



Spring 2-2023 Full Rapport

Genetisk identifikasjon av torskeegg i Meløy i Nordland, mars 2023

Quintela, M., Van Der Meeren, T., Dahle, G., Sørvik, A.G.E., Mateos-Rivera, A., Mjanger, H., Wennevik, W., Glover*, K. A.

* kontaktperson

Havforskningsinstituttet, Postboks 1870, Nordnes, 5817 Bergen
23.03.2023

Innledning

Denne rapporten skal sees i sammenheng med rapport 1-2023 (Material og metode). Rapporten beskriver genetiske og statistiske analyser av egg innsamlet i Meløy i Nordland (Figur 1) i perioden 28 februar – 2 mars 2023, samt analyse av prøver fra både vill og oppdrettstorsk. Hovedformålet var for å se om egg som ble fanget inn i området kunne stamme fra gyting av oppdrettsfisk. I området er det kun ett oppdrettsanlegg for torsk. Undersøkelsen ble initiert av Fiskeridirektoratet. Prøvene av egg ble samlet inn av Havforskningsinstituttet, mens vill torsk fra området ble samlet inn av lokale fiskere og prøvetatt av Havforskningsinstituttet. Alle prøvene ble analysert av Havforskningsinstituttet i Bergen.

Material og metode

Materialie

Totalt ble det fanget inn prøver fra 224 fisk, av både oppdrett og vill opprinnelse. Oppdrettstorskprøven bestod av 144 individer som allerede er analysert og beskrevet i rapporten «*Rømming 1-2023: Sporing av rømt oppdrettstorsk fanget i Nordland i januar 2023*» (Tabell 1). Fiskeridirektoratet samlet inn fisk fra to merder ved anlegget, i tillegg til en prøve fra utsortert død fisk. Prøvene ble kalt for M1_2_3_5_7 (død fisk fra anlegget), M2 og M4 (to

merder ved anlegget). Dødfisk prøven ble kalt for M1, og fikk individnavn M1_1 til M1_48. Det er oppgitt fra oppdretteren at all fisk ved anlegget har utgangspunkt fra ett enkelt gytekar. I tillegg til prøvene av oppdrettsfisken, ble det tatt gjelleprøver og otolitter (øresteiner) fra 80 vill torsk som var samlet inn av fiskere fra fjordene nord for Meløy (Gåsværfjorden, Støttfjorden til Reipå, og Mesøyfjorden). Prøvene ble levert som torskehoder. Otolittene ble lest, og basert på gitte kriterier ble opprinnelsen til disse fiskene klassifisert som oppdrett eller vill.

Videre ble oppsynsskipet MS Fjorgyn benyttet som arbeidsplattform for eggundersøkelser. Skipet har «dynamic positioning system» (DPS) som medførte at prøver ble tatt med stor nøyaktighet på posisjon til tross for tidvis mye vind og bølger. Det ble totalt samlet inn ca. 1900 egg fra i alt 50 stasjoner i det geografiske området som strekker seg fra 66° 44.016 til 66° 49.314 N og fra 13° 07.672 til 13° 44.320 E (Figur 1). Til sammen 1666 egg ble funnet på de fire østligste stasjonene (Bjærfjorden). Eggprøvene ble tatt med en WP2 håv med maskevidde 500 µm, som ble senket til 50 m dyp og dradd vertikalt til overflaten med hastighet på ca. 0,5 m/sekund. Egg og plankton ble først silt gjennom 2000 µm, deretter 750 µm duk og så oppbevart levende noen timer til prøvetakingen var ferdig. Deretter ble egg manuelt separert fra plankton og fotografert før de ble lagt på ren etanol for senere DNA-analyse. I alt 200 egg ble analysert fra 31 av stasjonene.

