

Estimering av effektivt antall gytefisk fra stikkprøver av ungfisk av laks

Betydning av genetiske markører, antall prøver og romlig
fordeling

Sebastian Wacker, Tonje Aronsen, Ingerid Julie Hagen, Sten Karlsson, Henrik
Hårdensson Berntsen, Helge Skoglund, Øyvind Solem, Harald Sægrov, Ola
Ugedal



HydroCen

Forskningen i HydroCen (Norwegian Research Centre for Hydropower-Technology) skal bidra til å styrke Norges posisjon som en ledende vannkraftnasjon og sikre at norsk vannkraftsektor kan utnytte mulighetene i fremtidens fornybare energisystem. HydroCen har definert fire forskningsområder:

Vannkraftkonstruksjoner
Turbin og generatorer
Marked og tjenester
miljødesign

NTNU er vertsinstitusjon og hovedforskningspartner i HydroCen sammen med SINTEF Energi og Norsk institutt for naturforskning (NINA).

HydroCen har rundt 50 nasjonale og internasjonale partnere fra forskning, industri og forvaltning. HydroCen er et av sentrene i Forskningsrådets ordning med forskningssentre for miljøvennlig energi (FME).

Estimering av effektivt antall gytefisk fra stikkprøver av ungfisk av laks

Betydning av antall genetiske markører, antall prøver og romlig fordeling

Sebastian Wacker¹
Tonje Aronsen¹
Ingerid Julie Hagen¹
Sten Karlsson¹
Henrik Hårdensson Berntsen¹
Helge Skoglund²
Øyvind Solem¹
Harald Sægrov³
Ola Ugedal¹

¹ Norsk Institutt for Naturforskning
² NORCE Norwegian Research Centre AS
³ Rådgivende Biologer AS

Wacker, S., Aronsen, T., Hagen, I.J., Karlsson, S., Berntsen, H.H., Skoglund, H., Solem, Ø., Sægrov, H. & Ugedal, O. 2022. Estimering av effektivt antall gytefisk fra stikkprøver av ungfisk av laks. Betydning av antall genetiske markører, antall prøver og romlig fordeling. HydroCen rapport 28. Norwegian Research Centre for Hydropower Technology

Trondheim, juni 2022

ISSN: 2535-5392 (digital publikasjon, Pdf)

ISBN: 978-82-93602-29-3

© NINA 2022

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

KVALITETSSIKRET AV

Ola H. Diserud

FORSIDEBILDE

Øyvind Solem

NØKKELORD

laks, bestandsstørrelse, effektivt antall gytefisk, genetisk overvåkning, COLONY

KONTAKTOPPLYSNINGER

HydroCen

Vannkraftlaboratoriet, NTNU

Alfred Getz vei 4

Gløshaugen,

Trondheim

www.HydroCen.no

Sammendrag

Wacker, S., Aronsen, T., Hagen, I.J., Karlsson, S., Berntsen, H.H., Skoglund, H., Solem, Ø., Sægrov, H. & Ugedal, O. 2022. Estimering av effektivt antall gytefisk fra stikkprøver av ungfisk av laks. Betydning av antall genetiske markører, antall prøver og romlig fordeling. HydroCen rapport 28. Norwegian Research Centre for Hydropower Technology.

Utviklingen innenfor genetiske verktøy gir nye muligheter innen miljøovervåking. Formålet med undersøkelsen i denne rapporten er å vurdere hvordan ulike faktorer kan påvirke estimater av effektiv bestandsstørrelse. Effektiv bestandsstørrelse er et standardisert mål på hvor mange individer som fører sine gener videre til neste generasjon. Effektiv bestandsstørrelse kan direkte relateres til forventet tap av genetisk variasjon fra genetisk drift (tilfeldig endring i genetisk sammensetning) og er dermed meget relevant i overvåking av bestander. Effektiv bestandsstørrelse er imidlertid i mange tilfeller vanskelig å beregne. Dette er særlig tilfelle i bestander med overlappende generasjoner og som utveksler genetisk materiale med andre bestander. Et alternativt og beslektet bestandsmål som er enklere å kvantifisere er effektivt antall foreldre. Dette er et standardisert mål på hvor mange foreldre som får avkom i enkelte år og er standardisert ut fra variasjon i antall avkom og kjønnsfordeling. En overvåking av effektivt antall reproduserende individer vil kunne være kostnadseffektivt og gi verdifull kunnskap om bestandsutvikling og status. I vilkårsrevisjoner og for pålagte tiltak (som miljødesign) i regulerte vassdrag, er kunnskap om status og bestandsutvikling av stor betydning. Beregning av effektivt antall reproduserende individer forutsetter en tilfeldig stikkprøve fra én årsklasse. Ut fra sammensetningen av hel- og halvsøsken, og ubeslektede individer i stikkprøven kan effektivt antall foreldre estimeres; jo større andel ubeslektede individer det er i stikkprøven desto flere foreldre har bidratt med avkom til den spesifikke årsklassen. Metoden er avhengig av et tilstrekkelig antall genetiske markører for å identifisere helsøsken, halvsøsken og ubeslektede individer. Metoden forutsetter i tillegg at stikkprøven er representativ for slektskapsforholdene i elva. Vi undersøkte muligheter og utfordringer ved bruk av ungfisk til estimering av effektivt antall gytefisk hos laks. Vi har benyttet prøver fra fem elver og flere gyteår, samt simulerte data. Resultatene viser at:

- Antall genetiske markører og prøver må være tilpasset størrelsen på bestanden for å unngå underestimert av effektivt antall gytefisk. Antall prøver bør være minst like høyt som effektivt antall gytefisk.
- Halv- og helsøsken var ikke tilfeldig fordelt i elva, men ble i stor grad funnet innenfor innsamlingsstasjoner. Slektskap ble dermed i mange tilfeller kraftig overestimert og effektivt antall gytefisk underestimert.
- Undersøkelsen viser metoder for å vurdere om antall genetiske markører, antall prøver og romlig fordeling av prøvene var egnet for estimering av effektivt antall gytefisk fra ungfisk.

Sebastian Wacker, NINA Trondheim, sebastian.wacker@nina.no

Innhold

2.1 Prøver	8
2.2 Genotyping	9
2.3 Slektskapsanalyse.....	9
2.4 Betydning av antall genetiske markører for estimering av effektivt antall gytefisk.....	10
2.5 Betydning av antall prøver for estimering av effektivt antall gytefisk	10
2.6 Betydning av romlig fordeling av søsken blant ungfisk for estimering av effektivt antall gytefisk	11
3.1 Oppsummering av slektskapsanalyser	12
3.2 Betydning av antall genetiske markører for estimering av N_{eb}	12
3.2.1 Vigda.....	12
3.2.2 Simulerte data.....	14
3.3 Betydning av antall prøver for estimering av effektivt antall gytefisk	17
3.4 Betydning av romlig fordeling av prøvene for estimering av effektivt antall gytefisk	19
3.4.1 Romlig fordeling av hel- og halvsøsken i elva.....	19
3.4.2 Sammenheng mellom romlig fordeling av ungfisk og estimering av effektivt antall gytefisk	20
3.4.3 Simulering av romlig fordeling	21
4.1 Antall markører	23
4.2 Antall prøver.....	23
4.3 Romlig fordeling av ungfisk	24
4.4 Konklusjon	24

Forord

Denne rapporten har som hovedformål å videreutvikle metodikk for genetisk overvåking av laks. Vi undersøker muligheter for estimering av effektiv bestandsstørrelse ved bruk av ungfiskprøver. Prosjektet er en del av forskningscenteret Hydrocen som finansieres av Norges forskningsråd, kraftbransjen, NVE og Miljødirektoratet. I tillegg bidro NINA med egne midler for å utvide undersøkelsen.

Vi takker Sven Fugger, Anne Kristin Jøranlid, Eva Marita Ulvan og Torgeir Havn for gjennomføring av feltarbeid og Ida Pernille Øystese Andersskog, Hege Brandsegg, Line Birkeland Eriksen and Merethe Hagen Spets for genotyping av prøvene. Rapporten ble kvalitetssikret av Ola H. Diserud og ansvarlig forsknings-sjef er Ingeborg Palm Helland.

Trondheim, juni 2022

Sebastian Wacker
Prosjektleder

1 Innledning

Kunnskap om bestandsstørrelse er sentralt i overvåkning og forvaltning av truede arter. I uregulerte og spesielt i regulerte og andre modifiserte vassdrag vil en overvåkning av bestandsutvikling av anadrome laksefisk være av stor betydning og kan bidra til å opprettholde levedyktige bestander og til å evaluere miljøtiltak. I anadrom laksefisk blir bestandsstørrelse (N_c) vanligvis målt som innsig, altså antall voksne fisk som vandrer opp i elva i løpet av gytesesongen, eller som antall gytefisk etter endt fiskesesong. For forvaltningen er bestandsstørrelse i all hovedsak relatert til bestandenes produksjonspotensiale i form av høstbart overskudd av individer, men dette er et upresist mål for å beskrive bestandenes evne til å opprettholde genetisk variasjon og egenart over tid. Effektiv bestandsstørrelse er imidlertid et mål som direkte kan relateres til forventet tap av genetisk variasjon som følge av genetisk drift (tilfeldig endring i genetisk sammensetning). Ved lav effektiv bestandsstørrelse er effekten av genetisk drift sterk og det er forventet et raskt tap av genetisk variasjon. Genetisk variasjon er grunnlaget for bestandens evne til genetisk tilpasning under miljøendringer. Effektiv bestandsstørrelse har derfor stor betydning i bevaringsbiologi og spesielt når det gjelder forvaltning av små bestander. Hvis effektiv bestandsstørrelse estimeres for et enkelt gyteår betegnes det som effektivt antall gytefisk (N_{e_b}).

I naturlige bestander er effektivt antall gytefisk typisk betydelig lavere enn gytebestandsstørrelsen i de enkelte årene. Faktorer som reduserer effektivt antall gytefisk i forhold til faktisk antall gytefisk er at ikke alle individer gyter, ulikt antall gytende hunner og hanner (skeiv kjønnsratio) og større enn tilfeldig variasjon i antall avkom mellom individene. I laks er effektivt antall gytefisk ofte halvert i forhold til bestandsstørrelse, men N_{e_b}/N_c forholdet varierer sterkt mellom bestander og gyteår (Ferchaud mfl. 2016). To bestander med samme bestandsstørrelse kan altså ha veldig forskjellig effektivt antall gytefisk og dermed ulik grad av genetisk drift, eller evne til å opprettholde genetisk variasjon. Kunnskap om N_{e_b}/N_c forholdet kan gi innsikt i bestandens mulighet å bevare genetisk variasjon og kan derfor brukes til å tilpasse forvaltning til enkeltbestander (Ferchaud mfl. 2016, Perrier mfl. 2016).

