



UiT Norges arktiske universitet

Behandling med gonadotropinfrigjørende hormon (GnRH) på rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.)

En undersøkelse av behandlingens effekt på klekkesuksess

Marcus Gamst Johansen

Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp.), FSK-3960, mai 2022

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi



Forord

Denne masteren markerer slutten på fem fine år på Norges fiskerihøgskole, og det er mange jeg ønsker å takke. Jeg vil starte med å takke mine veiledere Karl-Erik Eilertsen (UiT), Albert K. D. Imsland (Akvaplan-niva) og Sigurd O. Stefansson (UiB) for fantastisk veiledning hele veien. Deres bidrag med råd, tålmodighet og erfaringer har motivert og det har vært en trygghet å ha dere i ryggen.

Videre ønsker jeg å takke Pernilla Carlsson (NIVA) og Lars Olav Sparboe (Akvaplan-niva) for at dere pekte meg i riktig retning mot en næringsrelevant oppgave. Takk til de ansatte på forskningsstasjonen FISK som la til rette for forsøket og delte av deres erfaringer på oppdrett av rognkjeks. Takk til de ansatte i Akvaplan-niva på Framsenteret for kontorplass, gode lunsjsamtaler og evige mengder med kaffe.

Jeg ønsker også å takke alle mine medstudenter på Fiskeri- og havbruksvitenskap kull 2017, spesielt dere i sjømatgruppa for å ha gjort denne tiden lærerik og morsom. Nå står vi klare for en ny epoke i livet som Fiskerikandidater og klare for å ta fatt på nye utfordringer. Sist, men ikke minst vil jeg takke familien som har støttet, motivert og lest korrektur.

Denne masteroppgaven er en del av et prosjektet: kontroll av kjønnsmodning hos rognkjeks (STAMINA, NFR-269043).

Tromsø, mai 2022

Marcus Gamst Johansen

Sammendrag

Bruk av rensefisk i oppdrett har økt enormt de siste årene, fordi de spiser lakselus, en parasitt som lever på skinnen til laksefisk. Interessen for rognkjeks er spesielt stor, da den har vist seg å være en effektiv lusespiser, selv med lave temperaturer i havet. All rognkjeks som brukes i kommersielle oppdrettsanlegg i dag er etterkommere av foreldre som fangstes vilt. Årsaken er at rognkjeks bruker to til tre år på å bli kjønnsmoden, samtidig som ytre faktorer i akvakultur kan påvirke fiskens reproduksjon negativt. Systematisk avl kan være løsningen for å få rognkjeks bedre tilpasset et liv i oppdrett, samt føre til økt lusespising og redusert dødelighet hos rognkjeks. Dette studiet tar for seg om gonadotropinfrigjørende hormonbehandling kan være en løsning for å styre sluttmodningen hos rognkjeks. Kontroll på kjønnsmodningen er en viktig forutsetning for å kunne drive effektivt avlsarbeid.

Forsøket var gjennomført på forsknings- og innovasjonsstasjon på Kraknes (FISK) fra mars til juli 2021. En stamfiskgruppe på 48 rognkjeks ble brukt hvorav halvparten fikk implantert GnRH-analog og den andre halvparten fikk implantert sham-pellet (implantat uten virkestoff) og fungerte som kontrollgruppe i forsøket. Hunnfisken hadde en gjennomsnittsvekt på 2746 (\pm 110) g, hannfisken hadde en gjennomsnittsvekt på 982 (\pm 39) g. Fisken ble fulgt opp daglig frem til en kontrollert gyting, opptil 52 dager etter implantering. Det var ni GnRH-behandlede og seks sham-behandlede fisk som gytt under forsøket.

Av rognen ble det tatt ut to 5 ml prøver som ble inkubert i 520 ml inkubatorer i duplikat, i minimum 310 d°. Selv om det ikke ble funnet signifikant forskjell i gytetidspunkt mellom gruppene, hadde GnRH-gruppen i gjennomsnitt 12 dager tidligere gyting og mindre variasjon i gytetidspunktet (GnRH 19,89 (\pm 1,88) dager) sammenlignet med sham-gruppen (31,50 (\pm 5,69) dager). Resultatene fra forsøket viser at GnRH-behandlet rognkjeks gytt mer rogn og ovarievæske 5,4 (\pm 0,02) dl, enn fisk som fikk sham-behandling 4,0 (\pm 0,05) dl. Det ble ikke funnet noen forskjeller mellom GnRH- og sham-behandling på rognkornstørrelse eller hannfiskens vekt, GSI og spermatokritt. På klekkesuksess til rognen ble det funnet signifikant flere larver i rogn gytt av rognkjeks behandlet med GnRH 87,6 (\pm 3,0) % sammenlignet med de som hadde fått sham-behandling 59,0 (\pm 9,5) %. Det ble også funnet signifikant lavere andel uklekket rogn fra rognkjeks behandlet med GnRH med 8,8 (\pm 2,1) % enn i rognen fra sham behandlet hunnfisk med 22,8 (\pm 6,7) %. Forsøket viste at GnRH-behandling ga en tidligere og mindre variasjon i gytetidspunkt og høyere andel fiskelarver enn kontrollgruppen.

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Rognkjeksens biologi	4
1.2	Kjønnsmodning	6
1.3	Formål.....	8
2	Materiale og metode.....	9
2.1	Fiskens bakgrunn.....	9
2.2	Forsøksoppsett	9
2.3	Implantering av pellet.....	9
2.4	Daglig røktning.....	11
2.5	Kontrollert befruktning.....	13
2.6	Målinger av gonader og klekkesuksess	13
2.7	Rogninkubatorene.....	14
2.8	Gonadosomatisk indeks og spermatokritt.....	16
2.9	Vannbehandling	16
2.10	Bildetaking	16
2.11	Statistisk behandling av data.....	16
3	Resultat.....	18
3.1	Dødelighet under forsøket	18
3.2	Hunnfisk	18
3.2.1	Tid fra implantering til gyting.....	18
3.2.2	Stryketidspunkt.....	19
3.3	Hannfisk.....	22
3.4	Rognkornstørrelse.....	25
3.5	Klekkesuksess.....	26
4	Diskusjon.....	30

4.1	Dødelighet under forsøket	30
4.2	Hunnfisk	30
4.3	Hannfisk.....	32
4.4	Rognkornstørrelse.....	33
4.5	Klekkesuksess.....	33
5	Konklusjon	35
	Referanseliste	36
	Appendiks.....	43
	Hunnfisk	43
	Hannfisk	44
	Rognkornstørrelse	45
	Klekkeresultat.....	45
	Test for forutsetninger.....	47
	Hunnfisk	47
	Hannfisk	48
	Rognkornstørrelse	49
	Klekkesuksess	50

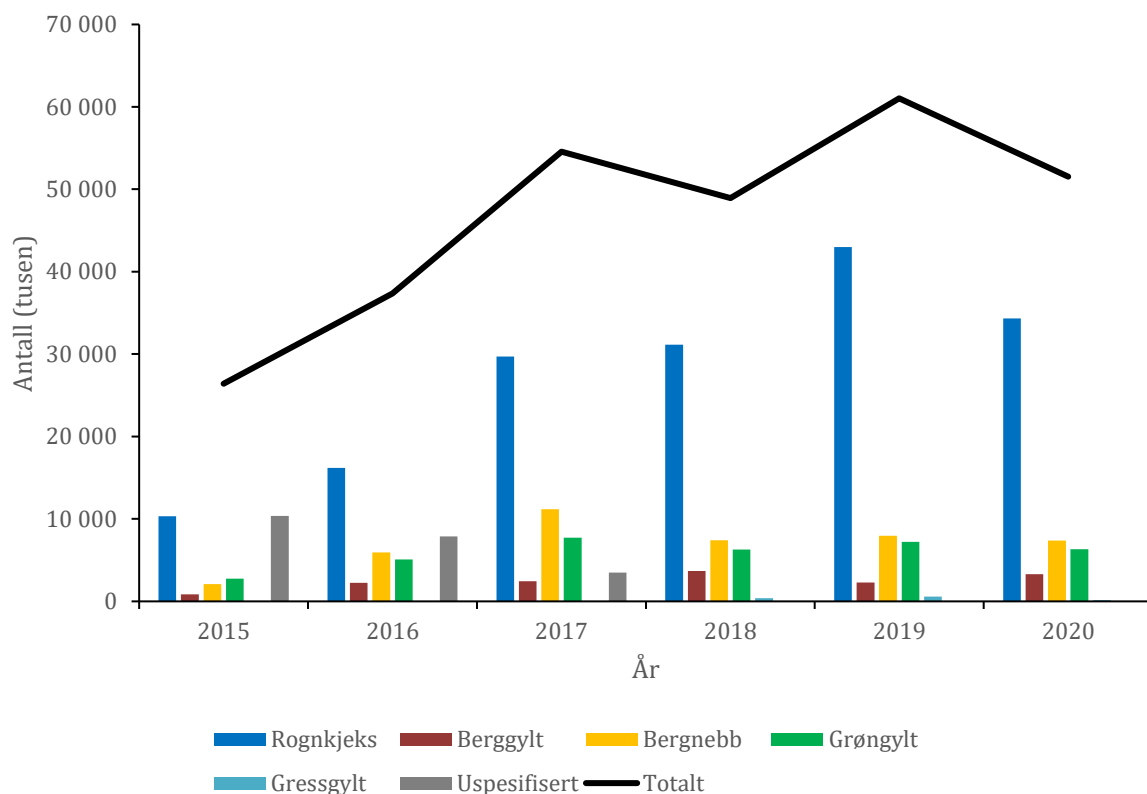
1 Introduksjon

Oppdrett av atlantisk laks (*Salmo salar* L.) har gjennomgått en enorm utvikling siden første utsett på starten av 1970-tallet. I 2020 ble det solgt 1 484 697 tonn laksefisk i Norge til en verdi av 68 459 millioner kroner (Fiskeridirektoratet, 2021a). I den offentlige rapporten "Verdiskapning basert på produktive hav i 2050" ble det estimert at produksjon av laksefisk i Norge bør kunne økes til 5 millioner tonn tilsvarende en verdi av 240 milliarder kroner i 2050 (Olafsen et al., 2012).

I stortingsmelding 16. (2014 - 2015) ønsket regjeringen å forbedre oppdrettsnæringens rammebetingelser for bærekraftig vekst. «... Endringer skal være forutsigbare og bidra til å styrke Norges stilling som sjømatnasjon» (s. 15). Kapasitetsendring skal vurderes på bakgrunn av miljøovervåkning for naturlig definerte produksjonsområder og produksjonskapasiteten reguleres på bakgrunn av denne vurdering (Nærings- og fiskeridepartementet, 2015). Resultatet av denne stortingsmeldingen ble til trafikkløssystemet som trådte i kraft i 2017. Trafikkløssystemet baserer seg på konsentrasjonen av kjønnsmodne lakselus (*Lepeophtheirus salmonis* K.) og systemet vurderes annethvert år. Produksjonskapasiteten av laks i produksjonsområdet kan reguleres opp 6 % ved grønt, fryses ved gult eller reduseres 6 % ved rødt (Regjeringen, 2017).

Lakselus er derfor blitt en begrensning for videre vekst i oppdrettsnæringen, og næringen jobber med flere metoder for å forebygge og redusere forekomst av lakselus i oppdrettsanlegg. Eksempler på forebyggende tiltak er avl, luseskjørt, nedsenkbare merder, lukkede anlegg og rognkjeks (Holan et al., 2017). Det er estimert at lakselusen koster næringen nær 5 milliarder kroner i året, og da er ikke inntektstapet for tapt tilvekst regnet med (Iversen et al., 2017). Avlusning av laks er et tiltak som blir satt i gang når lusen har etablert seg i oppdrettsanlegget. Det finnes ulike medikamentelle og ikke-medikamentelle avlusningsmetoder. Medikamentelle avlusningsmetoder skjer i form av et bad i kjemikalier eller konsum av legemidler og er noe man forsøker å redusere til fordel for ikke-medikamentelle avlusningsmetoder (Hjeltnes et al., 2019). Eksempler på ikke-medikamentelle avlusningsmetoder er et raskt bad i varmt sjøvann (28-34°C), et lengere bad i ferskvann (4-8 timer), mekaniske børster, trykkspyling eller rensfisk (Holan et al., 2017). Rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.) er en av rensfiskeartene som naturlig spiser lakselus. Den har av den grunn vekket næringens oppmerksomhet som en preventiv og kontinuerlig ikke-medikamentell avlusningsmetode uten behov for håndtering av laksen (Imsland et al., 2014; Imsland et al., 2018a; Powell et al., 2018).

I den tidligere omtalte rapporten "*Verdiskapning basert på produktive hav i 2050*" (Olafsen et al., 2012) konkluderte arbeidsgruppen videre med at dersom lakselus forblir et problem frem mot 2050, vil behovet for rensefisk til biologisk avlusning øke kraftig i samsvar med økt lakseproduksjon. Lakselusen er en ektoparasitt som har åtte forskjellige livsstadier, hvorav de første tre er frittlevende i vannmassene og de siste fem er på laksefisken. Lakselusen fester seg i det tredje livsstadiet og er å finne på laksefisk i størrelse fra 0,8 - 29 mm lang (Havforskningsinstituttet, 2020). Parasitten lever på skinnet hos laksefisk og livnærer seg på vertens hudvev, kroppsvæske og blod. Dette svekker fiskens immunforsvar og danner grobunn for sopp- og bakterieinfeksjoner som kan forstyrre fiskens osmotiske balanse, som igjen kan føre til at fisken dør (Moen & Svendsen, 2004; Noble et al., 2018). Oppdrett av rensefisk er en mulighet for å redusere lus og unngå overbeskatning av de naturlige bestandene. En viktig forutsetning for videre satsning på oppdrett av rensefisk er at man lykkes med en kostnadseffektiv produksjon som også ivaretar hensynet til god fiskevelferd (Powell et al., 2018). Rapporten til Olafsen et al. (2012) anslår at det i 2050 kan være behov for 60 millioner rensefisk. Ifølge statistikk fra Fiskeridirektoratet ble det brukt 60 millioner rensefisk allerede i 2019, hvorav 42,9 millioner er oppdrettet rognkjeks (Fiskeridirektoratet, 2021b, Fig. 1). Dette viser at økningen i produksjon og bruk av rognkjeks har vært enorm de siste årene. Resterende 18 millioner er fordelt på andre rensefisk-arter som bergnebb (*Ctenolabrus rupestris L.*), grøngylt (*Symphodus melops L.*), berggylt (*Labrus bergylta A.*) og gressgylt (*Centrolabrus exoletus L.*) (Fiskeridirektoratet, 2021b).



Figur 1. Endringen i utsett (kjøp/interne mottak) av oppdrettet og villfanget rensefisk til lakselusbekjempelse fordelt på art fra 2015 - 2020. Antall oppgitt i tusen. Kilde: Fiskeridirektoratet (2021b).

Bruken av rensefisk i lakseoppdrett har i de siste årene vært omdiskutert på grunn av en uakseptabel høy dødelighet. I en nasjonal tilsynskampanje på velferd hos rensefisk gjennomført av Mattilsynet i 2018 – 2019 ble det konkludert med at forholdene i merdene måtte forbedres for at videre produksjon skulle være forsvarlig. «Mye tyder på at den ikke tilpasser seg livet i oppdrettsanleggene eller at dens behov ikke blir ivaretatt.» (Mattilsynet, 2020, s. 24). Det ble også stilt spørsmål til hvor etisk og bærekraftig det er å produsere fisk utelukkende til et formål som lusespiser. Etterbruk av rensefisk har utnyttet potensiale, det vil være svært viktig for laksenæringen å utvikle potensialet for etterbruk av rensefisk både av omdømmemessige og økonomiske årsaker. Rensefisken lever nå kun for å forbedre forholdene for oppdrettslaksen som går til høyt betalende kunder, for så å selv ende opp som ensilasje eller bli destruert (Powell et al., 2018; Nøstvold et al., 2016). Fileten utgjør kun en liten del av rensefisken. I markeder som Asia er det vanligere å spise hele fisken, og her er det i flere år jobbet med å lage et produkt til menneskelig konsum. Bruk av rognkjeks som matfisk er utfordrende fordi den består av store mengder brusklignende vev som dekker hele kroppen. Likevel er dette noe som kan løses ved valg av tilberedning. Berggylt derimot har lite/kjedelig smak og bløt tekstur, og sammen med

et fargerikt utseende, gjør dette at den er lite attraktiv for forbrukerne (Voldnes et al., 2021; Nøstvold et al., 2016).

