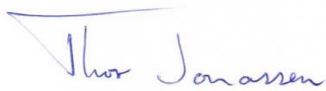



## Stamfiskhold og eggproduksjon av rognkjeks



Akvaplan-niva AS Rapport: 6838 - 1

**This page is intentionally left blank**

<b>Rapporttittel:</b> Stamfiskhold og eggproduksjon av rognkjeks	
<b>Forfatter(e)/Prosjektgruppe:</b> Akvaplan-niva: Thor Jonassen, Ane Nytrø, Thor Arne Hangstad, Armand Moe Nes, Ólöf D. B. Jónsdóttir, Albert Imsland  Nofima: Ingrid Lein  NIFES: Kristin Hamre  Universitetet i Tromsø: Mathias Danielsen, Inger-Britt Falk-Petersen  Gifas: Patrick Reynolds, Gerhard Eliassen	<b>Akvaplan-niva rapport nr / report no</b> 6838 - 1
	<b>Dato / Date</b> 01.09.2016
	<b>Antall sider / No. of pages</b> 107
	<b>Distribusjon / Distribution</b> Åpen
<b>Oppdragsgiver / Client</b> FHF	<b>Oppdragsg. referanse / Client's reference</b> 900977
<b>Sammendrag</b> Denne rapporten er sluttrapport for FHF-prosjektet "Stamfiskhold av rognkjeks" med hovedmål å utvikle kunnskap for en stabil og forutsigbar produksjon av rognkjeks til bruk i avlusning av laks. En måloppnåelse vil bety at rognkjeks kan produseres på en mer kostnadseffektiv og forutsigbar måte. Dette vil gi økt lønnsomhet for produsentene av rognkjeks i første omgang, blant annet gjennom gjenbruk av stamfisk, produksjon over større deler av året, og større utbytte av rogn og melke. En mer effektiv produksjon av rognkjeksyngel vil også komme laksenæringen til gode gjennom bedre biologisk sikkerhet og omdømme gjennom bruk av oppdrettet rognkjeks i stedet for villfanget rognkjeks. Det er i prosjektet testet og utviklet prosedyrer for stamfiskhold, stryking, befruktning, behandling av rogn og melke, inkuberingsprotokoller og etablert et kunnskapsgrunnlag for avlsarbeid på rognkjeks. .	
<b>Faglig ansvarlig</b>  Thor Jonassen   <hr/>	<b>Prosjektleder/Kvalitetskontroll</b>  Albert Imsland   <hr/>

## INNHOLDSFORTEGNELSE

1	Bakgrunn .....	6
2	Introduksjon.....	7
AP 1.	Får oppdrettet stamfisk av rognkjeks riktig fôr? .....	8
AP 2.1.	Miljø: Betydning av temperatur under sluttmodning .....	18
AP 2.2.	Miljø: Lysstimulering av vekst hos stamfiskrekrutter.....	24
AP 3.	Styring av gytetidspunkt hos rognkjeks .....	32
AP 4.1.	Kartlegge om rognkjeks er porsjonsgyter eller ikke.....	44
AP 4.2.	Utvikling av metodikk for stryking av rogn og melke .....	45
AP 4.3.	Uttesting av temperaturindusert sluttmodning .....	47
AP 4.4.	Hormonindusert sluttmodning.....	51
AP 4.5.	Forhold som kan påvirke eggkvalitet .....	53
AP 5.1.	Metoder for separering av rogn før inkubering .....	55
AP 5.2.	Konservering av melke.....	60
AP 5.3.	Hvordan befrukte, hvor mye melke.....	65
AP 5.4.	Temperaturprotokoll for inkubering av rognkjeksegg .....	72
AP 5.5.	Protokoll for inkubering av rognkjeksegg.....	87
AP 6.	Kunnskapsgrunnlag for avlsarbeid .....	94

© 2016 Akvaplan-niva AS. Rapporten kan kun kopieres i sin helhet. Kopiering av deler av rapporten (tekstutsnitt, figurer, tabeller, konklusjoner, osv.) eller gjengivelse på annen måte, er kun tillatt etter skriftlig samtykke fra Akvaplan-niva AS.

# 1 Bakgrunn

Denne rapporten er sluttrapport for FHF-prosjektet "Stamfiskhold av rognkjeks" prosjektnummer 900977 med Eirik Sigstadstø som faglig ansvarlig. Prosjektet ble gjennomført av Akvaplan-niva v/ Albert Imsland som prosjektleder og Thor Jonassen som faglig ansvarlig i samarbeid med Nofima v/ Ingrid Lein og NIFES v/ Kristin Hamre. I tillegg har Gifas v/ Patrick Reynolds og Gerhard Eliassen og Universitetet i Tromsø v/ masterstudent Mathias Danielsen og professor Inger-Britt Falk-Pettersen bidratt på enkelte av forsøkene Akvaplan-niva har hatt ansvar for.

Styringsgruppen for prosjektet bestod av Espen Grøtan, Marine Harvest Labrus AS, Dag Hansen, Arctic Cleanerfish AS, Andreas Lindholm, Norsk Oppdrettsservice AS, Lars Jørgen Ulvan, Nordland rensesk AS og Peter Hovgaard, Fjord Forsk Sogn AS.

Hovedmålet med prosjektet var å utvikle kunnskap for en stabil og forutsigbar produksjon av rognkjeks til bruk i avlusning av laks. Prosjektet hadde følgende delmål:

- Å kartlegge næringsinnhold i rogn fra villfanget og oppdrettet rognkjeks som første trinn i utvikling av stamfiskfôr til rognkjeks.
- Å kartlegge miljøkrav hos stamfisk, inkludert betydningen av gytetemperatur, samt klarlegge om lys kan brukes til å øke tilveksten hos stamfiskrekrutter.
- Å kartlegge, gjennom lysstyring av stamfisk, om gytetiden hos rognkjeks kan forskyves inntil 6 måneder fra normal gytetperiode ved hjelp av fotoperiodemanipulering.
- Å utvikle metoder for kontrollert gyting gjennom å kartlegge om rognkjeks er porsjonsgyter eller ikke, utvikle en metodikk for stryking av rogn og melke, testing av hormonindusert sluttmodning, samt testing av temperaturindusert sluttmodning.
- Å utvikle metodikk for separering av egg før inkubering. Dette for å forenkle inkubering og desinfisering, og dermed øke utbyttet av rogn i form av overlevelse på rogn.
- Å utvikle metodikk for konservering av melke, enten kjølelagring eller fryselagring for å sikre tilgang på melke av god kvalitet når det er tilgang på rogn.
- Å utvikle protokoll for befruktning av rogn for å oppnå best mulig befruktning og overlevelse av rogn.
- Å utvikle protokoller for temperaturregimer for inkubering av rogn som gir best overlevelse i rognfasen, og normal utvikling og overlevelse av larver etter klekking
- Å utvikle metode for registrering av egenskapen lusespising og sammenligne hvor effektivt rognkjeks med forskjellig genetisk bakgrunn spiser lus. Dette som grunnlag for et eventuelt seleksjonsprogram.

Laksenæringen bruker i dag store beløp på avlusning av laks i merd. I tillegg får laksen vekststagnasjon etter kjemisk behandling. Stabil tilgang på oppdrettet rognkjeks vil gi færre kjemiske avlusninger. En måloppnåelse vil bety at rognkjeks kan produseres på en mer kostnadseffektiv og forutsigbar måte. Dette vil gi økt lønnsomhet for produsentene av rognkjeks i første omgang, blant annet gjennom gjenbruk av stamfisk, produksjon over større deler av året, og større utbytte av rogn og melke. En mer effektiv produksjon av rognkjeksungel vil også komme laksenæringen til gode gjennom bedre biologisk sikkerhet og omdømme gjennom bruk av oppdrettet rognkjeks i stedet for villfanget rognkjeks.

## **2 Introduksjon**

Problemene med lakselus, og resistens mot kjemiske lusemiddel har vært et økende problem for norsk laksenæring de senere årene. Interessen for bruk av rensefisk for å kontrollere forekomsten av lakselus har derfor økt tilsvarende. Fangst av vill rensefisk representerer både en trussel mot ville bestander, og representerer smittefare. Det er derfor behov for å utvikle effektive metoder for oppdrett av rensefisk.

Interessen for å bruke rognkjeks som rensefisk har økt sterkt de siste par årene, hovedsakelig fordi de første livsstadiene er enklere å kontrollere enn hos andre rensefiskarter. Det har imidlertid vist seg at stamfiskhold og produksjon av rogn og melke kan være utfordrende, noe dette prosjektet vil avhjelpe.

## AP 1. Får oppdrettet stamfisk av rognkjeks riktig fôr?

*Næringsinnhold i egg fra oppdrettet sammenlignet med vill rognkjeks kan gi en pekepinn på dette.*

<b>Fagansvarlig:</b>	NIFES v/ Kristin Hamre
<b>Prosjektgruppe:</b>	Kristin Hamre
<b>Sammendrag:</b> Dette studiet er ment å danne grunnlag for videre forskning som kan bidra til utvikling av tilpassede fôr til rognkjeks. En har foretatt screening av hele ernæringsprofilen i egg fra oppdrettet og vill fisk som grunnlag for en innledende vurdering av om oppdrettet rognkjeks har optimal ernæring. Det ble funnet til dels store forskjeller i næringsinnhold mellom egg fra oppdrettet og vill rognkjeks.	

### Forord

Dette studiet inngår i prosjektet «Stamfiskhold av rognkjeks», finansiert av Fiskeri og Havbruksnæringsens Forskningsfond (FHF-prosjekt nr. 900977) og ledet av Akvaplan NIVA. Takk til Peter Hovgaard, Fjord Forsk Sogn AS, Sogndal, som har levert rogn fra oppdrettet stamfisk av rognkjeks og Thor Arne Hangstad, Akvaplan NIVA, Tromsø, som har levert rogn fra villfisk.

### Sammendrag

I dette FHF prosjektet, «Stamfiskhold av rognkjeks», har vi undersøkt mange ulike aspekter ved stamfiskhold, blant annet ernæring. Som en første tilnærming er det gjort en screening av hele ernæringsprofilen i egg fra oppdrettet og vill fisk. Hvis man antar at vill fisk har optimal ernæring, kan man da vurdere om fôret til den oppdrettede stamfisken er riktig sammensatt.

Egg fra oppdrettet rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) hadde høyere tørrstoffinnhold enn egg fra villfisk (hhv 21 og 18%). Proteininnholdet var ikke forskjellig, mens fettinnhold var høyere i egg fra oppdrettsfisk enn i egg fra villfisk. Det var lite glykogen i eggene (0.2-0.4 % av våtvekt). Vitamin C, D, E og K, samt astaxantin var høyere i egg fra oppdrettsfisk enn fra villfisk. Det samme gjaldt alle makromineraler, bortsett fra fosfor og mikromineralene mangan, jern og kopper. Taurin, flere frie aminosyrer og ammonium var også høyere i egg fra oppdrettsfisk enn fra villfisk. Den viktigste forskjellen i fettsyresammensetningen var høyere innhold av n-6 fettsyrer i egg fra oppdrettet rognkjeks. Fôret gitt til oppdrettet fisk inneholdt 58-59% protein og 15-16% fett og hadde generelt høye nivå av mikronæringsstoffer sammenlignet med anbefalinger for fisk i vekstfasen.

I naturen spiser rognkjeks hovedsakelig geleplankton (maneter, 83% av tørrvekt mageinnhold) og krepsdyr. Oppdrettsfôret til stamfisk, men også vanlige vekstfôr til fisk, er mye mer næringsrike enn rognkjeksens naturlige føde og det er dette som gir forskjellen i næringsinnhold i eggene. Vi vet ikke om rognkjeks i dagens oppdrett kan karakteriseres som feilernært, for å få vite det trenger man systematiske tester av hvordan fisken fungerer i forhold til ulik ernæring og dette inngikk ikke i dette prosjektet. Det høye næringsinnholdet i egg fra oppdrettet rognkjeks kan likevel tenkes å påvirke utviklingen tidlig i livsløpet, noe som bestemmer om man får en robust fisk av god kvalitet. Dette kan være med å forklare den høye dødeligheten og utviklingen av katarakt hos rognkjeks.



Dette studiet er ment å danne grunnlag for videre forskning som kan bidra til utvikling av tilpassede fôr til rognkjeks. Foreløpig er det mange spørsmål og få svar, samtidig som man står overfor utfordringer innen fiskevelferd som delvis kan ha sammenheng med ernæring. Videre forskning innen ernæring hos rognkjeks er derfor nødvendig.

## Bakgrunn

Lakselus blir nå vurdert som norsk oppdrettsindustri's største problem, man må ha hyppige avlusninger og lusa har utviklet resistens mot medikamentelle avlusningsmidler. Dette har ført til økt interesse for bruk av rensefisk til å beite ned lusen. Bruk av vill rensefisk har ulike begrensninger, som fare for nedfisking av bestandene og eventuell overføring av sykdommer, noe som åpner for oppdrett av rensefisk. Rognkjeks er den arten som har den enkleste produksjonsbiologien og antallet leverte fisk øker raskt. Den er en ny art i oppdrett med lite kjent biologi og det trengs forskning på mange felt for å kunne utvikle en produksjon som er effektiv og samtidig gir god fiskevelferd. I dette FHF prosjektet, «Stamfiskhold av rognkjeks», har vi undersøkt mange ulike aspekter ved stamfiskhold, blant annet ernæring. Som en første tilnærming er det gjort en screening av hele ernæringsprofilen i egg fra oppdrettet og vill fisk. Hvis man antar at vill fisk har optimal ernæring, kan man da vurdere om fôret til den oppdrettede stamfisken er riktig sammensatt.

I naturen spiser rognkjeks hovedsakelig geleplankton (maneter) og krepsdyr som krill, amfipoder og decapoder (Haugland, 2001). I mageinnholdet til 547 rognkjeks fanget i Norskehavet fra 1995 til 1999 var 83% av tørrvekten fra geleplankton, 11 % fra krepsdyr og 6% ikke identifiserbart. Tørrvekten av glassmanet (*Aurelia aurita*) kan variere fra 3.07-3.91 % av våtvekten (Lucas 1994, sitert av Haugland 2001), mens proteininnhold i tørrvekt målt med «Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay» (Pierce, Rockford, Illinois, USA) var 16.2% (Haugland 2001). Metoden måler vannløselig protein og vil dermed underestimere proteininnholdet noe. Likevel må geleplankton vurderes som svært næringsfattig. Dette tar rognkjeksens igjen ved å kunne spise maneter tilsvarende sin egen vekt i løpet av ett døgn (Haugland 2001). Krepsdyr er generelt næringsrike og vil tilføre protein, vitaminer og mineraler (Hamre *et al.*, 2013b), som kan kompensere for at hovedbyttedyret er næringsfattig. Analyse av rognkjeksens naturlige byttedyr var ikke en del av dette studiet, men kan med fordel gjøres senere.

## Metode

Rogn fra 10 oppdrettede fisk og 10 villfisk ble analysert. Den oppdrettede fisken var fra Fjordforsk Sogn AS, Sogndal, levert i september, oktober, desember 2014 og i februar, september, oktober 2015. Første generasjon ble oppdrettet fra befruktede egg-klaser funnet i Sognefjorden ved dykking. Larver og yngel ble holdt i 1x1 m kar, større fisk i 2x2 m kar eller i runde kar med 3 m diameter. Det ble brukt kontinuerlig svakt lys under vekstfasen og kunstig vinter- og vår-lys for å stimulere modning av stamfisken. Temperatur og saltholdighet var hhv 8,5°C og 34 g/L (dypvann fra 100 m). Den minste rognkjeksens ble fôret med Aquasoft fra Skretting AS. Dette fôret var basert på Vitalis Cal som ble knust og blandet med 20-30% vann, hvete gluten for å øke bindingen, samt krill for å øke smakeligheten. Når fisken var stor nok til å ta 9 mm pellets ble den fôret med Vitalis Cal. To prøver av mjukfôret er analysert. Rognen som ble analysert var ubefruktet, enten gytt i karet eller strøket. Den ble sendt på is med hurtigbåt fra Sogndal til Bergen morgenen etter at den var gytt, fordelt i rør og frosset ved -80°C.

Rogn fra villfisk ble strøket fra fisk fanget med garn mellom Senja og Sommarøy, juni/juli 2015. Fisken ble holdt i kar i 2-10 dager før stryking. Ubefruktet rogn ble frosset inn i flak, lagret ved -80°C og sendt til Bergen på flytende nitrogen. Ved NIFES ble prøvene lagret ved -80°C før analyse.

Næringsstoffer er analysert ved hjelp av akkrediterte metoder ved NIFES, bortsett fra tryptofan og cystein/cystin som ble analysert av NOFIMA, Bergen, for å kunne regne ut Protein /Nitrogen faktor for rognkjeksegg.

## Resultater

### *Analysert av egg*

Egg fra oppdrettet rognkjeks hadde ca 3 % høyere tørrstoffinnhold enn egg fra villfisk (hhv 21 og 18% Tabell 1a). Proteininnholdet lå på 12-13 %, fettinnholdet på 3-4% og glykogen på 0.2-0.4 % av våtvekt. Protein var ikke signifikant forskjellig i de to gruppene, men lå nominelt 0.6 % høyere i rogn fra oppdrettet fisk sammenlignet med villfisk. Forskjellen for fett og glykogen var henholdsvis ca 0.7 og 0.15%, mens forskjellen i makromineraler utgjorde ca 0.2% (Tabell 1a). Mikromineraler og vitaminer utgjør en mindre andel av tørrvekten. Dette betyr at bare halvparten av forskjellen i tørrvekten er gjort rede for. Videre er 4% av tørrvekten i egg fra oppdrettsfisk og 3 % av tørrvekten i villfiskegg ikke gjort rede for. Proteininnholdet i egg er genetisk bestemt og lar seg vanligvis ikke påvirke av hva fisken spiser. Proteininnhold er en derfor god standardiseringsfaktor og uttrykt på våtvekt var det likt i egg fra vill og oppdrettet fisk. Derfor blir resultatene i denne rapporten oppgitt på våtvekt.

Fettinnhold uttrykt på våtvekt var høyere i egg fra oppdrettsfisk enn i egg fra villfisk, mens det motsatte var tilfelle for glykogen (Tabell 1a). Av vitaminene ble tiamin, vitamin C, D, E og K, samt astaxantin analysert og alle bortsett fra vitamin D var høyere i egg fra oppdrettsfisk enn fra villfisk. Det samme gjaldt alle makromineraler, bortsett fra fosfor (Ca, Na, K, Mg) og mikromineralene mangan, jern og kobber. Jod, sink og selen var tilstede i like nivå i de to gruppene (Tabell 1a). Taurin, flere frie aminosyrer og ammonium var høyere i egg fra oppdrettsfisk enn fra villfisk. Det samme gjaldt summen av frie aminosyrer og metabolitter (Tabell 1b). Den viktigste forskjellen i fettsyresammensetning (målt som % av totale fettsyrer) var høyere nivå av ARA og sum av n-6 fettsyrer i egg fra oppdrettet fisk, noe som førte til en vesentlig lavere n-3/n-6 ratio. Dette er ventet, fordi man i oppdrettsfôr ofte bruker planteoljer med høyt innhold av n-6 fettsyrer. Omega 3 innholdet var imidlertid høyt i begge gruppene, så forskjellen i ratio er antagelig ikke dramatisk. EPA var lik i de to gruppene mens DHA var noe høyere i villfiskegg enn i egg fra oppdrettet fisk (Tabell 1c).

### *Fôranalyser*

Fôrene inneholdt 65-69% tørrstoff, 58-59% protein, 15-16% fett og 8-9% stivelse på tørrstoff. Det var generelt svært høye nivå av vitaminer og mineraler, sammenlignet med anbefalinger for fisk i vekstfasen (NRC, 2011). Fôrene hadde gode nivå av n-3 fettsyrer, men inneholdt relativt mye n-6 fettsyrer, særlig 18:2n-6.

## Diskusjon

Det var stor forskjell i næringsinnhold i egg fra oppdrettet og vill rognkjeks, med høyere innhold av tørrstoff og mange av næringsstoffene i egg fra oppdrettet fisk. Dette er antagelig en refleksjon av det fisken spiste, hovedsakelig geleplankton i naturen og et svært næringsrikt fiskemelbasert stamfiskfôr, tilsatt ekstra mikronæringsstoffer i oppdrett. I forhold til rognkjeks, hadde egg fra oppdrettet torsk (upublisert) og berggylt (Hamre *et al.*, 2013a) lignende innhold av næringsstoffer som egg fra vill fisk. Det er vanskelig å si hva det høye næringsinnholdet i egg har å si for utvikling av fisken videre i livet, men generelt kan både for lite og for mye næringsstoffer være skadelig.

Rognkjeks brukt til avlusning har ofte høy dødelighet. I en rapport fra Veterinærinstituttet (Bornø *et al.*, 2016) er mulige årsaker til denne dødeligheten undersøkt nærmere. I 2015 opplevde man i mer enn 90% av sakene (24 saker, 22 lokaliteter) i en spørreundersøkelse i veterinærtjenestene økt dødelighet blant rognkjeks i merd, dødelighet på mer enn 50% var rapportert i 35% av sakene og i 26% av tilfellene var dødeligheten knyttet til kvaliteten på fisken. I 6 av 24 leveranser ble fiskens kvalitet karakterisert som svekket allerede før den ble satt i merden, og fisk med høy dødelighet i merden hadde noen ganger hatt høy dødelighet i settefiskfasen. Bornø *et al.* (2016) knytter dødeligheten på rognkjeks i settefiskfasen hovedsakelig til sykdommer (83%) og til kvalitet på fisken (33%). De peker også på at fôringsregimer og type fôr varierer mye og at man har lite kunnskap på området.

Katarakt har vist seg å være et problem hos oppdrettet rognkjeks. Alvorlighetsgraden øker med fiskens alder, yngel hadde relativt lite katarakt, mens nesten 100% av stamfisken hadde katarakt med en gjennomsnittlig score på 7.3 av 8. Rognkjeks brukt til avlusning hadde en score på <4, mens villfisk lå på 1.13 (Jonassen *et al.*, 2016). Katarakt kan utløses av ulike faktorer, blant annet ernæring. Dette undersøkes nå nærmere.

## Konklusjoner

Oppdrettsfôret til stamfisk, men også vanlige vekstfôr til fisk, er mye mer næringsrikt enn rognkjeksens naturlige føde. Vi vet ikke om rognkjeks i dagens oppdrett kan karakteriseres som feilernært, for å få vite det trenger man systematiske tester av hvordan fisken fungerer i forhold til ulik ernæring. Det høye næringsinnholdet i egg fra oppdrettet rognkjeks kan likevel tenkes å påvirke utviklingen tidlig i livsløpet, noe som bestemmer om man får en robust fisk av god kvalitet. Dette, sammen med bruk av næringsrike fôr til yngel og settefisk, kan være med å forklare den høye dødeligheten og utviklingen av katarakt hos rognkjeks.

Dette studiet er ment å danne grunnlag for videre forskning som kan bidra til utvikling av tilpassede fôr til rognkjeks. Foreløpig er det mange spørsmål og få svar, samtidig som man står overfor utfordringer innen fiskevelferd som delvis kan ha sammenheng med ernæring. Videre forskning innen ernæring hos rognkjeks er derfor nødvendig.

## Tabeller

Tabell 1. Næringsinnhold i egg fra vill og oppdrettet rognkjeks

A. Hovednæringsstoffer, vitaminer og mineraler

	Oppdrett	Vill	<i>p</i>
<b>Hovednæringsstoffer (g/kg våtvekt)</b>			
Tørrstoff	210±30	180±20	0.025
Protein	130±10	120±10	ns
Fett	37±5	30±4	0.025
Glykogen	2.3±0.9	3.7±0.8	0.025
<b>Vitaminer (mg/kg våtvekt)</b>			
Tiamin	2.6±0.4	1.0±0.2	0.001
Vitamin C	21±5	0.6±0.2	0.001
Vitamin-D3	0.04±0.01	0.03±0.01	ns
Vitamin E (α- tokoferol)	82±9	15±6	0.001
Vitamin E (γ- tokoferol)	0.59±0.23	0.27±0.15	0.005
Sum vit K (μg/kg)	2.3±0.6	1.0±0.2	0.001
Astaxantin	0.09±0.05	0.00±0.00	0.001
<b>Makromineraler (g/kg våtvekt)</b>			
Ca	0.26±0.08	0.12±0.01	0.001
Na	2.7±0.8	1.9±0.2	0.025
K	3.4±0.5	2.6±0.2	0.025
Mg	0.36±0.18	0.06±0.02	0.005
P	1.70±0.27	1.41±0.15	ns
<b>Mikromineraler (mg/kg våtvekt)</b>			
Jod	1.1±0.4	1.3±0.4	ns
Mn	0.69±0.17	0.27±0.06	0.001
Fe	8.6±2.8	3.2±0.9	0.005
Cu	0.45±0.10	0.31±0.05	0.025
Zn	15±4	13±2	ns
Se	0.44±0.06	0.44±0.06	ns

\*Protein/N faktor = 5.09

B. Frie aminosyrer og metabolitter (mg/kg våtvekt)

	Oppdrett	Vill	<i>p</i>
<i>Essensielle aminosyrer</i>			
Arginin	8.5±2.4	8.2±3.0	ns
Histidin	12±3	3.1±1.0	0.001
Methionin	4.2±1.4	3.1±1.3	ns
Isoleucin	3.7±1.2	2.1±1.1	ns
Leucin	12±4	9±3	ns
Phenylalanin	5.2±1.9	3.6±1.3	ns
Lysin	37±14	13±4	0.005
Threonin	12±4	9±3	ns
Valin	9.3±3.2	7.1±2.3	ns
<i>Ikke essensielle aminosyrer</i>			
Aspartat	28±7	19±3	0.025
Serin	10±4	6±1	ns
Glutamat	98±29	48±11	0.001
Glutamin	5.8±2.0	6.3±1.5	ns
Prolin	28±9	18±5	0.025
Glycin	25±7	12±2	0.001
Alanin	24±9	8±2	0.001
Tyrosin	6.6±2.1	4.5±1.6	ns
<i>Andre</i>			
Taurin	660±201	428±61	0.005
Beta-Alalanin	4.0±1.8	3.6±4.4	ns
GABA	11±2	10±1	ns
Ethanolamin	83±19	111±23	ns
Phosphoethanolamin	56±13	24±4	0.001
Urea	107±32	85±34	ns
Ammonium	135±33	95±15	0.025
Sum*	726±133	506±92	0.025

\*Ekskludert taurin, ns; ikke signifikant

C. Fettsyrer (% av totale fettsyrer)

	Oppdrett	Vill	<i>p</i>
16:0	15.4±0.5	13.7±0.5	0.001
16:1n-7	1.7±0.2	1.3±0.2	0.005
18:0	4.9±0.2	3.9±0.2	0.001
18:1n-11	0.7±0.3	3.2±0.8	0.001
18:1n-9	14.3±1.5	12.9±1.9	ns
18:1n-7	4.6±0.4	3.6±0.8	0.005
18:2n-6	5.6±0.9	1.1±0.2	0.001
20:1n-9	0.8±0.2	2.6±0.6	0.001
20:4n-6 (ARA)	1.8±0.2	0.9±0.1	0.001
20:5n-3 (EPA)	17±2	17±1	ns
22:5n-3 (DPA)	3.1±0.4	1.3±0.2	0.001
22:6n-3 (DHA)	22±2	26±2	0.005
Sum mettet	22±2	20±1	0.001
Sum en-umettet	23±2	27±2	0.005
Sum n-3	43±2	47±1	0.005
Sum n-6	8.2±1.0	2.5±0.2	0.001
Sum flerumettet	52±1	49±1	ns
n-3/n-6	5.4±0.7	19±1	0.001

Tabell 2. Næringsinnhold i fôr til rognkjeks stamfisk (Aquasoft, Skretting). Aquasoft er basert på Vitalis Cal, tilsatt vann, krillmel og hvetegluten.

A. Hovednæringsstoffer, vitaminer og mineraler

	For 1 Skretting mjukfôr	For 2 Skretting mjukfôr	Behov*	
<b>Hovednæringsstoffer (g/kg)</b>				
Tørrstoff på våtvekt	690	650		
Fett på tørrvekt	154	157		
Protein (Nx6.25) på tørrvekt	580	590	30-60	
<b>Vitaminer (mg/kg tørrvekt)</b>				
Astaxantin	31	34		
Tiamin	28	28	1	
Vitamin C	83	39	50	
Vitamin-D3	0,087	0,139	0,006-0,06	
Vitamin E (alfa- tokoferol)	394	369	50	
Vitamin K3	0.0035	0.0030	0,2-2	
<b>Makromineraler (g/kg tørrvekt)</b>				
Ca	22	18	1.1-2.4	(copepoder)
Na	13	11		
K	7,9	6,0		
Mg	2,6	2,3	0.4-0.6	
P	16	12	4.5-6.0	
<b>Mikromineraler (mg/kg tørrvekt)</b>				
Jod	8,3	4,8	0.6-1.1	
Mn	33	40	13	
Fe	465	616	30-150	
Cu	29	18	3-5	
Zn	160	185	20-30	
Se	1,3	1,4	0.25-0.3	

\*Vindu som inkluderer flere fiskearter, i følge NRC 2011. For Ca er det ikke oppgitt behov, her er innholdet i copepoder oppgitt

## B. Aminosyrer

Aminosyrer (mg/g tørrvekt)	For 1 Skretting mjukfor	For 2 Skretting mjukfôr	Behov
HYP	2,8	3,5	4-8
HIS	13,3	15,3	
TAU	4,8	3,5	
SER	23,6	25,2	10-24
ARG	30,8	28,9	
GLY	31,8	30,6	
ASP	46,5	40,9	
GLU	97,0	116,7	5-15
THR	21,1	21,0	
ALA	28,2	26,9	
PRO	31,8	40,6	12-22
LYS	35,0	29,1	
TYR	17,8	20,4	6-16
MET	13,5	13,8	7-15
VAL	26,2	26,5	6-15
ILE	21,4	22,0	8-20
LEU	39,6	41,8	11-23
PHE	24,7	29,1	
Sum	510	536	

## C. Fettsyrer

Fettsyrer (% av totale fettsyrer)	For 1 Skretting mjukfor	For 2 Skretting mjukfôr	Behov
16:0	16,6	17,5	
18:1n-9	12,6	13,1	
18:2n-6	8,2	8,5	
20:4n-6 (ARA)	1,1	1,2	
20:5n-3 (EPA)	12,4	13,1	
22:6n-3 (DHA)	10,1	10,6	10-20
Sum mettet	26,7	27,9	
Sum en-umettet	29,1	25,4	
Sum n-3	28,2	29,9	
Sum n-6	10,2	10,6	
n-3/n-6	2,8	2,8	



## Referanser

Bornø, G., Alarcon, M., Linaker, M.L., Colquhoun, D., Nilsen, H., Gu, J., Gjerseth, B., Hamsen, H., Thoen, E., Gulle, S. and Jensen, B.B. (2016) Akutt dødelighet hos rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) i 2015, Veterinærinstituttets rapportserie, 2, 2016, pp. 44, Oslo.

Hamre, K., Nordgreen, A., Grotan, E. and Breck, O. (2013a) A holistic approach to development of diets for Ballan wrasse (*Labrus berggylta*) - a new species in aquaculture. *PeerJ*, **1**.

Hamre, K., Yufera, M., Ronnestad, I., Boglione, C., Conceicao, L.E.C. and Izquierdo, M. (2013b) Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Reviews in Aquaculture*, **5**, S26-S58.

Haugland, M. (2001) Rognkjeksens (*Cyclopterus lumpus* L) næringsøkologi i oppvekstområdene i Norskehavet – med spesiell vekt på geleplankton. **Avhandling for graden Candidatus scientarum**. Institutt for Fiskeri og Marinbiologi, Universitetet i Bergen, Bergen, pp. 67.

Jonassen, T.M., Hamadi, M.N., Reynolds, P., Nytrø, A.V., Imsland, A.K. (2016) Kartlegging av katarakt hos rognkjeks i oppdrett, Akvaplan-niva rapport 7708-1, pp. 54.

NRC (2011) *Nutrient requirements of fish and shrimp*, The National Academic Press, Washington D.C.

## AP 2.1. Miljø: Betydning av temperatur under sluttmodning

<b>Fagansvarlig:</b>	Akvaplan-niva v/ Thor Jonassen
<b>Prosjektgruppe:</b>	Ane Nytrø, Thor Arne Hangstad, Armand Moe Nes, Thor Jonassen, Albert Imsland
<b>Sammendrag:</b> <p>Forsøket testet om temperaturregimet til rognkjeks i perioden før gyting hadde betydning for rognproduksjon og eggkvalitet. Egg fra stamfiskgrupper som gikk på hhv. ca. 5 °C og ca. 10 °C ble sammenlignet i dette forsøket.</p> <p>Hold av stamfisk på 10 °C i forkant av gyting så ut til å være gunstig i forhold til stimulering av gyting, og resulterte i at et større andel fisk blie gyteklare og ga et større rogn-utbytte samlet sett fra gytegruppen sammenlignet med stamfisk holdt på 5 °C. Stamfiskhold på 10 °C ga også en jevnere temperaturovergang for inkubering, som ofte skjer på 10 °C.</p> <p>Betydningen av større eggdiameteren ved 5 °C sammenlignet med 10 °C var usikker, men på andre marine arter har dette vist seg å være positivt. Det gir bl.a. større larver som overlever bedre enn mindre larver under sulting.</p> <p>Dersom egg-diameter er et kvalitetskriterium kan derfor utvelgelse av stor stamfisk og vekststimulering av stamfiskrekrutter bidra til bedre egg- og larvekvalitet.</p>	

### Bakgrunn:

Den potensielle effekten av lys og temperatur på vekst kan være viktig for å korte ned produksjonstiden eller oppnå størst mulig gytemoden fisk, og dermed bedre produksjon av egg og melke. Man vet i dag at optimalt temperaturområde for vekst hos liten rognkjeks (yngel og settefisk) ligger fra 9 – 13 °C. Det er også god praktisk erfaring med hold og gyting av villfanget stamfisk ved ca. 10 °C, selv om naturlig gyting i sjøen hovedsakelig skjer i mars/april når temperaturen er en god del lavere, gjerne rundt 4 °C. Dette vitner om en relativt vid temperaturtoleranse, men man vet ikke om optimal temperatur med tanke på vekst også er optimalt under ovulering og gyting, eller for eggene under inkubering.

Utgangspunktet for forsøket var å teste om temperaturregimet til rognkjeks i perioden før gyting hadde betydning for rognproduksjon og eggkvalitet. Egg fra stamfiskgrupper som gikk på hhv. ca. 5 °C (T5) og ca. 10 °C (T10) ble sammenlignet i dette forsøket.

### Gjennomføring:

27. november 2014 ble 60 oppdrettede stamfisk som hadde gått på stabil lav temperatur (ca. 5 °C) og lysstyring for planlagt gyting medio februar 2015 (simulert naturlig lysregime 3 mnd. fremskyndt i forhold til naturlig lysregime) fordelt på fire kar (15 fisk per kar) hvor to kar hadde stabilt ca. 5 °C (T5) og to kar ca. 10 °C (T10) gjennom hele forsøket. T10 ble gradvis akklimatisert til ca. 10 °C i løpet av 5 dager. Fisken i T5 hadde snittvekt på 1266 g (SD=340 g)) ved start og T10 snittvekt 1208 g (SD=269 g)).

Gyteklar fisk ble strøket. Befruktede egg ble inkubert i triplikat ved at eggbatchen ble delt i tre mindre batcher à ca. 200 egg (beregnet basert på rognvolum) som ble plassert på en 1 mm bunnrist (ca. 11,5 cm diameter) i hver sin inkubator (11,5 cm diameter, dybde 18 cm) med vanngjennomstrømning (ca. 2 l/min) fra innløp i bunn til avløp i overflaten av inkubatoren. Forsøksinkubatorene var laget av 2-liters plastflasker med avkuttet bunn plassert opp-ned på rekke i en rigg (Figur 1). Eggene var håndtert minst mulig, men døde egg ble plukket ut og

partikler og bunnfall sugd ut ved behov. Det var ingen annen håndtering eller behandling av eggene.

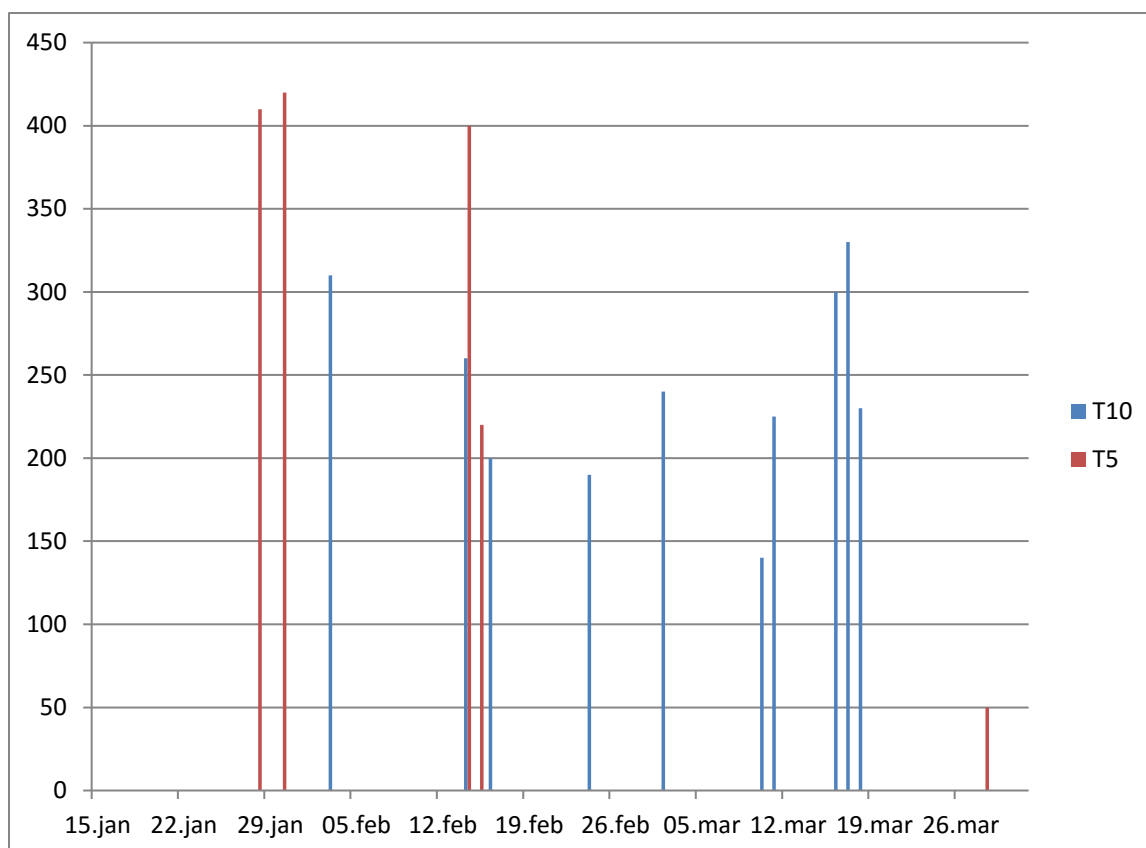


Figur 1. Forsøksinkubatorene med innløp (Wo) og innløp (Wi).

Inkuberingstemperaturen var stabil på ca. 10 °C fra start. De to temperaturgruppene ble sammenlignet med hensyn på eggutbytte per fisk, eggdiameter (målt på 10 egg fra 3 forskjellige egg-grupper per temperatur) og overlevelse til klekking. Forsøket ble gjennomført ved Akvaplan-niva forsøksstasjon i Kårvika, Tromsø.

### Resultater:

Første fisk ble strøket fra T5 28. januar og fra T10 3. februar, og i hele forsøksperioden ble det totalt strøket 3 fisk fra T5 og 7 fisk fra T10 (Figur 2). En fisk i hver temperaturgruppe ble strøket to ganger. Det var gyting i begge de replikate karene til T10, men kun i det ene replikatet til T5. To egg-batcher på 260 ml. og 190 ml. ble gytt i T10 (14/2 og 24/2) og i T5 skjedde en gyting (50 ml) i karet 28/3. Disse eggene var ubefruktet.



