

HiT notat nr 1/2003

Genetisk undersøkelse av stamfisk av ørret fra Måna, Tinnsjø

Jan Heggenes¹ og Knut H. Røed²

¹) Høgskolen i Telemark, N-3800 Bø i Telemark, Norge

²) Norges veterinærhøgskole, Boks 8146, Dep. 0033 Oslo 1, Norge

**Avdeling for allmenne fag (Bø)
Institutt for natur- helse- og miljøvern**

**Høgskolen i Telemark
Porsgrunn 2003**

HiT notat 1/2003
ISSN 1501-8520 (trykt)
ISSN 1503-3759 (online)

Høgskolen i Telemark
Postboks 203
3901 Porsgrunn
Telefon 35 57 50 00
Telefaks 35 57 50 01
<http://www.hit.no/>

Trykk: Kopisenteret. HiT-Bø

© Forfatterne/Høgskolen i Telemark

Det må ikke kopieres fra rapporten i strid med åndsverkloven og fotografiloven, eller i strid med avtaler om kopiering inngått med Kopinor, interesseorganisasjon for rettighetshavere til åndsverk

Sammendrag

I Tinnsjø ble det i perioden 1958-1998 utsatt 50 000 en-somrig ørret pr. år, hovedsaklig Tunhovd-ørret. Direktoratet for Naturforvaltning endret pålegget 06.08.1996 med krav om først å finneklippe og sette ut 50 000 ørret av Tunhovd stamme i 1996-1998, og deretter utsetting av finneklippet ørret av Tinnsjøstamme.

Det har vist seg vanskelig å få tilstrekkelig mengde stedegen rogne fra villfisk. Norsk Hydro ønsker derfor å beholde ca. 1000 ørret av 2000 årgang som nå går i anlegg som en reserve av stamfisk. Denne undersøkelsen ble gjennomført for klarlegge den genetiske struktur til anleggsfisken, og undersøke slektskap med stedegen ørret.

Et representativt utvalg på 30 ørret fra anleggsørreten ble undersøkt for 10

mikrosatelitter, sammen med ørret fra Tinnsjø, nedre del av Måna og Tunhovd.

Tilhørighets-analyser (assignment tester) viste at alle individene genetisk sett lå nær villfisk av Tinnsjø/Måna-nedre ørret. Det indikerer at ørreten tilhører stedegen stamme.

Genetiske analyser viste liten genetisk variasjon hos anleggsfisken sammenlignet med villfisk. Dette skyldes at foreldregenerasjonen har vært så liten at denne populasjonen har gått gjennom en genetisk flaskehals med betydelig tap av genetisk variasjon.

Nåværende anleggsfisk bør derfor ikke brukes mer enn nødvendig til produksjon av settefisk, og bør den så snart som mulig suppleres med flere individer fra andre stedegne foreldre.

Innhold

Innledning	s. 1
Materiale og metode	s. 2
Prøver fra de tre populasjonene ble innsamlet	s. 2
Ørreten ble undersøkt genetisk ved mikrosatellitt DNA	s. 3
Analyser	s. 4
Resultater og kommentarer	s. 4
Konklusjoner	s. 9
Referanser	s. 9
Vedlegg I	s. 10

Innledning

I Tinnsjø ble det i perioden 1958-1998 utsatt 50 000 en-somrig ørret per år (1958-62 satt 27 000 pr. år), hovedsaklig Tunhovd-ørret, men også noe Slidre-ørret. Fisken er satt fra land direkte i den nordlige delen av Tinnsjø mellom Austbygdåi og Måna. Genetiske undersøkelser av ørret i Tinnsjø har vist at utsatt ikke-stedegen ørret i liten grad bidrar til reproduksjonen (Heggenes et al. 1996). Endret pålegg ble derfor gitt av DN 06.08.1996 hvor det var et krav om først å finneklippe og sette ut 50 000 ørret av Tunhovd stamme i årene 1996-1998. F.o.m. 1999 ble utsettingspålegget endret til utsetting av finneklippet ørret av Tinnsjøstamme, og det ble igangsatt årlig stamfiske etter stedegen ørret.

Tinnsjø har 5 mulige rekrutteringselver av betydning for ørret. Måna var tidligere hovedgyteelv for ørret og storørret i Tinnsjø. Nye undersøkelser viser at det nå går relativt få storørret i elva. Tre andre gyteelver i nordenden av Tinnsjø er Gøyst, mer enn 3,5 km tilgjengelig, Mår, ca. 1,2 km tilgjengelig, og Austbygdåi med 1,2 km tilgjengelig for oppvandrende ørret. Tinnelva, dvs. utløp Tinnsjøen i sørenden, har en tilgjengelig svak utstrøm på ca. 100-300 m (avhengig av vannstand i Tinnsjøen som er regulert 4 m) som brukes til gyting.

