

Rømming 1-2014

Sporing av rømt oppdrettslaks fanget i flere elver i Ryfylke høsten 2013

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

* = kontaktperson

Havforskningsinstituttet, Postboks 1870, Nordnes, 5817 Bergen
30.03.2014

Innledning

Denne rapporten beskriver genetiske og statistiske analyser av prøver fra rømt oppdrettslaks innsamlet fra flere elver i Ryfylkeregionen i perioden 11.07-23.11.2014, samt analyse av prøver fra oppdrettslokaliteter i regionen. Rapporten estimerer sannsynlighet for at den rømte laksen stammer fra ett eller flere av disse anleggene, basert på DNA-analyser. Undersøkelsen ble initiert av Fiskeridirektoratet på bakgrunn av opplysninger om fangst av rømt laks i regionen (Vedlegg 1). Prøvene ble analysert av Havforskningsinstituttet i Bergen 23.01-21.02 2014.

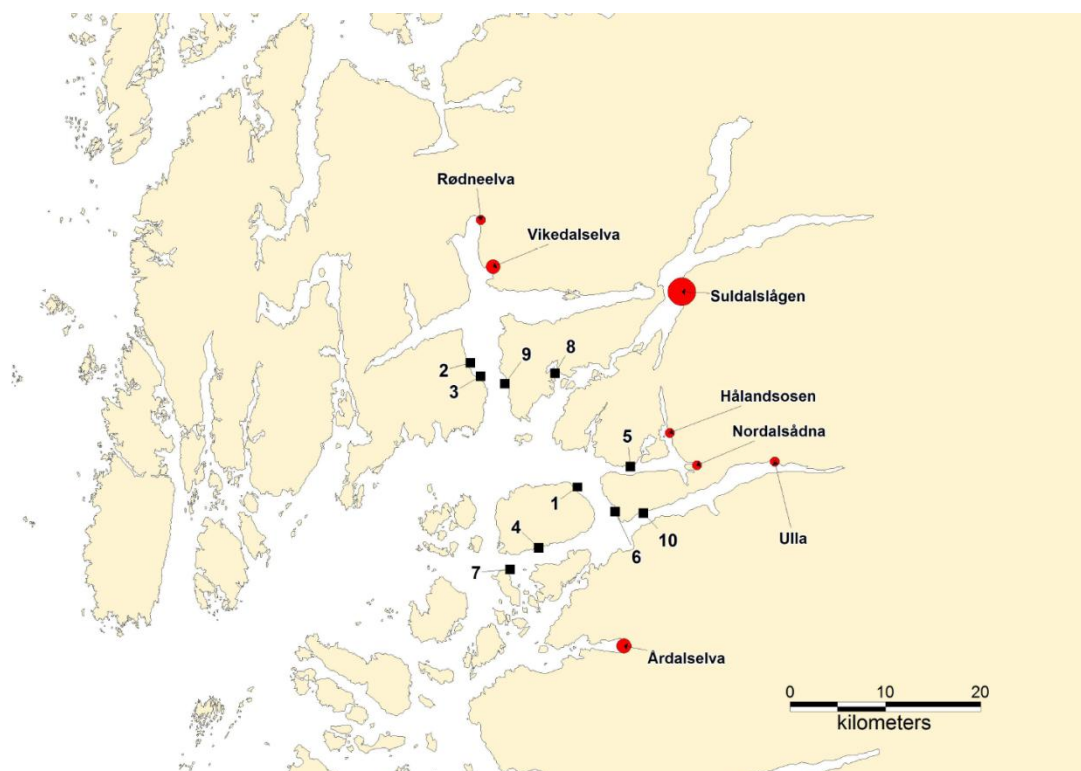
Materiale og metode

Materiale

Totalt ble det samlet inn prøver fra 313 fisk som var antatt å være rømt oppdrettslaks fra sju ulike elvelokaliteter i Ryfylkeregionen (Fig. 1; Vedlegg 1). Prøvene ble samlet inn av lokale fiskelag i forbindelse med sportsfiskesesongen eller utfisking av rømt laks fra elvene i etterkant av fiskesesongen. Det ble tatt skjellprøver av alle fiskene, og disse ble benyttet til analyser alder- og vekst, kondisjonsfaktor og klassifisering som rømt/vill/utsatt fisk. Rådgivende Biologer AS fikk oppdraget med å lese skjellprøvene for denne klassifiseringen (Vedlegg 1). Skjellprøvene som ble identifisert som sikkert rømt oppdrettslaks ble seinere benyttet til genetiske analyser. For de fleste individene foreligger det lengdedata, og for en del er vekten også registrert (Vedlegg 2). Innsamling og håndtering av materiale og nøyaktigheten på data for rømt fisk kan variere fra elv til elv. Prøvene av de antatt rømte fiskene fikk samlenavn: RF, med individ nr: 1-14RF1 til 1-14RF313.

Prøver av oppdrettslaks ble samlet inn fra de anleggene i regionen som hadde fisk av tilsvarende størrelse som de rømte fiskene (Tabell 1). Innsamlingen ble utført av Fiskeridirektoratet i perioden 25.09.2013 – 21.01.2014. Det ble til sammen tatt prøver av laks fra 17 merder på 10 anlegg, og alle disse prøvene ble gitt en entydig nummerering (Tabell 1). Hver av disse prøvene bestod av ca. 47 fisk. Disse prøvene refereres til som "baselineprøvene" og representerer mulige opphav til de rømte

fiskene. Prøven 131A (anlegg 10) ble samlet inn i forbindelse med sak 3-2013. Prøven 1-146A ble tatt etter at fisken var overført til slakteanlegg.



Figur 1 Kart over elver hvor rømt fisk ble innsamlet (røde fylte sirkler) og oppdrettsanlegg hvor det er tatt prøver til analyse (svarte firkanter). Størrelsen på de røde sirklene angir mengden rømt fisk fanget i vassdraget

Genetiske analyser

Prøvene ble organisert i en database og ble tildelt nummer (Tabell 1 og Vedlegg 2). DNA analyser ble utført i laboratoriet i Bergen i tidsrommet 23.01-21.02. DNA ble isolert med Qiagen DNeasy isoleringskit, og 18 DNA markører ble analysert for alle individ. Analysene ble utført i henhold til protokollen for sporing av rømt oppdrettslaks ved Havforskningsinstituttet. En rekke statistiske analyser ble gjennomført på datasettet. Disse analysene er forklart i resultatkapittelet.

Disse testene kan 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 ikke ble samlet i forbindelse med denne episoden, og som derfor ikke inngår i baseline materialet.

Tabell 1. Oversikt over baselineprøvene fra anleggene. Det er til sammen 17 prøver fra 10 anlegg. Deres geografiske plassering er vist i Fig. 1 (Kartet)

| | Prøve | Lokalitet | Merd | Innsamlet | Vekt (g) | Smoltleverandør | Dato utsatt brønnbåt | Rognleverandør | Avlslinje | |
|--|-----------|-----------|--------------------|--------------|----------|-----------------|----------------------|-------------------|--------------|------------|
| | 1-141A | 1A | 11913 Kjeahola | 1 | Des. 13 | 3008 | Kvingo | Juli 2012**** | Tveitevåg | Mowi |
| | 1-141B | 1B | 11913 Kjeahola | 2 | Des. 13 | 1880 | Kvingo | August 2012**** | Tveitevåg | Mowi |
| | 1-142A | 2A | 11964 Ringja | 1 | 15.01.14 | 2039 | Vågafossen | September 2012 | Tveitevåg | Mowi |
| | 1-142B | 2B | 11964 Ringja | 3 | 15.01.14 | 2152 | Fister | September 2012 | Tveitevåg | AquaGen |
| | 1-142C | 2C | 11964 Ringja | 5 og 6 | 15.01.14 | 893 | Fister | Oktober 2012 | Tveitevåg | Mowi |
| | 1-142D | 2D | 11964 Ringja | 7 og 8 | 15.01.14 | 866 | Fister | Oktober 2012 | Tveitevåg | Mowi |
| | 1-143A | 3A | 18639 Halsavika | 11 og 17 | 15.01.14 | 1328-1101 | Herand | Oktober 2012**** | Tveitevåg | Mowi |
| | 1-144A | 4A | 11928 Langavika | *** | 15.01.14 | 2155 | Vågafossen | Aug/Sept 2013**** | Tveitevåg | Mowi |
| | 1-145A | 5A | 11888 Sandvik | 2 | 20.01.14 | 2032 | Hognaland | September 2012 | Erfjord | Salmobreed |
| | 1-146A** | 6A | 11893 Fosså | 16 | 20.01.14 | 2032 | Fister | September 2012 | Tveitevåg | AquaGen |
| | 1-147A* | 7A | 13222 Kunes | 5003 og 5004 | 20.01.14 | 755-722 | Eidesvik | Oktober 2013 | Erfjord | Salmobreed |
| | 1-148A | 8A | 11925 Vintraviki | 1 og 3 | 21.01.14 | 874 | Salar bruk | Mars 2013 | Bjøolve bruk | Aquagen |
| | 1-148B | 8B | 11925 Vintraviki | 2 | 21.01.14 | 593 | Salar bruk | Mars 2013 | Fjon bruk | Salmobreed |
| | 1-149A | 9A | 15796 Borgarliflot | 1 | 21.01.14 | 1602 | Fjon bruk | September 2012 | AquaGen | AquaGen |
| | 1-149B | 9B | 15796 Borgarliflot | 4 | 21.01.14 | 1327 | Bolstad bruk | Oktober 2012 | AquaGen | AquaGen |
| | 1-149C | 9C | 15796 Borgarliflot | 5 | 21.01.14 | 1862 | Salar bruk | Oktober 2012 | AquaGen | AquaGen |
| | 131A***** | 131A | 18235 Bastli | 1 | 25.09.13 | 1075 | Øyer | September 2012 | Tveitevåg | Mowi |

