

Rømming 3-2015

Sporing av rømt oppdrettslaks fanget i Driva høsten 2015

Wennevik, V., Quintela, M., Sørvik, A.G.E., Skaala, Ø., Glover, K.A.

Havforskningsinstituttet, Postboks 1870, Nordnes, 5817 Bergen
21. desember 2015.

Innledning

Denne rapporten beskriver genetiske og statistiske analyser av prøver fra rømt oppdrettslaks innsamlet fra Driva (vassdragsnummer 109.Z) i Møre og Romsdal i perioden 06.09-25.10.2015, samt analyse av prøver fra oppdrettslokaliteter i regionen. Rapporten gir en sannsynlighetsvurdering av muligheten for at den rømte laksen stammer fra disse anleggene, basert på DNA-analysene. Undersøkelsen ble initiert av Fiskeridirektoratet på bakgrunn av opplysninger om fangst og observasjon av relativt mye rømt laks i Driva innerst i Tingvollfjorden. Informasjonen som ble mottatt tydet på at fisken kunne stamme fra en nylig rømming i området.

Materiale og metode

Materiale

Rømt oppdrettslaks:

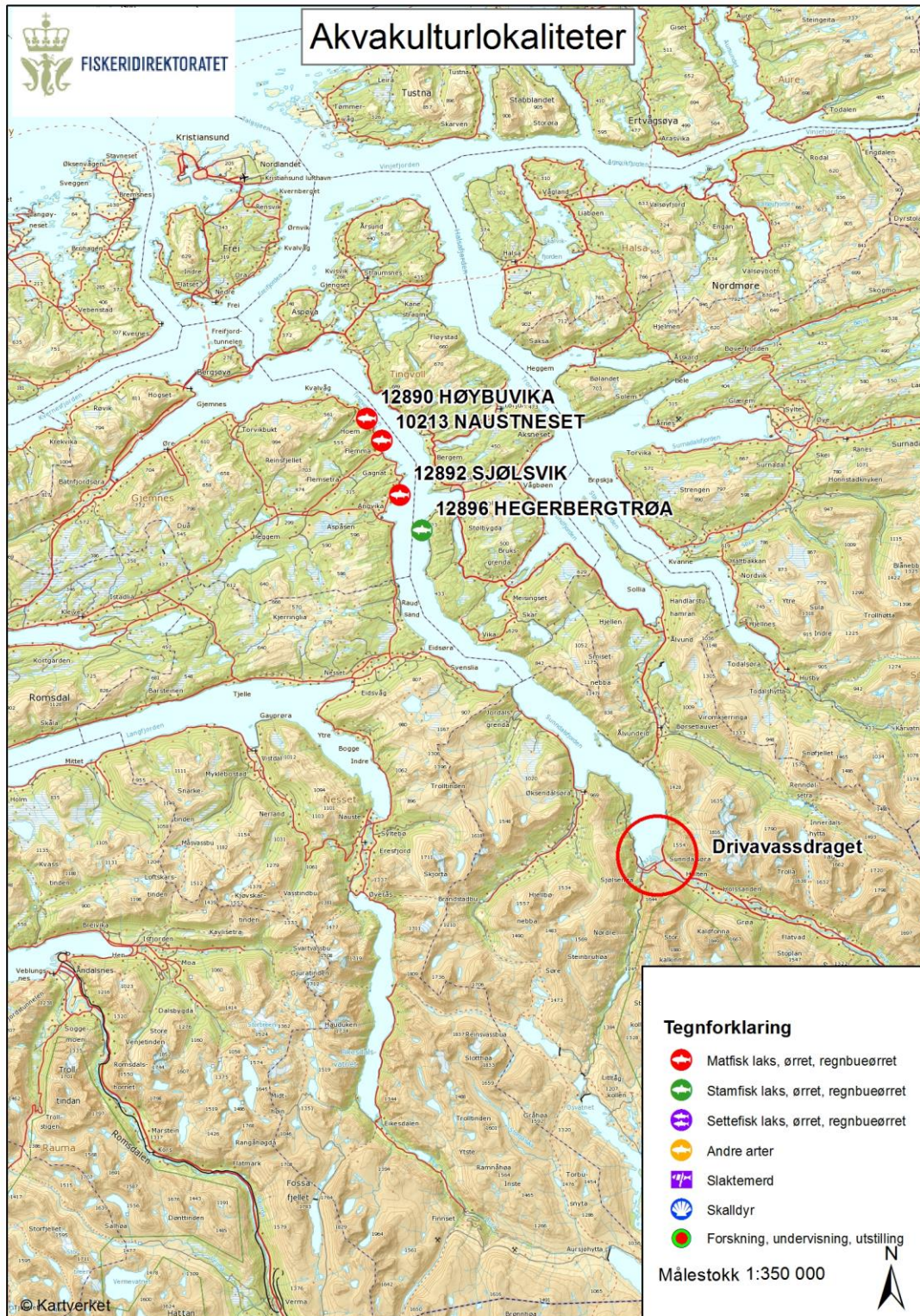
Prøver av rømt fisk ble samlet inn av Norsk institutt for naturforskning (NINA) i forbindelse med et forskningsprosjekt i elva. Det var en viss spredning i størrelse, men hovedmengden av den rømte laksen var mellom 2.5 og 4 kg.

