

ANALYSE VAN DE GENMIGRATIE BIJ DE GRONDEL *POMATOSCHISTUS MINUTUS* (PALLAS, 1770) IN DE ZUIDELIJKE NOORDZEE EN WESTERSCHELDE AAN DE HAND VAN MICROSATELLIET MERKERS

Larmuseau Maarten

Laboratorium van Aquatische Ecologie, Departement Biologie, Katholieke Universiteit Leuven
Charles De Bériotstraat 32, 3000 Leuven
E-mail: maartenlarmuseau@hotmail.com

Introductie

Genetische verschillen tussen biologische (sub)populaties zijn voornamelijk het resultaat van mutatie, natuurlijke selectie en genetische drift. Genetische uitwisselingen tussen (sub)populaties (genmigratie) resulteren daarentegen in homogenisatie (het verkrijgen van gelijke allelfrequenties). De balans tussen mutaties, selectie, drift en genmigratie bepaalt bijgevolg de populatiestructuur van een soort. Hieruit volgt dat mag aangenomen worden dat populaties van soorten met een hoge graad van migratie een onderling veel kleiner genetisch verschil zullen vertonen dan populaties van soorten die sedentair zijn. De dispersiemogelijkheid van een soort is dus een belangrijke factor in het bepalen van de genetische populatiestructuur (Grant and Waples, 2000). Bij terrestrische en zoetwater omgevingen zal de dispersie verhinderd worden door fysische barrières zoals rivieren, bergen en woestijnen. Mariene omgevingen daarentegen zijn meer homogeen en kennen veel minder barrières voor migratie (Neigel, 1997). Daar mariene organismen daarenboven een grotere effectieve populatiegrootte en fecunditeit hebben, is het in vergelijking met terrestrische en zoetwaterorganismen moeilijker om een substructuur binnen de populaties te bewaren en voor de onderzoeker om deze populatiestructuur via genotypering vast te stellen (Waples, 1998).

Cowen *et al.* (2000) toonden nochtans aan dat mariene populaties in staat zijn een intraspecifieke structuur te behouden doordat de mariene omgeving meer heterogeniteit vertoont dan verwacht door o.a. bodemtopologie, hydrodynamica, klimaatbarrières, saliniteitsverschillen en stroompatronen die de dispersie van pelagische larven en adulten enigszins zullen beperken.

Palumbi (1994) suggereert naast deze larvale retentie nog vier andere factoren die genetische differentiatie promoten tussen mariene populaties namelijk:

- (1) 'isolatie-door-afstand', waarbij de genetische differentiatie van neutrale loci zal stijgen met de geografische afstand. Dit komt voor bij die soorten die een distributie kennen die groter is dan de individuele dispersiecapaciteit;
- (2) het specifieke gedrag van mariene vissen zoals filopatrie of 'homing' (o.a. door middel van een inwendig kompasmechanisme);
- (3) de historische vicariante omstandigheden die vorming kunnen geven aan natuurlijke barrières op een geologische tijdschaal;
- (4) de selectiedruk van de omgeving die kan leiden tot lokale adaptatie.

Recente populatiegenetische studies op basis van hoog polymorfe merkers en performante statistische analysemethoden wijzen erop dat significante genetische differentiatie tussen geografisch gescheiden populaties eerder de regel zijn dan de uitzondering bij mariene organismen. Sommige soorten blijken zelfs in staat te zijn gestructureerd in populaties voor te komen binnen een schaal die zelfs kleiner is dan hun individuele dispersiepotentieel (Olsen *et al.*, 2004).

