

RAPPORT OM ARBEIDET MED BLODANALYSER FOR POPULASJONSUNDERSØKELSER

Av

DAG MØLLER, GUNNAR NÆVDAL og AAGOT VALEN
Fiskeridirektoratets Havforskningsinstitutt

INNHold

	Side		Side
Forord.....	1	Lyr.....	7
Innledning.....	1	Sei.....	8
Identifikasjon av arvelige karakterer.....	1	Hyse.....	9
Generelt.....	1	Kviting.....	10
Blodtyper.....	2	Sild og brisling.....	11
Generelt.....	2	Andre fiskearter.....	11
Materiale og metoder.....	2	Selarter.....	11
Resultater.....	2	Identifikasjon av populasjoner.....	14
Torsk.....	2	Generelt.....	14
Klappmyss.....	3	Torsk.....	14
Hemoglobin- og serumproteintyper.....	3	Grønlandssel.....	14
Materiale og metoder.....	3	Videre arbeider.....	15
Resultater.....	5	Summary.....	16
Torsk.....	5	Litteratur.....	16

FORORD

Serologiske undersøkelser (blodanalyser) av fisk og sel ble satt i gang vinteren 1959 ved Fiskeridirektoratets Havforskningsinstitutt.

I årene 1960-63 ble undersøkelsene støttet ved en årlig bevilgning fra Norges Almenvitenskapelige Forskningsråd til dekning av lønn til laboratorieassistent, en utgiftspost som senere er overført Havforskningsinstituttets budsjett, og som for en stor del er dekket med midler fra Fiskerinæringens Forskningsfond.

Selfangstrådet har også støttet undersøkelsene med midler fra Selfondet til dekning av utgifter til teknisk og vitenskapelig assistanse. Midlene er dels gitt som lønn, dels som stipendier. Disse utgiftene er også senere overført til Havforskningsinstituttets budsjett.

I det følgende vil vi i korthet omtale de undersøkelser som er utført, og de viktigste resultatene av arbeidet.

INNLEDNING

Dyrene i havet er sjelden jevnt fordelt. De forskjellige artene synes ofte å være oppdelt i mer eller mindre adskilte individgrupper eller *populasjoner*. Skal en finne årsakene til variasjoner i mengde og fordeling av en art, må en først kunne identifisere individgruppene eller kjenne sammenhengen mellom individgruppene innen arten. Arbeidet med frednings- og beskatningsregler må ta hensyn til om be-

stemmelsene gjeldende en bestand i et område, innvirker på individtallet i bestander i andre områder.

På liknende måte som et individ er et produkt av arv og miljø, kan en si at en individgruppe er et produkt av arvemassen for individene som inngår og miljøet de lever i. En individgruppe med én sammensetning av arvemassen har sannsynligvis et annet fremtoningspreg enn en annen gruppe med en annen sammensetning av arvemassen, og to populasjoner med ens arvemasse, men som lever i forskjellig miljø, har sannsynligvis forskjellige karaktertrekk.

Skal en prøve å identifisere populasjonene innen en art, bør en både nytte seg av den forskjellen som oppstår mellom individgrupper som har forskjellig sammensetning av arvemassen, og forskjellen som fremtrer mellom grupper på grunn av at de lever i forskjellig miljø. Samtidig bør en prøve å følge med individenes vandring ved hjelp av merking.

IDENTIFIKASJON AV ARVELIGE KARAKTERER

GENERELT

Skal en undersøke sammensetningen av arvemassen, må en først identifisere karakterer som gir uttrykk for en del av arven. For dyreartene i sjøen har det i få tilfelle vært påvist arvelige karakterer. I alminnelighet påvises karakterene ved arveanalyser; undersøkelser som en i stor utstrekning er forhindret fra å utføre med dyr i sjøen fordi en ikke behersker befruktningen eller oppalingen av avkom til en slik

størrelse at karakteren kan påvises. En utvei er å undersøke karakterer som generelt har vist seg å være arvelig i andre organismer, og så indirekte vise at denne karakteren er arvelig ved hjelp av Hardy-Weinbergs lov (Appendiks).

BLODTYPER

Generelt

Etter Landsteiners oppdagelse av ABO-blodtype-systemet hos mennesket i 1900, har studiet av blodtypene hatt en rivende utvikling. I dag har en påvist blodtyper hos en rekke forskjellige pattedyr, fugler, amfibier, reptiler og fisk. Og der mulighetene har vært tilstede for en nærmere undersøkelse av ned-arvingen, har en vist at blodtypeegenskapene har en ganske bestemt arvegang.

Blodtypene påvises ved *antigen-antistoff* reaksjoner. Antigenet er bundet til de røde blodlegemer, mens antistoffet er knyttet til serum. Først blodceller sammen med serum, og serumet inneholder antistoff mot et eller flere av cellens antigener, vil cellene klistre seg sammen i større eller mindre klumper. Er det derimot ikke antistoff tilstede mot antigener på de tilførte celler, vil det ikke være noen reaksjon, og vi sier at reaksjonen er negativ. Injiseres røde blodlegemer fra en art i blodomløpet til en annen art, kan den siste arten reagere ved å danne spesifikt antistoff mot de innførte fremmede blodceller. Med serum fra injiserte dyr kan en derfor påvise blodtyper hos den arten hvis blodlegemer er nyttet til injeksjon.

Materiale og metode

Blodtypeundersøkelsene startet ved å undersøke hvordan blodceller av torsk reagerte med forskjellige typer av menneskesera. Blodlegemer av i alt 300 torsk er testet med serier av testsera for blodtypene A, B, M, N og D hos menneske. Senere har vi nyttet kaniner og høns til injeksjon av torske- og selblodlegemer. Til vanlig ga hver fisk tilstrekkelig blodmengde for injeksjon av tre kaniner/høner. I alt har vi injisert 106 kaniner med blodlegemer fra 46 forskjellige torsk, 24 kaniner med celler fra 9 klappmyss og 9 høns med torskeblodceller. Kaninene ble i alminnelighet ikke nyttet til injeksjon av mer enn en celletype. Blod ble først tappet fra torsk/sel som hadde vent seg til livet i akvarium. Blodlegemene ble sentrifugert fra serum, vasket og oppslemmet i fysiologisk saltoppløsning (11,7 g/l NaCl). Vi har hele tiden arbeidet så sterilt og kaldt som mulig.

Det ble satt 12 injeksjoner på hver kanin/høne i et tidsrom av 4 uker, og først 10 til 14 dager etter siste injeksjon ble dyrene tappet for blod. Hver kanin ga omtrent 60 ml råserum. Etter inaktivering og en eller flere absorpsjoner ble hvert serum undersøkt m.h.p. spesifikt antistoff mot de blodcellene som ble injisert. I alt har vi nyttet blod fra ca. 3000 torsk i disse blodtypeundersøkelsene.

Resultater

Torsk, *Gadus morhua*

Det viste seg at enkelte menneskesera inneholdt spesielle antistoff mot torskeblodceller (HALVORSEN og MØLLER 1959). Denne første inndeling av blodceller hos torsk m.h.p. blodtype ble så ført videre ved injeksjon av kaniner.

Omtrent tredjedelen av de kaninene som ble injisert med torskeblodceller, viste seg å danne spesifikt antistoff. I alt ble det påvist 7 forskjellige antigener som er gitt navn etter alfabetet i den orden de ble identifisert (MØLLER 1962). Det ble ikke påvist spesifikt antistoff mot torskeblodceller i sera fra høns. Tabell 1 viser reaksjonene mellom de antistoffene som vi har isolert og 6 forskjellige prøver av blodceller hos torsk. Disse reaksjonene viser at en har påvist 7 uavhengige antigener. Det har ikke vært mulig å samle to eller flere av de antigenene en har påvist sammen i blodtypesystemer.

Konsentrasjonen av de spesifikke antistoffene har variert en god del; lavest var hele tiden konsentrasjonen av anti-B. Det har derfor vært vanskelig å få tilstrekkelig mengder av antisera til arbeidet med å bestemme frekvenser av blodtype B i forskjellige populasjoner. Reaksjonene mellom torskeblodceller og anti-C og anti-G viste seg dessverre i det lange løp ikke å være entydig. Vi har derfor kuttet ut disse antistoffene i arbeidet med identifisering av popula-

Tabell 1. Typing av torskeblodlegemer m.h.p. antigenene A, B, C, D, E, F og G.
Blood typing of cod cells with regard to the factors A, B, C, D, E, F and G.

Torskeblod- legemer	Anti-		C	D	E	F	G
	A	B					
<i>Cod cells</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>
01222.....	—	+	+	—	+	+	+
01264.....	+	—	—	+	+	+	+
01276.....	+	—	+	—	+	+	—
01354.....	—	+	—	+	—	+	+
01359.....	+	+	+	+	—	+	—

sjoner. Vi var også uheldig med antigen F, idet det viste seg at dette antigen var så alminnelig at vi ikke var i stand til å produsere nytt anti-serum med fisk som ikke var bærer av antigenet. Anti-A, D, og E har imidlertid vist seg meget anvendelig i identifiseringsarbeidet. Reaksjonene er klare og frekvensen av antigen A og E har stor variasjon i individgruppene i det området en har kartlagt.

Klappmyss, *Cystophora cristata*

Ved injeksjon av blodceller av klappmyss i kaniner, har en fått reist sterke antistoffer i kaninserum. De fleste av disse antistoffene synes imidlertid å reagere mot celler av alle klappmyss (generelle antistoffer). For å få isolert spesifikke antistoffer er det nødvendig å ha tilgang på forholdsvis store mengder ferske blodceller, og blodmengdene en har fått av de klappmyss-ungene en har hatt i akvarium, har ikke vært tilstrekkelig. Forsøk med frysing av blodceller på fangstfeltet for seinere bruk i laboratoriet, har ikke vært oppmuntrende. En har oppnådd å isolere et par forholdsvis svake spesifikke antistoffer, men vanskelighetene med tilgang på ferskt materiale har ført til at en foreløpig har måttet oppgi blodtypeundersøkelsene på klappmyss, og i stedet har en tatt opp arbeidet med elektroforese av hemoglobiner og serumproteiner.

HEMOGLOBIN- OG SERUMPROTEINTYPER

Matriale og metoder

Individuelle variasjoner i hemoglobin og serumproteineres kjemiske oppbygning er vanlig hos en rekke hvirveldyr. Spesielt har en funnet mange variasjoner av de jernbindende serumproteiner, de såkalte transferriner. Variasjonene er arvelige.

Variasjoner av proteinene undersøkes raskest og lettest ved elektroforese, som er en vandring av molekyler eller partikler i et elektrisk spenningfelt. En forskjell i to proteinmolekyleres kjemiske oppbygning kan føre til en forskjell i molekylenelektroskopiske nettoladning ved bestemte surhetsgrader og dermed til forskjell i vandringshastigheten i det elektriske spenningsfeltet. Vandringshastigheten i et medium som for vårt tilfelle er laget av agar og stivelse og en elektrolytt. Mediet kan også bestå av filterpapir, celluloseacetatpapir eller syntetiske polymerer.

Blod- og serumprøver av fisk er i stor utstrekning samlet undet tokt i Havforskningsinstituttets regi, ved fiskesalstagene rundt kysten og ved samarbeide med fiskerne. Antall prøver av de artene som er under-

søkt og området de er samlet inn fra, er gitt i tabellene over resultatene. Prøvene fra sel ble tatt av observatører fra Havforskningsinstituttet ombord på norske selfangstskuter på fangstfeltene i Vestisen, Austisen og ved Newfoundland. Prøvene fra Kvit-sjøen ble samlet av russiske forskere etter anmodning gjennom Selfangstkommissjonen for den nordøstlige del av Atlanterhavet. Fra Danmarksstredet er samlet blod av klappmyss fra den danske fangskuta «Ejnar Mikkelsen».

