

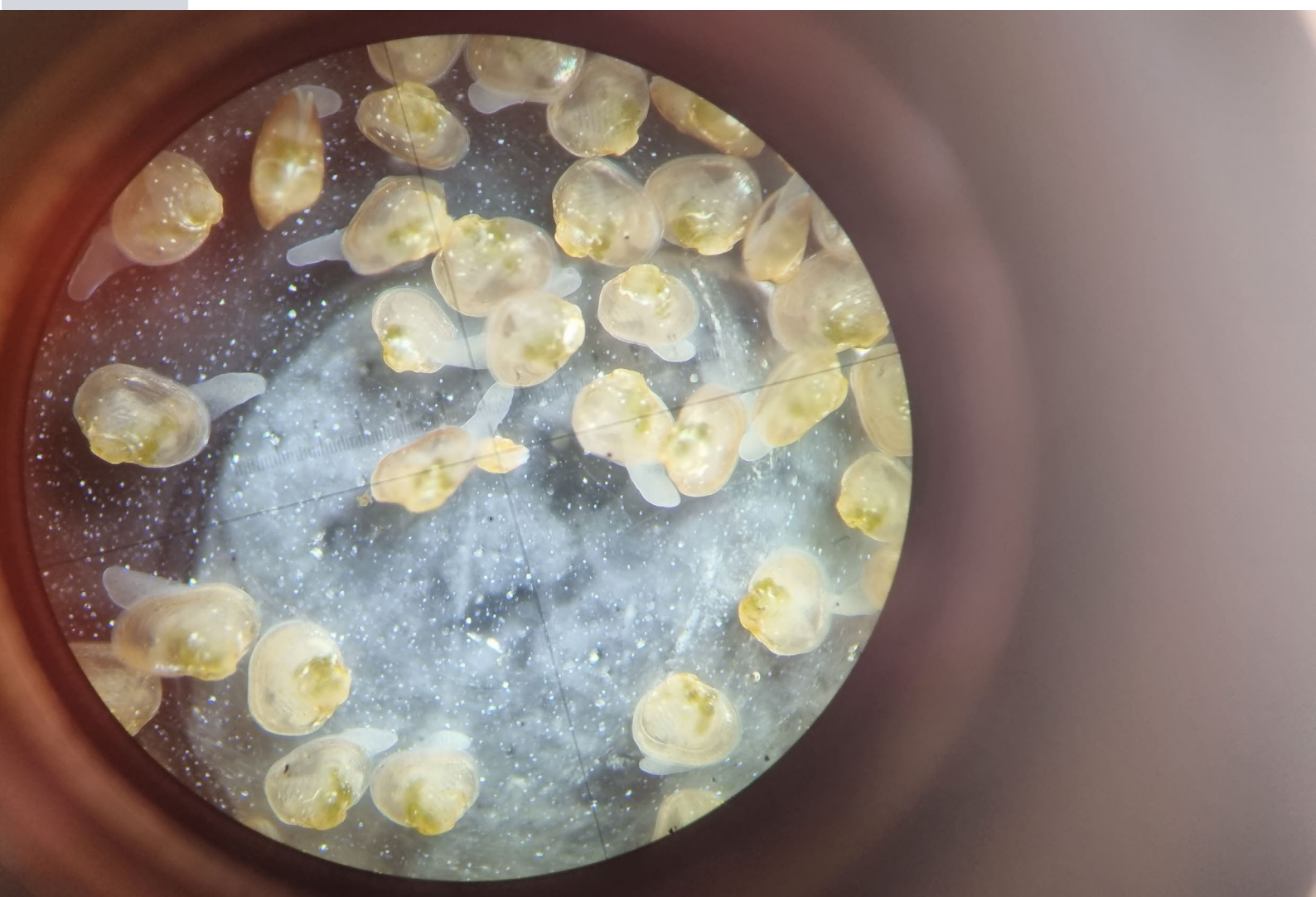
2219

NINA Rapport

Genetisk overvåkning av anleggsprodusert elvemusling

Infestasjoner 2020

Sebastian Wacker
Sten Karlsson



NINAs publikasjoner

NINA Rapport

Dette er NINAs ordinære rapportering til oppdragsgiver etter gjennomført forsknings-, overvåkings- eller utredningsarbeid. I tillegg vil serien favne mye av instituttets øvrige rapportering, for eksempel fra seminarer og konferanser, resultater av eget forsknings- og utredningsarbeid og litteraturstudier. NINA Rapport kan også utgis på engelsk, som NINA Report.

NINA Temahefte

Heftene utarbeides etter behov og serien favner svært vidt; fra systematiske bestemmelsesnøkler til informasjon om viktige problemstillinger i samfunnet. Heftene har vanligvis en populærvitenskapelig form med vekt på illustrasjoner. NINA Temahefte kan også utgis på engelsk, som NINA Special Report.

NINA Fakta

Faktaarkene har som mål å gjøre NINAs forskningsresultater raskt og enkelt tilgjengelig for et større publikum. Faktaarkene gir en kort framstilling av noen av våre viktigste forskningstema.

Annen publisering

I tillegg til rapporteringen i NINAs egne serier publiserer instituttets ansatte en stor del av sine forskningsresultater i internasjonale vitenskapelige journaler og i populærfaglige bøker og tidsskrifter.

Genetisk overvåkning av anleggsprodusert elvemusling

Infestasjoner 2020

Sebastian Wacker
Sten Karlsson

Wacker, S. og Karlsson, S. 2023. Genetisk overvåkning av anleggsprodusert elvemusling. Infestasjoner 2020. NINA Rapport 2219. Norsk institutt for naturforskning.

Trondheim, januar 2023

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-5014-6

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

Åpen

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

KVALITETSSIKRET AV

Jon H. Magerøy

ANSVARLIG SIGNATUR

Forskningsjef Ingeborg Palm Helland (sign.)

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Miljødirektoratet

OPPDRAGSGIVERS REFERANSE

M-2417|2022

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Sara Brækhus Zambon

FORSIDEBILDE

Små elvemuslinger produsert på anlegget på Austevoll, Katrine
Åmdal Sundt, UiB©

NØKKEWORD

- Norge
- Elvemusling
- Margaritifera margaritifera
- Overvåking
- Kultivering
- Ferskvann
- Trua arter
- Genetikk
- Genetisk variasjon

KEY WORDS

- Norway
- Freshwater pearl mussel
- Margaritifera margaritifera
- Monitoring
- Stocking
- Freshwater
- Threatened species
- Genetics
- Genetic variation

KONTAKTOPPLYSNINGER

NINA hovedkontor
Postboks 5685 Torgarden
7485 Trondheim
Tlf: 73 80 14 00

NINA Oslo
Sognsveien 68
0855 Oslo
Tlf: 73 80 14 00

NINA Tromsø
Postboks 6606 Langnes
9296 Tromsø
Tlf: 77 75 04 00

NINA Lillehammer
Vormstuguvegen 40
2624 Lillehammer
Tlf: 73 80 14 00

NINA Bergen
Thormøhlens gate 55
5006 Bergen
Tlf: 73 80 14 00

www.nina.no

Sammendrag

Wacker, S. og Karlsson, S. 2023. Genetisk overvåkning av anleggsprodusert elvemusling. Infestasjoner 2020. NINA Rapport 2219. Norsk institutt for naturforskning.

Elvemusling er oppført som «sårbar» på Norsk Rødliste og en betydelig andel av bestandene mangler rekruttering i nyere tid. For å sikre disse bestandene mot utryddelse ble det etablert et kultiveringsanlegg for elvemusling i Austevoll. I denne rapporten har vi undersøkt genetisk variasjon og genetisk integritet i anleggsprodusert elvemusling fra infestasjoner 2020. At genetisk variasjon og genetisk integritet blir ivaretatt i kultivering er av stor betydning for bestandenes overlevelse, tilpasningsevne og opprettholdelse av den lokale genetiske tilpasningen.

Vi vurderte genetisk variasjon og genetisk integritet for anleggsprodusert elvemusling fra fem bestander. For tre av disse bestandene (Etna, Svankilelva og Vollaelva), ble småmuslingene produsert ved innsamling av gravide muslinger etter befruktning i elva. Denne metoden er foretrukket fordi det forventes bidrag fra et stort antall fedre ved befruktning i elva og dermed redusert tap av genetisk variasjon hos småmuslingene sammenlignet med befruktning i anlegg med et begrenset antall stammuslinger. For de andre to bestandene (Haukåselva og Lyngstadelva), ble småmuslingene produsert ved befruktning i anlegget.

Det er ønskelig at genetisk tilstand til anleggsprodusert elvemusling klassifiseres ved et trafikklssystem som tar utgangspunkt i grenseverdier for tap av genetisk variasjon og genetisk integritet. I denne rapporten bruker vi grenseverdier foreslått av miljødirektoratet for klassifisering av anleggsprodusert elvemusling, men vi foreslår at disse grenseverdien kan revurderes etter hvert som flere produksjonsår blir vurdert og det foreligger et større og bedre datagrunnlag.

Genetisk integritet på gruppenivå ble ivaretatt for alle bestandene (F_{ST} mellom stammuslinger og småmuslinger $< 0,05$). Genetisk integritet på individnivå ble ivaretatt for alle bestandene med unntak av én småmusling fra Svankilelva som ble funnet blant småmuslingene fra Haukåselva. Det kan ikke utelukkes at tilordningen skyldes en feil ved prøvetaking eller merking av prøven. Innvirkningen på bestanden fra Haukåselva vurderes som lav, siden andelen av småmuslinger fra feil bestand var lav (0,5 %). Graden av innavl var ikke høyere i småmuslingene sammenliknet med stammuslingene og voksenmuslingene for noen av bestandene.

Av de tre bestandene som ble produsert ved innsamling av gravide muslinger, ble to klassifisert som grønn og én som gul. Alle disse bestandene var ørretmuslingbestander med lav genetisk variasjon. Tap av genetisk variasjon fra bestanden til småmuslingene var under 10 % for Etna og Vollaelva og produksjonen ble klassifisert som grønn. For Svankilelva ble 16 % av genetisk variasjon målt som allelrikdom tapt fra bestanden til småmuslingene og produksjonen ble klassifisert som gul. Tap av genetisk variasjon for Svankilelva kan skyldes et lavt antall mødre som bidro til småmuslingene og/eller få fedre som befruktet eggene til hver mor. Dette kunne ikke undersøkes videre, fordi prøver for genetisk undersøkelse av stammuslingene manglet.