Genetiske analyser

Prøvene ble registrert i en database ved Havforskningsinstituttet og ble tildelt nummer (Tabell 1). DNA-analyser ble utført i laboratoriet i Bergen i tidsrommet 23.01.2023-06.02.2023 (oppdrettstorsk fra sporingsrapport 1-2023) og 13.03.2023-16.03.2023 (egg og vill torsk). DNA ble isolert med Qiagen DNeasy isoleringskit (oppdrettstorsk), DNAdvance reagenser (vill torsk), og 5 % Chelex-metode (eggene). 21 forskjellige DNA-mikrosatelittmarkører (*i.e.* Gmo19, Gmo35, Gmo37, Gmo8, Tch11, Gmo132, Gmo2, Gmo3, Gmo34, Tch13, GmoC303, GmoC305, GmoC78, GmoC80, GmoC83, GmoC127, GmoC272, GmoC274, GmoC343, GmoG12, GmoG25a) ble analysert for alle individ i sammensatte multiplex (genotyping-betingelser tilgjengelig på forespørsel). PCR-produkter ble fortynnet og analysert på en ABI 3730XL Genetic Analyser, og fragmentstørrelsen i basepar (bp) ble beregnet med en 500LIZ™ størrelsesstandard. Automatisk scorete alleler (varianter av mikrosatelittene) ble kontrollert manuelt av to forskere og, etter kvalitetskontroll, ble individene som hadde <25 % manglende genotyper beholdt for videre statistiske analyser.

Statistiske analyser

Analysene ble utført i henhold til protokollen for sporing av rømt oppdrettsfisk ved Havforskningsinstituttet.

Populasjonsstrukturen ble undersøkt ved hjelp av hovedkomponentanalyse (PCA) utført ved bruk av funksjonen *dudi.pca* i *ade4*. Manglende data ble i denne analysen erstattet med gjennomsnittlige allelfrekvenser, uten bruk av skalerte allelfrekvenser (skala = FALSE). Resultatene ble fremstilt grafisk ved hjelp av et spredningsplott.

Direkte tilordning av egg til «baselinje»-prøvene (det vil si oppdrett og vill torsk) ble gjennomført med programmet GeneClass2 ved hjelp av Rannala & Mountains beregningsmetode. Direkte tilordning plasserer et individ i den «baselinje»-prøven som er genetisk mest lik (uansett absolutt grad av likhet).

Totalt antall alleler og allelerikdom (A_r - også referert til som allelisk diversitet), det vil si gjennomsnittlig antall alleler per locus når antall individer er korrigert for, ble beregnet med programmet MSA, mens observert genetisk heterozygositet (H_o) ble beregnet med GenAEx.

Genetisk differensiering mellom prøver ble testet ved estimering av parvis F_{ST} beregnet med programmet ARLEQUIN. F_{ST} er et mål på populasjonsdifferensiering; det vil si genetisk avstand mellom populasjoner uttrykt som forskjeller i allelfrekvens mellom to populasjoner på grunn av genetisk struktur. Korreksjonen for flere sammenligninger for F_{ST} P -verdier ble utført gjennom Falsk Discovery Rate (FDR).

Resultater og diskusjon

Genotyping kvalitetskontroller

Hver mikrosatellit-locus ble vurdert i forhold til manglende data. Locus Gmo127 visste 60,8 % manglende data og ble derfor fjernet fra alle analyser. Manglende data per individ (både for fisk og egg) ble deretter vurdert for datasettet med 20 mikrosatellit-loci. Individene med >25 % manglende genotyper ble fjernet fra analysene. De fleste individer hadde mindre enn 10 % manglende data. Amplifikasjonssuksessen til eggene var lav da 158 av 200 mislyktes fullstendig. Dette var forventet, og antakelig skyldes dette at mange egg ikke var torsk, men egg fra andre arter. Fire av eggene hadde en delvis DNA profil men oppnådde ikke kvalitetskriterier og ble derfor forkastet. Av de antatte 80 ville torsk fanget inn i området som referanseprøve, ble tre individ forkastet. Dette er fordi en kombinasjon av otolittlesing og

genetiske analyser viste at to av individene var rømt oppdrettstorsk, og én hadde usikkert opphav. Totalt antall individer per prøve med akseptabel datakvalitet er vist i Tabell 2. Det ble funnet i alt 38 egg som genetisk kunne identifiseres som torsk (Tabell 3).

Genetisk differensiering mellom vill og oppdrettstorsk

PCA-analysene separerte effektivt mellom oppdrett og vill torsk (Figur 2). Syv av de 38 eggene grupperte seg sammen med villtorsk, mens 31 grupperte seg med prøvene av oppdrettstorsk. Det vil si at 81,6 % av de analyserte torskeeggene har genetisk profil som er mest forenlig med den genetiske profilen til oppdrettstorsken.