Naast spatiële differentiatie kunnen populaties ook verschillen doorheen de tijd door variatie in de genetische samenstelling van de nakomelingen. Deze temporele variatie binnen mariene populaties is het gevolg van zowel een hoog variabel reproductief succes als van grote selectie op larvale populaties (De Innocentiis *et al.*, 2001). De mariene omgeving is immers onvoorspelbaar zodat het succes van de externe fertilisatie en van de postfertilisatiestadia zal afhangen van variabele omstandigheden. Krachtige zeestromingen kunnen eieren en larven van mariene soorten ver weg van de kinderkamerplaatsen of van geschikte zones laten drijven met zeer grote mortaliteit tot gevolg (member-vagrant hypothese; Sinclair, 1988). Dit wordt vaak gecombineerd met hoge predatie, wat de populatiedensiteit sterk kan reduceren. Ook is het volgens de 'match-mismatch' hypothese essentieel voor de overleving van larven dat de omvang van de overlap tussen het voorkomen van de larven en hun voedsel zo groot mogelijk moet zijn (Cushing, 1977). De significante temporele genetische differentiatie wijst dus op het bestaan van stochastische effecten die leiden tot een kleine effectieve populatiegrootte zodat een populatie opgevolgd wordt door een generatie die nakomelingen zijn van een minderheid van de vorige cohorte met belangrijke gevolgen voor adaptatie en evolutie (Hedgecock, 1994). Zo wordt vastgesteld dat in schril contrast met de geringe spatiële populatie genetische subdivisie er toch vaak hoge waarden genoteerd worden voor interannuele differentiatie bij mariene vissen op kleine ruimtelijke schaal (Knutsen *et al.*, 2003).

Doelstelling

Deze studie had als objectief het toetsen of een mariene vissoort, die een hoge dispersiemogelijkheid heeft en leeft in diverse en dynamische omgevingen, een metapopulatiestructuur kan onderhouden. Aansluitend rijst de vraag of deze structuur stabiel is in de tijd.

Door deze analyse was het bovendien mogelijk een inzicht te verwerven in de ruimtelijke rol van estuaria voor juveniele mariene vissen. De interactie tussen estuariene vissen met paaipopulaties in open zee kon immers worden geanalyseerd in een metapopulatieperspectief door de paai-eenheden te identificeren en de migraties tussen deze paaiplaatsen en de 'kinderkamers' vast te stellen.

Deze doelstellingen werden bereikt met behulp van gedetailleerde genotyperingen op basis van polymorfe merkers, microsatellieten genaamd. Zij maken het mogelijk subtiële genetische verschillen tussen subpopulaties op te sporen.

Het zuidelijke deel van de Noordzee (Frans-Belgisch-Nederlandse kustzone) inclusief het Schelde-estuarium fungeerde als studiegebied. Als modelsoort werd gekozen voor de mariene grondel *Pomatoschistus minutus* (Pallas, 1770) (Gobiidae, Teleostei)

(Nederlandse naam: dikkopje), een soort met een hoog potentieel voor dispersie. De keuze wordt gemotiveerd door het feit dat de talrijke ecologische, morfologische en gedragsstudies op het dikkopje een vraagstelling in metapopulatieperspectief mogelijk maken. Daarenboven zijn dikkopjes zeer algemeen voorkomend langs de kust en in de estuaria, en gemakkelijk te bemonsteren. Daar studies omtrent de populatiestructuur van mariene organismen in de zuidelijke Noordzee vooral gericht zijn op commercieel geëxploiteerde, sterk migrerende dieren, wordt een studie naar een commercieel onbelangrijk organisme als een meerwaarde beschouwd.

Werkwijze

Stalen van dikkopjes werden verzameld op zes plaatsen langs de Frans-Belgische-Nederlandse kust, inclusief het Schelde-estuarium tijdens de lente en herfst in 2004. Dit werd gerealiseerd door staalnamecompagnies via het oceanografisch onderzoeksschip de 'Zeeleeuw' en de kerncentrale van Doel. Na determinatie en meting van morfologische kenmerken werd het DNA geëxtraheerd en gegenotypeerd met zeven verschillende oude en -voor deze studie- nieuwe ontwikkelde microsatelliet loci. Na beeldanalyse en data-analyse verwezenlijkt door verschillende performante statistische programma's (o.a. Genetix, Spagedi, Structure, GeneClass,...) werden volgende resultaten verkregen.

