0,8496$). Det ble derfor laget et nytt modellsett hvor variabelen «side» (høyre/venstre) ble fjernet. Den nye modellen viser at det er en signifikant effekt av ploiditet i forhold til antall talte fotoreseptorer per øye. Fig. 21 viser en betydelig forskjell mellom diploide og triploide individer når det gjelder fargede fotoreseptorceller i retina, hvor triploide individer viser et betydelig lavere gjennomsnittsans tall enn de diploide individene.



Figur 20. Blåsensensitive fotoreseptorceller fra dissekerte øyer (venstre side), til et diploid individ (a) og et triploid individ (b).

Figur 21. Antall fotoreseptorer representert i diploide og triploide individer. Medianen er merket med en tykk strek i boksen og gjennomsnittsverdien er merket med et kryss. Horisontale streker, i enden av de stiplede linjene, viser maksimal- og minimalverdi i dataene.

4. Diskusjon

Hovedresultatene fra eksperimentene i denne oppgaven viser at trykk, tilsvarende eller over 400 bar er nødvendig for å triploidisere torskkeegg, og at det finnes et optimalt tidspunkt på ca. 26 minutter etter befruktning hvor triploidisering er mest effektivt. Høyt trykk påvirker ikke bare triploidisering, men også dødelighet, eggkvalitet og utviklingshastighet i tidlige stadier. Om disse effektene er et resultat av det hydrostatiske trykket i seg selv eller om det skyldes individets triploide status er åpent for videre studier.

4.1 Diskusjon av material og metode.

Forsøksoppsett (forsøk 1):

For å være sikker på å treffe «vinduet» for triploidisering av torsk, ble det satt opp en matrise med 24 ulike grupper med et forholdsvis bredt spekter av ulike trykk og tider etter befruktning. For å eliminere påvirkningsfaktorer som kan ha innvirkning på eggene eksempelvis temperatur, karmiljø og familieinteraksjoner ble alle gruppene oppfostret i samme tank. Eggene som ble benyttet i forsøket er alle avkom fra et kjønnsmodent par med Atlantisk torsk. Eggene i forsøket er derfor helsøsken med liten genetisk variasjon og startet derfor hovedsakelig med samme utgangspunkt før induksjon av trykk. Dette gir et mindre kompleks bilde, siden en utelukker den genetiske parameteren. Resultatene fra forsøket viste et konkret triploidiseringsvindu hvor det kan forventes triploider av torsk. De aktuelle gruppene for videre forsøk er derfor betydelig innsnevret. Dette danner et godt utgangspunkt for videre studier, da med flere replikater.

Alle forsøksgruppene ble trykkbehandlet i 5 min, 30 min etter befruktning. Behandlingstiden ble nøye beregnet for å sikre tilnærmet lik behandling for alle forsøksgruppene. Liknede forsøk utført av Håvardstun (2011), har imidlertid vist at det tar lengre tid å oppnå ønsket trykk i trykkammeret ved økende trykkverdier (400 bar: 33sek., 500 bar:45sek., 600 bar: 49sek.). Denne ekstratiden kan ha en potensiell innvirkning på trykkbehandlingen, ettersom den reelle tiden for utsatt trykk er ulik mellom forsøksgruppene. Dette bør derfor tas hensyn til ved videre forsøk.

Før eggene ble plassert i trykkammeret ble all luft fjernet. Det er likevel mulig at det var noe luft til stede ved behandling, men dette kunne ikke måles. Luftbobler kan påvirke løseligheten i gasser og er beskrevet i Henry's lov: mengden av en gass som kan løses i en væske ved en bestemt temperatur, er proporsjonal med gassens trykk (partialtrykk) over væsken. Dette kan

føre til en gassovermetning i vannet, hvor økt trykk kan resultere i at mer gass løser seg i vannet, og gasstrykket inne i eggene vil øke over tid. Når trykket slippes vil løseligheten gå tilbake til utgangspunktet, og luftbobler frigjøres. Om dette skjer inne i egget kan det føre til trykkfallsyke. Hvilken effekt dette eventuelt vil ha på eggene er ukjent (Anders Mangor Jensen, IMR, 2013, pers. com).

Temperaturmålinger viste en ganske homogen temperatur gjennom hele forsøket (i kar 6,03 °C ± 0,10; i inkubatorbrønnen 5,99 °C ± 0,09; i avløpsvann 6,05 °C ± 0,10; i luften 10,45 °C ± 0,70). Klekkingen skjer vanligvis etter 10 dager ved 7 °C, men er sterkt temperaturavhengig, og ved 2,5 °C vil prosessen ta opptil fire uker (Godø, 2005). I dette prosjektet tilsvarer temperaturen ca. 6 °C og klekking forventes derfor rundt 11-15 dager. Det er også kjent at klekkingen av egg forekommer ganske synkront (Hall *et al.*, 2004). I dette forsøket kunne en observere de første tegnene på klekking den 20/4-2012, tilsvarende 11 dager etter befruktning. En fullstendig klekking ble ikke observert før 25/4-2012 (15 dager etter klekking). Effekt av temperatur er likevel en lite sannsynlig forklaring, i og med at inkubatorene har en høy utskifting av vann, samt er utstyr med en spredningsarm for innkommende vann som skal gi jevn vannsirkulasjon i hele karet. I andre marine arter som kveite er det vist at lys påvirker klekking (Helvik og Walther, 1992). Det er derfor mulig at lys i forsøkshallen kan ha påvirket klekketidspunktet.

Forsøksoppsett (forsøk 2):

Bildeserien av polarlegemet er kun representert med et enkelt individ. Grunnlaget er derfor ikke tilstrekkelig for å trekke noen endelig konklusjon omkring polarlegemets utskillelse. I tillegg til å involvere flere individer burde også triploide individer vært benyttet i forsøksoppsettet for en sammenligning av polarlegemets struktur, plassering og tid for utskillelse.

Metoder for prøveuttak og analyse:

Befruktningsprosenten ble undersøkt ved fem ulike tider parallelt med trykkforsøket (forsøksstart (T_0), 20-, 40-, 60- og 80 minutter etter forsøksstart). Beregning av befruktningprosenten ble hovedsakelig gjort for å sikre at dødeligheten var et resultat av enten trykkbehandling eller naturlig dødelighet og ikke på grunn av at eggene og spermen tapte kvalitet over tid. Det ble også tatt hensyn til tidligere resultater fra forsøk utført av Håvardstun (2011), som ikke viste noen spesifikk trend mellom eksperimentgruppene (400,

500, 600 bar), eller mellom uttak gjort før og etter trykkbehandling. Resultatene fra befruktningsprosenten i dette forsøket, gir derfor ingen informasjon over befruktningsprosenten i de trykkbehandlede eggene.

Uttak for døde egg ble gjort tre ganger i løpet av forsøket. Det ble observert høyere dødelighet i grupper som ble utsatt for høyere trykk sammenlignet med grupper utsatt for lavere trykkverdier (kap 3.2). Metoden fungerte ikke til et statistisk oppsett, men gav oversikt over differansen mellom gruppene. En mer nøyaktig måling av dødelighet, da med daglige uttak og målinger ved forsøksslutt, kunne vært gjort for å kunne ta stilling til om trykkbehandlingen hadde noen påvirkning på overlevelse i forsøksperioden. I tillegg kunne det tas hensyn til overlevelsen ved sluttuttak (antall levende larver) og antall individer som ble fjernet ved uttak underveis i forsøket.

Det er flere ulike metoder for identifisering av triploider, hvor både indirekte og direkte metoder blir benyttet. Triploider har et ekstra kromosomsett som resulterer i at cellekjerne og den cellulære størrelsen av erytrocyttene øker for å gi plass til den økende mengden av DNA (Benfey *et al.*, 1984). Størrelsesmåling av kjerne og erytrocytter har derfor vært en populær metode for identifisering av triploide individer, som også er enkel og billig å bruke (Benfey og Sutterlin, 1984b, a, Benfey, 1999). Dessverre har det vist seg at erytrocyttens størrelse ikke alltid stemmer overens med ploiditetsstatus (Thorgaard og Gall, 1979). En annen ulempe med denne metoden, er at den krever blodceller. Ploiditet kan dermed ikke bestemmes før blodcellene er tilstede, og da er fisken flere uker gammel (Anders Mangor Jensen, IMR, 2013, pers. com). For en mer presis evaluering av ploiditet er det derfor nødvendig med en mer direkte metode som f. eks måling av DNA med flow cytometri (Tiwary *et al.*, 2004), hvor man kan bruke både egg og nyklekte larver for en rask bestemmelse av ploiditet (Anders Mangor Jensen, IMR, 2013, pers. com). Per i dag er dette den raskeste og mest presise teknikken som er tilgjengelig for identifisering av ploiditet hos fisk (Thorgaard *et al.*, 1982, Allen, 1983, Maxime, 2008).

Observasjoner i celledelingsstadiet ble først og fremst gjennomført for å bekrefte hypotesen om en raskere celledeling i diploide egg sammenlignet med triploide, siden triploide individer har 50 % mer arveanlegg. En ny metode modernisert fra Avery *et al.* (2009) og Kraeussling *et al.* (2011) ble derfor opprettet for å kunne karakterisere eggene i celledelingsperioden, da med tanke på symmetri, befruktningsgrad og gjennomsnittlig antall blastomerer per egg. Det ble også tatt hensyn til andre observerte abnormaliteter som «arrestert utvikling» og utvidet akse

mellom blastomerene og deres påvirkning av økt hydrostatisk trykk. Utvikling av en ny metode gjør det vanskelig å sammenligne med tidligere studier fra celledeling i, men fungerer for en uttesting av hypotesen i dette forsøket.

I epibolistadiet ble det utviklet en metode for å måle epiboli basert på eggets naturlige posisjon i vannlaget. Dette ble gjort ved lengdemål av eggets diameter samt mål for dekningsgrad (epiboli). Videre beregninger ble derfor basert på en todimensjonal oppfatning av egget. Egget er rundt og det er kanskje derfor mer naturlig å regne ut volum på egget samt areal for det ektodermale laget, for å kunne si noe om den reelle dekningsgraden av epiboli. Om dette er en optimal metode eller ikke kan derfor diskuteres, men metoden gir i alle fall et forholdstall hvor utgangspunktet er likt for alle individer. Forholdstallet ble også testet ved utregning av piksels til millimeter basert på mellomliggende ruteark i bildeserien og bekrefter at bildene er tatt med samme forstørrelse (vedlegg 7).

In situ hybridisering kan brukes som en kvalitativ metode for beregning av antall fotoreseptorer i retina med mRNA baserte prober som markører. For en mer presis estimering av genuttrykk (mRNA) ville det være mer korrekt å bruke kvantitativ revers transkriptase polymerase kjedereakjon, også kalt qPCR, som vil gi et indirekte estimat av mengden transkript til den aktuelle fotoreseptoren. Selv om qPCR gir et mer presist estimat på mengden transkript, vil metoden ikke kunne si noe om antall celler. Ved videre studier hadde det vært nyttig å benytte begge metodene for utforming av en protokoll som tilsvarende antall celler per estimat fra både diploide og triploide individer. På denne måten hadde videre studier blitt enklere og mye mindre tidskrevende når det gjelder sammenligning av fotoreseptorer i retina. Et slikt studie kunne også gitt informasjon om størrelsesforholdet mellom diploide og triploide celler.