Genetisk tilordning (assignment) mellom prøvene

Muligheten for å kunne bruke genetiske metoder for å identifisere opphavet til rømt fisk eller egg øker med den genetiske forskjellen mellom «baseline»-prøvene. Genetisk tilordning ble simulert mellom prøvene av vill og oppdrettsfisk for å teste om det var tilstrekkelig genetisk forskjell mellom gruppene for å kunne identifisere opphavet til eggene som vill eller oppdrett. Graden av genetisk differensiering mellom «baselinje»-prøvene (målt som F_{ST} verdi) og potensialet for genetisk tilordning er tett koblet.

Graden av selvtilordning mellom oppdrettet og vill torsk var veldig høy (99,52 %); dvs bare én oppdrettstorsk ble identifisert som vill fisk. Direkte tilordning av de 38 analyserte eggene til «baselinje»-prøver samsvarte nøyaktig med PCA-resultatet. De syv eggene som grupperte seg med prøvene fra vill torsk ble også direkte tilordnet til denne prøven, og de 31 eggene som viste oppdrettsgenetisk profil ble også direkte tilordnet til oppdrettstorsk (Figur 3).

Genetisk diversitet

Oppsummeringsstatistikk ble beregnet for den totale eggprøven (*Egg_ALT*, N=38) og gjennomført etter oppdeling med hensyn til opprinnelsen i *Egg_Oppdrett* (N=31) og *Egg_Vill* (N=7), se Tabell 2. Antall alleler varierte mellom 148-155 for oppdrettstorsk og egg som er genetisk lik oppdrettstorsk («oppdrettsegg»), mens vill torsk viste mye større genetisk variasjon med 318 alleler. Allelisk rikdom basert på 31 individer viste lignende verdier i oppdrettstorsk og egg med en oppdrettsgenetisk profil (7 - 7,67) men større verdier i villtorsk (12,78). Allelisk rikdom basert på 7 individer viste at «oppdrettsegg» har nesten identisk genetisk variasjon som oppdrettsfisk (4,76 - 4,98), og at egg klassifisert som vill torsk har

nesten identisk genetisk variasjon som vill torsk (6,42 - 6,84). Verdiene for *Egg_ALT* ligger mellom oppdrett og vill fordi det er en blandet prøve. Tilsvarende var observert heterozygositet lavere i prøvene fra oppdrettsanlegget sammenlignet med prøvene av vill torsk og egg av villtype. Disse resultatene tyder på tap av genetisk diversitet i oppdrettsfisken.

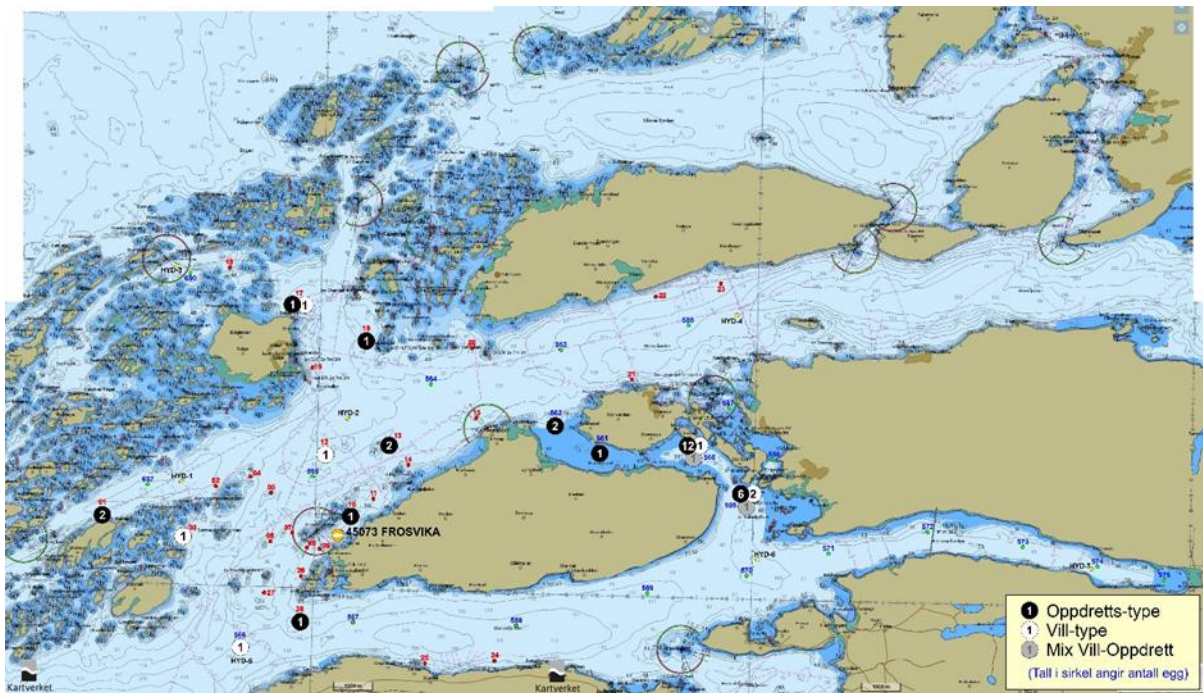
Genetisk differensiering mellom prøvene (både baselineprøver og egg)

