

**Tidleg utvikling av svømmeblæra hjå  
torskelarvar (*Gadus morhua* L.)  
frå intensivt oppdrett**



**Mastergradsoppgåve i  
celle- og utviklingsbiologi  
Marit Høyberg Aure**



**Institutt for biologi  
Universitetet i Bergen**

**2005**

**Tidleg utvikling av svømmeblæra hjå  
torskelarvar (*Gadus morhua* L.)  
frå intensivt oppdrett**

**Matergradsoppgåve i celle- og utviklingsbiologi**

**Marit Høyberg Aure**



**Institutt for biologi  
Universitetet i Bergen  
2005**

## Takk

Eg vil takke postdoktor Sindre Grotmol, professor Harald Kryvi og professor Geir Totland for all rettleiing med denne oppgåva. Det har vore ei fin tid i FIVUS et al., og eg har alltid fått gode råd og hjelp frå dykk når eg har trengt det. Harald Kryvi har òg laga illustrasjonane i resultatdelen. Tusen takk!

Takk til oppdrettsanlegget eg fekk torskelarvane frå. Utan prøvetakinga gjort av dei ansette der, ville det blitt ei tynn oppgåve.

Tusen takk til Teresa Cieplinska og Nina Karin Ellingsen for all den gode hjelpa eg har fått på og utanfor labben og alt det gode humøret som kjem frå dykk to! Takk til Kjell Toklum, for kritisk punkttørking av preparat, Irene Heggelund for framkalling og scanning av TEM-bilete og Egil Erichsen for pådamping av SEM-preparat.

Vil òg takke alle dei på lesesalen for ei fin tid og mykje god latter. Det har gjort at eg sjølv i nedturar eigentleg synes det har vore kjekt.

Takk til alle heime på Vatne som lurar på kva i alle dagar eg har gjort på dei siste åra, voner dykk får ei oppklaring no!

Marit Høyberg Aure

2005

## Innhald:

	<b>side:</b>
<b>Samandrag</b> .....	5
<b>Summary</b> .....	6
<b>Inntroduksjon</b> .....	7
<b>Materialer og Metoder</b> .....	9
Forsøksfisk.....	9
Lysmikroskopi.....	10
Elektronmikroskopi.....	10
Tredimensjonal rekonstruksjon.....	11
<b>Resultat</b> .....	12
Før svømmeblæra er fylt.....	12
Første fylling av svømmeblæra.....	13
Utviding av svømmeblæra.....	15
Avsnøring av stilken.....	16
Svømmeblæra og stilken etter avsnøring.....	17
Figurar.....	19
<b>Diskusjon</b> .....	53
Konklusjon.....	57
Framtidig arbeid.....	58
<b>Referanser</b> .....	59
<b>Vedlegg</b> .....	63

## **Samandrag**

I torskeoppdrett har ein ei rekke skjelettdeformasjonar og høge dødsrater på tidleg larvestadie. Skjelettdeformasjon i fremste del av ryggssøyla vert kalla nakkeknekk, og undersøkingar foreslår at overfylte svømmeblærer presser på ryggstrengen (notokorden) og fører til denne misdanninga. Tidleg normal utvikling av svømmeblæra er derimot lite kartlagt hjå torsk, og dette arbeidet vil difor morfologisk beskrive tidleg utvikling av svømmeblæra og forbindelsen mellom magesekk og svømmeblære.

Torskelarvar frå 4 til 17 dagar etter klekking vart henta frå eit intensivt oppdrettsanlegg og undersøkt i lys- og elektronmikroskopi.

Det vart funne at torsk fyller svømmeblæra første gongen 5 - 6 dagar etter klekking, og at samanhengen mellom fortarm og svømmeblære vert degenerert ikring 11 dagar seinere. Det vart funne teikn til programmert celledød i forbindelsen mellom fortarm og svømmeblære før første fylling, og dette vart meir utprega i den undersøkte perioden. Det vart ikkje påvist eit gjennomgåande lumen i forbindelsen, men det vart funne at torsk har eit utvikla kapillærnettverk i svømmeblæra før fylling, Epitelet i svømmeblæra endrar seg i den undersøkte perioden, og det er mogleg at gassekrerande vev er tilstades på eit tidleg stadie. Moglege mekanismar for fylling vert diskutert.

## Summary

In intensively-reared cod larvae skeletal deformities and high mortality have been a problem in an early larval-stage. A skeletal deformity found is abnormal dorsal curvature in the first part of the vertebral column. It is proposed that excessive gas in the swim bladder may cause the deformities through pressure on the notochord. Early swim bladder development in Atlantic cod is not well understood, and this work will describe the morphology of the swim bladder and the connection between the swim bladder and the midgut.

Intensively reared cod larvae, 4 - 17 days post hatch, were collected from a hatchery and examined in light- and electron microscopy.

Initial inflation of the swim bladder in intensively reared cod was found to happen from 5-6 days post hatching. Programmed cell death was found in the *ductus pneumaticus* before initial inflation, and throughout the examined period. A lumen through the connection was not found, but a developed capillary bed was found to be in place before initial inflation. The epithelium of the swimbladder developed most likely into a gas secreting tissue at an early stage. The connection between the midgut and the swim bladder degenerates by 16 days post hatching. Possible mechanisms for initial inflation are discussed.

## Introduksjon

Det er gjort store framskritt innan intensivt torskeoppdrett dei siste åra, men framleis er det ei rekke uløyste problem, særleg knytt til tidlege larvestadier. Det er rapportert om skjelettmisdanningar i form av deformasjonar på ryggrad, hovud og kjeve (Totland et al., 2004). I nokon tilfelle har so mykje som 80 % av fiskelarvane misdanning i den fremste delen av virvelsøyla, ofte kalla nakkeknekk. Det er òg registrert høge dødsrater blant torskeyngel. Undersøkingar kan tyde på at ryggstrengen (notokorden), støypeforma for ryggssøyla, blir pressa saman og det er foreslått at dette kan ha samanheng med overfylt svømmeblære (Totland et al., 2004).

Svømmeblæra er eit hydrostatisk organ som er plassert dorsalt i bukholahjå teleostar (ekte beinfisk). Det gir fisken oppdrift i vatnet slik at dei slepp å bruke muskelkraft for halde nøytral oppdrift i ulike nivå i vassøyla. Svømmeblæra blir hjå dei fleste teleostar danna som ei enkel dorsal utposing frå fordøyelseskanalen (Steen, 1970). Gasstrykket kan regulerast på ulike måtar, og ein deler svømmeblærer inn i to hovudformer, fysostom og fysoklist. Fysostom fisk har ein forbindelse i form av ein kanal, *ductus pneumaticus*, mellom svømmeblæra og fordøyelseskanalen. Dei kan rask endre trykket i svømmeblæra ved å sleppe luft ut eller presse luft inn gjennom kanalen. Dei kan òg tilføre gass gjennom ein saktare prosess der dei tilfører gass ved å sleppe løyst gass i blodet over i blæra. (Fänge, 1983). Fysoklist fisk manglar kanalen mellom svømmeblæra og fordøyelseskanalen. Trykket i svømmeblæra blir regulert av to spesialiserte områder, gasskjertelen og ovalen. Gasskjertelen er eit område i svømmeblæreveggen med sekreterande kubisk eller sylindrisk epitel. Under epitelet ligg eit dobbelt nettverk av kapillærer, *rete mirabile*. Her ligg kapillæra tett inntil kvarandre. Gasskjertelcellene produserer laktat som diffunderer ut i kapillærnettverket. Dette gjev lokal nedsetting av pH i blodet, og initierer Root-effekten som gjer at hemoglobin avgir oksygen lettare. Dette, saman med motstrømsprinsipp i kapillæra, gjev høge konsentrasjonar av oksygen i gasskjertelenden av rete. Når partialtrykket av oksygen og karbondioksid i blodet blir høgare enn i svømmeblæra, vil gass diffundere inn i svømmeblæra. Ovalen, det reabsorberande området, er eit rikt blodforsynt område dorsalt på svømmeblæra som kan snurpast igjen med glatt muskulatur. Her er blæreveggen tynn, og reabsorpsjonen er ein passiv prosess som skjer fordi gasstrykket i svømmeblæra alltid er høgare enn i blodet.

Mange fysokliste fisk er forbigående fysostome. Det vil seie at dei har ein kanal mellom fordøyelseskanalen og svømmeblæra på larvestadiet. Under tidleg utvikling degenererer kanalen, og gasstrykket vert etter det regulert av ein gasskjertel og oval (Steen, 1970). Apoptose, programmert celledød, er eit utbreidt trekk ved vevsdifferensiering og utvikling. Apoptose kan kjennast igjen ved at cellene krymper og mister strukturar i cytoplasma. Cellekjernene blir små og mørke, for dernest å fragmentere og til slutt gå i oppløysing.

Torsk er som vaksen fysoklist med godt utvikla gasskjertel og oval. Svømmeblæra blir danna som ei utposing frå fordøyelseskanalen og på larvestadiet har torsken ein forbindelse, ein stilk, mellom fordøyelseskanal og svømmeblære (Morrison, 1993). Det er blitt rapportert at denne forbindelsen degenererer innan larvane er 6,5 mm lang (DeJoung, 1936 referert i Dannevig og Dannevig, 1950). Det er i liten grad beskrive korleis denne forbindelsen er oppbygd, og det er ikkje dokumentert om den i det heile har nokon funksjon ved fylling av svømmeblæra.

Mekanismane bak den første fyllinga av svømmeblæra hjå fiskelarvar generelt er lite kartlagt, men to moglege løysingar er beskrive. Forbigående fysostome fiskelarvar kan fylle svømmeblæra ved å snappe luft i overflata og presse gass inn i svømmeblæra via kanalen, eller dei kan ha gassekrerande epitel som er aktivt ved første fylling (Doroshev et al, 1981). Det vert foreslått at torsken er forbigående fysostom, og at den fyller blæra første gongen ved å snappe luft i overflata (Totland et. al 2004) samstundes som det er beskrive at torsk allereie før første fylling har velutvikla kappilærnettverk, *rete mirabile*, som kan bli nytta til gassekresjon (Morrison, 1993).

Det meste ein veit om svømmeblæra hjå torsk er resultat av undersøkingar gjort på vaksne individ, og tidleg utvikling av svømmeblæra, normal funksjon og morfologi, er lite kartlagt. Sidan det kan vere eit problem med overfylte svømmeblærer, er det viktig å forstå den normale utviklinga for å kunne finne ei løysing på problemet. Denne oppgåva vil difor freiste å gi ei morfologisk beskriving av den tidlege utviklinga av svømmeblæra rundt gassfylling gjennom lys- og elektronmikroskopiske metodar, med spesielt vekt på perioden der *ductus pneumaticus* degenererer.



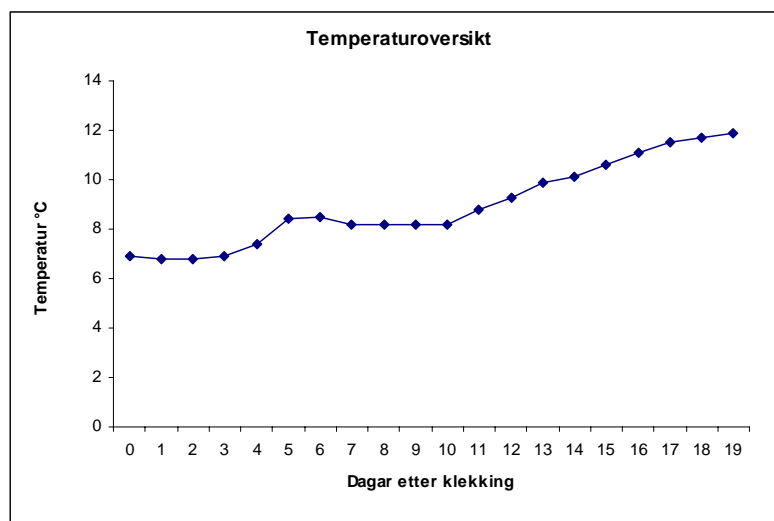
# Materiale og metoder

## Forsøksfisk og prøvetaking

Torskelarvar (*Gadus morhua* L.) til dette studiet vart samla inn ved eit intensivt oppdrettsanlegg i Hordaland våren 2004. Egga blei klekt i ein inkuberingstank, og etter to døger blei larvane overført til eit startfôringskar. Startfôringskaret var på 9000 liter, og larvetettleiken blei rekna til 120 larvar pr.L. Eit døger seinare blei larvane eksponert for kontinuerleg lys, og det vart sett i gong kontinuerleg fôring med rotatorien *Brachionus plicatilis*. Lysintensiteten (LUX = belysingsstyrke lik lumen pr. m<sup>2</sup>) vart målt ved vassflata, og var 800 LUX ved karkanten og 1700 LUX i senter av karet. I heile perioden blei kara tilført grøntvatn (24t i døgeret) som inneheldt algen *Nannochloropsis* produsert i biofence. Kvar dag blei daude torskelarvar siffonert frå karbotnen med ei rensearm og fjerna.

Det vart samla ein utviklingsserie av larvar med dagleg prøvetaking. Serien inneheldt larvar frå dag 4 til dag 17 etter klekking. Temperaturen ved klekking var 6,9 °C, og auka som vist i figur 1.

Torskelarvane blei lagt direkte i fikseringsvæske for teleostar (sjå vedlegg) og frakta til laboratoriet ved Universitetet i Bergen.



Figur 1: Oversikt over temperaturauken i utviklingsserien frå 0 (ved klekking) til 19 dagar etter klekking.

## Lysmikroskopi

Larvar frå 4 til 17 dagar etter klekking blei innstøpt i metacrylat, Technovit<sup>®</sup> 7100 (Herau Kulzer GmbH & Co, Tyskland) (sjå vedlegg). Larvane blei skylt 2 x 5 min i PBS (sjå vedlegg), derneft dehydrert i etanol (70 %, 90 %) før innstøyping. Blokkene blei seriesnitta (2 µm) og kvart snitt blei teken vare på. Dette blei gjort med stålkniv på ein Leica RM 2165 mikrotom. Snitta vart lagt på objektglas, farga med toulidinblått (Philpott, 1966) (sjå vedlegg) før montering i Mountex (Histolab products AB, Sverige).

## Transmisjonselektronmikroskopi (TEM)

Larvar frå 5, 8 og 11 dagar blei preparert til TEM. Larvane blei skylt 2 x 5 min i PBS og sekundærfiksert med 1 % osmium i 60 min (sjå vedlegg). Dei blei derneft skylt i destillert vatn og dehydrert med aceton (70 %, 90 % og 100 %). Fiskane blei delt i to med eit snitt rett bak bukhola og den fremste delen blei støpt inn i støypeformene. Formene blei merka og fylt med standardløysing Fluka Epon 821 (Fluka Chemie AG, Sveits) (sjå vedlegg). Dei låg so eit døger i romtemperatur (20°C) før det blei lagt to døger til polymerisering i varmeskap (60 °C).

Semitynne snitt (0,8µm) blei laga med glaskniv på ein Leica Reichert ultracut e mikrotom. Snitta vart lagt på objektglas, farga med toulidinblå og studert i lysmikroskop. Når det interessant området vart funne, blei snitta fotografert med eit ProgResC14 digitalkamera montert på eit olympus AH-3 mikroskop.

Ultratynne snitt (50 nm) blei laga med diamantkniv på ein Reichert–Jung Ultracut e mikrotom. Snitta vart overført til kopar-gridder med formvarhinne og kontrastfarga med uranylacetat (Watson, 1958) og blyhydroksyd (Reynolds, 1963) (sjå vedlegg). Dei blei so studert og fotografert i eit JEOL 100 S transmisjonselektronmikroskop.

### **Scanning elektronmikroskopi (SEM)**

Åtte stadier, 6, 7, 9, 10, 14, 15, 16 og 17 dagar etter klekking, blei preparert til SEM. Hud over bukholå og bukhinna på venstre side vart fjerna ved disseksjon. Preparata blei skylt i PBS (2 x 10 min) før dei blei sekundærfiksert med 1 % osmium i 60 min. Derneft blei dei skylt i destillert vatn (2 x 10 min) og dehydrert i aceton (2 x 10 min i 50%, 70%, 90% og i 4 x 15 min 100%) før kritisk punkttdrking. Dei blei so montert på karbontape festa på metallstubbar og pådampa gull-palladium. Etterpå blei dei studert og fotografert i eit JEOL JSM-6400 scanning elektronmikroskop.

### **Tredimensjonal rekonstruksjon (3-D)**

Torskelarvar frå fleire stadier blei utveld til tredimensjonal rekonstruksjon av symjeblæra og *ductus pneumaticus*. Serier med bilete blei teken av dei lysmikroskopiske snitta med eit ProgResC14 digitalkamera montert på eit olympus AH-3 mikroskop og behandla i Adobe<sup>®</sup> Photoshop<sup>®</sup> 7.0 (Adobe systems, San Jose, Cal. USA). Bileta blei optimalt posisjonert i forhold til kvarandre og stabla i Autoaligner 2.0 (Bitplane AG, Sveits). Dette skal kunne danne utgangspunktet for tredimensjonal rekonstruksjon i Imaris 4.1 (Bitplane AG, Sveits). Til tross for gjentekne forsøk var ikkje dette mogleg å få til grunna eit ukjend dataproblem, og blir difor ikkje presentert i resten av oppgåva.

### **Målingar og biletbehandling**

Målestokkar og lengde på bilete blei målt i Image Pro Plus 3.0 (media cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, USA). All biletbehandling blei gjort i Adobe<sup>®</sup> Photoshop<sup>®</sup> 7.0.

## Resultat

Utviklinga av svømmeblæra og degenereringa av forbindelsen mellom fordøyelseskanalen og svømmeblæra kan delast inn i fem stadier:

### Før svømmeblæra er fylt

Dette stadiet var ikring 4-5 dagar etter klekking. Svømmeblæra var ikkje fylt, og låg plassert dorsalt for fordøyelseskanalen i bukhol. Kranialt og dorsalt for svømmeblæra var ekskretorisk og hematopoietisk nyrevev. Mesenteriet dekte heile svømmeblæra. Forbindelsen, stilken, mellom fordøyelseskanalen og svømmeblæra strekte seg frå dorsalt i fortarmen til kaudalt i blæra. Forbindelsen hadde to lag, eit indre- og eit ytre-, og der var ikkje synleg lumen i denne perioden. Utanfor svømmeblæreveggen bestod det ytre laget av støtteceller, inne i svømmeblæreveggen utgjorde fibroblaster det ytre laget. Epitelet i svømmeblæreanlegget var einlaga høgt sylinderepitel, og i bindevevslaget rundt, var det godt utvikla kapillærnettverk (Figur 2).

Stilken delast inn i to regionar; ein proksimal og ein distal region. Den proksimale delen låg utanfor svømmeblæreveggen, og den distale delen låg inne i svømmeblæreveggen og gjekk saman med svømmeblæreepitelet (Figur 3).

**Den proksimale regionen av stilken** gjekk ut frå fortarmen like kaudalt for overgangen mellom spiserør og fortarm. Den snodde seg dorsalt og gjekk inn kaudalt i svømmeblæreveggen. Det ytre laget av støtteceller var på dette stadiet basofile og runde i lysmikroskop (Figur 4a og b). Dei låg, i tillegg til rundt stilken, rundt fordøyelseskanalen i overgangen mellom spiserør og fortarm, og langs heile spiserøret. Nokre stadar i støttecellene var det tidlege teikn til apoptose programmert celledød), ved at ein kunne små, framtrødande cellekjerner. Det indre laget i stilken hadde eit epiteloid preg, og cellene strekte seg på langs ut frå fortarmen (Figur 5). Diameteren av det indre laget endra seg frå å vere liten ut frå fortarmen, til å vere større i eit område lenger ventralt, ein ampull (Figur 4a og b). Cellene såg ut til å bøye av og inn mot sentrum i stilken, og dei fleste gjekk ikkje lenger ventralt enn ampullen. Det vart ikkje observert noko lumen i stilken i denne perioden.

**Den distale regionen.** I denne delen var stilken mindre og få celler utgjorde det indre epiteloide laget. Stilken blei i denne regionen støtta opp av fibroblaster (Figur 4c). Fibroblastkjernene låg inn mot basalmembranen i stilken (Figur 6), og hadde bindevevsfibrar som strekte seg sirkulært rundt svømmeblæra. Dei indre epiteloide cellene fylte heile stilken, og det var heller ikkje i denne regionen mogleg å observere noko lumen. Basalmembranen i stilken gjekk saman med basalmembranen i svømmeblæra kaudo-lateralt (Figur 4d).

**Svømmeblæreanlegget** var bygd opp av eit kraftig bindevevslag som omringa eit epitellag. Dette epitelet vil grense til det framtidige lumen i svømmeblæra, som i denne perioden var synleg som ei smal spalte. Epitelet i svømmeblæreanlegget var einlaga høgt sylinderepitel (Figur 7). Cellene var i kontakt med kvarandre gjennom desmosom, og hadde store kjerner med prominente nukleoli. (Figur 8a). Den ytre delen av veggen i blæra bestod av bindevev. Det låg fleire lag kollagenfibrar og fibroblaster med lange flak sirkulært rundt epitellaget. Ytterst i bindevevslaget låg melanocyttar med pigmentkorn i eit eller fleire lag dorsalt (Figur 8b). Ventralt i svømmeblæra var ikkje pigmentkorn tilstades. Svømmeblæra var allereie på dette stadiet godt vaskularisert. Eit tett nettverk av kapillærer låg direkte under epitelet rundt heile anlegget. Det var rikelig med pericyttar rundt desse blodkara. I tillegg var det eit godt utvikla nettverk av kapillærer som låg både sirkulært og longitudinelt kaudalt og ventralt i bindevevslaget (Figur 7).

### **Første fylling av svømmeblæra**

Denne perioden var ikring 5-6 dagar etter klekking, og her fekk ein den første fyllinga av svømmeblæra. Stilken hadde lumen, men ikkje heile vegen frå fortarm til svømmeblære. Apoptotiske trekk kunne observerast i støttecellene. Lumen i svømmeblæra hadde gått frå å vere smal spalteforma til å vere heilt rundt, og epitelet hadde endra form til kubisk epitel med eit lågare område kaudo-lateralt der stilken kom inn (Figur 9).

