

Genetisk karakterisering av ørretbestander i utvalgte innlandsvann i Aust-Agder.

Av Halvor Knutsen og Per Erik Jorde

Zoologisk avdeling, Biologisk institutt, Universitetet i Oslo, Pb. 1050 Blindern, 0316

Oslo

og

Havforskningsinstituttet, Forskningsstasjonen Flødevigen, 4817 His

Innhold

Forord.....	3
1 Innledning	4
2 Materiale og metode	5
2.1 Områdene.....	5
2.2 Innsamling av ørret.....	8
2.3 Genetisk analyse.....	8
2.4 Statistisk bearbeiding.....	9
3 Resultater og diskusjon.....	9
3.1 Genetisk variasjon innen og mellom vannene	10
3.2 Substruktur.....	11
3.3 Genetiske forandringer.....	12
4 Sammendrag og konklusjon.....	15
5 Litteraturliste.....	15

Forord

Vi vil takke Fylkesmannen i Aust-Agder, Miljøvernavdelingen og Landbruksavdelingen; Aust-Agder Fylkeskommune, Regionalavdelingen, Næringsseksjonen og Direktoratet for Naturforvaltning for økonomisk støtte til dette prosjektet. Dag Matzow ved Miljøvernavdelingen har vært behjelpelig med utlån av el-fiskeutstyr og Havforskningsstasjonen Flødevigen har latt ultrafryser og båt stå til vår disposisjon under feltperioden. Jan Atle Knutsen og Jan Henrik Simonsen takkes for hjelp med fangst av 0+ ørret under feltperioden. Arbeidet er utført av undertegnede ved Forskningsstasjonen Flødevigens genetikklaboratorium med god hjelp av Kate og Svein Erik Enersen.

1 Innledning

Alf Dannevig, best kjent som pioner innen havforskningen, var blant de første som påviste en sammenheng mellom tilførsel av sur nedbør fra Europa og fiskedød i innlandsvann på Sørlandet (Dannevig 1959). I respons på den omfattende fiskedøden som skjedde i 1960- og begynnelsen av 1970-åra (Jensen og Snekvik 1972), ble det blant annet i Agderfylkene satt i gang omfattende kalking av en rekke vann og vassdrag. Denne kalkingen foregår fortsatt mange steder.

Det har til nå vært gjort lite for å undersøke hvilken effekt kalkingen har på ørretbestandene i området. Utførte undersøkelser begrenser seg til kjemisk vannanalyse samt sporadisk prøvefiske for fisketellinger. Fortsatt vet vi derfor lite eller ingenting om i hvilken grad ørretbestandene skiller seg i arvelige faktorer, hvorvidt det er én eller flere avgrensa bestander innen de enkelte vann og vassdrag, og om kalkingen har klart å ivareta de lokale ørretbestandenes genetiske mangfold og særtrekk.

Tekniske og vitenskapelige nyvinninger de siste årene har åpnet for nye muligheter til å belyse disse viktige spørsmålene. I og med utviklingen av nye genetiske metoder, spesielt de såkalte mikrosatellit-DNA analysene (Estoup et al. 1993, Slettan et al. 1995, O'Reilly et al. 1996), er det nå mulig å karakterisere fiskebestandenes genetikk som den så ut tidligere og å sammenlikne med dagens situasjon. Mikrosatellitter er en spesiell type gener, som ikke koder for noe produkt, men som har vist seg verdifulle i populasjonsbiologiske studier, og som kan undersøkes fra gammelt materiale, inkludert fiskeskjell og otolitter. Slikt materiale er rutinemessig samlet inn fra ørret og andre arter (f.eks. laks) for andre formål i de siste hundre år, og representerer i dag en unik mulighet til å studere genetiske forandringer i fiskebestander over lange tidsrom (se f.eks. Nielsen et al. 1999). Genetiske forandringer over tid gjenspeiler både forandringer i bestandssammensetningen, f.eks. som følge av utsettinger oa., og forandringer som skyldes små effektive gytebestander lokalt (se Jorde og Ryman 1996, Luikart et al. 1998, 1999).

