

Kyngreining laxfiska með PCR-mögnun á *SdY* geninu

Skýrsla til Erfðanefndar landbúnaðarins

Lea Jerman Plesec, Leanne Rademakers, Arnar Pálsson

5. maí 2020

Ágrip

Ungviði laxfiska alast upp í ferskvatni en ekki er sjáanlegur munur á útliti fiskanna fyrir kynþroska. Kyn hefur samt mikið að segja með lífssöguákvæðanir sem liggja fyrir fiskunum, enda er vöxtur ólíkur sem og geta karlfiskar valið um að fara eða vera. Karlkyns laxar sem ganga til hafs og snúa aftur sem stórir fiskar þurfa að berjast um hylki kvenkyns laxa, sem velja þá á grundvelli gæða og stærðar. Karlkyns laxar sem í lengjast í ám geta valið laumu-æxlun, þ.e.a.s. orðið kynþroska smáir vextir og laumast til að frjóvga hrogn úr æxlun stærri einstaklinga. Meðal bleikja hérlendis finnast stofnar sem stunda sjögöngu á meðan aðrir eru fastir ofan fossa. Er mögulegt að ólík lífssögu einkenni þróist í tofnum sem geta ekki stundað sjögöngu? Hægt er greina kyn laxfiska með erfðaprófi, en aðferðin byggir á því að gott erfðaefti sé fáanlegt. Í þessari rannsókn voru gerðar tilraunir við að ná erfðaefti úr hreistri laxfiska, aðferðir til að greina kynákvæðandi genið bættar, aðferðinni beitt á gamalt og nýtt erfðaefti. Bestar niðurstöður fengust fyrir ferskt erfðaefti úr ungleikjum úr Skagafirði. Þar er töluverður breytileiki í hlutföllum kynja milli lækja, sem vert er að rannsaka frekar. Niðurstöðurnar sýna að aðferðirnar til að greina kyn virka ágætlega fyrir íslenska laxafiskastofna og að hægt er að rannsaka kynjahlutföll ungiðis í villtum nýtjastofnum laxfiska hérlendis.

Inngangur

Ungviði flestra laxfiska alast upp í ferskvatni, lækjum, ám og stundum vötnum. Flestar tegundir og stofnar laxfiska, með afgerandi undantekningum þó, leita síðan til sjávar og taka út vöxt og undirbúa kynþroska. Laxinn og urriði eru best þekktu dæmin um þetta, en sjóbleikja stundar einnig þennan lífstíl. Bleikjur hérlendis hafa einnig numið vötn og einangrast ofan fossa og stunda þ.a.l. ekki lengur sjögöngu. Urriði hefur einnig einangrast á nokkrum stöðum og stendur undir stórum sportveiðistofnum (Veidivötn og Þingvallavatn). Sjóganga er talin ákjósanleg því að þar komast fiskarnir í meiri fæðu en í ám eða vötnum að vetrarlagi og geta því fyrr orðið kynþroska. En sjóganga er einnig áhættusöm, því í hafi eru margir afræningjar og ekki er víst að fullþroska fiskur skili sér aftur í réttan straum á réttum tíma, til að tímagast. Kynþroska laxfiskar eru mismunandi að stærð við kynþroska og fer fram makaval (kvenfiskar velja sér karlfiska) og samkeppni milli karlfiska (sem geta frjóvgað marga kvenfiska) sem tengist stærð þeirra og styrk.

Kyn og kynjahlutföll í stofnum eru því mikilvæg atriði fyrir veiðistofna allra tegunda laxfiska á Íslandi. Margvíslegnar spurningarnar liggja fyrir eins og sést á eftirfarandi upptalningu. Hversu margir fiskar af hvoru kyni koma upp í árnar? Hvert er kynjahlutfall ungiðis í ánum? Leita fiskar af ólíku kyni frekar í sjögöngu (þekkt er að sumir karlfiskar kjósa að sitja eftir í ám og þroskast sem dverghængar sem freista þess að svindla sér inn í mökunartilburði stærri fiskanna)? Haldast kynjahlutföll í tilteknum vatnsföllum stöðug milli ára? Er hægt að greina kynjahlutfall í veiði mörg ár aftur tímann, með því að greina kyn frá hreistri? Geta okkar til að svara þessum hefur verið takmörkuð til þessa, enda er tímafrekt að greina kyn fiska með krufningu og ekki syndir fiskurinn af stað aftur eftir slíka meðferð. Mat á hrygningarstofnum í laxveiðiám er lykilatriði fyrir mat á nýliðun og stjórn á nýtingu. Kyn einstaklinga er lykilkættur í því mati. Veigamikið atriði er að rannsóknir á ungiðis, t.d. lax og sjóbleikju, eru því marki brendar að kyn einstaklinga er ekki vitað. Með erfðagreiningu er hægt að komast að kynjahlutföllum í ókynþroska fiski, ólíkra árganga og milli áa og landsvæða. Slík þekking hefur margvíslegt hagnýtt og fræðilegt gildi. T.d. er kynjahlutfall jafnt í öllum árgöngum eða í flestum ám?