Totalt ble det samlet inn 61 prøver av rømt laks fra elva, og 53 av disse ble levert til Havforskningsinstituttet. Klassifiseringen som rømt laks er basert på skjellprøver analysert av NINA. For de fleste innsamlede individ foreligger det registreringer av lengde og vekt (Vedlegg 1). Prøvene fikk samlenavn: RF, med individ nr: 3-15RF1 til 3-15RF93.

Referanseprøvene (baseline) fra anleggene:

Prøver av oppdrettslaks ble samlet inn fra de av anleggene i området som hadde fisk av tilsvarende størrelse som de rømte fiskene (Tabell 1). Det ble til sammen tatt 282 prøver av laks fra 6 merder på 4 anlegg, og alle disse prøvene ble gitt en entydig nummerering (Tabell 1). Det ble samlet inn prøver av ca 47 fisk fra aktuelle merder. Prøvene fra anleggene refereres til som "baselineprøvene" og representerer mulige

opphav til de rømte fiskene. Alt materialet ble samlet av Fiskeridirektoratet og overlevert Havforskningsinstituttet 16.11.2015.



Figur 1 Kart som viser Driva, og plassering av oppdrettsanlegg hvor det er tatt prøver til sporingsanalyse

Genotyping av DNA-markører

DNA analyser ble utført i Molekylærbiologisk laboratorium ved Havforskningsinstituttet i Bergen i tidsrommet 24.11.15 – 01.12.15. DNA ble isolert

fra skjellprøver eller fettfinner med Qiagen DNeasy isoleringskit, og 16 DNA markører ble analysert for alle individ. Analysene ble utført i henhold til protokollen for sporing av rømt oppdrettslaks ved Havforskningsinstituttet (Glover et al., 2008). Etter DNA-ekstraksjon og analyse av genetiske markører, ble prøver med dårlige/svake resultater kjørt om igjen slik at brukbare data kunne hentes ut av flest mulig prøver. Etter omkjøringer ble alle prøver med akseptable resultater for mindre enn 12 av de 16 markørene forkastet før videre analyse. I dette materialet var en del prøver av rømt fisk som var duplisert, dvs. prøver fra samme individ var innsamlet i flere ulike skjellprøveposer. Vi fant 18 dupliserte prøver, dvs. 9 individer var samlet to ganger. Antallet rømt fisk prøver ble derfor redusert til 44. I totalmaterialet fra anleggene ble noen få prøver ble også forkastet fordi de var forurenset, dvs. det var spor i prøven av DNA fra mer enn ett individ. Totalt ble 13 av prøvene utelukket fra datasettet av ulike årsaker (forurenset prøve, duplisert prøve, tekniske problemer) før videre analyser (Vedlegg 1).

