

Erfðagreining á kyni í íslenskum laxfiskastofnum

Skýrsla til erfðanefndar landbúnaðarins

Arnar Pálsson

28. desember 2022

Ágrip.

Verkefnið var á sviði grunnrannsókna á villtum laxfiskum í ám á Íslandi, með áherslu á lax og sjóbleikju. Það var unnið í samstarfi vísindamanna við Líffræðistofu Háskóla Íslands og ferskvatnssvið Hafrannsóknarstofnunar. Margir bændur eiga hlut í laxveiðiám eða veiðivötum á láglandi eða hálendi. Mat á ástandi þessara stofna, sérstaklega stærð hrygningarstofna er lykilatriði fyrir mat á nýliðun og stjórn á nýtingu. Þetta sést best í laxveiðiám sem eru veruleg búbót fyrir marga bændur og landsbyggðina í heild. En veiði úr vötnum skiptir einnig verulegu máli, annarsvegar sem leið til fæðuöflunar og annarsvegar sem tekjulind með sölu veiðileyfa.

Kyn kyn laxfiska er lykilþáttur í mati á hrygningarstofni og samsetningu veiðistofna. Nýlega var breytileiki í erfðabættinum *vgll3* bendlaður við breytileika í vexti, kynþroska og lengd dvalar í hafi meðal laxa. Upplögð markmið verkefnis voru fjórpætt. 1) að greina nákvæmni í mati á kyni fiska, þegar skilað er hreisturpokum með upplýsingum um þyngd, lengd og kyn fiska. 2) að greina kynjahlutfall ungvíðis í nokkrum ólíkum stofnum, 3) að kanna hlutfall *vgll3* erfðabreytileika, í nokkrum laxastofnum héraendis, og 4) að kanna hvort að hlutfall tegunda laxfiska milli svæða. Tilraunir fyrir markmið 3, greining stórfiskagensins, gengu ekki upp, m.a. vegna vandræða með vísa. Þess vegna var umræða um stórfiskagen minnkuð og felld úr titli verkefnisins. Niðurstöður fyrir hina liðina sýna að aðferðirnar virka vel til að meta kyn laxfiska á Íslandi, og gefa vísbendingum um breytileika í kynhlutföllum milli stofna.

Inngangur

Æxlunarlíffræði og lífsaga laxfiska er forvitnileg og mörgum spurningum ósvarað. Eins og hvað ræður lífsöguákvörðunum þeirra, hvenær er best að ganga til sjávar, best að þroska kynkirtla, æxlast, o.s.frv? Þessir þættir eru ólíkir á milli stofna og tegunda, og tengjast einnig skilyrðum í ám, lengd áa, samkeppni milli tegunda, veiðum á stofnunum og breytingum á loftslagi og vistfræðilegum aðstæðum af mannavöldum. Einnig er líklegt að breytingar á skilyrðum í hafi og ám muni hafa áhrif á lífsögu íslenskra laxfiska, t.d. er bleikjan á undanhaldi í mörgum ám, en vísbendingar um að urriði sé í sókn.

Þekking á kyni og stærð einstaklinga í laxastofnum eru lykilatriði fyrir mat á hrygningarstofnum í laxveiðiám og mat á viðkomu veiðistofna og náttúrulegra stofna. Kyn fullorðinna fiska nærri hrygningu er auðgreint, en seiði, ókynþroska fiska og þá sem eru ekki búnir undir hrygningu, er erfiðara að greina. Jafnvel með krufningu og athugun á kynkirtlum. Mikið af hreistursýnum er safnað úr lögum t.d. af veiðimönnum og ýmsar ástæður geta verið fyrir rangri kyngreiningu þeirra. Því er mikilvægt að þróa einfalda aðferð til að greina kyn laxfiska úr litlum efniviði, eins og t.d. hreistri eða uggaklippum. Fyrirhugað var að nota hreistur sem tímavél í þessu verkefni, til að greina erfðasamsetningu fiska sem lifðu fyrir áratugum síðan.

Bæði umhverfi og erfðir móta lífsögu laxfiska en samspil þessara þátta er flókið og geta verið ólík á ungvíði og kynþroska fisk. Hundruðir eða þúsundir erfðabátta áhrif á breytileika í flestum svipfarseinkennum. Því kom á óvart að breytileiki í *vgll3* geninu sýndi mjög sterkt samband við lífsögu laxa. Nokkrir erfðabreytileikar tengjast vexti, stærð við kynþroska og lengd dvalar í sjó. Áhrif þeirra eru ólík milli kynja, ein samsæta er víkjandi í karlfiskum en ríkjandi í kvenfiskum. Munur er á tíðni breytileikanna í *vgll3* eftir stofnum, norður-suður eftir Noregi, milli ólíkra áa og milli árganga eða tímabila innan sama árkerfis. Ætlunin var að kanna breytileika í kyni og stórlaxaarfdgerð meðal íslenskra laxfiska. Vegna þess að einungis fékkst styrkur 45% af verkefninu, og vegna þess að tilraunir með KASP vísa fyrir *vgll3* stórlaxagenið, var ákveðið að slepp því markmiði til að halda verkefni framkvæmanlegu.

Jafnt lindableikjur og stórlaxar í laxveiðiám eru mikilvægir fyrir efnahag og vistfræði landsins. Bæði nýting og verndun laxfiska byggist á þekkingu á grundvallarlíffræði tegundanna og svörun þeirra við loftslagsbreytingum og öðrum áhrifum mannsins. Gat er í þekkingu á grundvallaratriðum líffræði laxfiskastofna hérlendis, sbr.:

1. Góðar aðferðir vantar til að greina kyn ungvíðis, meðaflafisks og hreisturs (t.d. úr afla veiðimanna).
2. Upplýsingar vantar um sjögöngu laxa, hvar eru þeir í hafi, hversu hratt vaxa þeir, hvaða þættir stýra vexti og lengd dvalar í sjó?
3. Ónóg þekking er um kynjahlutfall veiðistofna og hlutfall ólíkra lífsöguforma (stór- eða smálaxa) í mismunandi ám eða yfir tímabil.

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, etir aldri, í nokkrum ám. Mismunur í kynjahlutfall laxa og sjóbleikju í ólíkum stofnum á Íslandi er einnig forvitnilegur, getur

endurspeglad nýliðunargetu og lífsöguþætti sem einkenna viðkomandi stofna og auðveldað þannig betur stjórn á nýtingu og veiðum.

Rannsóknir á ungvíði, t.d. lax og sjóbleikju, eru því marki brendar að ómögulegt er að vita kyn seiða. 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 milli áa? Rannsókn þessi fylgdi í kjölfar forrannsóknar sem erfðanefnd landbúnaðarins styrkti 2019, sem gerði okkur kleift að þróa aðferð til að greina kyn með fjölliðunar-mögnunaraðferð (PCR). Í þeirri rannsókn fannst munur í kynhlutföllum milli sjógöngu og landlæstra bleikustofna í Skagafirði. Eitt markmið þessa verkefnis er að kanna hvort sá munur finnst einnig í stærra úrtaki, úr fleiri ám og vötnum. Niðurstöður verkefnisins nýtast til að skilja laxastofna og bleikjustofna í ám og vötnum hérlendis og breytingar á þeim samfara t.d. loftslagsbreytingum.

Markmið

Markmið verkefnis er að þróa aðferðir til að greina fjölbreytileika meðal laxfiska hérlendis og að öðlast grundvallar skilning á lífssögu (kyni, stærð, vexti, fari) ólíkra stofna og tegunda og tengsl þeirra við umhverfisþætti. Verkefnið byggist á sömu aðferðafræði, erfðagreiningu á lykil genum, sem beitt var á þrjú sett af sýnum. Markmið verkefnis voru fjögur, samtvinnuð að vissu leyti.

Í fyrsta lagi þarf að meta nákvæmni fólks (eftirlitsmenn/veiðimenn/veiðiverðir) við mat á kyni fiska, þegar það skilar inn hreisturpokum með upplýsingum um þyngd, lengd og kyn fiska. Þetta er skoðað bæði fyrir bleikju og sjógöngu laxa.

Í öðru lagi er kynjahlutfall ungvíðis mikilvægt fyrir greiningu á fjölliðunargetu stofna og samsetningu seiða sem fara í sjógöngu (eða sitja eftir í ánum).

Í þriðja lagi var markmiðið að kanna hlutfall *vgll3* erfðabreytileika, sem tengist vexti og kynþroska, í nokkrum laxastofnum hérlendis.

Í fjórða lagi vildum við kanna hvort að hlutfall ungleikju og unglaxa sé mismunandi milli svæða.

Verkefnið var hannað til að mæta þessari þörf. Hérlendis hefur erfðagreiningum verið beitt í litlu mæli (bara í forrannsókn umsækjanda Arnars Pálssonar) til að kanna lífsöguþætti (kyn, vöxt og aldur og stærð við kynþroska) laxfiska. Verkefnið byggir á tengslum erfðapátta við lífsögueiginleika eins og kyn, vöxt og kynþroskaaldur. Lífssaga og erfðir verða hagnýtt til að skilja breytileika náttúrulegra laxfiskastofna og hvað hafi áhrif á þá. Það er lykillinn að vöktun, verndun og nýtingu á þessum stofnum. Við framkvæmd verkefnisins reyndust ákveðnir erfiðleikar við að greina *vgll3* erfðabreytileikann, sem og að ná erfðaefni úr gömlu hreistri. Mest af gögnum fengust því fyrir liði 2 og að vissu leyti 4.

Gildi verkefnis fyrir erfðanefnd landbúnaðarins fólst í því að:

1. Bæta aðferðir til kyngreininga í laxfiskum.

2. Afla betri upplýsinga um lífssögubreytileika, beitarsvæði og vistfræði laxa í íslenskri landhelgi.
3. Meta áreiðanleika kyngreininga, sem er mikilvæg fyrir veiðistjórnun.

Rannsóknarspurningar voru eftirfarandi:

1. Kynjahlutfall bleikju og bleikjuseiða í lindum og vötnum var rannsakað, sem eru ólíkar hvað varðar hitastig og einangrun. Markmiðið er að kanna hvort:
 - a. Hversu stórt hlutfall fiska er rangt kyngreindur (miðað við kyn ákvarðað frá krufningu) og eru frávikin misalgeng?
 - b. Kynjahlutfall bleikju og bleikjuseiða sé eins í mismunandi stofnum?
2. Könnuð voru sýni úr laxi sem veiðst hefur sem meðafli í makrílveiðum við Ísland síðastliðinn áratug. Þetta er hluti af stærra verkefni þar sem meta á uppruna laxanna, lífssögu (ferskvatnsaldur og sjávaraldur) og fæðu. Markmið fyrir þennan hluta:
 - a. Þróa skilvirkari aðferð til að meta kyn meðaflalaxa.
 - b. Athuga hversu stórt hlutfall fiska er rangt kyngreindur?
 - c. Athuga kynjahlutföll eftir uppruna laxa í sjó, veiðisvæði og eftir lífssögu.

Í víðara samhengi juku niðurstöður verkefnisins skilning okkar á samspili lífssögubátta og fjölbreytileika tegunda og svörun þeirra við breyttu umhverfi.

Aðferðir og verkáætlun

Rannsóknin snýst um að greina fjölbreytileika í íslenskum laxa og bleikjustofnum. Notaðra verða sameindaerfðafræðilegar aðferðir til að greina tvo erfðapætti, *SdY* genið sem ákvarðar kyn laxfiska (laxa, urriða, bleikju o.fl tegunda), og breytileika innan *vgll3* gensins sem tengist vexti, kynþroska og lengd sjógöngu laxa. Beitt var aðferðum sameindaerfðafræði til að meta erfðabreytileika í stofnum og milli stofna.

Sýnataka og gangasýrpur

Í þessu verkefni var fyrirhugað að beita þessari aðferð á þrjú sett af sýnum.

