

KYSTTORSK OG SKREI
I
LOFOTEN 2008

DNA typing av torsk ved bruk av PCR metode

Fiskeridirektoratet region Nordland
Fiskerikontoret i Svolvær

Juni 2008

Erun Thesen
Rapportskriver

SAMMENDRAG

I dette prosjektet har vi analysert ca. 2 000 individer av torsk. Dette for å kartlegge sammensetningen av kysttorsk og skrei i og rundt den etablerte ”Henningsværboksen”, dvs. området Vågan/Vestvågøy. I tillegg er det tatt prøver fra områder der en skulle forvente stor skreiandel.

Analysene viser, i den perioden prosjektet har vart, at det hovedsaklig har vært blandingsprøver med overvekt av kysttorsk i området. Dette er informasjon vi kan bygge videre på og vi vil vurdere om dette er analyser som er ønskelig å fortsette med i fremtiden.

INNLEDNING

Det ble i 2005 utført et pilotprosjekt; **Prøvetaking i Lofoten 2005** ved Geir Dahle og Eva Farestveit. Forskningsgruppe Populasjonsgenetikk ved Havforskningsinstituttet i Bergen.

En prosjektrapport ble skrevet og den er tilgjengelig på <http://www.imr.no>.

Forsker Geir Dahle, Havforskningsinstituttet i Bergen, har hatt ansvaret for opplæring og oppfølging av arbeidet som har vært gjennomført ved fiskerikontoret i Svolvær.

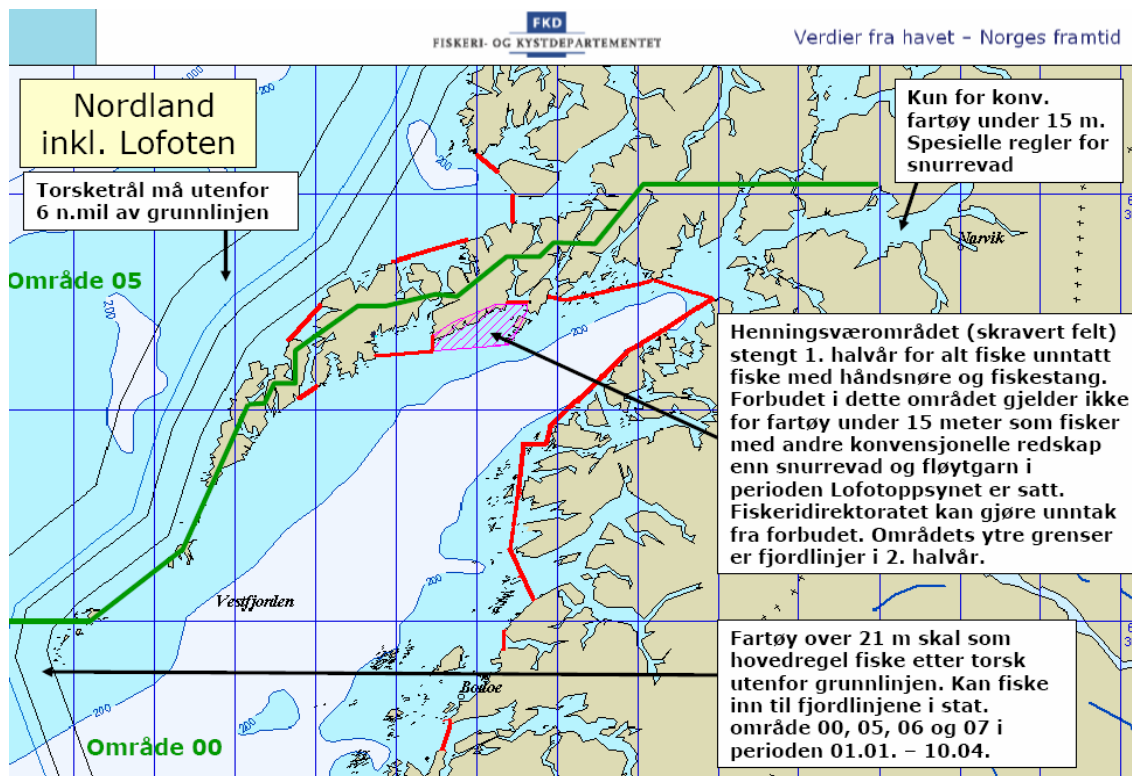
Fiskeridirektoratet ser det svært interessant å kunne gjennomføre analyser med tanke på å fastslå sammensetningen av skrei vs kysttorsk i fangstene i Lofoten.