Eiginleikar lifvera eru undir áhrifum bæði umhverfis og erfða en framlagið er mismikið eftir eiginleikum og aðstæðum. Íðullega hafa, tugir, hundruðir eða þúsundir breytileika áhrif á tiltekna eiginleika, t.d. hæð manna. Því kom á óvart að breytileiki í *vgl13* geninu sýndi mjög sterkt samband við lífssögu laxa [Ayllon et al., 2015, Barson et al.,]. Nokkrir erfðabreytileikar tengjast vexti, stærð við kynþroska og lengd dvalar í sjó. Áhrif breytileikanna eru ólík milli kynja, eins samsæta er víkjandi í karlfiskum en ríkjandi í kvenfiskum. Ástæðan er líklega ólík lífssögu-nálgun kynjana. Munur er á tíðni breytileikanna í *vgl13* eftir stofnum, norður-suður eftir Noregi, milli ólíkra áa og milli árganga eða tímabila innan sama árkerfis.

Markmið

Markmið rannsóknarinnar voru fjórþætt.

- Koma upp aðferðum til að greina erfðaeini (DNA) úr hreisturum laxfiska hérlandis.
- Betrumbæta aðferðir til að greina kyn laxfiska með PCR aðferð á *SdY* geninu.
- Greina mismunu í kynjahlutfall bleikju í ólíkum straumvötnum á Íslandi sem getur endurspeglad nýliðunargetu og lífssöguþætti sem einkenna viðkomandi stofna.
- Að greina hversu nákvæmir veiðimenn/verðir eru þegar skilað er inn hreisturpokum með upplýsingum um fiska.

Með því að erfðagreina lífsýni sem fylgja hreistri er hægt að greina kyn fisksins sem það kom úr. Þannig fæst mat á áreiðanleika kyngreiningar veiðimanna og líka staðfesting á kynjahlutföllum laxa, eftir aldri, í nokkrum ám.

Aðferðir

Hreistur fiska eru harðgerð og tiltölulega DNA snauð. Þar af leiðandi þarf að huga að ýmsu þegar einangra á DNA úr því. Hér var unnið með hreistur sem hafa verið þurrkuð við herbergishita og látin standa til lengri tíma (2-5 ár) sem gerir það að verkum að sýnin eru harðari en ella. Til að geta fengið að lokum eitthvað DNA til að vinna með þarf tiltölulega mikið af hreistri til að fá ágætt DNA magn.

Í upphafi var lagt upp með það að blanda lausnir sem nota átti í DNA einangrunina [Li et al., 2013]. Það er sjaldgæft að vísindamenn reyni að einangra DNA úr hreistri. En til að geta tekið tiltölulega lítil sýni úr fiskum og samtímis skaða þá ekki eða minnka lífsgæði þeirra er hægt að taka nokkrar hreisturflögur. Slíkt er iðulega gert af veiðimönnum og veiðileyfahöfum af fiskum sem berast. Hafa ber í huga að eitt meðalstórt hreistur er í kringum 0.5 mg (mælt á tilraunastofu, ekki staðfest heimild) og því er lítill efniviður til að vinna með. Aðferðin sem við lögðum upp með þurfti hins vegar 20-50 mg, sem gerir 40-100 hreisturflögur. Ekki er hægt að taka það margar flögur af lifandi fisk án þess að valda honum skaða í leiðinni. Einnig er ákaflega sjaldgæft að svo mörgum hreisturflögum sé safnað af veiddum fiskum. Önnur rannsókn [Johnston et al., 2013] notfærði sér 1-2 hreistur í DNA einangrun með QIAamp DNA mini kit (Qiagen Inc. Valencia, CA, USA). Það er aðferðin sem við ákváðum að nota.