Begge de to bestandene som ble produsert ved befruktning i anlegget ble klassifisert som gul. Bestanden i Lyngstadelva er en laksemuslingbestand, mens bestanden i Haukåselva er en ørretmuslingbestand, men begge har høy genetisk variasjon. Tap av genetisk variasjon fra bestanden til småmuslingene, målt som allelrikdom, ble estimert som 12% for Haukåselva og 9% for Lyngstadelva. Resultatene viser dog at tapet av genetisk variasjon ble underestimert for Lyngstadelva og kan forventes å være større enn 10%. Slektskapsanalyse viser at henholdsvis 31 og 42 foreldre hadde bidratt til småmuslingene fra Haukåselva og Lyngstadelva og at bidraget var skeivt fordelt mellom foreldrene. Dette resulterte i et effektivt antall gytere på henholdsvis 19 og 21 individer, som forklarer det betydelige tapet av genetisk variasjon.

Sebastian Wacker (sebastian.wacker@nina.no) og Sten Karlsson (sten.karlsson@nina.no)
Norsk institutt for naturforskning, Høgskoleringen 9, 7030 Trondheim.

Innhold

Sammendrag	3
Innhold	4
Forord	5
1 Innledning	6
2 Metoder	7
2.1 Prøver.....	7
2.2 Genotyping.....	7
2.3 Statistisk analyse.....	7
3 Resultater	9
3.1 Genotyping.....	9
3.2 Genetisk variasjon i stammusling.....	9
3.3 Genetisk variasjon i småmusling.....	10
3.4 Effektivt antall stammuslinger.....	11
3.5 Genetisk integritet.....	13
4 Diskusjon	16
4.1 Klassifiseringssystemet.....	16
4.2 Klassifisering av produksjonen fra infestering 2020.....	17
4.3 Betydning for forvaltning.....	20
5 Referanser	21
6 Vedlegg	23

Forord

Elvemusling (*Margaritifera margaritifera*) er listet som sårbar i norsk rødliste og som «endangered» i IUCN-rød list. En stor andel av de gjenlevende bestandene finnes i Norge, men en stor andel av disse bestandene mangler eller har dårlig rekruttering. I 2011 ble det etablert et kultiveringsanlegg for elvemusling på Austevoll, som driftes av Universitetet i Bergen på oppdrag av Miljødirektoratet. Basert på mange år med utvikling av metodikk for å avle opp elvemusling på anlegget og forskningsprosjekter for å forstå elvemuslingens parringssystem, har man i handlingsplanen for elvemusling (2019-2028) som mål å produsere avkom for utsetninger fra fem bestander hvert år. For å ivareta så mye som mulig av den eksisterende genetiske bredden i bestandene, skal det tas inn 60 stammuslinger fra hver bestand som er naturlig befruktet i vassdraget.

For å sikre at mest mulig av den genetiske variasjonen og integriteten til de ulike bestandene av elvemusling blir ivaretatt ved utsetninger, ønsker Miljødirektoratet at hver produksjon av småmuslinger blir analysert genetisk. I 2022 leverte NINA et tilbud på en anbudskonkurranse fra Miljødirektoratet om genetisk overvåkning av anleggsprodusert avkom av elvemusling, med en varighet på fire år med opsjon om ett pluss ett års forlengelse av oppdraget. NINA fikk dette oppdraget. Oppdraget går ut på å vurdere i hvilken grad de anleggsproduserte småmuslingene ivaretar bestandens genetiske integritet og genetiske variasjon, med en ambisjon om at det blir utarbeidet fungerende grenseverdier for dette.

Vi takker Miljødirektoratet for oppdraget, Katrine Åmdal Sundt ved kultiveringsanlegget på Austevoll, UiB for ett godt samarbeid og innsamling av DNA prøver, Martin Hanssen (Midtnorsk Naturundersøkelse) og Jon Magerøy (NINA) for innsamling av DNA prøver fra Etna, Svankilelva og Vollaelva, og ingeniørene ved NINAs genetiske laboratorium (NINAGEN) for DNA ekstraksjon og genotyping.

5 januar 2023, Sten Karlsson

1 Innledning

Elvemusling har forsvunnet fra ca. én tredjedel av de historiske lokalitetene, og en betydelig andel av de gjenværende bestandene mangler helt eller delvis rekruttering. For å fremme overlevelse av disse bestandene inntil miljøforholdene forbedrer seg ble det etablert et kultiveringsanlegg for elvemusling i Austevoll. Hvert år blir stammuslinger fra fem utvalgte bestander innsamlet for å produsere småmuslinger til utsetting i opphavselvene.

Et viktig mål for kultiveringsarbeidet er å sikre en videre rekruttering av bestandene samtidig som det også skal ivareta bestandenes genetiske variasjon og integritet. Genetisk variasjon er av stor betydning for enhver bestands overlevelse og tilpasningsevne (Reed & Frankham 2003, Frankham 2005, Hoffmann mfl. 2017). Når miljøforholdene endrer seg er overlevelsen av bestanden avhengig av genetisk variasjon som tillater en evolusjonær tilpasning. Det er store forskjeller i genetisk variasjon mellom elvemuslingbestander i Norge. Laksemuslingbestander har alltid stor genetisk variasjon, mens ørretmuslingbestander varierer fra nesten ingen genetisk variasjon til stor genetisk variasjon (Karlsson mfl. 2014, Wacker mfl. 2021). Det er ukjent i hvilken grad tapt genetisk variasjon påvirker overlevelsen av elvemuslingbestander på kort og lang sikt, men undersøkelse av genetisk variasjon i forhold til økologisk tilstand har vist at elvemuslingbestander med lav genetisk variasjon og høy grad av innavl har større sannsynlighet for å mangle rekruttering (Wacker mfl. 2021). Målet i kultivering er derfor å ivareta så mye som mulig av den genetiske variasjonen som finnes i bestanden.

Tidligere genetiske undersøkelser av stammuslinger og avkom i kultiveringsanlegget har vist at man kan sikre en høy grad av genetisk variasjon ved å samle inn gravide stammuslinger som blitt befruktet i elva. Dette sikrer en betydelig høyere grad av genetisk variasjon i avkommet sammenliknet med om befruktning skjer mellom et begrenset antall stammuslinger i anlegget (Wacker mfl. 2019). Hvor mye av den genetiske variasjonen som blir ivaretatt i avkommet vil være påvirket av antall gravide hunner som bidrar til produksjonen, i hvilken grad bidraget varierer mellom hunnene og hvor mange hanner som bidrar til produksjon gjennom befruktning av hunnmuslinger i elva. Det er derfor viktig å undersøke hver enkelt produksjon av elvemusling ved kultiveringsanlegget. Dette vil gi et viktig grunnlag for å vurdere kvaliteten av det som settes ut i elva.

Elvemuslingbestander i Norge har en tydelig genetisk struktur, med differensiering mellom ørret- og laksemusling og genetiske forskjeller mellom de ulike ørretmuslingbestandene (Karlsson mfl. 2014, Wacker mfl. 2021). Forvaltningen av elvemusling gjøres derfor på bestandsnivå, og bestandene blir kultivert hver for seg. En blanding av bestandene i kultivering vil kunne bryte ned genetiske tilpasninger til de lokale miljøforholdene hos de enkelte bestandene. Dette gjelder spesielt ørretmuslingbestander, som vanligvis er reproduktivt isolerte ovenfor vandringshindre for anadrom fisk og som derfor ikke har genetisk utveksling med andre bestander. Det er derfor også viktig å undersøke om den genetiske integriteten av bestandene blir ivaretatt i kultivering av elvemusling.

I denne rapporten undersøker vi genetisk variasjon og genetisk integritet i småmuslinger fra fem bestander som ble produsert med infestering i 2020: Etna (Innlandet), Haukåselva (Vestland), Lyngstadelva (Møre og Romsdal), Svankilelva (Trøndelag) og Vollaelva (Trøndelag). På grunnlag av resultatene diskuterer vi mulige grenseverdier og hva disse kan bety for den endelige effekten av kultiveringen på bestandene på lang sikt.

2 Metoder

2.1 Prøver

Prøver av småmuslinger, som ble produsert ved infestering i 2020, ble tatt mellom 13. juni og 23. juni 2022. Det ble innsamlet 200 småmuslinger fra hver bestand. Småmuslingene ble fiksert på sprit. Prøver av stammuslinger fra Haukåselva og Lyngstadelva ble tatt henholdsvis 7. juni og 10. mai 2022. Stammuslingene fra Etna, Svankilelva og Vollaelva ble tilbakeført elvene uten at det tatt prøver for genetisk analyse. For å sammenlikne genetisk variasjon mellom bestandene og småmuslingene produsert i anlegget, ble det isteden samlet inn nye prøver av 60 voksne muslinger fra Etna, Svankilelva og Vollaelva. Prøvene ble samlet inn 23.-24. juni 2022. Prøver av voksenmuslinger ble tatt ved å stryke på overflaten av de indre bløtdelene (fot og kappe) med en bomullspinne (Q-tip) (Karlsson & Larsen 2013, Karlsson mfl. 2013) og overført til en bufferløsning for lagring. Etter prøvetaking ble muslingene tilbakeført til elva.

I denne rapporten bruker vi begrepet «stammusling» for voksenmuslingene som ble tatt inn i anlegget for produksjon av småmuslinger. For bestander med befruktning i anlegget (Haukåselva og Lyngstadelva), utgjør stammuslingene alle mulige foreldre til småmuslingene. For bestander med befruktning i elva (foretrukket metode for kultivering ved kultiveringsanlegget), finnes alle mødrene blant stammuslingene, mens ingen eller få fedre forventes å være blant stammuslingene. For bestandene med befruktning i elva, er begrepet «stammusling» altså noe misledende da det også inkluderer hannmuslinger i elva. Estimerer av effektivt antall stammuslinger omfatter både innsamlede mødre og fedre, som står igjen i elva.

2.2 Genotyping

DNA ble ekstrahert som beskrevet av Karlsson og Larsen (2013), ved bruk av Dneasy tissue kit fra Qiagen. NINA har i mange studier genotypet åtte mikrosatellitter fordelt på to PCR-multiplexer som beskrevet av Karlsson & Larsen (2013) og Karlsson mfl. (2013). To av mikrosatellittene har imidlertid vist signifikante avvik fra Hardy-Weinberg likevekt, som sannsynligvis tilskrives usikker genotyping. Disse har derfor ikke blitt inkludert i de videre analysene. De seks resterende mikrosatellittene har imidlertid blitt brukt i mange studier, og i genetisk tilordning av elvemusling til vertsart. Karlsson mfl. (2016) beskriver utviklingen av et nytt mikrosatellitt-assay, der man beholdt seks av de åtte opprinnelige markørene. Man inkluderte også ni nye markører fra primersekvenser fra Geist mfl. (2003) og Garlie (2010), fordelt i to ulike PCR-multiplexer. I denne analysen ble muslingene undersøkt med hensyn til det nye markørsettet på 15 mikrosatellitter.

