

## GENETISK METODE I GYTEFELTKARTLEGGING:

# Egg fra kysttorsk kan skilles både fra andre arter og skrei

Ofte trengs det genetiske undersøkelser for å fastslå om innsamlede egg faktisk er fra kysttorsk. Utfordringen er at nylig gyttede egg – som er en indikasjon på at vi befinner oss i et gytefelt – har få celler og dermed et begrenset genetisk materiale å jobbe med.

SIGURD H. ESPELAND | sigurd.heiberg.espeland@imr.no, HANNE SANNÆS, TORJAN BODVIN, JON ALBRETSSEN og JAN HENRIK SIMONSEN

Det er godt dokumentert at mange lokale bestander av kysttorsk har gytefelt inne i fjorder og skjermete lokaliteter, der egg og larver holdes tilbake i området. Det hindrer at eggene og larvene driver langt og blandes med egg fra andre gytefelt. Denne mekanismen kan gjøre de lokale bestandene genetisk forskjellig fra hverandre dersom heller ikke den voksne fisken bytter gytefelt, men holder seg til de områdene der den selv ble gytt.

## Hva er mye og hva er lite egg?

Gytefeltkartleggingen gjøres på forskningstokt i kysttorskens gytetid hver vår. På stasjoner, plassert i et rute-nett i fjordene, senkes en hāv ned til 50 meters dyp. Alle egg som samles inn når hāven trekkes opp, blir sortert til sides. Stasjonene er plassert der det er rapportert å være gytefelt, både der det ikke er rapportert å være gytefelt og i områder der vi ikke forventer å finne egg. Enkelte egg kan man finne nesten alle steder langs kysten, også der det ikke er gytefelt. For å kunne si noe om en mengde egg er et gytefelt eller ikke, må man vite hvor mye egg det er på steder der det *ikke* er gytefelt. For å få et godt bilde av hva som er mye egg og hva som er lite egg, er det viktig å dekke store områder med representative stasjoner.

## Egg som er helt like

Ved hjelp av lupe og fotografering kan vi artsbestemme mange egg ved å se på hvordan egget ser ut og hvor stort det er. Likevel er det noen egg som er helt like på tidlige utviklingsstadier, og som i tillegg har nesten helt like eller

overlappende størrelsesfordelinger. Et eksempel er egg fra kysttorsk som kan forveksles med andre torskefisk som sei, hyse og hvitting. Torskeegg er som oftest mellom 1,2 og 1,5 millimeter i diameter, men kan være fra 1,15 og helt opp i 1,9 millimeter. Samtidig er hyseegg helt like utseendemessig, og de er ofte fra 1,2 til 1,7 millimeter. Det betyr at vi må undersøke eggene genetisk for å vite med sikkerhet om det er snakk om kysttorsk eller andre arter.

## Spesiell metode for DNA-fattige prøver

I sjøen kan vi finne noen timer gamle egg der det bare har skjedd få celledelinger. Enkelte ganger observerer vi egg med færre enn åtte celler; som gir svært begrenset genetisk materiale i prøven. Det er likevel svært viktig å hente ut DNA fra de tidligste stadiene. Disse eggene har hatt minst tid til å drive rundt i sjøen, og sier dermed mest om hvor gytefeltet er. Til sammenligning kan et egg i femte (siste) stadium ha drevet rundt i over 30 dager (om temperaturen i sjøen bare er 2 grader) og inneholde mange millioner celler og større mengde DNA. Utfordringen er at når vi lagrer egg på sprit blir de blakke, og det blir vanskelig å se om de er unge eller gamle. Vanligvis når man tar genetikprøver fra et dyr, bruker man vev, hvor selv en liten bit inneholder veldig mange celler og mye DNA. Da er det ofte ikke så viktig å sjekke hvor mye DNA man har klart å hente ut av prøven siden det finnes i så store mengder. For egg derimot må vi bruke en spesiell tilpasset metode som gjør det mulig å hente ut DNA fra prøver med lite genetisk materiale. Selv om metoden er

## FAKTA

## Kartlegging av gytefelt for kysttorsk

For å forvalte bestander av fisk på en bærekraftig måte er det ikke bare viktig å regulere uttaket, men også å beskytte bestandens gytefelt. Kysttorsk har mange små populasjoner som kan være mer genetisk sårbare for ytre påvirkninger og tilfeldig genetisk drift (genetisk endring som skyldes tilfeldigheter og ikke nødvendigvis at noen gener er mer overlevedesdyktige enn andre). Havforskningsinstituttet kartlegger gytefelt for kysttorsk som

en del av nasjonalt program for kartlegging av marine naturtyper. Målet er å identifisere hvor kysttorsk gyter og sette en verdi på disse områdene. Utbygging og tiltak som for eksempel mudring og oppdrettsanlegg påvirker rekruttering og overlevelse hos kysttorsk, og kan redusere verdien av et gytefelt. Forvaltningen trenger kunnskap om gytefeltene når det søkes om slike tiltak. Det er imidlertid usikkert hvilken og hvor stor effekt forskjellige tiltak har på et gytefelt.

god, kan det likevel være så lite DNA i prøven at vi ikke klarer å hente ut nok til å gjøre videre analyser.