1. hreistursýni af laxi úr fjórum ám, sem spanna tveggja áratuga tímabil (400 sýni)
2. sýni af ókynþroska ungvíði laxa og bleikja (400 í heild, jafn fjöldi laxa og bleikja, úr ám í Skagafirði og af Vestfjörðum).
3. Sýni úr sjögöngu laxi, safnað af Hafrannsóknastofnun.

1. Í fyrsta lagi voru skoðuð sýni úr Norðurá, Ferskvatnssvið Hafrannsóknarstofnunar hefur margra ára seríur af hreistursýnum úr þessar á sem notast verður við. Skoðuð verða sýni sem eru 1 árs, 10 ára og 20 ára í fyrsta hluta verkefnisins. Skoðuð voru 300 sýni í þessum hluta rannsóknarinnar. Erfiðlega gekk að ná erfðaefninu úr hreistri og var þessi verkþáttur settur á ís.

2. Rannsakað var kynjahlutfall bleikjuseiða í lindum og vötnum (563 fiskar). Notuð voru sýni úr safni Líffræðistofu Háskóla Íslands, þar sem DNA hafði áður verið einangrað með phenol-chloroform aðferð og kyn ákvarðað út frá krufningu og myndum sem voru teknar þegar fiskarnir voru veiddir. Sýnin hafa verið tekin undanfarin ár af sérfræðingum stofnunarinnar og samstarfsmönnum.
3. Einnig var rannsakað DNA úr meðaflalaxi frá makrílveiðum, 758 sýni frá 2010 til 2017. Sýni úr lögum, sem veiddist sem meðafla í makrílveiðum, voru tekin af áhöfn eða af eftirlitsmönnum Fiskistofu. Til eru upplýsingar um veiðistað, stærð og skráð kyn. Fiskurinn hefur jafnframt verið rakinn erfðafræðilega til landfræðilegs uppruna. DNA úr meðaflalaxi hafði áður verið einangrað af starfsmönnum Matís yfir nokkurra ár tímabil, ýmist með Chelex, HotShot eða Agowa aðferðum.

Einangrun á erfðaeefni

Erfðaeefni var einangrað úr sýnum með QIAGEN aðferð sem er fullþróuð á Líffræðistofu HÍ. Einangrun á erfðaeefni úr gömlu hreistri er ekki auðveld, eins við lærdum í fyrri rannsókn sem studd var af Erfðanefnd landbúnaðarins. Við þróuðum aðferðina, hún þurfti tilfæringa við, því sýnin eru gömul og einhver þeirra skemmd. Þrátt fyrir 2 mánað tilraunir tókst ekki að betrubæta DNA einangrunina fyrir hreistur meir, til að erfðaeefni úr gömlum sýnum.

Greining á kyni með PCR

Fjöllum fyrst um greiningar á kyni með PCR. Verkefnið byggir á tveimur forrannsóknum. Önnur var gerð var á Líffræðistofu HÍ í samstarfi við sérfræðinga Stofnsfisks og snérist um að þróa aðferð til að greina hvort að stakar bleikjur og laxar væru með karlákvarðandi genið *SdY* í erfðamengi sínu. Aðferðin byggir á PCR hvarfi, þar sem sértækir vísar þekkja kynákvarðandi genið, og magna upp búp af geninu ef það er til staðar í sýninu. Vísar sem bindast og magna upp hluta hvatberalitnings fiskanna eru notaðir til samanburðar, þess að komast að því hvort að erfðaeefni úr sýninu sé nægilega gott og hvort að ensímið sem notað er sé í lagi.

Hin forrannsóknin var unnin 2019, með fulltingi Erfðanefndar landbúnaðarins. Við beittum aðferðinni á sýni af ungvíði og erfðaeefni einangrað úr hreistri. Því miður gekk ekki vel að einangra erfðaeefni úr gömlum hreistur sýnum, en ágætlega úr ungum sýnum. Aðferðin skilaði mjög áhugarverðum niðurstöðum fyrir ungar bleikjur, sbr umræðu að ofan. Einnig þróuðum við aðferðina betur og fengum skýrari niðurstöður með betrubótum á vísunum og vinnuferlum.

Kyngreining laxfiska með PCR hvarfi felur í sér að magna upp svæði innan *SdY* kynákvarðandi gensins með sértækum vísunum. Hvarfið sjálft nýtir sér hitastigaprep til að i) aðskilja tvíþátta DNA, ii) binda sértæka vísa við einþátta DNA, og iii) afrita DNA út frá vísunum með sérhæfðum DNA pólýmerasa. Búið var að hanna sértæka vísa fyrir bleikjuafbrigði *SdY*-gensins og vísar fyrir laxafbrigði gensins voru til. Hjá karlkyns sýnum magnast upp svæði í PCR sem er spannað af vísunum en engin mögnun á sér stað í kvenkyns sýnum. Þess vegna, þarf samhliða að magna upp viðmiðunargen, til að tryggja að hvarfið eigi sér stað. Til að greina afurðir PCR hvarfsins er notast við rafdrátt á agarósageli. Undirstaða aðferðarinnar er að neikvætt

hlaðið DNA færast að jákvætt hlöðnu skauti í gegnum gel. Erfðaefni ferðast mishratt eftir stærð í gengum gelið, stærri bútar hreyfast hægar en þeir minni. Til hliðsjónar þarf að hafa viðmiðunarstiga sem inniheldur bönd af þekktri stærð og eru notuð sem viðmið til að ákvarða stærð PCR afurða sem magnast.

Kyngreining á bleikjusýnum - verklýsing

Í upphafi var útbúið stöðluð karlkyns og kvenkyns sýni sem voru keyrð samhliða prófuðu sýnunum. Phenol-chloroform aðferð var notuð til að einangra DNA úr uggasýnum frá karlkyns og kvenkyns sýnum sem notuð voru sem foreldrar í fyrri tilraunum og þ.a.l. var hægt að færa rök fyrir því að sýni væru rétt kyngreind. Viðmiðunargenin sem voru notuð eru *ETBR2* og *OTX2* og spanna vísapör þeirra beggja afurðir sem eru u.þ.b. 500 basapör að lengd (Basaraðir vísanna eru í töflu 3.1). Tvö vísapör, F2+R4 og F3+R5, sem magna upp bít af *SdY* geninu og höfðu komið best út í fyrri tilraunum hjá HÍ voru prófuð en bæði pörin spanna afurð sem er u.þ.b. 700bp að lengd (Basaraðir vísanna eru í töflu 1).

Tafla 1: Raðir vísa sem notaðir voru í kyngreiningartilraunum á bleikjum.

Vísir	Basaröð
ETBR2-F	GAG CTG TCC TTG GCT TTG TC
ETBR2-R	ACG CCC TGG TCA TCA ACT AC
OTX2-F	GCC AAA ACA CTT AGG GGA CA
OTX2-R	AAA GGC ATC GTT TTC CAA TG
SdY-F2	TTG GGC CTA TGA ATT TCT GAT GTT G
SdY-F3	TTC AAT GGC TGA CAG AGA GGC CAG A
SdY-R4	TTC ATA TCA CTC ACC CTG TCT GAA G
SdY-R5	GTG AAA TCT GTT GTG AAT TAC CCG T

Í PCR hvarfinu var notast við *Taq 2X* Master mix (New England Biolabs, #M0270L) en samsetningu hvarfa má sjá í töflu 2. PCR-hvörfin voru síðan keyrð við hitastig sem sjá má í töflu 3.

Tafla 2: Samsetning og rúmmál hvarfefna í einu PCR-hvarfi á kyngeni bleikja.

Efni (styrkur)	1x hvarf (µL)
<i>Taq 2X</i> Master Mix	6.25

SdY-F (10 μ M)	0.50
SdY-R (10 μ M)	0.50
Viðmiðunargen-F (5 μ M)	0.25
Viðmiðunargen-R (5 μ M)	0.25
DNA (50ng/ μ L)	2.00
H ₂ O	2.75
Heildarrúmmál	12.5

Tafla 3: Sýnir hitastigabrep sem PCR hvörf voru keyrð á bleikjusýnum.

Prep	Hitastig (°C)	Tími (mínútur:sekúndur)	Fjöldi keyrsluhringja
1	95	3:00	1x
2	95	0:45	40x
	57	0:45	
	72	1:45	
3	72	7:00	1x
	10	∞	

Afurðir PCR hvarfa voru fyrst keyrðar á 2% agarósageli í 1X TAE bufferlausn með EtBr við 90V í 28 mínútur sem var síðar staðlað í 1.5% agarósagel. Notast var við viðmiðunarstigann 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, #N3231L) og sýni voru lituð með Gel Loading Dye, 6X (New England Biolabs, #B7025S). Nöfn sýna voru merkt inná myndir og sýni sem sýndu mögnun á SdY afurð voru merkt með gulum punkti fyrir aftan sýnanafn. Niðurstöður voru skráðar og útreikningar gerðir í R.

Kyngreining á meðaflalaxi - verklýsing

Áður en kyngreiningar gátu hafist þurfti að fínstilla PCR hvarfið til þess að þróa aðferðina fyrir kyngreiningar á lóxum. Uppskrift sem HÍ hafði notast við fyrir kyngreiningu á bleikju var aðlöguð að verklagi fyrir laxa. Prófanir fóru fram á ólíkum samsetningum á mismunandi kynákvarðandi vísnum og viðmiðunarsvísnum, magni af hvarfefnum og DNA sem og lengd PCR hvarfsins. Vísarnir sem notast var við til kyngreininga fyrir mögnun á *SdY* geninu en vísarnir fyrir mögnun á

viðmiðunarafurðinni fyrir laxa (Basaraðir vísanna má sjá í töflu 4). Í hængum magna *SdY* vísar upp afurð sem er u.þ.b. 1.000bp að lengd og vísar fyrir viðmiðunarafurð magna upp svæði sem er 312-408bp en hrygnur sýna einungis band fyrir viðmiðunarafurðina. DNA sýni úr karlkyns og kvenkyns bleikju frá HÍ voru notuð sem viðmiðunarsýni í kyngreiningum ásamt DNA sýni úr hæng laxi sem jákvætt viðmið. Í PCR hvarfinu var notast við *Taq* DNA Standard Polymerasa og Standard *Taq* Buffer (New England Biolabs, #M0273L) en samsetningu hvarfa má sjá í töflu 5. Hvörfin voru keyrð við hitastig sem finna má í töflu 6. PCR afurðir voru rafdrengar á 2% agarósageli geli í 1X TAE bufferlausn með SYBR™Safe DNA gel stain frá Invitrogen við 150V í 55 mínútur. Notast var við 1 kb DNA ladder (New England Biolabs, #N3232L) og sýni voru lituð með Gel Loading Dye, 6X (New England Biolabs, #B7025S). Myndir voru teknar með BioRad Gel Doc og niðurstöður kyngreininga voru greindar af gelinu. Nöfn og kyn sýna voru merkt inná mynd. Niðurstöður voru skráðar og útreikningar gerðir í R.

Tafla 4: Basaraðir vísa sem voru notaðir í PCR hvörfum á laxi. Einnig voru vísar F2, F3, R4 og R5 fengnir úr bleikju (Sjá töflu 1).

Vísir	Basaröð
Ssa202-F	CTT GGA ATA TCT AGA ATA TGG C
Ssa202-R	GTT CAT GTG TTA ATG TTG CGT G
Sp2201-F	GGC CCA GAC AGA TAA ACA AAC ACG C
Sp2201-R	GCC AAC AGC AGC ATC TAC ACC CAG
SsaD157-F	ATC GAA ATG GAA CTT TTG AAT G
SsaD157-R	GCT TAG GGC TGA GAG AGG AAT AC
SdY-R2	AGA GGG TTG AAC GGT CAG AGG AG
ss_S	GGC CTA TGC ATT TCT GAT GTT GA
ss_AS	AGA GGA TTG AAC GGT CAG AGG AG

Tafla 5: Samsetning og rúmmál hvarfefna í einu PCR-hvarfi á löxum.