En løsning som kan bidra til å ivareta behovene til rensefisken kan være systematisk avl for å gjøre den bedre tilpasset et liv i oppdrett. Dette kan gjøres med å selektere individer etter generell overlevelse, sykdomsresistens, lusespising og/eller veksthastighet (Imsland et al., 2016; Imsland et al., 2021). Ved å bli selvforsynt med rogn fra egen stamfisk får man samtidig muligheten til å produsere avkom året rundt, i tillegg til at man vil redusere behovet for høsting av vill rensefisk (Imsland et al., 2019a).

1.1 Rognkjeksens biologi

Rognkjeksens er lett gjenkjennelig med en oval kroppsform med syv rader av beinknuter langs ryggen og magen, samt en sugekopp plassert mellom pektoralfinnene (Fig. 2). Som små beiter de primært zooplankton og beveger seg over på krepsdyr og maneter etter hvert som de blir større (Ingólfsson & Kristjánsson, 2002). Hunnfisken blir dobbelt så stor som hannene, med en lengde opp mot 63 cm og en vekt på 5,5 kg. Rognkjekshannene kalles også for rognkall på norsk. Rognkjeksens lever til vanlig i frie vannmasser frem til kjønnsmodning hvor den så trekker inn på grunne områder om våren for å gyte (Moen & Svendsen, 2004). Den er en batchgyter, og gyter vanligvis 2 ganger i løpet av et intervall på 8 - 14 dager (Davenport, 1985; Kennedy, 2018). Det er estimert å være mellom 100 000 – 400 000 rognkorn i hver batch avhengig av rognkjeksens størrelse. Sammen med rognen er det en gjennomsliktig ovarievæske som gjør rognen klebrig ved kontakt med divalente ioner fra sjøvann (Davenport, 1985). Rognen klekker ca. 280 døgngrader (d°) etter gyting (Imsland et al., 2019b).



Figur 2. Illustrasjon av en voksen rognkjeks. (Av Jan Fekjan. Artsdatabanken)

Rognkjeksbestanden har vært forsket på i lang tid og aldersestimering er en viktig del for å kunne si noe om hvor lang tid det tar før fisken blir kjønnsmoden. Aldersestimering på rognkjeks er krevende da fisken ikke har skjell på kroppen og otolittene er svært små sammenlignet med andre arter. De største otolittene på rognkjeks er sjeldent over 2 mm lange, kun en tiendedel av det man vanligvis finner hos atlantisk torsk (*Gadus morhua* L.) (Thorsteinsson, 1981). Studier viser til at frittlevende rognkjeks bruker minimum to år for hannfisk og tre år for hunnfisk på å bli kjønnsmoden (Albert et al., 2002; Hedeholm, Blicher & Grønkjær, 2014). Rognkjeksen får en tydelig fargeforandring når den blir kjønnsmoden der hannfisken blir rød/rosa og hunnfisken blir blå/grønn (Davenport, 1985). Hunnfisken er også betydelig større ved kjønnsmodning med ca. 1,5 kg mot hannfiskens 0,6 kg (Thorsteinsson, 1981; Imsland et al., 2019a).

Fisket etter rognkjeks har primært vært gjennomført med garn av Norge, Island, Grønland og Canada. Dette da den gyter grunt langs kysten på nordlige breddegrader i Atlanterhavet og det er rognen man er interesserte i. I Norge startet fisket på 1940-tallet og i 2018 fikk norsk rognkjeksfiske bærekraftmerket Marine Stewardship Council (MSC). I senere tid har det blitt en økende interesse for fangst av kjønnsmoden rognkjeks til avl, for å bruke etterkommere i akvakultur som en naturlig biologisk avlusningsmetode (Imsland et al., 2016; Imsland et al., 2021; Kennedy et al., 2018). Totalfangsten i Norge var i 2020, 219 tonn rogn, litt over halvparten av kvoterådet fra Havforskningsinstituttet på 400 tonn rogn (Durif, 2020). Fangst til

akvakultur utgjør foreløpig bare en brøkdel av dette da det landes som hele fisk. I 2021 ble det landet 13 tonn (rundvekt) levende rognkjeks fra Nordmøre til Vest-Finnmark (Råfisklaget, 2022).

Rognkjeks er den arten som det blir oppdrettet mest av til rensefisk innfor akvakultur i Norge. Det har vært en eksponentiell økning i oppdrett de siste fem årene fra 10,3 millioner i 2015, til 34,3 millioner individer i 2020 (Fiskeridirektoratet, 2021b). I dag stammer all rognkjeks brukt som rensefisk fra oppdrett, hvor foreldrene er fanget vilt (Powell et al., 2018). Interessen for rognkjeks har steget enormt sammenlignet med annen rensefisk, som eksempel berggyllt, fordi rognkjeks har vist seg å være en effektiv lusespiser selv ved lave temperaturer i havet (Imsland et al., 2014; 2018a).

Effekten av rognkjeks som rensefisk på laks ble i 2014 dokumentert i småskala forsøk ved Gildeskål forskningsstasjon i Nordland. Etter 54 dager hadde merdene tilsatt 10 % og 15 % rognkjeks en reduksjon på 93 % og 97 % kjønnsmodne hunnlus sammenlignet med kontrollmerden uten rognkjeks (Imsland et al., 2014). I en studie gjennomført av Imsland et al. (2018a) hvor de tilsatte rognkjeks i ulike konsentrasjoner i et kommersielt lakseoppdrett, fikk de betydelig lavere antall lakselus på de merdene tilsatt 6 % og 8 % rognkjeks. Forskjellen var på henholdsvis 73 % og 100 % reduksjon i antall kjønnsmodne hunnlus, sammenlignet med kontrollmerden.

Det er vist i et tidligere forsøk at man kan kontrollere når hunnfisken blir kjønnsmoden ved å utsette den for konstant lys etterfulgt av et "vintersignal" (Imsland et al., 2018b). Vintersignalet i det nevnte forsøket var en reduksjon på varigheten av dagslys fra 24 t til 4 t over en periode på 8 uker, etterfulgt av en økning til 24 t lys over 8 nye uker. Det samme ble bekreftet i et senere forsøk der de ved bruk av vintersignal utsatte kjønnsmodningen i 6 og 9 måneder for de to testgruppene (Imsland et al., 2019a). Dette indikerer at det vil være mulig å sikre en jevn rognproduksjon året rundt.

1.2 Kjønnsmodning

Marine kaldtvannsarter har hormonregulering gjennom hjerne-hypofyse-gonade-aksen likt som i andre virveldyr. Indre faktorer avgjør når en fisk er klar for kjønnsmodning, slik som genetikk, kroppsstørrelse, energistatus, vekstfaktorer og indre klokker. I tillegg blir fisken påvirket av ytre faktorer som lysperiode, temperatur, diett og feromoner (Thomassen, 2006). De fleste

fiskearter som flyttes fra naturlige forhold og til kontrollerte forhold i oppdrett blir negativt påvirket når det kommer til å produsere avkom (Mylonas & Zohar, 2001). Det vanlige er at hunnfisk har problemer med å gjennomgå siste oocytmodning og ikke gyter. Hannfisk får ofte problemer med dårlig spermieproduksjon eller dårlig spermiekvalitet. Dette kan for noen arter løses med manipulering av miljøparameter som temperatur, lysstyring, salinitet, tilsetning av substrat eller vegetasjon. For noen arter er det også forsøkt en hormonbehandling for å kontrollere sluttmodningen (Mylonas & Zohar, 2001). Lysstyring har vist seg å ha god effekt som metode for kjønnsmodning av rognkjeks, og kan brukes til å tilpasse og intensivere produksjonen på land (Imsland et al., 2019a).

Gonadotropinfrigjørende hormoner (GnRH) er decapeptider som utskilles pulserende hos virveldyr, fra hypothalamus som ligger i mellomhjernen. Decapeptidet binder seg til reseptorer på de gonadotrope cellene i hypofysens forlapp og stimulerer produksjon og utskillelsen av follikkelstimulerende hormon (FSH) og luteiniserende hormon (LH). Disse hormonene påvirker gonadene hos begge kjønn (Ohlsson, 2017; Chow et al., 1998; Mylonas & Zohar, 2001). Påvirkningen skjer kontinuerlig i alle stadier i livssyklusen og er avgjørende for en synkron utvikling. En viktig egenkontroll i kroppen er produksjonen av kjønnssteroider som skjer i gonadene og fungerer som et signal på seksuell status til hjernen og hypofysen hvor hormonene blir produsert. Her er det viktig å merke seg at den presise effekten ikke er fullstendig beskrevet og at forskning viser til at det kan være forskjeller basert på art, fysiologisk status, type steroider og hvilke reproduktive parameter man velger å observere (Zohar et al. 2010).

Det er tidligere gjennomført lignende studier med GnRH-analoger på en rekke ulike fiskearter som laks, torsk, piggvar (*Scophthalmus maximus* L.), brasme (*Abramis brama* L.), abbor (*Perca fluviatilis* L.) og sørlig flyndre (*Paralichthys lethostigma*), men ikke på rognkjeks. Behandling med GnRH-analoger har vist å indusere ovulering og spermieproduksjon hos torsk (Garber et al., 2009). Hos laks ga hormonbehandlingen en effekt som overstyrte temperaturregime i forsøket og ga fruktbarhet hos fisk på temperaturer som inaktiverte ubehandlet fisk (Vikingstad et al., 2008). I sørlig flyndre derimot viste det seg at en økende dose med GnRH-analog hadde en negativ effekt på befruktning, klekkesuksess og plommeseekkyngel (Wright-Moore et al., 2019).

Hittil er det funnet 24 ulike varianter av GnRH. Åtte av disse GnRH variantene er funnet i egentlige beinfisk (*Teleostei*). Hormonene blir originalt oppkalt etter arten de først er funnet

hos (Kah et al., 2007). I arter med tre ulike varianter for GnRH, slik som piggfinnefisker (*Perciformes*), er det vist til at det er en relasjon mellom økning i GnRH mRNA i alle tre genene. Dette er assosiert med reprodutiv aktivitet hos voksne individer, likevel trenger det ikke å være en direkte sammenheng med aktiviteten i hypofysen (Zohar et al., 2010). Gjennom helgenomanalyser er det funnet indikasjoner på arter innenfor klassen strålefinnefisk (*Actinopterygii*) som rognkjeks ligger under, kan ha opptil fem ulike funksjonelle GnRH-reseptorer (Kah et al., 2007).

1.3 Formål

Formålet med forsøket er å forsøke å styre sluttmodningen hos rognkjeks, slik at man på sikt kan oppnå kontrollert og årstidsuavhengig modning hos oppdrettet rognkjeks. En slik praksis vil være et viktig fundament i et kontrollert avlsprogram. Et avlsprogram vil legge til rette for å systematisk avle videre på gode lusespiseegenskaper, samtidig som man forbedrer sykdomsresistens og reduserer dødeligheten. Forsøket er basert på tidligere studier som viser til en signifikant forskjell i beitepreferanser, adferd og dødelighet i ulike familier (Imsland et al., 2016; Imsland et al., 2021).

Dette forsøket har følgende nullhypoteser (H_0) og alternative hypoteser (H_A):

H_{01} : Det er ingen forskjell i antall dager til gyting for GnRH-behandlet og sham-behandlet fisk.

H_{A1} : Fisk behandlet med GnRH vil gyte tettere etter implantering, enn sham-behandlet fisk.

H_{02} : Det er ikke forskjell i klekkesuksess for GnRH-behandlet og sham-behandlet fisk.

H_{A2} : Rogn fra fisk behandlet med GnRH vil ha en større overlevelse ettersom hormonbehandlingen vil gi sterkere signaler for å stimulere reproduksjon.

2 Materiale og metode

2.1 Fiskens bakgrunn

Stamfisken brukt i forsøket er andre generasjon fra villfanget fisk, fisket utenfor Hekkingen (69°36'N 17°50'Ø) i november 2018. Fisken ble klekket i slutten av januar 2019 og satt på startfôring med Otohime B1/B2 fra PTAqua (56,3 % protein, 15,9 % fett, 13,5 % aske, 2,6 % fiber, 2,3 % fosfor; Marubeni Nisshin Feed Company, Tokyo, Japan) i 90 l inkubatorer. Yngel med en vekt i størrelsesområdet 0,1 - 0,15 g ble flyttet 20 - 21.03.19 til tilvekstavdeling i 100 l lengdestrømsrenner og fôret med Gemma diamond (57 % protein, 15 % fett, 10 % aske, 0,2 % fiber, 1,5 % fosfor; Skretting, Stavanger, Norge). Temperaturen under startfôring og tilvekst ble holdt på 8 – 9°C. Den 30.01.20 hadde fisken en snittvekt på 270 g og ble flyttet til 14 000 l (ø = 3,5m, H = 1,45m) tanker og holdt på inntaksvannstemperatur og fôret på Vitalis Clean 7 stamfiskfôr (59 % protein, 11,5 % fett, 12,5 % aske, 0,4 % fiber, 1,3 % fosfor; Skretting, Fontaine-les-Vervins, Frankrike) frem til forsøkets start. Fisken brukt i forsøket er førstegangsgytere tilfeldig valgt fra tre ulike familier.

2.2 Forsøksoppsett

Forsøket er gjennomført ved Akvaplan-niva`s forsknings- og innovasjonsstasjon på Kraknes (FISK), på Kvaløya utenfor Tromsø. Forsøket ble gjennomført mellom 15.03.21 og 06.07.21. Stamfisken ble holdt samlet i en 14 000 l tank frem til 23.03.21. Deretter ble alle hannene flyttet over til en 1700 l tank (HBL = 0,8 m * 1,5 m * 1,5 m) frem til forsøkets slutt. Vanntemperaturen til stamfisken under forsøksperioden fulgte inntakstemperaturen og varierte mellom 3,6°C og 5,1°C og oksygenmetningen varierte mellom 91 % og 105 % og er målt med OxyGuard Handy Polaris 2 (OxyGuard International AS, Farum, Danmark). Inkubatorene som rognen ble oppbevart i, ble tilført vann med en temperatur mellom 4,1°C og 7,8°C og oksygenmetningen varierte mellom 98 og 130 %. Temperaturendringene var naturlige og fulgte årstiden forsøket ble gjennomført i.

2.3 Implantering av pellet

Det ble håvet ut to og to fisk om gangen av samme kjønn, vekt og visuell grad av kjønnsmodning, til sammen 48 fisk. Fisken ble så bedøvet med et bad i Finquel vet. (Scan Aqua

AS, Årnes, Norge) med en dose på 3,4 g per 15 l saltvann i ca. 4 minutter. Hunnfisken hadde en gjennomsnittsvekt på 2746 (\pm 110) g, hannfisken hadde en gjennomsnittsvekt på 982 (\pm 39) g. Implanteringen ble gjennomført ved bruk av en PIT tag implantator, dorsolateralt i muskelen, en cm over øverste beinknute på fiskens venstre side (Fig. 3). Samtidig ble PIT (passiv integrert transponder) som var implantert før forsøkets start, lest av. Halvparten av fiskene fikk implantert GnRH-analog (D-Ala6, Pro9 NEt) og den andre halvparten fikk implantert sham-pellet (implantat uten virkestoff) som skulle fungere som en kontroll.



