



Rømming 1-2020

Sporing av rømt oppdrettslaks fanget i Tingvollfjorden sommeren 2020

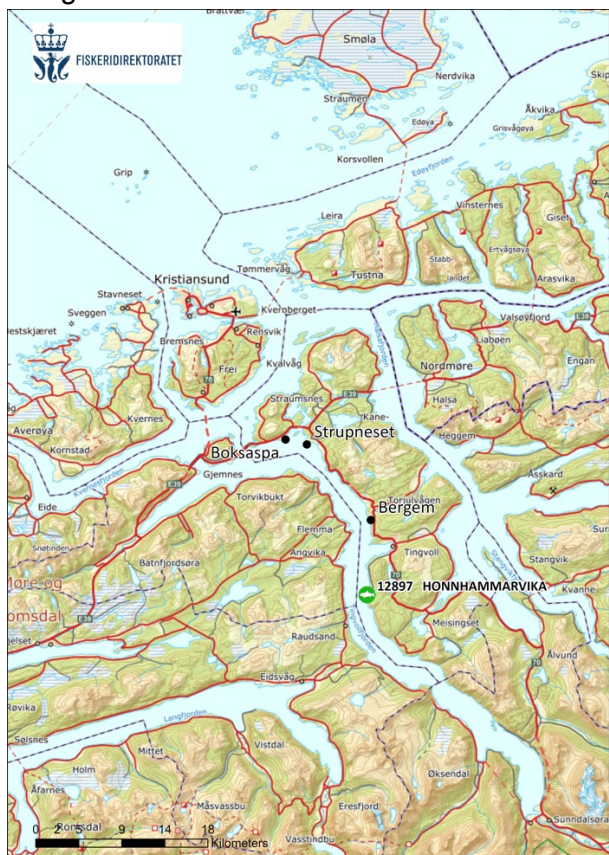
Wennevik, V., Quintela, M., Sørvik, A.G.E., Skaala, Ø., Glover, K.A.

Havforskningsinstituttet, Postboks 1870, Nordnes, 5817 Bergen

6. november 2020

Innledning

Denne undersøkelsen ble initiert av Fiskeridirektoratet på bakgrunn av opplysninger om fangst av rømt oppdrettslaks i kilenøter i Tingvollfjorden, Møre og Romsdal, i slutten av juni 2020. Informasjonen som ble mottatt tydet på at fisken kunne stamme fra en nylig rømming i området, med ukjente kilde. Denne rapporten beskriver genetiske og statistiske analyser av prøver fra rømt oppdrettslaks innsamlet fra Tingvollfjorden i perioden 22.06.2020- 07.07.2020, samt analyse av prøver fra én oppdrettslokalitet i fjorden som var den eneste lokaliteten i fjorden med fisk i aktuell størrelse (Fig. 1). Rapporten gir en sannsynlighetsvurdering av muligheten for at den rømte laksen kan stamme fra dette anlegget, basert på DNA-analysene.



Figur 1 kart som viser lokalisering til anlegget som er vurdert som mulig kilde til rømmingen samt lokaliteter for kilenoffangst av rømt oppdrettslaks (tre svarte prikker)

Materiale og metode

Materiale

Rømt oppdrettslaks

Skjellprøver av antatte rømt fisk ble samlet inn fra kilenotfangster i fjorden, fra totalt tre lokaliteter (Fig. 1). Totalt ble 281 skjellprøver samlet inn av lokale kilenotfiskere. Det var relativt liten spredning i størrelse på den prøvetatte fisken. Det ble målt vekt på de fleste fiskene, men noe ble registrert med sløyd vekt mens for andre ble det registrert rund vekt. For fisken som ble målt rund, varierte vekten mellom 2,5 kg og 4,1 kg. Det foreligger lengdemålinger for de fleste fiskene. Lengdene varierte mellom 52 cm og 97 cm, men de aller fleste individene var i lengdeintervallet 60 cm - 80 cm (Fig. 2, data for individene finnes i Vedlegg 1).