2.3 Statistisk analyse

Genetisk variasjon innenfor bestandene ble undersøkt i form av heterozygositet (forventet og observert andel heterozygote individer for hver enkelt markør) og allelrikdom (antall forskjellige alleler uavhengig av antall prøver). Allelrikdom og innavl ble beregnet ved hjelp av R-pakken *hierfstat* (Goudet 2005) og observert heterozygositet ble beregnet ved hjelp av R-pakken *adegenet* (Jombart 2008). Forventet antall alleler ved ulik utvalgsstørrelse ble undersøkt ved bruk av funksjonen *jackmsatpop*, i R pakken *diveRsity* (Keenan mfl. 2013).

Genetisk differensiering mellom bestander ble undersøkt i form av parvise genetiske forskjeller (genetisk forskjell mellom to bestander) mellom alle de undersøkte elvemuslingbestandene (parvis genetisk distanse). Parvis genetisk distanse F_{ST} ble beregnet i R-pakken *mmod* (Winter 2012). Konfidensintervaller for parvis genetisk distanse F_{ST} ble beregnet ved bruk av bootstrap (1000 permutasjoner) i R-pakken *diveRsity* (Keenan mfl. 2013).

Genetisk integritet på individnivå ble undersøkt ved bruk av «discriminant analysis of principal components» (DAPC) (Jombart mfl. 2010). Metoden maksimerer genetisk variasjon mellom

grupper (bestander) og minimerer genetisk variasjon innenfor grupper. Metoden er godt egnet for genetisk tilordning av enkeltindivider til bestander.

Vi undersøkte slektskapet blant småmuslingene og tilordnet småmuslingene til foreldre for Haukåselva og Lyngstadelva. Småmuslingene i begge bestandene ble produsert ved befruktning i anlegget og genotyper til alle foreldre var derfor i utgangspunkt tilgjengelig. Det var dog betydelig dødelighet blant stammuslingene fra begge bestandene, fra befruktning til prøveinnsamling. Det ble ikke tatt prøver av stammuslinger som døde, og antallet døde stammuslinger er også ukjent.

Effektivt antall stammuslinger og slektskap mellom småmuslinger og voksenmuslinger ble undersøkt i programmet COLONY (Jones & Wang 2010). Undersøkelsen ble gjort for Haukåselva og Lyngstadelva. Disse to bestandene hadde størst genetisk variasjon, og det fantes genotyper av de fleste foreldrene, fordi befruktning skjedde i anlegget. Programmet COLONY estimerer effektivt antall stammuslinger utfra andelen halv- og helsøsken blant alle parvise sammenlikninger mellom småmuslinger. For hver mulig kombinasjon av to småmuslinger (parvis sammenlikning), blir slektskap estimert som ubeslektet, halvsøsken eller helsøsken (parvis slektskap). 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, med «sibship scaling» og uten «sibship prior». Andel genotypefeil ble satt til 0,01, som er et konservativt høyt estimat. Sannsynlighet for at foreldrene var blant genotypene ble satt til 0,9 basert på en ukjent andel stammusling som vi ikke hadde prøver av.

Effekten av feilestimering av slektskap i COLONY, avhengig av antall prøver, ble estimert ved gjentatt tilfeldig utvelging av prøver og re-analyse i COLONY. Variasjon og bias i estimatet ble påvirket av både utvalget av individene og analysen i COLONY. Gjentatt tilfeldig utvelging av genotyper og inputfiler til COLONY, ble gjennomført ved bruk av et R-skript beskrevet i Ackerman mfl. (2017). Tjuefem, femti og syttifem prosent av prøvene ble prøvetatt og hver prøvetaking ble repetert fire ganger.

Feilestimering av slektskap i COLONY ble også undersøkt ved bruk av simulerte genotyper. For å kunne sammenlikne rekonstruert med kjent slektskap, simulerte vi genotyper til småmuslinger og voksenmuslinger med kjent slektskap og analyserte disse genotypene i COLONY. Genotyper ble simulert utfra observert slektskap (halv- og helsøsken, foreldre-avkom) blant muslinger fra Haukåselva og Lyngstadelva. Genotypene ble simulert og analysert i simuleringsmodus i COLONY, ved bruk av 15 mikrosatellitt-markører. Observerte allelfrekvenser ble brukt i simuleringene. Slektskap rekonstruert i COLONY ble sammenliknet med de kjente (simulerte) slektskapsforholdene.

3 Resultater

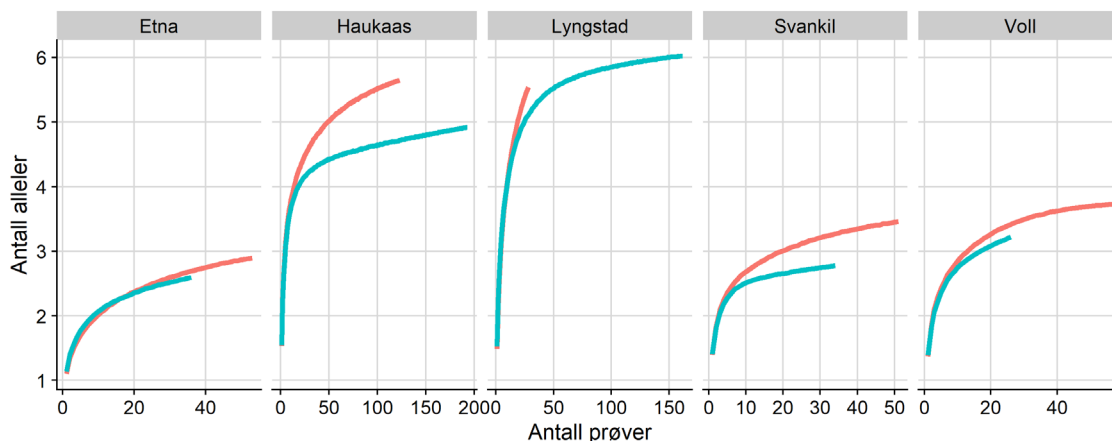
3.1 Genotyping

Genotypingen ble mislykket ved flere enn fire av de 15 markørene for 12 voksenmuslinger og for 11 småmuslinger. Disse ble ekskludert fra videre analyser.

3.2 Genetisk variasjon i stammusling

Vi undersøkte til hvilken grad den genetiske variasjonen som finnes i bestandene var representert i voksenmuslingene, ved å undersøke hvor mange ulike alleler (genvarianter) per markør som fantes med økende stikkprøvestørrelser. En utflatende kurve i disse undersøkelsene indikerer at de innsamlede muslingene reflekterer den genetiske variasjonen i bestanden. Denne undersøkelsen er spesielt relevant for Haukåselva og Lyngstadelva, der stammuslingene utgjorde alle potensielle foreldre. For de andre bestandene, der befruktning skjedde i elva, forventes det at et stort antall fedre bidro til småmuslingene. For Etna, Svankilelva og Vollaelva forventes derfor at det totalt blant avkommet ville være flere alleler representert enn påvist i undersøkelsen av voksenmuslinger.

Resultatene tyder på at den genetiske variasjonen som foreligger i bestandene i Haukåselva og Lyngstadelva bare delvis ble dekket av stammuslingene (**figur 1**). Disse bestandene har stor genetisk variasjon, og antallet påviste alleler økte kraftig opp til det undersøkte antallet individer (**figur 1**). Dette var også tilfelle når tidligere genotypete voksenmuslinger ble undersøkt sammen med stammuslingene fra Haukåselva. Antallet alleler flatet i større grad ut for Etna, Svankilelva og Vollaelva, men viste også i disse bestandene en svak økning helt opp til det undersøkte antallet individer (**figur 1**). Dette skyldes alleler med lav frekvens, som forelå i bare noen få av de genotypete individene. Det kan dog forventes at et betydelig antall fedre bidro til småmuslingene og at det totale antallet alleler representert i avkommet dermed var høyere enn påvist i de undersøkte voksenmuslingene.



Figur 1. Gjennomsnittlig antall alleler ved 15 mikrosatellitt-markører i voksenmuslinger (røde linjer) og småmuslinger (grønne linjer) fra Etna, Haukåselva, Lyngstadelva, Svankilelva og Vollaelva. Hvert antall prøver ble tilfeldig trukket 1000 ganger fra de undersøkte individene. Bare individer som ble genotypet ved alle markører er inkludert i figuren.

3.3 Genetisk variasjon i småmusling

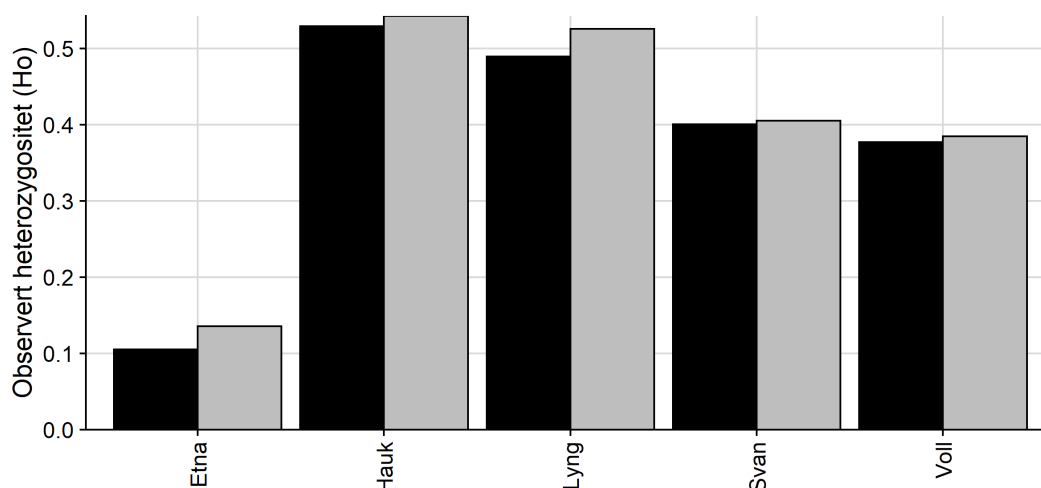
Vi sammenliknet genetisk variasjon i småmuslingene med genetisk variasjon i stammuslingene (Haukåselva og Lyngstadelva) eller et tilfeldig utvalg voksenmuslinger fra bestandene (Etna, Svankilelva, Vollaelva). Genetisk variasjon, målt som observert heterozygositet, var ikke redusert i småmuslingene sammenliknet med stammuslingene eller voksenmuslingene (**figur 2**). Graden av innavl var heller ikke høyere i småmuslingene sammenliknet med stammuslingene og voksenmuslingene (**figur 4**).