I de senere årene har genetiske metoder i økende grad blitt brukt i overvåkning av laksebestander. Genetisk overvåkning av laks praktiseres i dag for eksempel for å overvåke innkrysning av rømt oppdrettslaks (Karlsson mfl. 2016, Diserud mfl. 2019), for å luke ut stamlaks med opphav i rømt oppdrettslaks (Karlsson mfl. 2020) og for å evaluere genetiske konsekvenser som følge av kultivering (Karlsson mfl. 2016, Hagen mfl. 2019). En ny metode innenfor genetisk overvåkning er close-kin mark-recapture (CKMR). Metoden er en genetisk variant av fangst/gjenfangst med fysisk merking og har nylig blitt tilpasset og validert for laks (Wacker mfl. 2021). En omfattende genetisk overvåkning av bestandsstørrelse i anadrome laksefisk kan i framtida oppnås ved å kombinere genetisk estimering av bestandsstørrelse (CKMR) og effektivt antall gytefisk (dette prosjektet). De samme prøvene og samme genetiske data kan brukes til flere typer analyser og dette vil kunne gi svar på mange ulike problemstillinger og gjøre overvåkning mer kostnadseffektiv.

Til forskjell fra tradisjonelle måter å beregne bestandsstørrelsen på inkluderer genetiske estimater ikke bare anadrome individer, men også gyteparr. CKMR metoden er også egnet til å estimere det reproduktive bidraget til gyteparr (Wacker mfl. 2021). For å vurdere høstingspotensiale er gyteparr ikke interessant og er også vanskelige å telle. Gyteparr er derfor vanligvis ikke inkludert i konvensjonelle (ikke-genetiske) estimater av bestandsstørrelse. Gyteparr kan dog befrukte en stor andel egg og har dermed en stor betydning for effektivt antall gytefisk og for å opprettholde genetisk variasjon i bestanden (Perrier mfl. 2014). Gyteparr kan altså bidra til bestandens levedyktighet og er derfor viktig å ta hensyn til i forvaltning.

Genetiske metoder for å estimere effektivt antall gytefisk er hovedsakelig basert på slektskapsanalyse innenfor et tilfeldig utvalg avkom fra et gyteår. En viktig forutsetning for denne metoden er at prøvene representerer et tilfeldig utvalg av gytebestanden og at estimatene av slektskap er tilstrekkelig sikre. Usikkerheten i slektskapsanalysen er primært avhengig av antall genetiske markører i analysen og av et tilstrekkelig antall prøver (Ackerman mfl. 2017). Hvorvidt innsamlet ungfisk representerer gytebestanden

vil også være viktig for å oppnå sikre estimater av effektivt antall gytefisk. Med tanke på representativitet i slektskap vil prøver av voksen laks sannsynligvis være bedre enn prøver av ungfisk, men i mange tilfeller vil det være vanskelig å få tilgang til et tilstrekkelig antall prøver av voksenfisk, og det vil da være gunstig å kunne analysere ungfisk. Ved innsamling av ungfisk vil det være ekstra viktig å samle in prøvene på en slik måte at man får et representativt bilde av slektskap i bestanden. For innsamling av årsyngel (0+) vil dette være spesielt viktig å ta hensyn til siden de i større grad oppholder seg i familiegrupper (i området hvor de ble gytt) enn eldre lakeunger. Ved innsamling innenfor begrensede områder vil derfor slektskap mellom individene være større enn i et tilfeldig utvalg ungfisk fra hele bestanden. Gruppering av 0+ ungfisk gir imidlertid samtidig mulighet til å systematisk velge ut prøver etter formål. På denne måten kan vi for eksempel få innsikt i bestandens tilstand i ulike deler av elva.

I denne rapporten undersøker vi muligheter og utfordringer ved estimering av effektivt antall gytefisk ved bruk av ungfiskprøver, med hensyn til:

- Betydning av antall genetiske markører for estimering av effektivt antall gytefisk
- Betydning av antall prøver for estimering av effektivt antall gytefisk
- Betydning av romlig fordeling av prøvene for estimering av effektivt antall gytefisk

2 Material og metoder

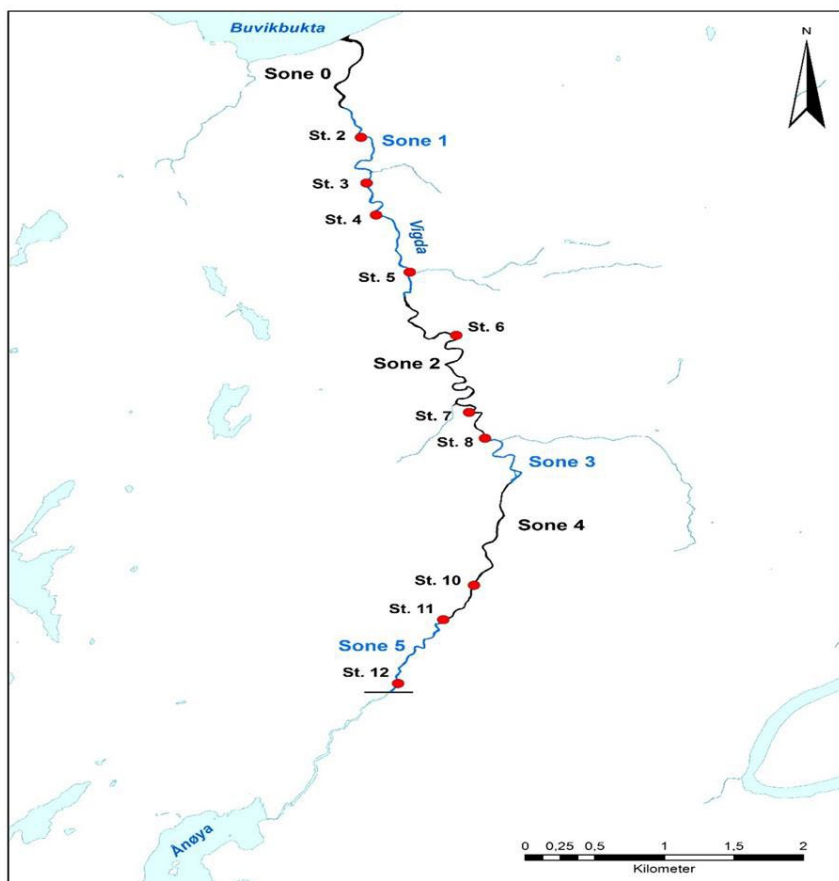
2.1 Prøver

Estimering av effektivt antall gytefisk ble undersøkt ved bruk av ungfisk fra Vigda (Trøndelag) fra gyteårene 2018 og 2019. Det er god kunnskap om laksebestanden i Vigda, med årlige gytefisktellinger (Solem mfl. 2019) og ungfiskundersøkelser (Solem mfl. 2020). I tillegg blir utvandrende smolt PIT merket og tilbakevandrende voksenfisk blir registrert ved hjelp av fast installerte antenner. Ungfisk fra gyteårsklasse 2018 ble samlet inn ved elektrisk fiske i året etter gyting (0+), 10 og 11 oktober 2019 (Solem mfl. 2020) og mellom 29 august og 15 oktober 2020 for 2019 gyteåret. Alderen av ungfisk ble estimert ut ifra størrelsen (det er ingen eller lite overlapp mellom 0+ og eldre ungfisk). Innsamling ble gjennomført ved 10 stasjoner fordelt over den lakseførende delen av elva (figur 1) og ca. 30 individer ble innsamlet ved hver stasjon (tabell 1). De undersøkte elfiskestasjonene hadde et areal mellom 43 og 72 m² (Solem mfl. 2020). Ungfiskene ble lagret i etanol og prøver for genetisk undersøkelse ble senere tatt fra gjellebuene.

Fra Vigda hadde vi også prøver av voksenfisk fra 2018 og 2019 som var mulige foreldre til den undersøkte ungfisken. Ved genetisk tilordning av foreldre til avkom som er tilnærmet 100 % sikker hadde vi mulighet å kontrollere sikkerheten i slektskapsanalysen blant ungfisken alene. Prøver av voksenfisk ble innsamlet under gytefisktelling og ved PIT merking av smolt som ble registrert ved tilbakevandring som gytefisk (Wacker mfl. 2021). Antall voksenfiskprøver var 113 for 2018 gyteåret og 52 for 2019 gyteåret.

Tabell 1. Antall ungfisk (0+) fra Vigda gyteårene 2018 og 2019 som ble innsamlet ved elfiskestasjonene St 2 – St 12.

År	St 2	St 3	St 4	St 5	St 6	St 7	St 8	St 10	St 11	St 12
2018	28	30	30	31	28	29	27	22	28	28
2019	17	30	32	30	30	28	30	31	33	30



Figur 1. Oversikt over stasjonsnett for elektrisk fiske etter ungfisk i Vigda. Øvre grense for anadrom strekning er markert med strek ved stasjon 12. Figuren er hentet fra Solem et al. (2016).

I tillegg til materialet fra Vigda undersøkte vi genotyper av ungfisk fra øvre delen av Altaelva (Troms og Finnmark; heretter Sautso), Ekso (Vestland), Årøyelva (Vestland) og Fortunselvi (Vestland) som tidligere har blitt analysert for andre formål (tabell 2). Ungfisk fra Sautso fra gyteårene 2011, 2013 og 2014 ble innsamlet som 0+, 1+ og 2+ og ved tre til fire innsamlingsstasjoner (tabell 2) (Ugedal mfl. 2016). Ungfisk (0+) fra Årøyelva fra gyteår 2019 ble innsamlet ved fem innsamlingsstasjoner (tabell 2). Ungfisk fra Ekso fra gyteår 2018 (2+), gyteår 2019 (1+) og gyteår 2020 (0+) ble innsamlet ved fire til seks innsamlingsstasjoner høsten 2020 og våren 2021 (tabell 2). Ungfisk (1+) fra Fortunselvi fra gyteåret 2017 ble samlet inn ved åtte innsamlingsstasjoner (tabell 2).

2.2 Genotyping

DNA fra gjelleprøven fra laksungene ble ekstrahert ved bruk av et Qiagen DNeasy[®], blood and tissue kit (Qiagen). Nittiseks enkelt-nukleotide-polymorfe-markører (SNPer) ble genotypet på en EP1[™] 96.96 Dynamic array IFCs (Fluidigm, San Fransisco, CA.). Sekstiåtte av disse SNPene er nøytrale og ble brukt i slektskapsanalyse. Prøvene fra Vigda ble i tillegg genotypet for ytterligere 96 nøytrale SNPer og slektskapsanalysen ble sammenliknet ved bruk av henholdsvis 68 og 164 SNPer.

2.3 Slektskapsanalyse

Effektivt antall gytefisk ble estimert i programmet COLONY (Jones & Wang 2010). Programmet estimerer effektivt antall gytefisk for foreldregenerasjonen utfra andelen halv- og helsøsken blant alle parvise sammenlikninger mellom ungfisk. For bestander uten betydelig grad av innavl kan effektivt antall gytefisk N_{eb} estimeres ved bruk av en forenkling av likning (10) i Wang (2009):

$$N_{eb} = \frac{1}{0.25 \times (Hp + 2 \times Fp)}$$

Der Hp og Fp er henholdsvis andel halvsøskenpar og helsøskenpar blant alle parvise sammenlikninger mellom ungfisk.