Statistiske metoder

Genetisk forskjell mellom individer, og mellom samleprøver av individ, kan undersøkes ved hjelp av flere ulike statistiske teknikker. Et mye benyttet mål på genetisk differensiering mellom samleprøver av individ (for eksempel mellom populasjoner, eller mellom grupper) er F_{ST} . F_{ST} er et mål for genetisk distanse, jo høyere verdi, jo større distanse og jo større genetisk forskjell mellom prøvene. Parvis F_{ST} mellom alle prøver ble beregnet i programmet ARLEQUIN.

Genetisk diversitet i prøvene, målt som antall alleler og "allelic richness" ble beregnet ved hjelp programmet GENALEX (Tabell 3).

Videre ble genetisk struktur og clustering av individer i grupper analysert i programmet STRUCTURE 2.3.4. En strukturanalyse (Figur 3) viser genetisk likhet mellom prøvene basert på individuelle data (i motsetning til F_{ST} som viser forskjell i gjennomsnitt for prøvene). Analysen beregner tilhørighet for alle individer til et forhåndsdefinert sett av genetiske grupper (clustere). Hver genetisk gruppe blir i figurene angitt med en farge. Analysen tar høyde for at en samlet prøve evt. kan bestå av fisk med forskjellige opphav (både genetisk blanding dvs. krysninger mellom grupper og fysisk blanding). Strukturanalysen kjøres for et varierende antall forhåndsdefinerte clustere og utfra resultatene finner det antall clustere som best beskriver det aktuelle datasettet.

Muligheten for å kunne bruke genetiske metoder for å identifisere opphavet til rømt fisk øker med den genetiske forskjellen mellom baselineprøvene. En genetisk tilordningsanalyse ble utført ved hjelp av programmet GeneClass. Genetisk tilordning ble simulert mellom de ulike baselineprøvene fra oppdrettsanleggene, for å teste om det var tilstrekkelig genetisk forskjell mellom baselineprøvene til å kunne identifisere

de rømte fiskene. Graden av genetisk differensiering mellom baseline-prøvene (målt som F_{ST} verdi) og potensialet for genetisk tilordning er tett koblet.

Videre identifisering av opphavet til den rømte fisken ble gjennomført ved to metoder. 1) Direkte tilordning til baselineprøvene, og 2) Ekskludering fra baselineprøver på signifikansnivå 0,001 og 0,05. Direkte tilordning plasserer et individ i den baselineprøven som er genetisk mest lik (uansett absolutt grad av likhet).

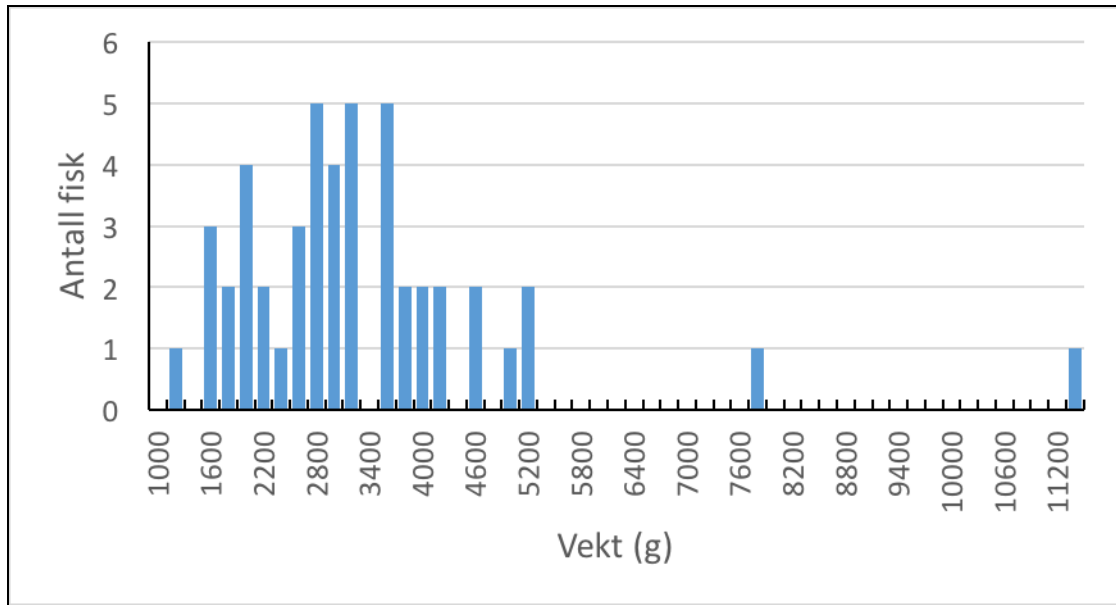
Direkte tilordning tar ikke med i betraktningen at ikke alle kilder som teoretisk sett kan ha gitt opphav til rømlingene er representert i datamaterialet, dvs. alle individer tilordnes en av baselineprøvene som er representert i datamaterialet selv om de med lav sannsynlighet kan ha sitt opphav i en rømming som har skjedd langt unna. Følgelig er det viktig å få et mål for genetisk likhet mellom den rømte fisken og baselineprøvene. Dette oppnår man ved "Eksklusjons basert simulering" kalkulert for ulike grader av sannsynlighet. Denne metoden ekskluderer hvert individ i tur og orden fra hver av baselineprøvene ut fra sannsynligheten for at et gitt individ tilhører baselineprøven.