For statistisk oppsett av data ble det brukt en lineær modell (LM) for beregning av eggets diameter og en generalisert lineær modell (GLM) for beregning av sannsynligheten for triploiditet, sannsynligheten for ulike variasjoner i celledelingsfasen, dekningsgrad av epiboli og generalisert lineær mikset modell for antall fotoreseptorer i diploider sammenlignet med triploider. En LM kan benyttes ved antagelser om konstant varians og normalfordeling. Dette er vanlig å benytte ved parametriske mål som for eksempel lengde. For analyse av diameter ble derfor LM benyttet. Både diameter og dekningsgrad av epiboli er begge lengdemål, men for analyse av epiboli ble det valgt en binær logistisk regresjon innen familien GLM. Dette fordi det her er snakk om proporsjoner: hvor stor andel av egget som er dekket av kappen. Det

betyr at responsvariabelen har en nedre begrensning på 0 (ikke noe av egget er dekket) og en øvre begrensning på 1 (hele egget er dekket). På grunn av disse begrensningene er en binomisk fordeling best å bruke. GLM danner grunnlaget for de fleste statistiske undersøkelsene utført i denne oppgaven. Den skiller seg fra LM ved at den tillater avvik fra konstant varians og tillater annen fordeling enn en normalfordeling. Man kan altså spesifisere fordelingen av den uforklarte variansen i modellen avhengig av hvilken type data man har. Mesteparten av data som er presentert her følger en binomisk fordeling. Andre data som antall blastomerer per egg er telledata og kan i de fleste tilfeller spesifiseres som poisson fordelt. I alle data blir trykk og tid etter befruktning behandlet som kontinuerlige variabler. Dette valget gir rom for diskusjon ettersom det kun er 4 tider etter befruktning. Jeg valgte denne løsningen fordi n var rimelig stor innen hver tid og fordi jeg da ble i stand til å få et rimelig godt estimat av optimal tid etter befruktning.

4.2 Diskusjon av resultater

Den fysiske effekten av hydrostatisk trykk (fra befruktning fram til klekking).

Statistisk analyse fra flowcytometri viser at sannsynligheten for triploiditet har en signifikant effekt av trykk. Modellering av data (fig. 17) viser en s-formet kurve, hvor overgangen fra diploid til triploid status ser ut til å ligge mellom 200 og 500 bar der ca. 350 bar representerer trykket hvor det oppnås 50 % triploiditet. Resultatene viste også en signifikant effekt av tid etter befruktning. Dette kan observeres i gruppene trykket ved 400 bar, som viste variabel ploiditetsstatus i de ulike gruppene. Ved 600 bar derimot, ser det ut til at triploidisering er uavhengig av tid etter befruktning.

Ulike tider etter befruktning ved trykkbehandling av torsk, har blitt testet av Ihssen *et al.* (1990). Det ble da benyttet 8500 psi (tilsvarer 586 bar) i 5 min 15, 30 og 45 min etter befruktning, men en vellykket triploidisering ble bare oppnådd ved 30 min etter befruktning. Ettersom eggforsyningene i 2004 var begrenset ble produksjonen i dette forsøket for lav til at forsøket kunne videreføres. Ved et nytt forsøk i 2005 gikk de derfor bort fra ulik tid etter befruktning. I lignende forsøk gjort av Haugen *et al.* i 2009 (upublisert) ble det testet ut trykkbehandling 10, 15, 20, 25, 30, 35 og 40 min etter befruktning. Triploidiseringsvinduet ble her funnet å være mellom 20-35 min, hvor tidene før og etter viste kraftig reduksjon i triploidisering (Trine Haugen, IMR, 2013, pers. com). Alle gruppene ble behandlet med 600 bar i 5 min. Begge disse forsøkene står i kontrast til resultatene presentert i denne oppgaven, hvor også tidene 10 og 40 minutter etter befruktning ved 600 bar også gav en tilnærmet 100 %

triploid status. Dette kan tyde på at vinduet for triploidisering varierer fra egg-gruppe til egg-gruppe, men at tiden for trykkbehandling etter befruktning hovedsakelig dekker et ganske bredt vindu.

Effekter av fysisk behandling på egg, eller den potensielle virkningen av de cytologiske, molekylære eller genetiske konsekvensene av disse behandlingene har ikke vært et tema for systematiske undersøkelser (Maxime, 2008). Heller ikke de underliggende mekanismene bak triploidisering med trykksjokk har blitt undersøkt (Piferrer *et al.*, 2009). I pattedyrceller er det kjent at strukturen og fysiske egenskaper av makromolekyler (membran lipider og proteiner, cytoskjelett) så vel som fysiologiske prosesser i relasjon med membranen er påvirket av forandring i hydrostatisk trykk. Effekten av høyt trykk er grundig gjennomgått av Macdonald (1984). En økning i trykk reduserer fluiditeten i cellemembranen. Høyt trykk vil også forårsake uorden i mikrotubuler, mikrofilamenter (Wilson *et al.*, 2001) og membranbundne proteiner (Scarлата, 2005). Effekten av hydrostatisk trykk er reversibelt. I dette forsøket ga gruppene som ble utsatt for 400 bar en relativt stor andel triploide individer når behandlingen foregikk ved 20 og 30 min etter befruktning. Ved ytterpunktene, 10 og 40 min etter befruktning derimot, var gruppen representert med lavere ploiditetstatus. Dette kan da skyldes at mikrotubuler og mikrofilamenter er trykkfølsomme og at det ved høyere trykk, vil føre til en kraftigere tilbakedannelse av mikrotubuler (Wilson *et al.*, 2001). Dette kan igjen føre til en forsinket utskillelse av polarlegemet og dermed fungere som en mulig forklaring på at trykkbehandling kan benyttes seinere i prosessen (40 min etter befruktning) enn først antatt. Siden prosessene som forstyrres ved triploidisering normalt reverseres til første celledeling kan det være en mulighet for at egg som trykkes før dette tidspunktet (10 min etter befruktning) vil reverseres tilstrekkelig til å skille ut polarlegemet, tross behandling med høyt hydrostatisk trykk. Andre teorier baseres på at høyt hydrostatisk trykk (600 bar) har en effekt på oolemma (vitelinmembranen), som gjør at den motstår utskillelse av polarlegemet (Piferrer *et al.*, 2009). Om effekten av trykk øker i takt med mostanden til vitelinmembranen kan dette være en forklaring på hvorfor 600 bar gruppens ploiditetsstatus var uavhengig av tid.

I resultatene fra flowcytometri analysene ble det også registrert triploide individer i grupper hvor det hovedsakelig ikke skal være mulig å oppnå triploid status (eksempelvis et individ i gruppe 1c og 1d som er trykket med 1 bar 30 og 40 min etter befruktning og skal fungere som en diploid kontrollgruppe). Grunnen til dette er uvisst, men det kan ikke utelukkes at det finnes individer hvor utskillelsen av polarlegemet har mislykkes (naturlig polyploide individer). Tilstedeværelsen av polyploide individer er blitt observert i flere fylogenetiske

ordre som nevnt i Thorgaard og Gall (1979), Pandian og Koteeswaran (1998) og Maxime (2008).

H_{A1}: Økt trykk vil resultere i økt mengde i triploide individer.

Flowcytometri analyser viste at trykk hadde en signifikant effekt på triploidi. Denne arbeids hypotese er derfor akseptert.

H_{A2}: Tid etter befruktning vil påvirke triploidiserings effektiviteten.

Flowcytometri analyser viste også en signifikant effekt av tid. Denne arbeidshypotesen er derfor bekreftet.

Den biologiske effekten av triploiditet og høyt hydrostatisk trykk på utvikling (fra befruktning fram til klekking).

Dødelighet

Måling av dødelighet viste at gjennomsnittsdødeligheten per trykkgruppe i inkubasjonsfasen, økte i gruppene som ble utsatt for høyere trykk (400- og 600 bar). Det er foreløpig ikke gjort sammenlignende data fra økt trykk og dødelighet på Atlantisk torsk, men triploidisering med temperatursjokk viser signifikant redusert overlevelsesrate (Peruzzi *et al.*, 2007). Peruzzi *et al.* (2004) fant også en økende dødelighet ved larvestadiet og tidlig utvikling i havabbor. Ifølge Cherfas *et al.* (1994) er det sannsynlig at dårlig overlevelse ved tidlige stadier skyldes trykket egget blir utsatt for under meiose II, mens dødeligheten på senere stadier skyldes den triploide statusen til individet (Piferrer *et al.*, 2009). Ut fra observasjoner vist i fig. 10 kan det se ut til at gruppene med triploid fisk er representert med en generelt høyere dødelighet enn gruppene med diploide individer. Det kan derfor tenkes at torskens triploide status har større effekt i tidligere stadier enn først antatt i Cherfas *et al.* (1994), på dødeligheten i inkuberingsstadiet. Likevel bør det nevnes at dødeligheten i den diploide kontrollgruppen ble målt til å være noe høyere enn de andre diploide gruppene. Hva dette skyldes er ukjent. Det ble også målt større variasjon i dødelighetsdata i de diploide gruppene.

Celledeling

Resultater fra celledelingsanalysen viste at andelen asymmetriske egg økte ved høyere trykk. Dette kan kanskje være en mulig forklaring på observert dødelighet og deformitet i triploider,

i senere stadier (Opstad *et al.*, 2013). Det ble derimot ikke funnet noen effekt av verken tid eller trykk på egg i «arrestert utvikling» eller utvikling (gjennomsnittlig antall blastomerer). Dette avkrefter derfor første del av hypotesen (H_{A3}) om redusert celledelingshastighet i triploide individer som følge av tre kromosomer og derfor redusert replikasjons-hastighet. Selv om det ikke ble registrert noen signifikant effekt av trykket kunne man likevel observere en trend hvor sannsynligheten for egg i «arrestert utvikling» også ser ut til å øke i forhold til økt trykk, og gjennomsnittlig antall blastomerer ser ut til å minke når trykket øker. Ved manglende signifikant effekt er det vanskelig å si om denne trenden er reell eller kun er et resultat av tilfeldigheter. Videre studier er derfor nødvendig for å bekrefte dette.

H_{A3} : Økt trykk vil påvirke celledelingshastighet, delingssymmetri og eggoverlevelse

Analyse for celledeling viste ingen signifikant effekt av verken trykk eller tid på gjennomsnittlig antall blastomerer. Hypotesen er derfor avkreftet når det gjelder trykkets påvirkning av celledelingshastigheten. Delingssymmetri derimot viste en signifikant effekt for trykk på asymmetriske celler. Hvor sannsynligheten for asymmetri økte i takt med trykket. Det ble også registrert en signifikant effekt av trykk for «utvidet aksial» (annen form for asymmetri). På dette området er derfor hypotesen akseptert. Ubefruktede egg og egg i arrestert utvikling representerer eggoverlevelsen. Det ble funnet en signifikant effekt av trykk for ubefruktede egg, men det ble ikke funnet noen form for effekt av verken trykk eller tid for forekomsten av egg i «arrestert utvikling». Hypotesen kan derfor sies å være delvis bekreftet.

Utviklingshastighet

Resultater fra gastrulaperioden viser at tid og trykk har en signifikant effekt på dekningsgraden av det ektodermale laget (epiboli) i gruppene som er trykket 10 og 40 minutter etter befruktning. Gruppene som ble trykket 20 og 30 min etter befruktning viser derimot liten eller ingen påvirkning av det økende trykket. Det kan derfor være en mulighet for at for tid for trykkbehandling (tid etter befruktning) påvirker egget i gastrula stadiet. Gruppene som ble trykket 20 og 30 min etter befruktning skiller seg også her ut som de gruppene som gir mest stabile verdiene uavhengig av trykket. Grunnen til dette er vanskelig å si, men det kan tyde på at visse tidspunkter i utskillelsen av polarlegemet i meiose II er mer sårbare for trykkbehandling og at dette da kan ha en påvirkning i senere stadier. Likevel viser gruppene som er trykkbehandlet 20 og 30 minutter etter befruktning stabile verdier for epiboli og avkrefter derfor igjen at utviklingshastigheten forandres som et resultat av et ekstra kromosom i triploider.