I denne rapporten har vi benyttet gammelt skjellmateriale av ørret som ble samlet inn av Alf Dannevig på 1930-tallet fra vann i Aust-Agder. Disse skjellene er fremdeles bevart og tilgjengelig på Flødevigen og ved å sammenligne disse genetisk med ferske prøver fra de samme vannene har vi gjort en første kartlegging av bestandsstruktur og genetiske forandringer hos innlandsørret på Sørlandet.

2 Materiale og metode

Valg av område (Figur 1) og bestander for denne undersøkelsen ble delvis basert på tilgjengelighet av gammelt materiale. For populasjonsgenetiske studer kreves et rimelig stort antall individer fra hver lokalitet, og vi har valgt vann der vi har skjellprøver fra minst 60 fisk fra hvert tidspunkt. I tillegg til gammelt materiale ble nye prøver samlet inn høsten 2000.

2.1 Områdene

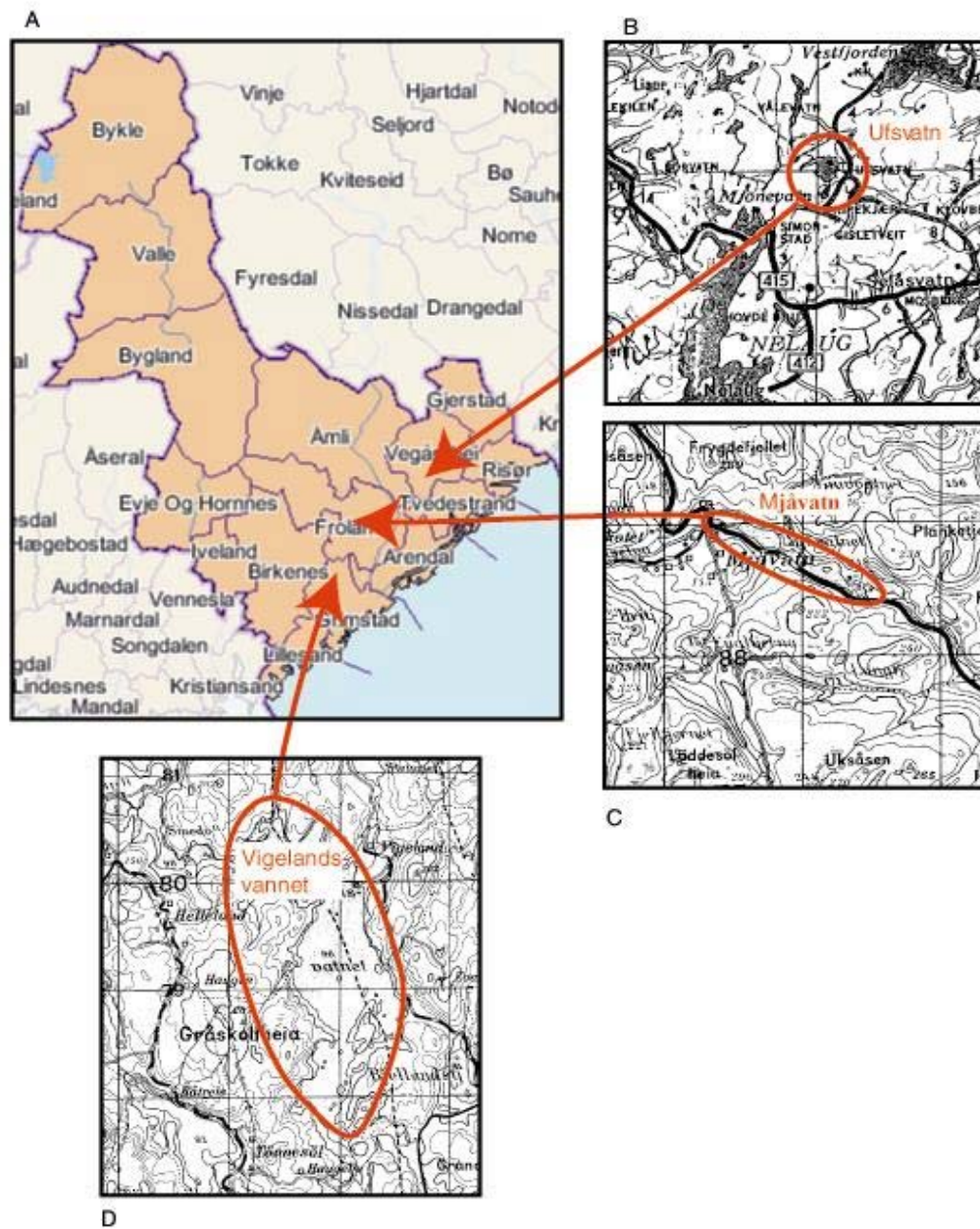
Ufsvatn i Åmli kommune (Figur 1B) drenerer til Nelaug. Det har vært forsuret og kalking her ble satt i gang i 1992 og pågår fremdeles. Ørreten har ikke vært utryddet og bestanden har vært vurdert som god siden første vurdering i 1975. I 1992, før kalking, ble den karakterisert som avtatt. Ørret (60 stk) ble samlet inn høsten 2000 ved el-fiske i bekken (hovedbekken fra syd-øst). Fra dette vannet inkluderer vi dessuten skjellprøver fra 65 ørret samlet inn i 1933.

