

Technical University of Denmark



## Kunstig reproduktion af ål: Roe II og IIB

Tomkiewicz, Jonna; Jarlbæk, Henrik

*Publication date:*  
2008

*Document Version*  
Også kaldet Forlagets PDF

[Link back to DTU Orbit](#)

*Citation (APA):*  
Tomkiewicz, J., & Jarlbæk, H. (2008). Kunstig reproduktion af ål: Roe II og IIB. Institut for Akvatiske Ressourcer, Danmarks Tekniske Universitet. (DTU Aqua-rapport; Nr. 180-08).

## DTU Library

Technical Information Center of Denmark

---

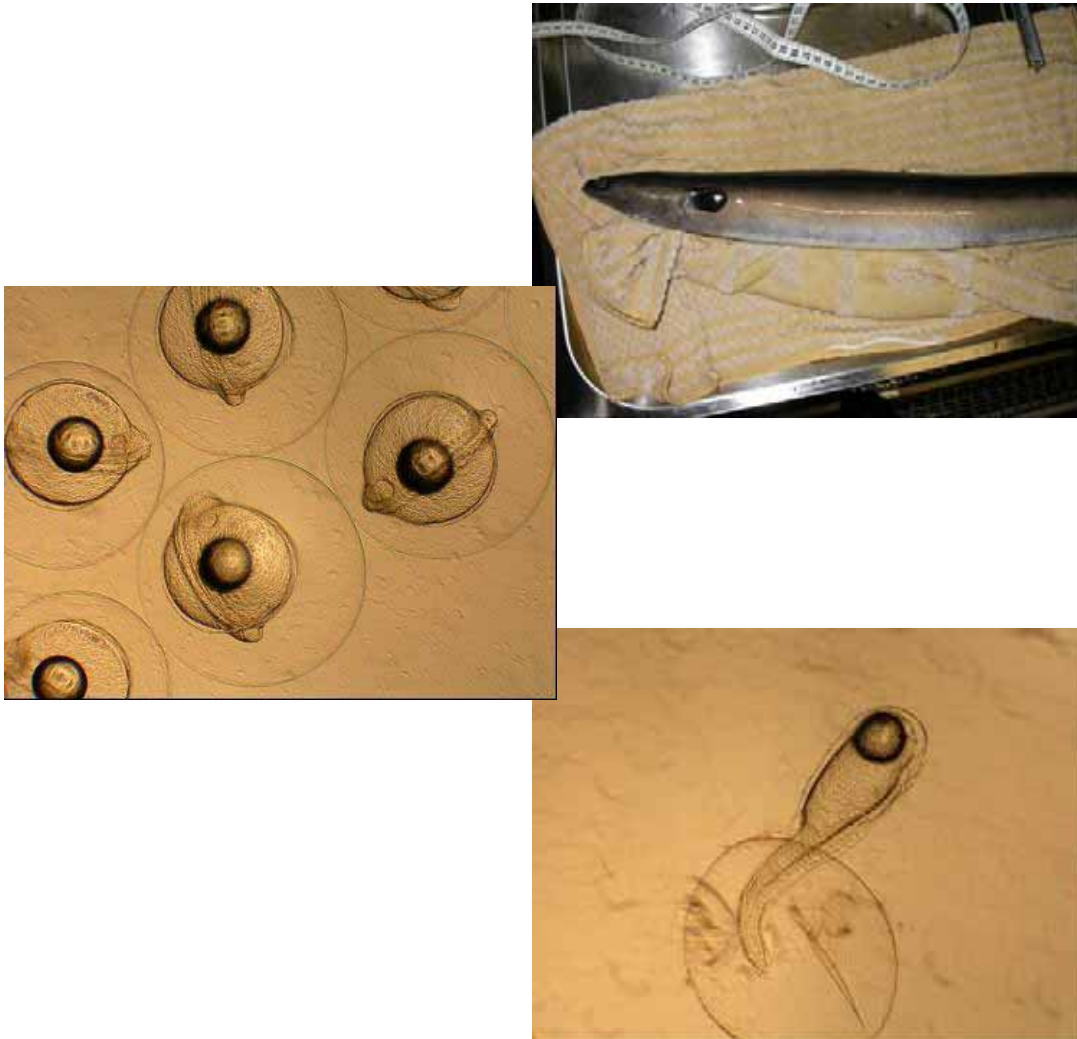
### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

# Kunstig Reproduktion af Ål: ROE II og IIB



Danmarks Tekniske Universitet, DTU Aqua  
&  
Københavns Universitet, KU-LIFE

## Resume

Der har gennem tiderne været gjort mange forsøg på at formere den europæiske ål (*Anguilla anguilla*) men med ringe succes. Problemet er, at ål i forbindelse med deres kønsmodning og gydevandring til Sargassohavet går i stå i udviklingen af deres kønsorganer, fordi der sker en hormonal hæmning i hjernen. Det er derfor nødvendigt at modne ålene kunstigt gennem hormonbehandling.

Denne rapport beskriver resultaterne af to sammenhængende projekter: Kunstig reproduktion af ål - fase II og IIB (ROE II og IIB). Projekterne er en videreførelse af et tidligere projekt ”Kunstig reproduktion af ål – Fase 1 (ROE I), som blev ledet af Københavns Universitet (2001-2003). I ROE I blev en metode udviklet for japanske ål testet, og det lykkedes at producere enkelte larver. Det var kun 2. gang i historien, at det lykkedes at frembringe larver af den europæiske ål.

Formålet med projektet, ROE II, var at etablere et egnet forsøgsanlæg og videreføre forsøgene med kunstig forplantning af den europæiske ål. I projektet skulle metoder til hormonel induktion af modning hos ål standardiseres, kvaliteten af kvaliteten af æg skulle forbedres og overlevelsen af fostre og larver øges. Et foder til moderfisk og forskellige metoder til vurdering af effekten af behandling skulle udvikles og afprøves.

Denne rapport beskriver de etablerede faciliteter til forsøg med modning af ål, inkubering af æg og larver, og de forskellige behandlinger i forsøgsrækken. Udviklingen af specialfoder til moderfiskene med justeret fedtsyresammensætning med henblik på at højne kvaliteten af æg og fostre er beskrevet. Forsøgsresultaterne tyder på, at foderet i høj grad har medvirket til at øge overlevelse af æg og larver i projektet.

I forsøgene, som strakte sig over næsten et år, lykkedes det adskillige gange at producere levedygtige fostre og larver. De sidste i ROE IIB, som forlængede projektperioden. De længstlevende larver blev 5 dage gamle, og slog dermed den hidtidige rekord frembragt af et russisk forskerhold i 1980'erne. Det var også en succes, at der gentagne gange blev opnået masseklækning af larver. Projektet bragte med disse resultater Danmark i en førerposition indenfor kunstig befrugtning af den europæiske ål.

Til dokumentation af ovarie- og ægudviklingen hos hunålene er der anvendt vævsanalyse, ligesom der er arbejdet med ultralyds- og CT-scanninger af ålene. Især ultralydsscanningerne kan forventes på sigt at finde anvendelse i et fremtidigt åleopdræt ved udvælgelse af egnede hunål. CT scanningerne giver sammen med analyser af fedtindhold og -sammensætning et klart billede af, hvordan protein og fedt oplagret muskulatur anvendes under modningen, hvor ålene ikke tager føde til sig.

Projekterne ROE II og IIB er finansieret af Fødevarer ministeriet via FIUF midlerne. Projekterne er et samarbejde mellem Danmarks Tekniske Universitet (DTU Aqua), Københavns Universitet (KU-LIFE), og erhvervet repræsenteret ved Billund Aquakulturservice, Dana Feed, Dansk Åleproducentforening og Lyksvad Fiskefarm. Forsøgene videreføres i projektet ”Kunstig befrugtning af ål” - ROE III (2007-2008) under Fødevarerministeriets Havforskningsprogram 2006.

## Abstract

Despite several attempts to breed European eels (*Anguilla anguilla*) in captivity, hatching of larvae has been achieved only on a few occasions. A main obstruction is an inhibition of the gonadal development at the onset of sexual maturation and initiation of the spawning migration towards the Sargasso Sea. Repeated hormonal treatment to produce gametes is an approach which successfully has been applied to produce viable eggs and larvae of the Japanese eel (*A. japonica*).

A pilot project entitled: Artificial reproduction of eels – Phase 1 (ROE I) led by University of Copenhagen (2001-2003) tested the applicability of the Japanese methodology to the European eel. The project succeeded in producing a few larvae. This was only the second time in history that larvae of the European eel were obtained in culture. This report presents the results of two subsequent projects on artificial reproduction of eels: ROE II and ROE IIB.

The aim of ROE II was to establish suitable rearing facilities and continue experiments to reproduce European eels in culture. Specific objectives included standardisation and enhancement of methods to induce maturation, improvement of egg quality and embryonic and prelarval survival, development of broodstock feed and methods to evaluate the efficacy of treatments.

This report describes the established facilities, experiments using different treatments to mature eels and incubation of embryos and prelarvae. The development and test of a broodstock feed with an adjusted lipid composition to enhance the egg and larval quality is included. The preliminary results indicate that the improved broodstock feed helps increasing viability of eggs and larvae.

The ROE II experimental series succeeded in producing viable embryos and larvae a number of times. The last experiments were conducted during an extension of the project, ROE IIB. The longest living larvae reached 5 days of age, which exceeded the record of 3.5 days set by a Russian research group in the 1980s. In addition, mass hatching was achieved several times during the experiments. These results brought Denmark in a front position within artificial reproduction of European eel.

Histological techniques were used to describe ovary and oocyte development in female eels sampled during experiments, and combined with ultrasound and CT-scanning to document morphological changes. Ultrasound scanning may prove to be a useful method in future female broodstock selection. CT-scanning combined with analyses of lipid content and composition will illustrate how protein and fat stored in the muscle are reallocated and used during the maturation period.

The projects ROE II and IIB were funded by the Danish Ministry of Food, Agriculture and Fisheries through the FIUF programme and represent a collaboration between the Technical University of Denmark (DTU Aqua), Copenhagen University (KU-LIFE), Billund Aquaculture Service, Dana Feed, the Danish Eel Producer’s Association and Lyksvad Fishfarm. The experiments are continued in the project: ROE III (2007-2008) funded by the Marine Research Program 2006 under the Ministry of Food.

## Forord

Denne rapport omhandler de to projekter ”Kunstig reproduktion af ål II og IIB” (ROE II og IIB). Projekterne har modtaget støtte fra Fødevarerministeriet og EU via FIUF-midlerne. Projektet ROE II blev gennemført i perioden 08.2005 – 09.2006, mens en forlængelse af projektet, ROE IIB, blev gennemført i perioden 09.2006 – 03.2007.

Projekterne er et samarbejde mellem Danmarks Tekniske Universitet, Institut for Aquatiske Ressourcer (DTU Aqua) (tidl. Danmarks Fiskeriundersøgelser, DFU), det Biovidenskabelige Fakultet ved Københavns Universitet (KU-LIFE) (tidl. Den Kgl. Veterinære og Landbohøjskole ), Billund Aquakulturservice (BA), Dana Feed (DF) Dansk Åleproducentforening (DÅP), og Lyksvad Fiskefarm (LF). I projektet deltog fra DTU Aqua: Jonna Tomkiewicz, Josianne Støttrup, Peter Munk og Henrik Jarlbæk, KU-LIFE: Eiliv Svalastoga, Fintan McEvoy og Lene Buelund, BA: Peter Lauesen, DF: Bjarne Olsen, DÅP: Christian Graver, og LF: Mogens Larsen.

Følgende personer og firmaer har desuden bidraget til gennemførelsen af projekterne:

Conny Sørensen, KU-LIFE	CT-scanninger
Inge Boetius, tidl. DFU	Pensioneret og passioneret åleforsker
Inge Holmberg, DTU Aqua	Fedtsyreanalyser
Inger Hornum, DTU Aqua	Dissektion af ål samt histologi-arbejde
Kirstine L. Underbjerg, Biologistud. KU	Dissektion af ål samt histologiarbejde
Lis Olesen Larsen, tidl. KU	Reproduktionsfysiologi og hormoner
Rikke H. Bucholtz, DTU Aqua	Dissektion af ål samt lysmikroskopi
Torben Jensen, Biologistud. KU	Dissektion af ål
Stine Kærulf Andersen, DTU Aqua	Hjælp til databearbejde
DSM Nutritional Products A/S	Sponsorat af fedtsyreproduktet VEVO-DAR

Denne rapport er udarbejdet til Direktoratet for FødevarerErhverv efter projektets afslutning. Forsidefotos C. Graver og P. Lauesen. Reference til denne rapport: Tomkiewicz, J. og Jarlbæk, H. (2008). Kunstig Reproduktion af Ål: ROE II og IIB. DTU Aqua Rapport, 180-08. DTU Aqua. Institut for Akvatiske Ressourcer. Danmarks Tekniske Universitet.

DTU Aqua, Charlottenlund, 2008

Redaktører

Jonna Tomkiewicz  
Projektleder

Henrik Jarlbæk  
Projektkoordinator

## Indholdsfortegnelse

<b>Kunstig Reproduktion af Ål:</b> .....	<b>1</b>
<b>Resume</b> .....	<b>2</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Forord</b> .....	<b>4</b>
<b>Indholdsfortegnelse</b> .....	<b>5</b>
<b>1 Introduktion til rapporten og dens opbygning</b> .....	<b>7</b>
<b>2 Indledning og projektbeskrivelse</b> .....	<b>8</b>
2.1 Formål .....	8
2.2 Baggrund og projektsammenhæng .....	8
2.2.1 Den europæiske ål og bestandsstatus.....	8
2.2.2 Projekt ”Kunstig reproduktion af ål - I” .....	9
2.2.3 Projekt ”Kunstig reproduktion af ål - II” .....	10
2.2.4 Projekt ”Kunstig reproduktion af ål – IIB”.....	11
2.3 Opstillede milepæle og forventede produkter .....	12
2.4 Projektets perspektiver .....	14
<b>3 Forsøgsfaciliteter</b> .....	<b>15</b>
3.1 Forsøgshal .....	15
3.2 Anlæg til stamfisk .....	16
3.3 Anlæg til produktion af kunstigt saltvand.....	16
3.4 Anlæg til inkubation af æg og kultur af larver.....	17
3.5 SRO (Styring, Regulering og Overvågning) .....	18
<b>4 Forsøgsopsætning</b> .....	<b>18</b>
4.1 Fysiske og kemiske parametre .....	18
4.2 Stamfisk.....	19
4.2.1 Valg af stamfisk .....	19
4.2.2 Selektion og fodring af moderfisk.....	19
4.2.3 Selektion af hanål.....	20
4.2.4 Tilvæning til saltvand .....	20
4.3 Forsøgsplan .....	20
<b>5 Forsøgsangang og -resultater</b> .....	<b>23</b>
5.1 Bedøvelse, mærkning og vejning.....	23
5.2 Injektion af modningshormoner .....	23
5.3 Hormonbehandling af hunål og produktion af æg.....	23
5.3.1 Modningshormonet SPE – dosering og frekvens .....	23
5.3.2 Vurdering af tidspunkt for slutmodning .....	24
5.3.3 Indgivelse af slutmodningshormon i hunål og produktion af æg.....	26
5.4 Hormonbehandling af hanål og produktion af sæd.....	26
5.4.1 Modningshormonet HCG – dosering og frekvens.....	26
5.4.2 Produktion af sæd .....	26
5.5 Befrugtning og fosterudvikling .....	27
5.5.1 Strygning, befrugtning, udsortering og inkubering.....	27
5.5.2 Befrugtningsforsøg med forskellige slags saltvand .....	28
5.5.3 Abnorm udvikling .....	30
5.6 Klækning og kultur af larver .....	31
5.6.1 Klækning.....	31
5.6.2 Blommesækklarver .....	33
<b>6 Befrugtningssucces, fosterudvikling og larveproduktion</b> .....	<b>34</b>
6.1 Forløb og succesrater for hunålene i forsøget .....	34
6.2 Relativ frekvens af befrugtninger, fostre og larver.....	35
<b>7 Morfologisk beskrivelse af de tidligste udviklingsstadier hos ålelarver</b> .....	<b>36</b>
<b>8 Udvikling af foder til moderfisk</b> .....	<b>38</b>
8.1 Baggrund.....	38

8.2	Screening af vilde og opdrættede ål.....	38
8.3	Specialfoderet og den ændrede fedtsyreprofil i moderfiskene.....	39
8.4	Resultater .....	39
8.4.1	Screening af standardfoderet .....	39
8.4.2	Screening af ålene.....	39
8.4.3	Specialfoder (JD-foder) .....	42
8.4.4	Optagelse af fedtsyrer i moderfiskene.....	42
8.4.5	Reallokering af fedtsyrer i hunålene under ægudviklingen .....	42
<b>9</b>	<b>Histologisk vurdering af æg- og ovarieudvikling.....</b>	<b>44</b>
<b>10</b>	<b>Ultralydsscanning støttet af CT-scanning til vurdering af ovarieudvikling.....</b>	<b>49</b>
10.1	Introduktion til ultralydsscanning af hunål .....	49
10.2	Materialer og metoder i forbindelse med ultralydsscanning.....	49
10.3	Introduktion til CT-scanning af hunål .....	50
10.4	Materialer og metoder i forbindelse med CT-scanning.....	50
10.5	Resultater vedr. ultralydsbestemmelse af hunålenes anatomi .....	51
10.6	Billedanalyse.....	54
<b>11</b>	<b>CT-scanning til vurdering af lipidreallokering under udvikling .....</b>	<b>57</b>
11.1	Introduktion til CT-scanning i forbindelse med analyse af fedtfordeling og – mobilisering. ....	57
<b>12</b>	<b>Afprøvning af mobilt udstyr til ultralydsscanning af ål på forsøgsanlægget ...</b>	<b>59</b>
<b>13</b>	<b>Konklusioner og fremtidsperspektiver.....</b>	<b>60</b>
<b>14</b>	<b>Formidling af resultater.....</b>	<b>63</b>
14.1	Præsentationer nationalt og internationalt .....	63
14.2	Publikation i internationale videnskabelige tidsskrifter .....	63
14.3	Populærvidenskabelige artikler, rapporter m.v.....	63
14.4	Posters.....	63
<b>15</b>	<b>Åleprojektets scrapbog.....</b>	<b>64</b>
<b>Bilag I: Indledende litteratursøgning om kunstig modning af ål.....</b>		<b>66</b>
	Taksonomi .....	66
	Reproduktionsstrategi.....	66
	Gydeområder .....	67
	Gydetidspunkt og -dybde .....	68
	Drift af leptocephaler og metamorfose .....	68
	Introduktion til hormoninteraktioner i fisk.....	69
	Hormoninteraktioner i fisk generelt.....	69
	Hormoninteraktioner i ål .....	71
	Modning af hanål .....	71
	Modning af hunål .....	71
	Japanske ål .....	72
	Europæiske ål .....	72
	Australiske ål.....	72
	Konklusion vedr. behandlingsmetoder beskrevet i litteraturen .....	73
	Blankål-hunner.....	73
	Blankål-hanner.....	73
	Modning og gydning.....	73
	Befrugtning .....	73
	Larveopdræt .....	73
<b>Bilag II: Review af viden om ultralydsscanning af fisk .....</b>		<b>74</b>
	Sex determination and maturational status.....	74
	Technical aspects.....	75
	Ultrasound in the assessment of body composition .....	75
<b>Bilag III: Anvendt litteratur .....</b>		<b>76</b>

## 1 Introduktion til rapporten og dens opbygning

Denne rapport omhandler de to projekter ”Kunstig reproduktion af ål II og IIB” (ROE II og IIB). Projekterne har modtaget støtte fra FIUF-midlerne, der administreres af Direktoratet for FødevareErhverv. Projektet ROE II er en opfølgning på pilotprojektet: *Kunstig reproduktion af ål (ROE I)* gennemført i perioden 2001-2003 under ledelse af Benedikte Pedersen, Marinbiologisk Laboratorium, Københavns Universitet. Projektet ROE II blev afviklet i perioden 08.2005 – 09.2006, mens en forlængelse af projektet, ROE IIB, blev gennemført i perioden 09.2006 – 03.2007. I 2006 bevilgede det Rådgivende Udvalg for Fødevareforskning (RUFF) midler til et efterfølgende projekt *Reproduktion af ål i kultur (ROE III)* fra ”Havforskningsprogrammet 2006”. ROE III gennemføres i perioden 04.2007 – 09.2008. Projekterne ROE II, IIB og III er ledet af seniorforsker Jonna Tomkiewicz, Danmarks Tekniske Universitet, Institut for Akvatiske Ressourcer (tidl. Danmarks Fiskeriundersøgelser). Rapporten er udarbejdet af projektkoordinator Henrik Jarlbæk og projektleder Jonna Tomkiewicz på baggrund af bidrag fra forskellige projektdeltagere. Rapporten er opdelt i kapitler der omhandler forskellige emner og milepæle:

Kapitel 2	Projektets forhistorie og indhold, projektgruppens sammensætning og milepæle. <i>Henrik Jarlbæk og Jonna Tomkiewicz.</i>
Kapitel 3	Opbygning af forsøgsanlæg. <i>Peter Lauesen, Christian Graver, Henrik Jarlbæk og Jonna Tomkiewicz.</i>
Kapitel 4	Forsøgsopsætning. <i>Peter Lauesen, Christian Graver, Henrik Jarlbæk og Jonna Tomkiewicz.</i>
Kapitel 5	Forløb og resultater af forsøg med hormonbehandling af ål. <i>Christian Graver, Peter Lauesen, Henrik Jarlbæk og Jonna Tomkiewicz.</i>
Kapitel 6	Befrugtning og klækning af ålelarver. <i>Christian Graver, Peter Lauesen, Henrik Jarlbæk og Jonna Tomkiewicz.</i>
Kapitel 7	Morfologisk beskrivelse af udviklingen fra det befrugtede æg og frem til den 5 døgn gamle larve. <i>Peter Munk og Jonna Tomkiewicz.</i>
Kapitel 8	Udvikling specialfoder til moderfisk og resultater. <i>Josianne Støttrup og Charlotte Jacobsen.</i>
Kapitel 9	Histologi til dokumentation af hunålenes udviklingsstadier. <i>Jonna Tomkiewicz.</i>
Kapitel 10	Anvendelse af ultralydsscanning og CT-scanning til vurdering af ovarieudvikling. <i>Fintan McEvoy, Lene Buelund og Eiliv Svalastoga.</i>
Kapitel 11	Anvendelse af CT-scanning til vurdering af energiallokering under ovarieudviklingen. <i>Lene Buelund, Fintan McEvoy og Eiliv Svalastoga.</i>
Kapitel 12	Anvendelse af mobilt udstyr til ultralydsscanning. <i>Fintan McEvoy, Lene Buelund, Henrik Jarlbæk og Jonna Tomkiewicz.</i>
Kapitel 13	Konklusioner og fremtidsperspektiver. <i>Jonna Tomkiewicz og Henrik Jarlbæk.</i>
Kapitel 14	Formidling af projektresultater – gennemførte og planlagte præsentationer og publikationer. <i>Jonna Tomkiewicz.</i>
Kapitel 15	Åleprojektets ”scrapbog”. <i>Henrik Jarlbæk.</i>



Bilag 1	Indledende litteratursøgning om kunstig reproduktion af ål med fokus på den europæiske ål. <i>Christian Graver og Peter Lauesen.</i>
Bilag 2	Litteraturgennemgang og resume af viden omkring ultralydsscanning af fisk. <i>Fintan McEvoy.</i>
Bilag 3	Referencer.

## 2 Indledning og projektbeskrivelse

Af *Henrik Jarlbæk og Jonna Tomkiewicz*

### 2.1 Formål

Det overordnede formål med projekterne ROE II og IIB var at videreudvikle de metoder, der blev anvendt i ROE I til kunstig reproduktion af den Europæiske ål (*Anguilla anguilla*), og forbedre de opnåede resultater. Følgende delmål var opstillet:

- At samle den viden og de erfaringer op, der blev genereret i ROE I, og sikre at informationen systematiseres, dokumenteres og gøres frit tilgængelig.
- At forbedre kvaliteten af æg og larver, der fremkommer efter kunstig modning og gonadeudvikling hos den europæiske ål.
- At implementere kendte histologiske metoder og ultralydsscanning, der dels på et tidligt stadie i den kunstige modningsproces kan indikere æggenes udvikling, og dels kan benyttes til at bestemme tidspunktet for slutmodningen af hunålene.

### 2.2 Baggrund og projektsammenhæng

#### 2.2.1 Den europæiske ål og bestandsstatus

Ålen er en af de meget få arter, der i akvakultur gennem årtier har været opdrættet, uden at det er lykkedes at have alle artens livsstadier i kultur. Åleopdræt har således altid været afhængig af individer fanget i naturen – enten som glasål eller som små gulål.

Ål kan i akvakultur opnå sammen modningsgrad som blankål i naturen, men de udvikler ikke deres kønsorganer yderligere, og der er ingen forplantning i fangenskab. Det har heller ikke umiddelbart været muligt at kopiere udviklingen hos de fritelevende ål, da der mangler kendskab til ynglende ål i naturen.

Det er karakteristisk for ålearter overalt, at blankålene trækker ud mod mere eller mindre specifikke, dybe områder i oceanerne, hvor de modner og gyder. Det er imidlertid ikke lykkedes at studere, fange eller analysere gydende ål, og hverken æg eller de tidligste stadier af de nyklækkede larver (blommesækklarver) kendes. Det vides heller ikke hvad larvernes ernæring udgøres af, når blommesækken er fordøjet.

Bestanden af den europæiske ål er gennem de seneste 20 – 30 år faldet drastisk. Fangster og anden registrering af glasål, der med Golfstrømmen føres fra Sargas-

sohavet til Europas kyster viser, at rekrutteringen nu er reduceret til ca. 1 % af niveauet i begyndelsen af 1980'erne. Årsagerne til denne nedgang i bestanden er mange og inkluderer vandkraftværker, afspærringer og opstemninger af vandløb, reduktion i antal og areal af vådområder, klimaændringer, forurening med miljøgifte (dioxin, PCB, mv.) der kan ophobes i ålenes fedtvæv, parasitter (svømmeblæreorm) og selvfølgelig overfiskning.

Ålen er en af de få arter, der fiskes og spises i flere livsstadier: glasål er en delikatesse i flere Middelhavslande, gulål og blankål fanges og konsumeres i en lang række lande. Udover fangst af glasål til direkte konsum fanges der i flere lande (primært Frankrig og England) glasål til videre opvækst i akvakultur eller til genudsætningsprogrammer. Størsteparten af de glasål, der fanges i Europa eksporteres til Asien (primært Kina).

### 2.2.2 Projekt ”Kunstig reproduktion af ål - I”

I 2001 bevilgede Direktoratet for FødevarerErhverv (DFFE) midler fra FIUF-programmet til forprojektet ”Kunstig reproduktion af ål - Fase I”, der fik akronymet ROE I, hvilket stod for *Reproduction Of Eel – Phase I*, og samtidig er *roe* det engelske ord for rogn. Bevillingen blev givet til Marinbiologisk Laboratorium, Københavns Universitet (KU) i samarbejde med Dana Feed A/S i Horsens.

Projektet, som blev ledet af Benedikte Pedersen, KU, havde til formål at undersøge, om man kunne overføre en metode udviklet til kunstig reproduktion af den japanske ål (*Anguilla japonica*) til den europæiske ål. Oprindeligt var der ansøgt om midler til et projekt, der også inkluderede fodring af larver; men DFFE bestemte sig for at faseopdele projektet således, at Fase 1 skulle demonstrere modning af ål samt befrugtning og klækning af æg og larver. DFFE meddelte samtidig, at såfremt de ønskede resultater blev opnået i Fase 1, så man gerne, at den ekspertise, der er funderet i Danmarks Fiskeriundersøgelser og Dansk Åleproducentforening, blev inddraget i det videre arbejde.

De mål, der blev sat for ROE I, blev i vid udstrækning nået, men den europæiske ål er vanskeligere at modne end den japanske ål. I projektet lykkedes det at modne såvel hanner som hunner, og der blev opnået befrugtninger med de producerede æg og sæd. Det lykkedes også at få fostre i nogle af æggene, og der blev klækket enkelte larver, som levede i nogle få dage.

Selv om resultaterne i ROE I på mange måder var lovende, var der også en del problemer i forløbet: kvaliteten af æggene var meget svingende, befrugtningssgraden var lav, og antallet af klækninger var meget ringe. Hvis man tager i betragtning, at ovariet hos en moden hun indeholder 500.000-1.000.000 æg, så er nogle få hundrede udsorterede, befrugtede æg og måske 1 klækket larve pr. 10 hunål stadig kun en begrænset succes.

### 2.2.3 Projekt ”Kunstig reproduktion af ål - II”

I den faglige afrapportering af ROE I til DFFE i 2003 konkluderede Benedikte Pedersen, KU, at det ikke var sandsynligt, at der kunne opnås yderligere positive resultater med basis i de afprøvede metoder. Denne vurdering var medlemmerne af Dansk Åleproducentforening ikke enige i, og i 2004 kontaktede foreningen Danmarks Fiskeriundersøgelser (DFU) med henblik på et nyt projekt. Intentionen var, at DFU i samarbejde med erhvervet skulle arbejde videre ud fra de erfaringer, der var opnået i ROE I. For at sikre en fundering i såvel forskningsverdenen som i det praktiske akvakulturerhverv etablerede DFU en projektgruppe med følgende sammensætning og kompetencer:

#### **Projektdeltagere og ekspertise i projektet:**

Danmarks Fiskeriundersøgelser (nu: Danmarks Tekniske Universitet, Institut for Akvatiske Ressourcer):

Jonna Tomkiewicz, seniorforsker (projektleder, fisks reproduktion, histologi).

Josianne Støttrup, seniorforsker (udvikling af foder til moderfisk og larver).

Peter Munk, seniorforsker (larvemorfologi).

Charlotte Jacobsen, seniorforsker (fedtsyreanalyser i relation til udvikling af foder og energiallokering).

Henrik Jarlbæk, projektkoordinator (tidl. deltager i ROE I, projektmanagement og -økonomi, ålefoder).

Det Biovidenskabelige Fakultet på Københavns Universitet (tidl. Den Kgl. Veterinære og Landbohøjskole):

Fintan McEvoy, lektor (ultralydsscanning).

Eiliv Svalastoga, professor (CT-scanning, energiallokering).

Lene Buelund, dyrlæge og ph.d.-studerende (billedanalyse og energiallokering).

Billund Aquakulturservice ApS:

Peter Lauesen, biolog, konsulent (kultur af larver og opdræt af marine fisk).

Dana Feed A/S:

Bjarne Hald Olsen, teknisk salgschef (tidl. leder af firmaets forskningscenter i Horsens og deltager i ROE I, ålefoder).

Dansk Åleproducentforening:

Chr. Graver, biolog og konsulent (åleopdræt i recirkuleringsanlæg, teknisk og biologisk ekspertise, dataregistrering).

Lyksvad Fiskefarm:

Mogens Larsen, åleopdrætter (udlejning af bygninger, vagtordning, leverandør af stamfisk).

I januar 2005 blev der indsendt en ansøgning til DFFE om støtte via FIUF-midlerne til projektet ROE II. I juni 2005 bevilgede DFFE det ansøgte beløb på 4.26 mio. kr. Projektet blev igangsat i august 2005, med planlagt afslutning medio september 2006. I projektets første 1,5 mdr. skulle de ansøgte forsøgsfaciliteter opbygges og der skulle gennemføres litteraturstudier. De efterfølgende 11 mdr. var afsat til forsøg med ål, mens den sidste måned skulle bruges til afrapportering.