H_{A4}: Triploide individer inneholder et ekstra kromosom og vil derfor utvikles langsommere enn diploide individer.

Epiboli analyse viste en interaksjon mellom trykk og tid. Hvor gruppene som ble trykket 20 og 30 min etter befruktning viste stabile verdier for alle gruppene i forsøket, uavhengig av trykk og tid. Gruppene som ble trykket 10 og 40 min etter befruktning derimot viste en redusert utvikling ved økt trykk. Hypotesen er derfor delvis bekreftet.

Egg-diameter

I tillegg til epiboli ble det også gjort mål av eggets diameter, noe som helt uventet viste en signifikant effekt av trykk (bar) på eggets diameter, hvor økende trykk førte til en generelt mindre eggdiameter. En mulig forklaring på dette kan være osmotisk vanntap under trykksjokk. Vi vet ikke hva som skjer med vitelinmembranen når den utsettes for trykk. Kanskje vannpermeabiliteten øker. Vitelinmembranen som omslutter plommen (fram til epiboli) er den eneste betydelige barrieren for diffusjon av vann og ioner mellom cytoplasma og det ytre mediet (Potts og Eddy, 1973). Den lave permeabiliteten sørger for at det hypoosmotiske egget ikke mister vann. Det er imidlertid lite trolig at dette skal innvirke på egg diameteren (eggeskalldiameteren). En annen mulig grunn kan være at trykket har påvirket kortikalreaksjonen slik at mindre kolloider frisettes i perivitellinrommet, og dermed reduserer svellingsgraden. Dette vil føre til mindre utspenning av chorion før herding og er kanskje den mest akseptable forklaringen.

Selv om det ble påvist en signifikant effekt av trykk på eggdiameteren var differansen mellom gruppene utsatt for lavest- og høyest trykk liten. Det ble også registrert stor variasjon innad i de ulike gruppene. Stigningstallet (a) for grafen er gitt med formelen $y = ax + b$ og tilsvarer $y = 0,00002582 * x + 1,403$. Det er derfor vanskelig å si om denne observasjonen er reell.

Antall celler

Triploide cellekjerne inneholder per definisjon 50 % mer DNA enn diploid cellekjerne og som en konsekvens av dette har triploider større cellekjerne. Dette medfører også en korresponderende økning i cellevolumet for å opprettholde forholdet mellom kjernematerialet og det cytoplasmatiske volumet på nivå med diploider (Benfey, 1999). I noen organismer har kroppsstørrelse vist seg å være korrelert med størrelsen på cellen (Ihssen *et al.*, 1990), og det kunne derfor forventes at triploide individer hadde en raskere vekst og derfor ble større sammenlignet med diploider (Piferrer *et al.*, 2009). Dette ble avkreftet av Ihssen *et al.* (1990)

og av Pandian og Koteeswaran (1998), som viste at triploid fisk verken ble større, eller vokste raskere sammenlignet med diploid fisk. Ihssen *et al.* (1990) vurderte disse tidligere funnene og viste at økt celle størrelse førte til redusert antall celler i forskjellige organer, da blant annet i blod-, hjerne-, muskel, retina- lever- og nyrevev mfl. (Benfey, 1999). Resultater fra statistisk analyse av antall fotoreseptorer, i dette arbeidet, viste en signifikant effekt av ploiditet, hvor triploide individer inneholdt et redusert antall fotoreseptorer sammenlignet med diploide individer. Det ble ikke observert noen størrelsesforskjell på øynene i triploide sammenlignet med diploide larver. Dette kan tyde på at det finnes færre, men også større blå sensitive fotoreseptorer i triploid fisk og bekrefter resultater fra blant annet Swarup (1959) som viser at større kjernemateriale blir kompensert for med et redusert antall celler i retina.

H_{A5}: Ploiditet vil påvirke antall fotoreseptorer i retina.

Analyse for fotoreseptorer inneholdt for få antall observasjoner (n) til å finne interaksjoner mellom trykk og tid. Likevel var det en sterk effekt av trykk, hvor triploide individer inneholdt et betydelig mindre antall fotoreseptorer enn diploide. Hypotesen er derfor bekreftet.

Kunnskap om de potensielle konsekvensene av trioloiditet er mangelfull, og studier basert på fysiologi i triploid fisk er ofte begrenset til vekst og overlevelse, utnyttelse av oksygen og reproduksjonsfysiologi (omtalt i Benfey (1999) og Tiwary *et al.* (2004)). Med unntak av hematologiske studier, er grunnforskning utført på triploide fiskeceller begrenset. Siden den fysiologiske kapasiteten av alle organsystem er avhengig av cellulær struktur og funksjon, er det naturlig å stille spørsmål om et redusert antall celler vil ha funksjonelle konsekvenser i triploid fisk. Det er påvist at celler i flere organer er større enn i diploide individer (Benfey, 1999). Økning av det cellulære volumet kan tenkes å forlenge den interne avstanden, og dermed signaloverføringen. Det kan også tenkes at økt cellevolum kan redusere overflateområdet og dermed påvirke transportprosessene over membranen (Maxime, 2008).

Effekten av triploidisering i oppdrett

Dette foreliggende arbeidet har vist at fiskens triploide status kan ha en biologisk effekt som kan få konsekvenser i en oppdrettssammenheng. Studier av triploid Atlantisk torsk viste en signifikant høyere overlevelse i inkubasjonsfasen, men en signifikant lavere overlevelse fra startfôring og de neste 87 dagene. Etter sortering (dag 87) på størrelse og ploiditesnivå og overføring til individuelle tanker var det derimot minimal forskjell i overlevelse mellom triploide og diploide grupper (Opstad *et al.*, 2013). Også andre studier har vist at det ikke er noe spesifikt skille mellom diploide og triploide individer i overlevelse og vekst når fisken er oppfostret i separate kar med identiske levevilkår (McGeachy *et al.*, 1995, Ojolic *et al.*, 1995, Felip *et al.*, 1997, Haffray *et al.*, 2005). Ved felles oppfostring derimot, vil flere triploide arter vise en lavere overlevelseshastighet i vekstfasen sammenliknet med diploid fisk for eksempel Atlantisk laks, karpe, regnbueørret, ørret (*Salmo trutta*), maller (*Siluriformes*) mfl. (Utter *et al.*, 1983). Sett i forhold til at fotoreseptorer påvirker torskens syn, kan dette tyde på at triploid torsk taper førkonkurransen med diploid fisk når de oppfostres sammen og at dette kanskje er en mulig forklaring for redusert vekst og økt dødelighet. Siden torsk er visuelle predatorer kan antall fotoreseptorer forventes å være en slik påvirkende faktor. Fotoreseptorer er lysfølsomme nerveceller i retina (netthinnen). De fleste fisker har både staver- og tappceller i retina, der stavene er svært lysømfintlige og kan registrere små lysmengder. Tappene derimot, sørger for fargesyn og høy synsskarphet og gjør det lettere å skille objekter fra hverandre. Det finnes flere typer tapper som hver inneholder en pigmenttype med karakteristisk absorpsjonsevne (Kryvi og Totland, 1997). Resultatene fra dette studiet viste at triploide individer inneholdt en redusert mengde fotoreseptorer ved tidlige larvestadier sammenliknet med diploide individer. Det er derfor grunn til å tro at torskens triploide status kan ha en innvirkning på synsskarpheten og dermed torskens evne til å fange bytter og konkurransedyktighet i forhold til diploide individer.

Triploid torsk har mange nyttige anvendelser innenfor havbruk. Men en intensiv storskala produksjon av triploid fisk er først og fremst avhengig av konsumentens aksept. I følge nasjonale- og EU-forskrifter er polyploid fisk, som triploider, ikke regnet som genetisk modifiserte organismer (Directive 90/220/EEC den 23 April 1990). Dette fordi triploidisering ikke endrer DNA, men kun manipulerer delingsprosessen i kromosomene (Triantafyllidis *et al.*, 2007). Polyploid fisk er derfor unntatt fra de strenge reguleringene som gjelder for bruk og oppbevaring av genmodifiserte organismer i landbruk og oppdrett og merking av polyploid produkter er ikke påkrevd (Piferrer *et al.*, 2009). Likevel kan det være nødvendig med en

grundig framlegging av informasjon om triploid fisk for å kunne oppnå aksept blant konsumentene, med en redegjørelse for hvorfor det er nødvendig med steril fisk i oppdrett.

4.3 Konklusjon og fremtidsperspektiver:

Flere studier, da inkludert dette studiet, har demonstrert et suksessfullt utfall av triploider ved hydrostatisk trykkbehandling (ca 600 bar). Dette studiet viser i tillegg, at fisk også kan oppnå en triploid status ved 400 bar hvor tid etter befruktning spiller en vesentlig rolle for triploidiseringssuksess. Studiet har også vist at effekten av trykk er reell og ofte forverres ved høyere trykk. Det anbefales derfor å definere et behandlingsvindu hvor trykket er lavest mulig, men likevel gir 100 % triploiditet. Et optimalisert behandlingsvindu for triploidisering av torsk kan, ut ifra data observert i det foreliggende arbeidet, forventes å ligge mellom 400 og 500 bar og ca 26 minutter etter befruktning. Dette behandlingsvinduet forventes å gi en høy grad av triploiditet samt mindre negativ effekt på utvikling og vil derfor fungere som et godt utgangspunkt i videre arbeid. Videre forskning er likevel nødvendig for å fastslå faktorer som eksakt trykk, tid etter befruktning og behandlingstid (tid utsatt for trykk) som er nødvendig for å forhindre utskillelsen av det andre polarlegemet. Videre vil det også være interessant å teste tider utenfor sonene som er representert i studiet for å oppnå en bedre forståelse av mekanismene rundt polarlegemets utskillelse.

Torskelarvene som ble brukt i det presenterte studiet, er avkom fra en hunn og en hann. Presenterte data for statistikk tar derfor ikke hensyn til den genetiske differansen mellom ulike populasjoner, eller innad i en populasjon. Videre arbeid må derfor gjøres med flere replikater samt materiale fra ulike foreldre, innad det optimale vinduet som er presentert i dette studiet. Dette hadde forsterket forsøksoppsettet, slik at det statistiske oppsettet hadde representert informasjon om torsk generelt. For å ta hensyn til genetisk variasjon bør videre forsøk også inneholde data fra andre populasjoner.

På tross av gjentatte gode resultater og utarbeidelse av et optimalt behandlingsvindu viser ofte triploidiseringsforsøk en betydelig variasjon i triploidiseringssuksessen mellom triploide og diploide individer, både mellom ulike arter og innad samme art. Dette tyder på at genetiske og familie variasjoner spiller en viktig rolle på utfallet av triploidiseringen. Eggkvaliteten varierer i forhold til eggcyklusen, at fisken er førstegangsgyter, morfiskens tilstand (vekt) osv. og er derfor også en faktor som en må ta hensyn til ved triploidisering. Selv ved protokoller

for Atlantisk torsk vil det derfor forekomme naturlige variasjoner som avviker fra utfallet i optimale prøveforsøk.

Det hadde også vært interessant og utført videre studier av antall og størrelse av fotoreseptorer for å kartlegge hvordan dette påvirker fiskens synsskarphet og adferd. Og om dette kan knyttes opp mot dårligere vekst, overlevelse og konkurransedyktighet i triploide individer sammenlignet med diploid fisk.