Ved innsamlingen har en gått fram på følgende måte: Blodprøver av fisk er tatt fra hjerteregionen med en 2 ml injeksjonssprøyte og overført til to rene 2 ml glasstuber, en med og en uten antikoaguleringsmiddel. Fra små fisk har en samlet blodet ved å klippe halen av fisken og la blodet renne direkte ned i tubene. Etter at blodet er koagulert, er det sentrifugert, og det rene serum er pipettert over i en ny tube. Både blod og serum må oppbevares kjølig. (ses. 5).

Av sel ble blodet samlet på 15 ml glasstuber eller 50 ml glassflasker så snart som mulig etter at selen var drept. Prøvene ble ellers behandlet på samme måte som fiskeblodet, bortsett fra at også blodprøvene kunne oppbevares frosset.

Elektroforeseteknikken som er brukt til analysing av hemoglobinene, er beskrevet av SICK (1961). En modifisert teknikk er nyttet til analyse av serumproteinene. Forandringene som er gjort av SICK, er beskrevet av MØLLER (1965a). Metodene vil her bli beskrevet i korthet:

Til analysing av hemoglobine ble brukt en elektrolytt (buffer) etter følgende oppskrift.

9,85 g dikaliumfosfat
4,2 g natriumdihydrogenfosfat
10 l destillert vann

Denne bufferen (fosfatbuffer) har pH 7,3 og liten ledningsevne. Den brukes bare en gang. Med fosfatbufferen har vi laget et elektroforesmedium (gel) bestående av 1 g agar (Ionagar No 2, Oxoid) i 100 ml buffer.

Til analysing av serumproteinene ble nyttet en buffer bestående av

60,5 g trishydroksymethylamidometan
6,0 g E.D.T.A. (etylendiamintetra-
eddiksyre)
4,6 g borsyre
2 l destillert vann.

Denne bufferen (heretter kalt *trisbuffer*) har pH 9,0 og stor bufferkapasitet kombinert med liten ledningsevne. Den kan brukes omigjen flere ganger.

Til trisbufferen har en anvendt en gel (elektroforesemedium) laget av 2 g stivelse (Starch hydrolysed, The British Drug Houses Ltd.) og 0,8 g ionagar i 100 ml trisbuffer.

Dessuten er det for selserum nyttet en modifisert fosfatbuffer med pH 6,3. Til denne er gelen laget av 1 g «difcoagar» (Difco Laboratories 0560—01) i 100 ml buffer.

Elektroforesemediet ble oppvarmet i vannbad til 98°C og fikk da konsistens som en seigflytende væske. Denne ble spredt utover objektglass med pipette, 2 ml på hvert glass. Gelen stivner etter et par minutter, men gelen med trisbuffer må stå ca. 15 min. i kjøleskap for å få den rette konsistens for det videre arbeidet.

Et stykke stivt filterpapir ble så stukket ned i gelen på tvers av glasset. Filterpapiret trakk vann ut av gelen, og når vannet nådde ca. 2 mm opp over gel-overflaten, ble filterpapiret fjernet. I spalten som ble stående igjen (heretter kalt *startpunktet*), ble så litt av det serum som skulle analyseres, plasert med en tynn pasteurpipette.

Elektroforesekaret er vist på fig. 1. Karet er en plastkasse med to langsgående skillevegger. I den ene enden er det delt av et mindre rom med en tversgående skillevegg. Langs ytterveggene er lagt inn elektroder av platina. Disse er koplet til kontaktpunkter i forkant av karet, og her blir ledningene fra strømkilden koplet til. Strømmen er tatt fra en likeretter som kan reguleres mellom 115 og 200 volt.

I hvert av karetets ytterrom ble det fylt 400 ml buffer. Bufferen ble avkjølt til ca. +2°C før bruk. Midtrommet ble fylt med is for avkjøling. Objektglassene med prøvene ble lagt på tvers over skilleveggene, som regel seks glass hver gang. Som bru mellom gel og buffer ble det brukt et dobbelt Whatman nr. 1 filterpapir på hver side. En metallkasse med is (ikke vist på figuren) ble satt over apparatet for å holde temperaturen konstant under analysen og hindre uttørring av gelen.

Som regel ble en eller to serumprøver applisert på hvert glass, mens vi har oppnådd gode resultater med fire hemoglobinprøver på glasset, slik som de to siste glassene i fig. 1 viser.

Ved hemoglobinanalysene er nyttet en analysetid på $\frac{3}{4}$ time og et spenningsfall av 80 volt over gelen. For serumprøvenes vedkommende brukte vi en analysetid av $1\frac{1}{2}$ —2 timer med et spenningsfall av 65 volt.

Etter elektroforeseprosessen er proteinene denaturert i fortynnet eddiksyre og deretter er preparatene tørket og farget i Amidoschwartz 10 B. Mønsteret som representerer proteinene slik de kommer fram som

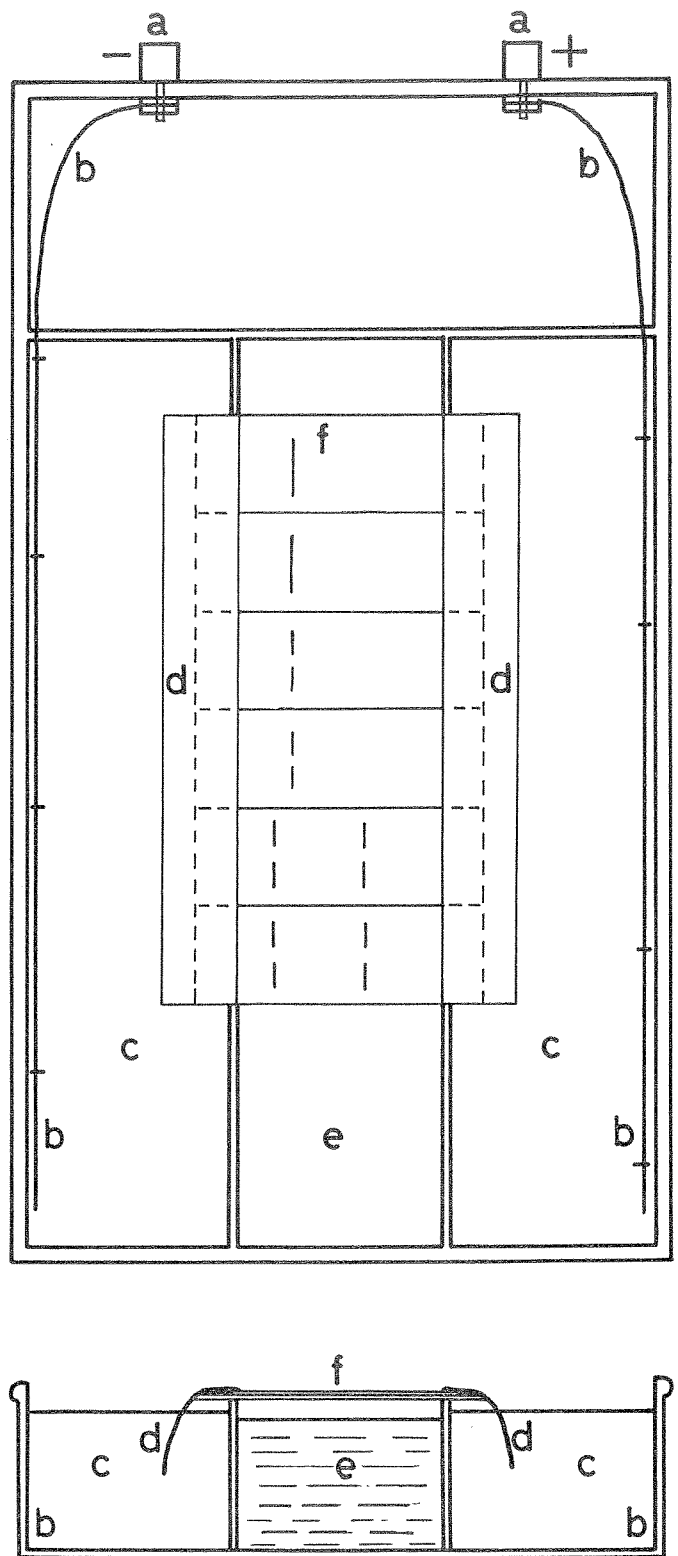


Fig. 1. Apparat for elektroforese, sett ovenfra og i tverrsnitt. a kontaktpunkter, b elektroder av platina, c buffer, d filterpapir e is, f objektglass med gel.

Electrophoretic apparatus, seen from above and in section. a electrode connections, b electrodes, c buffer solution, d filter paper, e ice, f microscopic slides with gel.

blåfargete band på objektglassene etter farging, er kalt *elektroforetogram*, og en skjematisk tegning av disse er benyttet ved beskrivelsen.

For å undersøke hvilke proteiner som er jernbindende er nyttet såkalt autoradiografi som først ble brukt for humanserum av GIBLETT, HICKMAN og SMITHIES (1959). Radioaktivt jern (Fe^{59}) i form av 0,1 ml ferroklorid (ca. $10 \mu C$) er tilsatt like mengder serum. Serum ble analysert som vanlig, preparatene farget og tørket, og deretter holdt i kontakt med en røntgenfilm i to døgn i mørkerom. Filmen ble så framkalt og fiksert. Det radioaktive jernet svertet røntgenfilmen, og stedet hvor svertingen forekom, markerte de proteinene som hadde tatt opp jern. Transferinene kunne derfor identifiseres ved å sammenlikne banda på preparatene med svertingen av filmen.

Oppbevaring av materialet er en vesentlig faktor ved analyser i større omfang. SICK (1961) fant at torskhemoglobiner ikke tålte frysing. Også hemoglobinene fra de fiskeartene vi har undersøkt, blir ødelagt ved frysning, og må i likhet med torskens hemoglobiner analyseres innen seks dager etter at prøvene er tatt. For å undersøke hvordan serumproteinene hos fisk forholder seg i denne forbindelsen, har vi gjort en del parallellforsøk med ferskt og frosset materiale. Proteinene tåler innfrysing, men ferskt materiale gir klarere resultat enn materiale som har ligget nedfrosset en tid.

Resultater

Torsk

Hemoglobintyper. SICK (1961) har ved elektroforese i agargel ved pH 7,2 påvist tre forskjellige mønstre av torskhemoglobiner, fig. 2. Mønstrene består av i alt fem forskjellige band. Nærmest startpunktet finner en i alle prøvene et svakt band (kalt Hb II). Lenger ute kan individene enten ha ett eller begge av to kraftige bånd HbI-1 og HbI-2. De tre typer av mønstre er kalt HbI-1, HbI-1-2 og HbI-2. Tett inntil båndene HbI-1 og HbI-2, men noe lenger ute, ligger to mindre kraftige bånd (HbI-1' og HbI-2'). I mønsteret HbI-1-2 er båndet HbI-2' sannsynligvis skjult av HbI-1.