Merknader:

* 1-147A: Oversvømming 5003 i juni til 5004 (Betyr fisk har vært flyttet)

** 1-146A: Prøve tatt på fisk for slakting på Hjelmeland.

***1-144A: Merd ikke oppgitt.

*****"Utsatt dato" oppgitt i Fiskeridirektoratet sitt Excel skjema for oversikt over anleggene, stemmer ikke med informasjonen i Akvaspor 9 som fulgte med hver prøve.

***** 131A ble samlet inn i forbindelse med sak 3-2013 – og er fra anlegg 10 i kartet.

Resultater og diskusjon

Klassifisering av det innsamlede materialet ut fra skjellanalyser

Analysene av skjell fra laks som i utgangspunktet var klassifisert som rømt laks basert på morfologi viste at enkelte fisk var feilklassifisert. Av de totalt 313 individene som ble analysert, ble klassifisering endret fra oppdrettslaks til vill laks for 11 individer. Noen få individer ble også klassifisert som fisk utsatt fra klekkeri, eller usikker utsatt/oppdrett. Disse individene ble utelatt fra videre statistiske analyser.

Genotyping

Etter DNA-ekstraksjon og analyse av genetiske markører, ble prøver med dårlige/svake resultater kjørt om igjen opptil 3 ganger slik at data kunne hentes ut av flest mulig prøver. Etter omkjøringer ble alle individ med godkjente data for mindre enn 17 av de 18 markørene forkastet for videre analyse. En del av individprøvene ble også forkastet fordi de var forurenset, dvs. det var spor av DNA fra mer enn ett individ i DNA som ble isolert fra skjellprøvene. Analyser viste også at en del av skjellprøveposene inneholdt skjell fra de samme individene, dvs. skjell fra én laks var lagt i mer enn én skjellprøvepose, noe som skyldes manglende rutiner for innsamling og håndtering av prøver av rømt oppdrettsfisk. Totalt ble 89 individer utelukket fra datasettet av ulike årsaker (vill eller utsatt fisk, usikkert opphav, forurenset prøve, duplisert prøve, dårlig DNA kvalitet) før videre analyser. Totalt antall rømt laks som ble benyttet for statistiske analyser i denne saken var 224 (Vedlegg 2).

Av alle fiskene som ble analysert, ble det observert enkelte individer som hadde tre alleler (tre genvarianter) på noen markører. Forekomst av mer enn 2 varianter for en DNA-markør i en slik analyse kan tyde på forurensing av prøven (i praksis skyldes dette gjerne at det er DNA fra mer enn ett individ i prøven), men kan også skyldes at dette individet er triploid (har tre sett med gener). Av de individene som hadde mer enn 2 alleler, hadde alle 3 alleler. Det er konkludert med at noen få av laksene analysert i denne saken er steril triploid laks med tre sett med gener.

Triploid laks kan oppstå ved en tilfeldighet på grunn av miljøforhold under befruktning av eggene, ellers det kan være et resultat av trykkbehandling på eggene for å lage steril laks. Industrien har så vidt begynt å produsere triploid laks kommersielt, men det er usikkert om disse triploide individene var et resultat av tilfeldighet, eller var resultat av målrettet produksjon av steril laks.

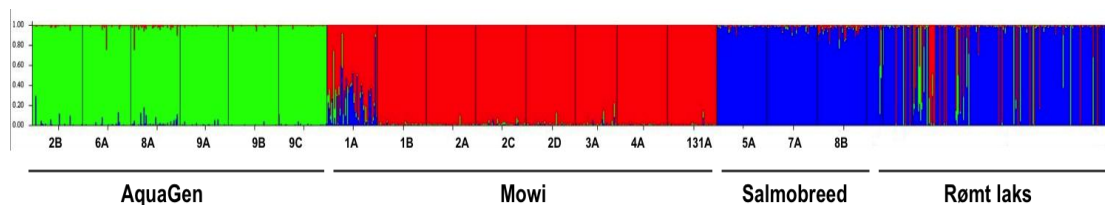
Triploid fisk i datasettet skaper noen utfordringer. 1. Det blir mer komplisert å genotype individer, spesielt når det er kombinert med dårlig DNA kvalitet, 2. Triploid fisk kan ikke behandles statistisk på samme måte som diploid fisk (Dvs. statistiske analyser som sporing bygger på kan ikke bruke data fra triploide individer). Likevel kan forekomst av triploide individer også være informativt når det gjelder

identifisering av kilden av de rømte fiskene (for eksempel hvis det er kun ett eller noen få anlegg som har triploid fisk og en stor andel av den rømte fisken var triploid, vil dette kunne medvirke til å identifisere kilden til rømmingen). Imidlertid ble det i dette tilfellet kun funnet to triploide individer blant de rømte fiskene, og enkelt individer i prøvene fra anleggene (data ikke presenterte).

De resterende statistiske analysene presentert nedenfor er basert på kun de diploide laksene. Triploid fisk ble fjernet fra datasettet før de statistiske analysene ble utført. Siden de er så få vil ikke fjerning av disse individ har noen innflytelse på resultatene.

Innledende sortering basert på Strukturanalysen

Et strukturdiagram (Fig. 2) viser genetisk likhet mellom individer og sett med prøver. Hver fisk blir representert med en vertikal linje som kan bestå av et eller flere farger. Hver genetisk gruppe blir angitt med en farge, og tar høyde for at en samlet prøve evt. kan bestå av fisk av forskjellige opphav (både genetisk blanding dvs. krysninger mellom grupper og fysisk blanding).



Figur 2 Strukturdiagram som viser hvordan laks fra anlegg, og rømt laks, fordeler seg i tre ulike genetiske grupper. Laks fra anleggene grupperer seg i henhold til avlslinjen som er benyttet