Genetisk forskjell mellom enkeltindivider og grupper av individer kan undersøkes ved hjelp av flere ulike statistiske metoder. Blant disse er parameteren F_{ST} , som er et mål for genetisk distanse. Jo høyere verdi for F_{ST} , desto større genetisk distanse mellom prøvene. I dette prøvematerialet fant vi de største parvise genetiske forskjellene målt som F_{ST} mellom egg/individer med ulik opprinnelse. Disse resultatene viser ingen genetisk differensiering mellom oppdrettsegg og oppdrettsfisken (Tabell 4). På samme måte ble det ikke funnet noen genetisk differensiering mellom ville egg og vill fisk (Tabell 4).

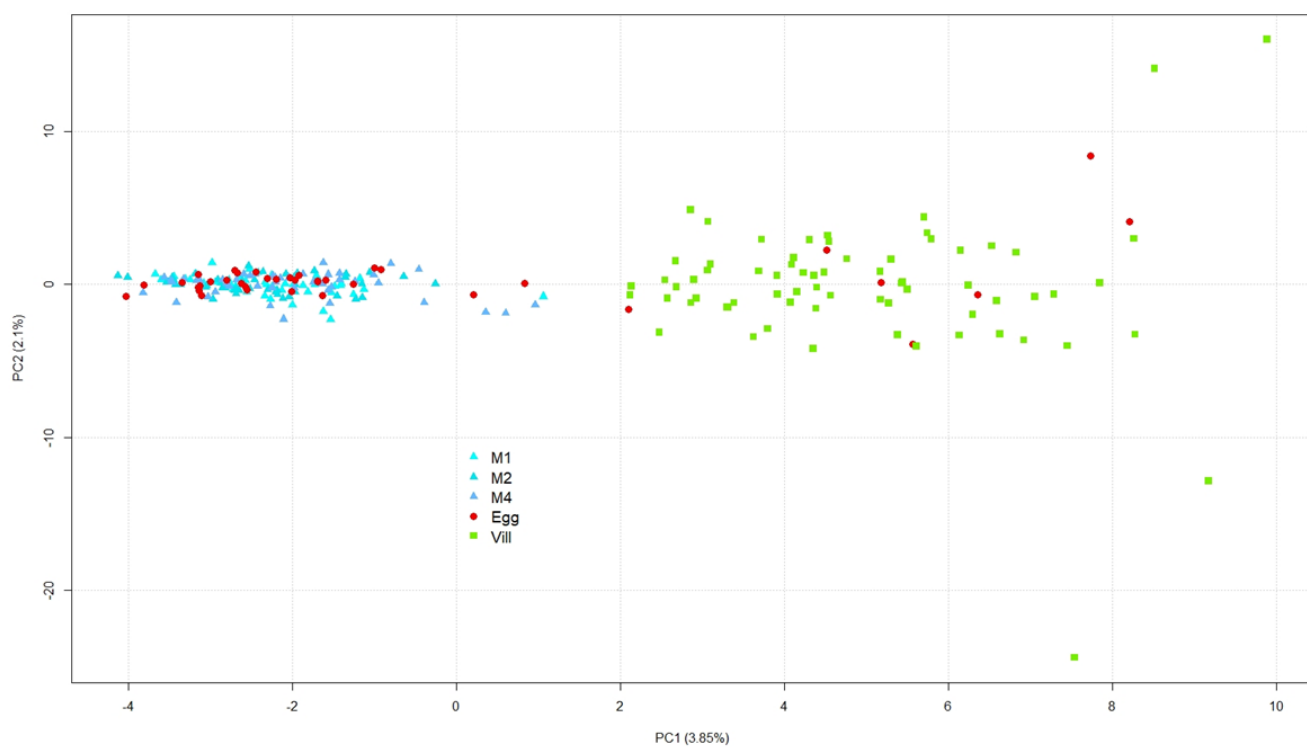
Konklusjon

Av de 38 torskeeggene som ble analysert med tilfredsstillende resultat, har hovedvekten (31 av 38) en genetisk profil som er svært lik oppdrettstorsken i det aktuelle anlegget. Alle analysene inkludert i denne saken støtter disse funnene, og gir en meget sterk indikasjon på at disse 31 eggene stammer fra gyting mellom to oppdrettstorsk. I og med at anlegget antakeligvis har mistet en del torsk ved rømming (se sporingsak 1-2023), kan disse analysene ikke si med sikkerhet om eggene stammer fra gyting i anlegget, og/eller gyting av oppdrettstorsk som har rømt fra anlegget.