Vísarnir sem hafa verið notaðir til þessa á Líffræðistofnun Háskóla Íslands við kyngreiningu laxfiska magna upp svæði sem er u.þ.b. 200 basapör að stærð. Oft á tíðum reyndist erfitt að greina búta sem eru svo litlir og ákváðum við þ.a.l. líka að búa til ný vísapör út frá *SdY*-geninu í erfðamengi bleikjunnar borið saman við lax og urriða. Við framkvæmdum PCR tilraunir til að athuga hvort erfðaeinið væri nægilega gott og hvort hvarfið hafi tekist, með því að notast við sérstakt viðmiðunargen. Í fyrri rannsóknum á Líffræðistofnun höfum við notast við mögnun á hluta hvatberaerfðamengisins en það hefur ákveðna galla. T.a.m. er töluvert meira af hvatberum m.v. eitt eintak af *SdY*-gen í hverri frumu. Ef vísapör fyrir bæði genin eru í einu PCR hvarfi verður töluvert líklegra að hvatberagenið magnast meira upp því það eru fleiri DNA mót til staðar. Það og sú staðreynd að *SdY* gena bandið er minna gerir það að verkum að *SdY* böndin verða almennt óljósari og erfiðara að greina þau á gelinu. Sú ákvörðun var því tekin að notfæra sér önnur gen sem eru staðsett í kjarnanum. Fyrri niðurstöður sýndu að *OTX2* og *ETBR2* væru hentug gen.

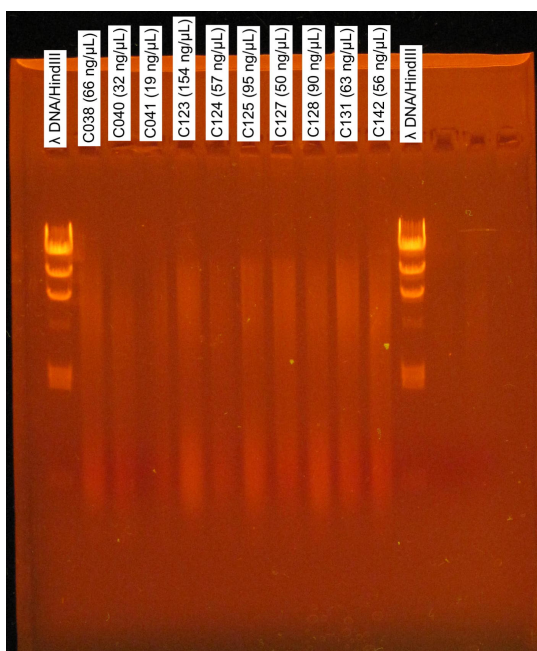
Að lokum var ákveðið að kyngreina mikinn fjölda ungleikja úr 8 ám frá Skagafirði á Íslandi með svipaðri aðferð. Sýnin sem voru notuð í DNA einangrun höfðu verið klippt úr ugga fiskanna og geymd í 80% etanól lausn en einangrunin var framkvæmd með NucleoMag Tissue kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG). Kyngreining var síðan framkvæmd með PCR en notast var við vísapör sem magna upp ~200 basapara bút af *SdY*-geninu í karlkyns fiskum. Viðmiðunargenið *ETBR2* var notað til að staðfesta að mögnun ætti sér stað í öllum sýnum og voru afurðirnar dregnar á 2% agarósa geli greina bönd og stærðir þeirra. Þannig var hægt að greina kyn einstaklinganna.