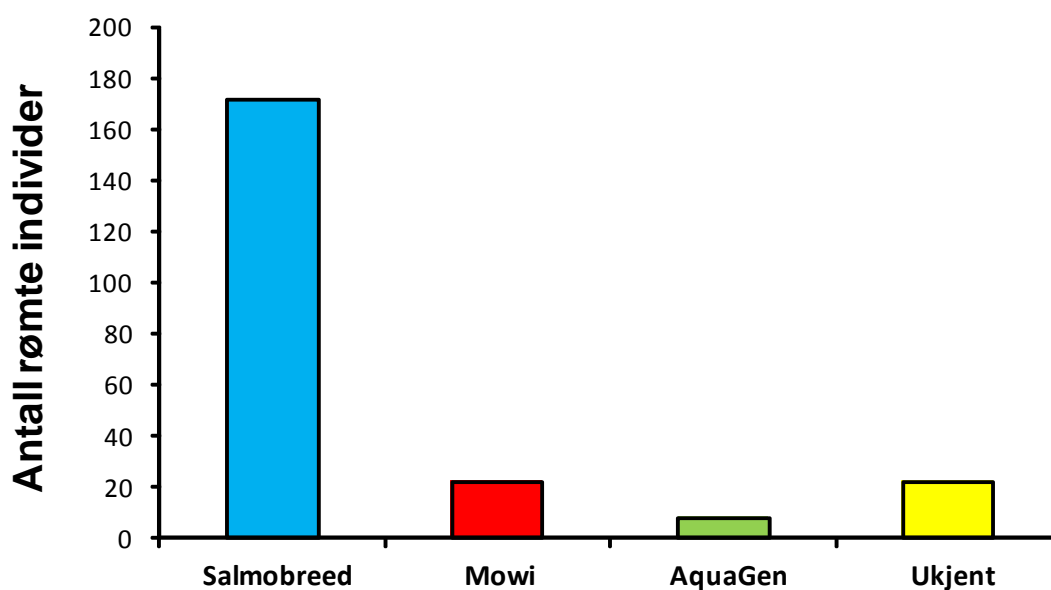
Resultatene fra strukturanalysen viser at prøvene fra anleggene i denne saken deler seg i tre distinkte grupper. Den observerte fordeling av farger mellom baselineprøvene samsvarer med hvilke oppdrettlinje som er representert i de ulike baselineprøvene. Prøver fra merder med Aquagen er illustrert med grønn farge, merder med Mowi er illustrert med rød og Salmobreed med blå farge. Dette betyr at det er store og tydelige genetiske forskjeller mellom fisk som stammer fra disse tre avlslinjene. Hver av baselineprøvene er dominert av en av de tre fargene, med unntak av baselineprøve 1A som var dominert av rødt men også hadde et visst innslag av andre farger.

De rømte fiskene er også representert i Strukturanalysen (Fig. 2). Gruppen av rømt fisk framkommer i denne analysen som bestående av en blanding av flere farger (og dermed av blandet genetisk opphav), men er imidlertid dominert av blått. Dette indikerer at de fleste rømte fiskene fanget i forbindelse med denne saken mest sannsynlig er av Salmobreedlinjen, og dermed kommer fra et anlegg eller en merd som hadde fisk av denne linjen.

Klassifisering av de rømte fiskene til avlslinje

Analysen av de 224 rømte fiskene ble innledet med klassifisering til en avlslinje. Dette ble gjort med utgangspunkt i Strukturanalysen (Fig. 2), samt direkte tilordning

og ekskludering på individnivå med programmet GeneClass (Vedlegg 2). Dette ble gjort på følgende måte: Dersom et individ ble direkte tilordnet en baselineprøve med en bestemt avlslinje i tilordningsanalysen, ikke ekskludert fra alle anleggene med denne avlslinjen i eksklusjonsanalysen, og tilordnet samme linje i strukturanalysen, ble det rømte individet definert som tilhørende denne avlslinjen. Individuer som ikke oppfylte disse kriteriene ble klassifisert som "ukjente". Denne klassifiseringen til avlslinje viste at de fleste rømte fiskene stammet fra Salmobreed (172 av totalt 224 rømte fisk = 77 %), og resten fordelte seg blant de to øvrige avlslinjene, samt den gruppen som ble forkastet fra alle baselineprøvene (det er viktig å merke seg at fiskene som ble forkastet fra alle tre linjene i denne analysen likevel mest sannsynlig stammer antakelig fra en eller flere av disse tre avlslinjene, men trolig fra en annet årsklasse eller genetisk gruppe innenfor disse avlsselskapene, slik at de ikke kan identifiseres til sin opphavslinje med utgangspunkt i baselinematerialet i denne saken). I praksis betyr det at de fiskene som er ekskludert fra alle baselineprøvene har rømt fra et eller flere anlegg utenfor innsamlingsområdet. Dette gjelder imidlertid mindre enn 10 % av de analyserte rømlingene.



Figur 3 Klassifisering av de rømte individene i avlslinje.

Med bakgrunn i klassifiseringen til avlslinje (Fig. 3), ble etterfølgende analyser også gjort ved at de rømte fiskene ble også delt opp i fire separate grupper, og i tillegg ble alle de rømte fiskene analysert samlet.

Genetisk differensiering mellom prøvene (både baselineprøver og RF)

Genetisk forskjell mellom individer og samleprøver av individer kan undersøkes ved hjelp av flere ulike statistiske teknikker. Strukturanalysen (Fig. 2) representerer en måte å gjøre dette på. Et annet og mye benyttet mål på genetisk differensiering mellom samleprøver av individer (for eksempel en populasjon, en prøve av flere individer) er F_{ST} . F_{ST} er et mål for genetisk distanse, jo høyere verdi, jo større distanse

og jo større genetisk forskjell mellom prøvene. I dette prøvematerialet fant vi størst parvise genetiske forskjeller målt som F_{ST} mellom prøvene som stammer fra de forskjellige avlslinjene, og de minste parvise forskjellene mellom prøvene som hadde fisk levert fra samme avlslinje (Tabell 2). Dette samsvarer med bildet fra Strukturanalysen (Fig. 2), men viser i tillegg at det er til dels tydelig genetiske forskjeller mellom baselineprøver fra samme avlslinje, selv om forskjellene er mindre enn mellom baselineprøver som kommer fra forskjellige avlslinjer.

Basert på parvis F_{ST} , var den samlede prøven av rømt fisk (RF) svært forskjellig fra alle baselineprøvene av AquaGen- og Mowilinjene. F_{ST} verdiene mellom RF og AquaGen og mellom RF og Mowi er flere ganger større enn mellom RF og Salmobreed (5A, 7A og 8B). Forskjellen mellom RF og 7A er svært liten. Dette betyr at den samlede prøven av alle de 224 rømte laksene ligner mest på baselineprøven 7A.

Tabell 2. Parvise F_{ST} verdier (genetisk distanse – nede til venstre), og tilhørende P-verdier (oppe til høyre) mellom baselineprøvene fra anleggene samt de rømte fiskene. Legg merke til at de rømte fiskene er blitt tilordnet til sin sannsynlige opprinnelige linje som følge av forskjellige data (Vedlegg 2).

