



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Institutionen för akvatiska resurser

2015-03-09

Genetisk analys av öring från Brunnshtyttebäcken

Stefan Palm & Tore Prestegaard

Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för akvatiska resurser, Sötvattenslaboratoriet
Stångholmsvägen 2, 178 93 Drottningholm

Bakgrund

I Brunnshtyttebäcken, på gränsen mellan Nora och Hällefors kommun (Örebro län), finns lek- och uppväxtområden för en öringstam som anses ha högt bevarandevärde. Stammen är snabbväxande och storvuxen (<9 kg), den tycks ha jämförelsevis hög tolerans mot försurning och höga vattentemperaturer och är så vitt man känner till opåverkad av tidigare utsättningar med främmande öring. Efter 2–5 år (oftast två) i bäcken vandrar öringen ut i det närliggande sjösystemet Lunds fjärden-Malen-Grecken, där den livnär sig på främst siklöja och nors, innan den återvänder för lek. Sedan 1960-talet skyddas stammens lek- och uppväxtområden av ett naturreservat. Något fiske riktat efter öring i sjösystemet eller bäcken förekommer inte.

Brunnshtyttebäcken tillhör Gullspångsälvens vattensystem som via bl.a. Letälven, sjön Skagern och Gullspångsälven mynnar i Vänern. Det kan inte uteslutas att det före 1900-talet fanns möjlighet för öring att vandra hela vägen till och från Vänern (ca 100 km enkel väg).

Åtminstone kan situationen ha varit sådan initialt, innan möjligheterna för fiskvandring minskade tack vare landhöjning och olika former av mänsklig påverkan. Påtagliga likheter i livshistorieegenskaper mellan Brunnshtytteöringen och den "Gullspångsöring" som leker nedströms första kraftverket i Gullspång (snabb tillväxt, storvuxenhet), kan också tolkas som en indikation på ett gemensamt ursprung för dessa båda stammar. Någon genetisk analys för att klargöra om så är fallet har emellertid ännu inte genomförts.

I denna studie användes genetiska DNA-markörer (s.k. mikrosatelliter) för att genetiskt karaktärisera dagens population av Brunshytteöring. Arbetet har utförts vid Sötvattenslaboratoriet, Drottningholm (SLU-Aqua) på uppdrag av Länsstyrelsen i Örebro län.

Syften har varit att (1) skatta öringstammens "genetiska profil" (dess nuvarande allelfrekvenser), (2) analysera graden av släktskap med Gullspångsöring (nutida och prov från 1960-talet) samt andra svenska öringstammar som kartlagts vid Sötvattenslaboratoriet inom tidigare projekt. I studien ingår även (3) en enklare jämförande analys av beståndets genetiska status.

Material och metoder

Det analyserade materialet bestod av DNA extraherat via fenprov från sammanlagt 38 öringungar (stirr) fångade i september 2014 vid elfiske i Brunshyttebäcken. De provtagna ungarna fångades på två olika uppväxtområden i bäcken, emellan vilka det verkar osannolikt att ungar förflyttar sig i större omfattning (Martin Engström, Lst Örebro, pers. komm.). Efter mätning och provtagning återutsattes individerna levande. Fiskens storlekssammansättning indikerade att materialet omfattade minst tre olika åldersgrupper/årsklasser (Berit Sers, SLU-Aqua, pers. komm.).

Genetisk variation studerades med hjälp av tio mikrosatelliter som använts i ett stort antal tidigare studier av öring. För detaljer om de aktuella markörerna och de laborativa metoder som använts hänvisas till Dannewitz *m.fl.* (2004). Utöver ovanstående beskrivet material har även genetiska data för andra populationer som ingått i tidigare studier av öring vid Sötvattenslaboratoriet använts för olika statistiska analyser.