Skjellprøvene ble levert til Havforskningsinstituttet for verifisering av opphav ved hjelp av skjellanalyse (rømt eller vill) og genetisk analyse. Prøvene av rømt fisk fikk samlenavn: RF, med individ nr: 1-20RF1 til 1-20F281 (heretter refereres til som RF).

Referanseprøvene (baseline) fra aktuell oppdrettslokalitet

Prøver av oppdrettslaks ble samlet inn fra det eneste anlegget i området som hadde fisk av tilsvarende størrelse som de rømte fiskene (Tabell 1). Det ble til sammen tatt 188 fettfinneprøver av laks fra 4 merder på dette anlegget som representerte tre smoltgrupper, og alle disse prøvene ble gitt en entydig nummerering (Tabell 1). To av prøvene ble tatt fra det samme gruppe, og disse ble slått sammen til prøven 1C. Det ble samlet inn prøver av 47 fisk fra hver av de aktuelle merdene (2x47 for samle-prøven 1C). Prøvene fra anlegget refereres til som "baselineprøvene" og representerer mulig opphav til de rømte fiskene. Alt materialet ble overlevert av Fiskeridirektoratet til Havforskningsinstituttet 07.09.2020.

Siden kun et anlegg ble prøvetatt i forbindelse med denne saken, ble tre andre referanseprøver også tatt inn i en av de statistiske analysene (Fig. 4) for å sette prøvene i denne saken i en større kontekst. Disse tre tilleggs referanseprøver stammer fra tidligere rømmingsepisoder utenfor området, er ikke mistenkt som mulig kilde til de rømte fiskene. De stammer fra fisk av Aqua Gen, Mowi og Salmobreed stammene.

Genotyping av DNA-markører

DNA analyser ble utført i molekylærbiologisk laboratorium ved Havforskningsinstituttet i Bergen i tidsrommet 07.09.20-23.10.20. DNA ble isolert fra skjellprøver eller fettfinner 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.

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 MSA.

Videre ble genetisk struktur og clustering av individer i genetiske grupper analysert i programmet STRUCTURE 2.3.4. En strukturanalyse 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 (clusterer). 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. kryssinger mellom grupper og fysisk blanding). Strukturanalysen kjøres for et varierende antall forhåndsdefinerte clusterer og utfra resultatene finner man det antall clusterer som best beskriver det aktuelle datasettet.

Vi brukte også en diskrimantanalyse/prinsipalkomponent-analyse for å illustrere de genetiske forskjellene i prøvene som inngår i analysen, samt sammenligne disse prøvene med tidligere utførte analyser av fisk av samme og andre oppdrett-stammer (de tilleggs referanseprøvene nevnt ovenfor).

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 tre metoder. 1) Direkte tilordning til baselineprøvene, og 2) Ekskludering fra baselineprøver på signifikansnivå 0,001, og 3) Slektskapsanalyser mellom den rømte fisken og fisk i baselineprøvene, prøvene som inngår i analysen.

Direkte tilordning plasserer et individ i den baseline-prøven 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. Derfor 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.

Den tredje metoden vi benyttet for å identifisere mulig opphav til de rømte fiskene baserer seg på analyser av mulig nært slektskap mellom individer. I denne analysen, utført i programmet Colony versjon 2.0.6.2, beregnes grad av slektskap mellom individer, og mulige hel- og halvsøsken blant individene identifiseres. Påvisning av helsøsken mellom rømt fisk og fisk i merd kan bidra til å identifisere kilden til rømt fisk.

Det er viktig å merke seg at disse metodene beregner sannsynlighet for at den rømte laksen kan ha 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 merder som det ikke ble tatt prøver fra i forbindelse med denne episoden, og som derfor ikke inngår i baseline-materialet.

