

KRYSNINGSFORSØK MELLOM SKREI OG KYSTTORSK  
[Crossing experiments between Arctic and coastal cod]

Av

KNUT E. JØRSTAD og OLAV R. GODØ  
Fiskeridirektoratets Havforskningsinstitutt

og

ERLEND MOKSNESS  
Statens Biologiske Stasjon Flødevigen, ARENDAL

og

JON REISEGG  
Institutt for fiskeribiologi, Universitetet i Bergen

ABSTRACT

JØRSTAD, K.E., GODØ, O.R., MOKSNESS, E. and REISEGG, J. 1981.  
Krysningsforsøk mellom skrei og kysttorsk. [Crossing experiments  
between Arctic and coastal cod]. Fisken Hav., 1981(2): 17-30.

Egg and sperm from Arctic and coastal cod (Gadus morhua L.) were collected during the spawning season in the Møre area. The parent fishes were classified to cod race according to type of otoliths, and the eggs were fertilized artificially as soon as possible. The fertilized eggs were sent by air to Statens Biologiske Stasjon Flødevigen and incubated in the laboratory. The eggs were divided in three main groups depending of parent classification, A (coastal cod x coastal cod), B (coastal cod x Arctic cod), C (Arctic cod x Arctic cod).

Several polymorphic enzymes (phosphoglucose isomerase, phosphoglucosmutase, isocitrate dehydrogenase, and lactate dehydrogenase were found both in the parent fish and in the newly hatched cod larvae. All phenotypes expected in the offspring were found. However, mendelian distribution could not be calculated due to mixing of larvae from more than two parents.

During the first 30 days after hatching, offspring from the crossing between Arctic and coastal cod seemed to have a reduced growth rate compared to the other groups. Due to low enzyme activity in these larvae, the phenotypic classification in this group was difficult.

A detailed genetic analysis of group B and C, before and after first feeding, show a significant change in the distribution of phenotypes and allele frequencies. The observed changes could be due to selection on phenotypes or may reflect different egg qualities for some of the parents used. The genetic analysis demonstrated, however, that changes occur during the first feeding stage, indicating that genetic selection can take place in this period of larval development.

#### INNLEDNING

Skrei og kysttorsk gyter om våren i de samme områdene fra Møre og nordover kysten. Undersøkelse av otolitt-typene brukes for å skille de to hovedtypene fra hverandre (ROLLEFSEN 1933), og genetiske studier har vist at de tilhører adskilte populasjoner (MØLLER 1966, 1968). Å bruke otolittkarakterer til å skille fiskebestander er svært utbredt (WILLIAMS and BEDFORD 1974). Krysning mellom skrei og kysttorsk kan tenkes å forekomme på gytefeltene, og et aktuelt spørsmål er hvordan otolittmønsteret hos avkom fra slike krysninger ser ut. Det genetiske bidraget i utformingen av otolitt-type er forøvrig lite undersøkt, mens miljøets (temperatur, lys og ernæring) innvirkning på kalkavleiring hos fisk er beskrevet av flere forfattere (BILTON and ROBBINS 1971 og PANELLA 1974).

Flere genetiske systemer hos torsk kan påvises like etter klekking (JØRSTAD, SOLBERG and TILSETH 1980). Det er derfor mulig å gjøre genetiske undersøkelser av torskelarver både i laboratoriet og i felten på et svært tidlig stadium.

Forsøkene som er beskrevet nedenfor ble lagt opp som et innledende eksperiment hvor en spesielt utprøvde metoder. I tillegg ville en undersøke otolitt-type på avkom fra forskjellige krysninger samt

den genetiske sammensetningen hos larvene før og etter første næringsopptak.

Undersøkelsene av otolitt-typer omhandles ikke her da en vil føre opp larvene så lenge som mulig. De genetiske analysene er imidlertid avsluttet.