Efni (styrkur)	1x hvarf (µL)
10x Standard	1.00
dNTP (10nM)	1.00
SdY-S (10µM)	0.50
SdY-R4 (10µM)	0.50
SsaD157F (10µM)	0.20

SsaD157R (10 μ M)	0.20
DNA (HotShot)	2.00
Betaine	1.00
<i>Taq</i> Polymerasi	0.12
H ₂ O	3.48
Heildarrúmmál	10

Tafla 6: Sýnir hitastigaprep sem PCR hvörf voru keyrð á löxum.

Prep	Hitastig (°C)	Tími (mínútur:sekúndur)	Fjöldi keyrsluhringja
1	95	4:00	1x
2	95	0:50	35x
	57	0:50	
	68	1:30	
3	68	7:00	1x
	4	∞	

Erfðagreining á stórlaxageninu

Hin aðferðin sem beitt var, var erfðagreining á *vgll3* geninu. Genið finnst í öllum laxfiskum en í *vgll3* geni laxa eru nokkrir erfðabreytileikar sem tengjast vexti, kynþroska og fjölda ára sem laxar dvelja í sjó. Ætlunin að var prófa tvo þeirra í verkefninu. Það eru þeir breytileikar sem sýna sterkasta sambandið við þessi svipfarseinkenni.

Þessi hluti verkefnisins fól í sér aðferðaþróun, sem tókst ekki sem skyldi. Beitt var einni nálgun til að greina sömu 2 breytilegu setin í *vgll3*. Við HÍ höfum við notað KASP aðferð til að greina staka basabreytingar í laxfiskum, 21 staka breytileika í bleikuerfðamenginu (Guðbrandsson o.fl. 2019, Ecology and Evolution). Aðferðin byggir á mögnun með sértækum vísnum, sem greina mun á stökum basa sem er frábrugðin milli samsæta í geninu. Fyrst er keyrt PCR hvarf og síðan litgreining í qPCR tæki, sem magngreinir afurðir 48 eða 96 sýna samtímis. Við reyndum að útfæra KASP aðferðina fyrir þessa tvo breytilegu staði í *vgll3*. Notuð voru 24 þekkt sýni við tilraunir og skilvirkni og nákvæmni borin saman.

Gagnagreining

Við greindum arfgerð sýna í hvorum hluta verkefnis um sig. Gögnum var safnað í töflur, gröf útbúin og samantektir á samræmi milli kyngreininga skv. hreisturpokum og erfðagreiningum. Einnig könnum við gæði aðferða og mun á kynjahlutfalli eftir ám, árgöngum og stofnum. Prófaðar voru tilgátur um breytileika í kynjahlutföllum milli ára og staða. Tölfræðigreiningar voru framkvæmdar í R sem og allar myndir teiknaðar.

Niðurstöður

Kyngreiningar á sýnum voru framkvæmdar í sitthvoru lagi en til að þróa svipaða aðferð fyrir laxinn var reglulega borið saman niðurstöður og aðlagð aðferðir miða við vandamál sem komu upp. Að lokum voru nokkur sýni handahófskennt valin og kyngreind aftur með PCR aðferð til að leggja mat á endurtakanleika (e. repeatability) aðferðanna. Niðurstöður voru síðan bornar saman við fyrri niðurstöður

Niðurstöður kyngreininga á bleikjum

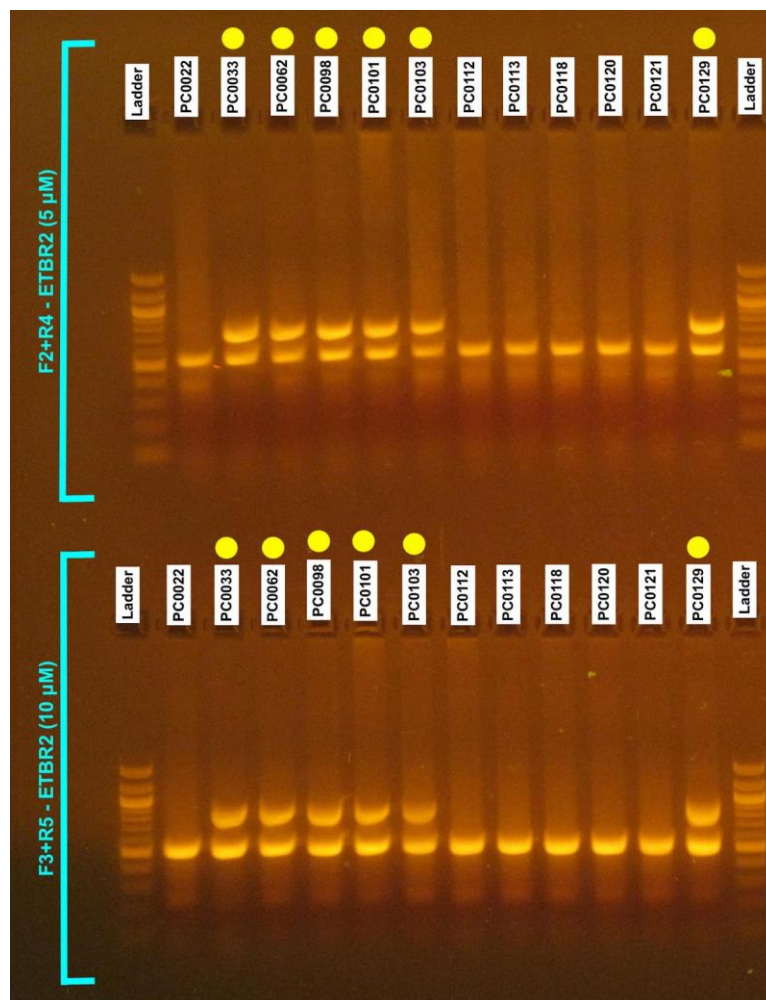
Í upphafi voru útbúin 12 viðmiðunarsýni, 6 karlkyns og 6 kvenkyns:

- Karlkyns sýni: PC0033, PC0062, PC0098, PC0101, PC0103, PC0129
- Kvenkyns sýni: PC0022, PC0112, PC0113, PC0118, PC0120, PC0121

Sýnin voru kyngreind blint (upplýsingar um kyn sýna var ekki þekkt þegar tilraun var gerð) bæði með F2+R4 og F3+R5 vísapörum og sýndu vísapörin sömu niðurstöður. Niðurstöður voru bornar saman við þekkt kyn og voru sýnin rétt kyngreind (sjá mynd 1). Hér var einnig prófað mismunandi styrki af vísam fyrir viðmiðunargenið og kom í ljós að fjórðungsstyrkur vísa þess á móti vísam fyrir *SdY* genið gaf skýrustu niðurstöðurnar. Líklega vegna þess að kynákvarðandi genið er bara til í einu eintaki í erfðamengi laxfiska, en kjarnagen í tveimur eintökum (einnig er mögulegt að vísarnir magni upp systureintök viðmiðunargenanna, og því þurfi fjórðungs þynningu á móti *SdY* vísunum). Í framhaldi af þessu var ákveðið að nota einungis F2+R4 vísaparið í kyngreiningar.

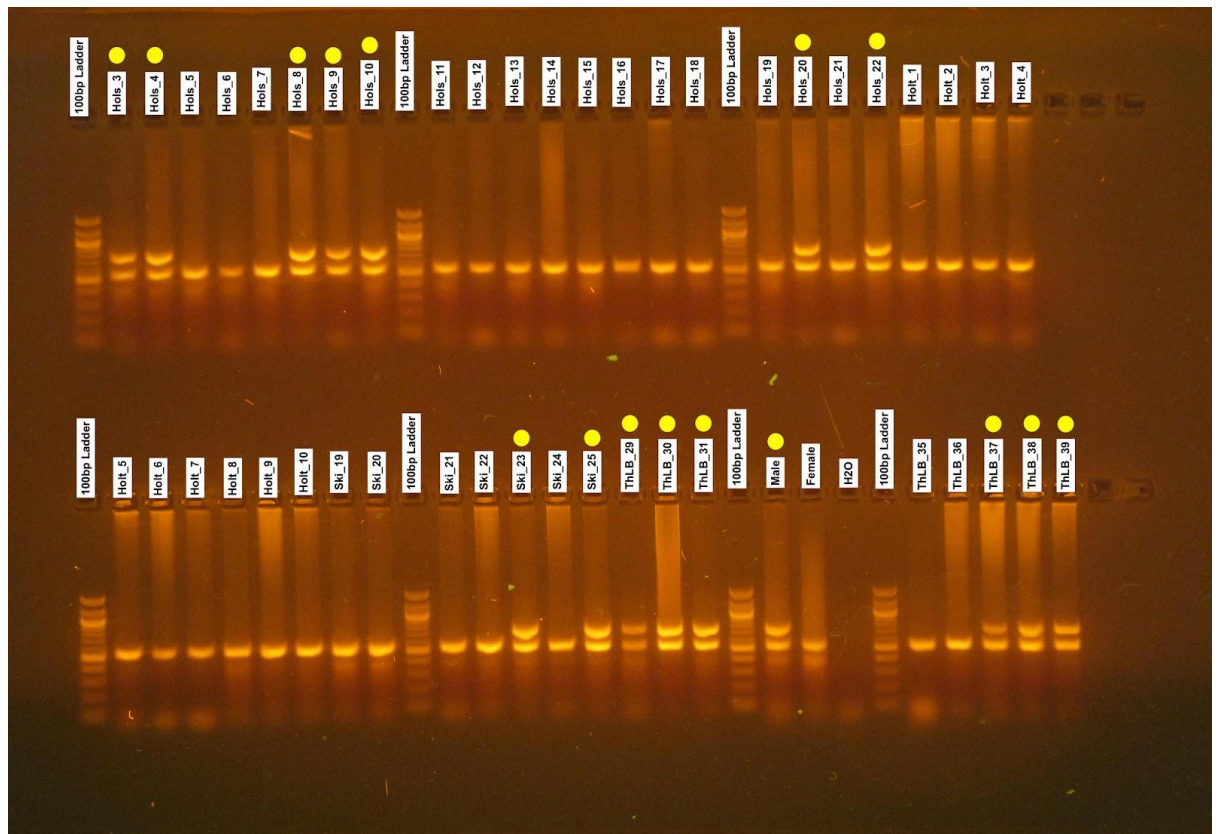
Sýni bleikjuseiða sem voru kyngreind fengust úr ýmsum lindum og vötnum á Íslandi, einnig voru 24 sýni á einum sýnabakka frá Loch Braigh Horrisdale í Skotlandi. Sýni voru frá eftirfarandi stöðu: Grænavatn (Mývatn, sýni merkt með *Grae*), Herðubreið (*Herd*), Hestvatn (*Hest*), Hólsá (*Hols*), Holtsós (*Holt*), Húsafell - Nýja virkjun (*HuNy*), Húsafell Oddar (*HuOd*), Húsafell – Eldri virkjun (*HuOl*), Kálfaströnd (Mývatn, sýni merkt sem *Kalf*), Klapparós (*Klap*), Lambeyrarkvísl (*Ladw*), Miðhúsaskógur (*Midh*), Presthólar (*Pres*), Skiphylur (*Ski*), Staðarhraun II (*Sta2*), Stóra Skálavatn (*Stor*), Straumsvík (*Stra*), Þingvallavatn (*Th*), Þverá/Hrauná (*TvHr*) og Úlfjótsvatn (*Ulf*). Í Þingvallavatni og Úlfjótsvatni voru einnig aðgreind

mismunandi afbrigða bleikjunnar, þá fengust flokkar fyrir: dvergbleikjuna (*ThSB* og *UlfSB*), kuðungableikjuna (*ThLB* og *UlfLB*), murtuna (*ThPL* og *UlfPL*) og sílableikjuna (*ThPI* og *UlfPI*). Einnig voru fiskar í Úlfljótsvatni sem voru blanda tveggja afbrigða: dvergbleikju og kuðungableikju (*UlfBB*), kuðungableikju og sílableikju (*UlfIL*), murtu og kuðungableikju (*UlfLL*) sem og murtu og sílableikju (*UlfPP*).



