

926 Genetiske analyser av elvemusling *Margaritifera margaritifera* (L.) – et nødvendig verktøy for riktig forvaltning av arten

NINA Rapport

Sten Karlsson
Bjørn Mejdell Larsen (red.)



NINAs publikasjoner

NINA Rapport

Dette er en elektronisk serie fra 2005 som erstatter de tidligere seriene NINA Fagrapport, NINA Oppdragsmelding og NINA Project Report. Normalt er dette NINAs 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 annet språk når det er hensiktsmessig.

NINA Temahefte

Som navnet angir behandler temaheftene spesielle emner. Heftene utarbeides etter behov og serien favner svært vidt; fra systematiske bestemmelsesnøkler til informasjon om viktige problemstillinger i samfunnet. NINA Temahefte gis vanligvis en populærvitenskapelig form med mer vekt på illustrasjoner enn NINA Rapport.

NINA Fakta

Faktaarkene har som mål å gjøre NINAs forskningsresultater raskt og enkelt tilgjengelig for et større publikum. De sendes til presse, ideelle organisasjoner, naturforvaltningen på ulike nivå, politikere og andre spesielt interesserte. 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 vitenskapelige resultater i internasjonale journaler, populærfaglige bøker og tidsskrifter.

Genetiske analyser av elvemusling *Margaritifera margaritifera* (L.) – et nødvendig verktøy for riktig forvaltning av arten

Sten Karlsson
Bjørn Mejdell Larsen (red.)

Karlsson, S. & Larsen, B.M. (red.) 2013. Genetiske analyser av elvemusling *Margaritifera margaritifera* (L.) – et nødvendig verktøy for riktig forvaltning av arten - NINA Rapport 926. 44 s.

Trondheim, januar 2013

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-2530-4

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

Åpen

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

REDAKSJON

Bjørn Mejdell Larsen

KVALITETSSIKRET AV

Odd Terje Sandlund

ANSVARLIG SIGNATUR

Assisterende forskningssjef Elisabet Forsgren (sign.)

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Direktoratet for naturforvaltning

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Jarl Koksvik

FORSIDEBILDE

Liten ørret, men til stor nytte for muslingen – et nødvendig samspill.

Foto: Bjørn Mejdell Larsen

NØKKELOORD

Elvemusling, *Margaritifera margaritifera*, Bivalvia – genetisk variasjon – metoder DNA innsamling - Norge

KEY WORDS

Freshwater pearl mussel, *Margaritifera margaritifera*, Bivalvia – genetic variation – methods DNA sampling - Norway

KONTAKTOPPLYSNINGER

NINA hovedkontor

Postboks 5685 Sluppen
7485 Trondheim
Telefon: 73 80 14 00

NINA Oslo

Gaustadalléen 21
0349 Oslo
Telefon: 73 80 14 00

NINA Tromsø

Framsenteret
9296 Tromsø
Telefon: 77 75 04 00

NINA Lillehammer

Fakkeldgården
2624 Lillehammer
Telefon: 73 80 14 00

Sammendrag

Karlsson, S. & Larsen, B.M. (red.) 2013. Genetiske analyser av elvemusling *Margaritifera margaritifera* (L.) – et nødvendig verktøy for riktig forvaltning av arten - NINA Rapport 926. 44 s.

Kunnskap om ertsutnyttelse (hvilken fiskeart muslinglarvene er avhengig av for en normal utvikling) hos ulike elvemusling-populasjoner i Norge koplet opp mot genetiske analyser av et utvalg av disse populasjonene inkludert enkelte delpopulasjoner, har gitt sterke indikasjoner på at det eksisterer to funksjonelle grupper av elvemusling: «ørretmusling» og «laksemusling». Dette har tilført en ny viktig dimensjon i forvaltningen av den truede muslingen i Norge. Resultatene har også vist behovet for en integrert felles forvaltning av elvemusling og dens ertsart, ikke minst i forbindelse med reetablering av elvemusling i vassdrag der den er utdødd eller der arten bare forekommer i tynne bestander.

Genetisk variasjon hos elvemusling i Norge er nå undersøkt i 27 forskjellige elvemusling-lokaliteter med tillegg av ytterligere seks delpopulasjoner i fire av lokalitetene. Arbeidet ble startet som en pilot-studie av 19 lokaliteter (til sammen 25 innsamlingsstasjoner) i 2006-2010. Genetisk variasjon ble studert både innen en elvemuslingbestand, og mellom bestander. Arbeidet ble utvidet med åtte nye lokaliteter i 2011-2012, bl.a. i Namsenvassdraget og Hestadelva. I tillegg ble det lagt opp til å undersøke flere individer fra enkelte av lokalitetene ved å supplere noen av de lokalitetene som var undersøkt tidligere for å se om antall prøver hadde noen betydning for konklusjonene. I tillegg skulle det utvikles/implementeres nye metoder for prøvetaking som ikke skadet eller drepte forsøksindivider. Resultatene fra dette prosjektet presenteres i denne rapporten