Mjåvatn i Froland kommune (Figur 1 C) ligger i et vassdrag som har vært ganske surt, men det har alltid vært ørret her. Vannene oppstrøms i samme vassdrag har vært regnet som fisketomme (Blengsvann, Kråkevann, Rosævann, Massævann). Rosævann har vært kalket siden 1985 og Mjåvatn blir indirekte kalket fra dette oppstrøms vassdraget. Det ble flyttet inn i underkant av 100 ørret fra Skjersæbekken (som tilhører Tovdalsvassdraget)

omkring 1985. Nå er det ørret i alle vannene. Ørret (61 stk) for genetisk analyse ble også her samlet i bekken, og vi inkluderer skjellprøvver fra 65 ørret samlet inn i 1937.

Vigelandsvann i Arendal og Grimstad kommuner (Figur 1 D) er en del av Uråna som drenerer til Rore. Vassdraget har vært forsuret og har vært kalket siden 1991.

Vigelandsvann ble regnet som fisketomt i 1975, men med liten bestand i 1983 (før kalking). Oppstrøms har noen vann vært fisketomme (Gangvann, mens andre alltid har hatt fisk f. eks. Snøløsvann, Hemningstveitvann). Det har vært satt ut noe ørret, av ulike stammer, så sent som ca 1990. I dag er det fisk (ørret, abbor) i alle vannene. Ørret (60 stk) ble i dette vannet samlet inn ved el-fiske i innløpsbekken og ved setting av finmasket garn i utløpet til innløpsbekken. Fra dette vannet har vi ikke gamle skjellprøver.



Figur 1. Kart over hvor de ulike vannene er lokalisert i Aust-Agder

2.2 Innsamling av ørret

For ikke å utøve for stor innvirkning på ørret-bestanden, ble ørret samlet inn som yngel (aldersklasse 0+ og 1+) fra tre vann, Ufsvatn, Mjåvatn og Vigelandsvann (se Figur 1). Feltperioden strakte seg fra juli 2000 til desember 2000. Høsten var preget av mye nedbør som gjorde feltarbeidet vanskelig å gjennomføre. I overkant av 60 ørret ble samlet inn fra hvert vann (se ovenfor), enten ved el-fiske i utløpsbekkene eller ved bruk av finmasket garn i bekkeutløpene. Straks etter innsamling ble fisken brakt til Havforskningsinstituttet, Forskningsstasjonen Flødevigen, der de ble frosset ned ved -80°C og lagret til genetiske analyser.

2.3 Genetisk analyse

DNA ble ekstrahert fra muskelvev fra nyere material (2000) og fra tørka fiskeskjell fra det eldre materialet (1933-1937) ved hjelp av et kommersielt kjemiset ("DNAeasy tissue kit", Quiagen, USA). Fra hvert vann og år ble DNA fra 60-65 ørret ekstrahert og benyttet til videre genetiske analyser. Totalt har vi analyser fra 310 ørret for dette studiet.