For hver mulig kombinasjon av to ungfisk (parvis sammenlikning) blir slektskap estimert som ubeslektet, halvsøsken eller helsøsken (parvis slektskap). Antall parvise sammenlikninger stiger raskt med antall ungfiskprøver (f.eks. 45 for 10 ungfiskprøver, 4950 for 100 ungfiskprøver). Halv- og helsøsken ble identifisert i COLONY med en sannsynlighetsmetode som tar hensyn til både sannsynlighet av parvis slektskap og rekonstruksjon av slektskap mellom alle individer («full-pedigree likelihood»). Analysen i COLONY ble gjennomført med mulighet for polygami blant hunner og hanner, uten oppdatering av allelfrekvenser, uten «sibship scaling» og uten «sibship prior». Andel genotypefeil ble satt til 0,001, som er et konservativt høyt estimat. For Vigda ble slektskapsanalyse blant ungfisk gjort med og uten genotyper av mulige foreldre. Sannsynlighet for at foreldre var blant genotypene ble satt på 0,2 for 2018 gyteåret og på 0,1 for 2019 gyteåret, basert på den estimerte andelen gytefisk som ble prøvetatt (Wacker et al. 2021).

2.4 Betydning av antall genetiske markører for estimering av effektivt antall gytefisk

Vi undersøkte betydning av antall SNP markører (68 versus 164) for rekonstruksjon av slektskap og estimering av effektivt antall gytefisk i COLONY. Ungfisk fra Vigda ble genotypet ved to markørsett (totalt 164 markører) slektskap ble rekonstruert ved bruk av henholdsvis ett (68 markører) og to (164 markører) markørsett og resultatene sammenliknet.

For å kunne sammenlikne rekonstruert med kjent slektskap simulerte vi genotyper til ungfisk med kjent slektskap og analyserte disse genotypene i COLONY. Ungfiskgenotyper ble simulert utfra observert slektskap (halv- og helsøsken) blant ungfisk i Vigda (0+ alder, gyteårene 2018 og 2019), Sautso (1+ og 2+ alder, gyteåret 2013) og Årøy (0+ alder, gyteåret 2019). Vi valgte ungfiskkohorter med mange prøver i forhold til effektivt antall gytefisk (tabell 2) fordi det antas minst feil i rekonstruksjon av slektskap i disse. Genotypene ble simulert og analysert i simuleringsmodus i COLONY ved bruk av henholdsvis 164 og 68 markører. Allelfrekvenser observert i Vigda 2018 gyteåret ble brukt i alle simuleringer for å utelukke at statistisk styrke i markørene var ulik. Slektskap rekonstruert i COLONY ble sammenliknet med de kjente (simulerte) slektskapsforholdene.

2.5 Betydning av antall prøver for estimering av effektivt antall gytefisk

Antall prøver kan påvirke estimatet av effektivt antall gytefisk gjennom tilfeldig variasjon i andel søskenpar blant individene som blir prøvetatt og gjennom feil som oppstår i estimering av slektskap i COLONY. Betydning av antall prøver for estimering av effektivt antall gytefisk ble undersøkt ved hjelp av prøvematerialet fra Vigda.

Effekten av tilfeldig variasjon i andel søskenpar ble undersøkt ved tilfeldig utvalg av ulikt antall individer fra alle prøvetatte individer i Vigda i gyteårene 2018 og 2019. Individene ble valgt ut uten hensyn til innsamlingsstasjon. Effektivt antall gytefisk ble beregnet utfra slektskap blant de utvalgte individene. Slektskap blant de utvalgte individene ble ikke estimert i COLONY på nytt, men hentet fra resultater av COLONY analysen som ble gjennomført med alle individer inkludert (tabell 2), som forventes å ha høyest

presisjon. Variasjon og bias i estimatet ble altså kun påvirket av utvalget av individer og ikke av analysen i COLONY. Mellom 10 og 90 % av prøvene (10 %, 20 %, ... 90 %) ble tilfeldig valgt ut og hvert antall ble gjentatt 100 ganger. Effektivt antall gytefisk ble beregnet utfra antall halv- og helsøskenpar ved bruk av likning (10) i Wang (2009).

Effekten av feilestimering av slektskap i COLONY avhengig av antall prøver ble estimert ved gjentatt tilfeldig utvelgning av prøver fra Vigda og re-analyse i COLONY. Utvalg av individer ble gjort som beskrevet ovenfor, men denne gangen ble slektskap blant de utvalgte individene estimert i COLONY på nytt. Variasjon og bias i estimatet ble altså påvirket av både utvalget av individene og analysen i COLONY. Gjentatt tilfeldig utvelgning av genotyper og forberedelse av COLONY input filer ble gjort ved bruk av et R skript beskrevet i Ackerman mfl. (2017). Mellom 10 og 90% av prøvene ble prøvetatt og hver andel ble prøvetatt ti ganger.

2.6 Betydning av romlig fordeling av søsken blant ungfisk for estimering av effektivt antall gytefisk

Det forventes at ungfisk fra samme familiegruppe (hel- og halvsøsken) vil bli funnet oftere innenfor samme innsamlingsstasjon enn forventet ved tilfeldig fordeling. Dette påvirker estimering av slektskap og dermed estimering av effektivt antall gytefisk når ungfisk blir innsamlet fra et begrenset antall stasjoner, fordi en betydelig andel av alle parvise sammenlikninger mellom ungfisk vil da gjøres innenfor stasjoner. Slektskap blir i større grad overestimert og dermed blir effektivt antall gytefisk underestimert hvis antall stasjoner er lavt og det er stor overrepresentasjon av søskenpar innenfor stasjoner. Romlig fordeling av søsken i elva og hvordan ungfiskprøvene ble tatt i ulike innsamlingsstasjoner vil derfor påvirke estimering av effektivt antall gytefisk.

Vi undersøkte denne effekten ved å tilfeldig trekke prøver fra ulikt antall stasjoner og plote sammenhengen mellom antall prøvetatte stasjoner og estimert effektivt antall gytefisk. Alle prøver innsamlet ved de utvalgte stasjonene ble brukt for estimering av effektivt antall gytefisk. Slektskap blant de utvalgte individene ble ikke estimert i COLONY på nytt, men hentet fra resultater av COLONY analysen som ble gjennomført med alle individer inkludert (tabell 2). Metoden gir en indikasjon på egnethet av innsamlingen av ungfisk til estimering av effektivt antall gytefisk. En manglende sammenheng mellom antall stasjoner og effektivt antall gytefisk (flat kurve) viser en høy grad av fordeling av søsken over elva og dermed lite bias ved estimering av effektivt antall gytefisk. En stigende men avflatende kurve viser at familiegrupper er stasjonsvis fordelt, men at man ved å analysere fisk fra et tilstrekkelig antall stasjoner kan oppnå sikre estimater av effektivt antall gytefisk. En stigende og ikke avflatende kurve viser at innsamlingen ikke representerer gjennomsnittlig slektskap blant ungfisk i elva og at effektivt antall gytefisk mest sannsynlig er underestimert.

I tillegg til tilfeldig utvalg fra ulikt antall stasjoner undersøkte vi også effekten av romlig fordeling av søsken på estimat av effektivt antall gytefisk ved å simulere en romlig fordeling av helsøsken. Hensikten med simuleringen var ikke å etterlikne en realistisk fordeling og bevegelse av søsken i elva, men å illustrere effekten på estimering av effektivt antall gytefisk. Den simulerte elven besto av 100 avsnitt og i hvert avsnitt var det ett gytepar som produserte 100 avkom. Utgangspunktet var altså 100 helsøsken i hvert avsnitt. Forflytning av ungfisk ble simulert ved å variere andelen ungfisk som forflytter seg ut av avsnittet mellom 0 og 100 %. Ungfisk som forflyttet seg ut av avsnittet ble plassert i et tilfeldig avsnitt i elva. Effektivt antall gytefisk ble beregnet på grunnlag av slektskap mellom ungfisk i ti avsnitt av elva (hvert tiende avsnitt mellom 5 og 95).

3 Resultater

3.1 Oppsummering av slektskapsanalyser

Tabell 2 oppsummerer de ulike estimatene av slektskap og effektivt antall gytefisk for de ulike stikkprøvene fra ulike gyteår og aldersgrupper innen gyteår og elv. Basert på dette materialet vil vi undersøke effekten av antall genetiske markører, stikkprøvestørrelse, romlig fordeling og aldersgruppe på estimat av slektskap og effektivt antall gytefisk.

Tabell 2. Oppsummering av slektskapsanalyser i Vigda, Sautso (Altaelva), Ekso, Årøyelva og Fortunselvi. Ungfisk (alder 0+, 1+, 2+) fra gyteårene 2011 til 2019 ble innsamlet på høsten (H) eller på våren (V). Tabellen viser antall prøver (N), estimert effektivt antall gytefisk (Ne_b), N relativ til Ne_b (rN), antall identifiserte halvsøsken- (N halv) og helsøskenpar (N hel), antall innsamlingsstasjoner, forventet andel (halv- og hel-) søskenpar (ved tilfeldig fordeling av søsken) der begge individene ble innsamlet ved samme stasjon og observert andel halvsøskenpar- (P halv) og helsøskenpar (P hel) der begge individene ble innsamlet ved samme stasjon.

Prøver	alder	tid	Gyteår	N	rN	Ne_b	N halv	N hel	stasjoner	P forv	P halv	P hel
Vigda	0+	H	2018	278	1.1	240	566	45	10	0,10	0,38	0,42
Vigda	0+	H	2019	291	3.3	86	1264	348	10	0,10	0,49	0,96
Sautso	0+	H	2011	94	0.6	156	90	11	4	0,24	0,30	0,82
Sautso	1+	H	2011	100	0.7	152	112	9	4	0,24	0,17	0,33
Sautso	2+	H	2011	75	0.8	97	67	24	4	0,32	0,40	0,92
Sautso	0+	H	2013	92	0.8	117	101	21	4	0,24	0,40	0,90
Sautso	1+	H	2013	93	0.6	149	103	6	4	0,25	0,22	0,33
Sautso	2+	H	2013	100	0.6	174	102	6	3	0,35	0,38	0,50
Sautso	0+	H	2014	93	0.9	101	132	19	4	0,24	0,42	0,68
Sautso	1+	H	2014	81	0.6	138	82	6	3	0,39	0,49	0,67
Ekso	0+	H	2019	59	0.8	77	59	15	4	0,31	0,54	0,93
Ekso	1+	H	2018	29	0.2	135	12	0	4	0,20	0,25	--
Ekso	2+	H	2017	23	0.6	39	18	4	4	0,18	0,33	0,25
Ekso	0+	V	2019	139	1.3	111	263	42	6	0,23	0,41	0,24
Ekso	1+	V	2018	183	2.3	79	654	97	6	0,22	0,51	0,35
Ekso	2+	V	2017	23	0.5	46	16	3	5	0,27	0,25	0,00
Årøyelva	0+	H	2019	277	3.9	71	1516	325	5	0,29	0,40	0,41
Fortunselvi	1+	H	2017	132	1.7	78	348	47	8	0,19	0,38	0,21

3.2 Betydning av antall genetiske markører for estimering av Ne_b

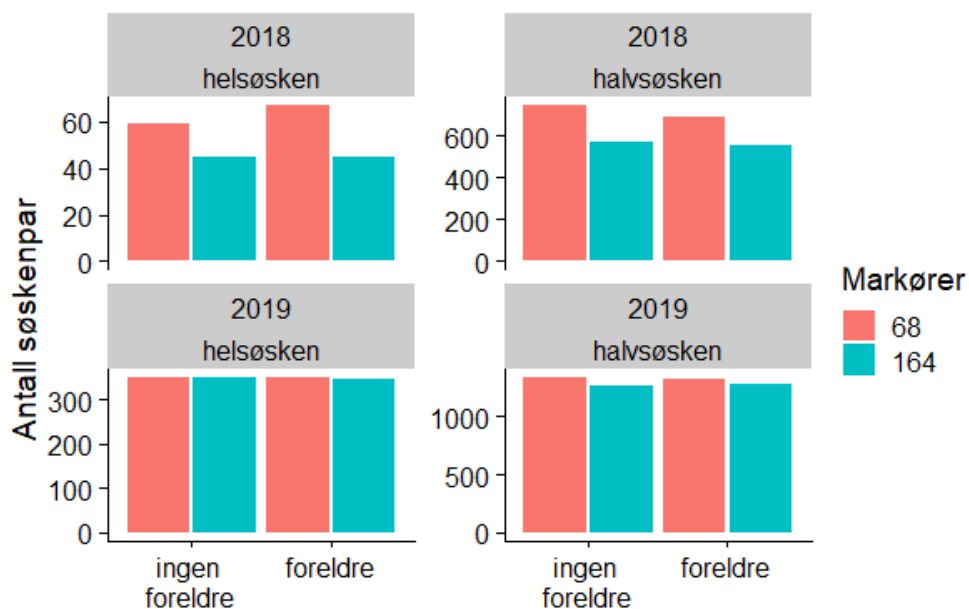
3.2.1 Vigda

Det var betydelig større grad av slektskap blant ungfisk fra gyteår 2019 enn fra gyteår 2018 (tabell 2). Antall helsøskenpar var 45 for gyteår 2018 (blant 281 ungfisk) og 348 for gyteår 2019 (blant 290 ungfisk). Antall halvsøskenpar var 566 for gyteår 2018 og 1264 for gyteår 2019 (tabell 2; figur 2).