Genetisk variasjon hos elvemusling *Margaritifera margaritifera* (L.) i Norge

Det er fra tidligere feltstudier vist at det finnes en artsspesifikk ertsavhengighet til enten laks eller ørret hos elvemusling i Norge. Det har også blitt vist at denne erts-spesifisiteten gjenspeiles i fordelingen av genetisk variasjon både mellom og innen laksemusling- og ørretmusling-populasjoner. Hovedkonklusjonene fra en studie som tidligere er publisert er ikke endret, men denne nye undersøkelsen inkluderer et større prøvemateriale. Vi undersøkte 775 individer av elvemusling fra 27 forskjellige lokaliteter (og ytterligere seks delpopulasjoner i fire av lokalitetene) med seks mikrosatellitt-markører. Genetisk variasjon innen ørretmusling-populasjoner i form av heterozygositet og antall alleler var generelt lavere enn det som ble funnet innen laksemusling-populasjoner. Som gruppe var den genetiske variasjonen hos ørretmuslingene signifikant lavere enn hos laksemuslingene. Den genetiske differensieringen mellom ørretmusling-populasjoner var meget høy ($F_{ST} = 0,345$), og signifikant høyere enn mellom laksemusling-populasjoner ($F_{ST} = 0,025$). Vertstilørighet forklarte 11,43 % av den totale genetiske variasjonen, mens 15,16 % av variasjonen kunne tilskrives variasjon mellom populasjoner innen ertsgruppene. Ut fra parvise genetiske distanser grupperte, med få unntak, ørretmusling og laksemusling-populasjonene seg i to forskjellige genetiske grupper. Ørretmusling-populasjoner var genetisk meget distinkte, med en relativt lav genetisk variasjon innen populasjoner, mens laksemusling-populasjoner var forholdsvis lite (men signifikant) genetisk differensierte med en relativt høyere genetisk variasjon innen populasjonene. Dette er observasjoner som det må tas hensyn til i forvaltning av elvemusling i Norge. Våre resultater synes å støtte en hypotese om at ørretmusling og laksemusling representerer to forskjellige fylogenetiske grupper med forskjellig innvandringshistorie. Dette er det viktig å endelig besvare i framtidige studier. Observasjonen at det tilsynelatende er en polarisert infeksjon av muslinglarver på enten ørret eller laks gjør det rimelig å legge til grunn dette som et føre-var-prinsipp i det videre forvaltningsarbeidet med elvemusling i Norge.

Utprøving av metoder for innsamling av DNA fra elvemusling

Elvemusling er en truet art. Det er derfor ikke uproblematisk å drepe individer av elvemusling for å ta prøver til genetiske analyser. For å finne fram til en mest mulig skånsom metode ble det undersøkt fire ulike metoder for innsamling av DNA prøver: 1. Prøvetaking av haemolymfe-

væske. 2. Skraping av fot. 3. Kappebiopsi. 4. Q-tip. Ingen av prøvetakingsmetodene var letale, da samtlige muslinger var i live 128 dager etter prøvetaking. Gjennomsnittlig vekst var lik og ikke signifikant forskjellig fra en kontrollgruppe for alle prøvetakingsmetoder, utenom Q-tip-metoden som for visse individer syntes å føre til en stagnasjon i vekst. DNA-utbyttet fra haemolymfe og fotskrap var signifikant lavere og mer variabelt enn fra de andre metodene. Genotypingssuksessen var minst fra DNA-ekstrakt fra haemolymfe og kappebiopsi, men høy for de andre metodene. Q-tip prøver lagret i lysis buffer ved romtemperatur ga større DNA-utbytte enn prøver lagret i kjøleskap og tørkede Q-tip prøver. På bakgrunn av disse resultatene og hvor effektivt DNA kunne ekstraheres fra de ulike prøvetakingsmetodene, anbefaler vi Q-tip prøvetaking som en skånsom DNA-prøvetakingsmetode for fremtidige genetiske analyser hos elvemusling eller andre store ferskvannsmuslinger. Metoden muliggjør en effektiv og skånsom prøvetaking av elvemusling uten å sette begrensninger på antall individer som ønskes undersøkt.

Betydningen av antall prøver ved innsamling og analyser av DNA fra elvemusling

Hvor mange muslinger må det tas DNA-prøver fra for å få gode svar? Hva som er et tilstrekkelig antall individer avhenger av de spesifikke problemstillingene, hvilken type og hvor mange genetiske markører som benyttes, og den faktiske genetiske variasjonen og variasjonsfordelingen i det rådende datamaterialet. De mest brukte målene på genetisk variasjon innen naturlige populasjoner er heterozygositet, antall ulike alleler og estimert genetisk variasjon mellom populasjoner (F_{ST}). Presisjonen av disse målene avhenger generelt av hvor mange individer som analyseres. Jo flere individer som analyseres, desto større er sannsynligheten for å oppdage flere forskjellige typer alleler i populasjonen, og desto større presisjon oppnås i estimatet av allelfrekvenser. Dette har betydning for riktig karakterisering av populasjoner, og for å ha tilstrekkelig statistisk teststyrke til å oppdage reelle forskjeller mellom subpopulasjoner. Mikrosatellitter er en type genetiske markører som er mye benyttet i populasjonsgenetiske studier. Her har vi undersøkt effekten av antall prøver på estimatene av heterozygositet, allelfrekvens og sannsynlighet for å oppdage alleler ved bruk av mikrosatellitter. Vi konkluderer med at en stikkprøvegruppe på minimum 30 individer som oftest er tilstrekkelig for standard populasjonsgenetiske parametere, gitt at prøvetakingen er tilfeldig fra en panmiktisk populasjon. Hvis tilfeldig og representativ prøvetaking er vanskelig, anbefaler vi å øke antall prøver. For andre spesielle problemstillinger må undersøkelsene designes spesielt, og antall prøver må vurderes og bestemmes i hvert enkelt tilfelle.

Et viktig fundamentalt prinsipp for bevaring av elvemusling bør være å gjøre tiltak som i størst mulig grad bevarer den genetiske variasjonen og integriteten. Med bakgrunn i observasjoner av en nesten polarisert infeksjon av muslinglarver på enten laks eller ørret, og samsvarende observasjoner av genetisk variasjon, foreslår vi at forekomster av elvemusling i første rekke grupperes til laksemusling og ørretmusling. Deretter samles populasjoner av enten laksemusling eller ørretmusling i grupper med likt genetisk opphav, og til sist beskrives bestander som er reproduktivt isolerte fra hverandre (populasjoner). Vi foreslår at i den grad det er mulig, bør populasjon være den enheten som skal være gjenstand for bevaring og tiltaksbehov hos elvemusling i Norge. Ut fra de meget store genetiske forskjellene mellom ørretmusling-lokaliteter, men de relativt små forskjellene mellom laksemusling-lokaliteter, foreslår vi at man ved eventuelle re-etableringer av elvemusling fra andre bestander viser ekstra stor forsiktighet ved utsettinger av ørretmuslinger, da disse på grunn av større grad av genetisk isolasjon har større potensiale for lokale genetiske tilpasninger. Ytterligere studier er imidlertid nødvendig for å forstå den evolusjonære bakgrunnen til de funksjonelle forskjellene som finnes mellom ørretmusling og laksemusling.