#### MATERIALE OG METODER

Gytende torsk ble samlet inn under merketokt på Møre i mars/april 1980. Fisken ble klassifisert til henholdsvis skrei eller kysttorsk ved hjelp av otolittundersøkelse (ROLLEFSEN 1933), og det ble tatt prøver av hvit muskulatur for genetiske analyser. Disse prøvene ble frosset ned for seinere analyse ved Havforskningsinstituttet i Bergen. Kunstig befruktning av eggene ble foretatt, og de enkelte gruppene ble sendt til Statens Biologiske Stasjon Flødevigen, Arendal (10 april). Krysningene ble delt i 3 hovedgrupper:

- A: Kysttorsk mot kysttorsk (2 foreldre).
- B: Kysttorsk mot skrei (2+4 foreldre).
- C: Skrei mot skrei (3+2 foreldre).

I gruppe B og C ble det utført to krysninger i hver (I og II), men av plasshensyn ble disse slått sammen. De tre gruppene ble inkubert og føret opp i hvert sitt 60-liters sort, sylindrisk akvarium (DANNEVIG og HANSEN 1952) ved en temperatur på  $6,0^{\circ} \pm 0,1^{\circ} \text{C}$ . Klekkingen av de tre gruppene startet 24 april, og 50% klekking inntraff 25 april (dag 0). Innsamlingen av zooplankton og føring av larvene fulgt metoden beskrevet av MOKSNESS (1981). En del av larvene ble konserverte i 4% buffret formalin og senere opparbeidet for standard lengde (SL, fra fremre del av snute til enden av notochord) og tørrvekt (TV).

Foruten muskelprøver av stamfisken, ble det tatt en rekke prøver av larvene i de tre gruppene. Fra de gruppene hvor det var flest larver (B og C), ble det tatt 100 individer fra hver like etter klekking (dag 2). På grunn av lite materiale i gruppe A, ble det

bare tatt 40 larver av denne på samme tidspunkt. Videre tok en 100 larver fra gruppene B og C etter at første næringsopptak var ferdig (dag 15) (ELLERTSEN et al. 1980b). I tillegg ble det tatt 20 larver hver 3. dag fra gruppe C for å kontrollere når de enkelte enzymene kunne påvises under de nevnte betingelser.

Alle larvene ble individuelt behandlet som beskrevet av JØRSTAD, SOLBERG and TILSETH (1980). Prøvene ble lagret ved  $-20^{\circ}\text{C}$  i Flødevigen inntil de ble sendt til Havforskningsinstituttet hvor de ble analysert ved hjelp av stivelsesgel elektroforese. Detaljer er i hovedsak beskrevet tidligere (JØRSTAD 1979). Stivelsesgelen ble farget for følgende enzymer: phosphoglucose isomerase (PGI), phosphoglucomutase (PGM), laktat dehydrogenase (LDH) og isocitrat dehydrogenase (IDH). Betingelsene for enzymfargingen er beskrevet av HARRIS and HOPKINSON (1976) og WARD and BEARDMORE (1977)).

ALLENDORF and UTTER (1977) har foreslått nomenklaturregler for enzym loci og alleler. Denne nomenklaturen er brukt her.

## RESULTATER

### Biologiske observasjoner

Antall egg i hver av de tre gruppene ble ikke beregnet ved ankomst til laboratoriet. Endel dødelighet ble observert på eggene uten at det er mulig å anslå mengden. Prosentvis dødelighet må likevel anses som liten. Bilder av larvene like før og etter klekking er vist i Fig. 1. Disse larvene er avkom fra krysning mellom kysttorsk og skrei. Stor reduksjon i antall larver ble observert i en alder av 11-15 dager, men det foreligger ikke målinger på hvordan dødeligheten forløp i de tre gruppene. Ved en alder av omkring 30 dager hadde gruppe B den klart minste veksten i forhold til de to andre gruppene. På grunn av kapasitetproblemer ble ingen direkte målinger foretatt.

Ut fra de begrensede målingene, som er gjort (summert i Tabell 1), kan en ikke påvise forskjeller mellom de tre gruppene.