Genetisk variasjon, målt som antall alleler per markør, ble redusert fra stammuslingene eller voksenmuslingene til småmuslingene i alle bestandene (**tabell 1; figur 1; figur 3**). Reduksjonen i allelrikdom ble estimert til mellom 6 % og 9 % i Etna, Lyngstadelva og Vollaelva (**tabell 1; figur 1; figur 3**). Reduksjonen var størst i Haukåselva (12,3 %) og Svankilelva (16,4 %) (**tabell 1; figur 1; figur 3**). Når genotyper fra tidligere undersøkelser ble slått sammen med stammuslingene fra Haukåselva (for å øke antall prøver i estimering av allelrikdom) var reduksjon i allelrikdom på 16 % (**figur 1**). Allelrikdom ved undersøkelse av 123 individer fra Haukåselva ble estimert til 5,65 alleler for voksenmuslinger (stammuslinger og tidligere innsamlete voksenmuslinger) og til 4,72 alleler for småmuslingene (**figur 1**).

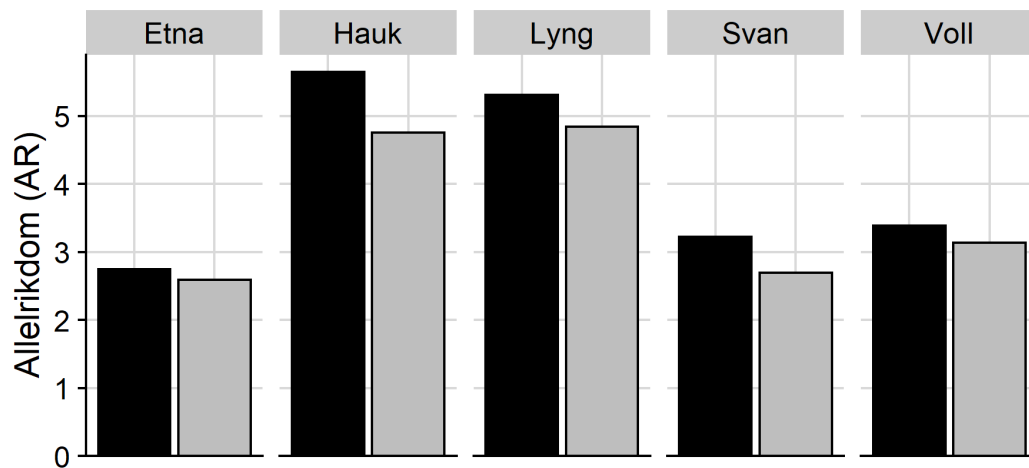
Tabell 1. Antall undersøkte småmuslinger og stammuslinger, effektivt antall stammuslinger (Neb) (95% konfidensintervall), reduksjon i allelrikdom fra stammuslinger til småmuslinger (Reduksjon AR (%)), antall prøver brukt i estimering av allelrikdom (N AR) og antall markører brukt i estimering av allelrikdom (Markør AR).

Bestand	Småmuslinger	Stammuslinger	Neb	Reduksjon AR (%)	N AR	Markør AR
Etna	37	60*	--	5,6	36	15
Haukåselva	198	44	19 (11-38)	12,3	40	15
Lyngstadelva	194	41	21 (12-39)	8,8	29	14
Svankilelva	40	60*	--	16,4	34	14
Vollaelva	41	60*	--	7,4	40	14

* Stikkprøve fra elva og ikke fra stammuslingene



Figur 2. Genetisk variasjon målt som observert heterozygositet i stammuslinger (svarte stolper) og småmuslinger (grå stolper) fra Etna, Haukåselva, Lyngstadelva, Svankilelva og Vollaelva.



Figur 3. Genetisk variasjon målt som allelrikdom i stammuslinger (svarte stolper) og småmuslinger (grå stolper) fra Etna, Haukåselva, Lyngstadelva, Svankilelva og Vollaelva. Allelrikdom er beregnet innenfor bestander og er derfor ikke sammenliknbar mellom bestander.

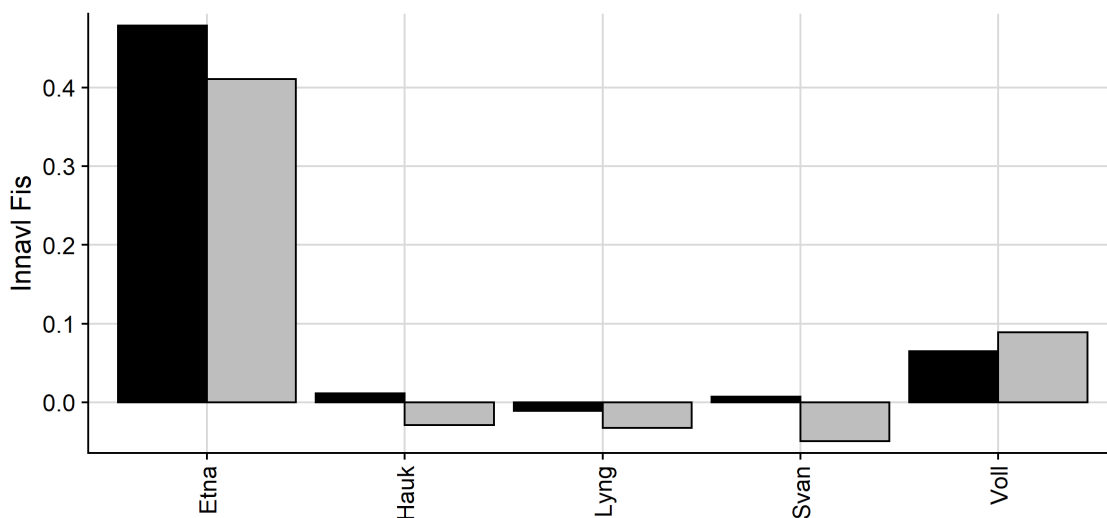


Fig 4. Grad av innavl i stammuslinger (svarte stolper) og småmuslinger (grå stolper), fra Etna, Haukåselva, Lyngstadelva, Svankilelva og Vollaelva.

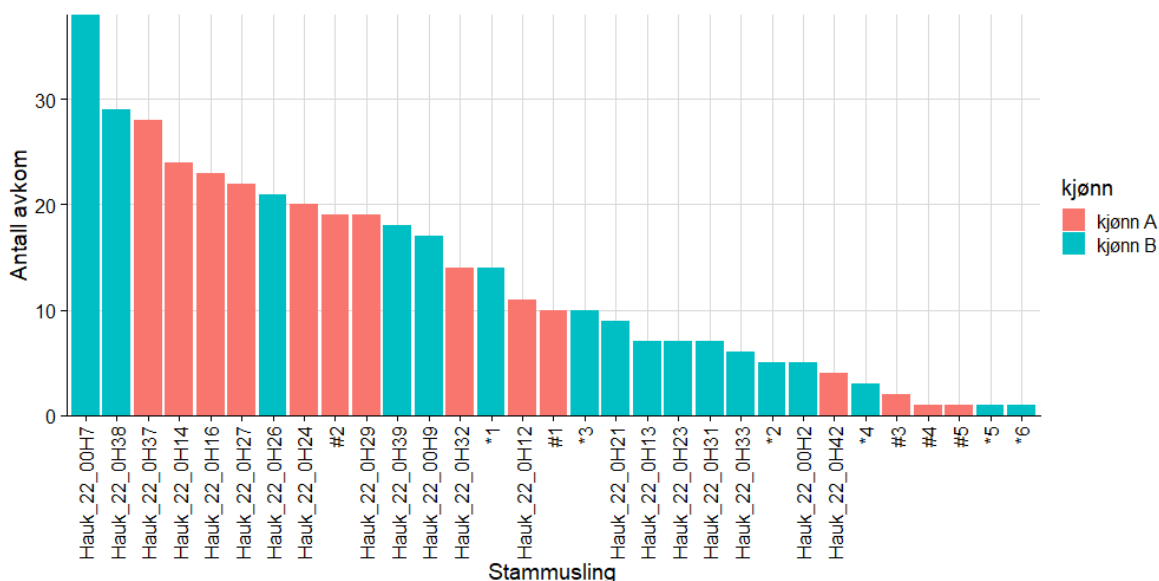
3.4 Effektivt antall stammuslinger

Småmuslingene fra Haukåselva ble tilordnet 31 foreldre, hvorav 20 kjente foreldre som det fantes prøver fra (**figur 5**), mens ingen avkom ble identifisert fra 24 andre stammuslinger som det også fantes prøver fra og som var i live ved prøvetaking (**figur 5; tabell 1**). Antallet av de to kjønnene til de tilordnede foreldrene var 17 og 14. Det var betydelig større variasjon i antall avkom blant foreldre enn forventet ved tilfeldig fordeling (varians: 94,5; gjennomsnitt: 12,8

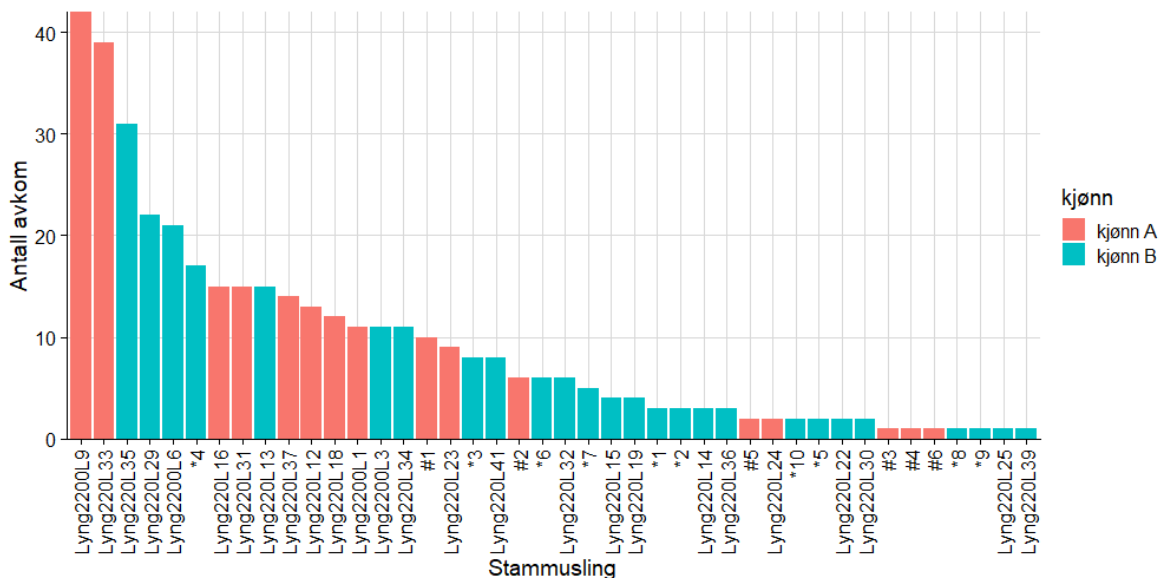
avkom; i Poissonfordeling forventes varians være likt gjennomsnitt) (**figur 5**). Effektivt antall stammuslinger ble estimert til 19 (**tabell 1**).