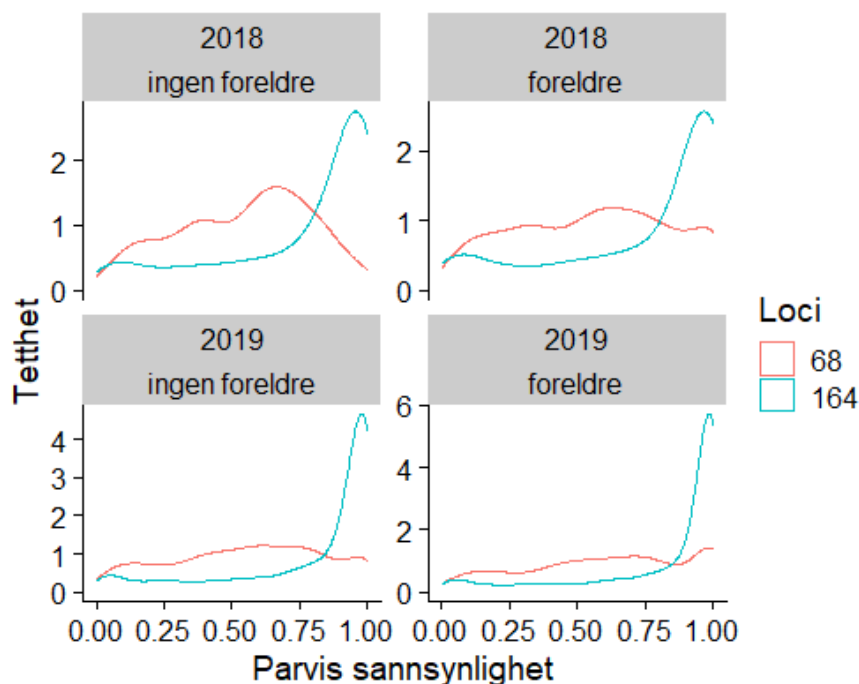
Flere hel- og halvsøskenpar ble tilordnet i COLONY ved bruk av 68 markører enn ved bruk av 164 markører (figur 2). Forskjellen i antall søskenpar var større for 2018 gyteåret enn for 2019 gyteåret (figur 2). Søskenpar ble tilordnet med betydelig høyere parvis sannsynlighet ved bruk av 164 markører enn ved bruk av 68 markører (figur 3). Analysen ble gjennomført med og uten genotyper av mulige foreldre, men

dette hadde ingen betydelig effekt på antall hel- og halvsøsken (figur 2) eller parvis sannsynlighet for tilordning (figur 3).

Større slektskap blant ungfisk fra gyteår 2019 enn blant ungfisk fra gyteår 2018 tilsvarer et lavere effektivt antall gytefisk i 2019 enn i 2018 (tabell 2). Ved bruk av 164 markører (og med genotyper av potensielle foreldre) var estimert effektivt antall gytefisk 243 i gyteår 2018 og 88 i gyteår 2019 (tabell 3). For gyteår 2019 med høyt slektskap og tilsvarende lavt effektivt antall gytefisk var det en forholdsvis liten effekt av antall markører, mens denne effekten var betydelig for gyteår 2018 (tabell 3).



Figur 2. Antall hel- og halvsøskenpar («fullsib» og «halfsib») i Vigda gyteårene 2018 og 2019 estimert i programmet COLONY ved bruk av enten 68 (rød) eller 164 (grønn) genetiske markører og med og uten genotyper av gytefisk (potensielle foreldre).



Figur 3. Sannsynlighetsfordeling for parvis sannsynlighet for hel- og halvsøskenpar i Vigda i 2018 og 2019 estimert i programmet COLONY ved bruk av enten 68 eller 164 genetiske markører og med (til høyre) og uten (til venstre) genotyper av gytefisk (potensielle foreldre).

Tabell 3. Effektivt antall gytefisk (med 95% konfidensintervall) i Vigda i 2018 og 2019 estimert i programmet COLONY ved bruk av enten 68 eller 164 genetiske markører og med og uten genotyper av gytefisk (potensielle foreldre).

	68 loci	164 loci
2018		
Med foreldrekandidater	204 (165-255)	243 (202-295)
Uten foreldrekandidater	194 (158-241)	240 (199-290)
2019		
Med foreldrekandidater	86 (63-116)	88 (67-116)
Uten foreldrekandidater	85 (64-114)	88 (66-120)

3.2.2 Simulerte data

Betydning av antall genetiske markører i rekonstruksjon av slektskap i COLONY ble undersøkt ved bruk av simulerte genotyper. Fem grupper av ungfisk ble simulert, med ulike andeler halv- og helsøsken, basert på undersøkelse av empiriske data (tabell 2) med et effektivt antall gytefisk mellom 71 og 243 (figur 4).

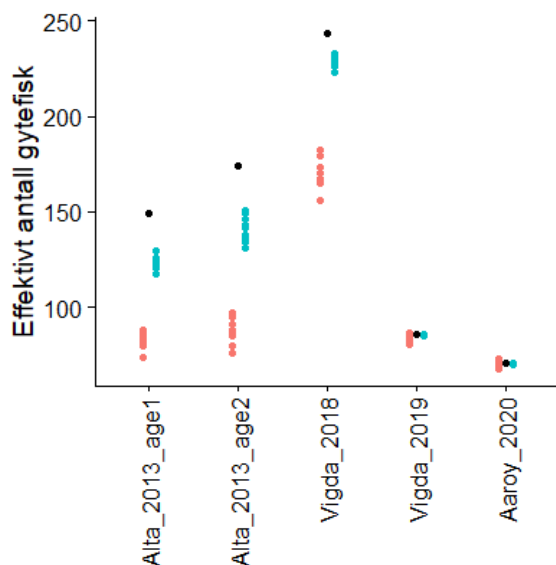
Antall genetiske markører hadde stor betydning for rekonstruksjon av slektskap når effektivt antall gytefisk var stort (Sautso og Vigda 2018). I disse tilfellene ble antall søskenpar i mye større grad overestimert ved bruk av 68 markører enn ved bruk av 164 markører (figur 4; figur 5; tabell 4). Ved høy grad av slektskap og lavt effektivt antall gytefisk (Vigda 2019 og Årøyelva) ble slektskap rekonstruert med lite feil, uansett om 68 eller 164 markører ble brukt (figur 4; figur 5).

Det forekom tilfeller der slektskapet mellom individuelle ungfiskpar både ble underestimert (f.eks. halvsøsken tilordnet som ubeslektet) og overestimert (f.eks. halvsøsken tilordnet som helsøsken) (tabell 4).

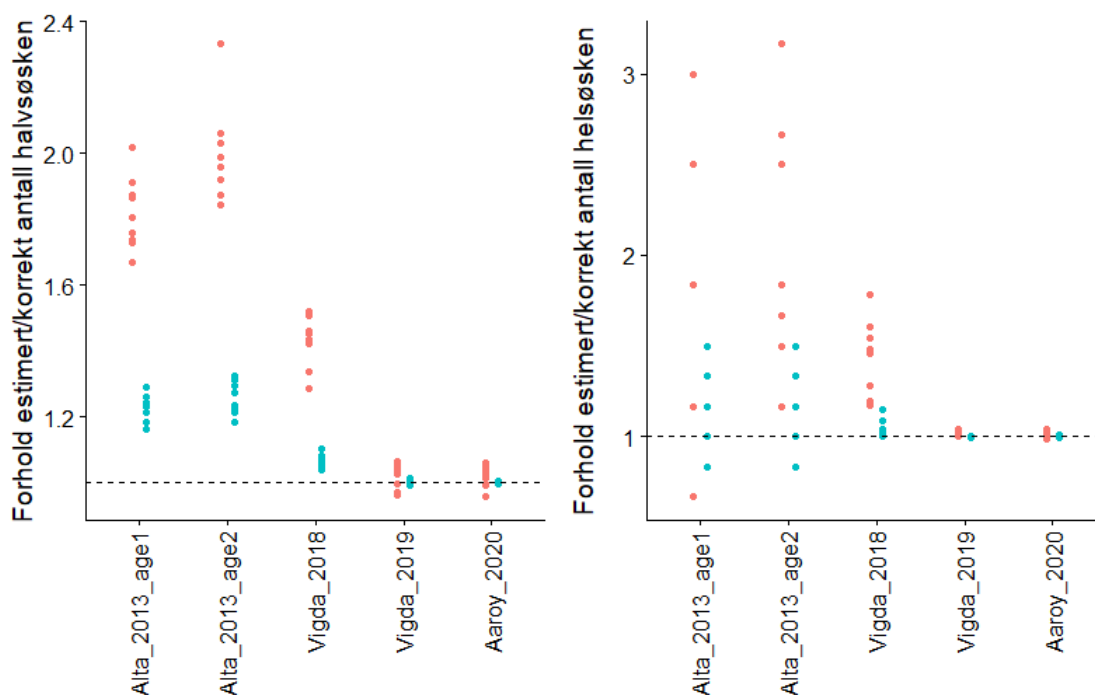
Feil i antallet tilordninger ble derfor delvis utliknet i beregningen av effektivt antall gytefisk, som tar utgangspunkt i det totale antallet hel- og halv-søsken (tabell 4).

Antall markører hadde stor betydning for identifisering av individuelle søskenpar. Ved høyt effektivt antall gytefisk ble under halvparten av de simulerte og dermed kjente halvsøskenparene identifisert ved bruk av 68 markører, mens ca. 90% av halvsøskenpar ble identifisert ved bruk av 164 markører (tabell 4; figur 6). Ved lavt effektivt antall gytefisk ble en stor andel av halvsøskenpar (ca. 80%) identifisert ved bruk av 68 markører, mens nær 100% ble identifisert ved bruk av 164 markører (tabell 4; figur 6). Hellsøskenpar ble som regel i større grad identifisert enn halvsøskenpar (figur 6). Ved høyt effektivt antall gytefisk ble identifisering av helsøskenpar forbedret ved bruk av flere genetiske markører (164 istedenfor 68) (tabell 4; figur 6).