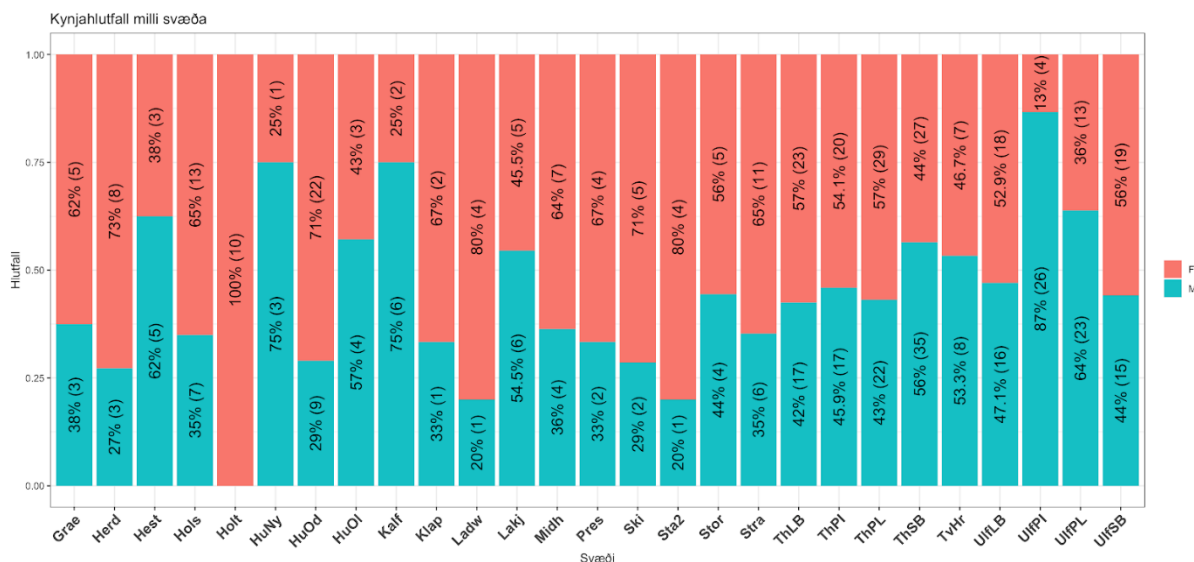
Mynd 1: Niðurstöður kyngreiningar á viðmiðunarsýnum bleikja þar sem kyn er þekkt. Niðurstöður sýndu að sýnin voru rétt kyngreind. Ákveðið var að vinna með lægri styrk af vísnum fyrir viðmiðunargenin til að böndin sýndu svipaðan styrkleika á myndum.

Sýnin sem unnið var með voru á sjö 96 brunna plötum en nokkur sýni á plötunum vantaði. Fyrir hverja plötu var tekið frá 3 brunna fyrir stöðluð karlkyns og kvenkyns sýni og hvarf þar sem vatn var sett í staðinn fyrir DNA (Sjá dæmi um niðurstöður á mynd 2).



Mynd 2: Dæmi um niðurstöður kyngreiningar frá sýnum af hálfum bakka, 45 sýnum og 3 stöðlum sem eru merkt sem: “Male”, “Female” og “H2O”. Tvö gel voru gerð fyrir hvern 96 brunna bakka. Sýni eru merkt og gulur punktur settur fyrir aftan sýni þar sem SdY band hefur magnast upp en þau sýni eru greind sem karlkyns.

Niðurstöður sem fengust frá gelunum voru skráðar niður og bornar saman við upplýsingar sem voru til staðar um kyn sýnanna. Af 563 sýnum var hægt að kyngreina 562 þeirra eða 99.8%. Alls voru 293 sýni greind sem kvenkyns en 269 sem karlkyns. Á grafi á mynd 3 má sjá hlutfall og fjölda karlkyns og kvenkyns sýna milli svæða. Upplýsingar um kyn voru til fyrir 361 sýni. Af þeim voru 179 sýni greind kvenkyns en 182 karlkyns (sjá töflu 7). 10 sýni sem voru skráð kvenkyns voru karlkyns samkvæmt PCR kyngreiningu eða u.þ.b. 6%. Sambærilegt hlutfall, eða 6.4% sýna, var skráð karlkyns en var kvenkyns samkvæmt kyngreiningu. Helsta ástæða fyrir því að fiskar voru vitlaust kyngreindir, er líklega sú að þeir voru ungir (upplýsingar til fyrir hluta sýnanna) og kynfæri þeirra þ.a.l. ekki fullmynduð.



Mynd 3: Hlutfall og fjöldi kvenkyns (bleikt) og karlkyns (blátt) bleikja milli stofna og afbrigða innan stofna. Fjöldi einstaklinga er mismunandi milli svæða, allt frá 3 sýnum upp í 62 sýni. Hlutfallið er einnig mismunandi, allt frá 100% kvenkyns sýnum í 87% karlkyns sýni.

Tafla 7: Fjöldi kvenkyns (F) og karlkyns (M) bleikja miða við skráð gögn og PCR kyngreiningu.

		Skráð gögn	
		F	M
PCR	F	168	11
	M	10	172

Átta handahófskennd sýni voru tekin af fimm bökkum og kyngreind aftur til að sjá hvort endurtekningin gæfi sömu niðurstöður. Af 40 sýnum, voru 38 sýni sem sýndu sömu niðurstöðu (95%), eitt sýni syndi mismunandi niðurstöðu miðað við fyrri PCR kyngreiningu en eitt sýni magnaðist ekki upp í seinna PCR hvarfi. Ástæða fyrir því gæti verið að gleymst hafi verið að setja DNA í brunninn. Kyngreiningin var einnig endurtekin ef (a) niðurstöður PCR kyngreiningar voru ekki í samræmi við skráðar upplýsingar eða (b) ef engin mögnun átti sér stað í hvarfinu (ekkert band fyrir viðmiðunargen var til staðar). Í fyrra tilfellinu (a) var önnur PCR kyngreining gerð og ef sömu niðurstöður fengust staðfesti það kyngreininguna. Til þessara sýna töldust einnig þau sýni sem sýndu mjög dauft *SdY* band, óháð skráðu kyni. Í seinna tilfellinu (b) var prófað að nota *OTX2* sem viðmiðunargen. Sýnin 29 sem gáfu mismunandi niðurstöður miðað við skráð kyn eftir krufningu, voru kyngreind aftur. Af þeim voru 21 (72%) sem gáfu sömu niðurstöðu og í fyrri PCR kyngreiningunni en 8 (28%)

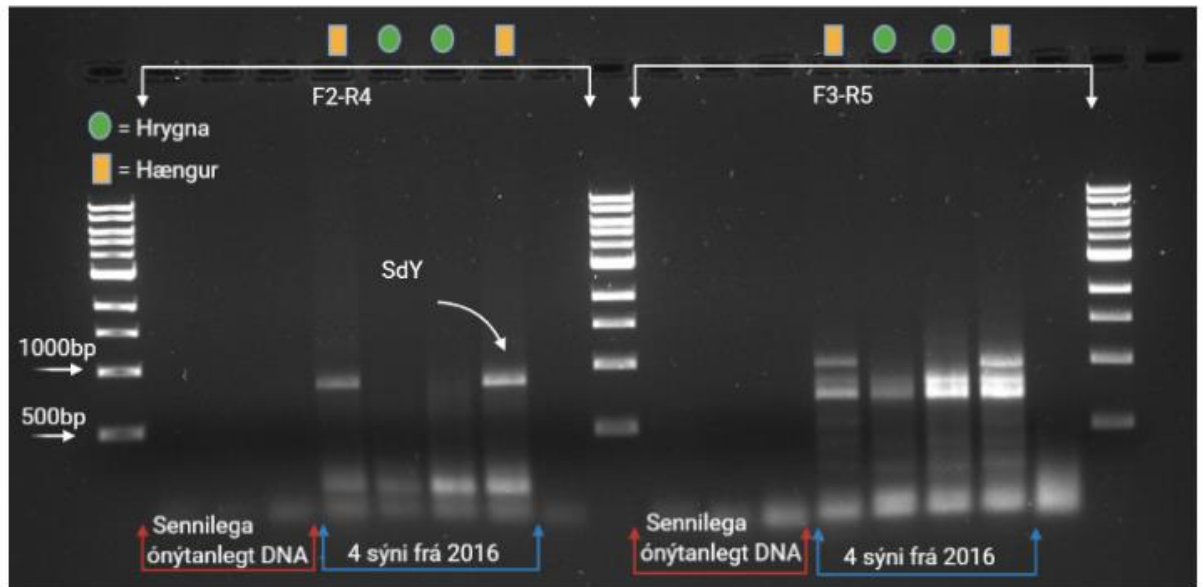
þeirra gáfu mismunandi niðurstöðu og þ.a.l. eins og krufningin gaf til kynna. Í 7 af þessum 8 tilfellum var sýni skráð karlkyns og fyrri PCR kyngreining sýndi kvenkyns sýni en seinni PCR sýndi að þau væru í raun karlkyns. Möguleg ástæða fyrir þessu gæti verið að vísar náðu ekki að bindast við svæðið og þ.a.l. magnaðist ekkert upp eða það lítið magnaðist upp að það sást ekki á gelinu.

Niðurstöður kyngreininga á löxum: Þróun á aðferð til að meta kyn meðaflalaxa

Til þess að hægt sé að framkvæma kyngreingu á meðaflalaxi með PCR hvarfi er mikilvægt að hanna góða vísa. Í þessum hluta verkefnisins var ákveðið að nota tvö vísapör í sama PCR hvarfinu, eitt til að magna upp bút af kynákvarðandi geninu *SdY* og hitt til að magna upp viðmiðunarafurð. Með þessari nálgun er hægt að greina á milli hænga og hrygna á gelmynd og útiloka misheppnuð sýni. Vísapör þurfa einnig að virka vel saman þ.e. að PCR afurðirnar séu vel aðskildar á geli, að engar óvæntar afurðir séu til staðar, að afurðirnar séu í álíka miklum styrk og að lágmarka myndun vísistvennda (*e. primer dimers*).

Prófanir á vísu: Fyrstu prófanir á *SdY* vísapari

Í upphafi voru vísapörin F2+R4 og F3+R5, sem HÍ hefur notað í kyngreiningum á bleikju, prófuð á sýnum frá Hafrannsóknarstofnun (geymt á Matís) með PCR aðferð og greint hvort vísarnir virkuðu jafn vel á laxasýnum. Byggt var á reynslu frá HÍ, og var búist við því að F2+R4 virkaði betur (á mynd 4 sést samanburður milli F2+R4 og F3+R5 á sömu sýnum). Eins og búist var við hentaði F3+R5 ekki nógu vel þar sem mikið er um aukaafurðir sem gera greiningu milli hængs og hrygnu erfiða. Aftur á móti virðist F2+R4 virka vel og var notast við þá vísa í áframhaldandi tilraunum. Búist var við u.þ.b. 750 bp afurð frá F2+R4 vísaparinu (svipað og hjá bleikjunni) en samkvæmt niðurstöðunum á mynd 4.4 var afurðin stærri eða í kringum 1.000 bp. Því var skoðað hvar á geninu *SdY* vísarnir bindast og kom þá í ljós að F2 binst innröð sem inniheldur endurtekningaröð. Endurtekningaröðin gæti verið mislög milli tegunda og bútarinnar þ.a.l. mislangir.