De statistiska metoder och program som använts för att analysera och utvärdera data är i korthet följande: skattningar av genetisk variation samt F -statistik (Weir & Cockerham 1984) beräknades med hjälp av FSTAT (Goudet 1995) samt HPrare (Kalinowski 2005). FSTAT användes även för att utvärdera avvikelser från Hardy-Weinberg-proportioner och kopplingsjämvikt mellan markörer. Likheter och skillnader mellan stickprov av öring från olika delar av Sverige illustrerades grafiskt med hjälp av ett s.k. neighbor-joining dendrogram (PHYLIP, Felsenstein 2004) baserat på parvisa genetiska avstånd (Cavalli-Sforza & Edwards 1967). Det genetiskt effektiva antalet föräldrar till den analyserade avkomman skattades utifrån graden av avvikelse från kopplingsjämvikt med programmet LDNE (Waples 2006; Waples & Do 2008).

Resultat och diskussion

Genetisk variation

Antal observerade anlagsvarianter per mikrosatellit (locus), förväntad heterozygositet, samt skattningar av F_{IS} återges i tabell 1. Med ett undantag (*Ssa197*) förelåg inga statistiskt signifikanta avvikelser från de genotyp-proportioner som förväntas enligt Hardy-Weinbergs lag, vilket indikerar att den provtagna öringen från Brunnshyttebäcken hör till en och samma biologiska population. Detta resultat var väntat eftersom vandringshinder saknas i den relativt korta bäcken och storvuxen öring leker på samtliga de provtagna områdena.

Det svagt signifikanta överskottet av homozygota genotyper för markören *Ssa197* ($F_{IS}=0,26$; $P=0,04$) kan antingen återspegla en slumpmässig falsk signifikans (s.k. "typ-I fel") eller att detta locus uppvisar en viss andel s.k. nollalleler – anlagsvarianter som inte "syns" vid analys. Av sammanlagt 45 parvisa test för oberoende association av funna genotyper i de olika markörerna var tre jämförelser ($3/45=0,067$) signifikanta ($P<0,05$) vilket är nära den andel (0,05) som förväntas av slumpen. Även detta resultat stöder tolkningen att de analyserade ungarna härstammar från samma genetiskt homogena population.

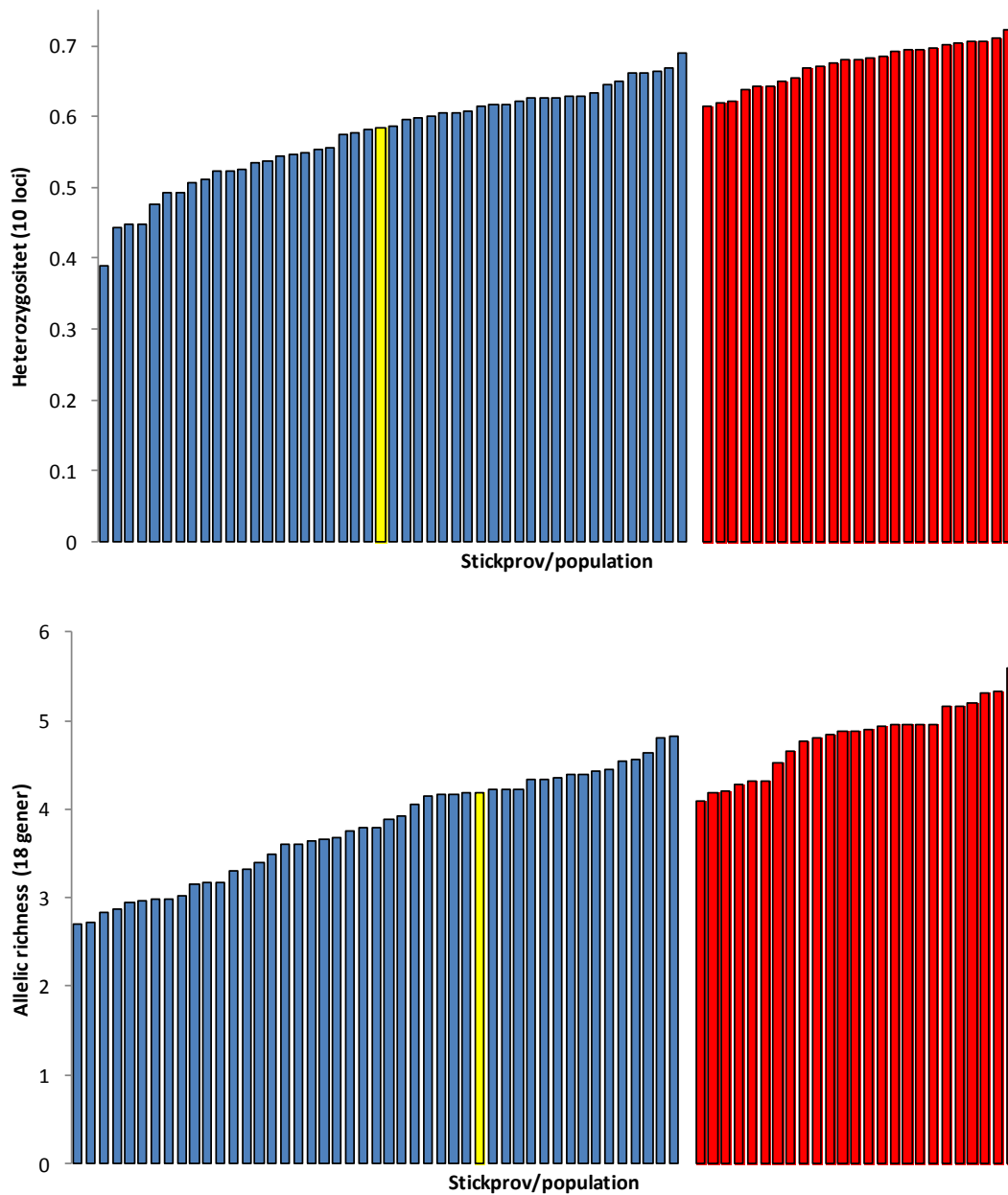
Tabell 1. Genetisk variation per locus samt i genomsnitt: A (antal funna anlagsvarianter), H_E (förväntad heterozygositet) samt F_{IS} (procentuell avvikelse mellan observerad och förväntad heterozygositet).