#### 2.2.4 Projekt ”Kunstig reproduktion af ål – IIB”

Ca. 2/3 inde i projektfasen var der opnået særdeles gode resultater med modning af ålene samt efterfølgende klækning af larver, hunålene gød også æggene over flere gange med ugers interval. Disse resultater kombineret med at flere hunner havde endnu ikke havde gydt betød, at det ville være hensigtsmæssigt at fortsætte eksperimenterne udover den oprindeligt planlagte forsøgsperiode.

I forbindelse med ultralydsscanningerne var det konstateret, at metoden ikke er egnet til at identificere æg i slutmodningen, men derimod særdeles egnet til at følge ovarieudviklingen under den hormonale behandling. Dermed kan det undgås at hunner prøvetages og aflives i forsøg for at bestemme ovarieudvikling. Der blev i denne sammenhæng søgt om midler til en ny serie scanninger med henblik på at undersøge, om det ville være muligt i slutfasen udtage biopsier fra ovariet uden væsentlige gener for fiskene.

På KU-life var der udover de planlagte ultralydsscanninger også foretaget CT-scanninger af ålene. Disse scanninger ville projektgruppen gerne anvende til verifikation af specifikke strukturer og organer, der også var ultralydsscannet. Der blev derfor søgt om midler til at analysere udvalgte CT billedserier. Der blev samtidig søgt om midler til at gennemføre analyser af fedtsyre-sammensætningen i ovarier, indvoldsfedt og muskulatur fra hunner prøvetaget i løbet af ROE II i forbindelse med ultralyds- og CT-scanninger. Da ålene ikke tager føde til sig under modningsforløbet er det vigtigt at vide, hvilke fedtsyrer der allokeres fra muskulatur og fedtdepoter til ægproduktionen, og hvilke fedtsyrer, der anvendes til almindelig forbrænding. Analyserne ville sammen med CT-scanningerne vise energi-reallokeringen hos hunner med to forskellige behandlingstyper.

De nævnte ønsker om forlængelse forsøg og yderligere analyser blev skrevet sammen i en ansøgning til DFFE om et 6 måneders projekt ROE IIB (fra medio september 2006 til medio marts 2007). Ansøgningen havde et budget på 1,38 mio. kr., som blev bevilget

Da de to projekter har en naturlig sammenhæng med en fælles forsøgsserie, er denne rapport udarbejdet som en fælles afrapportering af projekterne ROE II og ROE IIB.

## 2.3 Opstillede milepæle og forventede produkter

Følgende milepæle og produkter var opstillet for projekterne ROE II og IIB:

### ROE II

- I. Litteraturgennemgang og populærvidenskabelig artikel vedr. reproduktion af ål: Der blev i starten af projektfasen afsat tid til at to af projektdeltagerne kunne gennemgå den tilgængelige viden indenfor reproduktion af ål, som grundlag for forbedrings- og udviklingsforslag. Der udarbejdes et resume samt en populærvidenskabelig artikel, der redegør for status på området kunstig reproduktion af ål med specielt fokus på den europæiske ål.
- II. Etablering af forsøgsanlæg: En forbedring af modningsproceduren og dermed kvaliteten af æg og larver forudsatte etablering af et professionelt anlæg. Der skulle derfor opbygges en række små recirkuleringsanlæg til stamfisk, samt faciliteter til inkubering af æg og kultur af larver. Konstruktionen af disse anlæg skulle ske på baggrund af erhvervsmæssige erfaringer med reproduktion af marine fisk og resultaterne opnået i ROE I.
- III. Udvikling af specialfoder til moderfisk fra opdræt: I projektperioden skulle der udvikles og testes et foder til kommende moderfisk, da standardfoderet til opdrætsfisk ikke forventedes at indeholde vigtige fedtsyrer i tilstrækkelig mængde til ægproduktionen. En analyse af fedtsyresammensætningen hos opdrættede og vildtlevende ål, samt i standardfoderet skulle derfor gennemføres, og der skulle formuleres et specialfoder til moderfisk.
- IV. Forbedring af vandkvalitet og sorteringsmetoder: En forbedring af kvaliteten af det vand, der benyttes til inkubering af æg og larver, var et fokus område. Bakterielle infektioner var et stort problem i ROE I og medvirkende til at kun meget få æg med fostre nåede frem til klækningsstadiet. Også sorteringsmetoder til at skille de levende æg, fostre og larver fra bundfald og urenheder skulle forbedres.
- V. Systematisering af protokoller: De æg og larver, der blev opnået i ROE I, fremkom på baggrund af varierende behandlinger af relativt få ål. Der var derfor behov for at gentage de potentielt mest interessante behandlingsprotokoller i en større, systematisk opsat forsøgsrække med flere ål. Dette skulle danne grundlag for åbne, systematiserede protokoller for modning af den europæiske ål, og den opnåede viden skulle gøres tilgængelig og reproducerbar.
- VI. Undersøgelse af ovarieudvikling ved hjælp af vævsanalyse (histologi): En serie prøvetagninger af hunner var planlagt til beskrivelse af udviklingen i ovariet gennem behandlingsforløbet. Vævsprøverne, som undersøges i mikroskop, viser forskelle i ægcellernes størrelse og udseende, som meget

præcist beskriver ægudvikling i ovariet og også de enkelte ægcellers udvikling. En histologisk beskrivelse af udviklingsforløbet er ikke tidligere udarbejdet for den europæiske ål. Metoden er meget anvendelig til sammenligning af udviklingen hos forskellige fisk og som dokumentation og test af andre metoder.

- VII.** Litteraturgennemgang og ultralydsscanning af fisk: Den histologiske metode er meget præcis, men samtidig tidskrævende og medfører at forsøgsfisk må ofres. Det var derfor planlagt at undersøge om ultralydsscanning kan anvendes som en skånsom og enkel metode til at følge udviklingen hos de enkelte hunål. Ultralydsscanning er tidligere anvendt i forbindelse kønsbestemmelse og ovarieudvikling hos andre fisk i akvakultur inkl. stør, torsk, laks og kuller. Der skulle udarbejdes et resume og en artikel om ultralydsscanning af fisk herunder udvikling af metoden med ultralydsscanning til arbejdet med de modnende ål.
- VIII.** Morfologisk beskrivelse af ålelarver: Succes med klækning af larver af den europæiske ål er kun beskrevet tidligere som resultatet af ROE I og i en serie videnskabelige artikler fra et russisk forskerteam. Midt i 1980’erne nåede de russiske forskere så langt, at de havde ålelarver, der blev 3,5 døgn gamle efter klækning. I ROE I blev den længstlevende ålelarve 2,5 døgn gammel. En morfologisk beskrivelse af foster- og larveudvikling skulle beskrives i den udstrækning, at nye udviklingstrin forekom.
- IX.** International kontakt: Det er ikke kun i Danmark, at der arbejdes med at udvikle metoder til kunstig reproduktion af den europæiske ål. Mange af de igangsatte projekter er strandet på grund af manglende succes. Der blev imidlertid opnået nogle interessante resultater i et hollandsk ledet EU-projekt med titlen ”Vurdering af reproduktions-kapaciteten hos europæisk ål” (EU-projektnavn EELREP nr. Q5RS-2001-01836). I projektet nåede forskere næsten lige så langt som i ROE I, dog uden at opnå klækning af larver. Til gengæld havde denne forskergruppe berørt mange andre aspekter af problematikken, der ikke var kapacitet til i det danske projekt. Det blev derfor planlagt, at der skulle tages kontakt til de hollandske forskere.

#### **ROE IIB**

- X.** Effekt af specialfoder på moderfisk, ægkvalitet og larveoverlevelse. Den forlængede projektperiode ville gøre det muligt at lade de sidste hold ål, som havde fået specialfoderet i længst tid, gennemføre modningen og levere æg til befrugtning. En analyse af fedtsyreprofilen i de hunner, der havde fået forbedret foder ville blive gennemført og sammenlignet med hunner på standardfoder.
- XI.** Fedtdeponering, anvendelse og fedtsyrefordeling i hunålene. I ROE II blev der udtaget og nedfrosset en mængde prøver af filet, ovarie og lever. Prø-

verne kan vise, hvordan fedtsyrer og energi anvendes under modningen, og om der er nok af de vigtige langkædede fedtsyrer. En laboratorieanalyse (FAME) af prøver udtaget fra ål i forskellige modningsstadier og fra forskellige behandlinger, var derfor planlagt. Data vil blive analyseret og resultaterne indgå i ROE III.

- XII.** Udvidet billedanalyse af CT scanninger til morfologisk beskrivelse af allokering af fedt under modningen: I forbindelse med ultralydsscanningerne på KU-Life gennemført under ROE II var ålene også blevet CT-scannet. I forbindelse med ROE IIB blev CT-scanningerne inddraget i en udvidet billedanalyse af CT-scanningerne, som kunne give informationer om allokeringen af fedt i hunålene i modningsforløbet.
- XIII.** Afprøvning af mobilt udstyr til ultralydsscanning af fiskene på forsøgsanlægget. Ultralydsscanningerne havde vist sig velegnede til at identificere ovariet på et tidligt tidspunkt i udviklingen. Det burde således være muligt at finde frem til de hunner, der havde de mest udviklede ovarier på begyndelsestidspunktet for behandlingen. Foreløbige resultater fra ROE II tydede på, at ovarieudviklingen på starttidspunktet skal have nået et vist niveau, for at hormonbehandlingen virker optimalt. Det transportable udstyr skulle også bruges i forbindelse med udtagningen af en biopsi fra ovariet til vurdering af ovariets udviklingsgrad senere i forløbet. Hvis metoden virkede, ville man kunne optimere valget af moderfisk samt følge udviklingen hos de samme fisk gennem et modningsforløb. Begge dele ville mindske omkostningerne i fremtidige forsøg med optimering af behandling og yngelproduktion ved at reducere antallet af fisk, den nødvendige hormonmængde og arbejdsindsatsen.

## **2.4 Projektets perspektiver**

Kunstig reproduktion af ål er en forudsætning for, at åleopdrætserhvervet kan blive selvforsynende med sættefisk til produktionen af ål. Etablering af metoder til modning og produktion af æg og larver vil både være til stor gavn for åleopdræt og samtidig være med til at lette presset på den vilde ålebestand. I projektet har målet været at opnå større succes med klækning af blommesækklarver. Hvis målet nås vil der forsat være mange opgaver at løse, idet larveudviklingen hos ål er dårlig kendt fra naturen og deres fødegrundlag er ukendt. Samtidig har larverne en lang og kompliceret udvikling før de bliver til glasål. Det er imidlertid lykkedes for japanerne at producere glasål om end i ringe mængde ved anvendelse af en metode svarende til den i ROE-projekterne anvendte metode. Der er derfor også meget, der taler for, at det gennem en målrettet indsats vil kunne lykkes for den europæiske ål.

### 3 Forsøgsfaciliteter

Af Christian Graver, Peter Lauesen, Henrik Jarlbæk og Jonna Tomkiewicz

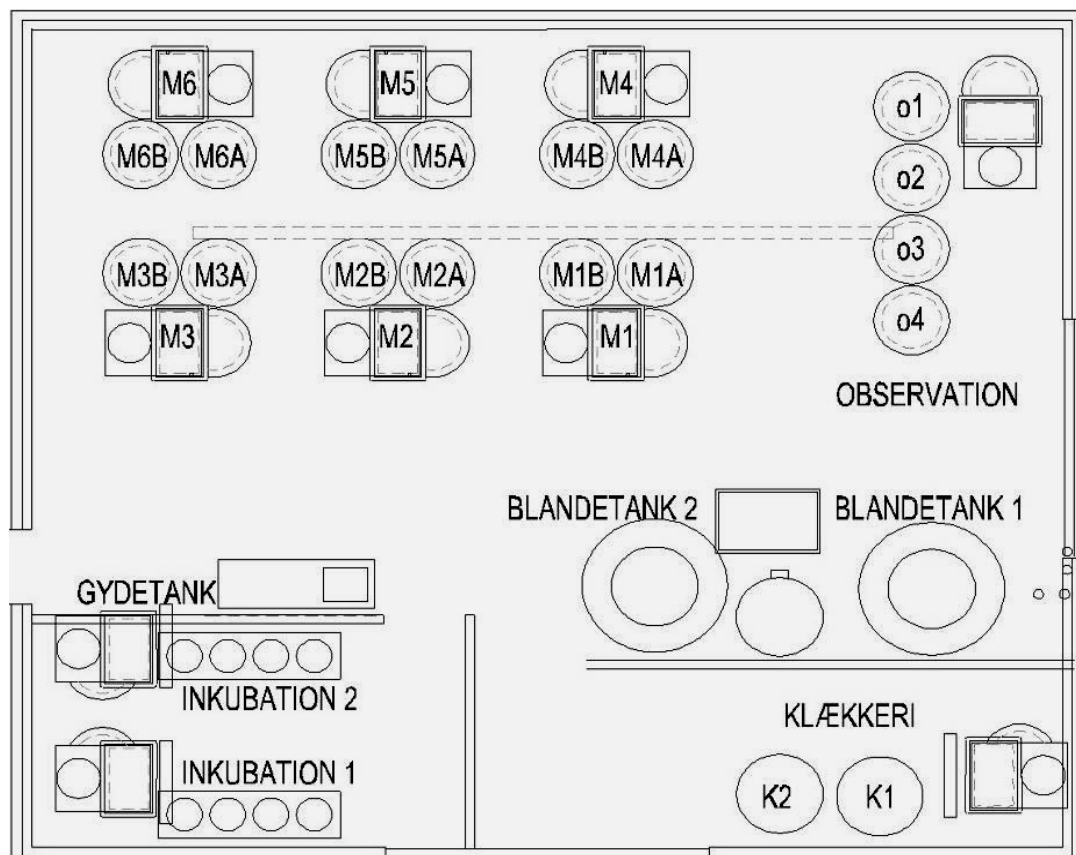
#### 3.1 Forsøgshal

Indledningsvis blev der opbygget faciliteter til forsøg med ål på en kommerciel fiskefarm. Forsøgshallen (Figur 3.1) har et areal på ca. 144 m<sup>2</sup>. Hallen blev til brug for projektet opdelt og indrettet i 3 afdelinger

- Et stort rum med modningsanlæg
  - 6 anlæg til stamfisk
  - 1 observationsanlæg
  - 1 gydekar
  - 1 anlæg til produktion af saltvand
- Et mindre rum med 2 inkubationsanlæg
- Et mindre rum med 1 anlæg til larver.

Alle kar blev forsynet med luftsten via et centralt trykluftssystem.

Alle 3 afsnit blev forsynet med luftkonditioneringsanlæg, der kunne sikre en ensartet temperatur. Alle vinduer og lysninger til det fri blev afblændet med sort plastic.

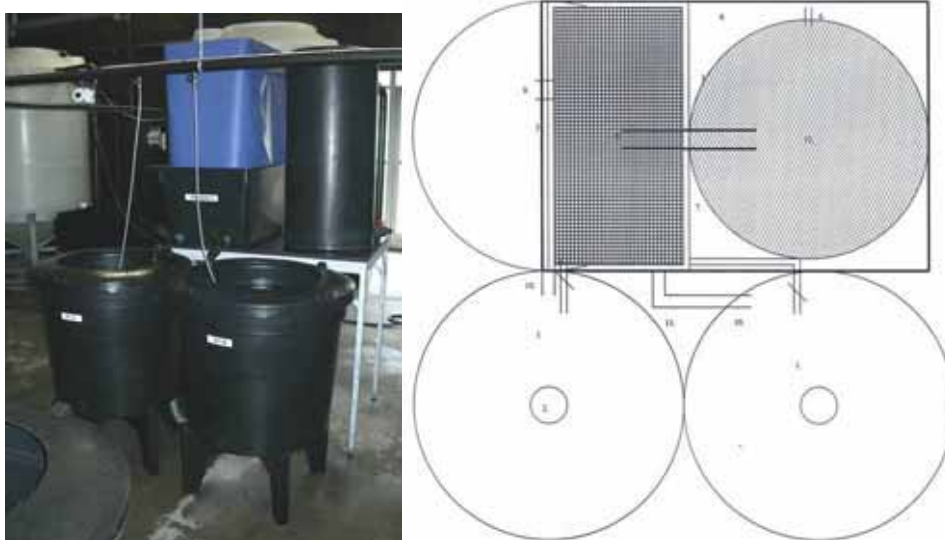


Figur 3.1. Oversigtstegning af forsøgshal. (Tegning: Billund Aquakulturservice)



### 3.2 Anlæg til stamfisk

Modningsanlæggene for stamfiskene (Figur 3.2) er opbygget ved hjælp af 3 stk. 300 liter regnvandstønder. Den ene fungerer som reservoir/pumpesump, mens de to andre fungerer som opbevaringskar for ålene. Over disse står et grusfilter og et rislefilter til fysisk og biologisk rensning af det recirkulerende vand. Observationsanlægget er identisk med opbevaringsanlæggene for stamfisk, men har 4 fiskekar.

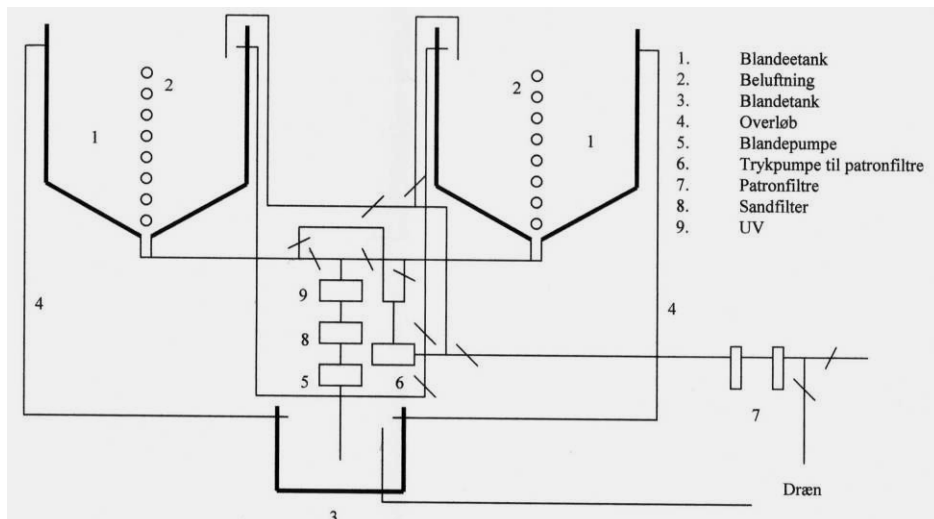


Figur 3.2. Modningsanlæg (Foto: C. Graver, tegning: Billund Aquakulturservice)

### 3.3 Anlæg til produktion af kunstigt saltvand

Blankålene gyder i havvand, men da saltvand fra havet ofte indeholder uønskede kim eller menneskeskabt kemisk forurening, blev det valgt at anvende kunstigt saltvand i anlæggene til moderfiskene.

Til opblanding af det kunstige salt med vand fra den lokale grundvandsboring, blev der bygget et opblandingsanlæg (Figur 3.3). Anlægget består af et blandekar og 2 stk. 4.500 liter tanke (polyethylen) samt filtre og pumper. I de store, gennemlufte reservoirtanke kan der ske en opblanding, men det vigtigste formål er, at vandet kan modne. Tankene er forbundet sådan, at der kan anvendes modnet saltvand fra én vilkårlig tank, mens der bliver opblandet i den anden. Saltvandet bliver kontinuert filtreret gennem sandfilter og UV belyst, inden det anvendes.



Figur 3.3. Anlæg til produktion af kunstigt saltvand. (Foto: C. Graver, tegning: Billedlund Aquakulturservice)

### 3.4 Anlæg til inkubation af æg og kultur af larver

Der blev konstrueret og opsat to separate inkubationsanlæg. Hvert anlæg består af et reservoir, sandfilter og pumpe, der er identisk med dem, der findes i anlæggene til stamfisken, blot er fiskekarrene byttet ud med 4 cylindriske inkubatorer (hvid polyethylen) med konisk bund. Hver inkubator har et rumindhold på 70 liter. Desuden kan alt vand til de 4 inkubatorer UV-belyses. Anlægget til larver har et reservoir, sandfilter og pumpe tilsvarende det, der findes til de øvrige anlæg og med 2 stk. 500 liter cylindriske larvekar (polyethylen) med konisk bund. Alt vand til de 2 larvekar kan UV-belyses.

### 3.5 SRO (Styring, Regulering og Overvågning)

I forsøgsanlægget overvåges pumperne via niveaualarm og trykluftssystemet via pressostat. Rumtemperaturen – og dermed også vandtemperaturen – overvåges med min/max alarm. Alle alarmer er tilsluttet et centralt alarmsystem på fiskefarmen og tilknyttet personalets vagttjeneste.

## 4 Forsøgsopsætning

*Af Christian Graver, Peter Lauesen, Henrik Jarlbæk og Jonna Tomkiewicz*

### 4.1 Fysiske og kemiske parametre

**Temperatur:** Vandtemperaturen i forsøgene blev reguleret via den omgivende lufttemperatur, der blev holdt på ca. 20 °C ved hjælp af et luftkonditionerings-anlæg.

**Lys:** Der blev ikke praktiseret et egentligt lysregime. Der var tændt lys ved normal arbejdstid ca. 08-16, og når der blev arbejdet i hallen.

**Salinitet:** Det kunstige saltvand blev opnået ved at opsalte ferskvand fra fiskefarmens vandboring med et kommercielt saltprodukt: *Tropic Marin* (Producent: Dr. Bierner GmbH, Tyskland). Der blev styret efter en saltholdighed i modningsforsøgene på 35 ‰. Koncentrationen blev målt med et refraktometer.

**pH:** pH-niveauet blev målt ca. 1 gang/dag med en bærbar pH-måler.

**Vandskifte:** Da der ikke blev fodret i modningsanlæggene, praktiseredes et vandskifte på ca. 1 % af det samlede volumen pr. dag. Vandkvaliteten blev kontrolleret ved måling af indholdet af ilt, ammoniak, nitrit og nitrat.

**Ilt:** Fiskekarrene blev besat med maksimalt 70 kg ål pr. m<sup>3</sup>, hvilket kombineret med, at der ikke blev fodret, samt at vandet i karrene blev cirkuleret ca. 2,4 gange i timen medførte, at iltindholdet ikke var en kritisk faktor. Iltniveauet målt ca. 1 gang/dag med en bærbar iltmåler (Oxyguard).

**Ammoniak– nitrit – nitrat:** Selv om der ikke fodres i karrene udskiller ålene ammoniak (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), der af bakterierne i de biologiske filtre omdannes til nitrit og nitrat. Recirkuleringsanlæggene blev styret efter følgende grænseværdier for indholdet af de nævnte stoffer: NH<sub>3</sub><sup>+</sup> < 0,01 mg/liter, NO<sub>2</sub> < 0,1 mg/liter og NO<sub>3</sub> < 10 mg/liter. For stofferne ammoniak (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), nitrit (NO<sub>2</sub>) og nitrat (NO<sub>3</sub>) var der lidt højere værdier i de første par uger indtil sandfiltrene, der også virkede som biologiske filtre, var kommet rigtigt i gang. Herefter var værdierne meget stabile. Vandets indhold af ammoniak, nitrit og nitrat blev målt og kontrollerede ved hjælp af testsæt (Aqua-merck 11117 og 11158 samt Merckoquant 10020).

**Forsøgsregime:** Nedenstående skema opsummerer de fysisk-kemiske forhold i forsøgsperioden.

	Normal	Afvigelse
Temperatur	20 °C	± 0,5 °C
Salinitet	35 ‰	± 2 ‰
Ilt	95 %	± 5 %
pH	8,2	± 0,1
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	<0,01 mg/l	Under opstart +0,01 mg/l
NO <sub>2</sub>	<0,1 mg/l	Under opstart +5,0 mg/l
NO <sub>3</sub>	<10 mg/l	Under opstart +50 mg/l

## 4.2 Stamfisk

### 4.2.1 Valg af stamfisk

I det tidligere projekt, ROE I, anvendtes indledningsvis vildål. Det viste sig imidlertid, at vildål ofte er smittebærere af forskellige sygdomme, der let kommer i udbrud, når ålene holdes i fangenskab og håndteres, og derved bliver stresspåvirkede. Desuden er vildål i meget stor udstrækning bærere af svømmeblæreormen *Anguillicola crassus*, der, ved en kraftig infektion med mange orme i den enkelte ål, kan nedsætte ålens immunforsvar og generelle kondition. I ROE I projektet blev der derfor senere i forløbet anvendt ål fra opdræt. I ROE II blev der derfor udelukkende anvendt ål fra opdræt på Lyksvad Fiskefarm.

Fiskene var ankommet som glasål (ca. 0,3 g/stk.) fra Frankrig. Ålene opdrættes i recirkuleret ferskvand en temperatur på ca. 25°C og fodres med kommercielt tørfoder (Dana Feed).

### 4.2.2 Selektion og fodring af moderfisk

I fiskefarmens anlæg blev der ved projektets start udvalgt et hold opdrætsfisk, der vejede mellem 600 og 700 g/stk. med henblik op opfodring til moderfisk. Moderfiskebestanden fik standard ålefoder (DanaFeed) i de første 5 mdr., hvorefter de overgik til det udviklede specialfoder (se kapitel 8)

I løbet af projektperioden blev der udtaget 13 hold moderfisk til forsøg med start fra december til marts. Til hvert hold moderfisk, blev de største ål udtaget i forbindelse med sortering (vægt min. 800g og max 1200g). Ved at udelukke at vælge de største fisk kunne der opnås rimelig sikkerhed for, at de sidste hold hunner havde spist af specialfoderet.

Der indgik 400 hunål i modningsforsøgene + 35 hunål som reference i forskellige delforsøg. Gennemsnitsvægten af hunålene ved start af modningsforsøgene var 920 gram med en standardafvigelse på 75 gram (N=400).

#### 4.2.3 Selektion af hanål

De udvalgte hanål stammede ligeledes fra opdræt på Lyksvad Fiskefarm. Hannerne når blankålstadiet ved en langt mindre størrelse end hunnerne. Erfaringsmæssigt er der en skæv kønsfordeling med ca. 80-85 % hanål i opdrætsanlæg. Der var således en stor chance for at finde hanål i opdrætsanlægget, især ved lav vægt. Hanålene i blev udvalgt ved en størrelse svarende til en vægt på 110-120 g. Det er vanskeligt at se forskel på hun- og hanål med samme størrelse, men hanålene blev udvalgt og separeret fra hunnerne ved at se på øje størrelse og form.

Der indgik i alt 48 hanål med en gennemsnitsvægt på 110 g i modningsforsøgene.

#### 4.2.4 Tilvæning til saltvand

De udvalgte stamfisk blev overført til et mindre anlæg på fiskefarmen, hvor fiskene gradvist blev tilvænnet til saltvand før overførsel til forsøgsanlægget. Til start var der ferskvand i karrene. Herefter blev saliniteten gradvist øget, så den efter 1-2 uger var oppe på 35 ‰.

Anlægget bestod af 2 stk. 20 fods kølecontainere med et samlet vandvolumen på 10 m<sup>3</sup>. Container A indeholdt et komplet vandbehandlingsanlæg med mikrosigte, opstrøms biologisk filter, rislefilter, UV-enhed og iltkegle for opiltning af vandet. Desuden fandtes udstyr til pH-regulering og beluftning. Container B indeholdt 4 stk. 1 x 1 meter kar. Containerne, der var forbundet med fleksible rørforbindelser, var endvidere forsynet med alarmer for afvigende niveauer i ilt, pH og flow.

### 4.3 Forsøgsplan

Modningsforsøgene var oprindelig opdelt i 15 hold. Disse blev reduceret til 13 hold, idet nogle hold blev lagt sammen for at opnå et større antal på nogle hold.

Nedenstående oversigt viser kombinationen af forskellige behandlinger, som blev gennemført med moderfiskene. Fiskene i modningsforsøgene indgik dels i en regelmæssig prøvetagning til undersøgelse af modningsforløbet og dels i befrugtningsforsøg. Prøvetagning havde fokus på specifikke behandlinger og hold, som således blev startet med et større antal fisk. Nogle af disse fisk nåede dog også at modne og blive afstrøget, før de blev prøvetaget og indgik således også i befrugtningsforsøgene.

	Hold	A	B	C	D	E	F	G	J	L	M	P 1	P 2	Q
<b>Prøvetagning</b>	Histologi+lipid			◆		◆		◆	◆		◆	◆	◆	◆
	Scanning							◆					◆	
<b>Specialfoder til- delt (i uger) før opsaltning</b>	Spec.foder 0	○	○	○	○	○	○	○						
	Spec.foder 5								○					
	Spec.foder 10									○	○			
	Spec.foder 14											○	○	○
<b>Saltvandsophold ved fuld salinitet (i uger) før hor- monbehandling- len startede</b>	Saltvand 1						○			○				
	Saltvand 2								○			○	○	
	Saltvand 3	○						○			○			○
	Saltvand 4		○											
	Saltvand 7			○										
	Saltvand 9				○									
	Saltvand 11					○								
<b>Hormon-dosering</b>	Fuld SPE	○	○	○	○	○		○			○			○
	½ SPE						○		○				○	
	Var. 3 SPE									○				
	Var. 2 SPE											○		
<b>Antal</b>	Hunål ved start	10	10	35	10	35	10	60	55	10	40	20	70	35

Tabel 4.1 Oversigt over behandlinger og hold til prøvetagning til scanning og histologi.

#### Prøvetagning (◆)

**Histologi+lipid:** Fra disse hold blev der regelmæssigt udtaget fisk til dissektion, og prøvetagning af ovarier til histologisk undersøgelse. Fra de samme fisk blev der taget prøver fra ovarier, fileteret og indvoldsfedt til analyse af fedtsyresammensætning i de forskellige organer og muskulatur gennem modningsforløbet.

**Scanning:** Fisk fra disse hold blev ultralyds- og CT-scannet før dissektionen. Der udtaget til prøver til histologi og fedtsyreanalyser som nævnt ovenfor.

#### Behandlinger (○)

##### Specialfoder

De fisk, der indgik i forsøgene, blev udtaget på forskellige tidspunkter, og de havde således enten fået standard ålefoder eller modtaget specialfoder i en kortere eller længere periode, før de blev udtaget til forsøg.

Spec.foder 0: Fisk på standard ålefoder.

Spec.foder 5: Fiskene havde modtaget specialfoder i 5 uger

Spec.foder 10: Fiskene var fodret med specialfoder i 10 uger.

Spec.foder 14: Fiskene var fodret med specialfoder i 14 uger.

##### Saltvandsophold før hormonbehandling

For den japanske ål henvises der i litteraturen til, at et saltvandsophold i en periode forud for hormonbehandlingen, skulle have en gunstig virkning på modnings-

forløbet. Forskellig varighed af saltvandsophold efter tilvænnning blev derfor afprøvet i forsøgene. Tabel 4.1 viser, hvor lang tid hunålene opholdt sig i saltvand før start af hormonbehandlingerne.

### Hormondosering

Ifølge den japanske metode til modning af ål, som blev anvendt i ROE I, injiceres hunålene med en hormonopløsning baseret på frysetørrede laksehypofyser (”Salmon pituitary extract”, forkortet SPE). Standard dosis i protokoller for den japanske ål er 25mg SPE per gram kropsvægt gennem hele forsøgsperioden. I forsøgs-serien i ROE II anvendtes såvel standard dosis, ½ dosis og stigende dosis.

Fuld SPE: Standard dosis som anvendt for den japanske ål.

½ SPE: Hunål modnet efter samme protokol som ”Fuld SPE” blot med den halve hormonmængde.

Var. 3 SPE: Hunål modnet med en variabel mængde hormon i 3 trin: ¼, ½ og fuld dosis.

Var. 2 SPE: Hunål modnet med en variabel mængde hormon i 2 trin: ½ og fuld dosis.

### Sammenligning af behandlinger

Med ovenstående forsøgsdesign kunne der med baggrund i de udtagne prøver – og i nogle tilfælde også scanninger - gennemføres følgende sammenligninger af behandlingerne:

Foder: Sammenligning af effekt af fodringsperiode med specialfoder til moderfisk før de blev overført til opsaltningsanlægget.