| | 2B | 6A | 8A | 9A | 9B | 9C | 1A | 1B | 2A | 2C | 2D | 3A | 4A | 131A | 5A | 7A | 8B | Alle RF | AquaGen | Mowi | Salmobreed | Ekskludert alle |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|-------|------------|-----------------|
| 2B | **** | 0.969 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.184 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 6A | 0.000 | **** | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.014 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 8A | 0.009 | 0.014 | **** | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.047 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 9A | 0.018 | 0.023 | 0.031 | **** | 0.000 | 0.804 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.071 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 9B | 0.027 | 0.035 | 0.036 | 0.022 | **** | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.017 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 9C | 0.014 | 0.019 | 0.025 | 0.000 | 0.015 | **** | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.207 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 1A | 0.076 | 0.076 | 0.062 | 0.089 | 0.089 | 0.085 | **** | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 1B | 0.101 | 0.101 | 0.092 | 0.113 | 0.121 | 0.111 | 0.050 | **** | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.007 | 0.000 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.003 | 0.000 | 0.000 |
| 2A | 0.098 | 0.097 | 0.085 | 0.116 | 0.117 | 0.111 | 0.054 | 0.016 | **** | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.695 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.003 | 0.000 | 0.000 |
| 2C | 0.093 | 0.092 | 0.081 | 0.105 | 0.110 | 0.100 | 0.042 | 0.017 | 0.024 | **** | 0.000 | 0.009 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.000 |
| 2D | 0.094 | 0.095 | 0.086 | 0.107 | 0.106 | 0.105 | 0.052 | 0.011 | 0.015 | 0.014 | **** | 0.016 | 0.000 | 0.005 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.052 | 0.000 | 0.000 |
| 3A | 0.093 | 0.091 | 0.083 | 0.108 | 0.111 | 0.104 | 0.043 | 0.008 | 0.017 | 0.006 | 0.006 | **** | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.212 | 0.000 | 0.000 |
| 4A | 0.107 | 0.107 | 0.094 | 0.119 | 0.122 | 0.117 | 0.065 | 0.018 | 0.000 | 0.033 | 0.016 | 0.022 | **** | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 131A | 0.101 | 0.101 | 0.094 | 0.121 | 0.116 | 0.116 | 0.052 | 0.008 | 0.016 | 0.017 | 0.007 | 0.011 | 0.022 | **** | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 5A | 0.124 | 0.130 | 0.119 | 0.124 | 0.138 | 0.128 | 0.104 | 0.141 | 0.146 | 0.136 | 0.131 | 0.138 | 0.158 | 0.145 | **** | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 7A | 0.096 | 0.098 | 0.081 | 0.110 | 0.119 | 0.108 | 0.080 | 0.110 | 0.111 | 0.103 | 0.103 | 0.100 | 0.123 | 0.111 | 0.064 | **** | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 8B | 0.100 | 0.103 | 0.091 | 0.114 | 0.115 | 0.106 | 0.080 | 0.117 | 0.114 | 0.106 | 0.111 | 0.113 | 0.126 | 0.126 | 0.092 | 0.049 | **** | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Alle RF | 0.070 | 0.073 | 0.064 | 0.084 | 0.091 | 0.082 | 0.057 | 0.086 | 0.085 | 0.079 | 0.079 | 0.075 | 0.096 | 0.086 | 0.043 | 0.010 | 0.047 | **** | 0.000 | 0.000 | 0.050 | 0.000 |
| AquaGen RF | 0.005 | 0.017 | 0.013 | 0.011 | 0.013 | 0.005 | 0.070 | 0.102 | 0.095 | 0.094 | 0.089 | 0.092 | 0.111 | 0.100 | 0.111 | 0.079 | 0.085 | 0.051 | **** | 0.000 | 0.000 | 0.019 |
| Mowi RF | 0.087 | 0.086 | 0.078 | 0.101 | 0.100 | 0.099 | 0.035 | 0.012 | 0.014 | 0.010 | 0.006 | 0.003 | 0.019 | 0.016 | 0.121 | 0.096 | 0.100 | 0.069 | 0.085 | **** | 0.000 | 0.000 |
| Salmobreed RF | 0.094 | 0.098 | 0.087 | 0.108 | 0.117 | 0.107 | 0.081 | 0.117 | 0.116 | 0.110 | 0.110 | 0.105 | 0.127 | 0.117 | 0.045 | 0.010 | 0.056 | 0.001 | 0.076 | 0.101 | **** | 0.000 |
| Ekskludert alle | 0.035 | 0.037 | 0.031 | 0.050 | 0.052 | 0.047 | 0.029 | 0.058 | 0.055 | 0.044 | 0.048 | 0.046 | 0.066 | 0.055 | 0.070 | 0.041 | 0.053 | 0.019 | 0.020 | 0.039 | 0.040 | **** |

Grønne = anlegg med fisk levert av AquaGenlinje, rød = fisk levert av Mowilinje, blått = fisk levert av Salmobreedlinje. P-verdier merket med grått er ikke signifikant.

Tabell 3 er en oppsummering av genetiske data for baselineprøvene, for den rømte fisken og for de ulike linjene. Når alle de 224 rømte fiskene vurderes samlet, ser man at denne gruppen har mer genetisk variasjon enn det vi ser i baselineprøvene. Dette er delvis fordi det er flere individ i denne prøven, men det indikerer også at de rømte fiskene stammer fra forskjellige kilder. Dette var også indikert i resultatene fra strukturanalysen (Fig. 2) samt i klassifiseringen av de rømte fiskene til avlslinje (Fig. 3).

Tabell 3. Oppsummeringsstatistikk for baselineprøvene og for de rømte fiskene (RF). De rømte fiskene har også blitt ordnet inn til forskjellige grupper rømt fisk basert på sin individ klassifisering til avlslinje (Vedlegg 1).

| Prøve | Antall individ | Alleler | AR | Ho | Avvik HWE (0.05) | Avvik LD (0.05) |
|-----------------|----------------|---------|-----|---------------|------------------|-----------------|
| 131A | 46 | 122 | 5.0 | 0.724 ± 0.045 | 1 | 10 |
| 1A | 47 | 143 | 5.6 | 0.759 ± 0.053 | 1 | 18 |
| 1B | 46 | 125 | 5.0 | 0.693 ± 0.039 | 1 | 21 |
| 2A | 46 | 120 | 4.9 | 0.701 ± 0.035 | 3 | 13 |
| 2B | 47 | 151 | 5.9 | 0.757 ± 0.047 | 0 | 14 |
| 2C | 47 | 132 | 5.3 | 0.732 ± 0.046 | 0 | 14 |
| 2D | 46 | 127 | 5.0 | 0.731 ± 0.032 | 2 | 17 |
| 3A | 39 | 134 | 5.3 | 0.695 ± 0.043 | 2 | 16 |
| 4A | 47 | 115 | 4.7 | 0.710 ± 0.034 | 0 | 16 |
| 5A | 47 | 106 | 4.4 | 0.859 ± 0.031 | 8 | 15 |
| 6A | 45 | 142 | 5.7 | 0.766 ± 0.059 | 0 | 15 |
| 7A | 47 | 124 | 4.9 | 0.746 ± 0.037 | 1 | 39 |
| 8A | 46 | 154 | 5.9 | 0.747 ± 0.038 | 1 | 19 |
| 8B | 46 | 113 | 4.8 | 0.753 ± 0.029 | 2 | 20 |
| 9A | 45 | 135 | 5.4 | 0.724 ± 0.051 | 2 | 10 |
| 9B | 47 | 133 | 5.3 | 0.797 ± 0.045 | 0 | 20 |
| 9C | 45 | 140 | 5.6 | 0.731 ± 0.047 | 0 | 7 |
| Alle RF fisk | 224 | 210 | 5.7 | 0.744 ± 0.030 | 13 | 112 |
| Salmobreed RF | 172 | 142 | 4.9 | 0.747 ± 0.032 | 6 | 89 |
| AquaGen RF | 8 | 105 | 6.2 | 0.757 ± 0.041 | 0 | 0 |
| Mowi RF | 22 | 122 | 5.4 | 0.717 ± 0.044 | 1 | 0 |
| Ekskludert alle | 22 | 176 | 7.2 | 0.748 ± 0.034 | 4 | 5 |

Alleler = totalt antall genetisk varianter observert i prøven, AR = gjennomsnittlig antall genetisk varianter per prøve pr genetisk markør og når antall individ er korrigerte for (i dette tilfelle re-analyserte for N=8), Ho = observert heterozygositet, HWE = antall avvik fra Hardy Weinberg likevekt ved signifikansnivå 0.05, LD = antall likevekt koblinger observert i prøven ved signifikansnivå 0.05.

Sammenlikning av oppsummeringsstatistikk for den samlede prøven av de 172 rømte fiskene med Salmobreed som genetisk bakgrunn (som klassifisert i Fig. 3), og baselineprøvene fra anlegg med Salmobreedlinje (5A, 7A, 8B), viste at de rømte fiskene liknet mest på prøve 7A. Dette skyldes blant annet at det er flere alleler (genvarianter) i prøven av de rømte fiskene enn i prøvene 5A og 8B, og fordi det var

flere forekomster av såkalt koblings ulikevekt i prøven av de rømte fiskene enn i prøvene 5A og 8B.

Simulering av genetisk tilordning (assignment) mellom prøvene

Muligheten for å kunne bruke genetiske metoder for å identifisere opphavet til rømt fisk øker med den genetiske forskjellen mellom baselineprøvene.

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 tilbake til anlegg. Graden av genetisk differensiering mellom baselineprøvene (målt som F_{ST} verdi) og potensialet for genetisk tilordning er tett koblet.