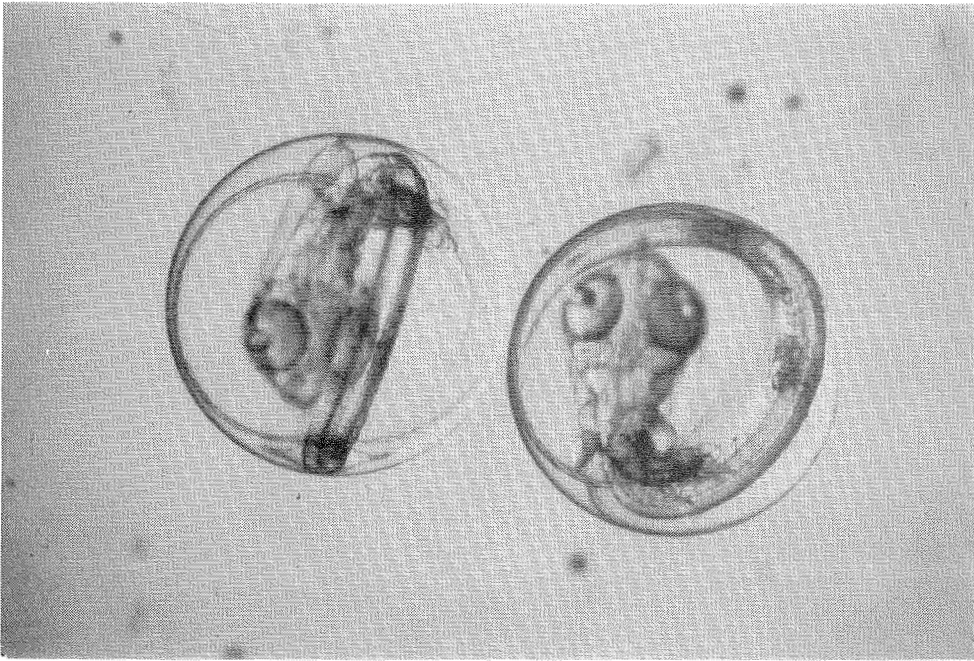


Fig. 1a. Torskeegg like før klekking. [Cod eggs just before hatching].



Fig. 1b. To dager gamle torskelarver. [Two days old cod larvae].

### Genetisk variasjon hos stamfisk og avkom

Analyser av larver fra gruppe C tatt på forskjellige tidspunkter etter befruktningen viste god overenstemmelse med tidligere under-

Tabell 1. Standard lengde (SL), tørrvekt (V) og antall (N) av larvene like etter klekking. Kysttorsk x kysttorsk (A), kysttorsk x skrei (B) og skrei x skrei (C). [Standard length (SL), dry weight (TV) and number (N) of newly hatched larvae. Coastal cod x coastal cod (A), coastal cod x arctic cod (B) and arctic cod x arctic cod (C)].

Krysning	Dag 0			Dag 3		
	SL (mm)	TV (mg)	N	SL (mm)	TV (mg)	N
A				4,43 (±0,33)	0,051 (±0,003)	22
B				4,85 (±0,12)	0,052 (±0,004)	142
C	4,61 (±0,25)	0,056 (±0,005)	44	4,59 (±0,17)	0,0055 (±0,006)	27

søkelser (JØRSTAD et al., 1980). Alle de nevnte enzymene kunne påvises like etter klekking også under de betingelser som ble brukt i Flødevigen.

Oversikt over fenotyper hos stamfisk og observerte fenotyper i de enkelte larvegruppene er gitt i Tabell 2. Svært liten variasjon ble påvist for PGM og IDH. Mer variasjon ble påvist for PGI-1 og LDH-3, og et eksempel på stivelsesgel farget for disse enzymene er vist i Fig. 2. Som det fremgår av Tabell 2, ble alle forventede fenotyper i de enkelte krysningene påvist i larvegruppene. Det ble observert et lite antall av PGI-1 (100/100) i gruppe C, men dette skyldes sannsynligvis en feilklassifisering.

