

Notat

<i>Tittel:</i> Protokoll for produksjon og transport av rogn og melke fra rognkjeks	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
	<i>Dato:</i> 9. november 2015
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Ingrid Lein	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 7
<i>Avdeling:</i> Produksjonsbiologi	<i>Prosjektnr.:</i> 10952
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF 900977
<i>Kommentarer:</i> Nofima i samarbeid med Cryogenetics as arbeidet med befruktning av rogn fra rognkjeks. Arbeidet er en del av FHF-prosjekt nr. 900977 Stamfisk rognkjeks. Høsten 2015 legges det inn mye rogn i kommersielle klekkerier, og det benyttes til dels nye metoder hvor en frakter ubefruktet rogn og melke fra fisker til de aktuelle anleggene. Resultatene av dette har vært svært varierende. Vi vil derfor komme med noen anbefalinger basert på arbeidet som er gjort tidligere i år, og på erfaringer med andre marine arter som kveite og torsk. Protokollen beskriver lagring av melke, stryking og befruktning av rogn samt transport av rogn. Utstyrsliste er vist bakerst i notatet.	

Innhold

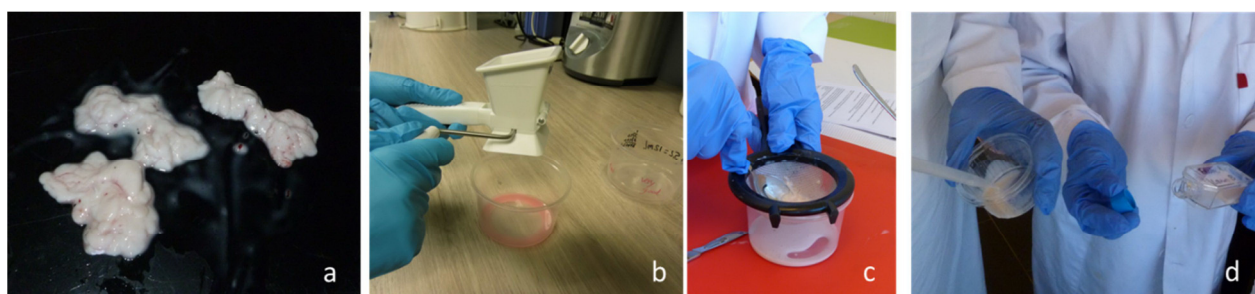
1	Ekstraksjon og lagring av melke	1
2	Stryking av rogn.....	4
3	Befruktning av rogn	5
4	Transport av rogn	6
5	Utstyrsliste	7

1 Ekstraksjon og lagring av melke

De fleste produsentene av benytter melke som er ekstrahert fra gonader. I forsøk ved Nofima har vi fått svært god befruktning (>90%) både for kjølelagret og frossen melke. I denne protokollen beskrives kun kjølelagring av melke.

Ved å gjøre klar melken på forhånd vil en både sikre kvaliteten på melken, og spare arbeid hver gang det strykes rogn. Dersom melken/gonaden skal fraktes fra fisker til eget anlegg anbefaler vi at prepareringen foregår hos fisker. Hvis dette ikke er mulig bør gonadene finkuttes og blandes med AquaBoost SpermCoat for å sikre spermienes tilgang til oksygen. Både ferdig preparert melke og oppkuttet gonade må fraktes kjølig med is.

- Fisken avlives med en overdose bedøvelse (vi benytter Finquel, 125-150 mg/l).
- Fisken tørkes godt med tørkepapir og legges på en ren skjærfjel. Bruk hansker. Buken åpnes med en ren skalpell, og gonaden skjæres ut. Legg papir på skjærefjelen for å unngå at det kommer sjøvann til gonaden, dette kan aktivere spermienes. Legg gonaden over i en ren plastbeholder.
- Gjenta for så mange fisk som du har bruk for. NB! Gonader som er tatt ut bør settes kjølig umiddelbart, enten kjøleskap eller i isoporkasse med is.
- Ta med plastbegrene til laboratoriet eller en annen ren plass. Legg gonaden på en ren skjærfjel, og skjær bort så mye blodårer/slitrer som mulig (Figur 1a).
- Mal gonaden to ganger gjennom en gonadekvern (Cryogenetics). Sil deretter melken gjennom en tesil for å bli kvitt slitrer (Figur 1b, c). IKKE bland melke fra ulike hanner før kvaliteten er sjekket.