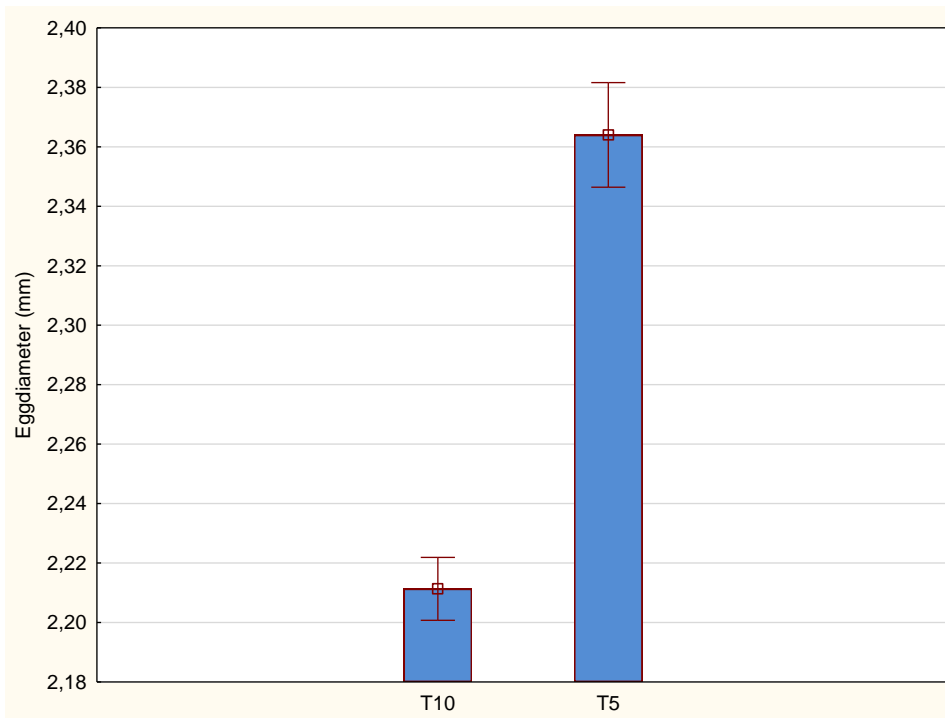
Figur 2. Gytetidspunkt og mengde egg gytt (ml) hos rognkjeks på to forskjellige temperaturer (T5: ca. 5 °C og T10: ca. 10 °C).

Det var færre fisk som gytt i T5 og mesteparten av gytingen (med unntak av en "etternøler) var tidligere (fra 28. januar til 15. februar) sammenlignet med T10 (fra 3. februar til 16. mars). Totalt rognutbytte (inkludert egg gytt i kar) fra T10 var 2425 ml. sammenlignet med 1500 ml. for T5 grunnet færre gytinger i T5. Fra forsøksstart til først gyting vokste fisken i T5 ca. 0,01-0,03 % per dag, mens fisk fra T10 vokste ca. 0,05 % per dag (Tabell 1).

Tabell 1. Sammenligning av noen nøkkeltall mellom T5 og T10.

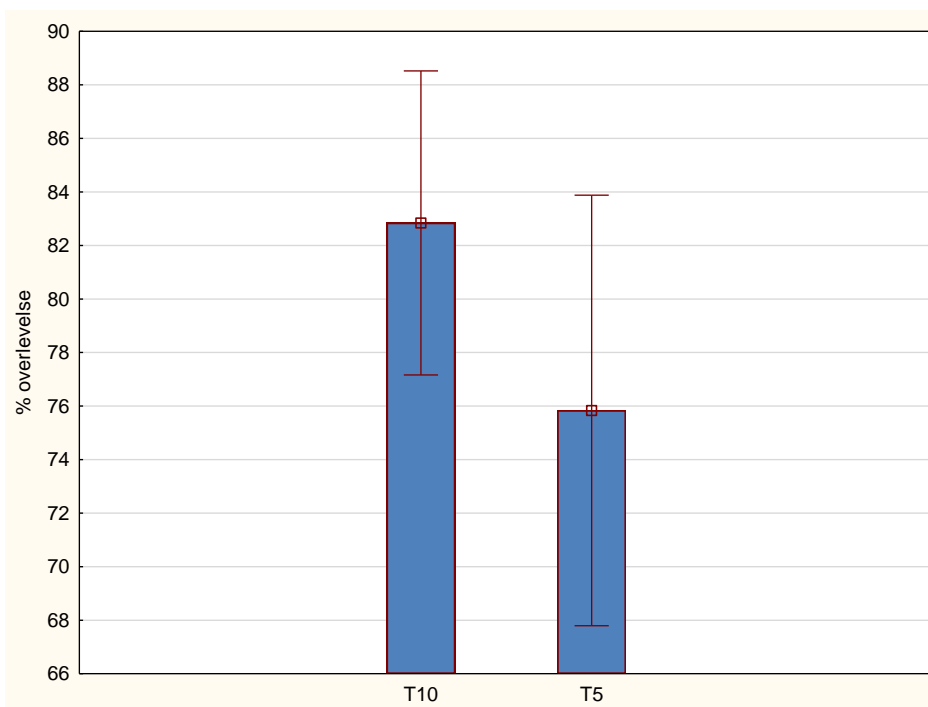
	Vekt (g) ved første stryking		Eggbatch (ml)		Eggdiameter (mm)		Fekunditet (per gyting)	
	T10	T5	T10	T5	T10	T5	T10	T5
<b>AVG</b>	2102	2298	247	363	2,23	2,37	0,12	0,16
<b>MAX</b>	2689	2508	330	420	2,33	2,46	0,15	0,19
<b>MIN</b>	1558	2067	140	220	2,13	2,25	0,07	0,10
<b>SD</b>	396	201	63	95	0,07	0,09	0,03	0,04

Egg-diameteren på rogn fra fisk som modnet på lav temperatur (T5) var signifikant større ( $P > 0,05$ ) sammenlignet med rogn på høy temperatur (T10, Figur 3).

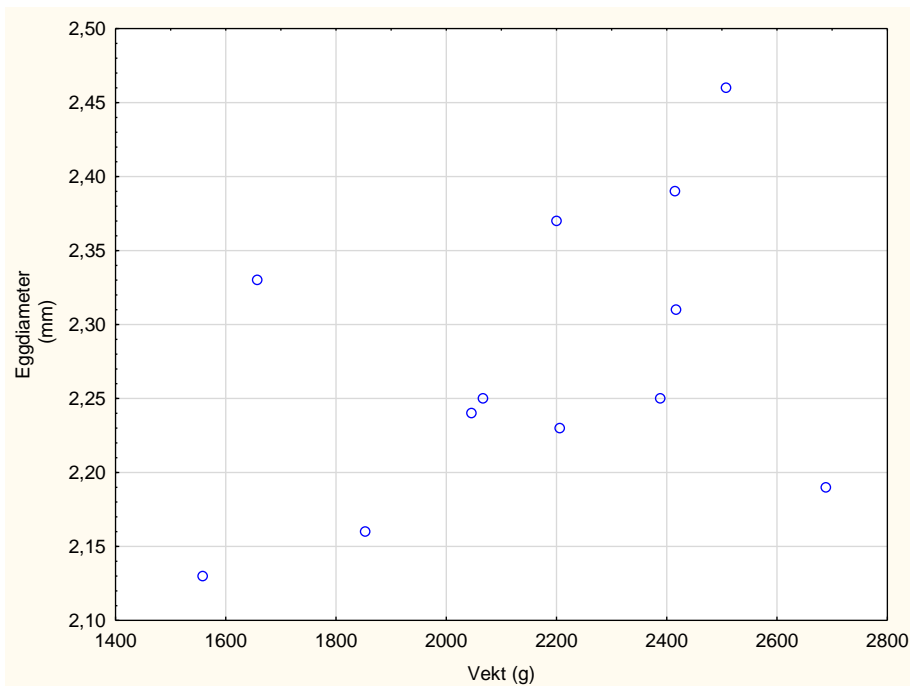


Figur 3. Gjennomsnittlig egg-diameter ( $\pm 0,95$  % konfidensintervall) for egg fra rognkjeks strøket på hhv. 10 °C (T10) og 5 °C (T5). Vertikale linjer indikerer SEM.

Inkuberingstid varierte fra 255-353 dg for T5 og 268-386 for T10. Total dødelighet frem til klekking ble registrert. En av tre replikat fra en egg-gruppe i begge temperaturgruppene (T5 og T10) ble ekskludert fra analysene pga. unormal dødelighet. Analyser av overlevelse viser variasjon fra 68 % til 88 %, men ikke signifikant forskjell mellom gruppene ( $p > 0,05$ , t-test, Figur 4).

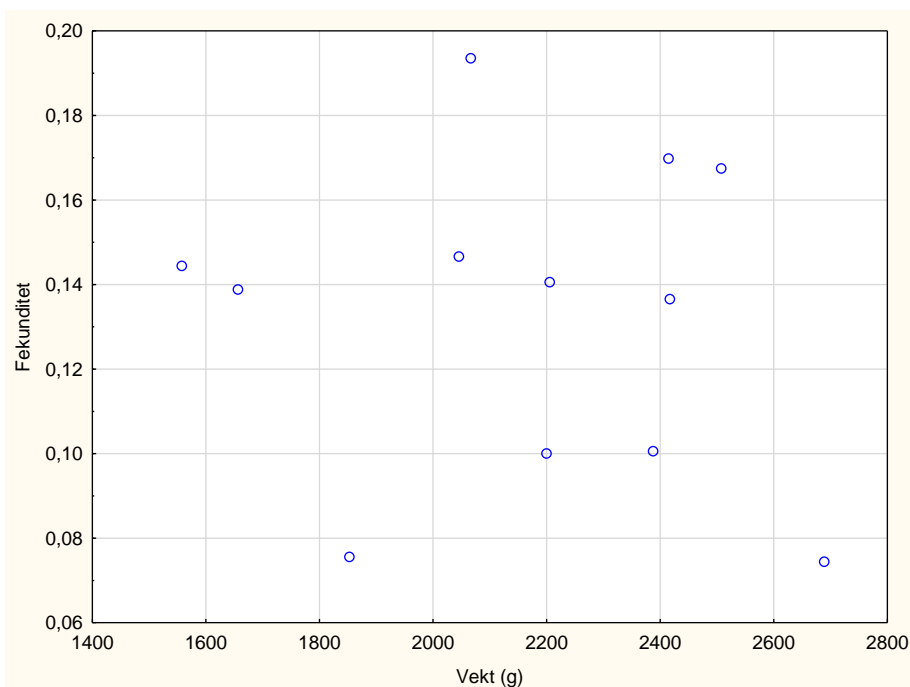


Figur 4. Gjennomsnittlig % overlevelse frem til klekking for egg fra rognkjeks strøket på hhv. 10 °C (T10) og 5 °C (T5). Vertikale linjer indikerer SEM.



Figur 5. Sammenheng mellom egg-diameter og fiskevekt ved gyting.

Det var en tendens, men ingen signifikant sammenheng mellom fiskestørrelse og egg-diameter (lineær regresjon,  $r=0,4131$ ,  $p=0,1820$ , Figur 5).



Figur 6. Sammenheng mellom fekunditet og fiskevekt.

Det var ingen sammenheng mellom fekunditet og fiskevekt (lineær regresjon, Figur 6).

## **Diskusjon:**

Den totale eggproduksjonen var høyest ved 10 °C sammenlignet med 5 °C som følge av høyere gyteaktivitet. Det var liten forskjell i størrelsene på egg-batchene, men hovedmengden av gytingen kom tidligere ved 5 °C.

All fiske ble strøket, bortsett fra totalt tre batcher som ble gytt naturlig i kar. Størrelsen på de strøkne egg-batchene kan være påvirket av stryketeknikk, men var stort sett større eller like store som de naturlig gytte egg-batchene.

Egg-diameteren var påvirket av temperatur, og den var større ved 5 °C sammenlignet med 10 °C. Store egg gir normalt store larver, noe som kan være fordelaktig med tanke på larvekvalitet (overlevelse). Egg-diameter var ikke påvirket av fiskestørrelse, men det var en trend som antydte at stor fisk produserer større egg.

Selv om det var en antydning til høyere overlevelse ved 10 °C er det ikke grunn til å tro at stabil lav temperatur (5 °C) var negativt for eggkvalitet. Andre inkuberings-forsøk i dette prosjektet (AP5) underbygger dette. T5 fikk en brå overgang fra gyting til inkubering hvor det var en dobling i temperatur, som kan forklare en noe høyere dødeligheten. Temperaturaklimering under inkubering har vist seg å ha betydning for eggoverlevelse (ref. AP5 i dette prosjektet).

## **Konklusjoner:**

Hold av stamfisk på 10 °C i forkant av gyting så ut til å være gunstig i forhold til stimulering av gyting, og resulterte i at et større andel fisk ble gyteklare og ga et større rogn-utbytte samlet sett fra gytegruppen sammenlignet med stamfisk holdt på 5 °C. Stamfiskhold på 10 °C ga også en jevnere temperaturovergang for inkubering, som ofte skjer på 10 °C.

Betydningen av større eggdiameteren ved 5 °C sammenlignet med 10 °C var usikker, men på andre marine arter har dette vist seg å være positivt. Det gir bl.a. større larver som overlever bedre enn mindre larver under sulting.

Dersom egg-diameter er et kvalitetskriterium kan derfor utvelgelse av stor stamfisk og vekststimulering av stamfiskrekutter bidra til bedre egg- og larvekvalitet.

## AP 2.2. Miljø: Lysstimulering av vekst hos stamfiskrekrutter

<b>Fagansvarlig:</b>	Akvaplan-niva AS v/ Thor Jonassen
<b>Prosjektgruppe:</b>	Ane Nytrø, Thor Arne Hangstad, Armand Moe Nes, Thor Jonassen, Albert Imsland
<b>Sammendrag:</b> Kontinuerlig lys ga en vekststimulerende effekt på rognkjeks, men nærmere analyser av kjønnsavhengige data viste at dette var basert på hunnfiskens vekstrespons på lys. Hannfiskene viste ingen slik vekstrespons på økende daglengde. Uavhengig av lysregime flatet veksten til hannfiskene av ved ca. 600-800 g, mens hunnfisken opprettholdt en jevn vekst og var ved forsøkslutt ca. dobbelt så stor som hannfiskene (1600 g).	

### Bakgrunn:

God vekst for stamfiskrekrutter i påvekstfasen frem mot kjønnsmodning kan være gunstig siden det generelt for fisk er en positiv sammenheng mellom veksthastighet, størrelse og kjønnsmodning (rasktvoksende fisk kjønnsmodner tidligere). Større fisk gyter ofte flere og større egg.

Kontinuerlig lys har på en rekke arter vist seg å ha en vekststimulerende effekt, og denne er ofte sterkere ved lav temperatur enn ved høy temperatur. Lysmanipulering av rognkjeks er ikke tidligere undersøkt, hverken i forhold til styring av vekst eller regulering av gytetidspunkt. I dette forsøket ble det derfor undersøkt om kontinuerlig lys stimulerte til økt vekst hos liten rognkjeks (stamfisk-rekrutter).

### Gjennomføring:

Forsøket ble kombinert med AP 3 ("Styring av gytetidspunkt hos rognkjeks") beskrevet nedenfor der den første perioden av forsøket (beskrevet her) testet den vekststimulerende effekten av kontinuerlig lys (LD24:0) sammenlignet med en kontrollgruppe på simulert naturlig fotoperiode (SLDN).

Fisken benyttet i forsøket var produsert ved forsøksstasjonen til Akvaplan-niva avdeling Kraknes og var avkom av villfisk fanget i Sandnessundet (Kraknes, Tromsø). Eggene var strøket i slutten av april 2013 (første gyting 19. april) og inkubert på råvann (3,5 – 5,3 °C) og klekket i slutten av juni. Larvene var startfôret på tørrfôr (Gemma Micro, Skretting) på temperaturer mellom 10 og 11 grader.

Før forsøksstart 30. april 2014 ble all fisk individmerket og fordelt på forsøksgrupper med to kar på simulert naturlig lys SLDN (med 3 mnd. fremskyndt gytetidspunkt) og fire kar på kontinuerlig lys (LD24:0). All fisk hadde gått på SLDN siden 11. november 2013. Før forsøksstart var daglengden for SLDN-regimet 21 timer. Overgang i daglengde ved forsøksstart for gruppene overført til kontinuerlig lys var derfor liten. Det var ikke dimming av lyset ved overgang dag-natt. Selv om lysregimet på Tromsø-breddegrad har mørketid var minimum daglengde i modellen 4 timer siden mørketiden ikke har fullstendig mørke, men skumringslys på dagen.



Mot slutten av forsøksperioden kunne en identifisere kjønn basert på fargeforskjeller hos hannfisk, samt gatt/papille på begge kjønn. Siden all fisk var ID-merket kunne en da sortere datasettet i forhold til kjønn og gjøre kjønnsavhengige analyser av vekstdataene. Forsøket ble gjennomført ved forsøksstasjonen til Akvaplan-niva avdeling Kraknes.

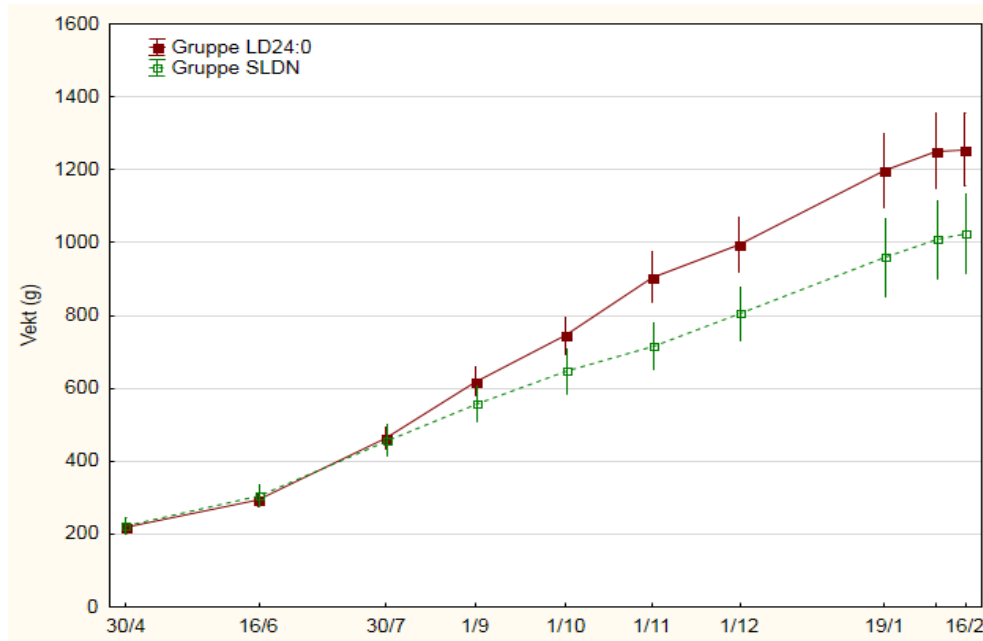
Hvert kar hadde 30 fisk, og totalt i forsøket ble 180 fisk fordelt på 6 kar. Forsøkskarene var sorte og med dimensjon 1,5 x 1,5 m, med vannvolum på 1 600 liter. Vannutskifting ved start var 1 000 L/timen, økende til 1 500 L/timen utover i forsøket. All fisk ble føret i overskudd (Amber Neptun, Skretting). Gjennomsnittsvekten for fisken i alle gruppene var ved oppstart ca. 200 g med en variasjon mellom ca. 100 og 400 g. Sjøvannstemperaturen var ca. 5 °C ved start. Gjennomsnittlig temperatur i perioden var 5,8 °C (max/min: 8,6/3,0 °C). Temperaturprofil gjennom forsøksperioden er gitt i Figur 7. Oksygenmetningen var relativt stabil (gjennomsnittlig 95,1 %, max/min: 109/81 %).



Figur 7. Temperatur i forsøksperioden.

## Resultater:

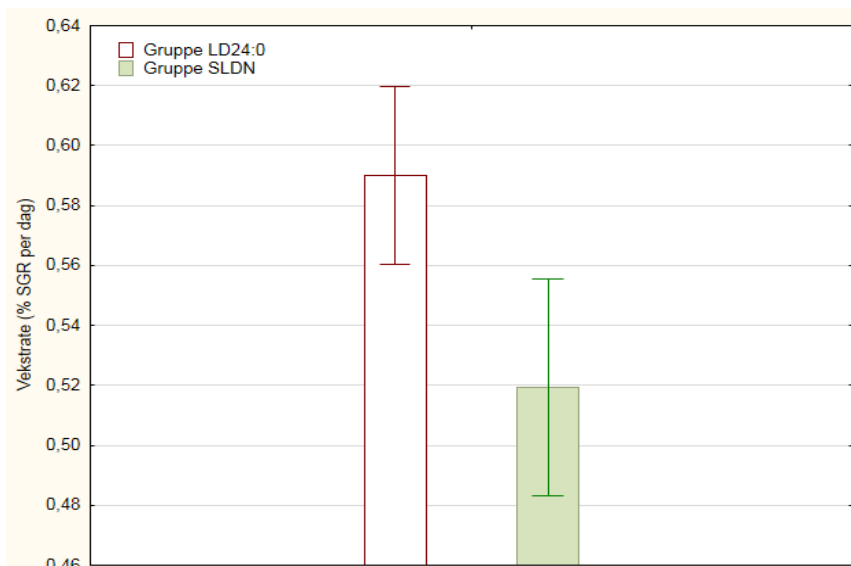
Det var ingen forskjeller mellom gruppene ved oppstart av forsøket 30. april. Først ved veiing 1. november 6 måneder etter oppstart var det klare vektforskjeller mellom gruppene, der de fire karene på kontinuerlig lys var signifikant større enn kontrollen (SLDN), Figur 8.



Figur 8. Vektutvikling for rognkjeks på to alternative fotoperioder, kontinuerlig lys (LD24:0) og SLDN på simulert naturlig varierende daglengde. Ved forsøksstart (30. april) representerte daglengden for SLDN starten av august (21 timer ved breddegrad Tromsø), tilsvarende uke 32) og 1. oktober var daglengden tilsvarende ca. uke 47 (ca. 1. november, ca. 5 timers lys). Punktene på grafen er markert med 95 % konfidensintervall. Ingen overlapp av strekene indikerer signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ).

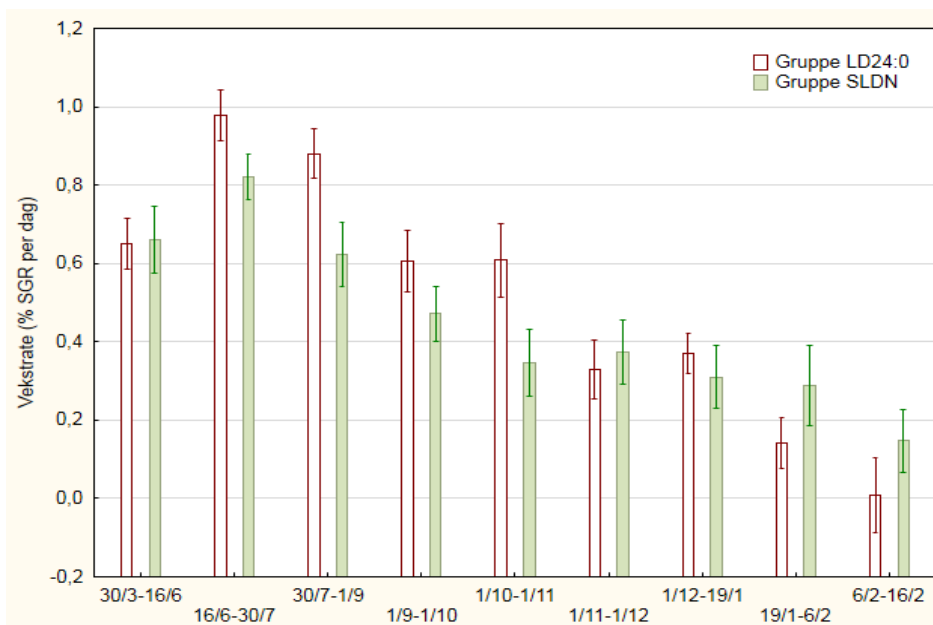
Man kan derfor tidlig i forsøket konkludere med at kontinuerlig lys gir en vekststimulerende effekt hos rognkjeks.

Akkumulert vekstrate (SGR) frem til 16. februar (291 dager) var signifikant forskjellig (enveis ANOVA,  $p < 0,05$ ) med hhv. 0,59 % per dag for gruppen på kontinuerlig lys og for gruppen på simulert naturlig fotoperiode (SLDN) 0,52 % per dag (Figur 9).



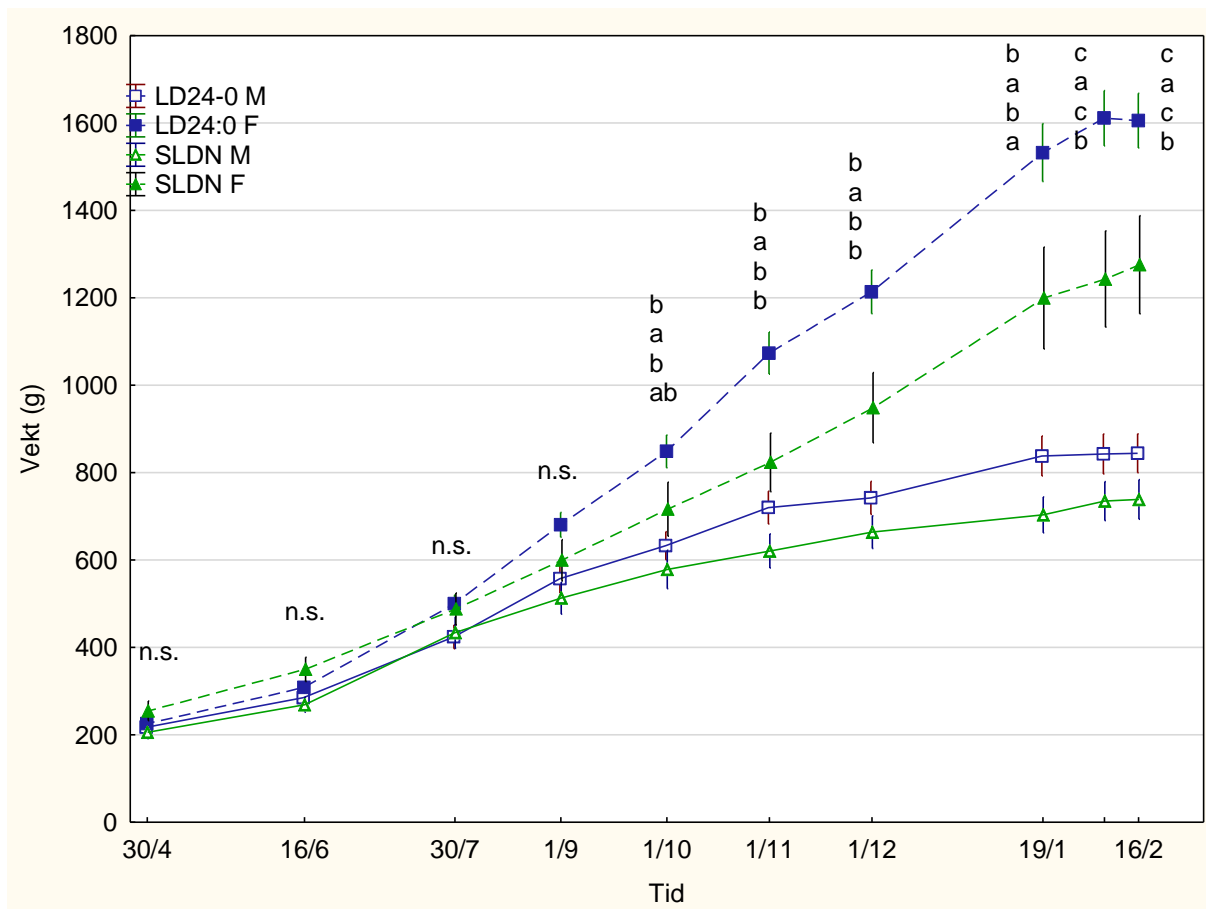
Figur 9. Forskjell i gjennomsnittlig SGR for perioden frem til 16. februar (291 dager) hos rognkjeks på to forskjellige lysregimer, kontinuerlig lys (LD24:0) og simulert naturlig lys (SLDN). Punktene på grafen er markert med 95 % konfidensintervall. Ingen overlapp av strekene indikerer signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ).

Det var signifikante forskjeller i vekstraten mellom gruppene (en-veis ANOVA,  $p < 0,05$ , Figur 10) kun i perioden der veksten var høy (16/6 – 1/11). Det kan tyde på at den vekststimulerende effekten av kontinuerlig lys kommer best til uttrykk under gode vekstbetingelser mens responsen er mindre tydelig når vekstforholdene er mindre optimale. Dette kan være stressrelatert hvor økt forbrekking går på bekostning av tilvekst. Redusert appetitt når fisken nærmer seg kjønnsmodning kan også tenkes å spille inn. Veksten var spesielt lav for LD24:0 den siste perioden av forsøket. Dette kan være påvirket av kjønnsmodning.



Figur 10. Vekstrate (% SGR) hos rognkjeks på kontinuerlig lys (LD24:0) og simulert naturlig lys (SLDN). Punktene på grafen er markert med 95 % konfidensintervall.

Individmerket fisk og identifisering av kjønn basert på fargeforskjeller og forskjeller på gatt og papill gjorde det mulig med kjønnsavhengige vekstanalyser, som viser kjønnsforskjeller i vekst og respons på lys (Figur 11).



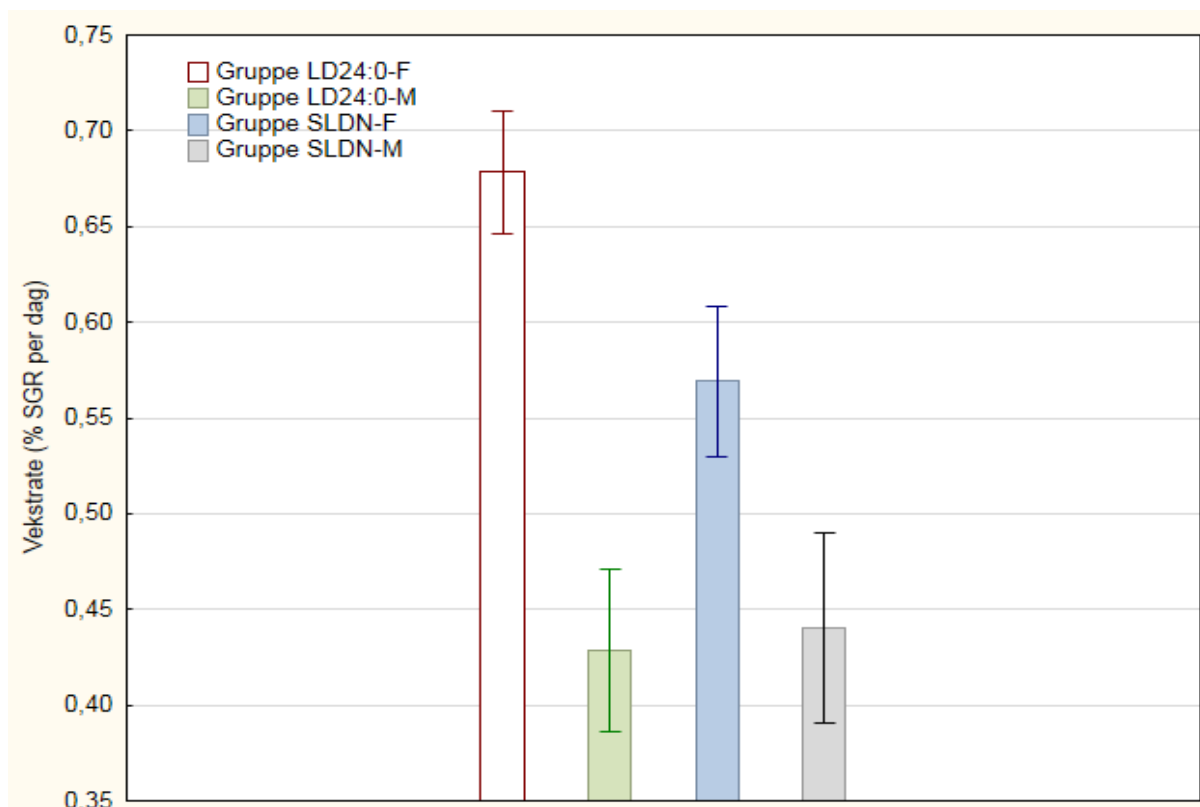
Figur 11. Kjønnssavhengig vekst (F=hunnfisk, M=hannfisk) hos rognkjeks på to tre forskjellige lysregimer (SLDN og LD24:0).

Kjønnfordelingen i de forskjellige gruppene er gitt i Tabell 2.

Tabell 2. Kjønnfordeling i de forskjellige forsøksgruppene 16. februar.

Gruppe	Umodne/uidentifisert kjønn	Hanner	Hunner
LD24:0 (4 kar)	22	37	63
SLDN (2 kar)	15	28	20

Hannfiskene hadde betydelig lavere gjennomsnittlig vekstrate sammenlignet med hunnfisken (Figur 12). Det er også viktig å merke seg at det ikke er forskjell i vekstrate mellom hannfisk på forskjellig lysregime. Dette tyder på at hannfisk ikke responderer på lys like sterkt som hunnfisk eller er like lysfølsom som hunnfisk.



Figur 12. Sammenligning av vekstrate (SGR) hos hannfisk (M) og hunnfisk (F) på kontinuerlig (LD24:0) og naturlig (SLDN) lys frem til 16. februar (298 dager). Vertikale linjer på grafen er markert med 95 % konfidensintervall. Ingen overlapp av strekene indikerer signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ).

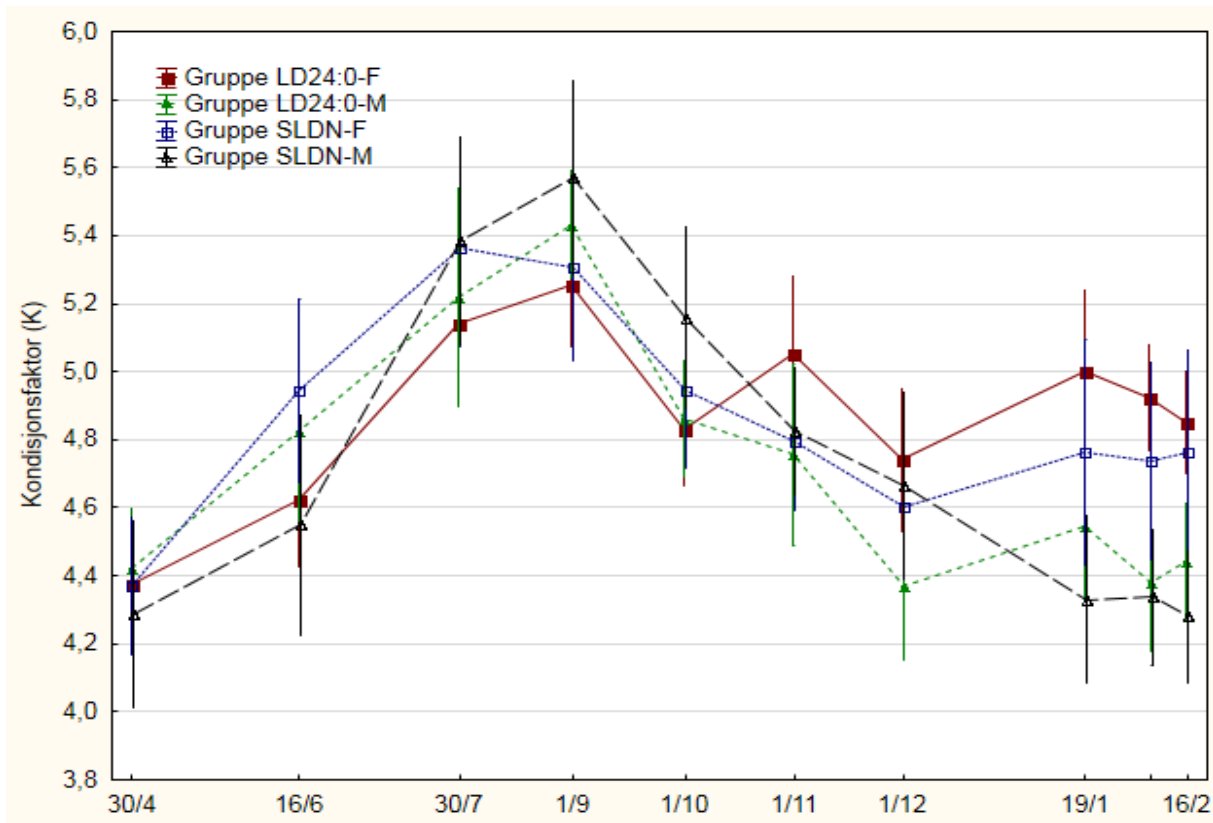
Allerede ved en størrelse rundt 600 g viser hannfisk avtagende vekst sammenlignet med hunnfisk (Figur 11). Dette skjer samtidig både på kontinuerlig (LD24:0) og naturlig lys (SLDN). Denne størrelsen hvor vekstraten avtar kan tenkes å markere kritisk størrelse for kjønnsmodning siden en så en klar økning i antall kjønnsmodnende hannfisk i denne perioden. Ved veiing 16. februar resulterte dette i betydelige variasjoner i sluttvekter mellom kjønnene (Tabell 3).

Tabell 3. Forskjeller i vekt for de forskjellige forsøksgruppene per 16. februar 2015.

Lysregime	Hunnfisk	Hanfisk
LD24:0	1593 g	792 g
SLDN	1304 g	741 g

I motsetning til hannfisken var det for hunnfisk betydelig raskere vekst på LD24:0 sammenlignet med naturlig fotoperiode (SLDN). Dette tyder på at det er kjønnsforskjeller i respons på lys hvor veksten hos hannfisk ikke blir påvirket av fotoperiode, mens økende daglengde stimulerer veksten hos hunnfisk. Konklusjonen gjort ovenfor om at kontinuerlig lys gir en vekststimulerende effekt på rognkjeks ser altså ut til å være basert på hunnfiskens bidrag til økt vekst i fiskegruppene.

Det var liten forskjell i kondisjonsfaktor mellom kjønnene frem til desember (Figur 13). Deretter økte kondisjonsfaktoren noe hos hunnfisken mens den fortsatte å gå ned for hannfisken. De første tegnene på kjønnsmodning ble observert fra desember, først på hannfisk. Kondisjonsfaktoren på hunnfisk var ca. 27 % høyere enn for hannfisk 16. februar, sannsynligvis som resultat av større gonadeoppbygging.



Figur 13. Kjønnforskjeller i kondisjonsfaktor hos rognkjeks på to forskjellige lysregimer (SLDN og LD24:0) per 16/2. Vertikale linjer indikerer 95% konfidensintervall.

Fiskehelsen kan ha spilt inn på vekstresponsen i forsøket, spesielt den første måneden etter oppstart av forsøket hvor en observerte dårlig appetitt på fisken, samt noe dødelighet og utvikling av sår. Disse forholdene stabiliserte seg, men ved veiing 1. desember var det en dramatisk utvikling i antall fisk med sår av varierende omfang, anslått til 50-60 % av fiskebestanden. Analyser viste infeksjon av *Tenacibaculum* sp., og denne var sannsynligvis årsak til sårproblemene. Bakterieinfeksjonen lot seg vanskelig behandle med antibiotika, både gjennom fôr og injeksjoner. Det ble også flere ganger foretatt formalinbehandling uten klare effekter. Profylaktisk behandling med formalin ble også gjennomført i perioden. Til tross for dette var dødeligheten i denne delen av forsøket (fram til 16. februar) lav med hhv. 4 fisk i SLDN og 9 fisk i LD24:0. Dødeligheten så altså ikke ut til å være påvirket av fotoperiode. Alle grupper fikk lik behandling.

Det var også en klar økning i antall fisk med katarakt, og ved veiing 1. desember anslo en at ca. 60 % av fisken hadde katarakt av en eller annen grad. Dette var ikke undersøkt under lupe med spaltelampe. Vanmiljøet i karene ble vurdert som bra, med stabilt oksygennivå og god vannutskifting (1 – 1,5 utskiftninger per time).

**Konklusjoner:**

Kontinuerlig lys ga en vekststimulerende effekt på rognkjeks, men nærmere analyser av kjønnsavhengige data viste at dette var basert på hunnfiskens vekstrespons på lys. Hannfiskene viste ingen slik vekstrespons på økende daglengde.

Uavhengig av lysregime flatet veksten til hannfiskene av ved ca. 600-800 g, mens hunnfisken opprettholdt en jevn vekst og var ved forsøkslutt ca. dobbelt så stor som hannfiskene.