Sten Karlsson, NINA, Postboks 5685 Sluppen, 7485 Trondheim; sten.karlsson@nina.no
Bjørn Mejdell Larsen, NINA, Postboks 5685 Sluppen, 7485 Trondheim; bjorn.larsen@nina.no

Innhold

Sammendrag	3
Innhold	5
Forord	6
1 Innledning.....	7
2 Genetisk variasjon hos elvemusling <i>Margaritifera margaritifera</i> (L.) i Norge	9
2.1 Innledning	9
2.2 Materiale og metode	10
2.2.1 Innsamling	10
2.2.2 DNA ekstraksjon	10
2.2.3 Genotyping av mikrosatellitter	10
2.2.4 Dataanalyser	10
2.3 Resultater	14
2.4 Diskusjon	20
3 Utprøving av metoder for innsamling av DNA fra elvemusling	24
3.1 Innledning	24
3.2 Materiale og metoder	24
3.2.1 Prøvetaking	24
3.2.2 DNA analyser	25
3.3 Resultater	25
3.4 Konklusjon	27
4 Betydningen av antall prøver ved innsamling og analyser av DNA fra elvemusling ..	29
4.1 Innledning	29
4.2 Metoder og resultater	32
4.2.1 Effekt på antall alleler og heterozygositet	33
4.2.2 Effekt på F_{ST} og populasjonsstruktur	33
4.3 Diskusjon og konklusjon	34
5 Oppsummering	37
5.1 Bevaring av genetisk variasjon	37
5.2 Re-etableringer og kompensasjonsutsetninger	38
5.3 Hva om utgangsmaterialet har for liten genetisk variasjon?	39
5.4 Kunnskapsmangel og utfyllende kartlegging	39
6 Referanser	41

Forord

Muslinglarvene til elvemusling vil bare utvikle seg normalt på laks eller ørret i Norge. I handlingsplanen for elvemusling er det beskrevet at det i anadrome vassdrag der laks dominerer vil laks normalt være den viktigste og kanskje den eneste vertsarten for muslinglarvene. Ovenfor vandringshindret i anadrome vassdrag derimot, og i små anadrome vassdrag (sjøørretvassdrag) ser ørret ut til å være eneste vertsart. Det er derfor nødvendig å bestemme hvilken fiskeart som er primærvert i hvert enkelt vassdrag. Direktoratet for naturforvaltning uttrykte derfor tidlig interesse for å starte et prosjekt på genetikkk hos elvemusling. Kunne det være genetiske forskjeller mellom ulike populasjoner av elvemusling i Norge avhengig av vertsart?

NINA startet derfor i 2007 et pilot-prosjekt på genetiske analyser av elvemusling i Norge. Vi møtte noen metodiske utfordringer underveis, og gamle prøver måtte erstattes med nye, samtidig som metoden med innsamling av DNA-prøver stadig var under utprøving. Materiale fra til sammen 19 lokaliteter (men totalt 25 innsamlingsstasjoner) ble samlet inn i løpet av årene 2008-2010, og resultatene ble rapportert i 2011 (Larsen mfl. 2011a). Den genetiske studien og den samlede kunnskapen om infeksjonsgrad og morfologi hos «ørretmusling» og «laksemusling», ga sterke indikasjoner på at det eksisterer to funksjonelle grupper av elvemusling. Dette tilførte en ny viktig dimensjon i forvaltningen av den sterkt truede muslingen i Norge. Resultatene viste også behovet for en integrert felles forvaltning av elvemusling og dens vertsart, ikke minst i forbindelse med reetablering av elvemusling i vassdrag der den var utdødd eller der arten forekom i tynne bestander.

NINA fikk i 2011 midler fra Direktoratet for naturforvaltning til å videreføre de genetiske analysene av elvemusling. Prosjektet skulle strekke seg over to år, og hadde som hovedformål å studere et større utvalg av lokaliteter og et større antall individer på utvalgte lokaliteter for å styrke hypotesen om to genetisk distinkte typer av elvemusling i Norge. Samtidig skulle det gjennomføres en metodetest for å finne fram til en anbefalt metode for prøvetaking av DNA fra levende muslinger, som ikke skulle skade eller drepe forsøksindividene. Prosjektet ble finansiert av DN, men supplert med en betydelig egeninnsats fra NINA.

En særlig takk går til Jarl Koksvik på Direktoratet for naturforvaltning for et alltid hyggelig og godt samarbeid, og alle dere andre som i årenes løp har vært involvert underveis i prosjektet.

Trondheim, januar 2013

Bjørn Mejdell Larsen
Prosjektleder

1 Innledning

Det har vært en global tilbakegang for de ikke-marine bløtdyrene, og spesielt har tilbakegangen vært dramatisk for gruppen av ferskvannsmuslinger. Mange arter står i fare for å bli utryddet, og elvemusling, *Margaritifera margaritifera* (L.) hører til en av de mest truede ferskvannsmuslingene i verden. Elvemusling står da også på IUCNs liste over truede dyrearter (IUCN 2011), og er ført opp på Bern-konvensjonens liste III over arter som det skal tas spesielt hensyn til. Elvemusling er i tillegg listet opp i EUs habitatdirektiv (vedleggene II og V). Den kraftige tilbakegangen i bestandene av elvemusling i hele Europa gjennom 1900-tallet har gitt økt bekymring i de fleste land der den fortsatt finnes, og fokus de siste ti-årene har blitt rettet mot det å redde arten fra total utryddelse.