Den genetiske analysen er basert på såkalt mikrosatellitt DNA. Mikrosatellitt DNA er regnet som en svært informativ metode i og med at det ofte forekommer mange ulike genvarianter (alleler) i hvert enkelt gen (lokus). For å få nok DNA fra hvert enkelt gen, ble mikrosatellittene amplifisert opp ved hjelp at en metode som kalles PCR (Polymerase Chain Reaction) på en PCT-100 maskin (MJ Research, USA). Prøvene ble videre analysert på en Alf Express II automatisk sekvenseringsmaskin (Amersham/Pharmasia, Biotech). Resultatet av analysene er genotyper for i alt 4 mikrosatellitter, betegnet som *U60*, *U73* (Estoup et al. 1993), *SSA197* (O'Reilly et al. 1996) og *MST543* (Estoup et al. 1998). Den videre statistiske bearbeidingen baseres på disse genotypene og på opptellinger (frekvenser) av de ulike genvariantene.

2.4 Statistisk bearbeiding

Allelfrekvensene i hvert utvalg (vann og år) ble regnet ut fra genotypene ved opptelling av alleler i hvert mikrosatellitt lokus. Mengde genetisk variasjon ble estimert fra allel- og genotypfrekvensene etter Nei og Chesser (1983), som gjennomsnittlig "heterozygositet" (H_S). Den relative fordeling av genetisk variasjon mellom vann ble estimert som F_{ST} etter Weir og Cockerham (1984), mens mengde genetiske forandringer over år innen vann ble estimert som F_K' etter Pollak (1983). Vi testet genotypfordelingen i hvert vann med den som forventes i en enkel populasjon (Hardy-Weinberg fordelingen) med en eksakt test (Guo og Thompson, 1992).

3 Resultater og diskusjon

Generelt var ny-innsamlet materiale lett å analysere. Amplifiseringen av DNA var god, og analysen av bandmønstre og tolkning av genotyper forløp uten større problemer. Replikate analyser av deler av materialet viste høy grad av repeterbarhet. For det gamle materialet var situasjonen noe annerledes. Generelt ble bandmønsteret svakere enn ved bruk av nytt materiale, noe som tyder på lavere amplifisering av DNA under PCR-reaksjonene. Dette ble delvis korrigert ved å øke antall reaksjonssyklus for gammelt materiale. Allikevel lot mikrosatellitten *U73* seg bare sporadisk amplifisere fra slikt materiale, og de fleste gamle individer kunne derfor ikke genotypes for dette locuset. Mikrosatellitten *MST543* ga varierende, ikke-repeterbare bandmønstre for det aller eldste materialet (fra Ufsvatn), og kunne ikke genotypes med sikkerhet. Vi ser derfor bort fra disse tilfellene i den videre analysen.

3.1 Genetisk variasjon innen og mellom vannene

Den genetiske variasjonen hos ørreten viste seg å være ulik mellom vann og også innen vann over tid (Tabell 1). I gjennomsnitt har Ufsvatn betydelig lavere grad av variasjon (gjennomsnittlig H_S år 2000: 0,171) enn Mjåvatn (0,496) og Vigelandsvann (0,482). Det ser ut til at variasjonen i Mjåvatn har økt siden 1930-tallet, spesielt i *SSA197* lokuset. En slik økning er teoretisk forventet etter innføring av fisk fra en genetisk ulik stamme. Siden det er satt ut fisk i Mjåvatn fra et annet område, om enn i begrensa antall (se ovenfor), er det trolig at dette forklarer den observerte økningen. Vi har imidlertid ikke genetiske data fra donorstammen (Skjersæbekken i Tovdalsvassdraget), og kan derfor ikke slå dette fast med sikkerhet.

For Ufsvatn er situasjonen en helt annen enn i Mjåvatn. Det synes som om mye av den genetiske variasjonen som fantes her i *SSA197* lokuset på 1930-tallet er forsvunnet i mellomtiden. Også for de øvrige genene, unntatt *MST543*, er variasjonen meget lav i dette vannet. Mulige forklaringer til dette tilsynelatende tap av genetisk variasjon i Ufsvatn er diskutert nedenfor.

Tabell 1. Mål på genetisk variasjon (H_S etter Nei & Chesser 1983) i alle vann og år.

