

# **Genetisk overvåkning av sjø-ørret populasjoner på Skagerrakkysten.**

Av Halvor Knutsen <sup>1</sup>, Per Erik Jorde <sup>1</sup> og Jan Atle Knutsen <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zoologisk institutt, Biologisk avdeling, Universitetet i Oslo P.O.Box 1050 Blindern, N-0316 Oslo.

<sup>2</sup>Havforskningsinstituttet, Forskningsstasjonen Flødevigen, 4817 His.

## *Innholdsfortegnelse*

Forord.....	3
Sammendrag .....	4
1 Innledning .....	5
2 Metode .....	7
2.1 Innsamling av ørret.....	7
2.2 Områdebeskrivelse .....	7
2.3 Genetisk Analyse.....	10
2.4 Statistisk analyse .....	10
3 Resultater .....	11
4 Konklusjon.....	14
5 Appendiks .....	16

## ***Forord***

Vi vil takke Fylkesmannen i Aust-Agder, Miljøvernavdelingen, Direktoratet for naturforvaltning og Havforskningsinstituttet Flødevigen for økonomisk støtte til dette prosjektet. Dag Matzow ved Miljøvernavdelingen har vært behjelpelig med utlån av el-fiskeutstyr og Havforskningsstasjonen Flødevigen har latt ultrafryser stå til vår disposisjon under feltperioden. Bror Jonsson, Nina Jonsson og Henry Knutsen takkes for hjelp med fangst av 0+ ørret under feltperioden.

Tusen takk for all hjelp!

Resultatene fra denne rapporten er publisert internasjonalt i *Heredity* (2001). *In press.*

### ***Sammendrag***

For sjø-ørretens vedkommende er det uklart i hvilken grad lokale bekker og elver representerer selvstendige bestander eller, alternativt, utgjør deler av ett eller flere systemer av mer eller mindre innbyrdes avhengige delbestander. I denne studien ble sjø-ørret (0+) i kalkede og ikke kalkede vassdrag karakterisert ved hjelp av 11 genetiske markører (izoenzym – loci). Resultatene tyder på at ørreten i hver enkelt bekk utgjør separate populasjoner/bestander, og at det bare i liten grad er utveksling av individer mellom bekkene. Ørretene i hver enkelt bekk må derfor betraktes som separate forvaltningsenheter. En sammenheng mellom genetisk likhet og geografisk posisjon ble funnet, noe som tyder på at den (minimale) utvekslingen som finner sted foregår mellom nærliggende bekker. Et avvik fra den generelle sammenhengen mellom genetisk likhet og geografisk posisjon ble funnet for to av bekkene (Fjeldalsbekken og Steindalsbekken), som er de to kalkede bekkene i undersøkelsen. De to bekkene hadde også et avvik fra Hardy-Weinberg likevekten i enkelte loci og samtidig en ikke tilfeldig assosiering av alleler (såkalt ”koblings-ulikevekt”). Disse observasjonene tyder på at de nåværende populasjonene i disse bekkene er nyetablerte eller påvirket genetisk av fisk fra andre vassdrag eller bekker.

## 1 Innledning

En god forvaltning av naturlig reproduserende organismer krever kunnskap om forvaltningsenheten, dvs. den lokale populasjonen. For en del arter, spesielt rene ferskvannsorganismer, er den lokale populasjonen lett identifiserbar ved lokaliteten den lever i, slik at forvaltningen kan konsentreres om lokaliteter som organismen lever i. For sjø-ørretens vedkommende er det imidlertid uklart i hvilken grad lokale bekker og elver representerer selvstendige bestander eller, alternativt, utgjør deler av ett eller flere systemer av mer eller mindre innbyrdes avhengige delbestander (såkalt metapopulasjons-struktur). Spørsmålet er hvorvidt de mange små og temporalt variable bekker og elver der sjø-ørreten gyter er i stand til å opprettholde en noenlunde permanent populasjon. Dette kommer frem som et vesentlig moment i Forvaltningsplan for sjøørret på Skagerrakkysten og i Oslofjorden (1996) hvor det står: *”I regionen finnes mange små og ustabile sjøørretbekker. Det er mulig at disse ikke kan opprettholde separate bestander, men at sjøørreten i flere bekker utgjør en bestand. En bestandsrettet forvaltning av sjøørret forutsetter at en kan finne frem til en avgrensning av bestandsenhetene.”*