**Den proksimale regionen av stilken.** Den første, tynne delen av den proksimale regionen hadde heller ikkje i denne perioden teikn til lumen. Støttecellene og dei epiteloide cellene var lik dei observert før første fylling (Figur 10a). Overgangen frå fortarmen var tydeleg som drag ut frå tarmveggen, og støttecellene var truleg synlege som klumpar på stilk og

spiserør i SEM (Figur 11a og b). Lenger ventralt, i ampullen, var det på dette stadiet eit tydeleg lumen (Figur 10b). Lumenet strekte seg i krypter, og dei epiteloide cellene stod på ein sterkt folda basalmembran og utgjorde eit svært uorganisert epitel. Somme områder var cellene veldig lave, medan andre var høgare (Figur 12). Støttecellene som låg rundt viste typiske teikn på apoptose. Dei låg heilt inntil og folda seg etter basalmembranen med lange utløparar både inn mot basalmembranen og ut mellom andre celler. Kjernane var tette og loberte (Figur 13).

Hjå nokre individ var det mogleg å sjå eit stort utspilt lumen i stilken. Hjå desse individ var dei epiteloide cellene i stilken lågare enn andre, og ikkje i tjukkare lag i ampullområdet. Alle individ med slike utspilte stilker hadde debris i stilk og i svømmeblæra (Figur 14).

**Den distale regionen av stilken.** Når ein kom til den distale regionen blei stilken brått mykje tynnare, og var lik distal region før fylling utan lumen (Figur 11c). Rett før den gjekk inn i svømmeblæra, opna stilken seg igjen og diameteren vart større. Stilken hadde ein tydeleg overgang til epitelet i svømmeblæra, og dei epiteloide cellene var svært låge med kjerner som utgjorde mesteparten av cytoplasma (Figur 11d).

**Svømmeblæra.** Epitelet i svømmeblæra hadde endra form, og gjekk frå å vere høgt sylinderforma før fylling, til kubisk etter fylling. Det dorsolaterale området der stilken kom inn i svømmeblæra, var tydeleg tynnere enn resten av epitelet. (Figur 15). SEM preparat synta at stilken gjekk ut frå fortarmen og inn på venstre side av svømmeblæra (Figur 16). Bindevevslaga låg flakvis godt pakka saman og desse flaka kunne observerast i SEM (Figur 17). Kapillærnettverket låg framleis ventralt og kaudalt i svømmeblæreveggen. Blodkara som var plassert rett under epitelet samla seg i dei områda under det høgaste epitelet. Dorsolateralt var epitelet nærare plateepitel med lite underliggjande blodkar.

## Utviding av svømmeblæra

Denne perioden var ikring 7-9 dagar etter klekking. Stilken hadde framleis kontakt med fortarmen, men hadde ikkje synleg lumen lenger. Det indre laget var tynt både ved fortarmen og ved overgangen til svømmeblæra. Støttecellene hadde meir framtrødande apoptose enn tidlegare. Fibroblastkjernene rundt den distale delen av stilken var mindre framtrødande. Svømmeblæra utvida seg, og epitelet fekk større områder med tynt epitel. (Figur 18).

**Den proksimale regionen av stilken.** Utvendig likna stilken perioden ved første fylling med støtteceller i overgangen frå fortarmen (Figur 19a og b). I denne perioden vart dei apoptotiske trekka meir markert, og støttecellelaget rundt stilken hadde fleire mørke prominente kjerner, medan støttecellene ved fortarmen og rundt overgangen mellom spiserør og fortarm var uendra. Dei epiteloide cellene i stilken hadde ein tendens til mindre tydelege cellegrensar, og i overgangen frå fortarmen såg ein cellene som drag ut frå tarmepitelet (Figur 20). Ampullen var framleis den tjukkaste delen av stilken, men lumenet ein kunne observere ved første fylling, var ikkje lenger tilstades. Dei epiteloide cellene hadde framleis eit uorganisert preg, og låg tett saman inn mot sentrum av stilken. Den svært folda basalmembranen med dei same apoptotiske støttecellene var framleis tilstades på dette stadiet (Figur 21).

**Den distale regionen av stilken** gjekk framleis heile vegen inn til svømmeblæra, og likna tilstander ein hadde før fylling. I overgangen til svømmeblæra hadde ein ikkje lenger noko lumen som i den førre perioden (Figur 22). Stilken var tynnere enn tidlegare, og fibroblastkjernene rundt stilken var organisert som på tidlegare stadier med mindre tydelege kjerner.

**Svømmeblæra** utvida seg og fekk ei meir ellipsoid form. Det dorsale, tynne området i epitelet var blitt plateforma. I denne perioden breidde det seg laterad på begge sider. Kranialt og kaudalt var epitelet høgare enn i resten av blæra, (Figur 23), og ein kunne observere endoplasmatisk retikulum og mitokondrier i desse cellene. Under det høge, kubiske epitelet var det rikeleg med blodkar, medan det tynne området hadde eit underliggende lag med glatt muskulatur (Figur 24 a og b). Blodkara som låg rett under

epitelet i denne perioden var samla rett under det høgaste epitelet, og elles var det lite endring i denne organiseringa i forhold til tidlegare stadier (Figur 23).

Det var nokre få individ som på dette stadiet ikkje hadde fylt svømmeblæra. Desse såg ut til å ha kome kortare i utviklinga, og både stilken og svømmeblæra likna larvar frå dag 4 og 5 etter klekking.

### **Avsnøring av stilken**

Dette stadiet er ikring 10-15 dagar etter klekking. Ved overgangen frå fortarmen var det indre laget tynnare enn tidlegare, og det var eit søkk støttecellelaget der stilken blei avsnørt. Det var først det indre laget som, mot slutten av denne perioden, mista kontakta med fortarmen. Svømmeblæra auka meir i storleik, og dei kubiske områda vart meir framtrédande. Blodkara under epitelet trengte seg inn mellom epitelcellene i tillegg til å ligge ute i bindevevet. Elles var det lite endring i bindeveslaget rundt (Figur 25).

**Den proksimale regionen av stilken.** I byrjinga av denne perioden starta avsnøringa av den proksimale delen av stilken. Ein kunne framleis sjå draga av dei epiteloide cellene gå ut frå fortarmen dorsalt til ampullen, men draga var tynnere enn før (Figur 26a). I dei heilt proksimale støttecellene kunne ein først observere avsnøringa av stilken, og ein kunne sjå at dei rundt heile stilken hadde ei innbukting der den ville gå av. Støttecellene ved fortarmen og rundt fordøyelseskanalen hadde ikkje like framtrédande apoptotiske trekk som dei direkte rundt stilken (Figur 26b). Mesenteriet utanpå stilken bukta seg inn etter støttecellene (Figur 27a). Basalmembranen var framleis sterkt folda, og apoptotiske cellekjerner låg i støttecellelaget (Figur 27b). Mot slutten av perioden blei dei epiteloide cellene i stilken heilt avsnurpa, og mista kontakta med fortarmen. Berre støtteceller med apoptotiske trekk utgjorde den proksimale delen av stilken nede ved fordøyelseskanalen. Ampullen var ikkje degenerert på dette stadiet, men likna tidlegare stadier.

I den siste delen av denne perioden vart det òg observert individ med tydeleg overgang frå fortarmen. Desse individa hadde utspilt lumen i stilken med debris. Ein tydeleg overgang til svømmeblæra var òg tilstades med noko som kunne likne på klaffar i overgangen, men det vart ikkje funne muskulatur i desse (Figur 28a og b).



**Den distale regionen av stilken** var uendra i forhold til det førre stadiet. Den var tydeligare ventralt enn dorsalt. I overgangen mellom proksimal og distal del låg epitelcellene på langs med lange kjerner, og det var ikkje teikn til lumen i denne regionen (Figur 29). Fibroblastane rundt den distale delen hadde mindre tydelege kjerner inn mot basalmembranen.

**Svømmeblæra.** Dei lågare områda utgjorde ein større del av svømmeblæreepitelet enn tidlegare, og det kraniale kubiske epitelet vart meir markant og var konstant gjennom heile blæra. Det ventrale og kaudale epitelet endra tjukkeleik gjennom svømmeblæra utan at det var eit tydeleg mønster i dette (Figur 30). Blodkara låg, som observert på tidlegare stadier, konsentrert under det høge epitelet og ventralt i dei områda epitelet der var høgare (Figur 30).

I denne perioden var det nokre individ som skilde seg ut frå resten. Desse likna ikkje på ufylte svømmeblærer sett på tidlegare stadier, heller ikkje fylte svømmeblærer frå same stadiet. Svømmeblæra hjå desse verka kollapsa med utvida epitelceller som bukta seg inn i lumen. Blodkara var større og bukta seg inn mellom epitelcellene (Figur 31). Stilken hjå desse individa likna tidlegare stadier og hadde samanheng med fortarmen.

### **Svømmeblæra og stilken etter avsnøring**

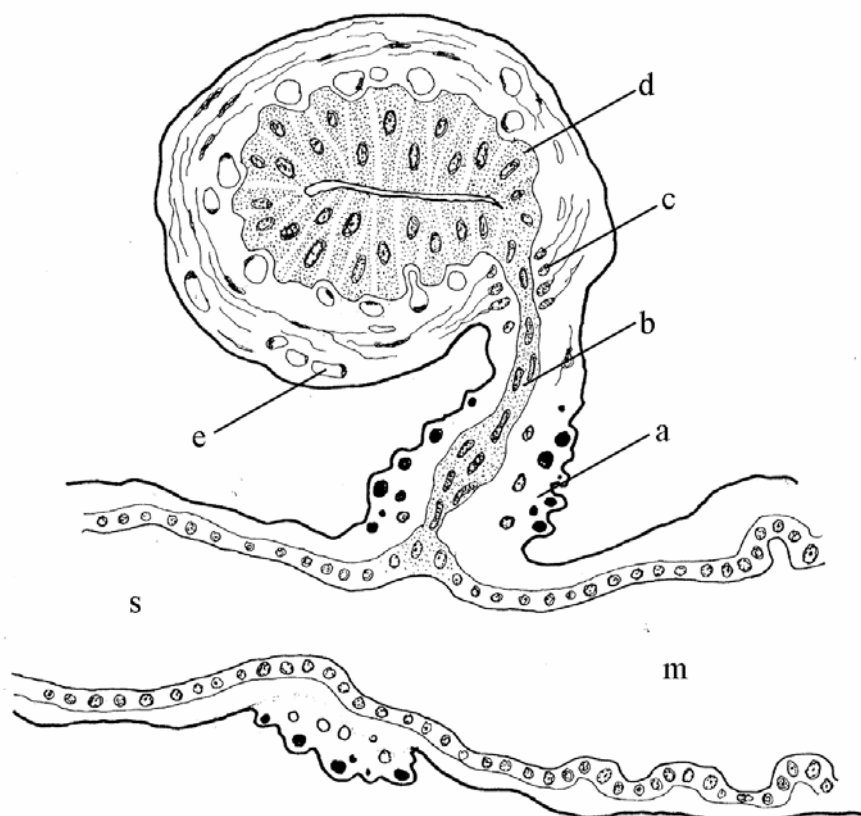
Dette stadiet var ikring 16-17 dagar etter klekking. Restar av stilken stod igjen som eit vedheng ut frå svømmeblæra, og berre mesenteriet gjekk mellom fortarm og svømmeblæra. Epitelet i svømmeblæra endra seg lite frå den førre perioden. Det var færre tydelege fibroblastkjerner i bindelvevslaget som for det meste av bestod kollagefibrar (Figur 32).

**Den proksimale regionen av stilken.** Det var ingen teikn til overgangen frå fortarmen i den proksimale regionen, berre ei utbukting ytterst i tarmveggen, der overgangen tidlegare hadde vore, stod att. Den var dekt av støtteceller med apoptotiske trekk som låg att nede ved fortarmen som ein kuppel. Mesenteriet gjekk mellom fordøyelseskanalen og

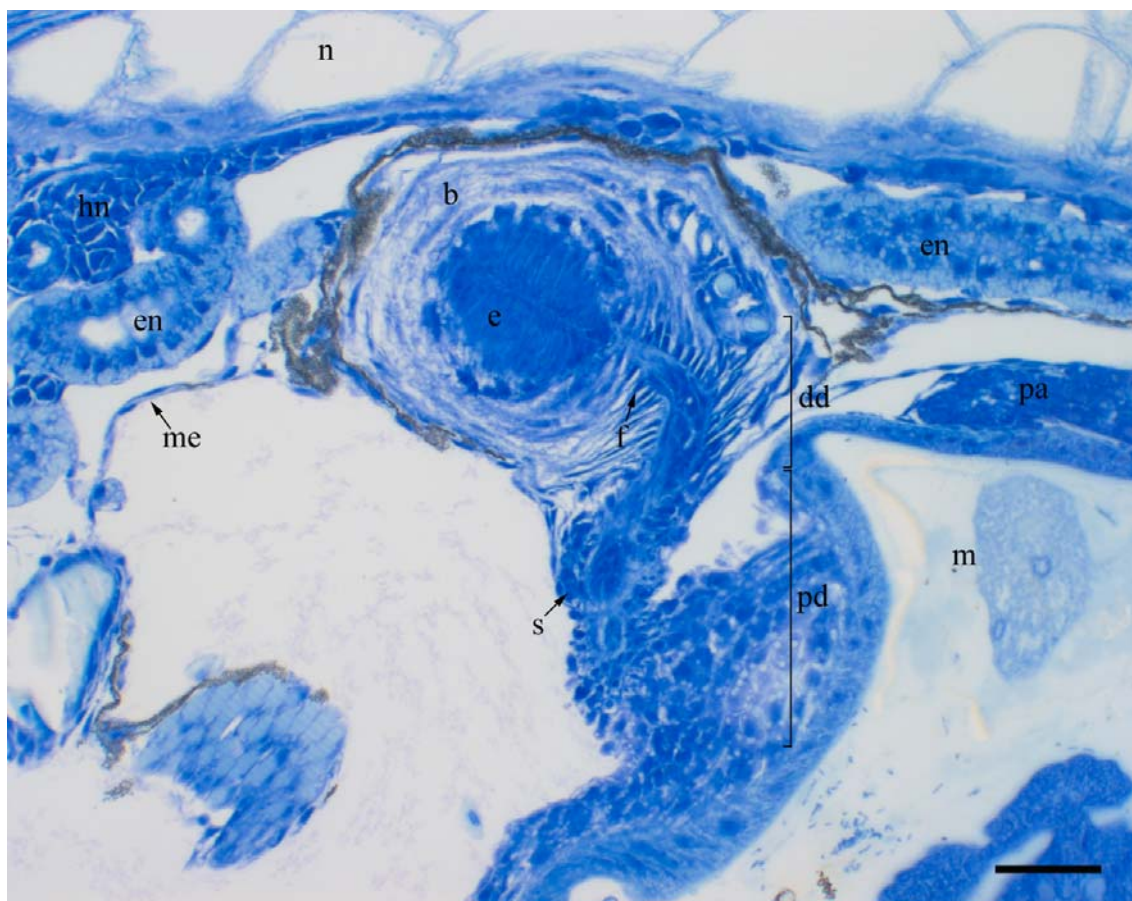
svømmeblæra, og ein kunne observere blodkar og nerver som gjekk i mesenteriet (Figur 33a). Lenger ventralt, i ampullen, kunne ein sjå det som var att av den proksimale regionen. Den var synleg som ein celleklump kaudo-ventralt for svømmeblæra (Figur 33b). Støttecellene ein kunne observere rundt spiserøret før fylling var heller ikkje tilstades, kun fortjukkinga rundt overgangen mellom spiserør og fortarm stod att. I SEM var ampullen synleg som eit vedheng på sida av svømmeblæra, men der det tidlegare hadde vore ein tydeleg samanheng med fortarmen, var det på dette stadiet berre eit tynt drag av mesenteriet att (Figur 34).

**Den distale regionen av stilken** var som i førre stadium liten, og det var ikkje mogleg å skilje mellom epiteloide celler og basalmembran. Fibroblastkjernene som ved fylling låg inntil stilken såg ut til å vere erstatta av kollagefibrar som omringa stilken og gjekk rundt svømmeblæra.

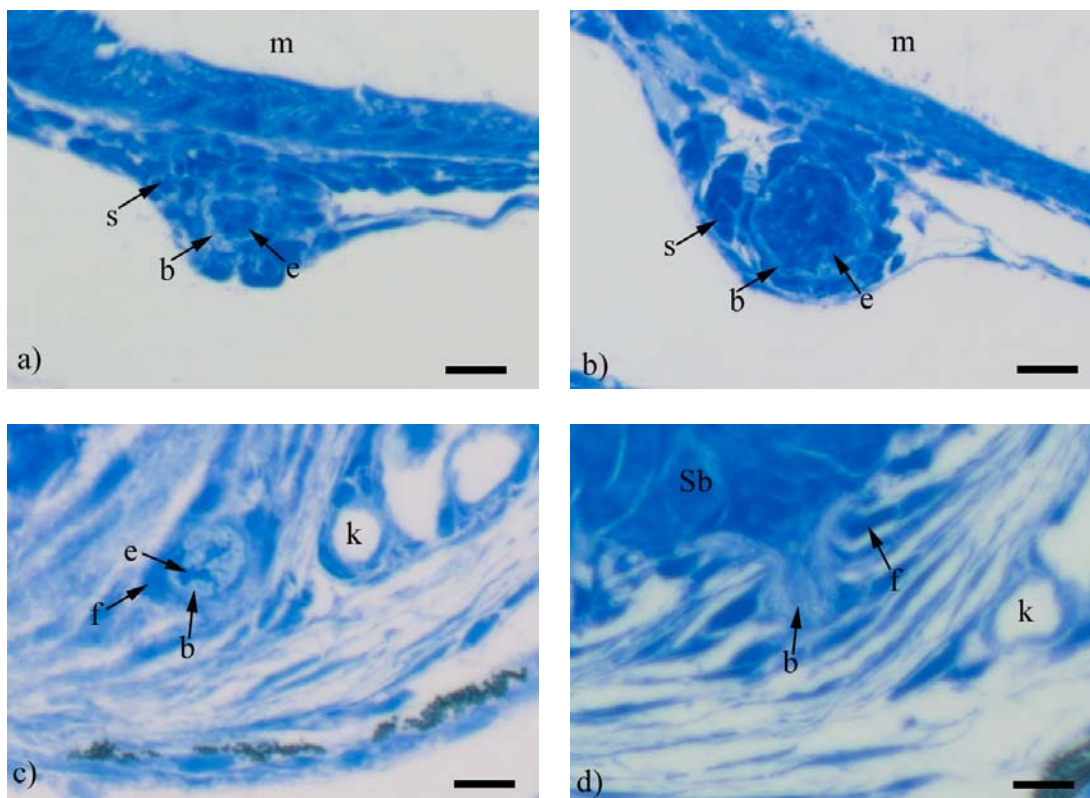
**Svømmeblæra.** Det kraniale epitelet var meir framtrudande enn tidlegare stadier. Dette området breidde seg ventrad somme plasser i blæra. Dei underliggande blodkara var samla under det kubiske epitelet, og kaudalt gjekk det mot plateepitel (Figur 35). I bindevevslaget var det færre tydelege fibroblastkjerner, og laget såg ut til å bestå av mest kollagenfibrar.



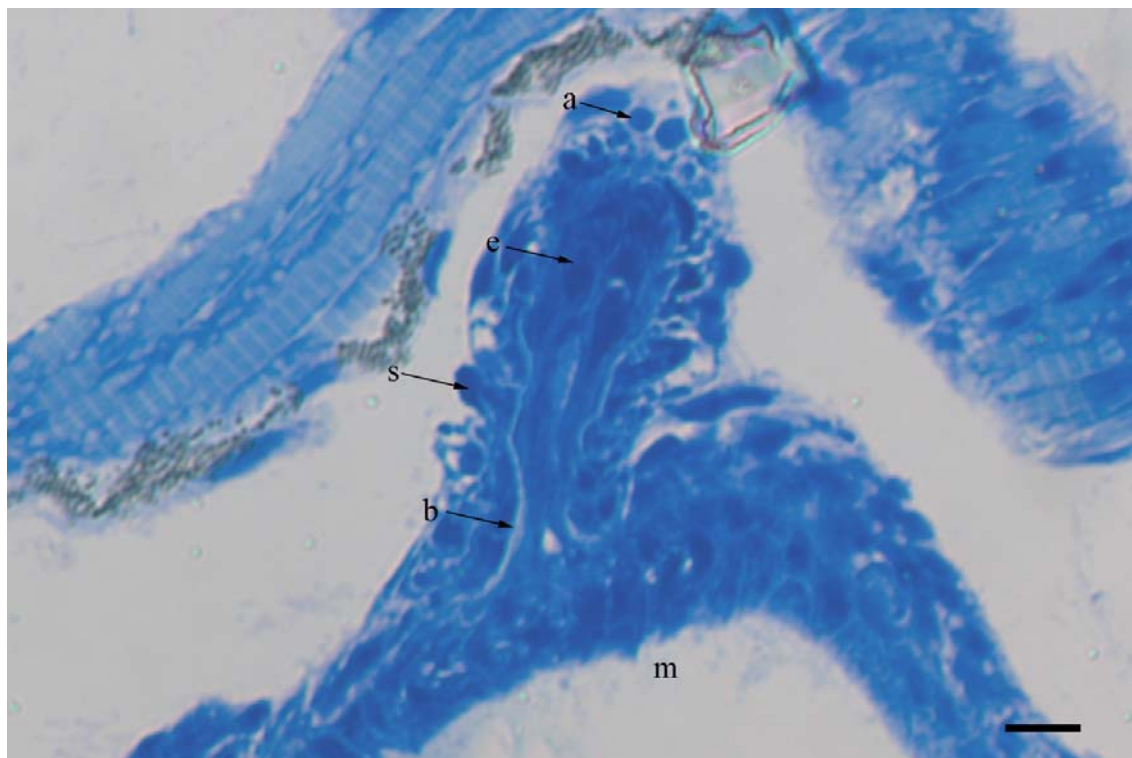
Figur 2: Svømmeblæra før fylling (ikring 4-5 dagar etter klekking). Det var ikkje synleg lumen i stilken denne perioden. Epiteloide celler utgjorde det indre laget (b) og frå fortarmen opp til svømmeblæreveggen var dei omringa av støtteceller (a). Inne i svømmeblæreveggen var det indre laget omringa av fibroblaster (c). Einlaga høgt sylinderepitel utgjorde svømmeblæreepitelet (d), og vart omringa av eit bindevevslag. Eit godt utvikla kapillærnettverk var tilstades (e). a: støtteceller, b: epiteloide celler, c: fibroblastkjerner, d: epitel i svømmeblæra, e: kapillærer, s: spiserør, m: fortarm. Illustrasjonen bygg på transversal- og saggital- snitt både frå lysmikroskop, TEM og SEM. Teikna av H. Kryvi.