Vann, år	Locus				Gjennomsnitt
	<i>U60</i>	<i>U73</i>	<i>SSA197</i>	<i>MST543</i>	
Mjåvatn, 1937	0,174	-*	0,047	0,575	0,265
Mjåvatn, 2000	0,366	0,480	0,514	0,625	0,496
Mjåvatn, gj.snitt	0,270	0,480	0,280	0,600	0,408
Ufsvatn, 1933	0,000	-*	0,495	-*	0,247
Ufsvatn, 2000	0,069	0,068	0,000	0,549	0,171
Ufsvatn, gj.snitt	0,034	0,068	0,247	0,549	0,224
Vigelandsvann	0,260	0,422	0,556	0,689	0,482
Innen vann og år, H_S	0,174	0,323	0,322	0,609	0,357
Over vann og år, H_T	0,187	0,358	0,354	0,797	0,424
Mellom vann (2000), F_{ST}	0,073	0,136	0,131	0,328	0,217

* ingen data (se ovenfor)

Som vist ovenfor er det ulik mengde genetisk variasjon (H_S) innen de ulike vannene. Dette tyder (ikke uventet) på at vi har å gjøre med genetisk forskjellige ørretbestander i hvert vann. De genetiske forskjellene kan kvantifiseres ved F_{ST} som måler hvor stor andel av den totale genetiske variasjonen som kan forklares som forskjeller mellom bestander (resten utgjøres av forskjeller mellom individer innen bestandene). Den nederste linja i Tabell 1 angir F_{ST} mellom vannene i dag (år 2000) og viser at 21,7% av all den genetiske variasjonen som vi finner hos ørreten i dette studiet skyldes genetisk differensiering mellom de tre vannene. Dette er bare litt mindre enn hva som tidligere er funnet mellom innlandsbestander av ørret fra hele Norge og Sverige samlet (se Ryman 1983), noe som indikerer at vi (fortsatt) har stor genetisk mangfold hos ørreten i Aust-Agder. Denne differensieringen er betydelig større enn den vi har funnet for sjøørret langs Skagerrakkysten (se Knutsen et al. 2001 a, b). Dette skyldes mindre barrierer i sjøen hvor utveksling av individer mellom bestander finner sted.

3.2 Substruktur

Genotypefordeling mellom individene i et vann forteller noe om bestandenes struktur. I bestander som ikke er oppdelt i undergrupper forventer vi teoretisk at genvariantene fordeler seg tilfeldig blant individene. Andelen individer som bærer to gitte genvarianter er da lik produktet av forekomsten av disse to genvariantene i bestanden (Hardy-Weinbergs prinsipp). Dersom, på den annen side, bestanden er oppdelt i to eller flere genetisk ulike underbestander vil vi kunne finne et tilsynelatende underskudd av individer (heterozygoter) som bærer to ulike genvarianter (Wahlunds prinsipp). Størrelsen på dette underskuddet måles ved F_{IS} , som er positiv ved underskudd av heterozygoter og negativ ved overskudd av slike genotyper.

I våre analyser viser Ufsvatn et avvik fra Hardy-Weinberg forventningen med klart underskudd av heterozygoter både i år 1933 og 2000 (se Tabell 2). Som forklart ovenfor innebærer dette sannsynligvis at vi har mer enn én ørretbestand i dette vannet og at

det undersøkte materialet representerer en blanding av ørret fra (minst) to bestander. Siden vi ikke vet om blandingen er lik i materialet fra 1933 og fra 2000 er det usikkert om den observerte reduksjonen i genetisk variasjon er reell, eller om den delvis kan forklares ved ulik representasjon av bestandene i de to åra.

Tabell 2. Oversikt over hvilke mikrosatellitter som viser avvik fra Hardy-Weinberg. F_{IS} verdien indikerer overskudd (negativ verdi) eller underskudd (positiv verdi) relativt til det som forventes i henhold til Hardy-Weinberg.

Vann, år	F_{IS} - verdier				Gjennomsnitt
	<i>U60</i>	<i>U73</i>	<i>SSA197</i>	<i>MST543AE</i>	
Mjåvatn, 1937	-0,097	⁻²	-0,016	-0,097	-0,070
Mjåvatn, 2000	0,058	0,13	-0,089	0,105	-0,018
Ufsvatn, 1933	⁻¹	⁻²	0,596***	⁻²	0,596**
Ufsvatn, 2000	0,489	-0,02	⁻¹	0,252**	0,240
Vigelandsvann, 2000	-0,172	0,093	0,084	-0,005	0,000

¹ Ingen genetisk variasjon, derfor er ingen F_{IS} verdi gitt.