Det er laget en generell handlingsplan for elvemusling i Europa (Araujo & Ramos 2000), og mange land har også laget sine egne nasjonale handlingsplaner. Norge fikk sin egen handlingsplan for elvemusling i 2006 (Direktoratet for naturforvaltning 2006). I tillegg til å være kategorisert som «sårbar» på Norsk Rødliste 2010 (Kålås mfl. 2010), ble den totalfredet mot all fangst fra 1. januar 1993. Elvemusling er nå også foreslått som prioritert art av Direktoratet for naturforvaltning etter den nye Naturmangfoldloven, som kom i 2009. Det generelle inntrykket er at mange elvemuslingbestander har redusert utbredelse i vassdragene, at bestandene mange steder er splittet opp og tynnet ut, og at rekrutteringen er nedsatt (Larsen 2005).

Forvaltningen har et særlig ansvar for internasjonalt truede arter. Norge alene har mer enn to tredeler av det totale antall elvemusling i Europa (utenom Russland) (Larsen 2010), og dette gjør elvemusling til en ansvarsart for Norge. Dette gjør bevaring av de norske populasjonene viktig også i en internasjonal sammenheng og forplikter oss til å opprettholde en god overvåking av tilstanden. Samtidig må det utarbeides effektive tiltak for å styrke reduserte bestander, men også bevaringsstrategier som opprettholder god status i populasjoner som fortsatt har god rekruttering. I en slik sammenheng behøver vi kunnskap om hvordan arten er genetisk strukturert mellom vassdrag, men også innad i vassdrag. I hvilken grad er populasjonene genetisk distinkte, og hvordan påvirker dette populasjonenes levedyktighet?

Elvemusling er en interessant art med mange fascinerende egenskaper. Den lever lenge, opptil 280 år, den har et parasittisk larvestadium på fisk, men er ellers lite mobil, den er en effektiv vannrenser og viktig element i vannhusholdningen (nøkkelart), og den lagrer miljøinformasjon i skallet. I Norge vet vi nå en del om artens utbredelse og biologi og generelle status i vassdragene våre, men mangler likevel fortsatt en del basiskunnskap for å kunne forvalte arten på en riktig måte.

Ferskvannsmuslinger har larver med et obligatorisk stadium på fisk, og muslinglarvene til arter i familien Margaritiferidae finnes bare på gjellene til ulike laksefisk (Ziuganov mfl. 1994). Verten til elvemusling, *Margaritifera margaritifera* (L.) er laks, *Salmo salar* (L.) og ørret, *Salmo trutta* (L.) i Europa (Young & Williams 1984, Bauer 1987a, Ziuganov mfl. 1994) og laks og bekkerøye, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill) i Nord-Amerika (Smith 1976, Cunjak & McGladdery 1991).

Laks er primærvert for elvemusling i Nova Scotia (Cunjak & McGladdery 1991) og Russland (Ziuganov mfl. 1994). Bauer (1987a; b) antyder at laks blir viktigere som vertsfisk jo lenger nord man kommer. I vassdrag i Skottland synes det å være overlapp i utnyttelsen av laks og ørret (Hastie & Young 2001; 2003). Ved undersøkelser i Norge er det funnet at laks var primærvert i flere av vassdragene der laks dominerte i antall (Larsen 2009, Larsen & Berger 2004a; 2007a; 2010, Larsen & Aspholm 2007, Larsen & Karlsen 2010, Larsen & Saksgård 2010, Larsen mfl. 2000a). I mindre anadrome vassdrag, der sjørøret dominerte i antall, ble det funnet eksempler på at ørret var primærvert (Larsen 2006, Larsen & Berger 2005a; 2007b). Andre lokaliteter, som er rene ørretbekker, har muslinglarver bare på ørret (Larsen & Berger 2005b, Larsen & Aspholm 2005, Larsen mfl. 2007b; 2008). I ett vassdrag der laks ble satt ut ovenfor anadrom strekning ble det ikke funnet muslinglarver på laksungene – bare på de stedegne ørretungene (Larsen mfl. 2002a, Larsen & Berger 2009b).

Det er derfor satt fram en hypotese om at larvene til elvemusling er svært spesialiserte i krav til vertsfisk, og bare kan utvikle seg normalt på enten laks eller ørret, og ikke nødvendigvis på begge arter i et vassdrag eller del av vassdrag. Dette har fått oss til å introdusere begrepene «laksemusling» og «ørretmusling». Laksemusling og ørretmusling kan forekomme i samme vassdrag (Larsen mfl. 2000a, 2002b; Larsen & Berger 2004a). I vassdrag med både laksemusling og ørretmusling er det også funnet at ørretmuslingen slipper larvene ut i vannet 3-4 uker tidligere enn laksemuslingen. Muslinglarvene på ørret (fra ørretmusling) er derfor større enn larvene på laks (fra laksemusling) på samme tidspunkt. Det er også vist at det er morfologiske forskjeller eller vekstforskjeller mellom laksemusling og ørretmusling i samme vassdrag (Larsen mfl. 2002b, Dunca mfl. 2010). Dette har åpenbart forvaltningsmessige konsekvenser i arbeidet med å styrke bestander av elvemusling, i forbindelse med reetablering av elvemusling, og flytting eller reintroduksjoner til vassdrag der bestandene har dødd ut. Vi ser at det ikke lenger er vilkårlig hvor muslingene kommer fra, og hvilken fiskeart de lever sammen med.