Locus	A	H_E	F_{IS}
<i>Str60</i>	3	0.20	-0.07
<i>Str58</i>	9	0.83	-0.11
<i>Ssa85</i>	5	0.58	0.18
<i>Ssa197</i>	4	0.46	0.26 *
<i>Str73</i>	3	0.46	-0.10
<i>Bs131</i>	5	0.72	0.05
<i>SsoSl4</i>	6	0.75	0.01
<i>One9</i>	5	0.35	0.01
<i>Ssa408</i>	7	0.81	0.03
<i>Str15</i>	4	0.71	-0.19
Alla loci	5.1	0.59	0.00

* $P<0,05$

En jämförelse med tidigare resultat för ett stort antal stickprov av öring från olika delar av Sverige visade att mängden genetisk variation hos öringen i Brunnshyttebäcken framstår som

normal för sjö- och strömlevande bestånd, medan havsvandrande öringbestånd i regel uppvisar något högre variationsgrad (figur 1).



Figur1. Genetisk variation hos öring från Brunnshyttebäcken (gul stapel) jämfört med stickprov från andra svenska sjö-/strömvattenlevande (blå staplar) samt havsvandrande öringbestånd (röda staplar). Övre delfiguren anger förväntad heterozygositet (genomsnitt, 10 mikrosatelliter) medan den nedre delfiguren visar genomsnittliga "allelic richness" (antalet påträffade anlagsvarianter). Båda måtten på genetisk variationsgrad tar hänsyn till skillnader i materialstorlek mellan stickprov.

Det genetiskt effektiva antalet föräldrar till den analyserade avkomman (*effective number of breeders*, N_b) skattades med programmet LDNE till 37 (95 % konfidensintervall: 24 – 65). Att tolka den erhållna skattningen av N_b i termer av ett motsvarande (högre) antal riktiga lekfiskar (N_{tot}) som gett upphov till den analyserade avkomman är svårt. Dels råder osäkerhet om de exakta andelarna ungar från olika årsklasser i det analyserade stockprovet. Dessutom observerades höstarna 2013 och 2014 spår av lek (lekgröpar) utmed nästan hela bäckens sträckning (Johnny Norrgård, Karlstads universitet, pers. komm.), medan den genetiska provtagningen 2014 endast skedde längs två delavsnitt. Beroende på hur mycket öringungar av olika storlek/ålder förflyttar sig i bäcken finns därför risk för en viss underskattning av det totala genetiskt effektiva antalet föräldrar till de analyserade årsklasserna.