Det er viktig å merke seg at disse metodene beregner sannsynlighet for at den rømte laksen har opphav i anleggene det er samlet inn prøver fra, eller sannsynlighet for at den ikke har opphav i disse. Disse testene kan likevel ikke utelukke at noen eller alle de undersøkte rømlingene i området teoretisk sett kan ha opphav i ett eller flere anlegg utenfor det undersøkte området, eller i de merdene som det ikke ble tatt prøver fra i forbindelse med denne episoden, og som derfor ikke inngår i baseline-materialet.

Resultater og diskusjon

Størrelsesfordeling av den rømte fisken

Gjennomsnittsvekt for de rømte laksene var 3288 g, varierende fra 1180 g til 11300 g. Som vist i figur 2, er det stor spredning i størrelse, men de fleste individer ligger i området 1600 g - 5000 g. Denne spredningen er en klar indikasjon på at prøven er sammensatt av fisk fra flere rømmingsepisoder.



Figur 2 Histogram som viser størrelsesfordeling av den rømte fisken som er analysert

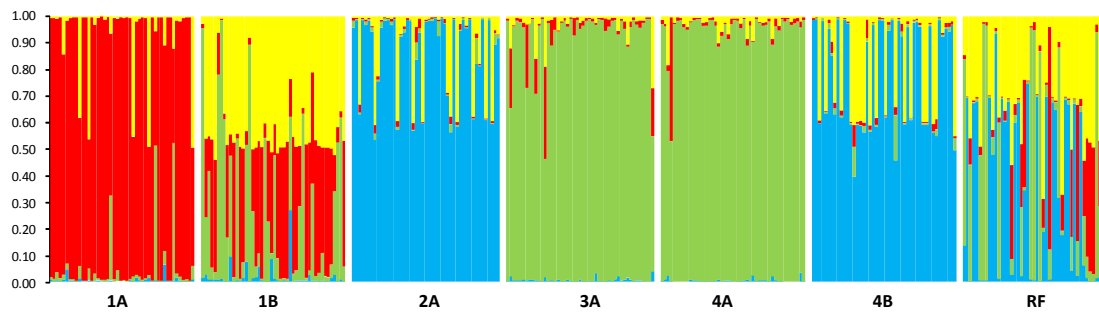
Genetisk diversitet i prøvene

Analysen av genetisk diversitet i prøvene (Tabell 2) viste at antall alleler (varianter i de genetiske markørene) var noe høyere i 2A og 4B (Stofnfiskur) enn i de andre prøvene. Lavest diversitet ble observert i prøven fra 1A. Diversiteten i den samlede prøven av rømt fisk var langt høyere enn i prøvene fra anleggene, noe som er en klar indikasjon på at prøven er sammensatt av fisk fra flere rømmingsepisoder.