I det videre arbeidet ble det viktig å få klarlagt den taksonomiske statusen til «laksemusling» og «ørretmusling». Kunne det la seg gjøre å finne klare genetiske forskjeller som skilte «laksemusling» og «ørretmusling» slik at de to gruppene kunne identifiseres og la seg skille fra hverandre? Selv om det i de senere årene er gjennomført genetiske studier på elvemusling i ulike sammenhenger flere steder i Europa (Machordom mfl. 2003, Geist & Kuehn 2005, Hadzihalilovic-Numanovic 2005, Hadzihalilovic-Numanovic & Arvidsson 2007, Bouza mfl. 2007, Geist mfl. 2010, Cauwelier mfl. 2009, Cauwelier mfl. 2012), er det ingen som tidligere har testet genetisk variasjon mellom muslingpopulasjoner med hensyn til vertsart. Cauwelier mfl. (2009) ser riktignok en splitting av elvemusling-populasjonene i Storbritannia i to fylogenetisk atskilte grupper, og Machordom mfl. (2003) beskriver to mitokondrielle linjer (nær beslektet): en nordlig linje som strakte seg fra Irland til Kola-halvøya inkludert Atlanterhavskysten, og et annet cluster som strakte seg fra Irland til den Iberiske halvøy. Men begge henfører dette til ulike innvandringsveier fra to adskilte refugier etter siste istid.

I Norge ble det startet en pilot-studie i 2007 der genetisk variasjon skulle undersøkes på elvemusling (Larsen mfl. 2011a). Materiale fra til sammen 19 lokaliteter (til sammen 25 innsamlingsstasjoner) ble undersøkt, og genetisk variasjon ble studert både innen en elvemuslingbestand, og mellom bestander. Innen en elvemuslingbestand var muslinger karakterisert som «ørretmusling» signifikant mindre genetisk variable enn muslinger karakterisert som «laksemusling», både målt som allelrikdom og forventet heterozygositet (Larsen mfl. 2011a). Den genetiske differensieringen var meget høy mellom bestander av «ørretmusling», og betydelig høyere enn mellom bestander av «laksemusling». Muslingpopulasjonenes vertsspesifisitet forklarte en betydelig større del (13 %) av den totale genetiske differensieringen enn det geografisk beliggenhet gjorde (2 %) (Larsen mfl. 2011a). De samlede observasjonene viste en sterk reproduktiv isolasjon mellom populasjoner av elvemusling i Norge, og spesielt gjaldt dette mellom populasjoner av «ørretmusling». Resultatene indikerte også at det fantes to evolusjonært distinkte grupper av elvemusling: de som brukte ørret som vert og de som brukte laks som vert. Dette var ny kunnskap, og et viktig bidrag i utviklingen av gode forvaltningsstrategier for å bevare det genetiske mangfoldet til elvemusling i Norge.

Prosjektet ble utvidet med nye lokaliteter i 2011-2012, bl.a. i Namsenvassdraget (relikt laksestamme og sjøvandrende laks) og Hestadelta (sjørret). I tillegg ble det lagt opp til å undersøke flere individer fra enkelte av lokalitetene som var undersøkt tidligere for å se om antall prøver hadde noen betydning for konklusjonene. I tillegg skulle det utprøves nye metoder for prøvetaking som ikke skadet eller drepte forsøksindividene. Resultatene fra dette prosjektet presenteres i denne rapporten.

2 Genetisk variasjon hos elvemusling *Margaritifera margaritifera* (L.) i Norge

Sten Karlsson, Bjørn Mejdell Larsen, Torveig Balstad, Line Eriksen & Kjetil Hindar

2.1 Innledning

Norge har gjennom konvensjonen om biologisk mangfold forpliktet seg til å bevare sitt biologiske mangfold (biodiversitet) på økosystem-, arts- og gennivå. En vanlig oppfatning er at bevaring av økosystem og naturtyper også bevarer arter, og at bevaring av arter også bevarer genetisk variasjon innen arten. Men det finnes etter hvert en anerkjennelse av at bevaring av arter ikke nødvendigvis bevarer det genetiske mangfoldet innen artene. Bevaring av genetisk mangfold har imidlertid fått liten oppmerksomhet innen det praktiske naturvernarbeidet (Laikre mfl. 2010).

Undersøkelser av genetisk variasjon innen arter gjør det mulig å oppdage forskjeller som ikke nødvendigvis gir seg uttrykk i åpenbare morfologiske forskjeller. Larsen mfl. (2011a) stilte spørsmål ved om det kunne finnes to funksjonelle typer av elvemusling basert på ulike populasjoners avhengighet av enten laks eller ørret som vert for muslingens larver. Det er også rapportert om forskjellig utnyttelse av ørret og laks som vert i Skottland (Hastie & Young 2001), og Bauer (1987a; b) antydte at laks ble viktigere som vert jo lenger nord man kom uten at dette ble koblet mot genetiske forskjeller mellom populasjoner.

Det er en generell oppfatning at elvemusling har en kompleks populasjonsstruktur (Geist & Kuehn 2005, Bouza mfl. 2007, Geist mfl. 2010) som i liten grad synes å være sammenfallende med populasjonsstrukturen til vertsfisken (Geist mfl. 2010). Elvemuslingen og dens vert har ulike livshistoriestrategier og habitatkrav (Geist & Kuehn 2008), og det virker ikke som om høy tetthet av for eksempel ørret alene er avgjørende for å opprettholde en høy rekruttering hos elvemusling (Geist mfl. 2006).

I Norge har vi observert at laks er primærvert i vassdrag som domineres av laks (Larsen 2009, Larsen & Berger 2004a; 2007a; 2010, Larsen & Aspholm 2007, Larsen & Karlsen 2010, Larsen & Saksgård 2010, Larsen mfl. 2000a), mens det i mindre anadrome vassdrag der sjørret dominerer er observert at ørret er primærvert (Larsen 2006, Larsen & Berger 2005a; 2007b). I andre ikke-anadrome vassdrag har elvemusling ørret som eneste vert (Larsen & Berger 2005b, Larsen & Aspholm 2005, Larsen mfl. 2007b; 2008). Der laks settes ut oppstrøms anadrom strekning har man ikke funnet muslinglarver på laks, bare på ørret (Larsen mfl. 2002a, Larsen & Berger 2009b). Alle disse observasjonene førte fram til hypotesen om at det finnes to typer av elvemusling: «ørretmusling» og «laksemusling» og at disse representerer to evolusjonært adskilte typer. I tillegg ble det i vassdrag med både «ørretmusling» og «laksemusling» funnet at «ørretmuslingene» frigjorde muslinglarvene 3-4 uker tidligere enn «laksemuslingene», og det ble også funnet ulik vekstshastighet hos de to typene (Larsen mfl. 2002b, Dunca mfl. 2010).