Referanser:

- AGLEN, A. 2002. Torsk i oppdrett. In: GLETTE, J., VAN DER MEEREN, T., OLSEN, R. E. & SKILBREI, O. (eds.) *Havbruksrapporten 2002*. Havforskningsinstituttet.
- ALLEN, S. K. 1983. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquaculture*, 33, 317-328.
- ARAKI, H., COOPER, B. & BLOUIN, M. S. 2007. Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. *Science*, 318, 100-103.
- ÁRNASON, T. & BJÖRNSSON, B. 2012. Spawning-related mortality in captive Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*, 43, 292-296.
- AVERY, T. S., KILLEN, S. S. & HOLLINGER, T. R. 2009. The relationship of embryonic development, mortality, hatching success, and larval quality to normal or abnormal early embryonic cleavage in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture*, 289, 265-273.
- BEKKEVOLD, D., HANSEN, M. M. & NIELSEN, E. E. 2006. Genetic impact of gadoid culture on wild fish populations: predictions, lessons from salmonids, and possibilities for minimizing adverse effects. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 63, 198-208.
- BENFEY, T., SUTTERLIN, A. & THOMPSON, R. 1984. Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41, 980-984.
- BENFEY, T. J. 1999. The physiology and behavior of triploid fishes. *Reviews in Fisheries Science*, 7, 39-67.
- BENFEY, T. J. & SUTTERLIN, A. M. 1984a. Growth and gonadal development in triploid landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41, 1387-1392.
- BENFEY, T. J. & SUTTERLIN, A. M. 1984b. Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 36, 359-367.
- BERG, E. & ALBERT, O. T. 2003. Cod in fjords and coastal waters of North Norway: distribution and variation in length and maturity at age. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 60, 787-797.
- BRANDER, K. 2005. *Spawning and life history information for North Atlantic cod stocks*, International Council for the Exploration of the Sea.
- CAL, R. M., VIDAL, S., GÓMEZ, C., ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, B., MARTÍNEZ, P. & PIFERRER, F. 2006. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 251, 99-108.
- CHERFAS, N. B., GOMELSKY, B., BEN-DOM, N., PERETZ, Y. & HULATA, G. 1994. Assessment of triploid common carp (*Cyprinus carpio* L.) for culture. *Aquaculture*, 127, 11-18.
- CHOURROUT, D. 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture*, 36, 111-126.
- DAMBERGS, N. 1964. Extractives of fish muscle. 4. Seasonal variations of fat, water-solubles, protein, and water in cod (*Gadus morhua* L.) filets. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 21, 703-709.
- FELIP, A., ZANUY, S., CARRILLO, M., MARTÍNEZ, G., RAMOS, J. & PIFERRER, F. 1997. Optimal conditions for the induction of triploidy in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 152, 287-298.
- FORDHAM, B. S. E. & TRIPPEL, E. 2002. Feeding behaviour of cod (*Gadus morhua*) in relation to spawning. *Journal of Applied Ichthyology*, 15, 1-9.
- GHIgliOTTI, L., BOLLA, S. L., DUC, M., OTTESEN, O. H. & BABIAK, I. 2011. Induction of meiotic gynogenesis in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) through pressure shock. *Animal Reproduction Science*, 127, 91-99.
- GODØ, O. R. 2005. Torskens generelle biologi. In: OTTERÅ, H., TARANGER, G. L. & BORTHEN, J. (eds.) *Oppdrett av torsk-næring med framtid*. Norsk Fiskeoppdrett AS.

- GODØ, O. R. & MOKSNESS, E. 1987. Growth and maturation of Norwegian coastal cod and Northeast Arctic cod under different conditions. *Fisheries Research*, 5, 235-242.
- GOMELSKY, B., EMELYANOVA, O. & RECOUBRATSKY, A. 1992. Application of the scale cover gene (N) to identification of type of gynogenesis and determination of ploidy in common carp. *Aquaculture*, 106, 233-237.
- HAFFRAY, P., BRUANT, J. S., FACQUEUR, J. M. & FOSTIER, A. 2005. Gonad development, growth, survival and quality traits in triploids of the protandrous hermaphrodite gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 247, 107-117.
- HALL, T. E., SMITH, P. & JOHNSTON, I. A. 2004. Stages of embryonic development in the Atlantic cod *Gadus morhua*. *Journal of morphology*, 259, 255-270.
- HANSEN, T., WARGELIUS, A., TARANGER, G. L. & FJELLDAL, P. G. 2012. Oppdrett av steril fisk. *Rapport fra Havforskningen*. Havforskningsinstituttet.
- HÅVARDSTUN, S. 2011. *Triploid induction in Atlantic cod (Gadus morhua L.) by the use of different pressure levels*. Master of Science University of Bergen.
- HELVIK, J. V. & WALTHER, B. T. 1992. Photo-regulation of the hatching process of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs. *Journal of Experimental Zoology*, 263, 204-209.
- IHSSEN, P., MCKAY, L., MCMILLAN, I. & PHILLIPS, R. 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. *Transactions of the American Fisheries Society*, 119, 698-717.
- INOUE, S. & SALMON, E. D. 1995. Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Molecular Biology of the Cell*, 6, 1619.
- JOHNSON, R. M., SHRIMPTON, J. M., HEATH, J. W. & HEATH, D. D. 2004. Family, induction methodology and interaction effects on the performance of diploid and triploid chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 234, 123-142.
- JØRSTAD, K. E., VAN DER MEEREN, T., PAULSEN, O. I., THOMSEN, T., THORSEN, A. & SVÅSAND, T. 2008. "Escapes" of Eggs from Farmed Cod Spawning in Net Pens: Recruitment to Wild Stocks. *Reviews in Fisheries Science*, 16, 285-295.
- KARLSEN, Ø., HEMRE, G. I., TVEIT, K. & ROSENLUND, G. 2006a. Effect of varying levels of macro-nutrients and continuous light on growth, energy deposits and maturation in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture*, 255, 242-254.
- KARLSEN, Ø., NORBERG, B., KJESBU, O. & TARANGER, G. 2006b. Effects of photoperiod and exercise on growth, liver size, and age at puberty in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 63, 355-364.
- KJESBU, O. 1989. The spawning activity of cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Biology*, 34, 195-206.
- KJESBU, O., KLUNGSØYR, J., KRYVI, H., WITTHAMES, P. & WALKER, M. G. 1991. Fecundity, atresia, and egg size of captive Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to proximate body composition. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 2333-2343.
- KJESBU, O., KRYVI, H. & NORBERG, B. 2005. Oocyte size and structure in relation to blood plasma steroid hormones in individually monitored, spawning Atlantic cod. *Journal of fish biology*, 49, 1197-1215.
- KJESBU, O. S. 1991. A simple method for determining the maturity stages of Northeast Arctic cod (*Gadus morhua* L.) by in vitro examination of oocytes. *Sarsia*, 75, 335-338.
- KJØRSVIK, E., PITTMAN, K. & PAVLOV, D. 2004. From fertilisation to the end of metamorphosis—functional development. *Culture of Cold-Water Marine Fish*, 204-278.
- KLEPPE, L. 2013. *Transcriptome dynamics in Atlantic cod (Gadus morhua L.) during oogenesis and early embryonic development and in embryos from cortisol treated females*. Dissertation for the degree of philosophia doctor (PhD), Universitetet i Bergen.
- KOEDPRANG, W. & NA-NAKORN, U. 2000. Preliminary study on performance of triploid Thai silver barb, *Puntius gonionotus*. *Aquaculture*, 190, 211-221.
- KOMEN, H. & THORGAARD, G. H. 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. *Aquaculture*, 269, 150-173.

- KRAEUSSLING, M., WAGNER, T. U. & SCHARTL, M. 2011. Highly asynchronous and asymmetric cleavage divisions accompany early transcriptional activity in pre-blastula Medaka embryos. *PloS one*, 6, e21741.
- KRYVI, H. & TOTLAND, G. K. 1997. Fiskeanatomi. Kristiansand: Høyskoleforlaget.
- LAMBERT, Y. & DUTIL, J. D. 2000. Energetic consequences of reproduction in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to spawning level of somatic energy reserves. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57, 815-825.
- LODISH, H., ARNOLD, B., KAISER, C. A., KRIEGER, M., SCOTT, M. P., BRETSCHKE, A., PLOEGH, H. & MATSUDAIRA, P. 2007. *Molecular Cell Biology*, New York, W. H. Freeman and Company.
- MACDONALD, A. 1984. The effects of pressure on the molecular structure and physiological functions of cell membranes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 304, 47-68.
- MARO, B., JOHNSON, M. H., WEBB, M. & FLACH, G. 1986. Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. *Journal of embryology and experimental morphology*, 92, 11-32.
- MARO, B. & VERLHAC, M.-H. 2002. Polar body formation: new rules for asymmetric divisions. *Nature Cell Biology*, 4, E281-E283.
- MAXIME, V. 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish and Fisheries*, 9, 67-78.
- MCGEACHY, S. A., BENFEY, T. & FRIARS, G. 1995. Freshwater performance of triploid Atlantic salmon (< i> *Salmo salar*</i>) in New Brunswick aquaculture. *Aquaculture*, 137, 333-341.
- MCGINNITY, P., PRODÖHL, P., FERGUSON, A., HYNES, R., Ó MAOILÉIDIGH, N., BAKER, N., COTTER, D., O'HEA, B., COOKE, D. & ROGAN, G. 2003. Fitness reduction and potential extinction of wild populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*, as a result of interactions with escaped farm salmon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, 2443-2450.
- MORTON, C. H. 2013. Identifisering av triploid fisk ved bruk av flowcytometri. In: BAKKETEIG, I. E., GJØSÆTER, H., HAUGE, M., LOENG, H., HODDEVIK SUNNSET, B. & ØSTERVOLD TOFT, K. (eds.) *Havforskningsrapporten 2013. Fisken og havet, særn. 1-2013.*: Havforskningsinstituttet.
- NISHIYAMA, M., SHIMODA, Y., HASUMI, M., KIMURA, Y. & TERAZIMA, M. 2010. Microtubule depolymerization at high pressure. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1189, 86-90.
- NORGES FORSKNINGSRÅD INNOVASJON NORGE OG FISKERI-OG HAVBRUKSNÆRINGENS FORSKNINGSFOND 2009. Plan for koordinert satsing på torsk. *Oppdrett og fangstbasert akvakultur 2010-2020*. Oslo: Programstyret for Havbruk.
- NORGES FORSKNINGSRÅD OG INNOVASJON NORGE 2006. Plan for koordinert satsing på torsk. *Oppdrett og fangstbasert akvakultur*. Oslo: Programstyret for Havbruk.
- ØIESTAD, V. 2005. Torsk i oppdrett -gjennom hundre år. In: OTTERÅ, H., TARANGER, G. L. & BORTHEIN, J. (eds.) *Oppdrett av torsk-næring med framtid*. Norsk Fiskeoppdrett.
- OJOLICK, E., CUSACK, R., BENFEY, T. & KERR, S. 1995. Survival and growth of all-female diploid and triploid rainbow trout (< i> *Oncorhynchus mykiss*</i>) reared at chronic high temperature. *Aquaculture*, 131, 177-187.
- OLSEN, E. M., LILLY, G. R., HEINO, M., MORGAN, M. J., BRATTEY, J. & DIECKMANN, U. 2005. Assessing changes in age and size at maturation in collapsing populations of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62, 811-823.
- OPSTAD, I., FJELLDAL, P. G., KARLSEN, Ø., THORSEN, A., HANSEN, T. J. & TARANGER, G. L. 2013. The effect of triploidization of Atlantic cod (< i> *Gadus morhua*</i> L.) on survival, growth and deformities during early life stages. *Aquaculture*.
- PANDIAN, T. & KOTEESWARAN, R. 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia*, 384, 167-243.