Resultaten and Discussie

De resultaten tonen een hoge genmigratie aan, een lage genetische differentiatie tussen populaties maar wel een hoge graad van genetische variatie binnen populaties bij *Pomatoschistus minutus*. Dit is algemeen waarneembaar bij mariene Teleostei met een langdurige larvale fase (DeWoody and Avise, 2000).

Spatiele differentiatie

De resultaten leiden ons tot het verwerpen van de nulhypothese dat er geen genetische spatiele differentiatie bestaat tussen populaties van dikkopjes in de zuidelijke Noordzee. Het bewijs voor niet-panmixie werd verkregen daar deze studie zeer zwakke, maar significante genetische verschillen vond tussen de stalen. De waarde van differentiatie tussen populaties (F_{ST} -waarde = 0,009) is gelijkaardig aan deze gerapporteerd voor andere mariene vissoorten met een groot potentieel voor genmigratie (Waples, 1998).

Niet-willekeurige processen die diffusie beperken zoals larvale retentie, selectieve migratie, geografische structuur en 'homing' gedrag, komen aldus in voldoende mate voor bij *Pomatoschistus minutus* in de zuidelijke Noordzee opdat populatie-onderverdeling zich voordoet. De populatiestructuur is wellicht vrij jong, daar geen differentiatie werd teruggevonden op het niveau van allozymes (e.g. Gysels *et al.*, 2003). Microsatellietmarkers hebben een grotere mutatiesnelheid en detecteren bijgevolg een jongere en fijnschaligere populatiestructuur (Ruzzante *et al.*, 1996). Toch moet rekening gehouden worden dat ondanks de significantie van de resultaten deze eveneens kan worden verklaard door de technische en analytische nadelen die een analyse met microsatellieten met zich mee kunnen brengen (Waples, 1998). De resultaten kunnen echter wel gevalideerd worden door de waargenomen tendens voor

een correlatie tussen geografische afstanden en populatie genetische afstanden (isolatie-door-afstand). Men kan bijgevolg stellen dat *P. minutus* in de zuidelijke Noordzee uit meerdere subpopulaties bestaat waartussen zich een hoge graad aan genmigratie voordoet gedomineerd door dispersie tijdens de pelagische fase.

Intra-annuele differentiatie

De differentiatie tussen populaties van *Pomatoschistus minutus* is groter in de lente (paaiperiode) dan in de herfst (de F_{ST} -waarden zijn dubbel zo groot tussen lentepopulaties onderling dan tussen herfstpopulaties onderling). Dit geeft een aanduiding dat buiten het paaiseizoen grondels zich in meer gemengde stock ophouden. Buiten het paaiseizoen verplaatsen de grondels zich vermoedelijk naar de voedingsgronden, die verschillend zijn van de plaatsen waar ze paaien. Genetisch komen dan minder duidelijk afgescheiden populaties voor maar eerder een mengeling van individuen uit verschillende populaties (Nesbø *et al.*, 2000). Dit toont het cruciale belang aan van een staalnamestrategie. Ook moet men rekening houden met het feit dat in deze studie mogelijks de lentestalen buiten de paaiperiode genomen zijn en dat bijgevolg de gevonden differentiatie tussen de populaties wordt onderschat.

Inter-annuele differentiatie

Door de gegevens van de studie van Pampoulie *et al.* (2004) samen te analyseren met de data van deze thesis, werd interannuele temporele variatie waargenomen. Zo zijn populaties van dikkopjes uit 2004 genetisch sterk verschillend met deze van 2000 en 2001. De variatie wordt toegeschreven aan de grote variantie in reproductief succes zodat er een groot verschil ontstaat tussen de geobserveerde en de effectieve populatiegrootte (Neigel, 1997). Deze thesis heeft bijgevolg het onderzoek naar de populatiestructuur van *P. minutus* verrijkt door differentiatie waar te nemen binnen en tussen populaties en deze niet enkel toe te wijzen aan spatiële differentiatie.