De individuelle variasjonene i hemoglobinene hos torsk er lettest å forklare ved å forutsette at de er genetisk bestemt på en slik måte at syntesen av hvert av hemoglobinene blir kontrollert av et gen. Individuer med de doble band HbI-1 og HbI-2, skulle således være heterozygoter for to slike alleler, og individer med bare ett av proteinene HbI-1 eller HbI-2, skulle være homozygote for det genet som kontrollerer syntesen av dette proteinet. Hvis dette er

riktig, må en vente at individer med mønstrene HbI-1, HbI-1-2 og HbI-2 skal fordele seg i populasjonen i samsvar med Hardy-Weinbergs lov:

$$q^2 \text{HbI-1} : 2qp \text{HbI-1-2} : p^2 \text{HbI-2}$$

I uttrykket er q og p genfrekvensene for genene som henholdsvis kontrollerer dannelsen av båndet HbI-1 og HbI-2.

En kan lett beregne genfrekvensene ut fra fordelingen av antall homozygoter og hetrozygoter. I vårt tilfelle vil vi kunne beregne genfrekvensen q slik:

$$q = \frac{2 n_{\text{HbI-1}} + n_{\text{HbI-1-2}}}{2 n}$$

I uttrykket er $n_{\text{HbI-1}}$ antall individer med mønstertypen HbI-1, $n_{\text{HbI-1-2}}$ antall individer med mønster-

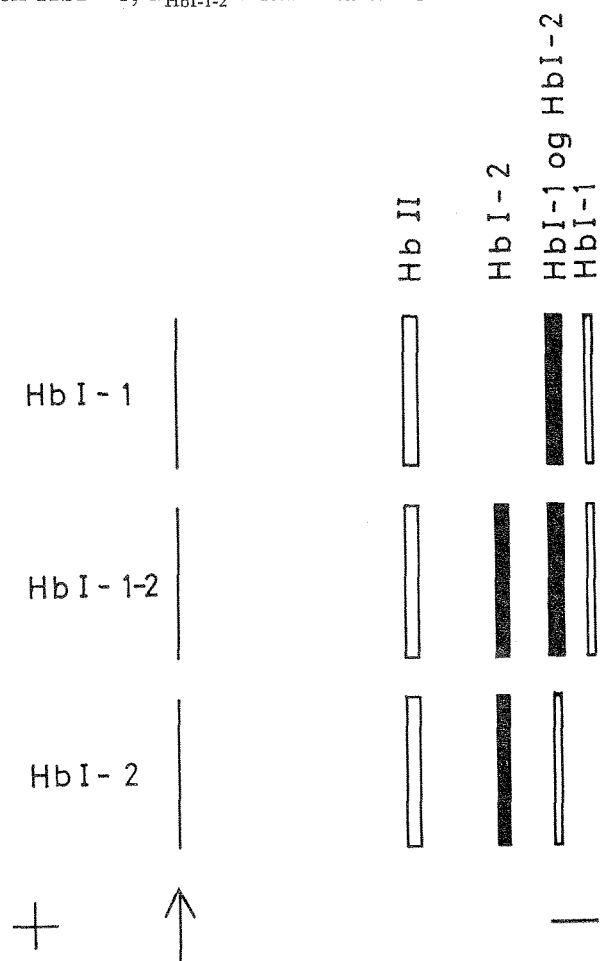


Fig. 2. Elektroforetogrammer av torskhemoglobin fra tre individer som hver representerer en hemoglobintype. Tegnforklaring for denne og påfølgende figurer: Utfylte felt: sterke bånd, åpne felt: middelsterke bånd, enkle streker: svake bånd og skråråkraving: diffust fargete områder. Pilen markerer startpunktet.

Electrophoretograms from three individual cod hemoglobins each representing a hemoglobin type. Legend in this and the following figures: Filled in bars: strong bands, open bars: moderately strong bands, single lines: faint bands, cross hatched: diffuse stained areas. Arrow indicate the point of application.

Tabell 2. Hemoglobintyper hos torsk, fordeling og frekvenser. n_{obs} = observert antall, n_{exp} = forventet antall i henhold til Hardy-Weinbergs lov.

Hemoglobin types in cod, distribution and frequencies. n_{obs} = observed number, n_{exp} = expected number according to Hardy-Weinberg law.

Innsamlingsdato <i>Date of sampling</i>	Lokalitet <i>Locality</i>		Hemoglobintyper			Total	Genfrekvens av HbI ¹ <i>Frequency of HbI¹</i>
			HbI-1	HbI-1-2	HbI-2		
			<i>Hemoglobin types</i>				
			<i>HbI-1</i>	<i>HbI-1-2</i>	<i>HbI-2</i>		
10.12.65	Arendal	n_{obs}	41	44	15	100	.630
		n_{exp}	40	47	14		
18.12.64	Bergen	n_{obs}	28	46	25	99	.515
		n_{exp}	26	49	23		
30.1.64	Altafjorden	n_{obs}	3	35	57	95	.216
		n_{exp}	4	32	58		
5.11.64	Tanafjorden	n_{obs}	3	23	92	118	.123
		n_{exp}	2	25	91		

typen HbI-1-2 og n er totalantallet av individer i prøveserien. Da genfrekvensene blir beregnet på grunnlag av et begrenset antall individer, må vi regne med at de avviker en del fra de virkelige genfrekvensene som eksisterer i populasjonen prøvene er tatt fra. Men fordi de virkelige genfrekvensene er ukjente, må en bruke de observerte genfrekvensene som erstatning for de virkelige ved innsetting i Hardy-Weinbergs lov.

Fordelingen av de tre hemoglobinmønstrene i fire prøveserier fra norskekysten er gitt i tabell 2.

Forutsatt at de individuelle variasjonene som er funnet i hemoglobinene hos torsk, er kontrollert av to alleler (kalt Hb¹ og Hb²) som har samme mulighet for å komme til uttrykk når de er tilstede i et individ (*co-dominant gener*), er observerte genfrekvenser beregnet og gitt til høyre i tabellen. På grunnlag av

de observerte genfrekvensene er teoretisk fordeling av de tre hemoglobinmønstrene beregnet i linje merket n_{exp} i samme tabell.

Av tabellen går det frem at det er god overensstemmelse mellom observert og forventet fordeling i henhold til Hardy-Weinbergs lov. Dette styrker i høy grad antakelsen om at hemoglobintypene hos torsk er kontrollert av to alleler. Vi har fått bekrefteelse på dette ved å analysere 10 000 torsk fra Norskekysten og Barentshavet delvis i samarbeid med Genetisk Institutt, Universitetet i København (MØLLER og SICK 1963, FRYDENBERG *et al.* 1965). Genfrekvensene varierer fra område til område, men det er alltid god overensstemmelse med Hardy-Weinbergs lov hvor dette kan forventes.

Transferrintyper. Fig. 3 viser ti forskjellige mønstre som er funnet ved kombinert stivelse og agar-gel

Tabell 3. Transferrintyper hos torsk. Fordeling og frekvenser. Kolonnen «Ikke rep.»: Summen av forventete typer som ikke er representert.

Transferrin groups in cod. Distribution and gene frequencies. The column «Not rep.»: The expected totals of not-represented types.

Innsamlingsdato <i>Date of sampling</i>	Lokalitet <i>Locality</i>		Transferrintyper											Ikke rep. <i>Not rep.</i>	Total	Genfrekvenser				
			<i>Transferrin groups</i>													<i>Gene frequencies</i>				
			AA	AB	AC	AD	BB	BC	BD	CC	CD	DD	C ¹ C			q _A	q _B	q _C	q _D	q _{C¹}
4.12.64	Smøla	n_{obs}		1	7		1	23	1	63	3		1		100	.04	.14	.80	.02	.01
		n_{exp}	0,2	1.1	6.4	0.2	1.8	21.6	0.5	64.0	3.2	0.0	0.8	0.2						
1.12.64	Helgeland	n_{obs}		4	14		2	26		48	2		2		98	.09	.17	.71	.01	.01
		n_{exp}	0.8	3.1	12.9	0.2	3.0	24.3	0.4	50.0	1.4	0.0	1.4	0.6						
1.11.64	Varangerfj.	n_{obs}		1	12		2	15		49	2				83	.10	.12	.77	.01	
		n_{exp}	0.9	2.0	13.0	0.2	1.2	15.3	0.2	48.6	1.5	0.0								
19.11.64	Bjørnøya	n_{obs}		5	29		2	6	27	3	63	7	1		148	.16	.16	.64	.05	
		n_{exp}	3.6	7.3	29.4	2.2	3.7	30.0	2.2	60.3	8.9	0.3								

elektroforese ved pH 9,0 (trisbuffer) av serumproteiner hos torsk. Alle mønstrene har en hurtig vandrende komponent (albumin) som i alminnelighen når frem til filtrerpapiret (overgangen mellom objekt glass og buffer) i løpet av elektroforesen. Noen proteiner som beveger seg saktere, kan også sees som et eller to svakere bånd. Mønstrene som vi har studert nærmere, ligger nærmest startpunktet og består av fem bånd kalt A, B, C₁, C og D, idet A er den hurtigste komponenten av de fem. Alle serumprøver av torsk som vi har analysert, inneholder enten ett eller to av disse båndene. A, B, C og D har vi funnet alene, dessuten A sammen med B, C og D, B sammen med C og D, og C sammen med C₁ og D. Mønstrene har vi gitt navn etter de bånd de består av. Består mønstret bare av ett bånd, har vi kalt mønstret med A for AA, B for BB osv. Ved hjelp av radioaktivt jern har en vist at båndene A, B, C og D er forskjellige typer av transferriner. Da båndet C₁ finnes meget sjelden, har en ikke fått undersøkt dette båndet nærmere, men båndets beliggenhet og intensitet er svært lik de andre, så vi har gått ut i fra at også dette båndet er et transferrin.

Hvis vi forutsetter at fem likeverdige alleler, kalt Tf^A, Tf^B, Tf^{C1}, Tf^C og Tf^D har kontrollert dannelsen av transferrintypene hos torsk, så vil homozygotene Tf^ATf^A, Tf^BTf^B, Tf^{C1}Tf^{C1}, Tf^CTf^C og Tf^DTf^D gi mønstrene AA, BB, C₁C₁, CC og DD, og heterozygotene Tf^ATf^B, Tf^ATf^{C1}, Tf^ATf^C, Tf^ATf^D, Tf^BTf^{C1}, Tf^BTf^C, Tf^BTf^D, Tf^{C1}Tf^C, Tf^{C1}Tf^D og Tf^CTf^D vil gi mønstrene AB, AC₁, AC, AD, BC₁, BC, BD, C₁C, C₁D og CD. I tabell 3 presenteres resultatene fra 6 prøveserier fra forskjellige steder på kysten. Genfrekvensene er regnet ut på tilsvarende måte som frekvensene for hemoglobingenene, bare at en her må regne med flere heterozygoter. Hardy-Weinbergs lov som gjelder uansett antall gener i allelsystemet, vil da se slik ut:

$$q_A^2 AA : 2q_A q_B AB : 2q_A q_{C_1} AC_1 : 2q_A q_C AC : 2q_A q_D AD : \\ q_B^2 BB : 2q_B q_{C_1} BC_1 : 2q_B q_C BC : 2q_B q_D BD : q_{C_1}^2 C_1 C_1 : \\ 2q_{C_1} q_C C_1 C : 2q_{C_1} q_D C_1 D : q_C^2 CC : 2q_C q_D CD : q_D^2 DD$$

q_A, q_B etc. er genfrekvensene for henholdsvis Tf^A, Tf^B etc. Som det fremgår av tabellen er det god overensstemmelse mellom observert og ventet fordeling av transferrintypene i de forskjellige individgruppene. Transferrinmønstrene hos torsk er altså arvelige.