Figur 3: Saggittalsnitt av svømmeblæreanlegget og ikringliggende organ 5 dagar etter klekking. Svømmeblæra er ikkje fylt. Stilken er snitta i heile si lengde, og ein kan sjå dei to hovudregionane med støtteceller (s) og fibroblastar (f). Den proksimale delen (pd) går frå fortarmen opp til svømmeblæreveggen, og den distale delen (dd) går saman med epitelet i svømmeblæra. b: bindevevslag, dd: distal del, e: epitel, en: ekskretorisk nyrevev, f: fibroblast, hn: hematopietisk nyrevev, pa: pankreas, pd: proksimal del, s: støtteceller, me: mesenteriet, m: fortarm, n: notochord. 2µm tjukt Metacrylatsnitt. Målestokken er 200 µm.

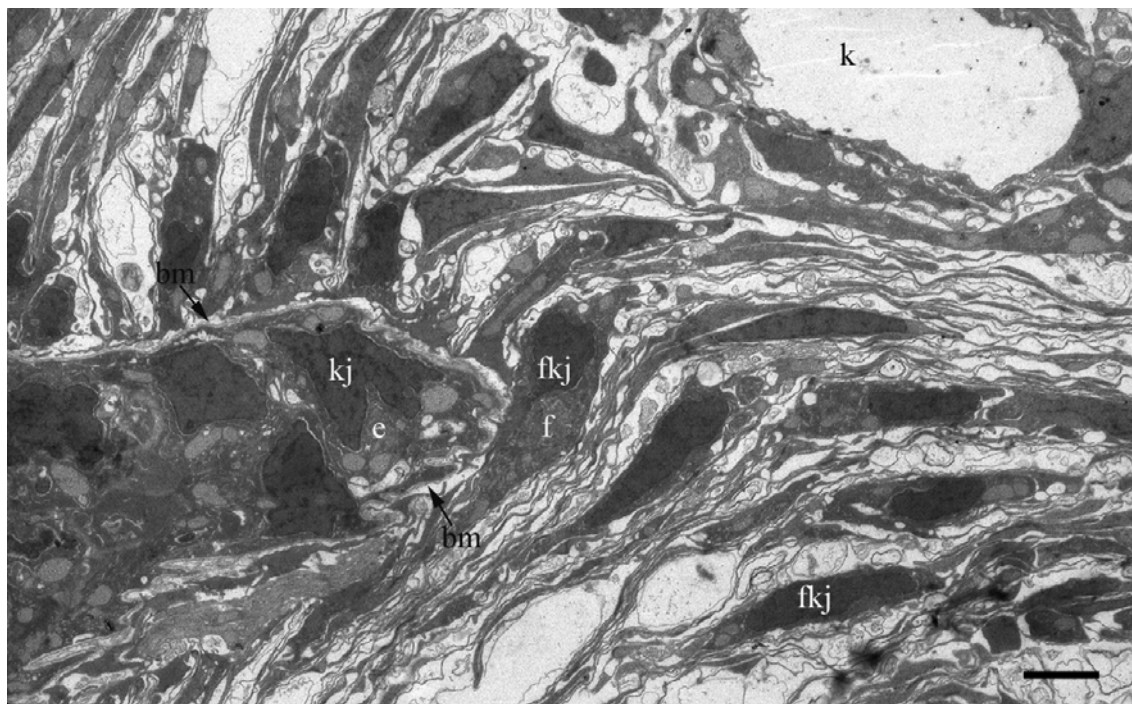


Figur 4: Horisontalsnitt av stilken i ulike nivå før oppblåsing 5 dagar etter klekking. **a)** Proksimal del, rett dorsalt for overgangen frå fortarmen. Stilken er ein tett struktur, cellegrensene i det indre laget er utdelige (e), og ein har basofile, runde støtteceller (s) rundt. Ein tydeleg basalmembran skil dei to laga (b) Målestokken er 50 $\mu$ m. **b)** Proksimal del, ampullen. Stilken er framleis ein tett struktur, med eit tjukkare lag epitelceller (e). Same støttecellene (s) rundt som i nivå a), og ein tydeleg basalmembran (b) er tilstades. Målestokken er 60  $\mu$ m. **c)** Distal del, i svømmeblæreveggen. Stilken er svært liten med få synlege epitelceller (e). Utanfor basalmembranen (b) ligg fibroblstar (f). Målestokken er 40  $\mu$ m. **d)** Distal del, ved overgangen til svømmeblæreepitelet (Sb). Det indre laget i stilken går saman med epitelet i svømmeblæra, framleis er det ikkje råd å sjå lumen. Målestokken er 35  $\mu$ m. Metacrylatinnstøpt vev, 2  $\mu$ m tjukt snitt. b: bindevev, e: epitel, f: fibroblast, k: kapillær, s: støtteceller.

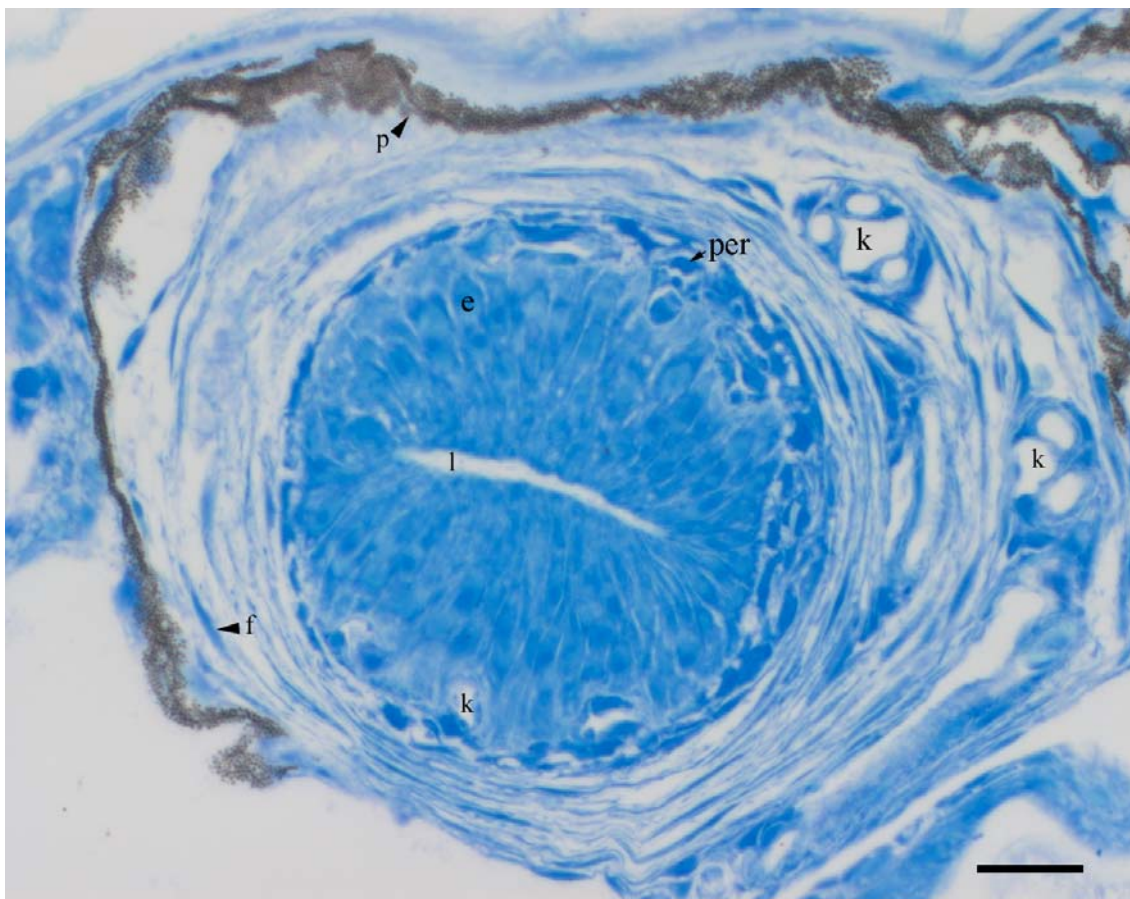


Figur 5: Sagittalsnitt av den proksimale delen av stilken 4 dagar etter klekking. Dei epiteloide cellene (e) i stilken strekker seg på langs frå fortarmen i tynne drag før ein kjem til ampullen der cellene bøyer inn mot sentrum. Støttecellene (s) ligg rundt det indre laget, skild av ein basalmembran (b). Støttecellene har apoptotiske trekk, ved at kjernen virkar tette og mørke (a). Metacrylatinnstøpt vev, 2  $\mu\text{m}$  tjukt snitt. Målestokken er 50  $\mu\text{m}$ . a: støtteceller som har apoptotiske trekk, b: basalmembran, e: epitelceller i stilken, m: fortarmen, s: støttecelle.



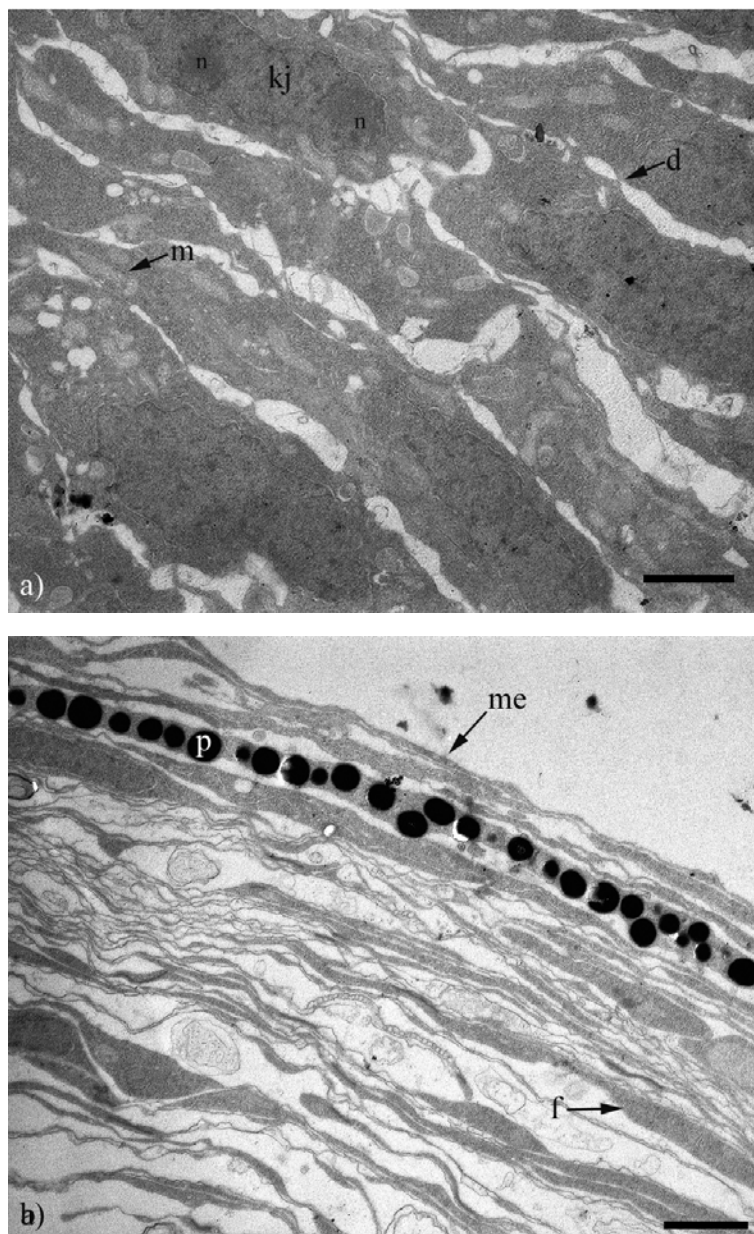


Figur 6: Sagittalsnitt av den distale delen av stilken 5 dager etter klekking. Epiteloide celler (e) i stilken stand på ein basalmembran (bm). Fibroblaster (f) med lange utløparar ligg inn mot basalmembranen og støtter stilken inne i svømmeblæreveggen. Målestokken er 1,5  $\mu\text{m}$ . Eponinnstøpt vev, 0,5  $\mu\text{m}$  tjukt snitt. bm: basalmembran, e: epitelcelle i stilken, f: fibroblast, fkj: fibroblastkjerne, k: kapillær, kj: kjerne i epitelcelle.

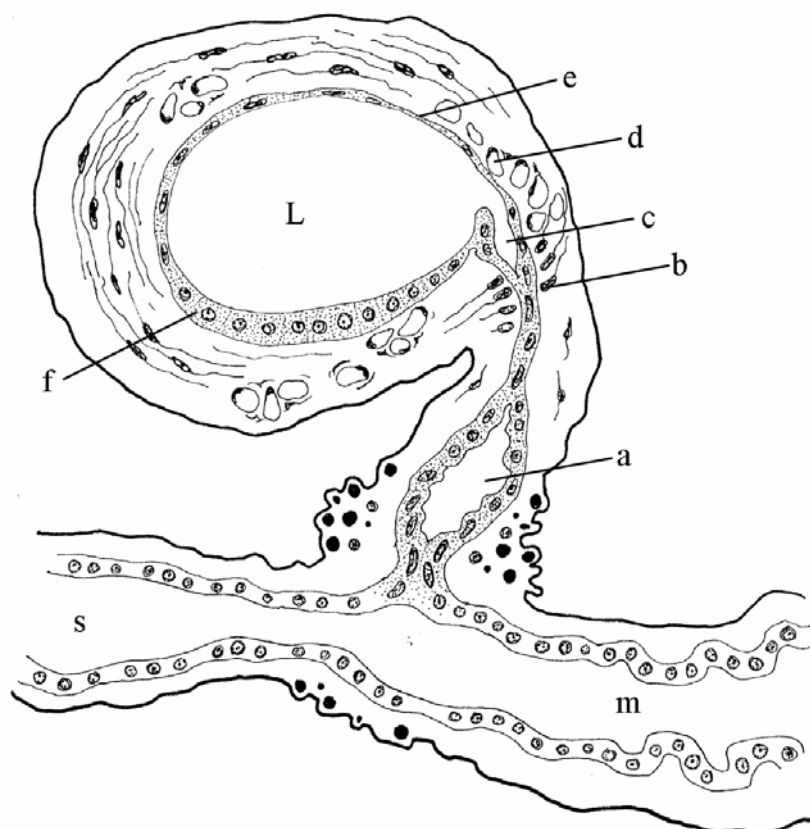


Figur 7: Sagittalsnitt av svømmeblæra før første fylling, 5 dagar etter klekking. Epitelet i blæra er høgt sylindforma (e). Under epitelet ligg kapillærer (k) rundt heile anlegget. Kapillærane er støtta opp av pericytter (per). Ein har i tillegg kapillærer kaudalt i og ventralt i veggen. Bindevevslaget er fibroblaster (f) og kollagenfibrar. Dorsalt har ein pigmentkorn (p) ytterst i bindevevet. Metacrylatininstøypt vev, 2  $\mu\text{m}$  tjukt snitt. Målestokken er 100  $\mu\text{m}$ . e: epitel, f: fibroblast, k: kapillær, l: lumen, p: pigmentkorn, per: pericytt.

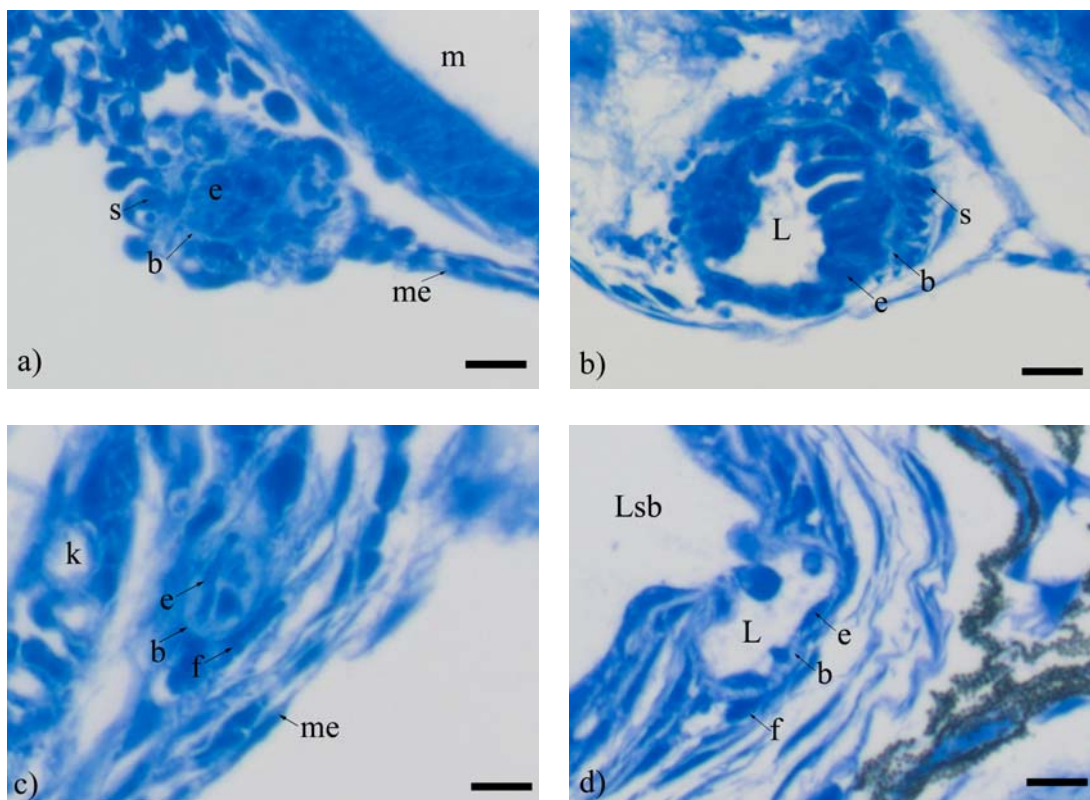




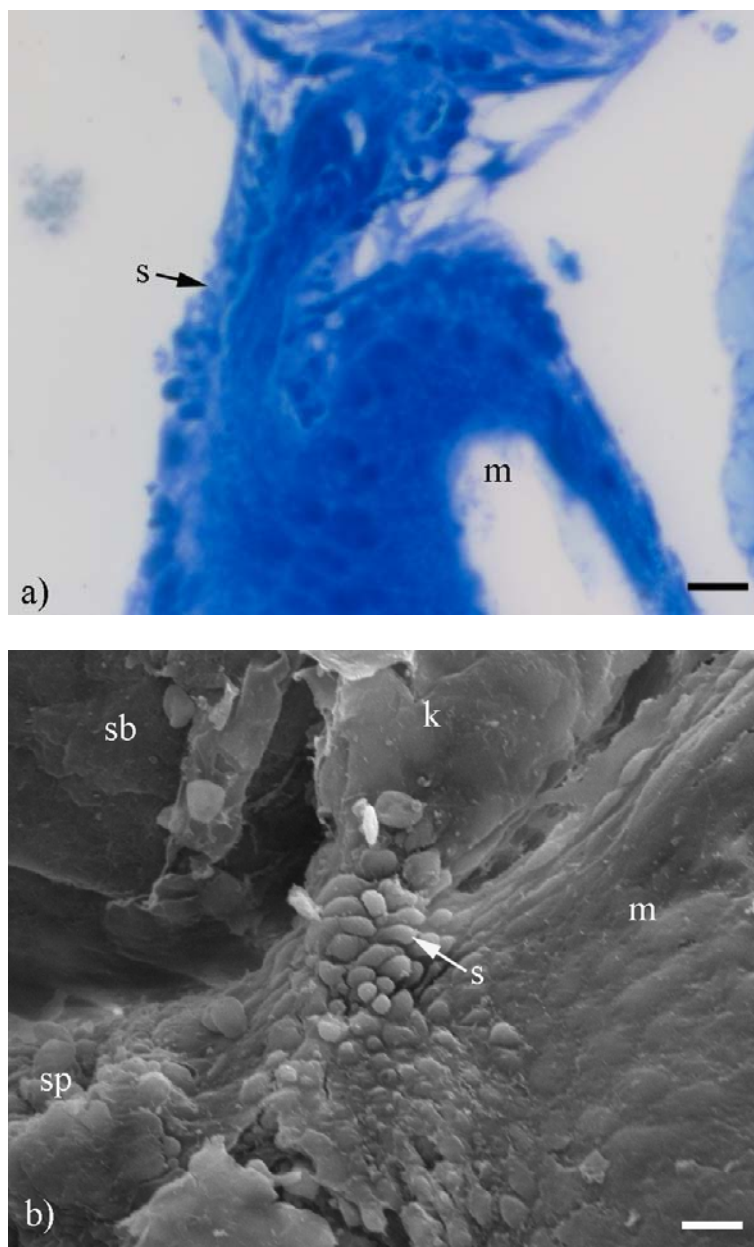
Figur 8: Sagittalsnitt av svømmeblæreveggen 5 dagar etter klekking. **a)** Epitelet i svømmeblæra før oppblåsing. Cellene har store kjerner med fleire nukleoli. Dei er i kontakt via desmosomer (d). **b)** Ytterst i bindevevslaget. Fibroblastceller (f) ligg lagvis utanpå kvarandre. Heilt ytterst ligg det pigmentkorn (p). Dei kan ligge i eit eller fleire lag. Svømmeblæra er dekt av mesenteriet (me). Begge bileta er av eponinntøpvt vev, 0,05  $\mu\text{m}$  tjukt snitt. Målestokken er 2 $\mu\text{m}$ . d: desmosom, f: fibroblast, p: pigmentkorn, kj: kjerne, me: mesenteriet, mi: mikrovilli, n: nukleolus, u: utløper, m: mitokondrie,