De genetische populatiestructuur

Uitgaande van deze studie kan men stellen dat *Pomatoschistus minutus* in de zuidelijke Noordzee bestaat uit meerdere subpopulaties waartussen zich hoge mate van genmigratie voordoet ('patchy' metapopulaties; Smedbol *et al.*, 2002). De aanwijzingen voor interannuele temporele instabiliteit, een trend naar isolatie-door-afstand en een hoge graad van genmigratie zijn in tegenstelling met de kenmerken van de 'Member-Vagrant' hypothese (Sinclair, 1988) maar zijn eerder gelijkaardig aan die van de "Adopted-Migrant"-hypothese (=de 'geadopteerde migrant'-hypothese) gesuggereerd door McQuinn (1997) voor haring metapopulaties. De studie argumenteert hier m.a.w. dat het 'Adopted-migrant'-model met een hoge graad aan uitwisseling tussen naburige populaties een realistische hypothese is om de huidige en vroegere resultaten omtrent de genetische populatiestructuur van het dikkopje in de zuidelijke Noordzee te beschrijven (Planes *et al.*, 1996).

Relatie met Westerschelde

Er werden, zoals verwacht, genetische aanwijzingen gevonden voor een kinderkamerfunctie van de Westerschelde voor het dikkopje tijdens de herfst. Een

seizoenale successie was immers reeds waargenomen in de soortssamenstelling van het Schelde-estuarium, waarbij tijdens de zomer en de herfst juveniele *Pomatoschistus* sp. en *Sygnathus rostellatus* de visgemeenschap domineren (Maes, 2000). Opvallend is dat de resultaten van deze studie aantoonen dat juveniele grondels van populaties zowel ter hoogte van de Oosterschelde als ten zuiden van de Scheldemonding in de herfst naar de Westerschelde trekken ondanks het feit dat de waterstroom in de zuidelijke Noordzee stroomt van zuid naar noord.

Verrassend is het unieke lentestaal genomen in de Schelde, dat duidelijk genetisch verschillend is van de stalen uit de mariene populaties. Redelijkerwijs zouden grondels niet paaien in de Wester- of Zeeschelde omwille van de grote turbulentie. De voorspelling was alvorens dat de grondels die werden gevonden in Doel tijdens de lente, dikkopjes zouden zijn die toevallig in de Schelde waren gebleven en na de herfst niet waren teruggekeerd naar de Noordzee. Dit werd echter niet teruggevonden in de resultaten. Verder genetisch onderzoek, samen met onder meer isotopen en otolietenonderzoek, moet in staat zijn om te bevestigen of er sprake is van een residente populatie in de Westerschelde. Voorlopig zijn er geen voorbeelden of aanwijzingen van residente populaties van mariene soorten in de Westerschelde.

Conclusie

Deze thesis heeft nieuwe inzichten gebracht in de populatiestructuur van *Pomatoschistus minutus* in de zuidelijke Noordzee. Er zijn aanwijzingen dat dikkopjes in verschillende subpopulaties voorkomen die zowel spatiële als (inter- en intra-annuele) temporele differentiatie vertonen. Er werden, zoals verwacht, aanwijzingen gevonden voor een kinderkamerfunctie van de Westerschelde voor dikkopjes van populaties van zowel ten noorden als ten zuiden van de Scheldemonding. Toch vertoonde het staal genomen in Doel tijdens de lente een apart status; verder onderzoek zal uitwijzen of er sprake is van een residente populatie in het Schelde-estuarium.

Alhoewel de microsatelliet analyse bewijzen vond voor een kleinschalige populatiestructuur, blijft het patroon moeilijk te interpreteren. Verder onderzoek op basis van een betere staalnamestrategie, complementaire genetische merkers, fenotypische informatie en onderzoek naar de mogelijkheid van lokale adaptatie, is daarom noodzakelijk voor het onderzoek naar de populatiestructuur en naar de functionele rol van de Westerschelde voor het dikkopje in de zuidelijke Noordzee.