Hold G (0 uger) – Hold M (10 uger) – Hold Q (14 uger)

Saltvand: Sammenligning af længden af ophold i saltvand efter tilvænningsperioden og før hormonbehandlingens start.

Hold G (3 uger) – Hold C (7 uger) – Hold E (11 uger)

Hormon: Sammenligning af hormondosering.

Hold J og P2 fik ”½ SPE”, hvorimod de øvrige af de hold, hvorfra der blev udtaget fisk til histologi og fedtanalyser, alle fik ”Fuld SPE”.

## 5 Forsøgsgang og -resultater

Af Christian Graver, Peter Lauesen, Henrik Jarlbæk og Jonna Tomkiewicz

### 5.1 Bedøvelse, mærkning og vejning

Ålene blev kun bedøvet i forbindelse med start af hvert nyt hold, hvor der skulle tages en del mål på fiskene (længde, vægt, øjendiameter m.v.), og samtidig skulle de mærkes individuelt (se nedenfor). Som bedøvelsesmiddel blev der anvendt benzocain.

De første 2 hold ål blev individuelt mærket med eksterne plasticmærker, der var forankret i ålenes rygmuskulatur. Plasticmærkerne (FLOY® T-BAR ANCHOR fra FLOY TAG Inc. - ”floytags”), viste sig at være uegnede til mærkning af ål. Ålene gnubbede sig så meget op ad hinanden og karsiderne, at sårene efter indsættelsen af plasticmærket ikke ville hele. Desuden nippede fiskene i hinandens mærker.

De resterende ål blev mærket med *Passive Integrated Transponder tags* (PIT-tags) fra ASSA ABLOY ITG (tidligere Sokymat Industry & Logistics). Disse tags blev implanteret i rygmuskulaturen med en speciel kanyle og kunne efterfølgende aflæses elektronisk vha. en håndholdt scanner (fra Jojo Automasjon, Norge). Der var ikke nogen form for bivirkninger; sår eller andet ved brugen af PIT-tags.

Ved start og i forbindelse med den ugentlige hormoninjektion blev såvel hunål som hanål vejnet som en del af den almindelige sundhedskontrol og registrering af data.

### 5.2 Injektion af modningshormoner

Ålene blev, som nævnt ovenfor, ikke bedøvet i forbindelse med injektionerne. Fiskene blev lagt på et bord, hvor deres hoved blev dækket med et klæde, således at de faldt fuldstændig til ro og på ingen måde reagerede på injektionen.

Fiskene – både hunner og hanner – blev ved forsøgsrækkens start (Hold A+B) injiceret med hormon intraperitonalt (i bughulen), da det var den metode, der blev anvendt i ROE I. Metoden blev derefter ændret til injektionerne foretaget intramuskulært i rygmuskulaturen. Denne metode blev anvendt i EU-projektet EELREP. Metoden havde den fordel, at ålene var roligere, når de lå på bugen, og der var umiddelbart ingen ændring i effekten af hormonet.

### 5.3 Hormonbehandling af hunål og produktion af æg

#### 5.3.1 Modningshormonet SPE – dosering og frekvens

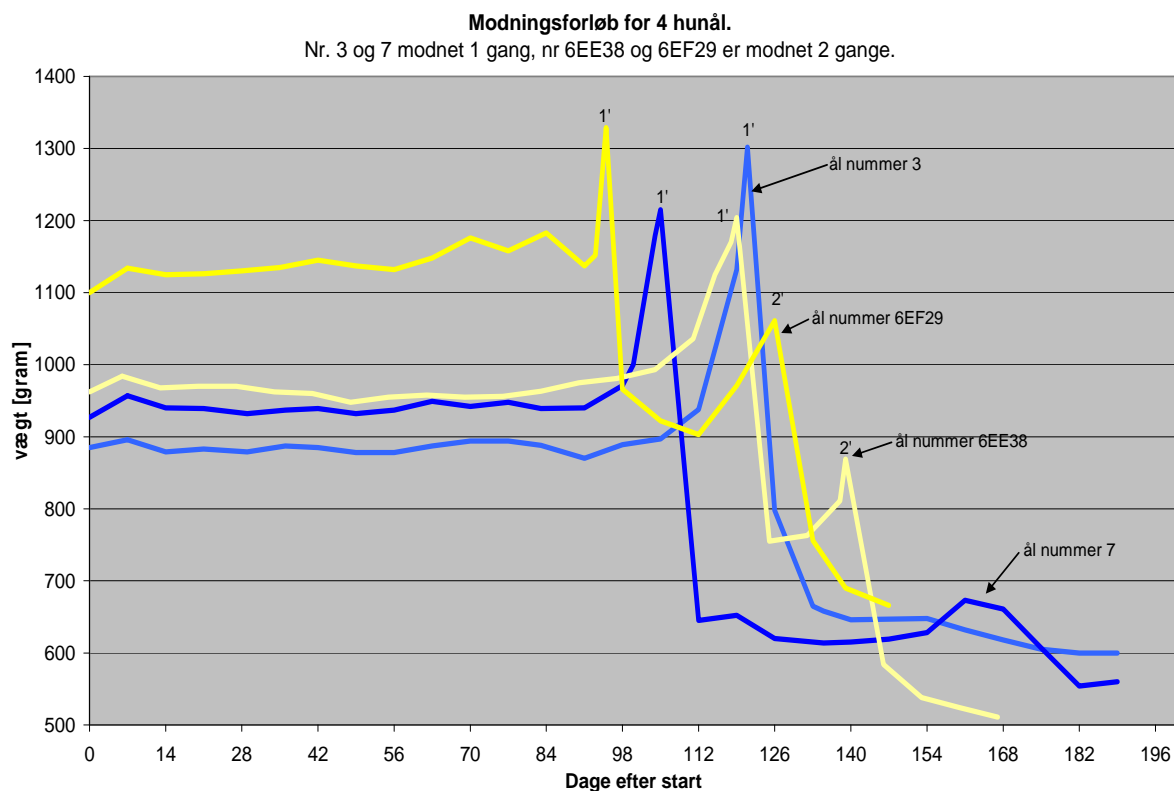
Da SPE er et hypofyse-ekstrakt og ikke et kemisk fremstillet produkt, kan forskellige partier ikke altid forventes at have samme kvalitet og dermed virkning fra leverance til leverance. For at minimere variationerne blev der for alle forsøgsserier i ROE II anvendt SPE med samme produktionsnummer.



Hormonerne i SPE blev udtrukket på følgende måde: hypofysepulveret blev homogeniseret i isotonisk saltvand. Homogenatet blev herefter centrifugeret ved 3.500 omdrejninger/minut i 20 minutter; hvorefter supernatanten (den flydende ikke-bundfældede del) blev anvendt til injektion som et SPE-ekstrakt. Der blev anvendt en dosis på enten 25 mg, 12.5 mg eller 6.25 mg SPE-ekstrakt pr. kilo kropsvægt svarende til fuld dosis, ½ dosis eller ¼ dosis i forsøgsdesignet.

### 5.3.2 Vurdering af tidspunkt for slutmodning

Efter et vist antal behandlinger, ses en stigning i vægten hos de hunner, der responderer på behandlingen (Figur 5.1). Det er et tegn på, at de mest udviklede æg er ved at hydrere, dvs. at der optages vand, hvorved æggene svulmer op og bliver klare. Da hunnerne ikke spontant gennemgår en ægløsning, skal der indgives slutmodningshormon på dette tidspunkt, for at sikre at æggene frigives, ellers sker der en overmodning med tab af befrugtningedygtighed. Ålene blev også palperet (befølt) på bugen. Hvis bugen er blød, er det tegn på, at ovarierne, og dermed æggene er i gang med at svulme op.

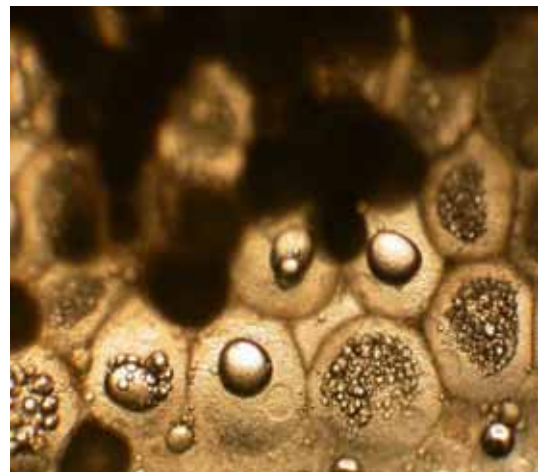


Figur 5.1: Eksempel på vægtændringer hos 4 hunål. To af fiskene kunne stryges én gang, mens de 2 andre øgede vægten igen efter første stryging, og kunne stryges to gange. Bemærk, at ål nummer 7, der havde en vægtstigning hen imod dag 160, alligevel ikke gennemførte den 2. modning.



Figur 5.2 Udtagning af biopsi fra ovariet (foto: C. Graver)

Under mikroskop kan kvaliteten af æggene vurderes ud fra en skala fra 1-6 udviklet af Arjan Palstra under EELREP-projektet (Palstra 2004). På baggrund af æggenes udseende vurderes det, hvornår præcist slutmodningshormonet skal indgives.



Figur 5.3 Biopsier fra 2 fisk. Til venstre: En fisk, der har fået fuld dosis SPE. Bemærk, at oliedråber er begyndt at flyde sammen og cellekernen er på vej ud til cellemembranen. Til højre: En fisk på samme stadie, blot har den fået ½ dosis SPE. Her ses at oliedråberne i flere celler er smeltet sammen til én (Foto: P. Laesen).

Biopsier blev mikroskoperet ved 40 gangs forstørrelse (Figur 5.3). Der blev foretaget en vurdering af cellekernens placering i ægget, da kernen begynder en vandring ud til cellens periferi, og oliedråberne begynder at løbe sammen i den sidste tid in-

den den endelige modning. Der fandtes mange stadier af ægudvikling i de enkelte biopsier, så vurderingen af hvilke æg, der skulle sættes på, eller om ålen skulle vente yderligere nogle dage/timer, var meget individuel. Det lykkedes ikke i projektet at finde en objektiv parameter til vurdering af den samlede status for den enkelte ål.

### **5.3.3 Indgivelse af slutmodningshormon i hunål og produktion af æg**

Når det blev vurderet, at ægstadierne var på det rette udviklingstrin, blev slutmodningen iværksat ved at indgive en ekstra SPE indsprøjtning og hormonet DHP (17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one). Dette er sammen procedure, som anvendes for den japanske ål. I dette projekt blev der anvendt 200  $\mu$ g DHP pr. hun. Hormonet blev indgivet ved injektion fordelt over flere forskellige steder gennem hunnens bug og direkte i ovariet. Æggene stryges efter ca. 12 timer.

I projektet var der også nogle ål, der gød spontant, men det viste sig svært at få noget ud af disse spontangydte æg.

## **5.4 Hormonbehandling af hanål og produktion af sæd**

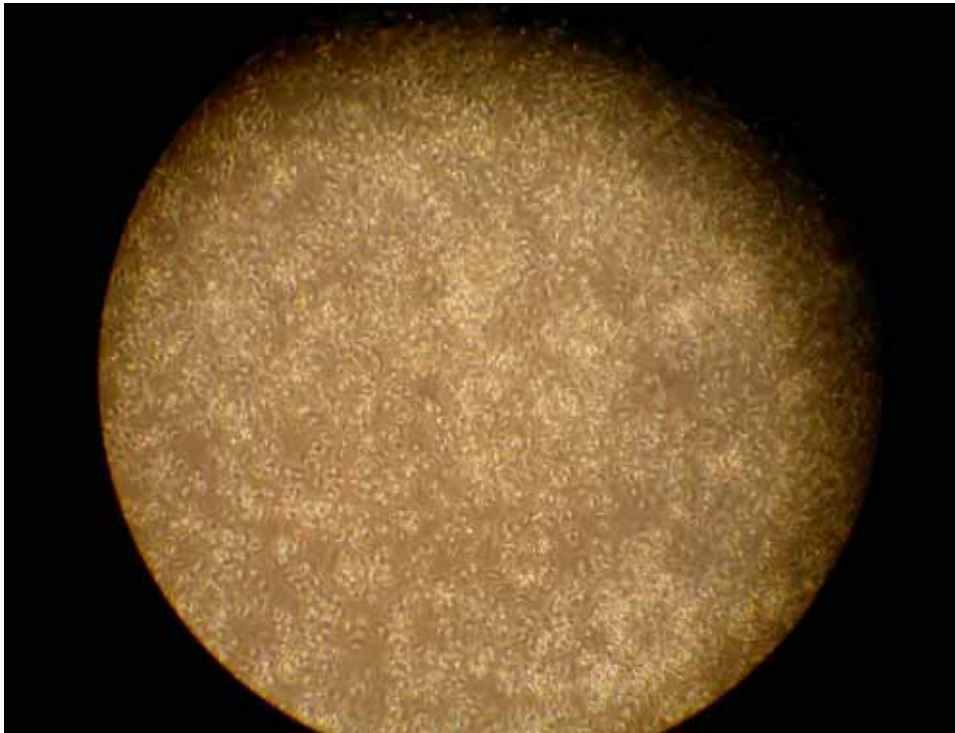
### **5.4.1 Modningshormonet HCG – dosering og frekvens**

Hanål blev udtaget flere gange i forsøgsperioden, så der efter 8 – 10 uger hele tiden var en ny gruppe af modne hanner. Alle hanålene fik én gang om ugen HCG (Human Chorion Gonadotropin). Hormonet, som er i pulverform, blev opløst i isotonisk saltvand og var herefter klar til injektion. Hver han fik ved den ugentlige injektion 200 IU HCG.

### **5.4.2 Produktion af sæd**

Første tegn på sædproduktion sås efter sjette injektion af HCG. Mængden af sæd og bevægeligheden hos sædcellerne var dog meget ringe. Efter ottende injektion forekom sædproduktion hos alle responderende individer. På dette tidspunkt var sædcellernes bevægelighed god. Produktion af sæd hos det enkelte individ kunne holde sig i op til 3 måneder, herefter blev sæden gradvis tyndere og produktionen aftog. I sådanne tilfælde blev ålen kasseret.

Den ålesæd, der blev dannet og anvendt i projektperioden, havde en meget kort periode, hvor aktiviteten var høj. Typisk toppede bevægeligheden af sædcellerne ved eksponering til saltvand efter 5 - 10 sek. Herefter faldt bevægeligheden hurtigt, og efter 30 sekunder var cellerne ikke aktive. Faldet i bevægelighed tilskrives i litteraturen tabet af kaliumioner ( $K^+$ ) fra sædcellerne til det omgivne miljø.



Figur 5.4 Ålesæd (Foto: P. Lauesen)

## **5.5 Befrugtning og fosterudvikling**

### **5.5.1 Strygning, befrugtning, udsortering og inkubering**

Ca. 12 timer efter injektion af slutmodningshormonet var hunnen klar til at blive strøget. Her var det igen et meget subjektivt skøn over, hvornår det ”rette tidspunkt” var opnået, og man måtte palpere sig frem. Blev æggene strøget for tidligt, var de ikke tilstrækkeligt udviklede, hvorimod de var overmodne, hvis de blev strøget for sent. Tidsrummet, hvori der var størst chance for vellykket strygning, blev vurderet til at være så snævert som 30 minutter.

Når strygningen skulle foregå, blev hunålen forsigtigt tørret af, så der ikke dryppede vand ned i æggene. Æggene blev strøget ned i en tør bakke, der forinden var desinficeret med sprit.

På forhånd var der udvalgt 3 – 4 hanner med god sædproduktion. Hannerne blev ligeledes duppet forsigtig af, og sæd fra dem alle blev strøget ned over æggene. Bakken blev forsigtigt vippet frem og tilbage for at fordele sæden mellem æggene.

Efter ca. 5 minutter overførtes bakkens indhold til en spand med i fin-filtreret, UV-behandlet naturligt havvand (20°C). Efter max en time overførtes æggene til bærglas med tempereret havvand og ubefrugtede/døde æg blev kasseret. Herefter blev æggene inkuberet ved 20°C med regelmæssig omrøring og vandskifte. Fosterudviklingen tog ca. 2 døgn (se næste kapitel, 5.5.2).

## 5.5.2 Befrugtningsforsøg med forskellige slags saltvand

Befrugtningsforsøgene i nærværende projekt kan deles i 4 overordnede grupper:

- Befrugtning og fosterudvikling i kunstigt saltvand
- Befrugtning og fosterudvikling i naturligt havvand
- Befrugtning og fosterudvikling i naturligt havvand med tilsætning af KCl
- Befrugtning og fosterudvikling i naturligt havvand med tilsætning af KCl og progesteron

### Befrugtning og fosterudvikling i kunstigt saltvand

Der blev ved projektets begyndelse udført befrugtninger i kunstigt saltvand med en salinitet på 35 promille. For en del ægs vedkommende blev der opnået befrugtning, men skallen på de befrugtede æg forblev blød igennem hele fosterudviklingen samtidig med, at æggene bibeholdt deres oprindelige størrelse på ca. 1 mm.



Figur 5.5 Udvikling af æg i de første timer efter befrugtningen. Den første deling sker normalt efter 2 timer. Kimsken dannes efter 10 - 15 timer. (Foto: C. Graver)

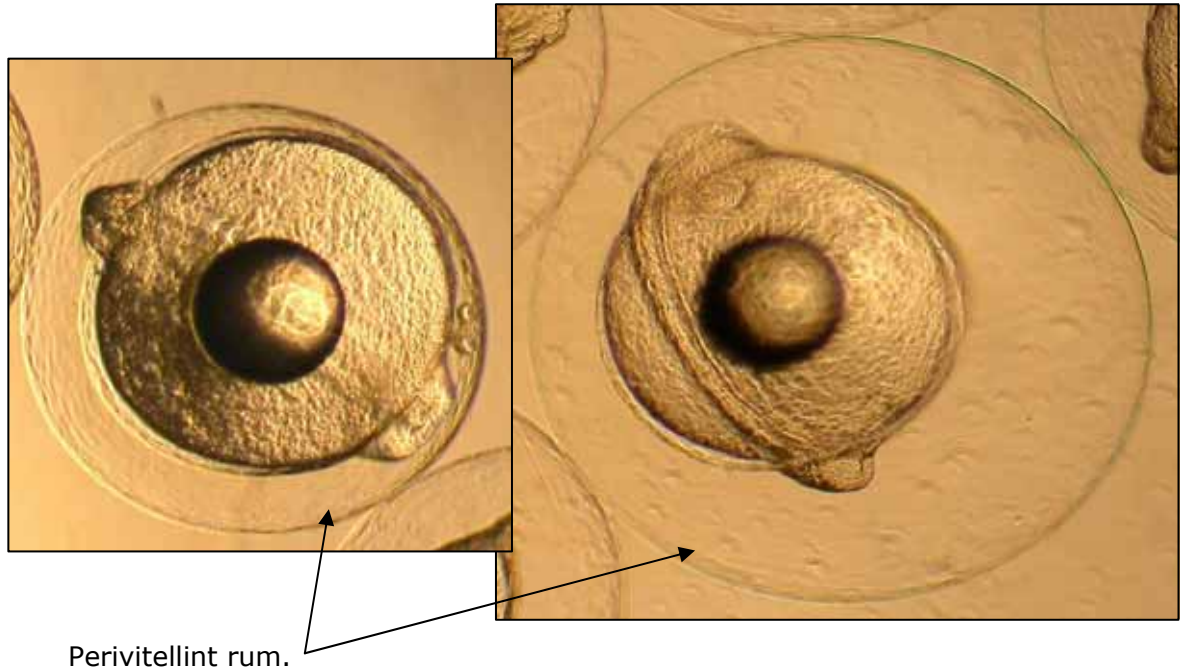
Ved sammenligning med billeder af æg fra den japanske ål, blev det klart, at disse æg, ligesom æg produceret i ROE I, manglede et veludviklet perivitellint rum. Det perivitelline rum udgøres af det volumen, der findes mellem selve æggets indre overflade og æggeskallen. Hvis det perivitelline rum udvikles korrekt, sker dette i forbindelse med befrugtningen, hvor ægget optager vand fra omgivelserne og svulmer fra 0,9 – 1,1 mm til ca. 1,5 mm i diameter. I den samme proces hærder skallen og fosteret får mere plads til den efterfølgende udvikling.

### Befrugtning og fosterudvikling i havvand

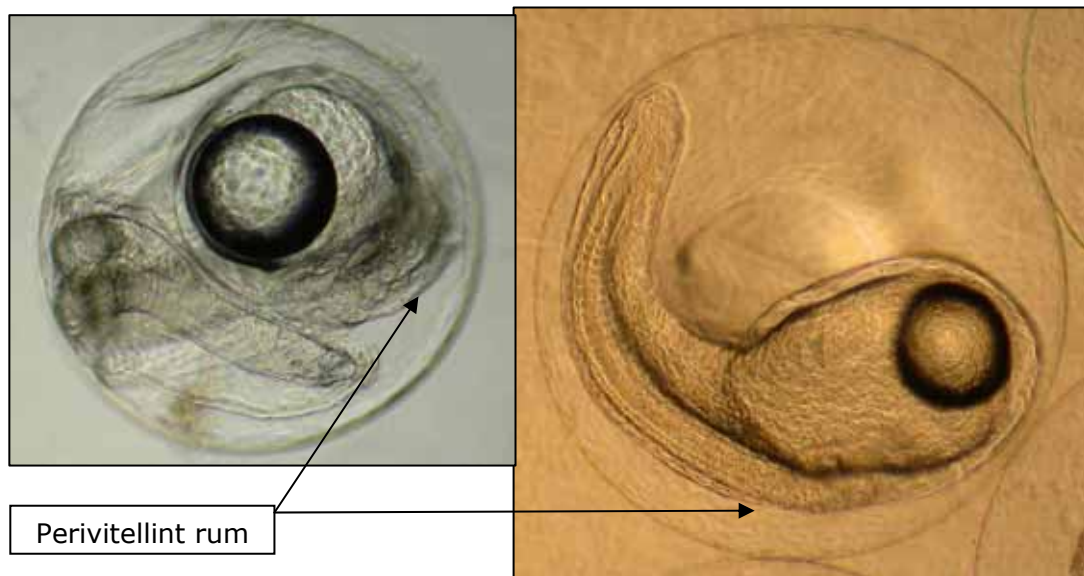
Problemet med manglende perivitellint rum blev løst ved anvendelse af naturligt havvand under befrugtningen og den senere inkubation af æg/fostre. Identifikationen af sammenhængen mellem vandkvaliteten og det perivitellint rum gjorde det muligt senere i forsøgsrækken at klække større mængder af åleæg. Et veludviklet perivitelline rum i æg er kendt fra andre ålearter. Det er påvist, at dannelsen af det



perivitellint rum er afhængig af mængden af calcium i vandet. Forsøg med befrugtning af æg i kunstigt saltvand tilsat ekstra calcium medførte imidlertid ingen ændring i udviklingen for ålene, der indgik i nærværende projekt.



Figur 5.6 36 timer gamle ålefostre med meget forskelligt perivitellint rum. (Foto: C. Graver, P. Lauesen)



Figur 5.7. 46 timer gamle ålefostre (lige før klækning) med meget forskelligt perivitellint rum. Venstre: Æg befrugtet i kunstigt saltvand. Højre: Æg befrugtet i havvand. (Foto: C. Graver, P. Lauesen)

### **Befrugtning og fosterudvikling i havvand med tilsætning af KCl**

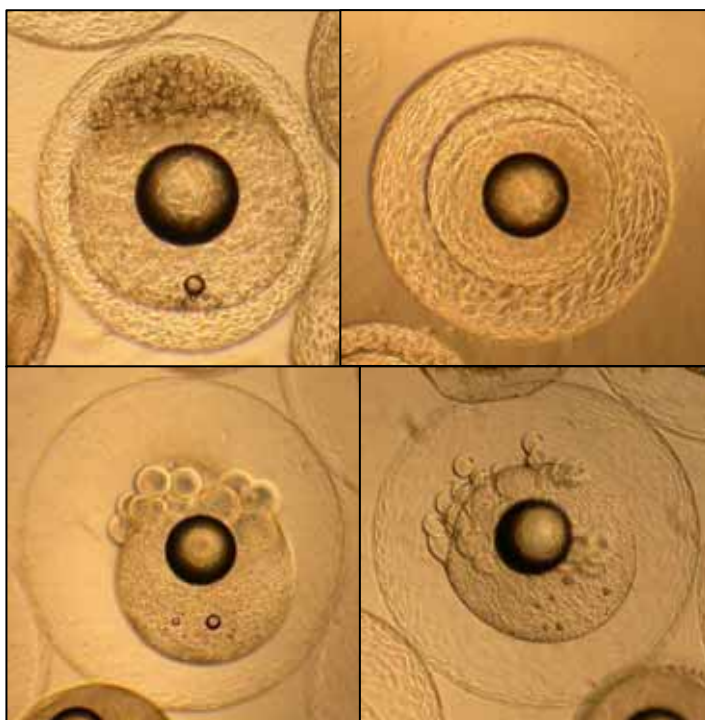
Da befrugtningssuccesen var meget lav, og i særdeleshed svingende også i saltvand, blev også andre forbedringer forsøgt. Der blev arbejdet med at forøge varigheden af sædcellernes bevægelighed, og med at optimere selve befrugtningen af æggene. For at øge sædens bevægelighed blev der tilsat  $K^+$ , hvorved varigheden af sædcellernes bevægelighed kunne forlænges til over 1 min. Denne metode blev efterfølgende anvendt i forsøgene.

### **Befrugtning og fosterudvikling i havvand med tilsætning af KCl og progesteron**

Tilsætning af progesteron sammen med kalium blev ligeledes forsøgt. Progesteron anvendes ved in vivo befrugtning af æg fra pattedyr, med det formål at øge befrugtningssuccesen. Der blev derfor fremstillet en opløsning af 1 liter naturligt, filtreret havvand, tempereret til  $20^{\circ}\text{C}$  og tilsat 1,13 gram kalium klorid samt 2 mg progesteron opløst i en smule albumin. Der var imidlertid ingen umiddelbar effekt af progesterontilsætningen på befrugtningssuccesen, og det blev ikke anvendt i forsøgene efterfølgende.

### **5.5.3 Abnorm udvikling**

Det sås ofte, at æggene kunne befrugtes og gennemløbe de indledende delinger, hvorefter celledelingen enten gik i stå eller udviklede sig ukontrolleret. I flere succesfulde befrugtninger sås abnorm udvikling af cellerne efter 16 – 32 celle stadiet (se nedenstående Figur 5.8). Der var ingen umiddelbar sammenhæng mellem hormonbehandling og befrugtningssuccesen, og forekomsten af de abnorme celledelinger.



Figur 5.8 Øverste række: Normal udvikling af kimske i æg befrugtet i kunstigt saltvand. Nederste række: Anormal udvikling hos æg befrugtet i havvand. (Foto. C. Graver, P. Lauesen)

## 5.6 Klækning og kultur af larver

### 5.6.1 Klækning

Ved den sunde udvikling af fostre klækkede hovedparten af larverne efter 48 – 54 timer ved en temperatur på 20 – 20,5 grader C. Kort før klækningen begyndte larverne at bevæge sig i æggene. Der kunne på dette tidspunkt ikke observeres hjerteslag. Hjerteslag blev først registreret efter, at larverne havde forladt æggene. Efter klækningen svømmede larverne ud af æggene og lå stille på bunden af opbevaringsglasset, eller de befandt sig frit i vandet, hvor de hang som et komma (se Figur 5.9). Hvis de blev forstyrret, eller de rørte ved hinanden, forsøgte de at undvige. Larverne er transparente og kunne primært ses pga. den store oliedråbe fortil i blommesækken og senere på en mørk pigmentering i halen. På grund af bakteriel vækst, der var fremmet af døde larver, var det nødvendigt at skifte vandet hyppigt. Dette vandskifte var meget vanskeligt, da larverne som nævnt var næsten usynlige, og de befandt sig i hele vandsøjlen, hvor de hang med oliedråben opad.

Der forekom 2 hold æg, hvor der klækkede meget store mængder æg. I det ene hold (04-05-2006) klækkede op mod 10.000 larver; den ældste larve fra dette hold levede i 3½ døgn efter klækning. I det andet hold (31-07-2006) klækkede ca. 3.000 larver. Desuden var der 3 hold, hvor der klækkede mellem 100 – 1.000 larver og flere hold, hvor færre larver blev klækket, se nedenstående tabel. Den længst levende larve blev 5 døgn og stammede fra et mindre hold larver. Der var ikke nogen umiddelbar sammenhæng mellem klækningens succes, og hvor længe larverne levede.

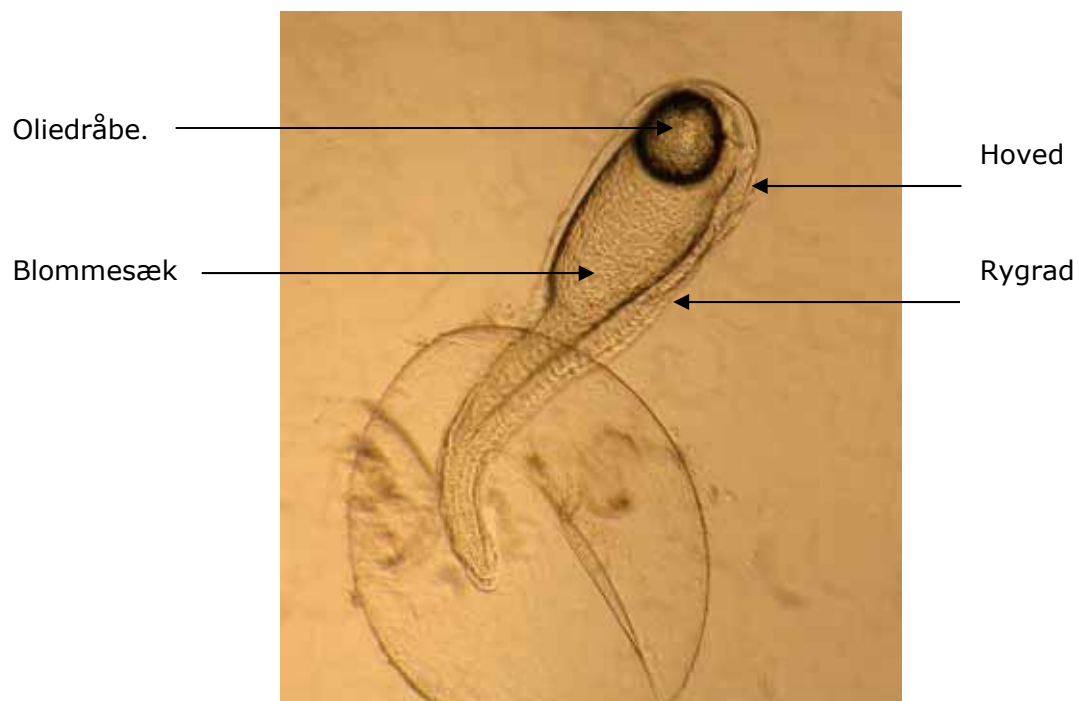
Antal larver	Antal hunner
1	1
1 – 10	5
10 – 100	7
100 – 1000	3
> 1000	2
I alt	18

Tabel 5.1. Relativ mængden af larver klækket for hver af de 18 hunner, der fik larver.





Figur 5.9 Nyklækkede ålelarver og uklækkede æg. (Foto: C. Graver)



Figur 5.10 Nyklækket ålelarve. (Foto: P. Lauesen)

### 5.6.2 Blommesækklarver

På klækningstidspunktet har larverne en relativt stor blommesæk og oliedråbe, men fra klækketidspunktet og frem blev det mere og mere svært at se larverne, efterhånden som blommehmassen og oliedråben blev absorberet.