Dessverre var flere foreldrepar slått sammen i de gruppene hvor en hadde størst materiale. Det er derfor ikke mulig å kontrollere nedarvingen i de enkelte enzymssystemene. Dette er imidlertid gjort tidligere (JØRSTAD et al. 1980).

Enzymaktiviteten i de tre larvegruppene varierte i vesentlig grad. Larvene i gruppe A hadde høy aktivitet for alle enzymene, og opptil 100% av larvene kunne klassifiseres til fenotype. Også i gruppe C

Tabell 2. Ulike fenotyper påvist hos foreldre og avkom. Kysttorsk x kysttorsk (A), kysttorsk x skrei (B) og skrei x skrei (C). [Different phenotypes in parent fish and offspring. Coastal cod x coastal cod (A), coastal cod x arctic cod (B) and arctic cod x arctic cod (C)].

Krysning	Foreldre/avkom	PGI-1	PGM <sup>+</sup>	LDH-3	IDH-1 <sup>+</sup>
A	K♀3	100/100		70/100	
	K♂6	100/150		70/100	
	-----				
	Larver	100/100		70/70	
		100/150	-	70/100	
		-	-	100/100	
B	I: K♀3	100/100		70/100	
	S♂8	100/150		100/100	
	II: K♂1	100/100		100/100	
	K♂6	100/150		70/100	
	K♂7	100/100		70/100	
	S♀11	150/150		70/100	
	-----				
	Larver	100/100		70/70	
		100/150	-	70/100	
		150/150	-	100/100	
C	I: S♂5	100/150	70/100	70/100	90/100
	S♂10	100/150	100/100	100/100	100/100
	S♀9	150/150	100/100	70/100	100/100
	II: S♀13	100/100	100/100	70/100	100/100
	S♂12	30/150	100/100	70/100	100/100
	-----				
	Larver	30/100	70/100	70/70	100/100
		100/100	100/100	70/100	90/100
		100/150	-	100/100	
		150/150	-	-	

+: Larvene i krysning A og B ikke analysert for disse enzymene.

kunne mesteparten av larvene (90%) klassifiseres. Påfallende dårligere enzymaktivitet var det i gruppe B hvor under halvparten av larvene ble fenotype bestemt.

#### Genetisk sammensetning før og etter første næringsopptak

De statistiske testene er i hovedsak beskrevet av SOKAL and ROHLF (1969), og resultatene av analysene er gitt i Tabell 3. Da PGM og IDH viste svært liten variasjon, ble det ikke utført statistiske