² Ingen data (se ovenfor)

Statistisk signifikansnivå: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.3 Genetiske forandringer

Ut fra forskjellene i allelfrekvenser i Mjåvatn og Ufsvatn på 1930-tallet og i dag (2000) kan vi estimere mengden genetiske forandringer i hvert vann i denne perioden. Tabell 3 gir estimater på forandringen i hvert lokus og som et gjennomsnitt over alle mikrosatellitter for de to vannene separat.

Tabell 3. Mål på genetiske forandringer (F_K') i Mjåvatn og Ufsvatn fra 1930-tallet til i dag. Estimerer av genetisk effektiv populasjonsstørrelse (N_e , med 95% konfidensintervall, CI) er gjort under antagelse at forandringene skyldes tilfeldig genetisk drift og at generasjonstiden er ca 7 år. Se tekst for diskusjon.

Locus	Mjåvatn	Ufsvatn
<i>U60</i>	0,130	0,054
<i>U73</i>	_*	_*
<i>SSA197</i>	0,077	0,0818
<i>MST543AE</i>	0,035	_*
Gjennomsnitt F_K' (CI)	0,055 (0,024-0,134)	0,078 (0,025-0,338)
Ant generasjoner	9	10
Estimert N_e (CI)	82,2 (33,5 - 184,6)	63,9 (14,8 - 196,5)

*) Data ikke tilgjengelig for eldre materiale

I populasjoner av begrenset størrelse vil det alltid forekomme tilfeldige genetiske forandringer, såkalt genetisk drift, over tid. Gitt at det er vanskelig med sikkerhet å slå fast årsaken til de observerte genetiske forandringene er det interessant å undersøke hvorvidt vi kan forklare forandringene bare som en konsekvens av slik tilfeldig drift. Dette kan vi gjøre fordi det, i fravær av andre forstyrrende faktorer, finnes en enkel sammenheng mellom den genetisk effektive populasjonsstørrelsen (N_e) og observert drift. Etter teorien (Nei & Tajima 1981, Waples 1989, Jorde & Ryman 1995) har vi følgende omtrentlige forhold:

$$N_e = \frac{G}{2F_K'}$$

der F_K' er den observerte genetiske driften i tidsperioden og G er antall ørretgenerasjoner som denne perioden tilsvarer. Tidligere demografiske studier av innlandsørret antyder en generasjonstid på ca 7 år (Jorde og Ryman 1996). Dersom dette er tilfelle også her

tilsvarende undersøkelsesperioden 9 generasjoner for Mjåvatn (1937-2000) og noe under 10 generasjoner for Ufsvatn (1933-2000). Fra data som vist i Tabell 3 estimerer vi da at den effektive størrelsen på ørrepopulasjonen i disse vannene er henholdsvis 82 (usikkerhet: 33,5 - 184,6) for Mjåvatn og 64 (usikkerhet: 14,8 - 196,5) for Ufsvatn. Det er interessant å merke seg at disse to estimatene, selv om de er lave, ligger innenfor hva som er funnet tidligere hos innlandsørret (50-500: Jorde og Ryman 1996). Dette kan tyde på at de genetiske forandringene som vi observerer skyldes tilfeldigheter i små bestander, enten fordi bestandene alltid har vært små eller fordi de har gått igjennom en flaskehals, kanskje i forbindelse med forsuringen. Imidlertid, som diskutert ovenfor, er det trolig at iallfall en del av den genetiske forandringen som har funnet sted i Mjåvatn skyldes innblanding av fremmed fisk, og ikke genetisk drift. I så fall kan bestanden effektivt sett være større enn beregnet her. Også for Ufsvatns vedkommende er det usikkerheter forbundet med beregningene som vi har gjort av effektiv populasjonsstørrelse. Dette ikke bare på grunn av det bredere statistiske konfidensintervallet for dette vannet (og som skyldes at færre gener er undersøkt her), men fordi genotypedataene tyder på at dette vannet kan inneholde flere enn én ørrebestand (se ovenfor). Imidlertid er forandringen av en slik karakter (tap av genetisk variasjon) som vi kan forvente av akkumulert genetisk drift i små bestander, og dette styrker antagelsen om at bestanden(e) i dette vannet er eller har vært effektivt små.