Figur 5.11 Ålelarve 4 døgn (Foto C. Graver)



Figur 5.12. Til venstre ses en 5 dage gammel ålelarve. Blommesækken er næsten brugt, og oliedråben er svundet ganske betydeligt. På billedet til højre kan man se anlæg til øjne og anlæg til mund. (Foto: P. Lauesen)

Larverne øgede deres længde betragteligt i de følgende dage. Dette skete på bekostning af blommesækken og oliedråben, som svandt ind. I løbet af de første dage efter klækningen gik mange larver til grunde. Det begyndte med, at en del af larverne udviklede deformiteter specielt i rygsøjlen. Rygsøjlen blev skæv i visse områder, hvorefter larven til sidst ikke kunne svømme, den mistede evnen til at osmoregulere, den krummede sig sammen og døde til sidst.

Med basis i viden om andre marine larver, virker det sandsynligt, at den altovervejende årsag til at ålelarverne i nærværende projekt ikke levede længere end 5 døgn må søges dels i hunålens ernæringstilstand og dels i modningsmetodikken, som betinger æggets optagelse af vigtige næringsstoffer.

## 6 Befrugtningssucces, fosterudvikling og larveproduktion

*Af Christian Graver, Peter Lauesen, Henrik Jarlbæk og Jonna Tomkiewicz*

### 6.1 Forløb og succesrater for hunålene i forsøget

Nedenfor ses skema over de i alt 400 hunål, der indgik i forsøgene. Heraf blev 287 anvendt til histologiske undersøgelser, scanninger eller døde undervejs. De få utilsigtede dødsfald, der var gennem projektet, skyldtes hovedsageligt, at fisk undslap forsøgskarrene og døde på gulvet i løbet af natten

I alt nåede 143 ål frem til slutmodning og gydning. Af disse blev 113 stk. (= 79 %) strøget. De fleste af de resterende ål modnede, men kunne ikke stryges, mest fordi slutmodningshormonet ikke virkede på dem, i nogle tilfælde fordi ålen selv gød æggene spontant, nogle få der ikke responderede på hormonbehandlingen, og enkelte der døde. Befrugtning blev vurderet indenfor få timer, mens fosterudvikling blev vurderet 36 timer efter befrugtning.

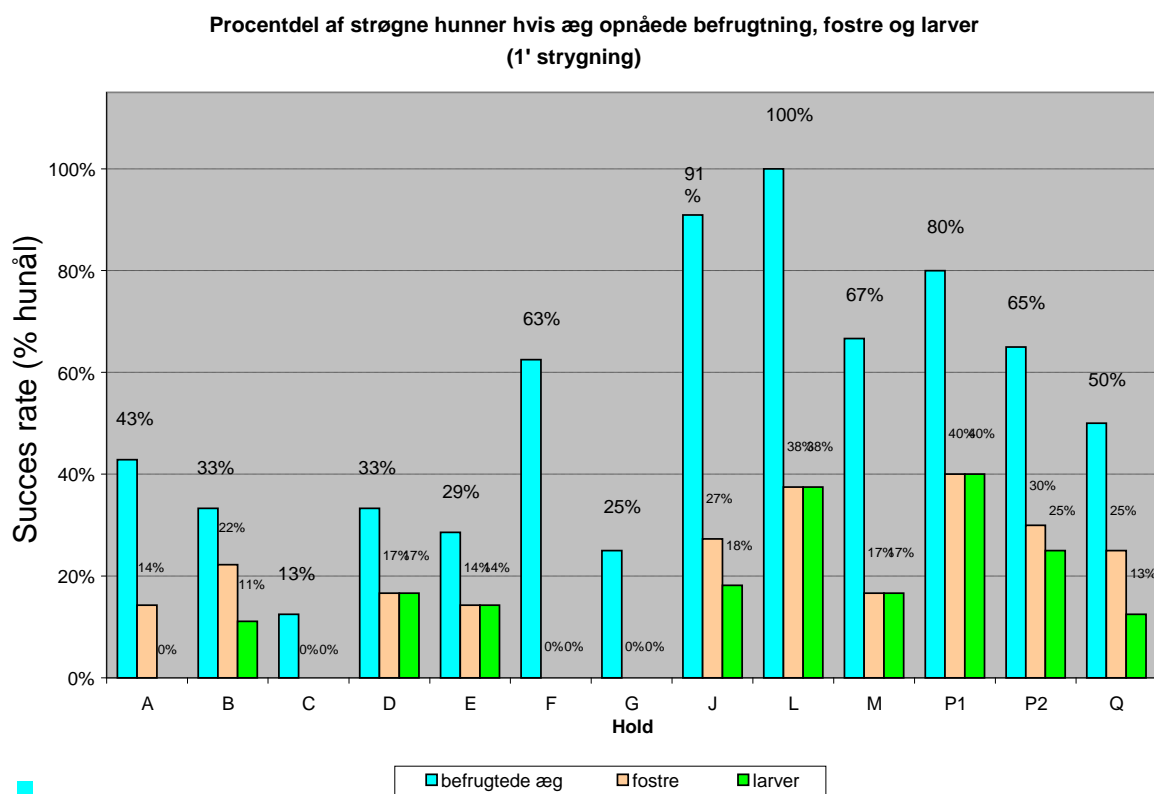
Antal ål fra start	Antal ål til histologi, scanning eller døde	Ål der blev strøget	Hold æg der blev befrugtet	Hold æg hvori der udvikledes fostre	Hold æg hvor der klækkede larver
400	287	113	64	23	18

Tabel 6.1 Regnskab for hunål, der indgik i forsøgsrækken i ROE II.

## 6.2 Relativ frekvens af befrugtninger, fostre og larver

Af de 113 hunål, der blev strøget, lykkedes det at befrugte æg fra 64 hunner (= 57 %). I æggene fra 23 hunner blev der dannet fostre, hvilket svarende til 36 % fra 18 ud af de 64 portioner æg, der blev befrugtet, klækkede der larver svarende til 28 %.

Resultaterne ses i relation til de forskellige hold i modningsforsøgene i Figur 6.1. Figuren viser, hvor mange af de succesfulde strygninger, der resulterede i henholdsvis befrugtede æg, udviklede fostre og klækkede larver. Disse resultater er baseret på æg fra første strygning. Der var endvidere 12 hunner, som modnede igen og blev strøget. Af disse lykkedes det at befrugte æg fra 6 ål og æg fra 2 af disse udviklede sig til fostre. Ingen af æggende med fostre fra 2. portion rogn nåede til klækning.



**F**

Figur 6.1 Den procentvise succesrate for hunål med vellykket 1. strygning af rogn.

Det ses, at der blev opnået befrugtning af æg fra hunner i alle 13 forsøgshold. Der var 3 hold, hvor der ikke blev opnået fostre, nemlig hold C, F og G. Hunnerne i hold F og J, som fik ½ dosis SPE, udviklede ægcellerne langsommere og havde mindre æg i de øvrige hold. Ud fra antallet af oliedråber og cellekernens vandring så oocytterne ud til at modne normalt.

Æg fra alle strøgne hunner i Hold L kunne befrugtes. Dette hold lå blandt de 2 højeste, hvad angik udvikling af fostre og klækning af larver, kun overgået af Hold P1.

Både Hold L og P1 fik variabel hormondosis, forskellen på de to hold var, at P1 var fodret 4 uger længere med specialfoder. De gode resultater for Hold L og P1 indikerer, at der i fremtidige forsøg bør arbejdes videre med brug af variabel dosis hormon.

Frekvensen af ægbatches med vellykkede befrugtninger, fosterudvikling og klækning blev generelt bedre gennem forsøgsperioden. Dette stemmer overens med, at ålene fra Hold J – Q havde fået specialfoder, og derved bidraget til at æggenes indhold af de essentielle fedtsyrer, som er værdifulde for foster- og larveudvikling. Fremgangen skyldes også, at der gennem projektperioden blev høstet erfaringer, som resulterede i en mere optimal håndtering af ålene.

Hold D, (fuld dosis SPE), var et atypisk hold, hvor nogle af ålene ekstraordinært blev behandlet med LhRh (Luteinizing hormone releasing hormone) efter at oocyterne havde nået en diameter på 6–700 µm. Behandlingen resulterede i befrugtede æg, der havde et andet udseende end æggene opnået ved brug af SPE alene, men uden væsentlig forbedring af befrugtningssucces.

Nogle af hunnerne i hold D modnede senere end forventet. Fra denne gruppe ål modnede en hun efter 22 uger og de strøgne æg resulterede i den første og bedste masseklækning i hele forsøgsperioden. Der klækkede mellem 5.000 og 10.000 larver, hvoraf den længstlevende levede i 3½ døgn. Moderfisken havde ikke modtaget specialfoder. Den næstebedste klækningssucces stammer fra en ål fra hold J. Dette hold fik tildelt ½ dosis hormon. Gydningen fandt sted 25 uger efter den første injektion og resulterede i en 5 dage gammel larve.

I projektet lykkedes det således at frembringe levedygtige æg, der udviklede sig til blommesækklarver med en levetid på 5 dage. Dermed satte projektet verdensrekord, idet den tidligere rekord på 3.5. døgn opnået, af et russisk forskerhold i midten af 1980'erne, dermed blev overgået. Det var også kun tredje gang i historien, at det er lykkedes at frembringe larver af den Europæiske ål. Foruden russerne, er det kun forskerne i det tidligere projekt ROE I, der har opnået klækning af larver. Det er også første gang i historien, at der er rapporteret gentagne masseklækninger.

Resultaterne, der blev opnået i denne forsøgsrække og den efterfølgende forsøgsserie i ROE III, indgår i en artikel, der primo 2008 vil blive indsendt til det internationale tidsskrift *Aquaculture*: Tomkiewicz, J., Stoettrup, J.G., Munk, P., Lauesen, P., Graver, C. and Jarlbaek, H., Jacobsen, C. and Schmidt, J. Induction of maturation and production of larvae of European eel (*Anguilla anguilla*).

## 7 Morfologisk beskrivelse af de tidligste udviklingsstadier hos ålelarver

*Af Peter Munk, Jonna Tomkiewicz, Peter Lauesen og Christian Graver*

De forskellige embryoner udvikler sig i forskellige rater på grund af eksperimentelle forhold, forskelle mellem forældrene og der kan endvidere være små forskelle in-

denfor det enkelte hold æg. Derfor er tidsangivelse (for eksempel ”timer fra befrugtning”) ofte uhensigtsmæssig som eneste angivelse af udvikling. Der findes ikke en systematisk beskrivelse af fosterudviklingen og de tidlige levestadier af den europæiske ål, og projektgruppen har derfor anvendt de første observationer af embryo og larve-udvikling, dokumenteret ved fotografier og prøvetagning under arbejdet januar-juni 2006, til at påbegynde en egentlig stadiebeskrivelse.

I opbygningen af stadiebeskrivelsen er der taget udgangspunkt i den systematik, der er anvendt for en af ”typearterne” indenfor larveforskningen: zebrafisk (Kimmel et al 1995). Der er fællestræk, men også stor forskel på udviklingen mellem disse to arter, og stadiebeskrivelsen for den europæiske ål vil blive tilpasset efterhånden som data bliver til rådighed, så den kommer til at bygge på de tydeligste udviklings-træk hos netop denne art.

Med den overordnede udviklingsbeskrivelse fra zebrafisk som udgangspunkt blev der observeret følgende forløb for åle-embryonerne inkuberet ved 21°C:

- 1) Zygote perioden – det nyligt befrugtede æg (tid 0)
- 2) Delingsperioden – synkrone celledelinger indtil deling 7 (set ved tid 3 timer)
- 3) Blastulaperioden – følgende asynkrone delinger med udvikling af blastula til ca. 30% epiboly (omkransning af blommemasse) (set ved tid 6 timer)
- 4) Gastrulaperioden – bevægelser af celler og dannelse af morfometriske rudimenter (notochord etc) (set ved tid 21 timer)
- 5) Segmentationsperioden – udvikling af somitter (set ved tid 31 timer)
- 6) Pharyngulaperioden – udvikling af lateral-linie systemet (set ved tid 45 timer)
- 7) Klækningsperioden – udvikling af hale, hjerte og øjne (pigmentering) (set ved tid 48-55 timer)

Foreløbig beskrivelse af udviklingen af blommesækklarver (tid efter klækning).

- 8) Døgn 1: Blommesækklarve - Pigment på halespids, blommesæk større end olie-dråbe
- 9) Døgn 2: Blommesæk af samme størrelse som olie-dråbe. Øjnene upigmenterede, tydeligt labyrint organ.
- 10) Døgn 3,5: Blommesæk meget reduceret, tydelig hjertesæk.
- 11) Døgn 5: Blommesæk næsten opbrugt, begyndende kæbedannelse og pigmentering af øjne.

På baggrund af materialet med mange fotos af de enkelte stadier vil de vigtigste ”milesten” til udvikling af mere udbygget stadiebeskrivelse blive identificeret og specifikt målrettet ålens foster- og larvestadier. Endvidere kan materialet bruges til at pege på, hvor der ved senere forsøg skal skaffes yderligere materiale til beskrivelse af larvernes udvikling. Den morfologiske beskrivelse af foster og larveudviklingen i denne og den efterfølgende forsøgsserie i ROE III, indgår i en artikel, der primo 2008 vil blive indsendt til det internationale tidsskrift *Aquaculture*: Tomkiewicz, J., Stoettrup, J.G., Munk, P., Lauesen, P., Graver, C. and Jarlbaek, H., Jacobsen, C.

and Schmidt, J. Induction of maturation and production of larvae of European eel (*Anguilla anguilla*).

## 8 Udvikling af foder til moderfisk

Af Josianne Støttrup og Charlotte Jacobsen

### 8.1 Baggrund

Da det blev valgt at anvende ål fra opdræt til forsøget og ikke vilde ål, var det væsentligt at arbejde med fodersammensætningen af fedtsyrer. Ål i opdræt får et kunstigt foder, der er sammensat med det formål at opnå en høj vækst og lav foderkvotient.

I mange tilfælde er vækstfoderet ikke særlig velegnet til moderfisk, hvorfor det er normalt i akvakultur at anvende et særligt foder til moderfisk. Dette foder indeholder bl.a. særlige fedtsyrer i bestemte forhold, som sikrer en normal udvikling af moderfisk og levedygtige æg og larver.

### 8.2 Screening af vilde og opdrættede ål

Det første mål var derfor at undersøge foderets indhold af fedtsyrer, samt fedtsyreindhold i både vildfisk og opdrætsfisk. Følgende spørgsmål blev stillet:

1. Afspejler fedtsyresammensætningen i opdrætsfiskene det, der findes i foderet. ”Du er, hvad du spiser” forventes også at gælde for ål.
2. Afviger fedtsyresammensætningen i de vilde fisk væsentligt fra opdrætsfiskenes? Hvis ålene i opdræt har fået et foder, der afviger væsentlig fra det naturlige foder, forventes fedtsyresammensætningen at være forskellig.
3. Var fedtindholdet i vilde fisk fra hhv. Norge og Klintholm forskellige. Hvis ålene fra Norge var mere fremme i udviklingen forventedes de at have en fedtsyreprofil, der var lidt forskellige fra ålene fra Klintholm.

Fiskene blev hentet fra henholdsvis Klintholm (blankål fra Østersøen), fra Norge (blankål fra Norges vestkyst) og opdrætsfisk fra Lyksvad Fiskefarm. Fiskenes muskelvæv, gonader samt fedtvæv blev analyseret. Gonade og indvoldsfedt blev dissekeret fra fisken og frosset sammen med den ene filet. Til bestemmelse af fedtsyresammensætningen anvendes følgende procedure: Fedtsyreren ekstraheres fra prøverne efter en metode af Bligh & Dyer (1959). Herefter bliver fedtsyrerne methylet efter AOCS Official Method Ce 2-66. (AOCS 1998) og analyseret ved hjælp af gaschromatografi efter AOCS Official Method Ce 1b-89 (AOCS 1998).

Efter den første screening og på baggrund af resultaterne blev der sammensat et nyt foder til moderfiskene. Fedtsyresammensætningen blev baseret på den tilgængelige information om en ideel fedtsyresammensætning til marine fiskearter, der lever i varme områder. Dette valg var baseret på den antagelse, at åleæg gydes i varmt saltvand, og ålelarver lever i varmt saltvand, når de klækker, og formodes derfor at have samme behov som andre saltvandsarter, der lever i varme områder.

### 8.3 Specialfoderet og den ændrede fedtsyreprofil i moderfiskene

Det nye specialfoder (“JD-foder”) blev efterfølgende analyseret. Samtidig blev der taget nye prøver af fiskene, der havde fået specialfoderet, for at undersøge, om de afspejlede det nye foders sammensætning, og om fordelingen nu var som ønsket. Følgende spørgsmål blev stillet:

1. Har det fremstillede JD-foder den ønskede sammensætning, for de mål der ønskes mht. fedtsyrefordelingen.
2. Hvor hurtigt går det med at påvirke fedtsyresammensætningen hos de potentielle moderfisk?

Analyserne blev foretaget på samme måde som beskrevet ovenfor. Ål, der var blevet fodret JD-foder i 5, 10 og 14 uger blev analyseret og sammenlignet med opdrætsål, der ikke havde fået JD foder, vilde fisk fra hhv. Klintholm og Norge samt selve JD-foderet.

## 8.4 Resultater

### 8.4.1 Screening af standardfoderet

Ålefoderet bestod af fiskemel (55%), fiskeolie (18%), hvede (17%) samt lidt hvedegluten (4%), levertran (1%) og lecitin (0,5%). Totalt i foderet var der størst indhold af 16:00. Endvidere var der et højt indhold af de essentielle, langkædede (n-3) fedtsyrer fra især de marine kilder: fiskemel, fiskeolie og levertran. Indholdet af de essentielle, langkædede (n-6) fedtsyrer var til gengæld meget lavt og stammede kun fra de marine kilder. Indholdet af 18:2(n-6) var forholdsvis højt og stammede primært fra plantekomponenterne i foderet.

Konklusion: Opdrætsålene fra Lyksvad Fiskefarm havde fået tildelt et foder, hvis fedtsyreprofil indikerer, at der er anvendt marine olier fra nordatlantiske fisk.

### 8.4.2 Screening af ålene

Der var en markant forskel i fedtsyresammensætning hos opdrætsål og vildål i både fedtet (Figur 8.1), muskelvævet (Figur 8.2) og i gonaderne (Figur 8.3). Der var langt større variation hos de vilde ål end hos opdrætsål. Generelt indeholdt vilde ål mest 18:1(n-9), som lå på omkring 30 % i både muskel, fedt og gonaderne. Indholdet af denne fedtsyre i de opdrættede ål var markant lavere og bidrog til forskellen mellem disse to grupper (Figur 8.4 og 8.5).

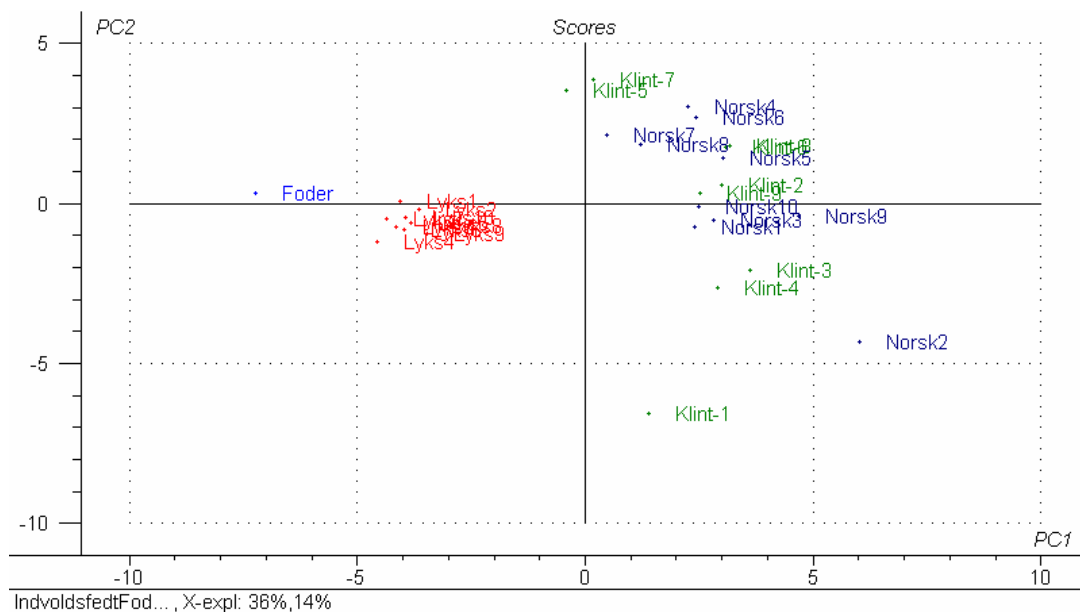
Ser man på de essentielle langkædede, flerumættede fedtsyrer, var der signifikante forskelle mellem de vilde ål og opdrætsfiskene. Indholdet af essentielle fedtsyrer hos de vilde fisk afspejler det, man finder hos fisk fra den nordlige hemisfære med en høj EPA:ARA ratio.

Konklusion: Forskellen mellem opdrætsål og vilde ål fra Klintholm og Norge var større end mellem vilde ål fra de to områder.

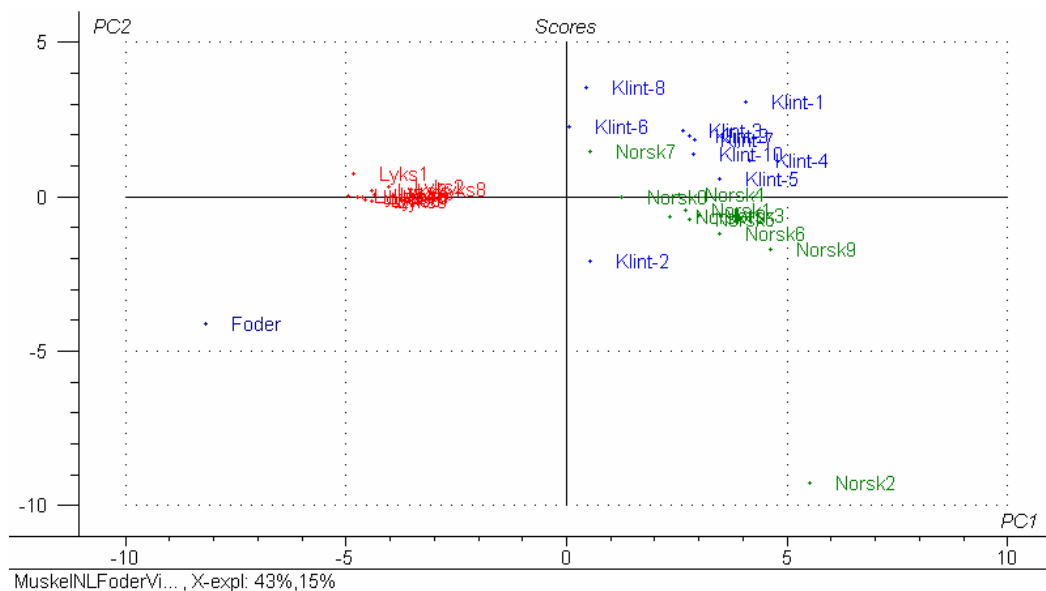
Der var ikke nogen signifikant forskel mellem vilde ål fra Klintholm og fra Norge, uanset at de histologiske undersøgelser viste, at de Norske åls ovarier ikke var helt så udviklede.



”Kunstig reproduktion af ål – ROE II og II-B”

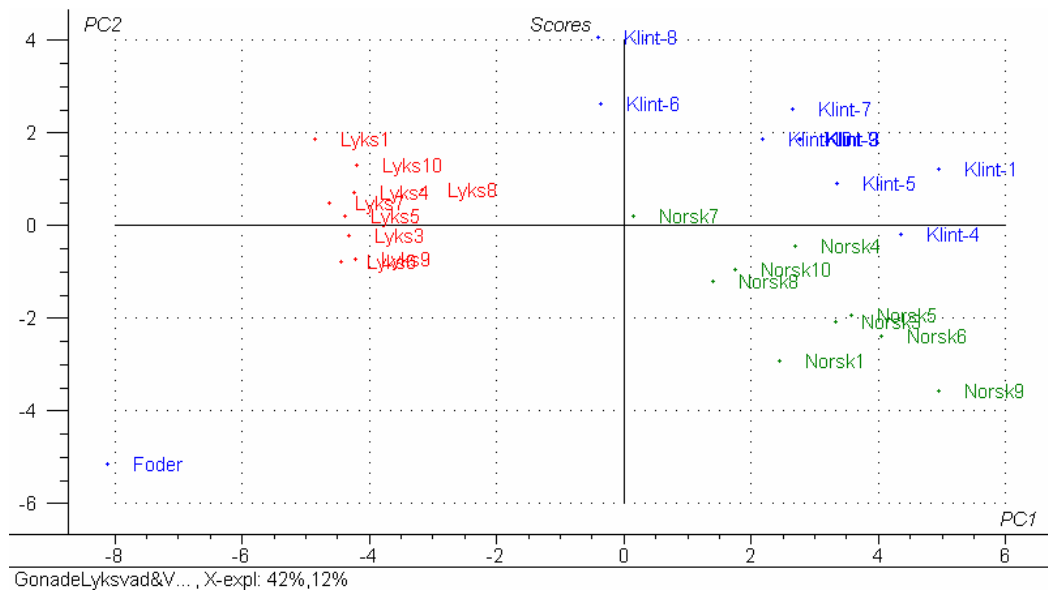


Figur 8.1. Prøverne af fedt fra ålene fra Lyksvad Fiskefarm (rødt, tv. i diagrammet) ligner foderet (klar blå, t.v. i diagrammet) men er væsentlige forskellige fra de vilde ål (grøn og mørkeblå th. i diagrammet) mht. fedtsyresammensætningen.

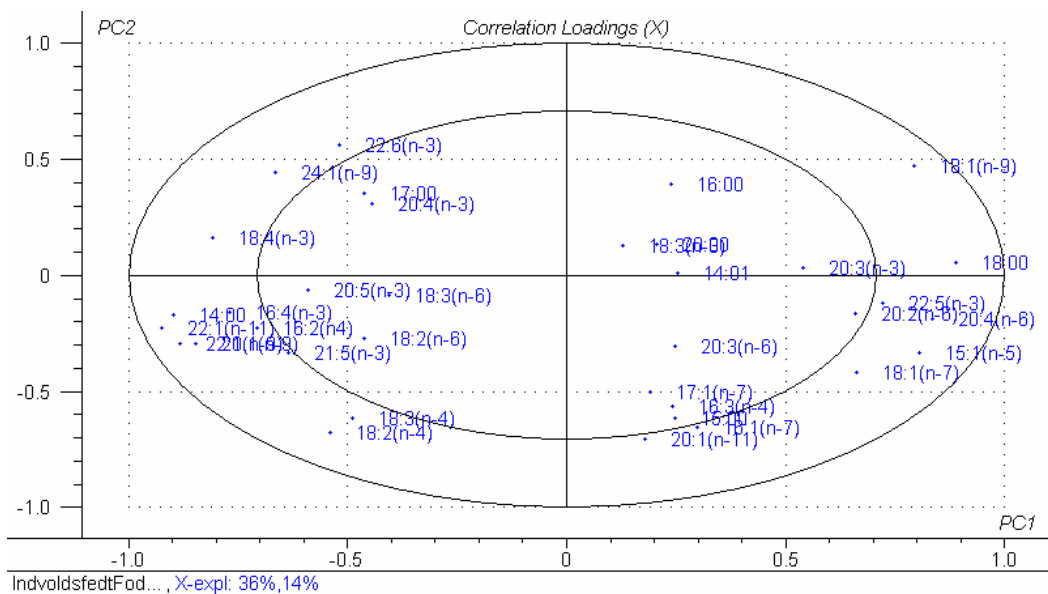


Figur 8.2. Prøverne af muskeltvæv fra ålene fra Lyksvad Fiskefarm (rødt, tv. i diagrammet) er væsentlige forskellige fra de vilde ål (grøn og blå th. i diagrammet) mht. fedtsyresammensætningen. Opdrætsålenes fedtsyresammensætning i muskeltvævet ligner i vid udstrækning foderets fedtsyresammensætning.

”Kunstig reproduktion af ål – ROE II og II-B”



Figur 8.3. Prøverne af gonader fra ålene fra Lyksvad Fiskefarm (rødt, tv. i diagrammet) er væsentlige forskellige fra de vilde ål (grøn og blå th. i diagrammet) mht. fedtsyresammensætningen. Gonadernes fedtsyresammensætning hos de opdrættede ål ligner i stor udstrækning fedtsyresammensætningen i foderet.



Figur 8.4. Her ses hvilke fedtsyrer, der bidrager til forskellen mellem fedtprøverne blandt foderet og de 3 grupper fisk (Klintholm, Lyksvad Fiskefarm og Norge). De, der er længst væk fra centrum, er dem, der bidrager mest til forskellen.



fremgår af analyserne, er der en væsentlig forskel på fedtsyreprofilen i hhv. muskler, indvoldsfedt og gonader.

For at kunne tilpasse foderet til moderfisken bedst muligt, er det vigtigt at vide hvilke fedtsyrer, der anvendes til udvikling af æggene, og hvilke der blot bruges til almindelig forbrænding samt i hvilke mængder. Et meget væsentligt aspekt, når det gælder ål er, at de ikke tager føde til sig under modningen, hvilket de heller ikke antages at gøre i naturen. Derfor må den nødvendige næring, der skal indbygges i æggene være til stede forud for igangsætningen af modningen. Ligeledes er det væsentligt, at sker en reallokering af fedtsyrer og protein fra muskulatur og indvoldsfedt til ovariet og æggende under modningen. I projektfasen ROE IIB er der gennemført et omfattende analysearbejde på disse prøver. Data vil blive analyseret og afrapporteret som en del af projektfasen ROE III.

Resultaterne, der er beskrevet her og fra den efterfølgende forsøgsserie i ROE III, indgår i en artikel vil primo 2008 blive indsendt til det internationale tidsskrift *Aquaculture*: Støttrup, J.G., Jacobsen, C., Tomkiewicz, J., & Jarlbaek, H. Manipulation of essential fatty acid composition in reared European eel broodstock.

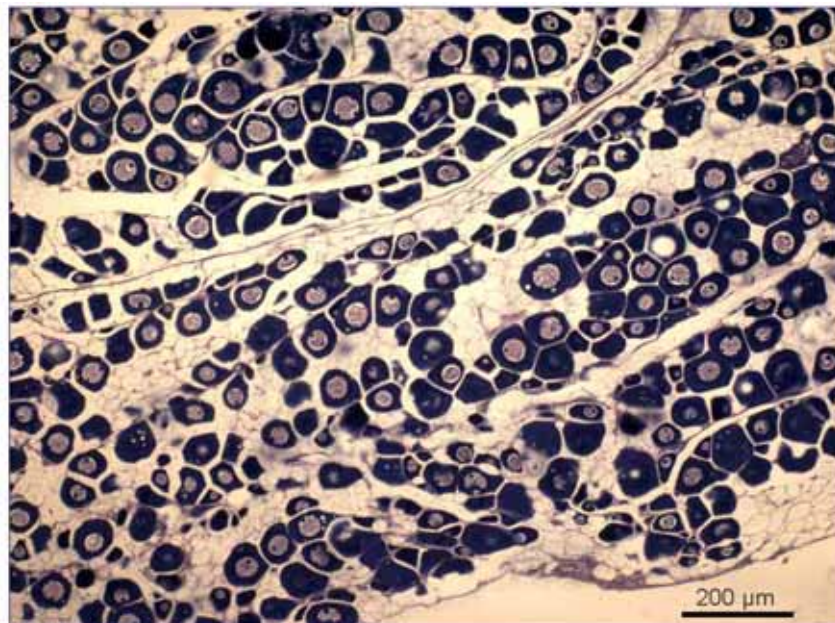
## 9 Histologisk vurdering af æg- og ovarieudvikling

*Af Jonna Tomkiewicz*

### Ovariets udvikling hos europæiske ål under hormonal stimulering

Som hos andre fiskearter, udvikler ålenes gonader sig gradvist, efterhånden som fiskene vokser og øger deres længde og vægt. Gulålene, som er karakteristiske for vore søer og vandløb er ikke kønsmodne, og det gælder også ålene i opdrætsanlæg indtil en vis størrelse. I naturen forvandler nogle af gulålene sig til blankål i sommerens løb, og i løbet af efteråret giver blankålene sig til at vandre. Når blankålene er vandret ud i saltvand, tager de ikke længere føde til sig, og det antages, at de har startet deres gydevandring mod Sargassohavet. Blankålene er imidlertid ikke kønsmodne i almindelig forstand, fordi de går i stå i et såkaldt præpubertetsstadium. Det betyder, at selv om der sker forandringer i retning af seksuel modning, går udviklingen af testes og ovarier i stå, fordi der sker en hæmning af kønshormonerne i hjernen. Derfor modnes ålene ikke naturligt i vore farvande. Hæmningen kan imidlertid overvindes ved at indgive hormoner, som får kønsorganerne til at færdigudvikle sig.