Det var delvis store andeler av søskenpar identifisert i COLONY som ikke var korrekte. Bare 25 -35 % av halvsøskenpar var korrekte i simuleringer med høyt effektivt antall gytefisk når 68 markører ble brukt (tabell 4; figur 7). Denne andelen var betydelig høyere (ca. 75 – 85 %) når 164 markører ble brukt (tabell 4; figur 7). Også ved lavt effektivt antall gytefisk var andelen korrekte identifiserte halvsøskenpar høyere ved bruk av 164 enn 68 markører (tabell 4; figur 7). Andelen helsøskenpar som var korrekte var generelt høyere enn andelen halvsøskenpar, men også for helsøskenpar forbedret et større antall markører tilordningen (tabell 4; figur 7).



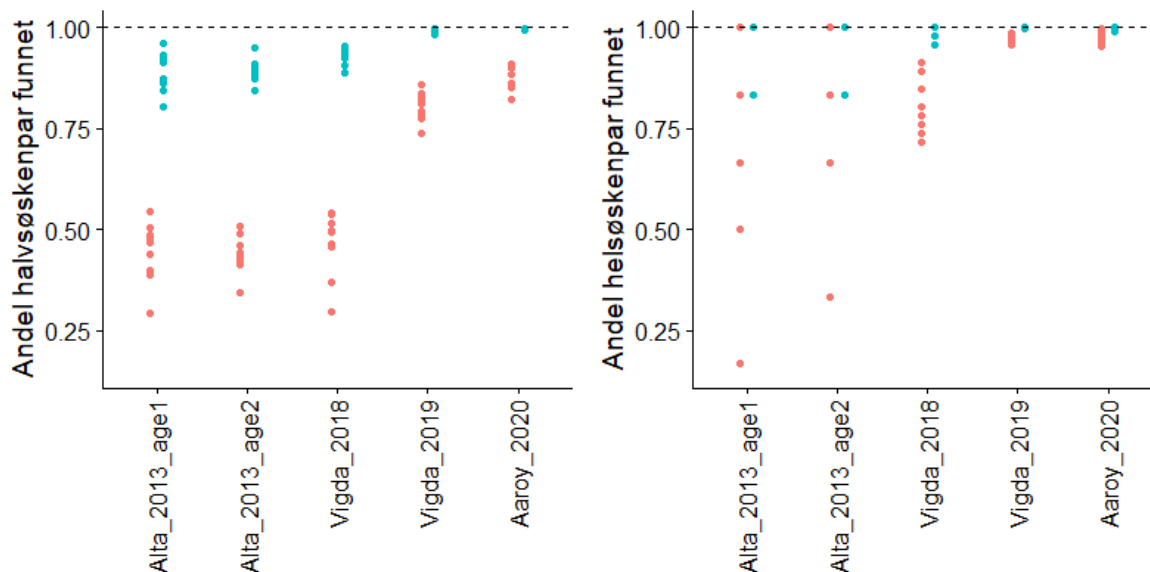
Figur 4. Effektivt antall gytefisk estimert i COLONY basert på simulerte genotyper ved bruk av 68 (rød) og 164 (grønn) markører. Genotyper av ungfisk ble simulert basert på slektskap i empiriske data fra Sautso (gyteår 2013; 1+ og 2+ alder), Vigda (gyteår 2018 og 2019; 0+ alder) og Årøyelva (gyteår 2020; 0+ alder) og svarte sirkler viser kjent korrekt effektivt antall gytefisk. Hver sirkel viser en simulering av ungfisk-genotyper og analyse i COLONY (N=10 per scenario).



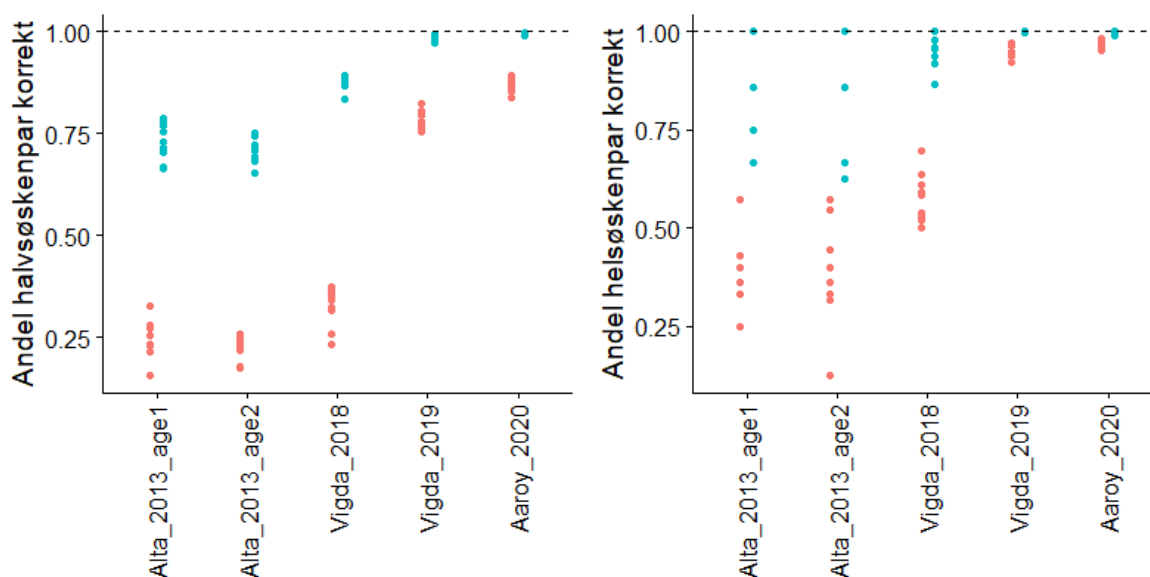
Figur 5. Forholdet mellom antall søskenpar estimert i COLONY og kjent korrekt antall søskenpar basert på simulerte genotyper ved bruk av 68 (rød) og 164 (grønn) markører. Genotyper av ungfisk ble simulert basert på slektskap i empiriske data fra Sautso (gyteår 2013; 1+ og 2+ alder), Vigda (gyteår 2018 og 2019; 0+ alder) og Årøyelva (gyteår 2020; 0+ alder). Hver sirkel viser en simulering av ungfisk-genotyper og analyse i COLONY (N=10 per scenario). Den stiplede linjen viser korrekt estimering av antall søskenpar.

Tabell 4. Tilordning av kjente hel- og halvsøskenpar i COLONY ved bruk av 68 og 164 genetiske markører. Genotyper og slektskap ble simulert på grunnlag av slektskap blant ungfisk fra gyteårene 2018 og 2019 i Vigda og med identiske allelfrekvenser. Tabellen viser summen av ti replikater og antall hel- og halvsøskenpar og ubeslektede par («simulert som») som ble tilordnet som helsøsken, halvsøsken og ubeslektet i analysen. Korrekt tilordnet slektskap er markert grønt.

	Tilordnet som (68 markører)			Simulert totalt	Tilordnet som (164 markører)			Simulert totalt	
	Simulert som	Helsøsken	Halvsøsken		Ubeslektet	Helsøsken	Halvsøsken		Ubeslektet
2018									
Helsøsken		377	61	22	460	455	5	0	460
Halvsøsken	151		2605	2804	5560	23	5165	372	5560
Ubeslektet	140	5301	381939	387380	0	753	386627	387380	387380
Tilordnet totalt	668	7967	384765		478	5923	386999		
2019									
Helsøsken		3373	66	31	3470	3465	5	0	3470
Halvsøsken	123		10233	2334	12690	2	12570	118	12690
Ubeslektet	58	2721	400111	402890	0	184	402706	402890	402890
Tilordnet totalt	3554	13020	402476		3467	12759	402824		



Figur 6. Andel simulerte søskenpar som ble identifisert i COLONY (antall korrekt tilordnet delt med antall simulert) ved bruk av 68 (rød) og 164 (grønn) markører. Genotyper av ungfisk ble simulert basert på slektskap i empiriske data fra Sautso (gyteår 2013; 1+ og 2+ alder), Vigda (gyteår 2018 og 2019; 0+ alder) og Årøyelva (gyteår 2020; 0+ alder). Hver sirkel viser en simulering av ungfisk-genotyper og analyse i COLONY (N=10 per scenario). Den stiplede linjen viser at alle simulerte søskenpar ble identifiserte.

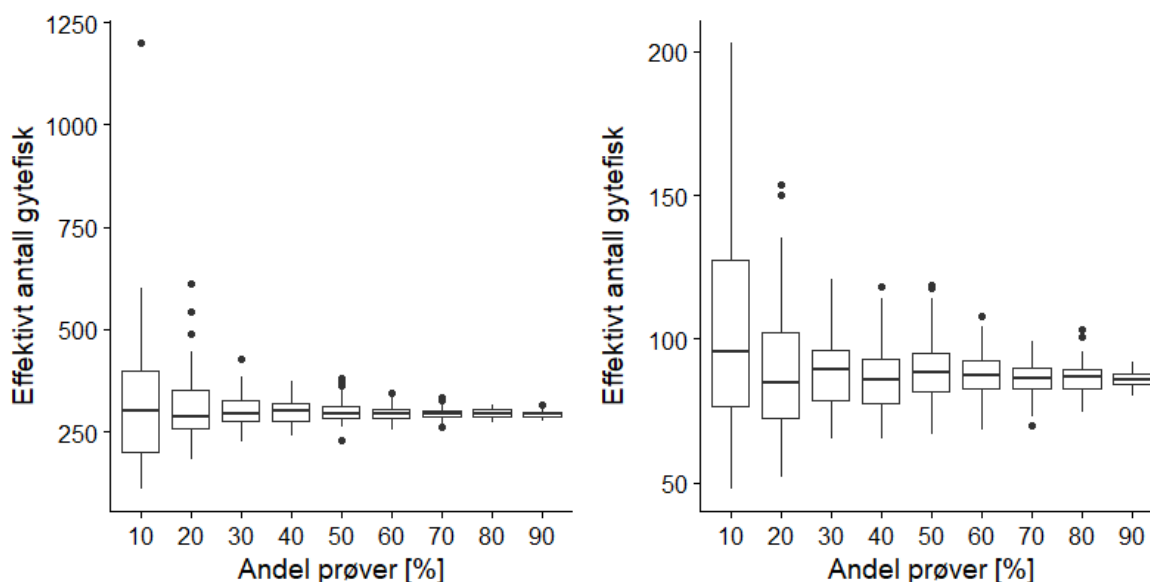


Figur 7. Andel av i COLONY identifiserte søskenpar som var korrekte (antall tilordnet totalt delt med antall korrekt tilordnet). Slektskap ble rekonstruert ved bruk av 68 (rød) og 164 (grønn) markører. Genotyper av ungfisk ble simulert basert på slektskap i empiriske data fra Sautso (gyteår 2013; 1+ og 2+ alder), Vigda (gyteår 2018 og 2019; 0+ alder) og Årøyelva (gyteår 2020; 0+ alder). Hver sirkel viser en simulering av ungfisk-genotyper og analyse i COLONY (N=10 per scenario). Den stiplede linjen viser at alle identifiserte søskenpar var korrekte.