Målet med studien er å underbygge hypotesen som tidligere er framsatt, om at det finnes genetiske variasjoner både mellom og innen bestander av elvemusling, som i stor grad forklares av hvilken fiskeart som er primærvert for muslingenes larver i de ulike bestandene. Analyser av et materiale samlet inn i 2006-2010 (Larsen mfl. 2011) supplert med flere lokaliteter samlet inn i 2011-2012 blir presentert her.

2.2 Materiale og metode

2.2.1 Innsamling

I forbindelse med dette prosjektet ble det utviklet en innsamlingsmetode for DNA-prøver som i ubetydelig grad skader muslingene (Karlsson mfl. 2013; kapittel 3 i denne rapporten). Dette har gjort det mulig å samle inn prøver fra levende muslinger, og prøvetakingen kan lett utvides til flere individer enn det som for eksempel blir samlet inn i forbindelse med det nasjonale overvåkningsprogrammet på elvemusling (Larsen mfl. 2000b). **Figur 1** gir en geografisk oversikt over innsamlingsstasjoner som har inngått i analysene. Med bakgrunn i tidligere feltundersøkelser er primærvert for elvemusling for hver lokalitet og delpopulasjon oppgitt til enten laks eller ørret (**tabell 1**). Materialet fordeler seg på 17 lokaliteter/delpopulasjoner med laks som primærvert og 16 lokaliteter/delpopulasjoner med ørret som primærvert (**tabell 1**). **Tabell 2** oppsummerer innsamlingen av prøver i 2006-2012. Det er foreløpig samlet inn prøver til analyse av genetisk variasjon i 27 lokaliteter/elver fordelt på fire geografisk begrensede områder i Norge: Finnmark (2 elver), Trøndelag/Nordland (11 elver), Rogaland/Hordaland (8 elver) og Østlandet (6 elver) (**figur 1**; **tabell 2**). I tre av elvene i Trøndelag (Aursunda, Mossa og Figga) er det undersøkt to stasjoner i hver elv. I Oga (Trøndelag) er det undersøkt i alt fire stasjoner. Til sammen utgjør materialet 33 uavhengige datasett som er analysert med hensyn til genetisk variasjon. Prøvematerialet som ble undersøkt av Larsen mfl. (2011a) ble utvidet og supplert med flere individer på 12 av lokalitetene/stasjonene (Begna, Hoenselva, Oga, Håelva, Figgjo, Skeivikbekken, Svinesbekken, Borråselva, Mossa (to delpopulasjoner) og Aursunda (to delpopulasjoner), og til sammen åtte nye lokaliteter ble inkludert (Hunnselva, Fallselva, Lerangsbekken, Oselva, Forneselva, Bjøra, Mellingselva og Hestadelva).

2.2.2 DNA ekstraksjon

DNA (arvestoffet) ble ekstrahert fra spritfikserte prøver av fremre lukkemuskel i 2006-2011 og fra Q-tip prøver oppbevart i lysis buffer i 2011-2012 (nærmere omtalt i kapittel 3 i denne rapporten), ved bruk av henholdsvis E.Z.N.A.TM tissue DNA kit og E.Z.N.A.TM microelute genomic DNA kit (E.Z.N.A.®, Omega Bio-Tek Inc, Norcross).