Småmuslingene fra Lyngstadelva ble tilordnet 42 foreldre, hvorav 26 foreldre har blitt tatt prøver av (**figur 6**). Av 41 stammuslinger som var i live ved innsamling av prøvene, hadde altså 26 bidratt til de undersøkte småmuslingene (**figur 6; tabell 1**). Det var større forskjell i antall mellom de to kjønnene (16 vs. 26 foreldre) sammenliknet med Haukåselva. Det var betydelig større variasjon i antall avkom blant foreldre enn forventet ved tilfeldig fordeling (variens: 97,6; gjennomsnitt: 9,2 avkom) (**figur 6**). To foreldre (kjønn B) hadde til sammen bidratt ca. en tredjedel av alle småmuslingene (**figur 6**). Effektivt antall stammuslinger ble estimert til 21 (**tabell 1**).

Det var gode forutsetninger for slektskapsanalyse for Haukåselva og Lyngstadelva, fordi den genetiske variasjonen var stor og fordi det forelå prøver av foreldrene. Likevel er det usikkerhet knyttet til undersøkelsen, spesielt fordi vi manglet prøver fra mange av stammuslingene. Slektskap kan bli overestimert ved bruk av et utilstrekkelig antall prøver (Ackerman et al. 2017; Wacker et al. 2022). Undersøkelse av tilfeldig utvalgte andeler av småmuslingene tyder på at antallet prøver var tilstrekkelig for Haukåselva, mens det må forventes en underestimert av effektivt antall stammuslinger for Lyngstadelva (**vedlegg 1**). Vi undersøkte usikkerheten i slektskap, ved å analysere simulerte genotyper av kjent slektskap. Slektskapet og allelfrekvenser i simuleringene var basert på observert slektskap og allelfrekvenser i Haukåselva og Lyngstadelva. Resultatene tyder på at det var bare ubetydelig feiltildeling av slektskap blant småmuslinger (søsken) og mellom stammuslinger og småmuslinger (foreldre-avkom) (**vedlegg 2, vedlegg 3**).



Figur 5. Antall avkom for stammuslinger fra Haukåselva. Kjønn til stammuslingene var ukjent. Foreldre med enkelttall som individbetegnelse har ikke blitt prøvetatt.



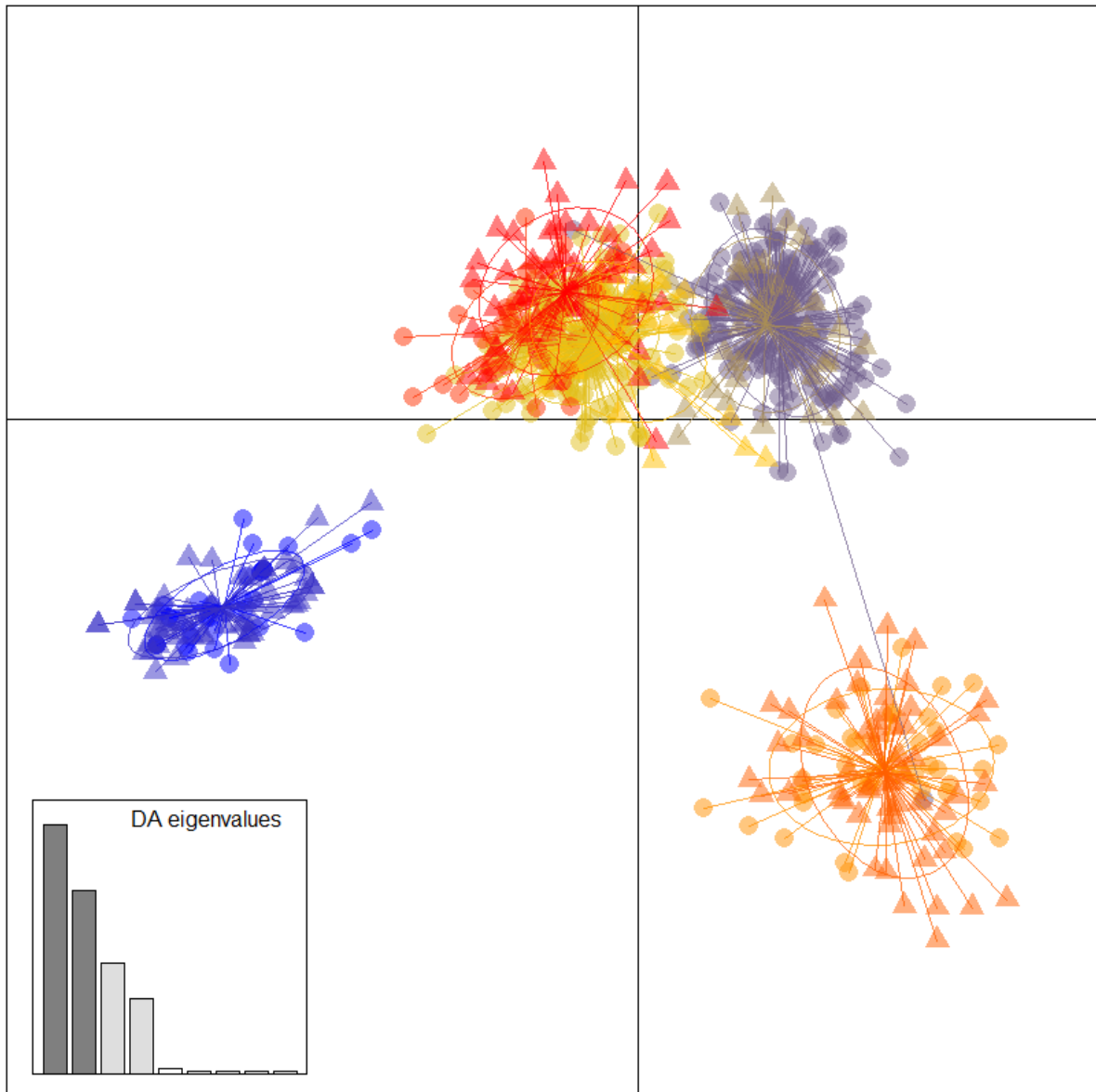
Figur 6. Antall avkom for stammuslinger fra Lyngstadelva. Kjønn til stammuslingene var ukjent. Foreldre med enkelttall som individbetegning har ikke blitt prøvetatt.

3.5 Genetisk integritet

Vi undersøkte om den genetiske integriteten av bestandene ble ivaretatt i produksjonen av småmuslingene ved bruk av «Discriminant Analysis of Principal Components» (DAPC). Metoden grupperer enkeltindivider ved å maksimere genetisk variasjon mellom bestander og minimere genetisk variasjon innenfor bestander.

Resultatene tyder på at den genetiske integriteten i bestandene ble ivaretatt i produksjonen av småmuslinger. Elvemusling fra Etna og Svankilelva ble tydelig differensiert fra de andre bestandene, og alle voksenmuslinger og småmuslinger fra disse bestandene ble gruppert innenfor tydelig avgrensede grupperinger (**figur 7**).

Én av de 199 småmuslingene (0,5 %) fra Haukåselva (id *Hauk22HS59*) ble plassert blant muslingene fra Svankilelva (**figur 7**). Individet hadde alleler som ikke ble funnet blant andre individer fra Haukås, ved to markører. Haukåselva og Svankilelva ble så tydelig differensiert at denne småmuslingen med høy sannsynlighet kommer fra Svankilelva og ikke Haukås. Alle småmuslingene fra Etna og Svankilelva ble genetisk gruppert til sine respektive bestander. Med denne metoden var det ingen tydelig differensiering mellom Vollaelva og Lyngstadelva, og det var derfor ikke mulig å skille mellom opphavet til småmuslingene fra disse bestandene, men ingen individer fra disse bestandene ble plassert utenfor grupperingen (**figur 7**). Som gruppe var det imidlertid stor og signifikant genetisk forskjell mellom Vollaelva og Lyngstadelva (**tabell 2**).



Figur 7. Gruppering av stammuslinger (trekanter) og småmuslinger (sirkler) basert på discriminant analysis of principal components (DAPC). Fargene viser muslinger fra Etna (blå), Haukåselva (grå), Lyngstadelva (gul), Svankilelva (oransje) og Vollaelva (rød).

Vi beregnet parvise genetiske distanser (F_{ST}) mellom alle grupper av voksenmuslinger og småmuslinger. Det var ubetydelig genetisk distanse mellom småmuslinger og stammuslinger fra samme bestand (F_{ST} : 0,001-0,018; **tabell 2**). Genetisk distanse var betydelig større mellom småmuslinger og stammuslinger fra andre bestander (F_{ST} : 0,044-0,295) og mellom småmuslinger fra de ulike bestandene (F_{ST} : 0,051-0,280) (**tabell 2**). Minst genetiske distanse ble funnet mellom muslingene fra Haukåselva og Lyngstadelva (**tabell 2**).

Tabell 2. Parvise genetiske distanser (F_{ST}) mellom stammuslinger (stam) og småmuslinger (små) fra Etna, Haukåselva, Lyngstadelva, Svankilelva og Vollaelva. Parvise genetiske distanser mellom stammuslinger og småmuslinger fra samme bestand er markert grå og parvise genetiske distanser med øvre 95% konfidensintervall <0.05 er framhevet (se vedlegg 4 for 95 % konfidensintervaller).

	Etna små	Etna stam	Haukås små	Haukås stam	Lyngstad små	Lyngstad stam	Svankil små	Svankil stam	Volla små	Volla stam
Etna små		0,014	0,243	0,235	0,218	0,236	0,280	0,255	0,259	0,295
Etna stam	0,014		0,241	0,234	0,216	0,234	0,275	0,250	0,253	0,291
Haukås små	0,243	0,241		0,001	0,051	0,044	0,107	0,099	0,098	0,090
Haukås stam	0,235	0,234	0,001		0,048	0,042	0,102	0,092	0,094	0,087
Lyngstad små	0,218	0,216	0,051	0,048		0,004	0,126	0,118	0,097	0,094
Lyngstad stam	0,236	0,234	0,044	0,042	0,004		0,128	0,117	0,099	0,095
Svankil små	0,280	0,275	0,107	0,102	0,126	0,128		0,018	0,180	0,182
Svankil stam	0,255	0,250	0,099	0,092	0,118	0,117	0,018		0,175	0,181
Volla små	0,259	0,253	0,098	0,094	0,097	0,099	0,180	0,175		0,006
Volla stam	0,295	0,291	0,090	0,087	0,094	0,095	0,182	0,181	0,006	

4 Diskusjon

4.1 Klassifiseringssystemet

Det skal etableres et klassifiseringssystem som gir lett tilgjengelig informasjon om i hvilken grad produksjonen av småmuslinger ved kultiveringsanlegget for elvemusling reflekterer genetisk variasjon og genetisk integritet av opphavsbestandene. Det er foreslått at klassifiseringssystemet utformes som trafikklys. Klassifiseringen skal være et hjelpemiddel for forvaltningen i vurderingen av hvor godt småmuslingene representerer bestandens genetiske variasjon og integritet.