3.3 Betydning av antall prøver for estimering av effektivt antall gytefisk

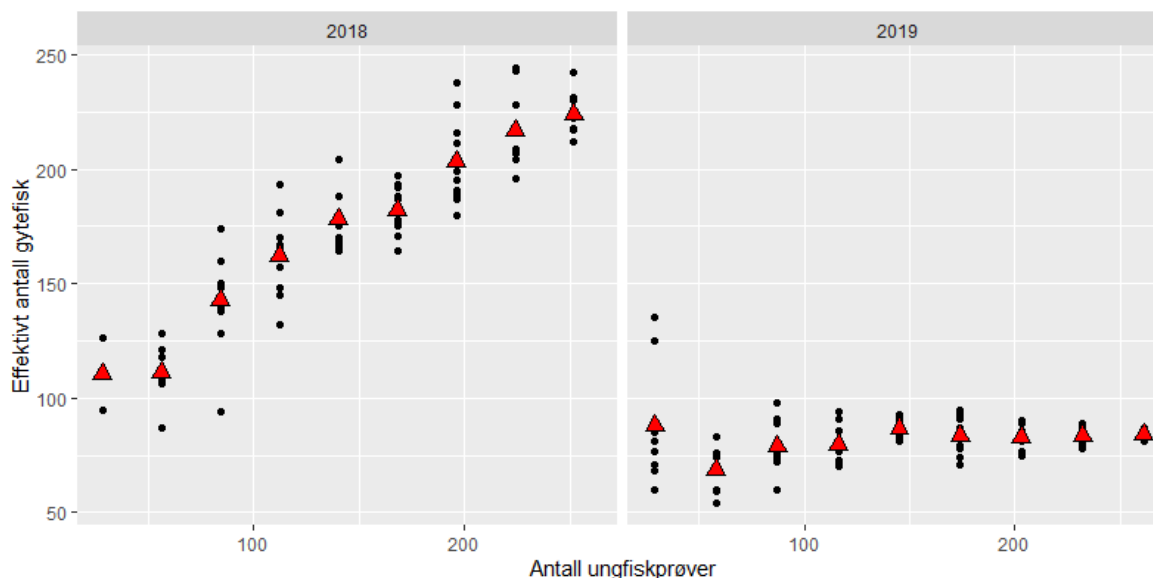
Betydning av antall prøver for estimering av effektivt antall gytefisk ble undersøkt ved tilfeldig utvalg av ungfisk uten hensyn til innsamlingsstasjon. Dette ble gjort med og uten re-analyse av slektskap mellom prøver i COLONY.

I gjentatt tilfeldig utvelgning av prøver uten re-analyse av slektskap ble den tilfeldige utvelgning gjort 100 ganger og for hver tilfeldig utvelgning ble effektivt antall gytefisk estimert, basert på slektskap analysert på det fullstendige materiale i COLONY. Denne analysen viste økt usikkerhet, men ingen bias i estimert effektivt antall gytefisk ved redusert antall prøver (figur 8).



Figur 8. Effektivt antall gytefisk beregnet fra slektskap mellom ungfisk i Vigda fra gyteår 2018 (venstre) og 2019 (høyre). Figurene viser effektivt antall gytefisk ved gjentatt tilfeldig utvelgning av ulike andeler av innsamlete ungfisk uten re-analyse (2018: $N = 278$; 2019: $N = 291$).

Gjentatt tilfeldig utvelgning av prøver med re-analyse av slektskap i COLONY (164 markører) for hver utvelgning viste en bias i estimert effektivt antall gytefisk ved redusert antall prøver (figur 9). Slektskap ble overestimert og effektivt antall gytefisk underestimert ved lavere antall prøver (figur 9). Ved stort effektivt antall gytefisk (Vigda gyteår 2018) var det en konstant økning i estimert antall gytefisk ved utvelgning av 10% til 90% av prøvene (28-250 prøver; figur 9). Ved lavt effektivt antall gytefisk (Vigda gyteår 2018) var det ingen tydelig bias ved utvelgning av 10-90% av prøvene (29-262 prøver; figur 9).



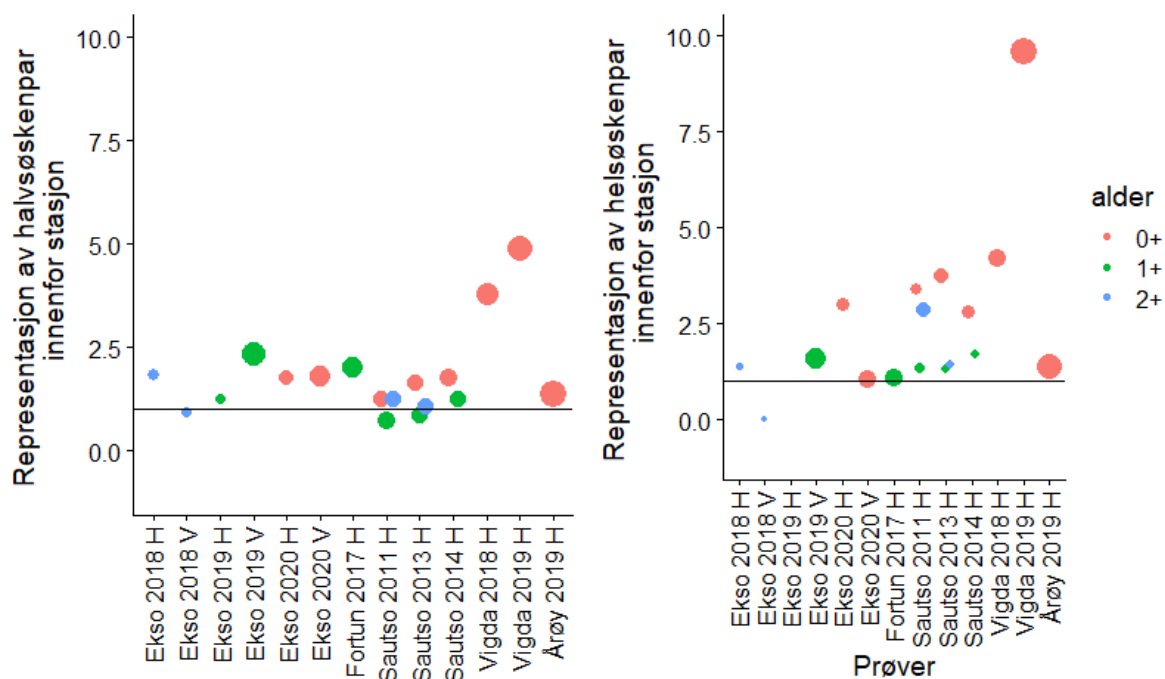
Figur 9. Effektivt antall gytefisk estimert i COLONY fra tilfeldig utvalgte prøver av ungfisk i Vigda fra gyteår 2018 (venstre) og 2019 (høyre). Hver svart sirkel viser en analyse i COLONY og røde trekanter viser gjennomsnitt. Totalt antall prøver var 278 for gyteår 2018 og 291 for gyteår 2019.

3.4 Betydning av romlig fordeling av prøvene for estimering av effektivt antall gytefisk

3.4.1 Romlig fordeling av hel- og halvsøsken i elva

En større andel av hel- og halvsøskenpar ble funnet innenfor innsamlingsstasjoner enn forventet ved en tilfeldig fordeling av søsken i elva (tabell 2; figur 10). Overrepresentasjonen av søskenpar innenfor stasjoner var større for helsøsken enn for halvsøsken i 16 av 19 ulike analysegrupper (tabell 2). Andelen halvsøskenpar funnet innenfor stasjoner var 1,58 (median; IQR (variasjonsbredde i kvartiler): 1,09-2,00) ganger så stor som forventet ved tilfeldig fordeling av søsken i elva (tabell 2; figur 10). Andelen helsøskenpar funnet innenfor stasjoner var 2,36 (median; IQR: 1,33-2,96) ganger så stor som forventet ved tilfeldig fordeling av søsken i elva (tabell 2; figur 10). Fordeling av søsken i elva varierte mellom elver og år. Nesten alle helsøskenpar ble funnet innenfor stasjoner i Vigda i 2019 gyteåret, mens andelen helsøskenpar funnet innenfor stasjoner tilsvarte en tilfeldig fordeling av søsken i elva i andre tilfeller (tabell 2; figur 10).

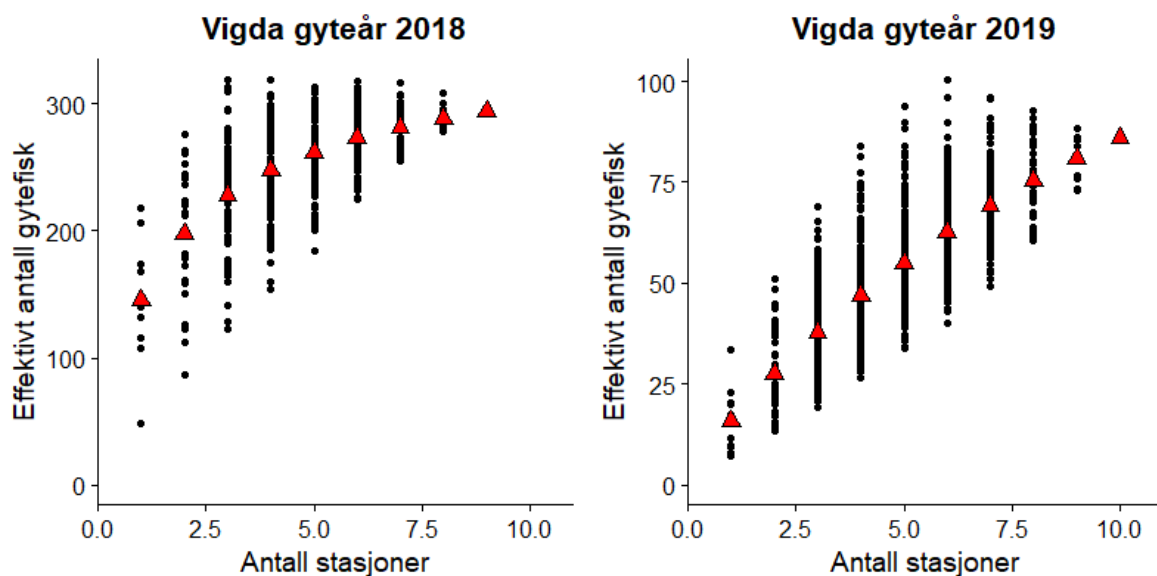
Det er forventet at ungfisk sprer seg utover større deler av elva med høyere alder. Som forventet var overrepresentasjonen av søskenpar innenfor stasjoner større for 0+ ungfisk enn for 1+ og 2+ ungfisk. For helsøskenpar var overrepresentasjonen 3,2 for 0+ (median) og 1,4 for både 1+ og 2+ ungfisk (tabell 2; figur 10). For halvsøskenpar var overrepresentasjonen 1,7 for 0+ (median), 1,3 for 1+ og 1,2 for 2+ ungfisk (tabell 2; figur 10). Det best egnede materialet for å undersøke fordeling av søsken ved ulike aldre var fra Sautso der ungfisk av ulik alder ble samlet inn fra samme gyteår, mens de ulike aldre i de øvrige vassdragene var fra ulike gyteår, og i Sautso var det en forholdsvis liten forskjell mellom de ulike aldre innen årklasse, men også en forholdsvis liten overrepresentasjon av slektskap innen stasjoner (tabell 2; figur 10).