Niðurstöður

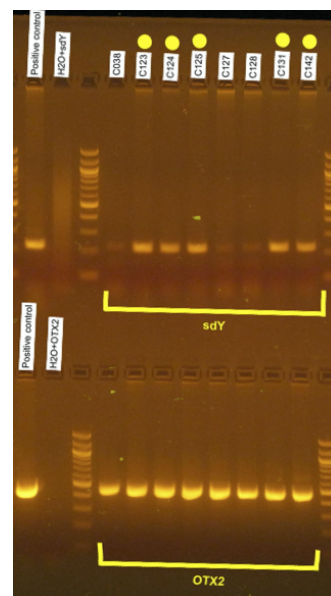
DNA einangrun

Niðurstöður DNA einangrunar með kit-inu sýndu að 0,5-4,6 mg hreistursýni úr urriða (2-5 ára) gefa DNA styrk um 20-150 $ng/\mu L$. Gæði erfðaefnis úr sýnunum var kannað með rafdrætti á geli, sem sýndi að töluvert af DNA var til staðar, en að gæði þess voru takmörkuð (ekki mikið um heillega búta, erfðaeftnið var mikið niðurbrotið). Það gæti stafað af almennu niðurbroti þar sem sýnin voru þurrkuð og geymd við stofuhita (Mynd 1a). Við ákváðum líka að kyngreina urriða sýnin og nota *OTX2* sem viðmiðunargen. Niðurstöður gáfu skýra mynd af kyni einstaklinga og voru þær í samræmi við þekkta kyngreiningu sýnanna (Mynd 1b).

Einangrun á DNA úr eldri hreistrum gekk illa. Við gerðum nokkrar tilraunir en fengum aldrei nægilega sterka eða heillegar afurðir. Því gátum við ekki klárað þann hluta rannsóknarinnar (markmið 4).



(a) DNA styrkur var mældur með NanoDrop-tæki og sýni síðan dregin á geli samhliða λ -DNA/HindIII-ladder



(b) Kyngreining á sýnum sem voru með DNA styrk á bilinu 50-150 $ng/\mu L$. Efri dálkar sýna mögnun á *sdY*-geninu þar sem sýni merkt með gulum punkti eru flokkuð sem karlkyns sýni. Nedri dálkar sýna mögnun á viðmiðunargeni í samsvarandi sýnum.

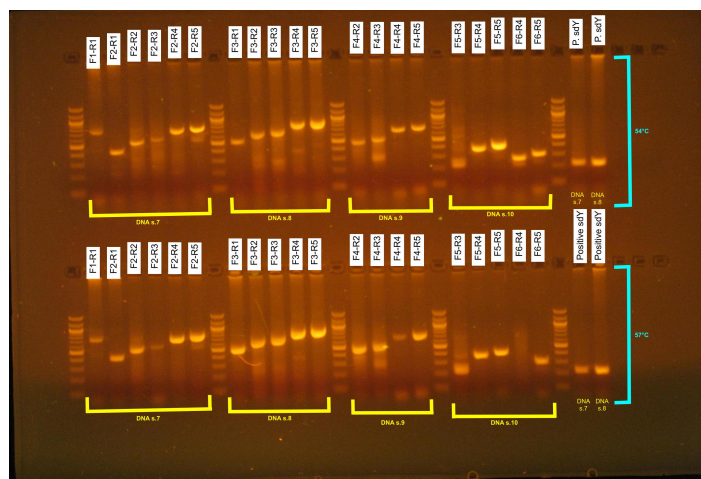
Mynd 1: DNA sýni voru einangruð úr hreistri urriða með QIAamp DNA mini kit. Sýnin voru að lokum mæld með NanoDrop-tæki sem mælir DNA styrk í lausnunum. Til að athuga hversu heillegt DNA var í sýnunum voru 0,5 μg af DNA var rafdregin á geli (a). 8 sýni með tiltölulega mikinn styrk af DNA voru kyngreind og voru sýni C123, C124, C125, C131 og C142 karlkyns en sýni C038, C127 og C128 kvenkyns (b). Það var í samræmi við fyrri gögn sem skráðu af hvaða kyni fiskarnir voru þegar hreistrin voru tekin.