Genetisk variasjon kan gå tapt hvis stammuslingene ikke representerer den genetiske variasjonen som finnes i bestanden, hvis ikke alle stammuslingene bidrar til produksjonen eller hvis bidraget fra de ulike stammuslingene til produksjonen er veldig forskjellig. Stammuslingene antas å være et tilfeldig utvalg av individer fra bestanden og genetisk variasjon i stammuslingene brukes som mål for genetisk variasjon i bestanden. Sammenlikning av genetisk variasjon mellom stammuslinger og småmuslinger kan derfor brukes til å estimere samlet tap av genetisk variasjon fra bestanden til småmuslingene.

Tap av genetisk variasjon i småmuslingene sammenliknet med bestanden, måles som endringer i heterozygositet, allelrikdom og innavl. Det er store forskjeller i genetisk variasjon mellom bestander og tapet kvantifiseres derfor som relativ endring i prosent og ikke som absolutt endring. Vi foreslår at klassifiseringen av produksjonen foretas ved bruk av den parameteren som viser størst relativt tap av genetisk variasjon.

For å bevare genetisk variasjon og genetisk integritet av bestandene ved utsettinger av anleggsproduserte elvemuslinger, bør grenseverdiene til klassifiseringssystemet bestemmes med hensyn til konsekvenser i et lengre tidsperspektiv, der de små muslingene blir kjønnsmodne og bidrar inn i bestanden. En klassifisering ut fra et slikt perspektiv er imidlertid vanskelig, fordi man på nåværende tidspunkt ikke vil kunne vite hvor stor andel av den opprinnelige bestanden de utsatte muslingene vil utgjøre og fordi man ikke vil kunne si noe om hvorvidt den opprinnelige bestanden vil gjenoppta en naturlig rekruttering. Det kan derfor være hensiktsmessig å avgrense vurderingen og klassifiseringen til en sammenlikning mellom stammuslingene og avkommet (småmuslingene). Det forventes at genetisk variasjon kan bli effektivt ivaretatt ved innsamling av 60 stammuslinger og befruktning i elva (Wacker mfl. 2019, Geist mfl. 2021). Innsamling av 30 gravide hunnmuslinger som har blitt befruktet av et stort antall hanner hver kan gi et effektivt antall gytemuslinger på over 100, som er forventet å ivareta alleler med lav frekvens (f.eks. $<0,0001$ sannsynlig for tap av allel med 0,05 frekvens). Det er allikevel viktig å være klar over at for noen bestander vil en jevnt fordelt produksjon fra de gravide stammuslingene ikke kunne være tilstrekkelig for å ivareta den samlede genetiske variasjonen i bestanden.

Genetisk integritet forventes generelt å være ivaretatt i kultiveringen ved kultiveringsanlegget, siden bestandene kultiveres hver for seg. Genetisk integritet kan likevel bli redusert ved feil, hvis individer fra ulike bestander blandes i anlegget. Genetisk integritet kan også bli forstyrret ved skeivt bidrag fra stammuslingene som fører til tilfeldige endringer i allelfrekvenser mellom bestanden og småmuslingene. Genetisk integritet er vurdert på bestandsnivå ved å undersøke genetisk differensiering mellom stammuslinger og småmuslinger (F_{ST}). Genetisk integritet på individnivå vurderes ved å undersøke om enkeltindivider faller utenfor grupperingen av bestanden.

Vi brukte et foreløpig klassifiseringssystem for å vurdere produksjonen fra infesteringen i 2020. Et bedre datagrunnlag er ønskelig for å vurdere hvor lite tap av genetisk variasjon som er oppnåelig ved innsamling av 60 stammuslinger etter befruktning i elva. For ingen av de tre bestandene fra infesteringen i 2020 ved befruktning i elva, ble det tatt prøver av de faktiske stammuslingene og for de to bestandene der befruktning skjedde i anlegget manglet vi prøver fra en del av stammuslingene. Grenseverdiene til klassifiseringssystemet burde derfor først fastlegges når et bedre datagrunnlag foreligger. At det blir tatt prøver av alle stammuslinger ved

kultiveringsanlegget er av stor betydning for evaluering og optimalisering av produksjonen. Endringen i genetisk variasjon i prosent vil være sammenliknbar mellom infesteringen i 2020 og seinere produksjoner, selv om grenseverdiene endres.

Det foreslåtte klassifiseringssystemet fra Miljødirektoratet er:

Grønn: Mindre enn 10 % reduksjon i genetisk variasjon, målt som allelrikdom (A_r) og observert heterozygositet (H_o), og mindre enn 10 % økt innavlsgrad (F_{IS}) i småmuslinger sammenliknet med stammuslinger og ikke signifikant avvik i genetisk distanse (F_{ST}) mellom småmuslinger og stammuslinger.

Gul: Mellom 10 % og 20 % reduksjon i genetisk variasjon, målt som allelrikdom (A_r) og observert heterozygositet (H_o), og mellom 10 % og 20 % økt innavlsgrad (F_{IS}) i småmuslinger sammenliknet med stammuslinger, og signifikant avvik i genetisk distanse (F_{ST}) mellom småmuslinger og stammuslinger med en F_{ST} -verdi $< 0,05$ og fler enn 95 % av småmuslingene har sannsynlig opphav i stammuslingene.

Rødt: Mer enn 20 % reduksjon i genetisk variasjon, målt som allelrikdom (A_r) og observert heterozygositet (H_o), og mer enn 20 % økt innavlsgrad (F_{IS}) i småmuslinger sammenliknet med stammuslinger, og signifikant avvik i genetisk distanse (F_{ST}) mellom småmuslinger og stammuslinger med en F_{ST} -verdi $> 0,05$, og at < 90 % av småmuslingene har sannsynlig opphav i stammuslingene.

I vurderingen av produksjonen fra infestering i 2020 brukte vi grenseverdier på 0-10 % (grønn), 10-20% (gul) og >20 % (rød) tap av genetisk variasjon fra bestanden (målt i stammuslinger) til småmuslinger. For eksempel har en gjennomsnittlig laksemusling-bestand en allelrikdom på 6,3 alleler, som blir redusert til henholdsvis 5,7 og 5,0 alleler ved 10% og 20% tap av genetisk variasjon. Laksemusling-bestander i Norge har en allelrikdom fra 5,7 til 6,9 alleler (Wacker et al. 2021). Ved grønn klassifisering har altså produksjonen fra en gjennomsnittlig laksemuslingbestand en allelrikdom som ligger innenfor variasjonen som finnes blant laksemusling i Norge, mens dette er ikke tilfelle ved gul klassifisering.

For en samlet *grønn* eller *gul* klassifisering av produksjonen må den genetiske distansen være ubetydelig, som kan anses å være tilfelle ved $F_{ST} < 0,05$. Hvis småmuslingene har en betydelig genetisk distanse til bestanden ($F_{ST} > 0,05$), klassifiseres produksjonen som rødt.

Genetisk integritet på individnivå kan ikke klassifiseres ved bruk av faste grenseverdier. Det er store forskjeller i genetisk distanse mellom elvemusling-bestander i Norge. Laksemuslingbestander er, for eksempel, ikke forskjellig nok fra hverandre for å kunne tilordne enkeltindivider. Genetisk integritet på individnivå undersøkes og vurderes kvalitativt i hvert enkelt tilfelle. Denne metoden kan oppdage eventuelle tilfeller der stammuslinger eller småmuslinger har blitt blandet i anlegget.

4.2 Klassifisering av produksjonen fra infestering 2020

Etna

Genetisk variasjon og integritet for produksjonen av småmuslinger fra Etna klassifiseres som *grønn*.

Genetisk variasjon, målt som allelrikdom, ble redusert med 6 % fra bestanden til småmuslingene. Bestanden er en ørretmusling med forholdsvis lav genetisk variasjon og resultatene viser at en stor andel av den genetiske variasjonen (alleler) forelå i 60 voksenmuslinger fra bestanden. Lite

tap av genetisk variasjon fra bestanden til småmuslingene viser at et tilstrekkelig antall foreldre bidro til småmuslingene.

Elvemusling fra Etna var den eneste bestanden i 2020-produksjonen som hadde en betydelig grad av innavl. Graden av innavl ble dog redusert med 14 % fra bestanden til småmuslingene.

Genetisk integritet ble ivaretatt og det var ubetydelig genetisk differanse ($F_{ST} < 0,05$) mellom bestanden og småmuslingene ($F_{ST}: 0,014$). På individnivå ble alle småmuslinger gruppert sammen med voksenmuslingene fra Etna.

Det forelå ingen prøver av stammuslingene fra Etna for genetisk undersøkelse. Småmuslinger kunne derfor ikke tilordnes til mødre og effektivt antall gytemuslinger kunne ikke estimeres.

Haukåselva

Genetisk variasjon og integritet for produksjonen av småmuslinger fra Haukåselva klassifiseres som *gul*.

Genetisk variasjon, målt som allelrikdom, ble redusert med 12 % fra bestanden til småmuslingene. Bestanden er mest sannsynlig en ørretmusling, men har forholdsvis stor genetisk variasjon, med en nesten like stor variasjon som i laksemuslingbestander (Wacker mfl. 2021). Forskjellen mellom voksenmuslinger og småmuslinger var større når flere prøver ble brukt til estimering av allelrikdom. Dette forklares med forekomst av sjeldne alleler, altså alleler med lav frekvens. Dette er alleler som mest sannsynlig vil gå tapt i produksjonen og ved genetisk drift generelt. Samtidig bidrar alleler med lav frekvens i større grad til allelrikdom når dette blir estimert for et stort antall individer. Når allelrikdommen ble estimert for 123 individer (stammuslinger og tidligere innsamlete voksenmuslinger) ble tapet av allelrikdom fra bestanden til småmuslingene estimert til 16 %.

Småmuslingene fra Haukåselva ble produsert ved befruktning i anlegget. Antallet stammuslinger som var i anlegget på tidspunktet av befruktningen og larveslippet er ukjent, siden det har vært betydelig dødelighet mellom innsamlingen av stammuslinger og produksjonen og mellom produksjonen og innsamlingen av prøver. Småmuslingene ble tilordnet 31 foreldre, som er et betydelig lavere antall enn forventet ved befruktning i elva og innsamling av gravide stammuslinger. I tillegg var det betydelig variasjon i bidraget fra foreldrene, som var større enn forventet ved tilfeldighet. Dette resulterte i et effektivt antall stammuslinger på 19, som betyr stor sannsynlighet for at alleler med lav frekvens går tapt.