Baserat på tidigare studier kan annars $N_b/N_{tot}=0.3$ betraktas som ett grovt riktmärke för öring (Dannewitz m.fl. 2011). Givet detta kan totala antalet föräldrar till de tre analyserade årsklasserna beräknas till omkring 120 (95 % konfidensintervall: 80 -220), eller omkring 40 (27-73) lekfiskar per år där även eventuellt tidigt köns mogna hanar ingår. Som jämförelse kan nämnas att man tidigare årligen räknade antalet lekvandrande öringar på väg upp i bäcken med en fast fälla; under perioden 1975-1997 passerade i genomsnitt 52 (mellan 5 och 116) fiskar per år, varav ca två tredjedelar utgjordes av honor (Martin Engström, Lst Örebro, pers. komm.).

Det genetiskt effektiva antalet föräldrar (N_b) ska inte förväxlas med motsvarande storhet per generation (N_e). Den sistnämnda storheten avgör hur snabbt genetisk variation förloras och inavel ackumuleras i en *isolerad* population. För N_e per generation finns bevarandebiologiska "tumregler" avseende lägstanivåer för genetisk bevarande sett över olika tidsperspektiv (t.ex. $N_e > 50-100$ vid korttidsbevarande). Det har föreslagits att när antalet årsklasser inkluderade i det analyserade provet är likt generationsintervallet, bör skattningar av N_b och N_e vara av samma storleksordning (Waples & Do 2010). Ett sådant förhållande mellan N_b och N_e kunde också observeras i en genetisk långtidsstudie av öring i en jämtländsk fjälltjärn (Charlier m.fl. 2012). Om samma förhållande även råder för öring i Brunnshyttebäcken, och om generationsintervallet antas vara av storleksordningen 5-7 år (en grov skattning baserad på tidigare åldersanalyser och märkningsstudier) kan detta innebära att N_e är 2-3 gånger högre än ovan nämnda N_b . Med reservation för ovanstående osäkerheter och antaganden kan detta tolkas som att populationen idag inte är akut liten genetisk sett, samtidigt som den antagligen skulle behöva öka numerärt, och/eller att den är beroende av ett visst naturligt genutbyte med andra öringbestånd i samma vattensystem för att vara långsiktigt livskraftig.

Slutligen genomfördes en analys med ett s.k. dendrogram ("släktskapsträd") där den analyserade öring från Brunnshyttebäcken jämfördes med ett större antal öringbestånd från tidigare studier vid Sötvattenslaboratoriet. Någon närmare likhet med öring härstammande från nedre delen av samma vattensystem (Gullspångsälven) kunde inte observeras. Snarare framstår beståndet i Brunnshyttebäcken som ett bland många hittills undersökta genetiskt

distinkta bestånd från olika delar av Sverige (figur 2). Avsaknaden av någon påtaglig genetisk likhet med Gullspångsöring (eller andra undersökta bestånd) indikerar att öringen i Brunshyttebäcken inte har något närmare släktskap med denna stam. Hos såväl Gullspångsöring som Brunshytteöring finns dessutom ett antal anlagsvarianter som hittills inte påträffats i den andra stammen, vilket kan indikera en längre tid av genetisk isolering.

En alternativ tolkning som inte helt kan uteslutas är markanta genetiska förändringar (frekvensförändringar och förluster av anlagsvarianter) som ägt rum mer nyligen i någon eller båda öringstammarna. Dock kan noteras att i dendrogrammet (figur 2) förekommer flera prov av Gullspångsöring insamlade under olika årtionden (1960-2010 tal) från individer med olika ursprung (vildfödda/odlade; Palm m.fl. 2012). Även om tydliga genetiska skillnader finns mellan dessa olika prov av Gullspångsöring, sitter de ändå placerade närmast varandra. Fram till och med 1950-talet förekom ännu ett naturligt och stabilt lekbestånd av storvuxen sjövandrande öring (och lax) i Gullspångsälvens nedersta del, och några utsättningar med främmande öring i detta område är inte kända. Vad gäller öringen i Brunshyttan finns inte heller några kända utsättningar med främmande stam dokumenterade.