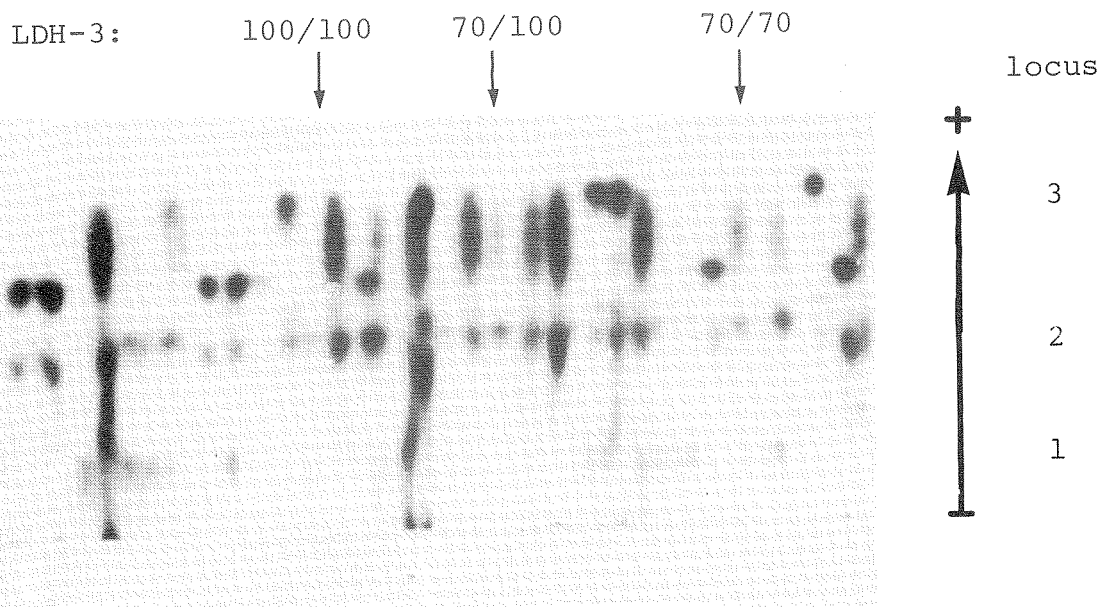


Fig. 2a. Stivelsesgel farget for laktatdehydrogenase (LDH). Larver fra kysttorsk x kysttorsk. Ulike fenotyper markert med pil. [Starch gel stained for lactate dehydrogenase (LDH). Larvae from coastal cod x coastal cod. Different phenotypes indicated by arrow].

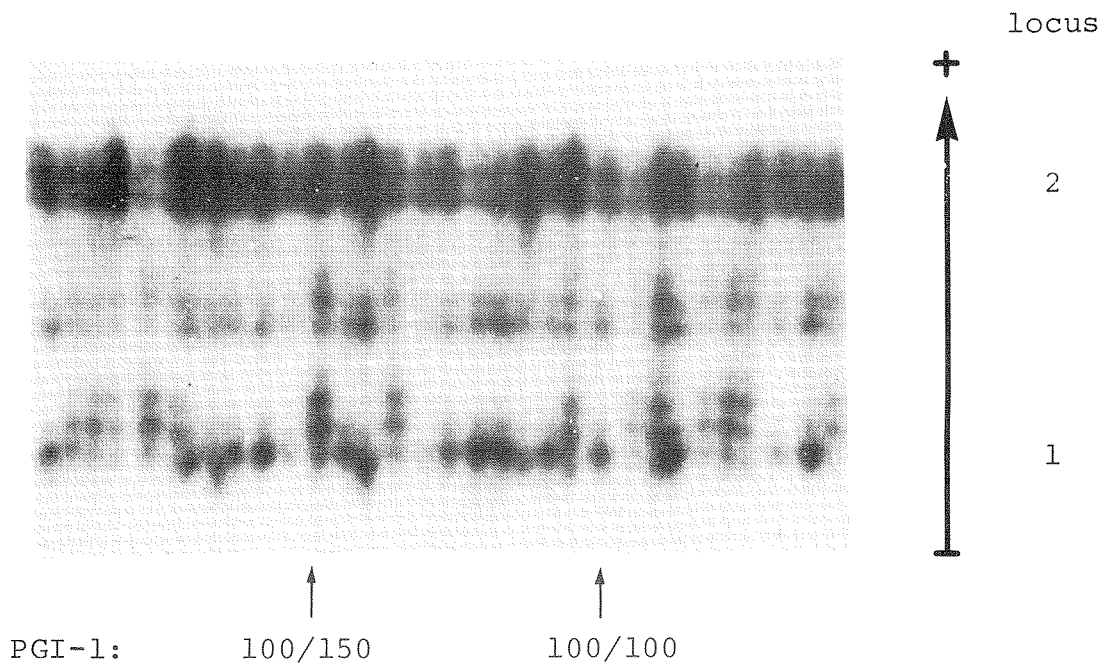


Fig. 2b. Stivelsesgel farget for phosphoglucose isomerase (PGI). Larver fra kysttorsk x kysttorsk. Ulike fenotyper markert med pil. [Starch gel stained for phosphoglucose isomerase (PGI). Larvae from coastal cod x coastal cod. Different phenotypes indicated by arrow].



beregninger for disse enzymene. Krysningen i gruppe A ga for lite materiale til å bli analysert både før og etter første næringsopp-  
tak. I de to andre gruppene ble fordelingen av fenotyper kraftig  
forandret gjennom perioden.