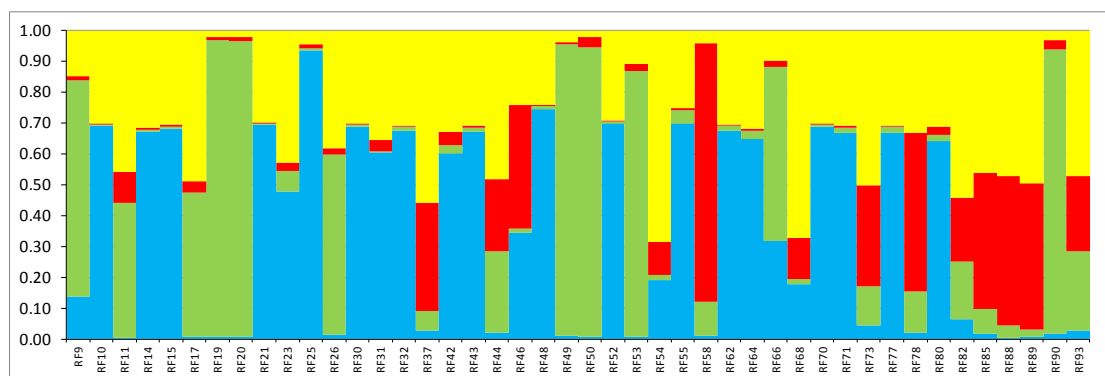
Genetisk differensiering mellom prøvene

De minste genetiske forskjellene ble observert mellom prøve 2A og 4B, begge av Stofnfiskur-stamme, og mellom 3A og 4A, begge av Aquagen QTL (Tabell 3). Forskjellene mellom de andre prøvene var relativt høye og signifikante med F_{ST} -verdier fra 0,033-0,07. F_{ST} -verdien mellom prøve 1A og 1B, som begge er oppgitt å være av Aquagen-stamme, er også relativt høy: 0,05.

For den samlede prøven av rømt fisk ble det observert minst genetisk distanse i sammenlikningen med prøve 3A. Størst forskjell ble observert i sammenlikning med prøve 1A, men den er likevel relativt høy (0,031). Verdiene i sammenlikning mot de andre prøvene var litt høyere enn sammenlikningen mot 3A. De observerte F_{ST} forskjellene viser at den sammensatte prøven av rømt fisk ikke stammer utelukkende fra ett av disse anleggene, noe som også var indikert av størrelsesfordelingen samt høyere genetisk diversitet observert i den samlede prøven av rømt fisk.



Figur 3 Strukturdiagram som viser hvordan laks fra ulike merder og anlegg, og rømt fisk, fordeler seg i fire ulike genetiske grupper.



Figur 4 Utsnitt av figuren over som viser fordelingen av de rømte fiskene i fire grupper

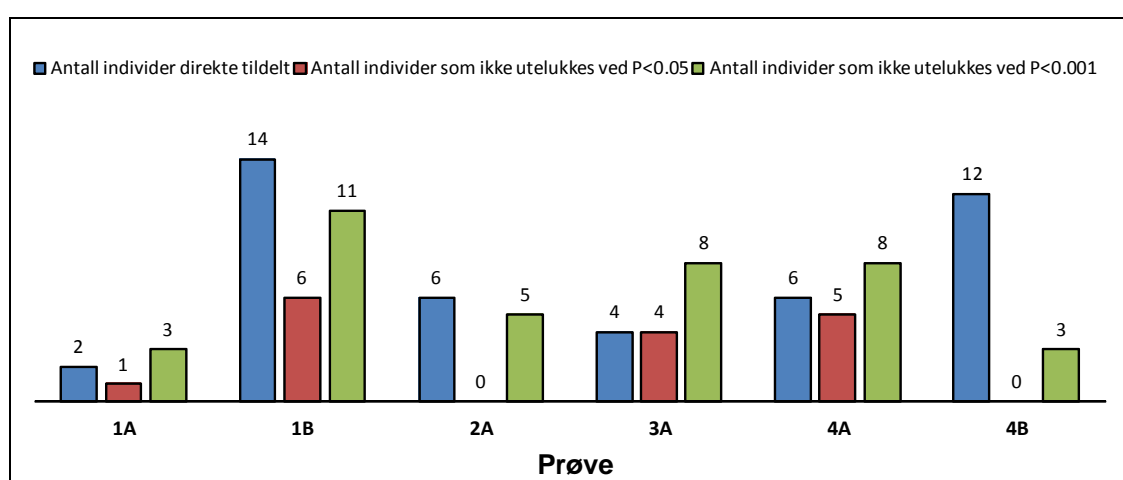
Strukturanalyse er også en form for genetisk tilordning. Strukturanalysene klassifiserer de rømte individene i forhold til et antall valgte kategorier, med en angitt ”andel av genomet” tilhørende hver av kategoriene (Vedlegg 1). I dette tilfellet er det definert fire kategorier. For de fleste fiskene vil en av de fire kategoriene være dominerende, mens enkelte individ framstår som en blanding mellom ulike kategorier. I Figur 3-4 vil slike individ være karakterisert ved at søylen som representerer individet består av flere farger.