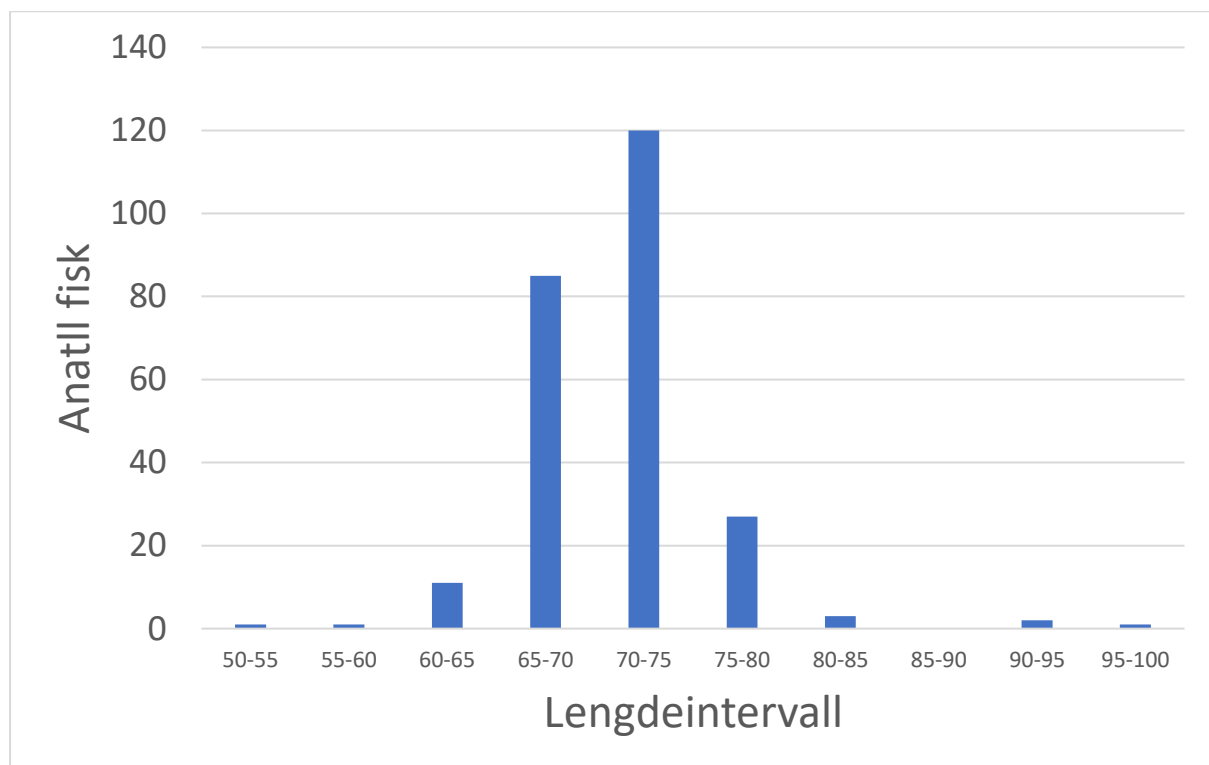
Resultater og diskusjon

Opphav til den antatt rømte fisken

Analysene av vekstmønster i skjellene viste at det var enkelte individer blant de antatte rømte fiskene som var faktisk villfisk. Disse ble fjernet fra videre analyser. Også individer hvor det ikke var mulig å bestemme opphav (rømt, vill, utsatt) sikkert ble ekskludert fra datasettet. Totalt ble 17 individer tatt ut av datasettet som følge av skjellanalysene.

Størrelsesfordeling av den rømte fisken

Gjennomsnittsvekt for de rømte laksene som det forelå rundvekt fra var 3,8 kg, varierende fra 2,5 kg til 6,2 kg (Tabell 1). Som vist i lengdefordelingen (Fig. 2), ligger de de aller fleste individer i størrelsesområdet 600 mm - 800 mm. Denne begrensede spredningen viser at hovedmengden av fisken er relativt homogen i størrelse, mens det er enkelte individer som avviker, noe som kan indikere at prøven kan inneholde noe fisk fra ulike kilder.



Figur 2 Størrelsesfordeling (lengde, mm) av den rømte fisken fanget i Tingvollfjorden og som er analysert i denne saken.