Figur 3. Implantering av gonadotropinfrigjørende hormon (GnRH)-analog/sham-pellet dorsolateralt i muskelen, en cm over øverste beinknute på fiskens venstre side ved forsøkets start 15.03.2021.

GnRH-analog Reproboost® ble levert av John Stubblefield (Center of Marine Biotechnology, Baltimore, USA). Fisken ble implantert med hormonmengde tilpasset egen kroppsvekt på implanteringstidspunktet. Hunnfisken fikk en dose på $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ og hannfisk fikk en dose tilsvarende $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Dosene ble levert i størrelsesvariasjon 25, 50, 75, 100 og $200 \mu\text{g}$ og tilpasset fiskens vekt individuelt til nærmeste $25 \mu\text{g}$. Dosene gitt til hunnfisken varierte fra $225 \mu\text{g}$ til $300 \mu\text{g}$, og fra $50 \mu\text{g}$ til $75 \mu\text{g}$ på hannfisken. Hormonene var tilsatt i en biologisk nedbrytbar mikrosfære som er satt sammen av polymer som gradvis løses opp og frigir hormonene i form av decapeptider. Kontrollfisken fikk en sham-behandling, bestående av kun mikrosfæren, uten tilsatte hormoner.

2.4 Daglig røkting

Hver dag gjennom hele forsøksperioden var det tett oppfølging av fisken for å sikre at gytingen og befruktningen av rognen ble gjennomført under kontrollerte omstendigheter. Fisken ble flyttet mellom to identiske tanker ved behov for å sikre at man fikk kontrollert alle fiskene regelmessig. Fisken ble også føret en gang om dagen og tanken ble rensset ved behov.

Hunnfiskens mageregion ble kontrollert etter fyldighet og utbuling ved gattåpningen som visuelt indikerer grad av kjønnsmodning. Når fisken viste ytre tegn til å være gyteklar ble fisken tatt ut av tanken, tørket fri for saltvann og strøket. Fisken ble så avlivet før videre prøvetaking. Kjønnsmoden fisk som mangler utbuling rundt gattåpningen og er ikke klar for stryking (Fig. 4), mens kjønnsmoden fisk med kraftig utbuling rundt gattåpningen er klar for stryking (Fig. 5).



Figur 4. Hunnfisk #18 som var kjønnsmoden, men ikke strykeklar, ble avlivet før gyting som følge av svekket fysisk form, skade på øyet og problemer med egen oppdrift.



Figur 5. Kjønnsmoden og gyteklar rognkjeks #13 med tydelig utbuling rundt gattet som indikerer at den var strykeklar, rognen ble inkubert i inkubator 4.

Uttak av spermie ble gjennomført med samme hannfisk til alle rognbatchene. Da hunnfisken hadde gytt, ble hannfisken bedøvet med et bad i Finquel vet. med en dose på 3,4 g i 15 l saltvann i ca. 4 minutter. Fiskens grad av bedøvelse ble testet ved å klype den i overleppen for å

kontrollere respons. Når fisken var bedøvet ble den tørket forsiktig med et håndkle for å fjerne saltvann fra huden før stryking. Det ble så tatt ut et par dråper spermie, nok til å dekke behovet for befruktningen.

Inkubatorene ble kontrollert daglig ved å sikre at vannet strømmet gjennom inkubatorene slik at rognen fikk jevn tilførsel av nytt oksygenrikt vann. Det ble også kontrollert at rognen lå rolig over risten, samt at den så frisk ut uten tegn til vekst av verken alger eller bakterier.

2.5 Kontrollert befruktning

Da hunnfisken var strøket, ble rognmengden med ovarievæsken målt. Det ble videre tatt ut tre prøver av rognen. I to av prøvene ble 5 ml rogn og 5 ml ovarievæske målt ut på og deretter befruktet med 20 µl spermie tilsatt ved bruk av mikropipette. Rognen og spermierne ble lett blandet sammen før den ble overført til inkubatoren, som var tilsatt saltvann for å aktivere spermierne. Saltvann gjør også ovarievæsken klebrig slik at rognen fester seg i hverandre. Etter 30 minutters herding av rognen etter befruktning, var rognen festet til hverandre og vanntilførselen ble forsiktig skrudd på. Den tredje rognprøven ble tatt for å måle rognkornstørrelsen i mikroskop.

2.6 Målinger av gonader og klekkesuksess

Like etter stryking ble hunnfisken avlivet. Buken ble åpnet ved bruk kniv og gonadene med restrogn ble skåret ut og veid. For hannfisk ble fisken avlivet først før gonadene forsiktig ble skåret ut og veid (Mettler Toledo ICS689g-CC60, Albstadt, Tyskland). Gonadene ble så kvernet og silt over en tynn finmasket fiberduk for å skille gonadevev fra flytende spermier. Det ble så målt total prøvemengde fra hver enkelt fisk før sentrifugering av 2 ml prøve i Eppendorf MiniSpin® (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland) på 13 000 rpm (RCF = ca. 11300 x g) i 3 minutter for å måle andelen spermieceller.

For å sikre at telling og registreringen av klekte fiskelarver ikke skjedde for tidlig, ble rognen oppbevart til den var passert 310 d° fra gyting. Inkubatoren med fiskelarvene ble så overført til et overdosebad med Finquel vet. Doseringen var på 0,5 g per liter saltvann i ca. 5 minutter, som ga en rask innsovning for å sikre en best mulig human behandling. Innholdet i inkubatoren ble telt og registrert etter utviklingsstadiene ubefruktet rognkorn «solegg», uklekket rognkorn og

fiskelarve. Ubefruktede rognkorn blir veldig gule, uklekket rognkorn er rogn der utviklingen har stoppet, men de beholder fargen og fiskelarven er ferdig klekket.

2.7 Rogninkubatorene

Rogninkubatorene er sammensatt av to plastbeger (polypropylen) av typen Superfos[®] 520 ml (Berry Superfos, Taastrup, Danmark) med diameter (Ø) på 95 mm (Fig. 6). Den øverste beholderen ble modifisert ved at bunnen ble skåret ut og erstattet med en finhullet rist av plast med hullstørrelse 1 mm limt fast med TEC7 Trans Clear. Plastbegrene var adskilte med en plaststrips for å sikre at vannet rant ut fra undersiden av den øverste beholderen. Dette var nødvendig for å sikre at rognen og larvene ble holdt tilbake under den kontinuerlige utskiftningen av vann uten at trykket ble for stort (Fig. 6.).

Vannet ble tilført testriggen på tre ulike steder for å sikre likt trykk tilgjengelig til hver enkelt inkubator. Hver rognbatch ble inkubert i duplikat med hver sin separate vannforsyning med justeringsventil for å se om variasjon i resultatene gjentok seg i begge inkubatorene (Fig. 7.). Vanntilførselen ble holdt på ca. 100 ml i minuttet til hver inkubator. Totalt ble det brukt 32 inkubatorer i forsøket for 16 prøver med duplikater.



Figur 6. Oppsettet av inkubatorene. Inkubatoren var designet slik at rognen ble oppbevart på den grå plastristen under inkubasjon og vannet beveget seg over rognen for så å renne ut av toppen på det nederste plastbegeret, ved den røde stripsen.



Figur 7. Oversikt over testtriggen med vannforsyning inn fra sidene og på midten (svart), inkludert separat justeringsventil for vanntrykk (blå), til hver enkelt inkubator.

2.8 Gonadosomatisk indeks og spermatokritt

Gonadosomatisk indeks (GSI) er en metode for å bestemme hvor mange prosent gonadene utgjør av kroppsvekten. GSI ble regnet ut etter at all data var samlet inn, ved bruk av formel 1.

$$GSI = \frac{\text{Gonadevekt}}{\text{Totalvekt}} * 100 \quad (\text{formel 1})$$

Spermatokritt er en metode for å bestemme innholdet av sperm i gonadevæsken. For å få gonadene flytende ble de kvernet og silt over en finmasket duk. Av gonadevæsken ble det pipettert ut 2 ml og overført til eppendorfrør og sentrifugert med Eppendorf MiniSpin® på 13 000 rpm i 3 minutter. Etter sentrifugering ble cellehøyden til spermien målt og regnet om til prosentmessig andel av total prøvemengde gonadevæske.

2.9 Vannbehandling

Saltvannet brukt til forsøket ble pumpet inn fra en sjøledning på 60 meters dyp. Vannet ble rensert gjennom et 60 µm partikkelfilter og deretter UV behandlet. Til slutt ble vannet mettet med oksygen og ført ut til fisken/rognen i PVC plastrør.

2.10 Bildetaking

Bildene fra forsøket er tatt med mobilkamera (Samsung S20FE). Detaljerte målinger etter klekking ble gjort med stereomikroskop (Leica M205 FA; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) med påmontert kamera (Leica DFC3000 G). Bildene ble analysert i dataprogrammet Leica applicationsuite V4.7.

2.11 Statistisk behandling av data

Resultatene ble kontinuerlig registrert manuelt i Microsoft Office 365 Excel (versjon 2108) og alle statistiske analyser ble gjennomført i TIBCO Statistica™ (versjon 14.0.0.15). Resultatene ble testet med variansanalyse (ANOVA). Signifikante forskjeller funnet i variansanalysen ble

fulgt opp med en Newman-Keuls (NK) post hoc test for å finne signifikante forskjeller mellom de eksperimentelle gruppene. Et signifikansnivå på $P = 0,05$ ble brukt. Data ble testet for om de var normalfordelt ved hjelp av Kolmogorov-Smirnov-test og for lik varians i gruppene ved hjelp av Levene's test. Alle data som har variabilitet, er presentert som gjennomsnitt \pm standard feil (SE). Standard feil er regnet ut ved bruk av formel 2. Mulig forskjell i gytetidspunkt mellom GnRH- og sham-gruppene ble undersøkt med logistisk regresjon (Hosmer & Lemeshow, 1989).

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (\text{formel 2})$$

SE = standard feil, SD = standardavvik, n = antall målinger

3 Resultat

3.1 Dødelighet under forsøket

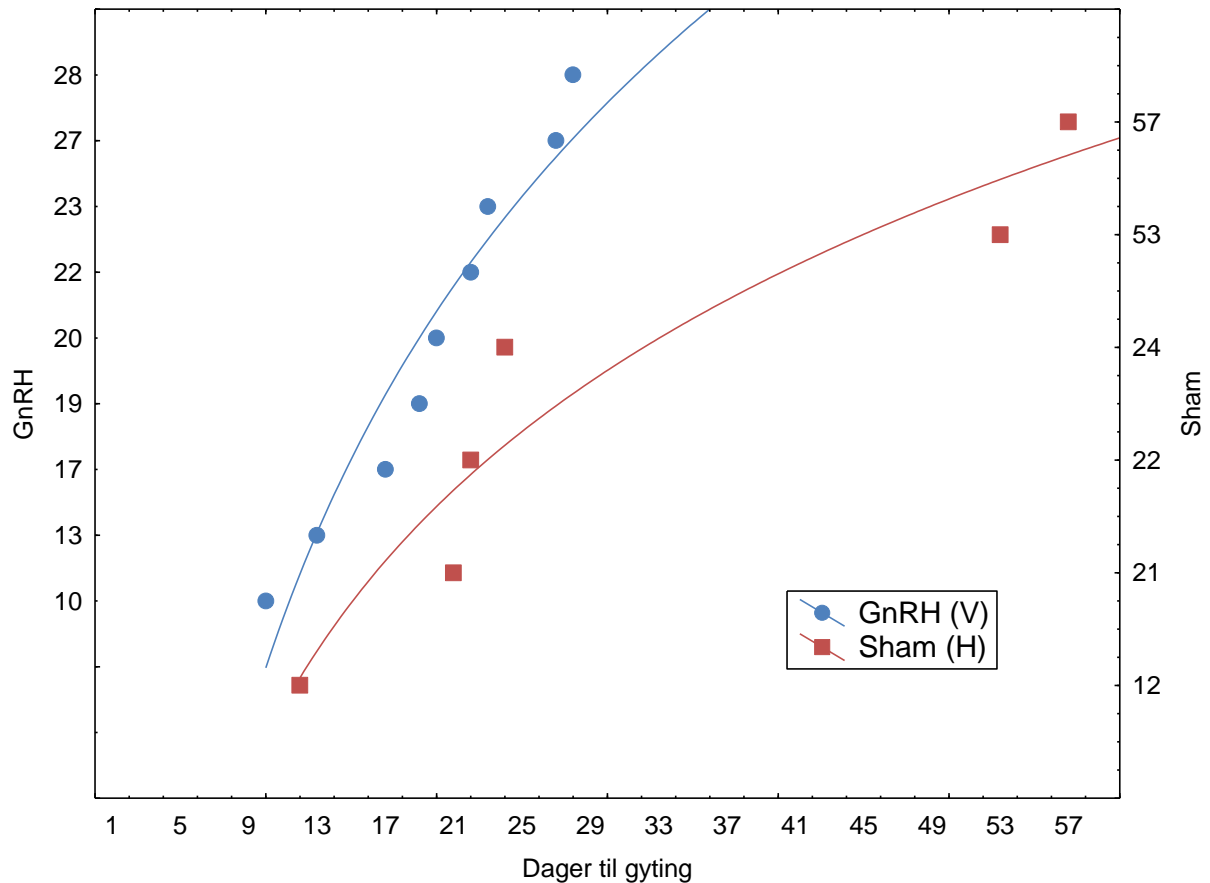
Under oppstarten av forsøket var det to hunnfisk som døde. Begge to hadde fått sham-behandling, altså uten virkemidler, og døde allerede første uken etter implantering. Underveis i forsøket ble det i tillegg besluttet å avlive tre hunnfisker av dyrevelferdshensyn. Disse hadde skade på øyet, slet med oppdriften og spiste ikke. Av disse tre fiskene hadde en fått GnRH- og to sham-behandling. I tillegg døde fem hannfisker av ukjent dødsårsak i løpet av tidsrommet april – mai. Av disse hadde tre fått GnRH-behandling og to sham-behandling. En siste hannfisk som hadde fått sham-behandling ble avlivet fordi den lå på siden ved vannutløpet og klarte ikke å rette seg, selv med hjelp.

3.2 Hunnfisk

3.2.1 Tid fra implantering til gyting

Av de 24 hunnfiskene i forsøket var det 15 som gytt. Ni av disse var behandlet med GnRH og brukte i gjennomsnitt 19,89 ($\pm 1,88$) dager fra implantering til første kontrollerte gyting, hvorav første fisk gytt etter 10 dager og siste etter 28 dager. De resterende seks hunnfisk som var behandlet med sham brukte i gjennomsnitt 31,50 ($\pm 5,69$) dager fram til første gyting, gytetidspunkt varierte fra 8 til 57 dager blant de sham-behandlede fiskene. Det var ikke funnet signifikant forskjell i variansen på tid til gyting mellom gruppene, selv om forskjellen tenderte mot signifikans (enveis-ANOVA, $P = 0,1$) og det var signifikant større variasjon i gytetidspunkt hos sham-gruppen (Levene's test, $P < 0,001$, Appendiks 1, Tabell 18). Det ble så gjennomført en multippel logistisk regresjon for å teste om den logaritmiske regresjonen var lik mellom gruppene, også denne testen tenderte mot signifikans ($P = 0,07$, Fig. 8).