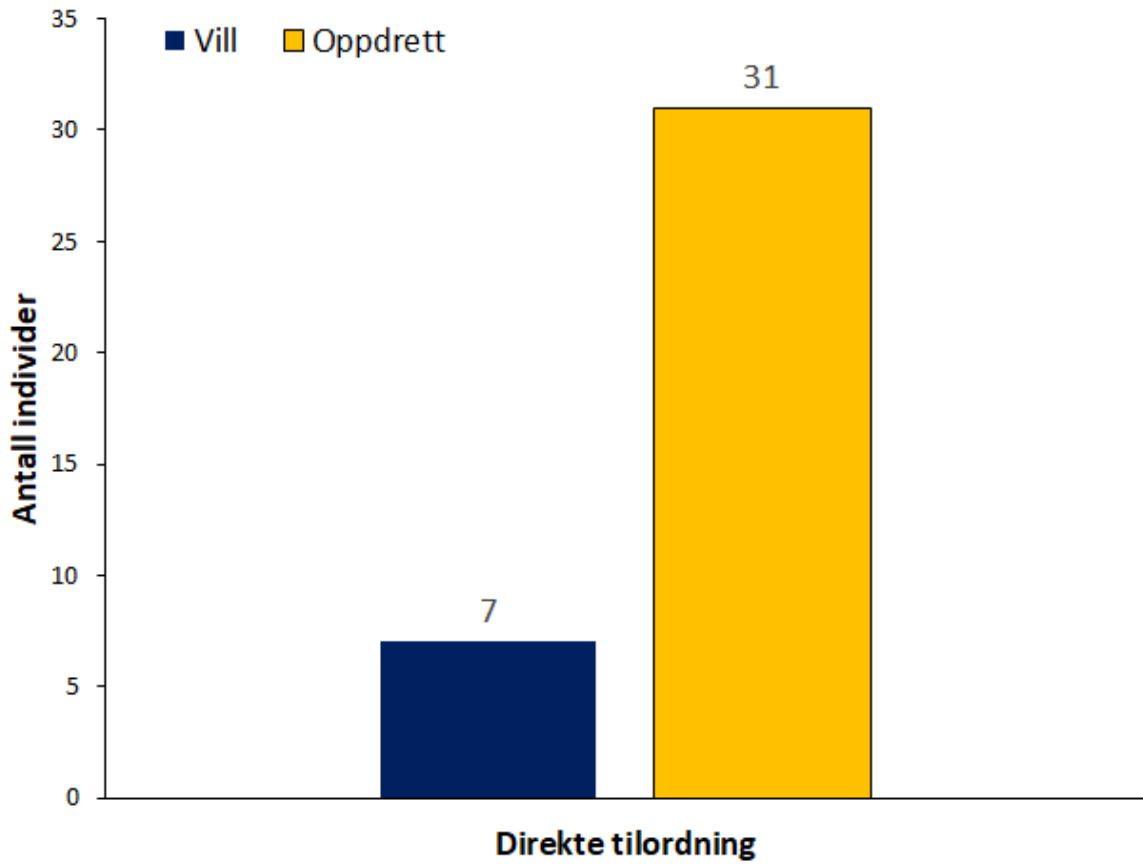
FIGURER og TABELLER



Figur 1. Kart som viser hvor eggene er samlet inn. Svarte sirkler = antall egg identifisert med sannsynlig oppdrett x oppdrett foreldre (29 stk), hvite sirkler = antall egg identifisert som sannsynlig vill x vill foreldre (7 stk). Grå sirkler viser antall egg hvor vi foreløpig er usikker på opphavet men som inneholder genetisk materiale fra oppdrettfisk (2 stk).



Figur 2. Hovedkomponentanalyse (PCA) plot som viser genetisk forskjell mellom oppdrettstorsk (M1-M4), vill torsk (Vill) og eggene (rød).



Figur 3. GeneClass analyse: Direkte tilordning av de 38 analyserte egg til baselineprøver (*i.e.* anlegg og vill fisk).

Tabell 1. Oversikt over «baseline» prøvene fra anleggene, egg og vill fisk. Det er til sammen 3 oppdrett prøver fra 1 anlegg.

Individer	Prøve	Lokalitet	Merd	Innsamlet dato	Vekt (g)	Rognleverandør	Gruppe
M1_1 til M1_48*	M1**	Meløy i Norland	1,2,3,5 og 7	18.01.2023		Havlandet Marin Yngel	Miks
M2_1 til M2_48*	M2	Meløy i Norland	2	18.01.2023		Havlandet Marin Yngel	a
M4_1 til M4_48*	M4	Meløy i Norland	4	18.01.2023	3.3	Havlandet Marin Yngel	a