Det har vist seg vanskelig å få en årviss forsyning av tilstrekkelig mengde rogn til oppdrett av nødvendig antall settefisk av stedegen stamme. Norsk Hydro ønsker derfor å beholde ca. 1000 ørret av 2000 årgang som nå går i anlegget til A/L Settefisk, Reinsvoll, som en reserve av stamfisk for de år det eventuelt skulle vise seg vanskelig å få nok rogn fra villfanget ørret. Ifølge de opplysninger fra Norsk Hydro (R. Løvberg, pers. med.), stammer de omtalte 1000 ørret sannsynligvis fra rogne fra en hun-ørret og melke fra to hanner, alle fanget ved stamfiske i Månas innløp i Tinnsjø høsten 1999.

Fylkesmannen i Telemark ønsket et representativt utvalg av de 1000 ørret på A/L Settefisk ble undersøkt genetisk for å være sikker på at dette er fisk av stedegen stamme. Foreliggende undersøkelser ble gjennomført for å klarlegge dette. De spesifikke målsettingen for prosjektet var:

- 1) Klarlegge den genetiske struktur til anleggfsk av ørret fra Måna, Tinnsjø, som går i anlegget til A/L Settefisk, Reinsvoll.
- 2) Teste slektskap mellom denne populasjonen og populasjon av villfisk av ørret fanget i Tinnsjø og i nedre del av Måna.
- 3) Teste om denne populasjonen er iblandet genetisk materiale fra tidligere utsatt fisk fra Tunhovd.

Materiale og metoder

Prøver fra de tre populasjonene ble innsamlet

Prøver av ørret fra fisken i anlegget til A/L Settefisk, Reinsvoll, ble innsamlet i oktober 2002. Et tilfeldig utvalg på 30 individer ble fanget direkte fra samle karet, bedøvet, lengdemålt og fettfinnen ble klippet som vevsprøve og oppbevart på individuelt merkede tuber med etanol. All prøvetatt fisk ble satt tilbake i karet. Dette materialet er senere i rapporten omtalt som anleggfsk-populasjonen.

Et materiale fra Tunhovd-ørret fra anlegget til A/L Settefisk fra 1999-årsklassen ble brukt som referansemateriale til genetisk struktur til Tunhovd-ørret. Vevsprøver ble tatt fra halefinnen.

Et større materiale på ca. 350 ørret fra Tinnsjø ble garnfanget, hovedsakelig i nordre del av Tinnsjø, sommeren og høsten 2001 i forbindelse med det pågående merkeprosjekt i Tinnsjø (L. Flå, pers. med.). Gjellebuer ble innsamlet fra all fisk og bevart individuelt i etanol på dramsglass. Vevsprøver ble tatt fra gjellebuene.

Et tidligere innsamlet materiale av naturlig fisk fra nedre del av Måna ble også analysert, som en av de viktigste rekrutteringselvene for Tinnsjø. Det er også elven hvor egg og melke som var opphavet til populasjonen ved A/L Settefisk ble innsamlet.

Ørreten ble undersøkt genetisk ved mikrosatellitt DNA

Ørret viser betydelig genetisk variasjon (f. eks. Hansen 2002). DNA mikrosatellitt-teknikker gir pr. i dag mest informasjon om genetisk variasjon, og ble benyttet til denne undersøkelsen.

Mikrosatellitter er korte segmenter av DNA, vanligvis 50-200 basepar. Slike mikrosatellitter inneholder tandem repeterte sekvenser av 1-5 basepar. De er gjennomgående vidt utbredt i genomet og viser ofte stor grad av genetisk variasjon (polymorfi) og er som oftest ikke utsatt for seleksjon (nøytrale). De er derfor velegnet til å påvise eventuelle genetiske forskjeller mellom populasjoner.

Omtrent 100-200 mg vevsprøve ble brukt for å ekstrahere DNA ved en modifisert prosedyre etter salt-ekstraksjonsmetoden (Miller et al. 1988, Pogson et al. 1995). Variasjonen ble analysert ved å amplifisere opp de repeterte sekvensene ved hjelp av PCR-teknikk (Polymerase Chain Reaction). Variasjonen i PCR-produktene ble synliggjort og analysert ved bruke av en sekvenseringsmaskin (se Vedlegg I for detaljer).