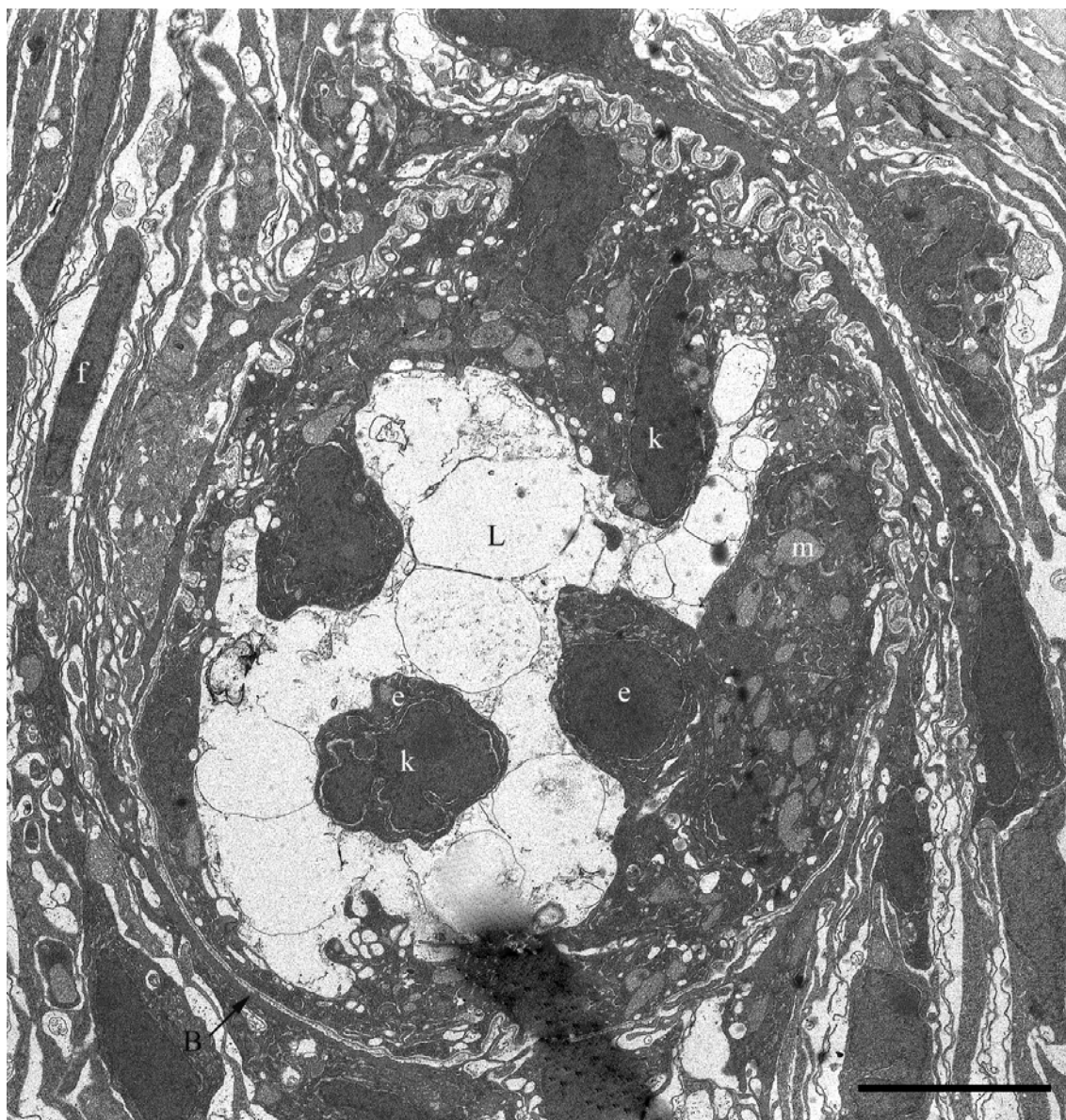
Figur 9: Svømmeblæra ved fylling (ikring 5-6 dagar etter klekking). Lumen i stilken var synleg i ampullen (a) og i overgangen til svømmeblæra (c). Støttecellene hadde apoptotiske trekk. Rundt den distale delen var det framleis tydelege fibroblastkjerner (b). Lumen i svømmeblæra var heilt rundt (L), og epitelet hadde endra form til kubisk epitel (f) med eit lågare område kaudo-lateralt. Kapillæra var som før fylling (d). a: lumen i ampullen, b: fibroblastkjerner, c: lumen ved overgangen til svømmeblæra, d: kapillærer, e: tynt epitel, f: tjukt epitel, L: lumen i svømmeblæra, s: spiserør, m: fortarm. Illustrasjonen bygg på transversal- og saggital- snitt både i lysmikroskop, TEM og SEM. Teikna av H. Kryvi.



Figur 10: Horisontalsnitt av stilken i ulike nivå ved første fylling, 6 dagar etter klekking (same nivå som figur 4). **a)** Proksimal del, ved fortarmen. Stilken har ikkje synleg lumen, og som ved 5 dagar etter klekking, er dei epiteloide cellene (e) vanskeleg å skilje frå kvarandre. Dei er omringa av støtteceller (s). Målestokken er 50 $\mu$ m. **b)** Proksimal del, ampullen. I denne perioden er det eit tydeleg lumen (L) i stilken i dette nivået. Rundt dei epiteoide cellene (e) ligg støtteceller (s). Målestokken er 45 $\mu$ m. **c)** Distal del, inne i svømmeblæreveggen. Stilken er mindre i diameter enn i ampullen, og det er ikkje teikn til lumen. Det er få epiteloide celler (e) i det indre laget, og dei er omringa av fibroblastceller (f). Målestokken er 40 $\mu$ m. **d)** Distal del, overgangen til svømmeblæreepitelet. Stilken får igjen eit lumen (L). Dei epiteloide cellene (e) i stilken er svært låge med store kjerner som opptek det meste av cytoplasma. Framleis er dei omringa av fibroblastar (f). Målestokken er 41 $\mu$ m. Metacrylatinntøppt vev, 2  $\mu$ m tjukt snitt. b: basalmembran, e: epitel, f: fibroblast, k: kapillær, L: lumen, Lsb: lumen i svømmeblæra, m: fortarmen, me: mesenteriet, s: støttecelle.

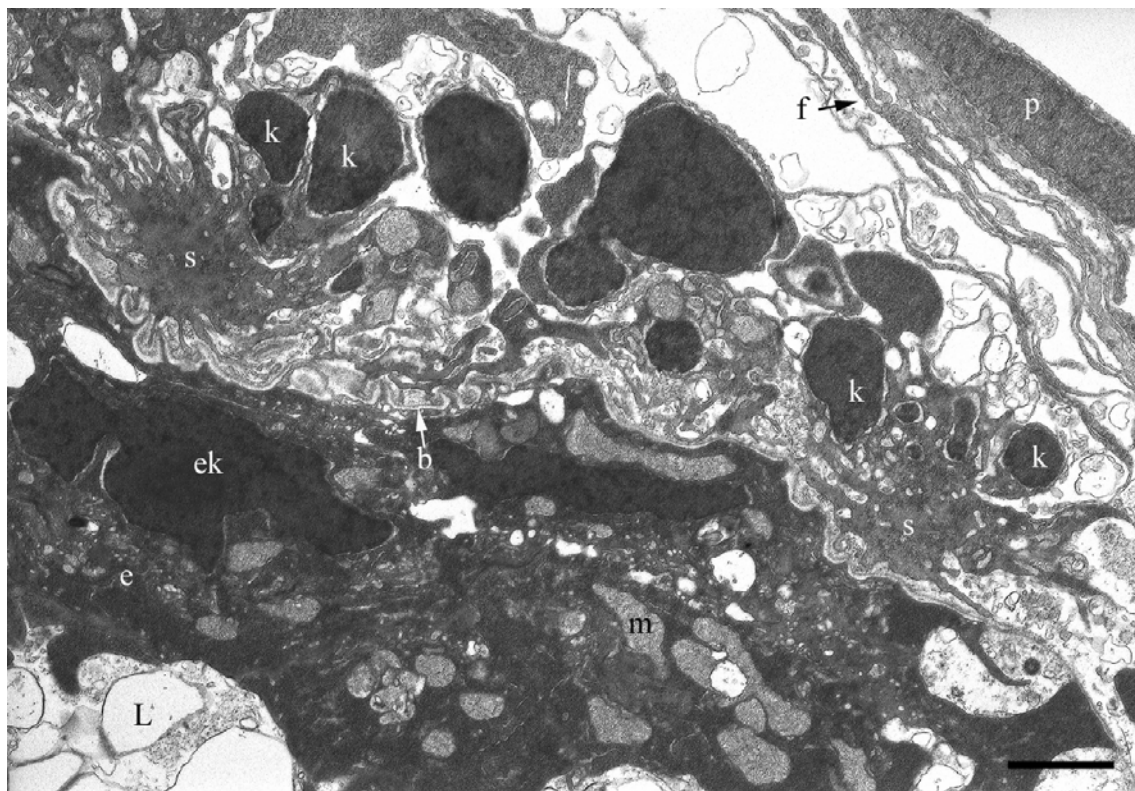


Figur 11: Proksimal del av stilken, ved overgangen ut frå fortarmen ved første fylling, 6 dagar etter klekking. **a)** Støttecellene (s) ligg rundt dei epiteloide cellene i stilken. Dei er runde og basofile i lysmikroskopet. Metacrylatinnstøpt sagittalsnitt, 2  $\mu\text{m}$ . Målestokken er 100  $\mu\text{m}$ . **b)** Scanningpreparat der ein kan sjå overgangen frå fortarmen. Støtteceller (s) ligg truleg rundt overgangen som klumpar, og ein kan berre følge desse opp til svømmeblæreveggen. Målestokken er 10  $\mu\text{m}$ . s: støtteceller, m: fortarm, k: stilk, sb: svømmeblære

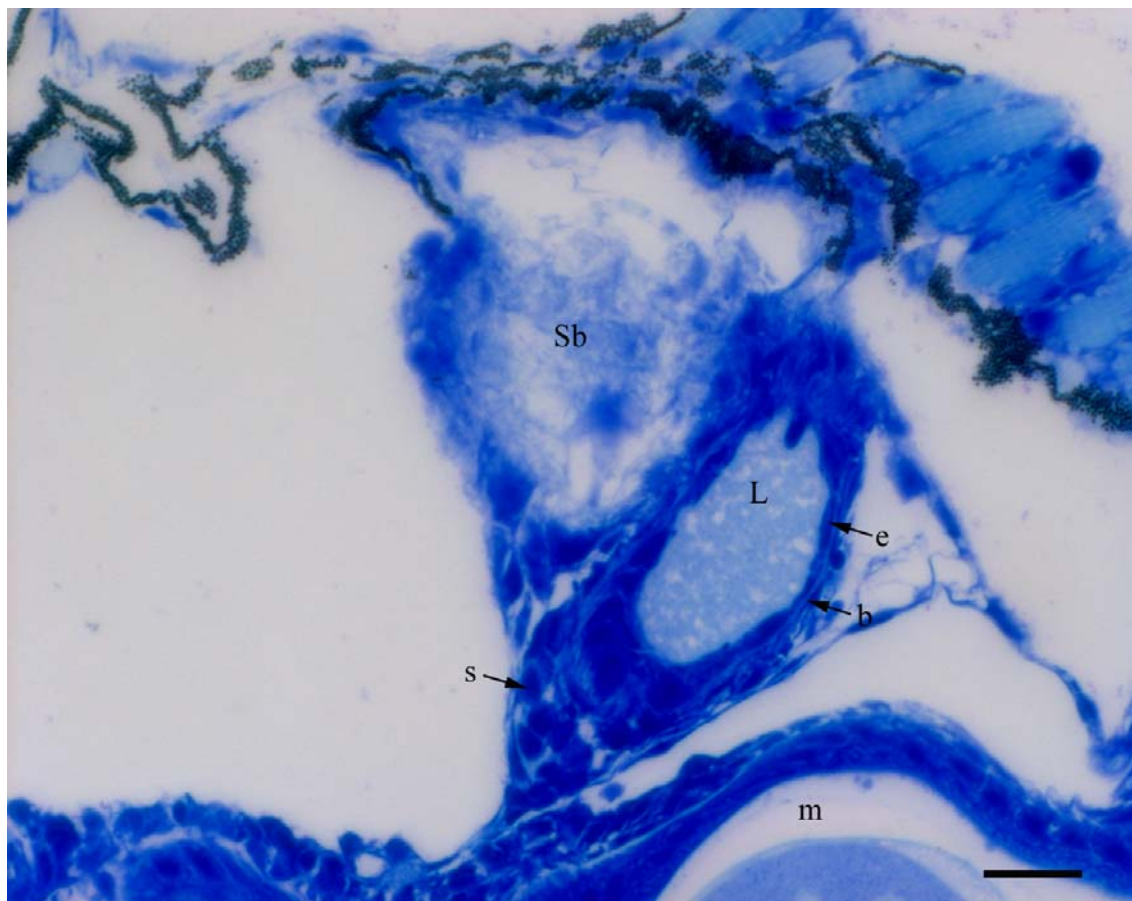


Figur 12: Horisontalsnitt som viser stilken i transversalsnitt, 6 dagar etter klekking. Dette er i det stilken er i ferd med å gå over i den distale delen. Ein svært folda basalmembran (B) avgrensar epitelcellene (e) frå støttecellene. Eponinnstøpt vev, 0,05  $\mu\text{m}$  tjukt snitt. Målestokken er 5  $\mu\text{m}$ . L: lumen, k: kjerne, e: epitel, m: mitokondrie, B; basalmembran, f: fibroblast.

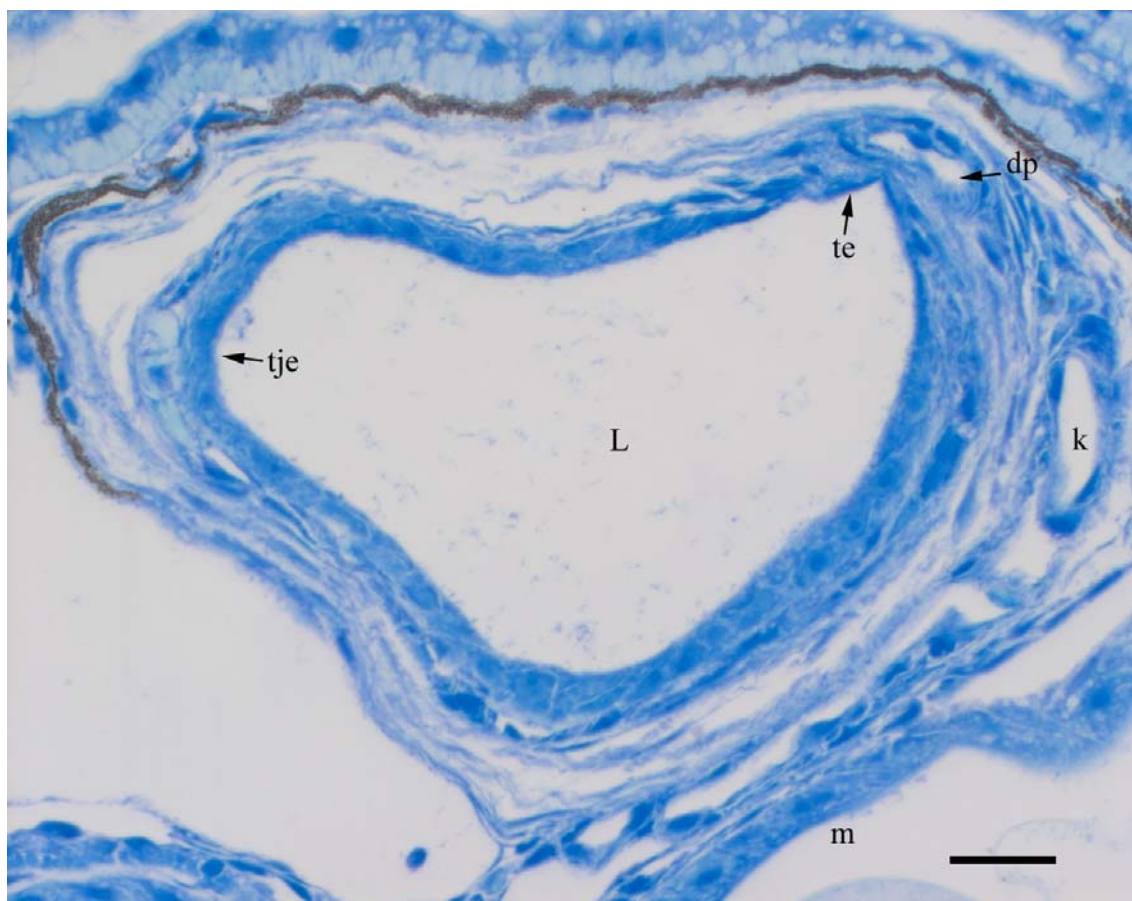




Figur 13: Detaljbilete av støtteceller i stilken, 5 dagar etter klekking. Støttecellene (s) er svært folda inn mot basalmembranen (b) med mange og lange utløparar. Dei har loberte og mørke kjerner (k), og ein ser her minst to slike celler. Epitelcellene har eit uryddig preg. I nedre venstre hjørne er lumen i stilken (L). Eponinnstøpt vev, 0,05  $\mu\text{m}$  tjukt snitt. Målestokken er 2,5  $\mu\text{m}$ . b: basalmembran, ek: epitelcellekjerne, f: fibroblast, k: kerne i støttecelle, L: lumen i stilken, m: mitokondrie, p: mesenteriet, s: støttecelle.

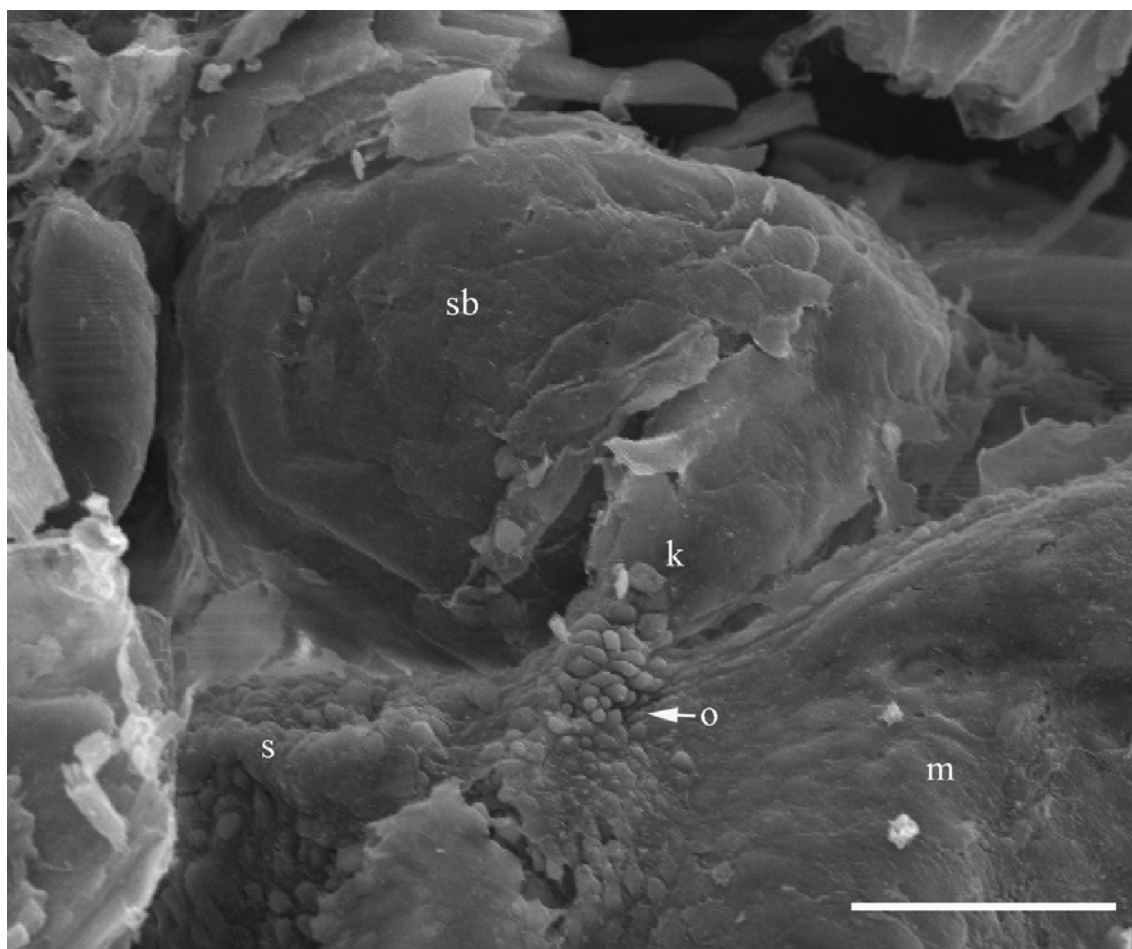


Figur 14: Sagittalsnitt av kanalen ved første fylling, 6 dagar etter klekking. Lumen i stilken er utspilt, og dei epiteloide cellene (e) i kanalen er lågare enn i stilkar utan utspilt lumen. Debris i kanalen ser ut til å fylle lumen (L) i stilken. Støttecellene rundt kanalen er basofile og ser ikkje ut til å ha apoptotiske trekk. Ein ser berre skalken av svømmeblæra (Sb) på dette snittet. Metacrylatinntøpt snitt, 2  $\mu\text{m}$  tjukt. Målestokken er 100  $\mu\text{m}$ . Sb: svømmeblæreskalken, s: støtteceller, L: Lumen i stilken, e: epiteloide celler, b: basalmembran, m: magesekk.