Resultatene viser også at de 60 stammuslingene ikke reflekterer den genetiske variasjon i elvemusling fra Haukås. Selv under optimale forhold for produksjon av småmuslinger ved fertilisering i anlegget, altså med lik kjønnsfordeling og likt bidrag fra alle foreldre, ville en betydelig andel av genetiske variasjonen fra bestanden gå tapt.

Innavl ble ikke påvist i stammuslinger eller småmuslinger fra Haukås.

Genetisk integritet ble ivaretatt, og det var ubetydelig genetisk forskjell ($F_{ST} < 0,05$) mellom bestanden og småmuslingene ($F_{ST}: 0,001$). På individnivå ble alle småmuslingene, unntatt ett individ, gruppert sammen med voksenmuslingene. Det ene individet ble genetisk tilordnet Svankilelva. Det var tydelig genetisk differensiering mellom muslingene fra Haukåselva og Svankilelva, og tilordningen kan derfor anses som å ha lav usikkerhet. Det er ukjent om småmuslingen med opphav i Svankilelva ble blandet i produksjonen fra Haukåselva i kultiveringsanlegget eller om tilordning skyldes feil ved prøvetaking eller merking av prøven. Andelen individer med fremmed opphav (én av 199, 0,5%) vurderer vi som så lav at det uansett ikke vil få en stor innvirkning på bestanden.

Lyngstadelva

Genetisk variasjon og genetisk integritet for produksjonen av småmuslinger fra Lyngstadelva klassifiseres som *gul*.

Genetisk variasjon, målt som allelrikdom, ble redusert med 8,8 % fra bestanden til småmuslingene. Bestanden er en laksemusling, med stor genetisk variasjon. Allelrikdommen ble beregnet på grunnlag av 29 individer, men resultatene indikerer at reduksjonen i allelrikdom hadde vært betydelig større ved beregning på grunnlag av flere prøver. Det forelå ingen tidligere genotypete prøver fra Lyngstadelva, og allelrikdommen kunne derfor ikke undersøkes i en utvidet stikkprøve. I klassifiseringen av produksjonen ble det antatt at tapet av allelrikdom fra bestanden til småmuslingene overstiger 10 %, men det kan ikke utelukkes at tapet var større enn 20 %.

Tap av genetisk variasjon fra bestanden til småmuslingene fra Lyngstadelva kan forklares med befruktning i anlegget. Som for Haukåselva, var antallet foreldre (totalt 42 foreldre) ikke tilstrekkelig for å reflektere den genetiske variasjonen i bestanden og det var større variasjon i bidraget fra foreldrene enn forventet ved tilfeldighet. Et lavt effektivt antall stammuslinger (21 stammuslinger) gir stor sannsynlighet for tap av genvarianter fra bestanden.

Svankilelva

Genetisk variasjon og genetisk integritet for produksjonen fra Svankilelva klassifiseres som *gul*.

Genetisk variasjon, målt som allelrikdom, ble redusert med 16 % fra bestanden til småmuslingene. Bestanden er en ørretmusling med forholdsvis lav genetisk variasjon, som ble ytterligere redusert i produksjonen. Tapet av genetisk variasjon tyder på et lavt effektivt antall stammuslinger. Det forelå ingen prøver av stammuslingene fra Svankilelva for genetisk undersøkelse. Småmuslinger kunne derfor ikke tilordnes til mødre, og det er ukjent om et lavt effektivt antall stammuslinger skyldes få gravide muslinger, skeivt bidrag fra mødrene, få fedre eller en kombinasjon av disse.

Innavl ble ikke påvist i stammuslingene eller småmuslingene fra Svankilelva.

Genetisk integritet ble ivaretatt, og det var ubetydelig genetisk differanse ($F_{ST} < 0,05$) mellom bestanden og småmuslingene (F_{ST} : 0,018). På individnivå ble alle småmuslinger gruppert sammen med voksenmuslingene fra Svankilelva.

Vollaelva

Genetisk variasjon og genetisk integritet for produksjonen fra Vollaelva klassifiseres som *grønn*.

Genetisk variasjon, målt som allelrikdom, ble redusert med 7 % fra bestanden til småmuslingene. Bestanden er en ørretmusling med forholdsvis lav genetisk variasjon, og resultatene viser at en stor andel av den genetiske variasjonen (alleler) var representert i 60 voksenmuslinger fra bestanden. Lite tap av genetisk variasjon fra bestanden til småmuslingene viser at et tilstrekkelig antall foreldre bidro til småmuslingene.

Innavl ble ikke påvist i stammuslinger eller småmuslinger fra Vollaelva.

Genetisk integritet ble ivaretatt, og det var ubetydelig genetisk differanse ($F_{ST} < 0,05$) mellom bestanden og småmuslingene (F_{ST} : 0,006). På individnivå ble alle småmuslinger gruppert sammen med voksenmuslingene fra Vollaelva.

Det forelå ingen prøver av stammuslingene fra Vollaelva for genetisk undersøkelse. Småmuslingene kunne derfor ikke tilordnes til mødre og effektivt antall gytemuslinger kunne ikke estimeres.

4.3 Betydning for forvaltning

Vi undersøkte tap av genetisk variasjon og genetisk integritet i produksjonen av småmusling ved kultiveringsanlegget for elvemusling. Resultatene ble oppsummert ved bruk av et trafikklyssystem med foreløpige grenseverdier. Genetisk overvåking av produksjonen ved anlegget vil gi et viktig bidrag til forvaltningen av elvemusling. Klassifiseringen av produksjonen kan brukes til å vurdere om småmuslingene skal settes ut i elva, hvor mye av produksjonen skal settes ut i elva og om produksjonen bør repeteres med nye stammuslinger på et senere tidspunkt. Flere faktorer, som ikke er del av klassifiseringssystemet, vil ha stor betydning for disse avgjørelsene.

En viktig og ukjent faktor som vil kunne påvirke effekten av kultiveringen er utviklingen av forholdene for naturlig rekruttering i elva. Manglende rekruttering er i dag det viktigste kriteriet for utvalg av bestander som tas inn til kultiveringsanlegget (Larsen & Magerøy 2019). Kultivering er ressurskrevende og brukes for bestander som sannsynligvis ikke ville overleve uten utsettinger. Formålet med kultiveringen er altså å sikre overlevelse av bestander inntil miljøforholdene i elva tillater naturlig rekruttering og en langsiktig overlevelse. Hvis naturlig rekruttering ikke gjenopprettes før den gjenværende bestanden av voksenmuslinger har forsvunnet, kommer de tilbakeførte småmuslingene å utgjøre den framtidige bestanden. Hvis naturlig rekruttering gjenoppstår mens den gjenværende bestanden fortsatt er i live, så vil forholdet mellom gjenværende individer og kultiverte muslinger avgjøre den framtidige genetiske sammensetningen av bestanden. En stor overvekt av kultiverte muslinger ville da kunne svekke den genetiske tilstanden av bestanden, hvis de kultiverte muslingene ikke reflekterer den genetiske variasjonen i den opprinnelige bestanden, ved en såkalt Ryman-Laikre effekt (Ryman & Laikre 1991).

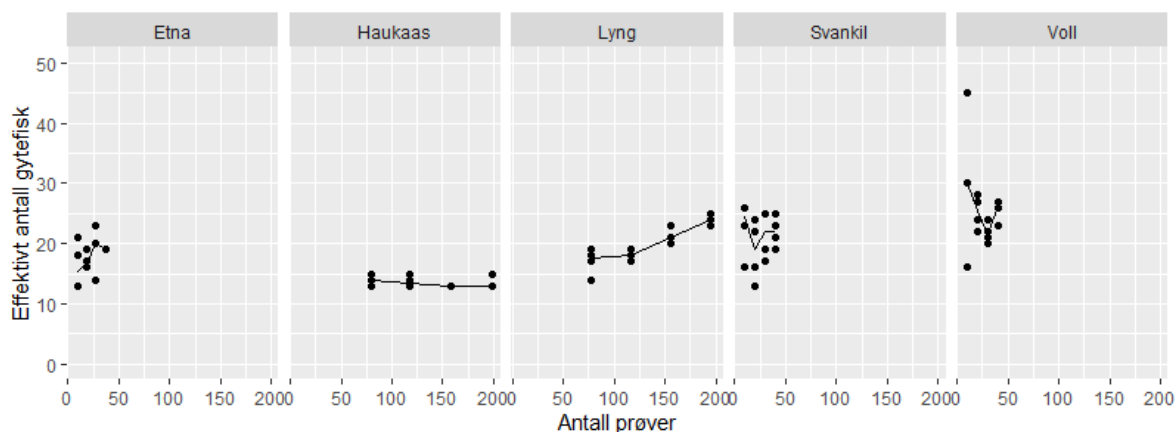
Forholdet mellom gjenværende og kultiverte muslinger vil påvirkes av overlevelsen av de utsatte småmuslingene. Småmuslingene har blitt satt ut i totalt 18 lokaliteter i treårsperioden 2016-2018 (Larsen & Magerøy 2019), og oppfølgingen tyder på god overlevelse av muslinger som var minst to år gamle (Magerøy mfl. 2019; Magerøy mfl. 2022). Bestandene som tas inn til kultiveringsanlegget i dag har en bestandsstørrelse på minst 250-500 individer (Larsen & Magerøy 2019, Jon H. Magerøy, pers. med.), men det vurderes å ta inn mindre bestander i fremtiden (Larsen & Magerøy 2019). Utviklingen av naturlig rekruttering og overlevelse av den naturlige bestanden sammenlignet med de kultiverte muslingene, vil være viktige faktorer som må vurderes i tillegg til den genetiske sammensetningen av de kultiverte muslingene. I tilfeller der kultiverte muslinger har en betydelig redusert genetisk variasjon og utgjør fullstendig eller med overvekt den framtidige bestanden, kan en repetert kultivering med nye stammuslinger være en god metode for å forbedre den genetiske tilstanden av bestanden.