Resultatene fra strukturanalysen bekrefter inntrykket av sammensatt og genetisk blandet prøve av rømt fisk. Prøve 3A og 4A, som begge er oppgitt å være Aquagen QTL-stamme er homogene, mens det er noe mer variasjon mellom prøvene 2A og 4B (Stofnfiskur) og det ser også ut til at prøven 1B er noe forskjellig fra 1A selv om begge er oppgitt å være av Aquagen-stamme. Disse forskjellene samsvarer med de vi så i analysen av F_{ST} . Det er ingen klar knytning mellom en hovedgruppe av rømt fisk eller noen av anleggene. Vi anser det som sannsynlig at flere genetiske linjer er representert i prøven av rømt fisk, enn det som er representert i baseline-prøvene. Dette bekreftes av at mange av individene er karakterisert ved at søylen består av flere farger.

Simulering av genetisk tilordning (assignment) mellom prøvene

I gjennomsnitt var graden av selv-tilordning (self-assignment) mellom baselineprøvene 68,7 %. Dette betyr at 191 av 278 individer fra disse 6 baseline prøvene ville blitt riktig identifisert tilbake sin opprinnelige kilde (merd) ved bruk av genetisk informasjon. Dette er for upresist til å bestemme opphavet til rømt fisk basert på denne typen analyse alene. Tilordning til feil prøve skjer imidlertid hovedsaklig innenfor samme genetiske linje, noe som gir god mulighet til å skille mellom anlegg med fisk av ulik genetisk linje/stamme.

Identifisering av den rømte fisken



Figur 5 Direkte tilordning av rømte individer til anlegg (blå søyler). Antall fisk som *ikke* kan ekskluderes fra det anlegget ved sannsynlighetsnivå 0,05 (røde søyler) og sannsynlighetsnivå 0,001 (grønne søyler).

Tilordningsanalysen vist i figur 6 viste at flest rømt fisk ble direkte tilordnet til prøve 1B og prøve 4B. Det ble imidlertid tilordnet individer til alle baselineprøvene. I en tilordningsanalyse vil individene man tilordner alltid bli tilordnet én av baselineprøvene, selv om den egentlige kilden ikke er representert i baselinematerialet. Det er derfor viktig å få et mål på likhet ved eksklusjonsanalysen. Eksklusjonsanalysene viser et meget viktig resultat. Hele 35 (80%) og 28 (64%) av de 44 rømte fiskene ble forkastet fra samtlige baselineprøver på henholdsvis 0,05 og 0,001 forkastningsnivå. Dette gir meget sterkt signal om at de fleste rømte fiskene som ble analysert i denne saken ikke kan stamme fra noen av disse anleggene. De fiskene som ikke ble forkastet fra samtlige baselineprøver ble tilordnet til forskjellige anlegg uten at ett anlegg peker seg ut som hovedkilde.