- PERUZZI, S., CHATAIN, B., SAILLANT, E., HAFFRAY, P., MENU, B. & FALGUIERE, J. C. 2004. Production of meiotic gynogenetic and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. 1. Performances, maturation and carcass quality. *Aquaculture*, 230, 41-64.
- PERUZZI, S., KETTUNEN, A., PRIMICERIO, R. & KAURIC, G. 2007. Thermal shock induction of triploidy in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*, 38, 926-932.
- PIFERRER, F., BEAUMONT, A., FALGUIÈRE, J. C., FLAJŠHANS, M., HAFFRAY, P. & COLOMBO, L. 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293, 125-156.
- PLANAS, M. & CUNHA, I. 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177, 171-190.
- POTTS, W. & EDDY, F. 1973. The permeability to water of the eggs of certain marine teleosts. *Journal of comparative physiology*, 82, 305-315.
- SCARLATA, S. 2005. The effect of hydrostatic pressure on membrane-bound proteins. *Brazilian journal of medical and biological research*, 38, 1203-1208.
- SCHULZ, R. W., DE FRANÇA, L. R., LAREYRE, J.-J., LEGAC, F., CHIARINI-GARCIA, H., NOBREGA, R. H. & MIURA, T. 2010. Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology*, 165, 390-411.
- SKJÆRAASEN, J., SALVANES, A., KARLSEN, Ø., DAHLE, R., NILSEN, T. & NORBERG, B. 2004. The effect of photoperiod on sexual maturation, appetite and growth in wild Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 30, 163-174.
- STEARNS, S. C. 2000. Life history evolution: successes, limitations, and prospects. *Naturwissenschaften*, 87, 476-486.
- SWARUP, H. 1959. Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L.). *Journal of Genetics*, 56, 143-155.
- TARANGER, G., AARDAL, L., HANSEN, T. & KJESBU, O. 2006. Continuous light delays sexual maturation and increases growth of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) in sea cages. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 63, 365-375.
- TARANGER, G. L., CARRILLO, M., SCHULZ, R. W., FONTAINE, P., ZANUY, S., FELIP, A., WELTZIEN, F.-A., DUFOUR, S., KARLSEN, O., NORBERG, B., ANDERSSON, E. & HAUSEN, T. 2010. Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 483-515.
- THORGAARD, G. H. & GALL, G. A. 1979. Adult triploids in a rainbow trout family. *Genetics*, 93, 961-973.
- THORGAARD, G. H., RABINOVITCH, P. S., SHEN, M. W., GALL, G. A., PROPP, J. & UTTER, F. M. 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. *Aquaculture*, 29, 305-309.
- THORSEN, A. 2005. Egg og klekkeridrift. In: OTTERÅ, H., TARANGER, G. L. & BORTHEN, J. (eds.) *Oppdrett av torsk-næring med framtid*. Norsk Fiskeoppdrett AS.
- THORSEN, A., TRIPPEL, E. A. & LAMBERT, Y. 2003. Experimental methods to monitor the production and quality of eggs of captive marine fish. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 33, 55-70.
- TIWARY, B. K., KIRUBAGARAN, R. & RAY, A. K. 2004. The biology of triploid fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 14, 391-402.
- TRIANAFYLLIDIS, A., KARAIKOU, N., BONHOMME, F., COLOMBO, L., CROSETTI, D., DANANCHER, D., GARCÍA-VÁZQUEZ, E., GILBEY, J., SVÅSAND, T. & VERSPOOR, E. 2007. Management options to reduce genetic impacts of aquaculture activities. *Genetic impact of aquaculture activities on native populations. Genimpact final scientific report*, 161-174.
- TRIPPEL, E. A., BENFEY, T. J., NEIL, S. R., CROSS, N., BLANCHARD, M. J. & POWELL, F. 2008. Effects of continuous light and triploidy on growth and sexual maturation in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Cybium*, 32, 136-138.
- UTTER, F. M., JOHNSON, O. W., THORGAARD, G. H. & RABINOVITCH, P. S. 1983. Measurement and potential applications of induced triploidy in Pacific salmon. *Aquaculture*, 35, 125-135.

- VÁARKONYI, E., BERCSÉANYI, M., OZOUF-COSTAZ, C. & BILLARD, R. 1998. Chromosomal and morphological abnormalities caused by oocyte ageing in *Silurus glanis*. *Journal of fish biology*, 52, 899-906.
- VAN BLERKOM, J. & BELL, H. 1986. Regulation of development in the fully grown mouse oocyte: chromosome-mediated temporal and spatial differentiation of the cytoplasm and plasma membrane. *Journal of embryology and experimental morphology*, 93, 213-238.
- VARADARAJ, K. & PANDIAN, T. 1990. Production of all-female sterile-triploid *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, 84, 117-123.
- WANG, Q., RACOWSKY, C. & DENG, M. 2011. Mechanism of the chromosome-induced polar body extrusion in mouse eggs. *Cell division*, 6, 17.
- WILSON, R. G., TROGADIS, J. E., ZIMMERMAN, S. & ZIMMERMAN, A. M. 2001. HYDROSTATIC PRESSURE INDUCED CHANGES IN THE CYTOARCHITECTURE OF PHEOCHROMOCYTOMA (PC-12) CELLS. *Cell biology international*, 25, 649-666.

6. Vedlegg:

Vedlegg 1. Beskrivelse av statistikk

a) Generalisert lineær modell (glm) for analyse av triploidi, avhengig av trykk (bar) og tid etter befruktning:

```
fit1.glm <- glm(Triploid~Bar*poly(Tid, 2), binomial)
anova(fit1.glm, test='Chi')
fit2.glm <- glm(Triploid~Bar+poly(Tid, 2), binomial)
fit2b.glm <- glm(Triploid~Bar+poly(Tid, 1), binomial)
anova(fit2.glm, fit2b.glm, test='Chi')
summary(fit2.glm)
anova(fit2.glm, test='Chi')
```

b) Generalisert lineær modell (glm) analyse av symmetri, befruktning, «arrestert utvikling», gjennomsnittlig antall blastomerer og egg med utvidet akse for å teste effekten av trykk (bar) og tid etter befruktning:

Model brukt for å teste effekten av trykk og tid på sannsynligheten for asymmetri:

```
fit1.glm <- glm(asymmetri~bar*poly(tid, 2), binomial)
anova(fit1.glm, test='Chi')
fit1b.glm <- glm(asymmetri~bar*poly(tid, 1), binomial)
anova(fit1b.glm, test='Chi')
fit1c.glm <- glm(asymmetri~bar+poly(tid, 1), binomial)
anova(fit1c.glm, test='Chi')
fit1d.glm <- glm(asymmetri~bar, binomial)
anova(fit1d.glm, test='Chi')
```

Model brukt for å teste effekten av trykk og tid på sannsynligheten for ubefruktede egg:

```
fit2a.glm <- glm(ubefrukted~bar*poly(tid, 2), binomial)
anova(fit2a.glm, test='Chi')
fit2b.glm <- glm(ubefrukted~bar*poly(tid, 1), binomial)
anova(fit2b.glm, test='Chi')
fit2c.glm <- glm(ubefrukted~bar+poly(tid, 1), binomial)
anova(fit2c.glm, test='Chi')
fit2d.glm <- glm(ubefrukted~bar, binomial)
anova(fit2d.glm, test='Chi')
```

Model brukt for å teste effekten av trykk og tid på sannsynligheten for egg i «arrestert utvikling»:

```
fit3.glm <- glm(arrestert_utvikling~bar*poly(tid, 2), binomial)
anova(fit3.glm, test='Chi')
fit3b.glm <- glm(arrestert_utvikling~bar*poly(tid, 1), binomial)
anova(fit3b.glm, test='Chi')
fit3c.glm <- glm(arrestert_utvikling~bar+poly(tid, 1), binomial)
anova(fit3c.glm, test='Chi')
fit3d.glm <- glm(arrestert_utvikling~bar, binomial)
anova(fit3d.glm, test='Chi')
```

Model brukt for å teste effekten av trykk og tid på gjennomsnittlig antall blastomerer per egg:

```
fit4.glm <- glm(blastomerer~bar*poly(tid, 2), poisson)
anova(fit4.glm, test='Chi')
fit4a.glm <- glm(blastomerer~bar*poly(tid, 1), poisson)
anova(fit4a.glm, test='Chi')
fit4b.glm <- glm(blastomerer~bar+poly(tid, 1), poisson)
anova(fit4b.glm, test='Chi')
fit4c.glm <- glm(blastomerer~bar, poisson)
anova(fit4c.glm, test='Chi')
```

Model brukt for å teste effekten av trykk og tid på sannsynligheten for egg med utvidet aksial:

```
fit5.glm <- glm(utvidet_aksial~bar*poly(tid, 2), binomial)
anova(fit5.glm, test='Chi')
fit5b.glm <- glm(utvidet_aksial~bar*poly(tid, 1), binomial)
anova(fit5b.glm, test='Chi')
fit5c.glm <- glm(utvidet_aksial~bar+poly(tid, 1), binomial)
anova(fit5c.glm, test='Chi')
fit5d.glm <- glm(utvidet_aksial~bar, binomial)
anova(fit5d.glm, test='Chi')
```

c) Lineær modell (lm) og Generalisert lineær modell (glm) for analyse av eggdiameter og epiboli, avhengig av trykk (bar) og tid etter befruktning:

Modell for effekten av trykk og tid etter befruktning på eggets diameter

```
fit1a.lm <- lm(diameter~bar*poly(tid, 2))
anova(fit1a.lm)
fit1b.lm <- lm(diameter~bar*poly(tid, 1))
anova(fit1b.lm)
fit1c.lm <- lm(diameter~bar+poly(tid, 1))
anova(fit2a.lm)
fit1d.lm <- lm(diameter~bar)
anova(fit1d.lm)
```

Modell for effekten av trykk og tid på dekningsgraden av epiboli:

```
fit3.glm <- glm(dekningsgrad~bar*poly(tid, 2), quasibinomial)
anova(fit3.glm, test='F')
fit4.glm <- glm(dekningsgrad~bar*poly(tid, 1), quasibinomial)
anova(fit3.glm, fit4.glm, test='F')
anova(fit3.glm, test='F')
summary(fit3.glm)
```

d) Generalisert mikset lineær modell (glmm) og generalisert lineær modell (glm) for analyse av blåsensitive fotoreseptorer, avhengig av fiskens ploiditet:

Effekten av øyets plassering (venstre og høyre) og ploiditetsnivå (diploid og triploid) på antallet fotoreseptorer i øyet:

```
side.glmm <- glmmPQL(fotoreseptorer~side2, random=~+1|individ, quasipoisson)
summary(side.glmm)
```

Nytt datasett med bare ett mål for fotoreseptorer per individ:

```
fit6.glm <- glm(fotoreseptorer~ploidi, quasipoisson)
anova(fit6.glm, test='F')
```

Vedlegg 2. Data fra flowcytometri analyse

Tabell 7. Fordeling av diploide og triploide individer ved bruk av flowcytometri.

Trykk (bar)	Minutter etter befruktning	Triploid (n)	Diploid (n)	Uleselig*
1	10	0	50	0
	20	1	49	0
	30	1	49	0
	40	0	49	1
50	10	1	49	0
	20	0	49	1
	30	1	48	1
	40	2	48	0
100	10	1	48	1
	20	0	47	3
	30	0	50	0
	40	0	46	4
200	10	2	48	0
	20	0	48	2
	30	0	47	3
	40	1	47	2
400	10	26	21	3
	20	39	10	1
	30	45	3	2
	40	30	19	1
600	10	50	0	0
	20	43	0	7
	30	49	1	0
	40	49	0	1

*Uleselige prøver tilsvarer prøver som av en eller annen grunn er umulig å kategorisere

Vedlegg 3. Estimering av befruktningsprosent:

Tabell 8. Mengden egg (ml), som ble tatt ut for befruktningsprøver den 09/04-2012 (B). Flytende egg antas å være levende og egg som har sunket til bunnen antas å være døde.

