



Bruk av genetiske metoder i forvaltningen

Mange kommersielle fiskebestander er i dag kraftig redusert, og det er allment akseptert at "føre-var-prinsippet" anvendes for å unngå store, uforutsette endringer i bestandene. Samtidig er det et økende krav til overvåking og økosystembasert forvaltning. Dette vil måtte møtes med vitenskapelige data, og molekylærgenetiske metoder har blitt trukket fram som det beste verktøyet for å øke vår kunnskap og forståelse av dynamikken i fiskebestandene.

Geir Dahle
geir.dahle@imr.no

Molekylærgenetiske metoder gjør bruk av nedarvede, avgrensede og stabile genetiske markører, og har et stort potensial for blant annet å analysere bestandsstrukturer, rekruttering og bestemme sammensetningen i fiske på blandede bestander.

Viktig hjelpemiddel for fiskeriforvaltningen

Molekylære teknikker er en av mange for å håndtere utfordringer i fiskeriforvaltningen, men disse verktøyene er mest effektive dersom de brukes i kombinasjon med andre metoder: merkedata (elektroniske og konvensjonelle), fysisk oseanografi, livshistorievariasjoner og økologisk modellering. Ved å kombinere genetisk informasjon med biologisk og økologisk kunnskap fra lange tidsserier, kan vi øke forståelsen av de faktorene som kontrollerer fordelingen av bestander eller individer i både tid og rom.

De forventninger vi gjerne har når det gjelder mulig differensiering mellom ulike populasjoner, bygger i første rekke på økologisk kunnskap om de ulike artene og deres miljø. Stor populasjonsstørrelse, høy fekunditet (formeringssevne) og store muligheter for spredning fører i kombinasjon til en forventning om liten differensiering mellom marine populasjoner. Sammenlignende studier har også vist at marine fiskepopulasjoner er mindre differensierte enn arter i ferskvann eller anadrome arter som for eksempel laks. I de senere årene er det imidlertid observert flere arter hvor en finner en svak, men tydelig genetisk strukturering. Dette skyldes sannsynligvis en kombinasjon av økt sensitivitet i de genetiske metodene, bedre prøvetaking og bedre statistiske analyser.

Lang forskningstradisjon ved Havforskningsinstituttet

Havforskningsinstituttet har i mer enn 40 år drevet populasjonsgenetiske studier på økonomisk viktige arter. De metodene som ble utviklet på 1960-tallet ble raskt tatt i bruk for å studere populasjonsstruktur/bestandsstruktur hos både torsk, laks og sild.

Marin ressursforvaltning står foran en rekke nye utfordringer i årene som kommer, og vi har allerede sett eksempler på

drastiske reduksjon i de ville bestandene med stenging av tidligere meget produktive områder som resultat (torskefiske på østkysten av Canada, torskefiske i Nordsjøen), og anbefaling om nulluttak av kyst-torsk nord for 62°N.

For å fremme en bærekraftig utnyttelse av de artene vi er satt til å gi råd for, trenger vi mer inngående vitenskapelig informasjon både om artens biologi, populasjonsstruktur og de omgivelsene de lever i og det samspillet de har med andre arter i miljøet. Denne kunnskapen må gjøres tilgjengelig for å kunne forklare og rettferdiggjøre de grep som forvaltningen iverksetter.

Rømming fra oppdrettsanlegg medfører en potensiell risiko for uønskede genetiske forandringer i våre ville fiskebestander. Oppdrett av torsk er på vei til å bli en ny næring. I 2005 ble det solgt omtrent 7400 tonn oppdrettstorsk, men den potensielle produksjonen i de nærmeste årene er betydelig større. Miljøutfordringene er betydelige, og må tas på alvor før oppdrett av torsk kommer for langt. Det er viktig å trekke lærdom av lakseoppdrett, hvor en hele tiden har vært i etterkant med nødvendig kunnskap for god rådgivning om blant annet genetiske interaksjoner. Potensielle problemer i forbindelse med torskeoppdrett vil i tillegg til gyting i merd og rømming/geninteraksjon med ville stammer, være sykdom og spredning av patogener.