Konklusjoner

En kombinasjon av DNA- og statistiske analyser demonstrerer at de fleste rømte fisk i denne saken (80% eller 64%, avhengig av valgt signifikansnivå) kan ekskluderes fra samtlige av baselineprøvene. Dette betyr at ingen av anleggene som er representert i denne undersøkelsen peker seg ut som hovedkilde til den rømte fisken. Prøven av rømt fisk er sammensatt av fisk fra flere rømmingsepisoder. Dette bekreftes også av at selv om de rømte fiskene ble fanget i begrenset tid og rom, var det stor spredning i størrelse. Dette er også indikert av DNA analysene som viste at det var høy genetisk diversitet blant de rømte fiskene, og at de hørte til flere genetiske grupper.

Tabell 1. Oversikt over prøvene samlet inn fra anlegg i området i forbindelse med rømmingsepisode 3-2015. Prøve 1C var regnbueaure.

HI nr	Prøve	Selskap	Lokalitet	Merid	Innsamlet	Vekt	Smoltleverandør	Dato utsatt / levert brønnbåt	Rognleverandør	Rogninnlegg dato	Genetisk linje
3-151A	1A	Aqua Gen AS	12896 Hegerbergtrøa	3	05.11.15	3,9	Nofima	14.08.14	Aquagen	12.09.13	Aquagen
3-151B	1B	Aqua Gen AS	12896 Hegerbergtrøa	6	05.11.15	7,3	Hemne	23.05.14	Aquagen	23.10.12	Aquagen
3-151C	1C	Aqua Gen AS	12896 Hegerbergtrøa	8	05.11.15	4,0	Hemne	26.10.14	Aquagen	04.03.14	Aquagen
3-152A	2A	Lerøy Midt AS	12890 Høybuvika	119	10.11.15	5,3	Lerøy Belsvik	4-5.08.14	Stofnfiskur- Island	03.10.13	Stofnfiskur
3-153A	3A	Lerøy Midt AS	12892 Sjølsvik	113	10.11.15	5,4	Botn	4-5.08.14	Lerøy Aakvik	15.11.13	Aquagen QTL
3-154A	4A	Lerøy Midt AS	10213 Naustneset	108	10.11.15	4,5	Botn	05.08.14	Lerøy Aakvik	15.11.13	Aquagen QTL
3-154B	4B	Lerøy Midt AS	10213 Naustneset	103	10.11.15	4,6	Lerøy Belsvik	09.07.14	Stofnfiskur- Island	03.10.13	Stofnfiskur

Tabell 2. Oppsummeringsstatistikk for baselineprøvene og for de rømte fiskene (RF).

Prøve	Antall individer	Alleler	AR	Ho	Avvik HWE (0.05)	Avvik LD (0.05)
1A	46	117	7.3	0.818 ± 0.049	6	54
1B	46	138	8.6	0.743 ± 0.051	4	40
2A	47	155	9.6	0.826 ± 0.033	1	13
3A	47	129	8.0	0.801 ± 0.034	2	12
4A	46	127	7.9	0.782 ± 0.033	1	13
4B	46	156	9.7	0.804 ± 0.031	0	26
RF	44	175	10.9	0.765 ± 0.038	4	22

Tabell 3. Parvise F_{ST} verdier (genetisk distanse – nede til venstre), og tilhørende P-verdier (oppe til høyre) mellom baselineprøvene fra anleggene samt de rømte fiskene.

	1A	1B	2A	3A	4A	4B	RF
1A	****	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1B	0.0490	****	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2A	0.0699	0.0651	****	0.0000	0.0000	0.1488	0.0000
3A	0.0456	0.0330	0.0623	****	0.1799	0.0000	0.0000
4A	0.0507	0.0386	0.0645	0.0014	****	0.0000	0.0000
4B	0.0658	0.0617	0.0021	0.0635	0.0636	****	0.0000
RF	0.0622	0.0307	0.0388	0.0301	0.0332	0.0409	****

Vedlegg 1. Dokumenter fra Fiskeridirektoratet: Se vedlagt elektronisk fil.