Figur 10. Over- og underrepresentasjon av søskenpar innenfor stasjoner blant ungfisk i Ekso (gyteår 2018-2020; innsamling høst og vår), Sautso (gyteår 2011, 2013, 2014; innsamling høst), Vigda (gyteår 2018, 2019; innsamling høst) og Årøy (gyteår 2019; innsamling høst). Representasjon ble beregnet som andel søskenpar der begge individer ble innsamlet fra samme stasjon relativ til forventningen ved tilfeldig fordeling av søsken i elva (heltrukket horisontal linje lik 1). For de fleste stikkprøvene var søsken overrepresentert innenfor stasjoner. Størrelsen på sirkelene viser antall søskenpar (se tabell 2) og fargen viser ungfiskalder.

3.4.2 Sammenheng mellom romlig fordeling av ungfisk og estimering av effektivt antall gytefisk

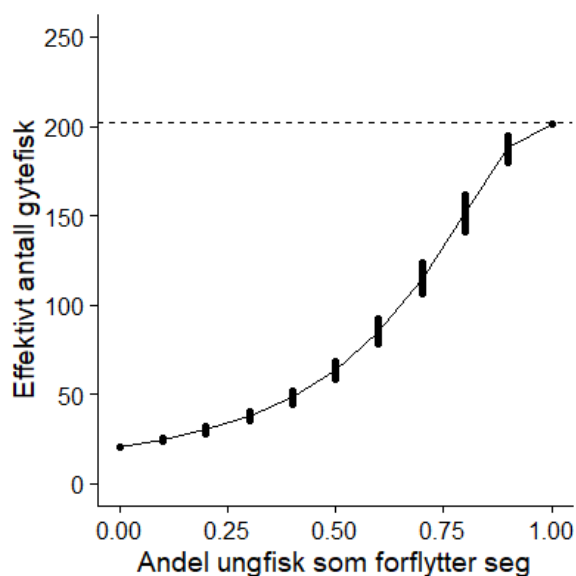
Antall prøvetatte stasjoner hadde stor betydning for estimering av effektivt antall gytefisk i Vigda (figur 11). Det var en sterk overrepresentasjon av søskenpar innenfor stasjoner i begge undersøkte gyteårene (figur 10) og dermed en tydelig sammenheng mellom antall utvalgte stasjoner og estimert effektivt antall gytefisk (figur 11). Analysen antyder dog at antall innsamlingsstasjoner var tilstrekkelig for estimering av effektivt antall gytefisk i 2018, da kurven flatet ut med stigende antall stasjoner (figur 11). Derimot var antall innsamlingsstasjoner ikke tilstrekkelig for 2019 gyteåret og kurven hadde gjennomgående stor stigning (figur 11). Det er derfor sannsynlig at et betydelig større effektivt antall gytefisk hadde blitt estimert hvis prøvene hadde blitt samlet inn ved flere enn ti stasjoner.



Figur 11. Effektivt antall gytefisk beregnet fra slektskap blant ungfisk i Vigda fra gyteår 2018 (venstre) og 2019 (høyre). Ungfisk ble innsamlet ved elfiskestasjoner og effektivt antall gytefisk er beregnet gjentatt tilfeldig utvelgning fra ulikt antall stasjoner. Utvelgning ble gjort for alle mulige kombinasjoner av et gitt antall innsamlingsstasjoner. Hver svart sirkel viser en kombinasjon av innsamlingsstasjoner og røde trekanter viser gjennomsnitt.

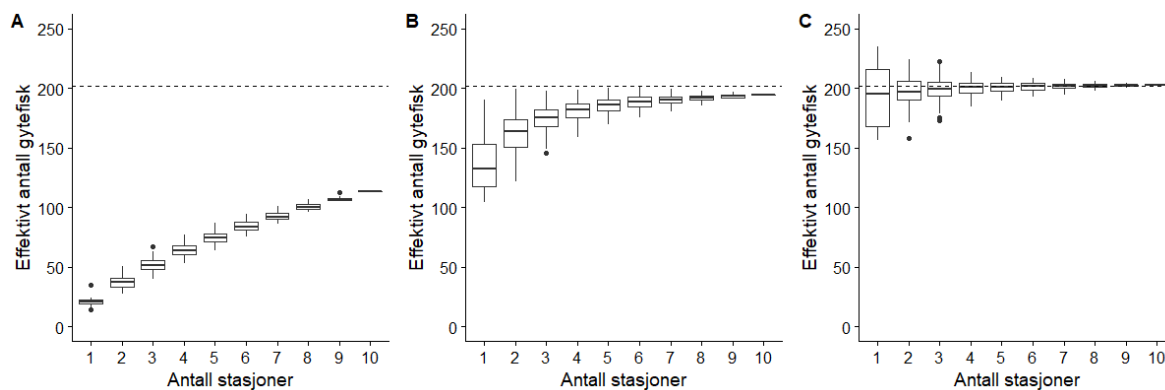
3.4.3 Simulering av romlig fordeling

Vi simulerte en forenklet romlig fordeling av søskengrupper i elva for å illustrere effekten av forflytning på estimering av effektivt antall gytefisk. Helsøskengrupper ble plassert innenfor 100 stasjoner og graden av forflytning ble simulert ved å variere andelen av ungfisk som forflytter seg til en tilfeldig stasjon i elva. Simuleringen viser en avtagende bias i estimering av effektivt antall gytefisk med økende grad av forflytning (lavere andel av ungfisk som forblir i stasjonen) (figur 12).



Figur 12. Effekten av romlig fordeling av ungfisk-søskengrupper i elva på estimering av effektivt antall gytefisk. Forflytning av ungfisk i elva ble simulert ved å variere andelen av ungfisk som forflytter seg til en tilfeldig stasjon i elva. Med økende forflytning vil estimert effektivt antall gytefisk nærme seg den korrekte simulerte verdien (stiplet linje).

Vi brukte gjentatt tilfeldig utvelging av ulikt antall stasjoner på de simulerte dataene for å illustrere hvordan denne analysen kan gi indikasjon på en bias i effektivt antall gytefisk i analysen av empiriske data (jfr. figur 11). Resultatene viser at antall utvalgte stasjoner har mindre betydning for estimert effektivt antall gytefisk med økende grad av spredning av ungfisken (figur 13). Når søskengrupper i stor grad forblir innenfor stasjoner etter klekking er estimatet veldig avhengig av antall utvalgte stasjoner og gjentatt tilfeldig utvelging viser at effektivt antall gytefisk blir mest sannsynlig underestimert (figur 13A). Ved en større grad av forflytning av ungfisk flatet forholdet mellom antall prøvetatte stasjoner og effektivt antall gytefisk ut (figur 13B). I analyse av empiriske data kan dette indikere at effektivt antall gytefisk blir estimert uten betydelig bias. Ved veldig stor grad av forflytning av ungfisk, som nærmer seg en tilfeldig fordeling i elva, er estimering av effektivt antall gytefisk uavhengig av antall prøvetatte stasjoner (figur 13C).



Figur 13. Effekten av romlig fordeling av søskengrupper blant ungfisk i elva på estimering av effektivt antall gytefisk. Forflytning av ungfisk i elva ble simulert med utgangspunkt i helsøsken i hver stasjon og ved å variere andelen av ungfisk som forflytter seg til en tilfeldig stasjon i elva: 70% (A), 90% (B) og 97% (C) av ungfisk. Figurene viser effektivt antall gytefisk ved gjentatt tilfeldig utvelging fra ulikt antall stasjoner. I simuleringen var ungfisk innenfor hver stasjon helsøsken og effekten av forflyttingen av en gitt andel ungfisk på effektivt antall gytefisk kan derfor ikke overføres til en naturlig situasjon (jfr. figur 11).

4 Diskusjon

Undersøkelsen viser at effektivt antall gytefisk kan bli estimert ved genetiske analyser av slektskap blant ungfisk av laks. Denne metoden kan bidra til bedre overvåking av blant annet laksebestander. Det er imidlertid noen kriterier som må oppfylles for at metoden skal gi et godt bilde på den effektive bestandsstørrelsen. Antall genetiske markører og antall ungfiskprøver må være tilstrekkelig for å estimere slektskap med lite feil. Hvor mange markører og prøver som er tilstrekkelig avhenger av hvor mye slektskap det er blant ungfiskene og dermed den effektive bestandsstørrelsen. Hvis antall markører eller prøver ikke er tilstrekkelig vil effektivt antall gytefisk bli underestimert. Også romlig fordeling av søsken i elva og romlig fordeling av prøvetaking har stor betydning for estimering av effektivt antall gytefisk. Når søsken ikke er tilfeldig fordelt i elva, men forekommer i høyere grad innenfor begrensede områder kan effektivt antall gytefisk bli kraftig underestimert. Undersøkelsen gir en verdifull innsikt som kan brukes for å optimalisere innsamling og analyser for å oppnå så sikre estimater av effektivt antall gytefisk som mulig, og for å vurdere prøvematerialets egnethet.

4.1 Antall markører

Vi sammenliknet rekonstruksjon av slektskap ved bruk av henholdsvis et (68 SNP) eller to (164 SNP) markørsett. Resultatene viser at 68 SNP-markører kan være tilstrekkelig for å estimere slektskap blant ungfisk i små bestander med et effektivt antall gytefisk på under 100. I større bestander er det nødvendig med et større antall markører og 164 SNP-markører var tilstrekkelig for å identifisere halv- og helsøsken og for å estimere effektivt antall gytefisk, men i store bestander kan effektivt antall gytefisk bli moderat underestimert også ved bruk av 164 SNP markører. Analyser av empiriske og simulerte data viser at et for lavt antall genetiske markører generelt overestimerer slektskap og dermed underestimerer effektivt antall gytefisk.

Ved analyse av empiriske data kan det være uklart om den effektive bestandsstørrelsen ble estimert korrekt eller underestimert på grunn av for lite analysestyrke i markørene. En analyse av simulerte data som tilsvarende slektskap i det undersøkte materialet kan gi indikasjon på en mulig bias i estimering av effektivt antall gytefisk. I programmet COLONY kan en slik simulering gjøres. Begrensningen i fremgangsmåten er at simuleringen tar utgangspunkt i slektskap som blir rekonstruert i COLONY, som i seg selv kan være et overestimat av slektskap. I tilfeller der det er usikkerhet om bestandsstørrelsen bør det derfor brukes tilstrekkelig mange markører for å estimere effektivt antall gytefisk med lav bias også hvis den ligger i den øverste enden av det som anses som mulig bestandsstørrelse i den undersøkte elven. Alternativt kan re-analyser av prøvene i COLONY med reduserte, ulike antall genetiske markører gi indikasjon om analysestyrken var tilstrekkelig.