Befruktningsprøver (B)	Volum flytende (ml)	Volum sunket (ml)	Totalt volum egg (ml)
B ₀	5,20	0,60	5,80
B ₂₀	3,20	0,90	4,10
B ₄₀	5,30	0,80	6,10
B ₆₀	5,00	0,60	5,60
B ₈₀	4,00	0,60	5,50

Tabell 9. Antall befruktete egg, beregnet fra en representativ mengde flytende egg.

Min etter Befruktnings (B)	Antall egg talt (stk)	Antall egg som er befruktet (stk)	Befruktete egg av ant totalt talte egg (%)
B ₀	543	483	88,95 %
B ₂₀	545	409	75,05 %
B ₄₀	535	476	88,97 %
B ₆₀	568	493	86,80 %
B ₈₀	571	454	79,51 %

Tabell 10. Beregning av antall egg og befruktningsprosenten ved forutsetning av 500 egg per ml (ca. 600 000 egg pr. liter).

Min etter Befruktnings (B)	Volum flytende (stk.)	Volum sunket (stk.)	Totalt volum egg (stk.)	Antall befruktet	Befruktningsprosent
B ₀	2600	300	2900	2312,71	79,75 %
B ₂₀	1600	450	2050	1200,73	58,57 %
B ₄₀	2650	400	3050	2357,76	77,30 %
B ₆₀	2500	300	2800	2169,89	77,50 %
B ₈₀	2450	300	2750	1947,98	70,84 %

Vedlegg 4. Data fra måling av dødelighet

Tabell 11. Dødelighet (ml) for de ulike behandlingsgruppene ved tre ulike datoer (11.04.12, 13.04.12, 19.04.12):

Volum av døde egg (ml) per dato:																
Trykk:	1 bar				50 bar				100 bar				200 bar			
Gruppe:	1a	1b	1c	1d	2a	2b	2c	2d	3a	3b	3c	3d	4a	4b	4c	4d
11.04.12	0,6	1,0	0,9	1,0	0,4	1,0	1,2	0,8	1,0	1,0	0,9	0,9	1,0	1,0	0,9	1,3
13.04.12	1,4	1,2	1,0	1,1	0,4	1,2	1,4	1,2	1,1	1,1	1,1	1,0	1,0	1,3	1,3	1,4
19.04.12	1,0	1,0	1,3	1,4	0,9	0,5	1,0	1,5	0,8	0,9	1,0	0,8	0,5	0,9	1,0	1,0
Totalt:	3,0	3,2	3,4	3,5	1,7	2,7	3,6	3,5	2,9	3,0	3,0	2,7	2,5	3,2	3,2	3,7

Volum av døde egg (ml) per dato:								
Trykk:	400 bar				600 bar			
Gruppe:	5a	5b	5c	5d	6a	6b	6c	6d
11.04.12	1,2	1,2	1,2	1,4	1,6	2,0	2,1	2,1
13.04.12	1,4	1,5	1,5	1,3	1,5	1,5	1,7	1,7
19.04.12	1,1	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1	1,0	1,0
Totalt:	3,7	3,8	3,9	3,8	4,2	4,6	4,8	4,8

Vedlegg 5. Data fra celledeling.

Tabell 12. Fordelingen av egg etter 12 ulike kategorier i prosentandel. Kategoriene er fordelt etter symmetrisk celledeling ved i 2, 4, 8 celle stadiet (S2, S4, S8), asymmetrisk celledeling med 3, 4, 5, 8 celler (AS3, AS4, AS5, AS8), udefinerte egg (UB) ubefruktede egg (UB), egg med utvidet akse ved 4 og 8 celledetstadiet (UA4, UA8) og egg i «arrestert utvikling».

trykk (bar) tid (minutt grupper	1			50			100			200			400			600								
	1a	1b	1c	1d	2a	2b	2c	2d	3a	3b	3c	3d	4a	4b	4c	4d	5a	5b	5c	5d	6a	6b	6c	6d
S2	3	2	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	1	3	0	0	2	0	0	2	0	0	0
S4	8	4	6	11	7	18	0	0	4	9	4	3	2	7	8	2	2	2	4	2	0	0	0	1
S8	33	45	52	45	20	46	35	49	51	47	46	48	59	43	50	35	41	36	42	36	20	19	18	26
AS3	2	0	0	0	0	4	0	0	0	0	2	0	2	2	0	2	0	1	0	0	2	0	1	0
AS4	8	2	6	5	12	0	0	2	6	5	0	5	2	5	3	0	10	0	3	7	4	6	4	1
AS5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	0	3	3
AS8	10	12	19	23	17	4	12	16	6	18	16	27	12	16	19	14	10	20	9	26	2	8	4	4
UD	2	0	0	0	32	0	0	12	0	0	4	0	0	3	0	0	0	1	0	0	4	2	1	4
UB	25	27	13	14	12	14	29	12	15	7	21	10	16	13	11	35	23	22	21	8	31	38	30	36
UA4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	10	4
UA8	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	0	6	3	0	2	3	10	12	8	13	9	10	11
AU	8	8	3	2	0	14	18	7	15	11	7	6	2	5	5	11	10	4	9	9	15	17	12	8

Vedlegg 6. Data over eggdiameter og epiboli

Tabell 13. Lengdemål for eggdiameter og dekningsgraden av epiboli målt i mm i de ulike trykk (bar)- og tidsgruppene (tid etter befruktning).

Trykk	Tid	Eggdiameter (mm)	a+b/2	Epiboli
1	10	1.41	0.87	0.62
1	10	1.41	0.78	0.55
1	10	1.42	0.85	0.60
1	10	1.39	0.93	0.67
1	10	1.38	0.90	0.65
1	10	1.38	0.87	0.63
1	10	1.37	0.91	0.67
1	10	1.42	0.81	0.57
1	10	1.40	0.94	0.67
1	10	1.39	0.88	0.63
1	10	1.44	0.91	0.63
1	10	1.41	0.88	0.62
1	10	1.39	0.84	0.61
1	10	1.39	0.85	0.61
1	10	1.35	0.89	0.66
1	10	1.40	0.92	0.66
1	10	1.42	0.89	0.63
1	10	1.39	0.83	0.59
1	10	1.35	0.83	0.61
1	10	1.39	0.93	0.67
1	20	1.43	0.82	0.57
1	20	1.40	0.94	0.67
1	20	1.41	0.81	0.57
1	20	1.44	0.91	0.63
1	20	1.39	0.88	0.64
1	20	1.42	0.90	0.63
1	20	1.41	0.89	0.63
1	20	1.45	0.88	0.60
1	20	1.40	0.79	0.56
1	20	1.44	0.88	0.61
1	20	1.42	0.91	0.64
1	20	1.41	0.89	0.63
1	20	1.40	0.86	0.62
1	20	1.41	0.89	0.63
1	20	1.39	0.82	0.59
1	20	1.38	0.89	0.65
1	20	1.39	0.90	0.65
1	20	1.39	0.86	0.61
1	20	1.41	0.73	0.52
1	20	1.40	0.83	0.59
1	30	1.41	0.79	0.56
1	30	1.37	0.83	0.61
1	30	1.39	0.89	0.65
1	30	1.40	0.74	0.53
1	30	1.39	0.89	0.64
1	30	1.38	0.85	0.61
1	30	1.41	0.79	0.56
1	30	1.42	0.90	0.63
1	30	1.43	0.88	0.61
1	30	1.39	0.90	0.65
1	30	1.40	0.87	0.62
1	30	1.39	0.80	0.57
1	30	1.39	0.85	0.61
1	30	1.40	0.90	0.65
1	30	1.34	0.88	0.66
1	30	1.37	0.91	0.67
1	40	1.43	0.82	0.57
1	40	1.40	0.94	0.67
1	40	1.41	0.81	0.57
1	40	1.44	0.91	0.63
1	40	1.39	0.88	0.64
1	40	1.42	0.90	0.63
1	40	1.41	0.89	0.63

1	40	1.45	0.88	0.60
1	40	1.40	0.79	0.56
1	40	1.44	0.88	0.61
1	40	1.42	0.91	0.64
1	40	1.41	0.89	0.63
1	40	1.40	0.86	0.62
1	40	1.41	0.89	0.63
1	40	1.39	0.82	0.59
1	40	1.38	0.89	0.65
1	40	1.39	0.90	0.65
1	40	1.39	0.86	0.61
1	40	1.41	0.73	0.52
1	40	1.40	0.83	0.59
50	10	1.38	0.76	0.55
50	10	1.41	0.87	0.62
50	10	1.38	0.82	0.59
50	10	1.37	0.83	0.61
50	10	1.39	0.87	0.62
50	10	1.43	0.91	0.63
50	10	1.44	0.88	0.61
50	10	1.41	0.81	0.58
50	10	1.38	0.77	0.56
50	10	1.37	0.85	0.62
50	10	1.45	0.88	0.61
50	10	1.39	0.84	0.60
50	10	1.41	0.84	0.59
50	10	1.40	0.78	0.56
50	10	1.41	0.84	0.60
50	10	1.40	0.82	0.58
50	10	1.37	0.86	0.63
50	10	1.41	0.82	0.58
50	10	1.37	0.83	0.61
50	10	1.39	0.81	0.58
50	10	1.35	0.81	0.60
50	10	1.37	0.86	0.63
50	10	1.40	0.80	0.57
50	20	1.38	0.89	0.65
50	20	1.35	0.88	0.66
50	20	1.38	0.89	0.64
50	20	1.39	0.87	0.62
50	20	1.36	0.83	0.61
50	20	1.39	0.93	0.66
50	20	1.39	0.86	0.62
50	20	1.36	0.79	0.58
50	20	1.46	0.86	0.59
50	20	1.44	0.88	0.62
50	20	1.41	0.92	0.65
50	20	1.40	0.87	0.62
50	20	1.45	0.94	0.64
50	20	1.38	0.80	0.58
50	20	1.41	0.90	0.64
50	20	1.37	0.85	0.62
50	20	1.39	0.92	0.66
50	20	1.44	0.89	0.62
50	20	1.44	0.79	0.54
50	20	1.41	0.77	0.55
50	20	1.39	0.80	0.57
50	20	1.41	0.89	0.64
50	30	1.41	0.88	0.63
50	30	1.35	0.84	0.62
50	30	1.43	0.89	0.62
50	30	1.39	0.88	0.63
50	30	1.42	0.82	0.58
50	30	1.36	0.83	0.61
50	30	1.42	0.95	0.67
50	30	1.42	0.86	0.60
50	30	1.39	0.93	0.67
50	30	1.41	0.71	0.51
50	30	1.39	0.91	0.65
50	30	1.39	0.80	0.57
50	30	1.42	0.89	0.63
50	30	1.42	0.85	0.60