### AP 3. Styring av gytetidspunkt hos rognkjeks

<b>Fagansvarlig:</b>	Akvaplan-niva AS v/ Thor Jonassen
<b>Prosjektgruppe:</b>	Ane Nytrø, Thor Arne Hangstad, Armand Moe Nes, Thor Jonassen, Albert Imsland
<b>Sammendrag:</b>	
<p>Målsetningen med forsøket var å beskrive en metode for å styre gytetidspunkt på rognkjeks ved hjelp av lys (fotoperiodemanipulering) og dermed få til kontrollert årstidsuavhengig gyting på rognkjeks. Fisk à ca. 200 g ble fordelt på forsøksgrupper med to kar på simulert naturlig lys (SLDN) med 3 mnd. fremskyndt gytetidspunkt og fire kar på kontinuerlig lys (LD24:0). Fisken på LD24:0 lys ble seinere splittet i to grupper som fikk et 3 mnd. komprimert høst-vårsignal for styring av gytetidspunkt hhv. 3 og 6 mnd. forskjøvet i forhold til SLDN.</p> <p>Effekten av de testede lysregimene for styring av gytetidspunkt var tydeligere for hunnfisk enn for hannfisk, hvor hannfisk startet gyting ved ca. 600-800 g, uavhengig av lysregime.</p> <p>Gyting hos hunnfisk i UT3 skjedde 6 mnd. etter overgang fra kontinuerlig lys til et høst-vår regime komprimert til 3 mnd. Dette tyder på at rognkjeks trenger 6 mnd. til å forberede seg til gyting.</p> <p>Men sporadisk gyting på hunnfisken ved ca. 1600 g, før forventet gytetidspunkt, tyder på at kjønnsmodning og gyting ikke er styrt av lys (fotoperiode) alene og at en ikke kjenner alle bakenforliggende årsaker til kjønnsmodning hos rognkjeks.</p> <p>En faktor som kan spille inn er størrelse. Størrelse som premissgiver for kjønnsmodning og forskjeller i størrelse ved kritisk tidspunkt hvor fisken bestemmer seg for å kjønnsmodne er en mulig forklaringsmodell for forskjellene i respons på de forskjellige lysregimene.</p> <p>En annen faktor som kan spille inn er temperatur. Siden temperaturen i forsøket ikke var konstant, men varierte med sesong, kan det tenkes at lysregimer eller "høst-vår signal" som skjer under andre temperaturregimer enn i naturen kan svekke effekten av signalet.</p> <p>Betydningen av størrelse og temperatur ved styring av gytetidspunkt hos rognkjeks bør undersøkes nærmere.</p>	

#### Bakgrunn:

Årstidsuavhengig egg- og yngelproduksjon er viktig for god utnyttelse av produksjonskapasiteten i et klekkeri. I tillegg vil det være etterspørsel etter rognkjeks for avlusning store deler av året grunnet forskjell i tidspunkt for påslag av lus langs kysten, samt ulike utsettingstidspunkt av smolt. Utvikling av metoder for styring av kjønnsmodning og gyting er derfor nødvendig.

Den årlige reproduksjonssyklusen til rognkjeks er sannsynligvis som for andre marine arter på våre breddegrader styrt av indre rytmer, som synkroniseres ved hjelp av ytre rytmer. Lys er antagelig den viktigste miljøfaktoren, selv om andre rytmer slik som temperatur, næringstilgang og andre kan ha en viss innflytelse.



Hos vårgytende fisk som f.eks. torsk skjer modningen av egg eller spermceller naturlig utover høsten på minkende daglengder. Setter en da på lys fra sommeren av vil denne prosessen stoppe opp eller raten reduseres slik at selve modningen blir senere. En kan da holde fisken "på vent" inntil man setter fisken over på et naturlig varierende lysregime som starter med et høstsignal (avtakende daglengde). Fisken forventes da å starte gytesesongen etter ca. 6 mnd. på det simulerte "vårsignalet" som for både torsk og rognkjeks starter i april ved ca. 17 timers lys (Tromsø-breddegrad).

Det er god erfaring med styring av kjønnsmodning ved hjelp av lys hos arter som laks og torsk. For uttesting har man derfor valgt en av lysstyringsmodellene som tidligere har vært brukt på torsk, siden det er stor overlapp mellom de to artene når det gjelder naturlig gytetidspunkt, geografisk utbredelse, gytevandring og miljø.

Lysregimet er basert på å holde fisken på kontinuerlig lys inntil man overfører til naturlig fotoperiode som starter med gradvis reduksjon i daglengde (høstsignal), og deretter en økning (vårsignal). I modellen har en valgt å komprimere høst-vårsignalet til 3 mnd. slik at gytingen forventes å skje 3 mnd. etter at høstsignalet er gitt (start av endring fra kontinuerlig lys til gradvis avtagende daglengde). Dette 3-mnd lyssignalet ble i forsøket gitt på to grupper med tre måneders mellomrom, med tanke på forskjøvet gytingen med hhv. 3 og 6 mnd. (Figur 14). Begge gruppene gikk under ellers like betingelser og naturlig varierende temperatur.

Synkronisering av gyting, fekunditet (mengde egg strøket fra hver fisk) og egg-overlevelse ble sammenlignet. En referansegruppe gikk på et simulert naturlig lysregime (SLDN).

Målsetningen med forsøket var å beskrive en metode for å styre gytetidspunkt ved hjelp av lys (fotoperiodemanipulering) og dermed få til kontrollert årstidsuavhengig gyting på rognkjeks.

### **Gjennomføring:**

Fisken benyttet i forsøket var produsert ved forsøksstasjonen til Akvaplan-niva avdeling Kraknes og var avkom av villfisk fanget i Sandnessundet (Kraknes, Tromsø). Eggene var strøket i slutten av april 2013 (første gyting 19. april) og inkubert på råvann (3,5 – 5,3 °C) og klekket i slutten av juni. Larvene var startfôret på tørrfôr (Gemma Micro, Skretting) på temperaturer mellom 10 og 11 grader.

Før forsøksstart 30. april 2014 ble all fisk individmerket og fordelt på forsøksgrupper med to kar på simulert naturlig lys SLDN (med 3 mnd. fremskyndt gytetidspunkt) og fire kar på kontinuerlig lys (LD24:0). All fisk hadde gått på SLDN siden 11. november 2013. Før forsøksstart var daglengden for SLDN-regimet 21 timer. Overgang i daglengde ved forsøksstart for gruppene overført til kontinuerlig lys var derfor liten. Det var ikke dimming av lyset ved overgang dag-natt. Selv om lysregimet på Tromsø-breddegrad har mørketid var minimum daglengde i modellen 4 timer siden mørketiden ikke har fullstendig mørke, men skumringslys på dagen. Forsøket ble gjennomført ved forsøksstasjonen til Akvaplan-niva avdeling Kraknes.

Fisken på kontinuerlig lys ble seinere splittet i to grupper, hhv. UT3 og UT6 med hhv. 3 og 6 mnd. forskyvning i gytetidspunkt sammenlignet med SLDN. Lyssignalet for styring av gytetidspunkt (simulert vinter- og vår fotoperiode) er vist i Figur 14. UT3 fikk dette signalet fra 13. januar 2015 og UT6 fra 7. april 2015 (

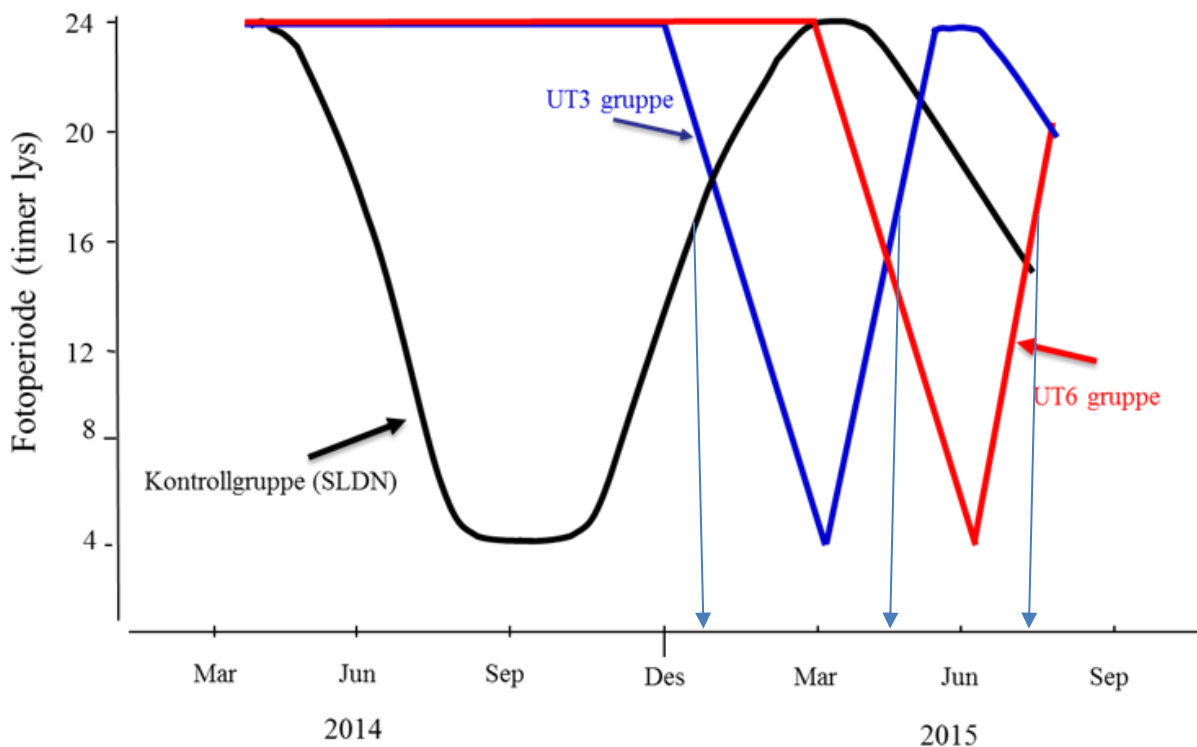
Tabell 4). Vekst ble registrert frem til 16. juni 2015. Forventet gytetidspunkt for hver av gruppene er tre mnd. etter at lyssignalet startes opp, hhv. april og juli.

Første delen av signalet ga en nedgang fra kontinuerlig lys til 4 timers lys i løpet av 8 uker (vintersignal) og fortsatte med en økning i daglengde fra 4 timers lys til kontinuerlig lys på 8 uker (vårsignal). Forventet start av gytessesongene var ved ca. 17 timers lys, som tilsvarer ca. 10. april på breddegraden for Tromsø hvor forsøket ble gjennomført (

Tabell 4). Lyskilden var 2 x 18W lysstoffrør av dagslystypen. Lysene var plassert i senter av karet 52 cm over vannflaten.

Hvert kar hadde 30 fisk à 224 g ( $\pm$  76,7 g) og totalt i forsøket ble 180 fisk fordelt på 6 kar. Forsøkskarene var sorte og med dimensjon 1,5 x 1,5 m, med vannvolum på 1 600 liter. Vannutskifting ved start var 1 000 L/timen, økende til 1 500 L/timen utover i forsøket. All fisk ble føret i overskudd med Skretting Vitalis fra kl. 08:00 til 16:00 daglig. Gjennomsnittsverken for fisken i alle gruppene var ved oppstart ca. 200 g med en variasjon mellom ca. 100 og 400 g. Sjøvannstemperaturen var ca. 5 °C ved start. Gjennomsnittlig temperatur i perioden var 5,8 °C (max/min: 8,6/3,0 °C). Temperaturprofil gjennom forsøksperioden er gitt i Figur 7. Oksygenmetningen var relativ stabil (gjennomsnittlig 95,1 %, max/min: 109/81 %).

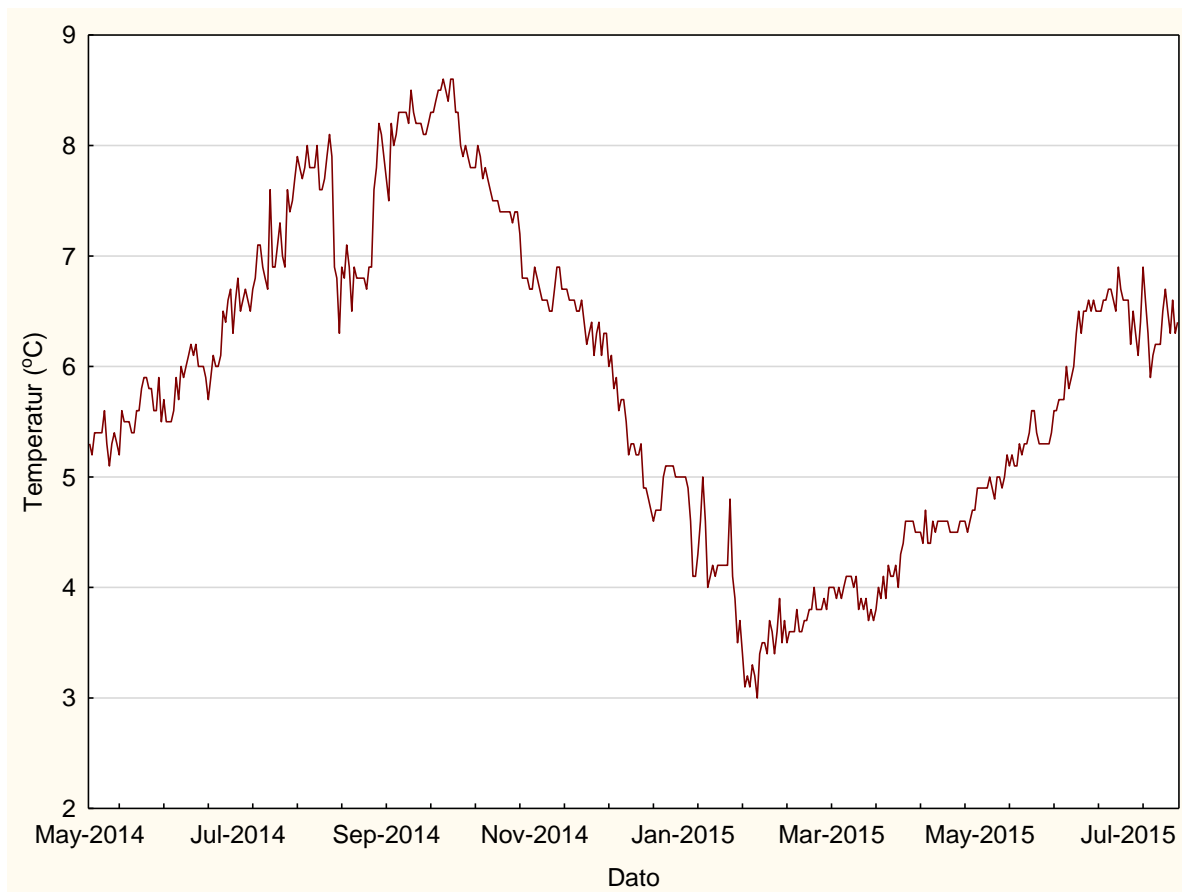
Modningsstatus på fisken ble fulgt opp daglig frem til 26. juli og gyteklar fisk ble strøket. Egg-batcher gytt naturlig i kar ble også registrert. Av egg-batchene gytt fra 2. februar til 16. mai ble 3 replikater à 200 egg fra hver strøket egg-batch (6 batcher fra UT3 og 7 batcher for UT6) befruktet og inkubert fram til klekking. Eggoverlevelse og klekkeprosent ble registrert.



Figur 14. Fotoperiode (høst-vår-signal) for stimulering av kjønnsmodning og gyting etter endt periode med kontinuerlig lys (LD24:0) i gruppe UT3 og UT6. Forventet gyting på de ulike lysregimene er indikert med piler.

Tabell 4. Lysstyringsprotokollen for forsøket hvor UT3 og UT6 er henholdsvis 3 og 6 mnd. forskyvning av gytetidspunkt i forhold til gyting på simulert naturlig fotoperiode (SLDN).

UKE	Dato	SLDN	UT3	UT6
		Timer lys	Timer lys	Timer lys
15	07.04.14	24,0	24,0	24,0
16	14.04.14	24,0	24,0	24,0
17	21.04.14	22,5	22,5	22,5
18	28.04.14	21,2	21,2	21,2
19	05.05.14	20,0	24,0	24,0
20	12.05.14	19,0	24,0	24,0
21	19.05.14	18,0	24,0	24,0
22	26.05.14	17,0	24,0	24,0
23	02.06.14	16,0	24,0	24,0
24	09.06.14	15,0	24,0	24,0
25	16.06.14	14,0	24,0	24,0
26	23.06.14	13,0	24,0	24,0
27	30.06.14	12,0	24,0	24,0
28	07.07.14	11,0	24,0	24,0
29	14.07.14	10,0	24,0	24,0
30	21.07.14	9,0	24,0	24,0
31	28.07.14	7,8	24,0	24,0
32	04.08.14	6,5	24,0	24,0
33	11.08.14	4,7	24,0	24,0
34	18.08.14	4,3	24,0	24,0
35	25.08.14	4,0	24,0	24,0
36	01.09.14	4,0	24,0	24,0
37	08.09.14	4,0	24,0	24,0
38	15.09.14	4,0	24,0	24,0
39	22.09.14	4,0	24,0	24,0
40	29.09.14	4,3	24,0	24,0
41	06.10.14	4,7	24,0	24,0
42	13.10.14	6,5	24,0	24,0
43	20.10.14	7,0	24,0	24,0
44	27.10.14	7,8	24,0	24,0
45	03.11.14	9,0	24,0	24,0
46	10.11.14	9,5	24,0	24,0
47	17.11.14	10,0	24,0	24,0
48	24.11.14	11,0	24,0	24,0
49	01.12.14	11,5	24,0	24,0
50	08.12.14	12,0	24,0	24,0
51	15.12.14	13,0	24,0	24,0
52	22.12.14	14,0	24,0	24,0
1	29.12.14	15,0	24,0	24,0
2	05.01.15	16,0	24,0	24,0
3	12.01.15	17,0	23:30	24,0
4	19.01.15	18,0	20:00	24,0
5	26.01.15	19,2	17:00	24,0
6	02.02.15	20,7	14:30	24,0
7	09.02.15	23,0	11:30	24,0
8	16.02.15	24,0	09:00	24,0
9	23.02.15	24,0	06:00	24,0
10	02.03.15	24,0	04:00	24,0
11	09.03.15	24,0	06:00	24,0
12	16.03.15	24,0	09:00	24,0
13	23.03.15	24,0	11:30	24,0
14	30.03.15	24,0	14:30	24,0
15	06.04.15	24,0	17:00	23:30
16	13.04.15	24,0	20:00	20:00
17	20.04.15	24,0	23:30	17:00
18	27.04.15	24,0	24:00	14:30
19	04.05.15	24,0	24:00	11:30
20	11.05.15	22,5	24:00	09:00
21	18.05.15	21,2	24:00	06:00
22	25.05.15	20,0	24:00	04:00
23	01.06.15	19,0	24:00	06:00
24	08.06.15	18,0	24:00	09:00
25	15.06.15	17,0	24:00	11:30
26	22.06.15	16,0	24:00	14:30
27	29.06.15	15,0	24:00	17:00
28	06.07.15	14,0	24:00	20:00
29	13.07.15	13,0	24:00	23:30
30	20.07.15	12,0	24:00	24:00
31	27.07.15	11,0	24:00	24:00
32	03.08.15	10,0	24:00	24:00
		Fargekode:		
		"Gytetidsregulering":		
		Forventet gyteperiode:		



Figur 15. Temperatur i forsøksperioden.

En kunne etter hvert i forsøket identifisere kjønn basert på fargeforskjeller. Siden all fisk var ID-merket kunne en da sortere datasettet i forhold til kjønn og gjøre kjønnsavhengige analyser av vekstdataene. Forsøket ble kombinert med AP 2.2 ("Lysstimulering av vekst hos stamfiskrekrutter") som beskrev den vekststimulerende effekten av kontinuerlig lys (LD24:0) i den første perioden av forsøket.

### Resultater og diskusjon:

Hos rognkjeks blir hannfisken rød når den kjønnsmodner og nærmer seg gyting. En identifiserte derfor kjønn basert på visuell vurdering av farge og gattåpning hos hann- og hunnfisk. Bruken av farge som indikator for kjønn er subjektiv og forbundet med usikkerhet, men samme fisk ble identifisert som samme kjønn ved flere tidspunkt, samt ved forsøksavslutning ved at all fisk ble avlivet og gonader undersøkt (Tabell 5). Basert på subjektiv vurdering av farge så en tidlig kjønnsmodning på hannfisken (fra september), uavhengig av lysregime, mens hunnfisken begynte å bygge seg opp fra februar, fem mnd. seinere enn hannfisken. Andelen fisk identifisert som hunnfisk ved gyting, vurdering av gattåpning eller undersøkelse av gonader ved forsøksslutt var størst i UT3.

Tabell 5. Observasjon av fisk (antall) fordelt på kjønn i de forskjellige lysgruppene ved forskjellige tidspunkt i forsøksperioden. Dataene for hver gruppe er summen fra begge replikatene.

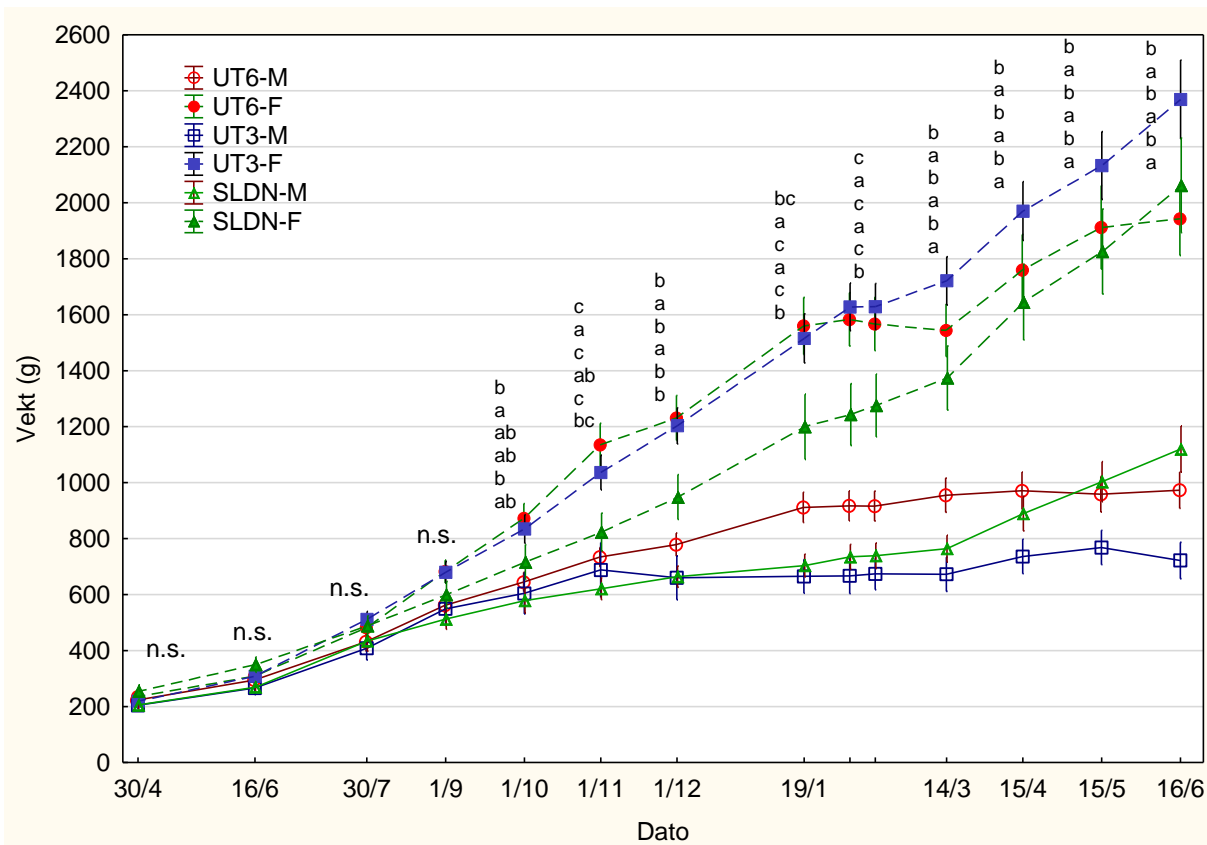
Dato	UT6-M	UT6-F	SLDN-M	SLDN-F	UT3-M	UT3-F
01.sep	6		10		3	
01.okt	6		20		6	
06.feb	20	30	27	31	15	43
15.mai	25	19	26	19	11	34
16.jun	25	18	25	20	12	36

I første del av forsøket frem til september så en ingen klar respons på lys eller forskjeller i vekst mellom kjønnene (Figur 16). Fra oktober så en respons på kontinuerlig lys hos hunnfisk i form av økende vekst sammenlignet med fisk på simulert naturlig lysregime (SLDN). Slik respons på lys var ikke observert hos hannfisk på noen av lysregimene, men det var en utflating av vekst sammenlignet med hunnfisk.

En slik kjønnsavhengig respons på lys og kjønnsdifferensiert vekst har en også på kveite, hvor effekten av lys er langt tydeligere for hunnfisk enn for hannfisk. Kjønnsmodning påvirker veksten, og det ble derfor spekulert i om kjønnsmodningen gjorde at effekten av kontinuerlig lys på vekst uteble hos hannfisk. Dette kan også være tilfelle for rognkjeks siden en allerede fra veiing 1. september, samme tidspunkt som veksten begynte å stagnere, så de første tegnene på kjønnsmodning hos hannfisken i alle gruppene (basert på observasjon av fargeforandringer på fisken). Hannfisken med kjønnsdrakt hadde også melke (ble testet med stryking av fisken). Kjønnsdrakt på hunnfisken så en først fra 6. februar, i alle gruppene.

Den kjønnsdifferensierte veksten hos rognkjeks kan derfor være et resultat av tidlig kjønnsmodning hos hannfisken, siden veksten til hannfisk stagnerer med modning (som sett på kveite). Synlig kjønnsmodning på hannfisken så ut til å starte ved 600-800 g og ved ca. 1600 g for hunnfisken. Disse hovedtrekkene samsvarer også med rognkjeks i naturen der hannfisken kjønnsmodner og gyter ett år tidligere og ved en mindre størrelse enn hunnfisken.

For hunnfisken økte veksten med økende daglengde. I perioden hvor naturlig lys (SLDN) hadde avtakende eller kort daglengde (ca. juni-januar, Figur 14) var veksten raskest ved kontinuerlig lys (LD24:0), men ettersom daglengden øket på SLDN økte også veksten (fra januar), og fisken på SLDN hadde ved siste veiing 16. juni tatt igjen UT3 og UT6 (Figur 16). Dette kan også delvis skyldes redusert vekst for UT3 og UT6 pga. kjønnsmodning og gytingen (Figur 17), mens det ikke ble funnet gyteklare fisk på SLDN.



Figur 16. Kjønnsspesifikk vekst hos rognkjeks ved tre forskjellige fotoperiode (UT6, UT3 og SLDN). M=hannfisk, F=hunnfisk. Vertikale linjer mellom punktene indikerer standard feil (SEM). Forskjellige bokstaver ved hvert veietidspunkt indikerer signifikante forskjeller i vekt mellom gruppene (2-veis ANOVA etterfulgt av Newman-Keuls post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Den tidlige gytingen på UT6 (1. feb-3. mars, Figur 17) mens fisken fremdeles var på kontinuerlig lys er vanskelig å forklare siden en forventet at kontinuerlig lys ville "nullstille" eller utsette kjønnsmodningen. En hadde også forventet at SLDN ville gyte under et vårregime som startet ved ca. 17 timers daglengde, men ingen fisk gyte på SLDN. Dette tyder på at kjønnsmodning og gyting ikke er styrt av lys alene og at en ikke kjenner alle bakenforliggende årsaker til kjønnsmodning hos rognkjeks.

Et forhold som kan ha spilt inn for SLDN og som bør undersøkes nærmere er størrelse. Da SLDN gikk fra kontinuerlig lys til simulert naturlig lys fra begynnelsen av forsøket fikk den gradvis avtakende daglengde. Dette utgjorde høstsignalet som ga fisken informasjon om sesong og mulighet for å styre gytesesongen, som var forventet påfølgende vår. Mens UT3 og UT6 fikk et slikt signal ved ca. 1600 g var hunnfisken på SLDN kun ca. 300-600 g. Teorien rundt styring av kjønnsmodning sier at fisken må ha en minimums- størrelse eller ernæringsmessig status på et bestemt tidspunkt eller stadium i modningsforløpet for å være i stand til å respondere på et lyssignal (fotoperiode) eller andre signal den styrer etter. Størrelse er derfor en premissgiver for kjønnsmodning. Det kan derfor tenkes at hunnfisken i SLDN utsatte gytingen fordi den ved "bestemmelsestidspunktet" for modning ikke hadde oppnådd kritisk størrelse for å gyte den påfølgende våren.

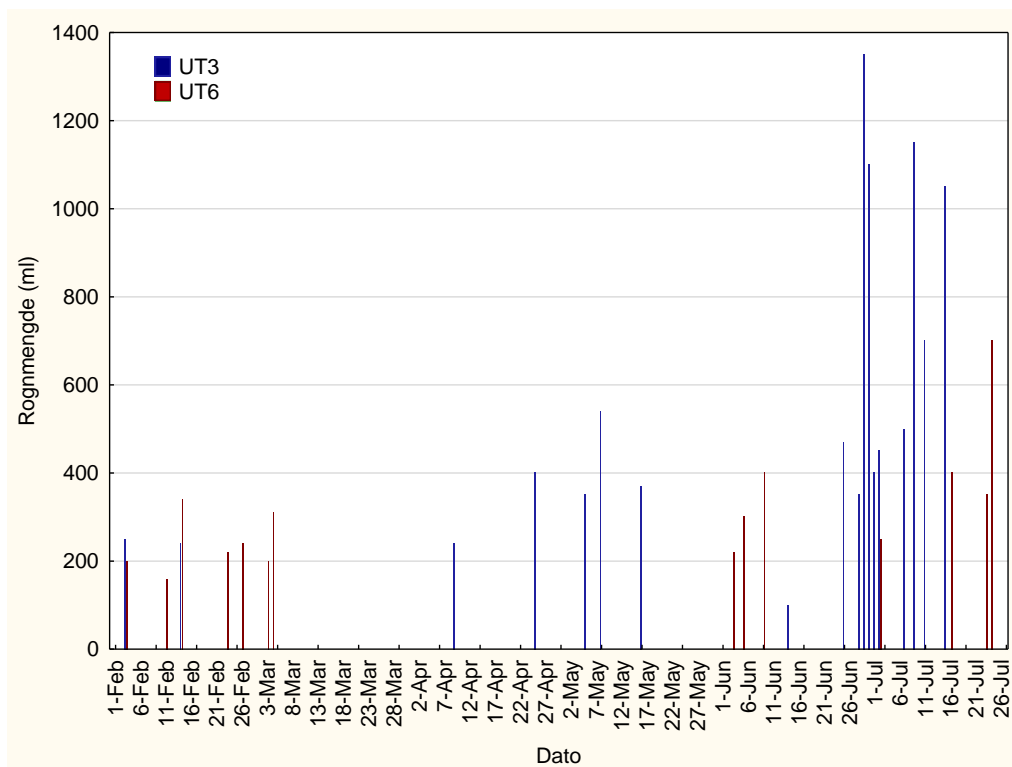
En annen faktor som kan ha spilt inn er temperatur. Siden temperaturen i forsøket ikke var konstant, men varierte med sesong (*Figur 7*), kan det tenkes at lysregimer eller "høst-vår signal" som blir gitt under andre temperaturregimer enn i naturen kan svekke effekten av lyssignalet. Dette er tilfelle for SLDN som var fremskyndt med 3 mnd. i forhold til naturlig lysregime og UT6, som fikk avtakende daglengde ("høstsignalet") i april under økende temperatur (retningen på lys og temperatur i motfase). Kun UT3 fikk lys- og temperatursignalet i fase (daglengde og temperatur avtok samtidig) slik fisken opplever i naturen og kan derfor ha opplevd et tydeligere sesonnsignal enn de andre gruppene.

Figur 17 viser gyteforløpet og mengde rogn (strøket eller gytt i kar) for UT3 og UT6, med 28 gytende hunnfisk i UT3 (10360 ml) og 20 i UT6 (3240 ml). Selv om det var sporadiske gytninger i både UT3 og UT6 i februar og april – juni, var det en markert gytetopp for UT3 i juni/juli (*Figur 17*) ca. 6 mnd. etter starten på lyssignalet (overgang fra kontinuerlig lys til avtakende daglengde,

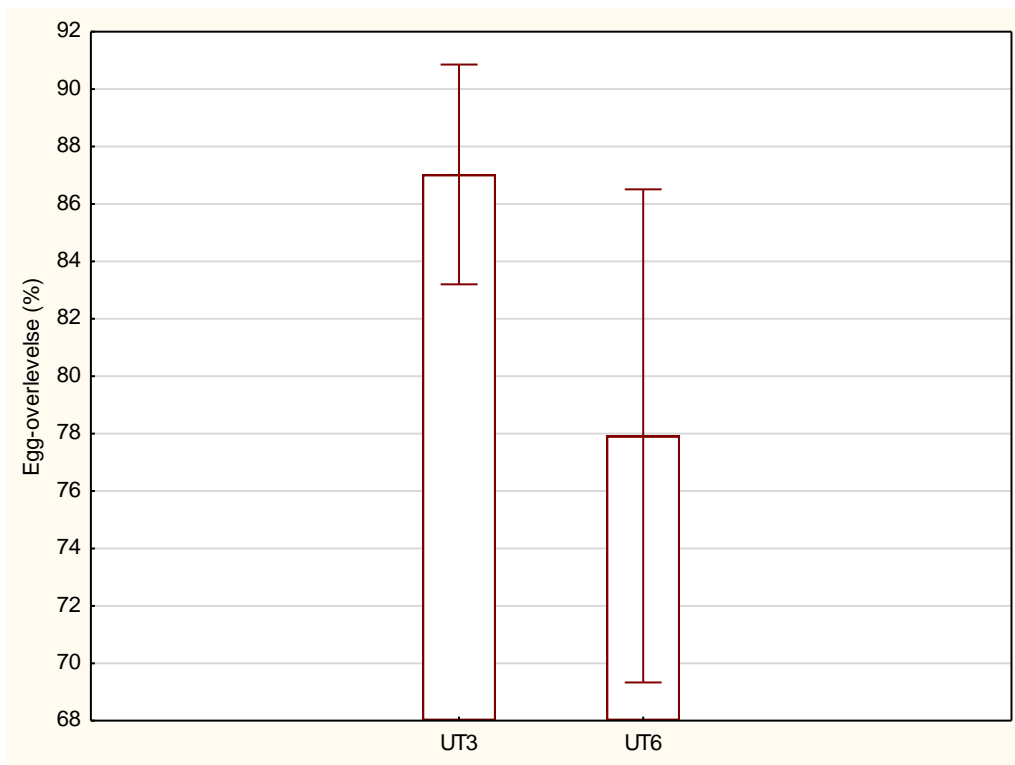


Tabell 4). Dette var tre mnd. forsinket i forhold til forventet gyting i april. Grunnen til forsinket gyting kan være at lyssignalet (høst-vår regimet) som naturlig går over 6 mnd. i forsøket var komprimert til 3 mnd. Selv om fisken oppfattet lyssignalet så den altså ut til å trenge 6 mnd. på klargjøring til gyting. Det kan også forklare hvorfor en ikke klarte å fanget opp gytetoppen på UT6 (Figur 17), som i forhold til denne teorien skulle kommet fra oktober (etter at forsøket ble avsluttet).

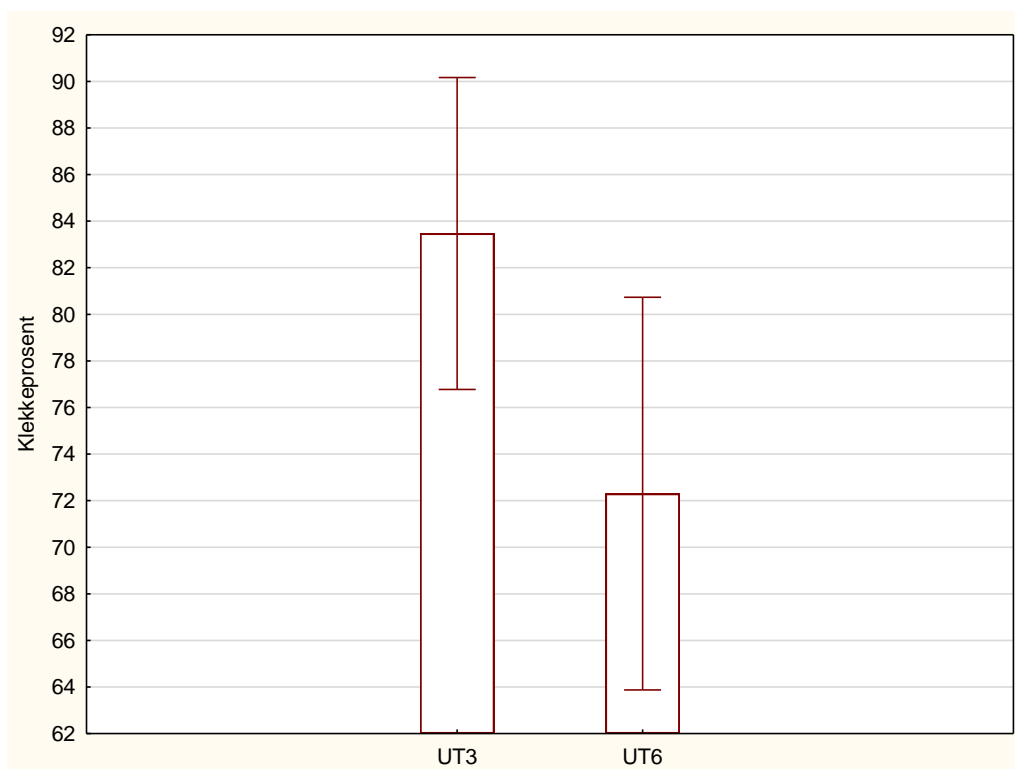
Normalt lå størrelsen på gytebatchene på 200 – 500 ml. Egg-utbyttet fra UT3 var tre ganger større enn fra UT6, muligens fordi en fanget opp gytetoppen til UT3 og ikke UT6. Generelt var fekunditeten for hunnfisken i UT6 lavere enn i UT3, muligens fordi gytetoppen i UT6 ikke ble fanget opp (forsøket ble avsluttet 26. juli). Det var ingen forskjeller i egg-overlevelse (%) og klekkeprosent mellom de to lysgruppene hvor det var gyting (Figur 18).



Figur 17. Gytetidspunkt og mengde egg gytt (ml) hos rognkjeks på tre forskjellige lysregimer (UT6, UT3 og SLDN).



Figur 18. Overlevelse på egg under inkubering for gruppe UT3 og UT6. Vertikale linjer på søylene indikerer 95 % konfidensintervall.



Figur 19. Klekkeprosent hos gruppe UT3 og UT6. Vertikale linjer på søylene indikerer 95 % konfidensintervall.

## Konklusjoner:

1. Effekten av de testede lysregimene for styring av gytetidspunkt var tydeligere for hunnfisk enn for hannfisk, hvor hannfisk startet gyting ved ca. 600-800 g, uavhengig av lysregime.
2. Gyting hos hunnfisk i UT3 skjedde 6 mnd. etter overgang fra kontinuerlig lys til et høst-vår regime komprimert til 3 mnd. Dette tyder på at rognkjeks trenger 6 mnd. til å forberede seg til gyting.
3. Men sporadisk gyting på hunnfisken ved ca. 1600 g, før forventet gytetidspunkt, tyder på at kjønnsmodning og gyting ikke er styrt av lys (fotoperiode) alene og at en ikke kjenner alle bakenforliggende årsaker til kjønnsmodning hos rognkjeks.
4. En faktor som kan spille inn er størrelse. Størrelse som premissgiver for kjønnsmodning og forskjeller i størrelse ved kritisk tidspunkt hvor fisken bestemmer seg for å kjønnsmodne er en mulig forklaringsmodell for forskjellene i respons på de forskjellige lysregimene.
5. En annen faktor som kan spille inn er temperatur. Siden temperaturen i forsøket ikke var konstant, men varierte med sesong, kan det tenkes at lysregimer eller "høst-vår signal" som skjer under andre temperaturregimer enn i naturen kan svekke effekten av signalet.
6. Betydningen av størrelse og temperatur ved styring av gytetidspunkt hos rognkjeks bør undersøkes nærmere.

## AP 4.1. Kartlegge om rognkjeks er porsjonsgyter eller ikke

Fagansvarlig: Nofima AS v/ Ingrid Lein

Resultatmål: Klarlegg om rognkjeks bør strykes flere ganger i løpet av en sesong eller ikke.