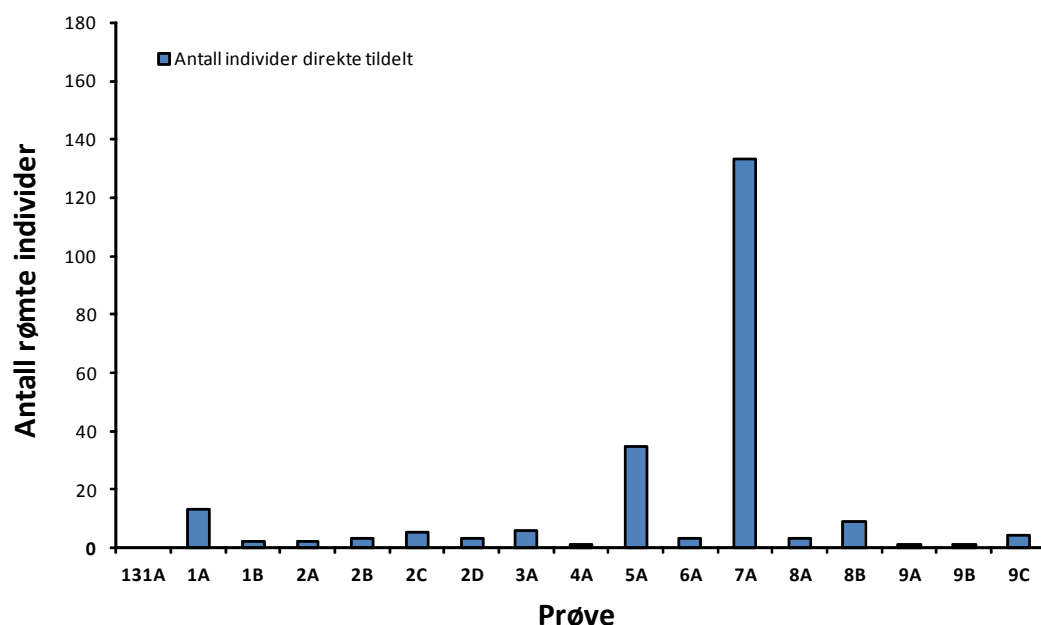
I gjennomsnitt var graden av selv-tilordning mellom baselineprøvene 52,8%. Dette betyr at kun 52,8% av individene fra disse 17 baseline prøvene fra de 10 anleggene ville blitt riktig identifisert tilbake sin opprinnelige kilde ved bruk av genetisk informasjon. Det betyr at hele 47.2% av de rømte fiskene ville blitt feilplassert i andre anlegg. Dette er for upresist til å bestemme opphavet til rømt fisk basert på denne typen analyse alene. Resultatene fra denne analysen viser imidlertid at feil-tilordning i hovedsak forekom mellom prøvene ”gruppevis”, og innenfor de ulike avlslinje. Dvs. fisk av Mowilinjen ble i hovedsak feil-tilordnet til anlegg med fisk av Mowilinje, osv. Dersom vi ser på tilordning til avlslinje oppnådde vi korrekt identifisering mellom baselineprøvene på 99.7%. Dette betyr at det er mulig å utelukke enkelte anlegg som kilde til den rømte fisken, mens andre anlegg med fisk fra samme avlslinje ikke uten videre kan utelukkes. Dette er i samsvar med konseptet DNA beredskapsmetoden bygger på, der muligheten for å identifisere en kilde til de rømte fiskene og å utelukke samtlige andre mulig kilder vil variere fra sak til sak avhengig av hvilket genetisk materiale de nærliggende anleggene har.

Identifisering av den rømte fisken til anlegg (baselineprøve)

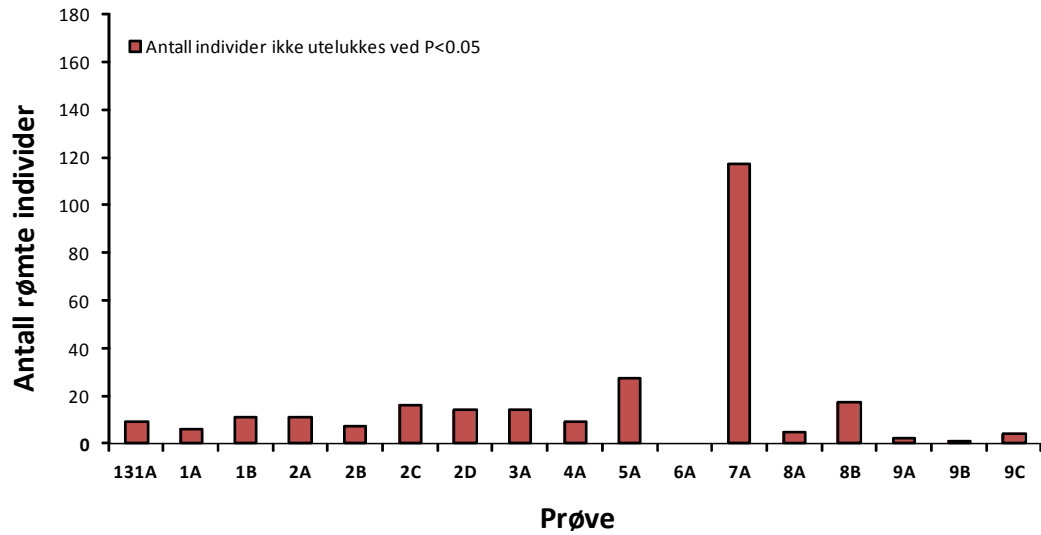
Identifisering av de 224 rømte individene til baselineprøver ble gjennomført ved to metoder. 1) Direkte tilordning til baselineprøvene, og 2) Ekskludering fra baselineprøver på signifikansnivå 0,001 og 0,05. Direkte tilordning plasserer et individ i den baselineprøven som er genetisk mest lik (uansett absolutt grad av likhet). Direkte tilordning tar ikke med i betraktningen at i noen situasjoner, slik som i alle rømmingsepisoder, vil ikke alle kilder som teoretisk sett kan ha gitt opphav til rømlingene, være representert. Følgelig er det viktig å få et mål for genetisk likhet mellom disse rømlingene 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.

Direkte tilordning av alle 224 rømte fiskene til baselineprøver (Fig. 4a) viser at de fleste rømte fiskene var genetisk mest like prøve 7A (133stk = 59 %) og 5A (35stk = 16 %). Resten av de rømte fiskene fordelte seg over de resterende prøvene.

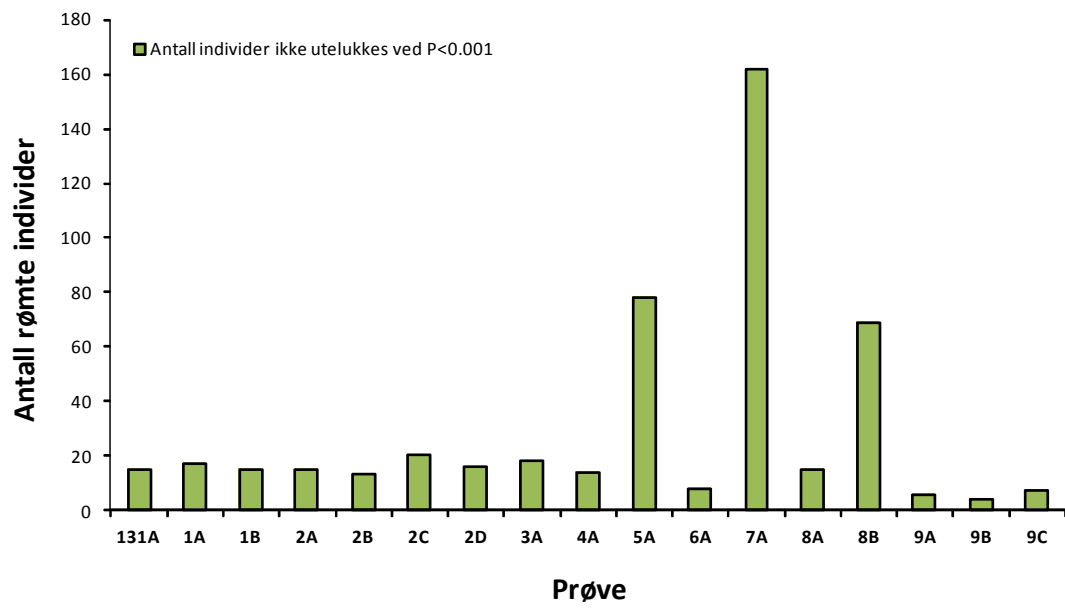
Når man ser på ekskluderingsresultatene (Fig. 4c), framkom det at ved signifikansnivå 0,001 (det mest krevende og samtidig sikreste signifikansnivået), kunne ingen av de 172 individene klassifisert til salmobreedlinjen ekskluderes fra baselineprøven 7A. Ved signifikansnivå 0,05 (Fig. 4b) var det fortsatt vanskelig å forkaste de aller fleste rømte fiskene fra anlegg 7A, men derimot ville de aller fleste av de rømte fiskene blitt forkastet fra anlegg 5A og 8B. Dette gir et sterkt signal på at de fleste rømte fiskene stammer fra anlegg 7A. Alle baselineprøvene med Mowi og Aqua Gen som genetisk bakgrunn utelukkes som hovedkilde til de rømte fiskene ved det mest stringente forkastningsnivået med bakgrunn i denne analysen.