Formålet med dette foreslåtte studiet er å karakterisere populasjonstrukturen hos sjø-ørret i kalkede og ikke kalkede vassdrag ved hjelp av et utvalg av genetiske markører. En slik tilnærming kan gi utfyllende informasjon til pågående og planlagte økologiske og demografiske undersøkelser utført av NINA og Havforskningsinstituttet Flødevigen, ved bl.a. å belyse de demografiske prosessene i et lengre tidsperspektiv. Tidsperspektivet oppnås fordi genetiske forandringer som forekommer innen lokalitetene har en viss innebygd "treghet". Den genetiske variasjonen som foreligger i naturlige bestander representerer resultatet av de demografiske prosessene som kontinuerlig pågår innen og mellom lokalitetene. Innen lokalitetene endrer mengden og sammensetningen av den genetiske variasjonen seg fra år til år i henhold til bl.a. populasjonenes størrelse (den såkalt genetisk effektive størrelsen) ved tilfeldig genetisk drift. Denne driften, sammen med naturlig seleksjon i respons på lokale miljøforhold, resulterer over tid både i tap av genetisk variasjon innen lokalitetene og i at lokale populasjoner divergerer og blir mer genetisk ulike. Utveksling av individer mellom lokalitetene vil, på den annen side, motvirke genetisk divergens og føre til

større genetisk likhet mellom ørret fra forskjellige lokaliteter og høyere grad av genetisk variasjon innen hver av dem. Dette studiet søker å karakterisere de demografiske prosessene indirekte; ved å analysere de genetiske konsekvensene de har.

## **2 Metode**

### **2.1 Innsamling av ørret**

For å belaste ørreten i de ulike små kystvassdragene minst mulig og samtidig få et rimelig antall ørret fra hver bekk, ble det i dette studiet benyttet ørretynge (såkalt 0+ gruppen). Det er viktig med et stort antall individer for at de estimatene skal være beheftet med minst mulig statistiske feil. El-fiske ble utført fra 14.06.1999 til 21.06.1999; en dag i hvert vassdrag. Det ble fanget ca. 80 individer i hver bekk (Vedlegg), og fangsten ble fordelt over en så stor del av bekken som mulig. Nært beslektede individer opptrer ofte i familiegupper tett sammen (Elliot 1994) og ved å prøvefiske over store deler av elvesystemet minimeres dette problemet (Allendorf & Phelps 1981).

Ørreten ble merket individuelt og fryst ned på  $-80^{\circ}\text{C}$  på tørris straks etter innsamling, og ble dretter transportert til Flødevigen Havforskningsstasjon der de ble lagt på ultrafryser ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) for lagring. Det totale materialet ble til slutt fraktet på tørris ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) til Isoenzymlaben, Biologisk Institutt, Universitetet i Oslo, for genetisk analyse.

### **2.2 Områdebeskrivelse**

Ørreten ble samlet inn i Aust-Agder i områdene beskrevet under (beskrevet etter Matzov et al. 1990) (se Figur 1).

#### **Langangsvassdraget**

Langangsvassdraget ender opp i Åbelvikfjorden ved Eydehavn etter å ha passert Langangsvatnet og Rånehølen. Vassdraget er tilgjengelig for sjøørret med noen bekker ovenfor Jordtjern, en strekning på omtrent 4,5 km. Av dette er ca 2,5 km gyttestrekning med varierende grusforhold. Det var høy tetthet av 0+ i hele gyttefeltet. Området er forøvrig kjent for å ha en god oppvandring av sjøørret.

### **Mørefjærbekken**

Mørefjærbekken ender opp ved Saltrød nær Stokke kirke. Sjørret kan vandre opp i Totjenna og inn i den nedre flate delen av Røydalsbekken. Vassdraget anses som viktig for reproduksjonen av sjørret til Tromøysundområdet. Bekken har gode oppvekstvilkår, særlig i den nedre delen.

### **Songebekken**

Songevassdraget munner ut i Songekilen i Tromøysund. Det er flere innsjøer på sjørretstrekningen: Songetjern, Mjåvatn, Bjordalstjern og Bjørnebotjern. Vassdraget er tilgjengelig for sjørret på en strekning av 3,5 km. Av dette er ca. 2 km gyttestrekning. Substratet er av stein og grov grus. Oppvekstforholdene for ørret er meget gode.