L y r, *G. pollachius*

Bare et fåtall hemoglobinprøver er analysert av denne arten. Individuelle variasjoner er ikke funnet, idet alle de undersøkte prøvene likner torskens HbI-1.

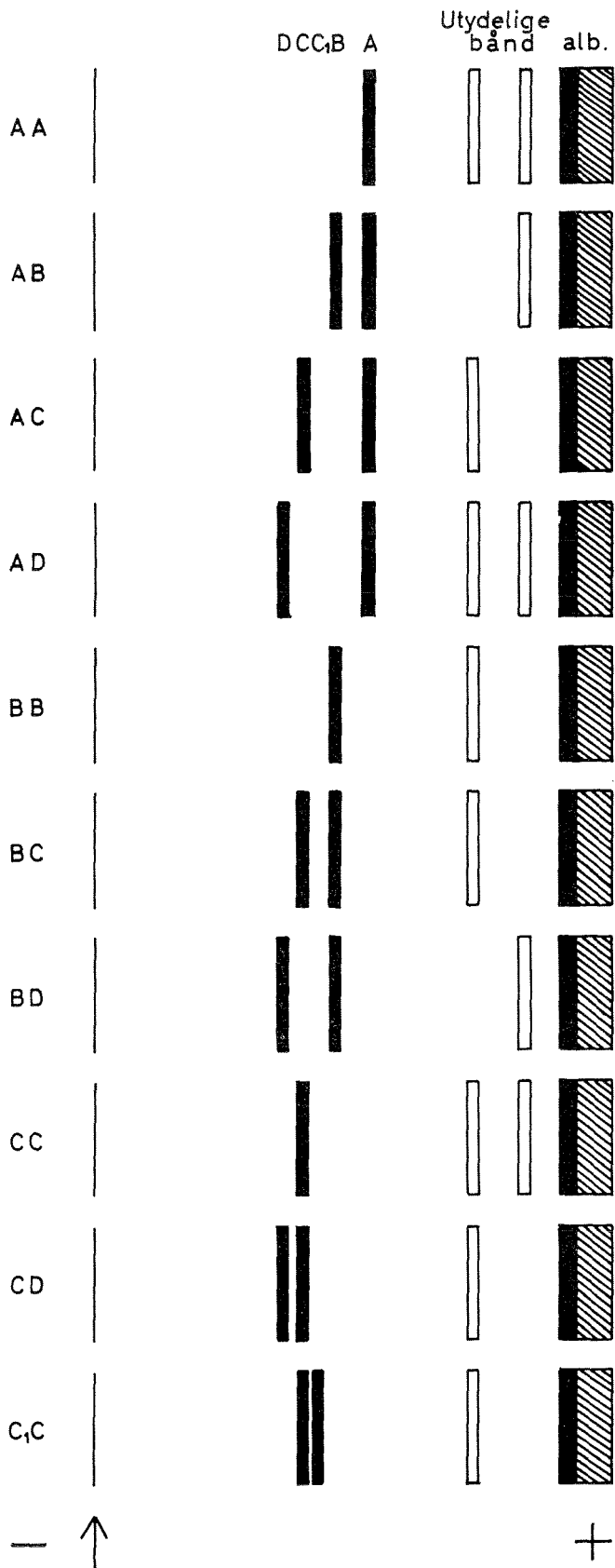


Fig. 3. Elektroforetogrammer av torskesera fra 10 individer som hver representerer en transferrintype. Tegnforklaring som fig. 2. *Electrophoretograms from ten individual cod sera each representing a transferrin group. Legend: Fig. 2.*

Tabell 4. Transferrintyper hos lyr, fordeling og frekvenser.
Transferrin groups in pollack, distribution and frequencies.

		Transferrintyper <i>Transferrin groups</i>			Total	Grefrekvenser <i>Gene frequencies</i>	
		AA	AB	BB		q _A	q _B
Hordaland juli-aug 65	<i>n</i> _{obs}	2	18	55	75	0.1467	0.8533
	<i>n</i> _{exp}	1.6	18.8	54.6	75.0		

Elektroforetogrammet av lyrserum er karakterisert ved få bånd. Foruten albuminene kan det skilles mellom maksimalt fem fraksjoner.

Tre individuelle elektroforetogrammer er vist skjematisk i fig. 4. Fraksjonene er merket med romertall. Nærmest startpunktet finnes et svakt bånd (I). I noen preparater synes det å forekomme individuelle variasjoner her, men denne fraksjonen er for svak til at dette kan avgjøres med den brukte metode.

Noe større mobilitet har to bånd (II og III) som tydelig varierer individuelt, idet begge to eller bare ett av dem finnes hos den enkelte fisk. På grunnlag av disse fraksjonene kan en derfor dele fiskene inn i tre grupper (representert i fig. 4). Autoradiografien har vist at disse proteinene binder jern. De er altså transferriner og blir i det følgende kalt Tf A og Tf B slik at førstnevnte har større mobilitet mot anoden, og gruppene benevnes AA, AB og BB. Fordelingen av disse transferrintypene i en prøveserie fra Hordaland er gitt i tabell 4, første linje.

Bånd IV, som har enda noe større mobilitet mot

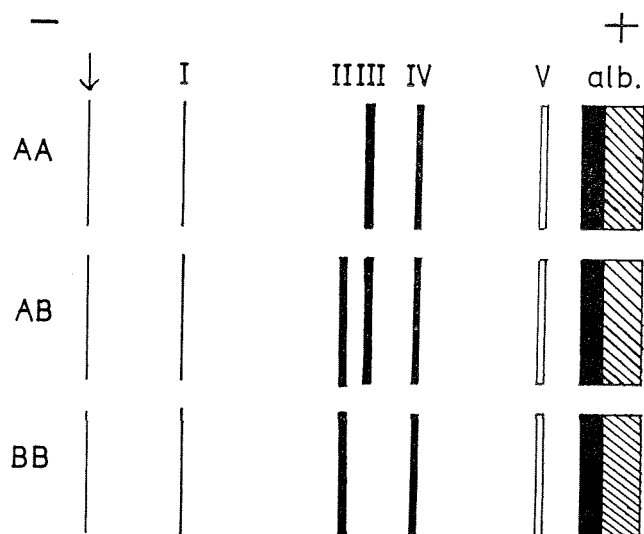


Fig. 4. Elektroforetogrammer av serum av tre individer av lyr som hver representerer en transferrintype. Tegnforklaring se Fig. 2.

Electrophoretograms from three individual pollack sera each representing a transferrin group. Legend: Fig. 2.

anoden, synes å være konstant. Det samme gjelder det svake båndet V som ligger nær albuminene og som ofte er vanskelig å skille fra dem.

Forutsatt at de individuelle variasjonene som er funnet i transferrinene hos lyr er kontrollert av to co-dominante alleler, er observerte genfrekvenser bereknet og gitt til høyre i tabell 4. Disse genene er kalt Tf^A og Tf^B. På grunnlag av de observerte genfrekvensene er teoretisk fordeling av de tre transferrintypene bereknet i linje merket *n*_{exp} i samme tabell.

Av tabellen går det frem at det er god overensstemmelse mellom observert og forventet fordeling i henhold til Hardy-Weinbergs lov. Dette styrker i høy grad antakelsen om at transferrinene hos lyr er kontrollert av to co-dominante alleler. En videre bekreftelse på dette kan en få ved å analysere et større materiale, men ut fra den gode overensstemmelsen med Hardy-Weinbergs lov i denne prøveserien, sammen med det en vet om nedarvingen for transferriner hos andre arter, er det meget stor sannsynlighet for at transferrintypene hos lyr er arvelig kontrollert.

Sei, *G. virens*

I alt 180 hemoglobinprøver er analysert. Et tilsvarende system som hos torsk er ikke funnet, idet de aller fleste prøvene har gitt samme resultat (tilsvarende omtrent torskens HbI—1). Bare i et enkelt tilfelle er det funnet en sei med avvikende hemoglobintype, nemlig en som likner torskens HbI—1—2.

Elektroforetogrammet av seiserum likner mye på tilsvarende elektroforetogram for serum av lyr. Fig. 5 viser to individuelle mønstre. Bånd I tilsvarende fraksjonen med samme nummer hos lyr, men har noe

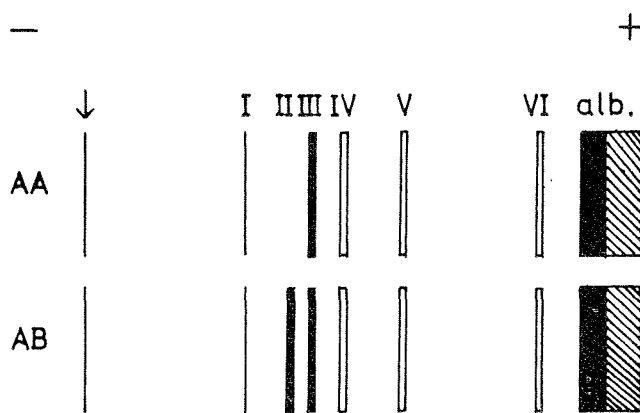


Fig. 5. Elektroforetogrammer av serum av to individer av sei som hver representerer en transferrintype. Tegnforklaring som i Fig. 2.

Electrophoretograms from two individual coalfish sera each representing a transferrin group. Legend: Fig. 2.

større mobilitet. Det samme gjelder II og III som varierer individuelt. I motsetning til forholdet hos lyr er det proteinet som har størst mobilitet (III), vanligst i de undersøkte prøvene av sei, og bånd II alene er ikke funnet hos et eneste av de undersøkte individene. En kan altså bare dele seiindividene inn i to grupper på grunnlag av disse fraksjonene, som også hos sei binder jern. Proteinene benevnes Tf A og Tf B og gruppene kalles transferrintyper (AA og AB). Fordelingen av transferrintypene i de prøvene en har undersøkt, er vist i tabell 5 (i linjene merket n_{obs}).

Bånd IV varierer en del i styrke, men finns trolig hos alle individene. Dette båndet kan vanskelig parallelliseres med noen fraksjoner i lyrserum. Derimot kan bånd V og VI, som begge synes å være konstante, lett sammenliknes med IV og V hos lyr.

Også for sei har en antatt at to co-dominante alleler kontrollerer transferrinene. Bare to transferrintyper er funnet hos denne arten, og av disse er den ene (AB) antatt å være heterozygoten og den andre (AA) den ene homozygoten. I tabell 5 er beregnet observerte genfrekvenser for hver enkelt prøveserie og forventet fordeling i følge Hardy-Weinbergs lov. Når det gjelder den hypotetiske homozygoten (BB), som ikke er funnet, så går det fram av tabellen at dersom hypotesen om et to-allel system er riktig, så er det svært liten sjanse for å finne den. Alt i alt er overensstemmelsen mellom observert og forventet fordeling meget god, og det er overveiende sannsynlig at transferrintypene hos sei er arvelig bestemt på samme måte som for lyr.

Tabell 5. Transferrintyper hos sei. Fordeling i tre prøveserier fra Vestlandet.

Transferrin groups in coalfish. Distribution in three samples from Western Norway.