Figur 4a Direkte tilordning av de 224 rømte individer til anlegg.



Figur 4b Antall rømte fisk (totalt 224) som ikke blir ekskludert fra prøven ved 0,05 signifikansnivå

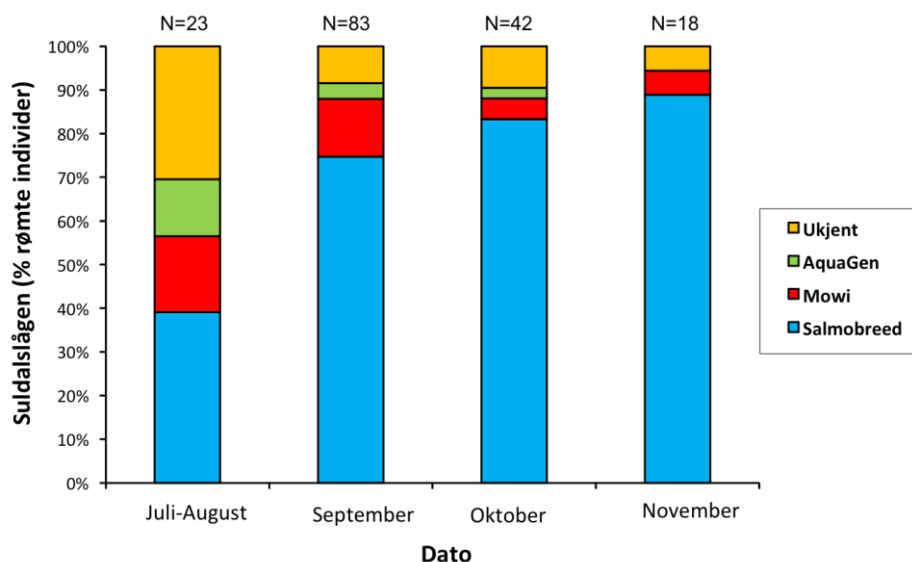


Figur 4c Antall rømte fisk (totalt 224) som ikke blir ekskludert fra prøven ved 0,001 signifikansnivå

Biologiske analyser av den rømte fisken sammenholdt med genetisk klassifisering

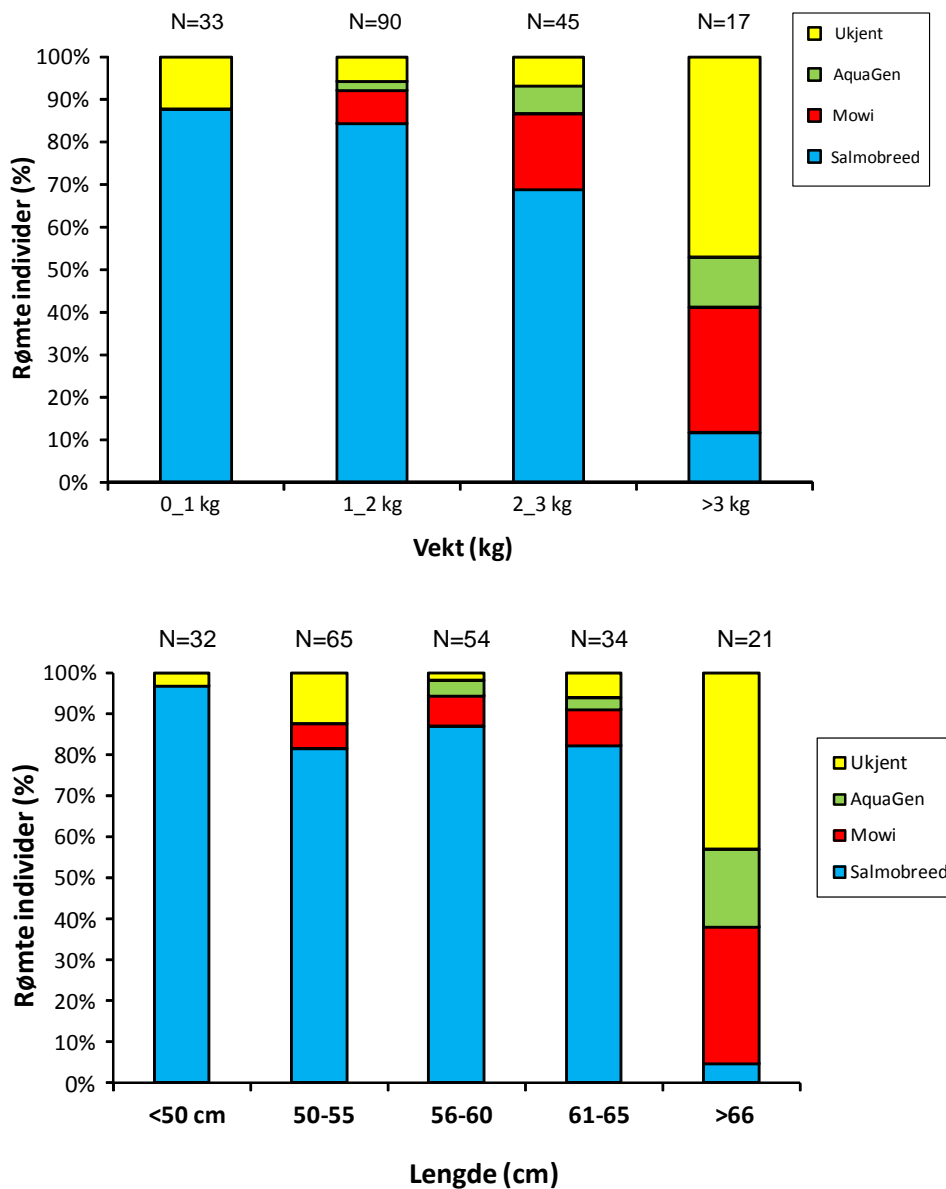
For de fleste rømte laksene foreligger det biologisk informasjon, fra både analyser av skjell, og målinger utført på fangststed, slik som vekt og lengde (Vedlegg 2). Hvilke data som er tilgjengelig for individene varierer noe mellom ulike innsamlings-lokaliter. Det er også angitt fangstdato for de fleste fiskene, noe som gjør det mulig å se nærmere på utviklingen over tid i parametre som lengde og vekt, og se om det er trender eller mønstre i sammensetningen av den rømte fisken over tid.

Vi fordelte fangsten av de rømte i fiskene i Suldalslågen på fire ulike tidsperioder og sammenliknet fordelingen blant oppdrettslinjene i disse tidsperiodene. Mønsteret som framkommer viser at i den første perioden, juli-august, var fangsten av rømt laks sammensatt av flere ulike oppdrettslinjer (Fig. 5). Videre utover høsten ble fangstene mer og mer dominert av laks av salmobreedlinjen.



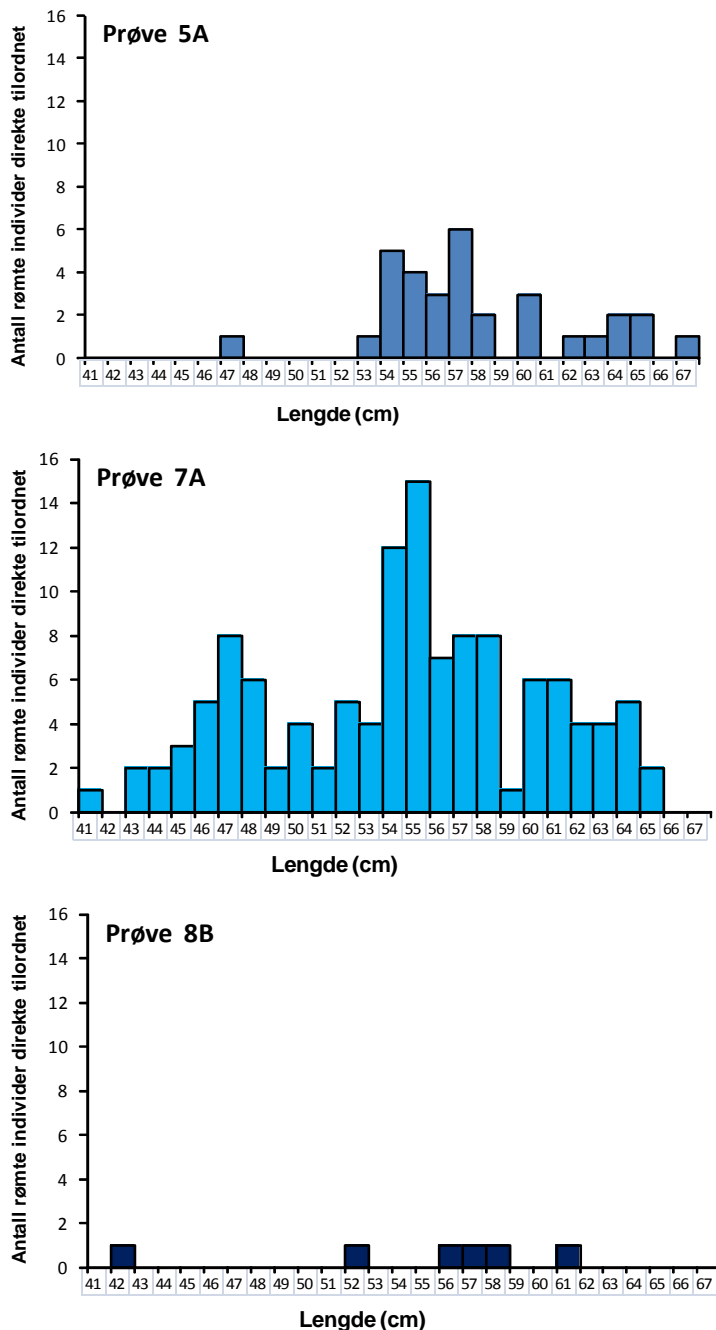
Figur 5 Klassifisering til avlslinje av rømt fisk i Suldalslågen i ulike tidsperioder