Det var tre fisker (to GnRH og en sham) som gytt utenfor arbeidstid. Dette ble registrert og rognen ble fjernet fra forsøket (Tabell 1). Rognkjeksene gyter i flere batcher. Fisken ble derfor holdt i tanken og fulgt opp nøye. Fiskene behandlet med GnRH brukte henholdsvis 7 og 9 dager fra første gyting til andre gyting, mens fisken behandlet med sham brukte 14 dager til andre gyting. På disse tre fiskene er det andre gyting som ble brukt i inkubatorene fordi studiet var avhengig av en kontrollert gyting slik at det var mulig å måle ut riktig mengde rognkorn og fordele disse likt i inkubatoren før de klistret seg sammen. Det var for lite data til å gjennomføre statistisk analyse på tiden mellom batchene.



Figur 8. Oversikt over kontrollert gytetidspunkt, illustrert med en logaritmisk fordeling. Fordelingene for gonadotropinfrigjørende hormon (GnRH; blå runding) og sham (rød firkant) er uavhengig av hverandre med hver sin y-akse. ($GnRH = -18,0288 + 18,0118 \cdot \log_{10}(x)$, $Sham = -6,3299 + 6,8547 \cdot \log_{10}(x)$)

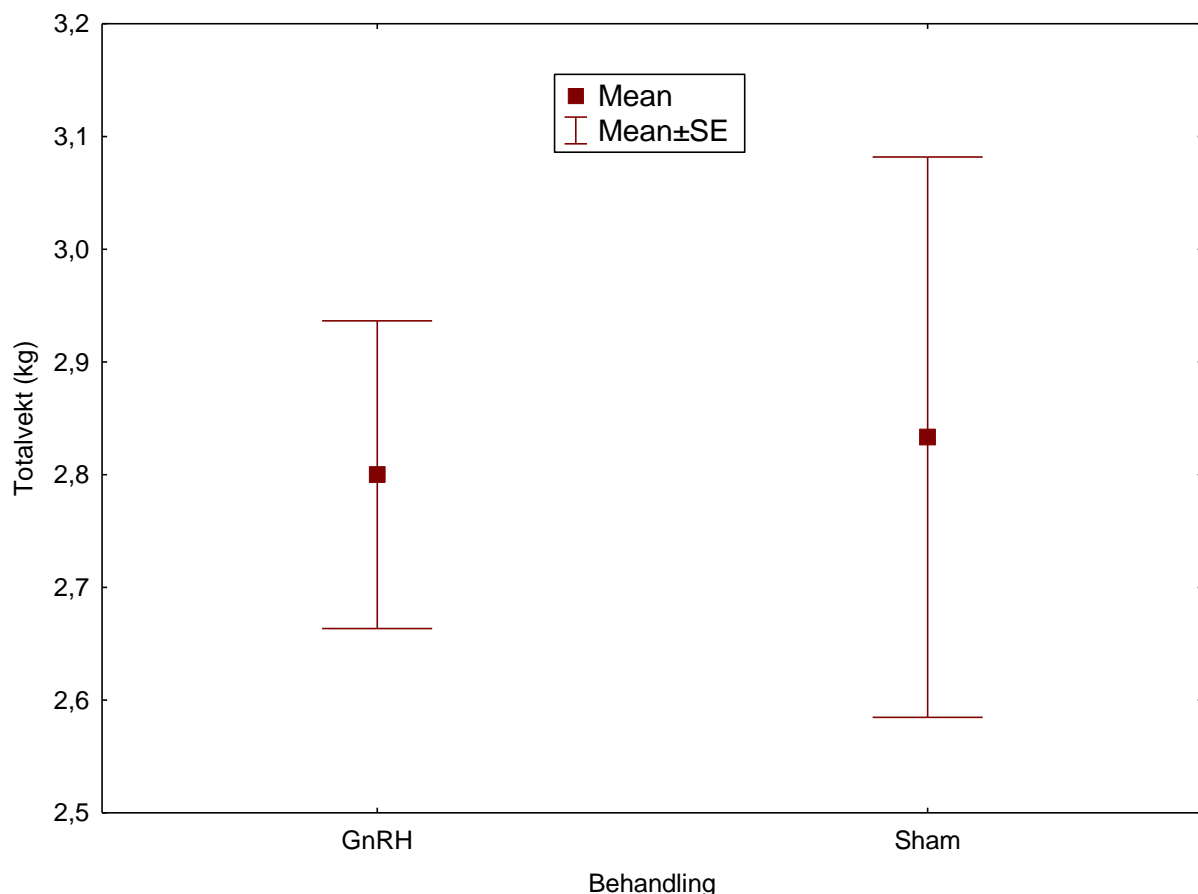
Tabell 1. Oversikt over antall dager fra behandling til kontrollert gyting. Dager i parentes viser første gytebatch som ble gytt ukontrollert i karret og derfor ikke kunne brukes i forsøket. GnRH = gonadotropinfrigjørende hormon.

Behandling:	Dager fra implantering til gyting:								
GnRH:	10	13	17	19	20	22	23 (16)	27	28 (19)
Sham:	12	21	22 (8)	24	53	57	-	-	-

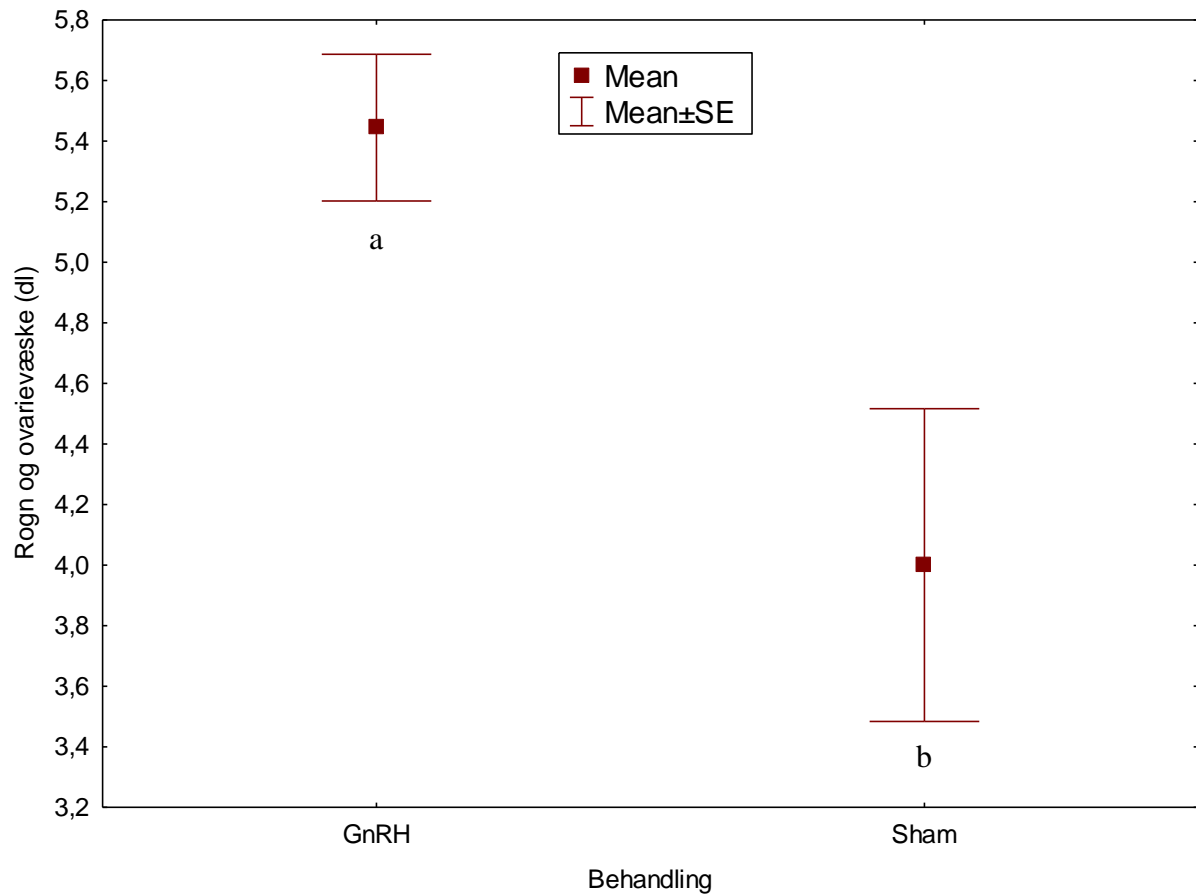
3.2.2 Stryketidspunkt

Fisken ble veid ved implantering under starten av forsøket og etter hvert som de var gyteklar. Hunnfiskene hadde en gjennomsnittlig startvekt på henholdsvis 2,89 ($\pm 0,07$) kg for GnRH-fisk og 2,59 ($\pm 0,19$) kg for sham-fisk, ikke signifikant forskjell (enveis-ANOVA, $P = 0,18$). På stryketidspunktet hadde hunnfiskene en gjennomsnittlig totalvekt på henholdsvis 2,80 ($\pm 0,13$)

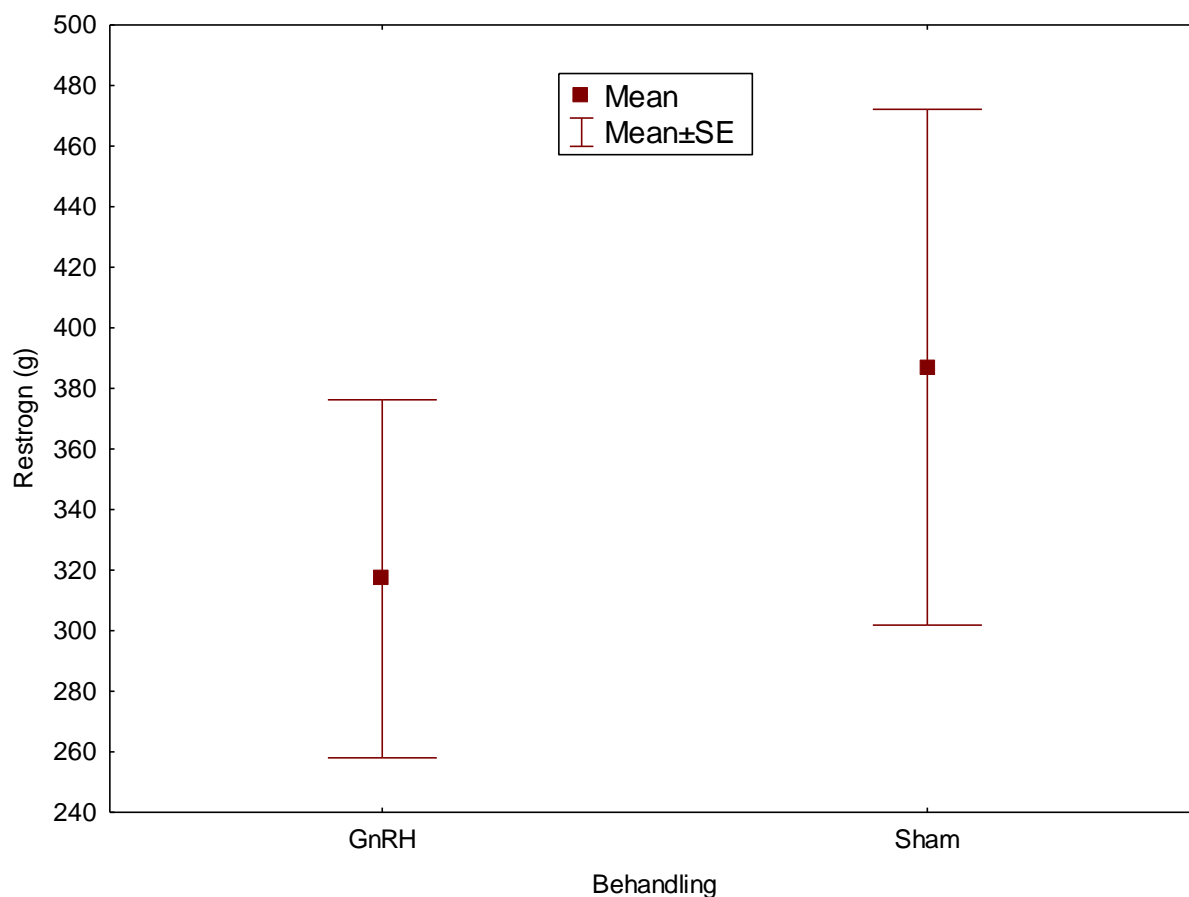
kg for GnRH-fisk og 2,83 ($\pm 0,23$) kg for sham-fisk. Vekten var ikke signifikant forskjellig (enveis-ANOVA, $P = 0,90$, Fig. 9). Målingene viser at GnRH-behandlet fisk hadde et gjennomsnitt på 5,4 ($\pm 0,02$) dl gytt mengde rogn og ovarievæske mot sham-behandlet fisk som hadde et gjennomsnitt på 4,0 ($\pm 0,05$) dl gytt mengde rogn og ovarievæske. En enveis-ANOVA viste at det var en statistisk signifikant forskjell i gytt mengde rogn og ovarievæske mellom gruppene ($P < 0,05$, Fig. 10). Forskjell var 36 % høyere for fisken som var GnRH-behandlet, sammenlignet med fisken som var sham-behandlet (NK post hoc test, $P < 0,05$). Etter gyting og prøvetaking ble buken på fisken åpnet og gonadene skåret ut og veid. Her ble gjennomsnittet for GnRH 317 (± 55) g og for sham-fisken ble det et gjennomsnitt på 387 (± 77) g. Det ikke var en statistisk signifikant forskjell i restrogn mellom gruppene (enveis-ANOVA, $P = 0,49$, Fig. 11).



Figur 9. Total kroppsvekt (totalvekt) av hunnfisk ved stryking fordelt på behandling (GnRH og sham). Illustrert med gjennomsnitt og standard feil (SE). GnRH = gonadotropinfrigjørende hormon.



Figur 10. Mengde gytt rogn og ovarievæske for hunnfisk ved stryking, fordelt på behandling (GnRH og sham). Illustrert med gjennomsnitt og standard feil (SE). Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell (NK post hoc test $P < 0,05$). GnRH = gonadotropinfrigjørende hormon.