### **Allemansbekken**

Bekken munner ut innerst i Sømskilen ved Vessøya. Tilgjengelig strekning for fisk er 2 km. Bekken har en gyttestrekning på ca. 300 meter med substrat av sand og fin grus. Gode oppvekstvilkår med mange fine kulper. De nedre deler av bekken er jordbrukspåvirket.

I 1999 ble det foretatt graving av Vegvesenet i området, som resulterte i gjørmete/grumsete vann. Etter gravingen ble igangsatt undersøkte vi bekken på nytt og observerte ingen 0+, og kun enkelte 1+.

### **Sævelibekken**

Sævelibekken munner ut innerst i Vikkilen ved Grimstad. Den er tilgjengelig for sjørret over en strækning på i overkant av 300 meter. Bunnssubstratet er fin og grov grus, og oppvekstforholdene er meget gode.

### **Pendalsbekken**

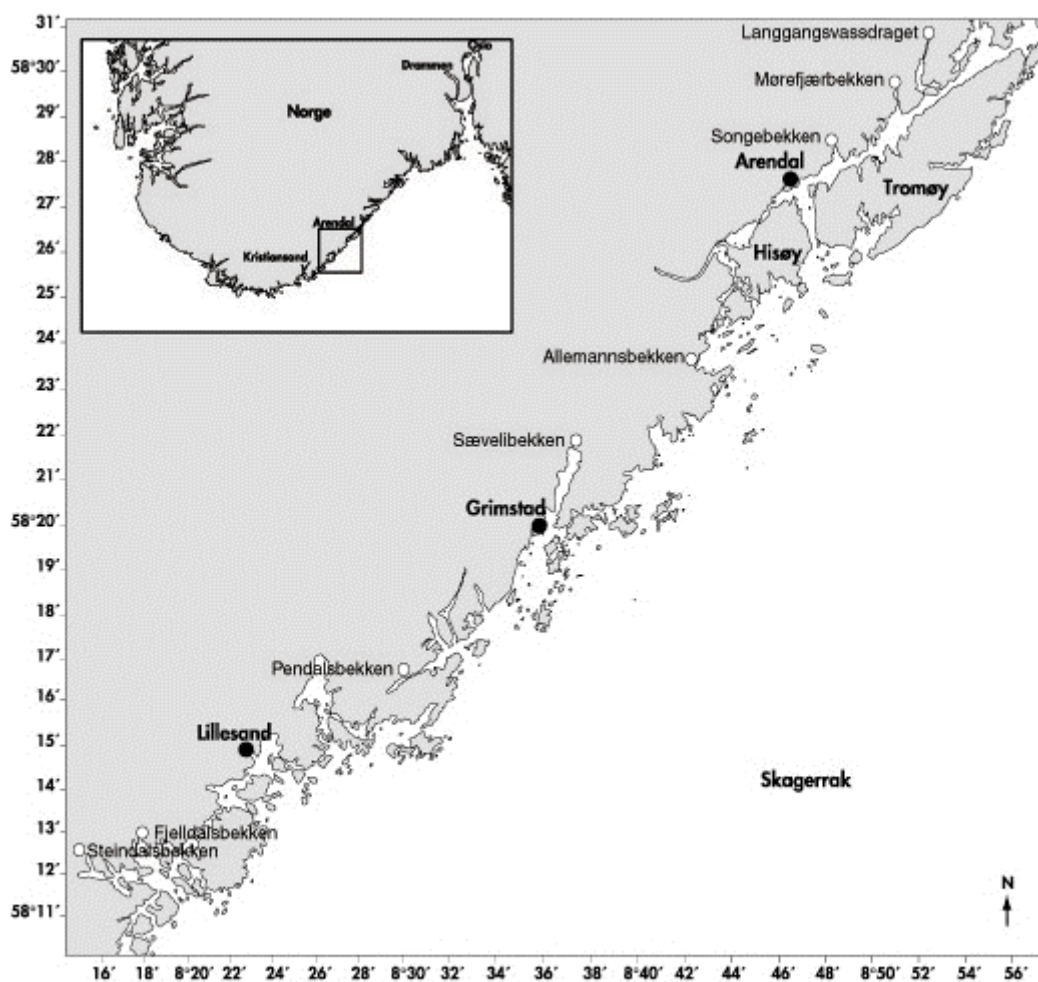
Bekken munner ut i Engekilen ved Eide. Det er ca. 700 meter tilgjengelig sjørretstrekning. Av denne distansen er 300 meter gyttestrekning med sand og varierende grus. Oppvekstforholdene er meget gode i de nedre deler, men sparsomme i de øvre.

