

Differenzierung von Seelachsbeständen mit Hilfe der EPIC-PCR

1 Hintergrund und Ziele

Die Anforderungen an die Rückverfolgbarkeit von Fischereierzeugnissen werden vor dem Hintergrund wachsender gesetzlicher Anforderungen und Verbrauchervünschen immer größer [1, 2, 3]. Somit steigt auch der Bedarf an Untersuchungsverfahren, die sich für die Kontrolle der Rückverfolgbarkeit im Rahmen der Lebensmittelüberwachung eignen.

Es wurde untersucht, ob sich die durch den ICES (*International Council for the Exploration of the Sea*) klassifizierten Seelachsbestände (*Pollachius virens*) im Nordost-Atlantik mit Hilfe einer molekularbiologischen Methode, der EPIC-PCR (*Exon primed, Intron-crossing Polymerase Chain Reaction*), differenzieren lassen. Außerdem wurde an Hand einer Probe aus dem Handel geprüft, ob sie sich dem Herkunftsbestand zuordnen lässt.

2 Material & Methoden

(I) Probenmaterial

- Auswahl von 130 Seelachsproben aus der Nordsee, der Nordost- Arktis, Island und Ostgrönland
- Zusätzlich wurden 31 Handelsproben aus der Nordsee untersucht

→ Insgesamt wurden 161 Proben untersucht.

(II) Extraktion der DNS mit Hilfe der CTAB-Methode [4]

(III) Primertests

- Es wurden neun EPIC- Primersysteme an jeweils 3 Proben aus der Nordsee getestet

→ Erfolgskontrolle der PCRs mit Hilfe der Agarose- Gelelektrophorese (Abb. 1).

- Untersuchung der Variabilität der PCR-Produkte durch direkte Sequenzierung bzw. durch eine RFLP (*Restriction fragment length polymorphism analysis*) an Hand von jeweils 10 Proben aus der Nordsee, Island und Ostgrönland

→ Auswahl der **Primer Act 2F/2R [5]** und **CalmEx 4F/5R [6]** für die Reihenuntersuchung.

(III) Reihenuntersuchung

- Sequenzierung der PCR- Produkte von CalmEx 4F/5R

→ Auswertung von 3 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) als mögliche Marker (Abb. 2).

- Analyse der PCR-Produkte von Act 2F/2R mit der RFLP auf Basis zwei verschiedener Restriktionsenzyme (HpyCH4 IV und Taq α I)

→ Auswertung von jeweils drei polymorphen Banden als mögliche Marker (Abb. 3).

(IV) Statistische Auswertung

- Untersuchung der Differenzierung über die einzelnen Marker mit Hilfe von paarweisen genetischen Distanzen (N_e 's D und Φ_{ST}) sowie einer AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*)

- Auswertung über alle Marker über eine Diskriminanzanalyse

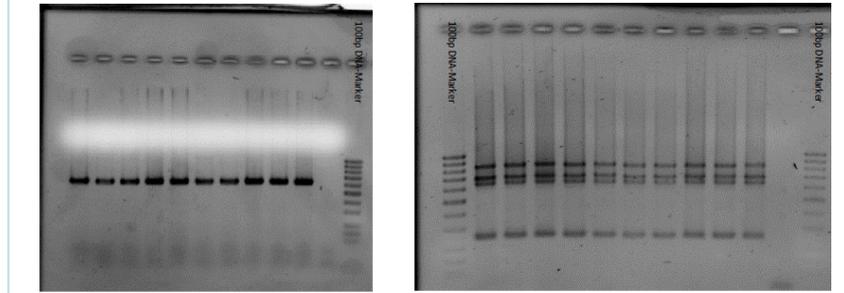


Abb. 1: PCR-Produkte von CalmEx 4F/5R (links) und Act 2F/2R (rechts) (2,5 %iges Agarosegel, Färbung mit Ethidiumbromid)