Created in BioRender.com bio

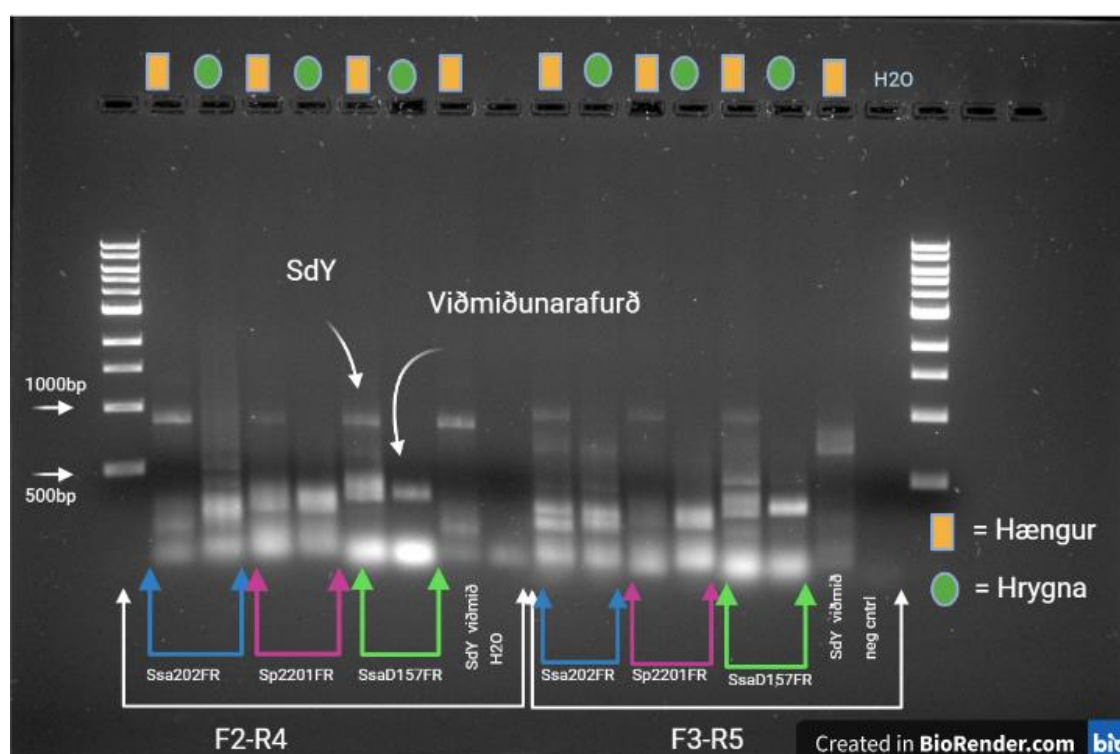
Mynd 4: Samanburður á vísapörunum F2+R4 og F3+R5 fyrir kyngreiningu á laxi. Vísapörin voru prófuð á sömu sýnum, (3 sýni frá 2011 sem höfðu áður gefið slæma niðurstöðu og 4 sýni frá 2016), með sömu PCR aðferð.

Prófanir á vísam: Möguleg vísapör fyrir viðmiðunarafurð prófuð

Við fengum vísapör frá Matís, til að magna upp 3 viðmiðunarafurðir: Ssa202, sp2201 og SsaD157 (sjá töflu 8). Þessi vísapör magna upp stutt tafsröð (e. microsatellite) sem eru mikið notuð á rannsóknastofu Matís til að greina erfðafjölbreytileika innan íslenskra laxastofna og til að rekja uppruna laxa sem veiðast í sjó. Vísarnir voru þróaðir í alþjóðlegu rannsóknasamstarfi, sem hafði það að markmiði að samræma erfðagreiningar milli evrópskra - og bandarískra rannsóknahópa sem stunduðu rannsóknir á stofnerfðafræði laxa, verkefnið heitir SalSea og lesa má meira um það í Gilbey et al. (2018). Almennu eru 14 vísapör notuð hjá Matís en í þessu tilfelli þurfti að finna vísapar sem magnaði upp PCR afurð af hentugri stærð því SalSeaPrint vísarnir magna upp breytileg svæði í erfðamengi laxa óháð kyni. Fyrirnefnd SalSeaPrint vísapör voruð prófuð með vísapari fyrir SdY, annars vegar F2-R4 og hins vegar F3-R5 til samanburðar. Vísarnir voru prófaðir á DNA úr áætluðum hæng og hrygnu veidd í meðafla árið 2016. Þetta var gert til þess að athuga hvaða viðmiðunarvísapar hentaði best. Eins og sést á mynd 5 kom viðmiðunarvísaparið SsaD157 best og skýrast út með SdY vísaparinu F2-R4 bæði fyrir hænginn og hrygnuna. Aftur á móti mátti ýmslegt bæta áður en farið var að kyngreina, svo sem styrk afurðanna, magn vísatvennda og magn annarra hvarfefna.

Tafla 8: Taflan sýnir viðmiðunarvísapör sem voru prófuð og áætlaða stærð PCR afurða.

Viðmiðunarvísapar	Áætluð stærð PCR afurðar
Ssa202 F+R	244-276 bp
Sp2201 F+R	259-339 bp
SsaD157 F+R	312-408 bp



Mynd 5: Myndin sýnir próf á viðmiðunarvísapörum fyrir SdY vísapörin F2-R4 og F3-R5. Öll hvörfin voru gerð á tveimur DNA sýnum úr hæng og hrygnu veidd 2016.

Prófanir á hvarfþáttum

Þar sem F2+R4 gaf sæmilegar niðurstöður með SsaD157 F+R, voru prófanir því næst gerðar á mismunandi þáttum hvarfsins. Þar sem viðmiðunarafurðarin sýndi meiri styrk á gelinu miðað við SdY afurðina var styrkur viðmiðunarvísanna minnkaður um helming í hvarfinu. Til þess að fínstilla hvarfið frekar voru gerðar prófanir á ólíkum hitastigum í þáttatengingarskrefi PCR hvarfsins með mismunandi hvarfefnum. Prófað var að bæta annars vegar Betaine og hins vegar MgCl₂ við PCR hvörf með mismunandi hitastigum í þáttatengingarskrefi (55°C, 57°C og 60°C) og gáfu niðurstöður til kynna að hvarfið virkaði vel með viðbættu 1 µL Betaine og 57°C í þáttatengingarskrefi. Til að auka styrk afurðanna enn frekar var fjöldi hvarfhringja aukinn í 35 og gaf það sterkari bönd. Einnig var athugað hvort að magn Taq polymerase hafði áhrif á styrk PCR afurðanna með því að prófa 3 mismunandi

rúmmál af *Taq* polymerase á sömu sýnum og gáfu niðurstöður til kynna að hentugast væri að nota 0.12 µL af *Taq* polymerase.

Fleiri SdY vísapör prófuð, lokaval á vísnum og loka fínstillingar PCR hvarfsins

Fleiri vísar fyrir *SdY* genið sem nýst hafa fyrir bleikju, og höfðu tveir þeirra verið hannaðir með arfgerð laxins í huga. Þetta voru vísarnir S, SA og R2 (sjá töflu 4). Fræðilega séð ættu allir fram-vísar að virka með öllum aftur-vísunum og var það prófað til þess að finna besta mögulega vísaparið til að magna upp *SdY* genið. Parið sem kom best út var S+R4 en S er nokkurs konar laxa staðgengill F2 vísisins, með sömu basaröð að undanskilinni einni basabreytingu (A -> C). Þess vegna kom ekki á óvart að S vísirinn hafi virkað vel. Aftur á móti kom á óvart að S-AS samsetninging hafi ekki virkað betur þar sem báðir vísar eru hannaðir út frá erfðamengi laxins. Ástæðan fyrir því gæti hins vegar verið að PCR hvarfið hafði áður verið fínstillt að F2+R4 vísaparinu. S+R4 var síðan prófað með viðmiðunarvísaparinu SsaD157FR. Fyrst um sinn var styrkur viðmiðunnarafurðarinnar ekki nógu góður svo mismunandi magn SsaD157FR var prófað og virtist 0.4 µL af SsaD157FR virka best (þ.e ca. 0.2 µL af framvísi og 0.2 µL af afturvísi). Því næst voru S+R4 og SsaD157FR prófaðir á stærri hóp sýna til að athuga hvort hvarfið virkaði jafn vel á stærri mælikvarða og kom það með ágætum út. Því var ákveðið að notast við *SdY* vísaparið S+R4 og viðmiðunarvísaparið SsaD157FR í PCR hvarfi sem lýst er í aðferðahluta (tafla 5) til að greina kyn meðaflalaxa frá árunum 2010-2017.

Niðurstöður kyngreininga hjá Matís: Kyngreiningar á meðaflalaxi frá árunum 2010-2017

Niðurstöður kyngreininga voru skráðar í töflu (sjá töflu 9). Heildarfjöldi sýna var mismunandi milli ára en einnig var fjöldi sýna sem voru nothæf töluvert breytilegur.

Tafla 9: Heildaryfirlit yfir árangur kyngreininga á meðaflalaxi frá 2010-2017. Efsta línan sýnir heildarfjölda fiska sem greindir voru. Næstu tvær línur sýna fjölda greindra hænga annars vegar og hrygna hins vegar. Fjórða línan sýnir fjölda fiska þar sem ekki var hægt að áætla kyn út frá PCR aðferð. Í neðstu línunni er fjöldi sýna þar sem hægt er að bera saman skráð kyn og greint kyn. Hvorki skráð kyn né greint kyn má vera ókyngreint. Þessi sýni eru borin saman til þess að athuga hversu stórt hlutfall sýnanna er rangt skráð.

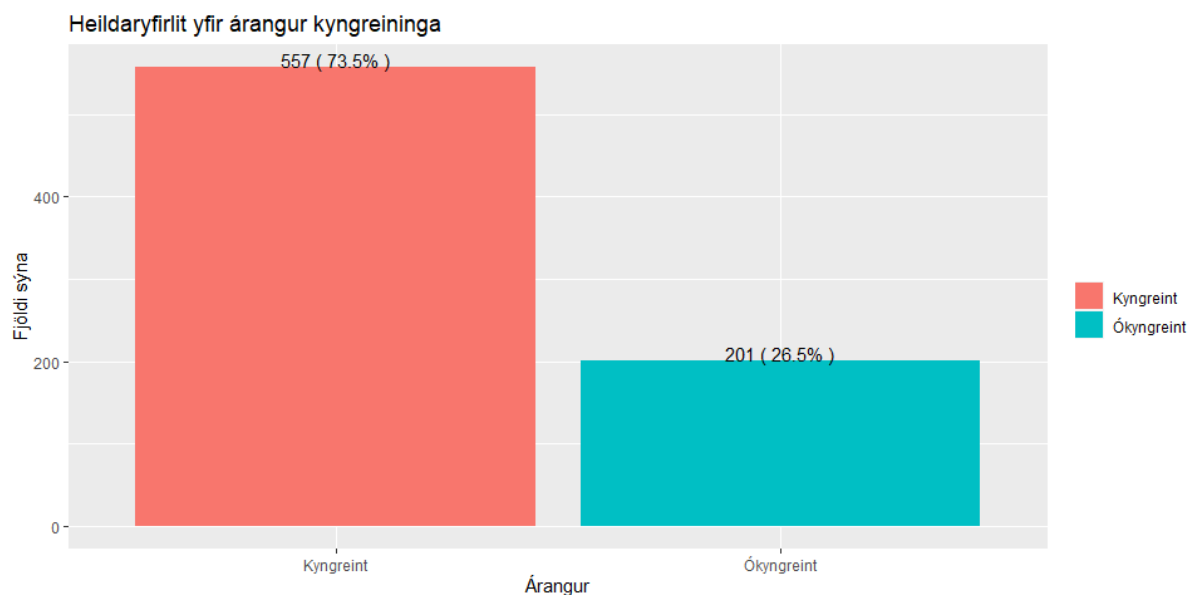
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	Heild
Fjöldi sýna	158	247	48	124	37	86	53	5	758
Fjöldi kyngreindra hænga	24	42	18	38	18	10	25	4	179
Fjöldi kyngreindra hrygna	74	114	25	78	17	43	26	1	378
Fjöldi ókyngreint	60	91	5	8	2	33	2	0	201
Fjöldi sambærilegra sýna	97	123	38	95	30	33	43	5	464