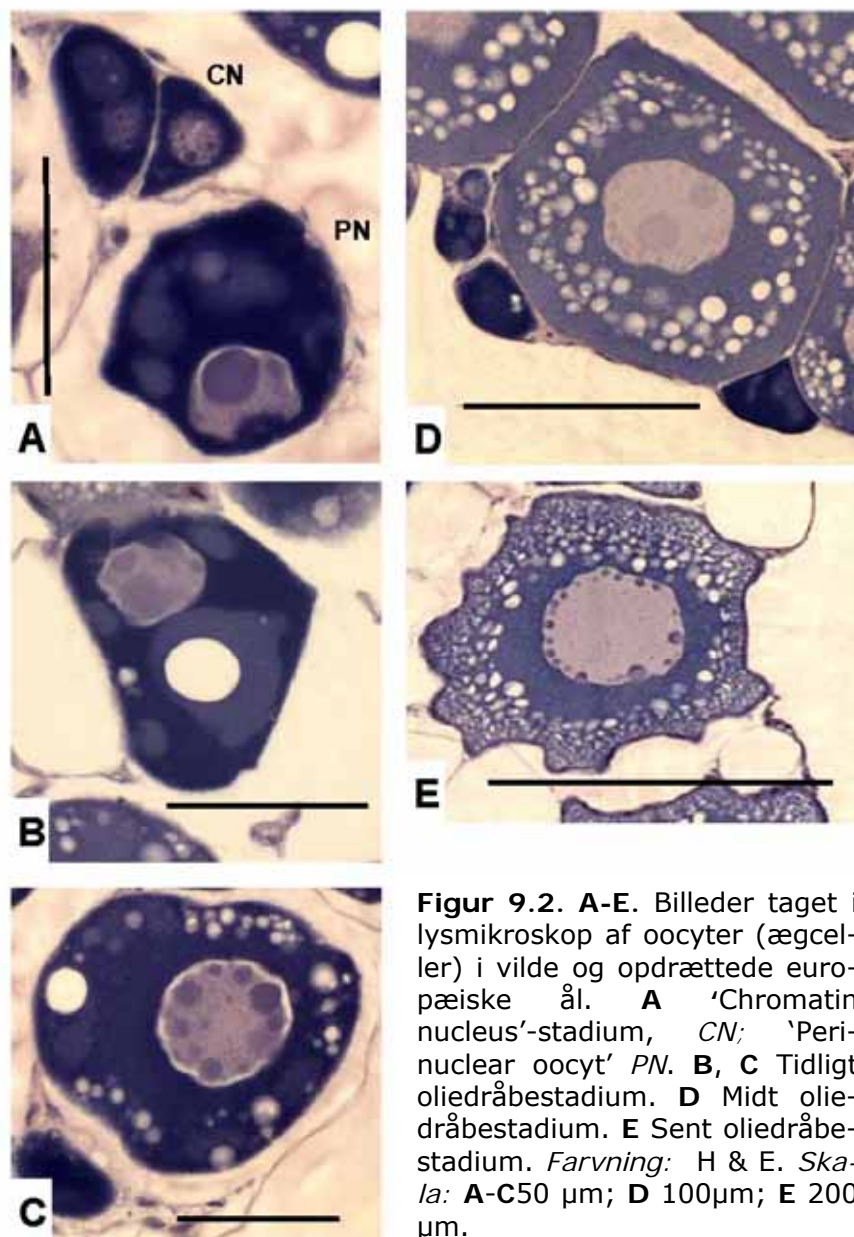
I forsøgene i ROE II blev hunner fra opdræt med en længde på minimum 80 cm valgt som moderfisk. Forud for hormonbehandlingen af forsøgsholdene blev der udtaget 10 hunål til obduktion, og prøver af ovariet blev udtaget til vævsanalyse (histologi) og opbevaret i formalin. Der blev ligeledes obduceret 10 vilde hunål af tilsvarende størrelse fra Østersøen landet i Klintholm og 10 hunål fra Norges kyst landet i Frederiksværk.



**Figur 9.1.** Ovariets udvikling hos en umoden ål i natur eller opdræt. *Farvning:* H & E.

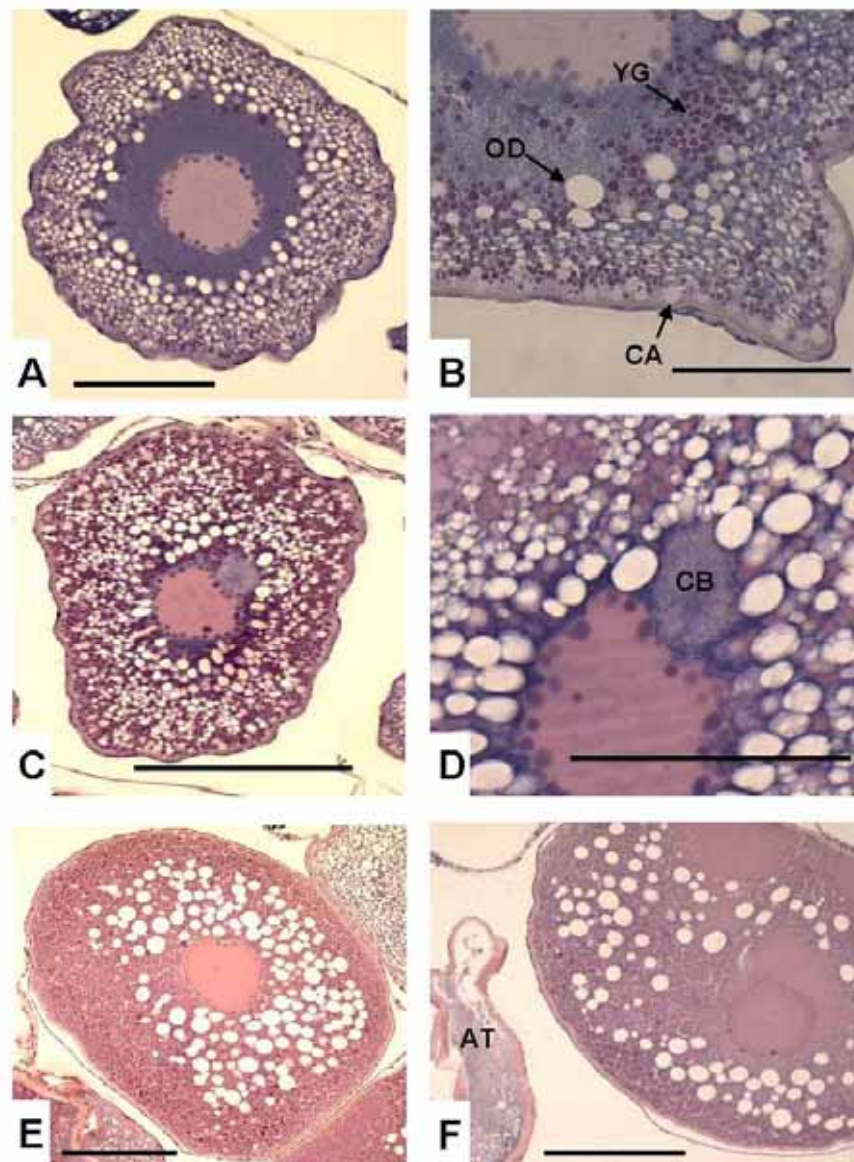
For opdrætsfiskene i forsøgene blev der for udvalgte hold udtaget 5 hunner hver 14. dag gennem hele behandlingsforløbet. Også disse hunner blev obduceret og ovarievæv prøvetaget. I laboratoriet blev ovarieprøverne indstøbt i paraffin og snittet ved 4  $\mu\text{m}$ . Snittene blev farvet med hæmatoxylin og eosin (H & E). Denne teknik farver oocyternes cellekerner og cytoplasma i violette og rødlige farver, mens bindevæv og fedtvæv ikke påvirkes væsentligt.

Ovariet hos umodne ål er domineret af små ægceller (oocytter) som ligger tæt omgivet af fedtceller (Figur 9.1). Der er ikke forskel på ovariets udseende afhængig af, om det er vilde ål eller opdrætsål, men der er en tendens til at opdrætsålene har mere fedt oplageret i fedtvævet.





Hos de vilde blankål og de store opdrætsål anvendt i ROE II var ægcellerne vokset betydeligt, og der var indlejret oliedråber i ægcellerne under udviklingen (Figur 9.2). De mest udviklede ægceller hos de prøvetagne blankål og moderfiskene fra opdræt (før hormonbehandling) var generelt i midt eller sent oliedråbestadium (Figur 9.2 D og E). I ovarierne forekom samtidig mindre udviklede ægceller af udseende som i Figur 9.2 A-C samt store fedtceller. Selvom opdrætsålene ikke ændrer udseende som i naturen, når deres gonadeudvikling således samme niveau, dvs. de større hunner er også i præpubertetsstadiet.



**Figur 9.3. A-F.** Lysmikroskopibilleder af oocytter (ægceller) i udvikling hos opdrættede europæiske ål under hormonelt induceret modning. **A, B** Oocytter i tidlig vitellogenese (blommedannelse); **CA** corticale alveoli; **OD** oliedråber; **YG** blommekorn. **C, D** Oocytter i midt vitellogenese; **CB** cytoplasmatisk legeme. **E** Oocyt i sen vitellogenese. **F** Migrerende nucleus-stadium; **AT** atretisk oocyt (nedbrydning). *Farvning:* H & E. *Skala:* **A, B, D** 100 µm; **C, E, F** 200 µm.

Ved indgivelse af hormon (SPE) skete der en forandring i løbet af få uger. Der indlejredes blommekorn i cytoplasma og antallet af oliedråber øgedes (Figur 9.3). Hos de fleste hunner i forsøgene startede vitellogenese (dannelsen af blommeprotein, blommekorn) i løbet af de første 2 uger, men hos enkelte gik der 3-5 uger, mens nogle få slet ikke responderede. De første blommekorn sås i periferien af cellen blandt oliedråberne. Med stigende antal behandlinger øgedes mængden af blommekorn i ægcellerne og oliedråberne blev flere og større.

Midtvejs i blommedannelsen opstod et lille legeme, der lå tæt op af kernen, her kaldet det cytoplasmatiske legeme (Figur 9.3 C og D). Legemets natur og funktion kendes ikke, og det sås ikke i det næste stadium, hvor ægcellen var fuld af blommekorn og store oliedråber (Figur 9.3E). Samtidig med, at ægcellen fyldtes med blommekorn, voksede den betydeligt og nåede en størrelse på 800-900 µm (Figur 9.3E). Mod slutningen af stadiet smeltede oliedråberne sammen og dannede større dråber. Ægcellen gik herefter ind i slutmodningen, hvor kernen begyndte at migrere mod cellevæggen og mikropyle (det sted, hvor befrugtningen foregår) (Figur 9.3 F). På dette tidspunkt var det nødvendigt at indgive slutmodningshormon for at få hunnen til at ovulere (frigive æggene, ægløsning). Det skete sjældent spontant, selv om æggene var færdigudviklede.

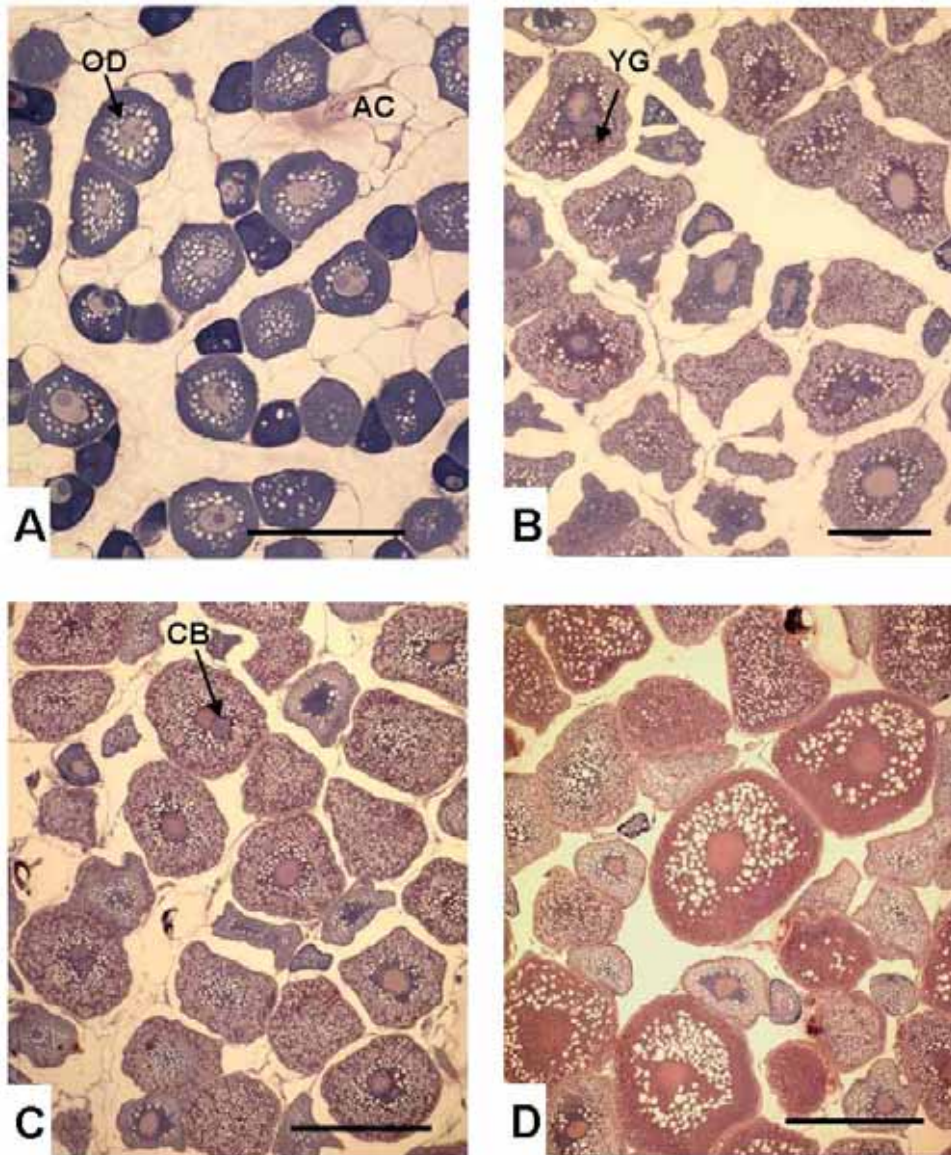
I ovariet udviklede ægcellerne sig ikke synkront, men så ud til at udvikle sig i grupper (kohorter) (Figur 9.4). I Figur 9.4A ses ovariet hos en moderfisk udtaget forud for behandling. Ægceller i forskellige oliedråbestadier er tydelige iblandt store fedtceller. I Figur 9.4B ses begyndende blommedannelse i ægcellerne, men der er stadig ægceller i oliedråbestadiet. Fedtcellerne skrumper gradvist ind, og det antages, at fedtcellernes olieindhold overføres direkte til ægcellerne. Midtvejs i blommedannelsen (Figur 9.4C) er der meget lidt fedt tilbage mellem ægcellerne, og i de udviklede ovarier er det ikke synligt.

Der var oftest 4-5 forskellige kohorter af ægceller hos hunnerne i sen modning. Efterfølgende blev det observeret, at hunner, som havde gydt en gang, genmodnede og gød igen med et par ugers mellemrum uden yderligere hormonel stimulering med SPE. Nogle hunner gød 3 gange uden SPE stimulering efter første gydning. Resultaterne af forsøgene viser således, at hunner hos den europæiske ål ikke udvikler og gyder alle æggene på en gang, men at de er portionsgydere, dvs. de gyder flere portioner af æg over en længere periode. Det er en almindelig kendt strategi hos fisk, f.eks. er torsk, brisling og tun portionsgydere. Ålene har også et meget stort antal æg, hvilket understøtter teorien om, at de i naturen vil gyde deres æg i flere portioner.

Kategoriseringen af de forskellige ægstadier er blevet anvendt i forsøgene til at vurdere effekten af behandlingen hos hunålene. Ved at identificere de mest udviklede



ægceller i ovariet og deres hyppighed, kan modningsstadiet vurderes, og relateres til ovariets størrelse og udseende. I andre analyser sammenlignes udviklingen med lipidindhold og CT-scanningerne, der viser, hvordan forskellige fedtsyrer og energi allokeres til ovariet under udviklingen.



**Figur 9.4. A-F.** Lysmikroskopibilleder af ovarievæv i kunstigt modnede europæiske ål. **A** Præ-pubertet stadium; oocytter i oliedråbestadiet, *OD*; fedtceller, *AC*. **B** Tidlig vitellogenese; blommekorn, *YG*. **C** Midt vitellogenese; cytoplasmatisk legeme, *CP*. **D** Sen vitellogenese. *Farvning* H & E. *Skala* **A** 100µm; **B**; 200µm; **C**, **D** 500µm.

De histologiske undersøgelser og resultaterne indgår i en artikel, der i 2008 vil blive indsendt til *Journal of Fish Biology*: Tomkiewicz, J. Oogenesis of European eel, *Anguilla anguilla*, induced by hormonal treatment.

## **10 Ultralydsscanning støttet af CT-scanning til vurdering af ovarieudvikling**

*Af Fintan McEvoy, Lene Buelund og Eiliv Svalastoga*

### **10.1 Introduktion til ultralydsscanning af hunål**

Ultrasound imaging is used widely for the diagnosis of disease, for monitoring reproduction and for quality control in the food production industry. The technique is non-invasive and non destructive so that if required repeated measurements can be made and each measurement can be made in the confidence that significant physiological changes are not indices in the organ being imaged. There is no evidence of cell or oocyte damage resulting from ultrasound at beam energies and with the scan times used in ultrasound imaging. The ultrasound image is a map of differences within and between tissues of acoustic properties. Thus tissues or liquids that are uniform will not generate a signal and appear as black areas on the image. Tissue that has many internal differences or the interface between two tissues that themselves are different with respect to sound, will generate a loud echo, and this will be displayed as a bright region on the image.

### **10.2 Materialer og metoder i forbindelse med ultralydsscanning**

Eels were scanned immediately before or after CT scanning. They were restrained using Benzocaine administered in water, approximately 20 minutes prior to scanning. Each eel was identified and its number entered into the database of the imaging unit. In all over the course of the study 110 eels were scanned. The period over which they were scanned was at least 11 weeks, with the period extended in some cases after that to monitor the period after oocyte stripping.

The unit used for all scans was a Siemens, Acuson Sequoia, with a 7.5 to 14 MHz linear array transducer. This was typically run at 14 MHz with an image depth of 4 to 5 cm. The 14 MHz used in this study is considered of very high frequency and results in excellent resolution in the final image. Lower imaging frequencies can be used and are widely reported in fish ultrasound applications. These frequencies allow greater tissue penetration but have poorer resolution. The individual oocyte in the eel is smaller than the spatial resolution power of even 14 MHz ultrasound beams, it was therefore not possible to image individual oocytes.

Scan images were collected in this systematic way:

1. Transverse images were collected at the level of the cloaca and every 3 cm cranial to the level of the heart. The ultrasound transducer for these images was placed on the ventral body surface. Thus the ventral surface and ventrally positioned structures are positioned uppermost on the final ultrasound image. These allowed clear identification of the ovaries and permitted the calculation of cross sectional areas.

2. A single image of the left eye was collected permitting eye diameter measurements.
3. Sagittal oblique images from the left and right body wall centered 3 cm cranial to the cloaca were also collected. These permit determination of wall thickness (dermis together with muscle thickness).

Images were stored in DICOM format first on the ultrasound unit’s hard drive and later exported over a PACS network for image analysis using the open source computer software program, ImageJ. The cross sectional area of the ovaries, and body wall thickness were determined for each scan.

### **10.3 *Introduktion til CT-scanning af hunål***

Computed tomography (CT-scanning) is an imaging technique that utilizes X-Rays to obtain transverse images of successive slices. Different tissues stop or attenuate X-rays by different amounts. This differential attenuation is detected by the CT machine and is the basis for image formation. The image thus obtained in eels, is literally a map of the attenuation coefficients distributed throughout the fish. The data in addition to being used for image making can be analyzed. The presence of lipid in a soft tissue for example muscle, ovary or liver, alters the attenuation coefficient (measured in Hounsfield Units, HU). The data thus has potential for use in tracking movements within the body, of lipid reserves in fish. With this future application in mind CT data was collected from the fish just before or just after the collection of ultrasound images.

### **10.4 *Materialer og metoder i forbindelse med CT-scanning***

The eels were under the same chemical restraint (Benzokain) as that used for the ultrasound examination. Restraint is more important for CT as movement in the fish would result in blur on the image. CT images were collected from all eels that were submitted for ultrasound examination (110). The eels were placed on the scanning table of a single slice helical CT scanner (Emotion, Siemens GmbH, Germany). In these units the fish is placed on a scanning table which moves continuously through a central aperture in the machine. This arrangement was used to create a set of transverse images 5 mm in thickness extending the entire length of the eel. Table movement during scanning was set to that there were no gaps between adjacent slices on the final image set. Thus one scan from an eel results approx 140-150 images, depending on the length of the eel. During the course of the study a frame was designed which contained up to 5 eels and maintained separation during scanning, thus reducing the total scanning time required.

Images were stored in DICOM format and later be exported to image analysis software. For illustrative purposes a limited analysis has been performed on individual scans.

### 10.5 Resultater vedr. ultralydsbestemmelse af hunålenes anatomi

CT images Ultrasound images and cut frozen section from eels after euthanasia were used initially to permit and assist image interpretation. A collection of three images obtained from the level of the liver is shown in Figure 10.1. This include liver and muscle but no ovarian tissue

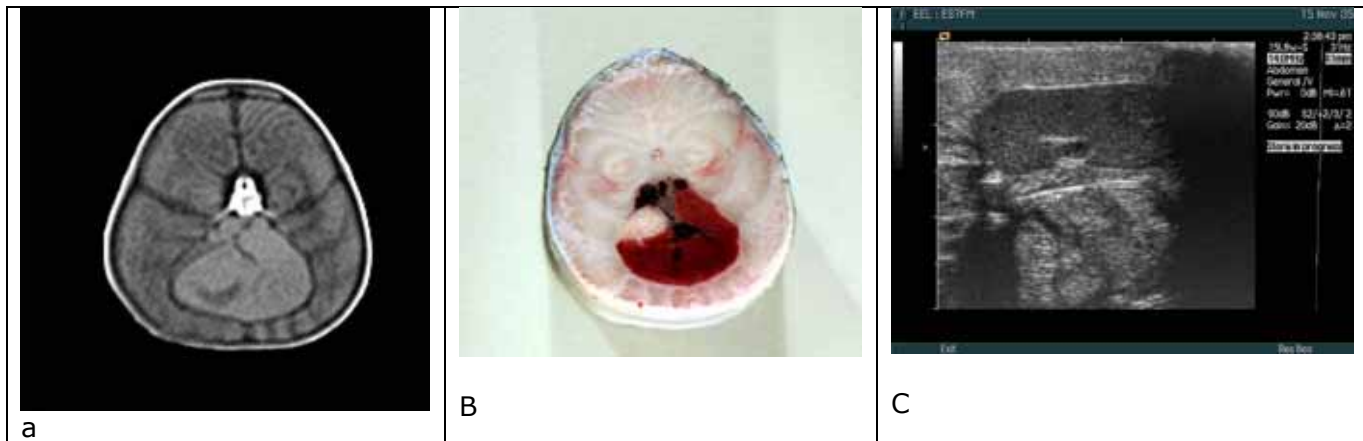


Figure 10.1. CT image (a), frozen anatomical section (b) and ultrasound image (c) from an eel - All images section are from the region of the liver. On the CT image dorsal is uppermost. A clear distinction between skin, subcutaneous tissue, muscle skeleton (vertebral body) and liver is seen. The frozen section in (b) is orientated in the same way as the CT image and matches the ct appearance closely. The compartmentalization seen in the muscle tissue on the anatomical specimen matches the CT appearance. The liver contains dark coagulated blood with in vessels is seen centrally. The ultrasound image (c) is presented as it appears during collection. Dorsal is lower most on this image. Muscle is seen uppermost with the darker liver present centrally within the image.

Caudal to the liver segments of the alimentary tract, the swim bladder and ovarian tissue could be identified, Figure 10.2. More caudally at the level of the cloaca, the kidney could be clearly identified.

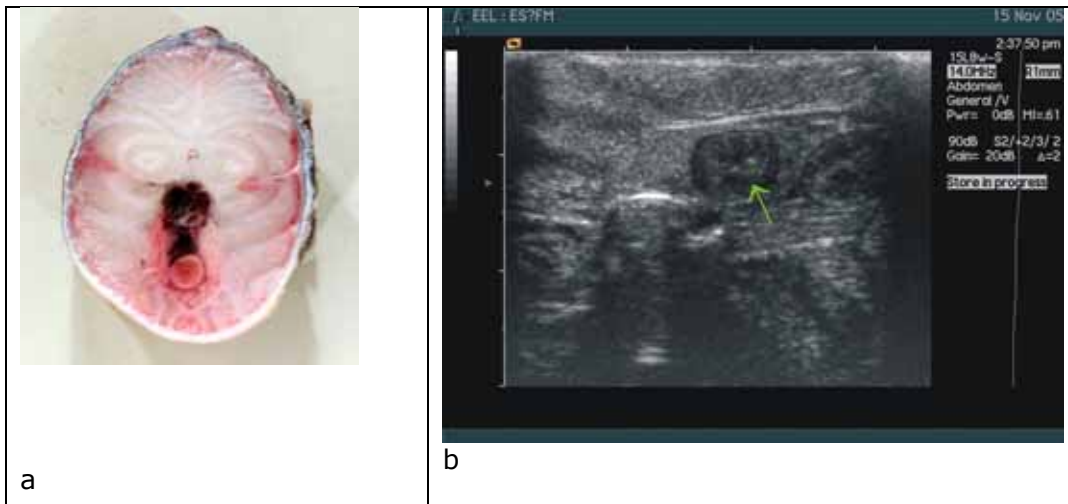


Figure 10.2 Transverse anatomical specimen (a) and ultrasound image (b) taken caudal to the liver. The anatomical specimen shows a central pink coloured loop of the alimentary tract (likely a transverse segment of the stomach) ventral to a dark area (spleen). Ovarian tissue in this eel can be seen on either side of the stomach on the anatomical specimen, but cannot be identified with certainty on the ultrasound image. The ultrasound image from the same area shows circular transverse slice of the stomach (green arrow) with some detail of the mucosal surface (which appears black)

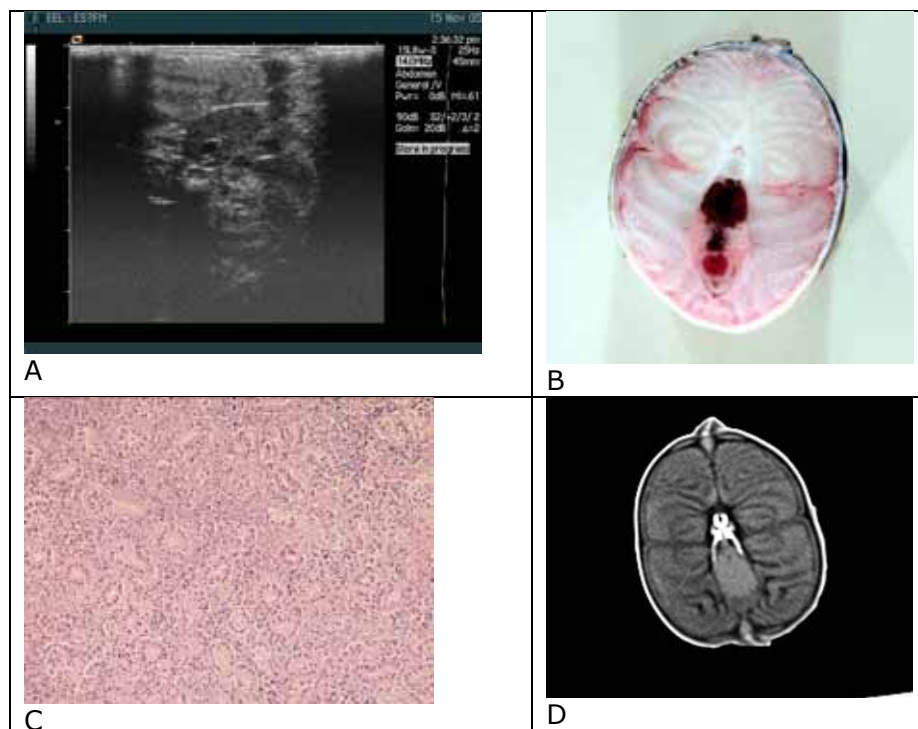


Figure 10.3 Images and tissue collected from the level of the cloaca. The ultrasound image (a) shown an elliptical structure with a circular dark zone. This corresponds to the dorsally positioned tissue on the anatomical specimen (b). This was confirmed as renal tissue on histology (c). The CT image (d) differentiates the kidney from surrounding tissue at this level.



Thus in the immature fish illustrated in Figures 10.1 to 10.3 above, the major organs can be identified. The immature ovary however is difficult to discern with certainty.

Ultrasound images from maturing eels.

An entire image set is shown in Figure 10.4.