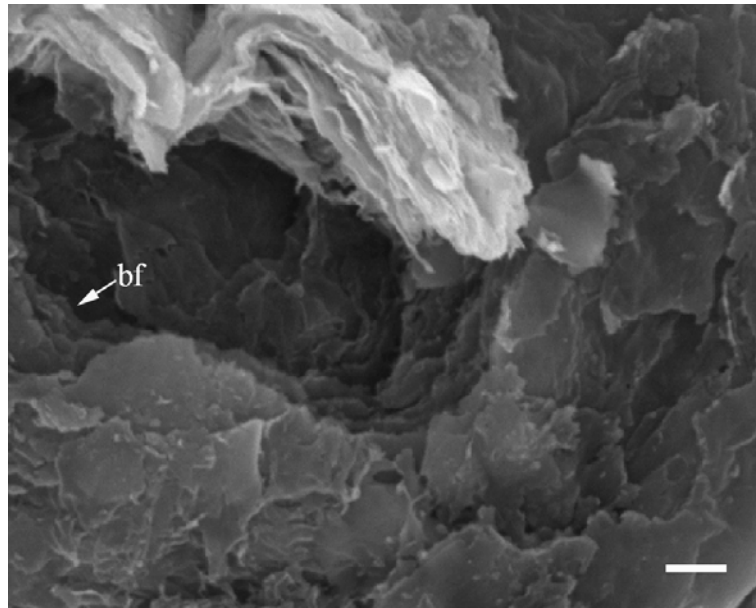


Figur 15: Sagittalsnitt av svømmeblæra ved første oppblåsing, 6 dagar etter klekking. Det er kubisk epitel i det meste av svømmeblæra (tje). I området der stilken vil komme inn, er epitelet lågare plateforma (te). Svømmeblærelumen (L) er i denne perioden heilt rundt. Metacrylatinnstøpt snitt, 2  $\mu\text{m}$ . Målestokken er 100  $\mu\text{m}$ . L: lumen, m: fortarmen, k: kapillær, te: tynt epitel, tje: tjukt epitel, dp: *ductus pneumaticus* (stilken).

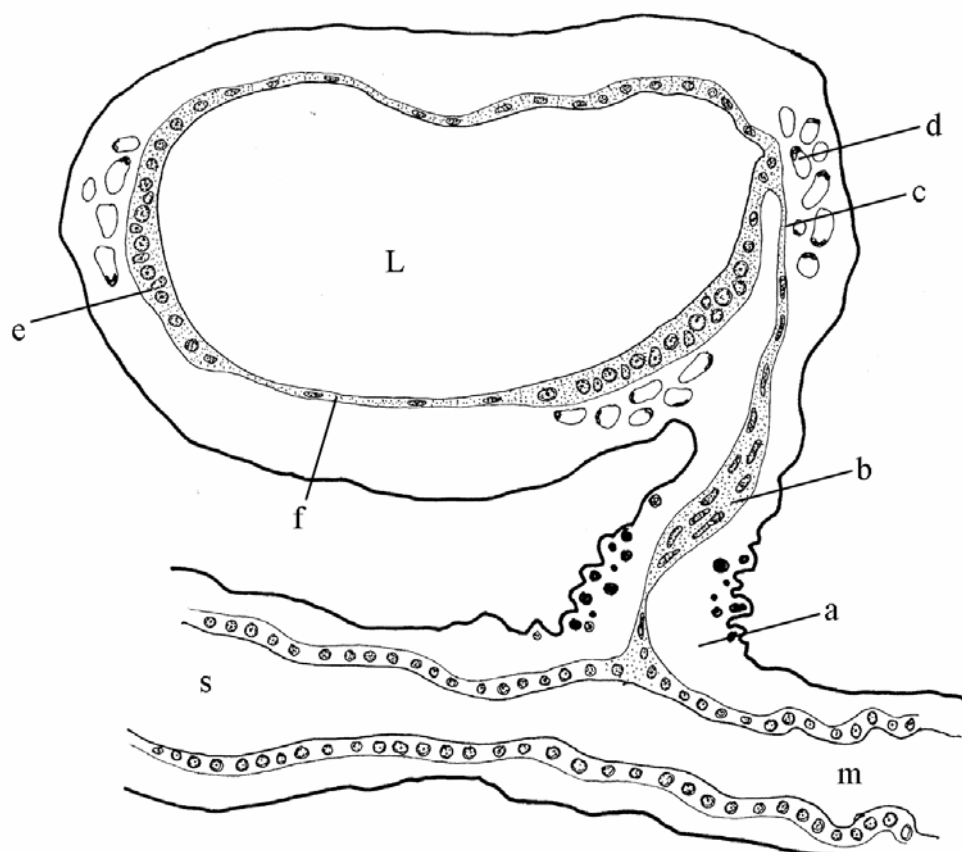




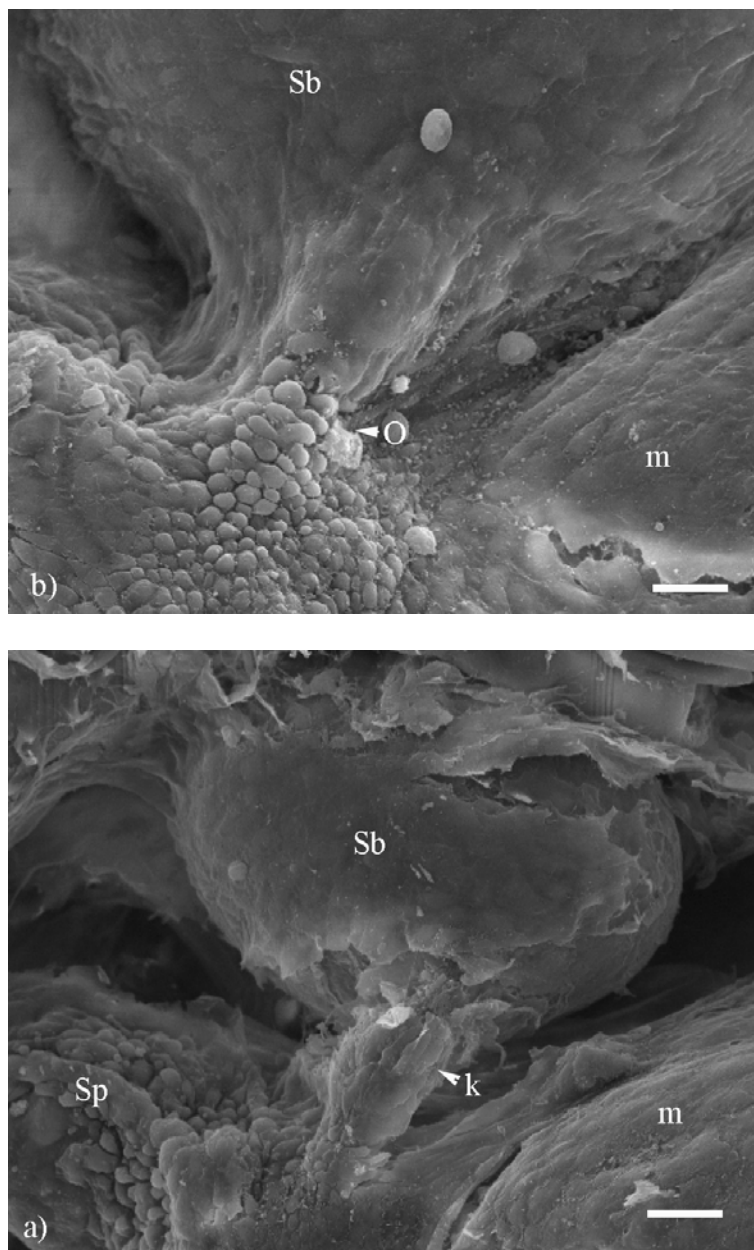
Figur 16: Scanningpreparat av dissekert fisk ved første fylling, 6 dager etter klekking (same fisk som figur 9b). Stilken kjem ut frå fortarmen og inn i svømmeblæra på venstre side. Dei klumpete cellene rundt den proksimale delen av stilken ligg òg rundt spiserøret. Målestokken er 50  $\mu\text{m}$ . k: stilken, m: fortarm, o: overgangen frå fortarmen, s: spiserør, sb: svømmeblæra.



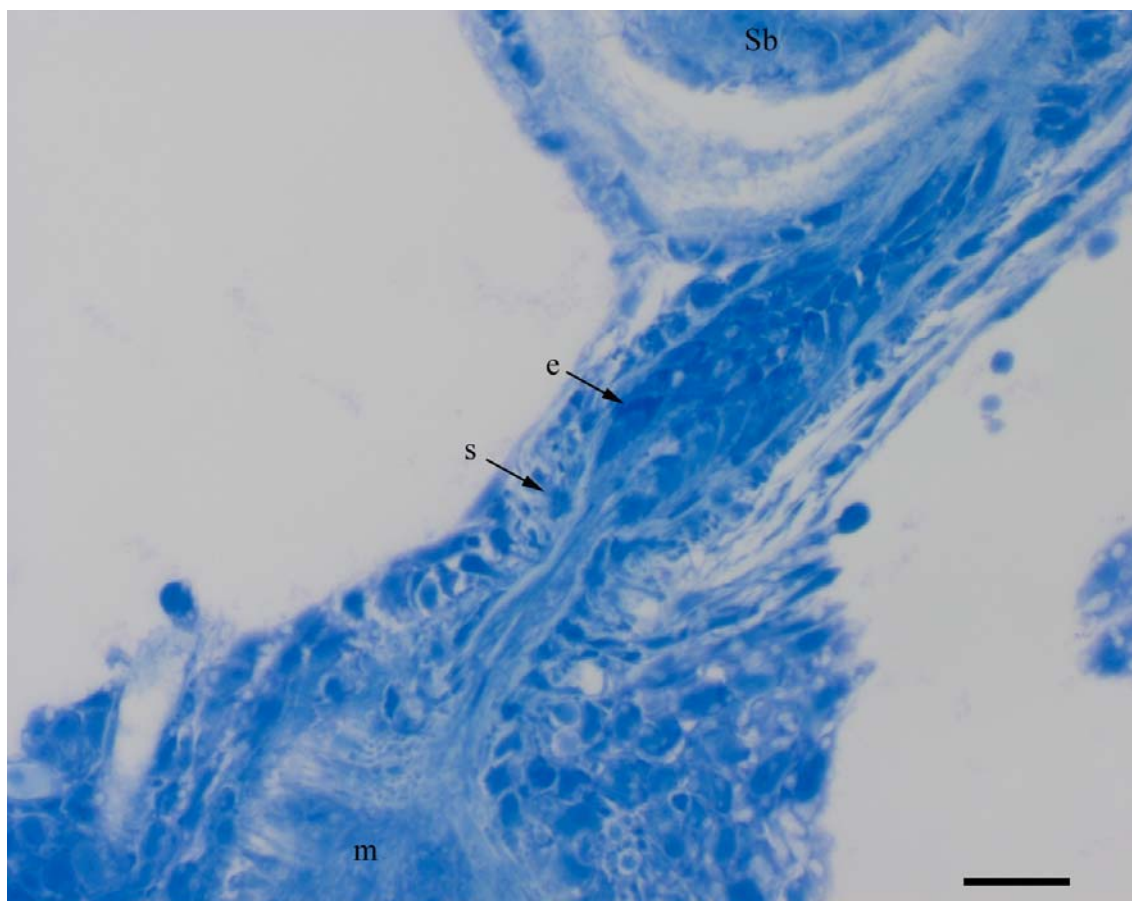
Figur 17: Detaljbilete av scanningpreparat. Bindevevslaget i svømmeblæreveggen ligg som flak utanpå kvarandre. Målestokken er 5  $\mu\text{m}$ . bf: bindevevsflak.



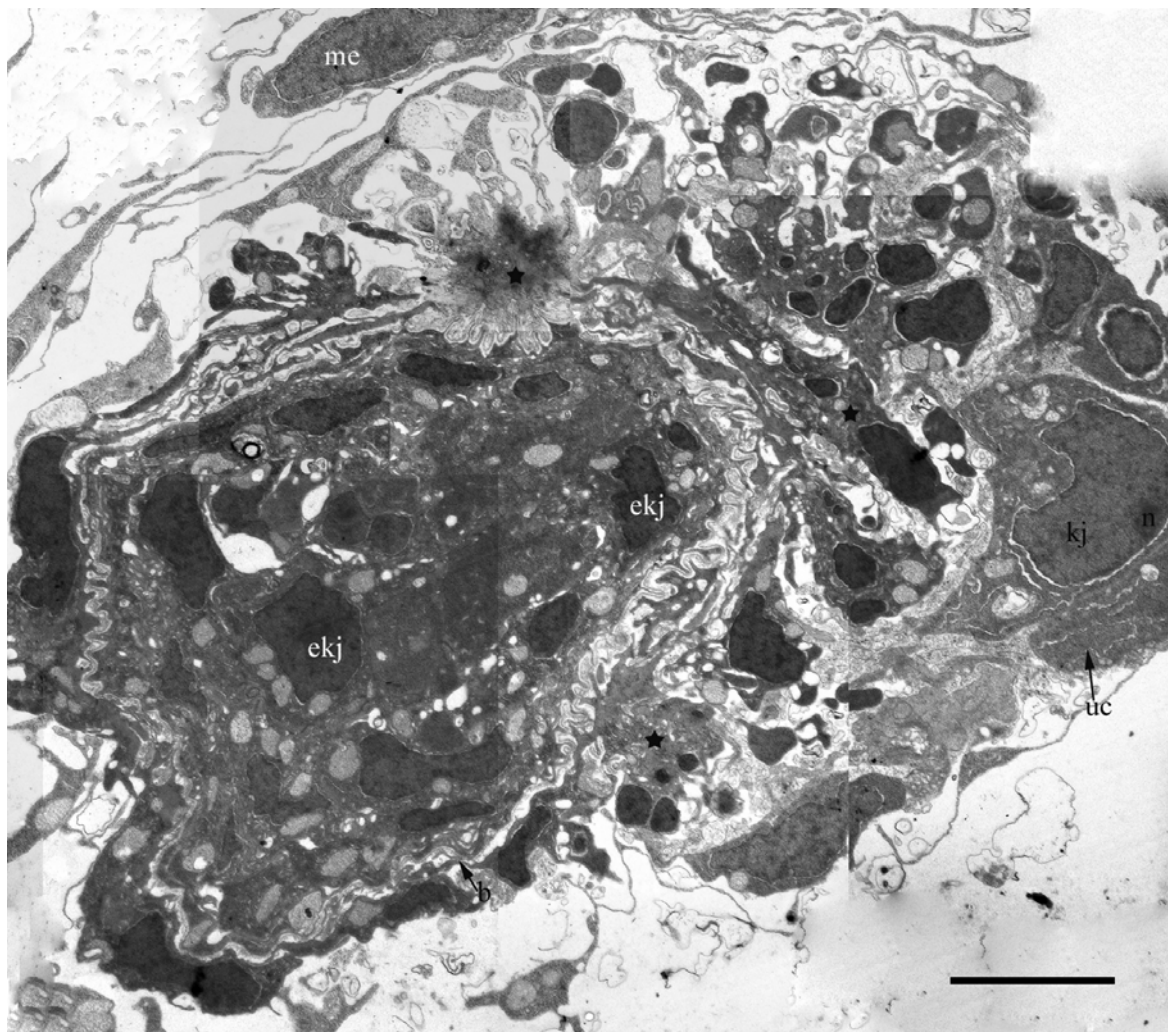
Figur 18: Utviding av svømmeblæra (ikring 7-9 dagar etter klekking). Stilken hadde ikkje synleg lumen (b), og var tynn ved overgangen frå fortarmen og ved overgangen til svømmeblæra (c). Apoptosen i støttecellene vart meir framtrèdande (a) og fibroblastkjernene rundt den distale delen var mindre tydelege. Svømmeblæra utvida seg, og det vart større områder med tynt epitel (f). Blodakar samla seg under det kubiske epitelet (e). Bindevevslaget endra seg lite frå førre stadie, og er ikkje illustrert. a: støtteceller, b: det indre laget i stilken (utan lumen), c: tynt område av stilken ved overgangen til svømmeblæra, d: kapillærer, e: tjukt epitel, f: tynt epitel, L: lumen i svømmeblæra, s: spiserør, m: fortarm. Illustrasjonen bygg på transversal- og saggital-snitt både i lysmikroskop, TEM og SEM. Teikna av H. Kryvi.



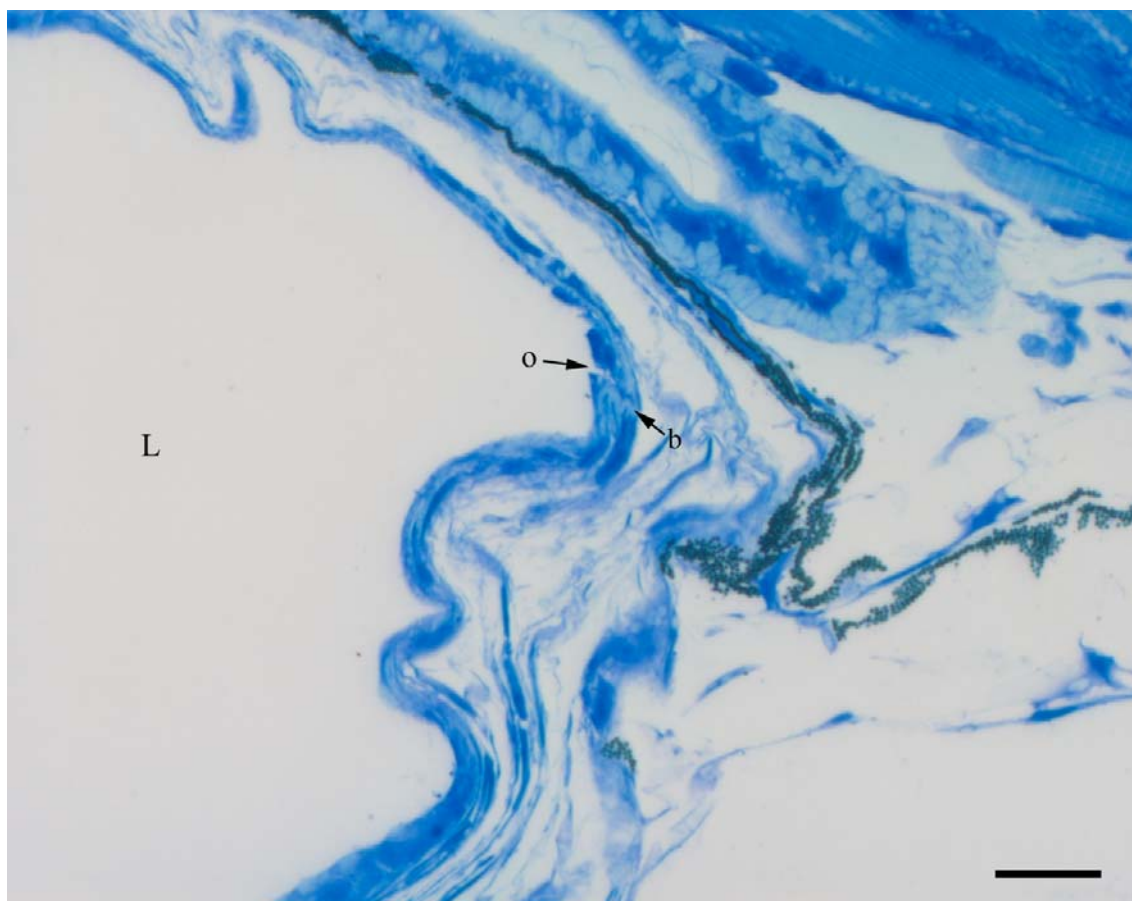
Figur 19: Svømmeblære fra dissekerte scanningpreparat, 6 dager etter klekking. **a)** Stilken går framleis tydeleg ut frå fortarmen etter at svømmeblæra er fylt. Målestokken er 25 $\mu$ m. **b)** Detaljbilete av overgangen frå fortarm til stilk. Klumpete celler ligg rundt stilken i dette området som på tidlegare stadier. Målestokken er 15  $\mu$ m. k: stilken, m: fortarm, o: overgang, Sb: svømmeblære, Sp: spiserør.



Figur 20: Den proksimale delen av stilken etter den første fyllinga, 8 dagar etter klekking. Støttecellene (s) er lysare og har mindre og tette kjerner. Dei epiteloide cellene (e) i stilken liknar tidlegare stadier, og overgangen frå fortarmen er tydeleg. Metacrylatinnstøpt vev, 2 $\mu$ m tjukt snitt. Målestokken er 100  $\mu$ m. m: fortarmen, s: støtteceller, e: epitel, Sb: svømmeblæra.

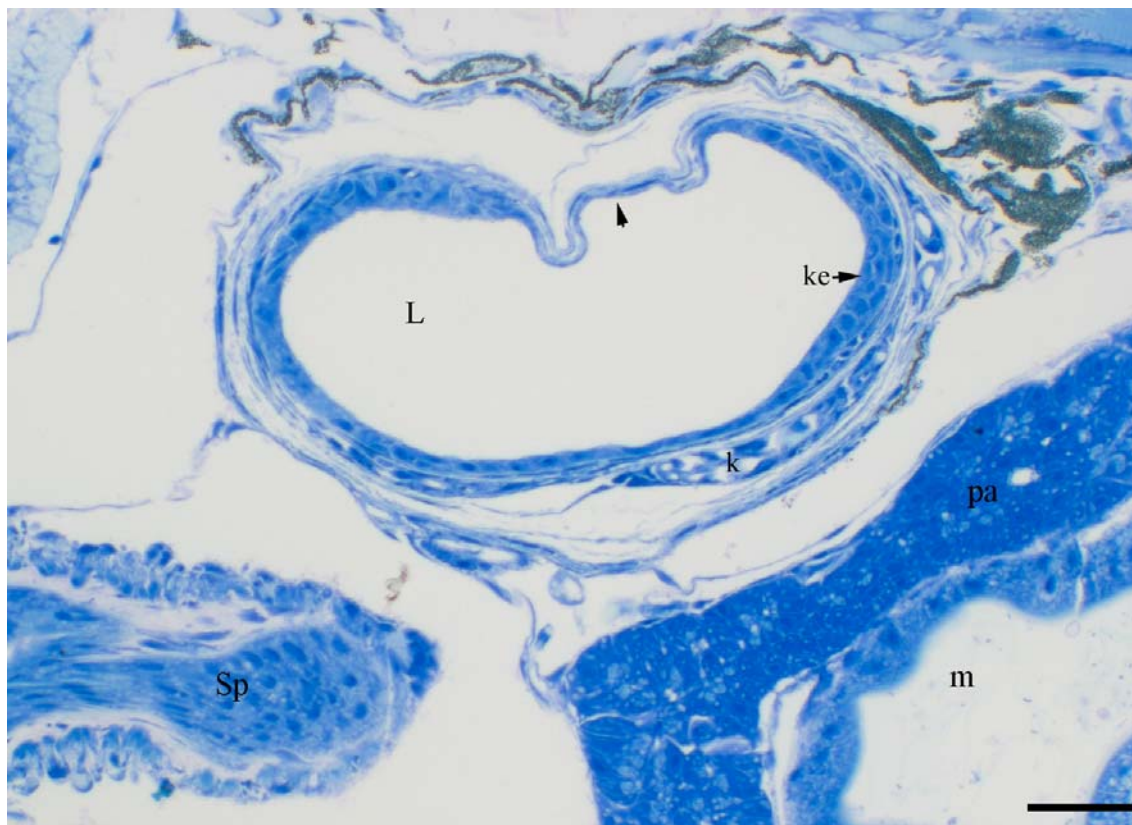


Figur 21: Horisontalsnitt av proksimal del av stilken etter at svømmeblæra er fylt, 8 dagar etter klekking. Støtteceller lik dei observert ved oppblåsing ligg inn mot basalmembranen (b). Dei har mange utløparar og loberte, tette kjerner (k). Skalk av slike celler syner at dei er svært folda i alle retningar. Epitelcellene (e) ligg tett saman, og det er ikkje noko teikn til lumen i stilken. Eponinnstøpt vev, 0,05  $\mu\text{m}$  tjukt snitt. Målestokken er 5 $\mu\text{m}$ . b: basalmembran, ekj: epitelcellekjerne, stjerne: støtteceller.