Metoder

a. Proteiner/enzymer

Den vanligste teknikken for å studere variasjon i vev eller væsker er analyser av allozymvariasjon. Allozymer er funksjonelt like varianter av enzym, som kan separeres ved hjelp av elektroforese. Enzymene blir gjort synlige ved hjelp av en kjemisk reaksjon, og genetisk variasjon blir bestemt ut fra forskjellig mobilitet hos de ulike allelene. Det er observert allozymvariasjon mellom individer i nesten alle dyrepopulasjoner, og denne teknikken var den dominerende for genetiske studier av marin fisk fra 1970 og langt ut på 1990-tallet. Metoden er fortsatt i bruk, men i mindre grad enn andre metoder, og Havforskningsinstituttet bruker allozymvariasjon og hemoglobinvariasjon som en viktig karakter i studier av bl.a. torsk, sild og uer.

Bruk av allozymer er en billig metode, krever lite spesialisert utstyr eller eksper-

tise, og er en relativt rask metode. Man kan raskt analysere mange gener, og mer enn hundre individer kan kjøres i en og samme analyse.

b. DNA

Alle dyreceller inneholder to typer DNA: mitokondrielt DNA (mtDNA) og nukleært DNA (nDNA). Begge typer er bygget opp av fire forskjellige nukleotider. Innen populasjonsgenetikk studerer vi en eller flere utvalgte regioner i en eller helst begge typer DNA.

PCR er en teknikk for å oppformere de(n) utvalgte delen(e) av DNA og dermed lage enormt mange kopier for videre analyse. En PCR-reaksjon med 35 sykler vil lage totalt over 68 milliarder kopier av den utvalgte delen av DNA.

To av de mest brukte metodene ved Havforskningsinstituttet i dag er mikrosatellitter og pantophysin.

MIKROSATELLITTER er korte repeterte enheter av DNA, vanligvis mellom to og fem basepar i lengde. De finnes overalt i genomet og har en meget høy mutasjonsrate (frekvensen av forandringer i arvestoffet). Det er identifisert arter med mikrosatellitter med opp til 100 alleler. Mikrosatellitter er mye brukt i studier av populasjonsstruktur, men brukes også i studier av gyteatferd og slektskap mellom individer. En typisk studie av en marin fisk med mikrosatellitter bruker kanskje 5–15 mikrosatellittgener, avhengig av problemstillingen. Metoden er i utgangspunktet artspesifikk, men samme “verktøy” kan en sjelden gang brukes i beslektede arter (for eksempel stillehavslaks og atlantehavslaks).

PANTOPHYSIN (*PanI*) koder for et protein som er under seleksjon – påvirkes av miljøet. Dersom denne seleksjonen ikke er ekstremt høy vil forskjeller mellom grupper av individer kunne påvises “raskere” (i løpet av 10 000 år!) i dette systemet enn i ikke-selektive proteiner/enzymer. Dette systemet har to varianter, hvor den ene (*PanI^b*) er totalt dominerende i skrei, mens den andre typen (*PanI^a*) er dominerende i kysttorsk (se figur 1.15.2).

Mulige bruksområder

a. Artsidentifisering

Korrekt artsidentifisering er nødvendig for forvaltning av en art og for å kunne gi riktige tall for mengde og utbredelse av arten, for å bestemme hvor den fisken som landes kommer fra, og å sikre riktig merking av fiskeprodukter på markedet/i butikken (autentisering). Arter kan være morfologisk ganske like og dermed vanskelig å skille fra hverandre, spesielt på

juvenile/0-gruppestadiene og for kryptiske arter, dvs. arter som utseendemessig er helt like, og genetisk nesten helt like, men likevel såpass forskjellige at en krysning mellom to slike arter vil føre til et sterilt avkom som for eksempel uerartene (*Sebastes sp.*). Molekylærgenetiske markører er nyttige for å løse mulige taksonomiske problemer, og kan brukes til å studere marine arter på forskjellig utviklingstrinn.