### Er dette en torsk?

For å undersøke konsentrasjonen av DNA bruker vi en kjemisk analysemetode (spektrofotometri) på hver enkelt prøve. I prinsippet vil DNAet kunne fortelle hvilken art egget er fra, men dette vil kreve omfattende analyser. Vi bruker enklere analyser, hvor vi spesifikt spør om egget er en torsk eller en hyse. Hvis vi får et negativt svar – ikke utslag på ”dette er torsk” eller ”dette er hyse” – er det viktig å vite om vi har klart å få ut tilstrekkelig mengde DNA eller ikke. Er det nok DNA, så betyr det at prøven ikke er fra et torskkeegg. Om vi ikke klarte å hente ut tilstrekkelig DNA, så kan prøven likevel være fra en torsk.

En annen utfordring er at om vi mislykkes med DNA-ekstraksjonen, er prøven ”brukt opp”, og opphavet til egget vil være ukjent for alltid. Da er det viktig at de eggene vi får resultat fra er representative for gytefeltet. Hvis vi bare klarer å hente ut DNA fra en mindre andel av eggene vi fant på en stasjon, kan vi ikke vite om det er noen arter eller stadier som konsekvent faller ut av datasettet. Med metoden vi brukte var vi i stand til å hente ut DNA fra 100 prosent av eggene i Sogn og Fjordane i 2015 og 99,3 prosent av eggene i Finnmark/Altafjorden (det var ett egg vi ikke fikk DNA fra).

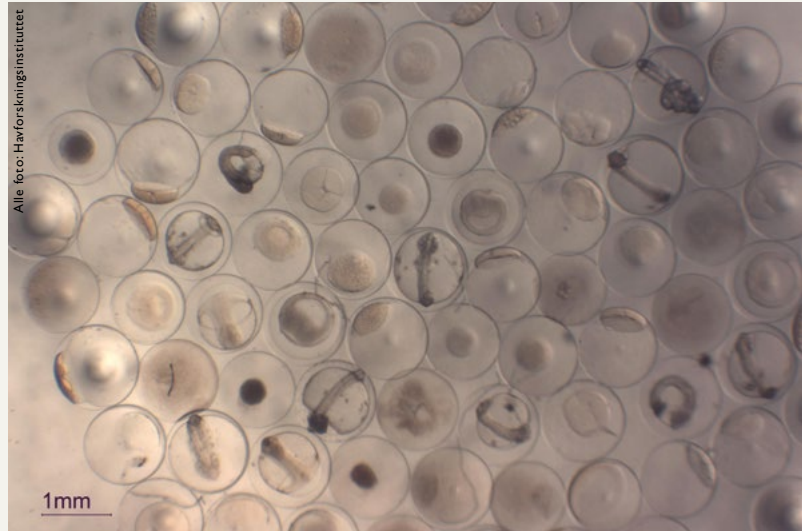
### Identifiserer egg fra andre fiskearter og fra skrei

Metodene for videre genetisk analyse tilpasses problemstillingen i det området hvor prøven er tatt. I sør fokuseres det på artsidentifisering innenfor et knippe relevante arter som torsk, sei, hyse og hvitting som overlapper i gytetid og eggstørrelse. Til dette brukes artsspesifikke markører som kjenner igjen typiske sekvenser i artens DNA. For prøver fra nord vil problemstillingen i tillegg dreie seg om innslag av skreiegg på kysttorskens gyteplasser. Prøvene derfra blir derfor også analysert ved hjelp et eget gen, *PanI* (pantophysin), hvor forskjellige varianter opptrer med forskjellig hyppighet hos kysttorsk og skrei.

Under årets kartlegging i Altafjorden i Finnmark fant vi for det meste egg i eldre stadier. Normalt er 60–90 prosent av eggene vi finner nygytte, men i Finnmark var bare 4 prosent av eggene i det første nygytte stadiet. Genetiske undersøkelser avslørte at kun de nygytte eggene stammet fra kysttorsk. På de andre stasjonene, som hadde et stort innslag av eldre egg, var prøvene dominert av den genvarianten av pantophysin som finnes mest hos skrei. Når vi arbeider videre med å kartlegge og verdisette gytefelt for kysttorsk i Altafjorden, er det viktig å kun bruke de eggene som er fra kysttorsk.