## Fjelldalsbekken

Elva munner ut i sjøen innenfor Fjelldalsøya i Blindleia. Sjørretstrekningen er på 3,2 km, hvorav 1,6 km er gytestrekning. Bunnssubstratet er sand og grov grus. Gode oppvekstforhold, med kulper og skjul. Bekken er oppkalket.

## Steindalsbekken

Bekken munner ut i sjøen innerst i Steindalsfjorden. Sjørretstrekningen er 1,7 km, hvor 450 meter er gytestrekning. Bekken er oppkalket.



Figur 1. Kart over sjørretbekkenes geografiske posisjon langs kysten av Aust-Agder.

### 2.3 Genetisk Analyse

I forkant av analysene ble hver fisk delt i tre deler: hode, mage og ryggdel. Hver del analyseres for seg, da ulike gener er aktive i ulike organer. Den genetiske analysen ble basert på protein-elektroforese, der varianter (alleler) av protein-kodende gener (loci) identifiseres ved deres mobilitet i et elektrisk felt. Protein-elektroforesen gir data i form av individuelle genotyper for et stort antall ulike loci ved bruk av forskjellige histokjemiske fargeprosesser. Et stort antall locus-spesifikke fargeteknikker er utviklet over en årrekke, og mange av dem har vist seg å kunne identifisere genetiske polymorfier hos ørret: i Skandinavia er omkring 25-30 polymorfe proteinkodende gener kjent hos denne arten (Jorde 1994), hvor det i dette studiet ble det valgt ut et antall av disse som ble undersøkt. Ved siden av at teknikken er godt innarbeidet hos ørret, har proteinelektroforesen fordelene framfor andre teknikker ved at den er billig, og spesielt vellegnet til å analysere store antall individer. Det siste punktet er sentralt i dette studiet for å ha en høy grad av sikkerhet i å identifisere genetiske forskjeller, som langt på vei uttrykkes i frekvensforskjeller i forekomst av alleler. Vi testet de følgende 15 kjente polymorfe loci: *CK-2\**, *DIA\**, *bGLUA\**, *G3PDH-2\**, *GPI-1\**, *GPI-2\**, *GPI-3\**, *IDH-2\**, *LDH-1\**, *MAN\**, *MDH-2\**, *MDH-4\**, *MPI\**, *PEP-B\**, and *PEP-LT\**.

### 2.4 Statistisk analyse

Allelfrekvensene til individene i en bekk ble estimert fra genotypene ved opptelling av alleler i hvert locus. Forskjeller i allelfrekvensene mellom bekker ble testet mot null hypotesen om likhet i allelfrekvenser v.h.a. chi-kvadrat tester. Mengde og fordeling av genetisk variasjon innen og mellom bekker ble analysert etter Nei & Chesser (1983). Dendrogrammet (Figur 3) som viser genetisk likhet mellom elvene ble regnet ut av BIOSYS-1 (Swofford & Selander 1989) som baserer seg på Nei's "unbiased genetic identity" (Nei 1978). For å plote genetisk differensiering mot avstand (Figur 2) ble GENEPOP 3.1 D. brukt (Raymond & Rousett, 1995). Vi regnet også ut sansynlighets-verdier for at hvert individ tilhørte den bekken de var samlet i

på bakgrunn av deres genotyper ved en Bayesiansk test regnet ut av softwaret GENECLASS (Cornuet *et al.* 1999). Resultatene er presentert som prosent individer i en bekk som ble anvist til bekken den ble fanget i. Til slutt utførte vi en "mixed fishery analyse" hvor de 6 ukalkede etablerte bekkene ble satt som kilde for de to kalkede bekkene behandlet som blandede bestander. Hensikten var her å se om noen av de 6 etablerte bekkene kan ha bidratt mer enn andre i rekoloniseringen av de oppkalkede bekkene. Denne analysen ble utført v.h.a. softwaret WHICHRUN (version 4.0: Banks & Eichert, 2000).