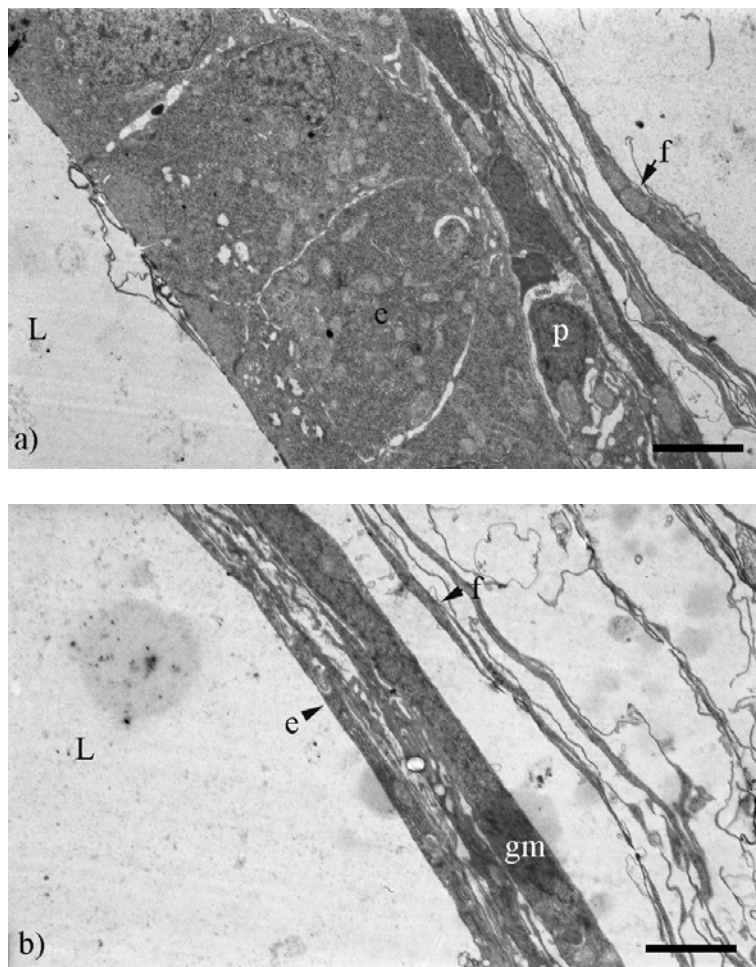
Figur 22: Sagittalsnitt av den distale delen av stilken etter første fylling, 9 dager etter klekking. Ved overgangen til svømmeblæra (o) er stilken svært liten og den kan kjennast att på den lysere basalmembranen (b) som omringer eit par epitelceller. Epitelet i stilken går over i plateepitel i svømmeblæra. Metacrylatinnstøpt vev, 2  $\mu\text{m}$  tjukt snitt. Målestokken er 100  $\mu\text{m}$ . b: basalmembran, L: lumen i svømmeblæra, o: overgangen frå stilk til svømmeblære.



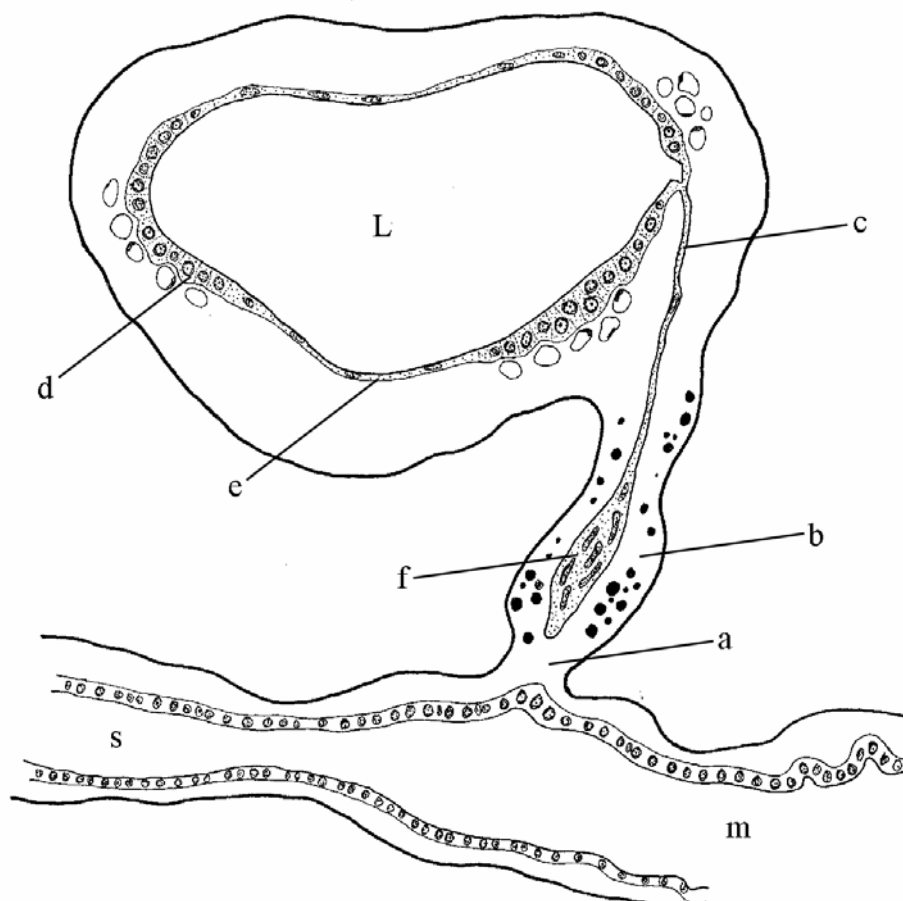


Figur 23: Svømmeblæra etter den første fyllinga, 7 dagar etter klekking. Dorsalt er epitelet gått over til plateepitel (pil). Det kraniale og kaudale epitelet er høgast, medan det ventrale epitelet er ein mellomting. Svømmeblæra er utvida og har ei meir ellipsoid form. Blodkara (k) er samla under det høgaste epitelet, og den andre grupperinga ligg i bindevevslaget kaudalt og ventralt. Metcrylatinnstøpt vev, 2 $\mu$ m. tjukt snitt. Målestokken er 200  $\mu$ m. L: lumen, pa: pancreas, m: fortarm, Sp: spiserør, pil: tynt epitel, k: kapillærer, ke: kubisk epitel.

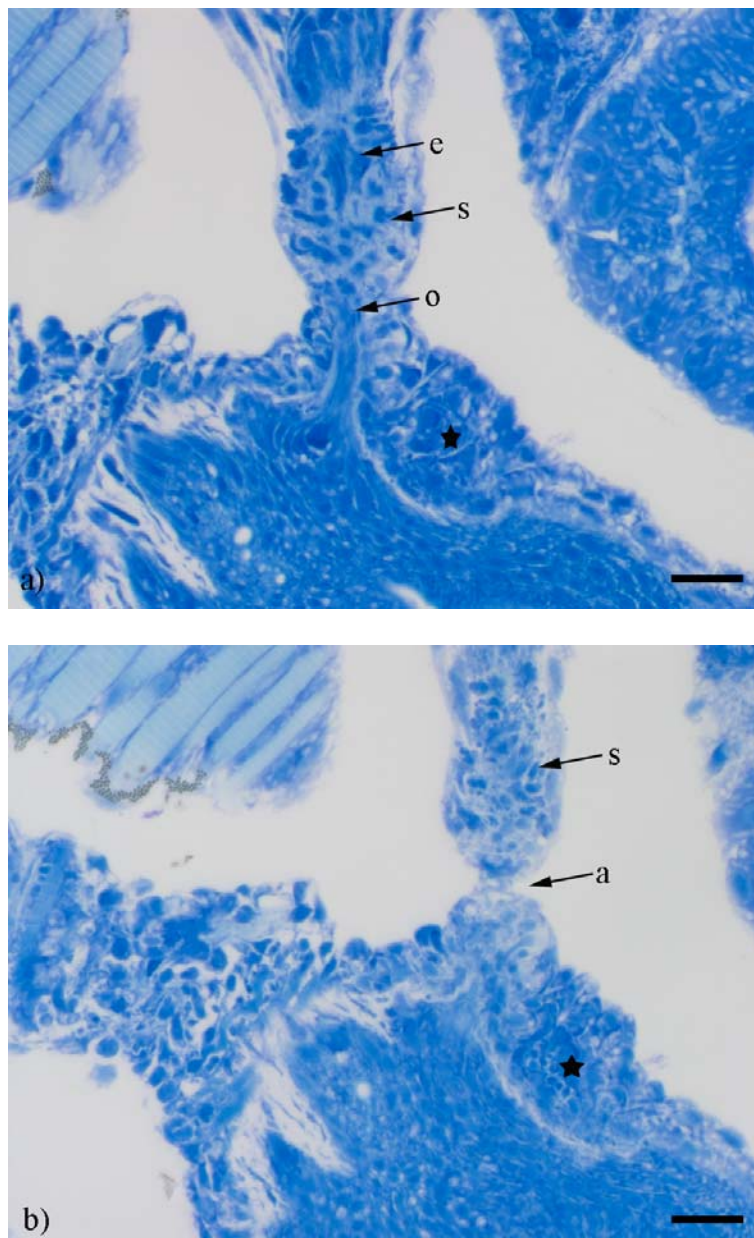




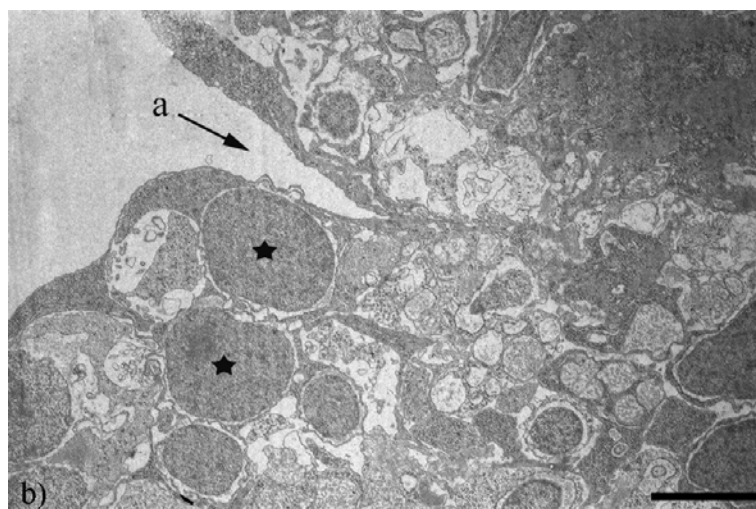
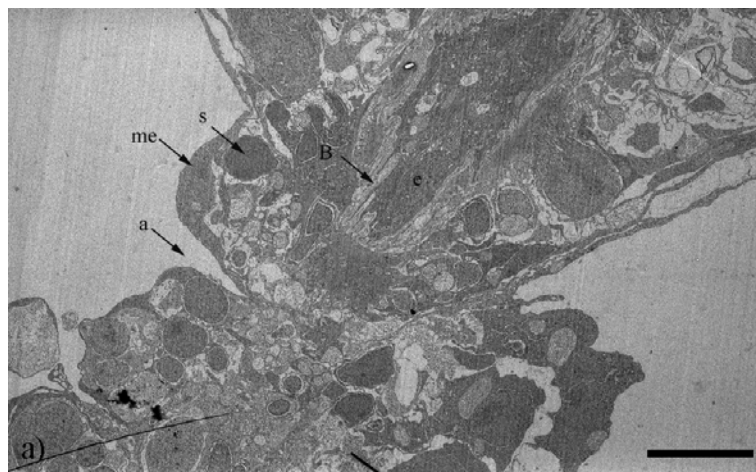
Figur 24: Epitel i svømmeblæra etter den første fyllinga, 8 dagar etter klekking. **a)** Høgt epitel i svømmeblæra. Cellene har mange mitokondrier og basale eller sentrale kjerner. Blodkar støtta opp av pericytter (p) ligg direkte under epitelcellene. Målestokken er 2,6  $\mu\text{m}$ . **b)** Tynt epitel dorsalt i svømmeblæra. Under epitelcellene ligg eit lag glatt muskulatur. Målestokken er 2  $\mu\text{m}$ . Begge bileta syner eponinnstøpt vev, 0,05  $\mu\text{m}$  tjukke snitt. L: lumen, e: epitelcelle, f: fibroblast, gm: glatt muskulatur, p: pericytt.



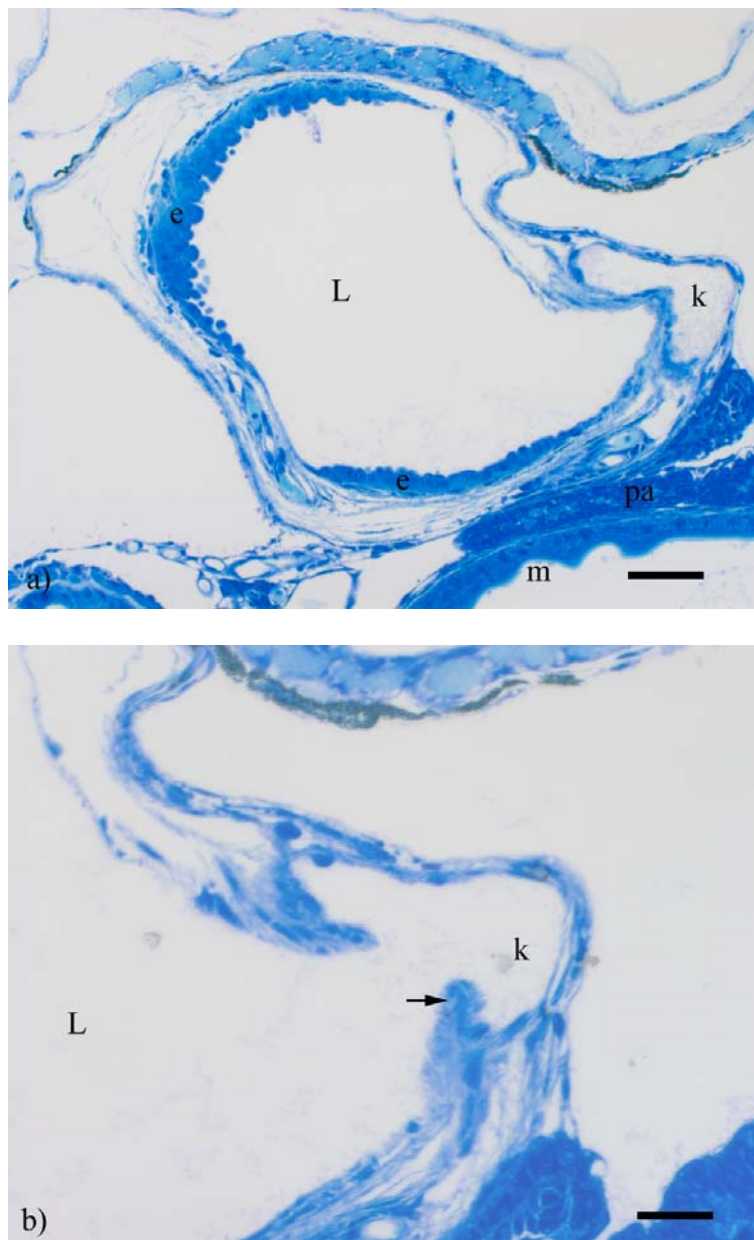
Figur 25: Avsnurping av stilken (10-15 dagar etter klekking). I denne perioden mista ein kontakta mellom fortarm og svømmeblære. Det indre laget (f) vart avsnurpa før støttecellene (a). Støttecellene hadde apoptotiske kjerner (b). Ved overgangen til svømmeblæra var stilken tynnere enn tidlegare (c), og fibroblastkjernene i bindevevslaget mindre tydelege. Dei kubiske områda i svømmeblæreepitlet vart meir framtrédande (d). Bindevevslaget var uendra frå førre stadie, og er difor ikkje illustrert her. a: avsnurping av det indre laget, b: apoptotiske støtteceller, c: tynt tynt område av stilken, d: tjukt epitel, e: tynt epitel, f: dei epiteloide cellene i stilken, L: lumen i svømmeblæra, s: spiserør, m: fortarm. Illustrasjonen bygg på transversal- og saggital-snitt både i lysmikroskop, TEM og SEM. Teikna av H. Kryvi.



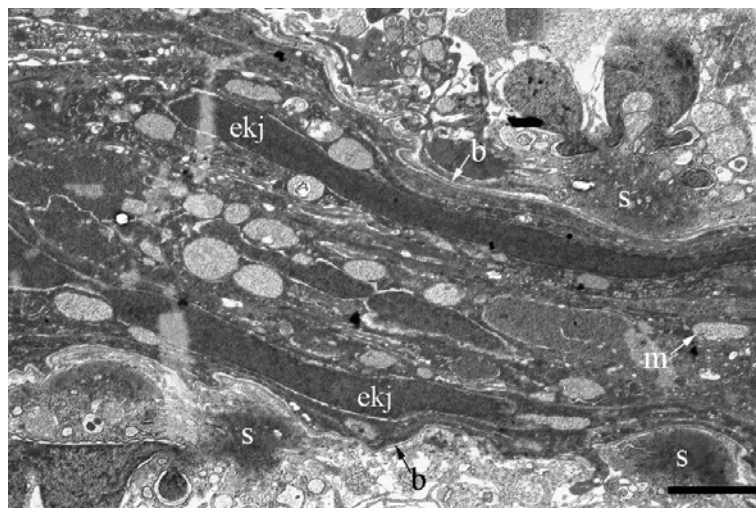
Figur 26: Sagittalsnitt av den proksimale delen av stilken 10 dagar etter klekking. **a)** Sagittalsnitt gjennom sentrum av stilken syner overgangen frå fortarmen. Det indre laget er framleis i kontakt med fortarmen. Støttecellene (s) rundt stilken har eit apoptotisk preg, medan dei som ligg ved fortarmen ikkje har det (stjerne). **b)** Lateralt i stilken ser ein at støttecellene, og stilken, er i ferd med å snøre seg av (a). Begge bileta er metacrylatinnstøypt vev, 2µm tjukke snitt. Målestokken på begge er 100 µm. a: avsnøring, e: epitelceller, o: overgang frå fortarm, s: støtteceller, stjerne: støtteceller utan apoptotiske teikn.



Figur 27: Avsnøring av den proksimale delen sett i TEM, 11 dager etter klekking. **a)** Mesenteriet følger inn i avsnøringa. Støttecellene er uryddige, og ein kan sjå støttecellene med apoptotiske kjerner og svært folda cellekropp. Målestokken er  $5,5\ \mu\text{m}$  **b)** Detaljbilete av avsnøringa. Uorganisert vev utgjer støttecellelaget. Apoptotiske kjerner er det mange av (stjerne). Målestokken er  $2\ \mu\text{m}$ . Begge er eponinnstøyppt vev,  $0,05\ \mu\text{m}$  tjukke sagittalsnitt. a: avsnurping, me: mesenteriet, B: basalmembran, e: epiteliod celle, s: støttecelle, stjerne: apoptotiske cellekjerner.

