

Fiskenes gener kan afsløre ulovligt fiskeri

Nye DNA-metoder kan med meget stor sikkerhed afsløre fra hvilket havområde en fisk stammer. Disse nye metoder forventes at blive vigtige redskaber i kampen mod den globale overudnyttelse af fiskebestande.

Forfatter



Einar Eg Nielsen, professor
DTU Aqua
een@aqu.dtu.dk

En stor del af verdens kommercielt vigtige fiskebestande er overfisket og har behov for at blive genopbygget. Derfor er der indført strenge fangstreguleringer – typisk i form af kvoter eller lukninger af fiskeri i bestemte havområder, hvor fiskebestandene har det specielt dårligt. I EU har man indført et system af fangst-certifikater for alle handlede fisk, der skal dokumentere, fra hvilket havområde en given fisk stammer. Samtidig har forbrugerne presset på for at kunne købe fisk fra bæredygtige fiskerier, hvor man er sikker på at bestandene ikke overudnyttes. Det har resulteret i en række øko-mærker, hvor Marine Stewardship Council (MSC) er det mest kendte og verdensomspændende mærke. MSC-mærkede fisk opnår en højere pris end ikke-økomærkede, og fiskerne har derfor en stor økonomisk interesse i at få certificeret deres fiskeri som bæredygtigt. Des-

være betyder denne merpris også, at enkelte brodne kar blandt fiskere og fiskehandlere kan se en økonomisk fordel i at fejlmærke ulovligt eller ikke bæredygtigt fiske fisk. Vi arbejder derfor på at udvikle uafhængige metoder, der kan afgøre om fisken rent faktisk stammer fra det område, der står på etiketten, og dermed afsløre synderne.

DNA fra fiskefileten

DNA-baserede metoder har vist sig som meget lovende i forbindelse med at udvikle universelle værktøjer til at henføre enkelte fisk til deres geografiske oprindelsesbestand. DNA findes i alle celler i alle organismer og kan analyseres fra enhver vævstype fra friskfangede fisk til en fiskefilet på tallerkenen.

Hidtidige DNA-metoder har været baseret på såkaldt "neutral" genetisk variation – det vil sige variationer i fiskenes DNA, der findes tilfældige steder i de dele af fiskenes arvmasse, som ikke består af funktionelle gener. At man kalder det neutral genetisk variation skyldes, at den ikke har betydning for fiskenes fitness (dvs. deres overlevelse og reproduktionsevne).

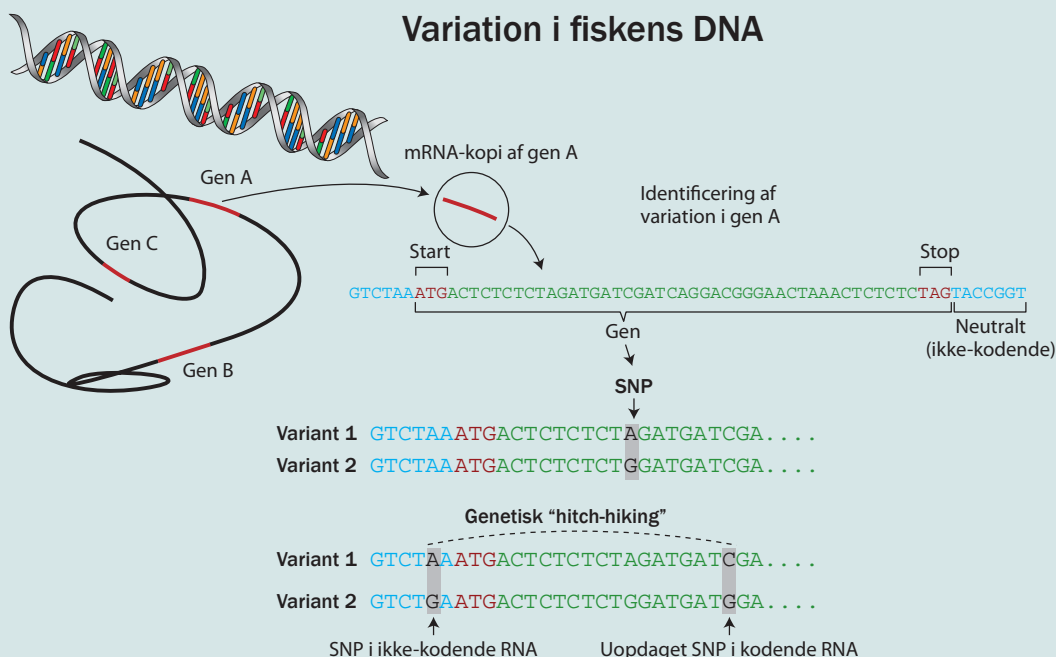
Metoder baseret på neutral genetisk information er meget velegnede til at beskrive slægtskabsforholdene mellem bestande af en art og til at vurdere graden af genetisk udveksling mellem dem. Anvendelsen har dog været begrænset af, at der generelt er meget små genetiske forskelle mellem forskellige bestande af den samme marine fiskeart. Dette skyldes hovedsageligt, at der er generelt stor genetisk udveksling (migration) mellem bestande på grund af de relativt få fysiske barrierer i havet.