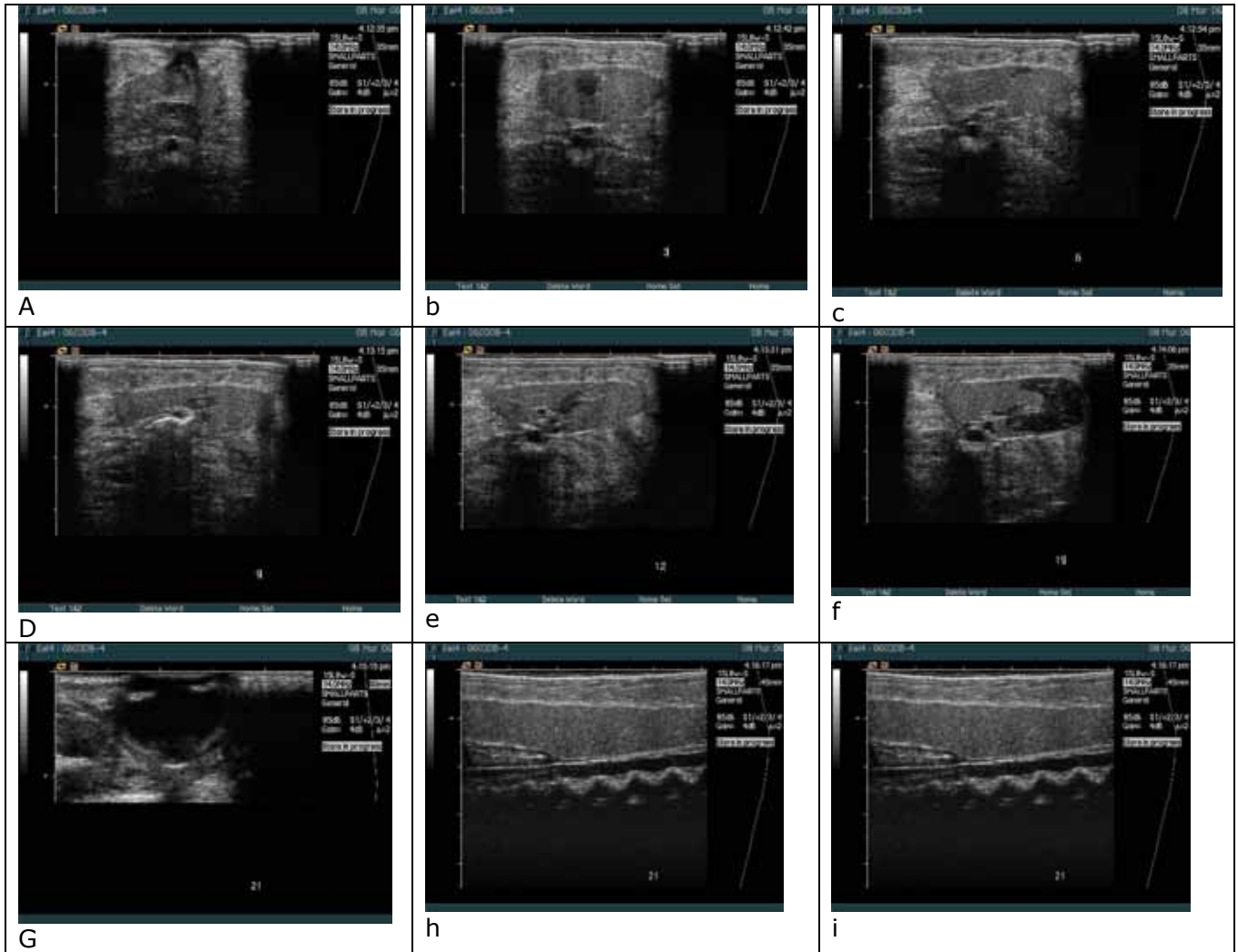


Figure 10.4. *Transverse and sagittal ultrasound images from the entire length of an eel taken 7 weeks after the start of the observation period. Image (a) is taken from the level of the cloaca. Images up to and including (f) taken at 3 cm intervals proceeding cranially. Image (g) is from the eye (magnified compared to other images). Images (h) and (i) are sagittal views centered at a level 3 cm cranial to the cloaca.*

The ovaries could be clearly imaged at all stages from the beginning of the artificially induced maturation process to the end of examination period and at multiple scanning positions between the liver and the cloaca. The level 3 cm cranial to the cloaca was used for measurement and is illustrated in Figures that follow.

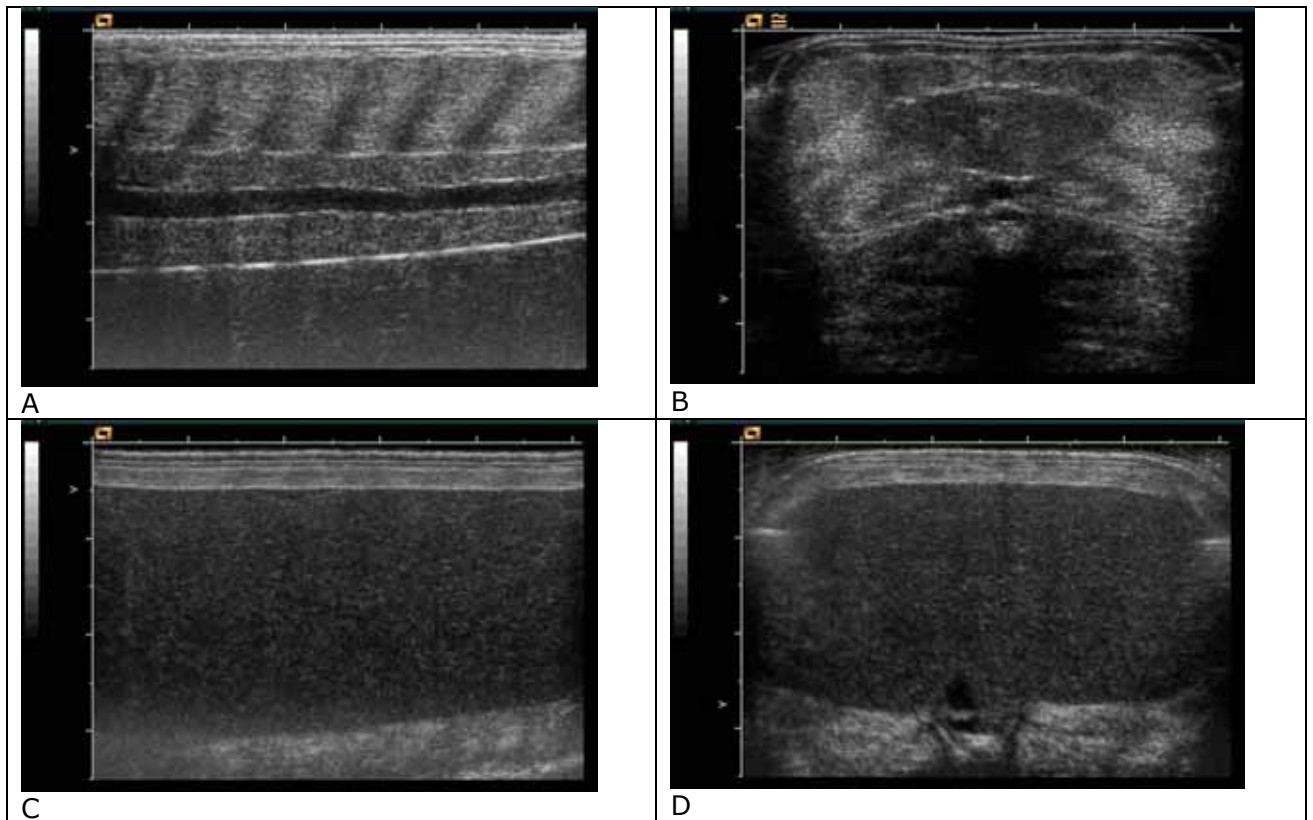


Figure 10.5 (a) *Sagittal and (b) transverse ultrasound images from a level 3 cm cranial to the cloaca in the same eel. The images show a scale in centimetres. Note the thick (1cm) body wall containing a repeating pattern on the sagittal view. The ovary is seen on both views within the body cavity, surrounding the intestinal vessel on the sagittal vessel. Ultrasound images (c) sagittal and (d) transverse from an eel in the same group but at day 68. Note the great reduction in body wall thickness and the great increase in ovarian diameter, evident on both image orientations.*

## 10.6 *Billedanalyse*

Ovarian cross sectional area was measured 3 cm cranial to the cloaca. This was done by freehand drawing of a region of interest around the ovary. The images in Figure 10.6 illustrate this procedure. In all cases the boundary of the ovary was readily identified. The plot of cross sectional area against time shows the rapid phase of increasing ovarian diameter towards the end of the observation period.

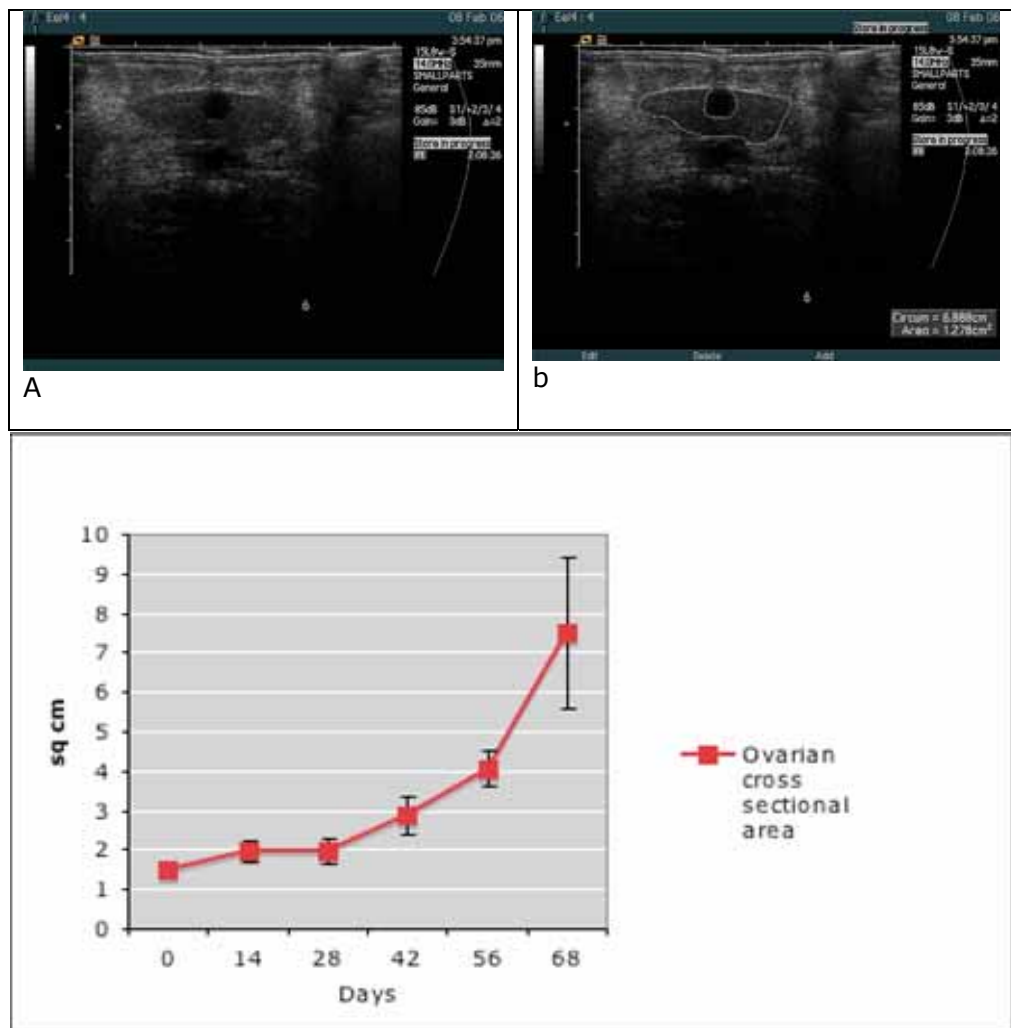


Figure 10.6 *Transverse ultrasound images collected 3 cm cranial to the cloaca without (a) and with (b) the ovary marked for cross sectional area measurement. The plot (c) shows the changes in ovarian cross sectional area during induced ovarian maturation. Data points are means, error bars show standard deviation, group size = 5.*

Body wall, (dermis and muscles) measurements showed a gradual decrease over the study period. Again these measurements were made by freehand placement of markers. This procedure is illustrated in Figure 10.7 together with the accompanying plot of the data.



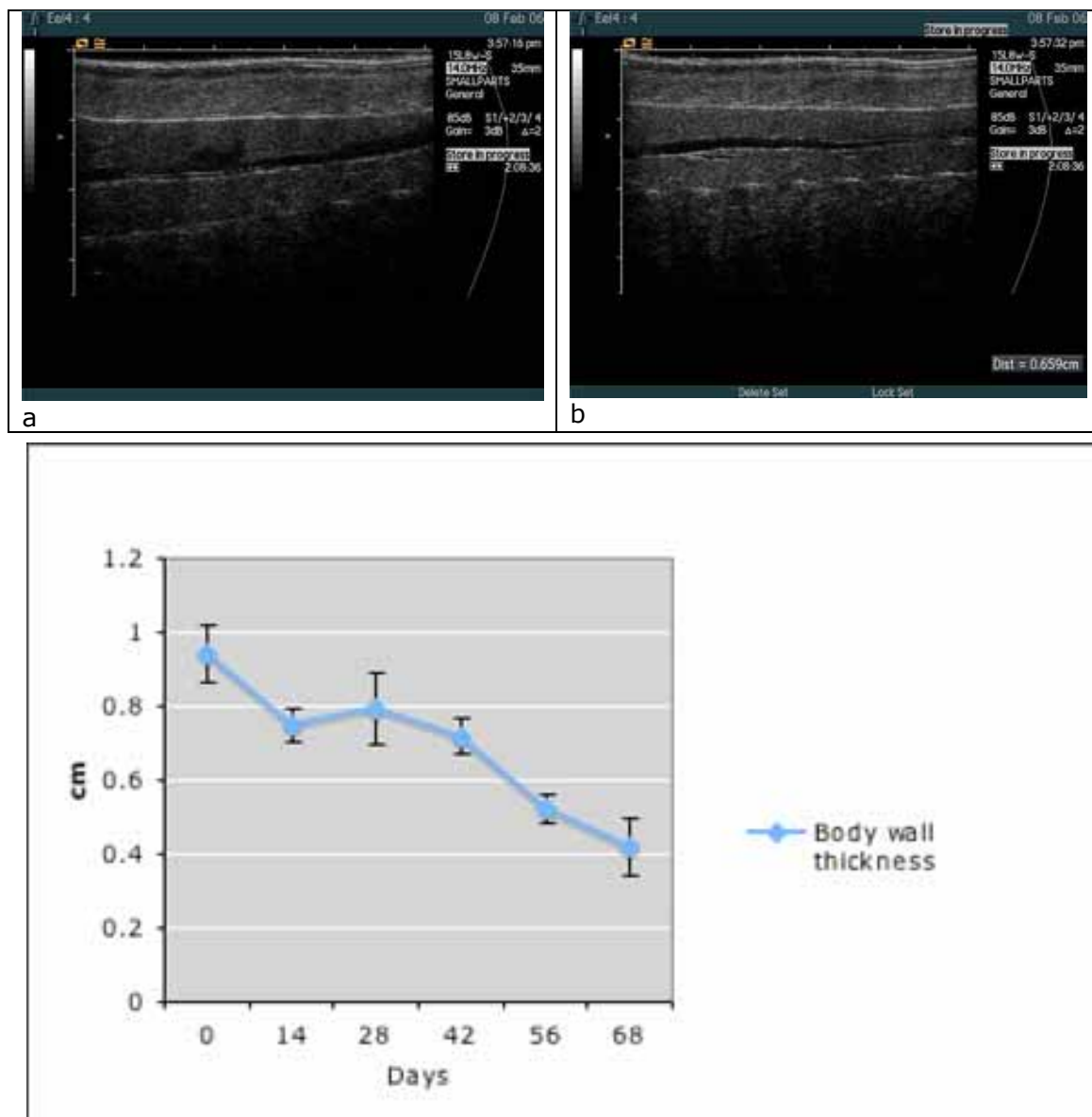


Figure 10.7 *Sagittal ultrasound images collected 3 cm cranial to the cloaca without (a) and with (b) the body wall marked thickness measurement. The plot (c) shows the changes in body wall thickness during induced ovarian maturation. Data points are means, error bars show standard deviation, group size = 5.*

Part of the results was presented at the 2006 Joint Scientific Conference of the International Veterinary Radiology Association and the American College of Veterinary Radiology in Vancouver, Canada, august 2006. (McEvoy F.J., Tomkiewicz, J., Jarlbaek, H. and Svalastoga, E. Ultrasonography and CT of the European Eel: Potential applications in reproductive management). A scientific publication is in preparation for submission to the international journal *Aquaculture*:  
 McEvoy, F. Buelund, L.E., Svalastoga, E.L., Tomkiewicz & Jarlbaek, H. Morphological comparison between frozen sections, CT and ultrasound.

## 11 CT-scanning til vurdering af lipidreallokering under udvikling

*Af Lene Buelund, Eiliv Svalastoga og Fintan McEvoy*

### 11.1 Introduktion til CT-scanning i forbindelse med analyse af fedtfordeling og –mobilisering.

Computed tomography (CT). This powerful imaging technique was initially used to assist in interpretation of the ultrasound images. Both CT and ultrasound produce cross sectional images. In addition to image data the CT provides quantitative data concerning tissue composition, especially with respect to fat. The linear attenuation coefficient for X-Rays for fat is different to that for muscle. This is measured in Hounsfield units (HU). At the beam energy settings used in CT examination the physical density of tissue is the primary tissue characteristic that relates to HU. Materials such as protein that have HU greater than zero are more attenuating to X-rays than water. Tissues with HU less than zero, such as adipose tissue are less attenuating than water. The spatial resolution of modern CT units is of the order of 1 mm<sup>3</sup> (depending on imaging parameters and on the nature of the machine (single or multi-slice). In all cases the individual contents of the adipocyte cannot be resolved. The HU value produced by the CT machine represents an average of all materials within the sample volume (Voxel). It is to be expected then that as the composition of adipose tissue in fish changes or as the relative proportions of adipose tissue deposits with differing composition alters, then a change in the profile of HU for the whole animal should be seen. In a feasibility experiment CT data from some of the eels used in this study was analysed. This required making a frequency plot of voxel number against voxel value for the whole eel. This produces a plot such as seen in Figure 11.1.

Differences in tissue composition clearly allow CT to differentiate ovary from muscle body wall. The colour coded images in Figure 11.1 shows that muscle thickness decreased and ovarian size increased during ovarian maturation. The plot in Figure 11.1 (c) suggests that during ovarian development fat mobilization can be detected resulting at the end of the period in a change in profile of the curve. These data are however preliminary and it cannot be stated if this will be a general finding in eels undergoing induced ovarian development.

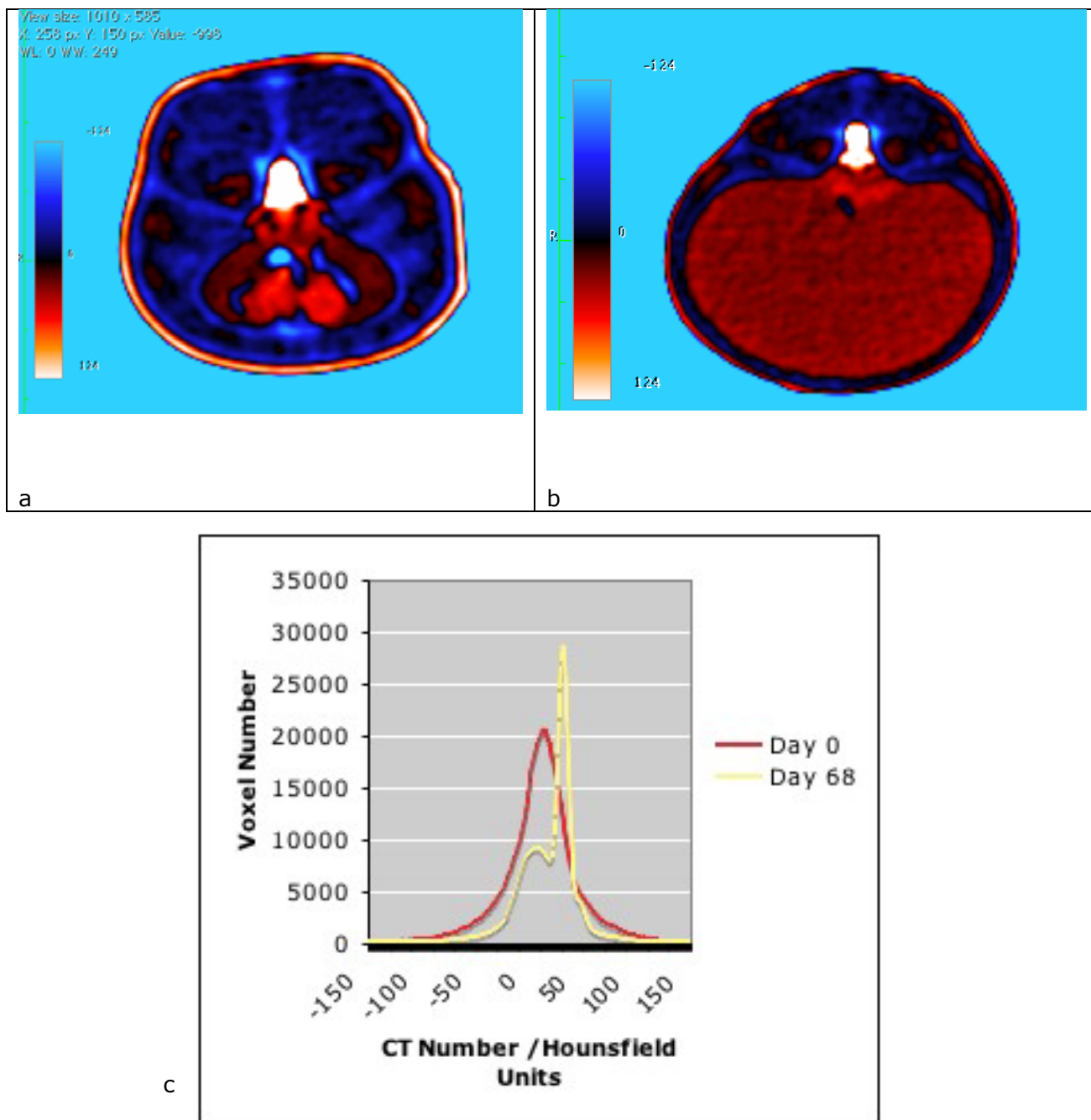


Figure 11.1. Transverse computed tomographic images from different individuals obtained (a) at the onset of the observation period (day 0) and (b) at the end of the observation periods (day 68). In both these images lower HU values ( $< 0$ ) are displayed in red. Tissues with a higher HU value ( $> 0$ ) are displayed in blue or white. In general the greater the fat content of a solid tissue the lower its HU value will be. The ovary is clearly seen in red on both images, essentially filling the coelomic cavity at the end of the study period. (c) This plot shows voxel number against voxel value. It can be seen that at day “0”, there is essentially one population of soft tissues (red curve). At the end of the scan period (day 68) there are two peaks (yellow curve).

Part of the results was presented at the 2006 Joint Scientific Conference of the International Veterinary Radiology Association and the American College of Veterinary Radiology in Vancouver, Canada, august 2006. (McEvoy F.J., Tomkiewicz, J., Jarlbæk, H. and Svalastoga, E. Ultrasonography and CT of the European Eel: Potential applications in reproductive management). Two scientific publications are in preparation for submission to an international journal:

Buelund, L.E., Svalastoga, E.L., McEvoy, F, Tomkiewicz, J., Jacobsen, C. Støttrup, J.G, Jarlbæk, H., Lauesen, P., & Graver, C. Monitoring body composition during artificially induced maturation in the European eel using histogram analysis of Computer Tomographic scans.

Buelund, E.L., Svalastoga, E.L., McEvoy, F, Tomkiewicz, J., Støttrup, J.G, Jacobsen, C. & Jarlbæk, H. Changes in tissue fat content measured by in artificially induced maturation in the European Eel measured by Computer Tomography.

## **12 Afprøvning af mobilt udstyr til ultralydsscanning af ål på forsøgsanlægget**

*Af Fintan McEvoy, Lene Buelund, Henrik Jarlbæk og Jonna Tomkiewicz*

Ultralydsscanning har, som ovenfor beskrevet, vist sig velegnet til at identificere ovariet på et tidligt tidspunkt i udviklingen. Det vil således være muligt at finde frem til de hunner, der har de mest udviklede ovarier på begyndelsestidspunktet. Resultaterne i projektet indikerer, at ovarieudviklingen skal have nået et vist niveau for at hormonbehandlingen virker optimalt. Metoden vil derfor være velegnet til at udvælge moderfisk.

I ROE II blev levende ål fra nogle af projektets forsøgshold kørt med kurer fra forsøgsanlægget på Lyksvad Fiskefarm syd for Kolding til KU-life på Frederiksberg (København), hvor fiskene blev scannet med en Siemens, Acuson Sequoia, en 7.5 til 14 MHz linear array transducer. Der blev normalt benyttet 14 MHz med en billeddybde på 4 til 5 cm. I ROE II forsøgene blev de modnede ål efterfølgende. Men målet er på sigt at anvende metoden som en non-invasiv teknik til at følge udviklingen hos moderfiskene, hvorved behandlingen bedre kan tilpasses og ikke-responderende individer kan udgå af forsøgene.

Det har derfor været ønsket at finde et transportabelt scanningsudstyr, der forsøgsvis kunne anvendes på forsøgsanlægget til afprøvning af metoden. Det var også ønske at afprøve det transportable udstyr i forbindelse med udtagning af ægbiopsier fra levende hunål. Ægprøverne skulle anvendes til at sammenligne hunnernes udviklingsgrad med de histologiske resultater

På sigt er det hensigten at anvende udstyret til at optimere valget af moderfisk og følge udviklingen hos de samme fisk gennem et modningsforløb. Begge dele vil mindske omkostningerne i fremtidige forsøg med optimering af behandling og yngelproduktion ved at reducere antallet af fisk, den nødvendige hormonnængde og arbejdsindsatsen.

I forbindelse med ROE IIB/ROEIII blev et ultralydsudstyr udlånt af KU-Life forsøgsvis anvendt til scanning af moderfisk på forsøgsanlægget i forbindelse med forsøgsstart. Den transportable scanner anvender en transducer på 5MHz med en billeddybde på 5-10 cm. Det viste sig imidlertid, at opløsningen på den anvendte transducer ikke var tilstrækkelig høj til at det var muligt at identificere ovariet og opmåle arealet. Det blev derfor opgivet at anvende det transportable udstyr og i stedet blev ålene transporteret til KU-Life med henblik på at afprøve biopsiteknikken ved brug af 14 MHz transduceren.

I forbindelse med scanningen på KU-Life blev biopsier udtaget fra ovariet ved hjælp af ultralydsguidet finnålsaspiration. I forbindelse med scanning og prøvetagningen af oocytter blev ålene bedøvet med benzokain som ved de tidligere ultralyds- og CT scanninger. Efterfølgende blev ultralydstransduceren placeret 3 cm kranialt for gattet, og guidet ved hjælp af ultralydsbilledet, blev en steril 21 g kanyle stukket ind i gonaderne. For at udtage oocytter var det nødvendigt at aspirere prøven ved hjælp af undertryk. Dette kunne opnås ved at koble en sprøjte på kanylen og påføre et undertryk svarende til ca. 1 ml luft.

I starten af hunnernes modningsforløb var succesraten for disse oocyt aspirationer svingende, trods det faktum at det var muligt at visualisere gonadevævet via ultralydsscanningen. Succesraten øgedes ikke ved at øge undertrykket, hvormed oocytterne blev udtaget, tværtimod blev oocytterne ødelagt. Senere i modningsforløbet blev det muligt i de fleste tilfælde muligt at udtage oocytter, og proceduren er skånsom for dyrene, så en videreudvikling af proceduren vil reducere antallet af dyr, der skal aflives med henblik på dissektion.

Det er derfor fortsat projektgruppens ønske, at finde et egnet ultralydsudstyr udstyr, der kan anvendes til at identificere de mest velegnede hunåler og følge udviklingen. Ligeledes vil man gerne arbejde videre med at udvikle den skånsomme biopsimetodik til brug i løbet af modningsforløbet. Der er derfor søgt om FIUF-midler her til i et supplerende projekt: ROE III LC.

## 13 Konklusioner og fremtidsperspektiver

*Af Jonna Tomkiewicz og Henrik Jarlbæk*

Overordnet må det konstateres, at projekterne ROEII og ROEIIB har været særdeles succesfulde i relation til kunstig reproduktion af ål. I projektperioden blev det opnået at holde ålelarver i live i 5½ døgn, hvor den hidtidige ”verdensrekord” var på 3½ døgn opnået af et russisk forskerhold i første halvdel af 1980’erne. Ligeledes lykkedes det flere gange i projektet at gennemføre masseklækninger af larver.

Hovedformålene for ROE II blev også opnået:

- Kvaliteten af æg og larver blev forbedret væsentligt i forhold til resultaterne i ROE I.
- Viden og erfaring med hensyn til kunstig reproduktion af den europæiske ål er blevet systematiseret og dokumenteret blandt andet med nærværende rapport.

- Ultralydsscanning og histologiske metoder er blevet implementeret i forbindelse med vurdering af moderfisk og deres kønsprodukter.

Særlige milepæle og produkter omfatter:

Etablering af forsøgsanlæg: I løbet af august-september 2005 blev der etableret de forsøgsenheder på Lyksvad Fiskefarm, der muliggjorde gennemførelsen af ROE II og ROE IIB. Modningsanlæggene, som er leveret og opbygget af Billund Aquakulturservice har fungeret yderst tilfredsstillende, dog har erfaringer med æg og larver i ROEII, IIB og ROE III vist, at det vil være hensigtsmæssigt at foretage mindre ændringer i inkubations- og larverum. Der er ansøgt om midler til disse ændringer i ROE III LC, en ansøgning indsendt til DFFE i efteråret 2007.

Der er i projektperioden udviklet specialfoder til moderfisk, hvorved det er lykkedes at manipulere fedtsyresammensætningen hos opdrættede ål således, at den ligner de vildtlevende åls. Dette specialfoder har med stor sandsynlighed væsentligt til de gode resultater, der blev opnået i ROE II, ROE IIB og senere i ROE III, hvor det lykkedes at få larver, der levede i 12 dage og dermed gennemlevede blommesækstadiet.

Der er udviklet systematiserede protokoller, som er testet og anvendt til at forbedre metoden. Dette inkluderer forbedrede protokoller til befrugtning og inkubation af æg og larver. I forsøgsrækken anvendtes i begyndelsen kunstigt fremstillet saltvand i forbindelse med befrugtning og ægudvikling. Forsøgene viste imidlertid, at det perivitelline rum, som naturligt udvikles for at give plads til fostrene inde i æggene, kræver naturligt havvand i forbindelse med befrugtning. Æggene i de to tidligere studier (de russiske og ROE I), hvor det lykkedes at klække æg og få larver, havde ikke perivitellint rum, og det er således første gang, at udviklingen af naturligt udseende æg fra den europæiske ål beskrives. Ligeledes er det første gang, at det er lykkedes at opnå gentagne masseklækninger, samt at opnå ålelarver, der har levet så længe dvs. 2 døgn længere end den tidligere rekord.

Der er i projekterne udviklet en række metoder, der anvender state-of-the-art viden og teknologi. Det gælder såvel histologiske metoder, ultralydsscanning og CT-scanning som med stor præcision kan beskrive udviklingen. Kombinationen af disse metoder med fedtsyreanalyser giver en værdifuld indsigt i den usædvanlige morfologi og fysiologi hos ålene, som det er nødvendigt at have indsigt i hvis det skal lykkes at reproducere ål i fangenskab. Et naturligt næste trin vil være at kombinere disse metoder med molekylærbiologiske teknikker til studier af de komplicerede hormonale mekanismer, der forårsager hæmningen af ålens udvikling og antagelig også er årsagen til de store forskelle i respons på hormonbehandlingen hos hunnerne. I denne sammenhæng er udvikling af den non-invasive metode en stor fordel både fordi det er muligt at følge det enkelte individ og fordi det reducerer antallet af forsøgsdyr.

Projektet har modtaget stor opmærksomhed internationalt på grund af de ekstraordinært gode resultater, og derigennem er der også etableret et stort internationalt netværk. I projektperioden er der således etableret kontakt til ledende hollandske og franske åleforskere herunder koordinatoren for det internationale EU-projekt EELREP. Flere af projektgruppens deltagere besøgte de hollandske kolleger, ligesom franske og hollandske forskere har besøgt forsøgsanlægget i Danmark. Efter den internationale omtale af projektresultaterne blev projektgruppen kontaktet og fik besøg af new zealandske forskere, der arbejder med to australske ålearter. Udveksling af ideer og resultater er fortsat ind i ROE III perioden, og de danske projektdeltagere er inviteret til at besøge et nyt forsøgsanlæg etableret i New Zealand i 2007.