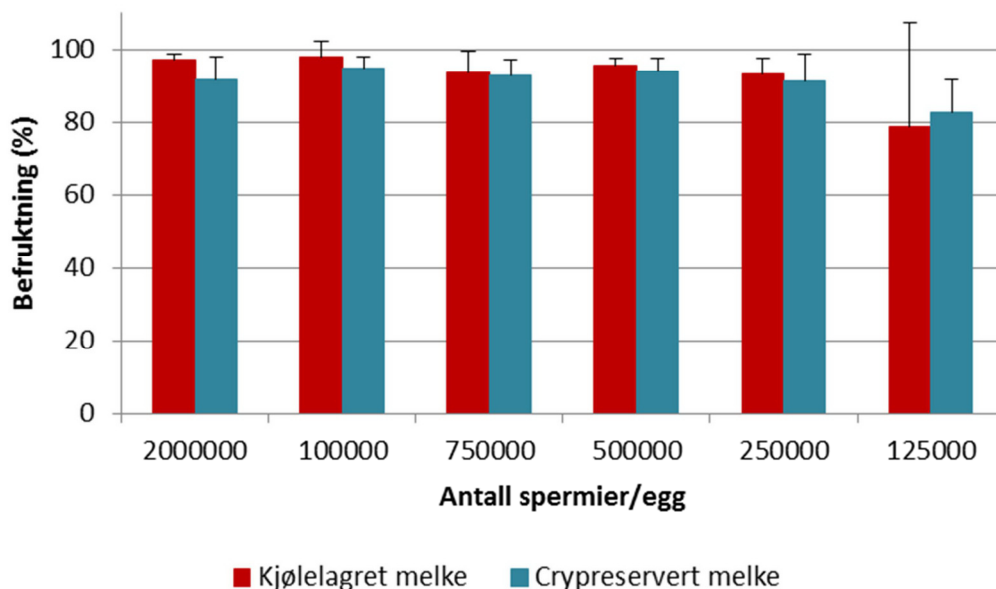
Figur 1 Dissekerte gonader (a), kverning av gonade (b), siling melke (c) og overføring til celledyringsflaske (d).

- Melken blandes 1:1 med med en fysiologisk løsning (AquaBoost® SpermCoat fra Cryogenetics). Dette fortynner melken slik at spermienes får bedre tilgang til oksygen under lagring.
- Det er viktig å vite tettheten av spermier. I våre forsøk har spermietettheten variert fra 2-3 mrd./ml til 30 mrd./ml. Tettheten kan måles ved bruk av mikroskop og et hemacytometer (tellekammer), men dette er svært tidkrevende. Vi har benyttet et SDM6 Fotometer fra Cryogenetics som er kalibrert for melke fra rognkall (Figur 2). Dette er en rask og enkel metode som benyttes mye av lakserognprodusenter.



Figur 2 SDM6 Fotometer til telling av antall spermier/volum i melke fra rognkall.

- Våre resultater viser at spermene hos rognkall er aktive, (Figur 3), det er derfor ikke nødvendig å bruke mye melke per egg dersom en kjenner tettheten av spermene. Overflødig melke gir næring til bakterier under inkuberingen av rogn.