Vi analyserte variasjon i ni forskjellige DNA mikrosatellitter (Tabell 1).

Analyser

Computer-programmet BIOSYS-1 (Swofford & Selander 1981) ble brukt til å beregne allel-frekvenser per lokus, midlere sample-størrelse og midlere antall alleler per lokus, og midlere forventet heterozygositet over lokus innen populasjoner.

BIOSYS-1-programmet ble brukt til å beregne genetiske Nei's avstander mellom populasjoner.

Den vesentligste del av analysene gikk ut på å vurdere sannsynligheten for at ørreten fra Reinsvoll var av stedegent opphav, eller fra innført ørret, dvs. sannsynligvis Tunhovd. Vi benyttet computer-programmet WhichRun 3.2. for å klassifisere enkeltindivider fra Reinsvoll-populasjonen til de ulike gruppene av stedegen villfisk (Tinnsjø, Måna) og settefisk-populasjoner (Tunhovd). Dette programmet er utviklet til å klassifisere individer basert på analyser av polymorfe lokus som bl.a. mikrosatellitter (Banks and Eichert 2000).

Resultater og kommentarer

De ni mikrosatellittene var alle polymorfe, men viste betydelige forskjeller og bredde mht. antall allel i de stedegne villfisk- og Tunhovd-populasjonene, fra to (Bru22, Str60) til 21 (Bru25 i Måna-nedre) (Tabell 1). For alle de tre populasjonene var graden av variasjon høy og nokså lik med midlere forventet heterozygositet fra 0.60 i Tunhovd til 0.66 i Tinnsjø (Tabell 1). Forholdsvis mange alleler viste relativt lave frekvenser. Av de i alt 80 forskjellige alleler påvist i Tinnsjø, viste 56 frekvenser lavere enn 0.1. Tilsvarende viste 46 av i alt 73 alleler i Måna-nedre frekvenser lavere enn 0.1, og tilvarende tall for Tunhovd var 37 av i alt 63 alleler. Det var bare mindre forskjeller i forventet heterozygositet og antall alleler per locus mellom de tre naturlige populasjonene. Analysene viste derfor betydelig naturlig genetisk variasjon.

Resultatene var svært forskjellige for anleggfsfisk-populasjonen av ørret i anlegget til A/L Settefisk. Denne populasjonen viste liten genetisk variasjon (Tabell 1). Tre av de undersøkte mikrosatelittene var monomorfe, og for de øvrige ble det påvist bare 3 eller 4 alleler (Tabell 1). Denne populasjonen visert liten genetisk variasjon fordi det er for få individer i foreldregenerasjonen, sannsynligvis bare 3 eller 4 individer (R. Løvberg, pers. med.). Bruk av så få individer i foreldregenerasjonen medfører tildels betydelig tap av genetisk variasjon. Normalt bør en foreldregenerasjon bestå av minst 20 individer for å ta vare på en vesentlig del (98%) av variasjonen i den opprinnelige populasjonen (f.eks. Caughley & Gunn 1996)

Dersom det er ønskelig å bruke rogn og melke fra ørret fra den nåværende anleggfsfisk-populasjonen til produksjon av settefisk for Tinnsjø, bør dette derfor skje over et så kort tidsrom som mulig. Den nåværende anleggfsfisk-populasjonen bør så snart som mulig suppleres med stedegen ørret med opphav fra andre foreldre for slik å øke den genetiske variasjonen hos anleggfsfisk.

Tabell 1. Antall individer analysert (N), antall alleler (N_{all}) funnet og forventet hetrozygositet (H, Hardy-Weinberg likevekt) for mikrosatelittloci analysert på ørret prøvetatt fra Tinnsjø, Måna-nedre, Anleggfsfisk og Tunhovd.

Loci	Tinnsjø			Måna-nedre			Anleggfsfisk			Tunhovd		
	N	N_{all}	H	N	N_{all}	H	N	N_{all}	H	N	N_{all}	H
Bru13	31	14	0.87	111	10	0.83	30	3	0.57	37	13	0.83
Bru22	32	2	0.12	113	2	0.31	30	1	0.00	40	2	0.10
Str58	31	15	0.80	99	10	0.71	26	4	0.74	36	10	0.86
Str15	32	6	0.78	101	5	0.69	29	3	0.64	36	4	0.71
Bru25	29	19	0.92	108	21	0.85	30	3	0.66	34	13	0.91
Bru14	30	4	0.34	108	4	0.33	29	1	0.00	40	2	0.05
Str60	32	2	0.44	109	2	0.29	30	1	0.00	40	2	0.32
Str12	31	11	0.86	109	12	0.84	30	3	0.63	34	11	0.83
Bru7	31	7	0.80	112	7	0.71	30	3	0.63	38	6	0.76
Middel	37.2	8.9	0.66	107.8	8.1	0.62	29.3	2.4	0.43	37.2	7.0	0.60

Resultater fra tidligere undersøkelser indikerer at det ikke var sterke koblinger mellom de undersøkte lokus, og derfor ikke påvirker tolkningen av resultatene (Heggenes et al. 2002).