Hönnun vísa fyrir kyngreiningar

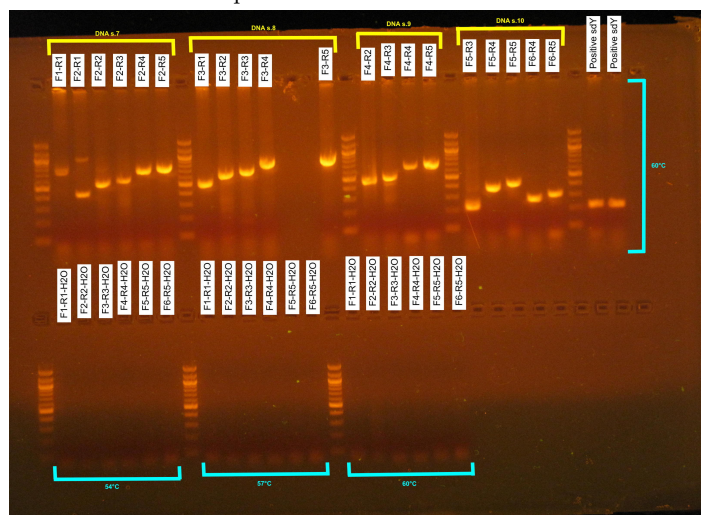
SdY er kynákvarðandi gen sem var fyrst skilgreint meðal laxfiska í regnbogasilungi [Yano et al., 2012]. Genið hefur mikla basa samsvörun milli laxfiska og er hægt að nýta sér það með því að nota sömu vísapör til að magna upp hluta gensins og þannig kyngreina mismunandi tegundir. Til að kanna heppilegustu samsetningarnar hönnuðum við 6 mismunandi fram-vísa og 5 mismunandi aftur-vísa þar sem við studdumst einnig við þekkta vísa sem höfðu verið notaðir í fyrri rannsóknum [Yano et al., 2012, Yano et al., 2013] og athuguðum síðan mismunandi samsetningar af fram og aftur vísam (Tafla 1). Við notuðum sýni frá þekktum karlkyns bleikjum til að sjá hvort það yrði mögnun í PCR hvörfum. Sömu pörin voru prófuð við þrjú mismunandi hitastig til að athuga við hvaða aðstæður pörun vísa við einþátta DNA mót væri skilvirkust (Mynd 2). Fyrstu niðurstöður sýndu að vísaparanir F2-R4 sýna góð bönd á geli eftir PCR þegar notast er við sýni af báðum kynjum (mynd ekki sýnd).

Tafla 1: Tafla sem sýnir hér um bil lengd bandanna sem mismunandi paranir af fram og aftur vísapörum spanna. Eftirfarandi pör voru síðan notuð í PCR hvörf og dregin á geli.

Vísar	Lengd bands	Vísar	Lengd bands	Vísar	Lengd bands	Vísar	Lengd bands
F1-R1	730	F2-R5	780	F3-R5	860	F5-R3	320
F2-R1	420	F3-R1	510	F4-F2	480	F5-R4	370
F2-R2	530	F3-R2	620	F4-R3	620	F5-R5	410
F2-R3	690	F3-R3	770	F4-R4	680	F6-R4	270
F2-R4	740	F3-R4	830	F4-R5	720	F6-R5	300



(a) Efri röð sýnir bönd sem vísapör magna upp þegar notast er við 54°C í skrefi þar sem vísar bindast við einþátta DNA mót. Í neðri röðinni er notast við 57°C



(b) Efri röð sýnir bönd sem vísapör magna upp þegar notast er við 60°C í skrefi þar sem vísar bindast við einþátta DNA mót. Neðri röð athuga hvort einhver mögnun eigi sér stað í vatnssýnum (ekkt DNA mót).

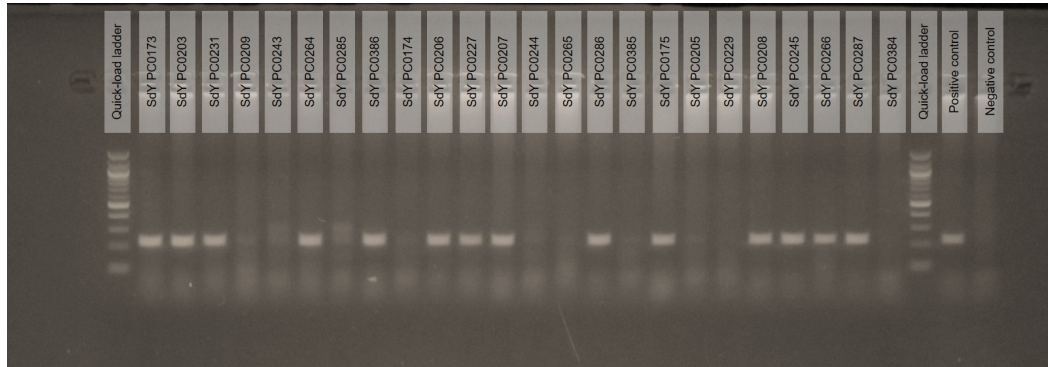
Mynd 2: Mismunandi vísaparanir til að magna upp *sdY*-genið voru athugaðar í karlkyns bleikju-sýnum sem var búið að kyngreina áður. Vísapörin voru prófuð við þrjú mismunandi hitastig: 54°C, 57°C og 60°C.