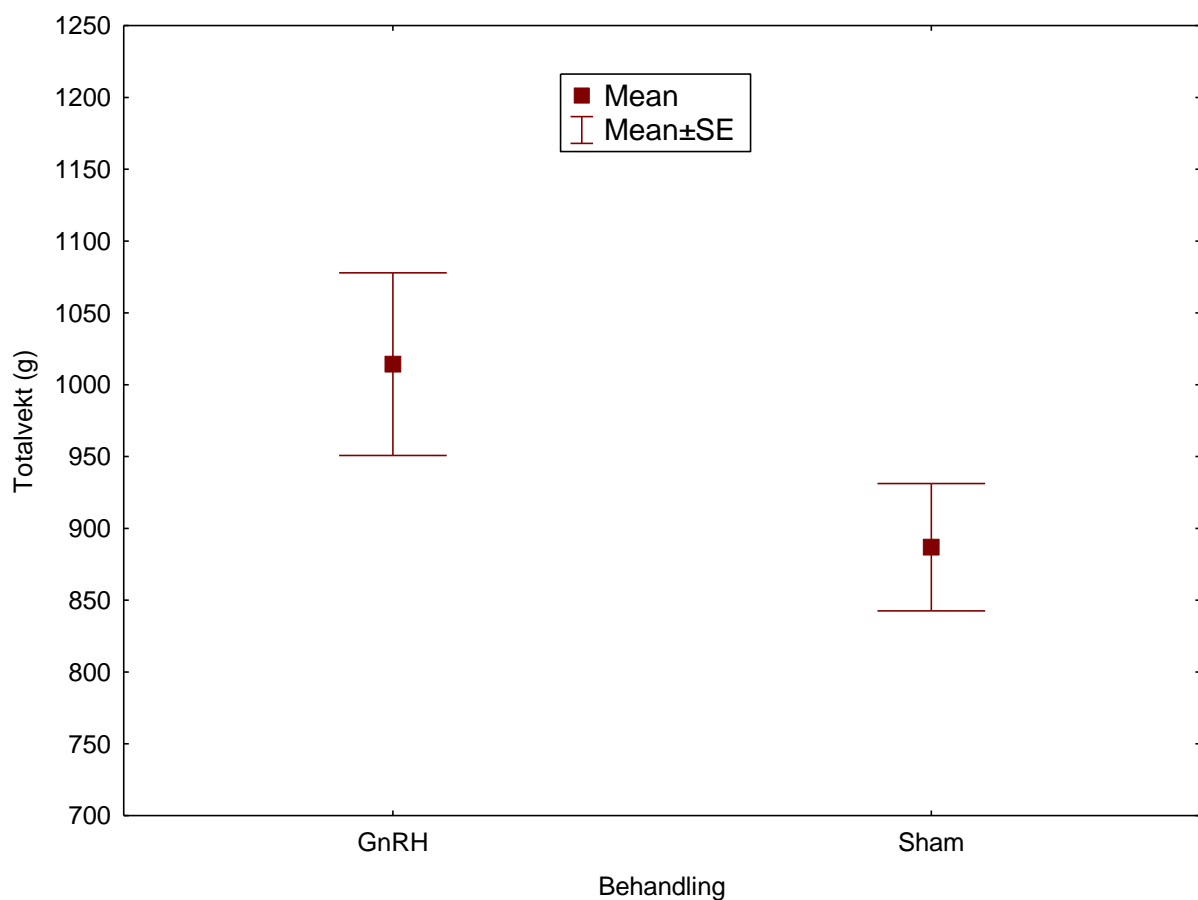
Figur 11. Mengde restrogn hos hunnfisk etter stryking fordelt på behandling (GnRH og sham). Etter stryking ble fiskene avlivet før buken ble åpnet og restrogn tatt ut og veid. Illustrert med gjennomsnitt og standard feil (SE). GnRH = gonadotropinfrigjørende hormon.

Ved avslutningen av forsøket var det fire fisker som ikke hadde gytt. To av disse var behandlet med GnRH og to var behandlet med sham. Ingen av disse viste ytre tegn til å være gyteklar i nær fremtid. Fiskene var lysere i fargen enn de andre og buken var flat og veldig hard, de ble derfor flyttet over til en ny tank hvor resten av 2019-1 generasjonen var. De ansatte på forskningsstasjonen skulle melde videre dersom disse gytte på et senere tidspunkt, men det er ikke rapportert om nye observasjoner ved avslutning av denne oppgaven.

3.3 Hannfisk

Av de 24 hannfiskene i forsøket var det 17 som var igjen når forsøket ble avsluttet, ni GnRH-behandlet fisk og åtte sham-behandlet fisk. Fiskene ble veid ved implantering under starten av forsøket og ved avslutning av forsøket. Startvekten på GnRH-gruppen var 1045 (\pm 64) g og 950

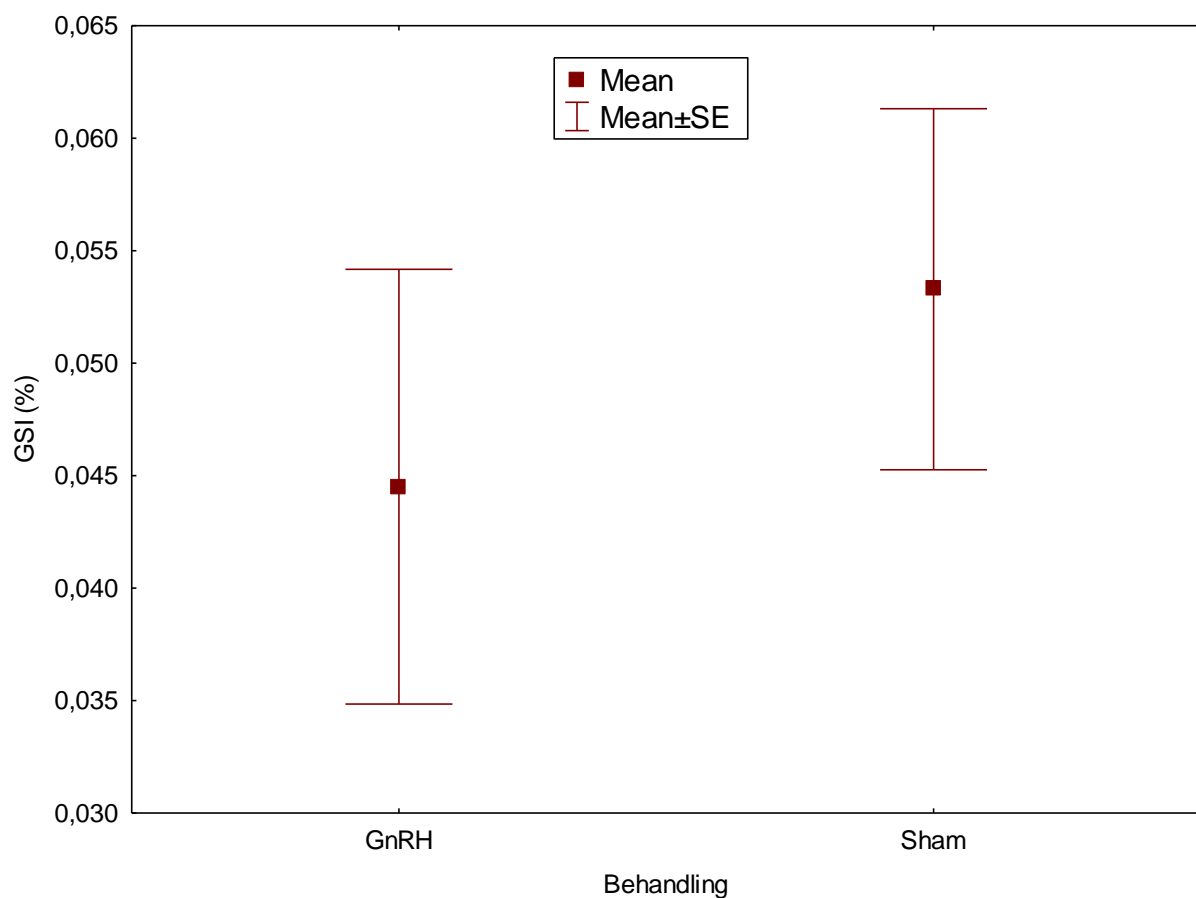
(± 42) g for sham-gruppen. Den gjennomsnittlige forskjellen i startvekten for gruppen var ikke signifikant forskjellig (enveis-ANOVA, $P = 0,27$). Det var en gjennomsnittlig reduksjon i kroppsvekt hos begge gruppene gjennom forsøket på henholdsvis 3 % og 7 % for GnRH og sham. Vektvariasjonen på fiskene var ved slutten av forsøket var 1014 (± 60) g for GnRH-gruppen og 887 (± 42) g for sham-gruppen. Ved prøvetakning var derfor forskjellen større, men en enveis-ANOVA viste at det fortsatt ikke var signifikant forskjell mellom gruppene ($P = 0,12$, Fig. 12).



Figur 12. Totalvekt av hannfisk ved avlivning og prøvetakning fordelt på behandling (GnRH og sham). Illustrert med gjennomsnitt og standard feil (SE). GnRH = gonadotropinfrigjørende hormon.

GSI ble regnet ut ved bruk av formel 1. Målingene varierte mellom 0,2 – 7,8 %. Resultatene viser at det ikke var signifikant forskjell i GSI mellom gruppene (enveis-ANOVA, $P = 0,50$, Fig. 13). Som et mål på andel spermieceller i gonadene ble det gjennomført et spermatokritt og regnet om til prosent av prøvemengde. Det var fire fisker som ikke hadde utviklede gonader,

hvorav en var sham-behandlet og tre var GnRH-behandlet. Utenom disse fire fiskene som var uten spermie, varierte spermatokrittprøvene fra 67 % til 100%. Gjennomsnittet for GnRH-behandlet fisk var $53 (\pm 13) \%$ og $72 (\pm 10) \%$ for sham-behandlet fisk. Det ble ikke funnet signifikant forskjell mellom gruppene (enveis-ANOVA, $P = 0,30$). En av fiskene i hannfisk-gruppen var ved implantering av hormon estimert feil kjønn på (#48, sham-behandlet). Dette som følge av at den var liten og lyseblå i fargen. Dette ble først oppdaget ved dissekering og fisken ble av den grunn fjernet fra forsøket (Fig. 14).



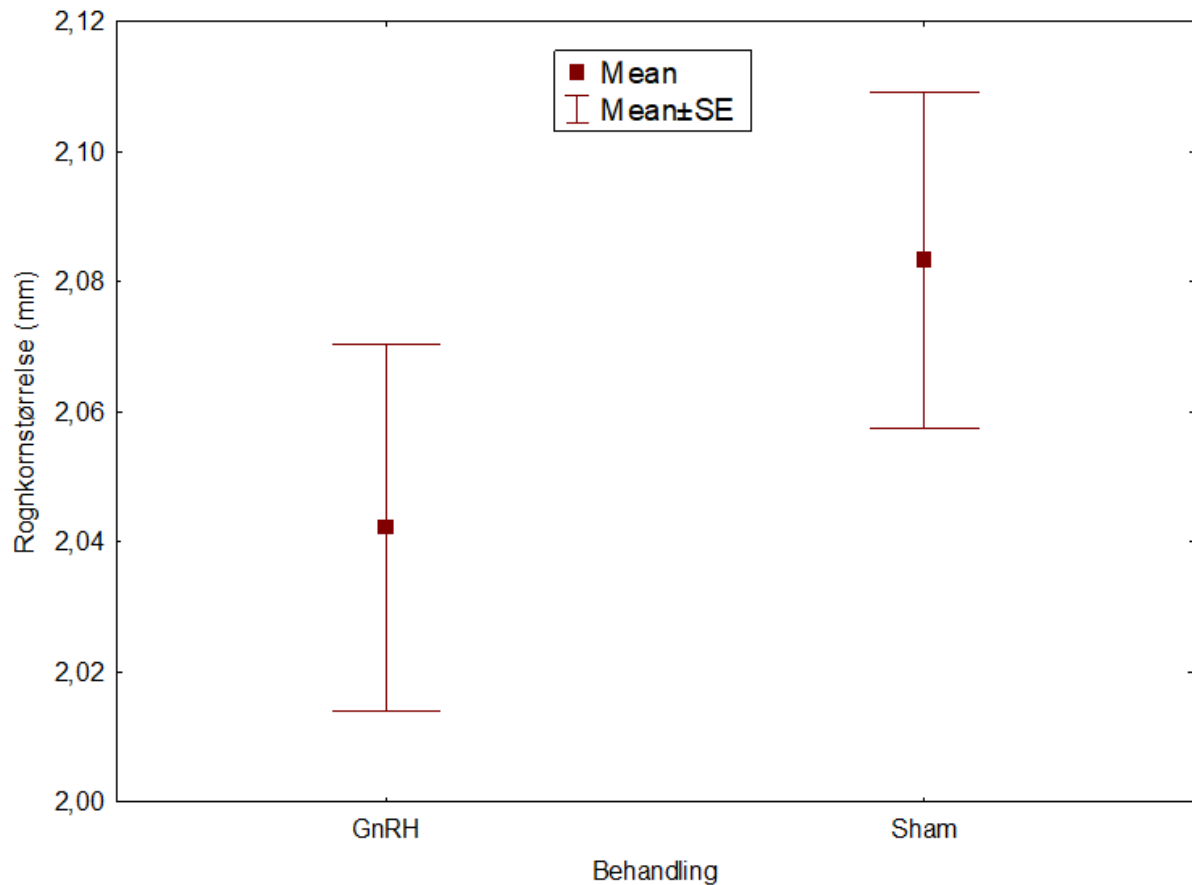
Figur 13. Gonadosomatisk indeks (GSI) hos rognkjekshanner fordelt på behandling (GnRH og sham). Buken ble åpnet og gonadene ble tatt ut og veid. Illustrert med gjennomsnitt og standard feil (SE). GnRH = gonadotropinfrigjørende hormon.



Figur 14. Hunnfisk # 48 som ble mistolket for å være hannfisk under implantering ved forsøkets start som følge av liten i størrelsen og lys blåfarge. Ble fjernet fra forsøket ved dissekering. Gonadene er det avlange organet (blå) midt i bildet, med lite rogn som var umoden.

3.4 Rognkornstørrelse

Like etter gyting ble rognkornstørrelse målt (diameter) ved mikroskopering. Det ble målt 30 rognkorn fra hver batch og målingene varierte fra 1,81 mm til 2,22 mm. GnRH behandlet fisk hadde en gjennomsnittlig rognkorndiameter på 2,04 (\pm 0,03) mm. Fisk implantert med sham hadde en gjennomsnittlig rogndiameter på 2,08 (\pm 0,02) mm. En enveis-ANOVA viser at variansen ikke er signifikant forskjellig ($P = 0,33$, Fig. 15).



Figur 15. Rognkornstørrelse fra rognkjeks fordelt på behandling (GnRH og sham). Målt i mikroskop like etter gyting. Illustrert med gjennomsnitt og standard feil (SE). GnRH = gonadotropinfrigjørende hormon.

3.5 Klekkesuksess

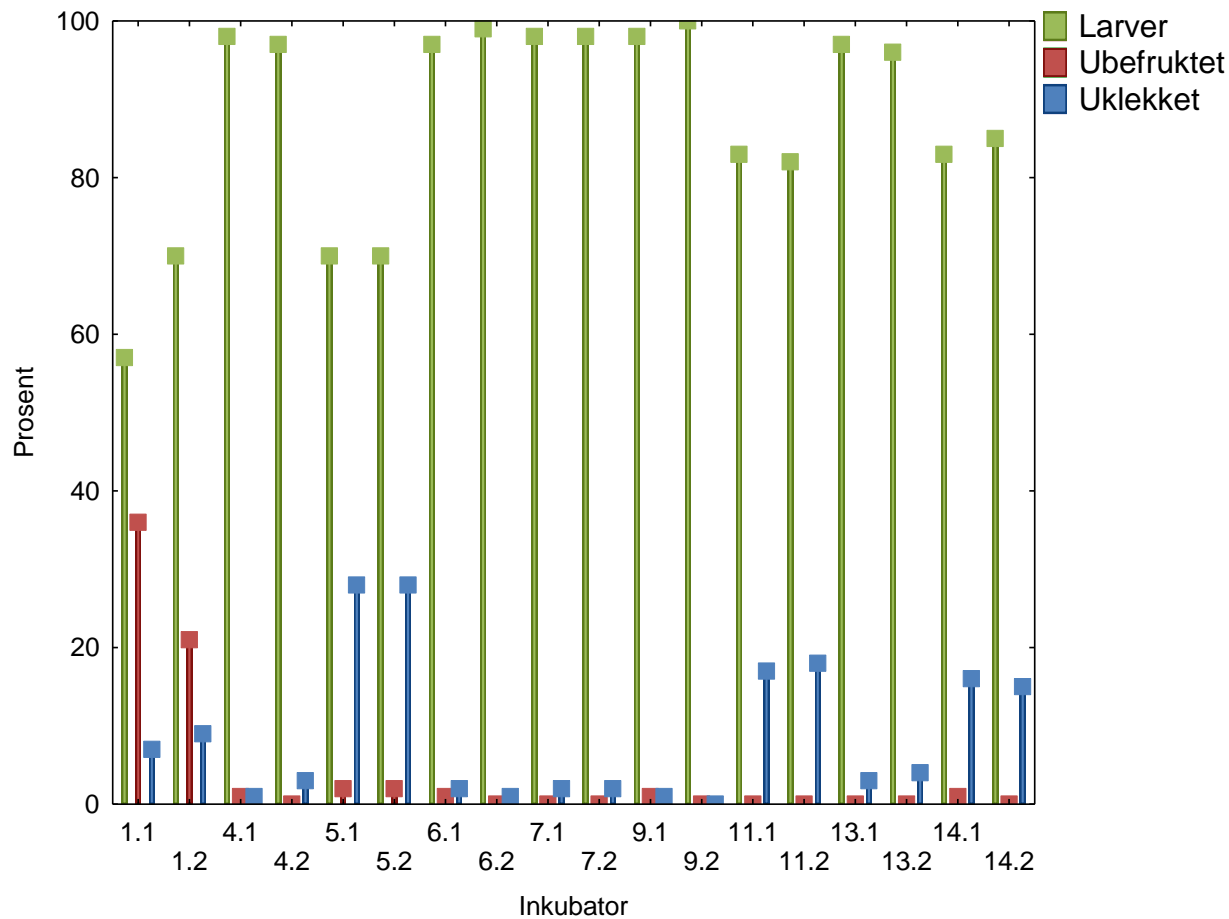
All rognen ble oppbevart til 310 d°, før telling og registrering. Registreringene ble klassifisert i fiskelarver, uklekket rognkorn og ubefruktede rognkorn (Fig. 16). Resultatene er presentert i prosent for å ta høyde for variasjon i antall rognkorn mellom inkubatorene som følge av variasjon i rognkornstørrelse ved utmåling før inkubering.