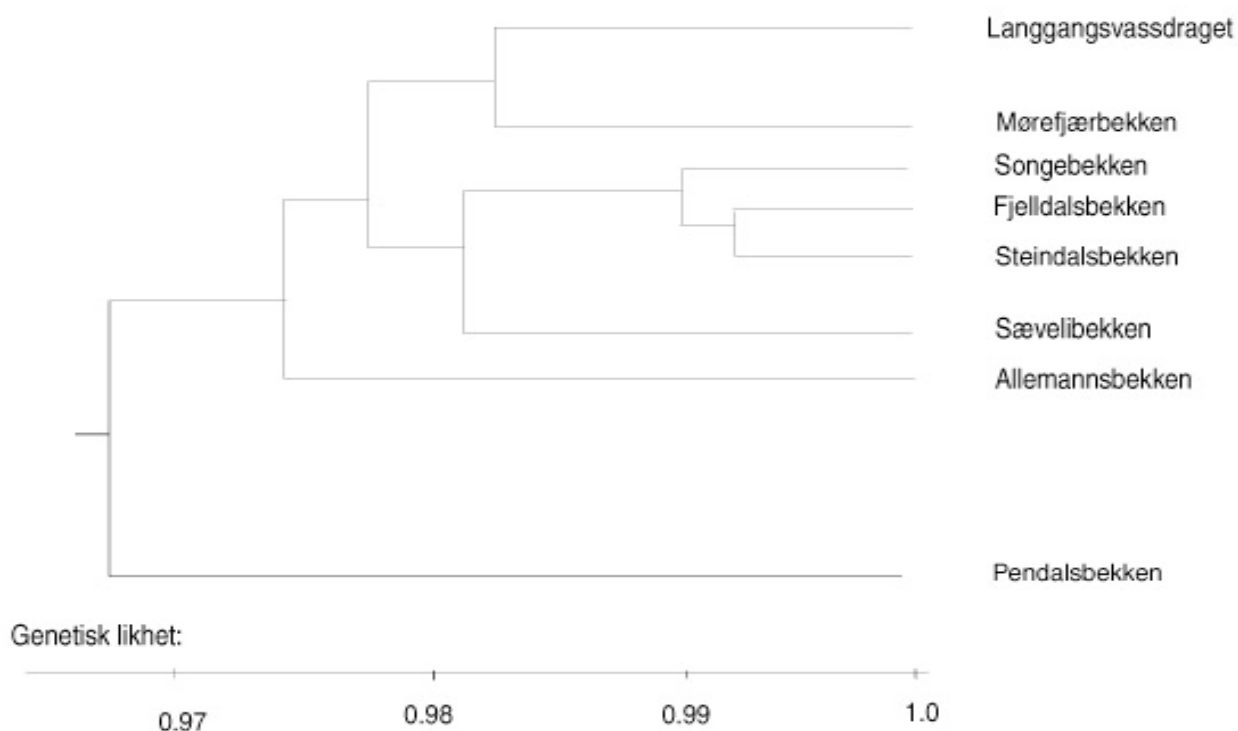
### **3 Resultater**

Av de 15 undersøkte genene viste 11 seg å være variable; og den videre analysen ble utført på disse lociene (cf. Vedlegg). Den totale genetiske variasjonen i disse lociene ( $H_T = 0.227$ ) var omtrent som forventet for annen europeisk ørret (Gjennomsnittlig  $H_T = 0.247$ ; cf. Garcia-Marin *et al.* 1991; Jorde and Ryman 1996; og upubliserte data fra Enheten för Populationsgenetik, Stockholms Universitet).

I de fleste bekkene hadde ørreten genvarianter(alleler) som var i "Hardy-Weinberg likevekt", som forventet. Langangsvassdraget og Allemannsbekken hadde imidlertid et signifikant underskudd av hetrozygoter (Allemannsbekken: i lociene *PEPLT* og *DIA*, Langangsvassdraget: i lociene *G3PDH-2* og *bGLUA*). Dette tyder på at disse to bekkene hver inneholder mer enn en populasjon, dvs at det finnes en videre populasjons-strukturering innen bekkene.