2.2.3 Genotyping av mikrosatellitter

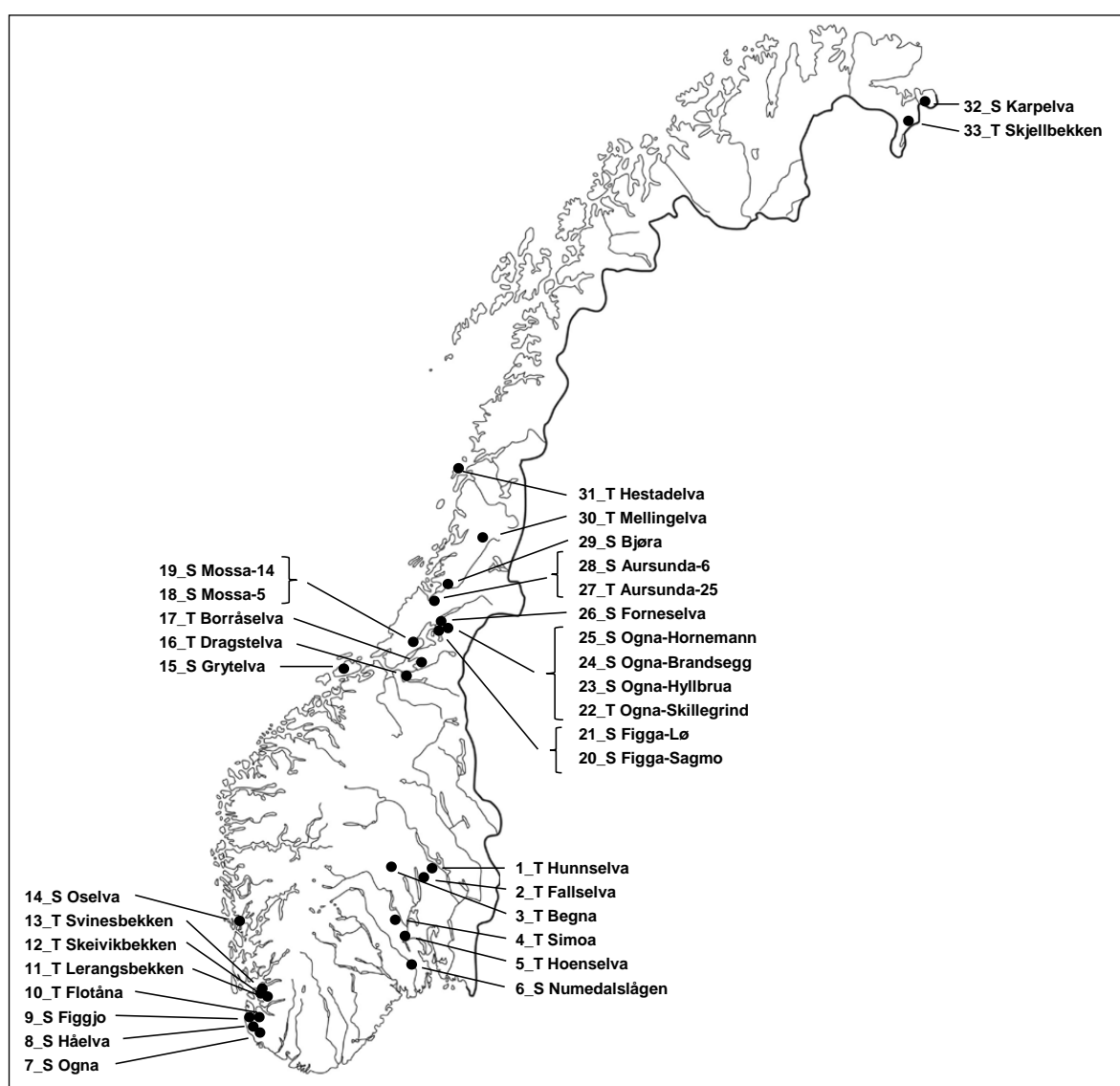
I alt ble 812 individer fordelt på 33 forskjellige stasjoner (**figur 1**) genotypet for åtte mikrosatellitt markører. PCR ble utført i to ulike multiplexer bestående av følgende mikrosatellitter: MarMa3050, MarMa3621, MarMa4322, MarMa4726, MarMa2671, MarMa4143, MarMa5167, MarMa5280 (Geist mfl. 2003). Hver multiplex PCR ble utført i et totalt reaksjonsvolum av 10 µl, bestående av henholdsvis 4,2 µM og 3,4 µM av primere for multiplex 1 og multiplex 2, men med forskjellige konsentrasjoner for hvert primerpar, 0,8 mM av hver dNTP, 1X reaksjonsbuffer bestående av 15mM MgCl og 1 unit av Hotstar polymerase (QiaGen). PCR ble kjørt på en Quattro Cycler (VWR) med følgende program: Denaturering i 15 minutter ved 95 °C: 30 sykluser med denaturering ved 94 °C i 30 sekunder, avkjøling ved 55 °C i 30 sekunder og extension ved 72 °C i 45 sekunder. PCR ble avsluttet med et siste extension-steg ved 72 °C i 10 minutter. Fragmentene fra hver multiplex ble separert og visualisert med en ABI 3130xl DNA sekvenseringsmaskin (Applied Biosystems) og fragmentstørrelsene (antall basepar i hvert allel) ble bestemt med GENEMAPPER ver. 3.7 (Applied Biosystems).

2.2.4 Dataanalyser

Genepop v.4 (Raymond & Rousset 1995) ble brukt for å teste for mulige avvik fra genetisk (Hardy-Weinberg) likevekt, homogenitetstest av allelfrekvenser mellom populasjoner, beregning av forventet og observert heterozygositet og beregning av F_{ST} (det vanligst brukte mål på genetisk differensiering) (Weir & Cockerham 1984). Mulige genotypingsfeil ble undersøkt med hjelp av MICRO-CHECKER (Van Oosterhout mfl. 2004). Estimat på antall forskjellige alleler i en

populasjon uavhengig av antall prøver (allelrikdom; engelsk: allelic richness) ble utført i FSTAT v. 2.9.3 (Goudet 2001). For å teste om det var forskjell i forventet heterozygositet, allelrikdom og F_{ST} mellom grupper av populasjoner ble det benyttet opsjonen for dette i FSTAT v. 2.9.3 (Goudet 2001) med 1000 permutasjoner. Populasjonene ble gruppert etter vertstilhørighet. Testen gjøres ved at muslingpopulasjonene plasseres tilfeldig i en av gruppene. Forskjellen mellom gruppene for den valgte parameteren estimeres, hvorefter prosedyren repeteres et valgt antall ganger. P-verdien er andelen av gangene det observerte estimatet er høyere enn det randomiserte.

Fordeling av den totale genetiske variasjonen til populasjoner og vertstilhørighet ble undersøkt med AMOVA (Analysis of Molecular Variance), implementert i Arlequin ver. 3.5.1.2 (Schneider mfl. 2000). Lokalitetene (egentlig innsamlingsstasjonene) ble gruppert i to ulike vertsgrupper (ørret og laks). Den totale genetiske populasjonsstrukturen ble visualisert i en prinsipalkomponentanalyse (PCA, principal component analysis) basert på Neis parvise genetiske distanser (Nei 1972).



Figur 1. Angivelse av lokaliteter (elver) og populasjoner/delpopulasjoner (egentlig innsamlingsstasjoner) der det er samlet inn DNA prøver fra elvemusling inkludert i denne studien.

Tabell 1. Angivelse av antatt primærvert for elvemusling i de ulike lokalitetene og innsamlingsstasjonene med kommentarer og kildehenvisninger.