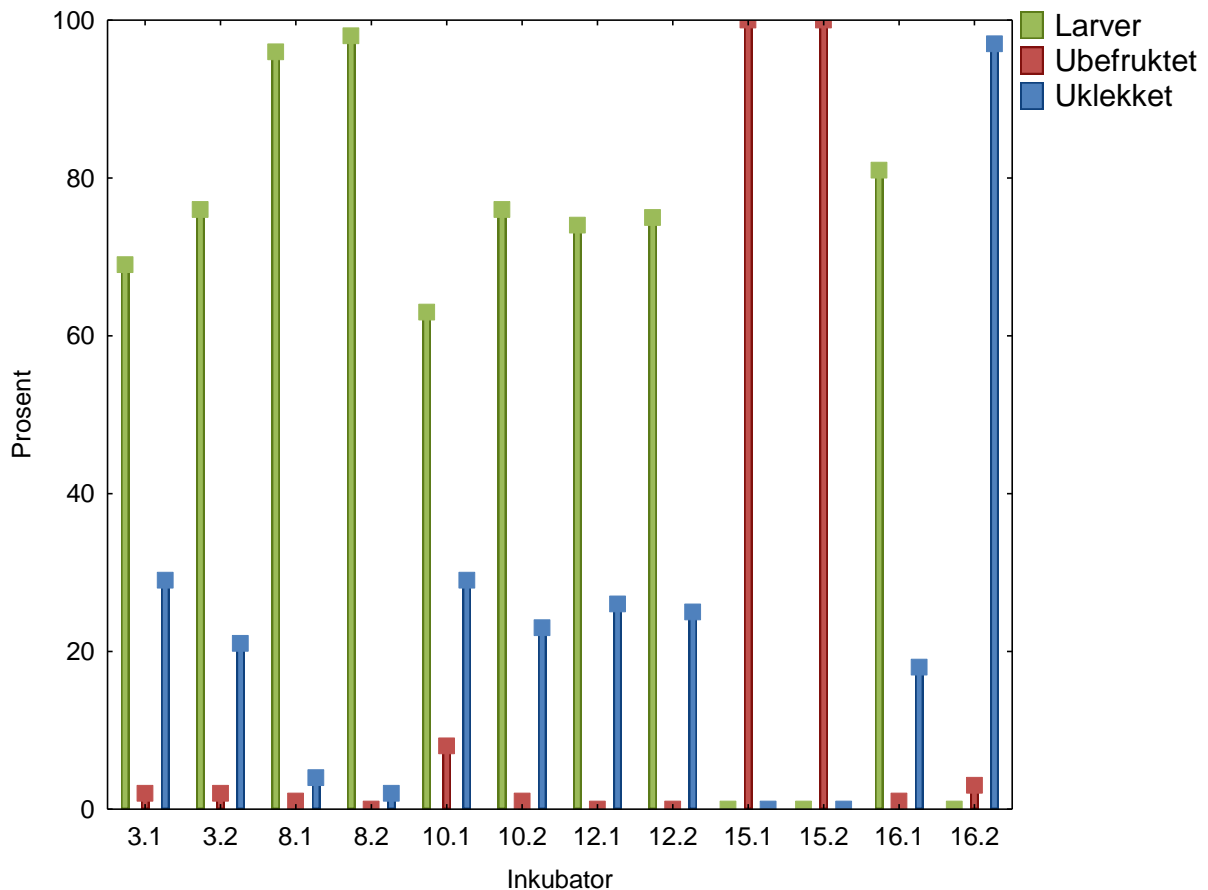
Figur 16. Ubefruktede rognkorn "solegg" (til venstre), uklekket rognkorn med øyne (midten) og en ferdigutviklet fiskelarve (til høyre).

Under inkubasjon så man god overlevelse på flere inkubatorer. For fiskelarvene som kom fra en mor som var behandlet med GnRH, var variasjonen i registrert klekkeprosent fra 56,8 % til 99,5 %, og et gjennomsnitt på 87,6 (\pm 3,0) % på alle GnRH inkubatorene (Fig. 17). For fiskelarver som stammer fra en mor som hadde fått sham-behandling ser vi en signifikant lavere gjennomsnittlig overlevelse (enveis-ANOVA, $P < 0,01$, Fig. 17 og 18). For sham-gruppen var det variasjonen i registrert klekkeprosent fra 0,0 % til 98,0 %, og et gjennomsnitt på 59,0 (\pm 9,5) %. Gjennomsnittet for gruppene ble videre testet for signifikans (NK post hoc test, $P < 0,01$) Den laveste registreringen var på inkubator 15, der ingen av rognkornene ble befruktet (Fig. 18).

Inkubator to ble fjernet fra resultatene da den ble brukt til å inkubere første batch fra fisk # 38 som ble gytt i tanken. Denne fisken fikk en kontrollert gyting på batch nummer to som ble inkubert i inkubator nummer ti (Fig. 18).



Figur 17. Illustrerer fordelingen av innholdet i de ulike inkubatorene for begge duplikatene til fisk behandlet med gonadotropinfrigjørende hormon (GnRH). Innholdet ble registrert i grupper avhengig av stadiet (larver, ubefruktet og uklekket) ved telling 230 d^o etter befruktning og regnet om til prosent for å ta høyde for variasjon i inkubatorene.



Figur 18. Illustrerer fordelingen av innholdet i de ulike inkubatorene for begge duplikatene til fisk behandlet med sham (implantat uten virkestoff). Innholdet ble registrert i grupper avhengig av stadiet (larver, ubefruktet og uklekket) ved telling 230 d° etter befruktning og regnet om til prosent for å ta høyde for variasjon i inkubatorene.

Det ble videre testet for om det var signifikant forskjell for resultatene på det resterende materiale i inkubatorene. For ubefruktede GnRH-behandlet rogn var det registreringer fra 0 % til 35,8 %, med et gjennomsnitt på 3,7 (\pm 2,2) %. For sham-behandlet fisk varierte registreringene fra 0 % til 100 %, med et gjennomsnitt på 18,2 (\pm 9,8) %. Gjennomsnittet var ikke statistisk signifikant (enveis-ANOVA, $P = 0,15$). For uklekket rogn varierte målingene for GnRH-behandlet fisk fra 0,3 % til 28,4 % med et gjennomsnitt på 8,8 (\pm 2,1) %. Til sammenligning varierte sham-behandlet fisk fra 0 % til 96,7 % med et gjennomsnitt på 22,8 (\pm 6,7) %. Her ble det funnet en signifikant forskjell i variablene (enveis-ANOVA, $P < 0,01$) og en signifikant forskjell mellom gjennomsnittet til gruppene (NK post hoc test, $P < 0,01$, Fig. 17 og 18).

4 Diskusjon

4.1 Dødelighet under forsøket

Under forsøket døde elleve fisk hvorav fire ble avlivet som følge av synlige skader, fire GnRH og syv sham. Dette kan være en blanding av naturlig død, økt fysisk behandling og stress i form av implantering. Kjønnsmoden fisk er mer utsatt for stress og infeksjonssykdommer under reproduksjonsperioden (Mylonas & Zohar, 2001; Taranger et al., 2010). Rognkjeks er ikke stimulering, i motsetning til for eksempel laks, og er derfor en vanskelig art å følge opp helsemessig. Rognkjeks suger seg ofte fast med sugekoppen og de kan sitte fast selv post mortem. Vannstrømmen i karret får finnene til å bevege seg, noe som kan se ut som et livstegn. Noe behandling ble derfor ansett som nødvendig for å kunne ivareta dyrevelferden.

Av de fire med synlige skader var det tre hunnfisk som hadde øyeskade. Det ble gjort en observasjon på at fiskene med øyeskade ikke ble strykeklar til tross for at størrelse og farge skulle tilsi det. Det kan tenkes at øyeskaden har vært hemmende for kjønnsmodningen til fisken ved at den ikke har fått tilstrekkelig lyssignalisering for sluttmodning (Imslund et al., 2021; Imslund et al., 2018b).

På ubehandlet torsk er det funnet forskjell i dødelighet under kjønnsmodning mellom vill og oppdrett, med høyere dødelighet for oppdrettet torsk. Dette begrunnes med at oppdrettet hunnfisk som har mindre energi lagret på kroppen, i form av fett og proteiner, ikke reduserer stimuleringen av gonader og av den grunn øker risikoen for død (Taranger et al., 2010). I et annet studie hvor de så på forskjeller i dødelighet mellom vill og oppdrettet abbor opptil 14 dager etter gyting ble det observert betydelig lavere dødelighet på oppdrettet fisk av begge kjønn etter gyting (Kristan, Stejskal & Policar, 2012). I et GnRH studie på brasme var det ikke noe dødelighet på ubehandlet kontrollfisk eller behandlet hannfisk, mens det ble registrert 12,5 % og 5,5 % dødelighet på GnRH-behandlet hunnfisk. Det er ingenting i forsøket som indikerte at dødeligheten kom som følge av implantering eller økt behandling under forsøket (Kucharczyk et al., 2005).

4.2 Hunnfisk

GnRH-behandlet fisk hadde 9 gytinger på 28 dager, til sammenligning hadde sham-behandlet fisk 6 gytinger på 57 dager. I forsøket var det kun 15 av 24 hunnfisk som gytt. Med så begrenset materiale er det vanskelig å slå fast om effekt eller ei og forsøket burde gjennomføres

med flere fisk for å kunne si noe konkret om effekten av GnRH-analogen. Effekten er til dels lik et GnRH-studie gjennomført på brasme, der det kun var hormonbehandlet hunnfisk som gytte med hhv. 62 % og 100 % av forsøksgruppen (Kucharczyk et al., 2005). For laks er det vist til at GnRH-behandling i kaldt vann, likt dette forsøket, ga ovulering hos 75 % innen fire uker. Til sammenligning hadde sham-behandlet fisk kun 33 % som ovulerte i løpet av samme tid (Vikingstad et al., 2008).

For de tre fiskene som gytte utenfor arbeidstid ble fisken holdt i tanken, i håp om å få en kontrollert gyting ved neste batch. For de to GnRH-behandlede fiskene ble tiden mellom første og andre batch 7 og 9 dager. Dette var kortere enn for den sham-behandlede fisken som brukte 14 dager mellom batchene. Forsøket ga for lite resultater til å kunne konkludere med noe, men kan være interessant å se nærmere på ved eventuelle senere studier. Det finnes en studie som har sett på direkte observasjon på tid mellom batchene på ubehandlet fisk, som er på 13 dager (Fulton, 1907). I et GnRH studie på piggvar ble det funnet at det er kortere tid mellom batchene sammenlignet med kontrollen i forsøket (Mugnier et al., 2000) i tråd med funnene i dette forsøket.

Dagens metode i kommersiell drift er å undersøke indre organer i foreldrene brukt til avl etter første gyting, for å se etter tegn til sykdommer. Korte intervaller mellom batchene er derfor nødvendig om det skal kunne brukes for å redusere behovet for antall stamfisk. Stamfisken screenes tidligst mulig etter gyting slik at man er sikker på at neste generasjon er frisk og av best mulig kvalitet.

GnRH-behandlet fisk gytt i gjennomsnitt 5,4 dl rogn og ovarievæske, 36% mer enn sham-behandlet fisk som hadde et gjennomsnitt på 4,0 dl. Det indikerer at GnRH-behandlingen har virket og underbygges av at det ikke er funnet forskjell i totalvekten mellom gruppene eller mengde restrogn igjen i fisken ved dissekering. I en tidligere studie gjennomført på gyllen havkaruss (*Sparus aurata* L.) fikk de like resultat med signifikant mer rogn i behandlet gruppe sammenlignet med kontrollgruppen (Barbaro et al., 1997). I studien nevnt tidligere med hormonbehandling på torsk ble det ikke funnet forskjell i rognmengde per kilo kroppsvekt mellom gruppene (Garber et al., 2009).

For de fire fiskene som ikke gytt var buken fortsatt flat og veldig hard ved avslutningen av forsøket. Det at de ikke har gytt i perioden fra forsøket ble avsluttet til slutføring av denne oppgaven var som forventet. Disse var mest sannsynlig ikke like klar som resten av fiskene i

forsøket ved implantering av hormoner. Det var et bevist valg ved utfisking til implantering under starten av forsøket, at man forsøkte å få en god variasjon i forsøksmaterialet både på størrelser, farger og ytre tegn til kjønnsmodning. Det er likt det man så i et forsøk på sommerflyndre (*Paralichthys dentatus*) der 7 av 12 GnRH-behandlet hunnfisk ikke gytt (Berlinsky et al., 1997). Hos brasme gytt alle i GnRH-behandlede hunnfisk og ingen fra kontrollgruppen (Kucharczyk et al., 2005).

4.3 Hannfisk

For hannfisken så man ikke samme effekt som hos hunnfisken når det kommer til reproduktivitet. Det ble gjennomført et forsøk på å stryke fisken for å måle mengde spermier. Dette var uten hell og det ble derfor besluttet å dissekere fisken for å veie og kverne gonadene istedenfor å sentrifugere strøket prøvemateriale. Det ble gjennomført en test ved å spinne prøvene på ulike hastigheter og lengder for å se etter forskjell. Alle prøvene ble målt likt og det ble derfor bestemt å beholde spinne alle prøvene på 13 000 rpm i 3 minutter. Mesteparten av hannfisken hadde en kraftig rød kroppsfarge, som ble tolket som et tegn på at fisken var kjønnsmoden (Davenport, 1985; Imsland et al., 2019a). Ved dissekering kom det tydelig frem hvor små gonadene til fisken i begge gruppene faktisk var. For fire av fiskene var gonadene helt tomme, tre av disse var GnRH-behandlet.

Resultatene viser at det ikke var forskjell i gonadestørrelse mellom GnRH-behandlet og sham-behandlet fisk som følge av behandlingen. Ved gjennomføring av spermatokritt ble det ikke funnet signifikant forskjell mellom gruppene. Det ble det derimot funnet økt spermieproduksjon hos GnRH-behandlet gruppe i et forsøk på torsk (Garber et al., 2009) og brasme (Kucharczyk et al., 2005). Denne forskjellen kan tyde på at den relative effekten til GnRH på gentranskripsjon av FSH og LH avhenger av fiskens art, kjønn og reproduksjonsstatus (Zohar et al., 2010).