Kyngreining á mismunandi lækjarbleikjum

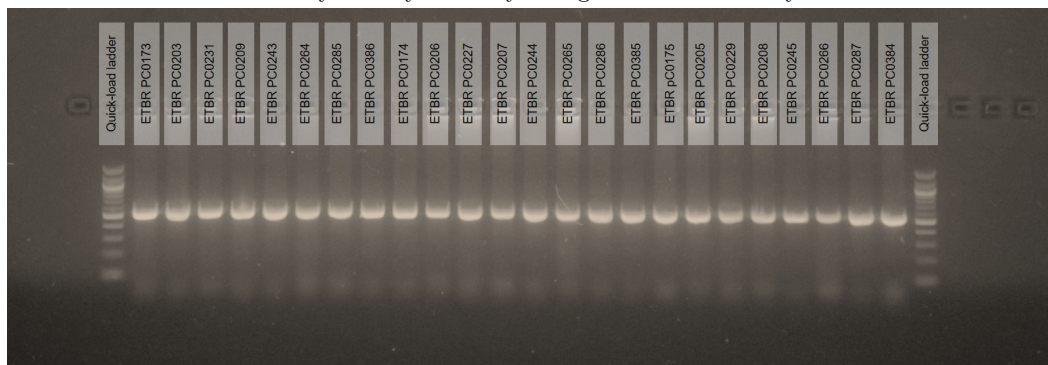
Samtals voru einangruð og kyngreind uggasýni úr 180 bleikjum. Flest þeirra (156) voru ungvíði úr 8 mismunandi lækjum eða ám á Skagafjarðarsvæðinu. En hin 24 voru af fullorðnum rennandi bleikjum. Hvert sýni var prófað tvisvar sinnum. Kyngreiningin fól í sér að magna upp *sdY*-genið með sérútbúnum vísam og ef það sást band þegar sýnið var dregið á geli, þá var *sdY*-genið til staðar og sýnið úr karlkyns fisk, ef ekkert band var sjáanlegt var sýnið kvenkyns. Hin prófunin fór þannig fram að genið *ETBR2* var notað sem viðmiðunargen til að tryggja að mögnun færi fram í sýnunum. Einnig var notast við jákvætt og neikvætt viðmiðunarsýni fyrir *sdY*-genið, en það voru staðfest kvenkyns og karlkyns sýni notuð. Sýnin voru keyrð á geli þannig að í efri röð voru niðurstöður *sdY* mögnunar og í röð fyrir neðan, í tilsvarendi dálki, var sama sýni nema með *ETBR2* mögnun (Mynd 3).

Niðurstöður fyrir 180 sýni sýndu 89 kvenkyns fiskar og 91 karlkyns fiskar. Magn og hlutföll milli áa voru hins vegar breytileg. Greind voru 26 sýni fiska sem aðgengileg voru á tilraunastofunni. Rennandi fiski hafði verið safnað á hrygningarstöðum (í Vatnshlíðarvatni, Þingvallavatni og Fljótá) og erfðaeftirbærni einangrað. Erfðagreiningin var 100 prósent samhljóða kyngreiningunni, sem sýnir okkur að aðferðin

er bæði nákvæm og skilvirk.