DNA-analyser

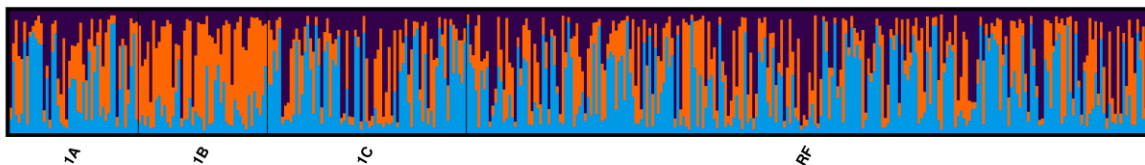
Etter DNA-ekstraksjon og analyse av genetiske markører, ble prøver med dårlige/svake resultater kjørt om igjen slik at data kunne hentes ut av flest mulig prøver. Etter omkjøringer var 18 markører scoret for de fleste individer, mens noen individer manglet data for enkelte markører. En av baseline-prøvene var av dårlig kvalitet og det måtte gjennomføres flere analyser for å hente ut mest mulig data. Én av de 18 markørene viste ingen variasjon og ble derfor fjernet fra datasettet. Totalt ble 34 individer (23 individer fra baselineprøvene, og 11 individer fra prøven av rømt fisk) fjernet fra datasettet fordi det ikke var mulig å få data av tilstrekkelig kvalitet. To individer ble tatt ut fordi de var triploide. Det var også dupliserte individer i prøven fra den rømte fisken. Trolig var det i noen tilfeller tatt skjellprøver to ganger av samme fisk. Ti individer ble fjernet av denne årsak. Datasettet for videre analyser besto derfor av 406 individer (Vedlegg 1).

Genetisk diversitet i prøvene

Analysen av genetisk diversitet i prøvene (Tabell 1) viste at antall alleler (varianter i de genetiske markørene) varierte mellom 125 og 137 i prøvene fra anlegget. Lavest diversitet ble observert i prøve 1C. Diversiteten i den samlede prøven av rømt fisk, RF, var høyere (181 alleler) enn i noen av prøvene fra anlegget. Dette kan være en indikasjon på at prøven er sammensatt av fisk fra flere kilder, men det kan også skyldes at prøven består av flere fisk og derfor er mer genetisk variasjon fanget opp. Korrigert for prøvestørrelse er imidlertid den genetiske variasjonen i den rømte fisken (7,1) på omtrent samme nivå som fisken i anlegget (6,5-7,5).

Genetisk differensiering mellom prøvene

Totalt sett, ble det observert veldig små genetiske forskjeller mellom alle fire prøvene som denne analysen består av (Tabell 2). De minste genetiske forskjellene ble observert mellom prøvene 1C og RF. Mellom disse to prøvene var den genetiske forskjellen, målt som F_{ST} , tilnærmet 0, dvs ingen forskjell. Forskjellene var også svært lave mellom andre prøver fra anlegget, og mellom disse prøvene og den rømte fisken. Prøven RF var altså ikke signifikant forskjellig fra prøve 1C, marginalt signifikant forskjellig fra 1A og signifikant forskjellig fra 1B. De lave observerte F_{ST} forskjellene samt signifikansnivå gir en klar indikasjon på at de rømte fiskene i hovedsak stammer fra merder ved dette anlegget.