Det har vært uklart om rognkjeks er en porsjonsgyter som f.eks torsk og kveite som gyter mange porsjoner per sesong. Det ble derfor gjort en test hvor 6 par, dvs. en hun og en han ble satt i hvert av 6 kar. Fire ganger daglig ble det sjekket om det hadde forekommet gyting. Ved gyting ble vekten av rogn registrert. Resultatene er vist i Tabell 1. nedenfor. Det ble registrert gjentatt gyting, dvs. to porsjoner i halvparten av karene. I to kar ble det registrert en gyting mens det ikke forekom gyting i det ene karet.

Intervallene mellom gytingene varierte fra 7-11 dager, noe som er mye lengre enn det en finner hos torsk, kveite og piggvar som har intervaller på 2-4 dager.

I 2016 har vi i regi av FHF-prosjektet Ren rogn tatt ut rogn fra 10 hunnfisk ved å åpne fisken og tømme gonadene. Så langt ser det ut til at den ene gonaden (venstre) tømmes først, og at den andre modnes senere.

*Tabell 1. Registrerte gytinger hos enkeltpar. Vekt (g) per porsjon er vist i skraverte felt. Temperatur og oksygenmetning i perioden er vist i de to kolonnene til høyre.*

Dato	Tank nummer						Temperatur °C	Oksygen (%)
	1	2	3	4	5	6		
22.mai								
23.mai							7,6	>97
24.mai							7,6	>94
25.mai		337					7,6	>89
26.mai							7,5	>91
27.mai							7,4	>91
28.mai				464			8,0	>91
29.mai						338	7,6	>86
30.mai	537							
31.mai								
01.jun		520					7,8	>89
02.jun							7,7	>91
03.jun							7,7	>97
04.jun							8,5	>93
05.jun				363			8,6	>90
06.jun								
07.jun								
08.jun								
09.jun					301		8,9	>90
10.jun	171						9,3	>93
Sum rogn (gram)	708	857		827	301	338		

### Konklusjon:

Så langt ser det ut til at rognkjeks gyter 1-2 porsjoner per sesong med relativt langt intervall mellom hver gyting.

## AP 4.2. Utvikling av metodikk for stryking av rogn og melke

Ansvarlig: Nofima AS v/ Ingrid Lein

Resultatmål: Utvikle metode for stryking av rogn av god kvalitet basert på utvikling av genitalieporen hos hunnfisk.

### Status

Det har vært strøket mange hunnfisk gjennom sesongen, og ut fra disse erfaringene, og erfaring fra andre porsjonsgytere som kveite, torsk og piggvar kan en gi noen anbefalinger. Hunfisken bør ikke strykes før genitalieporen er svullen og rødlig. Fordi rognkjeks er en porsjonsgyter er det stor risiko for å stryke rogn som ikke er ferdig med sluttmodningen dersom en stryker hunfisken for tidlig (Figur 1a). Sluttmodningen av rogn skjer i løpet av timer, men er en viktig prosess fordi oocytene tar opp mye vann fra rognvæska i løpet av denne perioden, og det skjer også en endring i ionesammensetning i eggene i løpet av denne prosessen. Hos kveite har en sett at en kan oppnå høy befruktning på rogn som er strøket for tidlig, men at klekkeprosenten reduseres, og at andel larver med deformiteter øker. Figuren nedenfor viser rognkjeks ulike utviklingstrinn (a og b), og gangen i strykingen. Det er i regi av prosjektet utviklet en protokoll for stryking av rogn og melke, og befruktning. Denne er også oversatt til engelsk etter forespørsler fra Storbritannia.



Figur 1. Bildene viser ulike utvikling på gonadeporen (a og b), og gangen i stryking av rogn fra rognkjeks.

*Anbefalinger ved stryking av rogn fra rognkjeks*

1. Følg utvikling av gonadeporen (gattet), velg fisk som har svullent, og ofte rødlig gatt (b)
2. Bruk engangshansker for å unngå å skade skinnet på fisken
3. Tørk gattåpningen med tørkepapir for å unngå at det kommer sjøvann i rogn (c). Sjøvannet kan aktivere egget slik at det sveller og stenger åpningen hvor spermien skal entre egget (microphylen), og dermed hindre befruktning.
4. Det kan være nødvendig å gi et lett trykk i gattåpningen for at hinnen som stenger den skal åpnes. NB! Det skal ikke brukes makt!! (d)
5. Når fisken er klar skal rogna renne lett ut av fisken. Før rogn bak mot gonaden til det slutter å renne rogn (e)
6. Når fisken er ferdig strøket er den helt tom, det er bare skinnet med et tynt muskellag som dekker bukhulen (f).

## AP 4.3. Uttesting av temperaturindusert sluttmodning

<b>Fagansvarlig:</b>	Akvaplan-niva AS v/ Thor Jonassen
<b>Prosjektgruppe:</b>	Ane Nytrø, Thor Arne Hangstad, Armand Moe Nes, Thor Jonassen, Albert Imsland
<b>Sammendrag:</b> Et innledende forsøk ble gjennomført for å få en pekepinn på hvordan en rask temperaturøkning påvirker gyteforløpet. En ville også undersøke risikoen for spontan gyting i kar og eventuelle negative effekter på egg- og larvekvalitet. En rask temperaturøkning fra ca. 4,7 til 9,5 °C for gytemoden rognkjeks fremskynder gytingen med 1-2 dager og gir en noe mer synkron gyting. Men, denne temperaturøkningen kan ha negativ effekt på egg-diameter, befruktningsprosent og larvestørrelse ved klekking.	

### Bakgrunn:

For å redusere håndteringen av stamfisk (undersøkelse av gytestatus) og andre praktiske grunner kan det være ønskelig med en synkronisert sluttmodning av stamfiskgrupper. Bruk av miljøstimuli, for eksempel temperatur, kan være et alternativ til metoder basert på hormonindusert sluttmodning (injisering av Gonadotropin Releasing Hormons (GnRHs)). Temperatur ble testet basert på at det i praktisk oppdrett var gjort erfaringer som tydet på at en plutselig temperaturøkning kunne sette i gang ovuleringen. På villfisk fanget i Lofoten i mars/april ved ca. 3-4 °C skjedde en relativ spontan og synkron gyting etter at fisken ble overført til 10 °C (pers med Dag Hansen, Arctic Cleanerfish).

Et innledende forsøk ble gjennomført for å få en pekepinn på hvordan en rask temperaturøkning påvirker gyteforløpet. En ville også undersøke risikoen for spontan gyting i kar og eventuelle negative effekter på egg- og larvekvalitet.

### Gjennomføring:

Villfanget gytemoden rognkjeks samlet inn i april 2014 ble holdt i kar på naturlig temperatur (ca. 4,7 °C) frem til 6. mai. Fisken ble individmerket. Ved forsøksstart kl. 8:00 den 6. mai ble fisken fordelt på to kar (6 m<sup>3</sup>) med 49 fisk (44 hunner og 5 hanner) i det ene karet (LT) og 50 fisk (44 hunner og 6 hanner) i det andre (HT). Kjønnsfordelingen var basert på vurdering av kjønnsdrakt (farge).

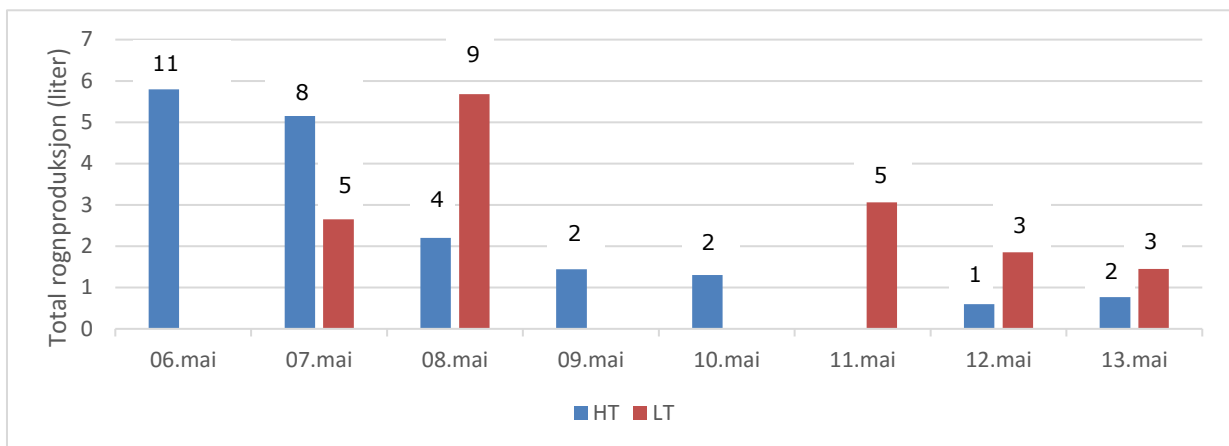
LT-karet fortsatte på lav temperatur (naturlig varierende fra ca. 4,7 – 5,0 °C), mens temperaturen i HT-karet ble gradvis økt fra 4,8 °C til 7,3 °C i løpet av ca. 2,5 timer, deretter videre økning til 8,5 °C etter ytterligere 3,5 timer og derfra gradvis til 9,5 °C i løpet av to dager. Deretter var temperaturen for HT stabil på ca. 9,5 °C. Rogn ble strøket og inkubert fra 6. til 13. mai. Inkuberingstemperatur var ca. 10 °C.

Det meste av fisken ble strøket, men noe rogn ble gytt i kar. Gyteforløpet og mengde egg produsert ble sammenlignet. Egg fra 15 forskjellige hunner fra hver gruppe ble inkubert. Egg-diameter, befruktningsprosent, egg-overlevelse, klekkeprosent og larvestørrelse ved klekking ble registrert.

## Resultater:

Fra HT (høy temperatur, ca, 9,5 °C) ble det strøket 30 batcher med egg med total rognmengde 17,46 liter og 6 batcher ble gytt naturlig i kar (3 stk. 6. mai og 3 stk. 7. mai). Fra LT (lav temperatur, 4,7-5,0 °C) ble det strøket 25 batcher med egg med total rognmengde 14,69 liter og 4 batcher ble gytt naturlig i kar (3 stk. 8. mai og 1 stk. 13. mai). Ingen fisk var gyteklar og strøket mer enn en gang i perioden.

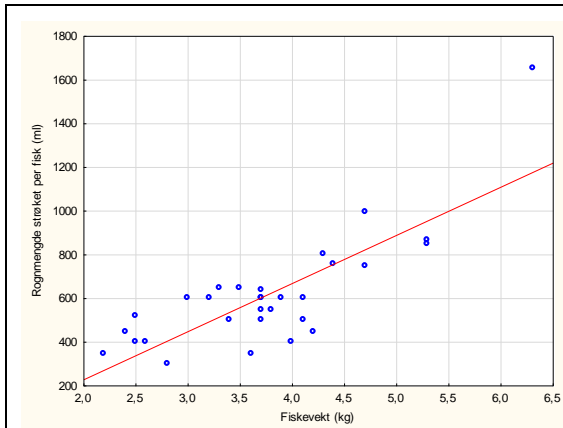
Mesteparten av rogn i HT ble strøket de første 3 dagene, mens rogn fra LT ble strøket dag 2, 3 og på slutten av perioden (Figur 20). 52 % av hunnfisken i HT (23 stk) og 32% av hunnfisken (14 stk) gytt de første tre dagene.



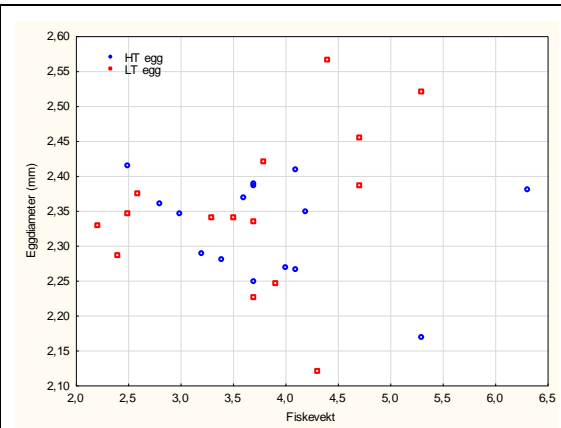
Figur 20. Eggproduksjon (liter) per gruppe (HT og LT) de første 8 dagene etter temperaturøkningen i HT (økning fra 4,7 til 9,5 °C). Tall over søylene indikerer antall fisk som er strøket.

Generelt ga større fisk høyere egg-utbytte ved stryking (lineær regresjon,  $p < 0,001$ ,  $r = 0,80$ ,  $r^2 = 0,64$ , Figur 21). Mest rogn (1,650 liter) ble strøket fra en fisk i HT på 6,3 kg. I LT ble det strøket 1,000 liter rogn fra en fisk på 4,7 kg. Fiskestørrelse påvirket ikke egg-diameteren (Figur 22).



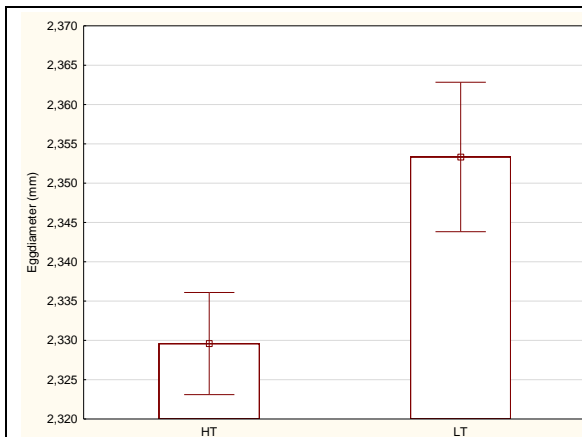


Figur 21. Rognproduksjon (strøket) som funksjon av fiskevekt, uavhengig av temperatur.

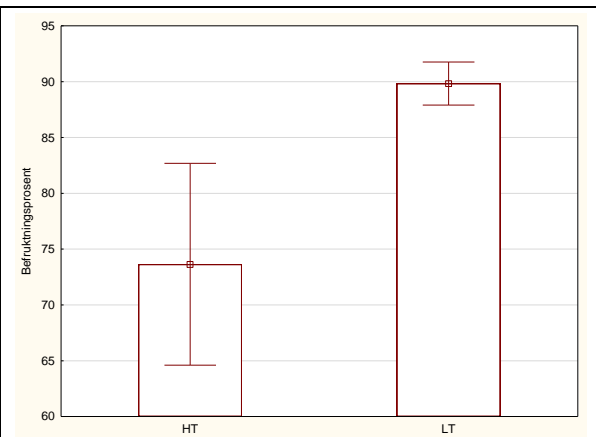


Figur 22. Variasjon i egg-diameter som funksjon av fiskevekt (kg) for temperatur-gruppene HT og LT.

Egg-diameteren var signifikant størst for LT-gruppen (LT: 2,35, HT: 2,33 mm, t-test,  $p < 0,05$ , Figur 23). Det var også høyere befruktningsprosent for LT-gruppen (LT: 89,8%, HT: 73,6%, t-test,  $p < 0,05$ , Figur 24).

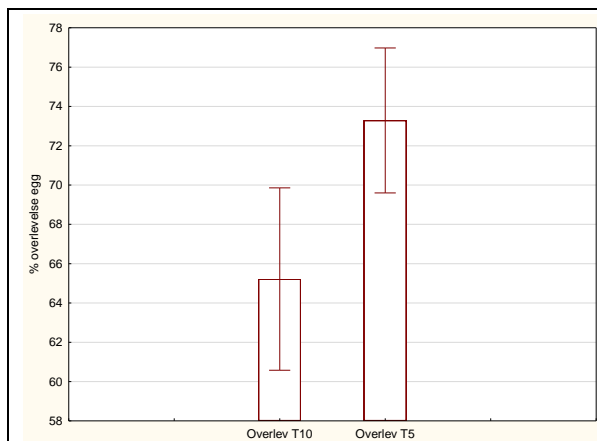


Figur 23. Forskjell i egg-diameter mellom de to temperaturgruppene HT og LT (basert på 10 egg fra 15 egg-batcher for hver av gruppene). Vertikal linjer indikerer standard feil (SEM).

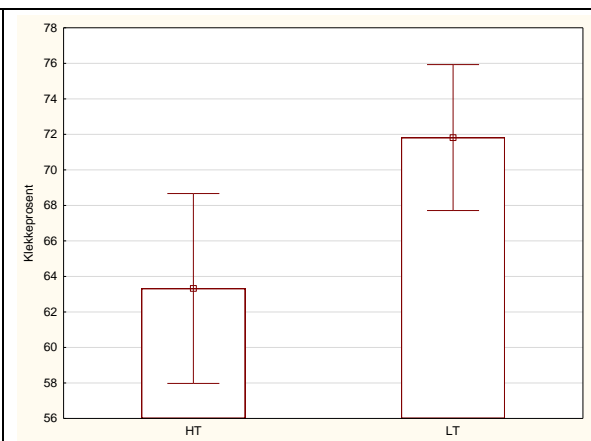


Figur 24. Forskjell i befruktningsprosent mellom de to temperaturgruppene HT og LT (basert på 10 egg fra 7 egg-grupper for HT og 15 egg-grupper for LT). Vertikal linjer indikerer standard feil (SEM).

Det var ingen forskjell i egg-overlevelse (Figur 25) eller klekkeprosent (Figur 26).

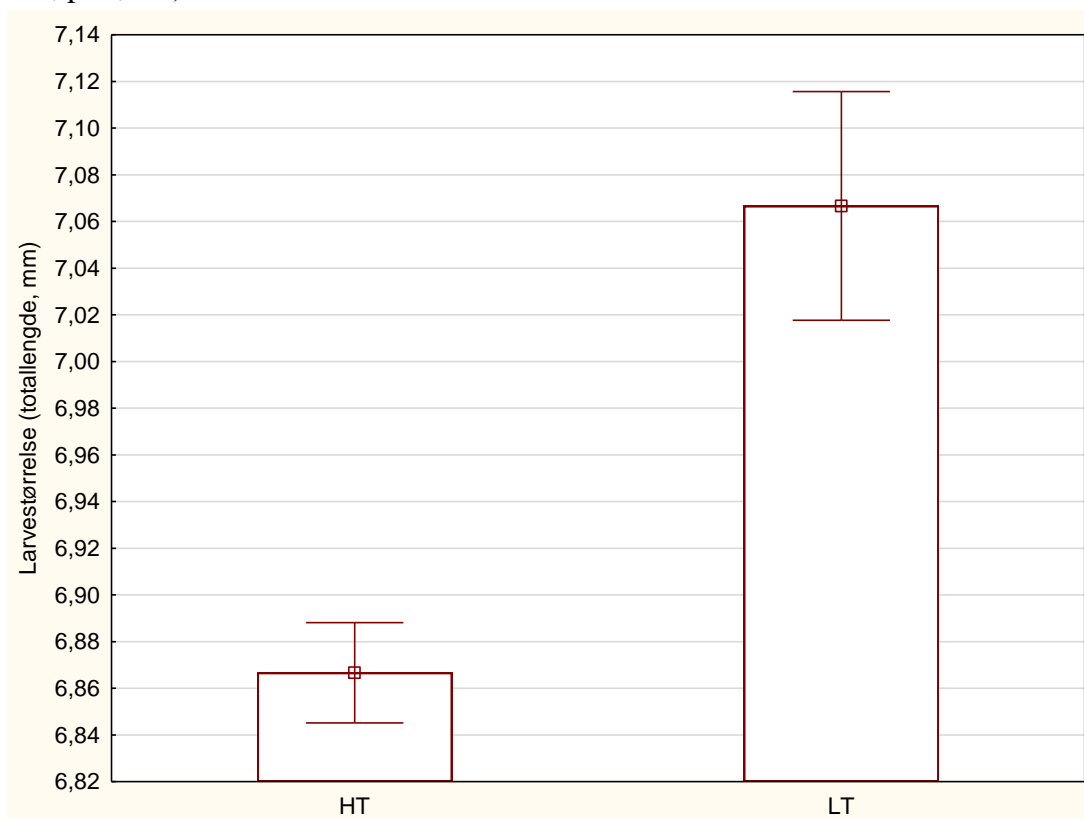


Figur 25. Forskjell i egg-overlevelse (%) mellom de to temperaturgruppene HT og LT (basert på 15 egg-batcher per gruppe). Vertikal linjer indikerer standard feil (SEM).



Figur 26. Forskjell i klekkeprosent mellom de to temperaturgruppene HT og LT (basert på 15 egg-batcher per gruppe). Vertikal linjer indikerer standard feil (SEM).

Larvene i LT-gruppen var signifikant større ved klekking (LT: 7,067 mm, HT: 6,867 mm, t-test,  $p < 0,001$ ).



Figur 27. Forskjell i larvestørrelse mellom de to temperaturgruppene (30 larver per replikat, 3 replikater for HT, 1 replikat for LT). Vertikal linjer indikerer standard feil (SEM).

### Konklusjoner:

En rask temperaturøkning fra ca. 4,7 til 9,5 °C for gytemoden rognkjeks fremskynder gytingen med 1-2 dager og gir en noe mer synkron gyting. Men, denne temperaturøkningen kan ha negativ effekt på egg-diameter, befruktningsprosent og larvestørrelse ved klekking.

## AP 4.4. Hormonindusert sluttmodning

Ansvarlig: Nofima AS v/ Ingrid Lein
-------------------------------------

Resultatmål: Utvikle metode for å synkronisere gyting hos rognkjeks.
--

### Status

Fordi rognkall vanligvis gir svært lite eller ingen rennende melke kan behandling med sluttmodningshormonet GnRH være en mulig metode for å hjelpe fisken å fullføre sluttmodningen, og dermed øke volumet av melke. Fordi få hanner gir rennende melke er det i dag vanlig å slakte hanfisk og dissekere ut gonaden for å få tilgang til spermier. Når en etter hvert begynner å bruke oppdrettet stamfisk i produksjonen vil det være ønskelig å utnytte hver han best mulig. Det er derfor ønskelig å kunne stryke melke fra hannene uten å måtte avlive fisken. Enkelte oppdrettere har også et ønske om å synkronisere gytingen hos hunnene bedre, spesielt ved bruk av lysstyring på oppdrettet stamfisk. Utvikling av metodikk for bruk av sluttmodningshormon er omfattende og ressurskrevende både i form av fisk og arbeidsmengde. I dette prosjektet er det derfor kun foretatt en innledende test hvor en benyttet det kommersielle produktet Ovaprim©.

Utvikling av en endelig metodikk for hormonindusert sluttmodning er et større arbeid. Aktiviteten i AP 4.4 må derfor anses som et innledende arbeid innen dette området.

### Gjennomføring

- 36 rognkaller ble individmerket med elektroniske merker, veid og sjekket for melke.
- Halvparten av fisken ble gitt en injeksjon med Ovaprim© mens den andre halvparten fikk en injeksjon med fysiologisk saltvann
- Fisken ble sjekket for melke etter 2 og 10 dager ved at den ble bedøvd, og deretter forsøkt strøket

### Resultat/diskusjon

Ved første gjennomgang var det 5 fisk som ga melke, men svært små mengder (dråper)

Ved de to siste gjennomgangene ga ingen av fiskene melke. Det var derfor ingen virkning av en enkelt dose med Ovaprim©. Det er ganske vanlig for flere arter at det er nødvendig med gjentatt behandling for å indusere sluttmodning, og ofte gis det en dobbel dose ved andre injeksjonsrunde. I en eventuell fortsettelse av arbeidet vil det derfor være aktuelt å foreta en gjentatt test hvor en følger et slikt opplegg.

### Konklusjon

- Injeksjon med enkel dose Ovaprim© ga ingen effekt på volum melke, eller antall hanner som slapp melke
- Flere tester, da med gjentatt og økt dose er nødvendig for å forvente positivt resultat

**Tabell 1.** Oversikt over hanner som ble injisert med Ovaprim© (farget område) eller fysiologisk løsning. Rennende melke er indikert med grønt.

Han nr.	Pit-tag	Vekt (g)	GnRh-injeksjon	Rennende melke		
				17. mars	19. mars	24. mars
1	036F1	740	0			
2	0ABEC	780	0			
3	0ECF6	650	0			
4	1064C	1030	0			
5	11F13	1050	0			
6	13B0D	1130	0			
7	299C5	1350	0			
8	375C3	800	0			
9	76C8E	580	0			
10	60848	1050	0			
11	C8BDE	760	0			
12	D0D63	1370	0			
13	FA744	710	0			
14	0542E	820	0			
15	02B75	1180	1			
16	09B7F	700	1			
17	105BC	740	1			
18	16F2B	1060	1			
19	1920B	970	1			
20	3A43F	660	1			
21	4EC3E	790	1			
22	769C8	1750	1			
23	BE80A	1070	1			
24	BEC77	650	1			
25	BEC83	1410	1			
26	CFC74	630	1			
27	D5C45	1330	1			
28	DEF75	570	1			

## AP 4.5. Forhold som kan påvirke eggkvalitet

<b>Fagansvarlig:</b>	Akvaplan-niva AS v/ Thor Jonassen
<b>Prosjektgruppe:</b>	Ane Nytrø, Thor Arne Hangstad, Armand Moe Nes, Thor Jonassen, Albert Imsland
<b>Sammendrag:</b>	
Basert på resultater fra forskjellige forsøk i prosjektet er det listet opp forhold som kan ha betydning for eggkvalitet og mulige konsekvenser.	

<b>Forhold</b>	<b>Betydning/konsekvens for eggkvalitet</b>	<b>Anbefaling</b>
Fiskebakgrunn: Vill eller oppdrettet stamfisk	Egg fra oppdrettet rognkjeks har betydelig høyere nivåer av en rekke næringsstoffer sammenlignet med egg fra villfisk. Dette tyder på ernæringsmessig ubalanse hos oppdrettsfisk. Konsekvens på eggkvalitet usikker.	Nøytral/usikker
Fiskestørrelse (hunnfisk)	Stor fisk gir større og flere egg enn liten fisk.	Stor fisk å foretrekke
Lyshistorikk/lysstyring og sesongforskyvning	Lysstyring og sesongforskyvning ingen effekt eggoverlevelse eller klekkeprosent.	Nøytral
Temperatur under modning og gyting (lang tid)	Større egg (mm) fra fisk holdt på 5 °C sammenlignet med 10 °C 3 mnd. før gyting. Fisk ved 10 °C produserte mer egg.	Nøytral
Temperatur under gyting, korttidseksponeering	Signifikant større egg (mm), bedre befruktningprosent og større larver, samt klar tendens til bedre eggoverlevelse og klekkeprosent på egg fra fisk holdt på 5 °C sammenlignet med fisk overført fra 5 til 10 °C i løpet av 8 timer kort tid før gyting.	Unngå rask temperaturøkning før gyting
Inkuberingstemperatur	Inkubering på 5 °C ga større larver og lite deformiteter, men lav eggoverlevelse og klekkeprosent og lang inkuberingstid sammenlignet med høy temperatur og gradvis økt temp.	Inkubering ved temperaturgradient fra 5 til 10 °C over noen dager.

	<p>Inkubering på 10 °C ga høye eggoverlevelse og klekkeprosent, men mye deformiteter.</p> <p>Inkubering med temperaturgradient fra 5 til 10 °C over noen dager ga god eggoverlevelse, høy klekkesuksess, tidlig klekketidspunkt og lav larvedødelighet og lite larvedeformiteter</p>	
Befruktningsmetode: Kjølelagret eller frossen melke	Både cryopreservert melke og melke kjølelagret i 15 dager ga tilnærmet 100% befruktning.	Ved behov for lagring av melke er kjøling og frysing egnet.
Befruktningsmetode: Melkekonsentrasjon	Både cryopreservert melke og melke kjølelagret i 15 dager fortynnet 10-20 ganger ga 90-100% befruktning.	Ved lite tilgang på melke kan denne fortynnes uten redusert befruktning.

## AP 5.1. Metoder for separering av rogn før inkubering

Ansvarlig: Nofima AS v/ Ingrid Lein

Resultatmål: Utvikle en metode for separering av rognkjeksrogn som resulterer i god befruktning og klekking, og som gir mulighet for effektiv desinfisering av rogn. Separering av rogn vil også gi større frihet med hensyn til valg av inkuberingsmetode.

### Status

I 2014 ble det gjennomført innledende forsøk hvor en testet én behandling med protease før befruktning, og også tilsetning av melk. Proteasebehandlingen ga svært lovende resultat med befruktning på samme nivå som kontrollen, men med 50 % lavere klekking (se framdriftsrapport fra 2014). Behandling med melk hadde ingen effekt på klebrigheten på rogn. I 2015 ble aktiviteten derfor konsentrert rundt bruk av enzym, og optimalisering av konsentrasjon og behandlingstid.

### Del 1. Innledende test: Effekt av dose og virketid på klebrigheten hos rogn fra rognkjeks – ubefruktet rogn

I dette første forsøket ble effekten ulike konsentrasjoner og varigheter av behandling med protease på andel single egg undersøkt.

#### *Forsøksfaktorer*

- 6 konsentrasjoner av proteasen alkalase (0,5, 1, 2, 4, 8 og 10 %)
- 6 ulike behandlingstider (2,5, 5, 7,5, 10, 15, og 20 minutter)

Alle behandlinger ble gjort i petriskåler, og med ubefruktet rogn. 4 gjentak per behandling, dvs. totalt 144 petriskåler.

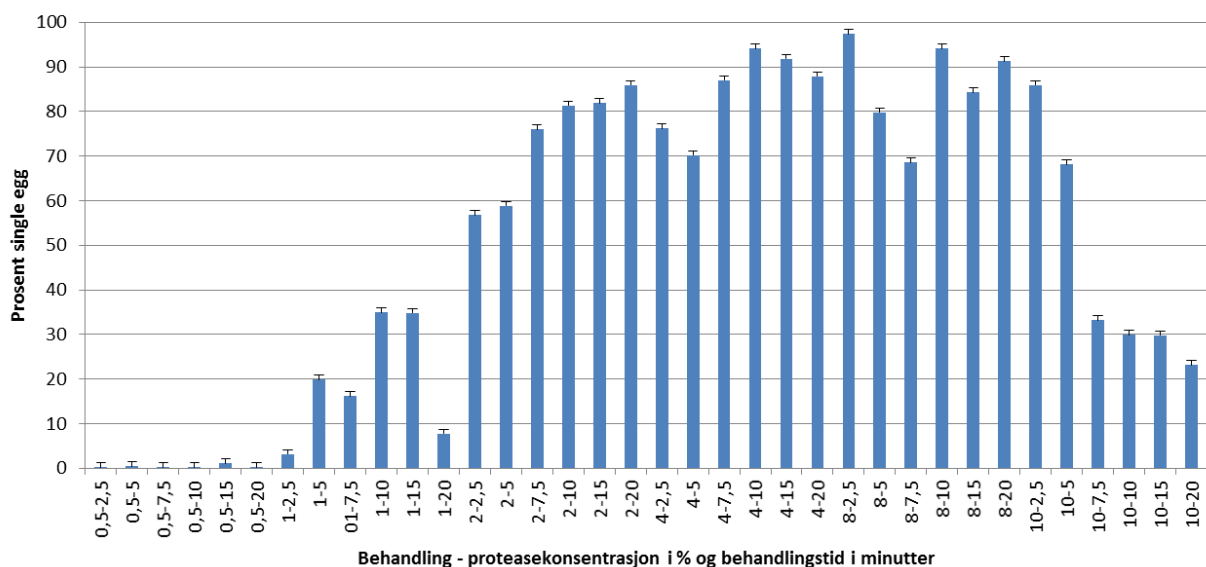
#### *Gjennomføring*

- Vi benyttet samme protease-løsning som i 2014 (Sigma-Aldrich Protease P4860-50 ML (>2,4 IU/ml).
- Det ble laget et stamløsning av protease som ble benyttet i forsøket.
- Rogn ble strøket fra en hunfisk, og oppbevart i kjølerom til forsøket startet
- Før forsøket ble alle petriskåler merket med behandling og gjentak nummer, og det ble gjort klar proteaseløsning til alle petriskålene
- På grunn av det store antallet petriskåler gjennomførte en behandling av to konsentrasjoner om gangen
- 1 ml rogn (120 egg) ble fordelt i hver petriskål
- Proteaseløsningene ble fordelt over rogn, og timer startet
- Etter at alarm hadde gått for hver behandlingstid ble rogn forsiktig helt over en tesil, og skylt med PBSs løsning (fysiologisk løsning)
- Petriskålene ble fylt med PBSs løsning, og satt i klekkeriet ved 8 °C til alle behandlinger var gjennomført
- Behandlingen ble gjentatt for alle 6 konsentrasjonene av protease

- Etter at alle behandlinger var ferdig ble hver petriskål undersøkt under lupe, og antall single egg og totalt antall egg ble talt. Dette ble brukt til å beregne prosent single egg for hver behandling og gjentak

## Resultater

Det ble funnet samspill mellom konsentrasjon av protease og behandlingstid, dvs. at prosent single egg rangerer seg forskjellig for de ulike behandlingene. Dette kan vises ved at behandlingstid 2,5 % minutter har ga lav andel single egg ved alle proteasekonsentrasjoner under 8 %. Den ga best resultat ved 8 og 10 % protease. 20 minutter behandlingstid fungerte best ved intermediære konsentrasjoner, dvs. 2, 4 og 8 %. Resultatene er vist i Figur 1. Figuren viser at de beste behandlingene ga mer enn 90 % single egg, og at disse ligger i det intermediære konsentrasjonsområdet. I praktisk bruk vil en være interessert i å bruke så lave konsentrasjoner som mulig for å redusere kostnadene, og så kort behandlingstid som mulig for å redusere arbeidsforbruket. De to laveste konsentrasjonene av protease (0,5 og 1 %) ga ingen effekt på klebrigheten av eggene. Den høyeste konsentrasjonen (10 %) ga også lavere andel single egg. Konsentrasjonene 2, 4 og 8 % ble derfor valgt ut for å bli testet i oppfølgingsforsøk med befruktning av egg.



Figur 1. Prosent single egg ved ulike kombinasjoner av proteasekonsentrasjon og behandlingstid.



## **Del 2. Effekt av dose og virketid på klebrigheten, befruktning og klekking**

Målet med dette forsøket var å teste hvordan de beste kombinasjonene fra den innledende forsøket påvirker befruktnings- og klekkeprosent.

### **Forsøksfaktorer**

- 3 proteasekonsentrasjoner (2, 4 og 8 %)
- 5 varigheter av behandling (2,5, 5, 10, 15 og 20 minutter)
- 3 hunfisk, 2 gjentak per hunfisk, dvs. totalt 6 gjentak per behandling

### **Gjennomføring**

- I oppfølgingsforsøket ble samme prosedyre som i forsøket over fulgt fram til og med skylling av roгна med PBS løsning.
- Deretter ble 20 µl melke blandet med 2 ml filtrert sjøvann og fordelt over roгна
- Etter 5 minutter ble roгна vasket tre ganger med finfiltrert sjøvann
- Etter vasking ble finfiltrert sjøvann med en svak antibiotikaløsning tilsatt i petriskålene
- Vannet ble skiftet to ganger per uke

### **Resultat**

Etter kort tid ble det observert at eggene ikke så normale ut, det var ikke tegn til fosterutvikling. Etter 120 døgngrader når roгна skulle nådd øyeroгnstadiet var det ikke tegn til befruktning. Flere av behandlingene i dette forsøket var i samme område som den som ble benyttet i 2015 (5 % protease i 5 minutter). Den eneste forskjellen var at Ringers løsning var byttet med PBS som er en annen fysiologisk løsning. En antok derfor at det var dette som førte til at en mislyktes med å befrukte roгна. Det ble derfor bestemt at en skulle kjøre en andre runde hvor en gikk tilbake til Ringers løsning.

### **Konklusjon**

Det var samspill mellom tid og konsentrasjon, men effekten av konsentrasjon var størst. Intermediære konsentrasjon av protease (2,4 og 8 %) ga høyest andel single egg. Fordi bildet for effekt av tid var noe uklar valgte en å gå videre med et bred variasjon for behandlingstid.

## **Effekt av dose og virketid på klebrigheten, befruktning og klekking**

Målet med forsøket var det samme som i Del 1.

### **Gjennomføring**

Forsøket ble gjennomført etter samme plan som 5.1, men med roгна fra 2 hunfisk, og med PBS som fysiologisk løsning i stedet for Ringers løsning.

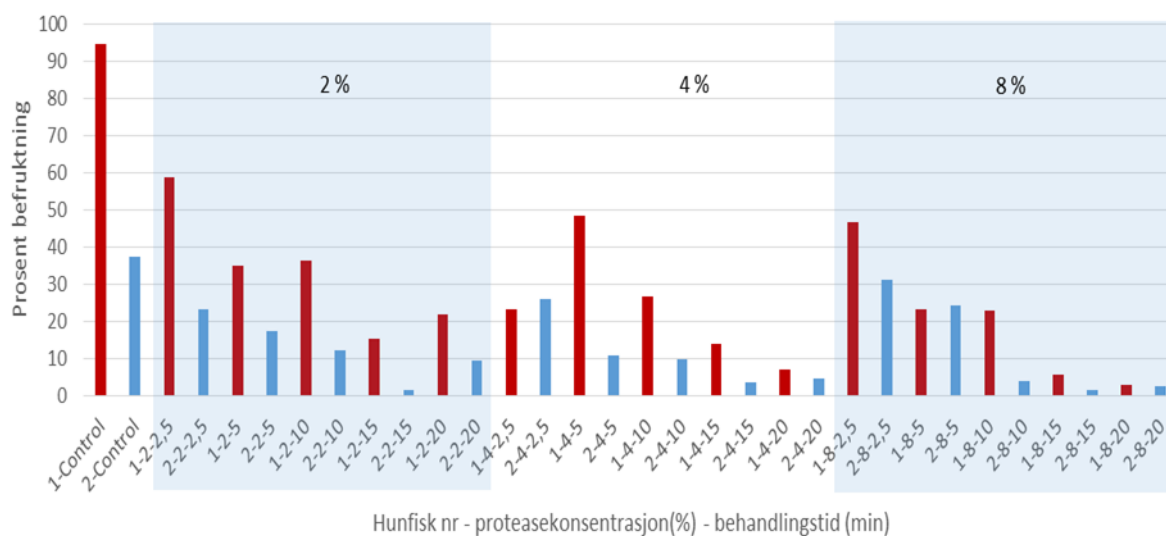
### **Resultat/diskusjon**

Figuren nedenfor viser hvordan befruktningsprosent ble tatt opp på foto av petriskåler når roгна var nådd øyeroгnstadiet.



Figur 1. Eksempel på bestemmelse av befruktingsprosent. Telling ble gjort på foto av petriskål hvor området med rogn ble forstørret (høyre). Antall befruktet og totalt antall rogn ble talt og brukt i beregningen.

Resultatene fra dette forsøket er ikke behandlet statistisk ennå, det er derfor bare gjennomsnittstall som vises i figuren. Det var stor forskjell i befruktning mellom rogn fra de to hunfiskene (røde og blå stolper i figur 2), men rogn fra hunfisk 1 i kontrollgruppen hadde >90 % befruktning. Dette viser at rogn fra denne fisken hadde potensial for god befruktning. All behandlet rogn hadde betydelig lavere befruktning enn kontrollen.



Figur 2. Prosent befruktning i kontrollgruppen, og behandlede grupper. Betegnelsene på X-aksen viser hunfisk nr, proteasekonsentrasjon og behandlingstid.

Best resultat blant behandlet rogn ble oppnådd med 2 % protease i 5 minutter. Denne behandlingen ga i underkant av 60 % befruktning. Verken rogn i kontrollgruppen eller behandlet rogn klekket. Dette mistenker vi skyldes at dette ikke skyldes rognkvaliteten, men at rogn sto uten bevegelse. I andre forsøk med svært god befruktning og utvikling på rogn var det også dårlig klekking. I forsøk som ble gjort i 2014 ble rogn satt i en shaker som gjorde at rogn beveget seg hele tiden, og da ble det oppnådd god klekking. Det er kjent at en del arter må ha bevegelse for å bli stimulert til klekking, og det kan se ut til at rognkjeks er en slik art. Det kan se ut som om proteasen skader eggmembranen, og dermed hindrer befruktning. Det må

vrderes om en skal teste en metodikk som ble utprøvd for berggylt hvor en behandlet eggene med protease etter befruktning.

### **Konklusjon**

- Alle behandlinger med protease ga redusert befruktning
- Proteasebehandlingen kan ha skadet eggmembranen

### **Del 4. Separering av rogn ved bruk av protease etter befruktning**

Basert på resultater fra arbeid utført av Bridie Grant ved Stirling University ble det våren 2016 gjennomført et forsøk hvor en behandlet ubefruktet rogn med protease etter at den hadde vært i kontakt med sjøvann, og utviklet limlag.