De mange gode resultater opnået i projektet har resulteret i et stort antal artikler til publikation i populærvidenskabelige og internationale tidsskrifter, indlæg på konferencer og møder, samt omtale i medierne (Kapitel 14 og 15). Projektets faglige erfaringer og resultater føres videre i projektet ROE III, som er bevilget af RUFF under Havforskningsprogrammet 2006, som fortsætter frem til september 2008

Der allerede opnået særdeles gode resultater i ROE III, idet det er lykkedes at få larver til at gennemleve blommesækstadiet. Dette er et gennembrud, idet det viser at den anvendte metode udviklet i ROE I - III kan anvendes til at producere larver af den europæiske ål. Udfordringen er nu få æg og larver til at gennemleve foster- og blommesækstadiet i større antal, sådan at det bliver muligt at udføre forsøg med fodring af larverne. Samtidig er der stadig behov for at forbedre modnings- og befrugtningmetoder således at flere hunner gennemfører forløber, at æg og sæd kvaliteten øges og befrugtningssuccesen øges.

Mange forskere har i tidens løb forsøgt at reproducere ål i fangenskab. En væsentlig årsag til, at det er lykkedes så godt i de danske projekter, skal utvivlsomt findes i det faglige samspil mellem forskere og erhvervet (Kapitel 2). I projektet komplementerer forskellige fagområder og eksperter hinanden, hvilket giver en meget professionel og effektiv tilgang til en problemløsning. Der vil vedblive at være behov for at inddrage nye eksperter i arbejdet. Det gælder både med hensyn til forbedring af modningsmetoder, hvor molekylærbiologi vil være et oplagt værktøj til analyse og videnopbygning, såvel som identifikation af egnede opvækstbetingelser og foder til larverne. Udviklingen af foder er en udfordring i sig selv, idet det ikke vides hvilke føde larverne ernærer sig af i naturen.

I fremtidigt projekter vil det således være hensigtsmæssigt at indgå i et internationalt samarbejde idet de nødvendige eksperter for en stor del findes i Europa. Projektdeltagerne i ROEII og IIB har således også medvirket til en EU-ansøgning, PRO-EEL med det formål at integrere den til rådighed værende viden og ekspertise. Set i lyset af den svigtende rekruttering af den europæiske ål er det vigtigere nu end nogensinde at arbejde mod en kontrolleret produktion af glas ål i fangenskab, både med henblik på at sikre erhvervet og på at bevare den truede europæiske ål.

## 14 Formidling af resultater

Af *Jonna Tomkiewicz*

### 14.1 Præsentationer nationalt og internationalt

- Tomkiewicz, J., Lauesen, P., Graver, C. og Jarlbaek, H. 2006. Oogenesis and maturation of European eel induced by hormonal treatment. *Workshop on Gonadal Histology of Fishes New Orleans, USA, 11-12 juli 2006.*
- Tomkiewicz, J., Støttrup, J., Jarlbæk, H., Munk, P., Lauesen, P., Graver, C., McEvoy, F., & Svalastoga, E. 2007. Kunstig reproduktion af europæisk ål. 14. *Danske Havforsker møde. Syddansk Universitet, Odense, 23-25 januar 2007.*
- Tomkiewicz, J., Støttrup, J.G., Munk, P., Lauesen, P., Graver, C. M., Jarlbaek H., Jacobsen, C., McEvoy, F., Svalastoga, E. L., Buelund and Schmidt, J. Successful production of European eel larvae. *Aquaculture Europe 2007 - European Aquaculture Society (EAS) Istanbul, Tyrkiet, 23-28 oktober 2007.*

### 14.2 Publikation i internationale videnskabelige tidsskrifter

- Nedenfor er vist er række artikler, der er ved at blive skrevet på baggrund af projektets mange og banebrydende resultater. Artiklerne vil blive sendt til førende internationale, censurerede tidsskrifter som nævnt efter titlerne på artiklerne.
- Støttrup, J.G., Jacobsen, C., Tomkiewicz, J., & Jarlbaek, H. Manipulation of essential fatty acid composition in reared European eel broodstock. *Aquaculture.*
- Tomkiewicz, J., Støttrup, J.G., Munk, P., Lauesen, P., Graver, C.M. and Jarlbaek, H., Jacobsen, C., and Schmidt, J. Artificial induction of maturation and production of larvae of European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture.*
- Tomkiewicz, J. Oogenesis of European eel induced by hormonal treatment. *Journal of Fish Biology.*
- McEvoy, F., Svalastoga, E.L., Buelund, L, Tomkiewicz, J, Jarlbaek, H. CT and ultrasound imaging anatomy of the European eel during artificially induced maturation. *Aquaculture.*
- Buelund, L, McEvoy, F., Svalastoga, E.L., Tomkiewicz, J, Jarlbaek, H. Monitoring fat mobilisation during artificially induced maturation in the European eel using computer tomography. *Aquaculture.*

### 14.3 Populærvidenskabelige artikler, rapporter m.v.

- Tomkiewicz, J. Kunstig befrugtning af ål og larver i massevis. *Fisk & Hav.* (manuskript indsendt 2007)

### 14.4 Posters

- McEvoy F.J., Tomkiewicz, J., Jarlbaek, H. and Svalastoga, E. Ultrasonography and CT of the European Eel: Potential applications in reproductive management. *The 2006 Joint Scientific Conference of the International Veterinary Radiology Association and the American College of Veterinary Radiology. Vancouver, Canada, august 2006.* Poster abstract er publiceret i: *Veterinary Radiology and Ultrasound, 2007, 48 (2): 185.*



## 15 Åleprojektets scrapbog

Af *Henrik Jarlbæk*

I den bredere offentlighed har projektet også vakt opmærksomhed.

Da projektet af DFFE blev bevilget støtte fra FIUF-midlerne, udsendte Danmarks Fiskeriundersøgelser en pressemeddelelse herom den 15. juli 2005. Nyheden blev efterfølgende bragt i en del danske medier:

- 2005-07- 16 *Ritzaus Bureau, Berlingske Tidende og Politiken*
- 2005-07- 17 *Fyens Stiftstidende, Vejle Amts Folkeblad, Viborg Stifts Folkeblad, Thisted Dagblad, Ringkøbing Amts Dagblad, Lemvig Folkeblad, Dagbladet Skjern-Tarm, Dagbladet Holstebro-Struer, Næstved Tidende og Sjællands Tidende.*
- 2005-07- 19 *123nu.dk, Lystfiskerforum, Internetnyhedstjeneste*
- 2005-08- 15 *Radioindslag i de lokale nyheder for DR-region Midt & Vest*
- 2005-08- 21 *Berlingske Magasin, feature-artikel om projektet*
- 2005-09 *Fiskerbladet, artikel om projektet*
- 2005-09 *Dansk Akvakultur, artikel i organisationens Nyhedsbrev*
- 2005-10- 24 *Kanal 99, DR's lokalradio i Vejle, nyhedsindslag om projektet*
- 2006-03- 21 *TV/MidtVest, 12 minutter lang udsendelse om projektet i serien Naturriget. I udsendelsen indgik også en "premiere" med en kort filmsekvens af den første ålelarve, der blev klækket i ROE-II.*

Den 6. juli 2006 blev der udsendt en pressemeddelelse fra projektet, hvori Danmarks Fiskeriundersøgelser fortalte, at det netop var lykkedes at holde larver af den europæiske ål i live i 4½ døgn, hvilket var en verdensrekord. Ligeledes blev det fortalt, at man i projektet, som de første nogensinde, havde opnået flere masseklækninger af europæiske ålelarver.

Denne pressemeddelelse vakte stor opsigt, både i den almindelige skrevne danske presse og i den del af den internationale presse, der beskæftiger sig med akvakultur:

- 2006-07-06 *Ritzaus Bureau, resume af DFU's pressemeddelelse samme dag*
- 2006-07-06 *Danmarks Fiskeriforening, Nyhed på foreningens Internetside*
- 2006-07-06 *TV/SYD + TV2Fyn, Jyllands-Posten, Politiken, Berlingske Tidende, Fyens Stiftstidende og BT bragte nyheden på deres Internetside*
- 2006-07-07 *Fiskemagasinet.dk, nyheden bragt på Internetside*
- 2006-07- 07 *Børsen, Resume af nyheden i avisen*
- 2006-07- 07 *Aquafeed.com, amerikansk Internetside, nyhedsomtale*
- 2006-07- 13 *Danafeed.dk, dansk fiskefoderfirma, nyhedsomtale*
- 2006-07- 14 *Fishfarmer-magazine.com, engelsk akvakulturside, nyhedsomtale*
- 2006-07- 14 *Fishupdate.com, engelsksproget fiskeriside, nyhedsomtale*
- 2006-07- 14 *Kyst.no, norsk Internetside, nyhedsomtale*
- 2006-07- 17 *BT.dk, nyhedsomtale (også omtalt 6/7 2006)*
- 2006-07- 21 *fis.com, engelsksproget Internetside, nyhedsomtale samt stor feature-artikel*

- 2006-07- 21 *fis.com*, hele DFU’s pressemeddelelse
- 2006-08- 02 *Dansk Akvakultur*, omtale i organisationens Nyhedsbrev
- 2006-08- 06 *Biomar.dk*, dansk fiskefoderfirma, artikel om nyheden
- 2006-08- 10 *Fiskeritidende*, forsideomtale + 2 artikler i avisen
- 2006-08 *Fish Farming International*, forsidehistorie

# fish farming international

An Informa Publication

Look for the 3 fish



They've got news for you

www.provimi-aqua.com

AUGUST 2006, Vol 33, No 8
THE FISH FARMER'S PAPER

**Takeover deal queried**  
page 6

**Molluscs Crab & Lobster**  
page 12

**Adelaide show preview**  
page 30

**Acui gets industry interested**  
page 38

**MEAL REPORT FARM GROWUP NEWS FISH VET'S DIARY MUSSEL TALK GOOD BUSINESS SHELLFISH SCENE**  
page 4  
page 8  
page 10  
page 18  
page 42  
page 46

## Eel project sets world record

**RESEARCHERS** in Denmark have succeeded in keeping larvae of the European eel (*Anguilla anguilla*) alive for five days – a world record.

Led by the Danish Institute for Fisheries Research (Difras), the project is also recorded a "first" in repeatedly achieving mass hatchings of this species in the laboratory.

Both feats represent breakthroughs in eel research, as it has proven extremely difficult to achieve hatching of the European eel in captivity.

The project's ultimate aim is to deliver eel fry both for aquaculture and wild fisheries, as in the absence of a successfully closed lifecycle, demand for juveniles – glass eels – from both sectors has put serious pressure on wild stocks.

Scientists at the research laboratory at Lykøvad Esfarm south of Kolding, where several pregnant eels are ready to spawn more eggs, hope, of course, to develop batches that live even longer.

"Every additional day and every additional hour contribute valuable knowledge of the European eel because the early life stages of this species have never been found in the wild," the researchers explained.

The previous record of 3.5 days was achieved by Russian scientists in the mid-1980s, when they succeeded in hatching many larvae from a single female, a so-called mass hatching.

Since then, there have been several failures European attempts, and it was only in 2002/03 that a preliminary Danish study succeeded again in hatching larvae, which led to the current attempt.

The project is working closely with the Danish industry, and the research team includes scientists from Difras, The Royal Veterinary and Agricultural University, Billund Akvakultur Service, The Danish Association of Eel Producers and Dana Feed.

■ More on this next month







World record in process (clockwise from top left): an eel larva emerging from the egg during the research; larva at four days (both photos); and at five days old

- 2006-08 *Dansk Akvakultur*, omtale i organisationens Nyhedsbrev af besøg fra DFFE på forsøgsanlægget på Lykøvad Fiskefarm
- 2006-09 *Fischmagazin*, tysk magasin, omtale af nyheden fra juli
- 2006- *Eurofish Magazine*, engelsk magasin, omtale af nyheden fra juli
- 2006-10 *Aquacultuur*, hollandsk akvakulturblad, omtale af nyheden fra juli
- 2006-10 *Fischer & Teichwirt*, tysk magasin, omtale af nyheden fra juli
- 2006-10 *FISH*, engelsk blad, artikel om nyheden fra juli
- 2006-12 *Blinker*, største tysksprogede lystfiskermagasin, 2 siders artikel
- 2007-03 *Hatchery International*, engelsksproget magasin, omtale af nyheden fra juli 2006

## Bilag I: Indledende litteratursøgning om kunstig modning af ål

*Af Christian Graver og Peter Lauesen*

### **Taksonomi**

Den europæiske ål *Anguilla anguilla* (L.) hører slægtsmæssig til klassen Actinopterygii (de strålefinnede fisk). Over ordenen Elopomorpha og ordenen Anguilliformes.

**Ordenen Anguilliformes består af 3 underordner:**

- Congroidei: 9 familier der bl.a. indeholder familien Congridae hvortil de store havål hører.
- Muraenoidei: 3 familier der bl.a. indeholder familien Murinidae hvortil murænerne tilhører
- Anguilloidei: 14 familier der bl.a. indeholder familien Anguillidae hvortil ålene hører.

Familien Anguillidae har systematisk gennemgået en del forandringer. En af de første meget grundige gennemgange af familien blev foretaget af Ege (1939). Ege beskriver ud fra morfometriske data 19 arter og subarter. Senere forfattere tager familien op til revision.

Lecomte-Finiger (2003) er den seneste af disse. Foruden morfologiske karakterer inkluderer forfatteren diverse biokemiske karakterer (transferiner, isoenzymer og DNA markører) i klassifikationen af familien.

Familien Anguillidae regnes i dag for at bestå af 15 arter. De to arter Europæisk ål: *A. A.* og den amerikanske ål: *A. rostrata* lever i det Atlantiske område. De øvrige 13 arter findes i Indo-pacific området. Blandt disse 13 arter findes den japanske ål: *A. japonica*.

Det er lykkedes at avle hybrider mellem *A. anguilla* og *A. japonica* Okmura (2004). Denne krydsning har ikke kun teoretisk interesse, men kan være interessant set i lyset af den store mængde af *A. anguilla* man finder i Japan Miyai (2004). Her vises en forekomst af op til 98 % af *A. anguilla* i den samlede ålebestand i visse floder. Disse ål stammer højst sandsynligt fra udsætninger af *A. anguilla* igennem de sidste 15 år. Grunden til disse udsætninger er, at Japanske glasålfiskere skal genudsætte en del af fangsten. Da prisen på glasål af *A. japonica* har været ca. 10 gange så høj som prisen på glasål af *A. anguilla* er disse blevet udsat i stedet.

### **Reproduktionsstrategi**

Alle arter af ål er indtil for nyligt anset for at være katadrome i deres reproduktionsstrategi. Det antages at gydning foregår i saltvand og opvæksten finder sted i ferskvand.

Nyere forskning tyder dog på en vis form for fakultativ katadromi, hvor ålene tilbringer hele deres livscyklus i saltvand., Ved at undersøge strontium forholdene i øresten hos *A. anguilla* og *A. japonica* , påviser Arai (2003) og Tsukamoto (1998, 2001), tre populationer: Én ren katadrom der vokser op i ferskvand, én der trækker

frem og tilbage mellem salt- og ferskvand og en ren saltvandsform. Den sidste form anses for at give et betydeligt tilskud til gydebestanden.

### **Gydeområder**

Placeringen af gydepladserne for de forskellige arter af ål, har været meget omdiskuteret.

For *A. anguilla* og *A. rostrata* definerer Schmidt (1922) et klart afgrænset område i det vestlige Atlanterhav, Sargasso havet. Denne definition af gydeområdet baserer Schmidt på fangster af præ-leptocephaler og leptocephaler i Atlanterhavet. Han kunne ud fra sine data bestemme områder, indenfor hvilke ålelarver har en vis størrelse. Ud fra sine iagttagelser af størrelserne på larverne, tegnede Schmidt de berømte koncentriske ringe i Sargasso havet.

Boëtius og Harding (1985 a,b) indlægger alle præ-leptocephaler/leptocephaler fanget af danske skibe indtil 1966 i en database. De får herved nogle muligheder som Schmidt aldrig havde for at analysere sine egne data. I alt ca. 19.800 leptocephaler fordelt på 1.564 træk på 556 stationer med leptocephaler er indlagt i databasen. Forfatterne konkluderer blandt andet, at gydeområdet for de to arter formodentlig strækker sig i et bælte tværs over Atlanterhavet d.v.s. at det er afgrænset i nord/syd retningen, men der er ikke belæg i data for en øst-/vestlig afgrænsning.

Gydeområdet for den japanske ål *A. japonica* er beskrevet af mange forfattere. Tsukamoto et al. (2003) analyserer alle data fra 1967 til 1998 for larver af den japanske ål. I artiklen placeres gydeområdet vest for den Vestlige Marianer Bjergryg 2-3000 km fra ålens opvækstområde. Den Vestlige Marianer Bjergryg er placeret i den nordlige ækvatorialstrøm i den vestlige del af det nordlige Stillehav.

Miller et al. (2002) placerer gydeområdet for *A. marmorata* på stort set samme plads som gydeområdet for *A. japonica*. I modsætning til *A. japonica* formodes *A. marmorata* at gyde over hele året.

Mange forfattere har påpeget vanskelighederne for ålen, i at finde hinanden, i de meget store havområder der er tale om. De meget få fangster, der er af blankål i det åbne hav, tyder ikke på at de vandrer i stimer.

Edel (1975) og Boëtius (personlig oplysning) beskriver begge en kraftig odør fra kønsmodne ål. Denne lugt må formodes ikke at være tilstrækkelig til at ålene, over store afstand, finder sammen.

Fricke og Tsukamoto (1998) fremfører en teori om, at gydepladserne for anguilliderne er knyttet til undersøiske bjergmassiver. I gydeområdet for *A. anguilla* findes bl.a. en undersøisk bjergtop ”Echo Bank”, 62 meter under havoverfladen, ca. 450 km nordøst for Bermuda og andre undersøiske bjergmassiver nær Antillerne. Disse anses af forfatterne som sandsynlige gydepladser for *A. anguilla*

Fricke og Tsukamoto’s teori understøttes af Tsukamoto et al. (2003), der endog sætter navne på tre undersøiske bjergtoppe i den Vestlige Marianer Bjergkæde.

## **Gydetidspunkt og -dybde**

Da der aldrig er fundet gydemodne *A. anguilla* i Sargasso havet kan gydetidspunktet og dybden hvori ålen gyder, kun estimeres ud fra årstiden og dybden, hvor de mindste larver forekommer. De fleste små larver findes i februar.

Schmidt (1929) antager, at dybden hvor ålene i Sargasso havet gyder, ligger mellem 200 og 500 meters dybde, idet han her finder de mindste larver (larver med blommesæk og præ-leptocephaler). Større larver (7-15 mm) findes på dybder fra 75 til 300 meter, hvor temperaturen er omkring 20 °C. De største larver findes mellem overfladen og 50 meters dybde.

Boëtius og Boëtius (1967) angiver en optimal temperatur på ca. 20 °C for kunstig kønsmodning af hanål. Samtidig skriver de, at denne temperatur findes på 100 til 200 meter i Sargasso havet. Det har ikke været muligt at finde kilder, hvor kønsmodning af hunner er blevet prøvet over et temperaturområde. Pedersen (2003) anvender, 20 °C ved kønsmodning af hunål mens Boëtius og Boëtius (1980) udfører deres forsøg ved ca. 23 °C.

Æg i naturen af *A. anguilla* og *A. rostrata* er ikke beskrevet, derimod beskriver bl.a. Aoyama et al. (2001) æg af *A. japonica*.

Tsukamoto (2003) sammenkæder den naturlige gydning i havet med månefaserne. Som ved blankålstrækket, er det i månens sidste kvarter før nymåne, at dette skulle foregå. Ved hjælp af ekkolod finder de på 230-250 meter vand, i nærheden af de undersøiske bjerge hvor *A. japonica* formodes at gyde, store samlinger af fisk om aftenen 2 dage før nymåne. Det lykkedes ikke at identificere disse fisk som *A. japonica*

## **Drift af leptocephaler og metamorfose**

Leptocephalstadiet hos ål er meget karakteristisk for de anguilliforme fisk. De er kendetegnet af det høje pilebladsformede udseende. Morfologisk er det meget svært at skelne de enkelte arter imellem. Deres tarm er kun lidt udviklet og deres fødevalg er stærkt omdiskuteret. Der er to overordnede teorier om hvorledes de ernærer sig. Den ene går ud på formodning om at de optager opløste organiske komponenter gennem epidermis. Den anden bygger på at de lever af detritus. Leptocephalerne har et højt indhold af glycosaminoglycaner, der anvendes under metamorfosen. Vandindholdet er op imod 90 %, hvilket hjælper med at lette opdriften, og deres metaboliske rate er meget lav. Ionkompositionen i leptocephalerne er meget lig den, der findes i havvand. Lecomte-Finiger (2004).

For *A. anguilla* beskriver Schmidt (1922), efter behandling af sine data, at der i Atlanterhavet findes tre overordnede størrelsesgrupper af ålelarver: gruppe 0, I og II (undertiden findes disse grupper i det samme træk med nettene.). Det fører til konklusionen at leptocephalerne må være 2 til 3 år gamle inden de når Europas kyster, hvor de metamorfoserer til glasål. Denne konklusion på tre år har stået uimodsagt i mange år og er stadig gældende hos mange.

Boëtius og Harding (1985a,b) påviser at Schmidt's slutning om en treårig leptocephal fase baseres på en fejlfortolkning af data. Der er tre størrelsesgrupper af leptocephaler, men om den midterste, der er mellem 40 og 50 mm, skriver forfatterne.

*”It is important to note that this group, typically 40-45 mm in length, which can be found at any time and at any place within the Sargasso Sea, cannot, by the very description of their occurrence, participate in the larval growth curve according to Schmidt”.* Boëtius og Harding konkluderer, at den ovennævnte gruppe, som de benævner ”Tramps” må være en ”rejsestørrelse” inden drift imod Europa/det amerikanske kontinent. De mener, at data giver grundlag for at slutte, at glasålene ikke er mere end 12 til 15 måneder gamle, inden de når de europæiske kyster. Lecomte-Finiger (1992) beskriver et forløb på ca. 1 år. Arai (2000) anvender otolith mikrostruktur og mikrokemi og finder at leptocephaler af *A. anguilla* driver mellem 163 og 235 dage. Efter denne tid går der mellem 18 og 52 dage med metamorfosen fra leptocephal til glasål. Det skulle give en total drifttid inden de går op i ferskvand ved Portugals kyst på mellem 220 og 281 dage.

Leptocephaler af *A. rostrata* er noget kortere tid undervejs. Deres samlede drifttid, til de når op i ferskvand som glasål, er mellem 171 og 252 dage. Tiden for metamorfosen er som hos *A. anguilla* 18 til 52 dage

Schmidt (1922) angiver drifttiden for *A. rostrata* til 10 til 12 måneder. Kleckner og McCleave (1985) reducerer tiden for driften til 8 til 12 måneder og Wang og Tzeng (1998) reducerer den yderligere til 7 til 9 måneder Disse forfattere anvender målinger af calcium/strontium forholdet i øresten hos leptocephaler/ glasål samt tælling af dagringe.

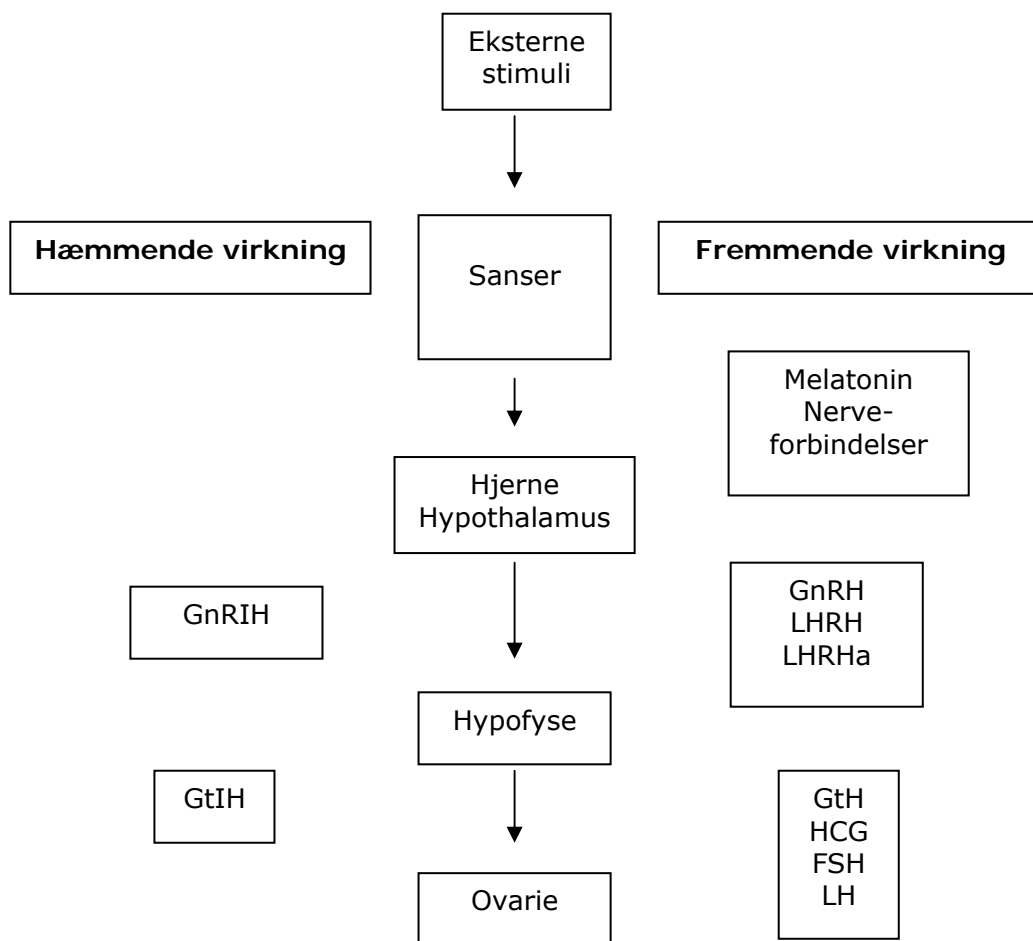
### ***Introduktion til hormoninteraktioner i fisk***

I det foregående afsnit har der været fokuseret på, hvad der gennem tiderne er opnået af viden om ålen i dens naturlige omgivelser. Da ålens færden under selve formeringen fortsat er en gåde, og da opdræt af ål efterhånden har en ganske stor interesse som følge af, at de naturlige fangster af såvel glasål som udvoksede ål falder drastisk, er det kun selvfølgelig, at der efterhånden er stor interesse i at forsøge at modne og formere ål i fangenskab. Før de mere specifikke forsøg med ål skal gennemgås, er det dog nødvendigt med en kort generel gennemgang af de vigtigste hormon interaktioner, der er involveret i forbindelse med modning og gydning

### ***Hormoninteraktioner i fisk generelt***

Hos de fleste fiskearter indtræder kønsmodningen når individet når en vis alder og/eller størrelse. Hvis der er tale om en art, der gyder i flere på hinanden følgende år, er gydningen normalt styret af eksterne faktorer, såsom ændringer i lys og temperatur. Disse påvirker igen en i fisken forekommende endogen rytme, der findes nedarvet i individet og som kommer til udtryk, hvis fisken holdes under helt konstante forhold. Normalt foregår modningen af fiskene under indflydelse af både de eksterne faktorer og den endogene rytme.

**Forenklet beskrivelse af hormon interaktioner ved modning af åleovarier**



Det hænder dog af og til, at det sidste trin, som omfatter ovulation og gydning ikke forløber trods en vellykket modning. Der kan mangle den/de eksterne påvirkninger, der udløser dette. Her kan man erstatte denne/disse stimuli ved at give en til flere injektioner med hormon, som stammer fra enten hjerne – hypofyse niveau Gonadotropin hormone releasing hormone (GnRH) eller på hypofyse - ovarie niveau hvilket kaldes gonadotropin (GtH). Herved kan man på en lidt grov måde erstatte den manglende påvirkning fra omgivelserne med et injiceret hormon. Nu kan gydningen forløbe i løbet af få dage til en uge. Afgivelsen af et modningshormon kan også være under indflydelse af et andet hormon, der blokerer dets frigørelse. Ved fjernelse af det blokerende hormon, vil det aktuelle hormon afgives i naturlig form. Interaktioner mellem hormoner i kønsmodne fisk, er undersøgt ganske grundigt og anvendes bl.a. til at inducere gydning hos en række fisk af interesse for akvakultur. I ovenstående figur ses en skitse over nogle af de hormoner, der er involveret i ovarie modning og gydning (Moksness 2004)

Til induktion af ovulation og gydning anvendes ofte HCG, som virker mellem hypofyse – ovarie, eller LHRH, som virker mellem hypothalamus og hypofyse. Ofte anvendes en analog (LHRHa), som er vanskeligere nedbrydelig end den almindelige LHRH og derfor er virksom ved lavere koncentration over en længere periode.

### **Hormoninteraktioner i ål**

Hos ålen ser det ud til, at hormonsystemerne i modnings- og gydeperioden er identiske med, hvad der findes hos andre benfisk. Der er dog den forskel, at ålen, i perioden hvor den opholder sig i ferskvand, og indtil den forlader kysten som blankål, kun når en modning, der svarer til smoltificerings stadiet hos laks, altså puberteten. Den egentlige kønsmodning finder sted under vandrings til gydepladsen. Som mål for hvor moden en ål er, anvendes det gonadosomatiske index GSI. GSI er udtrykt som ovariets vægt i procent af ålens totale vægt. Durif (2005) fandt ved undersøgelser af europæiske blankål fanget ved de franske kyster et GSI på 1,2 – 2 %. Til sammenligning kan GSI for den japanske blankål (*A. japonica*) nå op på 4 % og for den New Zealandske ål (*A. diffebachia*) i blank form endnu højere, før de forlader kysterne.

Hvis ål skal producere æg og sæd i fangenskab, er man derfor, i modsætning til forholdene hos de fleste andre fiskearter, nødt til at starte med at kønsmodne både han- og hunål, hvilket er en længerevarende proces end blot induktion af ovulation og gydning.

### **Modning af hanål**

Hanål er forholdsvis lette ad modne. Det gøres ved en ugentlig injektioner af HCG i en koncentration 250 IU/ål (vægt ca. 80 g/stk) Boëtius (1967). Sæd kan afstryges efter ca. 70 dage. Ved fortsatte ugentlige HCG injektioner kan sædproduktionen vedligeholdes i over 1 år. Forsøg viste dog i tillæg, at modning også kunne opnås ved injektion af en dosis på 100 IU/ hanål hver tredje uge. Det konkluderes dog, at injektioner med 250 IU/ål må anbefales for at sikre en stabil sædproduktion.

Benedikte Pedersen anvendte 200 IU/fisk for fisk i størrelsen 93 – 149 g Pedersen (2003). Hos den japanske ål fandt Ohta (1996) at injektion af 1 IU/g hanål inducerede produktion af sæd efter 10 uger.

### **Modning af hunål**

Der er afprøvet flere metoder til at modne hunål. Bruun (1949), Møller Christensen (1956) samt Boëtius (1962) injicerede hun-blankål med HCG. Der blev ikke opnået fuld modning (GSI nåede kun 12,6). Senere injicerede Boëtius (1980) bl.a. tørret karp hypofyse i blanke hunål med en snitvægt på 800 g. Det lykkedes herved at modne ål ved anvendelse af karp hypofyse alene. Ved anvendelse af både karp hypofyse og HCG lykkedes det at inducere både modning (GSI sluttede ved 40 %) samt ovulation. Enkelte æg blev befrugtet, men døde under inkuberingen.

Fontaine arbejdede med at modne europæiske hunål ved brug af en LHRH analog. Modningen stoppede dog ved et GSI på 10 – 12 %. Bezdenezhnykh et al 1983. Prokhorchik 1986, 1987 har haft succes med modning af ål hormon til gydning.