Tabell 3. Analyse av larver før (f.f.n.) og etter (e.f.n.) første næringsopptak. Kyst-  
torsk x kysttorsk (A), skrei x kysttorsk (B) og skrei x skrei (C). [Analysis  
of larvae before (f.f.n.) and after e.f.n.) first feeding. Coastal cod x  
coastal cod (A), coastal cod x arctic cod (B) and arctic cod x arctic cod (C)].

PGI-1

Krysning		Fenotyper				Antall	G/d.f. <sup>1)</sup>	Allel frekvenser		
		30/100	100/100	100/150	150/150			30	100	150
A	f.f.n.	-	20	17	-	37		-	0,77	0,23
	e.f.n.	-	-	-	-	-		-	-	-
B	f.f.n.	-	13	22	8	43	9,18/1 <sup>+</sup>	-	0,56	0,44
	e.f.n.	-	-	26	24	24		-	0,26	0,74
C	f.f.n.	18	3	44	17	82	16,41/2 <sup>++</sup>	0,11	0,42	0,47
	e.f.n.	3	-	26	26	55		0,03	0,26	0,71

LDH-3

Krysning		Fenotyper			Antall	G/d.f. <sup>1)</sup>	Allel frekvenser	
		70/70	70/100	100/100			70	100
A	f.f.n.	8	13	6	27		0,54	0,46
	e.f.n.	-	-	-	-		-	-
B	f.f.n.	3	28	13	44	6,27/1 <sup>+</sup>	0,39	0,61
	e.f.n.	2	32	3	37		0,50	0,50
C	f.f.n.	31	44	15	90	14,74/2 <sup>++</sup>	0,59	0,41
	e.f.n.	14	45	35	94		0,39	0,61

+ ) Signifikante verdier:  $0,01 < p < 0,05$

++ ) Signifikante verdier:  $p < 0,01$

1) Heterogenitetstest (SOKAL and ROHLF 1969) på om de er skjedd en forandring gjennom første næringsopptak. G er tilnærmet  $\chi^2$ -fordelt.

For PGI-1 var forandringen mest markert, og i begge krysningene  
skjedde forandringen til fordel for PGI-1 (150). I gruppe B har  
frekvensen signifikant forandret seg fra 0,44 til 0,74 ( $t=2,97$ ;  
 $df=93$ ;  $p < 0,01$ ) og i gruppen C fra 0,48 til 0,71 ( $t=2,75$ ;  
 $df=137$ ;  $p < 0,01$ ).

For LDH-3 var det også skjedd forandringer i fenotypefordeling. I  
gruppe B ble bare 40% av larvene bestemt til fenotype, og tallene  
fra denne gruppen er derfor usikre. G-heterogenitets-test utført på  
de observerte fenotypene, gir signifikant forandring gjennom peri-  
oden ( $G=6,27$ ;  $df=1$ ;  $p < 0,02$ ). Antall fisk er imidlertid så lite at  
testen er usikker. Kolmogorov-Smirnov's ikkeparametriske test

(SIEGEL 1956) er bedre egnet på små prøvestørrelser og gir ikke grunnlag for å slutte at det har skjedd en signifikant forandring ( $D=0,21$ ;  $p=0,1$ ) i fenotypesammensetningen. Forandringen i frekvensen for LDH-3 (100) fra 0,61 til 0,51 er heller ikke signifikant ( $t=0,91$ ;  $df=79$ ;  $p\sim 0,2$ ). I gruppe C var det for LDH-3 en tydelig forskyvning fra fenotype 70/70 over til 100/100, frekvensen for LDH-3 (100) forandret seg signifikant fra 0,41 til 0,61 ( $t=2,75$ ;  $df=184$ ;  $p<0,01$ ). I denne gruppen ble over 90% av larvene bestemt til fenotype i motsetning til i gruppe B.