### **Forsøksfaktorer**

- Ubehandlet kontroll
- 5 proteasekonsentrasjoner (1, 2, 3, 4 og 8 %)
- 6 varigheter av behandling 2,5, 5, 10, 15 og 20 minutter)
- Blanding av rogn fra 3 hunnfisk, 3 gjentak per behandling

Totalt omfattet forsøket 108 petriskåler.

### **Gjennomføring**

- På grunn av det store antallet behandlinger ble en proteasekonsentrasjon testet i gangen
- 1 ml rogn (ca. 120 rogn) ble fordelt i hvert av 18 petriskåler
- 20 ml filtrert sjøvann ble deretter tilsatt til skålene – ventet 5 minutter for å være sikker på at rogn var klebrig
- Sjøvannet ble slått av før den aktuelle proteaseløsningen ble tilsatt, og timer startet
- Petriskålene ble beveget regelmessig på et rotasjonsbord under behandlingen
- Etter 5, 10, 15, 20, 25 eller 30 minutter etter tilsetning av protease ble eggene skylt i en tesil, og antall løse/klebrige egg ble talt opp

### **Resultat/konklusjon**

Det var ingen effekt av proteasebehandling etter at rogn var blitt klebrig, uavhengig av konsentrasjon og behandlingstid.

## AP 5.2. Konservering av melke

Ansvarlig: Nofima AS v/ Ingrid Lein

Resultatmål: Utvikle protokoller for kortidslagring av rognkjeksmelke (kjøleskap) og frysekonservering (flytende nitrogen) som gir god befruktning

### Del 1. Cryopreservering av melke fra rognkall

Målet var å videreutvikle metodikk fro cryopreservering av melke fra rognkall, og å undersøke om kvaliteten på melken påvirker befruktningsresultatet.

Den frosne melken som ble brukt i forsøket var hentet fra stamfisk hos Norland Rensefisk våren 2014. Rennende melke ble strøket fra tre fisk. Deretter ble gonadene fra de samme tre fiskene dissekert ut, most og fortynnet med AquaBoost® før den ble sendt til Cryogenetics på Hamar for frysing. Etter frysing ble nitrogentanken med melke sendt til Nofima på Sunndalsøra, og lagret over vinteren.

### Forsøksfaktorer

- Opphav spermier: strøket melke eller most gonade
- Type kryokonserveringsmiddel: A eller B fra Cryogenetics
- Hanfisk: 1, 2 og 3

Forsøksoppsettet er vist i Tabell 1. På grunn av en misforståelse var stråene med frossen melke for hanfisk nr. 2 blitt brukt til annet formål i 2014. Det er derfor en ubalanse i datasettet.

Tabell 1. Forsøksoppsett

Hann #	Uttak melke	Fortynningsvæske	Antall petriskåler	Ant egg	Volum melke
1	Gonade	A	2	120	50 µl
1	Gonade	B	2	120	50 µl
1	Strøket	A	2	120	50 µl
1	Strøket	B	2	120	50 µl
2	Gonade	A	2	120	50 µl
2	Gonade	B	2	120	50 µl
3	Gonade	A	2	120	50 µl
3	Gonade	B	2	120	50 µl
3	Strøket	A	2	120	50 µl

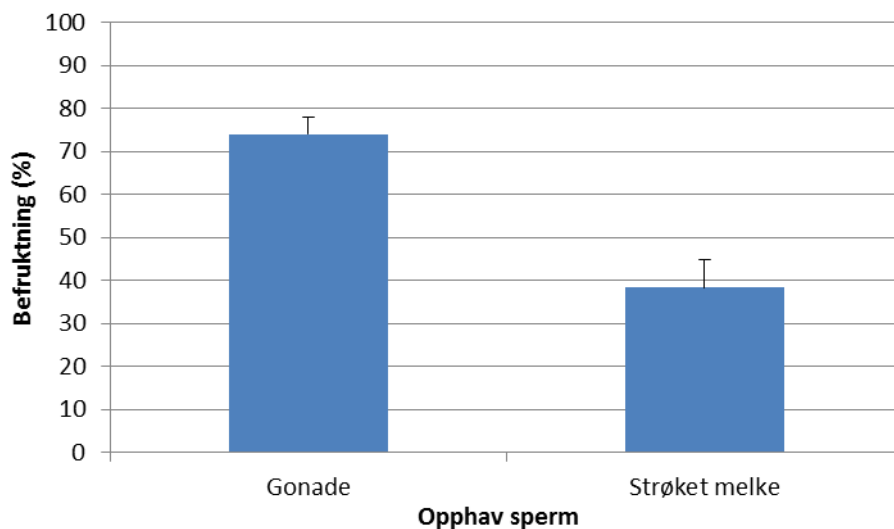
### Gjennomføring

- Rogn fra 2 hunfisk ble blandet før rogn ble fordelt i petriskåler, 1 ml (120 egg) i hver av 36 petriskåler.
- Det ble brukt 4 petriskåler (gjentak) per behandling.
- I henhold til oppsatt skjema ble et og et strå med frossen melke tint i 30 sekunder i vannbad ved 25 °C.
- Strået ble kuttet med saks, og den tinte melken ble overført til et eppendorfbeger.
- 50 µl melke (1 mill. spermier) ble fordelt over rogn. Deretter ble det tilsatt 2 ml filtrert sjøvann.

- Etter 10 min ble rogn vasket tre ganger med filtrert sjøvann før petriskålene ble plassert under svakt lys i klekkeriet.
- Vannet var tilsatt 1 % Penicillin-Streptomycin for å hindre bakteriebegroing. Vannet ble skiftet 2 ganger per uke.
- Når rogn nådde øyerognstadiet ble alle petriskålene fotografert, og befruktning ble talt opp på bildene (se eksempel Figur 1).

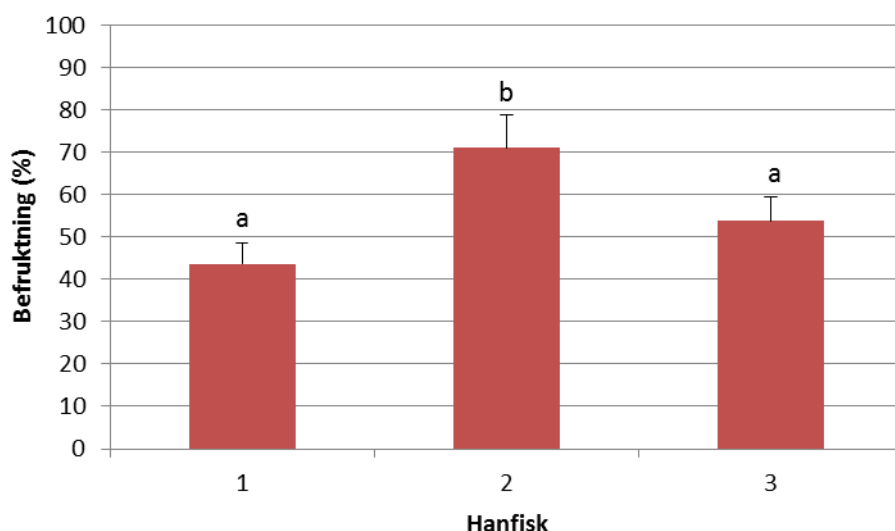
## Resultater/diskusjon

Befruktningsresultatene viste at spermier fra dissekert gonade ga bedre befruktning enn spermier i rennende melke etter nedfrysing på nitrogen. Denne forskjellen er vanskelig å forklare, men forskjellen er relativt klar, 74 versus 38 % befruktning (Figur 1).



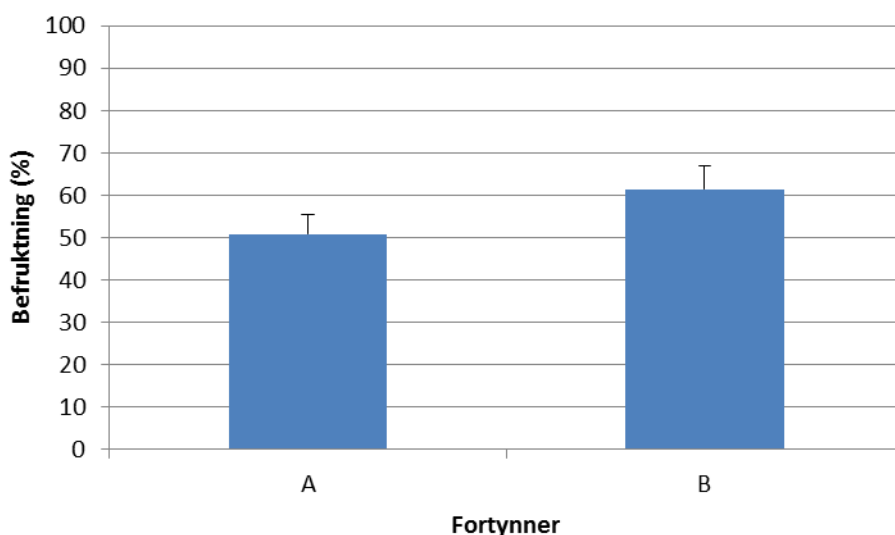
*Figur 1. Befruktningsprosent hos rogn befruktet med spermier fra strøket melke eller most gonade. Tallene er gjennomsnitt for de ulike hanfiskene. Standard feil er indikert på stolpene, og ulike bokstaver viser statistisk sikre forskjeller.*

Resultatene viste også at det er statistisk sikre forskjeller i befruktning mellom hanfisk. Det er ikke uventet at det er forskjell i befruktningsevne mellom hanfisk. I praktisk sammenheng viser dette at det er viktig å sjekke de kvalitetsparametere som er tilgjengelige som antall spermier/ml melke og motiliteten på spermene før melken brukes. Enten en benytter fersk eller frossen melke vil det være en fordel å blande melke fra flere hanfisk for å unngå redusert befruktning i forhold til potensialet.



Figur 2. Befruktningsprosent hos rogn befruktet med melke fra tre ulike hanner. Tallene er gjennomsnitt av befruktning med most gonade og strøket melke. Standard feil er indikert på stolpene, og ulike bokstaver viser statistisk sikre forskjeller.

Den statistiske analysen viste samspill mellom hanfisk og fortynningsvæske, dvs. at hannene rangerer seg forskjellig avhengig av hvilken fortynner som er benyttet. Dette har imidlertid liten praktisk betydning fordi den enkelte oppdretter ikke kan avgjøre hvilken fortynner som vil egne seg best for den enkelte hanfisk. Når en tar ut samspillet er forskjellen mellom fortynnere som vist i Figur 3. Cryogenetics har valgt å gå videre med fortynner B som ga best resultat.



Figur 3. Befruktningsprosent hos rogn befruktet med spermier fra frossen eller most gonade fortynnet med to ulike fortynningsvæsker. Tallene er gjennomsnitt for tre hanfisk. Standard feil er indikert på stolpene, og ulike bokstaver viser statistisk sikre forskjeller.

Befruktningen i de beste behandlingene var >90 %. Likevel var befruktningsprosenten mye lavere enn hva som ble oppnådd i forsøket som er beskrevet under AP 5.3. Dette kan skyldes kvalitet på rogn. I dette forsøket ble ikke rogn fra de to hunfiskene holdt atskilt, og en kan derfor ikke si noe om rognkvaliteten.

## Konklusjoner

- Spermier fra most gonade ga bedre befruktning enn spermier fra strøket melke
- Det var statistisk sikre forskjeller i befruktningsevne mellom hanfisk
- Den ene fortynningsvæsken (B) resulterte i bedre befruktning enn den andre (A)

**NB!** Se for øvrig videre resultater under AP5.3

## Del 2. Kjølelagring av melke

Målet med dette prosjekt var å klarlegge hvor lenge melke fra rognkall kan lagres ved kjøleskaptemperatur før befruktningsevnen reduseres.

### Forsøksfaktor

Antall dager etter befruktning

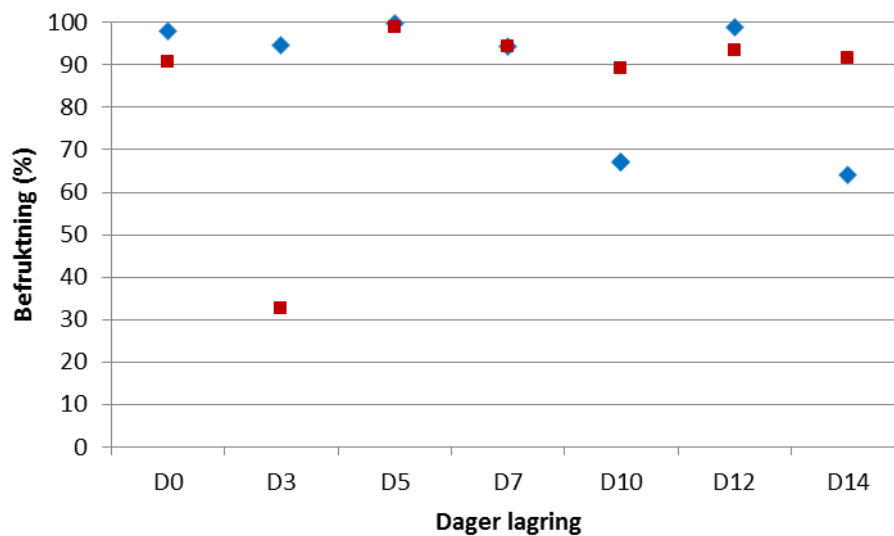
### Gjennomføring

- Rogn ble strøket fra to hunfisk.
- Gonade ble dissekert fra 5 hanfisk. Gonaden ble most og silt som beskrevet i framdriftsrapporten fra 2014.
- Motilitet på spermier ble vurdert under mikroskop, og antall spermier/ml ble bestemt ved bruk av et SDM6 fotometer fra Cryogenetics kalibrert for rognkjeks.
- Melken fra alle 5 hannene ble vurdert som god. Melken ble blandet, og fortynnet 1:1 med ApquaBoost® fra Cryogenetics.
- Melken ble lagret i kjøleskap (3 °C) i celledyrkingsflasker, maks. 10 ml melke/fortynner per flaske. Flaskene ble ristet 2-3 ganger daglig.
- Rogn ble strøket fra to hunfisk på dag 0, 3, 5, 7, 10, 12 og 14 etter at melke var preparert.
- Det var forskjellige hunfisker som ble strøket for rogn på de forskjellige dagene.
- Rogn fra hver hunfisk (1 ml) ble fordelt i 4 petriskåler, dvs. totalt 8 petriskåler per befruktningssdag.
- 20 µl (227.000 spermier/egg) ble raskt blandet med 1 ml filtrert sjøvann og fordelt over rogn.
- Rogna fikk deretter stå ca. 5 minutter før den ble vasket 3 ganger med filtrert sjøvann.
- Til slutt ble det tilsatt sjøvann med en svak antibiotikaløsning, og petriskålene ble plassert under svakt lys ved 8 °C i klekkeriet. Vannet ble skiftet 2 ganger/uke for beholde god vannkvalitet
- Ved øyerognstadiet (120 d°) ble alle petriskålene fotografert, og befruktningprosent ble beregnet fra optelling på foto.

### Resultater

Befruktningprosenten var generelt svært god, og er vist i Figur 4. Selv etter 14 dagers lagring ble det oppnådd >90 % befruktning. Forsøket ble utført med rogn fra to hunfisk for hvert befruktningstidspunkt for å eliminere effekt av rognkvalitet. Figur 4 viser at det er store utslag på 3 tidspunkt, dag 3, 10 og 14. På alle tre tidspunktene har en hunfisk gitt 90+ i befruktningprosent mens den andre ga mellom 33 og 67 % befruktning. Dette kan skyldes dårlig rognkvalitet, eller at tidspunkt for stryking av rogn var feil. Hovedresultatet er imidlertid at melke fra rognkall kan lagres i minimum 14 dager uten at befruktningsevnen reduseres. I dette forsøket ble melken ristet manuelt 2-3 ganger/dag for å sikre oksygentilgang. I

kommersielt bruk vil det være gunstig å bruke en shaker som beveger melken kontinuerlig. Med slikt utstyr vil en være sikker på at alle spermier får nok oksygen, og en unngår menneskelig feil som å glemme å riste melken.



Figur 4. Befruktningsprosent hos rogn som er befruktet med fortynnet melke som har vært lagret opp til 14 dager i kjøleskap. Det er benyttet to ulike hunner for hvert befruktningstidspunkt.

### Konklusjon

- Fortynnet melke fra rognkall kan lagres i minimum 14 dager i kjøleskap uten at befruktningsevnen reduseres



## AP 5.3. Hvordan befrukte, hvor mye melke

Ansvarlig: Nofima AS v/ Ingrid Lein
-------------------------------------

Resultatmål: Finne optimal mengde sperm per rognvolum både for fersk og frossen melke
---

### Status

Rognkall gir svært lite eller ingen melke ved forsøk på å stryke melke. Vanlig praksis i dag er derfor å dissekere ut gonaden og mose denne for å få tilgang på spermier. Dette betyr at en hanfisk må slaktes hver gang rogn skal befruktes. Dette er ikke et stort problem så lenge en benytter villfanget hanfisk, bortsett fra kostnaden per fisk. Når en nå etter hvert tar i bruk oppdrettet stamfisk vil hver hanfisk være verdifull, og en ønsker å utnytte de beste hannene best mulig. Det er fra næringen bedt om at vi skal undersøke muligheten for både fryselagring og kaldlagring av melke. I 2015 er ble det gjennomført flere forsøk som omhandler lagringsmetode og behov for spermier.

Før serien av forsøk som er beskrevet nedenfor ble startet ble det gjort en del innledende arbeid. Det var planlagt å benytte tellekammer (hemacytometer) til telling av spermietetthet. Dette er imidlertid en tidkrevende metode, og det ble derfor avtalt at vi skulle få låne et SDM6 fotometer fra Cryogenetics kalibrert for rognkjeks fra Cryogenetics. Dette er utstyr som brukes for måling av spermietetthet på flere arter, blant annet laks og ørret. Det er basert på måling av absorbans, og det lages en målekurve for hver art basert på partikkeltelling og absorbans. Cryogenetics hadde allerede lagt inn en del punkter for rognkjeks, men vi slaktet en del hanfisk i tillegg, slik at en fikk nok målepunkter til at målingene ble pålitelige. I tillegg gjorde vi en del tester av motilitet (bevegelighet) av spermier ved tilsetning av sjøvann under mikroskop for å lage en vurdering av motiliteten (dårlig, god, svært god). Det siste er en subjektiv vurdering. Vi gjorde også en test på hvor lenge spermier fra rognkjeks er bevegelige. Vi fant full bevegelighet de første 5-6 minuttene, deretter avtakende, men fremdeles noe aktivitet etter 12-14 minutter. Bruken av fotometer gjorde det mulig å utføre hele serien av forsøk med spermietetthet med stor nøyaktighet.

### Del 1. Effekt av antall spermier/egg på befruktning av rogn – og effekt av lagringsmetode

Gonade fra 4 hanner ble dissekert ut, most ved hjelp av en gonadekvern, silt og fortynnet med en fortynner (fysiologisk saltløsning) fra Cryogenetics. Bevegeligheten på spermene fra hver hann ble sjekket i mikroskop, og antall spermier/ml melke ble bestemt ved bruk av et SDM6 fotometer fra Cryogenetics kalibrert for rognkjeks. Deretter ble melken fortynnet 1:1 med AquaBoost® SpermCoat *Cleanerfish*. Halvparten av melken ble transportert til Cryogenetics hvor den ble fortynnet og standardisert til 2 mrd/ml, og deretter frosset på strå i flytende nitrogen. Den frosne melken ble fraktet tilbake til Sunndalsøra umiddelbart etter nedfrysing. Den andre halvparten av melken ble lagret i celledyrkingsflasker i kjøleskap ved ca. 3°C i tre dager før bruk. Før bruk ble også denne melken standardisert til en tetthet på 2 mrd./ml.

Melken som var frosset på nitrogen returnerte til Sunndalsøra tre dager etter at gonadene var dissekert ut. Da ble det strøket rogn fra 3 hanner. Rogna fra de tre hunnene ble holdt atskilt gjennom forsøket for å se om det var noen effekt av hunfisk, dvs. om dårlig rognkvalitet påvirket resultatet.

## Forsøksfaktorer

- 2 ulike lagringsmetoder (kjøleskap eller flytende nitrogen)
- 6 ulike tettheter av spermier/egg (125.000, 250.000, 500.000, 750.000, 1000.000 og 2000.000)
- 3 hunnfisk for rogn

Tetthetene på spermier ble valgt i samarbeid med Crogenetics som har erfaring fra mange ulike fiskearter, inkludert rognkjeks. Den laveste og høyeste tettheten ble tatt med for å sikre at en dekket ytterpunktene.

## Gjennomføring

Rogna ble fordelt i 46 petriskåler, 1 ml (~120 egg) per skål. For hver behandling var det 2 skåler (gjentak) med rogn fra hver hunnfisk, dvs. 6 gjentak per behandling. (Figur 1).



*Figur 1. Eksempel på forsøksoppsett som ble benyttet i de ulike befruktningforsøkene. Student Anne De Vries fra Nederland deltok i alle forsøk fra februar-juli.*

Behov for mengde melke ble beregnet, og satt i en tabell som ble brukt under gjennomføringen av forsøket. Kjølelagret melke ble blandet raskt med 1 ml filtrert (1 $\mu$ m) før den ble slått over rogn. Cryopreservert rogn ble tint i 30 sekunder ved 25°C i vannbad før den ble brukt til befruktning.

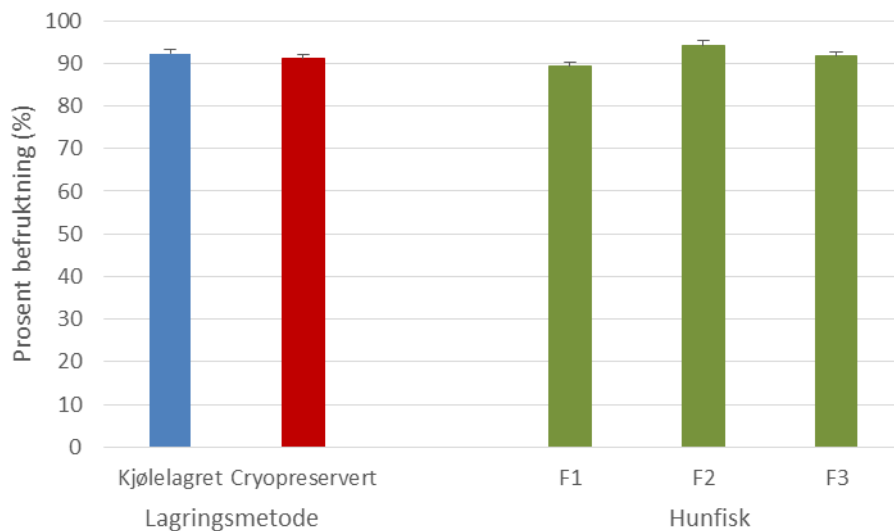
Både kjølelagret og cryopreservert melke ble blandet raskt med 1 ml finfiltrert sjøvann (1 $\mu$ l) før den ble fordelt over rogn. Deretter fikk rogn stå i ro 3-5 minutter før den ble skylt tre ganger med finfiltrert sjøvann. Petriskålene ble plassert i klekkeriet med svakt lys ved ca. 8°C. Når rogn nådde øyerognstadiet (120 d° ved 8°C) ble hver petriskål fotografert, og andel øyerogn ble talt opp på foto på datamaskin.

## Resultater/diskusjon

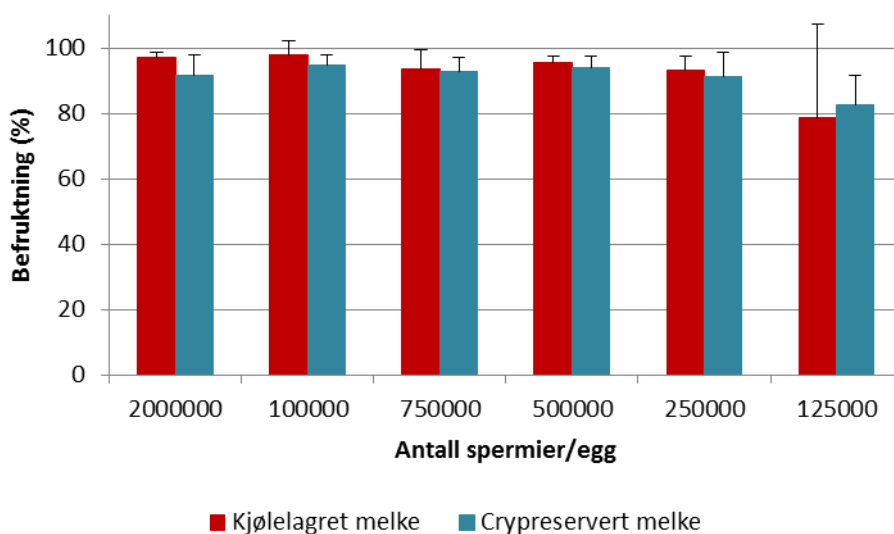
Det var svært god befruktning for alle behandlinger. Det var ikke forskjell i befruktning mellom kjølelagret og cryopreservert melke, noe som er uvanlig. Vanligvis reduseres spermienes befruktningsevne ved cryopreservering. Både kjølelagret og cryopreservert melke ga over 90 % befruktning, henholdsvis 92,3 og 91,2 % (Figur 2). Det var heller ingen statistisk sikre

forskjeller mellom hunfisk. De tre hunnene ga henholdsvis 89,3, 94,3 og 91,6 % befruktning (Figur 2).

Det var også små forskjeller i befruktning mellom de ulike tetthetene av spermier/egg. Kun den laveste tettheten av cryopreserverte spermier (125.000 spermier/egg) som ga noe lavere befruktning (Figur 3). I motsetning til de andre behandlingene var det også større variasjon i befruktning mellom de 6 gjentakene i denne behandlingen. Det var overraskende at den laveste spermietettheten ga så god befruktning, det ble derfor bestemt å gjøre en oppfølging med enda lavere tettheter.



Figur 2. Figuren viser gjennomsnittlig befruktningsprosent på rognkjeksrogn befruktet med melke lageret i kjøleskap eller med cryopreservert melke. Gjennomsnittlig befruktningsprosent på rogn fra tre ulike hunfisk som har fått samme behandling er vist i samme figur. Standardfeil er lagt inn.



Figur 3. Figuren viser befruktning av rogn som er befruktet med ulike tettheter av spermier. Kilde for spermier er enten kjølelagret melke eller cryopreservert melke. Standardavvik er vist på søylene.

## Del 2. Test av lave tettheter av spermier på befruktningsresultat– fersk melke

Målet med dette forsøket var å klarlegge om spermietettheter lavere enn de som ble testet i det første forsøket også resulterer i høy befruktning. En tok utgangspunkt i den laveste tettheten fra forsøk 8.1.

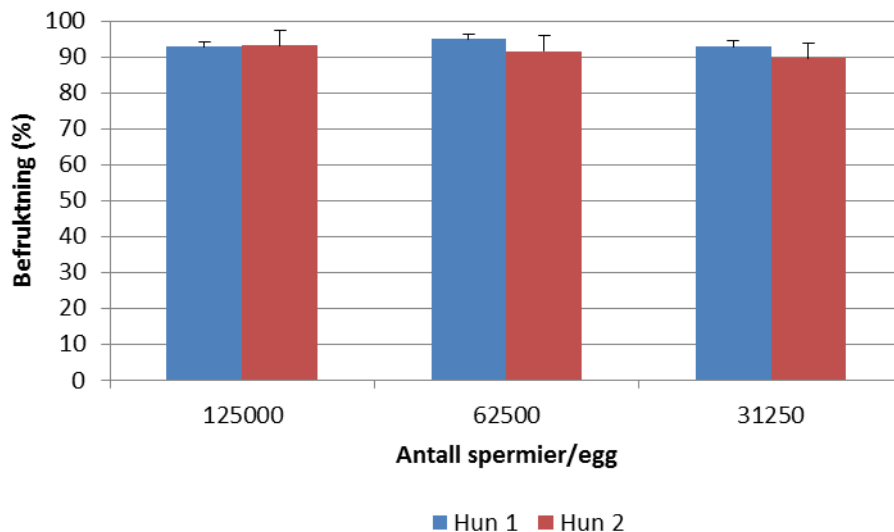
### Forsøksfaktorer

- 3 ulike tettheter av spermier (125.000, 62.500 og 31.250 spermier/egg).
- Rogn fra 2 hunnfisk for å ta ut effekt av hunnfisk
- 3 gjentak per hunnfisk og behandling, dvs. 6 petriskåler per spermietetthet

### Resultater/diskusjon

Det var god befruktning for alle behandlingene, over 90 % for alle behandlinger unntatt for en hunnfisk (2) ved den laveste tettheten. Dette var imidlertid en liten forskjell, 89,6 % mot 92,8 %. Forsøket viser at spermier fra rognkall er ekstremt vitale, og at en ved å ha kontroll på tettheten av spermier i melken kan økonomisere bruken av melke, og dermed redusere antall hanner som må avlives for å få tilgang til spermier.

Fordi både dette og det foregående forsøket ble gjort med små rognmengder (1 ml rogn/petriskål) ble det bestemt å gjøre et forsøk hvor en undersøker om resultatene også er gyldige for større rognmengder.



Figur 4. Figuren viser befruktning på rogn befruktet med lave spermietettheter, og viser befruktning for rogn fra to hunner. Standardavvik er vist på søylene.

Fordi forsøkene over ble gjort i petriskåler med små rognmengde (1 ml rogn/petriskål) ble det gjort to forsøk for å undersøke om funnene overfor er gyldig for større rognmengder, og om mengde rogn påvirker befruktningsresultatet.

### Del 3. Oppskalering av resultatene i 8.1 og 8.2

De to siste forsøkene er gjort i regi av et instituttstrategisk program i Nofima, men rapporteres likevel her for å demonstrere at resultatene fra befruktningforsøk gjort i liten skala er gyldige også i større skala. Målet med forsøket var å bekrefte at resultatene fra 8.1 og 8.2 er gyldige for større rognmengder. Mengde rogn ble derfor økt fra 1 ml (120 rogn) til 160 ml (19.200 rogn).

#### Forsøksfaktorer

- 4 ulike tettheter av spermier/egg (31.000, 125.000, 250.000 og 500.000)
- Rogn fra 2 hunnfisk for å se eventuell effekt av hunnfisk
- 2 gjentak per hunnfisk og behandling, dvs. 4 gjentak per spermietetthet.

#### Gjennomføring

Forsøket ble utført med rogn fra to hunnfisk, og rognen ble holdt atskilt under forsøket. Gonader ble dissekert fra 3 hanner. Gonaden fra hver hannfisk ble most vha. en kvern fra Cryogenetics, most og fortynnet 1:1 med AquaBoost® SpermCoat *Cleanerfish* fra Cryogenetics før melken fra de tre hannene ble blandet. Melken ble lagret i kjøleskap til den ble brukt.

160 ml rogn ble målt opp i litermål og fordelt til hver av 16 inkubatorceller. Vi brukte et inkubatorsystem som brukes til laks- og regnbuerogn, og består av enkeltceller som har separate inn- og utløp.

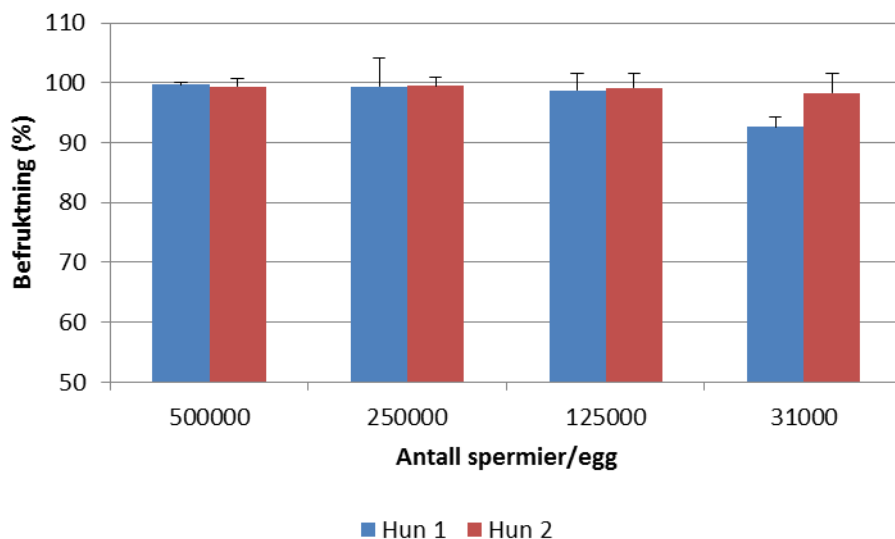


Figur 5. Bildene viser klekkeren med 11 separate klekkeseller med egne inn- og utløp.

Når rognen hadde nådd øyerognstadiet ble den fotografert. Bildene ble lagt inn i datamaskinen og talt. Fordi det her var langt større antall rogn ble tre områder på rognmatten fra en celle valgt ut og talt. Hvert område inneholdt 200-300 rognkorn. Gjennomsnittet av disse tre tellingene representerer befruktningprosenten for dette gjentak.

#### Resultater

Resultatene i dette forsøket samsvarer svært godt med resultatene fra forsøkene i mindre skala. Befruktningen varierte fra 91,4 til 99,5 % (Figur 6.) Det var ingen sikre forskjeller i befruktning for de 4 høyeste spermietetthetene. Bare den laveste skilte seg ut, men selv i den dårligste gruppen var befruktningen over 90 %.



Figur 6. Søylene viser befruktningsprosent på rogn fra to hunner befruktet med fersk melke med ulik spermietetthet. Standard avvik er vist på søylene.

#### Del 4. Effekt av økende rognmengde ved samme spermietetthet

Målet med dette siste forsøket var å undersøke om det er noen effekt av rognvolum på befruktningsprosent når spermietettheten holdes konstant.

##### Forsøksfaktorer

6 ulike rognvolum (1, 10, 20, 40, 80, og 160 ml rogn)

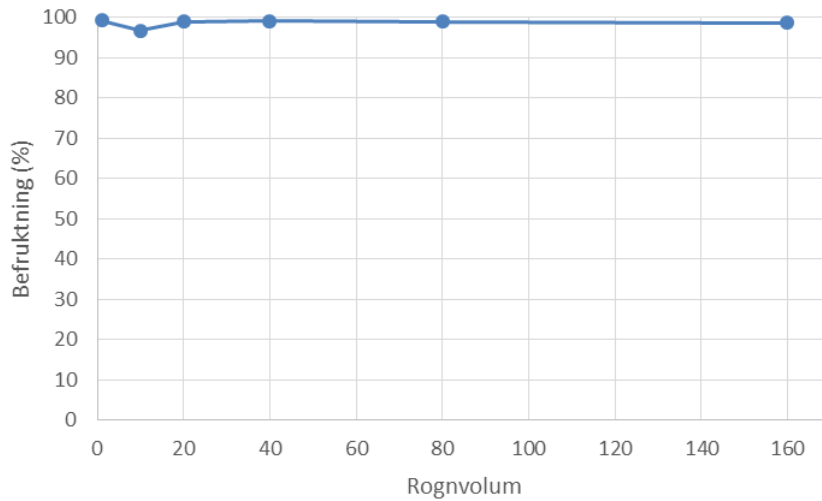
##### Gjennomføring

Forsøket ble gjort med rogn fra en hunnfisk, og forsøket er kjørt som en regresjon, dvs. økende volum, men ingen gjentak. Gonader ble dissekert fra 3 hanfisk, og behandlet som ovenfor. Rogna ble befruktet med 500.000 spermier/egg.

Forsøket ble gjort i same type enheter som forsøk 8.3., og disse to forsøkene ble kjørt samtidig.

##### Resultater/diskusjon

Det ble oppnådd svært høy befruktning for alle behandlingene, dvs. >96 %. Dette understøtter resultatene i forøsk 8.3. om at rognvolum ikke har betydning for befruktningssuksess, og at resultatene fra forsøkene i mindre skala kan overføres til større skala. Dette er viktig informasjon fordi resultater fra forsøk i liten skal ikke alltid kan overføres direkte til større skala.



*Figur 6. Punktene på linjen viser befruktningsprosent for rogn med volum som er vist på X-aksen.*

### **Konklusjoner fra forsøkene med spermietetthet og rognvolum**

- Melke fra rognkall egner seg svært godt for cryopreservering
- Spermier fra rognkall er svært vital, og gir høy befruktning selv ved ekstremt lave tettheter
- Resultatene fra forsøk i liten skala er gyldige i større skala

## AP 5.4. Temperaturprotokoll for inkubering av rognkjeksegg

<b>Fagansvarlig:</b>	Akvaplan-niva AS v/ Thor Jonassen
<b>Prosjektgruppe: *UiT og **Akvaplan-niva</b>	Mathias Danielsen*, Ane Nytrø**, Thor Arne Hangstad**, Armand Moe Nes**, Thor Jonassen**, Albert Imsland**, Inger-Britt Falk-Petersen*
<b>Sammendrag:</b> <p>Effekten av forskjellige inkuberingstemperatur på tidlig cellesymetri, eggutvikling, egg-dødelighet, klekkesuksess og tidlig larveutvikling ble undersøkt.</p> <p>Egg inkubert på lav temperatur (4-5 °C) resulterte i større larver med lite deformiteter både ved klekking og to uker etter klekking sammenlignet med egg inkubert på høy temperatur (ca. 10 °C) og temperaturgradient (4-5 °C i 10 dager og deretter en gradvis økning til ca. 10°C over ca. 2 dager). Men samtidig var eggoverlevelse og klekkeprosent lavest på lav temperatur, og inkuberingstiden var nesten dobbelt så lang sammenlignet med de to andre temperaturregimene.</p> <p>Det var høyest egg-overlevelse og god klekkeprosent ved høy temperatur, men forekomst av deformiteter på dette temperaturregimet var høyest.</p> <p>Inkubering med temperaturgradient ga god eggoverlevelse, høy klekkesuksess, tidlig klekkesidspunkt med tidlig og høy klekkestopp med lav larvedødelighet, middels larvestørrelse og lite deformiteter og skader på forskjellige kroppsdeler.</p> <p>Basert på dette anbefales et gradvis justert temperaturregime for inkubering av egg fra rognkjeks hvor en starter med lav temperatur (4-5 °C) de første dagene og deretter en gradvis økning til 10°C over ca. 2 dager.</p>	

### Bakgrunn

Erfaringer fra andre oppdrettsarter, spesielt torsk og laks, har vist at temperatur er en av de viktigste miljøfaktorene som påvirker klekkeprosent, og ikke minst kvalitet på nyklekte larver. For eksempel er det for torsk vist at egg inkubert ved 4,5 °C med økning til 9,5 °C i løpet av 8 timer ga høyere dødelighet og lavere klekkeprosent sammenlignet med egg inkubert på konstant 4,5 °C (Puvanendran *et al.*, 2013). Tok en i tillegg hensyn til larvemorfologi og histologi (larvekvalitet) kom egg inkubert på 4,5 °C med økning til 9,5 °C i løpet av 32 timer best ut. Disse forskjellene finnes til tross for at torskeegg i naturen er funnet i et temperaturintervall fra – 1,5 °C til 9 °C (Geffen *et al.*, 2006).

Ved en stabil temperatur på ca. 4 °C klekkes rognkjekseggene etter 6-8 uker (klekkestart normalt ved ca. 280 d°), men man har ingen kunnskap om temperaturfølsomheten for egg under



gyting og inkubering. I naturen gyter rognkjeksene på relativt grunt vann i strandsonen fra februar til november, med stor spredning i vanntemperatur, noe som kan antyde at den er mer temperaturløstolerant.