Fotos: Line Reeh





Variation i fiskens DNA



I laboratoriet bruger man en teknik med et såkaldt SNP-panel til at kortlægge SNP-markørerne. Resultaterne herfra sammenligner man med de enkelte fiskebestandes kendte variationer.

På det store fotos ses gydeklare torsk, som er blevet undersøgt af forskerne.

De nye DNA-baserede metoder til at henføre fisk til deres oprindelsesbestand, handler i første omgang om at identificere variationer i DNA-sekvensen mellem forskellige populationer af fisk, hvor en enkelt nukleotid er byttet ud med en anden (en sådan variation kaldes SNP (Single Nucleotide Polymorphism)). Og det skal vel at mærke være variationer i og omkring generne – dvs. i de områder af DNA'et, der udtrykkes som funktionelle proteiner, og derfor er den del af DNA'et, som er mest udsat for selektion (i modsætning til ikke-kodende eller "neutral" DNA, som hos mennesker udgør ca. 98 % af den samlede arvmasse).

I praksis finder man disse SNP'er ved at analysere messenger-RNA (mRNA), der er en kopi af det stykke DNA, hvor genet sidder. Udover den sekvens, der koder for selve proteinet, består mRNA også af dele, der ikke oversættes til protein. Hvis en observeret SNP befinder sig i denne ikke-kodende del af mRNA'et, stammer den altså ikke fra selve genet og er i den forstand genetisk neutral. Men når den alligevel kommer til at opføre sig som om, at den er under selektion, er det fordi den sidder tæt på en anden – ikke identificeret – SNP inden for genet eller i andre gener i nærheden. Og det er så i virkeligheden denne uidentificerede SNP, der er under selektion. Det fænomen kalder man genetisk "hitch-hiking".

Variation i gener

I modsætning til neutral genetisk variation, giver genetisk variation, som ligger inden for funktionelle gener, langt bedre muligheder for at identificere, hvor en given fisk stammer fra. Baggrunden for dette er, at forskellige bestande inden for den samme art

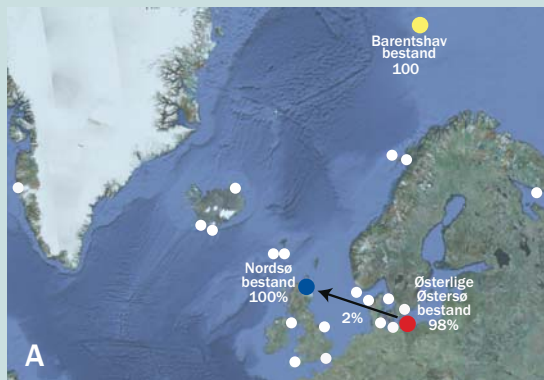


oplever forskellige miljøforhold (fx temperatur, saltindhold, iltindhold) og derfor gennem naturlig selektion er genetisk tilpasset til deres respektive lokale miljøer. Dette betyder, at man inden for vigtige gener for lokale tilpasninger, finder langt større genetiske forskelle mellem fisk fra forskellige bestande end i genomet generelt. Fx finder man hos torsk to forskellige varianter (alleler) af et gen, der koder for hæmoglobin (det ilttransporterende protein i blod). Disse varianter har forskellig iltbindings-evne ved forskellige temperaturer og iltkoncentrationer, og de optræder derfor med forskellig hyppighed hos forskellige bestande af torsk, afhængig af det lokale miljø (se boks side 40).

Det er dog sjældent nok at kigge på et enkelt gen, hvis man vil have en sikker bestemmelse. For at udvikle en mere generel metode har vi undersøgt forskelle i hyppighed af mange forskellige gen-varianter (genetiske markører) for mange bestande. Ud fra dette kan man udvælge paneler af genetiske markører, der giver en sikker identifikation, som også kan bruges som bevis i en retssag.