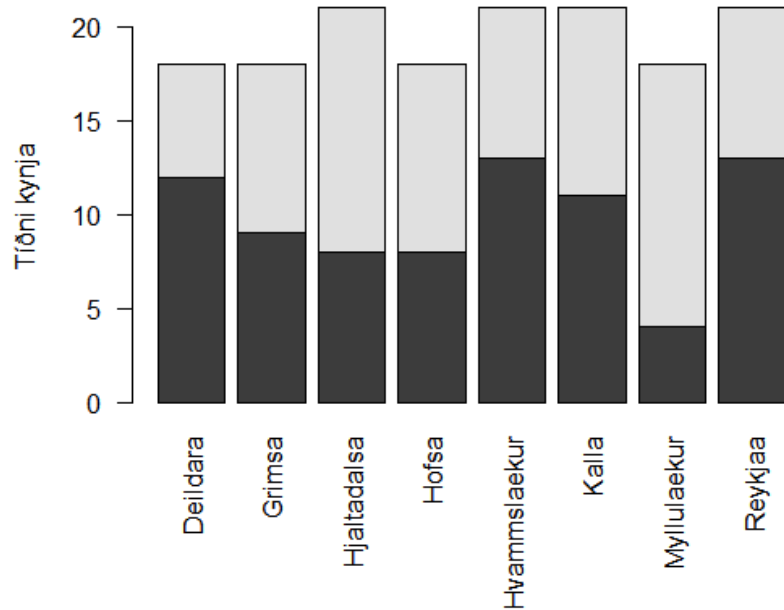
(a) *SdY*-genið magnað úr sýnum með PCR og afurðin dregin á geli með rafdrætti. Sýni sem eru með áberandi bönd eru karlkyns en sýni sem sýna engin bönd eru kvenkyns.



(b) *ETBR2*-genið magnað upp með PCR í öllum sýnum til að staðfesta að erfðaeftni einstaklinga sé nægilega gott fyrir PCR.

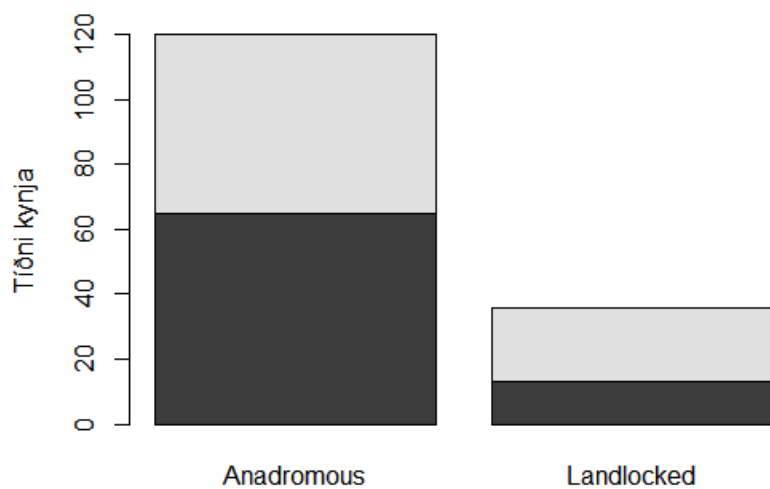
Mynd 3: Dæmi um niðurstöður sem fengust við kyngreiningu á ungleikjum. Hlutar tveggja gena voru alltaf mögnuð upp með PCR fyrir hvern einstakling. Hér er sýnd mögnun á 24 sýnum.

Alls voru 156 ungleikjur úr 8 lækjum og ám í Skagafirði kyngreindar, um 20 fiskar úr hverri á. Fiskarnir voru á 1-2 ári og ekki mögulegt að greina mun á kynjum eftir útliti. Hlutfall kynja var ekki marktækt ólíkt milli áa, en samt voru misjafnlega ýkt gildi (Mynd 4) sem hefðu mögulega gefið marktækan mun ef sýnin hefði verið stærri.



Mynd 4: Fjöldi ungleikja af hvoru kyni, eftir lækjum í Skagafirði. Svartlitað eru kvenkyns bleikjur og ljósleitt táknar karlfiska.

Sumir lækirnir eru tengdir við sjóinn með greiðri farleið. En aðrir eru einangraðir fyrir ofan fossa sem eru ófiskgengir. Þegar hlutfall kynja var kannað í lækjum af þessum tveimur gerðum kemur í ljós marktækt hærra hlutfall karlfiska í landlæstum stofnum (23 af 36) en sjógöngustofnum (55 af 120) (Mynd 5).



Mynd 5: Kyn ungleikja eftir gerðum lækja í Skagafirði. Svartlitað eru kvenkyns bleikjur og ljósleitt táknar karlfiska. Sex af ánum eru líklega með sjógöngustofna ("Anadromous") á meðan tvær eru klárlega einangraðar frá fiski sem gengur frá sjó vegna ófiskgengra fossa ("Landlocked").