4 Sammendrag og konklusjon

Ørret fra utvalgte vann i Aust-Agder ble karakterisert genetisk ved hjelp av såkalt mikrosatellitt-DNA teknikk. Resultatene viser at ørreten i ulike vann er genetisk forskjellige og at drøyt 20% av den totale genetiske variasjonen skyldes forskjeller mellom bestandene. Fra to av vannene ble også gammelt skjellmateriale fra 1930-åra undersøkt genetisk og dette avdekket tildels store genetiske forandringer i ørretbestandene fram til i dag. I det ene vannet (Mjåvatn) kan de observerte genetiske forandringene forklares ved utsetting av ikke-stedegen fisk, mens det i det andre (Ufsvatn) ser ut til å ha funnet sted tap av genetisk variasjon som følge av lav effektiv populasjonsstørrelse, eventuelt forårsaket av forsuring. Resultatene understøtter viktigheten av en bredere kartlegging av ørretbestandene i Aust-Agder og de forandringer de har vært igjennom som følge av menneskelig påvirkning.

5 Literaturliste

Allendorf, F. W. & Phelps, S. R., 1981. Use of allelic frequencies to describe population structure. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 1507-1514.

Dannevig, A., 1959. Nedbørens innflytelse på vassdragenes surhet, og på fiskebestanden. *Jeger og Fisker* 3-59.

Elliot, J. M., 1994. *Quantitative ecology and the brown trout*. Oxford series in ecology and evolution. Oxford University Press.

Estoup, A., Presa, P., Krieg, F., Vaiman, D. & Guyomard, R., 1993. (CT)-n and (GT)-n microsatellites: A new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity* 71: 488-496

Estoup, A., Rousset, F., Michalakis, Y., Cornuet, J. M., Adriamanga, M. & Guyomard, R., 1998. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology* 7: 339-353.

Guo S. W. & Thompson E. A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372

Jensen, K.W. & Snekvik, E., 1972. Low pH levels wipe out salmon and trout populations in southernmost Norway. *Ambio* 1: 223-225.

Jorde, P. E. & Ryman, N., 1995. Temporal allele frequency change and estimation of effective size in populations with overlapping generations. *Genetics* 139: 1077-1090.

Jorde, P. E. & Ryman, N., 1996. Demographic genetics of brown trout (*Salmo trutta*) and estimation of effective population size from temporal change of allele frequencies. *Genetics* 143: 1369-1381.

Knutsen, H., Knutsen, J. A., Jorde, P. E. (2001a). Genetic evidence for mixed origin of recolonized sea-trout populations. *Heredity* 87: 207-214

Knutsen, H., Jorde, P. E. and Knutsen, J. A.(2001b). Genetisk overvåkning av sjø-ørret populasjoner på Skagerrakkysten. Fylkesmannen i Aust-Agder, Miljøvernveddelingen. Rapport nr. 3-2001, ISSN 0800-8523.

Luikart, G., Sherwin, W. B., Steele, B. M., & Allendorf, F. W., 1998. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology* 7: 963-974.

- Luikart, G., Cornuet, J.-M. & Allendorf, F. W. 1999. Temporal changes in allele frequencies provide estimates of population bottleneck size. *Conservation Biology* 13: 523-530.
- Nei, M. & Chesser, R. K., 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Ann. Hum. Genet.* 47: 253-259.
- Nielsen, E. E., Hansen, M. M. & Loeschcke, V., 1999. Analysis of DNA from old scale samples: technical aspects, applications and perspectives for conservation. *Hereditas* 130: 265-276.
- O'Reilly, P. T., Hamilton, L. C., McConnell, S. K. & Wright, J. M., 1996. Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 2292-2298.
- Raymond, M., & F. Rousset., 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Ryman, N., 1983. Patterns of distribution of biochemical genetic variation in salmonids: differences between species. *Aquaculture* 33: 1-21.
- Slettan, A., Olsaker, I. & Lie, O., 1995. Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311, SSOL417 loci. *Animal Genetics* 26: 281-282.