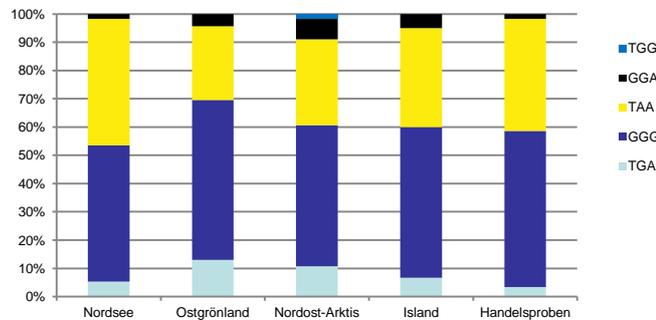


Abb. 2: Relative Häufigkeiten der SNPs in den PCR- Produkten von CalmEX 4F/5R

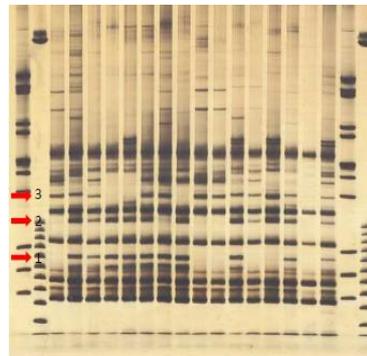


Abb. 3: Polymorphe Banden in der RFLP von Act 2F/2R (HpyCH4 IV, 12,5 %iges Polyacrylamidgel, Silberfärbung)

3 Ergebnisse

- Nur geringe Variation zwischen den Beständen
- Weder durch einzelne noch durch multiple Auswertung war eine eindeutige Differenzierung der durch den ICES klassifizierten Bestände möglich (Abb. 4)
- Innerhalb der Bestände ist ein hohes Maß an genetischer Variation vorhanden
- In der Nordostarktis konnte ein Genotyp detektiert werden, der in den anderen Beständen nicht auftritt (Abb. 2)

4 Ausblick

Um die Stabilität der genetischen Verteilung zu überprüfen, könnte eine Untersuchung auf Basis einer gestaffelten Probenahme während der Laich- (Winter) und der Fresszeit (Sommer) erfolgen.

Desweiteren sind Untersuchungen der grundsätzlichen Populationsstruktur des Seelachses notwendig, da die durch den ICES klassifizierten Bestände auf Grund der Migrationsbewegungen nicht notwendiger Weise biologische Einheiten darstellen.

Literatur:

- [1] Europäische Union (2002). Verordnung (EG) Nr. 178/2002. [2] Europäische Union (2010). Verordnung (EG) Nr. 1005/2008. [3] MSC (2012). Fischeinkauf: Nachhaltigkeit als Kaufkriterium gewinnt zunehmend an Bedeutung [4] Rogers, S.O. und Bendich, A.J. (1985). Extraction of DNS from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology* 5, 69-76. [5] Atarhouch et al. (2003). Primers for EPIC amplification of intron sequences for fish and other vertebrate population genetic studies. *Bio. Techniques*. 35, 676-682. [6] Chow (1998). Universal Primer for Calmodulin Gene Intron in Fish. *Fisheries Science*. 64(6), 999-1000.

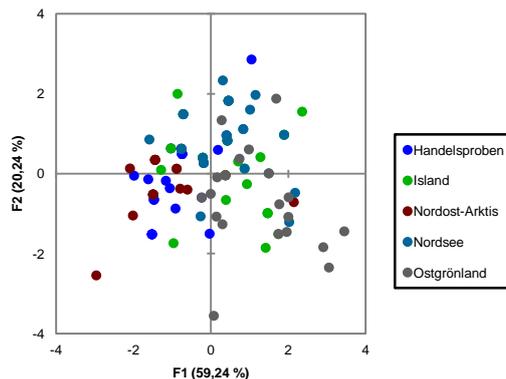


Abb. 4: Diskriminanzanalyse über alle Marker und Proben