Havforskningsinstituttet ble derfor bedt om å bidra med opplæring og tilrettelegging for at medarbeidere i Fiskeridirektoratet kunne gjennomføre slike analyser i forbindelse med fisket i Lofoten i 2007. Bistanden inkluderer kvalitetssikring/oppfølging av arbeidet og lån av nødvendig utstyr.

Vår analysevirksomhet er en oppfølging av dette, og det er andre året vi gjennomfører dette prosjektet. Rapporten, **Kysttorsk og skrei i Lofoten 2007**, omhandler første års arbeid.

Fiskeri og Kystdepartementets har utformet verneplaner for kysttorsken. Vern av kysttorsk har høy prioritet i 2007-08. Med dette analysearbeidet kan vi få inn data om hvordan forholdet mellom kysttorsk og skrei er i og rundt området ”Henningsværboksen”.

Nordland Fylkes Fiskarlag har også etterspurt forskningsinnsats for å få stadfestet om det er kysttorsk eller skrei i området.



BAKGRUNN

Det er mulig å skille eller typebestemme kysttorsk og skrei ved å lese forskjeller i otolittene. Dette krever erfarne lesere.

Andre genetiske metoder som variasjon i hemoglobinet og blodtype E er også blitt brukt i forsøk på å skille de to populasjonene.

PanI (tidligere *SypI*) analysene (Pogson et al. 1995, Fevolden and Pogson 1995) er basert på PCR-amplifisering (oppformering) av en spesifikk kodende del av genomet, en del av *Pantophysin* genet. Det fragmentet som blir produsert ved denne PCR reaksjonen, kuttes deretter med et spesifikt restriksjonsenzym (*DraI*). Denne metoden gir tre ulike fragmentmønster avhengig av om torsken er genotype AA, AB, eller BB.

FORPROSJEKT/PLANLEGGING

26. februar 2008 kom seniorforsker Geir Dahle fra Havforskningsinstituttet til Fiskerikontoret i Svolve med analyseutstyr tilsvarende det som ble brukt i 2007.

Bioingeniør Erun Thesen, inspektør med bakgrunn i tidligere Distriktslaboratoriet, fikk 1 ½ dag sammen med han til oppsetting av utstyret og ny gjennomgang av metode.

Utstyret han hadde med var PCR maskin, UV-lampe, elektroforesekammer m/power-supply, pipetter, kjemikalier og forbruksvarer til analysearbeidet.

Samme prøvetakingsprosedyre, utformet av Thesen i 2007, ble i år brukt av oppsynssjef Odd Steffensen. Han har ansvaret for prøveuttak i 2008 som en dokumentasjon på om "Henningsværboksen" skal forbi stengt eller ikke.

Prøven skal tas fortløpende fra fangsten før sortering. Prøvematerialet skal fortrinnsvis være avklippede brystfinner, og hvis det var mulig, 100 prøver fra samme fangst.

Prøven skal merkes med fangstområde, dato, fartøy, fangstredskap, prøvetaker og fraktes til Fiskerikontoret i Svolve. Prøvene skal fryses ned umiddelbart etter uttak, eller transporteres i kjølt tilstand.

ANALYSEMETODE

DNA ekstraksjon/isolering.

Ved bruk av "Chelex-metode" og proteinase.

Denne metoden er basert på at proteinasen ødelegger cellen/vevet og Chelex'en binder opp proteinene slik at DNA blir værende i løsningen.

PCR oppformering.

Fra det isolerte DNA ble *PanI* fragmentet oppformert ved hjelp av to spesifikke primere (enkeltrådet DNA som "gjenkjenner" *PanI* fragmentet).

Restriksjonskutting.

Det oppformerte fragmentet ble blandet med ett restriksjonsenzym. Dersom det oppformerte fragmentet er av "type B" vil restriksjonsenzymet finne et såkalt "kuttsted" og dele fragmentet i to deler som. Disse to delene vil vandre like langt på en gel. Dersom restriksjonsenzymet ikke finner et "kuttsted" er fragmentet av "type A". Dette betyr at dersom begge foreldrene gav torsken "type A" så vil torsken ha ett bånd, egentlig to fragment som vandrer like langt – AA. Dersom begge foreldrene gav torsken et "type B" *PanI* vil dette også gi ett bånd, egentlig 4 like store bånd – BB. En torsk som har fått en "type A" fra den ene og en "type B" fra den andre av foreldrene vil produsere to bånd, egentlige ett bånd for "type A" og to bånd fra "type B".