Siden 80-årene har vi brukt genetisk variasjon i enzymer for å identifisere arter, og i dag har genetikere også tatt i bruk variasjonen i en spesiell DNA-sekvens eller DNA-markør for å si noe om hvor mange arter som befinner seg i et område, og for å anslå mengden av hver av artene. Denne teknikken, som også er kjent som “DNA barcoding”, kan utføres parallelt med morfologiske analyser, og kan brukes til å skille nært beslektede og dårlig karakteriserte arter fra hverandre (<http://www.barcodinglife.com>) (Hebert et al. 2002).

Når det gjelder oppdrettsorganismer som kommer ut i det fri, enten som resultat av havbeite (planlagt utsetting) eller uhell, er det viktig å ha kunnskap om hvorvidt oppdrettsorganismer vil kunne krysse seg med ville artsfrender og dermed endre den genetiske sammensetningen i den ville populasjonen. Her er molekylære metoder et uvurderlig redskap.

b. Autentisering

Genetiske teknikker blir i dag mye brukt til å studere utrydningstruede og beskyttede arter, og teknikkene kan brukes for å identifisere ukjente prøver, art og til og med identifisere hvor individet kommer fra (Primmer et al. 2000).

Allozymer og mtDNA brukes for å identifisere ulike prøver av ferskt og kokt materiale i tillegg til hermetiske prøver. Et stort utvalg metoder er utviklet og benyttes til dels rutinemessig. Det finnes laboratorier som tilbyr denne tjenesten, både private og offentlige. Slike metoder er også under utvikling ved Havforskningsinstituttet.

I tillegg til å identifisere art, vil det i enkelte tilfeller også være mulig å kunne identifisere geografisk opprinnelse til den fangsten man studerer (Seeb et al. 1990). Begrensningen med disse metodene i dag er oppdaterte databaser med bakgrunns materialet og detekterbar genetisk struktur i de aktuelle artene. Nielsen et al. (2001) har utviklet en slik database for torsk og har vist at genetisk analyse av kun to eller tre individer av torsk fra en fangst vil kunne gi entydig identifikasjon av hvor fangsten kommer fra innen et område i Nordøst-Atlanteren, Østersjøen eller Nordsjøen.

c. Slektskapsanalyser/familieanalyser

Reproduksjon og rekrutteringsdynamikk er fortsatt dårlig kjent hos mange marine arter, men dette er faktorer som kan ha en stor innvirkning på demografien og stabiliteten til en populasjon. Molekylære markører kan lette forskningen på dette området, både ved forvaltning av ville bestander og i forbindelse med akvakultur.