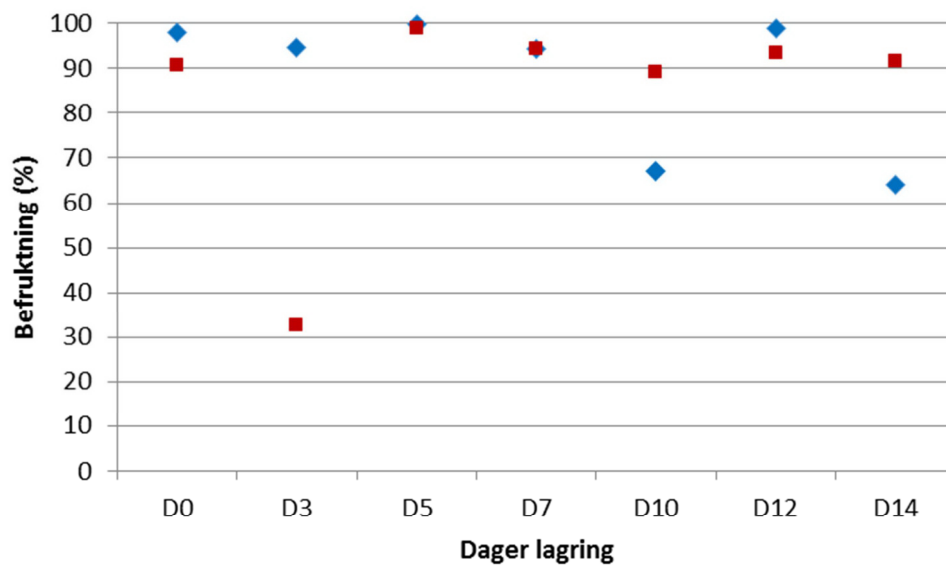
Figur 3 Befruktningssprosent ved ulike spermietettheter av kjølelagret eller frossen melke.

- I tillegg kan bevegeligheten på spermene si noe om kvaliteten. Til dette trenger du et mikroskop, mikroskopglass, dekkglass, engangspipette og sjøvann. Legg en LITEN dråpe melke på mikroskopglasset, legg forsiktig på dekkglasset. Tilsett sjøvann ved siden av dekkglasset mens du ser i mikroskopet. Dersom motiliteten er god skal du se en kraftig reaksjon når spermene aktiveres av sjøvannet
- Fordel maks 10 ml fortynnet melke til 25 cm² celledyrkingsflasker (Figur 4). Det er viktig at melken ligger i et tynt lag slik at alle spermene får tilgang til oksygen. Benyttes større flasker bregnes volumet i forhold til arealet på bunnen av flasken
- Flaskene med melke merkes med mengde (ml), tetthet og dato, og legges i kjøleskap (3-3,5 °C). Flaskene kan samles i en plastkasse eller lignende. **NB! Legg flaskene flatt for å få størst mulig overflate, og flaskene må beveges forsiktig 2-3 ganger daglig for å sikre at alle spermene får oksygen!** Eventuelt kan en bruke et ristebrett som sørger for en forsiktig, kontinuerlig omrøring av melken



Figur 4 Flasker for celledyrking. Finnes i ulike størrelser.

- Forsøk hos Nofima har vist at melke preparert etter denne oppskriften kan benyttes i minst 14 dager uten reduksjon i befruktningsevne. Forsøket ble gjort med rogn fra to hunner for hvert befruktningstidspunkt, og kun 3 av 14 hunnfisk ga befruktningsprosent under 90 % (Figur 5).