		Transferrintyper			Total	Genfrekvenser	
		Transferrin groups				Gene frequencies	
		AA	AB	BB (exp.)		q_A	q_B
Rogaland sept. 1965	n_{obs}	57	0	0	57	1.0000	—
Hordaland sept. 1965	n_{obs}	97	3	0	100	0.9850	0.0150
Nordmøre sept. 1965	n_{obs}	108	3	0	111	0.9865	0.0135
Total	n_{obs}	262	6	0	268	0.9888	0.0112
	n_{exp}	262.03	5.94	0.03			

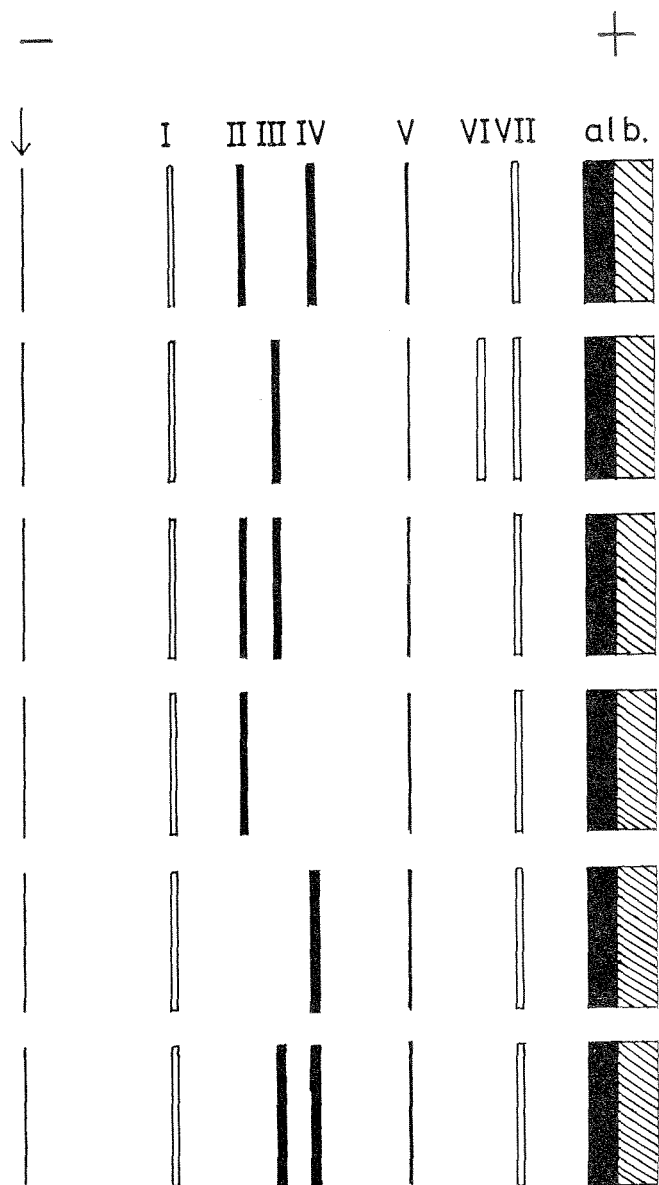


Fig. 6. Elektroforetogrammer av serum av seks individer av hyse som hver representerer en serumtype. Tegnforklaring som i Fig. 1.

Electrophoretograms from six individual haddock sera each representing a serum group. Legend: Fig. 1.

Hyse, *G. aeglefinus*

Av 220 hemoglobinprøver som er analysert, er funnet to som likner torskens HbI—1—2, mens alle de andre også her likner torskens HbI—1. En antar at de avvikende hemoglobinene både for sei og hyse er arvelig kontrollert, men de er for sjeldne til at dette kan undersøkes v.h.a. Hardy-Weinbergs lov, og de er også altfor sjeldne til å brukes i populasjonsundersøkelser, dersom de da ikke skulle være vanligere i populasjoner som en ennå ikke har hatt prøver fra.

Elektroforetogrammene av hyseserum tilsvarer i

store trekk tilsvarende mønster for lyr og sei, men er karakterisert ved at de er mere kompliserte, og individuelle variasjoner forekommer i langt større grad.

Seks individuelle elektroforetogrammer er vist skjematisk i fig. 6. Bånd I, som synes å være konstant, kan sammenliknes med tilsvarende bånd for lyr. Bånd II, III og IV varierer mellom individene. Ett eller to av disse finns alltid, og på dette grunnlag kan en derfor dele individene inn i de seks hovedtypene som er representert i figuren. Sammenlikning med lyr og sei (og også med torsk) taler for at disse proteinene er transferriner, men dette er ikke undersøkt for hyse. Inndeling i grupper er likevel ikke så enkelt som for lyr og sei. Hos en del individer opptrer fraksjonene med ulik styrke, og av og til forekommer småfraksjoner både framfor IV og bak II. En fullstendig og entydig inndeling av de 116 prøvene en har analysert basert på fraksjonene II, III og IV har en derfor ikke kunnet gjøre ennå.

Bånd V kan sammenliknes med lyrens bånd IV, men er svakere. I bånd VI og VII forekommer også individuelle variasjoner, idet begge eller (oftest) bare VII forekommer hos de enkelte individer. Etter 1½ time analysetid blir disse båndene for svake og diffuse for entydig bestemmelse, men ved å avbryte elektroforeseprosessen etter kortere tid, kan en gruppere individene på grunnlag av disse fraksjonene.

Albuminene er tegnet identiske i fig. 6. Individuelle variasjoner synes imidlertid også å forekomme i disse proteinene hos hyse. Men det ser ikke ut til at teknikken som er brukt passer særlig bra for undersøkelse av albuminer, og skal dette studeres nærmere, er det således nødvendig med tekniske modifikasjoner.

Da en ikke har vært i stand til å gjennomføre en entydig gruppeinndeling av hyseprøvene på grunnlag av variasjonene i serumproteinene, kan en foreløpig heller ikke si noe om hvorvidt disse variasjonene er arvelig kontrollert. Nedarvingsmåten ser eventuelt ut til å være mere komplisert enn hva tilfellet er for de andre artene som er undersøkt.

Kviting, *G. merlangus*

Tre arvelig kontrollerte hemoglobintyper hos kviting ble funnet samtidig som for torsk (SICK 1961) i prøver fra danske farvann og fra Nordsjøen. Vi har undersøkt en prøveserie på 102 individer fra Altafjorden, og disse prøvene var alle bare av en type. Det ser altså ut til at kvitingen ved nordgrensen for sin utbredelse bare har en hemoglobintype, og dette vil en forsøke å bekrefte og muligens finne årsaken til ved senere analyser.

Tabell 6. Transferrintyper hos kviting.
Fordeling og frekvenser.
Transferrin groups in whiting. Distribution and frequencies.

		Transferrintyper			Total	Gen- frekvenser	
		<i>Transferrin groups</i>				<i>Gene frequencies</i>	
		AA	AB	BB		q _A	q _B
Hordaland sept.-okt. 1965	<i>n</i> _{obs}	1	8	35	44	0.1136	0.8864
	<i>n</i> _{exp}	0.6	8.9	34.6	44.1		
Altafjorden okt. 1965	<i>n</i> _{obs}	1	13	58	72	0.1042	0.8958
	<i>n</i> _{exp}	0.8	13.4	57.8	72.0		

Også elektroforetogrammene av kvitingserum er karakterisert av få bånd. De tydeligste individuelle variasjonene forekommer i fraksjonene som i fig. 7 er kalt I og II, og som gir grunnlag for inndeling av individene i tre grupper (fenotyper), slik som vist i figuren. Autoradiografi-forsøk har vist at disse båndene representerer transferriner, og de blir derfor kalt Tf A og Tf B slik at førstnevnte har størst mobilitet mot anoden. Fenotypene blir kalt transferrintype AA, AB og BB. På grunn av at disse transferrinene har en elektroforetisk mobilitet som omtrent tilsvarer mobiliteten for hemoglobinene, vil selv små mengder av hemoglobiner i serum forstyrre avlesningen av transferrintypene. For denne arten må en derfor unngå prøver som viser tegn til hemolyse ved analyse av serumproteinene.

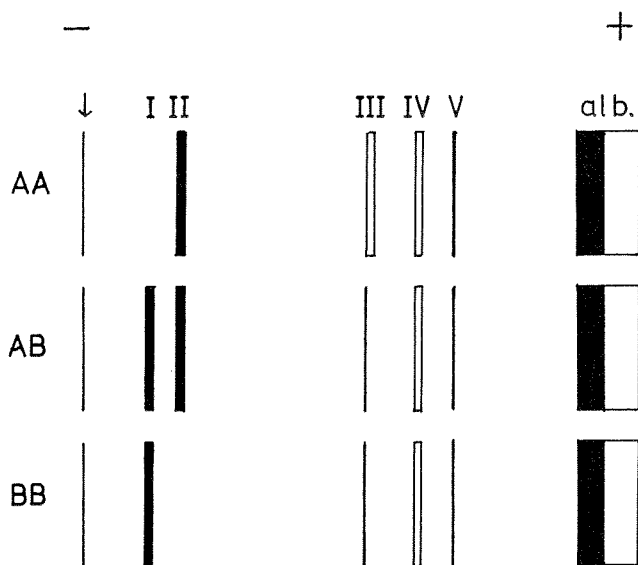


Fig. 7. Elektroforetogrammer av serum av tre individer av kviting som hver representerer en transferrintype. Tegnfor-
klaring som i Fig. 2.

Electrophoretograms from three individual whiting sera each representing a transferrin group. Legend: Fig. 2.

Fordelingen av transferrintypene hos kviting fra to prøveserier er gitt i tabell 6 (i linjene merket n_{obs}).

Variasjonene i transferrinene hos kviting kan lett forklares på tilsvarende måte som for lyr og sei. Idet en antar at Tf A og Tf B er kontrollert av et genpar (kalt henholdsvis Tf^A og Tf^B), er det i tabell 6 reknet ut genfrekvenser og forventet fordeling i følge Hardy-Weinbergs lov. Av tabellen ser en at det er meget god overensstemmelse mellom observert og forventet fordeling, og det ser altså ut til at transferrintypene også hos kviting er arvelig kontrollert.

En nærmere beskrivelse av serum-typene hos lyr, sei og kviting er under trykning (MØLLER og NÆVDAL 1966).

Sild, *Clupea harengus*, og brisling, *C. sprattus*

Høsten 1965 startet undersøkelser over hemoglobiner og serumproteiner hos sild og brisling. Også her er funnet hemoglobinvariasjoner, og noen av hemoglobintypene hos brisling er vist i fig. 8. Hos sild er funnet tilsvarende typer. Hemoglobintypene hos disse artene er likevel vanskelig å forklare, og det er i hvert fall tydelig at det ikke er så enkelt som hos torsk. En håper å få avklart dette når en har fått analysert et noe større antall prøver, men foreløpig tør en anta at variasjonene også hos disse artene er arvelig kontrollert, selv om en ikke kan se bort fra variasjoner med alder og kjønnsmodning, slik tilfellet er med laks (KOCH, EVANS og BERGSTRØM 1964).

Individuelle variasjoner forekommer i stor utstrekning i serumproteinene hos sild. Særlig tydelige har disse variasjonene vist seg å være i de fraksjonene som ved autoradiografiforsøk er påvist å være transferriner. Tre transferrintyper er funnet, og det er god grunn til å anta at dette er de to homozygotene og heterozygoten som er produktet av et genetisk toallelsystem. Dette vil en arbeide videre med. Også i andre serumproteiner forekommer det individuelle variasjoner. Disse proteinene forekommer i mindre konsentrasjon, og gir dermed svakere bånd på elektroforetogrammene, men en har håp om å få dem fram så tydelig at de også kan nyttes i populasjonsundersøkelser.