Referenties

- Chakraborty R. and O. Leimar. 1987. Genetic variation within a subdivided population. p.89-120. In: Population Genetics and Fishery Management. Ryman N. and F. Utter (Eds). Washington Sea Grant Program.
- Cowen R.C., M. Kamazima, M. Lwiza, S. Sponaugle, C.B. Paris and D.B. Olson. 2000. Connectivity of marine populations: open or closed? Science 287:857-859.
- Cushing D.H. 1977. Science and the fisheries. The Camelot Press Ltd, Southampton. 58p.

- De Innocentiis S., L. Sola, S. Cataudella and P. Bentzen. 2001. Allozyme and microsatellite loci provide discordant estimates of population differentiation in the endangered dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) within the Mediterranean Sea. *Molecular Biology* 10:2163-2175.
- DeWoody J.A. and J.C. Avise. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* 56:461-473.
- Grant W.S. and R.S. Waples. 2000. Spatial and temporal variability in genetics. p.61-93. In: *Fisheries oceanography, an integrative approach to fisheries ecology and management*. Harrison P.J. and T.R. Parsons (Eds). Blackwell Science.
- Gysels E. 2003. Genetic structure and evolutionary patterns of *Pomatoschistus gobies* in the European continental shelf and in the Mediterranean Sea. PhD, Katholieke Universiteit Leuven. 306p.
- Hedgcock D. 1994. Does variance in reproductive success limit effective population size of marine organisms? p.122-134. In: *Genetics and evolution of aquatic organisms*. Beaumont A.R. (Ed.). Chapman and Hall.
- Knutsen H., P.E. Jorde, C. André and N.C. Stenseth. 2003. Fine-scaled geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod. *Molecular Ecology* 12:385-394.
- Maes J. 2000. The structure of the fish community of the Zeeschelde Estuary. PhD. Katholieke Universiteit Leuven. 143p.
- McQuinn I.H. 1997. Metapopulations and the Atlantic herring. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7:297-329.
- Neigel J.E. 1997. Population genetics and demography of marine species. p.274-292. In: *Marine biodiversity: patterns and processes*. Ormond R.F.G., J.D. Gage and M.V. Angel (Eds). Cambridge University Press.
- Nesbø C.L., E.K. Rueness and S.A. Iversen. 2000. Phylogeography and population history of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.): a genealogical approach reveals genetic structuring among the eastern Atlantic stocks. *Proceedings of the Royal Society of London, Series b, Biological Sciences* 267:281-292.
- Olsen E.M., H. Knutsen, J. Gjøsæter, P.E. Jorde, J.A. Knutsen and N.C. Stenseth. 2004. Life-history variation among local populations of Atlantic cod from the Norwegian Skagerrak coast. *Journal of Fish Biology* 64:1725-1730.
- Palumbi S.R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25:547-572.
- Pampoulie C., E.S. Gysels, G.E. Maes, B. Hellemans, V. Leentjes, A.G. Jones and F.A.M. Volckaert. 2004. Evidence for fine-scale genetic structure and estuarine colonisation in a potential high gene flow marine goby (*Pomatoschistus minutus*). *Heredity* 5:1-12.
- Planes S., R. Galzin and F. Bonhomme. 1996. A genetic metapopulation model for reef fishes in oceanic island: the case of the surgeonfish, *Acanthurus triostegus*. *Journal of Evolutionary Biology* 9:103-117.
- Ruzzante D.E., C.T. Taggart, D. Cook and S. Goddard. 1996. Genetic differentiation between inshore and offshore Atlantic cod (*Gadus morhua*) off Newfoundland: microsatellite DNA variation and antifreeze level. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53:634-645.
- Sinclair M. 1988. *Marine populations: an essay on population regulation and speciation*. University of Washington Press Seattle and London. 252p.

- Smedbol R.K., A. McPherson, M.M. Hansen and E. Kenchington. 2002. Myths and moderation in marine 'metapopulations'? *Fish and Fisheries* 3:20-35.
- Waples R.S. 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity* 98:438-450.