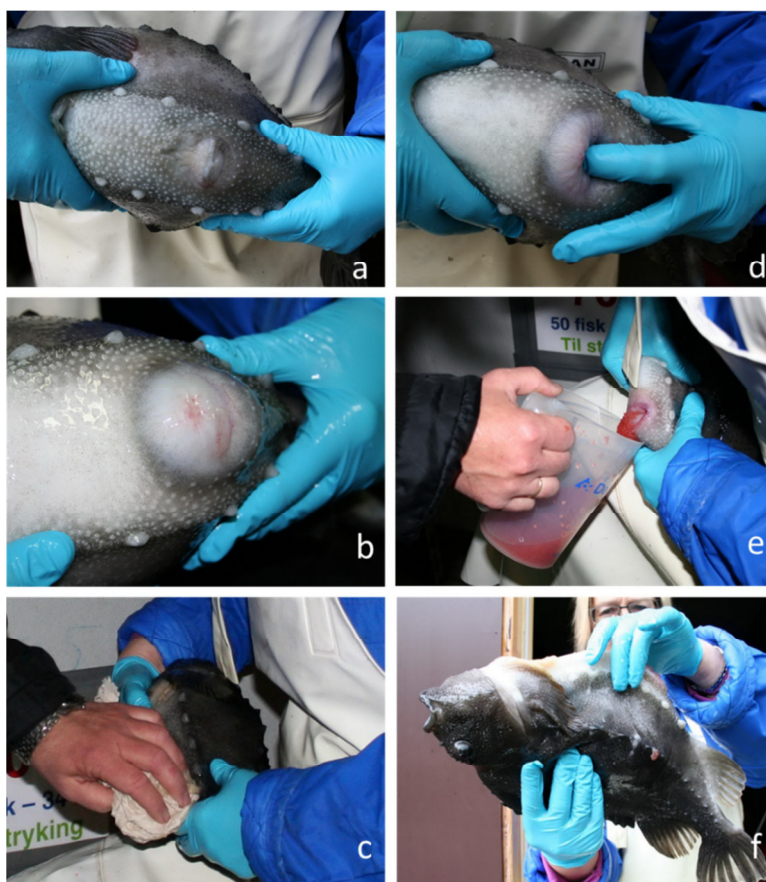


Figur 5 Befruktningsprosent på rogn som ble befruktet med melke fortynnet med AquaBoost® SpermCoat og lagret opp til 14 dager i kjøleskap. Rogn fra to hunner ble befruktet på hvert tidspunkt.

2 Stryking av rogn

Fordi rognkjeks er en porsjonsgyter er det stor risiko for å stryke umoden rogn dersom en er for tidlig ute (Figur 6a). Sluttmodningen som foregår de siste timene før gyting er svært viktig for videre utvikling av rogn.

- Følg utviklingen av gattet, og velg fisk som har svullent, ofte rødlig gatt (6b)
- Bruk engangshansker for å unngå å skade skinnet på fisken
- Bedøv fisken med anbefalt dose bedøvelsesmiddel (vi benytter Finquel, 125-150 mg/l)
- Tørk gattåpningen for å unngå at det kommer sjøvann i rogn (6c). Sjøvannet kan aktivere eggene slik at de sveller, og stenger åpningen hvor spermien skal entre egget (microphylen), og dermed hindre befruktning
- Det kan være nødvendig å gi et lett trykk i gattåpningen for at hinnen som stenger den skal brytes. **NB!! Det skal ikke brukes makt!!** (6d)
- Når fisken er klar skal rogn renne lett ut av fisken. Før rogn bak mot gonadeåpningen til det slutter å renne rogn (6e)
- Når fisken er ferdig strøket, er den helt tom, det er bare skinnet med et tynt muskellag som dekker bukhulen (6f)
- Rognkjeks ser ut til å gyte 2 porsjoner med 6-10 dagers mellomrom. Ved andre gyting er ikke gattet like oppsvulmet som ved første gyting. Det er likevel viktig at rogn slipper lett. Må det brukes makt betyr det at fisken ikke er gyteklar.



Figur 6 Ikke gyteklar rognkjeks (a), gyteklar rognkjeks (b), tørking av gattet for å unngå sjøvann i rogn (c), perforering av gatthinnen, ikke bruk makt! (d), stryking rogn (e), utgytt rognkjeks (f).

3 Befruktning av rogn

Det er i dag vanlig å bruke tørrbefruktning for befruktning av rognkjeksrogn, dvs. at melken blandes med rogn før sjøvann tilsettes. Vi anbefaler å bruke våtbefruktning både for å sikre at melken rekker fram til all rogn, og for å kunne skylle bort overflødig melke som gir næring til bakterier i inkubatorene.