Brisling har også individuelt varierende serumproteiner. På denne arten er ikke utført noen autoradiografi-forsøk, men ved sammenlikning med de andre artene er det nærliggende å tro at også dette er transferriner. Tre typer er også her vanlige, og dessuten forekommer det noen til. Materialet er foreløpig for sparsomt til at en kan si noe mere om dette, men det vil bli undersøkt nærmere i 1966.

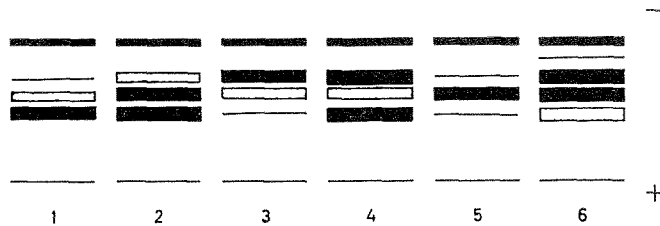


Fig. 8. Hemoglobintyper hos brisling representert som seks forskjellige elektroforetogrammer. Tegnforklaring som i Fig. 2. Hemoglobin types in sprat represented by six different electrophoretograms. Legend: Fig. 2.

Andre fiskearter

Hemoglobiner av gullflyndre, *Pleuronectes platessa*, er undersøkt av SICK, FRYDENBERG og NIELSEN (1963), men ingen variasjoner er funnet i danske farvann. Vi har undersøkt en prøveserie på 120 enkeltprøver fra Møre og funnet det samme mønster som danskene fant, og det ser altså ut til at gullflyndre er konstant med hensyn til hemoglobinene også i norske farvann.

Vi har også undersøkt en del serumprøver av gullflyndre. Hos denne arten er det funnet et komplisert system av individuelle variasjoner, men på liknende måte som for hyse har en ennå ikke kunnet foreta en entydig gruppeinndeling, og følgelig har en heller ikke kunnet gi noe arvelighetsbevis.

Hos makrell, *Scomber scombrus*, finns det tre hemoglobintyper som synes å være kontrollert av to alleler tilsvarende som hos torsk, men de undersøkte prøvene er foreløpig for få (ca. 50) til at dette kan avgjøres med sikkerhet.

Selarter

Hemoglobiner. I alt 609 hemoglobinprøver av grønlandssel, *Pagophilus groenlandicus*, 17 av snadd, *Pusa hispida*, 46 av storkobbe, *Erignathus barbatus* og 412 av klappmyss, *Cystophora cristata*, er undersøkt. For selhemoglobinene er nyttet samme metode (stivelse/agar-gel, pH 9,0) som for serum, da pattedyrhemoglobiner som regel ikke tåler så lave pH som er benyttet for fiskehemoglobiner (pH 7,2).

De aller fleste prøvene, uansett art og lokalitet, har gitt nøyaktig det samme resultat (NÆVDAL 1966 a og b). Ved elektroforesen deles hemoglobinene i en stor fraksjon (kalt hem A) som vandrer mot anoden, og en liten fraksjon (kalt hem A₂) som vandrer mot katoden. Det normale mønster er vist i fig. 9 b. Bare tre grønlandssel og ingen av de andre artene har hatt hemoglobiner som avviker fra dette mønsteret. De tre grønlandssel har hver en komponent i tillegg til de normale hem A og hem A₂. Disse hemoglobinene

er kalt hem B, C og D i den rekkefølge de ble oppdaget. Hem B og C er omtrent av samme styrke som hem A, mens hem D er svakere og tilsvarer omtrent hem A₂. Disse mønstre er vist skjematisk i fig. 9a, c og d.

Ved sammenlikning med det en vet om hemoglobintyper hos andre arter, m.a. mennesket, er det nærliggende å anta at de avvikende hemoglobinnene (spesielt hem B og C) er arvelig kontrollert, selv om de er altfor få til at en kan prøve overensstemmelsen med Hardy-Weinbergs lov. Men på samme måte som for sei og hyse er de avvikende hemoglobinnene hos grønlandssel altfor sjeldne til å brukes i populasjonsundersøkelsene.

Serumproteiner. Det er analysert 554 sera av grønlandssel, 15 av snadd, 40 av storkobbe og 416 av klappmyss, alle i kombinert stivelse-/agar-gel ved pH 9,0. En del av dette materialet er dessuten analysert i agar-gel ved pH 6,3. En beskrivelse av resultatene av analysene av de forskjellige selsera er nå under trykking (NÆVDAL 1966 a).

Også hver av selartene gir forskjellige og karakteristiske mønstre av bånd på elektroforetogrammene, og individuelle forskjeller eksisterer også her i stor utstrekning. En har ikke kunnet undersøke om alle disse er arvelig kontrollert, men for en del er dette tilfellet. Særlig tydelig er variasjonene i transferrinene hos grønlandssel. Tre transferriner (kalt Tf A, Tf B og Tf C) er funnet (NÆVDAL 1966 b), og hver av

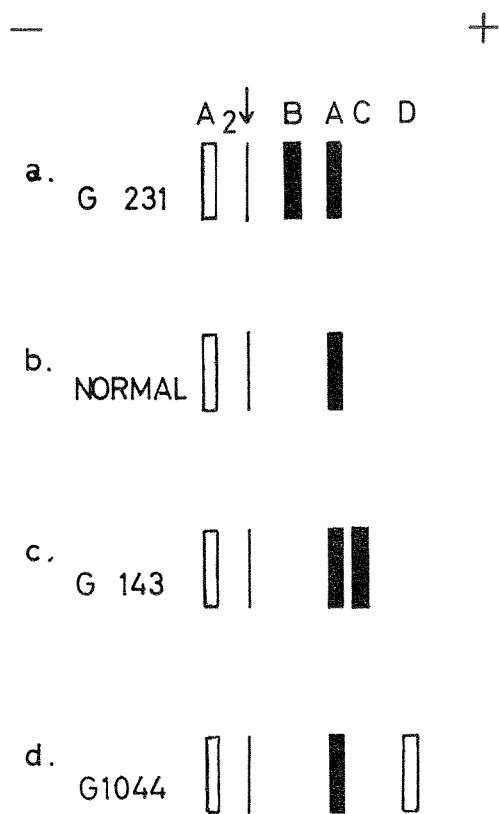


Fig. 9. Hemoglobintyper hos grønlandssel representert som fire forskjellige elektroforetogrammer. Tegnforklaring som i Fig. 2. Hemoglobin types in harp seal represented by four different electroforetograms. Legend: Fig. 2.

Tabell 7. Transferrintyper hos grønlandssel. Fordeling og frekvenser. Transferrin groups in harp seals. Distribution and frequencies.

	Transferrintype Transferrin group												Total	Genefrekvenser Gene frequencies			χ^2	
	AA		AB		BB		AC		BC		CC			q _A	q _B	q _C		
	Antall No.	%	Antall No.	%	Antall No.	%	Antall No.	%	Antall No.	%	Antall No.	%						
a) Vestisen 1963																		
Jan Mayen 1)n _{obs}	18	13.8	46	35.4	41	31.5	8	6.2	16	12.3	1	0.8	130	0.3462	0.5539	0.1000	1.01	
Area 2)n _{exp}	15,6		49,8		39,9		9.0		14.5		1.3							
b) Austisen 1963																		
Barents 1)n _{obs}	11	10.7	35	34.0	38	36.9	7	6.8	10	9.7	2	1.9	103	0.3107	0.5874	0.1019	1.17	
Sea 2)n _{exp}	9.9		37.6		35.5		6.5		12.3		1.1							
c) « 1964																		
1)n _{obs}	0	0	13	81.3	2	12.5	0	0	0	0	1	6.3	16	0.4063	0.5313	0.0625		
2)n _{exp}	2.6		6.9		4.5		0.8		1.1		0.06							
d) Kvitsjøen 1963																		
White Sea 1)n _{obs}	18	17.3	40	38.5	32	30.8	7	6.7	7	6.7	0	0	104	0.3990	0.5337	0.0673	0.90	
2)n _{exp}	16.6		44.3		29.6		5.6		7.5		0.5							
e) Newfoundlandfeltet 1964																		
Newfoundland Area 1)n _{obs}	14	7.5	66	35.3	78	41.7	14	7.5	15	8.0	0	0	187	0.2888	0.6337	0.0775	3.12	
2)n _{exp}	15.6		68.4		75.1		8.4		18.4		1.1							

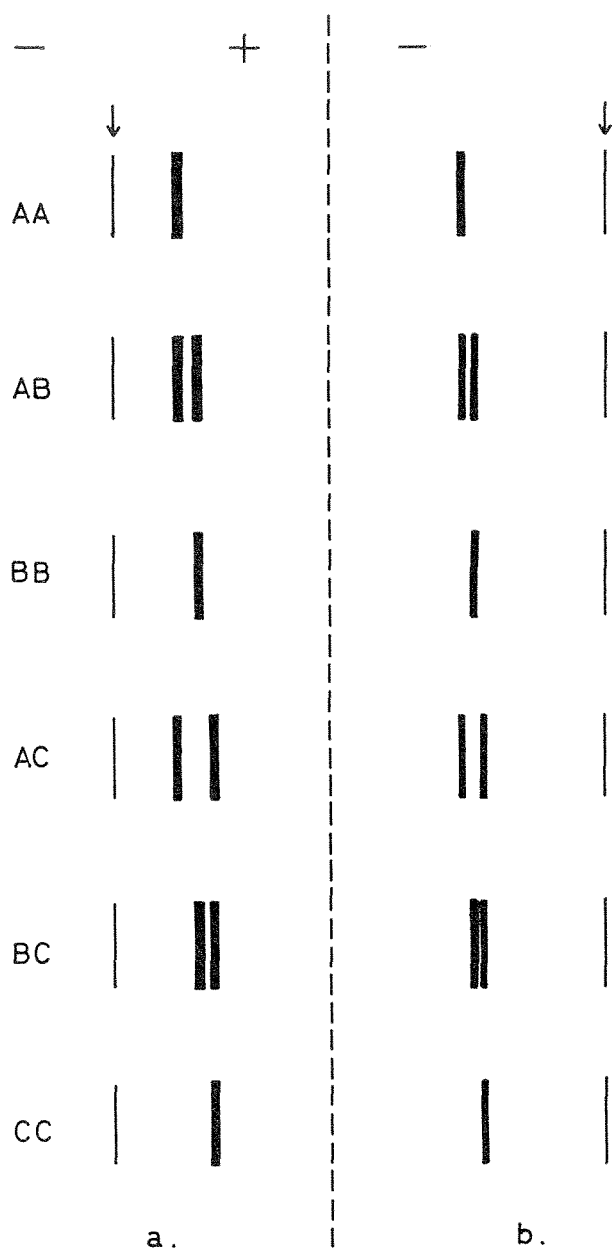


Fig. 10. Transferrintyper hos grønlandssæl.

a. Elektroforetogrammer ved bruk av kombinert stivelse/agar-gel og trisbuffer pH 9,0.

b. Tilsvarende elektrogrammer ved bruk av «Difco-agar» og fosfatbuffer pH 6,3.