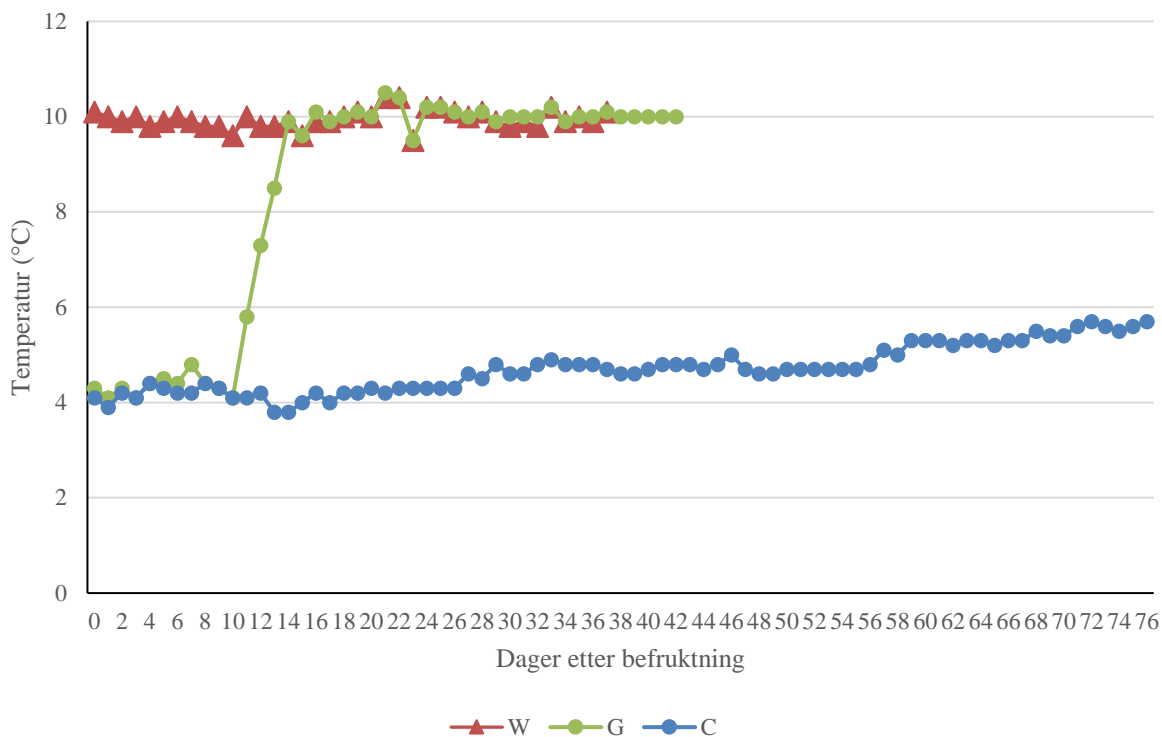
Inkuberingstemperatur for rognkjeksrogn ved TMY er 10 °C. Grunnen er at man får god klekkeprosent og relativt synkron klekking ved denne temperaturen (over to dager). 4 °C gir også god klekkeprosent, men asynkron klekking (klekking over en uke). En har lite data på om disse temperaturforskjellene gir kvalitetsforskjeller på egg og larver. En høyere temperatur gir også en kortere inkuberingsfase og en opplever dermed mindre problemer med påvekst av sopp og bakterier på eggene.

I forsøket vil en se på hvordan forskjeller i inkuberings-temperatur påvirker tidlig celledivisjon, eggutvikling, egg-dødelighet, klekkesuksess og tidlig larveutvikling.

### **Gjennomføring**

Tre forskjellige inkuberingstemperaturer ble testet på rogn fra villfanget stamfisk ved naturlig gyttidspunkt våren 2015: Gruppe **C**) Naturlig lav temperatur (ca. 5 °C) i ca. 10 dager, deretter gradvis økende til 10 °C, Gruppe **G**) naturlig lav temperatur (ca. 5 °C, råvann med de naturlige fluktuasjonene dette kan medføre), Gruppe **W**) konstant ca. 10 °C frem til klekking. Temperaturprofilen for de tre temperaturgruppene er vist i Figur 28. Gjennomsnittstemperatur ( $\pm$  SD) for hele inkuberingsperioden var for gruppe W, C og G hhv. 9,95 ( $\pm$  0,19), 4,70 ( $\pm$  0,49) og 8,37 ( $\pm$  2,52).

Forsøket ble gjennomført ved Tromsø Marin Yngel (Akvaplan-niva), Kraknes Troms Norge, fra 11. Mars til 30. Mai 2015. Målinger av formalin-fikserte larver og histologi ble gjort ved Institutt for arktisk og marin biologi fra august 2015 til april 2016.



Figur 28. Temperaturprofil for de tre temperaturgruppene W (varm, ca. 10 °C), G (gradient, ca. 5 °C i 10 dager og deretter økende til ca. 10 °C) og C (kald, ca. 5 °C).

Hver av de tre temperaturregimene ble testet med 5 replikater for hver av de tre temperaturgruppene i individuelle mini-inkubaturer med separat innløp og utløp. All testing ble gjort i to parallelle forsøkslinjer, med egg fra separate hunnfisk (en for hver linje befruktet med melke fra de samme to hannfiskene). To inkubatore for hver batch ble samlet fra under inkuberingen, mens to triplikater for hvert temperaturregime og batch ble inkubert uforstyrret. Totalt ble det altså benyttet 30 inkubatorer i forsøket. Inkubatorene ble plassert i samme rigg slik at en var sikker på at vannkvaliteten er mest mulig lik for alle inkubatorene.

Oppsummering av forsøksgruppene er gitt i Tabell 6. Ca. 200 egg ble plassert i hver av de 30 inkubatorene. Etter klekking ble 50 larver fra hver temperaturgruppe holdt i live i 2 uker før de ble sample og analysert.

Tabell 6: Oversikt over inkubatore, inkuberingstemperatur, stamfisk (hann og hunn) benyttet, batch nummer og hvilke inkubatore benyttet for sampling av de forskjellige eggstadiene under inkuberingen.

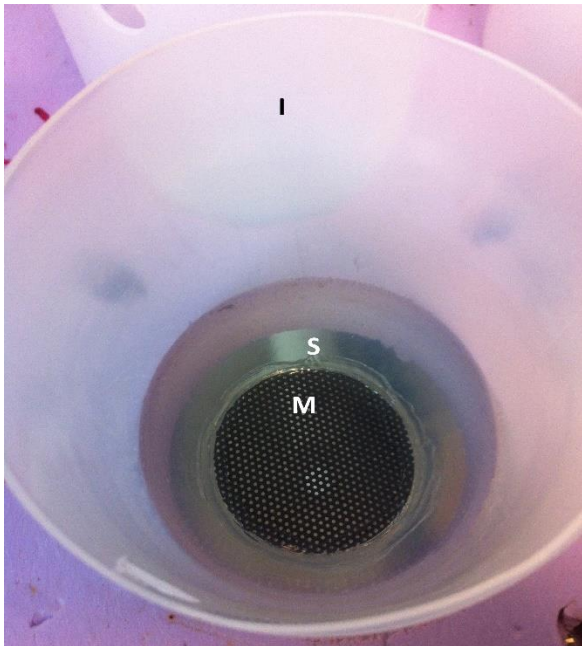
Inkubator	C	G	W	Hunn	Hann	Batch	Samplet under inkubering?
1	C1	G1	W1	1	1 & 2	1	Nei
2	C2	G2	W2	1	1 & 2	1	Nei
3	C3	G3	W3	1	1 & 2	1	Nei
4	C4	G4	W4	1	1 & 2	1	Ja
5	C5	G5	W5	1	1 & 2	1	Ja
6	C6	G6	W6	2	1 & 2	2	Nei
7	C7	G7	W7	2	1 & 2	2	Nei
8	C8	G8	W8	2	1 & 2	2	Nei
9	C9	G9	W9	2	1 & 2	2	Ja
10	C10	G10	W10	2	1 & 2	2	Ja

Ved hver gyting ble en mindre egg-gruppe (ca. 100 egg) tatt ut for analysering (nullpunktmåling) mhp. befruktningsprosent og egg-diameter. Deretter ble 200 egg telt inn i hver inkubator. Eggene ble plassert på en grovmasket planktonduk i inkubatoren som tillot vanngjennomstrømning fra innløp i bunn til avløp i overflaten av inkubatoren. Etter klekking ble 20-30 yngel holdt videre i 2 uker for å undersøke eventuelle senskader som følge av temperatur. Silduken i bunnen på inkubatorene var derfor dimensjonert til maskeåpning 750 µm for å være sikker på at ingen larver slapp gjennom. Yngelen ble startfôrt i inkubatorene. Det ble benyttet fôrautomat til fôring (mini-automater for akvariebruk).

Vanngjennomstrømning i inkubatorene ble regulert til 4 x utskiftninger per time. Oksygenmetningen var stabil mellom 89-109 % (justert gjennom regulering av vanntilførselen). Det var dimmet belysning fra 08:00 til 16:00 og ved prøvetaking, ellers mørke.

#### *Prøveuttak og analyser:*

Klekkeprocent ble beregnet ut i fra antall larver registrert etter klekking i forhold til antall overlevende egg frem til klekketidspunktet. Et utvalg av nyklekte larver fra hver inkubator ble analysert med utgangspunkt i målinger av lengde, vekt og plommevekt samt skjelettdeformiteter og organhistologi.



Figur 29: Nærbilde av inkubator.

Hver av de 30 inkubatorene var laget av avkuttete 2-liters plastflasker. Bunnen var kappet av og det var limt fast en plastring med 1,5 mm nettingduk. Forsøksriggen er vist i Figur 30.

Vannforsyningen per inkubator var ca. 2 L/min. Vannet var filtret gjennom 60- $\mu$ m trommelfilter, UV-behandlet og deretter luftet.



Figur 30: Oversikt over forsøksrigg. C: Kald temperatur, G: Gradient og W: varm temperatur.

Inkubatorene ble rengjort etter behov (når en så opphopning av partikler o.l.) Ved rengjøring ble eggene fjernet med en plastskje og lagt i en bøtte med sjøvann og lagt tilbake igjen etter at inkubatorene var rengjort.

### *Undersøkelser av larver*

20 larver ble samlet fra hver triplikate gruppe ved klekking og etter to uker og undersøkt i lup. Det ble målt totallengde, myotomhøyde, plommesekkhøyde, våtvekt, utvikling av dorsalfinne, halebøy, spinale skader, deformert kroppsform og mekaniske skader (f.eks. manglende kroppsdeler, sprukket plommesekk, erosjoner).



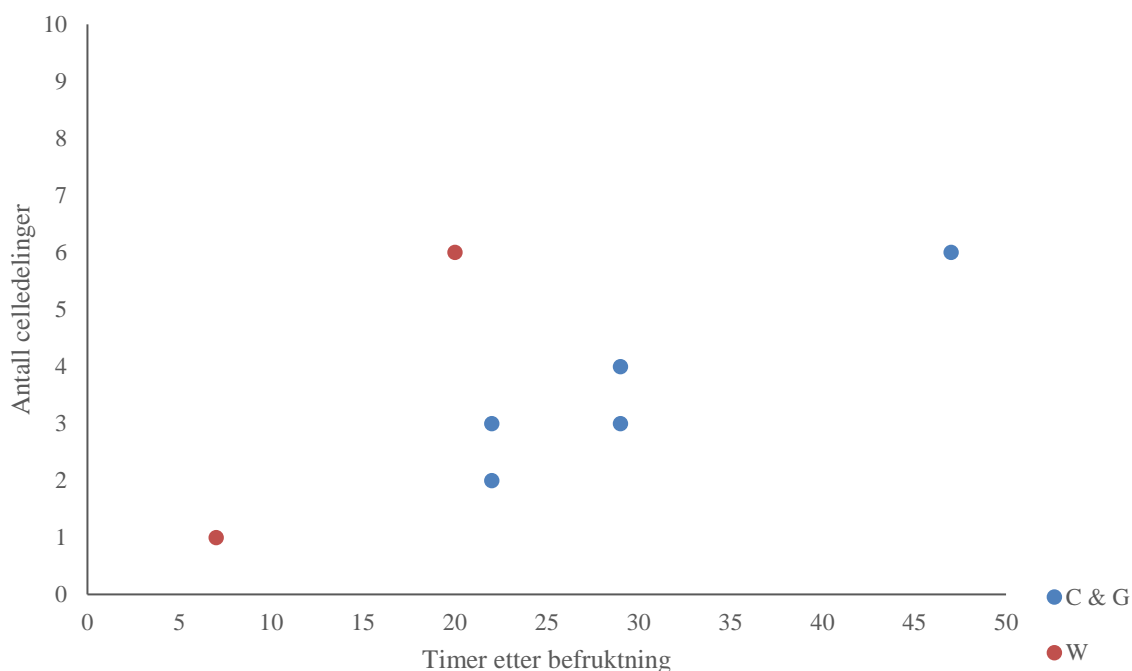
Figur 31: Nyklekkete larver ble målt mhp. 1: lengde, 2: høyde, 3: høyde på plommesekk.

### *Statistikk*

Dataene var testet for homogenitet og normalfordeling og forskjeller mellom grupper ble analyser med toveis-ANOVA. Der ANOVA viste signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) ble analysen fulgt opp med Newman Keuls post hoc test for å identifisere hvilke grupper som var forskjellige. Statistikkpakken Statistica ble benyttet.

### **Resultater**

Egg-størrelsen ( $\pm$  SE) varierte noe mellom de to egg-gruppene, med 2,23 mm ( $\pm$  0,0049) i batch 1 og 2,28 mm ( $\pm$  0,0045) i 2, men det var ingen statistiske forskjeller. Befruktingsprosenten var 97,79 % for batch og 98,89 % for batch 2. Tidlig celledeling var god for begge batchene, og utviklingen i celledeling over tid er vist i Figur 32.



Figur 32. Tidlig celledeling som antall celledelinger i forhold til tid etter befruktning.

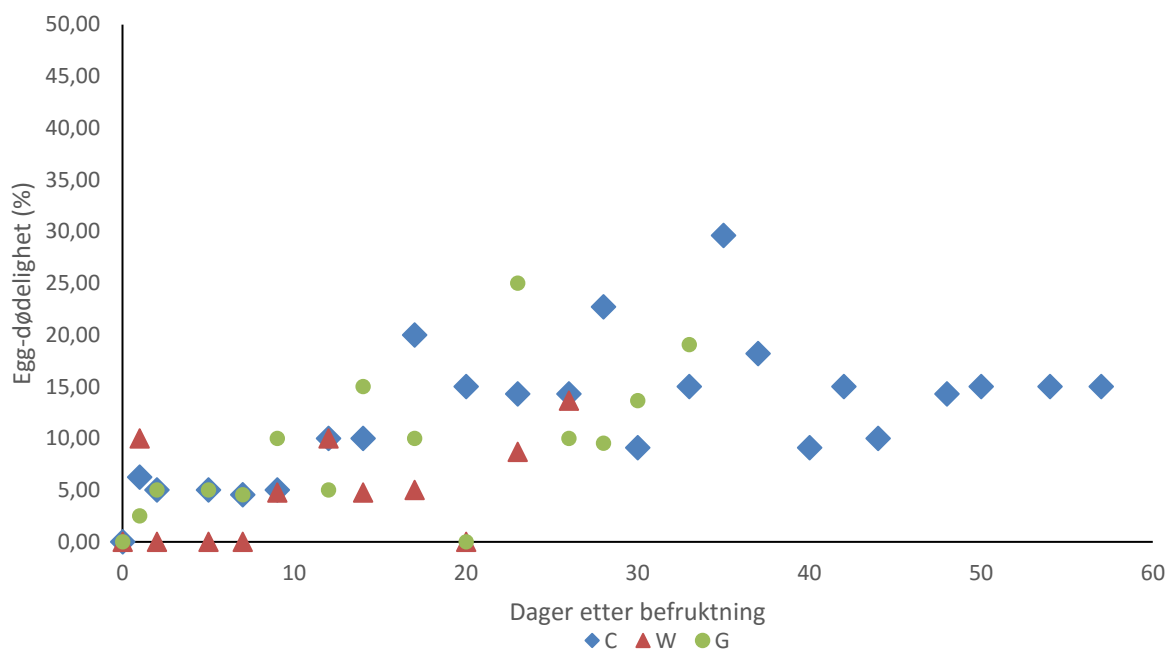
Utviklingen i celledeling var raskere ved høy temperatur, men i forhold til døgngader var utviklingen relativt like mellom gruppene. Minimum døgngader for de forskjellige utviklingsstadiene er gitt i Tabell 7.

Tabell 7 Minimum døgngader ( $d^\circ$ ) for de forskjellige utviklingsstadiene.

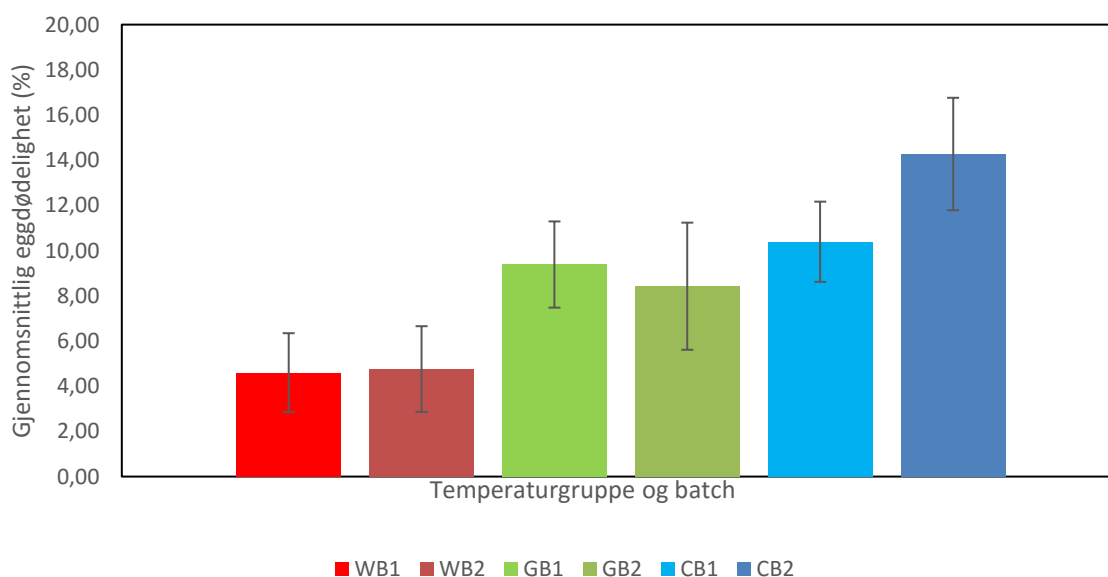
Eggutvikling					
Utvikling	$d^\circ$	Utvikling	$d^\circ$	Utvikling	$d^\circ$
2 celler	0,0	Embryo	49,8	Kroppspigment	138,4
4 celler	4,1	Øye	49,8	Pl.sekk vene-nett	173,8
8 celler	4,1	Lipid kompressjon	70,3	Hodevekst	183,3
16 celler	4,1	Otocyst	89,4	Åpen munn	209,8
64 celler	8,0	Øyepigment	117,3	Kroppsvækst	209,8
Morula	10,1	Otolitt	117,3	Egg fylt	254,3
Blastula	20,1	Hjerteslag	128,9	Klekking	278,6
Gastrula	29,2	Pl.sekk årer	128,9	Dorsal finne	308,4

### Eggdødelighet:

Dødeligheten var lav i alle gruppene ved start, men økte utover i inkuberingsfasen (Figur 33). Gjennomsnittlig eggdødelighet var lavest ( $p < 0,05$ ) ved høy inkuberingsstemperatur (gruppe W), mens det var ingen forskjell mellom de andre temperaturgruppene (Figur 34).



Figur 33. Utvikling i eggdødelighet for de tre inkuberingsregimene.



Figur 34. Gjennomsnittlig eggdødelighet for begge egggruppene inkubert for tre forskjellige inkuberingsgruppene W, G og C. Vertikale linjer indikerer 95% konfidensintervall.

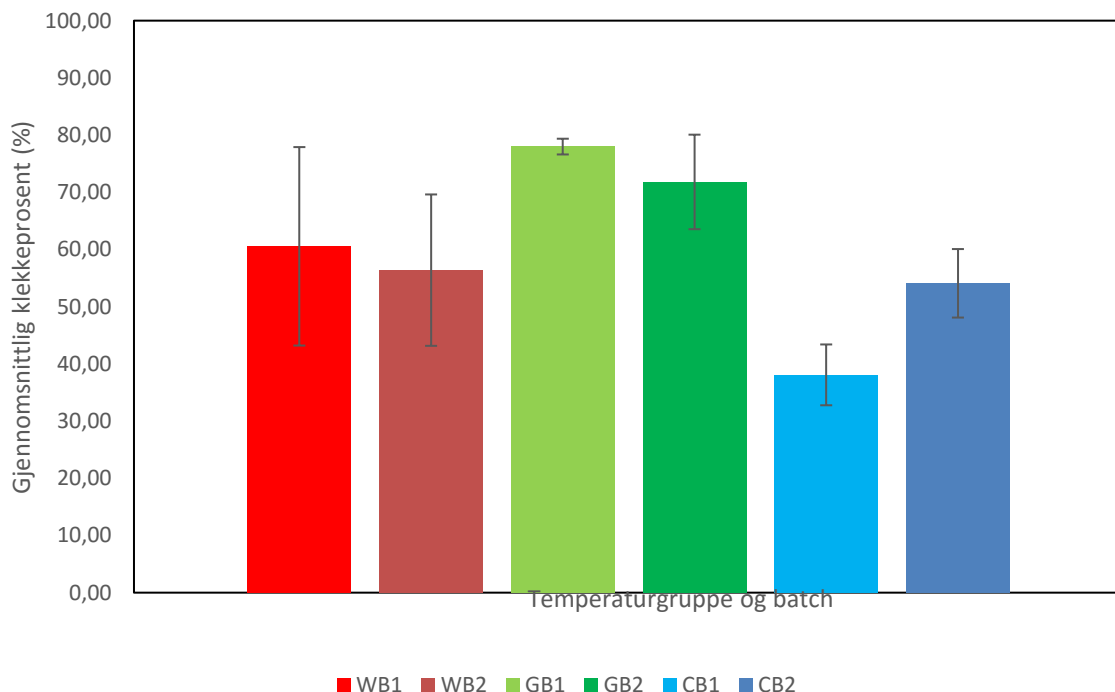
### Klekking:

Klekking startet ved 278,6 d°, 28 dager etter befruktning (DPF) for W, med klekketopp (50 % av totallekking) 3 dager etter klekking (DPH) og sluttet ved 9 DPH. For G startet klekking ved 279,9 d°, 35 DPF og nådde klekketopp same dag med klekking på nesten 80 % av larvene. Klekkingen var ferdig etter 7 dager ved 350 d° i G. I C startet klekking 63 DPF ved 285 d°, og nådde klekketoppen DPF. Klekkingen varte til 13 DPH (Tabell 8).

Tabell 8. Oversikt over døgngader (d°), dager etter befruktning (DPF) og dager etter klekking (DPH) for start, topp og slutt klekking for alle temperaturgruppene (W (varm temp), G (gradvis økning fra kald til varm) og C (kald temp)).

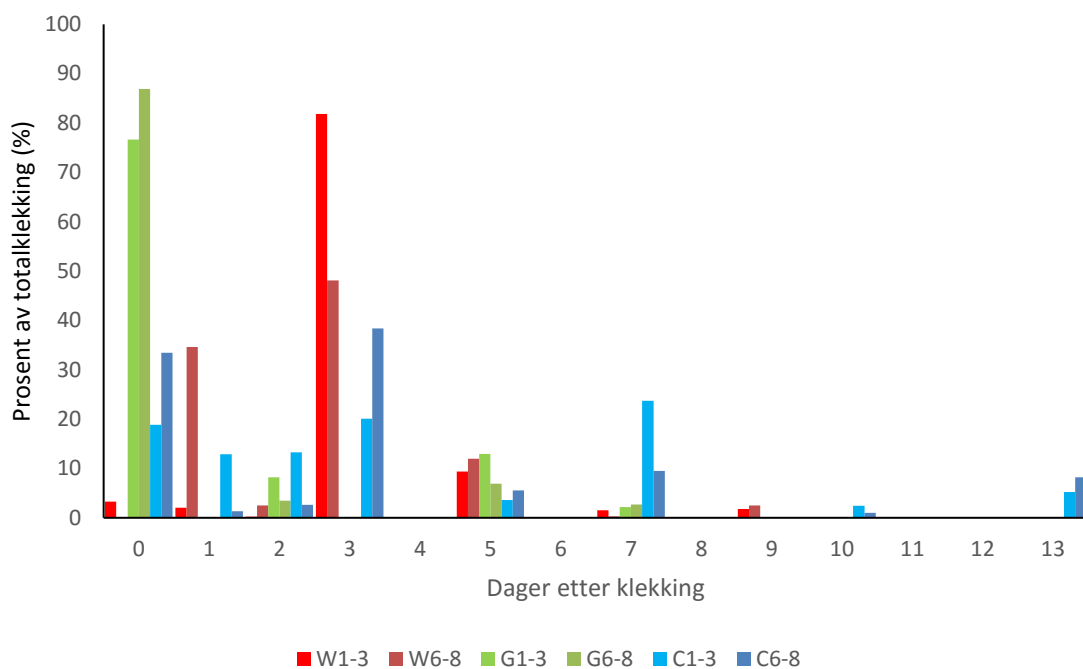
	Start		Topp (50 %)		Slutt	
	d°	DPF	d°	DPH	d°	DPH
W	278,6	28	308,4	3	368,1	9
G	279,9	35	279,9	0	350	7
C	285	63	301,3	3	356,2	13

Gjennomsnittlig klekkeprosent varierte mellom gruppene (Figur 35), med høyest klekkeprosent i G sammenlignet med C. Det var ingen forskjeller mellom G og W. Klekkeforløpet er vist i Figur 36.



Figur 35. Gjennomsnittlig klekkeprosent for begge egg-batchene på de tre temperaturregimene (W, G, C). Vertikale linjer indikerer 95% konfidensintervall.

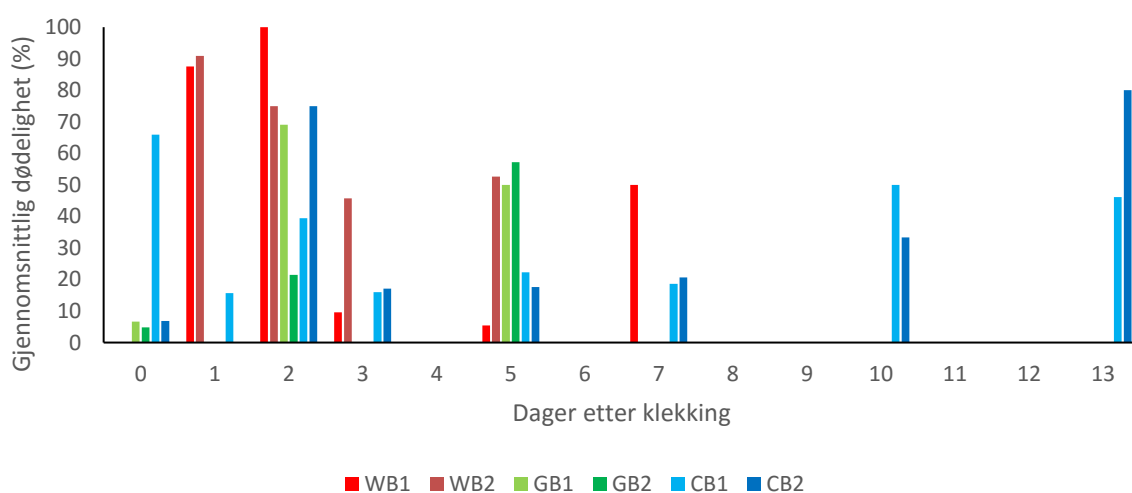




Figur 36. Klekkeforløpet for de to egg-batchene ved hver av de tre inkuberingstemperaturene vist som gjennomsnittlig prosent av total klekking fordelt over klekkeperioden.

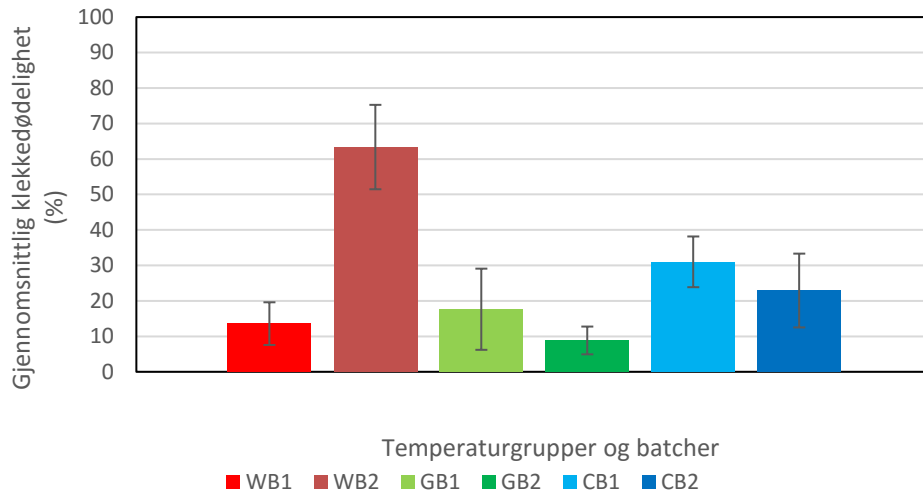
*Larvedødelighet:*

Larvedødeligheten var lav under klekketoppen for alle gruppene. Gradient gruppen (G) hadde lav dødelighet de første dagene, men økende dødelighet i den siste perioden av klekkingen (Figur 37). Ved både kald (C) og høy (W) inkuberingstemperatur var larve-dødeligheten høy før og etter klekketoppen (Figur 37).



Figur 37. Gjennomsnittlig larvedødelighet ved klekking som prosent av total dødelighet fordelt over tid etter klekking (DPH).

Gjennomsnittlig klekkedødelighet var høyest for egg-batch 2 i varm gruppe (W) og lavest I egg-batch 2 i gradient gruppe (G, Figur 38). There was a statistical significant difference in mortality at hatching between groups (Table 11), for the two week old larvae however, there was not (Table 12).



Figur 38 Gjennomsnittlig larvedødelighet ved klekking. Vertikale linjer på søylene indikerer 95% konfidensintervall.

#### Larveutvikling:

Larvene inkubert ved lav temperatur (gruppe C) var lengst, høyest og tyngst ved klekking, mens larvene inkubert ved høy temperatur (gruppe W) var kortest, lavest og hadde lavest vekt. Larver fra gradientgruppen (gruppe G) hadde størst plommesekk, mens larvene fra kald gruppe (C) hadde minst plommesekk (Tabell 9).

Tabell 9. Larvemorfometri ved klekking.

Batch	Lengde	Høyde		Plommesekk		Vekt		
Gruppe	(mm)	SD	(mm)	SD	(mm)	SD	(mg)	SD
WB1	5,70	0,66	1,02	0,14	1,14	0,08	4,70	0,71
WB2	5,11	0,88	0,91	0,14	1,10	0,08	4,17	0,73
W	5,33	0,85	0,95	0,14	1,12	0,08	4,37	0,75
GB1	5,67	0,71	1,00	0,14	1,14	0,09	4,74	0,76
GB2	5,76	0,52	1,03	0,14	1,16	0,09	5,07	0,78
G	5,71	0,64	1,02	0,14	1,15	0,08	4,88	0,79
CB1	5,91	0,83	1,02	0,14	1,09	0,08	5,27	0,81
CB2	6,32	0,51	1,14	0,14	1,13	0,09	5,84	0,82
C	6,11	0,72	1,08	0,14	1,11	0,09	5,55	0,84

Dorsalfinnen var utviklet kun i varm (W) og gradient (G) gruppe. Varm gruppe hadde signifikant høyere forekomst av haleknekk, ryggskader, deformiteter og andre skader på kroppen sammenlignet med de to andre gruppene ( $p < 0,05$ , Tabell 10).

*Tabell 10. Oppsummering av gjennomsnittlig forekomster av dorsalfinne, haleknekk, ryggskader, kropps-deformiteter og kropps-skader hos nyklekkete larver for de forskjellige batchene og inkuberingsgruppene.*

Gruppe/Batch	Dorsal finne (%)	Haleknekk (%)	Ryggskade (%)	Deformiteter (%)	Skader (%)
WB1	39,51	30,86	20,99	14,81	4,94
WB2	8,27	53,38	43,61	68,42	37,59
W	20,09	44,86	35,05	48,13	25,23
GB1	13,51	12,16	4,73	24,32	3,38
GB2	1,87	12,15	0,93	10,28	0,93
G	8,63	12,16	3,14	18,43	2,35
CB1	0,00	17,00	12,00	23,00	7,00
CB2	0,00	5,05	4,04	8,08	1,01
C	0,00	11,06	8,04	15,58	4,02

Forskjeller i lengde, høyde og vekt er gitt for de forskjellige batchene og inkuberingsgruppene Tabell 11. Det var ingen klare forskjeller mellom temperaturgruppene.

*Tabell 11. Oppsummering av gjennomsnittlig lengde, høyde og vekt for forskjellige batcher og temperaturregimer for to uker gamle larver.*

Gruppe/Batch	Lengde (mm)	SD	Høyde (mm)	SD	Vekt (mg)	SD
WB1	6,39	0,56	1,14	0,10	6,74	0,79
WB2	6,49	0,66	1,17	0,09	7,40	0,72
W	6,44	0,61	1,16	0,08	7,07	0,56
GB1	6,35	0,28	1,11	0,08	6,39	0,60
GB2	6,49	0,12	1,19	0,08	7,04	0,61
G	6,42	0,23	1,15	0,08	6,71	0,62
CB1	6,62	0,18	1,08	0,08	7,34	0,63
CB2	6,73	0,28	1,17	0,08	8,31	0,64
C	6,67	0,24	1,12	0,08	7,82	0,65

To uker etter klekking var det store forskjeller i deformiteter mellom gruppene (Tabell 12), hvor gradient gruppen (G) hadde lavest forekomsten av haleknekk og ingen eller tilnærmet ingen forekomst av andre kroppsdeformiteter og skader. Varm gruppe (W) hadde høyest forekomst av kroppsdeformiteter og skader.

Tabell 12. Oppsummering av gjennomsnittlig forekomster av haleknekk, kroppsdeformiteter og kroppsskader hos to uker gamle larver for de forskjellige batchene og inkuberingsgruppene.

Gruppe/Batch	Haleknekk (%)	(%)	Deformiteter (%)	Skader (%)
WB1	9,68	1,61	1,61	3,23
WB2	3,28	0,00	6,56	4,92
W	6,50	0,81	4,07	4,07
GB1	1,61	0,00	0,00	3,23
GB2	1,67	0,00	0,00	0,00
G	1,64	0,00	0,00	1,64
CB1	8,33	1,67	0,00	0,00
CB2	15,00	1,67	3,33	0,00
C	11,67	1,67	1,67	0,00

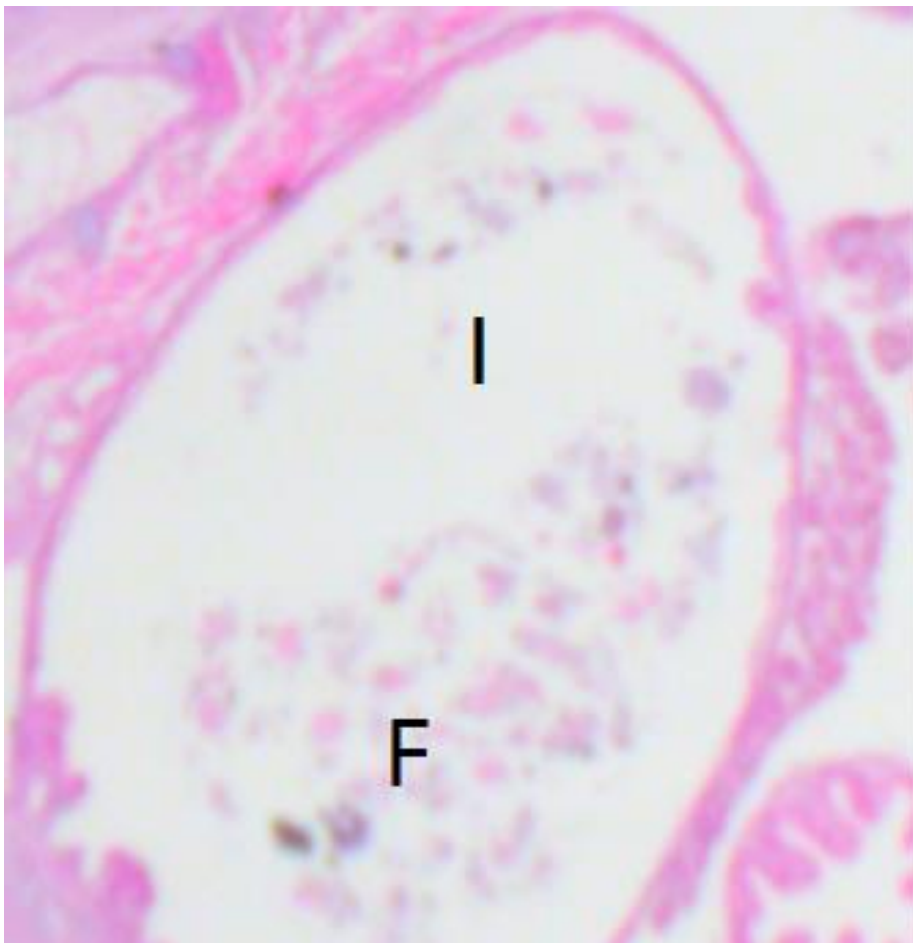
Histologiske undersøkelser på nyklekkete larver (Figur 39) og to uker gamle larver (Figur 40) viste ingen klare forskjeller i organutvikling mellom temperaturgruppene. Det var en klart redusert plommesekk og mer utviklet tarm i to uker gamle larver. Det var funnet fôrpartikler i tarmen til to uker gamle larver fra alle temperaturgruppene (Figur 41).



Figur 39. Nyklekket larve med øyne (E), hjerne (B), plommesekk (Y), gjeller (G), lever (L), pankreas (P), tarm (I) og ryggstreng (N).



*Figur 40. To uker gammel larve med øyne (E), hjerne (B), Otocyst (O), gjeller (G), lever (L), pankreas (P), tarm (I), nyre (K), anus (A) og ryggstreng (N).*



*Figur 41. Tarm (I) med fôrpartikler (F) hos to uker gammel larve.*

## Konklusjoner og anbefalinger

Inkuberingstemperatur spiller en viktig rolle for egg- og larvekvalitet hos rognkjeks.

Egg inkubert på lav temperatur (4-5 °C) resulterte i større larver med lite deformiteter både ved klekking og to uker etter klekking sammenlignet med egg inkubert på høy temperatur (ca. 10 °C) og temperaturgradient (4-5 °C i 10 dager og deretter en gradvis økning til ca. 10°C over ca. 2 dager). Men samtidig var eggoverlevelse og klekkeprosent lavest på lav temperatur, og inkuberingstiden var nesten dobbelt så lang sammenlignet med de to andre temperaturregimene.

Det var høyest egg-overlevelse og god klekkeprosent ved høy temperatur, men forekomst av deformiteter på dette temperaturregimet var høyest.

Inkubering med temperaturgradient ga god eggoverlevelse, høy klekkesuksess, tidlig klekkespunkt med tidlig og høy klekkeskudd med lav larvedødelighet, middels larvestørrelse og lite deformiteter og skader på forskjellige kroppsdelene.

Basert på dette anbefales et gradvis justert temperaturregime for inkubering av egg fra rognkjeks hvor en starter med lav temperatur (4-5 °C) de første dagene og deretter en gradvis økning til 10°C over ca. 2-3 dager.

## Referanser:

Geffen, A.J., Fox, C.J and Nash, D.M., 2006. Temperature-dependent development rates of cod *Gadus morhua* eggs. *Journal of Fish Biology*. 69:1060-1080.

Puvanendran, V., Falk-Petersen, I.-B., Lysne, H., Tveiten, H., Toften, H. and Peruzzi, S., 2013. Effects of different step-wise temperature increment regimes during egg incubation of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) on egg viability and newly hatched larval quality. *Aquaculture Research*. doi: 10.1111/are.12173.

## AP 5.5. Protokoll for inkubering av rognkjeksegg

<b>Fagansvarlig:</b>	Akvaplan-niva AS v/ Thor Jonassen
<b>Prosjektgruppe: Akvaplan-niva* og Gifas**</b>	Thor Arne Hangstad, Ane Nytrø, Armand Moe Nes, Thor Jonassen, Albert Imsland
<b>Sammendrag:</b> Rapporten gir et forslag til praktisk protokoll for inkubering av rognkjeksrogn basert på praksis fra forsøksanlegg ved Akvaplan-niva og resultater fra FHF-prosjektet "Hold av stamfisk rognkjeks".	

### 1. Forberedelser

- a. Design av inkubatore og oppsett (ref. alternativer, bilder)

Forskjellige typer inkubatorer blir benyttet til rognkjeks, eksempelvis Sterner familieinkubator eller klekkerrenner med innlagte klekkebakker (4-8 bakker per renne avhengig av størrelse på rennen).

Klekkerennene er vanligvis plassert i et eget romadskilt fra startfôringskar. Larvene flyttes etter klekking. Klekkebakkene bør utstyres med tetningslister i underkant og på sidene for å sikre vannstrøm gjennom bakkene. Avløpene fra rennene må sikres med silduk med maskeåpning liten nok til at larver ikke forsvinner i avløp ved klekking. Denne kan gjerne settes på kort tid før klekking slik at det ikke samles partikler på silduken slik at den tilstopper avløpet og skaper oversvømmelse (som kan medføre tap av egg og larver).