## DISKUSJON

Totalt viser den statistisk behandling av materialet at det skjer en signifikant forandring i den genetiske sammensetningen i løpet av første næringsopptak. Dette kan skyldes en seleksjon mot de aktuelle genetiske variantene, eller forskjell i egg-/larvekvalitet i de forskjellige avkomstgruppene.

Fra Tabell 2 ser vi at krysningen i gruppe I (B) vil gi en forventet frekvens for PGI-1 (100) på 0,75. I gruppe II (B) har vi flere hanner, og forventete frekvenser kan ikke entydig beregnes. Frekvensen for PGI-I (100) vil imidlertid være maksimalt 0,5.

For LDH-3 vil krysningen i gruppe I (B) gi en forventet frekvens for LDH-3 (100) på 0,75, mens en i gruppe II (B) vil forvente en frekvens på noe over 0,5. Vi ser altså at forventet frekvens for PGI-1 (100) og LDH-3 (100) vil være høyere i gruppe I (B) enn i gruppe II (B). En seleksjon mot avkommet i den første gruppen vil derfor gi en nedgang i frekvensen for PGI-1 (100) og LDH-3 (100). Dette samsvarer med det vi har observert.

Tilsvarende betraktninger kan en gjøre for gruppe C. Her vil seleksjon mot avkom i gruppe II (C) gi lavere frekvens for PGI-1 (100) og høyere frekvens for LDH-3 (100) som også samsvarer med det observert.

Forandringene i fenotypsammensetningen i forbindelse med første næringsopptak kan altså delvis forklares ved at larvene var avkom

fra flere foreldrepar. For å kunne skille seleksjon mot genotyper fra seleksjon mot avkomstgrupper, må en i fremtidige forsøk bruke larver fra bare ett foreldrepar.

Resultatene peker likevel på at seleksjon kan spille en viktig rolle for den genetiske sammensetningen av larver under naturlige forhold, og for de mulighetene forskjellige larvetyper har for å overleve. Et aktuelt spørsmål er hvordan kryssninger mellom kysttorsk og skrei klarer seg under naturlige forhold. De beskrevne krysningsforsøkene viser at det er mulig å gjennomføre slike forsøk. Detaljerte genetiske studier kan gjøres allerede ved klekking av larvene og på de ulike stadier i utviklingen.

På bakgrunn av de begrensede biologiske undersøkelsene kan en ikke påvise forskjeller mellom de tre larvegruppene. Direkte observasjoner tyder imidlertid på at larvene fra kryssningen mellom kysttorsk og skrei hadde redusert vekst i løpet av første måned etter klekking. Dette kan muligens forklare den lave enzymaktiviteten som ble observert i denne larvegruppen.

Variasjonen i styrken på de enkelte årsklassene av torsk kan tyde på at miljøforhold har stor betydning for overleving og oppvekst av larvene (WIBORG 1957 og CUSHING 1975). I forbindelse med første næringsopptak er larvene spesielt følsomme (ELLERTSEN et al. 1980a), og mulig seleksjon vil sannsynligvis virke på dette stadiet. De genetiske analysene av larvegruppene i det beskrevne forsøket understreker betydningen av dette utviklingstrinn.

Som nevnt var det begrenset genetisk variasjon i det analyserte materiale. I dag kan en ta små vevsprøver (biopsi) av levende fisk (JØRSTAD, REISEGG og GODØ 1981). Fisken kan merkes og holdes i akvarier inntil de genetiske analysene foreligger, og de mest aktuelle kryssninger kan settes opp på grunnlag av disse. På denne måten kan en sikre at mest mulig variasjon blir representert i kryssningene. For fremtidige undersøkelser vil en også understreke betydningen av at biologiske og genetiske data koordineres.

Vi vil takke P.T. Hognestad som lot oss bruke lokalene ved Statens Biologiske Stasjon Flødevigen, og G. Nævdal for gjennomlesning av artikkelen.

Dette arbeidet er delvis støttet av Norges Fiskeriforskningsråd (NFFR I.701.58 og NFFR I.701.48).