Transferrin types in harp seal.

a. *Electrophoretograms by use of combined starch-/agargel and «tris-buffer» pH 9,0.*

b. *Corresponding electrophoretograms by use of «Difcoagar» and phosphat-buffer pH 6,3.*

disse kan forekomme alene eller to sammen i de enkelte sera. Seks kombinasjoner, som alle er funnet, er da mulig, og disse kalles AA, BB, CC, AB AC, og BC, der to like bokstaver står for enkle transferriner og to ulike bokstaver står for doble transferriner. I Fig. 10 a er transferrintypene vist skjematisk slik de kom-

mer fram i stivelse-/agar-gel ved pH 9,0, og i fig. 10 b i agar gel ved pH 6,3.

En har antatt at tre co-dominante gener, kalt Tf^A , Tf^B og Tf^C , kontrollerer oppbygningen av henholdsvis Tf A, Tf B og Tf C, slik at AA, BB og CC er antatt å være homozygotene og AB, AC og BC heterozygotene i dette systemet. Observert fordeling (n_{obs}) av transferrintypene sammen med forventet fordeling (n_{exp}) i de prøvene av grønlandssæl som er samlet, er gitt i tabell 7. Overensstemmelsen mellom observert og forventet fordeling er ganske god, og ikke i noe tilfelle er avvikene statistisk sikre. At hypotesen om et tre-allelsystem er riktig, understøttes videre av en del observasjoner av transferrintypene hos mødre med unge.

Også i noen proteiner som vandrer like bak albuminene («postalbuminer») er det funnet individuelle variasjoner hos grønlandssæl, men disse proteinene forekommer i så liten konsentrasjon at båndene blir for svake til at en kan gruppere individene entydig på dette grunnlag.

Hos snadd er funnet et liknende system som hos grønlandssæl. Materialet er for sparsomt til at en kan undersøke den genetiske bakgrunn for disse variasjonene, men mye taler for at det er et arvelig system av samme type som for grønlandssæl.

Variasjonene som er funnet hos storkobbe, er mindre tydelige. Hos denne arten ser det ut til å forekomme en variasjon i *haptoglobinene* (d.v.s. serumproteiner som kan binde hemoglobiner som hemoglobin/haptoglobin komplekser), og dessuten som hos grønlandssæl i postalbuminer, men ingen av disse er særlig tydelige, og da materialet er lite, har det ikke lyktes å gi forklaring på disse variasjonene.

For klappmyss er det funnet et komplisert bilde av individuelle variasjoner. Transferrinene varierer ikke hos denne arten. Derimot kan en skille ut tre typer (kalt II—II, II—III og III—III) i proteinene som ligger nærmest transferrinene. Dette er trolig de to homozygotene og heterozygoten i et genetisk to-allelsystem. Men typene er ikke så tydelige som når det gjelder transferrintypene hos grønlandssæl, og avlesningene har vanskelig for å bli helt objektive og entydige.

I hemoglobinbindende serumproteiner finns også kompliserte individuelle variasjoner. En har foreløpig ikke kunnet gi forklaring på disse variasjonene, men det synes som om de til en viss grad er avhengig av alderen. Dette er likevel ikke hele forklaringen, for de individuelle variasjonene finns også hos fullt utvoksne, kjønnsmodne dyr. En har foreløpig kommet til den konklusjon at det hos klappmyss forekommer individuelle arvelige variasjoner i haptoglobinene, men

disse variasjonene kommer først fullt ut til uttrykk hos voksne dyr. Et liknende forhold, er såvidt en vet, ikke kjent for andre arter. Skal en undersøke dette nærmere, må en ha et større materiale av voksne dyr, spesielt fra Vestisen og Danmarksstredet.

IDENTIFIKASJON AV POPULASJONER

GENERELT

En kan dele individer inn i grupper etter forskjellige særpreg ved idividene, men en kan også skille grupper av individer fra hverandre ved særpreg som er karakteristisk for de forskjellige gruppene. Genfrekvensen karakteriserer ikke de enkelte individene innen en gruppe, men er karakteristisk for selve gruppen.

Har to populasjoner forskjellige frekvenser for samme gen, er dette en konkret forskjell mellom de to populasjonene, og det må ha sin årsak i at individer fra de to populasjonene ikke forplanter seg med hverandre, eller hvis avkom dannes, at dette ikke er forplantningsdyktig.

Skal en prøve å identifisere populasjoner innen en art ved hjelp av genfrekvensen, må denne kartlegges innen artens utbredelsesområde. Er området stort og individene jevnt fordelt, vil sannsynligvis frekvensen kunne forandre seg jevnt med stigende avstand mellom innsamlingsstedene da muligheten for forplantning mellom to individer vil minske med stigende avstand. En trinnvis forandring av frekvensen vil derimot avdekke grensene mellom populasjonene.

TORSK

I 1964 og -65 har vi samlet og analysert 4300 individer fra 28 lokaliteter med hensyn på otolitt-, hemoglobin-, transferrin- og blodtypene A, D og E. Tidligere er det analysert nærmere 5000 blodprøver m.h.p. hemoglobintype i samarbeid med Genetisk Institut, Universitetet i København (SICK og andre 1962, MØLLER og SICK 1963, FRYDENBERG og andre 1965).

Det vil føre for langt å legge fram alle resultatene i denne rapporten. Vi har derfor foretatt et utvalg i materialet (tabell 8) som klart underbygger det forhold at torsken i de nordnorske farvann ikke er homogen i sin sammensetning.

ROLLEFSEN (1933) fant tidlig at kysttorsk og skrei hadde forskjellige otolitttyper. Dette er særpreg som sannsynligvis er betinget av miljøet. Fordeler en analyseresultatene av prøveserier tatt under Lofotfisket i 1965 etter otolitttype og regner ut gen- og blodtype-

frekvensene for de to grupper av individer som fremkommer, finner vi et klart skille i alle prøveseriene for frekvensene av HbI¹, A og E. Da det er liten forskjell mellom kysttorsk og norsk-arktisk torsk i prøveserier tatt om høsten i frekvensene av Tf^A, Tf^B og Tf^C kan en ikke vente å finne en entydig forskjell i disse karakterene mellom individgruppene i alle prøveseriene. Men gjennomsnittsverdiene av alle prøveseriene for de to individgrupper viser stort sett de samme frekvensverdier som en har funnet hos kysttorsk på nordvestsiden av Vestfjorden og hos torsk fra Bjørnøya. Disse resultatene viser at tross fangst av gytende skrei og kysttorsk på samme redskap er det liten eller ingen utveksling av genetisk materiale mellom de to hovedpopulasjoner av torsk (MØLLER 1965 b og 1966 b).

Mellom prøveserier innsamlet om høsten i Vestfjorden finner en også store forskjeller. Parvise verdier av de to påfølgende år, 1964 og 1965, av genfrekvensene for HbI¹, Tf^A, Tf^B, Tf^C (serumprøvene fra Øksfjorden 1964 ble ødelagt før analysering) og blodtypefrekvensene for A og E fra to lokaliteter på hver side av fjorden er sammenfallende, mens det derimot er stor forskjell mellom frekvensene fra de to lokalitetene. Av dette kan en slutte at arvemassen i de to populasjonene som prøvene er hentet fra, er vidt forskjellige, og på tross av den korte avstanden må det være liten eller ingen utveksling av individer eller gener mellom de to populasjonene.

GRØNLANDSSEL

Av tabell 7 går det fram at det både i genfrekvenser og i fordelingene av transferrintypene er en viss forskjell mellom prøveseriene fra de forskjellige fangstfeltene. F.eks. synes type AA å være betydelig sjeldnere i prøveserien fra Newfoundland enn fra de andre feltene, og q_A er minst i prøveserien fra Newfoundland og størst i prøveserien fra Kvitsjøen.

Av en nærmere statistisk sammenlikning, som en ikke skal gå nærmere inn på her, har en kunnet dra følgende konklusjon: Det er ingen sikker forskjell mellom prøveseriene fra de to austlige ynglefeltene (Vestisen og Kvitsjøen). Heller ikke er det noen sikre forskjeller mellom noen av disse prøveseriene og prøveseriene fra hårfellingslegrene i Austisen. Alle prøvene fra de austlige feltene er derfor slått sammen og sammenliknet med prøveserien fra Newfoundlandsfeltet. Da finner en at en med ganske stor sikkerhet kan dele den totale bestand av grønlandssel inn i to hovedpopulasjoner med ulik arvemasse. Utvekslingen av individer mellom disse to populasjonene er så liten at en forskjell i genfrekvensene blir opp-

rettholdt. Dette er i samsvar med den kjennskapen en har til grønlandsselens vandringer og med resultater fra merkeforsøk (RASMUSSEN og ØRITSLAND 1964, SERGEANT 1965) idet det aldri er påvist vandring av grønlandssel rundt Kap Farvel.

Om det austlige bestanden igjen kan deles i to populasjoner med forskjellig arvemasse (en som yngler i Vestisen og en som yngler i Kvitsjøen) kan en ikke si noe om på grunnlag av transferrintypene for de prøvene en foreløpig har samlet og analysert.

VIDERE ARBEIDER

Arbeidet med arvelig kontrollerte individuelle forskjeller i blodet hos fisk vil bli ført videre. I første rekke vil en nytte variasjonene som er funnet hos sild og sei for å identifisere populasjoner av disse artene. For sild er det aktuelt å undersøke om det finns forskjeller i genfrekvenser mellom prøver fra det nordlige og sørlige innsiget av vintersild til norskekysten. Dessuten mellom vintersild og sild fra Nordsjøen og mellom de forskjellige stammer av sild i Nordsjøen og Skagerak, samt lokale sildestammer på kysten.

For sei er det særlig aktuelt å undersøke om det finns noen arvelige forskjeller mellom bestanden på

norskekysten og ved Island og Færøyane. Merkeforsøk har vist at det er ganske stor utvandring av sei fra norskekysten til de vestlige feltene (OLSEN 1961), og dersom prøver kan skaffes, vil en forsøke å finne ut om denne utvandringen er så stor at en kan anta at den norske og den islandske/færøyske seibestanden kan sies å ha felles arvemasse.

Innsamlingsarbeidet vil også omfatte nye prøveserier av torsk. Artens oppdeling i populasjoner med ulik arvemasse synes å være mer innviklet og detaljert enn en ventet. Når en har anledning til det, vil en fortsatt samle blod av andre arter for å forsøke å identifisere nye arvelige variasjoner i hemoglobin- og serumproteiner og sammenlikne genfrekvenser fra forskjellige områder.

Elektroforeseteknikken som er brukt, synes å passe bra for analyse av både hemoglobiner og serumproteiner. Den er rask å utføre, og dette er en faktor av stor betydning når en skal analysere et relativt stort materiale på kort tid, noe som er nødvendig i populasjonsundersøkelser. Men likevel kan det være nyttig å forsøke nye elektroforesemetoder og varianter av de metodene en hittil har brukt for å forsøke å finne nye arvelige karakterer og for å få dem en har funnet tydeligere fram. Dette siste gjelder særlig de varia-

Tabell 8. Blodprøver av torsk fra Vestfjorden og Bjørnøya med genfrekvenser av HbI¹, Tf^A, Tf^B og Tf^C og frekvenser av blodtypene A og E. Prøver tatt under gytesesongen er fordelt i grupper etter otolithtype.
Blood samples of cod from the Vestfjord and the Bear Island with gene frequencies of HbI¹, Tf^A, Tf^B, and Tf^C, and frequencies of the blood types A and E. The samples collected during the spawning season are divided into groups, skrei and coastal cod (kysttorsk), according to otolith type.