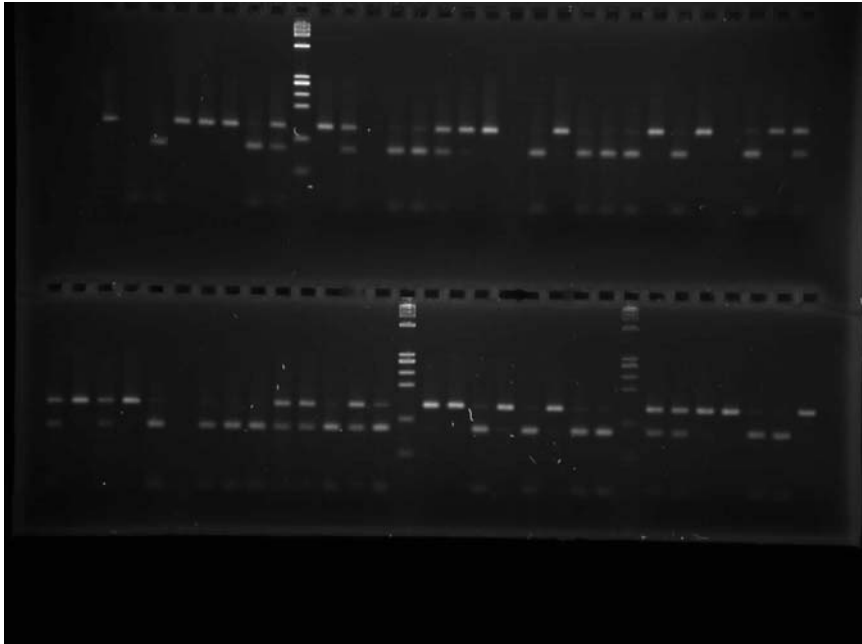
Elektroforese.

De kuttete ("type B") eller ukuttete ("type A") fragmentene ble separert ved hjelp av elektroforese i en gel som består av 2.0% MetaPhore agarose.

Avlesning.

Etter at elektroforesen har gått i 30-45 minutter, legges gelen i et Etidium Bromid bad. Etidium Bromid'en binder seg til DNA og ved hjelp av UV-lys er det mulig å se disse to båndene.

Hvordan disse plasserer seg i forhold til/avstand fra hverandre på gelen avgjør genotypen, AA, AB eller BB. Plasseringene blir registrert som resultat av PCR analysen.



Gel klar for avlesning og registrering.

GJENNOMFØRING

Da analysearbeidet startet ønsket vi også å ta inn prøver i områder vi antok det var et stort innslag av skrei. Oppsynssjef Odd Steffensen tok ut prøver fra Myreegga (snurrevad), og Røst (juksa og snurrevad) i tillegg til prøvene fra området vi ønsket å kartlegge.

Prøvetakingsperioden er fra 24.02.08 til 19.04.08 og det ble tatt prøver av totalt ca. 2 000 individer/torsk.

Prøvene var avklipte finner, uttatt direkte under sløyning av samfengt fangst, før sortering. Unntaket er Henningsværstraumen(1), 25.02.08, der prøvemateriale er gjellekappe.

Fra slutten av februar til 25.mars ble ingen prøver tatt ut. I perioden 01.04.08 tom 09.04.08 tok heller ikke oppsynssjef O.Steffensen ut prøver da han mente Havforskningen var i området og han fikk de informasjonen han ønsket fra dem.

Analysen i Pilotprosjektet (2005) viste at det ikke var noen signifikant forskjell mellom snurrevad og garn med hensyn på genetisk sammensetning.

Analysearbeidet av DNA ble gjennomført ved Fiskerikontoret i Svolvær i godt egnede lokaler.

Det var hovedsakelig Erun Thesen, ved hennes fravær Mildrid Ellingsen, som utførte og registrerte resultatene på analysene.

I oppstarten av årets prosjekt hadde vi store problemer med å få resultater på analysene.

030308 fikk Geir Dahle v/Havforskningsinstituttet overlevert prøver fra Henningsværstraumen(2)250208.