plassering i dendrogrammet (Figur 3) eller plotet av genetisk likhet mot geografisk avstand (Figur 2). Bestandene i disse bekkene er genetisk sett svært like hverandre, men samtidig ikke spesielt like sin nærmeste nabo (Pendalsbekken, cf. Figur 1 og 3). Fjellaldalsbekken og Steindalsbekken har begge for kort tid siden blitt oppkalket, da pH-forholdet i bekkene ikke var gode for ørreten. Etter kalking tok ørretbestanden seg kraftig opp. Ut i fra de genetiske observasjonene er det derfor rimelig å tro at det ikke bare er den opprinnelige bestanden som har tatt seg opp, men at innvandring fra en eller flere andre bestander har funnet sted. Om de opprinnelige ørretpopulasjonene hadde tatt seg opp som følge av kalking ville en forventet at ørreten i disse bekkene var genetisk sett likere f.eks Pendals-, Sæveli- eller Allemannsbekken som avstandsmessig ligger nærmere. Den observerte koblingsulikevekten mellom genvarianter i disse to bekkene støtter hypotesen om blandingspopulasjoner i disse bekkene, siden man ikke forventer slik ulikevekt i rene, etablerte bestander.



Figur 3. Dendrogram som viser hvor genetisk ulike ørreten er i de ulike bekkene. Dendrogrammet er regnet ut på bakgrunn av de 11 variable lociene i undersøkelsen.

Også, ved å regne ut sansynligheten for hvor hver enkelt fisk avstammer fra gitt sin variasjon i de 11 variable loci var det klart at de to kalkede bekkene gav et sterkt inntrykk av å inneha ørret som stammer fra flere av de andre bekkene (Tabel 1), mens de etablerte ukalkede bekkene hadde langt høyere grad av sansynlighet for å avstamme fra ørret fra den bekken de ble fanget.

Da vi gikk videre med dette og benyttet de 6 ukalkede bekkene som kilde (baseline-data), viste også denne testen en ganske jevn fordeling av påvirkning fra de ukalkede etablerte bekkene (Tabel 2).

Table 1. Oversikt i prosent over tildeling av individer til bekker bassert på deres genotyper kalkulert v.h.a. softwaret GENECLASS (Cornuet *et al.*1999).

		Donor population							
Recipient population	1#	2#	3	4	5	6	7	8	
1 Steindalsbekken #	<b>0.06</b>	0.15	0.11	0.19	0.01	0.29	0.08	0.13	
2 Fjeldalselva #	0.05	<b>0.18</b>	0.14	0.21	0.04	0.23	0.13	0.09	
3 Pendalsbekken	0.07	0.05	<b>0.62</b>	0.04	0.01	0.11	0.12	0.00	
4 Sævelibekken	0.06	0.05	0.05	<b>0.41</b>	0.13	0.16	0.15	0.00	
5 Allemannsbekken	0.02	0.06	0.10	0.12	<b>0.46</b>	0.10	0.02	0.12	
6 Songebekken	0.09	0.08	0.08	0.15	0.06	<b>0.38</b>	0.14	0.08	
7 Mørefjærbekken	0.06	0.00	0.15	0.10	0.01	0.14	<b>0.28</b>	0.16	
8 Langangsvassdraget	0.01	0.06	0.10	0.10	0.05	0.16	0.16	<b>0.35</b>	

Table 2. Estimert relativt bidrag fra hver av de seks ukalkede bekkene til de to rekoloniserte, ved en mixed fishery analysis (WHICHRUN 4.0; Banks & Eichert, 2000).

Recolonized population	Baseline population					
	3	4	5	6	7	8
1 Steindalsbekken #	0.18	0.21	0.05	0.29	0.08	0.19
2 Fjelldalselva #	0.18	0.23	0.06	0.20	0.14	0.21

Siden ørretbestandene i Fjelldalsbekken og Steindalsbekken for kort tid siden var kraftig desimert, kan en heller ikke se bort fra at årsaken til at de skiller seg genetisk fra nærmeste nabo (eks. Pendalsbekken) er p.g.a. store genetiske forandringer som følge av tilfeldig genetisk drift (tilfeldige genforandringer; et allment fenomen i små populasjoner). Denne forklaringen er imidlertid mindre sannsynlig ettersom denne prosessen burde føre til større (genetisk) innbyrdes forskjeller mellom disse to bekkene noe som ikke er tilfelle siden vi fant at de er meget like ( $F_{ST}$  på 0.001).

#### **4 Konklusjon**

Resultatene fra undersøkelsen tyder på at sjø-ørreten i bekkene langs sørlandskysten har lite kontakt med hverandre, og at de representerer separate ørret-populasjoner og bør betraktes som separate forvaltningsenheter. For Langangsvassdraget og Allemansbekkens vedkommende er det mulig at disse bekkene har en videre populasjons-strukturering og at det kan finnes mer enn en populasjon i hver av disse bekkene.