Estimater for Nei's genetiske avstand (Tabell 2) viste at Tinnsjø og Måna-nedre viste størst genetisk likhet ($D = 0.044$), mens den minste likheten var mellom anleggfsfisk-populasjonen og Tunhovd-populasjonen ($D = 0.252$). Resultatene for genetiske avstander må imidlertid tolkes med stor forsiktighet, ettersom anleggfsfisk-populasjonen har vært gjennom en genetisk flaskehals som er avgjørende for denne populasjonens genetiske struktur. En slik flaskehalseffekt kan derfor virke vesentlig inn på resultatet.

Tabell 2. Genetiske avstander mellom populasjoner av ørret prøvetatt fra Tinnsjø, Måna-nedre, Settefisk og Tunhovd. Nei's (1978) genetiske avstands-koeffisienter.

Populasjon	Tinnsjø	Måna-nedre	Anleggfsfisk	Tunhovd
Tinnsjø	**			
Måna-nedre	.044	**		
Anleggfsfisk	.164	.154	**	
Tunhovd	.063	.166	.252	**

Tilhørighets-(assignment) testene, hvor alle enkeltindivider fra anleggfsfisk-populasjonen ble klassifisert til den nærmest liggende populasjon - steden villfisk (Tinnsjø, Måna-nedre) eller Tunhovd -, viste imidlertid helt entydige resultater.

Av 30 enkeltindivider ble 11 klassifisert som Tinnsjø-fisk og 19 som Måna-nedre fisk. Ingen individer ble klassifisert som Tunhovd-fisk, for alle individene var Tunhovd den minst sannsynlige tilhørighet. Dette viser at det representative utvalget fra anleggfsisk-populasjonen (30 individer) genetisk sett er stedegen fisk.

Tabell 3. Tilhørighet for 30 ørret-individer fra anleggs-populasjonen. Forholdet P(1)/(P2) viser hvor mye mer sannsynlig det er at individet tilhører P(1) – den mest sannsynlige populasjon - framfor P(2) – den nest mest sannsynlige populasjon.

Individ	Mest sannsynlige populasjon: P(1)	Nest mest sannsynlige populasjon: P(2)	Ratio P(1)/P(2)
1	Tinnsjø	Måna-nedre	6
2	Måna-nedre	Tinnsjø	42
3	Tinnsjø	Måna-nedre	23
4	Tinnsjø	Måna-nedre	4
5	Tinnsjø	Måna-nedre	9
6	Måna-nedre	Tinnsjø	160
7	Måna-nedre	Tinnsjø	6
8	Måna-nedre	Tinnsjø	2
9	Tinnsjø	Måna-nedre	3
10	Måna-nedre	Tinnsjø	30
11	Måna-nedre	Tinnsjø	136
12	Tinnsjø	Måna-nedre	9
13	Måna-nedre	Tinnsjø	2
14	Måna-nedre	Tinnsjø	3
15	Tinnsjø	Måna-nedre	1
16	Måna-nedre	Tinnsjø	1
17	Måna-nedre	Tinnsjø	2
18	Måna-nedre	Tinnsjø	3
19	Tinnsjø	Måna-nedre	11
20	Tinnsjø	Måna-nedre	143
21	Tinnsjø	Måna-nedre	7
22	Måna-nedre	Tinnsjø	3
23	Måna-nedre	Tinnsjø	8
24	Måna-nedre	Tinnsjø	134
25	Måna-nedre	Tinnsjø	15
26	Tinnsjø	Måna-nedre	73
27	Måna-nedre	Tinnsjø	4
28	Måna-nedre	Tinnsjø	15
29	Måna-nedre	Tinnsjø	3
30	Måna-nedre	Tinnsjø	2

KONKLUSJONER

1) Et representativt utvalg på 30 ørret fra ca. 1000 ørret av antatt Tinnsjøstamme i anlegget til Settefisk AL, er undersøkt genetisk. Tilhørighets-analyser (assignment tester) viste at alle individene genetisk sett lå nær villfisk av Tinnsjø/Måna-nedre ørret. Det indikerer at ørreten tilhører stedegen stamme.