Mat á endurtakanleika kyngreiningaraðferðarinnar

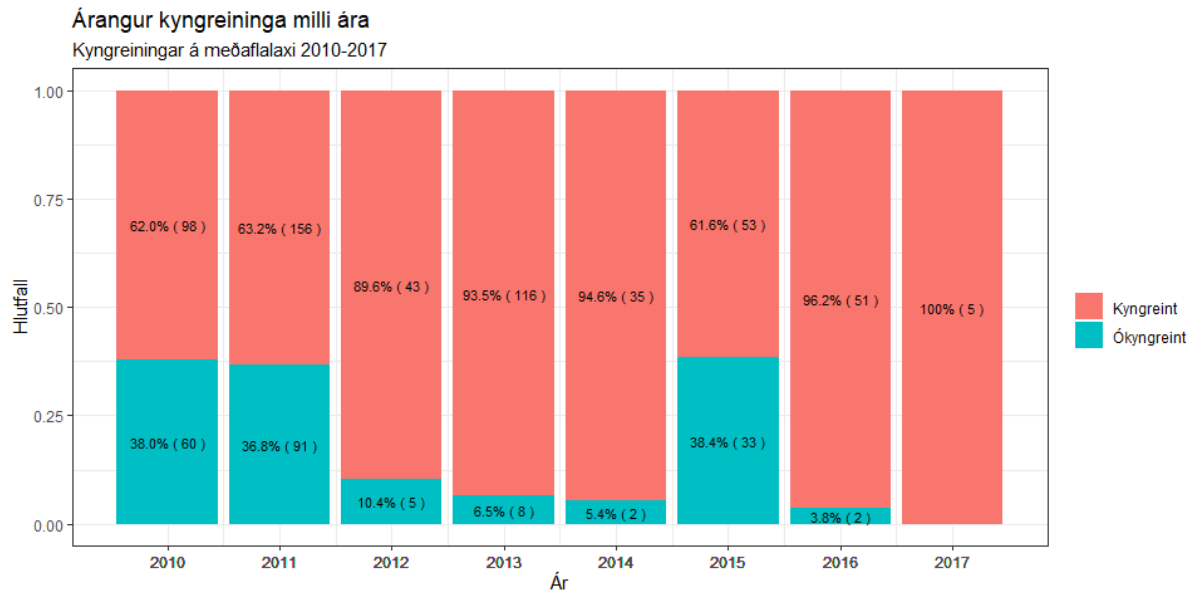
72 sýni voru tekin af handahófi, 12 sýni frá hverju ári frá 2016-2011, sem hafði áður verið búið að kyngreina með PCR aðferðinni. Þessi sýni voru kyngreind aftur með sömu PCR vísu og niðurstaðan borin saman við kyngreindu sýnin en þetta var gert til að leggja mat á endurtakanleika kyngreiningaraðferðarinnar. Eitt sýni af þessum 72 passaði ekki við upphaflegu kyngreininguna svo gera má ráð fyrir villutíðni uppá u.þ.b 1.4%. Endurtakanleiki aðferðarinnar er því metin nokkuð áreiðanleg þó alltaf megi búast við ákveðnum skekkjumörkum. Til þess að meta endurtekningarrhæfnina til fulls, hefði mátt kyngreina öll sýnin í tvígang eða greina nokkra tugi af sýnum þar sem kynið var vitað fyrirfram, en ekki gafst tími til þess.

Hlutföll kyngreindra og ókyngreindra sýna milli ára.

Til þess að meta árangur kyngreininga var skoðað hlutfall kyngreindra og ókyngreindra sýna. Sýni var flokkað sem ókyngreint ef ekki tókst að magna upp afurð (sjá mynd 6). Enn fremur var þetta hlutfall skoðað m.t.t. aldurs sýna. Ástæðan fyrir því var að alltaf er sú hætta fyrir hendi að DNA brotni niður með tímanum. Út frá grafi má sjá að ekki náðist að greina kyn um 26.5% sýnanna og að árangur kyngreininga var mismunandi milli ára (mynd 7). Ástæður fyrir því gætu verið margvíslegar en eru líklegast vegna DNA einangrunaraðferðar og aldurs DNA sýnanna. Hæsta hlutfall ókyngreindra sýna var árin 2010, 2011 og 2015. Ástæður fyrir því að þessir sýnaárgangar komu verr út úr kyngreiningu en hinir eru ekki alveg ljósar. Líklega er um að kenna slæmum gæðum á þeim vef sem notaður var til DNA einangrunar. Í fyrsta lagi voru sýnin frá 2010 og 2011 tálkn, sem reyndist erfitt að einangra úr af ástæðum sem ekki eru ljósar, þar sem slíkur vefur hentar vel til DNA einangrunnar í öðrum tegundum, t.d. makríl, síld og fleirum. Í öðru lagi er ekki vitað í hvaða vökva sýnin voru geymd í til varðveislu. Flest sýnin eru geymd í 96% etanóli en mörg sýnanna frá 2010, 2011 og 2015 voru hins vegar sett í óþekktan geymsluvökva.



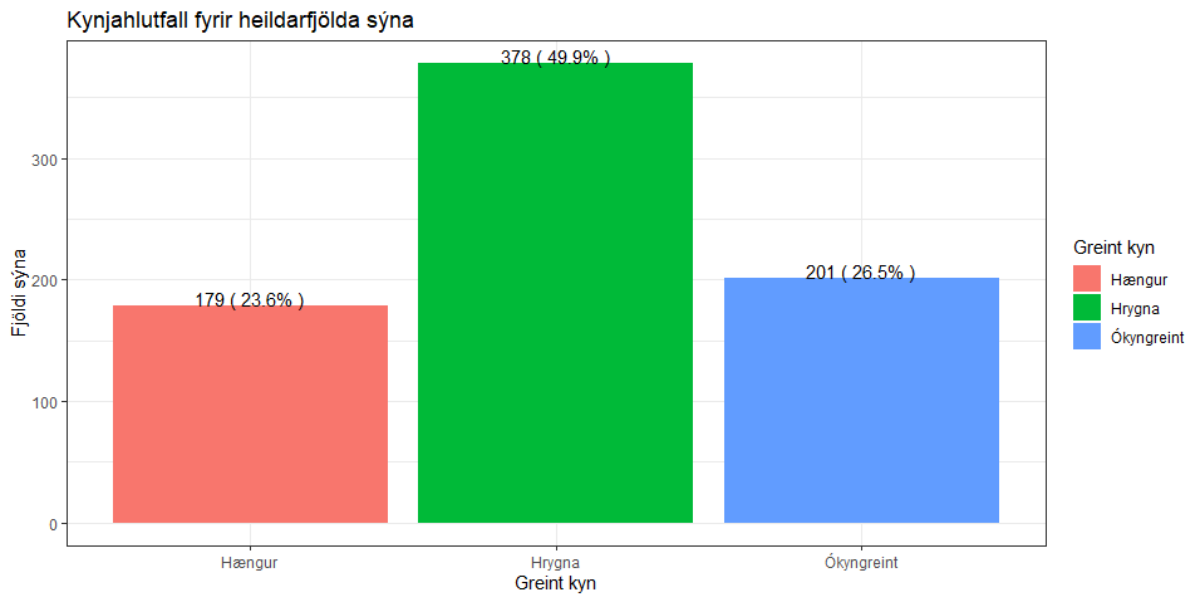
Mynd 6: Stöplarit sem sýnir heildarárangur kyngreininga á rannsóknastofu Matís. Rauðu stöplarnir tákna hlutfall sýna þar sem kyngreining heppnaðist og blágrænn litur sýnir hlutfall sýna sem heppnuðust ekki. Fjöldi greindra sýna er sýndur ofan á súlunum og hlutfall kyngreindra og ókyngreindra er sýnt innan sviga.



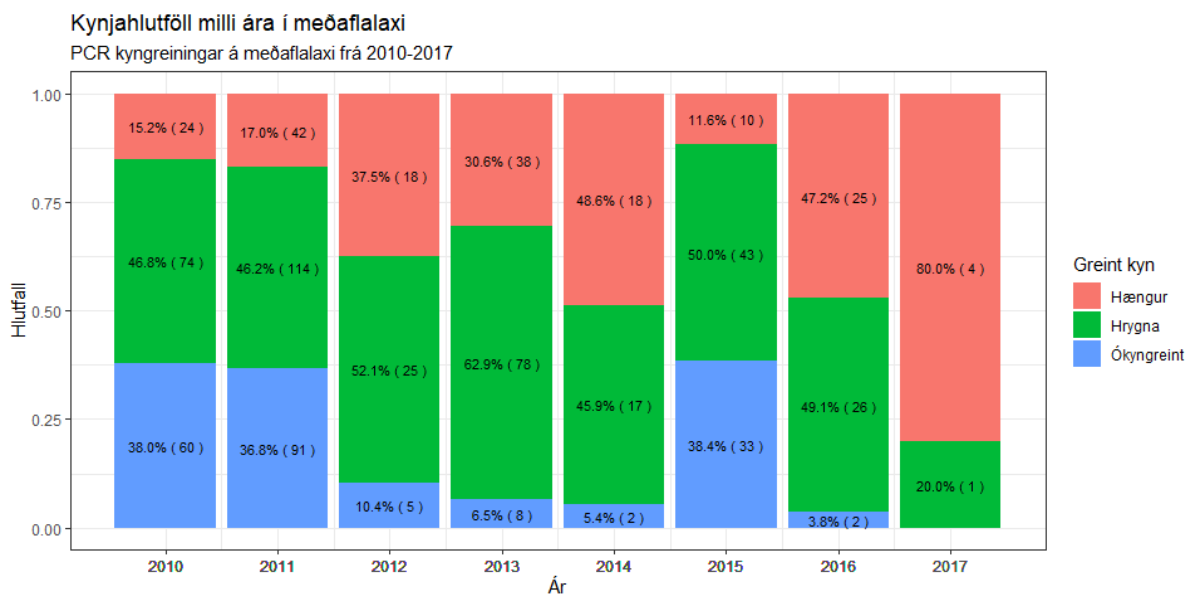
Mynd 7: Stöplarit sem sýnir árangur kyngreininga eftir sýnaárgöngum. Rauði hluti stöpla tákna hlutfall sýna þar sem kyngreining heppnaðist og blágrænn litur sýnir hlutfall sýna sem heppnuðust ekki. Hlutfall kyngreindar og ókyngreindra sýna er sýndur inni í hverri súlu og fjöldi sýna er sýndur innan sviga.

Hlutföll hænga og hrygna milli ára

Til þess að kanna hvort hlutfall veiddra hænga og hrygna sé breytilegt á milli ára var borið saman hlutfall kyngreindra fiska á milli ára. Eins og sést á mynd 8 má sjá að hlutfall hrygna er mun herra en hlutfall hænga. Alls greindust 179 hængar samanborið við 378 hrygnur. Þetta hlutfall er breytilegt milli ára (mynd 9) en samt sem áður er almennt meira um veiddar hrygnur. Mögulegar ástæður skekkju milli hlutfalla hænga og hrygna mætti rekja til fjölda ókyngreindra sýna. En eins og sést á mynd 9, virðist munurinn á hlutfallinu minnka þegar færri sýni eru ókyngreind. Einnig má hugsa sér að munurinn sé tilviljunarkenndur, þ.e. að það sé tilviljun að fleiri hrygnur hafi veiðst á hafi úti. Einnig er vert að athuga hvort kyngreiningaraðferðin sé ónákvæm en það er ólíklegt þar sem mat á endurtakanleiki aðferðarinnar gerir ráð fyrir villutíðni uppá 1.4% sem ekki getur skýrt allan muninn.