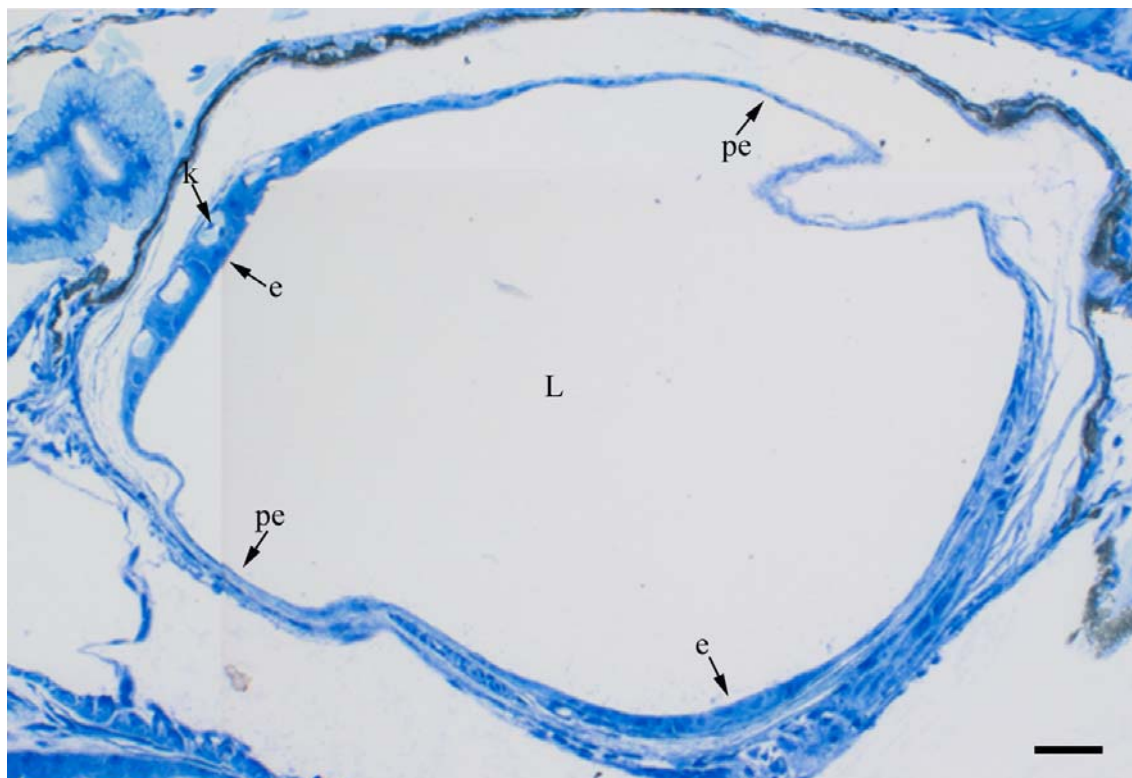


Figur 28: Sagittalsnitt av svømmeblære med utspilt lumen i stilken, 15 dager etter klekking. **a)** Epitelet i svømmeblæra er høgt kranialt og ventralt (e). Lumen i stilken er utspilt (k), og debris fyller lumen. Målestokken er 250  $\mu\text{m}$ . **b)** Detaljbilete av overgangen mellom stilk og svømmeblære. Dei epiteoide cellene i stilken er låge, og går saman med epitelet i svømmeblæra. Det kan minne om klaffar (pil) i overgangen mellom svømmeblære og stilk, det er ingen muskulatur i desse. Målestokken er 100  $\mu\text{m}$ . Begge er metacrylatinntøyst vev, 2 $\mu\text{m}$  tjukke. L: lumen, e: epitel, k: stilk, m: fortarm, pa: pancreas

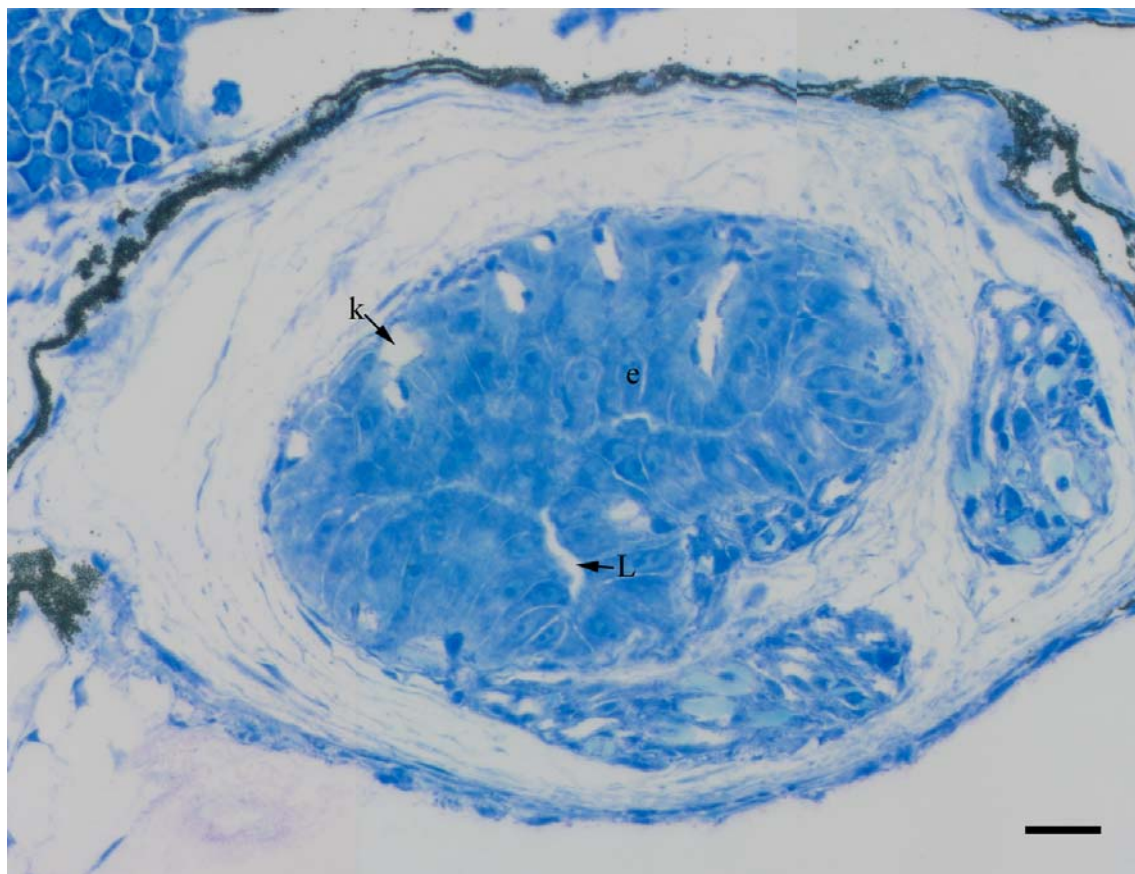


Figur 29: Sagittalsnitt av stilken 11 dager etter klekking. Dette er i den distale delen av stilken rett etter overgangen fra den proksimale delen. Basalmembranen er tydeleg på begge sider, og støtteceller med apoptotiske trekk ligg rundt. Epitelet har lange kjerner som er orientert på langs av stilken. Bilete av eponinnstøpt vev, 0,05  $\mu\text{m}$  tjukt snitt. Målestokken er 2,5  $\mu\text{m}$ .  
b: basalmembran, ekj: epitelcellekjerne, s: støttecelle, m: mitokondrie.



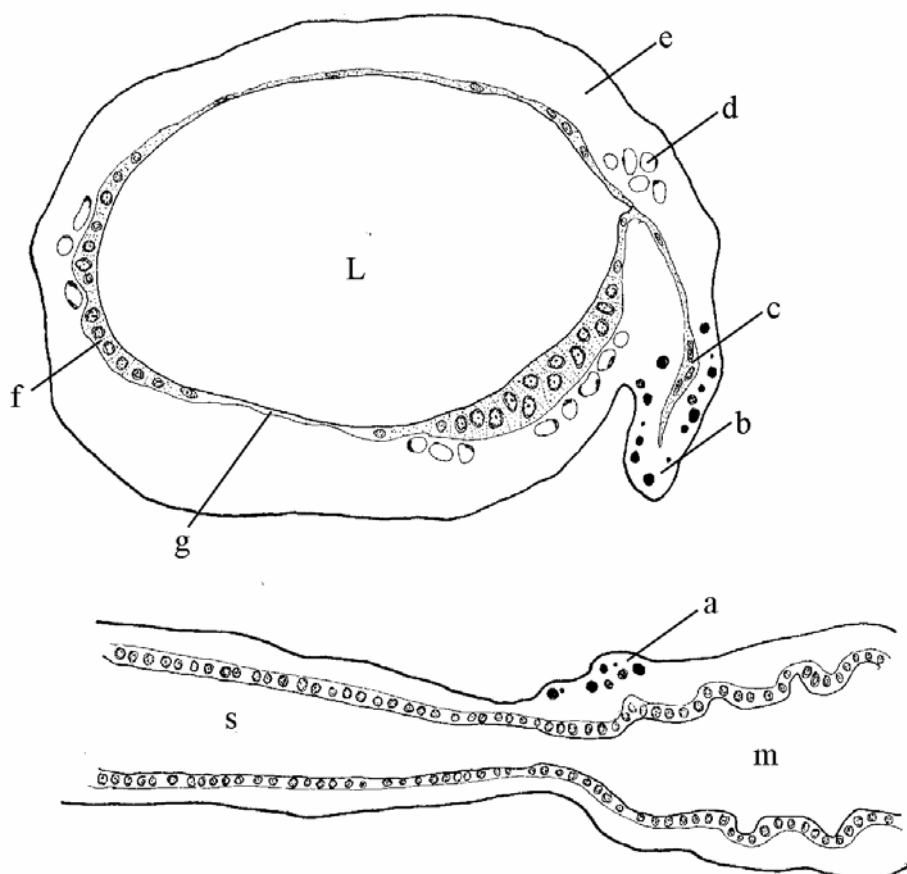


Figur 30: Sagittalsnitt av blæra ved tidleg degenerering av stilk, 15 dagar etter klekking. Det karniale og ventro-kaudale epitelet har kubisk form (e), medan ein har plateepitel dorsalt og ventro-kranialt (pe). Fleire kapillærer (k) ligg under det kubiske epitelet, særleg kranialt. Metacrylatinnstøpt vev, 2 $\mu$ m tjukt snitt. Målestokken er 150  $\mu$ m. L: lumen, k: kapillær, e: epitel, tjukt, pe: plateepitel.

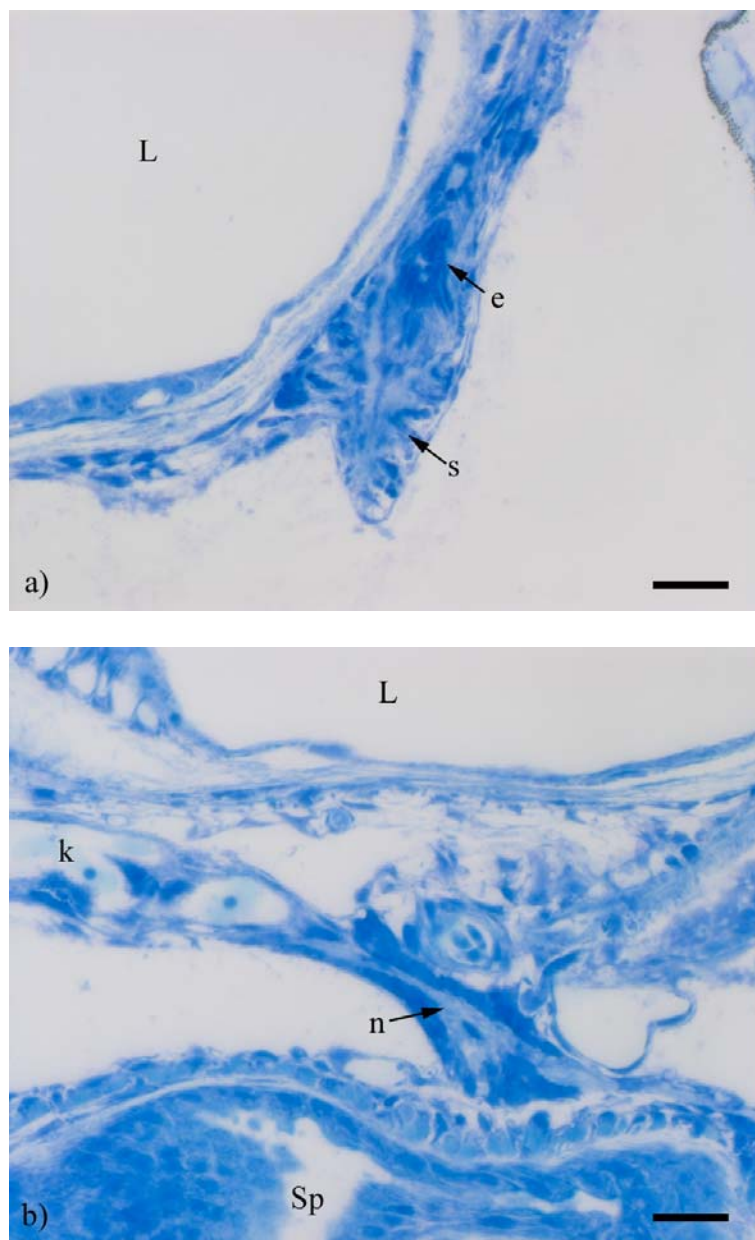


Figur 31: Sagittalsnitt av svømmeblære 14 dager etter klekking. Epitelcellene (e) er utvida og bukker seg inn i lumen (L). Kapillærer (k) går på langs inn mellom epitelcellene. Metacrylatinnstøpt vev, 2 $\mu$ m tjukt snitt. Målestokk er 100  $\mu$ m. e: epitelcelle, k: kapillær, L: lumen.

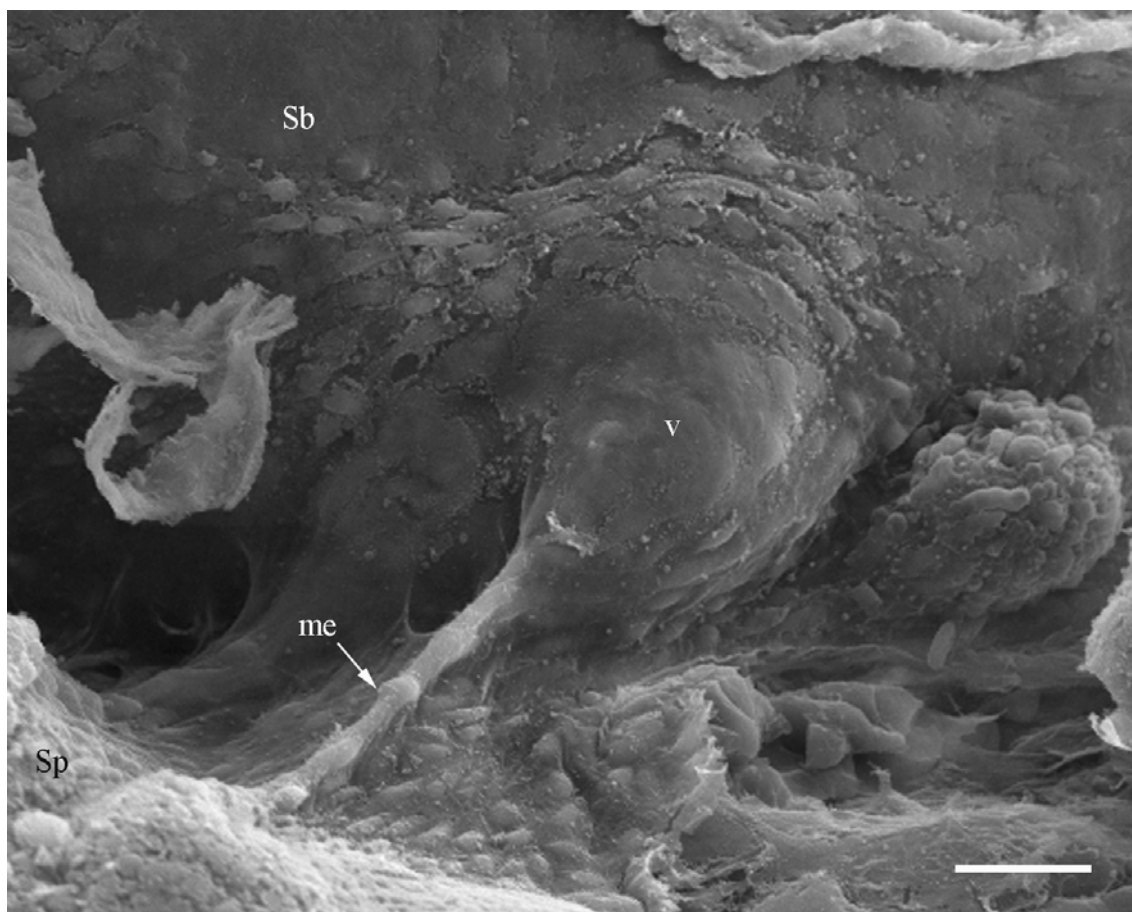




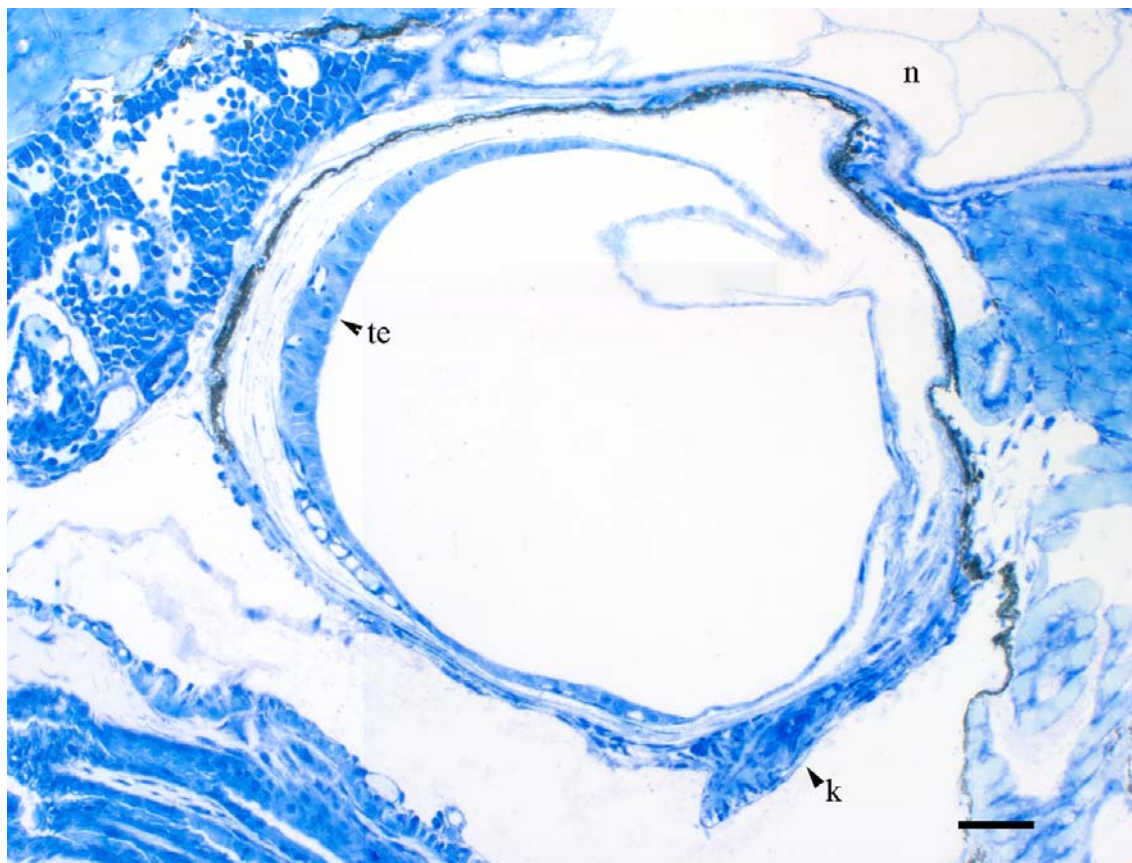
Figur 32: Svømmeblæra og stilken etter avsnurping (16-17 dagar etter klekking). Eit vedheng stod att av stilken (b, c) og berre mesenteriet gjekk ned til fortarmen. Nede ved fortarmen stod det att var det støtteceller med apoptotiske kjerner (a) der overgangen hadde vore. Epitelet i svømmeblæra hadde områder med kubisk epitel (f) kranialt og kaudalt. Kapillærene var organisert som tidlegare (d). Bindevevslaget er ikkje illustrert her fordi det ikkje endra seg frå førre stadie (e). a: støtteceller ved fortarmen, b: støtteceller i vedhenget, c: restar av det indre laget i stilken, d: kapillærer, e: bindevevslag, f: tjukt epitel, g: tynt epitel, L: lumen i svømmeblæra, s: spiserør, m: fortarm. Illustrasjonen bygg på transversal- og saggital-snitt både i lysmikroskop, TEM og SEM. Teikna av H. Kryvi.



Figur 33: Sagittalsnitt av restar etter stilken, 16 dagar etter klekking. **a)** Eit vedheng står att av den proksimale delen. Det er ingen teikn til at den har samband med magesekken. Støttecellene (s) har apoptotiske trekk og dei epiteoide cellene (e) har ein tendens til å ha utydelege cellegrensar. Mesenteriet ligg rundt vedhengen. Målestokken er 100 $\mu$ m. **b)** Nerve (n) og blodkar (k) mellom fortarm og svømmeblære. Målestokken er 100  $\mu$ m. Begge er metacrylatinnstøppt vev, 2  $\mu$ m tjukke snitt. L: lumen, e: epiteoide celler, s: støttecelle, k: kapillær, n: nerve, Sp: spiserør.



Figur 34: Scanningpreparat av dissekert fisk, 16 dagar etter klekking. Stilken er eit vedheng (v) ved svømmeblæra (Sb). Ein ser berre mesenteriet (me) som går rundt organa og mellom fordøyelseskanal og svømmeblære. Målestokken er 25  $\mu$ m. Me: mesenteriet, v: vedheng, Sb: svømmeblæra, Sp: spiserøret.



Figur 35: Sagittalsnitt av svømmeblæra 16 dagar etter klekking (same fisk som figur 28). Epitelet er tydeleg høgare kranialt (te). På dette snittet er òg det ventrale litt tjukkare enn resten av epitelet som er plateepitel. Stilken er redusert til eit vedheng ventralt for blæra (k). Metacrylatinnstøpt vev, 2  $\mu\text{m}$  tjukt snitt. Målestokken er 200  $\mu\text{m}$ . k: rest av stilken, te: tjukt epitel, n: notochorden.

## Diskusjon

### **Samanhengen mellom fordøyelseskanal og svømmeblære**

I arbeidet som her ligg føre, var det ikkje mogleg å observere lumen i stilken før fylling. Ved fylling av svømmeblæra var det lumen i ampullen og heilt distalt ved overgangen til svømmeblæra. Dersom stilken har ein gjennomgåande funksjonell kanal, er det mogleg at den er open i eit kort tidsrom, for so å stenge umiddelbart etter fylling. Vidare kan det tenkast at ein då ikkje vil kunne påvise ein open kanal ved metodane og prøvetakingsintervallet nytta her. Fysostome fisk har muskulatur i kanalveggen (Morris og Albright, 1979). Eventuell muskulatur i stilken hjå torsk kan trekke seg saman ved fiksering, noko som kan gjere det vanskeleg å påvise eit lumen. Ei slik samantrekking kan òg forklare den sterkt folda basalmembranen. På den andre sida vart det ikkje identifisert muskelceller i stilken i arbeidet som her ligg føre. Alternativt er det mogleg at stilken ikkje har eit kontinuerleg lumen på noko stadie. Det er vist at *Solea solea* L. har ein delvis dilatert kanal ved fylling som ikkje er funksjonell (Boulich og Gabaudan, 1991). Forbigåande fysostome fisk kan ha ein stilk med gjennomgåande lumen frå fordøyelseskanalen til svømmeblæra som ikkje berre er open i eit lite tidsrom (Schwarz, 1971; Trotter et al, 2004). Ut i frå funna gjort i arbeidet som her ligg føre, er det truleg at torsk ikkje har ein funksjonell kanal gjennom stilken, sjølv om dette ikkje er vist med sikkerheit.