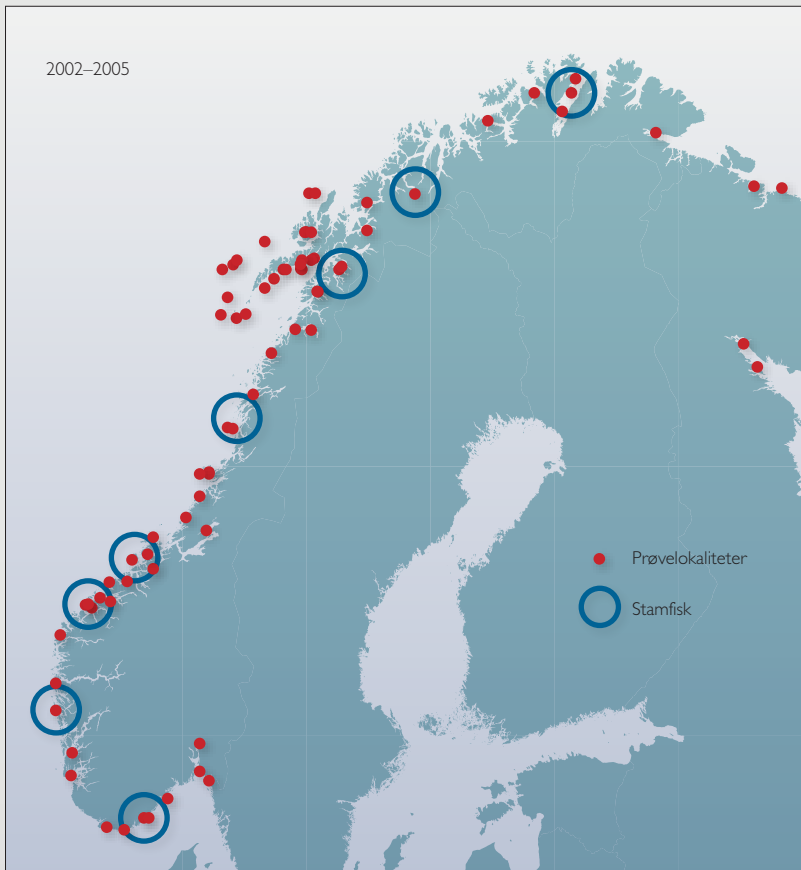
Rekrutteringsmekanismer er blitt studert ved hjelp av molekylærgenetiske markører, selv om det meste av forskningen har vært fokusert på arter i oppdrett eller arter som viser uvanlig reproduktiv strategi. Det finnes veldig få genetiske studier av reproduktiv atferd av kommersielt viktige fiskearter. Forsøk i Parisvatnet viste imidlertid at store hanner var mer “effektive” i forplantning, og at hanneres suksess var avhengig av størrelsesforskjeller mellom hanner og hunner. Det at den reproduktive suksessen hos hanner er så varierende kan føre til at det eksisterer flere søsken/halvsøsken enn forventet i ville bestander.

Molekylærgenetiske verktøy kan også brukes for å avsløre gyteatferd i ville populasjoner. Mange marine organismer, spesielt de artene med høy fekunditet og høy dødelighet i egg- og larvestadiene, kan oppleve stor variasjon i reproduktiv suksess. Molekylære teknikker har blant annet blitt brukt for å vise gyting ved ulike tidspunkt i samme område, ved å identifisere ulike larvegrupper. Små forskjeller i gytetidspunkt vil kunne føre til at larvene utsettes for ulike oseanografiske og biotiske forhold som har betydning for senere livsstadier, og dette kan føre til stor variasjon i overlevelse mellom ulike larvegrupper og dermed forskjeller i bidrag fra ulike gytere til neste generasjon.

Molekylærgenetiske teknikker har åpnet muligheten for å kunne identifisere foreldrene til et enkelt avkom i begrensede miljø som et oppdrettsanlegg. Ved hjelp av for eksempel mikrosatellittanalyser vil ett enkelt egg, eller en del av en larve, gi nok materiale til å kunne identifisere mor og far til dette individet. Innen eksperimentell biologisk forskning på marine arter som for eksempel torsk, kveite og hummer, vil denne muligheten for å kunne identifisere avkom til foreldre være meget verdifull, spesielt med tanke på muligheten for å studere seleksjon, konkurranse eller reproduktiv suksess. I eksperimentelle studier utført ved Havforskningsinstituttet er DNA-familieidentifisering blitt brukt på flere arter, blant annet sjøørret, atlantisk laks, hummer, kveite og torsk.

d. Rømt oppdrettsfisk

I Norge er laks i dag den viktigste arten innen fiskeoppdrett, men marine arter som



Figur 1.12.1

Kartlegging av kysttorsk i perioden 2002–2005. Torsk er samlet inn fra 70 lokaliteter (røde punkter), og levende stamfisk er samlet inn fra åtte lokaliteter (blå sirkler). Samarbeid mellom Havforskningsinstituttet, Bergen; Fiskeriforskning, Tromsø; Norges fiskerihøgskole, Tromsø og Moscow State University, Moskva.