Ved gjennomføring av et eventuelt lignende forsøk ville det vært interessant å teste flere hormonimplantering og jevnlig blodprøver til plasmaanalyse for å se om det blir forskjell mellom gruppene. Ifølge Rainis & Ballestrazzi (2005) har en enkel behandling på hannfisk kun positiv effekt i et par dager etter implantering. I arbeidet til Mylonas & Zohar (2001) vises det til at effekten kan gi økt spermieproduksjon opptil fem uker etter implantering. Hannfisken i dette forsøket sto i 51 - 52 dager fra implantering til prøvetaking. Forsøket på brasme ble

gjennomført over 13 dager (Kucharczyk et al., 2005) og forsøket på torsk ble gjennomført over 27 dager (Garber et al., 2009). Flyttingene av hannfiskene til egen tank reduserte "jaget" rundt de mest kjønnsmodne hunnfiskene og så ut til å redusere ukontrollert gyting i tanken. Hvordan dette har påvirket hannfisken er uvisst. Dette forsøket har ikke testet aktiviteten i spermie eller om behandlingen ville hatt en påvirkning på befruktning av rognen.

4.4 Rognkornstørrelse

Rognkornstørrelse ble målt til å være mellom 1,81 mm og 2,22 mm i diameter. Dette er innenfor det som er målt i tidligere studier (Davenport, 1985; Moen & Svendsen, 2004; Imsland, et al., 2019b). Variasjonen i målingene mellom gruppene ble testet med en variansanalyse og resultatene viste at begge gruppene var like. Det er tidligere funnet at antall egg i første og andre batch er lik, men størrelsen på rognkornene i andre batch er omtrent 1,6 % mindre (Kennedy, 2018). Ulik rognkornstørrelse vil kunne føre til at det blir en variasjon i antall rognkorn i inkubatorene. Dette blir tatt høyde for ved å regne resultatet om til relativ andel. Det ble for få resultater med ulik batch til å kunne se om dette var tilfelle for dette forsøk på oppdrettet rognkjeks.

4.5 Klekkesuksess

Det var god overlevelse hos begge gruppene med lite variasjon mellom duplikatene i de fleste inkubatorene. Gjennomsnittlig klekkesuksess for rogn fra GnRH-behandlet fisk var 87,6 (\pm 3,0) % og 59,0 (\pm 9,5) % på rogn fra sham-behandlet fisk. Det ble funnet signifikant høyere klekkeprosent i GnRH-gruppen og den hadde mindre variasjon enn sham-gruppen. Dette er motsatt av det som ble funnet i GnRH forsøket på torsk (Garber et al., 2009), piggvar (Mugnier et al., 2000) og sørlig flyndre (Wright-Moore et al., 2019). Der fant de signifikant lavere befruktningsgrad og klekkesuksess fra hormonbehandlede foreldre. På laks ble det ikke funnet forskjell i overlevelsen på embryo til øyerognstadiet mellom GnRH- og sham-gruppen holdt i kaldt vann (Vikingstad et al., 2008). På gyllen havkaruss ble det ikke funnet forskjell i levedyktige egg mellom gruppene (Barbaro et al., 1997). Det indikerer at GnRH-behandlet hunnfisk i dette forsøket fikk sterkere stimuli for reproduksjon (Mylonas & Zohar, 2001) og at de ble holdt under optimale vann- og miljøforhold for arten (Imsland et al., 2019a). Disse ulike effektene viser at det er forskjeller mellom arter i respons fra GnRH på hjerne-hypofyse-

gonadeaksen. En fisk som får sterkere stimuli av GnRH-behandling vil få en direkte effekt på utskillelsen av både FSH og LH som stimulerer til kjønnsmodning i fisken (Zohar et al., 2010).

Resultatene av GnRH-behandlingen bekreftes ved at det ikke ble funnet forskjell totalvekt på fisken, eller i prosent ubefruktede rognkorn mellom gruppene. Naturlig nok vil det derfor være en forskjell i uklekket rogn. Målingene på rogn fra GnRH-behandlet fisk varierte fra 0,3 % til 28,4 % med et gjennomsnitt på 8,8 (\pm 2,1) %. Rogn fra sham-behandlet fisk hadde høyere variasjon, fra 0 % til 96,7 % og et høyere gjennomsnitt på 22,8 (\pm 6,7) %.

Inkubator 2 ble besluttet fjernet da fisk # 38 gytt kontrollert med batch nummer to, 14 dager senere. Denne inkubatoren ville vært en dårlig representasjon da den var befruktet av en annen hannfisk enn resten av rognen i forsøket. Rognen ble gytt ukontrollert og klistret seg sammen, noe som førte til at rognklumpen måtte rives i mindre biter for å få ca. 5 ml prøvemengde. For rognen i inkubator 15, der begge inkubatorene ikke ble befruktet, er det ikke registrert noe unormalt. Da det er brukt samme hannfisk til å befrukte all rognen i forsøket mistenkes at hunnfisken har vært strøket for tidlig og at rognen ikke har vært klar.

5 Konklusjon

Det ble ikke funnet signifikant forskjell i antall dager til gyting mellom gruppene, selv om GnRH-gruppen hadde en mindre spredning i gytetidspunkt sammenlignet med sham-gruppen. Derfor beholder man den første nullhypotesen (H_{01}). GnRH-behandlet fisk produserte signifikant mer rogn og ovarievæske enn hunnene behandlet med sham. Det ble ikke funnet noen forskjeller i rognkornstørrelse eller i vekt, GSI og spermatokritt hos hannfisk, som følge av behandlingen. På klekkesuksessen til rognen ble det funnet signifikant mer fiskelarver i rogn fra GnRH-behandlede hunnfisk. Derfor forkastes den andre nullhypotesen til fordel for den andre alternative hypotesen (H_{A2}). På rogn fra sham-behandlet hunnfisk ble det funnet signifikant mer uklekket rogn. Dette indikerer at rognen fra GnRH-behandlet rognkjeks fikk sterkere stimuli for reproduksjon.

Referanseliste

- Albert, O. T., Torstensen, E., Bertelsen, B., Jonsson, S. T., Pettersen, I. H., Holst, J. C. (2002). Age-reading of lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*) otoliths: dissection, interpretation and comparison with length frequencies. *Fisheries Research*, 55 (1-3), 239-252. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(01\)00281-8](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(01)00281-8)
- Barbaro, A., Francescon, A., Bozzato, G., Merlin, A., Belvedere, P., Colombo, L. (1997). Induction of spawning in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by a long-acting GnRH agonist and its effects on egg quality and daily timing of spawning. *Aquaculture*, 154 (3-4), 349-359. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00067-7)
- Berlinsky, D. L., King, W., Hodson, R. G., Sullivan, C. V. (1997). Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus*. *Journal of the world aquaculture society*, 28, (1), 79-86. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1997.tb00964.x>
- Chow, M. M., Kight, K. E., Gothilf, Y., Alok, D., Stubblefield, J., Zohar, Y. (1998). Multiple GnRHs present in a teleost species are encoded by separate genes: analysis of the sbGnRH and cGnRH-II genes from the striped bass, *Morone saxatilis*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 21 (3), 277-289. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0210277>
- Davenport, J. (1985). Synopsis of biological data on the lumpsucker, *Cyclopterus lumpus* (Linnaeus, 1758), *FAO Fisheries Synopsis*, (147), 1-31. <https://www.fao.org/3/ap950e/ap950e.pdf>
- Durif, C., (2020). *Regulering av fisket etter rognkjeks*. Havforskningsinstituttet. Hentet fra <https://www.hi.no/resources/rad-rognkjeks.pdf>
- Fiskeridirektoratet. (2021a, 27. mai). Akvakulturstatistikk: matfiskproduksjon av laks, regnbueørret og ørret. Hentet fra <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Laks-regnbueoerret-og-oerret/Matfiskproduksjon>
- Fiskeridirektoratet. (2021b, 21. oktober). Akvakulturstatistikk: andre fiskearter. Hentet fra <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Rensefisk>

- Fulton, T. W. (1907). On the spawning of the lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*) and the paternal guardianship of the eggs. *Report of the Fishery Board for Scotland*, 24, 169-178.
- Garber, A. F., Fordham, S. E., Symonds, J. E., Trippel, E. A., Berlinsky, D. L. (2009). Hormonal induction of ovulation and spermiation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 296 (1-2), 179-183. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.08.009>
- Havforskningsinstituttet. (2020, 17. februar). Generell biologi. Hentet fra <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/generell-biologi>
- Hedeholm, R., Blicher, M. E. & Grønkjær, P. (2014). First estimates of age and production of lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*) in Greenland. *Fisheries Research* 149, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.08.016>
- Hjeltnes, B., Jensen, B. B., Bornø, G., Haukaas, A., Walde, C. S. (Red.). (2019). Fiskehelse rapporten 2018. (Rapport 6a/2018). Hentet fra <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2019/fiskehelse-rapporten-2018>
- Holan, A. B., Roth, B., Breiland, M. S. W., Kolarevic, J., Hansen, Ø. J., Iversen, A., Hermansen, Ø., Gjerde, B., Hatlen, B., Mortensen, A., Lein, I., Johansen, L., Noble, C., Gismervik, K., Espmark, Å. M. (2017). Beste praksis for medikamentfrie metoder for lakseluskontroll (MEDFRI): Faglig sluttrapport. (Rapport 10/2017) Hentet fra <https://nofimaas.sharepoint.com/sites/public/Cristin/Rapport%2010-2017.pdf?ga=1>
- Hosmer, D. W. & Lemeshow, S. (1989). *Applied logistic regression*. John Wiley & Sons, New York, 307s.
- Imslund, A. K., Reynolds, P., Eliassen, G., Hangstad, T. A., Foss, A., Vikingstad, E., Elvegård, T. A. (2014). The use of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) to control sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer) infestations in intensively farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 424–425, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.033>
- Imslund, A. K., Reynolds, P., Eliassen, G., Mortensen, A., Hansen, Ø. J., Puvanendran, V., Hangstad, T. A., Jónsdóttir, Ó. D. B., Emaus, P-A., Elvegård, T. A., Lemmens, S. C. A., Rydland, R., Nytrø, A. V., Jonassen, T. M. (2016). Is cleaning behaviour in lumpfish

- (*Cyclopterus lumpus*) parentally controlled? *Aquaculture*, 459, 156-165.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.047>
- Imslund, A. K. D., Hanssen, A., Nytrø, A. V., Reynolds, P., Jonassen, T. M., Hangstad, T. A., Elvegård, T. A., Urskog, T. C., Mikalsen B. (2018a). It works! Lumpfish can significantly lower sea lice infestation in large-scale salmon farming. *Biology Open*, 7, (9). <https://doi.org/10.1242/bio.036301>
- Imslund, A. K. D., Jonassen, T. M., Hangstad, T. A., Stefansson, S. O., Elvegård, T. A., Lemmens, S. C. A., Urskog, T. C., Nytrø, A. V. (2018b). The effect of continuous light and compressed photoperiods on growth and maturation in lumpfish *Cyclopterus lumpus*. *Aquaculture*, 485, 166-172. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.053>
- Imslund, A. K., Hangstad, T. A., Jonassen, T. M., Stefansson, S. O., Nilsen, T. O., Hovgaard, P., Elvegård, T. A., Lindberg, K. S., Mikalsen, B., Urskog, T. C., Norberg, B., Andersson, E., Spetland, F., Reynolds, P. (2019a). The use of photoperiods to provide year round spawning in lumpfish *Cyclopterus lumpus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 228, 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.11.004>
- Imslund, A. K. D., Danielsen, M., Jonassen, T. M., Hangstad, T. H., Falk-Petersen, I-B. (2019b). Effect of incubation temperature on eggs and larvae of lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). *Aquaculture*, 498, 217-222. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.061>
- Imslund, A. K. D., Reynolds, P., Hangstad, T. A., Kapari, L., Maduna, S. N., Hagen, S. B., Jónsdóttir, O. D. B., Spetland, F., Lindberg, K. S. (2021). Quantification of grazing efficacy, growth and health score of different lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) families: Possible size and gender effects. *Aquaculture*, 530, 735925. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735925>
- Ingólfsson, A. & Kristjánsson, B. K. (2002). Diet of juvenile lumpsucker *Cyclopterus lumpus* (*Cyclopteridae*) in floating seaweed: effects of ontogeny and prey availability. *Copeia* 2, 472–476.
- Iversen, A., Hermansen, Ø., Nystøyl, R., Hess, E. J. (2017). Kostnadsutvikling i lakseoppdrett: Med fokus på fôr- og lusekostnader. (Rapport 24/2017). Hentet fra <https://nofima.brage.unit.no/nofima->

[xmlui/bitstream/handle/11250/2481501/Rapport%2024-2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.01.030)

- Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L. G., Vaillant, C., Lareyre, J. J. (2007). GnRH and GnRH receptors in metazoa: A historical, comparative, and evolutive perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 153 (1-3), 346 – 364. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.01.030>
- Kennedy, J. (2018). Oocyte size distribution reveals ovary development strategy, number and relative size of egg batches in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). *Polar Biology*, 41, 1091–1103. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2266-9>
- Kennedy, J., Durif, C. M. F., Florin, Ann-B., Fréchet, A., Gauthier, J., Hüsey, K., Jónsson, S. Þ., Ólafsson, H. G., Post, S., Hedeholm, R. B. (2018). A brief history of lumpfishing, assessment, and management across the North Atlantic. *ICES Journal of Marine Science*, 76(1), 181–191. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsy146>
- Kristan, J., Stejskal, V. & Policar, T. (2012). Comparison of Reproduction Characteristics and Broodstock Mortality in Farmed and Wild Eurasian Perch (*Perca fluviatilis* L.) Females During Spawning Season Under Controlled Conditions. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 191-197. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v12_2_01
- Kucharczyk, D., Kujawa, R., Mamcarz, A., Targońska-Dietrich, K., Wyszomirska, E., Glogowski, J., Babiak, I., Szabó, T. (2005). Induced spawning in bream (*Abramis brama* L.) using pellets containing GnRH. *Czech Journal of Animal Science*, 50(3), 89–95. <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/52521.pdf>
- Mattilsynet (2020). Nasjonal tilsynskampanje 2018/2019: Velferd hos rensefisk. Hentet fra https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/akvakultur/rensefisk/mattilsynet_sluttrapport_renseskampanje_2018_2019.37769/binary/Mattilsynet%20sluttrapport%20rensefiskkampanje%202018%20-%202019
- Moen, F. E. & Svendsen, E. (2004). *Marine fish & invertebrates of Northern Europe*. Kristiansund: KOM, 608 s.
- Mugnier, C., Guennoc, M., Lebegue, E., Fostier, A., Breton, B. (2000). Induction and synchronisation of spawning in cultivated turbot (*Scophthalmus maximus* L.)