Samantekt

Niðurstöður sýna að hægt er að DNA einangra og kyngreina mjög lítil hreistursýni (allt niður í 0.5 mg) með tiltölulega góðum árangri og því hægt að notfæra sér Qiagen kittið til að ná erfðaeftni úr litlum sýnum. Aðferðin virkaði ekki fyrir eldri sýnin og þarf líklega að nota annað hvort meira hreistur eða slípa aðferðina enn frekar. Af þessum ástæðum gátum við ekki svarað rannsóknarspurningu fjögur, um breytingar á kynja hlutfalli laxfiska yfir tíma. Nýju vísarnir sem hannaðir voru sýndu ásættanlega niðurstöður og verður hægt að notfæra sér þá í tilraunum í framtíðinni. Næstum tvö hundruð bleikjusýna, úr fullvaxta fiski og ungviði sem ekki er hægt að kyngreina á útliti, voru greind með aðferðinni á tiltölulega skömmum tíma og er því hægt að áætla að afkastageta aðferðarinnar er hlutfallslega mikil og mun það nýtast vel í framtíðinni. Niðurstöðurnar benda til að hlutfall kynja ungviðis kann að vera mismunandi milli stofna sem hafa aðgengi að sjó eða ekki. Það skiptir töluverðu máli fyrir þekkingu okkar á þessum afmörkuðu stofnum sem finnast víða um land og umsýslu slíkra veiðivatna.

Vonir standa til að niðurstöður verkefnisins nýtist til að skilja laxafiskastofna hérlandis og breytingar á þeim t.d. samfara loftslagsbreytingum. Þá munu aðferðirnar og þekkingin einnig nýtast sem fyrsta skref fyrir áþekkar greiningar á fleiri laxa-, urriða- og bleikjustofnum hérlandis. Það er talið munu bæta skilning okkar á nytjastofnum laxfiska og einnig villtum stofnum bæði á láglandi og hálendi.

Þakir

Við þökkum erfðanefnd landbúnaðarins fyrir að styrkja verkefnið. Einnig þökkum við Stefáni Óla Steingrímssyni prófessor við Háskólann á Hólum, Jóhannesi Guðbrandssyni sérfræðingi við Hafrannsóknarstofnun, rannsóknar- og ráðgjafarstofnun hafs og vatna, og Zophoníasi O. Jónssyni prófessor við Háskóla Íslands fyrir sýni og ráðleggingar.

Heimildir

- [Ayllon et al., 2015] Ayllon, F., Kjaerner-Semb, E., Furmanek, T., Wennevik, V., Solberg, M. F., Dahle, G., Taranger, G. L., Glover, K. A., Almen, M. S., Rubin, C. J., Edvardsen, R. B., and Wargelius, A. (2015). The *vgl3* locus controls age at maturity in wild and domesticated atlantic salmon (*Salmo salar* l.) males. *PLOS Genetics*, 11(11):1–15.
- [Barson et al.,] Barson, N. J., Aykanat, T., Hindar, K., Baranski, M., Bolstad, G. H., Fiske, P., Jacq, C., Jensen, A. J., Johnston, S. E., Karlsson, S., Kent, M., Moen, T., Niemela, E., Nome, T., Naesje, T. F., Orell, P., Romakkaniemi, A., Saegrov, H., Urdal, K., Erkinaro, J., Lien, S., and Primmer, C. R.
- [Johnston et al., 2013] Johnston, S. E., Lindqvist, M., Niemelä, E., Orell, P., Erkinaro, J., Kent, M. P., Lien, S., Vähä, J.-P., Vasemägi, A., and Primmer, C. R. (2013). Fish scales and snp chips: Snp genotyping and allele frequency estimation in individual and pooled dna from historical samples of atlantic salmon (*salmo salar*). *Bmc Genomics*, 14(1):439.
- [Li et al., 2013] Li, Y., Gul, Y., Gao, Z., Luo, W., and Wang, W. (2013). A simple and affordable method of dna extraction from fish scales for polymerase chain reaction. *Biochemical genetics*, 51(1-2):1–6.
- [Yano et al., 2012] Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Cabau, C., Bouchez, O., Fostier, A., and Guiguen, Y. (2012). An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *oncorhynchus mykiss*. *Current Biology*, 22(15):1423–1428.
- [Yano et al., 2013] Yano, A., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Fostier, A., Guyomard, R., and Guiguen, Y. (2013). The sexually dimorphic on the y-chromosome gene (*sdY*) is a conserved male-specific y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary applications*, 6(3):486–496.