Mynd 8: Stöplarit sem sýnir fjölda laxasýna sem greind voru sem hængar (rauður), hrygnur (grænn) eða þar sem kyngreining heppnaðist ekki (blár). Fjöldi sýna er sýndur ofan á stöplunum og hlutfall af heildarfjölda sýna er sýnt innan sviga.

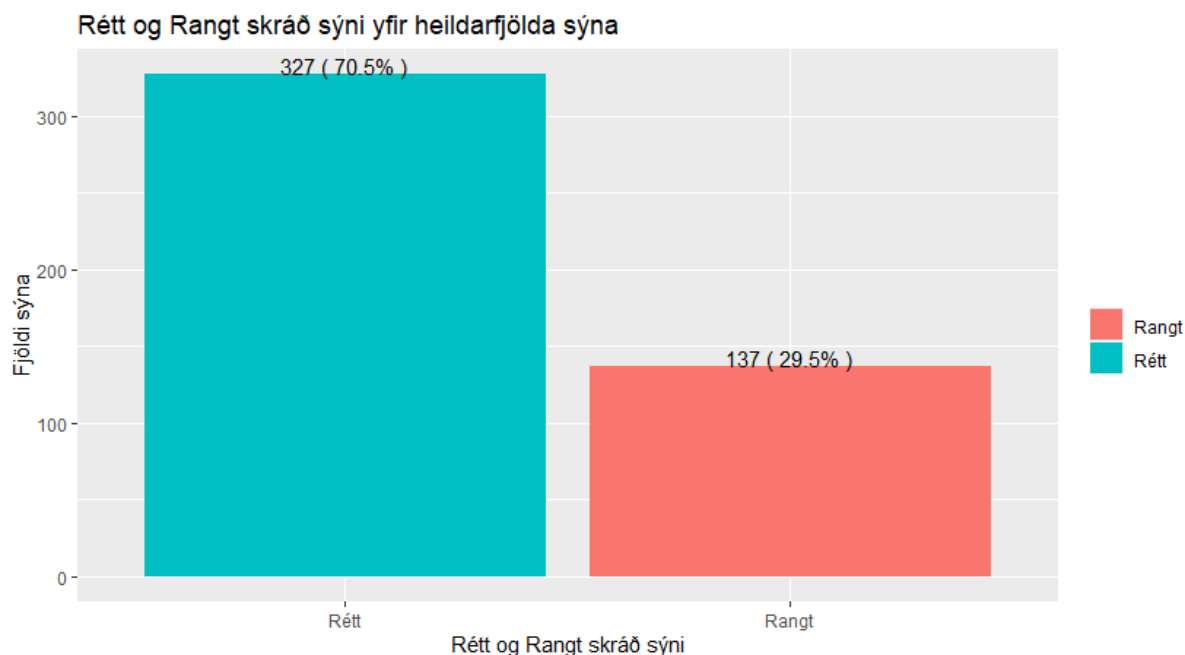


Mynd 9: Stöplarit sem sýnir hlutfall kyngreindra laxasýna innan mismunandi sýnaárganga. Hængar eru táknadur með rauðum, hrygnur með grænum og ókyngreind sýni með bláum. Kynjahlutfall og hlutfall ókyngreindra sýna er skrifadur inn í hverjum stöpli og fjöldi sýna er innan sviga.

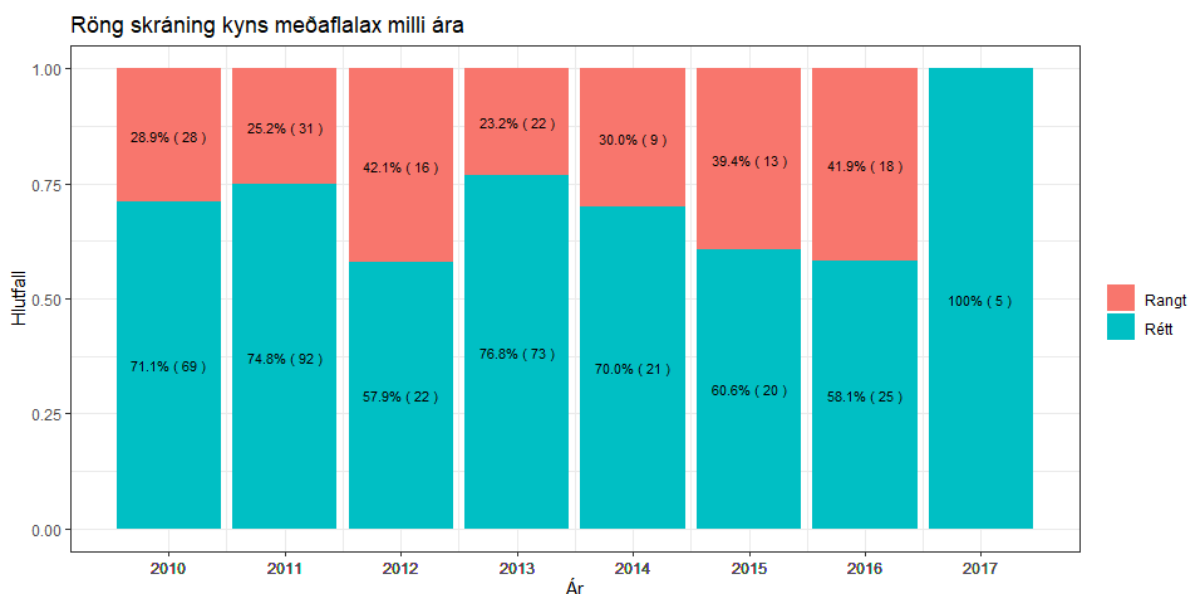
Hlutföll rétttrar og rangrar skráningar á sýnum

Þar sem kyn sýnanna, sem kyngreind voru í þessum hluta verkefnisins með erfðafræðilegum aðferðum, hafði áður verið metið út frá svipfari, var ákveðið að bera saman skráð kyn og kyn greint með PCR hvarfi til þess að sjá hversu stórt hlutfall af fiski var vitlaust skráð. Einungis var borið saman sýni þar kyn hafði verið skráð fyrir og hægt var að kyngreina með PCR aðferð. Eins og sést á mynd 10, var kyn u.þ.b. 30% veiddra fiska vitlaust skráð og virðist það hlutfall vera nokkuð svipað milli ára

(mynd 11). Hlutfallið af rangt kyngreindum sýnum var nokkuð hátt og varpar ljósi á þörf fyrir góða aðferð til áreiðanlegrar kyngreiningar.



Mynd 10: Stöplarit sem sýnir fjölda rétt og rangt skráðra laxasýna. Rétt skráning er táknuð með bláum lit og röng skráning er táknuð með rauðum lit. Fjöldi rétt og rangt skráðra sýna er merktur ofan á hvern stöpl og hlutfallið inni í sviga.



Mynd 11: Stöplarit sem sýnir hlutfall rétt og rangt skráðra laxasýna innan mismunandi sýnaárganga. Rétt skráning er táknuð með bláum lit og röng skráning með rauðum lit. Hlutfall rétt og rangt skráðra sýna er skrifaður inni hverjum stöpli og fjöldi sýna er innan sviga.

Hlutföll hænga rangt greindir sem hrygnur og öfugt

Í framhaldinu var ákveðið að skoða hvort algengara hafi verið að skrá hænga sem hrygnur eða hrygnur sem hænga. Til þess að sjá muninn þarf fyrst að leiðrétta fyrir

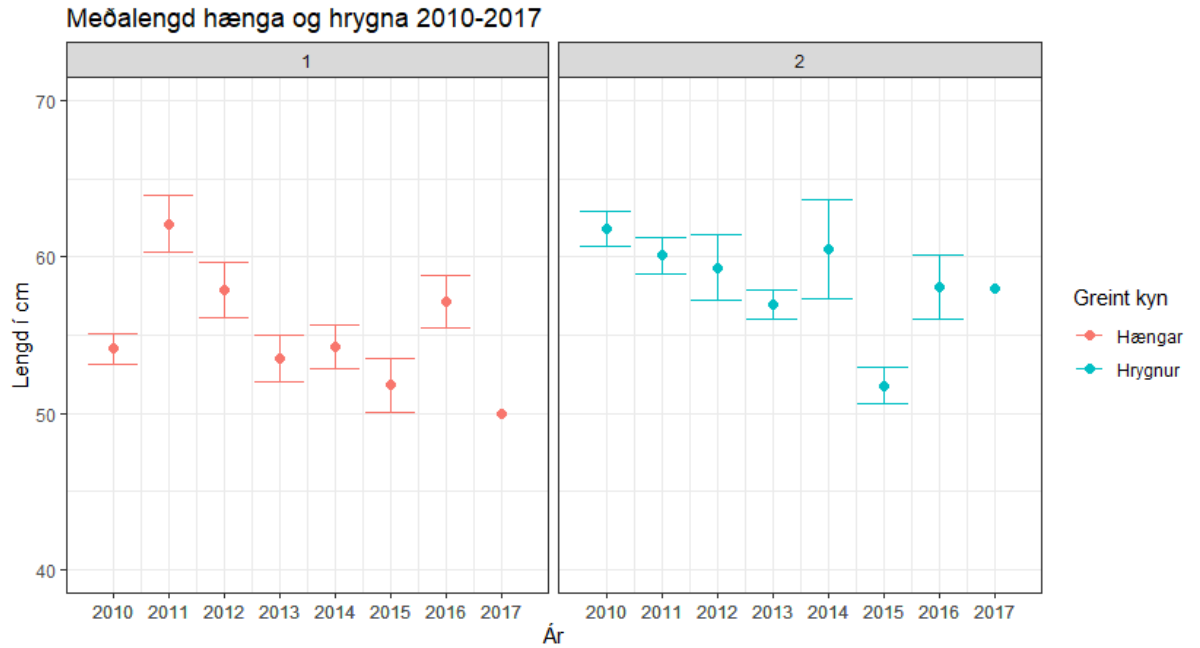
kynjahlutfalli í sýnunum. Eins og sést í töflu 10 er ekki mikill munur þegar á heildina er litið en hlutföllin eru mismunandi milli ára. Ætla hefði mátt að hængar væru oftar rangt skráðir sem hrygnur þar sem erfitt getur verið að greina útlitseinkenni þeirra áður en krókurinn á neðri skolti myndast en svo virðist ekki vera.

Tafla 10: Sýnir hlutfall rangt skráðra hænga og hrygna þegar kynjahlutfallið hefur verið leiðrétt.