Når man ser nærmere på størrelsesfordelingen av rømt laks innenfor de ulike kategoriene, ser man at Salmobreedlinjen dominerer de minste størrelseskategoriene, mens fisk større enn 65cm og 3kg består av en blanding av ulike avlslinjer (Fig 6).



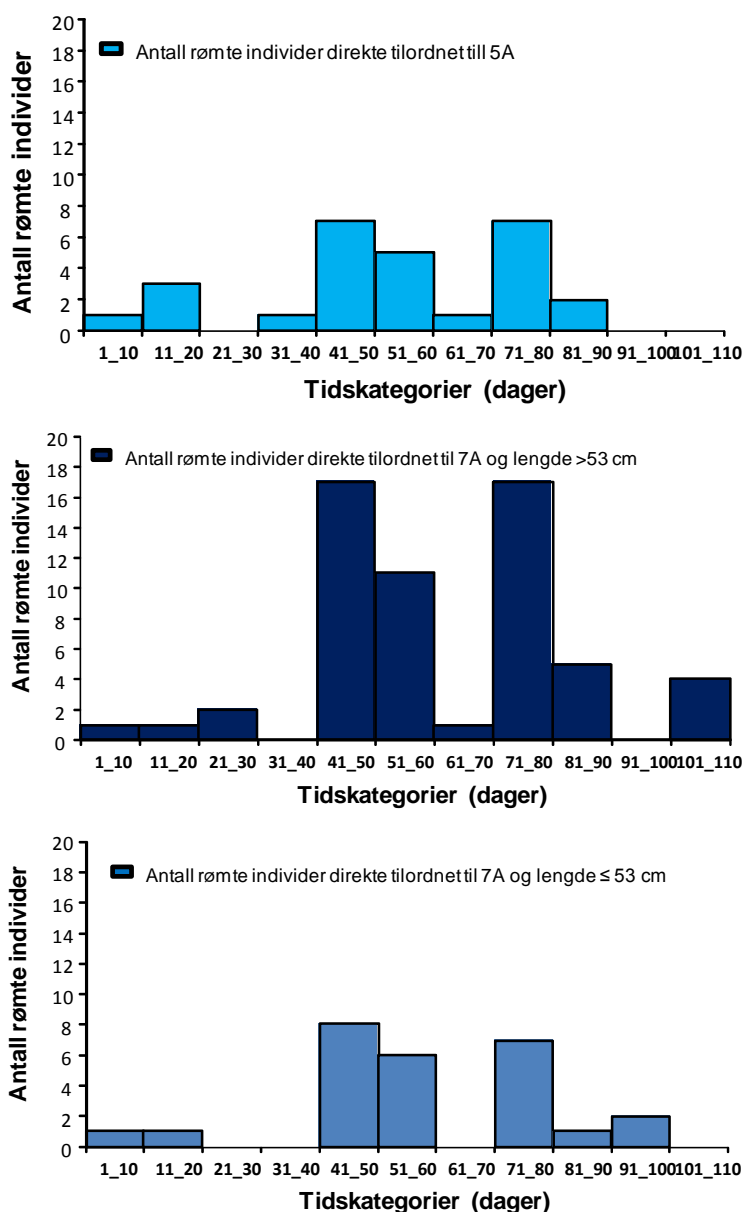
Figur 6 Fordeling av den rømte laksen i ulike størrelseskategorier og avlslinjer

Når man konsentrerer seg om de rømte fiskene med Salmobreed som opphavslinje (172stk), ser man at gjennom å kombinere direkte tilordning til et av de tre anleggene med Salmobreedlinje, og deres lengdefordeling, at de minste fiskene kun blir tilordnet til anlegg 7A, mens fisk over 53cm blir tilordnet både 7A og 5A (selv om de fleste i denne kategorien likevel blir plassert også i 7A). Svært få blir tilordnet anlegg 8A. Det kan også bemerkes at lengdefordelingen for fisk tilordnet prøven 7A er ikke normalfordelt (Fig. 7).



Figur 7. Lengdefrekvens av de rømte fiskene som ble først identifisert til Salmobreedlinje og deretter direkte tilordnet til en av de tre baselineprøvene av Salmobreed opphav. Individdata (genetisk identifisering samt biologisk informasjon) er tilgjengelig i Vedlegg 2.

Tidspunkt for fangst av de rømte fiskene av Salmobreedlinjen i Suldalslågen er presentert i Fig. 8. Midt i perioden var det lite fangst av rømt fisk (61-70 dager). Det er perioden etter at fiskesesongen er avsluttet og før koordinert utfisking av de rømte fiskene begynte. Det er likevel klart ut fra figuren at de rømte fiskene som ble tilordnet prøven 5A, og 7A, ble fanget i et overlappende tidsrom.



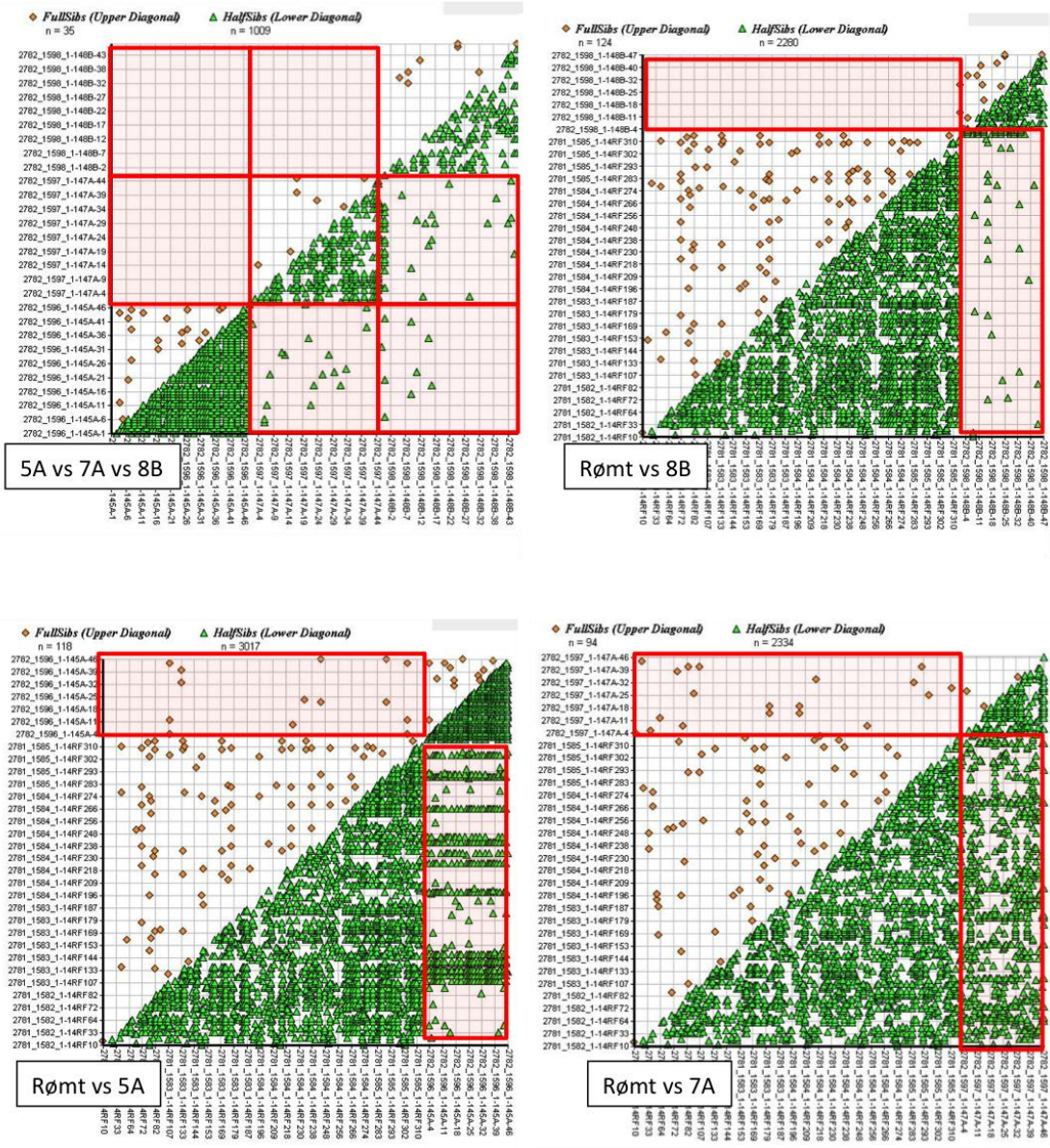
Figur 8 Fangstdato ved dagnummer (dag 1 satt til dato for første fangst av rømt laks) for laks klassifisert til Salmobreedlinjen direkte tilordnet til prøvene 5A, og 7A (fisk over 53cm lengde og fisk under 53cm lengde splittet i to grupper) som ble fanget i Suldalslågen høsten 2013.