### Japanske ål

Satoh (1992) modnede hunner af den japanske ål (*A. japonica*) ved brug af Synaphorin, DES-Na sammen med acetonetørret fiskehypofyse. Befrugtede æg blev først opnået ved injektion af syntetisk LHRH som slutmodningshormon.

Flere japanske forsøg med den japanske ål har med succes anvendt laksehypofyse ekstrakt (SPE) til modning af oocytter op til ca. 800µm, efterfulgt af injektion af 17,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) på rette tidspunkt for ovulation og gydning Ohta (1997), Kagawa (1997), Tanaka (2001), Tanaka (2003). Denne metodik resulterede i større mængder befrugtede æg og levedygtige larver. Ohta (1997) fandt, at feminiserede hunner af den japanske ål efter injektion med DHP kunne gyde naturligt hvis hanner og hunner blev bragt sammen. Kagawa (1997) fandt, at injektion af 2 mikrogram (DHP) udløste ovulation hos blankål, der i forvejen var modnet med SPE. Ovenstående metodik med injektion af 20 mg SPE i bughulen over nogle 11 – 12 uger, efterfulgt af injektion af DHP i bughulen på det rette modningstidspunkt, inducerede ovulation og naturlig gydning, samt befrugtede æg Ohta (1997). Disse æg blev afstrøget og befrugtet med sæd opløst i kunstig fremstillet sædvæske.

### Europæiske ål

Pedersen (2004) forsøgte samme metodik på den europæiske ål. Her opnåedes modning efter 16 – 23 ugers ugentlige injektioner med SPE i en dosis på 18,2 mg SPE/hun ål/uge og gydning efter en injektion med DHP i en koncentration på 2 mikrogram/g kropsvægt. Størrelsen af hunålene lå over 571 g ved forsøgets begyndelse. Hunnerne blev afstrøget manuelt, og befrugtet med afstrøget sæd. Befrugtede æg blev opnået, men kun meget få larver klækkedes og levede få dage. Pedersen fandt, at den europæiske ål var væsentlig vanskeligere at arbejde med end den japanske ål. Dette skyldtes, at modningen af oocytter hos den europæiske ål skete meget forskelligt de enkelte hunål imellem. Derfor krævede hver hunål sin egen protokol.

Van Ginneken (2005) og Palstra (2004) modnede ligeledes den europæiske ål efter den nævnte metode med SPE og DHP. De opnåede ovulation og både afstrygning og naturlig gydning blev afprøvet Van Ginneken (2005). Det sidste med meget fint gydningresultat, dog opnåedes kun få befrugtede æg.

Bezdenzhnykh et al (1983) og Prokhorchik (1986, 1987) havde ligeledes succes med at producere befrugtede æg af den europæiske ål. Larver blev klækket, men overlevede desværre ikke længere end 3,5 dage.

### Australske ål

En lignende metodik blev anvendt til modning af *A. australis* og *A. diffebachii* Lokman (2000). Modning hos disse arter indtraf allerede efter 4 – 19 uger, hvorefter modningshormonet 17 hydroxyprogesterone (tilsyneladende ikke DHP) kunne injiceres. Den korte tid for modningen kan ses i lyset af, at blankål af disse arter er væsentlig mere modne, når de optræder som blankål.

## ***Konklusion vedr. behandlingsmetoder beskrevet i litteraturen***

### **Blankål-hunner**

Blankål-hunner modnes med bedst resultat, hvis ålene har største grad af ”blankhed” (Måles på øjnenes størrelse, finnelængde, GSI, individstørrelse m.v.). Endvidere er det vist for den japanske ål at respons på hormon øges ved ophold i saltvand Kagawa (1998). ”Blankhed” kan bestemmes ved de målemetoder som bl.a. er opstillet af EELREP gruppen, *EELREP summary and recommendations* (2005). Det ser ud til, at jo større blankheds indeks, des mere påvirkelig er ålen for SPE.

Japanske ål kan findes langs kysterne med et GSI på 4 %, men til induktion af gydning anvendes ofte fisk med et GSI på 1 – 2 % Tanaka (2003), hvilket er samme GSI, som findes hos den europæiske ål i blank tilstand

Den mest beskrevne metodik i litteraturen har indtil videre været ugentlige injektioner med SPE 20 - 30 mg/kg, som kombineret med DHP har været mest virksomt til modning og vitellogenese. Da det virker, bruger alle denne metode. Formodentlig kan andre metoder også anvendes med fornuftigt resultat. Når oocyterne når en vis størrelse (ca. 800µm), påbegynder vandringen af cellekernen. På dette stadie er det vigtigt at injicere hormonet DHP på det rigtige tidspunkt, hvorefter GVBD og ovulation finder sted. Varighed: 7,5 – 11,5 uger

### **Blankål-hanner**

Blankål hanner modnes ved ugentlige injektioner med 1 – 2,5 IU/g HCG. Sædproduktion finder sted efter ca. 8 uger.

### **Modning og gydning**

Modning og gydning finder for den japanske ål bedst sted ved 21 – 22 grader C (18). Ved temperaturer på 18 – 20 grader C forekom naturlig gydning ikke, og æg afstrøget ved denne temperatur kunne ikke befrugtes.

### **Befrugtning**

Æg kan afstryges og forsøges befrugtet kunstigt, men japanske (Tanaka (2001)) og hollandske forsøg (Van Ginneken (2005)) viser, at befrugtede æg kan opnås ved at lade fiskene gyde naturligt. Metoden er effektiv for den japanske ål, men indtil videre mindre effektiv for den europæiske ål (kun få levedygtige æg opnået).

Da den europæiske ål synes at minde en del om den japanske ål, og da de 2 arter ligefrem kan krydses Okmura (2004) (Europæisk han og japansk hun), kan det være et indicium på, at de 2 arter er meget lig hinanden og derfor må formodes, at kunne behandles efter nogenlunde samme protokol.

### **Larveopdræt**

Det er indtil videre kun lykkedes at opfodre larver af den japanske ål. Her er man til gengæld nået helt til glasålsstadiet. Opdrættet skete ved 22 – 23 grader C og 32 – 35 promille salinitet. Tanaka et al (2001, 2003).

Tanaka beskriver hvorledes det var lykkedes at få nyklækkede ålelarver til at spise et vådfoder bestående af frysetørret hajæg-pulver og sojabønne peptid. Dette produkt blev fra dag 8, hvor blommesækken var opbrugt, blandet op i vand og i pasta-konsistens lagt på bunden af larvetanken i små mængder. Efter dag 16 blev der skiftet til et mere fast foder baseret hovedsagelig på krill-mel tilsat vitaminmix, samt de tidligere nævnte ingredienser. Alle ingredienser kan købes kommercielt i Japan (dog er den pågældende hajart nu ved at være truet af udryddelse). Der blev fodret 5 gange dagligt. Efter hver dags femte fodring blev larverne overført via hævert til en ren tank. Overlevelsen var 0,5 – 2 % på dag 100. Interessant er det dog, at det på et tidligere tidspunkt lykkedes forfatterne at få larverne til at spise hjuldyr, som er et meget anvendt foder til de fleste marine fiskearter. Hjuldyr viste sig dog hurtigt i at resultere i dårlig vækst og stor dødelighed, men de blev spist. Her kan der muligvis arbejdes med en særlig berigelse af disse som et fremtidigt mindre forurenende foder. Tanaka beskrev senere (Tanaka 2003), hvorledes det nu var lykkedes at nå glasåls stadiet 250 – 270 dage efter klækning. Det konkluderes dog, at selv om drømmen om produktion af mange japanske ålelarver er gået i opfyldelse, så halter teknikken på en del områder, såsom ægkvalitet, overlevelse, vækstraten for larverne i laboratoriet sammenlignet med de naturligt forekommende.

## **Bilag II: Review af viden om ultralydsscanning af fisk**

*Af Fintan McEvoy*

### ***Sex determination and maturational status***

Gonad imaging using ultrasound is widely applied and has been reported in salmon (Martin et al. 1983), rainbow trout Atlantic cod (Davie, Porter & Bromage 2003), halibut (Shields et al. 1993), *Hippoglossus hippoglossus* (Linnaeus), mature winter *Pleuronectes americanus* (Walbaum), yellowtail flounder, *Pleuronectes ferruginea* (Storer) and mature haddock, *Melanogrammus aeglefinus* (Linnaeus) (Martin Robichaud, Rommens 2001) and striped bass (Jennings, Will & Reinert 2005).

Sexing immature fish is more problematic than monitoring ovarian development. It is commercially advantageous to make an early determination of sex especially in larger species such as halibut, which are being commercially farmed and where the production of broodstock requires a high input. Thus early scanning when the gonads are small in size is required for sexing applications. In addition any such test must be non-invasive economical to perform and have a high specificity. One study in adult striped bass reports that sex determination in broodstock had a 95 % accuracy throughout the breeding season. However, in the same study juvenile hybrid striped bass could not be reliably sexed using ultrasound. (Blythe et al. 1994).

Monitoring ovarian development in contrast is less demanding. Ovarian enlargement is marked during maturation and cross sectional measurements correlated with the maturational status of fish and maximum ovary diameter was highly corre-

lated with oocyte diameter. In the male it was shown that testis diameter was larger in the spermiating male than in the non-spermiating male (Blythe et al. 1994).

### ***Technical aspects***

Some authors (Jennings, Will & Reinert 2005) have looked at the technical aspects of the ultrasound examination. B-Mode ultrasound is real time; images appear instantaneously on screen and are rapidly updated, twenty times or more per second. This makes it an interactive modality, the transducer and be realigned to produce the best image possible. Images can be recorder on digital clips of 60 or so frames (large file sizes), on video tape (analog) or as still compressed digital (JPEG) images for later analysis. Alternatively most units allow simple measurements (distance and area) to be made directly from the frozen screen image.

One aspect of technical specification that has been addressed is transducer design. Comparisons were made between curved array transducers which produced a “pie” shaped image and linear array transducers, which produce a rectangular image. The image from the curved array transducer is wider at its extremity than it is near to the transducer; this allows a single image to enclose cross sections that are wider than the physical width of the transducer. Differences in transducer frequency have also been explored. In general high frequency transducers have greater spatial resolution than low frequency, all other things being equal. Frequencies examined were 3.5, 5.0, 6.0 and 8 MHz. Another aspect considered was the compatibility of images with image analysis software. No one transducer could be considered best and the point is made that one must be clear what one requires from an imaging system, detailed anatomy, ease of use in the field or image size. (Jennings, Will & Reinert 2005) when making machine and transducer selections.

There are few reports of the use in fish management of transducers of the frequency (14MHz) used in the eel study in this report. High frequency transducers have the property of providing high resolution and are typically available on larger fixed ultrasound units. The level of detail obtained is not required for simple measurements such as ovarian cross sectional area and body wall thickness, so it is clear that similar results in eel are available using equipment more commonly used in field work.

### ***Ultrasound in the assessment of body composition***

In fat or semi-fat fish species such as halibut, an important factor in determining taste for the consumer is the fat content. Classically fish species are examined destructively for fat content by dissection followed by chemical analysis. Non destructive alternatives, and often those provided by imaging such as CT are always of interest to the industry (Kolstad et al. 2004). Ultrasound too has been used in catfish in this respect (Bosworth, Holland & Brazil 2001). These authors used sequences of transverse images of the fish to make measurements of muscle area and so were able to predict the meat yield in live fish.

Certain disease processes result in structural changes that are readily detected on ultrasound. Cyst formation within muscle as a result of protozoa in salmon has be

monitored using ultrasound (Boyce 1985). Using a 10MHz probe difference in acoustic properties between the fish meat and sealworms has been used to detect sealworm in fish fillets up to 4 cm deep (Hafsteinsson et al. 1989). Heart disease in farmed Atlantic salmon in Norway has been extensively investigated using ultrasound (Sande, Poppe 1995).

## Bilag III: Anvendt litteratur

- AOCS Official Method Ce 1b-89. Fatty Acid Composition by GLC. Marine Oils. AOCS Champaign, IL. 1998.
- AOCS Official Method Ce 2-66. Preparation of methyl esters of fatty acids. AOCS Champaign, IL. 1998.
- Aoyama, J., Ishikawa, S., Otake, T., Mochioka, N., Suzuki, Y., Watanabe, S., Shinoda, A., Inoue, J., Lokman, P.M., Inagaki, T., Oya, M., Hasumoto, H., Kubokawa, K., Lee, T.W., Fricke, H., Tsukamoto, K. 2001. Molecular approach to species identification of eggs with respect to determination of the spawning site of the Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish. Sci. 67, 761-763.
- Arai, T., Otake, T., Ohji, M., Miller, M.J., Tsukamoto, K., Miyazaki, N. 2003. Occurrence of sea eels of *A. japonica* along the Sanriku Coast of Japan. Ichthyol. Res. 50, 78-81.
- Arai, T., Otake, T., Tsukamoto K., 2000. Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels *Anguilla rostrata* and *A. anguilla*, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. Marine Biology 137, 39-45
- Bligh, E.G., W.J. Dyer (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-917.
- Blythe, B., Helfrich, L.A., Beal, W.E., Bosworth, B., Libey, G.S. 1994, "Determination of sex and maturational status of striped bass (*Morone saxatilis*) using ultrasonic imaging", Aquaculture, vol. 125, no. 1-2, pp. 175-184.
- Boëtius, I. 1990 Preliminary report on the occurrence of *Anguillicola* in some Danish fresh- and seawater areas.. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie. Berlin. Vol. 75, no. 6, . 889.
- Boëtius, I., Böetius, H., 1967. Eels, *Anguilla rostrata*, LeSueur, in Bermuda. Vidensk. Medd. Dansk. Naturhist. Foren. no. 130, 63-84.
- Boëtius, I., Boëtius, J. 1985. Lipid and protein content in during growth and starvation. Dana Vol. 4, 1-17.
- Boëtius, I., Boëtius, J. 1989. Ascending elvers, *Anguilla anguilla*, from five European localities. Analyses of pigmentation stages, condition, chemical composition and energy reserves. Dana.. Vol. 7, 1-12.
- Boëtius, I., Boëtius, J., 1967. Studies in the European Eel, *A. anguilla* (L.). Eksperimental induction of the male sexual cycle, its relation to temperature and other factors. Medd. Dan. Fisk Havunders. 4(11), 339-405.
- Boëtius, I., Boëtius, J., 1980. Experimental maturation of female silver eels *A. anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. Dana, vol. 1, 1-28.
- Boëtius, I., Boëtius, J., Hansen, H.J.M. 1991 Studies on lipid synthesis by incorpora-

- tion of super(14)C-acetate during experimental maturation of silver eels, *Anguilla anguilla*. Dana. Vol. 9, 1-14.
- Boëtius, J. 1976. Elvers, *Anguilla anguilla* and *Anguilla rostrata* from two Danish localities. Size, body weight, developmental stage and number of vertebrae related to time of ascent. Medd. Dan.. Fisk. Havunders. no. 7, 199-220.
- Boëtius, J. 1977. Experimental Indication of Lunar Activity in European Silver Eels, *Anguilla anguilla* (L). Medd. Dan. Fisk Havunders.6(1), 1-6.
- Boëtius, J. 1980. Atlantic *Anguilla*. A presentation of old and new data of total numbers of vertebrae with special reference to the occurrence of *Anguilla rostrata* in Europe. Dana. vol. 1,. 93-112..
- Boëtius, J. 1985. Greenland eels, *Anguilla rostrata* LeSueur. Dana. Vol. 4. 41-48..
- Boëtius, J., Boëtius, I., Hemmingsen, A.M., Bruun, A.F., Møller-Christensen, E. 1962 Studies of Ovarial Growth Induced by Hormone Injections in the European and American Eel (*A. anguilla* (L.) and *A. rostrata* (Le Sueur)). Medd. Dan. Fisk Havunders.3 (7), 183-198.
- Boëtius, J., Harding, E.F., 1985a. A re-examination of Johannes Schmidt's Atlantic eel investigations. Dana, vol. 4, 129-162.
- Boëtius, J., Harding, E.F., 1985b. List of Atlantic and Mediterranean *Anguilla leptocephalis*: Danish material up to 1966. Dana, vol. 4, 163-249.
- Bosworth, B.G., Holland, M., Brazil, B.L. 2001, "Evaluation of ultrasound imagery and body shape to predict carcass and fillet yield in farm-raised catfish", Journal of animal science, vol. 79, no. 6, pp. 1483-1490.
- Boyce, N.P. 1985, "Ultrasound imaging used to detect cysts of *Henneguya salminicola* (Protozoa: *Myxozoa*) in the flesh of whole Pacific salmon", Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 42, no. 7, pp. 1312-1314.
- Davie, A., Porter, M.J.R., Bromage, N.R. 2003, "Photoperiod manipulation of maturation and growth of Atlantic cod (*Gadus morhua*)", Fish Physiology and Biochemistry, vol. 28, no. 1/4, pp. 399-401.
- Durif C., Dufour S. and Elie P., 2004. The silvering of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. Journal of Fish Biology 66, 1025 – 1043
- Edel. R.K., 1975. The induction of maturation of female American eels through hormone injections Helgol. Wiss. Meeresunters. Vol. 27, no. 2, 131-138
- Eelrep Project 2001 – 2005., Summary & Recommendations., Estimation of the reproduction capacity of European eel.
- Ege, V., 1939. A revision of the genus *Anguilla* Shaw. A systematic, Phylogenetic and Geographical Study. DANA – Report No. 16. 256 p.
- Fricke, H., Tsukamoto, K., 1998. Seamounts and mystery of Eel Spawning. Naturwissenschaften 85, 290-291
- Hafsteinsson, H., Parker, K., Chivers, R. & Rizvi, S.S.H. 1989, "Application of ultrasonic waves to detect sealworms in fish tissue", Journal of Food Science, vol. 54, no. 2, pp. 244-247, 273.
- Jennings, C.A., Will, T.A., Reinert, T.R. 2005, "Efficacy of a high- and low-frequency ultrasonic probe for measuring ovary volume and estimating fecundity of striped bass *Morone saxatilis* in the Savannah River Estuary", Fisheries Research, vol. 76,

- no. 3, pp. 445-453.
- Kagawa H., Iinuma N., Tanaka H., Ohta H., Okuzawa K. 1998. Effects of Rearing Period in Seawater on Induced Maturation in Female Japanese Eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science* 64(1), 77 – 82
- Kagawa H., Tanaka H., Ohta H., Okuzawa K., Iinuma N. 1997. Induced Ovulation by injection of 17,20 $\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Artificially Matured Japanese Eel, with Special Reference to Ovulation Time. *Fisheries Science* 63(3) 365 – 367
- Kleckner, R.C., McCleave, J.D. 1985. Spatial and temporal distribution of American eel larvae in relation to North Atlantic Ocean current System. *Dana*, vol. 4, 67-92.
- Kolstad, K., Vegusdal, A., Baeverfjord, G., Einen, O. 2004, "Quantification of fat deposits and fat distribution in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) using computerised X-ray tomography (CT)", *Aquaculture*, vol. 229, no. 1/4, pp. 255-264.
- Lecomte-Finiger, R., 1992. Growth history and age at recruitment of European glass eel (*Anguilla anguilla*) as revealed by otolith microstructure. *Mar. Biol.* 114, 205-210.
- Lecomte-Finiger, R., 2003. The genus *Anguilla* Schrank, 1798: current state of knowledge and questions. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13: 265-279.
- Lecomte-Finiger, R., Maunier, C., Khafif, M. 2004. Leptocephali, these unappreciated larvae. *Cybiurn* vol. 28 no. 2. 83-95
- Lokman P.M. and Young G. 2000. Induced spawning and early ontogeny of New Zealand freshwater eels (*Anguilla diffebachii* and *A. australis*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 34: 135 - 145
- Martin Robichaud, D.J. & Rommens, M. 2001, "Assessment of sex and evaluation of ovarian maturation of fish using ultrasonography", *Aquaculture Research*, vol. 32, no. 2, pp. 113-120.
- Martin, R.W., Myers, S., Sower, S.A., Phillips, D.J., McAuley, C. 1983, "Ultrasonic imaging, a potential tool for sex determination of live fish", *North American Journal of Fisheries Management*, vol. 3, no. 3, pp. 258-264.
- Miller, M.J., Mochioka, N., Otake, T., Tsukamoto, K. 2002 Evidence of a spawning area of *Anguilla marmorata* in the western North Pacific. *Marine Biology* 140, 809-814.
- Miyai, T., Aoyama, J., Sasai, S., Inoue, J.G., Miller, M.J., Tsukamoto, K. 2004. Ecological aspects of the downstream migration of introduced European eels in the Uono River, Japan. *Envir. Biol. Fishes* 71. 105-115
- Moksness E., Kjørsvik E. and Olsen Y., 2004. *Culture of Cold-Water Marine Fish*. Blackwell Publishing
- Ohta H., Kagawa H., Tanaka H., Okuzawa K., Hirose K. 1996. Milt Production in the Japanese Eel, *Anguilla japonica* Induced by Repeated Injections of Human Chorionic Gonadotropin. *Fisheries Science* 62 (1), 44 – 49
- Ohta H., Kagawa H., Tanaka H., Okuzawa K., Iinuma N., Hirose K. 1997. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla Japonica*. *Fish Physiology and Biochemistry* 17: 163 – 169
- Okmura A., Zhang H., Utoh T., Akazawa A., Yamada Y. Horie N., Mikawa S., Oka

- H.P. 2004. Artificial hybrid between *Anguilla anguilla* and *Anguilla japonica*. *Journal of Fish Biology* 64, 1450 – 1454
- Palstra A.P., Cohen E.G.H., Niemantsverdriet, P.; Van Ginneken, V.J.T.; van den Thillart, G.E.E.J.M. 2004. Artificial Maturation and Reproduction of European Silver Eel: Development of Oocytes During Final Maturation. 5th int. symp. fish endocrinology proceedings
- Pedersen B.H. 2004. Fertilization of eggs, rate of embryonic development and hatching following induced maturation of the European eel *Anguilla anguilla*. *Aquaculture* 237, 461 – 473
- Pedersen, B. H., 2003. Induced sexual maturation of the European eel *A. anguilla* and fertilisation of the eggs. *Aquaculture* 224, 323-338
- Sande, R.D. & Poppe, T.T. 1995, "Diagnostic ultrasound examination and echocardiography in Atlantic salmon (*Salmo salar*)", *Veterinary Radiology and Ultrasound*, vol. 36, no. 6, pp. 551-558.
- Satoh H., Yamamori K., Hibiya T. 1992. Induced Spawning of the Japanese Eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 58(5), 825 – 832
- Schmidt, J., 1922. The Breeding Place of the Eel. *Phil. Trans. Roy. Soc., B*, 211: pp. 178-208.
- Schmidt, J., 1929. Introduction to the oceanographical reports. The Danish "Dana"-expeditions 1920-22. Rep. No. 1. 87 pp.
- Shields, R.J., Davenport, J., Young, C. & Smith, P.L. 1993, "Oocyte maturation and ovulation in the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), examined using ultrasonography", *Aquaculture and Fisheries Management*, vol. 24, no. 2, pp. 181-186.
- Tanaka H., Kagawa H., Ohta H. 2001. Production of leptocephali of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in captivity. *Aquaculture* 201 (51 – 60)
- Tanaka H., Kagawa H., Ohta H., Unuma T., Nomura K. 2003. The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*. 28: 493 – 497
- Tsukamoto K., Otake, T., Mochioka, N., Lee, T-W., Fricke, H., Inagaki, T., Aoyama, J., Ishikawa, S., Kimura, S., Miller, M.J., Hasumoto, H., Oya, M. & Suzuki, Y. 2003. Seamounts, new moon and eel spawning: The search for the spawning site of the Japanese eel. *Environmental Biology of fishes* 66, 221-229.
- Tsukamoto, K., Arai, T., 2001. Facultative catadromy of the eel *Anguilla japonica* between freshwater and seawater habitats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 220, pp. 265-276.
- Tsukamoto, K., Nakai, I., Tesch, F.W., 1998. Do all freshwater eels migrate? *Nature* 396, 635 - 636
- Van Ginneken, V.; Vianen, G.; Muusze, B.; Verschoor, L.; Lugten, O.; Onderwater, M.; Van Schie, S.; Niemantsverdriet, P.; Van Heeswijk, R.; Eding, E., van den Thillart, G. 2005. Gonad development and spawning behavior of artificially matured European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Animal Biology*, 55 (3) 203 - 218
- Wang, C.H., Tzeng W.N., 1998. Interpretation of geographic variation in size of American eel *Anguilla Rostrata* elvers on the Atlantic Coast of North American using their life history and otolith ageing. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 168, 35-43.



## DTU Aqua-rapportindex

Denne liste dækker rapporter udgivet i indeværende år samt de foregående to kalenderår. Hele listen kan ses på DTU Aquas hjemmeside [www.dfu.dtu.dk](http://www.dfu.dtu.dk), hvor de fleste nyere rapporter også findes som PDF-filer.

- Nr. 158-06 Østers (*Ostrea edulis*) i Limfjorden. Per Sand Kristensen og Erik Hoffmann
- Nr. 159-06 Optimering af fangstværdien for jomfruhummere (*Nephrops norvegicus*) – forsøg med fangst og opbevaring af levende jomfruhummere. Lars-Flemming Pedersen
- Nr. 160-06 Undersøgelse af smoltudtrækket fra Skjern Å samt smoltdødelighed ved passage af Ringkøbing Fjord 2005. Anders Koed
- Nr. 161-06 Udsætning af geddeyngel i danske søer: Effektivurdering og perspektivering. Christian Skov, Lene Jacobsen, Søren Berg, Jimmi Olsen og Dorte Bekkevold
- Nr. 162-06 Avlsprogram for regnbueørred i Danmark. Alfred Jokumsen, Ivar Lund, Mark Henryon, Peer Berg, Torben Nielsen, Simon B. Madsen, Torben Filt Jensen og Peter Faber
- Nr. 162a-06 Avlsprogram for regnbueørred i Danmark. Bilagsrapport. Alfred Jokumsen, Ivar Lund, Mark Henryon, Peer Berg, Torben Nielsen, Simon B. Madsen, Torben Filt Jensen og Peter Faber
- Nr. 163-06 Skarven (*Phalacrocorax carbo sinensis* L.) og den spættede sæls (*Phoca vitulina* L.) indvirkning på fiskebestanden i Limfjorden: Ecopath modellering som redskab i økosystem beskrivelse. Rasmus Skoven
- Nr. 164-06 Kongeåens Dambrug – et modeldambrug under forsøgsordningen. Statusrapport for første måleår af monitoringsprojektet. Lars M. Svendsen, Ole Sortkjær, Niels Bering Ovesen, Jens Skriver, Søren Erik Larsen, Per Bovbjerg Pedersen, Richard Skøtt Rasmussen og Anne Johanne Tang Dalsgaard.
- Nr. 165-06 A pilot-study: Evaluating the possibility that Atlantic Herring (*Clupea harengus* L.) exerts a negative effect on lesser sandeel (*Ammodytes marinus*) in the North Sea, using IBTS-and TBM-data. Mikael van Deurs
- Nr. 166-06 Ejstrupholm Dambrug – et modeldambrug under forsøgsordningen. Statusrapport for første måleår af monitoringsprojektet. Lars M. Svendsen, Ole Sortkjær, Niels Bering Ovesen, Jens Skriver, Søren Erik Larsen, Per Bovbjerg Pedersen, Richard Skøtt Rasmussen og Anne Johanne Tang Dalsgaard.
- Nr. 167-06 Blåmuslinge- og Stillehavsøstersbestanden i det danske Vadehav efteråret 2006. Per Sand Kristensen og Niels Jørgen Pihl
- Nr. 168-06 Tvilho Dambrug – et modeldambrug under forsøgsordningen. Statusrapport for første måleår af monitoringsprojektet. Lars M. Svendsen, Ole Sortkjær, Niels Bering Ovesen, Jens Skriver, Søren Erik Larsen, Per Bovbjerg Pedersen, Richard Skøtt Rasmussen og Anne Johanne Tang Dalsgaard.

- Nr. 169-07 Produktion af blødskaledede strandkrabber i Danmark - en ny marin akvakulturproduktion. Knud Fischer, Ulrik Cold, Kevin Jørgensen, Erling P. Larsen, Ole Saugmann Rasmussen og Jens J. Sloth.
- Nr. 170-07 Den invasive stillehavsøsters, *Crassostrea gigas*, i Limfjorden - inddragelse af borgere og interessenter i forslag til en forvaltningsplan. Helle Torp Christensen og Ingrid Elmedal.
- Nr. 171-07 Kystfodring og kystøkologi - Evaluering af revlefodring ud for Fjaltring. Josianne Støttrup, Per Dolmer, Maria Røjbek, Else Nielsen, Signe Ingvarsdén, Per Sørensen og Sune Riis Sørensen.
- Nr. 172-07 Løjstrup Dambrug (øst) - et modeldambrug under forsøgsordningen. Statusrapport for 1. måleår af monitoringsprojektet. Lars M. Svendsen, Ole Sortkjær, Niels Bering Ovesen, Jens Skriver, Søren Erik Larsen, Per Bovbjerg Pedersen, Richard Skøtt Rasmussen og Anne Johanne Tang Dalsgaard.
- Nr. 173-07 Tingkæravad Dambrug - et modeldambrug under forsøgsordningen. Statusrapport for 1. måleår af monitoringsprojektet. Lars M. Svendsen, Ole Sortkjær, Niels Bering Ovesen, Jens Skriver, Søren Erik Larsen, Per Bovbjerg Pedersen, Richard Skøtt Rasmussen og Anne Johanne Tang Dalsgaard.
- Nr. 174-07 Abildtrup Dambrug – et modeldambrug under forsøgsordningen. Statusrapport for 1. måleår af monitoreringsprojektet. Lars M. Svendsen, Ole Sortkjær, Niels Bering Ovesen, Jens Skriver, Søren Erik Larsen, Per Bovbjerg Pedersen, Richard Skøtt Rasmussen, Anne Johanne Tang Dalsgaard.
- Nr. 175-07 Nørå Dambrug – et modeldambrug under forsøgsordningen. Statusrapport for 1. måleår af monitoringsprojektet. Lars M. Svendsen, Ole Sortkjær, Niels Bering Ovesen, Jens Skriver, Søren Erik Larsen, Per Bovbjerg Pedersen, Richard Skøtt Rasmussen, Anne Johanne Tang Dalsgaard.
- Nr. 176-07 Rens Dambrug – et modeldambrug under forsøgsordningen. Statusrapport for 1. måleår af monitoringsprojektet. Lars M. Svendsen, Ole Sortkjær, Niels Bering Ovesen, Jens Skriver, Søren Erik Larsen, Per Bovbjerg Pedersen, Richard Skøtt Rasmussen og Anne Johanne Tang Dalsgaard.
- Nr. 177-08 Implementering af mere selektive og skånsomme fiskerier – konklusioner, anbefalinger og perspektivering. J. Rasmus Nielsen, Svend Erik Andersen, Søren Eliassen, Hans Frost, Ole Jørgensen, Carsten Krog, Lone Grønbæk Kronbak, Christoph Mathiesen, Sten Munch-Petersen, Sten Sverdrup-Jensen og Niels Vestergaard.
- Nr. 178-08 Økosystemmodel for Ringkøbing Fjord - skarvbestandens påvirkning af fiskebestandene. Anne Johanne Dalsgaard, Villy Christensen, Hanne Nicolajsen, Anders Koed, Josianne Støttrup, Jane Grooss, Thomas Bregnballe, Henrik Løkke Sørensen, Jens Tang Christensen og Rasmus Nielsen.
- Nr. 179-08 Undersøgelse af sammenhængen mellem udviklingen af skarvkolonien ved Toftesø og forekomsten af fladfiskeyngel i Ålborg Bugt. Else Nielsen, Josianne Støttrup, Hanne Nicolajsen og Thomas Bregnballe.

Nr. 180-08      Kunstig reproduktion af ål: ROE II og IIB. Jonna Tomkiewicz, Henrik Jarlbæk