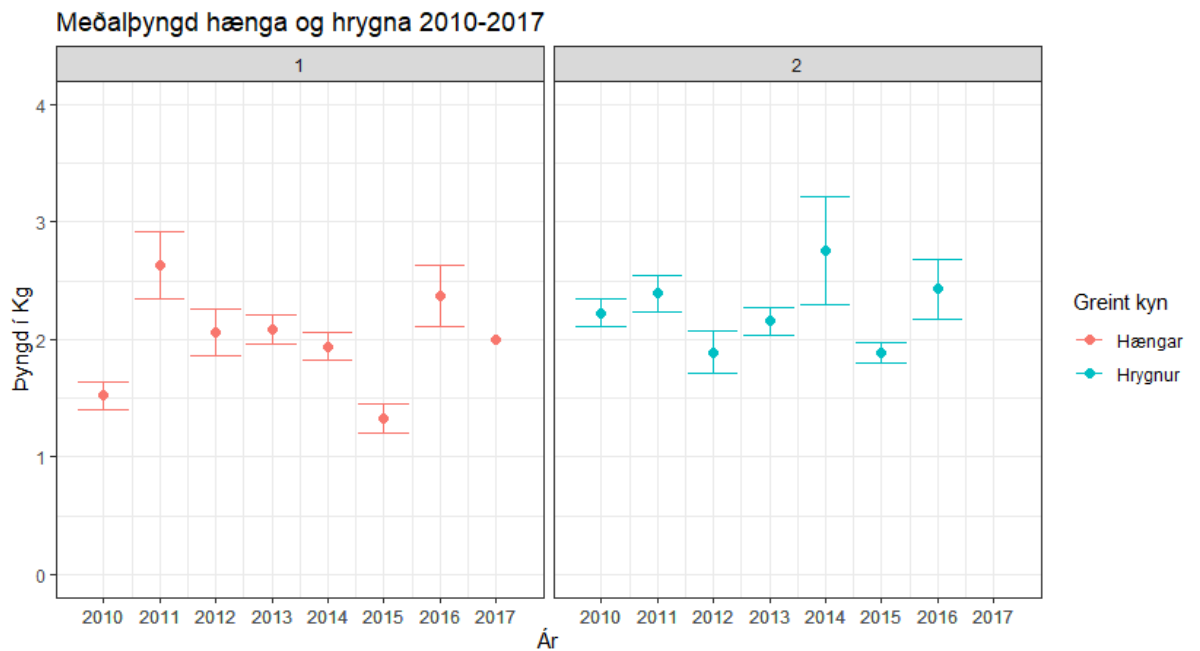
Ár	Hængar rangt skráðir sem hrygnur	Hrygnur rangt skráðar sem hængar
2010	45.80%	54.20%
2011	28.90%	71.10%
2012	73.10%	26.90%
2013	54.66%	45.34%
2014	88.10%	11.90%
2015	0%	100%
2016	67.80%	32.20%
Heild	51.60%	48.40%

Meðalþyngd og meðallengd hænga og hrygna borin saman eftir árum

Þar sem lengd og þyngd meðaflalaxa er skráð er áhugavert að skoða breytingu milli ára í meðalþyngd og meðallengd. Meðallengd hænga virðist almennt liggja á bilinu 50 cm til 62 cm og er talsvert breytileg milli ára eins og sést á mynd 12. Meðallengd hrygnanna er einnig breytileg milli ára en þær virðast hafa verið almennt lengri en hængarnir á árunum 2012-2014 og er munurinn hve mestur 2010 þegar hrygnurnar eru að meðaltali u.þ.b. 10 cm lengri. Ef litið er á bæði kynin virðist meðallengdin heldur hafa farið minnkandi en stækkandi eftir árum en þar gætu bæði umhverfis- og erfðabættir leikið stóran part. Erfitt er að segja nokkuð meira varðandi þróun meðallengdar en það væri áhugavert að fylgjast með meðallengd næstu ára. Svipaða sögu er að segja um meðalþyngd meðaflalaxa eins og sést á mynd 13. Meðalþyngd hænga sveiflast milli ára á bilinu 1,5 - 2,5 kg. Ekki virðast vera eins miklar sveiflur í meðalþyngd hrygna milli ára. Ef á heildina er litið virðist meðalþyngd laxanna almennt haldast nokkuð stöðug. Ef myndum 12 og 13 eru bornar saman má sjá, eins og búast mátti við, að meðalþyngd og meðallengd fylgist nokkuð vel að þó að meðallengdin virðist sveiflukenndari.



Mynd 12: Sýnir meðalengd hænga og hrygna á árunum 2010-2017. Meðalengd hænga (til vinstri) er táknuð með rauðum og meðalengd hrygna með bláum.



Mynd 13: Sýnir meðalþyngd hænga og hrygna á árunum 2010-2017. Meðalþyngd hænga (til vinstri) er táknuð með rauðum og meðalþyngd hrygna með bláum.

Umræður

Niðurstöður fyrir hluta 1 sýndu að PCR kyngreiningaraðferðin er góð til að greina kyn bleikja og virkaði hún í 99.8% tilfella. Upplýsingar um kyn höfðu verið skráðar niður fyrir 361 fiskasýni þegar þau voru veidd og sýndi PCR aðferðin sömu niðurstöður í 94% tilfella. Þessi 21 sýni sem höfðu verið vitlaust kyngreind við krufningu voru oftast yngri fiskar þar sem kynfæri voru ekki fullþroskuð. Ein af aðalástæðum þess að karlkyns fiskar geti greinst kvenkyns er að ef þeir eru með stökkbreytingu í

erfðamenginu þar sem vísarnir bindast, þá geta vísarnir ekki binst samsvarandi röð og þá verður engin mögnun í PCR hvarfi. Mat á endurtakanleika sýndi að í 95% tilfella mun aðferðin gefa sömu niðurstöður ef prófað er sömu sýnin aftur með PCR aðferðinni. Hér gæti hins vegar spilað inni að einungis 40 sýni voru endurtekin en til að ná sem marktækustu niðurstöðum hefði verið sniðugt að kyngreina öll sýnin aftur og síðan meta endurtekningarræfnina út frá því. Sýnin sem notuð voru til að prófa kyngreiningaraðferðina hjá HÍ fengust úr lindum og vötnum víðsvegar um Ísland. Mismörg sýni voru til frá hverjum stað, allt frá 3 sýnum upp í 62 sýni og gefur það augaleið að hlutfallið mun vera skekkt. Ef hlutfall á stöðum þar sem a.m.k. 20 sýni voru til staðar er borið saman má sjá að hlutfall kvenkyns fiska er frá 13% í UlfPI (Úlfjótssvatn, sílableikja) og allt upp í 71% í HuOd (Húsafell Oddar). Til að fá betri upplýsingar um kynjahlutfall þarf sýnastærðin að vera töluvert meiri fyrir staði þar sem 3-11 sýni voru til staðar.

Eins og fram kemur í niðurstöðum gekk með ágætum að þróa aðferð til kyngreiningar á meðaflalaxi. Hefðbundnar aðferðir við fínstillingar á PCR hvarfi voru notaðar þó ýmislegt fleira hefði mátt prófa, s.s. öðruvísi polymerasa og öðruvísi PCR hvörf, t.d. touchdown PCR. Vísapörin tvö sem urðu fyrir valinu, ss_S-R4 og SsaD157FR, komu vel út og voru böndin fyrir afurðirnar tvær vel aðskild á geli og böndin voru álíka skýr. Þó að heldur mikið hafi verið um vísistvenndir voru þær vel aðskiljanlegar frá afurðunum tveimur. Þegar fleiri vísapör fengust og voru prófuð kom á óvart að ss_S-ss_AS vísaparið (magnar upp *SdY*) hafi ekki virkað betur þar sem báðir vísar eru hannaðir út frá erfðamengi laxins. Ástæðan fyrir því gæti hins vegar verið að PCR hvarfið hafði áður verið fínstillt að öðru vísapari. Áhugavert hefði verið að prófa ss_S-ss_AS frekar og fínstillta PCR hvarf fyrir það og bera saman við ss_S-R4. Hinsvegar er kosturinn við að nota ss_S-R4 sá að það ætti líka að virka fyrir kyngreiningar á bleikju svo nota mætti þetta vísapar við kyngreiningar á báðum tegundum.

Á heildina lítið gengu kyngreiningarnar á meðaflalaxi vel þó að heldur mörg sýni væru ókyngreind eða um 27%. Ástæður þess eru ræddar í niðurstöðum en helst mætti nefna möguleg léleg gæði á DNA vegna aldurs sýna eða óvissrar geymsluáðferðar. Rétt mætti úr ókyngreindu sýnunum með því að endurtaka DNA einangrun úr þeim sýnum sem ekki tókst að kyngreina svo lengi sem vefjasýnið er nokkuð heillegt og vel geymt en því miður gafst ekki tími til þess.

Ef lítið er á hlutföll kynjanna gefa niðurstöðurnar til kynna að talsvert meira sé um hrygnur en hænga (mynd 8). Eins og nefnt er í niðurstöðum gætu ástæður þess gætu legið í fjölda ókyngreindra sýna, tilviljun við veiðar eða ónákvæmni aðferðarinnar (þó það sé ólíkleg ástæða). Til stendur að endurtaka greiningar í árgöngum þar sem stórt hlutfall fiska var ókyngreint. Ef ekkert af ofangreindu er ástæðan fyrir mismunandi hlutfalli kynjanna væri áhugavert að skoða frekar hvort það séu einhverjir umhverfis og/eða erfðabættir sem orsaka það að meira sé um kvenkyns fiska á miðum Íslands.

Niðurstöðurnar gefa einnig til kynna að um 30% af laxi sem veiddur er í meðafla sé rangt kyngreindur út frá svipfarseinkennum og sýnir þetta að brýn þörf er á góðri aðferð til kyngreiningar þannig að eins lítið sé um ranga skráningu og auðið er. Gott væri ef að verklag væri til staðar sem kæmi í veg fyrir slíkar skráningarvillur. Best væri ef slíkt verklag myndi taka til greina bæði kyn sem greint er úti á sjó út frá svipfars einkennum (eggjastokkar, sæðiskirtlar, krókur í skolti hænga, ofl.) og kyngreiningu með PCR hvarfi til að staðfesta að rétt kyn hafi verið skráð. Ekki var unnt að segja til um hvort kynið er algengara að skrá vitlaust en ætla hefði mátt að hængar væru oft rangt skráðir þar sem erfitt getur verið að greina

útlitseinkenni þeirra áður en krókur á neðri skolti myndast. Það væri áhugavert að skoða vitlausa kyngreiningu í samhengi við lengd, þyngd og kynþroska, þ.e. ef algengara er t.d. að skrá smávaxna og ókynþroska hænga sem hrygnur. Gæti það varpað ljósi á ástæður þess að kyn er vitlaust skráð. Skráð meðallengd og meðalþyngd meðaflalaxanna var einnig skoðuð. Ekki er víst hversu nákvæmar þær skráningar eru en þær ættu að gefa ágæta nálgun á raunlengd og þyngd. Nokkuð var um sveiflur milli ára í lengd og þyngd laxanna og fylgdust meðallengd og meðalþyngd nokkuð vel að eins og búast mátti við. Áhugavert væri fylgjast nánar með sveiflum í meðallengd og meðalþyngd milli ára og að setja niðurstöðurnar í samhengi við aðra þætti bæði lífssöguþætti og umhverfiþætti svosem fæðuframboð í sjó og veðurfar.

Aðalmarkmið þessa verkefnis var að þróa árangursríka og einfalda aðferð til að kyngreina laxfiska. Nemandi hjá HÍ prófaði aðferðina á bleikju og nemandi hjá Matís prófaði aðferðina til að hægt væri að nota hana á laxasýnum. Í heildina var hægt að kyngreina 85% sýna sem voru prófuð, í þessari tölu eru einnig þau sýni þar sem DNA gæði voru léleg og náðist þ.a.l. ekki að magna upp svæði. Því má áætla að aðferðin ætti almennt að virka vel ef DNA gæði eru ásættanleg. Þessi aðferð mun einfalda kyngreiningu á miklum fjölda sýna og það á tiltölulega skömmum tíma enda tekur tilraunin í heildina u.þ.b. 5 klukkustundir.

Þakkir

Davíð Gíslason hjá Matís, Eduardo Rodrigues við Benchmark genetics Iceland, Lea Jerman Plesec, Eiríkur A. Þormar og Zophonías O. Jónsson öll við HÍ.

Heimildaskrá

Guðbrandsson J., Kapralova KH., Franzdóttir, SR., Bergsveinsdóttir, ÞM., Hafstað, V. Jónsson, ZO., Snorrason, SS. og Pálsson, A. (2019). Extensive genetic differentiation between recently evolved sympatric Arctic charr morphs. *Ecology and Evolution*. Sep 12;9(19):10964-10983. doi: 10.1002/ece3.5516.

Gilbey, J., Coughlan, J., Wennevik, V., Prodöhl, P., Stevens, J. R., Garcia de Leaniz, C., ... & Coulson, M. W. (2018). A microsatellite baseline for genetic stock identification of European Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *ICES Journal of Marine Science*, 75(2), 662-674.