Familieklekkere er bøtteformede med konet bunn, gjerne forsynt med vanninntak i bunn og avløp i topp som gir oppstrøms vannsirkulering. Familieklekkere av forskjellige typer og størrelser kan plasseres i egne inkuberingsrom eller med overløp direkte i startfôringskar. Plasseres de i tilknytning til startfôringskar vil larvene følge med avløpet og samles opp i startfôringskaret.

Felles for begge typer inkubatorer er at egg inkubere sammenklistret i tynne kaker eller flak. Dette forenkler røkting. Det fungerer også greit å inkubere som eggballer, gitt at eggbatchen har god kvalitet og god befruktningsgrad. Dette forutsetter tilstrekkelig vanngjennomstrømning og -kvalitet.



Eksempel på familieklekker (t.v.) og klekkerrenne med bakker (t.h.).

- b. Klargjøring av inkubatorer

For de som benytter klekkerrenner bør en velge bakker med lysåpning <1 mm slik at en unngår at larvene kan svømme ut av bakkene. Dersom dette skulle skje vil dette kunne føre til at larvene

suges fast i risten på baksiden av bakkene og således risikerer å få mekanisk skade. Helt bak i rennen foran utløpet bør en installere hullrist med enda mindre lysåpning som rømningssikring for nyklekte larver. Vær obs på at luftbobler kan samle seg under hullristen i klekkebakkene dersom lysåpningen er svært liten. Her bør en ha rutiner der klekkebakkene ristes for å sikre evakuering av eventuell luft som har samlet seg på undersiden.

Dersom en bruker familieklekkere velger de fleste å la utløpene fra inkubatorene samles opp i en renne som ender opp i ett "oppsamlingskar". Oppsamlingskaret kles med en pose av planktonduk (like stor som karet). Planktonduken bør ha en maskeåpning mindre enn 500 µm, gjerne så liten som 300 µm da denne duken er mer smidig og enklere å jobbe med. En kan da hente ut larver fra dette oppsamlingskaret for overføring til startfôringsenhetene. Alternativt kan utløpene fra inkubatorene gå direkte over i startfôringsenhetene, men man bør ha løsninger som gjør at eggeskall følger med over i startfôringskarene siden disse kan gi grobunn for bakterievekst.

Alt av inkubatorer, rør og utstyr bør vaskes, desinfiseres og tørkes i god tid før innlegg av rogn. Sirkulerende vann bør settes på noen dager før for å stabilisere miljø og vannsirkulasjon, spesielt dersom en benytter temperaturregulering i klekkeriet.

### c. Miljøkontroll

Det anbefales bruk av dypvann som gir stabil temperatur, samt mindre risiko for belastning fra partikler, alger og bakterier. Råvannet bør filtreres (f.eks. trommelfilter eller hjulfilter på 60 µm eller gjerne mindre) og deretter UV-behandles. Det anbefales deretter tilleggsbehandling med finfiltrering med 5 µm patronfilter.

Basert på nye forsøk anbefales det temperaturregulering under inkubering. Et gradvis justert temperaturregime hvor en starter med lav temperatur (4-5 °C) de første dagene og deretter gradvis øker til 10°C over ca. 2 dager har vist å gi god eggoverlevelse, høy klekkesuksess, jevnt- og tidlig klekketidspunkt og lav larvedødelighet, middels larvestørrelse og lavt innslag av deformiteter.

Vanligvis benyttes svak belysning, f.eks. fra tildekkede lysstoffrør i tak over inkubatorene. Valgt strategi for lysregime varierer mellom produsenter, da påvirkning av lyseksposering under inkubering er ukjent. Vanlige strategier er kontinuerlig eller 8 timers lys, men det inkuberes også i konstant mørke.

## 2. Stryking og befruktning

### *Oppfølging av stamfisk før stryking:*

Stamfisken desinfiseres med glutaraldehyd eventuelt annen desinfiseringsmiddel (Halamid, Pyceze) før inntak til anlegget. Hunnfisken er klar for gyting når papilleåpningen er oppsvulmet og rød, ofte med bloduttredelser omkring gattet. Strykingen skjer gjerne noe prematurt, før papilleåpningen er veldig oppsvulmet. Dette gjøres for å unngå at rognkjeksene gyter naturlig i karet. Det kreves en del erfaring for å kjenne fiskens modningsforløp, som gjerne skjer raskere ved høye temperaturer. Gytemoden hunnfisk sorteres ut i et separat kar før stryking for å forenkle observasjonen av gatt og adferd på fisken og redusere unødvendig håndteringstress. Oppbygd hunnfisk sjekkes 2-3 ganger i uka, og oftere når fisken nærmer seg gyting. Gyteperioden for villfanget stamfisk som tas inn i anlegg er gjerne kortere enn for oppdrettet stamfisk. En kan med fordel ha kjønnene adskilt i egne kar, men dette forutsetter god kjennskap



til gyteadferd og anatomi hos arten, da naturlig gytt rogn som går i kar ikke vil bli befruktet av hannfisk i samme kar, og kan ikke befruktes etter kontakt med saltvann.

Gytemoden hannfisk kan normalt strykes gjentatte ganger og gi melke av god kvalitet over en lengre periode. Utfordringen er ofte små volum av melke, på tross av god kvalitet. Et alternativ til stryking vil være å avlive rognkallen og ta ut hele gonader som moses gjennom en liten tesil eller kvern for å få ut mest mulig melke. Melken kan deretter kjølelagres, cryopreserveres (fryses) eller brukes direkte i ubefruktet rogn. Metode for cryopreservering og kjølelagring av melke fra rognkjeks finnes som vedlegg til rapporten.

### *Stryking:*

Før stryking anbefales det at stamfisk bedøves med Finquel (Trikainmesilat) eller Aqui-S (Isoeugenol). For Finquel benyttes en dosering på 50 mg/l, tilsvarende som for torsk. Ved bruk av Aqui-S lages først en stamløsning i blandingsforholdet 1:10. Deretter benyttes 2 ml pr liter av stamløsningen pr liter sjøvann. Dette er en dosering kraftigere enn anbefalt dose på pakningsvedlegget, men har gitt en relativt hurtig virkning og god oppvåkning på rognkjeks.

Når fisken har tapt likevekt i bedøvelsesbadet tas den ut og tørkes med et fuktig håndkle. Dette for å sjøvannskontaminering av rogn og melke. Rogna strykes direkte i et tørt beger eller en bolle med vid åpning slik at det er enkelt å samle opp eggene. Etter stryking helles eggene med rognvesken over i et målebeger eller målesylinder for registrering av totalvolum. Ubefruktet rogn har god lagringstid ved lav temperatur. Forsendelse av ubefruktet rogn er derfor mulig, gitt at rogn holdes på lav temperatur gjennom hele prosessen.

Villfanget hunnfisk vil normalt gi 0,4 - 1 liter rogn, avhengig av kroppsstørrelse. 5 - 10 dråper melke gir normalt sett god befruktning, og melke fra to hannfisk benyttes ofte for å sikre befruktning. Melke og rogn blandes ved tørrbefruktning uten tilsetning av sjøvann. La blandingen stå i noen minutter før ny sammenrøring overføring til inkubator i tynne lag (2-3 rognkorn i høyden). Selve befruktningen skjer ikke før rogn kommer i kontakt med sjøvann. Det må derfor ikke være gjennomstrømming i inkubatoren og vannstanden bør være så lav som mulig. La vannet være avslått i 10 minutter slik at melken rekker å befrukte eggene.

Det vanlige er å inkubere sammenklistrede egg, men det kan være fordeler med separerte egg, bl.a. i forhold til enklere røkting av døde egg. Det er foreløpig ikke utviklet metode for separering av rognkjeksrogn som gir tilfredsstillende rognkvalitet..

#### a. Kvalitetskontroll

Etter befruktning bør en sjekke befruktningsprosent og cellesymetri for å få en indikasjon på kvaliteten av eggbatchen. Dårlige batcher fører normalt sett til høy dødelighet og utvikling av sopp- og bakterievekst. Det kan derfor lønne seg å kassere dårlige eggbatcher. Normal overlevelse til klekking er ca. 70 %, men dette tallet varierer avhengig av befruktningsprosent.

Siden en beregner innlagt eggmengde basert på volum bør en måle eggdiameter og regne om til antall egg for å få best mulig kontroll antall egg som inkuberes.

### **3. Regulering av miljø**

#### **a. Temperatur, lys og vannbehandling**

Dersom en inkuberer på lav temperatur kan risikoen for bakterie- og soppvekst øke, da oppholdstiden i inkubasjonsenhetene øker. Inkubasjonstemperaturer rundt 10 grader er vanlig i kommersielle produksjonsanlegg, men som nevnt over bør overgangen skje gradvis over noen dager slik at en får en periode i starten med lav teperatur. Temperatur under inkubering bør ikke overstige 12-13 °C.

#### **b. Vannutskifting, sirkulasjon og oksygen**

Vanngjennomstrømmingen i inkubatorene bør være høy nok til å sikre at oksygenivået i avløpet ligger over 90 % metning, men helst mellom 95 og 100 %. I en klekkerenne med 7 bakker sikres dette ved en vanngjennomstrømming på 15 - 20 l/min, mens i familieklekkere bør gjennomstrømmingen være mellom 3 -5 l/min pr enhet. I siste fase av inkuberingsperioden kan oksygenforbruket øke noe. Spesielt gjelder dette dersom en har bakterievekst som følge av lav befruktning og døde egg. Dersom en ikke har mulighet til å øke vanngjennomstrømmingen kan en oksygenere vannet inn. Nivåer på 110 til 115 % har vært benyttet uten at det er observert synlig negativ effekt på klekte larver.

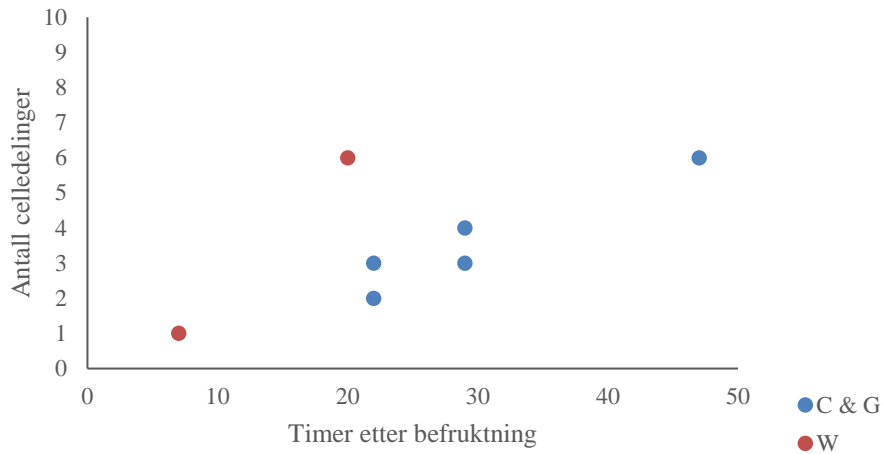
### **4. Mottak- og innlegging av ferdigbefruktet rogn**

Mange foretrekker å inkubere egg fra en hunn (ca. 500 ml) per inkubator befruktet med to hanner (6 – 8 dråper per batch). Ved batcher på mindre enn 2,5 dl blir egg-grupper (to eller flere hunner) slått sammen.

Eggene kan transporteres sammenklistrete flak ca. 100 – 150 døgngrader etter befruktning og inkuberes som vanlig. Det er vanligvis ingen behandling eller desinfisering av egg før levering, men dette bør hevert anlegg vurdere i forhold til egen helse- og hygienestrategi.

## 5. Eggutvikling

Utviklingen i celledeling over tid er vist i Figur 42.



Figur 42. Tidlig celledeling som antall celledelinger i forhold til tid etter befruktning.

Utviklingen i celledeling er raskere ved høy temperatur, men i forhold til døgngader er utviklingen relativt lik mellom forskjellige temperaturer. Minimum døgngader for de forskjellige utviklingsstadiene er gitt i Tabell 13.

Tabell 13. Minimum døgngader ( $d^\circ$ ) for de forskjellige utviklingsstadiene.

### Eggutvikling

Utvikling	$d^\circ$	Utvikling	$d^\circ$	Utvikling	$d^\circ$
2 celler	0,0	Embryo	49,8	Kroppspigmentering	138,4
4 celler	4,1	Øye	49,8	Pl.sekk vene-nett	173,8
8 celler	4,1	Lipid kompressjon	70,3	Hodevekst	183,3
16 celler	4,1	Otocyst	89,4	Åpen munn	209,8
64 celler	8,0	Øyepigment	117,3	Kroppsvkst	209,8
Morula	10,1	Otolitt	117,3	Egg fylt	254,3
Blastula	20,1	Hjerteslag	128,9	Klekking	278,6
Gastrula	29,2	Plommesekk	128,9	Dorsalfinne	308,4

## 6. Oppfølging og daglige rutiner

### a. Røkting av egg

Siden egg som regel inkuberes sammenklistret, anbefales det røkting og håndtering av egg under inkubering holdes på et minimum. Dette er for å redusere stress og risiko for forurensing for prematur klekking. Det er for gode eggbatcher (god befruktningsprosent) få problemer med sopp og dødelighet gitt at vannkvalitet og miljøforhold er gode. Ubefruktede egg ser ut til å bli "innkapslet" slik at de ikke forurenser andre egg ved å gi grobunn for sopp/bakterier.

### b. Miljøkontroll: Observasjoner, registreringer og tiltak

- Befruktningsprosent bør registreres ved inkubering. Ved lav befruktning (50% eller mindre) bør eggbatchen kasseres. Tilsvarende vurdering bør gjøres basert på cellesymetri (fra åtte timer etter inkubering).
- Ved akkumulering av partikler og groe bør en vurdere rengjøring- eller bytte av inkubator.
- Ved begroing av sopp og bakterier bør en vurdere desinfisering.
- Daglig registrering av temperatur og oksygen for vurdering av behov for justering av temperatur, vannutskifting og evt. oksygenering.
- Daglig sjekk av sikring (silduk) av avløp.
- Daglig loggføring av alle registreringer og tiltak mhp. dokumentasjon, benchmarking av grupper, erfaringskunnskap og problemløsning i forbindelse med avvik.

### c. Håndtering av rogn: Rutiner for renhold, desinfisering og plukking av døde egg

I enkelte anlegg opplever man at finpartikulært materiale i vannet legger seg på rogn. Dersom en observerer dette kan en benytte en liten silikonslange som hevert og "støvsuge" rogn og/eller vende "rognkaken". Det er også mulig å flytte hele rognkaker over i en bøtte med rent sjøvann mens en rengjør inkubatoren.

Fjerning av døde/ubefruktede egg har vist seg å være utfordrende på grunn av at rogn klebes sammen. For å fjerne døde egg kan en tynn silikonslange benyttes for å forsøke å "støvsuge" dem ut. Dette er vanskelig å lykkes med tidlig i inkuberingsfasen, men etter hvert vil disse eggene slippe taket. For å unngå at døde rognkorn blir utilgjengelige i midten av egg-klumpen anbefales det derfor å stryke ut rognkakene til svært tynne lag på 2-3 rognkorn i høyden.

Det oppstår av og til problemer med bakterie- og soppvekst på rogn. Rogna kan da behandles med Pyceze eller Buffodine, noe som ser ut til å ha positiv effekt.

Ikke alle anlegg behandler rogn i inkubasjonsfasen, mens andre gjør en rutinemessig desinfisering uavhengig om en har problemer med sopp eller bakterievekst. Det mest brukte desinfeksjonsmidlet er Buffodine. Basert på erfaringer bør en vente til eggene har nådd 60 døgngader før første behandling og behandling av egg eldre enn 230 døgngader kan medføre prematur klekking. Dersom en inkuberer i klekkerenner kan en behandle hele renna på en gang eller ta ut enkeltbakker og behandle disse, mens i familieklekkere vil det være hensiktsmessig å behandle hver enkelt enhet. Doseringen følger produsentens anbefaling på 1:100 med 10 minutters behandlingstid.

## 7. Klekking og uttak av larver

Klekking vil starte mellom 280 (høy temperatur) og 300 (lav temperatur) døgngader og kan vare opptil 350 døgngader ved lav temperatur (4-5 °C). I dager vil det si start klekking fra ca. 28 dager (ved ca. 10 °C) til 63 dager (ved 4-5 °C), og den kan strekke seg over 9 dager (ved ca. 10 °C) til 13 dager (ved 4-5 °C). Se tabell Tabell 14.

Tabell 14. Oversikt over døgngader ( $d^\circ$ ), dager etter befruktning (DPF) og dager etter klekking (DPH) for start, topp og slutt klekking for tre temperaturgrupper (W: ca. 10 °C), G: gradvis økning fra ca. 5 °C til ca. 10 °C og C: 4-5 °C.

	Start		Topp (50 %)		Slutt	
	$d^\circ$	DPF	$d^\circ$	DPH	$d^\circ$	DPH
W	278,6	28	308,4	3	368,1	9
G	279,9	35	279,9	0	350	7
C	285	63	301,3	3	356,2	13

I inkubatore som ikke er plassert i startfôringskar er det viktig med gode rutiner for raskt uttak av larver og overføring til startfôringskar for å unngå tap av larver. Ved klekking er det risiko for tap av larver gjennom silavløp eller ved oversvømmelse. Oversvømmelse skjer lett ved at eggeskall klogger til avløpssilen.

Uttak av larver kan skje med tapping med slange eller håving (våthåv) over i bølge eller direkte i startfôringskar. En bør ikke blande larver som har for stor spredning i klekketidspunkt.

## AP 6. Kunnskapsgrunnlag for avlsarbeid

<b>Fagansvarlig:</b>	Akvaplan-niva AS v/ Thor Jonassen
<b>Prosjektgruppe: Akvaplan-niva* og Gifas**</b>	Albert K. Imsland*, Patrick Reynolds**, Gerhard Eliassen**, Thor Arne Hangstad*, Ólöf D. B. Jónsdóttir*, Per-Arne Emaus*, Ane V. Nytrø*, Thor Magne Jonassen*
<b>Sammendrag:</b>	<p>Ni familiegrupper med individmerket rognkjeks (avkom fra villfisk) ble fordelt i ni forskjellige laksemerder med to familier per merd og to parallelle merder for hver familie. Innblandingsprosent av rognkjeks var 10%. Laksen var fri for lakselus ved forsøksstart. Lusepåslag ble målt annenhver uke. Mageinnhold på fisk fra alle familiegruppene ble målt fem ganger i løpet av forsøket.</p> <p>Resultatene viste at viktige egenskaper knyttet til lusespising varierte mellom de forskjellige familiegruppene. Dette gir grunnlag for genetisk seleksjon og systematisk avl på egenskaper knyttet til spiseatferd for kontinuerlig forbedring av avlusingskapasiteten hos rognkjeks.</p> <p>Spesielt familie 2 og 5 fremhevet seg, hvor familie 5 hadde en sterk preferanse for laksefôr og lite eller ingen lakselus i magen i perioden. Det var også relativt høy dødelighet i denne familiegruppen. Familie 2 var karakterisert med best vekst (til tross for ingen fôring av rognkjeks), størst variasjon i fødevalg, stor preferanse på lus og høy avlusingskapasitet ved svært lavt lusepåslag. Avlusningseffektiviteten gjorde seg også utslag i stor reduksjon av lus i merder hvor familie 2 var representert. Næringen bør i fellesskap organisere seg rundt avlsprosjekter på rognkjeks der flere avlsmål legges inn. Viktigst er sannsynligvis lusespising og sykdomsresistens. Stamfiskrekrutter fra slike prosjekter bør fordeles til stamfiskanlegg som kan sikre rogn til yngelproduksjon fra avlet rognkjeks.</p>

### Bakgrunn

En har i tidligere forsøk med bruk av rognkjeks til avlusing av laks sett store individuelle variasjoner i innhold av lus i magen. Dette indikerer at enkelte fisk er mer effektive lusespisere eller foretrekker lus mer enn andre. Dersom dette er genetisk påvirket vil avl på denne egenskapen kunne bli svært viktig for en kontinuerlig forbedring av avlusingskapasiteten til rognkjeks. For å undersøke dette genetiske potensialet for økt avlusingskapasitet ble preferansen for lakselus undersøkt i ni forskjellige familiegrupper av rognkjeks holdt sammen med laks i 78 dager. Forskjeller i vekst og overlevelse ble også undersøkt.

Dette forsøket er en del av et FHF-finansiert prosjekt (Prosjekt nr. 900977) og RFFNord finansiert prosjekt (AVLUS, 239135) og har som målsetning å gi ny kunnskap til stabil og forutsigbar produksjon av rognkjeks til bruk i avlusning av laks. Denne rapporten beskriver kunnskapsgrunnlaget for et fremtidig avlsarbeid basert på arbeidspakken AP 6.2: Kunnskapsgrunnlag for avlsarbeid: Testing av beiteaktivitet på lakselus. Prosjektgruppen for dette delprosjektet bestod av Akvaplan-niva AS: Ane Vigdisdatter Nytrø, Thor Arne Hangstad, Armand Moe Nes, Olly Jonsdottir, Thor Magne Jonassen, Albert K. Imsland og GIFAS: Patrick Reynolds, Gerhard Eliassen. Arbeidet har vært gjort i samarbeid med Nordlaks Oppdrett, Lerøy Midt og Grieg Seafood Finnmark.

## Gjennomføring:

**Rognkjeksens:** Gyteklar rognkjeks (8 hanner og 7 hunner) fanget med garn i Sandnessundet utenfor Kraknes, Troms, i april-mai 2014 ble strøket for egg og melke slik at ni forskjellige familiegrupper ble etablert. Alle familiegruppene var halvsøskengrupper. Etter befruktning ble eggene inkubert i separate inkubatore på 9–10°C ved Akvaplan-niva's forskningsstasjon på Kraknes (APN-K). Eggene ble seinere overført til Nofima's avlsstasjon som ligger veg-i-vegg hvor eggene ble klekket i perioden 20.-24. juni (Tabell 15).

Tabell 15. Informasjon om stryking, befruktning, klekking og yngelvekt for de ni familiegruppene i forsøket.

Familie nr.	Hann nr.	Hunn nr.	Befruktet	Klekket	Snittvekt ( $\pm$ SD) 12. november 2014
1	1073	1110	22 Mai	22 Juni	15.0 $\pm$ 1.6
2	1073	1035	22 Mai	23 Juni	11.9 $\pm$ 1.2
3	1091	1088	23 Mai	23 Juni	15.3 $\pm$ 1.6
4	1033	1088	23 Mai	23 Juni	14.4 $\pm$ 1.5
5	1033	1015	23 Mai	24 Juni	20.7 $\pm$ 2.1
6	1035	1084	18 Mai	20 Juni	13.0 $\pm$ 1.5
7	1032	1098	21 Mai	22 Juni	17.3 $\pm$ 1.8
8	1091	1102	22 Mai	23 Juni	17.2 $\pm$ 2.0
9	1030	1111	22 Mai	22 Juni	22.5 $\pm$ 2.2

To til tre dager etter klekking ble larvene startfôret på Gemma Wean diamond 2.0 mm (Skretting AS) og *Artemia* for hånd. All fisk ble bedøvd (benzoak 80 mg/L) og deretter merket med Trovan® Passive Integrated Transponder (PIT-merke) 2. desember 2014: all fisk fra same familie ble i tillegg merket med et eksternt farget Floyd merke (forskjellig farge for hver familie) festet øverst på ryggfinnen. Fisken ble stikkvaksinert med ALPHA JECT Marin micro 5 (Pharmaq AS) 15. desember 2014. Deretter ble 40 fisk fra hver familie (totalt 360 stk.) blandet og overført til et felles 11 m<sup>3</sup> kar ved APN-K med naturlig vanntemperatur for lagring før transport til GIFAS 7. mai 2015. Her ble fisken holdt i karantene i fire 3 m<sup>3</sup> kar til forsøket startet 25. mai. Det var ingen fôring av rognkjeksens. Oppsummering av rognkjeksens historikk er gitt i Tabell 16.

Tabell 16. Oppsummering av historikk til de ni familiegruppene av rognkjeks benyttet i forsøket.

Hendelse	Beskrivelse
Opphav villfisk (F0)	Sandnessundet, Tromsø, fanget mai 2014
Stryking og inkubering, TMY	Begynnelsen av mai 2014
Overført Nofima	28. mai og 6. juni 2014
Klekking	20-24. juni 2014
PIT-merking	2. desember 2014
Overført fra Nofima til TMY, Vaksinerings	15. des, 2014, (Alphaject micro 5)
Transport fra TMY til Gifas	7. mai
Floyd merking	21. mai
Overført til merder med laks	28. mai
Dødelighet/sykdom	Første dødelighet fra dag 42, avsluttet forsøket dag 78 pga. høy dødelighet. Akkumulert fra 10 % (fam. 6) til 35 % (fam. 5). Positiv på <i>Pasteurella</i> (PCR)

**Laksen:** Laksen benyttet i forsøket (totalt 3600 fisk, Aqua Gen stamme) var 0+ fra 2011 generasjon produsert ved Sundsfjord smolt AS og levert til Gildeskål Forskningsstasjon (GIFAS), Nordland, i mars 2015. Fisken var vaksinert med Alpha Marine Micro 4 (Pharmaq). All fisk hadde lik genetisk og miljømessig bakgrunn. Fra mars til mai 2015 ble fisken overført til Langholmen, Nordland, hvor forsøket ble gjennomført i småskala merder (5x5x5) i perioden mars til august. Valg av merd for de enkelte familiegruppene var tilfeldig (loddtrekning). Fisken ble sortert og fordelt med 400 laks og 40 rognkjeks i hver av de 9 forsøkemerdene den 25. mai. Gjennomsnittsvekt ved forsøksstart for rognkjeks ble målt til  $123.3 \pm 12.3$  g ( $\pm$  SD). I tillegg ble all laks fra hver merd bulkveid ved forsøksslutt. Laksen ble føret med standard laksefôr (CPK 75, Biomar, Århus, Danmark) to ganger daglig i henhold til tabell. Totalt fôrforbruk varierte fra 68 til 74 kg.

Det ble foretatt lusetelling på 30 laks like før overføring til forsøksmerdene og deretter på 30 laks fra hver forsøksmerd hver annen uke for å beregne lusepåslag. Fem kategorier ble registrert: 1) *Lepeophtheirus salmonis*: modne hunnlus; 2) *Lepeophtheirus salmonis*: modne hannlus; 3) *Lepeophtheirus salmonis*: Pre-adult; 4) *Lepeophtheirus salmonis*: Chalimus; 5) *Caligus elongatus*.

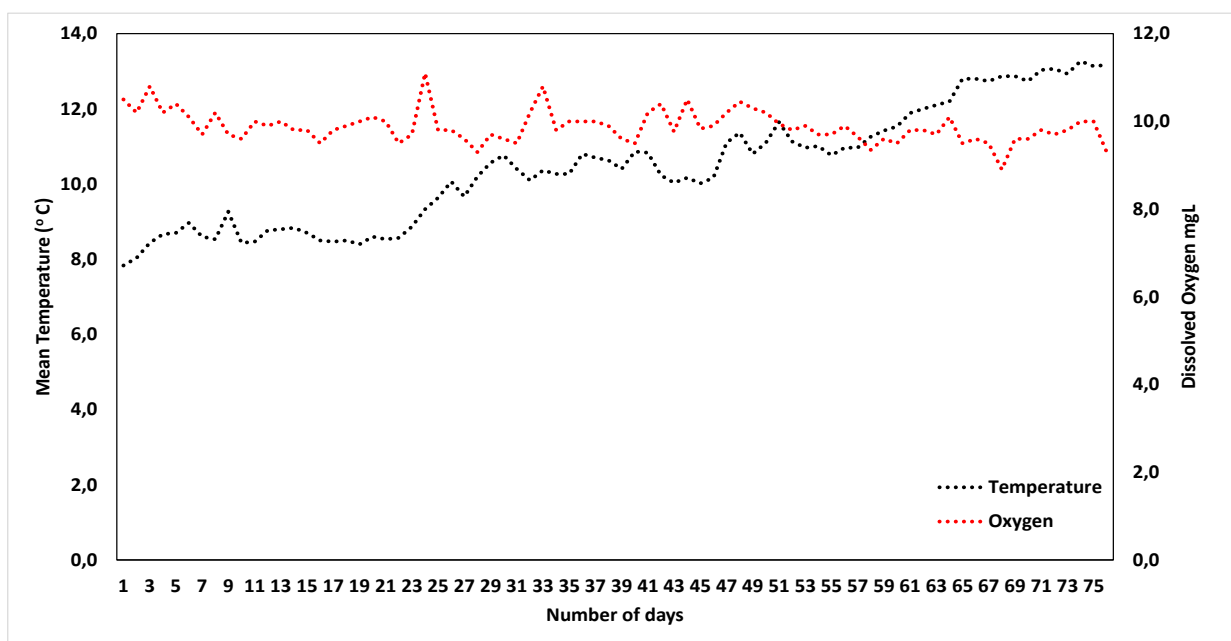
**Forsøksoppsett:** Fordeling av de enkelte gruppene ved forsøksstart 25. mai 2015 er vist i Tabell 17. For hver familie ble 20 rognkjeks plassert i én merd sammen med en annen rognkjeks-familie og 20 andre rognkjeks fra samme familie plassert i en annen merd med en annen familie. Dette ga to replikate merder for hver familie og totalt 40 fisk fra to forskjellige familier i hver merd. Innblandingsprosenten av rognkjeks i forhold til laks var 10% (forhold 1:10). PIT-merker fra all fisk ble registrert før overføring til merd.



Tabell 17. Fordeling av de ni familiegruppene av rognkjeks på ni forsøksmerder med laks (forsøksdesign). Fargekodene er referert i figurer med familiebaserte data.

Merd	Antall laks	Rognkjeksfamilier									Antall rognkjeks per merd
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	
401	400	20								20	40
402	400						20	20			40
403	400		20					20			40
404	400			20		20					40
405	400						20			20	40
406	400				20				20		40
407	400			20		20					40
408	400	20	20								40
409	400				20					20	40

Miljø (temperatur og oksygen) i forsøksperioden er vist i Figur 43. Saliniteten varierte i perioden fra 29,6 til 34,1 ppt. Siktedyp varierte fra 5-10 meter.



Figur 43. Variasjon i temperatur og oksygen i forsøksperioden.

Individuell vekt og lengde ble registrert samtidig med prøvetaking av mageinnhold. Individuell daglig vekstrate (SGR) var beregnet i henhold til Houde and Schekter (1981):

$$SGR = (eg-1) \times 100$$

hvor  $g = (\ln(V2) - \ln(V1)) / (t2 - t1)$  og V2 og V1 er vekt ved henholdsvis dag t2 og t1.

**Magetømming:** Prøvetaking for mageinnhold ble foretatt hver andre uke til samme tidspunkt om morgenen (Tabell 18). All fisk ble da bedøvd (Benzoak® 80 mg l<sup>-1</sup>) og en silikonslange (15 cm lang og diameter på 4 mm) festet til en sprøyte fylt med sjøvann ble forsiktig ført ned gjennom halsen og ned i magesekken. Vannet ble forsiktig presset inn i magesekken slik at

mageinnholdet ble presset ut gjennom tarmen på fisken og opp i en beholder. Deretter ble mageinnholdet overført til en petriskål for videre analyse i stereolupe. Innholdet ble klassifisert som: a) lakselus (alle stadier av *L. salmonis* og *Caligus elongatus*) b) laksefôr, c) uspesifiserte krepsdyr (for eksempel *Caprella spp.*), d) hydrozoer, e) Blåskjell (*Mytilus edulis*), f) uidentifisert eller tom mage. Etter prøvetaking ble fisken overført til oppvåkningskar med luftet sjøvann før overføring tilbake til deres spesifikke merd. Det ble observert økende dødelighet i forsøket fra dag 42, og det ble seinere bekreftet smitte med *Pasteurella spp.*

Tabell 18. Prøvetakingsplan for forsøket.

Uke nr.	Bulkveiing av laks	Utsett av rognkjeks i merd	Lusetelling	Mage-analyser	Veiing Rognkjeks	Adferd
1	X	X	X		X	
2						X
3			X	X	X	X
4						X
5			X	X	X	X
6						X
7			X	X	X	X
8						X
9			X	X	X	X
10						X
11			X	X	X	X
12						X
13			X	X	X	X
14						X
15			X	X	X	X
16						X
17			X	X	X	X
18						X
20	X		X	X	X	X

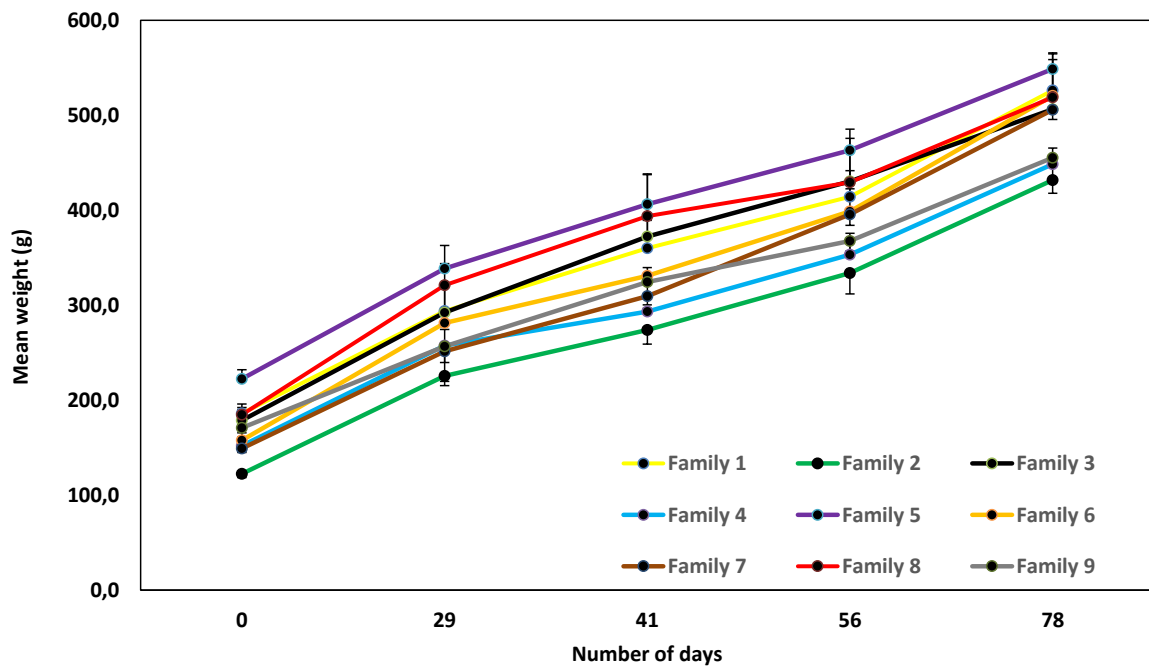
**Statistikk:** Programvaren Statistica™ 12.0 ble brukt for all statistisk analyse. Alle data ble testet for normalfordeling ved bruk av en Kolmogorov-Smirnov test (Zar, 1984) og homogeniteten av variansen ble testet ved bruk av Levene's F test (Zar, 1984). Mulige forskjeller i gjennomsnittsvekt og fôrpreferanse (forskjellige kategorier av mageinnhold) mellom familiegruppene ble testet med en toveis nøstet variansanalyse (ANOVA) hvor replikater (parallele grupper) ble nøstet innenfor hver behandling. Der ANOVA viste at det var signifikante forskjeller mellom gruppene ble en Student-Newman-Keuls (SNK) post-hoc test brukt for å identifisere hvilke grupper som var forskjellige. Et signifikansnivå på 0,05 ble brukt.

## Resultater

**Vekst og dødelighet:** Startvekt for rognkjeksene varierte fra  $122,6 \pm 3,9$  g for familie 2 til  $222,3 \pm 9,9$  g for familie 5. Disse gruppene var signifikant forskjellige gjennom hele forsøket (Figur 44, toveis nøstet ANOVA,  $P < 0,001$ ). På slutten av forsøket var den relative vektforskjellen mellom gruppene betydelig mindre, men familie 2 var fremdeles minst med en snittvekt på  $431,8 \pm 0,7$  g sammenlignet med  $548,5 \pm 16,1$  g for familie 5. Spesifikk vekstrate (SGR) var høyest for familie 2 gjennom hele forsøket (Figur 44) og var signifikant høyere enn familie 5 og 9 (toveis nøstet ANOVA,  $P < 0,01$ ).

Det ble registrert økning i dødelighet fra dag 42. Vevsprøver fra død fisk testet positivt for *Pasteurella* spp. Det var forskjell i dødelighet mellom familiene (toveis nøstet ANOVA,  $P < 0,01$ , Figur 45). Registrert dødelighet var lavest for fisk fra familie 6 (2,5%, SNK test,  $P < 0,05$ ), mens akkumulert dødelighet for de andre gruppene varierte fra 4,3% for familie 8 til 34,6% for fisk fra familie 5.

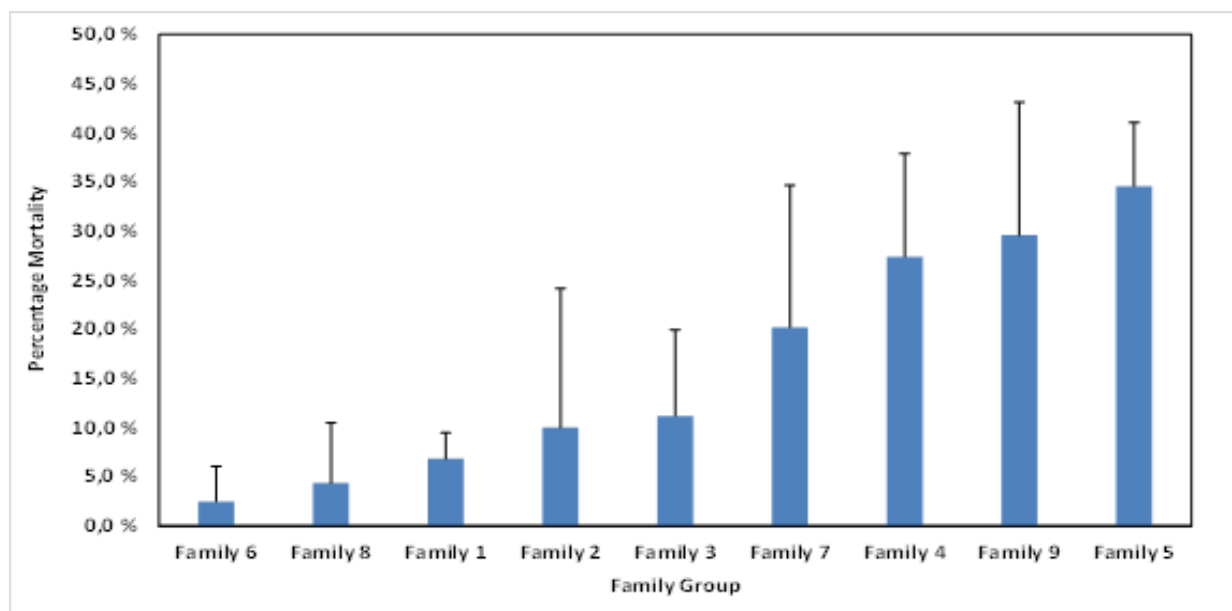
Laksen vokste fra  $122,9 \pm 5,1$  g til  $245,8 \pm 10,0$  g i forsøksperioden og det var ingen forskjell mellom gruppene (merdene). Vekstratene (SGR) varierte mellom 1,03 og 1,19 % per dag. Det var ingen dødelighet.



Figur 44. Vekst ( $g \pm SD$ ) hos ni familiegrupper (halvsøsken) av rognkjeks. Vertikale linjer indikerer standard feil av gjennomsnittet (SEM). Punkter for gjennomsnittsdata med linjer som ikke overlapper er signifikant forskjellige.