Mapping of coastal cod during the period 2002–2005. Cod was collected from 70 locations (red dots), and brood stock individuals were collected from eight locations (blue circles). Collaboration between the Institute of Marine Research, Bergen; Norwegian Institute of Fisheries and Aquaculture Research, Tromsø; Norwegian College of Fishery Science, Tromsø and Moscow State University, Moscow.

torsk og kveite er på vei inn, og i forbindelse med oppdrett er rømming av fisk sett på som et av de viktigste miljøproblemene.

Negative miljømessige konsekvenser av rømming er etter hvert godt dokumentert på laksefisk, og det er på det rene at rømming kan ha negative effekter både genetisk, økologisk og ved overføring av sykdom. Det er derfor et uttalt mål både fra forvaltning og næring at rømmings-tallene skal ned. Logistikken i dagens produksjonskjede tilsier at avkom fra et foreldrepar blir fordelt til flere smoltanlegg og videre til flere matfiskanlegg. Dermed har det liten hensikt å etablere databaser med genetiske og andre opplysninger fra avls- og stamfiskstasjoner eller smoltanlegg. Når formålet er å spore rømt oppdrettsfisk tilbake til matfiskanlegg, må referanseprøver eventuelt skaffes fra

hver matfisklokalitet. For en marin art som torsk vil det også være nødvendig å skaffe seg referansemateriale fra de stedegne populasjonene.

e. Bestandsestimering

Forvaltningen har behov for å vite hvor stor hver enkelt bestand er, men strukturen er et kontroversielt spørsmål og ofte avhengig av metode og tilnærming. Tradisjonelle metoder for å skille mellom bestander har inkludert markører som skjellanalyser, otolitter, parasitter, morfometri og morfologi. Disse markørene kan i større eller mindre grad være påvirket av miljøet, livshistorie eller til og med atferd. Genetiske markører derimot vil kunne gi varige og udiskutabel identifikasjon av et individ, uavhengig av alder, miljø, kjønn eller individuell atferd. Med dagens utvalg av nye statistiske metoder vil vi i kombina-

sjon med molekylære metoder på et sikrere grunnlag bestemme hvilken populasjon en fisk tilhører. Med disse metodene vil vi også kunne beregne hvor stor del en gruppe med genetisk divergente individer utgjør av en blandet bestand (for eksempel kysttorsk og skrei).

Havforskningsinstituttets bruk av genetiske metoder – utvalgte eksempler

a. Kartlegging av kysttorsk-populasjoner

For torsk har en et mye bedre grunnlag til å evaluere miljøeffekter, enn da en startet oppdrett av laks. Havforskningsinstituttet har siden 1960-tallet sammen med andre forskningsmiljø gjennomført genetiske studier av torsk.

Fra 2002 har Havforskningsinstituttet gjennomført en storskala kartlegging av kysttorsk langs hele norskekysten, basert på tidligere (syv protein-loci) og nye DNA-baserte genmarkører (fem mikrosatellitt-loci og *PanI*). Over 7000 prøver er samlet inn fra 70 lokaliteter langs hele kysten (Figur 1.12.1).

De nye analysene bekrefter at det er store genetiske forskjeller mellom nordøstarktisk torsk (skrei) og kysttorsk i *PanI*-systemet (Fevolden og Pogson 1997, Pogson og Fevolden 2003). Det er også funnet genetiske forskjeller mellom nordøstarktisk torsk og kysttorsk i hemoglobin og i tre mikrosatellitter. I tillegg viser dataene stor genetisk variasjon mellom kysttorsk fra ulike områder – særlig mht. nord/syd.

b. Kysttorsk-/skreiprosblematikken

Havforskningsinstituttet har i en årrekke studert genetisk variasjon hos så vel kysttorsk-populasjoner langs hele norskekysten som skreien i Barentshavet. Allerede i 1959 ble det første arbeidet på blodtyper fra torsk fisk publisert (Halvorsen og Møller 1959). Utover på 60-tallet ble det arbeidet med en rekke andre metoder, og hemoglobin og analyser av serum ved agar elektroforese var lenge den mest benyttede metoden. Denne pionerperioden hadde sitt høydepunkt på siste del av 1960-tallet. Klare genetiske forskjeller mellom nordøstarktisk torsk og ulike stammer kysttorsk ble funnet både i analyser av blodproteiner og blodtyper. Disse undersøkelsene er senere lagt til grunn for en egen kvote på kysttorsk i norske farvann.