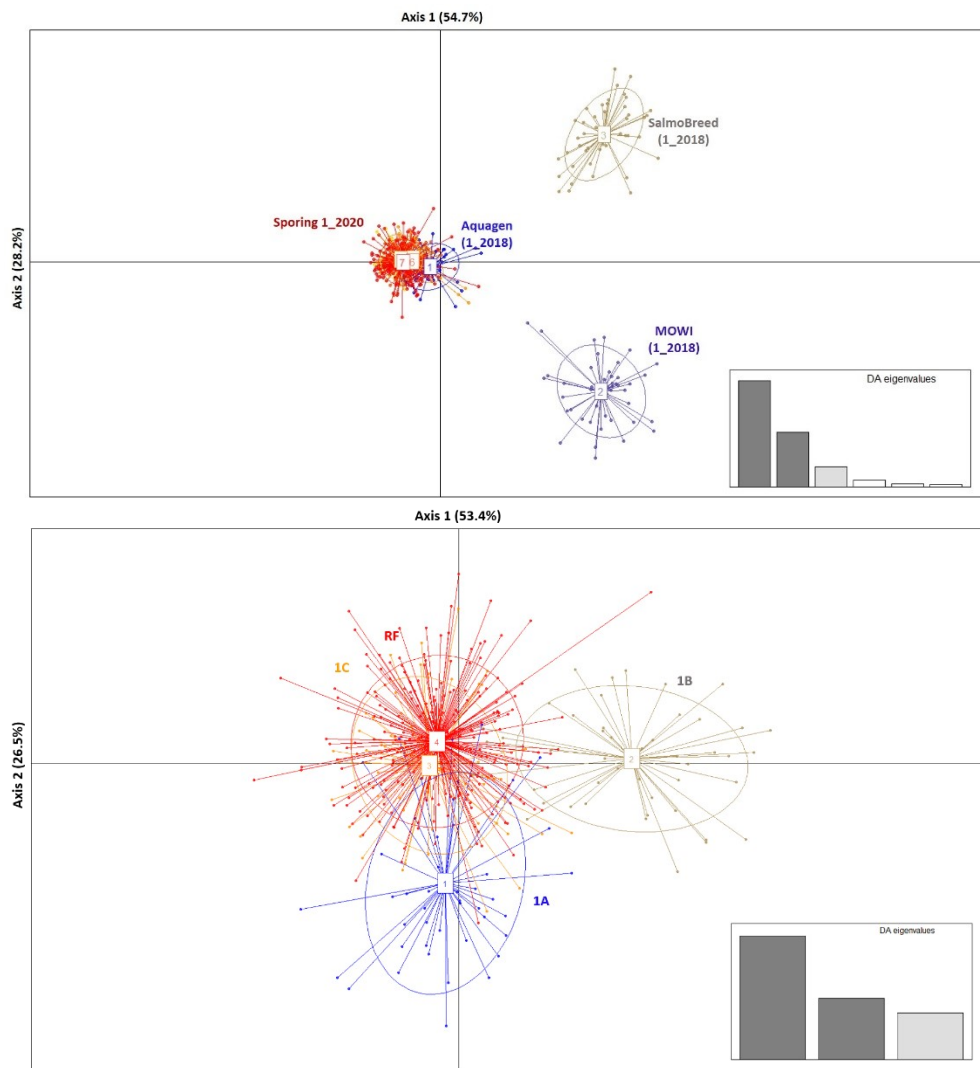


Figur 3 Diagram som viser hvordan laks fra de baselineprøvene 1A-1C, og de rømte fiskene (RF) fordeler seg i en strukturanalyse med inngitt tre ulike genetiske grupper. Hver vertikal linje representerer ett individ, og fargene representerer de genetiske gruppene. Hvert individ kan bestå av en eller flere farger.

Strukturanalyse (Fig. 3) er også en form for genetisk tilordning. Strukturanalysene klassifiserer individer i forhold til et antall på forhånd valgte genetiske kategorier (analysen kjøres for ulike antall genetiske grupper), med en angitt "andel av genomet" tilhørende hver av kategoriene (Vedlegg 1). I dette tilfellet er det definert to kategorier. For de fleste fiskene vil en av de tre kategoriene være dominerende, mens enkelte individ framstår som en blanding mellom ulike kategorier. I Figur 3 vil slike individ være karakterisert ved at søylen som representerer individet består av flere farger.

Resultatene fra strukturanalysen i denne saken viser at prøvene fra anlegget er svært like hverandre. Det framkommer heller ikke forskjeller mellom fisken fra anlegget og den rømte fisken og analysen bekrefter dermed de tidligere nevnte analysene at det er store grad av genetisk likhet mellom prøvene fra anlegget og de rømte fiskene.

I diskriminantanalysen (Fig. 4 øvre panel), ser vi at prøvene fra anlegg og rømt fisk overlapper. For å sette dette i kontekst, brukte vi prøver fra tidligere rømmingsepisoder (Aquagen, Mowi og Salmobreed stamme). Her ser man store genetiske forskjeller mellom fisk fra disse linjene, men man ser en stor grad av likhet mellom Aquagen stammen fra en tidligere sak, og alle prøvene fra denne episoden. Dette gir en meget sterk indikasjon på at den rømte fisken er av Aquagen-stamme.