#### LITTERATUR

- ALLENDORF, F.W. and UTTER, F.M. 1979. Population Genetics. P. 404-454 in HOER, W.S. and RANDALL, D.J. ed. Fish Physiology VII. Academic Press, New York.
- BILTON, H.T. and ROBINS, G.L. 1971. Effects of starvation, feeding, and light period on circulus formation on scales of young sockeye salmon (Onchorhynchus nerka). J. Fish. Res. Bd Can. 28: 1749-1755.
- CUSHING, D.H. 1975. Marine Ecology and Fisheries. Cambridge University Press, Cambridge. 278 pp.
- DANNEVIG, H. og HANSEN, S. 1952. Faktorer av betydning for fiskeeggenes og fiskeyngelens oppvekst. FiskDir. Skr. Ser. HavUnders., 10 (1): 1-36.
- ELLERTSEN, B., MOKSNESS, E., SOLEMDAL, P., TILSETH, S., WESTGÅRD, T. and ØIESTAD, V. 1982. Growth and survival of cod larvae in an enclosure. Experiments and mathematical model. Int. Coun. Explor. Sea Symp. Early life history of fish, April 1979. (In press.).
- ELLERTSEN, B., MOKSNESS, E., SOLEMDAL, P., STRØMME, T., TILSETH, S., WESTGÅRD, T. and ØIESTAD, V. 1980b. Some biological aspects of cod larvae (Gadus morhus L.). FiskDir. Skr. Ser. HavUnders., 17: 29-47.
- HARRIS, H. and HOPKINSON, D.A. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland, Amsterdam.

- JØRSTAD, K.E. 1979. Populasjonsgenetikk - torsk og sild. NFFR I. 701.47. Halvårsrapport, 1979: 1-24. [Mimeo.]
- JØRSTAD, K.E. SOLBERG, T. and TILSETH, S. 1980. Enzyme polymorphism expressed in newly hatched cod larvae and genetic analysis of larvae exposed to hydrocarbons. Coun. Meet. int. Coun. Explor. Sea, 1980 (F: 22): 1-16. [Mimeo.]
- JØRSTAD, K.E. REISEGG, J. og GODØ, O.R. 1981. Genetisk undersøkelse av merket torsk. Fisken Hav., 1981 (2):
- MOKSNESS, E. 1981. Survival, growth and food uptake of capelin larvae (Mallotus villosus) in a constructed basin, compared with laboratory and field observations. (Manus.).
- MØLLER, D. 1966. Genetic differences between cod groups in the Lofoten area. Nature, 212: s. 834.
- MØLLER, D. 1968. Genetic diversity in spawning cod along the Norwegian coast. Hereditas, 60: 1-32.
- PANELLA, G. 1974. Otolith growth patterns: an aid in age determination in temperate and tropical fishes. P. 28-29 in BAGENAL, T.B. ed. The ageing of fish. Unwin Brothers Ltd., Old Woking, Surrey, England.
- ROLLEFSEN, G. 1933. The otoliths of the cod. FiskDir. Skr. Ser. HavUnders., 4 (3): 1-14+2 plates.
- SIEGEL, S. 1956. Nonparametric statistics for the behavioural science. McGraw-Hill, Kogakusha, Tokyo.
- SOKAL, R.R. and ROHLF, F.J. 1969. Biometri. W.H. Freeman and Co., San Fransisco, California.
- WARD, R.D. and BEARDMORE, J.A. 1977. Protein variation in the plaice (Pleuronecta platessa L.). Genetic Research Comb., 30: 45-62.

- WIBORG, K.F. 1957. Factors influencing the size of the year classes in the Arcto-Norwegian tribe of cod. FiskDir. Skr. Ser. HavUnders., 11 (8): 1-24.
- WILLIAMS, T. and BEDFORD, B.C. 1974. The use of otoliths for age determination. P. 114-124 in BAGENAL, T.B. ed. The ageing of fish. Unwin Brothers Ltd., Old Woking, Surrey, England.