Han hadde ingen problemer med å analysere dem og feilen ble til slutt sporet til å ligge i PCR maskinen.

I samarbeid anskaffet Fiskeridirektoratet og Havforskningsinstituttet en ny PCR maskin. Denne ankom etter påske og først da kunne analysearbeidet med prøvene begynne.

Mot slutten av prosjektet oppsto det nye problemer med analysene. Vi klarte ikke å finne årsaken og derfor ble prøver med usikre/ingen resultater sendt til analyse i Bergen til seniorforsker Geir Dahle(20.05.08). De resterende prøvene ble sendt til HI Tromsø v/ forsker Torhild Johansen og Jon-Ivar Westgaard(23.05.08).

4,7 % av prøvene analysert i Svolvær gav ikke noe resultat. 65 av totalt 1378 individer, eller ca 3 fisk pr. prøve. Hva årsaken kan være er vanskelig å fastslå, men erfaringsmessig kan prøver med for mye DNA (for store biter prøvemateriale) eller gammelt vev gi dette utslaget. Men en suksessandel på over 95 % er klart akseptabelt.

For resultatene fra Tromsø var suksessandelen lavere og der var problemer med analysemaskinen årsaken.

Tabell 1. En konservativ måte å beskrive resultatene:

Prøver som inneholder mindre enn 5 % B regnes som ren kysttorskprøve, mens en prøve som inneholder mindre enn 5 % A må regnes som en ren skreiprøve

Område	Dato	Prøveresultat/tot.antall	Redskap	% A	% B
Myreegga	25.02.08	36/96	Snurrevad	66,7	33,3
Røst	22.03.08	70/70	Juksa	23,0	77,0
”	11.04.08	96/96	Snurrevad	57,8	42,2
”	19.04.08	T 36/96	Snurrevad	56,9	43,1
Brettesnes	31.03.08	26/26	Garn	71,2	28,8
Raftsundet	19.04.08	B 22/	Garn		
Moholmen	25.03.08	74/74	Snurrevad	78,9	21,1
”	25.03.08	96/96	Garn	74,0	26,0
”	10.04.08	44/44	Garn	73,9	26,1
”	12.04.08	96/96	Snurrevad	82,8	17,2
Henningsværstraumen I	25.02.08	86/88	Garn	79,7	20,3
Henningsværstraumen II	25.02.08	B 96/	Garn		
Henningsværstraumen	25.03.08	96/96	Garn	87,0	13,0
”	10.04.08	94/96	Garn	78,2	21,8
”	19.04.08	T 69/96	Snurrevad	89,9	10,1
”Henningsværboxen”	12.04.08	B 65/	Juksa		
”Box Svolvær”	10.04.08	55/55	Juksa	70,6	29,4
Hopskallen	28.03.08	96/96	Snurrevad	86,5	13,5
”	19.04.08	T 73/96	Snurrevad	84,3	15,7
Kabelvågbakken	25.03.08	88/88	Juksa	79,5	20,5
”	31.03.08	22/22	Juksa	72,7	27,3
Austnesfjorden	21.03.08	46/47	Garn	75,0	25,0
Austnesfjorden I	31.03.08	96/96	Garn	84,4	15,6
Austnesfjorden II	31.03.08	B 96/	Garn		
Austnesfjorden	10.04.08	58/58	Garn	88,8	11,2
”	12.04.08	38/38	Garn	82,9	17,1

B – prøvene er analysert ved Havforskningsinstituttet i Bergen

T – prøvene er analysert ved Havforskningsinstituttet i Tromsø.

RESULTATER

Ut fra de analyserte prøvene kan vi tolke resultatene slik at det er blandingsprøver med en sterk overvekt av kysttorsk. Unntaket er Røst, 230308, der vil har en overvekt av skrei, men denne prøven er også en blandingsprøve.

Dispensasjon fra forbudet om fiske etter torsk i ”Henningsværboxen” kan bare gis når det er tilstrekkelig store konsentrasjoner av skrei i området.

Jeg takker for bistand, prøveuttak og velvillighet:

Seniorforsker Geir Dahle, Havforskningsinstituttet i Bergen.

Forsker Torild Johansen og Jon-Ivar Westgaard, Havforskningsinstituttet i Tromsø.

Oppsynssjef Odd Steffensen.

De fartøyene prøvene ble uttatt fra og bedriftene i området.