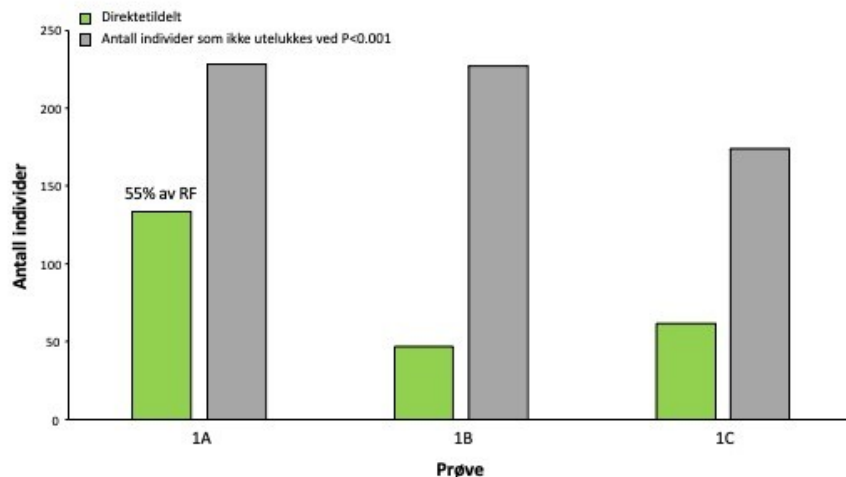
Figur 4 Diskriminantanalyse av prøver av rømt fisk og fisk fra anlegg. Øvre panel viser en sammenlikning mellom prøver samlet inn i denne saken og tidligere prøver av fisk av Aquagen, Mowi og Salmobreed-stamme. Det nedre panelet viser analysen av prøvene fra denne saken.

Simulering av genetisk tilordning (assignment) mellom de baselineprøvene

I gjennomsnitt var graden av selv-tilordning (self-assignment) mellom baselineprøvene 1A-1C 64,7 % (Tabell 3), varierende fra 54,9% for prøve 1C til 76,1% for prøve 1B. Dette betyr at 103 av 163 individer fra disse tre baseline-prøvene ville blitt riktig identifisert tilbake til sin opprinnelige kilde (merd) ved bruk av genetisk informasjon.