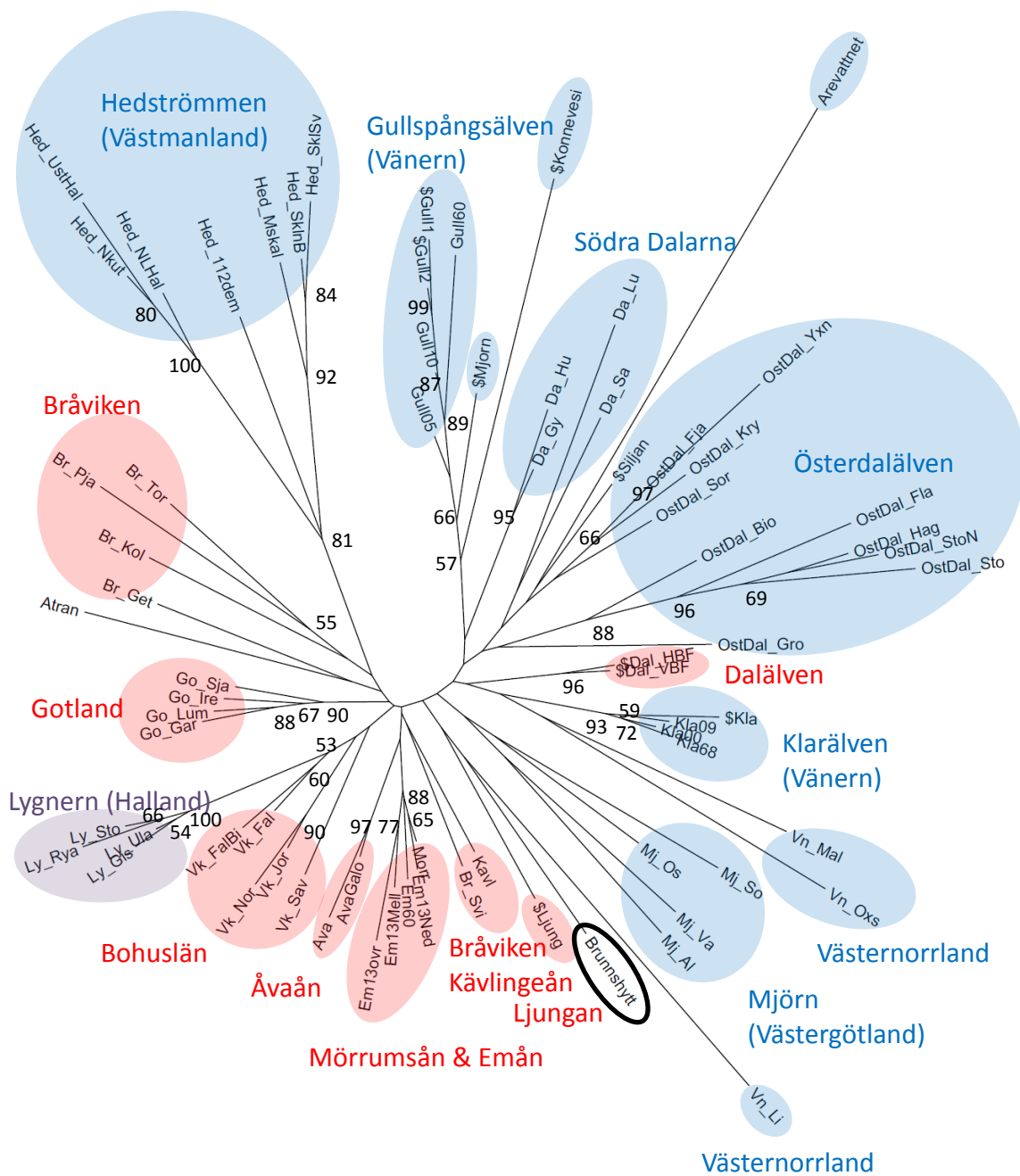
Sammantaget indikerar detta, tillsammans med den relativt höga genetiska variationsgraden hos den undersökta öringen från Brunshyttebäcken, att den markanta genetiska skillnaden mellan dagens Gullspångsöring och Brunshytteöring speglar ett ursprungligt mönster (långvarig reproduktiv isolering) snarare än påtagliga genetiska förändringar under mer närliggande tid. En mer ingående statistisk analys, helst baserad på ett större material från Brunshytteöring, skulle dock behövas för att komma vidare. Vid en sådan fördjupad analys kan bland annat en genetiskt baserad skattning erhållas av den tid som de båda stammarna har varit reproduktivt åtskilda (jfr. Hansen m.fl. 2014).