Egg 1 til 200	Egg	Norland	na	28.02.2023- 02.03.2023	na	na	na
Vill 1 til 80	Vill	Norland	na	01.03.2023	na	na	na

Merknader:

*Individuelle navn ble forenklet på denne måten for å forhindre at statistiske programmer avkuttet dem.

**Prøve M1-2-3-5-7 kalles M1 for enkelhet.

Tabell 2. Oppsummeringsstatistikk: Antall individer i hver prøve etter kvalitetskontroll av genotyping, antall alleler, allelisk rikdom (A_r) basert på et minimum antall av 31 og 7 individer og observert heterozygositet (H_o , gjennomsnitt \pm SE).

Type	Prøve	Antall individer	Antall alleler	Allelisk rikdom (N=31)	Allelisk rikdom (N=7)	H_o
Oppdrett	M1	46	155	7,21	4,76	0,672 \pm 0,043
Oppdrett	M2	46	149	7,00	4,83	0,676 \pm 0,049
Oppdrett	M4	48	150	7,06	4,89	0,654 \pm 0,047
Egg_Oppdrett	Egg	31	148	7,67	4,98	0,697 \pm 0,050
Egg_Vill	Egg	7	128	na	6,42	0,750 \pm 0,060
Egg_ALT	Egg	38	202	9,57	5,63	0,707 \pm 0,051
Vill	Vill	69	318	12,78	6,84	0,768 \pm 0,043

Tabell 3. Eggstasjoner som ble benyttet, antall egg i håvtrekkene, antall egg analyser og antall torskeegg funnet. Stasjon nr. korresponderer med stasjonene prottet i kartet i Figur 1.