Identifisering av den rømte fisken

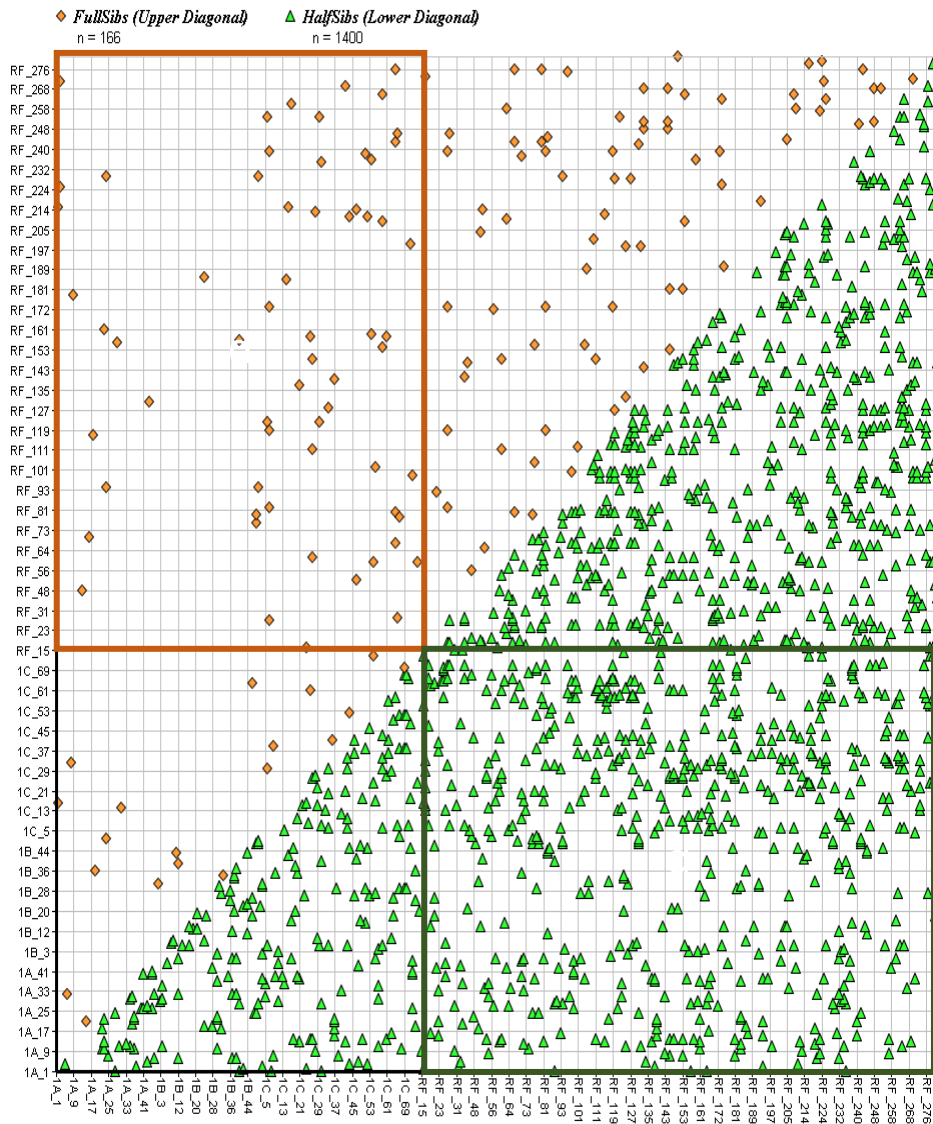
GENECLASS



Figur 5 Direkte tilordning av rømte individer til merder/grupper (grønne søyler). Antall rømlinger som ikke kan ekskluderes fra merder/grupper ved sannsynlighetsnivå 0,001 (grå søyler).

Tilordningsanalysen viste at flest rømt fisk ble direkte tilordnet til prøve 1A (Fig. 5). Det ble også tilordnet individer til de andre baselineprøvene. Det er viktig å merke seg, at 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. Eksklusjonsanalysen viser at det er veldig få individer som med høy grad av sikkerhet kan utelukkes fra tilhørighet til baselineprøvene 1A, 1B og 1C.

Resultatene fra slektskapsanalysen i COLONY (Fig. 6, Tabell 4) påviste med høy sannsynlighet helsøskenpar mellom den rømte fisken, og fisken i de tre baselineprøvene. Det var særlig mange søskenpar mellom den rømte fisken og fisken fra 1C (34), men også helsøskenpar mellom den rømte fisken og 1A (11) og 1B (1). Det ble også funnet sannsynlige helsøskenpar mellom de tre gruppene. Dette er en sterk indikasjon på at mye av den rømte fisken har sitt opphav fra 1C.



Figur 6. Figuren viser helsøskenpar som orange symboler i øvre diagonal og halvesøsken som grønne symboler i nedre diagonal. Helsøskenpar mellom rømt fisk og baselineprøvene ligger innenfor den røde rammen. Slektskap mellom de rømte fiskene vises øverst til høyre.

Konklusjoner

Analysene utført i denne saken gir et svært tydelig resultat. DNA analysene viser at det undersøkte anlegget er sannsynlig opphav til hovedmengden av de rømte fiskene som ble fanget og prøvetatt i Tingvollfjorden. Dette støttes av påvisning av svært små genetiske forskjeller mellom rømt fisk og prøvene fra anlegget, og av struktur- og tilordningsanalyser, DAPC-plottene og styrkes ytterligere av funnet av mange sannsynlige helsøsken mellom prøve 1C og de rømte fiskene. Med de små forskjellene som observeres mellom de ulike gruppene ved anlegget, er det vanskelig å peke på en gruppe/merd som hovedkilden. Som i alle saker av denne typen kan det imidlertid også her være noen få individer som sannsynligvis har opphav i andre rømmingsepisoder, men alle analysene indikerer meget sterkt at fisken i all hovedsak stammer fra dette anlegget.