50	30	1.42	0.81	0.57
50	30	1.44	0.81	0.56
50	30	1.41	0.91	0.65
50	30	1.39	0.90	0.65
50	30	1.42	0.89	0.63
50	30	1.41	0.92	0.66
50	30	1.43	0.89	0.63
50	40	1.40	0.81	0.58
50	40	1.44	0.86	0.60
50	40	1.42	0.90	0.64
50	40	1.40	0.97	0.70
50	40	1.40	0.78	0.56
50	40	1.40	0.81	0.58
50	40	1.45	0.85	0.59
50	40	1.38	0.78	0.56
50	40	1.41	0.78	0.55
50	40	1.42	0.68	0.48
50	40	1.41	0.83	0.59
50	40	1.40	0.87	0.62
50	40	1.40	0.90	0.64
50	40	1.43	0.88	0.62
50	40	1.40	0.87	0.62
50	40	1.37	0.87	0.64
50	40	1.42	0.84	0.60
50	40	1.40	0.79	0.57
50	40	1.43	0.83	0.58
50	40	1.39	0.85	0.62
100	10	1.41	0.82	0.58
100	10	1.41	0.84	0.59
100	10	1.47	0.81	0.55
100	10	1.37	0.90	0.65
100	10	1.39	0.94	0.67
100	10	1.40	0.80	0.57
100	10	1.38	0.83	0.60
100	10	1.43	0.93	0.65
100	10	1.41	0.86	0.61
100	10	1.41	0.88	0.62
100	10	1.37	0.84	0.61
100	10	1.43	0.79	0.55
100	10	1.42	0.95	0.67
100	10	1.42	0.88	0.62
100	10	1.45	0.93	0.64
100	10	1.39	0.84	0.60
100	10	1.44	0.90	0.63
100	10	1.40	0.87	0.62
100	10	1.40	0.89	0.63
100	20	1.40	0.91	0.65
100	20	1.43	0.84	0.59
100	20	1.39	0.89	0.64
100	20	1.41	0.85	0.61
100	20	1.40	0.82	0.59
100	20	1.42	0.87	0.61
100	20	1.42	0.67	0.47
100	20	1.40	0.84	0.60
100	20	1.36	0.87	0.64
100	20	1.38	0.81	0.59
100	20	1.44	0.89	0.61
100	20	1.45	0.91	0.63
100	20	1.41	0.83	0.59
100	20	1.40	0.83	0.59
100	20	1.38	0.89	0.64
100	20	1.40	0.81	0.58
100	20	1.41	0.87	0.61
100	20	1.37	0.85	0.62
100	20	1.40	0.84	0.60
100	20	1.38	0.82	0.59
100	20	1.40	0.86	0.62
100	20	1.42	0.96	0.68
100	20	1.39	0.76	0.55
100	30	1.38	0.88	0.64
100	30	1.42	0.88	0.62
100	30	1.40	0.91	0.65

100	30	1.42	0.97	0.68
100	30	1.37	0.83	0.60
100	30	1.36	0.87	0.64
100	30	1.37	0.82	0.60
100	30	1.34	0.86	0.64
100	30	1.38	0.83	0.60
100	30	1.41	0.82	0.58
100	30	1.40	0.89	0.64
100	30	1.39	0.85	0.61
100	30	1.38	0.86	0.62
100	30	1.39	0.95	0.69
100	30	1.40	0.89	0.64
100	30	1.40	0.85	0.61
100	30	1.43	0.89	0.62
100	30	1.45	0.89	0.61
100	30	1.38	0.87	0.63
100	30	1.42	0.87	0.61
100	30	1.36	0.85	0.62
100	30	1.41	0.89	0.63
100	30	1.40	0.84	0.60
100	30	1.40	0.87	0.62
100	30	1.43	0.87	0.61
100	40	1.37	0.80	0.58
100	40	1.42	0.85	0.60
100	40	1.43	0.81	0.57
100	40	1.42	0.81	0.57
100	40	1.41	0.86	0.61
100	40	1.39	0.79	0.57
100	40	1.42	0.87	0.61
100	40	1.39	0.79	0.57
100	40	1.42	0.89	0.63
100	40	1.37	0.83	0.61
100	40	1.43	0.92	0.64
100	40	1.38	0.88	0.64
100	40	1.41	0.92	0.65
100	40	1.42	0.86	0.61
100	40	1.38	0.84	0.61
100	40	1.39	0.87	0.63
100	40	1.39	0.81	0.58
100	40	1.40	0.80	0.57
100	40	1.37	0.84	0.61
100	40	1.40	0.80	0.57
100	40	1.38	0.86	0.62
100	40	1.41	0.87	0.62
100	40	1.42	0.84	0.59
100	40	1.41	0.87	0.62
100	40	1.38	0.87	0.63
200	10	1.41	0.88	0.62
200	10	1.41	0.85	0.61
200	10	1.45	0.83	0.57
200	10	1.37	0.90	0.66
200	10	1.34	0.80	0.60
200	10	1.38	0.88	0.64
200	10	1.34	0.76	0.57
200	10	1.39	0.83	0.60
200	10	1.41	0.72	0.51
200	10	1.40	0.85	0.61
200	10	1.37	0.86	0.63
200	10	1.39	0.82	0.59
200	10	1.44	0.91	0.63
200	10	1.36	0.80	0.58
200	10	1.40	0.85	0.61
200	10	1.36	0.83	0.61
200	10	1.38	0.80	0.58
200	10	1.42	0.90	0.63
200	10	1.38	0.88	0.64
200	10	1.36	0.83	0.61
200	20	1.36	0.74	0.54
200	20	1.46	0.86	0.59
200	20	1.38	0.80	0.58
200	20	1.38	0.77	0.56
200	20	1.40	0.80	0.57

200	20	1.38	0.89	0.64
200	20	1.41	0.79	0.56
200	20	1.41	0.88	0.63
200	20	1.40	0.85	0.60
200	20	1.39	0.81	0.58
200	20	1.39	0.87	0.62
200	20	1.39	0.91	0.66
200	20	1.39	0.85	0.61
200	20	1.36	0.79	0.58
200	20	1.40	0.87	0.62
200	20	1.42	0.92	0.65
200	20	1.41	0.87	0.62
200	20	1.45	0.79	0.54
200	20	1.41	0.81	0.57
200	20	1.40	0.82	0.59
200	20	1.39	0.74	0.53
200	20	1.38	0.81	0.59
200	20	1.39	0.79	0.57
200	20	1.44	0.88	0.61
200	20	1.37	0.79	0.58
200	20	1.40	0.80	0.57
200	20	1.42	0.80	0.56
200	30	1.41	0.73	0.52
200	30	1.38	0.84	0.61
200	30	1.40	0.83	0.59
200	30	1.40	0.89	0.63
200	30	1.37	0.92	0.67
200	30	1.35	0.86	0.64
200	30	1.36	0.87	0.64
200	30	1.36	0.80	0.59
200	30	1.33	0.78	0.59
200	30	1.39	0.84	0.60
200	30	1.38	0.79	0.58
200	30	1.39	0.88	0.63
200	30	1.42	0.91	0.64
200	30	1.42	0.96	0.67
200	30	1.43	0.91	0.64
200	30	1.40	0.85	0.61
200	30	1.38	0.74	0.54
200	30	1.39	0.86	0.61
200	30	1.39	0.93	0.67
200	30	1.40	0.86	0.61
200	30	1.38	0.88	0.64
200	30	1.42	0.90	0.63
200	30	1.38	0.85	0.62
200	30	1.39	0.87	0.63
200	30	1.43	0.85	0.59
200	30	1.39	0.85	0.61
200	30	1.41	0.92	0.65
200	30	1.38	0.89	0.64
200	30	1.43	0.90	0.63
200	30	1.38	0.85	0.62
200	40	1.43	0.96	0.67
200	40	1.38	0.94	0.68
200	40	1.39	0.89	0.64
200	40	1.39	0.87	0.62
200	40	1.42	0.89	0.62
200	40	1.45	0.93	0.64
200	40	1.39	0.86	0.62
200	40	1.41	0.90	0.64
200	40	1.38	0.85	0.62
200	40	1.41	0.87	0.61
200	40	1.38	0.88	0.64
200	40	1.40	0.89	0.64
200	40	1.38	0.94	0.68
200	40	1.40	0.87	0.62
200	40	1.43	0.91	0.64
400	10	1.43	0.88	0.62
400	10	1.40	0.90	0.64
400	10	1.35	0.83	0.61
400	10	1.38	0.90	0.65
400	10	1.36	0.82	0.60

400	10	1.43	0.84	0.59
400	10	1.37	0.87	0.63
400	10	1.38	0.81	0.59
400	10	1.38	0.86	0.62
400	10	1.36	0.74	0.54
400	10	1.33	0.83	0.62
400	10	1.41	0.81	0.58
400	10	1.40	0.71	0.51
400	10	1.36	0.87	0.64
400	10	1.44	0.92	0.64
400	10	1.40	0.92	0.65
400	10	1.38	0.76	0.55
400	10	1.42	0.92	0.65
400	10	1.45	0.74	0.51
400	20	1.40	0.81	0.58
400	20	1.40	0.85	0.60
400	20	1.39	0.83	0.60
400	20	1.37	0.90	0.66
400	20	1.42	0.93	0.66
400	20	1.34	0.91	0.68
400	20	1.44	0.92	0.64
400	20	1.38	0.87	0.63
400	20	1.38	0.79	0.57
400	20	1.36	0.82	0.61
400	20	1.43	0.94	0.66
400	20	1.42	0.95	0.67
400	20	1.39	0.89	0.64
400	20	1.39	0.84	0.61
400	30	1.35	0.83	0.61
400	30	1.36	0.84	0.62
400	30	1.45	0.84	0.58
400	30	1.44	0.92	0.64
400	30	1.36	0.85	0.63
400	30	1.39	0.83	0.60
400	30	1.46	0.99	0.68
400	30	1.39	0.75	0.54
400	30	1.40	0.88	0.63
400	30	1.44	0.58	0.40
400	30	1.40	0.82	0.59
400	30	1.38	0.92	0.66
400	30	1.35	0.88	0.65
400	30	1.41	0.90	0.64
400	30	1.39	0.86	0.62
400	30	1.43	0.92	0.65
400	30	1.40	0.95	0.68
400	30	1.38	0.85	0.61
400	30	1.40	0.67	0.48
400	30	1.40	0.83	0.59
400	30	1.33	0.63	0.47
400	40	1.35	0.72	0.54
400	40	1.41	0.76	0.54
400	40	1.43	0.70	0.49
400	40	1.36	0.95	0.70
400	40	1.43	0.92	0.65
400	40	1.42	0.74	0.52
400	40	1.41	0.90	0.64
400	40	1.35	0.79	0.58
400	40	1.37	0.77	0.56
400	40	1.40	0.84	0.60
400	40	1.40	0.95	0.68
400	40	1.39	0.80	0.58
400	40	1.40	0.89	0.63
400	40	1.37	0.82	0.60
400	40	1.31	0.80	0.61
400	40	1.37	0.84	0.61
400	40	1.39	0.89	0.64
400	40	1.39	0.78	0.56
400	40	1.35	0.68	0.51
400	40	1.39	0.63	0.45
600	10	1.42	0.85	0.60
600	10	1.40	0.96	0.68
600	10	1.39	0.83	0.60

600	10	1.37	0.76	0.55
600	10	1.38	0.73	0.53
600	10	1.39	0.87	0.63
600	10	1.37	0.78	0.57
600	10	1.37	0.74	0.54
600	10	1.36	0.69	0.51
600	10	1.38	0.88	0.64
600	10	1.38	0.82	0.60
600	10	1.37	0.80	0.58
600	10	1.35	0.87	0.64
600	10	1.40	0.78	0.56
600	10	1.39	0.74	0.53
600	10	1.35	0.72	0.53
600	20	1.43	0.94	0.66
600	20	1.38	0.87	0.63
600	20	1.42	0.87	0.61
600	20	1.41	0.83	0.59
600	20	1.39	0.91	0.65
600	20	1.40	0.89	0.63
600	20	1.40	0.88	0.63
600	20	1.37	0.71	0.52
600	20	1.42	0.88	0.62
600	20	1.37	0.62	0.45
600	20	1.40	0.72	0.52
600	30	1.40	0.92	0.66
600	30	1.34	0.86	0.64
600	30	1.42	0.89	0.62
600	30	1.39	0.90	0.65
600	30	1.39	0.88	0.63
600	30	1.42	1.00	0.71
600	30	1.37	0.78	0.57
600	30	1.31	0.84	0.64
600	30	1.37	0.92	0.67
600	30	1.41	0.86	0.61
600	30	1.39	0.90	0.65
600	30	1.41	0.88	0.63
600	30	1.37	0.84	0.61
600	40	1.39	0.77	0.55
600	40	1.38	0.81	0.59
600	40	1.43	0.87	0.61
600	40	1.38	0.58	0.42
600	40	1.40	0.82	0.59
600	40	1.39	0.78	0.56
600	40	1.40	0.77	0.55
600	40	1.39	0.85	0.61
600	40	1.42	0.75	0.53
600	40	1.40	0.74	0.53
600	40	1.43	0.72	0.51
600	40	1.40	0.82	0.58
600	40	1.38	0.83	0.60
600	40	1.39	0.69	0.50
600	40	1.36	0.83	0.61
600	40	1.37	0.76	0.55
600	40	1.40	0.80	0.57