Ørreten i Fjelldalsbekken og Steindalsbekken nedstammer trolig ved rekolonisering fra flere bekker. Det kan derfor se ut som om kalkingen ikke kom tidsnok i gang for å bevare de opprinnelige populasjonene. Siden vi ikke har prøver av Steindalsbekken og Fjelldalsbekken fra tidligere, kan vi ikke med sikkerhet slå dette fast.

### **Litteraturliste:**

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

**Banks, M.A. and Eichert, W. (2000).** WHICHRUN (Version 3.2) a computer program for population assignment of individuals based on multilocus genotype data. *Journal of Heredity*, **91**, 87-89.

**Cornuet, J. M., Piry, S, Luikart, G., Estoup, A. and Solignac, M. (1999).** New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, **153**, 1989-2000.

**Elliot, J. M. (1994).** *Quantitative ecology and the brown trout*, i: Oxford series in ecology and evolution. Oxford University Press inc.

**Garcia-Marin, J. L. Jorde, P. E. Ryman, N. Utter, F. Pla, C.** Management implications of genetic differentiation between native and hatchery populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Aquaculture* **95**: 235-249.

**Jorde, P. E. (1994).** Allozymes in scandinavian brown trout (*Salmo trutta* L.). Report, Division of Population Genetics, Stockholm University.

**Jorde, P. E. og 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.

**Matzow, D. og Lund, K. (1996).** Forvaltningsplan for sjørret på Skagerrakkysten og i Oslofjorden. *Utredning for DN, Nr. 1996-1.*

**Matzow, D., Simonsen, J. H. og Valland, N. (1990).** Registrering av sjøørretvassdrag i Aust-Agder 1988-1989. Nr. 1990-5.

**Nei, M. (1978).** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583-590.

**Nei, M og Chesser, R. K. (1983).** Estimation of fixation indices and gene diversities. *Ann. Hum. Genet.* **47**: 253-259.

**Raymond, M., and F. Rousset. (1995).** GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**:248-249.

**Swofford, D. L. & Selander, R. B. (1989).** BIOSYS-1: A FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in populations genetics and systematics. *The Journal of Heredity* **72**: 281-283.

Vedlegg. Allelfrekvenser fra de 11 lociene i undersøkelsen. Da alle lociene hadde 2 alleler, er der her kun oppgitt det vanligste allelet.

$\chi^2$  – testen beskriver graden av heterogenitet mellom ørretbekkene for hvert locus (\*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.05$ ).

LOKALITET	n	CK2	DIA	bGLUA	G3PDH-2	IDH-2	MAN	MDH2	MDH-4	MPI	PEPB	PEPLT
Allemannsbekken	52	0.8049	0.9615	0.4063	0.9841	0.8039	0.7857	0.5385	1.0000	0.8654	0.9043	0.8673
Fjelldalsbekken	80	0.7313	1.0000	0.6392	0.9122	0.8125	1.0000	0.6312	1.0000	0.8077	0.9400	0.9500
Langangsvassdraget	80	0.8175	0.9875	0.4610	0.8333	0.8938	1.0000	0.7750	1.0000	0.6937	0.8782	0.9313
Mørefjærbekken	80	0.9367	0.9125	0.6096	0.8203	0.8938	0.9938	0.6937	1.0000	0.5759	0.9808	0.9125
Pendalsvassdraget	73	0.8699	1.0000	0.8485	0.7895	0.5929	0.9861	0.6667	0.9795	0.5000	0.9795	0.8973
Songevassdraget	80	0.8354	0.9875	0.7375	0.9437	0.9416	1.0000	0.6218	1.0000	0.7875	0.9241	0.9125
Steindalsbekken	80	0.6964	1.0000	0.7115	0.9058	0.8797	1.0000	0.5938	1.0000	0.7375	0.9557	0.9375
Sævelibekken	79	0.6987	0.9494	0.6392	0.9747	0.9557	0.9620	0.4494	1.0000	0.8101	0.9684	0.9231
$\chi^2$ - test		46.35***	44.96***	80.18***	45.64***	107.27***	122.91***	44.46***	21.88**	77.34***	26.02***	7.79