Slektskap mellom rømte individer og individer i baselineprøver

En alternativ metode for å undersøke om det er sannsynlig at rømte individer kommer fra en konkret kilde, er å analysere slektskap mellom individer. I en oppdrettsmerd vil det være et begrenset antall familier representert, og ved hjelp av analyser i programmet COLONY kan man undersøke om det er sannsynlige helsøsken- og halvøskenpar mellom rømt fisk og fiskene i en merd. Programmet foretar en sannsynlighetsanalyse for slektskap mellom individer basert på variasjonen i DNA-markører. Vi gjennomførte slike analyser for å undersøke mulig slektskap mellom de rømte individene som tidligere ble tilordnet Salmobreedlinjen (172 individ), og anlegg med fisk av samme linje (5A, 7A, 8B), og for kontroll også en analyse hvor fisk fra de tre anleggene ble analysert mot hverandre.

Det var ingen sannsynlige søskenpar mellom de tre anleggene (Fig. 9), og også relativt få mulige halvøskenpar. Dette betyr i praksis at dersom det rømmer fisk fra kun en av de tre merdene, burde man ikke finne helsøskenpar mellom de rømte fiskene og de to andre kildene med Salmobreedlinje, kun med den aktuelle merden der deres søsken fortsatt er.

Analysene viste også at det var mange hel- og halvøskenpar blant de rømte fiskene, noe som indikerer at Salmobreed-rømlingene utgjorde en homogen gruppe med mange individer rømt fra samme kilde. Det var ingen sannsynlige helsøskenpar, og få mulige halvøskenpar mellom de rømte fiskene og anlegg 8B. Dette støtter de tidligere analysene som viser at selv om de fleste rømte fiskene er av Salmobreedlinje, er ikke merden 8B hovedkilden til de rømte fiskene (Fig. 4a). Mellom anlegg 5A og de rømte fiskene var det 6 sannsynlige helsøskenpar, og en del mulige halvøskenpar. Mellom anlegg 7A og de rømte fiskene var det totalt 17 sannsynlige helsøskenpar, og svært mange mulige halvøskenpar. Samlet sett indikerer disse analysene at det er et sannsynlig slektskap mellom mange av de rømte fiskene og anlegg 7A, og også slektskap mellom enkelte fisk og fisken i anlegg 5A. Dette er konsistent med analysene som viser at de fleste rømte fiskene med Salmobreedlinje har opphav fra merd 7A, men at noen av de også kan linje fra merd 5A (Fig. 4 og Fig. 7).



Figur 9. Plott som viser resultatet av Colony analysene. Innenfor hvert av de fire plottene vises forekomsten av halvøskenpar som et grønt punkt i nedre diagonalfelt, og helsøsken som oransje punkt i øvre diagonalfelt. I det første plottet sammenliknes anleggene 5A, 7A og 8B. Sammenlikninger på tvers av anlegg er markert ved de røde rektanglene. Plottet viser ingen helsøskenpar mellom anlegg, og få mulige halvøskenpar. Tilsvarende rektangler i de andre tre plottene viser mulige hel- og halvøskenpar mellom rømt fisk og anlegg.

Oppsummering og konklusjoner

Denne rømmingssaken er omfattende fordi den baserer seg på analyser av mange rømte fisk fanget i forskjellige elver over en lengre tidsperiode (august til november). Samtidig er det mange anlegg i området med fisk som overlapper i størrelse med de rømte fiskene, og dermed mange potensielle kilder til de rømte fiskene. De viktigste punktene er summert under:

1. Alle baselineprøvene basert på AquaGen- eller Mowi linjer er utelukket som opphav til hovedrømmingen. Dette er meget sikkert, og selv på det mest stringente forkastningsnivået (0,001), ble de aller fleste rømte laksene ekskludert fra samtlige av disse baseline prøvene (Fig. 4a-c, Vedlegg 2).
2. De aller fleste rømte laksene som stammer fra Salmobreedlinjen likner mest på prøven 7A (77 %) (Fig. 4a). Samtidig kunne nesten ingen av de 172 rømte laksene som har Salmobreed's genmateriale ekskluderes fra 7A ved signifikans 0,001 (Fig. 4c). Dette gir et meget tydelig signal på at anlegg 7, der prøven 7A er tatt fra, er den mest sannsynlig hovedkilden.
3. 20 % av de rømte fiskene klassifisert til Salmobreedlinje liknet mest på prøve 5A (Fig. 4a). Ved signifikans nivå 0,05 ble likevel nesten alle de rømte fiskene forkastet fra 5A (Fig. 4b). Men på signifikans 0,001 ble rundt halvparten av de rømte fiskene forkastet fra 5A (Fig. 4c). Dette betyr at selv om anlegg 5 er utelukket som hovedkilden i denne saken, kan det ikke utelukkes at det har vært en relativt sett mindre tilleggslekkasje fra dette anlegget.
4. Det er ikke mulig med sikkerhet å skille mellom følgende alternativer: **A:** Alle rømlingene tilordnet Salmobreedlinje kommer fra anlegg 7, og at enkelte ligner på fisk i anlegg 5A skyldes tilfeldighet på grunn av genetisk likhet mellom disse to prøvene, og **B:** Det har vært en relativt sett mindre rømming fra anlegg 5 i tillegg til hovedrømming fra anlegg 7. Slektskapsanalysen (Fig. 9), direkte tilordning av fiskene, samt at det er kun fisk >53cm som ble tilordnet til anlegg 5A indikerer at det har vært en rømming fra dette anlegget i tillegg til hovedrømming fra anlegg 7. Likevel kan det virke noe usannsynlig at det har rømt noen fisk fra anlegg 5 som har samme genetiske bakgrunn som fiskene fra anlegg 7, samme størrelse, og som ble fanget i akkurat det samme tidsrom som de rømlingene som stammer fra anlegg 7.

Basert på en helhetlig vurdering av de analysene som inngår i denne rapporten, kan det konkluderes med at de aller fleste rømte laksene i denne saken har sitt opphav fra et eller noen få anlegg med fisk av Salmobreedlinje, og at anlegg 7 er den mest sannsynlige hovedkilden til de rømte laksene. Samtidig er det ikke mulig å utelukke at i tillegg til hovedrømmingen fra anlegg 7, kan også anlegg 5 ha hatt et relativt sett mindre utslipp av fisk.