- Fordel ca. 1 liter rogn jevnt utover i et vaskevannsfat eller lignende
- Beregn hvor mye melke det er behov for. Vi anbefaler 250.000-500.000 spermier/egg. Vi regner 100-120.000 egg per liter rogn
- Klargjør en mengde filtrert sjøvann som er tilstrekkelig til å dekke rogn (omtrent samme volum som rognvolumet) i en beholder med lokk
- Tilsett melken til sjøvannet, sett på lokket, **RIST RASKT**, og slå blandingen av sjøvann og melke over rogn
- La stå 5-10 minutter. Rør litt på fatet med rogn innimellom. Dersom vannmengden er for liten til å dekke rogn fyller du på litt mer. Det er bedre å ha litt for lite i starten slik at melken ikke tynnes ut for mye
- Skyll forsiktig 3 ganger med filtrert sjøvann. Eggene har nå formet en «kake» som forsiktig kan overføres til inkubatorer med gjennomstrømning

4 Transport av rogn

Ved transport av rogn er det to faktorer som er svært viktige: *temperatur og tilgang på oksygen*.

Det er derfor viktig å bruke is under transporten for å holde temperaturen under kontroll. Det er viktig at det brukes VÅT is, dvs. is som har fått stå i en bøtte eller isoporkasse med vann før den benyttes. Da vil det være vann på ca. 0° som kjøler rogn.

Vi anbefaler å bruke rognkasser med skuffer (lakserogn), da kan det legges våt is i den øverste skuffen, og kaldt vann vil fordele seg jevnt over posene med rogn. Det holder med 1 skuff per kasse, dvs. at det ikke er nødvendig at alle kassene kommer med skuffer (valgfritt v/bestilling).



Figur 7 Rognkasse med innleggsskuff hvor en kan legge våt is i øverste skuff for kjøling av rogn.

Vi anbefaler også å tilsette litt oksygen i transportposene, selv om ubefruktet rogn ikke forbruker mye oksygen.

- Klargjør kassen med bobleplast eller bleier i bunnen. Begge deler vil verne mot støt, bleiene suger opp vann, og hindrer lekkasje av vann under transport
- Overfør rogn til doble plastposer, maks 1 liter per pose. Fordel rogn flatt i posen for å gi flest mulig av rogn god tilgang til oksygen
- Snurp sammen posen, og blås den opp med litt oksygen. Steng med en elektrikerstrips.
- Legg posen(e) i rognkassen, og legg en perforert skuff med VÅT is på toppen. Maks 2 poser à 1 liter per kasse
- Legg på lokket, og forsegle kassen med kraftig tape

Husk at det er bedre å bruke flere kasser med mindre mengder rogn enn å pakke store mengder rogn i en kasse/holder.

Kontakt Ingrid Lein:

e-mail: ingrid.lein@nofima.no

Mobil: 934 19 441

5 Utstysrliste

I tabellen nedenfor er noe av utstyret som er nevnt i teksten listet opp med leverandører.

Vare	Leverandør	Varenr.
Gonadekvern	Cryogenetics	
SDM6 Fotometer	Cryogenetics	
AquaBoost® SpermCoat	Cryogenetics	
Plastbeger for melke	NordEngros	69923
Lokk til plastbeger for melke	NordEngros	69925
Celledyrkingsflaske 25 cm ² (40 ml)	Cryogenetics/VWR	734-2312
Engangspipetter i plast (Pasteur pipette, 5 ml)	VWR	612-1684
Mikroskopglass (Microscope slide)	VWR	631-1553
Dekkglass (Cover glass)	VWR	631-0122
Rognkasse	Vartdal Plast	
Skuffer til rognkasse	Vartdal Plast	

Cryogeneticas AS - telefon 909 26 600