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(2): 146-160.
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126(2): 131-140.
- Garlie, S. 2010. Utvikling av mikrosatelitt multipleks PCR for genetiske studier av Margaritifera margaritifera. MSc. Høgskolen i Hedmark.
- Geist, J., Rottmann, O., Schröder, W. & Kühn, R. 2003. Development of microsatellite markers for the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. (Bivalvia : Unionoidea). *Molecular Ecology Notes* 3(3): 444-446.
- Geist, J., Bayerl, H., Stoeckle, B.C. & Kuehn, R. 2021. Securing genetic integrity in freshwater pearl mussel propagation and captive breeding. *Scientific Reports* 11(1).
- Goudet, J. 2005. HIERFSTAT, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes* 5(1): 184-186.
- Hoffmann, A.A., Sgro, C.M. & Kristensen, T.N. 2017. Revisiting Adaptive Potential, Population Size, and Conservation. *Trends Ecol Evol* 32(7): 506-517.
- Jombart, T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24(11): 1403-1405.
- Jombart, T., Devillard, S. & Balloux, F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *Bmc Genetics* 11.
- Jones, O.R. & Wang, J.L. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* 10(3): 551-555.
- Karlsson, S. & Larsen, B.M. 2013. Genetiske analyser av elvemusling *Margaritifera margaritifera* (L.) – et nødvendig verktøy for riktig forvaltning av arten.
- Karlsson, S., Larsen, B.M., Eriksen, L. & Hagen, M. 2013. Four methods of nondestructive DNA sampling from freshwater pearl mussels *Margaritifera margaritifera* L. (Bivalvia: Unionoidea). *Freshwater Science* 32(2): 525-530.
- Karlsson, S., Larsen, B.M. & Hindar, K. 2014. Host-dependent genetic variation in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). *Hydrobiologia* 735(1): 179-190.
- Karlsson, S., Larsen, B.M., Balstad, T., Eriksen, L. & Hagen, M. 2016. Elvemusling - evaluering av en kultiveringsmetode. NINA Rapport 1257.
- Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T.F., Crozier, W.W. & Prodohl, P.A. 2013. diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution* 4(8): 782-788.
- Larsen, B.M. & Magerøy, J.H. 2019. Elvemuslinglokalteter i Norge. En beskrivelse av status som grunnlag for arbeid med kartlegging og tiltak i handlingsplanen for 2019–2028. Norsk Institutt for Naturforskning (NINA).
- Magerøy, J.H., Kålås, S., Wathne, I., Rikstad, A. & Julien, K. 2019. Del 2. Utsetting av kultivert elvemusling. 2016-2018. S. 13-111 i: Jakobsen, P. (red.). 2019. Samlerapport om kultivering og utsetting av elvemusling. 2018. Universitetet i Bergen, Institutt for biologi, Rapport til Miljødirektoratet og Fylkesmannen i Hordaland.
- Magerøy, J.H., Sundt, K.Å., Jakobsen, P.J., Hanssen, M., Kålås, S. & Høitomt, G. 2022. Kultivering av elvemusling - Frislipp av kultivert musling samt innsamling og tilbakeføring av stammusling i 2021. NINA Prosjektnotat 354. Norsk institutt for naturforskning.
- Reed, D.H. & Frankham, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17(1): 230-237.

- Ryman, N. & Laikre, L. 1991. Effects of supportive breeding on the genetically effective population size. *Conservation Biology* 5(3): 325-329.
- Wacker, S., Larsen, B.M., Jakobsen, P.J. & Karlsson, S. 2019. Multiple paternity promotes genetic diversity in captive breeding of a freshwater mussel. *Global Ecology and Conservation* 17: e00564.
- Wacker, S., Larsen, B.M., Magerøy, J.H., Hagen, I.J., Kålås, S. & Karlsson, S. 2021. Genetisk struktur og variasjon i elvemusling i Norge. Betydning for bestandenes økologiske tilstand. Norsk institutt for naturforskning (NINA).
- Wacker, S., Aronsen, T., Hagen, I.J., Karlsson, S., Berntsen, H.H., Skoglund, H., Solem, Ø., Sæggrov, 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.
- Winter, D.J. 2012. MMOD: an R library for the calculation of population differentiation statistics. *Molecular Ecology Resources* 12(6): 1158-1160.

6 Vedlegg



Vedlegg 1. Effektivt antall stammuslinger estimert fra ulikt antall småmuslinger fra Etna, Haukåselva, Lyngstadelva, Svankilelva og Vollaelva. Hver sirkel viser en analyse i programmet COLONY og linjen forbinder gjennomsnitt.

Vedlegg 2a. Tilordning av kjente hel- og halvsøskenpar i COLONY, der genotyper og slektskap ble simulert på grunnlag av slektskap blant småmuslinger fra Haukåselva og med identiske allelfrekvenser. Tabellen viser 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			
Simulert som	Helsøsken	Halvsøsken	Ubeslektet
Helsøsken	510	0	0
Halvsøsken	0	2729	0
Ubeslektet	6	24	16234

Vedlegg 2b. Tilordning av kjente foreldre-avkom-par i COLONY, der genotyper og slektskap ble simulert på grunnlag av slektskap blant småmuslinger fra Haukåselva og med identiske allelfrekvenser. Tabellen viser antall foreldre-avkom-par og ubeslektede par («simulert som») som ble tilordnet som foreldre-avkom-par og ubeslektede par i analysen. Korrekt tilordnet slektskap er markert grønt.

Tilordnet som		
Simulert som	Foreldre	Ikke foreldre
Foreldre	329	0
Ikke foreldre	1	66

Vedlegg 3a. Tilordning av kjente hel- og halvsøskenpar i COLONY, der genotyper og slektskap ble simulert på grunnlag av slektskap blant småmuslinger fra Lyngstadelva og med identiske allelfrekvenser. Tabellen viser 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			
Simulert som	Helsøsken	Halvsøsken	Ubeslektet
Helsøsken	380	0	0
Halvsøsken	0	2820	1
Ubeslektet	0	2	15325

Vedlegg 3b. Tilordning av kjente foreldre-avkom-par i COLONY, der genotyper og slektskap ble simulert på grunnlag av slektskap blant småmuslinger fra Lyngstadelva og med identiske allelfrekvenser. Tabellen viser antall foreldre-avkom-par og ubeslektede par («simulert som») som ble tilordnet som foreldre-avkom-par og ubeslektede par i analysen. Korrekt tilordnet slektskap er markert grønt.

Simulert som	Tilordnet som	
	Foreldre	Ikke foreldre
Foreldre	317	0
Ikke foreldre	0	69

Vedlegg 4. Parvise genetiske distanser (F_{ST}) mellom stammuslinger (stam) og småmuslinger (små) fra Etna, Haukåselva, Lyngstadelva, Svankilelva og Vollaelva og 95% konfidensintervaller. Parvise genetiske distanser med øvre 95% konfidensintervall <0.05 er framhevet.

Parvis sammenlikning	F_{ST}	Nedre 95% KI	Øvre 95% KI
Etna_juv, vs. Etna_stam,	0.014	0.008	0.041
Etna_juv, vs. Hauk_juv,	0.243	0.231	0.263
Etna_juv, vs. Hauk_stam,	0.236	0.222	0.265
Etna_juv, vs. Lyng_juv,	0.218	0.207	0.238
Etna_juv, vs. Lyng_stam,	0.236	0.221	0.267
Etna_juv, vs. Svan_juv,	0.280	0.264	0.311
Etna_juv, vs. Svan_stam,	0.255	0.243	0.281
Etna_juv, vs. Voll_juv,	0.259	0.243	0.293
Etna_juv, vs. Voll_stam,	0.295	0.278	0.325
Etna_stam, vs. Hauk_juv,	0.242	0.231	0.257
Etna_stam, vs. Hauk_stam,	0.234	0.222	0.259
Etna_stam, vs. Lyng_juv,	0.217	0.206	0.233
Etna_stam, vs. Lyng_stam,	0.235	0.222	0.263
Etna_stam, vs. Svan_juv,	0.276	0.260	0.304
Etna_stam, vs. Svan_stam,	0.251	0.238	0.272
Etna_stam, vs. Voll_juv,	0.255	0.240	0.284
Etna_stam, vs. Voll_stam,	0.292	0.277	0.318
Hauk_juv, vs. Hauk_stam,	0.001	0.001	0.010
Hauk_juv, vs. Lyng_juv,	0.051	0.048	0.057
Hauk_juv, vs. Lyng_stam,	0.044	0.040	0.056
Hauk_juv, vs. Svan_juv,	0.107	0.100	0.121
Hauk_juv, vs. Svan_stam,	0.099	0.092	0.111
Hauk_juv, vs. Voll_juv,	0.099	0.092	0.113
Hauk_juv, vs. Voll_stam,	0.090	0.085	0.101
Hauk_stam, vs. Lyng_juv,	0.049	0.044	0.061
Hauk_stam, vs. Lyng_stam,	0.042	0.038	0.060
Hauk_stam, vs. Svan_juv,	0.102	0.095	0.122
Hauk_stam, vs. Svan_stam,	0.092	0.086	0.108
Hauk_stam, vs. Voll_juv,	0.094	0.088	0.112
Hauk_stam, vs. Voll_stam,	0.087	0.081	0.103
Lyng_juv, vs. Lyng_stam,	0.004	0.004	0.015
Lyng_juv, vs. Svan_juv,	0.127	0.118	0.141
Lyng_juv, vs. Svan_stam,	0.118	0.1107	0.1312

Lyng_juv, vs. Voll_juv,	0.097	0.0893	0.1119
Lyng_juv, vs. Voll_stam,	0.094	0.0867	0.106
Lyng_stam, vs. Svan_juv,	0.128	0.1177	0.1519
Lyng_stam, vs. Svan_stam,	0.117	0.1084	0.1386
Lyng_stam, vs. Voll_juv,	0.098	0.09	0.1208
Lyng_stam, vs. Voll_stam,	0.094	0.0865	0.1137
Svan_juv, vs. Svan_stam,	0.018	0.0134	0.0337
Svan_juv, vs. Voll_juv,	0.180	0.1683	0.2044
Svan_juv, vs. Voll_stam,	0.182	0.1719	0.203
Svan_stam, vs. Voll_juv,	0.175	0.1643	0.1972
Svan_stam, vs. Voll_stam,	0.181	0.17	0.2
Voll_juv, vs. Voll_stam,	0.006	0.005	0.021

Norsk institutt for naturforskning, NINA, er en uavhengig stiftelse som forsker på natur og samspillet natur–samfunn.

NINA ble etablert i 1988. Hovedkontoret er i Trondheim, med avdelingskontorer i Tromsø, Lillehammer, Bergen og Oslo. I tillegg driver NINA Sæterfjellet avlsstasjon for fjellrev på Oppdal, og forskningsstasjonen for vill laksefisk på lms i Rogaland.

NINAs virksomhet omfatter både forskning og utredning, miljøovervåking, rådgivning og evaluering. NINA har stor bredde i kompetanse og erfaring med både naturvitere og samfunnsvitere i staben. Vi har kunnskap om artene, naturtypene, samfunnets bruk av naturen og sammenhenger med de store drivkreftene i naturen.

ISSN:1504-3312
ISBN: 978-82-426-5014-6

Norsk institutt for naturforskning

NINA Hovedkontor

Postadresse: Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim

Besøks-/leveringsadresse: Høgskoleringen 9, 7034 Trondheim

Telefon: 73 80 14 00, Telefaks: 73 80 14 01

E-post: firmapost@nina.no

Organisasjonsnummer 9500 37 687

<http://www.nina.no>



Samarbeid og kunnskap for framtidens miljøløsninger