2) Genetiske analyser viste liten genetisk variasjon hos anleggfishen sammenlignet med villfisk. Dette skyldes at foreldregenerasjonen har vært såpass liten at denne populasjonen har gått gjennom en genetisk flaskehals med betydelig tap av genetisk variasjon. Den nåværende anleggfishen bør derfor ikke brukes mer enn nødvendig til produksjon av settefisk. Om mulig bør den så snart som mulig suppleres med flere individer fra andre stedegne foreldre.

Referanser

Banks, M.A. & Eichert, W. 2000. A computer program for population assignment of individual based on multilocus genotype data. *The Journal of Heredity* 91: 87-89

Caughley, G. & Gunn, A. 1996. *Conservation biology in theory and practice*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 459 s.

Hansen, N.M. 2002. Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (*Salmo trutta*) populations: an approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Molecular Ecology*, 11, 1003-1015.

Heggenes, J., Skaala, Ø., Borgstrøm, R. & Igland, O.T. 1996. Fiskeutsettinger i Tinnsjø: Genetiske effekter på lokal bestand. *Proceedings Fiskesymposiet 1996*: 91-104. Vassdragsregulantenenes Forening, Asker.

Miller, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16:1215.

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

Pogson, G.H., Mesa, K.A. & Boutilier, R.G. 1995. Genetic population structure and gene flow in the Atlantic cod, *Gadus morhua*: A comparison of allozyme and nuclear RFLP loci. *Genetics* 139: 375-385.

Raymond & Rousset 1995. GENEPOP (Version1.2): Population genetics software for exact tests and encumincism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.

Sneath P.H.A. & Sokal, R.R. 1973. Numerical taxonomy, the principles and practice of numerical classification. P. in Kennedy, D. & Park, R.B. (eds.). W.H.Freeman, San Francisco, USA.

Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. 1995. Biometry. W.H. Freeman, San Francisco, California.

Swofford, D.L. & Selander, R.B. 1981. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. Journal of Heredity 72: 281-283.

Weir & Cockerham 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370.

VEDLEGG I

Mikrosatelitt DNA

Under følger en detaljert og relativt teknisk beskrivelse av DNA- og analyse-metoder. I Resultatet og kommentarer har vi konsentrert oss om hovedspørsmålet hvorvidt anleggsørreten har opphav i stedegeen villfisk eller utsatt Tunhovd-fisk. For oversiktens skyld er derfor ikke alle resultater rapportert i detalj.

Omtrent 100-200 mg vevsprøve ble brukt for å ekstrahere DNA ved en modifisert prosedyre etter salt-ekstraksjonsmetoden beskrevet av Miller et al. (1988). Framgangsmåten var lik som i Pogson et al (1995), med unntak av at inkubasjon i lysis buffer som inneholdt 0.8 % SDS og 250ug Proteinease K ble gjort over natten ved 50°C.

Fremre primere ble ende-merket med fluoresens og PCR gjort på en GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Cetus) i 10 µl reaksjonsblandinger som inneholdt 20-40 ng genomisk template DNA, 2 pmol av hver primer, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl, 10 mM Tris-HCl, 0.2 mM dNTP and 0.5 U AmpliTaq (Perkin-Elmer). Termosykliske parametre etter denaturering ved 94°C i 5 min var 30 sykler ved 95°C i 1 min, 54°C annealing temperatur i 30 s, fulgt av forlengelse ved 72°C i 1 min. Det siste polymerisasjons-skrittet ble forlenget til 10 min. PCR produktet ble kjørt på elektroforese med en ABI Prism 310 Genetic-Analyser for fluoresens merkede produkter.

Analyser

Forskjeller i estimert forventet heterosygositet og antall alleler per locus mellom populasjoner ble testet med ikke-nonparametrisk Wilcoxon rank-sum test (Sokal & Rohlf 1995).

Overensstemmelse med Hardy-Weinberg likevekt for hver locus-populasjon kombinasjon og globalt over loci innen populasjoner ble analysert med programmet GENEPOP version 3.0 (Raymond & Rousset 1995) som benytter Markovkjede-metoden for å beregne estimater til Fisher's eksakte test vha. 1000 iterasjoner (Rousset & Raymond 1995). GENEPOP programmet og Markovkjede-metoden ble også benyttet til log-likelihood (G)-baserte tester for

populasjonsforskjeller i genotyper for hvert locus og over alle loci mellom populasjoner, og også for å beregne Weir & Cockerham's (1984) estimer for F_{ST} .