Resultatene for simuleringene viser at identifisering av spesifikke halvsøskenpar krever stor analysestyrke i de brukte markørene. Også ved bruk av 164 SNP-markører ble slektskap feilestimert for en betydelig andel ungfiskpar i bestander med stort effektivt antall gytefisk. I bestander med effektivt antall gytefisk på under 100 var det derimot nesten ingen feilestimering av slektskap mellom ungfiskpar ved bruk av 164 SNP-markører. Redusert feil i estimering av slektskap i bestander med lavt effektivt antall gytefisk skyldes at COLONY samtidig estimerer slektskap mellom alle individene, noe som gir økt analysestyrke ved høy grad av slektskap og dermed en betydelig andel halv- og helsøskengrupper som er knyttet til hverandre gjennom slektskap.

4.2 Antall prøver

Det er to typer feil som kan introduseres i estimering av effektivt antall gytefisk ved bruk av utilstrekkelig antall prøver. Den første typen er tilfeldig variasjon i andel søskenpar blant de innsamlede individene forutsatt perfekt kunnskap om slektskap. Dette fører til usikkerhet i estimatet ved lavt antall prøver, men ikke til en systematisk bias (figur 8). Ved estimering av effektivt antall gytefisk fra ungfiskprøver vil antall

prøver vanligvis være i en størrelsesorden på >100 individer og da vil denne effekten bidra lite til feilestimering.

Den andre typen feil ved bruk av utilstrekkelig antall prøver er overestimering av slektskap og dermed en underestimering av effektivt antall gytefisk. Tidligere undersøkelse av denne effekten i regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) viste at antall prøver bør være omtrent like stor som effektivt antall gytefisk for å oppnå et sikkert estimat (Ackerman mfl. 2017). Dette stemmer overens med våre analyser av prøver fra Vigda og simuleringer med reanalyse av slektskap, der omkring 300 var tilstrekkelig til å estimere et effektivt antall gytefisk på 240, mens 30-90 prøver var tilstrekkelig til å estimere et effektivt antall gytefisk på omkring 80. Undersøkelsen viste hvordan gjentatt tilfeldig utvelging av prøver og reanalyser i COLONY kan benyttes for å vurdere om antall prøver er tilstrekkelig til estimering av effektivt antall gytefisk.

4.3 Romlig fordeling av ungfisk

Undersøkelsen viser at den romlige fordelingen av søsken og prøvetakingen i elva kan ha store effekter på estimering av effektivt antall gytefisk. Søskengrupper var i nesten alle tilfeller (undersøkte vassdrag, gyteår og aldersgrupper) overrepresentert innenfor innsamlingsstasjoner. Ved prøvetaking innenfor begrensede områder (stasjoner for elektrisk fiske) vil en betydelig andel av parvise sammenlikninger av slektskap bli gjort innenfor stasjoner og dermed vil gjennomsnittlig slektskap i elva bli overestimert. Resultatet vil i tillegg være avhengig av avstand mellom innsamlingsstasjoner og størrelse av de enkle innsamlingsstasjonene. Resultatene viser at overestimering av slektskap blir større ved en mere skeiv fordeling av søsken i elva (stor andel av søskenpar funnet innenfor stasjoner) og ved prøvetaking i et lavt antall stasjoner. Når søsken oppholdet seg i stor grad innenfor begrensede områder i elven som i Vigda gyteår 2019 var prøvetaking ved ti stasjoner ikke tilstrekkelig for å estimere effektivt antall gytefisk uten bias. Våre analyser viste også at nært slektskap i større grad var relatert til innsamlingsstasjon i de yngre aldersgruppene (0+) enn i de eldre ungfiskene (1+ og 2+). Om mulig er det derfor en fordel å analysere eldre ungfiskgrupper enn års-yngel, og dersom et tilstrekkelig antall prøver finnes fra voksen laks forventes representativiteten av slektskap i gytebestanden kunne være enda bedre. Det kan imidlertid være av interesse å vite noe om gyteaktiviteten innen områder av et vassdrag og da vil analyser av års-yngel kunne være godt egnede.

Vi har vist hvordan effekten av den romlige fordelingen av søsken i elva på estimat av effektivt antall gytefisk kan undersøkes og vurderes. Den romlige fordelingen av søsken i elva kan variere mye mellom bestander og effekten på estimering av effektivt antall gytefisk bør undersøkes i hvert enkelttilfelle. Tilfeldig innsamling av prøver fra ulike antall stasjoner viser om søsken er tilfeldig fordelt i elva og om antall stasjoner er tilstrekkelig for estimering av effektivt antall gytefisk. Denne analysen er dog avhengig av en korrekt identifisering av helsøsken, halvsøsken og ubeslektede individer. Feilidentifisering vil underestimere sammenhengen mellom antall stasjoner og effektivt antall gytefisk fordi slektskap for noen ubeslektede par vil være overestimert og omvendt. Simuleringer viste en stor usikkerhet i identifisering av slektskap ved bruk av 68 SNP-markører men en høy presisjon ved bruk av 164 markører.

4.4 Konklusjon

Genetisk overvåkning av effektivt antall gytefisk kan gi viktig kunnskap til forvaltning av laksebestander. I likhet med tradisjonell overvåkning av antall fisk kan en overvåkning av effektivt antall gytefisk gi viktig kunnskap om bestandsutvikling, og kan i tillegg gi en statusbeskrivelse med tanke på bevaring av genetisk variasjon. Metoden kan bidra til en helhetlig og kostnadseffektiv bestandsovervåkning i regulerte vassdrag i sammenheng med blant annet vilkårsrevisjoner og pålagte tiltak som miljødesign. Estimert av effektivt antall gytefisk inkluderer hele bestandens overføring av genetisk materiale fra foreldre til avkom, inklusive bidrag fra gytepar og variasjon i reproduktivt bidrag blant gytefisk. Undersøkelsen viser at effektivt antall gytefisk kan beregnes fra slektskap estimert ved bruk av genetiske markører. Usikkerhe-

ten i estimatet er avhengig av antall genetiske markører og antall prøver fra en gyteårsklasse. Dette gjelder uansett om prøver av voksenfisk eller ungfisk blir brukt. Ved bruk av ungfiskprøver kan det i tillegg være utfordrende å samle inn prøver på en måte som reflekterer slektskap i elva. Dette er spesielt utfordrende ved bruk av 0+ ungfisk som i stor grad kan oppholde seg i familiegrupper i kort avstand fra klekkeområdet. Denne fordelingen avtar med økende alder og forventes være minst ved prøver av voksen laks. Hvilke aldersgrupper som er mest hensiktsmessig å analysere vil kunne variere mellom vassdrag og bør vurderes ut fra hvor stor bestanden er, om vassdraget er oppdelt i definerbare og antatt separate gyteområder og hvilke prøver som er praktisk mulig å få tak i.

Estimering av effektivt antall gytefisk fra ungfiskprøver forutsetter grundig planlegging av prøvetaking og genotyping. Undersøkelsen viser hvordan antall genetiske markører, antall prøver, romlig fordeling av prøver og bestandsstørrelsen kan påvirke estimatene av effektivt antall gytefisk. Resultater fra empiriske analyser av effektivt antall gytefisk bør i hvert enkelt tilfelle undersøkes og vurderes, som demonstrert i denne rapporten.

5 Referanser

- Ackerman, M.W., Hand, B.K., Waples, R.K., Luikart, G., Waples, R.S., Steele, C.A., Garner, B.A., McCane, J. & Campbell, M.R. 2017. Effective number of breeders from sibship reconstruction: empirical evaluations using hatchery steelhead. *Evolutionary Applications* 10: 146-160.
- Diserud, O.H., Hindar, K., Karlsson, S., Glover, K.A. & Skaala, Ø. 2019. Genetisk påvirkning av rømt oppdrettslaks på ville laksebestander – oppdatert status 2019. NINA Rapport 1659.
- Ferchaud, A.L., Perrier, C., April, J., Hernandez, C., Dionne, M. & Bernatchez, L. 2016. Making sense of the relationships between N_e , N_b and N_c towards defining conservation thresholds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Heredity* 117: 268-278.
- Hagen, I.J., Jensen, A.J., Bolstad, G.H., Diserud, O.H., Hindar, K., Lo, H. & Karlsson, S. 2019. Supplementary stocking selects for domesticated genotypes. *Nature Communications* 10.
- Jones, O.R. & Wang, J.L. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* 10: 551-555.
- Karlsson, S., Diserud, O.H., Fiske, P. & Hindar, K. 2016. Widespread genetic introgression of escaped farmed Atlantic salmon in wild salmon populations. *Ices Journal of Marine Science* 73: 2488-2498.
- Karlsson, S., Florø-Larsen, B., Sollien, V.P., Andersskog, I.P.Ø., Brandsegg, H., Eriksen, L.B. & Spets, M.H. 2020. Stamlakskontroll 2019. NINA Rapport 1836.
- Perrier, C., Normandeau, E., Dionne, M., Richard, A. & Bernatchez, L. 2014. Alternative reproductive tactics increase effective population size and decrease inbreeding in wild Atlantic salmon. *Evolutionary Applications* 7: 1094-1106.
- Perrier, C., April, J., Cote, G., Bernatchez, L. & Dionne, M. 2016. Effective number of breeders in relation to census size as management tools for Atlantic salmon conservation in a context of stocked populations. *Conservation Genetics* 17: 31-44.
- Solem, Ø., Ulvan, E.M., Holthe, E., Havn, T.B., Pettersen, O., Sollien, V.P., Nielsen, L.E., Fugger, S., Fugger, K., Nøstum, B.L., Kleven, R. & Bremset, G. 2019. Gytedefisktellinger i Børsaelva, Skjenaldelva, Snilldalselva og Vigda. Årsrapport 2018. NINA Rapport 1622.
- Solem, Ø., Bergan, M.A. & Ulvan, E.M. 2020. Ungfiskundersøkelser i Børsaelva og Vigda høsten 2019. NINA Rapport 1740.
- Ugedal, O., Næsje, T.F., Saksgård, L.M. & Thorstad, E.B. 2016. Fiskebiologiske undersøkelser i Altaelva. Samlerapport for 2011- 2015. NINA Rapport 1265.
- Wacker, S., Skaug, H.J., Forseth, T., Solem, O., Ulvan, E.M., Fiske, P. & Karlsson, S. 2021. Considering sampling bias in close-kin mark-recapture abundance estimates of Atlantic salmon. *Ecology and Evolution* 11: 3917-3932.
- Wang, J.L. 2009. A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. *Molecular Ecology* 18: 2148-2164.

www.hydrocen.no



Forskningssenteret HydroCen (Norwegian Research Centre for Hydropower Technology) skal bidra til å styrke Norges posisjon som en ledende vannkraftnasjon og sikre at norsk vannkraftsektor kan utnytte mulighetene i fremtidens fornybare energisystem.

NTNU er vertsinstusjon og hovedforskningspartner i HydroCen sammen med SINTEF Energi og Norsk institutt for naturforskning (NINA).

HydroCen har rundt 50 nasjonale og internasjonale partnere fra forskning, industri og forvaltning. Norsk Vannkraftsenter (NVKS) samler sin aktivitet i HydroCen i perioden 2017-2024.

HydroCen er et av sentrene i Forskningsrådets ordning med forskningssentre for miljøvennlig energi (FME). HydroCen har et budsjett på nærmere 400 millioner kroner fordelt på åtte år.

ISSN: 2535-5392

ISBN: 978-82-93602-29-3



HydroCen
v/ Vannkraftlaboratoriet, NTNU
Alfred Getz vei 4,
Gløshaugen, Trondheim

www.hydrocen.no

 HydroCen

 @FMEHydroCen