Basert på data fra en rekke publiserte arbeider, data fra pågående prosjekter og en feltstudie i Lofoten våren 2005 (<http://www.imr.no/aktiviteter/forskningsgrupper/populasjonsgenetikk/fagomrader>), og analyser ved hjelp av såkalt "assignment-test" (fordeling av hvert individ til den gruppen/populasjonen som er mest lik genetisk) på deler av et stort prøvemå-

teriale samlet inn i perioden 2002–2005 trekker vi den konklusjon at det ved hjelp det såkalte *PanI*-systemet er mulig å skille mellom en fangst av skrei og en fangst av kysttorsk (Figur 1.12.2).

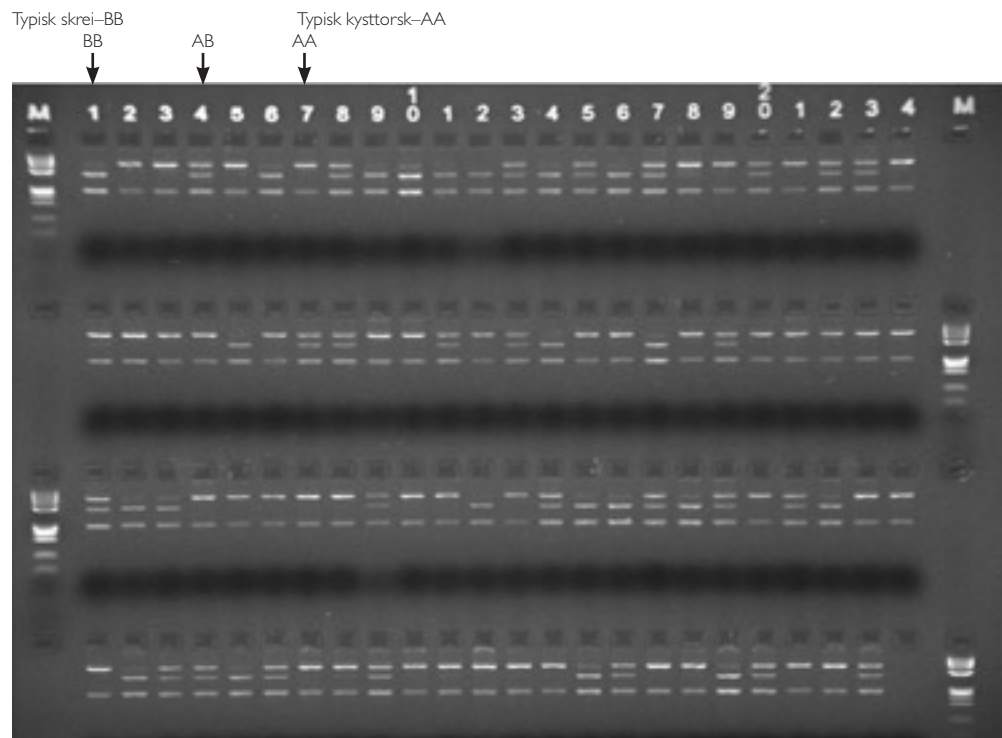
c. Sporing av rømt oppdrettsfisk

Ifølge fiskeriforvaltningen er det knyttet stor usikkerhet til hvor mye laks som faktisk rømmer fra norske oppdrettsanlegg. Hvor kommer rømlingene fra, og hva er den relative fordelingen av rapportert og urapportert rømming? Innledende arbeid ved Havforskningsinstituttet har vist at DNA-markører og nyutviklede statistiske tester i mange tilfeller kan identifisere laks med god presisjon. Vi undersøkte presisjonen i identifisering ved hjelp av 12 DNA-mikrosatellittmarkører, og dette viste at laks fra de fem største avlslinjene i Norge kunne skilles med høy presisjon. Presisjonen i identifiseringen av villaksbestandene var noe lavere, med unntak av Neiden, der presisjonen var 93 %. Dette skyldes sannsynligvis at Neiden tilhører en nordlig undergruppe av atlantisk laks, som er noe ulik laksen lenger sørover langs norskekysten. Det var bare 3–4 % feilidentifisering mellom oppdrettslaks og villaks. I tillegg viste en undersøkelse av syv ulike smoltgrupper fra fire matfiskanlegg i Hardangerfjorden at det var mulig å identifisere i underkant av 70 % av individene ved hjelp av 11 DNA-mikrosatellitter (Wennevik et al. 2006).

d. Identifisering av amerikansk hummer

De første amerikanske hummerne i norske farvann ble rapportert i slutten av 1999, og det ble opprettet et samarbeid mellom Havforskningsinstituttet og Akvariet i Bergen for å følge opp med registreringer og informasjon til fiskere. I startfasen ble noen få genetiske analyser utført, basert på allozymer og mikrosatellitter. En av konklusjonene var at morfologiske kjennetegn ikke alltid er egnet til å skille de to artene, og at det er nødvendig å teste et større utvalg av mikrosatellittmarkører for eventuelt å kunne påvise krysninger mellom de to artene (hybridisering). Hittil er 18 markører testet, og det er funnet tre markører spesielt egnet til sikker identifisering, eventuelt påvisning av hybrider (Jørstad et al. 2005).