- broodstock by implantation of a sustained-release GnRH-a pellet. *Aquaculture*, 181, (3-4), 241 - 255. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00234-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00234-3)
- Mylonas, C. C. & Zohar, Y. (2001). Use of GnRH-a-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10, 463–491.
- Noble, C., Nilsson, J., Stien, L. H., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Gismervik, K. (2018). Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd. Tromsø: Lundblad Media AS.
- Nærings- og fiskeridepartementet. (2015). Forutsigbar og miljømessig bærekraftig vekst i norsk lakse- og ørretoppdrett (Meld. St. 16 (2014-2015)) Hentet fra <https://www.regjeringen.no/contentassets/6d27616f18af458aa930f4db9492fbe5/no/pdfs/stm201420150016000dddpdfs.pdf>
- Nøstvold, B., Kvalvik, I., Voldnes, G., Jentoft, A. R. (2016). *Etterbruk av rognkjeks: Fra lusespiser til middagsmat*. (Rapport 43/2016). Hentet fra <https://nofima.brage.unit.no/nofima-xmlui/bitstream/handle/11250/2421389/Rapport%2b43-2016.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Ohlsson, B. (2017). Gonadotropin-Releasing Hormone and Its Role in the Enteric Nervous System. *Frontiers in Endocrinology*, 8 (110), 141-147. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00110>
- Olafsen, T., Winther, U., Olsen, Y., Skjermo, J. (2012). Verdiskapning basert på produktive hav i 2015. På oppdrag fra NTVA og DKNVS. Hentet fra <https://www.regjeringen.no/globalassets/upload/fkd/vedlegg/rapporter/2012/verdiskapning-rapport-010812.pdf?id=2322968>
- Powell, A., Treasurer, J. W., Pooley, C. L., Keay, A. J., Lloyd, R., Imsland, A. K., Leaniz, C. G. d. (2018). Use of lumpfish for sea-lice control in salmon farming: challenges and opportunities. *Reviews in Aquaculture*, 10, 683–702. <https://doi.org/10.1111/raq.12194>
- Rainis, S. & Ballestrazzi, R. (2005). The control of reproduction in finfish species through GnRH treatments, *Italian Journal of Animal Science*, 4 (4), 345-353. <https://doi.org/10.4081/ijas.2005.345>

- Regjeringen. (2017, 30. oktober). Regjeringen skrur på trafikklyset. Hentet fra <https://www.regjeringen.no/no/aktuelt/regjeringen-skrur-pa-trafikklyset/id2577032/>
- Råfisklaget. (2022). Rognkjeks og rognkall, levert levende til disp.mottak i Råfisklagets distrikt fra Finnmark til Nordmøre, 2020 og 2021. Tromsø. Upublisert.
- Taranger, G. L., Carrillo, M., Schulz, R. W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F., Dufour, S., Karlsen, Ø., Norberg, B., Andersson, E., Hansen, T. (2010). Control og puberty in farmed fish. *General and comparative endocrinology*. 165 (3), 483-515. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.004>
- Thomassen, M. S. (Red.). (2006). *Havbruksforskning: Fra merd til mat: Havbruk - produksjon av akvatiske organismer (2000-2005)*. Oslo: Norges forskningsråd.
- Thorsteinsson, V. (1981). The ageing validation of the lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*) and the age composition of the lumpsucker in Icelandic lumpsucker fisheries. *ICES, CM 1981/G:58*, 1-26. Hentet fra https://www.ices.dk/sites/pub/CM%20Documents/1981/G/1981_G58.pdf
- Vikingstad, E., Andersson, E., Norberg, B., Mayer, I., Klenke, U., Zohar, Y., Stefansson, S. O., Taranger, G. L. (2008). The combined effects of temperature and GnRHa treatment on the final stages of sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) females. *Fish Physiology and Biochemistry*, 34, 289–298. <https://doi-org.mime.uit.no/10.1007/s10695-007-9187-9>
- Voldnes, G., Ageeva T. N., Heide, M., Hermansen, Ø., Hogrenning, E., Kvalvik, I., Nikitina, E., Stormo, S. K. (2021). *Bærekraftig etterbruk av rensefisk*. (Rapport 34/2021). Hentet fra <https://nofima.brage.unit.no/nofima-xmlui/bitstream/handle/11250/2976554/Rapport%2b34-2021%2bB%25C3%25A6rekraftig%2betterbruk%2bav%2brensefisk%2b-%2bFaglig%2bsluttrapport%2bAP3.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Wright-Moore, W. D., Watanabe, W. O., Bourdelais, A. J., Alam, M. S., Rezek, T. C., Carroll, P. M., Woolridge, C. A. (2019). Spawning performance and egg quality of wild-caught and first generation southern flounder *Paralichthys lethostigma* broodstock induced with piscine and mammalian GnRH analogs. *Aquaculture*, 506, 367-379. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.062>

Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J. A., Elizur, A., Kah, O. (2010). Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165 (3), 438 – 455.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.017>

Appendiks

Hunnfisk

Tabell 1. Enveis ANOVA for dager til gyting fordelt på behandling.

Effect	Univariate Tests of Significance for dager til gyting Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	9506,944	1	9506,944	60,75057	0,000003
Behandling	485,344	1	485,344	3,10141	0,101711
Error	2034,389	13	156,491		

Tabell 2. Logaritmisk regresjon for dager til gyting fordelt på behandling.

Model is: logistic regression (logit) No. of 0's:9.000000 (60.00000%) No. of 1's:6.000000 (40.00000%)
Dependent variable: Behandling Independent variables: 1
Loss function is: maximum likelihood Final value: 8.548189929
-2*log(Likelihood): for this model= 17.09638 intercept only= 20.19035
Chi-square = 3.093970 df = 1 p = .0785924

Tabell 3. Enveis ANOVA for startvekt hunnfisk (kg) fordelt på behandling.

Effect	Univariate Tests of Significance for startvekt hunnfisk (kg) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	180972384	1	180972384	622,1611	0,000000
Behandling	555713	1	555713	1,9105	0,180784
Error	6399295	22	290877		

Tabell 4. Enveis ANOVA for totalvekt hunnfisk (kg) fordelt på behandling.

Effect	Univariate Tests of Significance for totalvekt hunnfisk (kg) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	114,2440	1	114,2440	465,0852	0,000000
Behandling	0,0040	1	0,0040	0,0163	0,900412
Error	3,1933	13	0,2456		

Tabell 5. Enveis ANOVA for rogn (l) fordelt på behandling.

Effect	Univariate Tests of Significance for rogn (l) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3,211111	1	3,211111	341,5455	0,000000
Behandling	0,075111	1	0,075111	7,9891	0,014286
Error	0,122222	13	0,009402		

Tabell 6. NK post hoc test for rogn (l) fordelt på behandling.

Newman-Keuls test; variable rogn (l) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00940, df = 13,000			
Cell No.	Behandling	{1}	{2}
1	GnRH	,54444	,40000
2	Sham	0,014443	0,014443

Tabell 7. Enveis ANOVA for restrogn (g) fordelt på behandling.

Univariate Tests of Significance for restrogn (g) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1784781	1	1784781	49,46216	0,000009
Behandling	17584	1	17584	0,48731	0,497426
Error	469089	13	36084		

Hannfisk

Tabell 8. Enveis ANOVA for startvekt hannfisk (g) fordelt på behandling.

Univariate Tests of Significance for startvekt hannfisk (g) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	16846720	1	16846720	568,0055	0,000000
Behandling	38157	1	38157	1,2865	0,274498
Error	444892	15	29659		

Tabell 9. Enveis ANOVA for sluttvekt hannfisk (g) fordelt på behandling.

Univariate Tests of Significance for sluttvekt hannfisk (g) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	15308865	1	15308865	572,9839	0,000000
Behandling	68805	1	68805	2,5753	0,129390
Error	400767	15	26718		

Tabell 10. Enveis ANOVA for spermatokritt (% prøvemengde) fordelt på behandling.

Effect	Univariate Tests of Significance for spermatokritt (% prøvemengde) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	6,568742	1	6,568742	49,45384	0,000004
Behandling	0,150420	1	0,150420	1,13246	0,304083
Error	1,992386	15	0,132826		

Tabell 11. Enveis ANOVA for GSI (%) fordelt på behandling.

Effect	Univariate Tests of Significance for GSI (%) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,040504	1	0,040504	58,83303	0,000001
Behandling	0,000326	1	0,000326	0,47395	0,501687
Error	0,010327	15	0,000688		

Rognkornstørrelse

Tabell 12. Enveis ANOVA for rognkornstørrelse fordelt på behandling.

Effect	Univariate Tests of Significance for rognkornstørrelse Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	61,27275	1	61,27275	10279,48	0,000000
Behandling	0,00608	1	0,00608	1,02	0,330774
Error	0,07749	13	0,00596		

Klekkeresultat

Tabell 13. Enveis ANOVA for larver (%) fordelt på behandling.

Effect	Univariate Tests of Significance for larver (%) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	16,11326	1	16,11326	253,5808	0,000000
GROUP	0,81304	1	0,81304	12,7952	0,001203
Error	1,90629	30	0,06354		

Tabell 14. NK post hoc test for larver (%) fordelt på behandling.

Newman-Keuls test; variable larver (%) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,06354, df = 30,000				
Cell No.	GROUP	{1}	{2}	
1	GnRH	,87587	,55456	
2	Sham	0,001338	0,001338	

Tabell 15. Enveis ANOVA for ubefruktet (%) fordelt på behandling.

Univariate Tests of Significance for ubefruktet (%) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,312952	1	0,312952	5,235480	0,029349
GROUP	0,125100	1	0,125100	2,092836	0,158360
Error	1,793256	30	0,059775		

Tabell 16. Enveis ANOVA for uklekket (%) fordelt på behandling.

Univariate Tests of Significance for uklekket (%) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,079381	1	1,079381	28,33693	0,000009
GROUP	0,300299	1	0,300299	7,88374	0,008686
Error	1,142729	30	0,038091		

Tabell 17. NK post hoc test for uklekket (%) fordelt på behandling.

Newman-Keuls test; variable uklekket (%) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,03809, df = 30,000				
Cell No.	GROUP	{1}	{2}	
1	GnRH	,08747	,28275	
2	Sham	0,008830	0,008830	

Test for forutsetninger

Hunnfisk

Tabell 18. Levene`s test for varianslikhet og Kolmogorov-Smirnov test for normal distribusjon for dager til gyting.

	Levene's Test for Homogeneity of Variances Effect: "Behandling" Degrees of freedom for all F's: 1, 13			
	MS Effect	MS Error	F	p
Dager til gyting	443,4573	28,76390	15,41715	0,001737

Variable: Dager til gyting, Distribution: Normal, Kolmogorov-Smirnov d = 0,26471, p = n.s.

Tabell 19. Levene`s test for varianslikhet og Kolmogorov-Smirnov test for normal distribusjon for startvekt (kg) for hunnfisk.

	Levene's Test for Homogeneity of Variances Effect: "Behandling" Degrees of freedom for all F's: 1, 22			
	MS Effect	MS Error	F	p
Startvekt (kg)	845375,8	97823,48	8,641849	0,007581

Variable: Startvekt (kg), Distribution: Normal, Kolmogorov-Smirnov d = 0,16489, p = n.s.

Tabell 20. Levene`s test for varianslikhet og Kolmogorov-Smirnov test for normal distribusjon for totalvekt (kg) for hunnfisk.

	Levene's Test for Homogeneity of Variances Effect: "Behandling" Degrees of freedom for all F's: 1, 13			
	MS Effect	MS Error	F	p
Totalvekt (kg)	0,016000	0,075840	0,210969	0,653595

Variable: Totalvekt (kg), Distribution: Normal, Kolmogorov-Smirnov d = 0,17195, p = n.s.

Tabell 21. Levene`s test for varianslikhet og Kolmogorov-Smirnov test for normal distribusjon for rogn (l).

Levene's Test for Homogeneity of Variances				
Effect: "Behandling"				
Degrees of freedom for all F's: 1, 13				
	MS Effect	MS Error	F	p
Rogn (l)	0,005273	0,002148	2,454420	0,141204

Variable: Rogn (l), Distribution: Normal, Kolmogorov-Smirnov d = 0,23011, p = n.s.

Tabell 22. Levene`s test for varianslikhet og Kolmogorov-Smirnov test for normal distribusjon restrogn (g).

Levene's Test for Homogeneity of Variances				
Effect: "Behandling"				
Degrees of freedom for all F's: 1, 13				
	MS Effect	MS Error	F	p
Restrogn (g)	1,161043	7403,161	0,000157	0,990198

Variable: Restrogn (g), Distribution: Normal, Kolmogorov-Smirnov d = 0,19264, p = n.s.

Hannfisk

Tabell 23. Levene`s test for varianslikhet og Kolmogorov-Smirnov test for normal distribusjon startvekt (g) hannfisk.

Levene's Test for Homogeneity of Variances				
Effect: "Behandling"				
Degrees of freedom for all F's: 1, 15				
	MS Effect	MS Error	F	p
Startvekt (g)	10165,10	9920,760	1,024629	0,327474

Variable: Startvekt (g), Distribution: Normal, Kolmogorov-Smirnov d = 0,12102, p = n.s.

Tabell 24. Levene`s test for varianslikhet og Kolmogorov-Smirnov test for normal distribusjon for sluttvekt (g) hannfisk.

Levene's Test for Homogeneity of Variances				
Effect: "Behandling"				
Degrees of freedom for all F's: 1, 15				
	MS Effect	MS Error	F	p
Sluttvekt (g)	15260,00	7502,678	2,033941	0,174302

Variable: Sluttvekt (g), Distribution: Normal, Kolmogorov-Smirnov d = 0,13801, p = n.s.

Tabell 25. Levene`s test for varianslikhet og Kolmogorov-Smirnov test for normal distribusjon for spermatokritt (% prøvemengde).

	Levene's Test for Homogeneity of Variances Effect: "Behandling" Degrees of freedom for all F's: 1, 15			
	MS Effect	MS Error	F	p
Spermatokritt (% prøvemengde)	0,107962	0,038561	2,799790	0,114997

Variable: Spermatokritt (% prøvemengde), Distribution: Normal, Kolmogorov-Smirnov d = 0,31853, p < 0,05.

Tabell 26. Levene`s test for varianslikhet og Kolmogorov-Smirnov test for normal distribusjon for GSI (%).

	Levene's Test for Homogeneity of Variances Effect: "Behandling" Degrees of freedom for all F's: 1, 15			
	MS Effect	MS Error	F	p
GSI (%)	0,000423	0,000200	2,117625	0,166220

Variable: GSI (%), Distribution: Normal (GnRH 2022 mai) Kolmogorov-Smirnov d = 0,27992, p < 0,15.

Rognkornstørrelse

Tabell 27. Levene`s test for varianslikhet og Kolmogorov-Smirnov test for normal distribusjon for rognkornstørrelse.

	Levene's Test for Homogeneity of Variances Effect: "Behandling" Degrees of freedom for all F's: 1, 13			
	MS Effect	MS Error	F	p
Rognkornstørrelse	0,002852	0,001710	1,668437	0,218961

Variable: Rognkornstørrelse, Distribution: Normal, Kolmogorov-Smirnov d = 0,22498, p = n.s.

Klekkesuksess

Tabell 28. Levene`s test for varianslikhet og Kolmogorov-Smirnov test for normal distribusjon for larver %.

Levene's Test for Homogeneity of Variances				
Effect: GROUP				
Degrees of freedom for all F's: 1, 28				
	MS Effect	MS Error	F	p
Larver %	0,241269	0,018822	12,81822	0,001279

Variable: Larver %, Distribution: Normal, Kolmogorov-Smirnov d = 0,23515, p < 0,10.

Tabell 29. Levene`s test for varianslikhet og Kolmogorov-Smirnov test for normal distribusjon for ubefruktet %.

Levene's Test for Homogeneity of Variances				
Effect: GROUP				
Degrees of freedom for all F's: 1, 28				
	MS Effect	MS Error	F	p
Ubefruktet %	0,340597	0,029094	11,70670	0,001932

Variable: Ubefruktet %, Distribution: Normal, Kolmogorov-Smirnov d = 0,42792, p < 0,01.

Tabell 30. Levene`s test for varianslikhet og Kolmogorov-Smirnov test for normal distribusjon for uklekket %.

Levene's Test for Homogeneity of Variances				
Effect: GROUP				
Degrees of freedom for all F's: 1, 28				
	MS Effect	MS Error	F	p
Uklekket %	0,042682	0,017776	2,401084	0,132481

Variable: Uklekket %, Distribution: Normal, Kolmogorov-Smirnov d = 0,22318, p < 0,10.