### **Organisering av det indre laget i stilken skil seg frå andre artar**

Dei epiteloide cellene som strekte seg på langs i midten av stilken med eit fortjukka område i ampullen, blei ved overgangen til svømmeblæreepitelet plateforma. Ultrastrukturelt var dette eit uryddig epitel som stod på ein folda basalmembran. Dette skil seg ut frå *Melanogrammus aeglefinnus* der epitelet i kanalen danner eit syncytium utan tydeleg basalmembran ved fylling av svømmeblæra (Schwarz, 1971). Andre artar som til dømes *Micropterus salmonides salmonides* og *Latris lineata* har kanaler med kubiske epitelceller (Johnston, 1953; Goodsell, 1996). Dette skil seg klart frå organiseringa av dei epiteloide cellene i stilken hjå torsk.

### **Det kubiske svømmeblæreepitelet er truleg gasskjertelvev**

Kubisk epitel samla seg i hovudsak i eit område kranialt i svømmeblæra mot slutten av den undersøkte perioden. Desse hadde ikkje underliggjande muskulatur, men eit kapillærnettverk som trengte seg inn mellom epitelcellene. Kapillærnettverket var tilstades allereie før fylling. I arbeidet som her ligg føre, vart det funne at cellene hadde endoplasmatisk retikulum, ein del mitokondrier, og store kjerner med mykje eukromatin. Noko som er i samsvar med det Morrison (1993) beskriv som gassekrerande epitelceller hjå torskelarvar. Copeland (1969) skriv at gasskjertelceller er kubiske til flate celler. Kubiske celler kranialt i svømmeblæreveggen blir beskrive som gasskjertelepitel hjå ein rekke artar, både forbigåande fysostome som snappar luft (Trotter et al, 2004; Boulhic og Gabaudan, 1991; Marty et al, 1995; Govoni og Hoss, 2001), og artar med indre gassekrering ved første fylling (Doroshev og Cornacchia, 1979; Doroshev et al, 1981; Schwarz, 1971). I arbeidet som her ligg føre, er det difor truleg at dei kubiske cellene kranialt i svømmeblæra hjå torsk er gasskjertelceller. Dette kan tyde på at torskelarvar har eit fullstendig utvikla gassekrerande apparat allereie før fylling.

### **Ovalen er ikkje utvikla i den undersøkte perioden**

Hjå vaksne individ ligg ovalen dorso-kaudalt og er vaskularisert frå forgreiningar av *arteria coeliaca* (Steen, 1970). Ein tynn svømmeblærevegg gjer det lett for gass å bli absorbert og den eksponerte overflata av ovalen kan regulerast ved at ein tynn transparent membran kan trekkast over ved hjelp av glatt muskulatur (Morrison, 1987). I følge Steen (1970) degenererer den proksimale regionen av stilken, medan den distale regionen vert gjort om til ovalen hjå fleire artar, men det var ingen teikn til at dette var tilfellet hjå torsk, kor eit gassabsorberande område i svømmeblæra var ikkje vart påvist i den undersøkte perioden. Frå fylling var det dorsale epitelet tynt, men det var ikkje spesielt godt vaskularisert, og det var ingen teikn til ein membran tilsvarande den hjå vaksne individ. Det er òg lite truleg at den distale regionen av stilken er forgjengaren til ovalen. Sjølv om ein i slutten av den undersøkte perioden endå kan sjå restar av stilken, og den er plassert dorso-kaudalt, er den svært redusert. Det er mogleg at det dorsale, tynne epitelet vil kunne utvikle seg til ovalen. Det vart i arbeidet som her ligg føre, observert muskulatur under det plateforma epitelet ved 8 dagar etter klekking, og dette kan vere ein forløpar for muskulaturen som regulerer foramen ovale hjå vaksne individ.

### **Den første fyllinga av svømmeblæra skjer samstundes med overgangen til levande føde**

I dette arbeidet blei forsøksfiskane fôra frå dag 3 etter klekking. Prøvetakinga starta 4 dagar etter klekking, og då hadde alle dei undersøkte larvane mat i fortarmen. Nyklekte larvar får næring frå plommesekken, og etter at den går tom, vil dei gå over til eksogen føde. Plommesekken gir dei også nøytral oppdrift, og plommesekkklarvar flyt fritt i vatnet. Denne oppdrifta vil dei miste når plommesekken går tom og eigenvekta blir større. Hjø torsk er overgangen frå endogen til eksogen føde, ein glidande overgang (Kjørsvik et al, 1991), og restar av plommesekken var tilstades fleire dagar etter første matopptak. I arbeidet som her ligg føre, blei den første fyllinga av svømmeblæra observert 5 – 6 dagar etter klekking. Dette er i samsvar med Timeyko (1986) som rapporterer at svømmeblæra hjå torsk fyller seg 5 dagar etter klekking. Det er kjend frå fleire artar at den første fyllinga av svømmeblæra skjer ved overgangen til eksogen føde (Doroshev et al., 1981, Schwarz, 1971, Battaglione og Talbot, 1990; Chatain, 1986; Kitajima et al, 1993), og det er lite truleg at torsk skil seg ikkje frå andre pelagiske fiskeartar på dette punktet.

### **Stilken er ikkje i kontakt med fortarmen 16 dagar etter klekking**

Stilken var ikkje lenger i kontakt med fortarmen 16 dagar etter klekking. Støttecellene synte teikn til programert celledød (apoptose) ved dei var svært folda med lange utløparar, noko som kan komme av at cellekroppen hadde trekt seg saman. Cellekjernene synte teikn til pyknose og karyorheksis allereie ved første fylling. Apoptotiske trekk vart meir utprega utover i perioden i samanheng med avsnøringa av stilken. Det var ikkje observert tydelege apoptotiske trekk av dei epiteloide cellene i stilken. Dei hadde etter kvart mindre tydelege cellegrenser, og det indre laget var tynt før avsnøring. Etter at kontakta mellom fortarm og svømmeblære var broten i den proksimale delen, stod det att ein rest som eit vedheng, og denne vil mest sannsynleg degenerere i løpet av dei følgjande dagane. Desse funna er i samsvar med DeJoung (1936, referert i Dannevig og Dannevig, 1950) som fann at stilken var degenerert når torsken var 6,5 mm lang.

### **Individ med hypertrofi i svømmeblæreepitelet syner patologiske endringar**

Etter 14 dagar var det individ som skilde seg frå fleirtalet ved at dei hadde hypertroferte epitelceller som bukta seg inn og tok opp heile lumen i svømmeblæra. Blodkara var utvida og trengte seg inn mot lumen i svømmeblæra, og desse svømmeblærene likna ikkje på



ufylte svømmeblærer frå tidlegare stadier. Dette fenomenet vert hjå fleire gjenkjend som patologiske endringar i svømmeblæra, og det er ikkje mogleg å fylle den med gass etter dette tidspunktet (Takashima et. al 1980; Trotter et al, 2001; Zilberg et al, 2004). Morrison (1993) beskriv derimot dette som normalutvikling hjå torskelarvar frå 17 dagar etter klekking. Resultata i arbeidet som her ligg føre, peiker derimot i den retning av at torskelarvar, som ikkje fyller svømmeblæra, mest sannsynleg gjennomgår ein liknande patologisk prosess funne hjå andre fiskelarvar. Resultata tyder òg på at dersom svømmeblæra ikkje vert fylt før eit bestemt tidspunkt i løpet av dei første 14 dagane etter klekking, vil ho ikkje kunne fyllast seinere.

### **Mekanismen for første fylling av svømmeblæra**

Mekanismen for fylling av svømmeblæra hjå torskelarvar er ikkje sikkert klarlagt. Det har likevel vore brei semje om at torskelarvar er utstyrt med ein kanal, og at dei er i stand til å snappe luft i overflata. Resultatet i arbeidet som her ligg føre, viser at larvane har ein forbindelse mellom fortarm og svømmeblære, men at det ikkje er tydeleg om denne kan vere funksjonell og luft kan passere. Apoptotiske trekk før fylling, samt at det ikkje vart observert lumen i heile kanalen kan tyde på at ein funksjonell kanal manglar. Stilken kan berre vere ein lukka cellestreng frå fordøyelseskanalen som distalt poser seg ut og danner svømmeblæra. Resultata i arbeidet som her ligg føre, kan tyde på at torskelarvar er i stand til indre gassekresjon på det tidspunktet då fyllinga skjer. Torskelarvane vart ikkje observert i kara ved prøvetaking til dette arbeidet, og det er difor usikkert om dei i det heile var i overflata for å snappe luft. Det er rapportert at torskelarvar i naturen i tida rundt første matopptak, for det meste er på 10-20 meters djup gjennom heile døgeret. Den minste form for omvelting i vatnet vil spreie larvar og egg gjennom heile vassøyla utan at dei har kontrollert vertikalvandring (Ellertsen et al, 1984; Lough og Potter, 1993). Dette kan tyde på at dei ikkje snapper luft i naturen. Metodane nytta i arbeidet som her ligg føre gav ikkje noko direkte svar på korleis torsken initielt fyller svømmeblæra, men resultata kan likevel tyde på at stilken har ein mindre funksjon og at gassekrerande vev spelar ei større rolle ved første fylling.

### Utspilt lumen i stilken kan komme av overfylt svømmeblære

I den undersøkte perioden var det nokre individ som skilde seg frå resten ved at stilken hadde eit utspilt lumen og debris. Stilkar hjå desse individa var ikkje i same degenerative stadie som individ utan utspilt lumen, og ved 15 dagar etter klekking var stilkar med utspilt lumen framleis i kontakt med fortarmen. Det var ingen teikn til avsnøring i den proksimale regionen, og lite apoptotiske trekk. Det kan tenkast at eit overskot av gass i svømmeblæra vil kunne bli pressa ut i stilken, og føre til at den blir utspilt. Resultata i arbeidet som her ligg føre indikerer at ein slik tilstand vil føre til at stilken ikkje degenerer som normalt, og at det gjenspeiler overfylte svømmeblærer. Det er usikkert kva dette vil ha å seie for vidare utvikling ettersom forsøksperioden ikkje varte lenger enn til normalt utvikla individ hadde degenerert stilk. Det har tidlegare vore foreslått at overfylte svømmeblærer kan føre til samantrykt notochord (Totland et al, 2004), men det vart ikkje observert nokon samanheng mellom utspilt lumen i stilken og samantrykt notochord i arbeidet som her ligg føre.

### Konklusjonar

- Svømmeblæra fyller seg første gongen frå dag 5 - 6 etter klekking.
- Det er apoptose i stilken allereie ved første fylling, og etter 16 dagar er ikkje svømmeblæra lenger i kontakt med fordøyelseskanalen.
- Kraniale, kubiske epitelceller i svømmeblæra er truleg forgjengaren til gasskjertelen.
- Innan 14 dagar etter klekking syner epitelet i svømmeblæra teikn til hypertrofi, noko som indikerer patologiske endringar og eit *point of no return*.
- Utspiling av stilken etter første fylling kan vere teikn på overfylt svømmeblære.
- Resultata i dette arbeidet kan tolkast dit at stilken ikkje har ein funksjonell kanal i fyllingsmekanismen, og at første fylling skjer ved gassekresjon frå gasskjertelvev.

**Vidare arbeid**

- Dersom stilken ikkje er funksjonell, treng ikkje larven tilgang til overflata. Eit forsøk der grupper med og utan tilgang til overflata blir samanlikna vil kunne bevise om stilken har ein funksjon ved første fylling eller ikkje.
- Det er hjå fleire artar beskrive at svømmeblæra dilaterer (bli væskefylt) før den blir gassfylt. Dette er ikkje undersøkt hjå torskelarvar, og utgreiing av dette vil kunne gje utvida forståing av fyllingsmekanismen.
- Vidare undersøking av ultrastrukturen både i stilk og gasskjertelvev vil kunne bidra til å forstå fyllingsmekanismen betre.
- Årsaka til overfylte svømmeblærer er ikkje funnen. Det er mogleg at ugunstige miljøforhold forstyrrer fyllinga av svømmeblæra. Det vil difor kunne vere interessant å finne ut kva ulike miljøparametrar har å seie for fylling av svømmeblæra hjå torsk.
- Ettersom det er apoptose i stilken gjennom heile den undersøkte perioden, kan det vere interessant å kartlegge tidlegare stadier for å finne ut kva celletyper støttecellene eigentleg er og finne ut når apoptosen starter.

## Referanser

**Battaglione SC og Talbot RB** (1990) Initial swim bladder inflation in intensively reared Australian Bass larvae, *Macquaria novemaculeata* (Steindachner) (Perciformes: Percichthyidae). *Aquaculture*. **86**:431-442

**Boulhic M og Gabaudan J** (1991) Histological study of the organogenesis of the digestive system and swimbladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus 1758). *Aquaculture*. **102**:373–396

**Chatain B** (1986) The swimbladder in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus auratus*. I. Morphological aspects of development. *Aquaculture*. **53**:303-311

**Copeland ED** (1969) Fine structural study of gas secretion in the physoclist swim bladder of *Fundulus heteroclitus* and *Gadus callaris* and in the euphysoclist swim bladder of *Opanus tau*. *Z. zellforsch.* **93**:305-331

**Dannevig A og Dannevig G** (1950) Factors affecting the survival of fish larvae. *J. Cons. Int. Explor. Mer* **16**(2):211-215

**Doroshev SI og Cornacchia JW** (1979) Initial swimbladder inflation in the larvae of *Tilapia mossambica* (Peters) and *Morone saxatilis* (Walabum). *Aquaculture*. **16**:57-66

**Doroshev SI, Cornacchia JW og Hogan K** (1981) Initial swim bladder inflation in the larvae of physoclistous fishes and its importance for larvae culture. *Rapp. P.-v. R  un. Cons. Int. Eplor. Mer*. **178**:495-500

**Ellertsen B, Fossum P, Solemdal P, Sundby S og Tilseth S** (1984) A case study of the distribution of cod larvae and availability of prey organisms in relation to physical processes in Lofoten. I Dahl E et al. The propagation of cod *Gadus morhua* L. *Fl  devigen rapp.* **1**: 453-477

**Fänge R** (1983) Gas exchange in fish swim bladder. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. Springer-Verlag. **97**:112-158

**Goodsell A, Wikeley D og Searle L** (1996) Histological Investigation of swim-bladder morphology and inflation in cultured larval striped trumpeter (*Latris lineata*) (Teleostei, Latridae). Mar. Fresh. Res. **47**:251-254

**Govoni JJ og Hoss DE** (2001) Comparison of the development of the swimbladder of *Brevoortia tyrannus* (Clupeidae) and *Leiostomus xanthurus* (Ciaenidae). Copeia. **2**:430-442

**Johnston, PM** (1953) The embryonic development of the swim bladder of the Largemouth Black Bass *Micropterus salmonides salmonides* (Lacepede). Jour. Morph. **93**: 45-67

**Kitajima C, Yamane Y, Matsui S, Kihara Y og Furuichi M** (1993) Ontogenic change in buoyancy in the early stage of Red Sea Bream. Nippon Suisan Gakkaishi. **59**(2):209-216

**Kjørsvik E, van der Meeren T, Kryvi H, Arnfinnson J og Kvenseth PG** (1991) Early development of the digestive tract og cod larvae (*Gadus morhua*)L., during start-feeding and starvation. Journ. Fish. Biol. **38**:1-15

**Lough GR og Potter DC** (1993) Vertical distribution patterns and diel migrations of larval and juvenile Haddock *Melanogrammus aeglefinnus* and Atlantic cod *Gadus morhua* on Georges Bank. Fish. Bull. Fish. Wild. Serv. **91**(2): 281-303

**Marty GD, Hinton DE og Summerfelt** (1995) Histopathology of swimbladder noninflation in walleye (*Stizosteidon vitreum*) larvae: role of development and inflation. Aquaculture. **138**: 35-48

**Morris SM og Albright JT** (1979) Ultrastructure of the swim bladder of the Goldfish, *Carassius auratus*. Cell Tissue Res. **198**:105-117

**Morrison CM** (1987) Histology of the Atlantic cod, *Gadus morhua*; an Atlas. Part one: Digestive tract and associated organs. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.

**Morrison CM** (1993) Histology of the Atlantic cod, *Gadus morhua*: An atlas. Part four: Eleutheroembryo and larva. Ottawa: Dept. of fisheries and oceans

**Philpott DE** (1966) A rapid method for staining plastic-embedded tissues for light microscope. Sci. Instrum. **11**:11-12

**Reynolds ES** (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. **17**:208–212

**Schwarz A** (1970) Swimbladder development and function in the Haddock, *Melanogrammus aeglefinnus* L. Biol. Bull. **141**:176-188

**Steen B** (1970) The swim bladder as a hydrostatic organ. I Hoar WS og Randall DJ (redaktører) Fish physiology IV Academic Press, New York, NY. pp 413-443

**Takashima F, Arai Y og Nomura M** (1980) Abnormal development of the swimbladder in hatchery-reared red sea-bream, *Chrysophrys major*. J. Tokyo. Uni. Fish. **67**:67-73

**Timeyko V** (1986) The digestive system og the white sea cod *Gadus morhua marisalbi* and the lumpfish *Cyclopterus lumpus*, at different stages of ontogeny. Voprosy Ikhtiologii. **26**:103-112

**Totland G, Kryvi H og Grotmol S** (2004) Torskeyngel med ”nakkeknekk” utgjør et av hovedproblemene i intensivt oppdrett i dag. Havbruksrapport 2004. 2.3: 57-63

**Trotter AJ, Pankhurst PM og Hart PR** (2001) Swimbladder malformation in hatchery-reared striped trumpeter *Latris lineata* (Latridae). Aquaculture. **198**:41-54

**Trotter AJ, Pankhurst PM og Battaglione SC** (2004) Morphological development of the swim bladder in hatchery-reared striped trumpeter *Latris lineata*. J. Appl. Ichthyol. **20**:395-401

**Watson MLW** (1958) Staining tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J. Biophys. Biochem. Cytol. **4**: 475–478

**Zilberg D, Ofir R, Rabinski og Diamant A** (2004) Morphological and genetic characterization of swimbladder non-inflation in angelfish *Pterophyllum scalare* (Cichlidae). Aquaculture. **230**:13-27



## Vedlegg; oppskrifter:

### FIKSATIV

#### Fikseringsvæske for teleostar:

- 300 ml PBS (fosfatbuffra sjøvatt) pH 7,2.
- 100 ml 0,2 M cacodylatbuffer pH 7,2.
- 50 ml 25 % glutaraldehyd .
- 50 ml 20 % formaldehyd frå paraformaldehyd.
- pH målt til 7,32.

#### PBS

- 8,0g NaCl.
- 0,2g KCl.
- 14,4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O.
- 2,3g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- Vert løyst i 1000 ml destillert vatn.
- pH blei justert til 7,2 med eit pH-meter.
- Oppbevart i kjøleskap ved 4 °C.

#### 0,2 M Cacodylatbuffer

- 42,8g C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>AsNaO<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O (Natrium – Dimethylarsinsäure – trihydrat).
- 9,6 ml 1,0 M HCl.
- Vert so løyst i 1000ml.
- Justert pH til 7,2.
- Oppbevart ved 4 °C.

#### 25 % Glutaraldehyd

- Ferdig frå produsent.

#### 20 % Formadlehyd

- Paraformaldehyd løyst i dest. vatn og varma opp til 80 °C.
- Tilsetting av nokre dråpar 1M NaOH til væska blir klar, avkjøl og filtrèr.

### **Osmiumtetroksid (OsO<sub>4</sub>, 1 %):**

- 1 ampull (0,1 g) osmiumtetroksid OsO<sub>4</sub>. (Merck mikroskopie KGaA, Tyskland)
- 10 ml PBS / cacodylatbuffer.

### **LYSMIKROSKOPI (metacrylatinnstøyping)**

#### **Kulzer Histo-Technik (Herau Kulzer GmbH & Co, Tyskland)**

##### Preinfiltrering

- Ein del 96 % etanol.
- Ein del Technovit 7100
- Desse to blir blanda saman og står til omrøring i 1-2 timar.

##### Infiltrering

- Ein pose herder. Bør eg ha eit betre navn på dette?
- 100ml Technovit 7100.
- Dette står og roterer i 12 timar.

##### Innstøyping

- 15 ml Technovit 7100.
- 1ml flytande herder.
- Dette vert blanda og fylt opp i former.
- Fiskane blir støyppt inn i formene, og dekt med knottar.
- Etter polymerisering, vert blokkene oppbevart lufttett.

### **FARGING**

#### Toluidinblå: (Philpott,, 1966)

- 2,0 g borax (dinatriumtetraborat – decahydrat).
- Blir løyst i 100ml dest.vatn.
- Tilsett 1,0 g toluidinblå (Merck Darmstadt ,Tyskland).

Borax blir fullstenig løyst i vatn før ein tilsett tuloidinblått.

Løsinga blir filtrert før bruk og objektglaset blir skylt med lunka vatn til overskotsfargen er vekk. Snittet/glaset blir så lufttørka.

## ELEKTRONMIKROSKOPI

### Fluka Epon (Fluka Chemie AG, Sveits)

#### Stamløysingar

##### Løysing A

- 62 ml Fluka Epon 821.
- 100ml DDSA.

##### Løysing B

- 100ml Fluka Epon 821.
- 89ml MNA.

#### Bruksløysing

- 2 deler A
- 1 del B

Løysinga vert blanda godt i magnetrører, fyller så sprøyter med epon og oppbevarer det i frysaaren. Vert teken ut ein time før bruk.

## KONTRASTFARGING

Uranylacetat farge: (Watson, 1958)

- 1g Uranylacetat.
- 50 ml aq. dest.

Uranylacetat og løysast i 50ml dest. vatn.

Grider vert lagt på dråper av fargeløysing på voksplate i 60min under lokk.

Dei vert so skylt i dest. vatn og tørka mot kant av filterpapir.

Blyhydroksyd farge: (Reynolds, 1963)

- 1,76g tri Na-citrat.
- 1,34g  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (blycitrat).
- 30ml dest. vatn. (nykøkt og avkjølt)

Dette blir rista kraftig i 1 min., og dernest av og til i dei neste 60 min.

Ein tilsett so 8 ml nylaga NaOH og 12 ml nykøkt, avkjølt dest. vatn.

Derneft legg ein gridane på dråper av denne løysinga på ei voksplate under lokk i ei  $\text{CO}_2$ -fri atmosfære i 10 min.