I begynnelsen av september 2005 ble Havforskningsinstituttet kontaktet av flere fiskere fra området rundt Bjørøy utenfor Bergen. De hadde alle fanget hummer som var morfologisk avvikende fra den vanlige europeiske hummeren. Genetiske analyser basert på de ovenfor nevnte mikrosatellittmarkørene slo fast at dette var amerikansk hummer.



Figur 1.12.2

Et eksempel på en elektroforetisk analyse av en tilfeldig utvalgt fangst. Denne inneholder så mange BB at det nok er en blandingsprøve.

Figure 1.12.2. Electrophoretic analyses of a randomly chosen landing. Due to the large number of BB this is regarded a mixed sample of NEA and coastal cod.

Medieoppmerksomheten førte også til rapporter fra fiskere i andre områder enn Bjørøy, de fleste fra Sørlandet. I alt ble det påvist 8 amerikanske hummere i 2005, og 4 i 2006. DNA-analysene som er utviklet er avgjørende for sikker identifisering av amerikansk hummer i Norge.

Genetiske endringer i villaksbestander

En undersøkelse av genetisk stabilitet i syv ville laksebestander ble gjennomført i 2004 og 2005 med ti DNA-mikrosatellittmarkører. Undersøkelsen var basert på tidligere innsamlet skjellmateriale og nyinnsamlet materiale fra samme bestander. De genetiske profilene basert på DNA-mikrosatellitter var stabile i laksebestandene i Etnelven, Namsen, Håelven og Granvinelven, mens det ble vist genetiske forandringer i laksebestandene i Vosso, Opo og Eio. Det interessante er at forandringene er påvist i bestander med svært høye innslag av rømt oppdrettslaks, mens det i et område uten noe særlig rømt laks ikke ble påvist forandring. Samtidig ble det vist at noen bestander med store innslag av rømt laks likevel er genetisk stabile.

Use of genetic methods in fisheries management

Many important commercial fisheries are severely depleted, and despite application of diverse management programmes, stocks have often continued to decline. There is therefore an increased demand on fishery monitoring, and management may be met by the use of improved scientific data on the target species and their environment. Molecular tools have enormous potential for clarifying issues related to marine resources, ranging from the traditional applications of stock structure assessments to more recent applications relating to recruitment or analysis of mixed stocks.