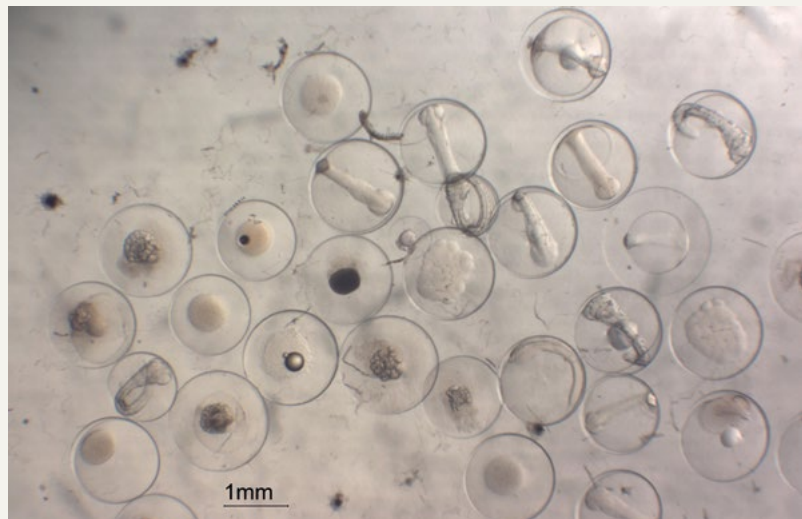
### Genetic techniques help identify eggs from Coastal cod

Mapping of spawning areas for coastal cod is often dependent on precise genetic analysis. Determination of the origin of eggs may be impossible without proper genetic techniques as eggs are often determined to specie by visual size. In parts of Norway it is also important to decide if the eggs are coastal cod eggs spawned in the area, or Northeast Arctic cod eggs who have drifted from far distances.

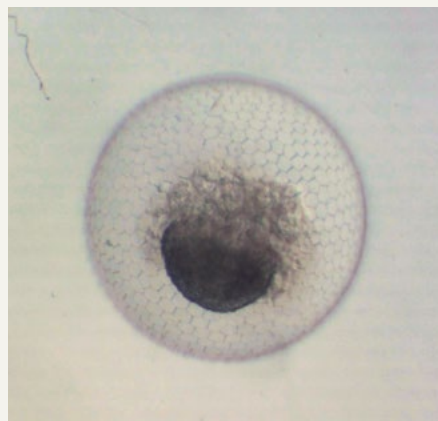


Figur 1. Egg samlet fra Søreivågen på Hisarøy, Gulen kommune i Sogn og Fjordane. Eggets størrelse og visuelle kjennetegn gjør at de ble artsbestemt som torskkeegg. På flere av eggene er det mulig å se enkeltceller, så mange av disse er helt nygytte og kan lett forveksles med andre arter. Genetiske undersøkelser viste at alle egg undersøkt fra dette området faktisk var torskkeegg.

Eggs collected in Søreivågen, Gulen municipality in Sogn and Fjordane. The eggs were determined as cod eggs due to size and visual appearance. Several of these eggs contain a low number of cells. Single cells can even be seen in the picture. In such an early life stage, cod and haddock e.g., cannot be distinguished without using genetic techniques.



Figur 2. En samling egg fra Arnafjord, en sørlig sidefjord til Sognefjorden. I denne prøven var det mange egg som hadde størrelse og utseende som gjorde at de ble bestemt til å være torskkeegg. Genetiske undersøkelser avslørte at 75 % av eggene var hyse, slik at dette sannsynligvis ikke er et gytefelt for kysttorsk, men for hyse. Eggs collected in Arnafjord, a southern branch of Sognefjorden. These eggs were visually identified as cod eggs as they were within the size range of cod and too young to identify with any other specific trait. Genetic analysis revealed that 75 % of these eggs were haddock, so this was most likely a spawning area for haddock, and not for cod.



Figur 3. Egg fra fløyfisk er lette å kjenne igjen på det tydelige mønsteret, og kan vanskelig blandes med andre egg. Prøve fra Risnefjorden, en sidefjord til Sognefjorden.

Egg from a Dragonet (*Callionymus lyra*) is easily recognizable based on the clear patterns on the egg and can hardly be misinterpreted as another specie. The egg is sampled in Risnefjorden, a fjord branch of the deep Sognefjorden.