Dato:	Stasjon nr.	Posisjon (DMM)		Genetikk-nr.	Antall egg		
		Lengde (N)	Bredde (Ø)		I prøven	Analysert	Torskeegg
28.02.2023	1	66 45.905	13 07.672	1	4	4	2
28.02.2023	687	66 46.298	13 09.298	2	4	4	
28.02.2023	2	66 46.333	13 11.533	3	2	2	
28.02.2023	3	66 45.623	13 10.384	4	1	1	1
28.02.2023	4	66 46.480	13 12.702	5	1	1	
28.02.2023	5	66 46.263	13 13.460	6	5	5	
28.02.2023	6	66 45.610	13 13.502	7	1	1	
28.02.2023	7	66 45.746	13 14.242	8	1		
28.02.2023	8	66 45.524	13 14.712	9	1	1	
28.02.2023	9	66 45.528	13 15.196	10	2	2	
28.02.2023	10	66 45.978	13 16.223	11	5	5	1
28.02.2023	11	66 46.228	13 16.932	12	4	4	
28.02.2023	565	66 46.515	13 14.939	13	2	2	
28.02.2023	12	66 46.800	13 15.299	14	4	3	1
28.02.2023	13	66 46.953	13 17.435	15	5	4	2
28.02.2023	14	66 46.693	13 18.124	16	3	1	
01.03.2023	690	66 49.165	13 10.440	17	2		
01.03.2023	18	66 49.287	13 11.860	18	1		
01.03.2023	17	66 48.798	13 14.203	19	8	4	2
01.03.2023	16	66 47.972	13 14.753	20	1		
01.03.2023	19	66 48.371	13 16.558	21	1	1	1
01.03.2023	564	66 47.745	13 19.000	22	1		
01.03.2023	15	66 47.334	13 20.449	23	1		
01.03.2023	20	66 48.323	13 20.151	24	2	0	
01.03.2023	563	66 48.296	13 23.298	25	0		
01.03.2023	562	66 47.244	13 23.233	26	4	2	2
01.03.2023	561	66 46.914	13 24.668	27	9	4	1
01.03.2023	21	66 47.915	13 25.733	28	2		
01.03.2023	558	66 46.838	13 30.590	29	5		
01.03.2023	557	66 47.586	13 29.069	30	2		
01.03.2023	556	66 48.649	13 27.726	31	3		
01.03.2023	22	66 49.078	13 26.493	32	1		
01.03.2023	23	66 49.341	13 28.668	33	5		
02.03.2023	28	66 45.200	13 14.645	34	9	8	
02.03.2023	27	66 44.911	13 13.284	35	4	3	
02.03.2023	566	66 44.122	13 12.578	36	2	2	1
02.03.2023	26	66 44.016	13 18.857	37	14	14	1
02.03.2023	567	66 44.564	13 16.507	38	33	33	
02.03.2023	25	66 44.528	13 14.590	39	1	1	
02.03.2023	24	66 44.084	13 21.311	40	3	3	
02.03.2023	568	66 44.541	13 21.983	41	1		
02.03.2023	569	66 44.993	13 26.337	42	2		
02.03.2023	560	66 46.961	13 27.882	43	24	23	14
02.03.2023	559	66 46.204	13 29.703	44	21	21	9
02.03.2023	570	66 45.307	13 29.861	45	7		
02.03.2023	571	66 45.670	13 32.752	46	20		
02.03.2023	572	66 45.964	13 35.791	47	74		
02.03.2023	573	66 45.782	13 39.311	48	150		
02.03.2023	574	66 45.537	13 41.909	49	386	41	
02.03.2023	575	66 45.385	13 44.320	50	1056		

Tabell 4. Parvise F_{ST} verdier (genetisk distanse – nede til venstre), og tilhørende P -verdier (oppe til høyre) mellom prøvene. P -verdier med fet skrift er signifikante etter FDR-korreksjon på $\alpha=0,05$ og den tilsvarende F_{ST} verdien er også uthevet med fet skrift for å lette identifiseringen. Eggene ble analysert ved duplikat; *i.e.* som en hel prøve av $N=38$ (Egg_ALT) og etter splitting i vill (Egg_Vill, $N=7$) og oppdrettsgenetikk profil (Egg_Oppdrett, $N=31$).

	M1	M2	M4	Egg_Oppdrett	Egg_Vill	Egg_ALT	Vill
M1	*	0,680	0,032	0,241	0,000	0,024	0,000
M2	0,000	*	0,027	0,673	0,000	0,259	0,000
M4	0,005	0,005	*	0,029	0,000	0,005	0,000
Egg_Oppdrett	0,002	0,000	0,006	*	0,000	1,000	0,000
Egg_Vill	0,080	0,074	0,076	0,074	*	0,006	0,434
Egg_ALT	0,005	0,001	0,008	0,000	0,035	*	0,000
Vill	0,055	0,053	0,053	0,048	0,001	0,030	*