Vedlegg 7. Omgjøring av enheter

Konvertere Pixels til millimeter (mm):

Data for lengdemåling i epiboli stadiet ble registrert i pixels. Denne benevnningen sier lite om den reelle størrelsen på blant annet eggets diameteren. Det ble derfor nødvendig å konvertere data om til millimeter. Dette ble gjort ved å benytte fotografier over skilleark, som opprinnelig ble benyttet for å separere de ulike trykk gruppene fra hverandre. Skillearkene bestod av et ordinært ruteark, hvor hver rute tilsvarte 0,5cm. Det ble gjort ca. 20 mål på hvert «skilleark» fra rutens begynnelse til (a) til markeringsstreken for neste rute. Gjennomsnittet for hver rutetilsvarte ~1000 pixels med et standardavvik på $\pm 17,84$ pixels (tilsvarer 0,09mm). Det ble registret høyere standardavviket i de ulike fotografiene enn mellom gjennomsnittsverdiene. Det er derfor fornuftig at 1000pixels = 0,5 cm. Konverteringen var også nødvendig for å sikre at forstørrelsen mellom bildene er konstant og at størrelsesdifferanse i mellom de ulike gruppene kun er et resultat av trykk eller tid etter befruktning.

Differansen mellom bilde taking og tid etter befruktning:

For å bevise at registrerte forskjeller som ble observert i epiboli og celledeling ikke var et resultat av tid etter befruktning, ble det kalkulert standardavvik fra alle gruppene. Tabell 1 viser differansen mellom de ulike gruppene ved celledelingsstadiet (09.04.2012, ca.10 t etter befruktning) hvor man ser at tiden fra befruktning til fotografering varierer med 1.52 min. Tabell 2 viser differansen ved epibolistadiet (09.04.2012-13.04.2012, 4 dager etter befruktning) og viser et standardavvik på ~30.25 min.

Tabell 14. Data over klokkeslett for befruktning (T_0), tid for fotografering (celledelingsstadiet) og differansen mellom de ulike trykk- og tidsgruppene (tid etter befruktning).

Gruppe	T_0	Tid for foto	min fra T_0 til fotografering
1a	10:20:00	20:04	584
1b	10:20:00	20:05	585
1c	10:20:00	20:05	585
1d	10:20:00	20:05	585
2a	10:30:00	20:11	581
2b	10:30:00	20:11	581
2c	10:30:00	20:11	581
2d	10:30:00	20:12	582
3a	10:40:00	20:24	584
3b	10:40:00	20:24	584
3c	10:40:00	20:24	584
3d	10:40:00	20:24	584
4a	10:50:00	20:33	583
4b	10:50:00	20:33	583
4c	10:50:00	20:34	584
4d	10:50:00	20:34	584
5a	11:00:00	20:42	582
5b	11:00:00	20:43	583
5c	11:00:00	20:43	583
5d	11:00:00	20:43	583
6a	11:10:00	20:50	580
6b	11:10:00	20:51	581
6c	11:10:00	20:51	581
6d	11:10:00	20:51	581
Standardavvik			$\pm 1.52\text{min}$

Tabell 15. Data over klokkeslett for befruktning (T_0), tid for fotografering (epibolistadiet) og differansen mellom de ulike trykk- og tidsgruppene (tid etter befruktning).

Gruppe	T_0	Tid for foto	min fra T_0 til fotografering
1a	10:20	08:36	5656
1b	10:20	08:38	5658
1c	10:20	08:56	5676
1d	10:20	08:56	5676
2a	10:30	09:08	5678
2b	10:30	09:14	5684
2c	10:30	09:20	5690
2d	10:30	09:24	5694
3a	10:40	09:36	5696
3b	10:40	09:42	5702
3c	10:40	09:46	5706
3d	10:40	09:49	5709
4a	10:50	09:59	5709
4b	10:50	10:04	5714
4c	10:50	10:07	5717
4d	10:50	10:10	5720
5a	11:00	10:27	5727
5b	11:00	10:38	5738
5c	11:00	10:39	5739
5d	11:00	10:42	5742
6a	11:10	10:57	5747
6b	11:10	11:01	5751
6c	11:10	11:05	5755
6d	11:10	11:08	5758
Standardavvik			$\pm 30.25\text{min}$

Vedlegg 8. Oppskrifter på løsninger benyttet i dette masterarbeidet

a) Fiksering:

Løs opp følgende i 800 ml destillert H₂O

- 40g NaCl
- 1g KCl
- 7.2g Na₂HPO₄
- 1.2g KH₂PO₄

juster pH til 7,4 med HCl og tilpass volumet til 1 L ved å tilsette destillert H₂O. Tilsett så 0,5 ml DEPS (Diethyl-pyrocbonat) og inkuber løsningen over natten ved rom temperatur før autoklaving.

Paraformaldehyd (4%) in PBS:

Løs opp 40g paraformaldehyd pulver i 500ml destillert H₂O. Varm så opp løsningen til 65°C (på en magnetisk oppvarmings rører i avtrekkskap) til løsningen blir gråhvit. Ved å tilsette et par dråper av NaOH (5molar) blir løsningen klar. Tilsett deretter 200 ml 5xPBS og tilpass til ønsket pH verdi (7.5) ved bruk av HCl. Juster volumet til 1L ved å tilsette destillert H₂O.

Bedøvelse:

- Vanlig → 20g Finquel til 1l destillert vann
- Til død → 100g Finquel til 1l destillert vann

Vedlegg 9. Protokoll for *In situ* hybridisering

Whole mount *in situ* hybridization (fra Helvik's lab.)

Fixation and preservation

Fixation in 4 % paraformaldehyde in 1 x PBS at 4 °C overnight or up to 48 h. Yolk proteins can be removed by injection of fixative in to the yolk sac.

2x 5 min wash in PBS at 4 °C

Remove embryos from their chorions using watchmaker forceps and transfer the embryos to vial

75% MeOH in 1 x PBS on ice 5 min

90% MeOH in 1 x PBS on ice 5 min

or directly into

100% MeOH on ice 5 min, replace with fresh MeOH after 5 min

Cool the embryos to -20 °C for at least 30 min. (for months)

Day 1. Protocol including bleaching of embryos (after Thisse et al. 2008)

Tissue Pre-treatment *Proteinase Digestion and Postfixation*

All steps are performed at RT (on a shaker).

1. Transfer embryos to a small petri dish/24 wells NUNC tray.
2. Immerse 5 min in 70% MeOH in PBS.
3. Immerse 5 min in 50% MeOH in PBS.
4. Immerse 5 min in 30% MeOH in PBS
5. Rinse 2 x 5 min in PBS.
6. Fix in 4% Paraformaldehyde in PBS, 20 min.
7. Embryos with chorion: Transfer to PBS and dechorionate.
8. Remove fixative/PBS and bleach embryos with 3% H₂O₂/0.5% KOH. Bubbles will form around the embryo. Monitor embryos in microscop, stop bleaching when pigmentation have almost disappeared.
9. Rinse for 5 min in PBS
10. Rinse 4 x 5 min in **PBSTw**
11. 1 min to 1.5 h at RT in 10µg/ ml Proteinase K in 0,1 M Tris pH 8.0 and 50 mM EDTA

Should be optimize for each type of tissue and developmental stage. Embryos: 1 cell to high for 1 min; 30% epiboly to 10 somites for 2-3 min; 10-20 somites for 3-4 min 24-32h for 5-6 min; 40-50 h for 10-15 min.

12. Rinse briefly in PBSTw
13. Fix in 4% Paraformaldehyde in PBS, 20 min.
14. Wash 4 x 5 min in PBSTw.

Hybridisation

1. Transfer embryos to 2.0 ml Eppendorf tubes.
2. Pre-hybridise in 250-500 µl Hybridisation Buffer (Hyb⁻) 2 h at 65°C.
3. Heat the probe in 80°C for 5-10 min, quickly cool on ice/ethanol, spin down and keep on ice/ethanol.
4. Replace with Hybridisation solution (Hyb⁺) and incubate overnight at 65 °C
 - i. 36 µl TEN buffer (5µl 1.0 M TRIS HCl (pH 7.5), 30µl 5.0 M NaCl +1µl 0.5 M EDTA)
 - ii. 250µl formamide* (100%) (High quality)
 - iii. 100 µl 50% dextran sulphate (heat to dissolve)
 - iv. 50 µl blocking sol (10%) (Blocking sol. made in maleate buffer)
 - v. 1 µl Tween 20
 - vi. 63 µl x µl of cRNA (100 –1000 ng) probe
y µl ^{DEPC}H₂O

Total volume of 500µl

*If no. of embryos is ~10, use half the amount of Hyb/probe.

Freeze aliquots of a premixed i, ii, iii (386 µl) and aliquots of blocking solutions (50 µl) and mix prior to use.

Post-Hybridisation washes

Transfer embryos to green containers and remove excess probe prior to washing by flushing the embryos with 2xSSCTw using Pasteur pipette.

Wash all at 65°C

1. 2 x 15 min 50% formamide* in 2xSSCTw (Low quality)
2. 1 x 30 min 50% formamide in 2xSSCTw
3. 2 x 15 min 2xSSCTw
4. 2 x 15 min 0.2xSSCTw

*) Formamide have to be de-ionised with resin 0,1 g/ ml (BioRad) Stir the formamide wit resin for 1 hour at RT before filtration, aliquot in 25 ml and freeze

RNase treatment (if background)

1. 30 min, at 37C in 0.02 mg/ml RNase A in RNase buffer.
(RNase buffer 10 mM Tris pH 7,5 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA)
2. 30 min at 65C in RNase buffer (as above without RNase).

Immunohistochemical detection

- (1) Wash 2-3 hours in 2 x SSC + 0,05 % Triton X-100 (25 µl in 50 ml) + 2 % Blocking reagent
- (2) Wash 2 x 5 min in 2 x SSC
- (3) 2-5 hours or over-night (4°C) FAB-fragment DIG-alkaline-phosphatase (1: 2000)* in 2 x SSC + 1 % blocking reagent + 0.3 % Triton X-100.
- (4) Wash 4 x 20 min in PBS(Tw)
- (5) Wash 2 x 10 min in Genius buffer 3 (100 mM Tris/HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂)

* Preabsorbed the FAB fragment (10 µl) with washed and crushed embryos overnight and in MAB + 1 % blocking reagent + 0,2 % Tween 20. Dilute to 20 ml (1 : 2000) with MAB + 1 % blocking reagent.

Day 3

Visualization

- (1) Incubate 1-12 hours in freshly prepared chromogen-substrate (45 µl NBT, 35 µl BCIP (X-phosphate) + 2,4 mg Levamisole in 10 ml buffer 3 (100 mM Tris/HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) Requires 200 µl per slides when one is using cover wells (sigma). *200 µl is enough to cover one nunc well.
- (2) To stop reaction, wash in 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl for 3 x 30 min
- (3) Post fixate in 4% PF overnight at 4 °C
- (4) Wash in 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl