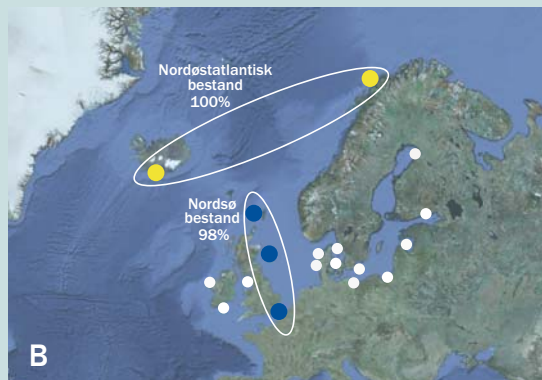
Den nye metode

Vi har i forbindelse med et EU-projekt anvendt denne nye tilgang på fire kommercielt vigtige arter: torsk, sild, tunge og kulmule. Til formålet identificerede vi en lang række variationer i fiskene, hvor en enkelt DNA-byggesten er udskiftet med en anden



Torsk

Torsken i Barentshavet og torsken i den Østlige Østersø trives og det internationale havundersøgelseråd (ICES) anbefaler kvoter i 2013 på henholdsvis 940.000 og 65.900 tons. Begge fiskerier er økocertificerede. Modsat går det rigtig dårligt for torsken i Nordsøen, hvor man anbefaler en historisk lav kvote (25.441 tons) og fiskeriet kan derfor ikke økocertificeres. Ved at udvælge blot otte SNP-markører (ud af 1261) kunne vi henføre alle indsamlede torsk til deres oprindelsesbestand. Dog undtagen én fisk, som viste at være en "Nordsø-torsk", der havde forvildet sig ind i den Østlige Østersø! I gennemsnit var sandsynligheden for den enkelte torsk 600.000 gange højere for den rigtige oprindelsesbestand end for den næstmest sandsynlige alternative bestand.



Sild

Der findes i øjeblikket ingen metode, der kan skelne imellem sild fra Nordsøen og Nordøstatlantisk sild (Norske vårgydere og Islandske sommergydere). Sikker bestemmelse af oprindelse er vigtigt i forbindelse med certificering af fiskerierne. Ved at anvende et panel af 31 SNP-markører med størst genetiske forskelle mellem sild fra Nordsøen og Nordøstatlanten, kunne vi henføre 100 % af de Nordøstatlantiske og 98 % af Nordsøildene korrekt tilbage til deres oprindelsesbestand. I gennemsnit var sildene mere end 16.000 gange så sandsynlige i deres oprindelsesbestand. I modsætning til torsken, var de få fisk, der ikke blev henført korrekt, ikke strejffere fra andre bestande, men individer hvis genetiske profil var næsten lige sandsynlig i de to bestande.

inden for et gen (disse kaldes SNP-markører, hvor SNP står for Single Nucleotide Polymorphism).

Vi endte med at identificere flere hundrede SNP-markører i hver fiskeart, og dem anvendte vi så på cirka 30 vævsprøver af fisk indsamlet fra hvert af de kendte og betydningsfulde gydebestande i arternes udbredelsesområde (boks nederst). I alt analyserede vi mere end 1000 fisk pr art, og dette dannede således vores basis for at kunne henføre fisk tilbage til oprindelsesområde. På grundlag af alle disse prøver er det naturligvis muligt at opstille et meget stort antal potentielle scenarier for test af ulovligt fiskeri og/eller fejlmærkning. Derfor valgte vi at fokusere på specifikke cases, en for hver art, som var direkte afledt af konkrete behov for kontrol og håndhævelse af lovgivningen.

For hver case udviklede vi et "minimums-panel med maksimum power", det vil sige det mindst mulige antal SNP-markører, der kunne give os den højeste mulige statistiske styrke til bestemmelse af oprindelse. Dernæst estimerede vi sandsynligheden for, at de enkelte fisk i vores prøver af gydefisk blev henført korrekt tilbage til deres oprindelsesbestand.

Stor præcision

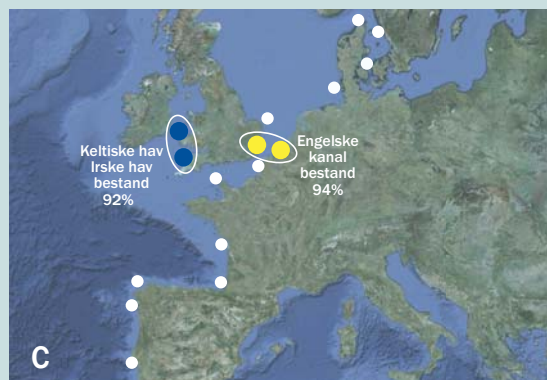
På grundlag af metoden var vi i stand til at henføre alle de indsamlede individer af de fire fiskearter til deres oprindelsesbestand med meget stor sikkerhed.

Eksempelvis undersøgte vi torsk fra Barentshavet, den østlige Østersø og Nordsøen, og ved at udvælge et panel med blot otte ud af 1261 SNP-markører kunne alle individer "stedbestemmes". Den gennemsnitlige sandsynlighed for, at den enkelte torsk tilhørte den rigtige oprindelsesbestand var således 600.000 gange højere end sandsynligheden for, at den tilhørte den næstmest sandsynlige bestand.

Retssager og fiskeforvaltning

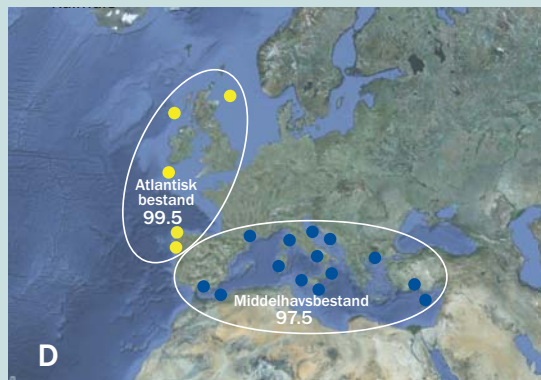
Da alle fisk, der handles inden for EU, skal være mærket med oprindelsesområde, er der et meget stort potentiale for at anvende metoden til kontrol af ulovligt fiskeri og til sporbarhed i detailhandelen. Metoden vil i forbindelse med en retssag ofte kunne levere "beviset" i form af en statistisk sandsynlighed for eller imod forsvarer eller anklagers påstande. Samtidig er "minimums-paneler med maksimum power" forholdsvis billige at anvende. Således er udgifter til kemikalier og lignende under 100 kroner pr fisk analyseret.

Udover at metoden kan bruges til kontrol og håndhævelse af lovgivningen, er den forbedrede sporbarhed også et vigtigt redskab i forhold til praktisk forvaltning af fiskebestande. For mange arter blander fisk fra genetisk adskilte bestande sig uden for gydetiden. Det betyder, at man i visse områder fisker på blandede bestande med hver deres biolo-



Tunge

De fleste tungebestande i Nordøst Atlanten er i en genopbygningsperiode efter lang tids hårdt fiskeritryk. I den forbindelse er der mistanke om, at en del af de tunger, der landes i Belgiske havne, ikke stammer fra lovligt fiskeri i det Keltiske hav/Irske hav, men i stedet fanges i områder lukket for fiskeri i den Engelske Kanal, når fiskerne er på vej hjem. Ved at anvende et panel af 50 SNP-markører, kunne vi henføre henholdsvis 92 % og 94 % korrekt til Keltiske hav/Irske hav og den Engelske Kanal. Selv på denne meget lille geografiske skala er en gennemsnitlig tunge mere end 60 gange så sandsynlig i sin oprindelsesbestand end i den anden bestand.



Kulmule

For kulmule findes der forskellige mindstemål for fisk landet i henholdsvis Atlanten (27 cm) og Middelhavet (20 cm). Derfor bliver Atlantiske kulmuler mellem 20 og 27 cm ofte indrapporteret som værende af middelhavsoprindelse og dermed tilsyneladende lovlige. Et panel bestående af 13 SNP-markører kunne henføre 98 % af alle fisk til deres oprindelsesbestand. 14 af i alt 15 fisk, som ikke blev henført korrekt, stammede interessant nok fra den vestlige del af Middelhavet (Algierske kyst og Malaga), hvilket højst sandsynligt repræsenterer fisk af atlantisk oprindelse, som har stukket snuden indenfor i Middelhavet. På trods af dette havde 95 % af alle kulmuler, en sandsynlighed, der var over 500 gange større for den rigtige oprindelsesbestand end for alternativet.

Kort, der viser områder, hvor der blev indsamlet prøver af gydebestande for fire arter af fisk (hvide cirkler) og den procentvise andel af fisk, der blev korrekt henført til deres oprindelsesbestand på baggrund af SNP-analyse-panelerne (farvede cirkler).

giske karakteristika såsom størrelse af gydebestand, vækst og rekruttering til fiskeri. For at undgå overfiskeri af små og sårbare bestande kan man gennem rutinemæssig genetisk monitoring af fiskeriet bestemme, hvor stor en andel af fiskene, som stammer fra de forskellige bestande. På den måde kan man dirigere fiskeriet i tid og rum for at sikre en bæredygtig udnyttelse af alle bestande. Fx arbejder vi netop nu med at bestemme bidraget fra torskebestanden i den Østlige Østersø til fiskeriet i den Vestlige Østersø, der også huser mindst en lokal bestand af torsk.

Fiskeritrykket vurderes af det internationale havundersøgelseråd (ICES) til at være alt for højt, men man ved ikke, hvor stor en andel af fiskeriet, der udgøres af torsk fra den voksende og sunde bestand i den Østlige Østersø (boks forrige side). At den andel er stigende indikeres af, at en større del af fiskeriet nu foregår tæt på grænsen mellem den Vestlige og Østlige Østersø. Ved hjælp af de indsamlede gydeprøver af torsk og et panel med 20 SNP-markører, kan vi bestemme bidraget fra de to gydebestande til det potentielt blandede fiskeri i forskellige dele af den Vestlige Østersø. I forvaltningsøjemed kan denne viden anvendes til at justere fiskeritrykket i de forskellige dele af den Vestlige Østersø, så det er bæredygtigt for alle biologiske (genetiske) bestande.

Videre læsning

Om Populationsgenetik:
www.fiskepleje.dk/
fiskebiologi/
populationsgenetik.aspx

Einar E. Nielsen et. al.:
Gene-associated markers provide tools for tackling illegal fishing and false eco-certification. Nature Communications 22 May 2012. DOI: 10.1038/ncomms1845

Fremtidig udvikling

Alle metoder har deres begrænsninger – også denne. Eksempelvis kan man ikke bruge genetiske metoder til at håndhæve lukkede områder, inden for den samme biologiske (genetiske) bestands udbredelsesområde, da fiskene vil være genetisk ens.

Vi arbejder nu på at forbedre metoden ved at undersøge variationen i og omkring et endnu større antal gener for de relevante arter. Det betyder, at vi får flere SNP-markører at vælge imellem og dermed også flere med stærkt forhøjede genetiske forskelle mellem bestandene. Dette betyder, at vi kan opnå en endnu højere grad af korrekt bestemmelse af oprindelsesbestand, især på en mindre geografisk skala – selv med et mindre og dermed hurtigere og billigere SNP-panel.

Et nyt stort fremtidigt udviklingsområde for disse metoder er til sporing af fisk fra akvakultur. Dette gælder både omkring kontrol af mærkning, men også til at finde ud af hvor fisk, der undslipper fra havbrug, stammer fra. I den forbindelse er der netop startet et nyt EU-projekt *AquaTrace*, der skal udvikle metoder til at spore havbars, havbrasen og pighvar. Så i fremtiden vil man sandsynligvis have uafhængige DNA-baserede metoder, der kan spore alle typer fisk og fiskeprodukter fra båd til forbrugers tallerken. ■



Genvarianter og fiskebestande

Hos torsk finder man to forskellige varianter (alleler) af et gen, der koder for hæmoglobin (det iltransporterende protein i blod, som også er årsag til blodets røde farve). Disse varianter (kaldet Hb1¹ og Hb1²) har forskellig iltbindingsevne ved forskellige temperaturer og iltkoncentrationer. Man har længe vidst, at forekomsten af disse to varianter i torsk fra hhv. den Østlige Østersø og i Bælthavet er meget forskellig, hvilket er et resultat af naturlig selektion på grund af de forskellige miljøforhold i de to havområder. Således er frekvensen af Hb1¹-varianten cirka 0,61 for torsk i Bælthavet, mens den kun er cirka 0,03 for torsk i den Østlige Østersø. Hvis man således står med en torsk af ukendt oprindelse, som har to kopier af Hb1¹-varianten, er det meget usandsynligt, at den stammer fra den Østlige Østersø. Faktisk er sandsynligheden ca. 400 gange større for, at den stammer fra Bælthavet, idet sandsynligheden for, at en torsk har to kopier af Hb1¹-varianten, er $0,6 \times 0,6 = 0,37$ i Bælthavet, mens den er $0,03 \times 0,03 = 0,0009$ for den Østlige Østersø.

Genet for hæmoglobin kan dog ikke alene give en sikker bestemmelse i ethvert tilfælde, da forskellen på sandsynlighed er mindre for andre kombinationer af varianterne (dvs. Hb1¹/Hb1² og Hb1²/Hb1²). Ej heller giver genet en sikker bestemmelse for torsk fra andre havområder, hvor forskellene i frekvens mellem de forskellige hæmoglobintyper er mindre.

Indsamling af prøver af mere end 1000 fisk pr art udgør grundlaget for den nye metode.

Foto: Line Reeh