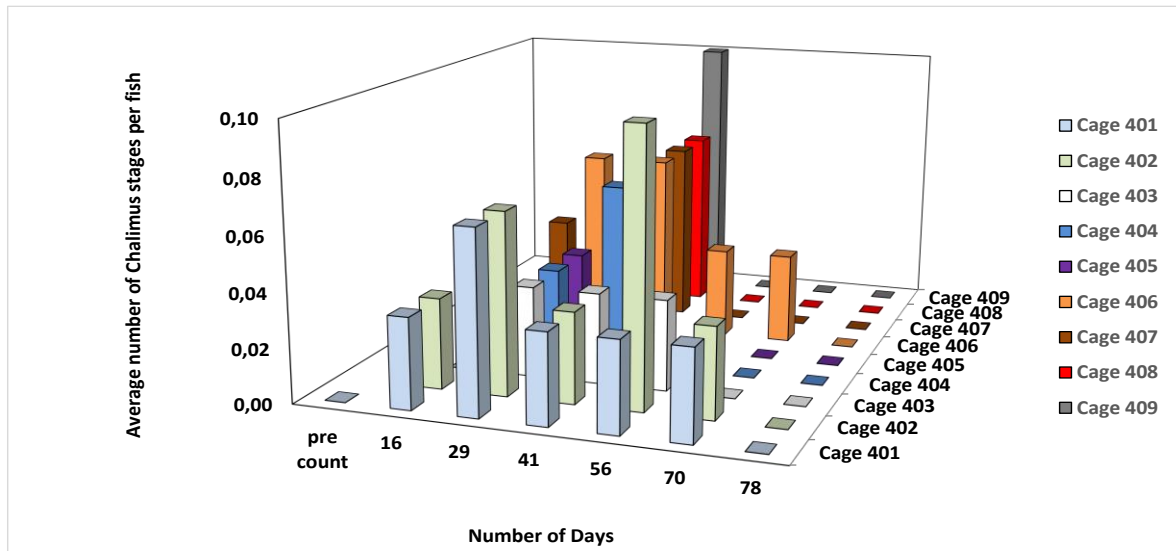
Tabell 19 Gjennomsnittlig akkumulert vekstrate (cSGR) for hver familiegruppe på forskjellig tidspunkt (n = 20; N = 180) og tilhørende ANOVA verdier. Gjennomsnittsverdier som ikke deler samme bokstav er signifikant forskjellige.

Family ID	Sampling Days			
	29	41	56	70
1	1.70 ± 0.07 <b>ab</b>	1.60 ± 0.04 <b>abc</b>	1.47 ± 0.01 <b>bcd</b>	1.31 ± 0.01 <b>cd</b>
2	2.07 ± 0.07 <b>a</b>	1.97 ± 0.02 <b>a</b>	1.73 ± 0.05 <b>a</b>	1.59 ± 0.03 <b>a</b>
3	1.70 ± 0.19 <b>ab</b>	1.77 ± 0.09 <b>abc</b>	1.57 ± 0.01 <b>ab</b>	1.33 ± 0.01 <b>cd</b>
4	1.82 ± 0.07 <b>ab</b>	1.69 ± 0.08 <b>abc</b>	1.59 ± 0.04 <b>ab</b>	1.40 ± 0.06 <b>b</b>
5	1.41 ± 0.28 <b>ab</b>	1.40 ± 0.15 <b>c</b>	1.29 ± 0.05 <b>d</b>	1.18 ± 0.07 <b>d</b>
6	1.91 ± 0.18 <b>ab</b>	1.80 ± 0.03 <b>ab</b>	1.67 ± 0.07 <b>ab</b>	1.54 ± 0.07 <b>ab</b>
7	1.78 ± 0.07 <b>ab</b>	1.91 ± 0.01 <b>a</b>	1.72 ± 0.10 <b>a</b>	1.54 ± 0.02 <b>ab</b>
8	1.83 ± 0.04 <b>ab</b>	1.79 ± 0.20 <b>abc</b>	1.54 ± 0.03 <b>abc</b>	1.33 ± 0.05 <b>cd</b>
9	1.23 ± 0.39 <b>b</b>	1.47 ± 0.08 <b>bc</b>	1.33 ± 0.07 <b>cd</b>	1.27 ± 0.03 <b>cd</b>
ANOVA	3.61	7.28	16.84	18.68
df	8,17	8,17	8,17	8,17
P-value	0.037	0.004	< 0.001	< 0.001



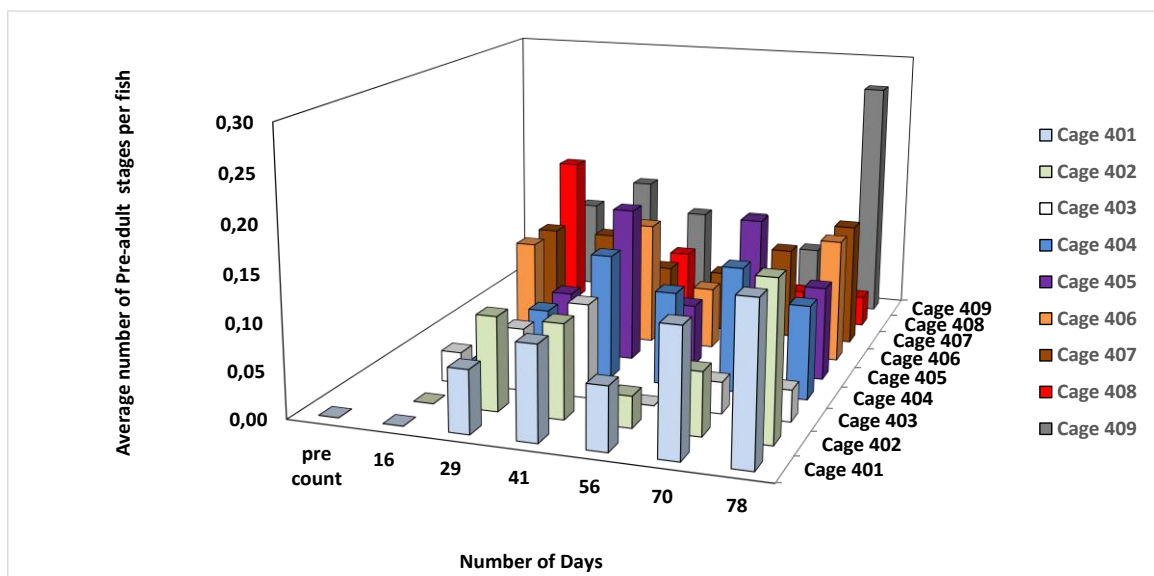
Figur 45. Akkumulert dødelighet bland 9 familiegrupper av rognkjeks testet positivt for *Pasteurella* spp..

**Utviklingen i infeksjonsgraden av lakselus:** Ved lusetelling på laksen annenhver uke ble alle stadiene registrert. Utviklingen i påslaget av Chalimus stadiene er vist i Figur 46. Påslaget var lavt gjennom hele forsøket. Ved start var det null og på dag 16 var det i tre merder telt gjennomsnittlig kun 0,03 lus og ingen i de andre merdene. Deretter økte påslaget for de fleste merdene, for deretter å bli redusert. Ved siste lusetelling dag 78 var det ingen lus på Chalimusstadiet på noen av laksen. Signifikante forskjeller mellom merdene ble ikke observert ved noen av måletidspunktene ( $p > 0.05$ ).



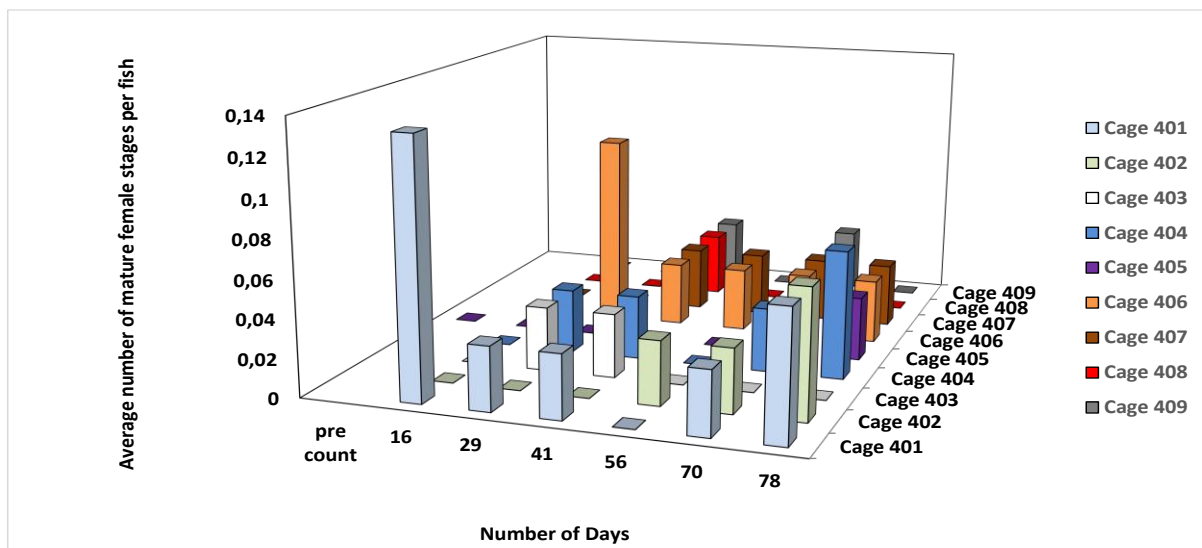
Figur 46. Gjennomsnittlig antall lus på Chalimusstadiet for hver av de ni forsøksmerdene.

Utviklingen i infeksjonsgraden for pre-adult stadiet er vist i Figur 5. Det var ingen lus på dette stadiet ved forsøksstart. Dag 16 var påslaget størst i merd 408. Generelt økte påslaget for alle gruppene frem til dag 41, bortsett fra i merd 403 og 408 som endte opp med mindre enn 0,05 lus per fisk. Motsetningen til dette var merd 401, 402 og 409 hvor påslaget var på sitt høyeste (gjennomsnittlig 0,15 – 0,25 pre-adulte lus) ved siste måling dag 78. Det var ikke signifikante forskjeller i infeksjonsgrad av pre-adulte stadier av lus mellom merdene i løpet av forsøksperioden ( $p > 0,05$ ).



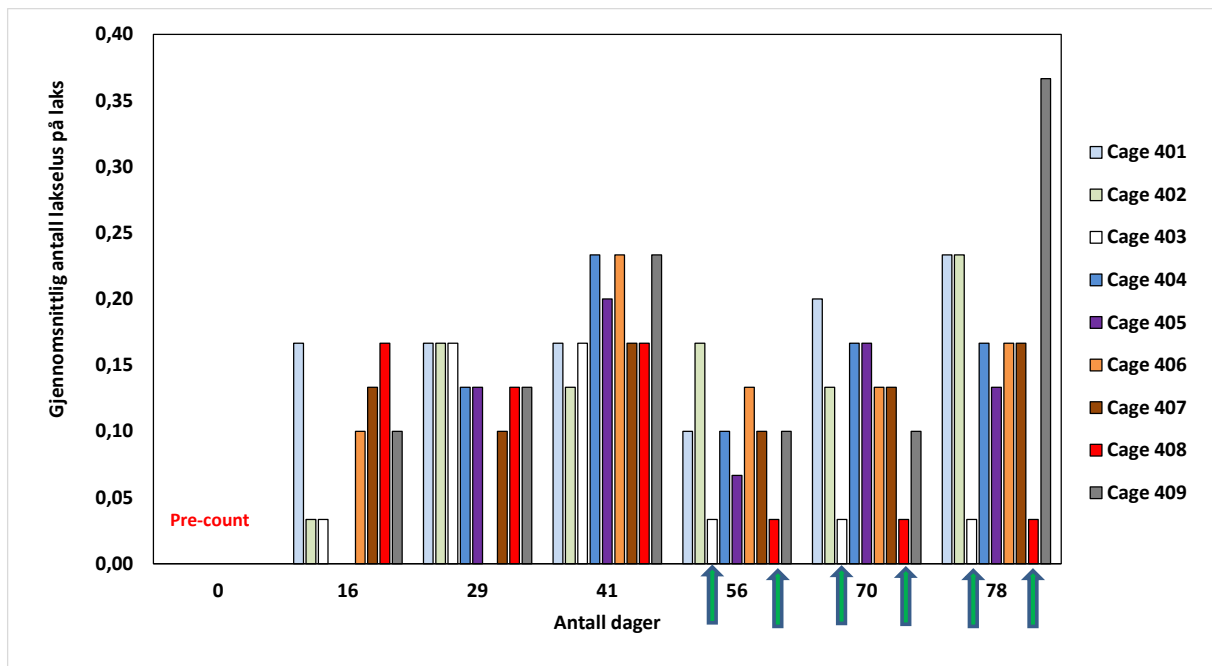
Figur 47. Gjennomsnittlig antall lus på pre-adult stadiet for hver av de ni forsøksmerdene.

Utviklingen i infeksjonsgraden for modne hunnlus er vist i Figur 48. Det var ingen lus på dette stadiet ved forsøksstart. Høyest lusetall fant en i merd 401 dag 16 (0,13 lus per fisk), på samme tidspunkt som det ikke var påvist modne hunnlus i noen av de andre merdene. Ved etterfølgende lusetelling dag 29 var lusetallet i merd 401 kraftig redusert (0,03), mens det hadde økt i merd 403, 404 og 406. Merdene 403, 408 og 409 var de eneste medene som fikk en klar reduksjon den siste halvdel av forsøket og endte på null ved forsøksslutt, mens merdene 401, 402 og 404 fikk en klar økning i modne hunnlus ved siste måling dag 78 (Figur 48).



Figur 48. Gjennomsnittlig antall modne hunnlus for hver av de ni forsøksmerdene.

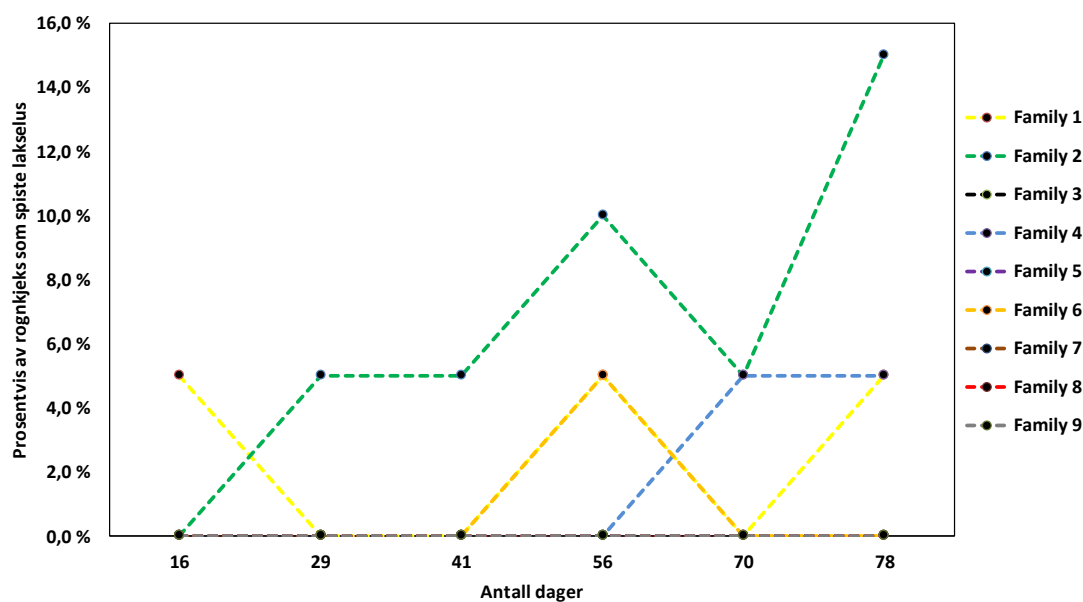
Slår en sammen alle stadiene av lakselus (Figur 49) ser en at infeksjonsgraden generelt øker utover i forsøksperioden frem til dag 41, med luseverdier varierende mellom 0,00 og 0,23, men uten signifikante forskjeller mellom merdene ( $p > 0,05$ ). Fra dag 56 hadde merd 403 og 408 svært lave og stabile lusetall, hovedsakelig bestående av lus på pre-adult stadiet (markert med piler i Figur 49). Motsetningen er merd 401, 402 og 409 som har høyest lusetall på slutten.



Figur 49. Utvikling i lusepåslag (alle stadier) gjennom forsøket. Pilene indikerer merdene (403 og 408) med klart størst reduksjon i lusepåslaget gjennom forsøket. Familie 2 er representert i begge merdene, sammen med familie 1 i merd 408 og familie 7 i merd 403.

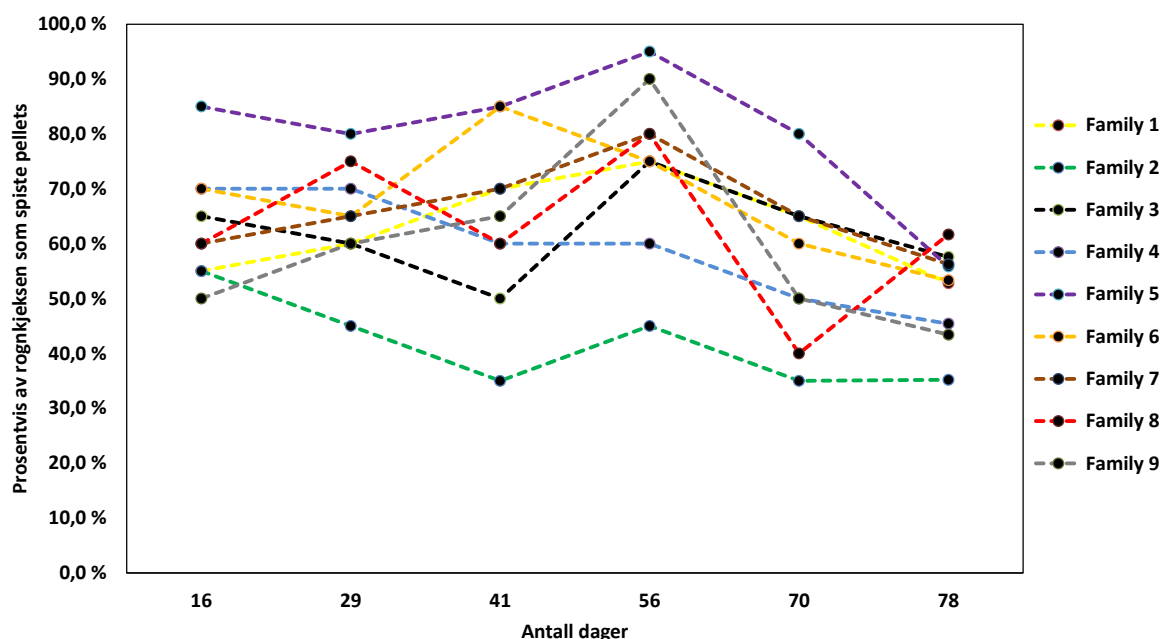
Ser en nærmere på hvilke familiegrupper som er representert i de forskjellige merdene (Tabell 17 i foregående kapittel) legger en spesielt merke til at familie 2 er representert i begge merdene med størst reduksjon i lusetall utover i forsøket (merd 403 (sammen med familie 7) og 408 (sammen med familie 1)).

**Mageanalyser:** Selv om lusepåslaget var lavt i dette forsøket (Figur 49) var det en klar variasjon mellom familiegrupper som hadde spist lakselus (pre-adult og modne hunnlus) av *L. salmonis* og /eller *C. elongatus* (Figur 50). Det var ikke funnet lakselus i magene til familiene 3, 5, 7, 8 eller 9, mens andelen fisk som spiste lakselus i familie 2 økte utover i forsøket, og var signifikant høyest (SNK test,  $P < 0,05$ ) på dag 78, til tross for at lusepåslaget i merdene med denne familien (403 og 408) var lavest i denne perioden. (Figur 49). For familie 1 hadde 5% av individene spist lakselus ved dag 16, 56 and 78.



Figur 50. Prosentvis av rognkjeks som har spist lakselus.

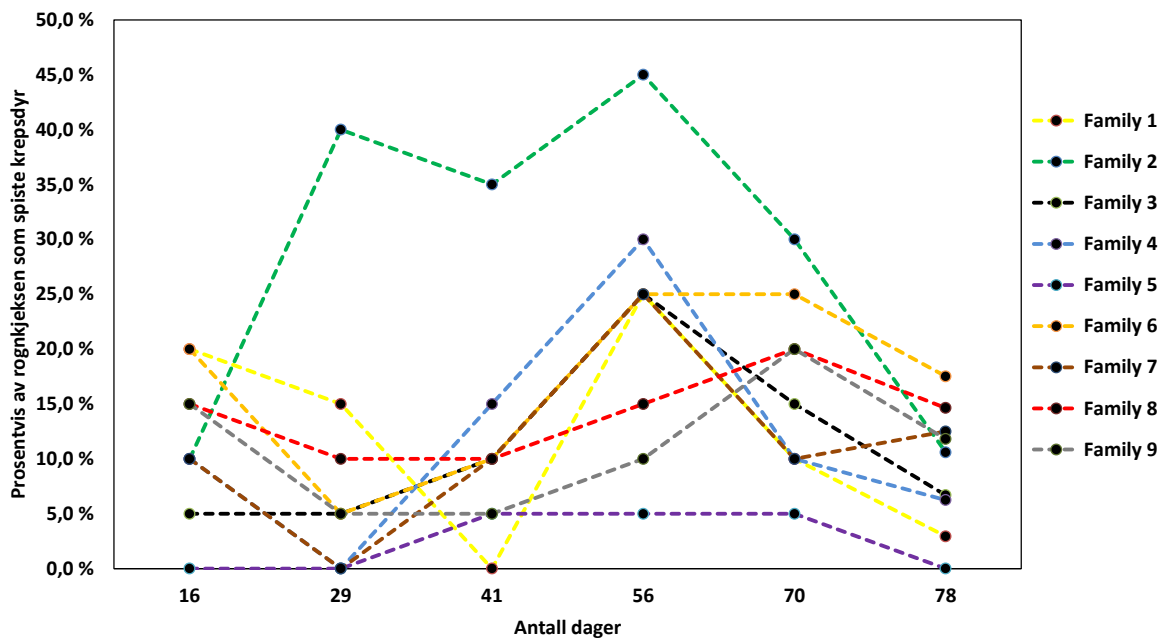
Det var signifikante forskjeller i andel rognkjeks med laksefôr i magen, hvor familie 2 hadde lavest andel (35-55 %) og familie 5 høyest andel fisk som hadde spist laksefôr (Figur 51).



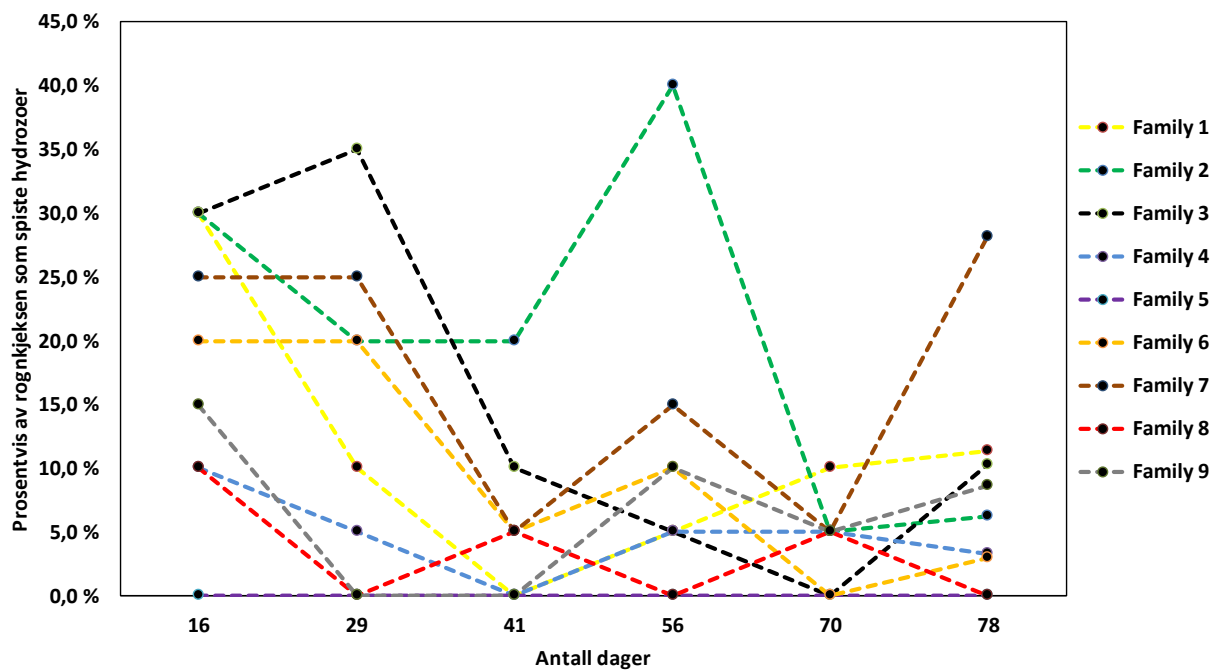
Figur 51. Prosentvis av rognkjeks som har spist laksepellets.

Tilsvarende hadde familie 2 stor preferanse for krepsdyr (Figur 52), hydrozoer (Figur 53), blåskjell (Figur 54) sammenlignet med de andre familiene. Ingen hydrozoer ble funnet i familie 5 og den hadde også minst preferanse for krepsdyr. Andelen med krepsdyr i magen var høyest i familie 1 og 6 ved første prøvetaking (dag 16).

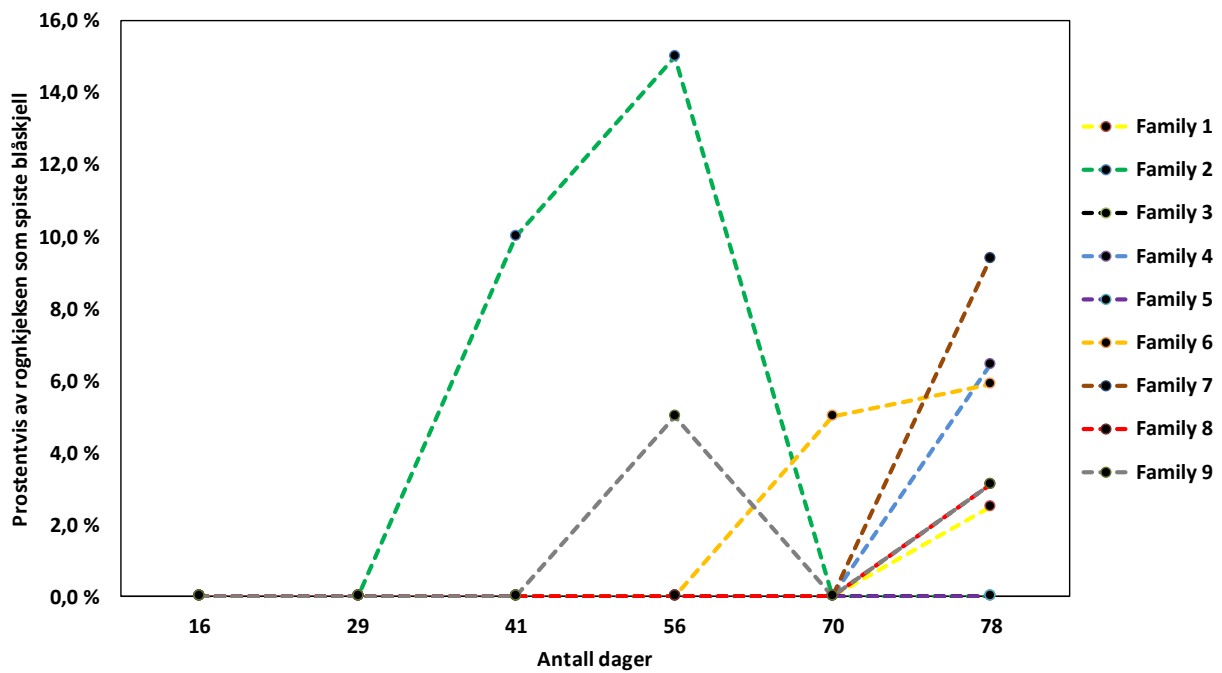




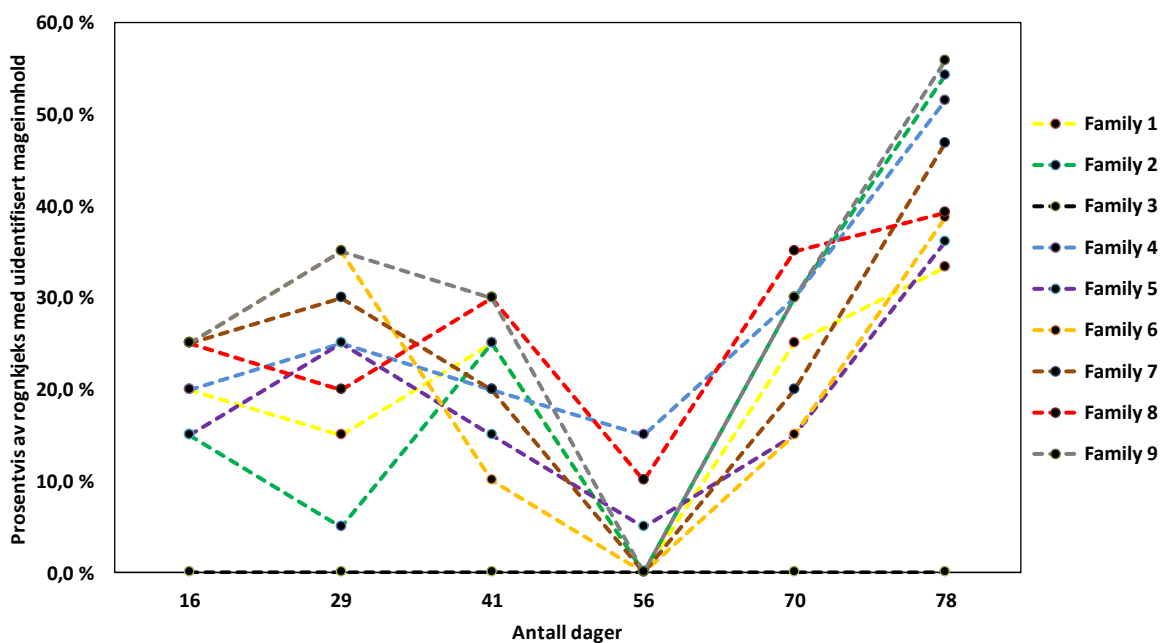
Figur 52. Prosentvis av rognkjeks som har spist krepsdyr.



Figur 53. Prosentvis av rognkjeks som har spist hydrozoer.



Figur 54. Prosentvis av rognkjeks som har spist blåskjell.



Figur 55. Prosentvis av rognkjeks med uidentifisert mageinnhold eller tom mage.

Bortsett fra dag 29 var det liten forskjell i andel fisk med tom mage eller mageinnhold som ikke kunne identifiseres (Figur 55). Her var det færrest fisk (5%) i familie 2 med tom eller uidentifisert mageinnhold. Det var en tendens til økende andel fisk med tom mage eller uidentifisert mageinnhold mot slutten av forsøket.

## Diskusjon

Forskjellen i startvekt mellom familie 2 (122,6 g) og familie 5 (222,3 g) var ikke et resultat av sortering, men et resultat av forskjellig vekst fra tidlig yngelstadie (Tabell 15). I kontrast til dette hadde familie 2 den beste veksten sammenlignet med alle familiegruppene etter at den var satt ut i merder med laks. Mye av vekstforskjellen var derfor tatt igjen på slutten av forsøket. Grunnen til at familie 2 får bedre vekst i sjø enn i kar på land er usikkert. Noe kan forklares ved at liten fisk generelt har høyere vekstrate enn stor fisk. Temperaturen økte også utover i forsøket, og liten fisk har høyere temperaturoptimum for vekst enn større fisk. I tillegg var det forskjell i fødevalg, hvor familie 2 var mer generalist og hadde høyere innslag av naturlig føde enn laksefôr. Det kan tenkes at laksefôr, til tross for at det har høy energitetthet ikke er optimalt for vekst hos rognkjeks. Rognkjeks ble ikke føret spesielt i dette forsøket. Likevel var veksten jevnt over for alle gruppene god, i motsetning til tidligere rapportert i forsøk med rognkjeks i merd med laks hvor rognkjeks tapte tilvekst (P. Reynolds, GIFAS, upubliserte data). I forsøket referert var rognkjeks 200 g ved start og ble kjønnsmoden ved ca. 450 g. Ved kjønnsmodning viste den liten interesse for lakselus. Vill rognkjeks blir kjønnsmoden når den er 5-6 år gammel (Thorsteinsson, 1983) og hannen (rognkallen) kan modne opptil to år før hunnen (Davenport, 1985). Det var ingen tegn til kjønnsmodning i dette forsøket, og dette spilte derfor ikke inn på forskjellene i vekst og spiseatferd observert mellom de ni familiegruppene.

Dødeligheten i forsøket var relatert til *Pasteurella* spp. påvist i alle familiegruppene. Det var likevel signifikante forskjeller i dødelighet hvor tre familiegrupper viste klart lavers akkumulert dødelighet, til tross for at de også var kohabitanter med familier med den høyeste dødeligheten. Dette kan tyde på genetisk basert motstandsevne mot denne bakterien, noe som bør undersøkes nærmere mhp. muligheten for å avle på sykdomsresistens. Det var ingen dødelighet eller sykdomstegn på laksen som inngikk i forsøket.

Rognkjeks spiste aktivt lus til tross for lav infeksjonsgrad av lakselus, spesielt i merd 403 og 408 som begge inneholdt familie 2. Dette fremkommer som en klar nedgang i lusepåslag fra dag 42 hvor den generelt var høy i alle merdene (maksimalt 0,17), til et stabilt lavt nivå på mindre enn 0,05 i flere merder fra dag 56. God avlusingseffektivitet ved lavt infeksjonsnivå er en svært viktig egenskap hos rognkjeks, og viser at den er effektiv mot lakselus selv ved strenge lusekrav.

Den høyeste avlusingskapasiteten var spesielt knyttet til familie 2, hvor opptil 15% av fisken hadde lus i magen ved en infeksjonsgrad på mindre enn 0,05 lus (alle stadier). Det var ikke registrert lus i magene til fisk fra familiene 3, 5, 7 og 8 i forsøksperioden, mens fisk fra familiene 1, 4, 6 og 9 hadde lav og varierende andel individer som spiste lus. Den spesielt effektive og vedvarende (stabile) lusespisingen i familie 2 ga en lavere infeksjonsgrad i merdene hvor denne familien var representert (403 og 408) hvor totalt antall lakselus per merd var 43-92% lavere enn i andre merder med andre familier.

Biter av laksepellets var det vanligste mageinnholdet i alle familiegruppene, noe som ikke er overraskende siden all fisk var tilvendt fôrpellets siden tidlig yngelstadie, og det var den mest tilgjengelige og næringsrike fôrkilden. Det var likevel signifikante forskjeller i andel fisk mellom de forskjellige familiegruppene som hadde spist pellets, hvor familie 5 hadde størst andel fisk med pellets i magen sammenlignet med alle andre familier, og spesielt i forhold til familie 2. På den annen side hadde familie 2 høyere innslag av krepsdyrarter sammenlignet med alle andre familier, mens familie 5 hadde lavest andel individer med krepsdyr i magen. Lignende mønster var observert både for hydrozoer og blåskjellarver. Tidligere forsøk har vist at rognkjeks er svært fleksibel i næringsvalget og endrer fôrpreferanse i forhold til hva som er mest tilgjengelig (Imslund et al., 2015). Dette kan være

en måte å redusere energiforbruket som går til å søke etter mat. For eksempel sammenfalt perioden med høy forekomst av blåskjellarver i magen til fisk i familie 2 med perioden med høyt påslag av blåskjell på nøtene. Dette samsvarer med Ingólfsson and Kristjánsson (2002) som fant at en begrenset andel ung rognkjeks spiste blåskjell, men at andelen kunne øke hvis forekomsten av blåskjell økte. Slik opportunistisk spiseatferd er også observert hos vill rognkjeks (Ingólfsson and Kristjánsson, 2002; Vandendriessche et al., 2007).

På tross av at pellets er mer næringsrikt og tilgjengelig enn naturlige fôrorganismer for alle familiegrupper i forsøket har flere familier, og spesielt familie 2, en sterk preferanse til naturlige fôrorganismer som har lavere energitetthet og er mindre tilgjengelig enn laksefôr. Dette kan ha bakgrunn i at naturlige tilpasninger og preferanser til slike organismer, og spesielt lakselus, gjennom mange generasjoner har manifestert seg gjennom genetisk seleksjon. Dette er også i overensstemmelse med teorier (Sih et al., 2004; Sih et al., 2004; West-Eberhard, 2003) om at slik spiseatferd ikke bare er styrt av miljø (fenotypisk plastisitet), men at den genetiske innflytelsen kan være sterk. Basert på denne teorien som støttes av observasjonene i dette forsøket bør den potensielle genetiske variasjonen knyttet til viktige atferdsmessige egenskapene som øker avlusingskapasiteten hos rognkjeks undersøkes nærmere, og utnyttes i genetisk seleksjon og avlsprogrammer for rognkjeks som lusespisere.

Det er kjent at atferdsmessige trekk er påvirket av både naturlig og kjønnsavhengig seleksjon. Fisk fra familie 1 og 2 har samme far, men forskjellige mødre. Tatt i betraktning forskjellen i opptak av naturlige fôrorganismer mellom disse to familiene og at dette til en viss grad er genetisk påvirket er det mest sannsynlig at disse egenskapene er ført videre gjennom maternale (mor) heller enn paternale (far) linjer. Studier som underbygger dette viser at både maternale (Royle et al., 2012) og paternale (McGhee and Bell, 2014) effekter på adferden til avkommet kan oppstå via epigenetiske endringer på genomet.

## Konklusjoner og anbefalinger

Viktige egenskaper knyttet til lusespising hos rognkjeks varierer mellom forskjellige familiegrupper. Dette gir grunnlag for genetisk seleksjon og systematisk avl på egenskaper knyttet til spiseatferd for kontinuerlig forbedring av avlusingskapasiteten hos rognkjeks.

Det var klare forskjeller i viktige egenskaper mellom de ni familiegruppene, hvor spesielt familie 2 og 5 fremhevet seg. Familie 5 hadde en sterk preferanse for laksefôr og lite eller ingen lakselus i magen. Det var også relativt høy dødelighet i denne familiegruppen. Familie 2 var karakterisert med best vekst (til tross for ingen fôring av rognkjeks), størst variasjon i fødevalg, stor preferanse på lus og høy avlusingskapasitet (15% av fisken med lus i magen) ved svært lavt lusepåslag (0 modne hunnlus og mindre enn 0,05 pre-adulte lus) ved siste måling. Avlusningseffektiviteten gjorde seg også utslag i stor nettoreduksjon av lus (over 80%) i merd 3 og 8 hvor familie 2 var representert. Det var ingen slik nettoeffekt i merd 1, 2 og 9, men ca. 56 % nettoeffekt i merd 4, 5 og 6.

Næringen bør i fellesskap organisere seg rundt avlsprosjekter på rognkjeks der flere avlsmål legges inn. Viktigst er sannsynligvis lusespising og sykdomsresistens. Stamfiskrekrutter fra slike prosjekter bør fordeles til stamfiskanlegg som kan sikre rogn til yngelproduksjon fra avlet rognkjeks.

## Referanser

- Davenport, J., 1985. Synopsis of biological data of the lump sucker *Cyclopterus lumpus* (L 1758). FAO Fisheries Synopsis No. 147.31 pp.
- Imsland, A.K., Reynolds, P., Eliassen, G., Hangstad, T.A., Nytrø, A.V., Foss, A., Vikingstad, E., Elvegård, T.A., 2015. Assessment of suitable substrates for lumpfish in sea pens. *Aquaculture International* 23, 639-645.
- Ingólfsson, A., Kristjánsson, B.K., 2002. Diet of juvenile lump sucker (*Cyclopterus lumpus*) in floating seaweed: effect of ontogeny and prey availability. *Copeia* 2, 472-476.
- McGhee, K.E., Bell, A.M., 2014. Paternal care in a fish: epigenetics and fitness enhancing effects on offspring anxiety. *Proc. R. Soc. B* 281, 1146-1151.
- Royle, N.J., Smiseth, P.T., Kolliker, M., Champagne, F.A., Curley, J.M., 2012. Genetics and epigenetics of parental care. In: Royle, N.J., Smiseth, P.T., Kolliker, M. (Eds.), *The evolution of parental care*. Oxford University Press, Oxford, UK., pp. 304–324.
- Sih, A., A. M. Bell and J. C. Johnson., 2004. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology & Evolution* 19(7), 372-378.
- Sih, A., A. M. Bell, J. C. Johnson and R. Ziemba., 2004. Behavioral syndromes: an integrative overview. *Quarterly Review of Biology* 79, 241-277.
- Thorsteinsson, V., 1983. Some aspects of the biology and the fisheries of the lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) *J. Ichthyol.* 10, 77-83.
- Vandendriessche, S., Messiaen, M., O'Flynn, S., Vincx, M., Degraer, S., 2007. Hiding and feeding in floating seaweed: Floating seaweed clumps as possible refuges or feeding grounds for fishes. *Estuarine Coast Shelf Sci.* 71, 691-703.
- West-Eberhard, M. J., 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Zar, J.H., 1984. *Biostatistical Analysis*, 2nd edition, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J., 718 pp.