Sammanfattningsvis har denna studie visat att:

- öringen i Brunshyttebäcken representerar en genetiskt homogen population;
- graden av genetisk variation i populationen framstår som "normal" (medelhög) jämfört med andra undersökta svenska sötvattenlevande öringbestånd;
- den genetiskt effektiva populationsstorleken är inte akut låg, men heller inte betryggande hög (åtminstone inte på längre sikt);
- det inte föreligger någon närmare genetisk likhet med den Gullspångsöring som leker i samma vattensystems allra nedersta del vid utloppet i Väneren.

Erkännanden

Tack till Martin Engström, Johnny Norrgård, Berit Sers och Johan Östergren för kommentarer på en tidigare version av rapporten samt hjälp med bakgrundsinformation. Denna studie har genomförts på uppdrag med finansiering från Länsstyrelsen i Örebro län.



Figur 2. Genetiskt "släkträd" för öring från Sverige (orotat s.k. neighbor-joining dendrogram baserat på 10 mikrosatelliter och parvisa "chord-distanser") med det analyserade provet från Brunnshyttebäcken inringat med svart. Röd och blå färg markerar prov analyserade för havsvandrande respektive sötvattenlevande (strömstationära eller sjövandrande) bestånd. Odlade stammar är markerade med dollartecken (\$). Notera att öringen i Lygnern-systemet tidigare haft fri vandringsväg till/från havet (Dellefors & Dannewitz 2007), vilket även kan ha gällt för den vilda öringen i Mjörn (Dannewitz m.fl. 2012).

Referenser

- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* 19:233-257.
- Charlier J, Laikre L, Ryman N (2012) Genetic monitoring reveals temporal stability over 30 years in a small, lake-resident brown trout population. *Heredity* 109:246-253.
- Dannewitz J, Petersson E, Dahl J, Prestegard T, Löf A-C, Järvi T (2004) Reproductive success of hatchery-produced and wild-born brown trout in an experimental stream. *Journal of Applied Ecology* 41:355-364.
- Dannewitz J, Palm S, Lundvall D, Prestegard T (2011) *Genetiska studier av öring från Lurån och Sångåns vattensystem*. Länsstyrelsen Dalarna, Rapport 2011:25, 30 sid.
- Dannewitz J, Palm S, Degerman E, Olsson J, Prestegard T, Östergren J (2012) Genetisk kartläggning av öring i Mjörn. *Aqua reports* 2012:11, 35 sid.
- Felsenstein J (2004) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86:485-486.
- Hansen M, Limborg MT, Ferchaud A-L, Pujolar J-M (2014) The effects of Medieval dams on genetic divergence and demographic history in brown trout populations. *BMC Evolutionary Biology* 14:122 doi:10.1186/1471-2148-14-122.
- Kalinowski ST (2005) HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes* 5:187-189.
- Palm S, Dannewitz J, Johansson D, Laursen F, Norrgård J, Prestegard T, Sandström A (2012) Populationsgenetisk kartläggning av Vänerlax. *Aqua reports* 2012:4. Sveriges lantbruksuniversitet, Drottningholm. 64 sid.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F -statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Waples RS (2006) A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics* 7:167-184.
- Waples RS, Do C (2008) LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8:753-756.