Tabell 1 Oversikt over prøvene samlet inn og benyttet i analyser i forbindelse med rømmingsepisode 1-2020.

Prøve	Antall individer	Alleler	Ar	Ho	uHe	F _{IS}	Avvik HWE (B)	Avvik LD (B)
1A	46	137	6.7	0.726 ± 0.052	0.725 ± 0.051	-0.017 ± 0.021	1 (0)	8 (2)
1B	46	151	7.5	0.730 ± 0.058	0.727 ± 0.055	-0.015 ± 0.015	3 (2)	10 (2)
1C	71	125	6.5	0.716 ± 0.055	0.715 ± 0.055	-0.078 ± 0.058	0 (0)	10 (2)
RF	243	181	7.1	0.737 ± 0.054	0.719 ± 0.052	-0.028 ± 0.005	7 (5)	61 (20)

Tabell 2 Parvise F_{ST} verdier (genetisk distanse – nede til venstre), og tilhørende P-verdier (oppe til høyre, 10000 kombinasjonsmuligheter) mellom baselineprøvene fra anlegget samt de rømte fiskene

	Prøve 1A	Prøve 1B	Prøve 1C	RF
1A	*	0.000	0.258	0.024
1B	0.012	*	0.003	0.000
1C	0.001	0.006	*	0.810
RF	0.003	0.008	0.000	*

Tabell 3 Selv-tilordning test av prøvene fra anlegget. Verdier i diagonalen, markert med grønt, er antall individer korrekt tilordnet

	1A	1B	1C
1A	29	9	8
1B	7	35	4
1C	22	10	39

Tabell 4 Oversikt over baselineprøvene fra anlegget. Det er til sammen tre prøver fra ett anlegg.

HI Nummer	Selskap	Lokalitet	Merd	Innsamlet	Vekt (kg)	Lengde (cm)	Smolt leverandør	Dato utsatt/levert brønnbåt	Rogn leverandør	Rogn innlegg dato	Genetisk linje
1-201A		12897 Honnhammarvik	5	06/07/2020	8.60	79.5					AquaGen
1-201B		12897 Honnhammarvik	7	06/07/2020	3.00	60.3					AquaGen
1-201C*		12897 Honnhammarvik	8/9	26/06/2020	4.50	-					AquaGen

*Prøver tatt ved Kråkøy slakteri

Tabell 5 Familiestruktur i undersøkte prøver. Hver linje representerer en familie med sannsynlige helsøsken mellom de rømte fiskene og fisk fra anlegget

Prob (Incl)	Member1	Member2	Member3	Member4	Member5	Member6
0.9987	1A_2	1C_16	RF_216			
0.9928	1A_3	RF_225	RF_271			
0.9963	1A_9	RF_179				
0.9252	1A_13	RF_48				
0.9797	1A_16	RF_69				
0.9985	1A_18	RF_117				
0.9686	1A_24	1C_2	RF_94	RF_229		
0.8067	1A_29	RF_156				
0.9934	1A_44	RF_130				
0.9003	1B_40	RF_157				
0.9966	1C_1	RF_76	RF_79			
0.9939	1C_6	1C_30	RF_122	RF_255		
0.9988	1C_7	RF_27	RF_82	RF_119	RF_174	RF_239
0.9993	1C_15	RF_185				
0.8828	1C_24	RF_16				
0.9998	1C_27	RF_61	RF_111	RF_147		
0.9533	1C_28	RF_213				
0.9720	1C_31	RF_235				
0.8962	1C_34	RF_128				
0.9668	1C_42	RF_269				
0.9070	1C_44	1C_52	RF_211			
0.9956	1C_47	RF_52	RF_214			
0.9995	1C_51	RF_238				
0.9888	1C_54	RF_159	RF_236			
0.8622	1C_56	RF_102				
0.9980	1C_59	RF_154	RF_208	RF_266		
0.9995	1C_65	RF_67	RF_80	RF_243	RF_276	
0.8698	1C_66	RF_28	RF_246			
0.9803	1C_67	RF_78				