Innsamlings- dato Date of sampling	Lokalitet Locality	Fangst- redskap Gear	Otolitt- type Otolith type	Antall No.	Genfrekvenser Gene frequencies				Blodtypefrekvenser Blood type frequencies	
					HbI ¹	Tf ^A	Tf ^B	Tf ^C	A	E
17.2.65	Vestfjorden 68°11'N 14°31'E	garn net	skrei kysttorsk	65	.117	.115	.131	.646	.523	.231
				62	.298	.123	.139	.664	.529	.647
25.2.65	Vestfjorden 68°11'N 14°31'E	garn net	skrei kysttorsk	54	.094	.093	.212	.686	.722	.407
				89	.278	.072	.183	.672	.736	.597
27.2.65	Vestfjorden 68°08'N 14°29'E	garn net	skrei kysttorsk	40	.163	.095	.238	.655	.475	.275
				49	.256	.090	.150	.760	.721	.744
2. 3.65	Vestfjorden 67°53'N 13°06'E	garn net	skrei kysttorsk	80	.056	.116	.165	.698	.475	.063
				40	.213	.050	.225	.713	.675	.600
5. 3.65	Vestfjorden 68°15'N 15°16'E	not seine	skrei kysttorsk	59	.086	.150	.117	.683	.492	.119
				39	.218	.090	.141	.731	.615	.615
Total/Gjennomsnitt Total/Mean			skrei	298	.097	.116	.166	.676	.476	.201
			kysttorsk	279	.261	.086	.139	.700	.662	.637
19.11.64	Bjørnøya Bear Island	trål trawl		150	.139	.155	.159	.639	.370	.101
26.10.64	Vestfjorden	ruse		160	.388	.052	.137	.797	.768	.955
23.10.65	67°50'N 14°42'E	trap-net		120	.454	.092	.083	.821	.758	.950
27.10.64	Vestfjorden	trål		80	.213				.590	.385
25.10.65	68°23'N 15°19'E	trawl		109	.200	.138	.142	.693	.583	.426

sjonene som synes å forekomme i albuminene hos enkelte arter, men som på grunnlag av de vanlige metodene ikke er tydelige nok for entydig inndeling i individgrupper.

Kunstig klekking og utsetting av yngel av saltvannfisk der den naturlige bestanden er liten på grunn av intens fiske, er forsøkt i en del tilfeller, og det vil sikkert bli mer aktuelt etter som fiskeeffektiviteten øker og fiskebestandene har tendens til å avta. Den praktiske verdien av disse forsøkene er likevel sterkt omdiskutert fordi yngelen som slippes ut er for liten til å bli merket slik at en seinere kan kjenne den igjen og skille den fra yngelen som er klekket naturlig i området. Påvisningen av arvelige karakterer i blodet, spesielt hemoglobintyper, kan imidlertid brukes til å få en viss kontroll med nytten av slik utsetting. En må da først kjenne frekvensene for hemoglobintypene for den naturlige populasjonen i det området en tenker å slippe ut fisk. Dernest må stamfisk velges ut etter at en har analysert en blodprøve fra hver enkelt fisk. En velger da fisk av bare en hemoglobintype eller i det minste slik at frekvensen i foreldregenerasjonen blir mest mulig ulik frekvensen for den naturlige populasjonen i området. Neste høst samler en så inn yngel (som da er store nok til at en kan få blodprøver av dem), og analyserer disse med hensyn på hemoglobintyper. Hvis frekvensen i yngel-populasjonen er den samme som i den naturlige populasjonen i området, må en anta at utsettingen har vært av liten eller ingen verdi. Dersom frekvensen derimot er den samme som for den kunstig sammensatte stamfiskpopulasjonen, må en anta at dette er yngel som stammer fra utsettingen, som da har vært vellykket. Ligger frekvensen et sted imellom, kan en til en viss grad beregne hvor mye av yngelen som stammer fra naturlig gyting og hvor mye som stammer fra utsettingen, og dermed kan en få et mål for den praktiske verdi av utsettingsarbeidet.

Foreløpig har en så vidt startet et slikt forsøk med torsk i Trondheimsfjorden.

SUMMARY

This report deals with the main results of the serological work which has been carried out at Institute of Marine Research in the last five years. The work was started with blood type studies on cod, and later electrophoresis of hemoglobins and serumproteins were undertaken. Electrophoretic work has been carried out on hemoglobins and serumproteins of several fish species and four seal species.

A total of seven specific antibodies against cod

erythrocyte antigens have been isolated, of which three give clear-cut and strong reactions.

The agar-gel electrophoresis (SICK 1961) were used for fish hemoglobins, and the modified technique described by MØLLER (1965 a) for seal hemoglobins and for all serum proteins.

Hemoglobin polymorphism in whiting and cod were found by SICK (1961). Individual differences are also found in haddock, coalfish, herring, sprat, mackerel and harp seal. However, we have not been able to prove that these differences represent cases of real genetic polymorphism, although this is likely.

Transferrin polymorphism has been found in cod (MØLLER 1965 a), coalfish, pollack, whiting, herring and harp seal. Beside this, individual differences in some of the serum proteins are found in all the species investigated, but we have not yet been able to decide whether these differences are genetically controlled.

For population studies about 4,300 cods from the Norwegian coast and the Barents Sea have been collected for otolith- and blood-typing, and electrophoresis of hemoglobins and serum proteins; and about 5,000 specimens have been analysed according to hemoglobin types in co-operation with Institute of Genetics University of Copenhagen (FRYDENBERG *et al.* 1965). Clear differences in frequencies are found between coastal cod and «skrei» (spawners invading from the Barents Sea) in the Lofoten area (MØLLER 1965 b). Differences are also found between samples from coastal cod from separate areas, but in most cases the frequencies seem to change in a clinal way rather than in steps, although the picture is complicated and far from clear.

The transferrins of harp seal also have been used for identification of populations. Significant differences in gene frequencies have been found between the sample collected at the breeding area off Newfoundland and the other samples, but not between the samples from the two eastern breeding areas (the Jan Mayen and the White Sea).

The work will be continued, and when polymorphism is found in species of commercial value, these characteristics will be used for identification of populations. Hemoglobin types will also be used as tracers in experiments with artificial propagation of salt water fishes.

LITTERATUR

- FRYDENBERG, O., MØLLER, D., NÆVDAL, G. og SICK, K. 1965. Haemoglobin polymorphism in Norwegian cod populations. *Hereditas*, 53: 257–271.

- GIBLETT, E. R., HICKMAN, C. G. og SMITHIES, O. 1959. Serum transferrins. *Nature, Lond.*, 183: 1589—1590.
- HALVORSEN, K. og MØLLER, D. 1959. Blood groups in fish (codfish). *XII Scandinavian Congress of Pathology and Microbiology, Göteborg*, : 303—304.
- KOCH, H. J. A., BERGSTRØM, E. og EVANS, J. C. 1964. The microelectrophoretic separation on starch gel of the haemoglobins of *Salmo salar* L. *Meded.K.vlaam.Acad.*, 26(9): 1—32.
- MØLLER, D. 1962. Serology of cod in Norwegian waters. Interim report on technique. *Coun.Meet.Int.Coun.Explor. Sea, 1962* (38): 1—2.
- 1965 a. Serum transferrins in cod. *Coun.Meet.Int.Coun., Explor.Sea, 1965* (155): 1—8.
- 1965 b. Cod populations: Preliminary results in the Lofoten area. *Coun.Meet.Int.Coun.Explor.Sea, 1965* (166): 1—2.
- 1966 a. Polymorphism of serum transferrin in cod. *FiskDir.Skr.Ser.HavUnders.* (Under trykking).
- 1966 b. Genetic differences of cod groups in the Lofoten area. *Nature, Lond.* (Sendt for trykking).
- MØLLER, D. og NÆVDAL, G. 1966. Transferrin polymorphism in some gadoid fishes. *Nature, Lond.* (Under trykking).
- MØLLER, D. og SICK, K. 1963. Rapport om identifisering av torskepopulasjoner basert på frekvensen av hemoglobintyper. *Fiskets Gang*, 49: 245—247.
- NÆVDAL, G. 1966 a. Hemoglobins and serum proteins in four North Atlantic Seals, studied by electrophoresis. *FiskDir. Skr.Ser.HavUnders.* (Under trykking).
- 1966 b. Protein polymorphism used for identification of harp seal populations. *Årbok Univ. Bergen* (Under trykking).
- OLSEN, S. 1961. An account of the Norwegian coalfish investigation with special reference to the tagging experiments. *Coun.Meet.Int.Coun.Explor.Sea 1962* (125): 1—8
- RASMUSSEN, B. og ØRITSLAND T. 1964. Norwegian tagging of harp seals and hooded seals in North Atlantic waters. *FiskDir. Skr. Ser. HavUnders.*, 13 (7): 43—55.
- ROLLEFSEN, G. 1933. The otoliths of the cod. *FiskDir. Skr. Ser. HavUnders.*, 4 (3): 1—14.
- SERGEANT, D. E. 1965. Migrations of harp seals, *Pagophilus groenlandicus* (Erxleben) in the Northwest Atlantic. *J. Fish. Res.Bd.Can.*, 22 (2): 433—464.
- SICK, K. 1961. Haemoglobin polymorphism in fishes. *Nature, Lond.*, 192: 894—896.
- SICK, K., FRYDENBERG, O. og NIELSEN, J. T. 1963. Haemoglobin patterns of plaice, flounder, and their natural and artificial hybrids. *Nature, Lond.*, 198: 411—412.
- SICK, K., MØLLER, D. og FRYDENBERG, O. 1962. Observations on the haemoglobin types of cod in Norwegian coastal waters. *Coun. Meet. Int. Coun. Explor. Sea 1962.*, (141): 1—3.

APPENDIKS: Arvemassen består av en rekke elementer eller gener.

A	A'	A	A'	A	A'	A'	etc.
B	B	B'	B	B'	B	B	
C	C	C	C	C	C	C	
D''	D'	D'	D	D''	D	D	

etc.

Mange av genene er nøyaktig like (f.eks. A og A, A' og A', C og C), mens andre er vidt forskjellige (A er forskjellig fra B, som er forskjellig fra C etc.). Noen av genene er imidlertid ikke mere forskjellige enn at de kan erstatte plassen til hverandre (f.eks. A og A', D, D' og D''). Disse genene innvirker på samme egenskap, og genene slås sammen i en gruppe eller et allelsystem (f.eks. alle A og A', alle D, D' og D''). Hvert individ har to sammenhørende gener for hver egenskap. De to genene (alleler) som er representert fra hvert allelsystem i individet, kan altså både være like og ulike. Domineres allelsystemet av et gen, vil flertallet av individer imidlertid ha to like gen for den egenskap som påvirkes av allelsystemet. Domineres allelsystemet av to gen med omtrent samme hyppighet, vil $\frac{1}{4}$ av individene ha to av det ene gen, $\frac{1}{4}$ vil ha to av det andre gen, mens halvparten av individene vil ha begge genene representert i sin organisme. Individer med to like alleler, kalles *homozygoter* m.h.p. det spesielle genet, mens individer med forskjellige alleler kalles *heterozygoter*.

Hardy-Weinberg har vist at forholdet mellom homozygoter og heterozygoter i en individgruppe bare er avhengig av de enkelte gens hyppighet (*genfrekvens*) i individgruppens arvemasse. Genfrekvensen er i alminnelighet tilnærmet konstant med tiden, og forholdet vil bestå fra generasjon til generasjon. Hvis en kan vise at en egenskap i en gruppe individer varierer i takt med Hardy-Weinbergs lov, viser en samtidig at den er arvelig.