Lokalitet	Vertsfisk	Kommentar	Kilde
1_T Hunnselva	Ørret		Larsen 1998, Larsen & Hårsaker 2002a, Larsen & Berger 2009a
2_T Fallselva	Ørret		Ikke undersøkt
3_T Begna	Ørret		Larsen 2000
4_T Simoa	Ørret	Forekomst av larver på ørret lavere enn forventet	Larsen mfl. 2007b
5_T Hoenselva	Ørret	Laks settes ut, men ikke funnet larver på disse	Larsen & Hårsaker 2002b, Larsen mfl. 2002a, Larsen & Berger 2009b
6_S Numedalslågen	Laks	Ørret finnes, men ikke funnet larver på disse	Sandaas mfl. 2012
7_S Ognå	Laks	Ørret finnes, men ikke funnet larver på disse	Larsen & Brørs 1998, Larsen mfl. 2012a
8_S Håelva	Laks (ørret)	Sporadisk forekomst av larver på ørret	Larsen & Berger 2004b, Larsen & Berger 2010
9_S Figgjo	Laks (ørret)	Ingen/sporadisk forekomst av larver på ørret	B.M.Larsen upublisert materiale
10_T Flotåna	Ørret		B.M.Larsen upublisert materiale
11_T Lerangsbekken	Ørret		B.M.Larsen upublisert materiale
12_T Skeivikbekken	Ørret	Laks forekommer sporadisk, men ikke funnet larver på disse	Larsen & Berger 2005a, Larsen 2011
13_T Svinesbekken	Ørret		Larsen & Berger 2005b, Larsen 2011
14_S Oselva	Laks (ørret)	Sporadisk forekomst av larver på ørret	Larsen mfl. 2007a
15_S Grytelva	Laks og ørret (?)	Usikker. Varierende forekomst av larver på ørret – laks primærvert	Larsen mfl. 2004, Larsen & Saksgård 2010
16_T Dragstelva	Ørret		Ikke undersøkt
17_T Borråselva	Ørret		Larsen & Hårsaker 2001, Larsen mfl. 2008
18_S Mossa-5	Laks eller ørret (?)	Oppgang av laks stanset pga vannkraftregulering. Forekomst av larver på ørret lavere enn forventet - laks sannsynlig primærvert	Larsen & Saksgård 2012c
19_S Mossa-14	Laks eller ørret (?)		Ikke undersøkt
20_S Figga-Sagmo	Laks (ørret)	Sporadisk forekomst av larver på ørret	Larsen mfl. 2000a, Larsen mfl. 2011b, Larsen & Saksgård 2012a; 2013
21_S Figga-Lø	Laks (ørret)	Sporadisk forekomst av larver på ørret	Larsen mfl. 2000a, Larsen mfl. 2011b, Larsen & Saksgård 2012a; 2013
22_T Ognå-Skillegrind	Ørret		Larsen mfl. 2000a, Larsen mfl. 2011b
23_S Ognå-Hyllbrua	Laks eller ørret (?)	Usikker. Oppgang av laks stanset pga Gyro. Forekomst av larver på ørret lavere enn forventet	Larsen mfl. 2000a, Larsen mfl. 2011b, Larsen & Saksgård 2012a; 2013
24_S Ognå-Brandsegg	Laks (ørret)	Sporadisk forekomst av larver på ørret	Larsen mfl. 2000a, Larsen mfl. 2011b, Larsen & Saksgård 2012a; 2013
25_S Ognå-Hornemann	Laks (ørret)	Sporadisk forekomst av larver på ørret	Larsen mfl. 2000a, Larsen mfl. 2011b, Larsen & Saksgård 2012a; 2013
26_S Forneselva	Laks eller ørret (?)	Usikker. Oppgang av laks stanset pga kraftverksdemning. Forekomst av larver på ørret lavere enn forventet	Larsen & Saksgård 2012b
27_T Aursunda-25	Ørret	Ovenfor naturlig anadrom strekning. Laks forekommer, men ikke funnet larver på disse	Larsen & Berger 2004a, Larsen & Saksgård 2011
28_S Aursunda-6	Laks (ørret)	Sporadisk forekomst av larver på ørret	Larsen & Berger 2004a, Larsen & Saksgård 2011
29_S Bjøra	Laks (ørret)	Sporadisk forekomst av larver på ørret	B.M.Larsen upublisert materiale
30_T Mellingelva	Ørret	Laks (Namsblank) forekommer vanlig, men ikke funnet larver på disse	B.M.Larsen upublisert materiale
31_T Hestadelva	Ørret	Laks forekommer sporadisk, men ikke funnet larver på disse	Larsen & Berger 2007b, Larsen & Bjørland 2012
32_S Karpelva	Laks (ørret)	Sporadisk forekomst av larver på ørret	Larsen & Aspholm 2007, Larsen & Aspholm under arbeid
33_T Skjellbekken	Ørret		Larsen & Aspholm 2005, Ieshko mfl. 2009, Larsen & Aspholm 2011

Tabell 2. Lokalitet, dato for innsamling, antall og skallengde på muslinger som er samlet inn i forbindelse med genetiske analyser av elvemusling, enten i form av vevsprøver på sprit eller i form av ikke-letale Q-tip-prøver. Lokalitetene er nummerert fra 1 til 33 fulgt av S eller T som står for laks (salmon) og ørret (trout), og angir at vertsfisk på innsamlingslokaliteten er vurdert å være henholdsvis laks og ørret (se **tabell 1**). Lokalitet er videre angitt med navn på elva og en stasjonsbetegnelse for lokaliteter med flere innsamlingsstasjoner (Mossa, Figga, Ogna og Aursunda).

Lokalitet	Stasjon	Dato innsamling	Antall		Skallengde, mm
			Vev sprit	Q-tip buffer	
1_T Hunnselva		14.10.2011	0	30	90,3 – 118,3
2_T Fallselva		14.10.2011	0	15	74,0 – 111,8
3_T Begna		03.08.2010 og 15.10.2011	15	15	72,0 – 109,7
4_T Simoa		04.08.2010	15	0	92,8 – 140,1
5_T Hoenselva		04.08.2010 og 16.10.2011	15	15	89,1 – 107,4
6_S Numedalslågen		21.09.2009	15	0	59,2 – 142,9
7_S Ogna		30.08.2008, 21.08.2010, 26.-28.08.2011	15	30	72,6 – 149,4
8_S Håelva		20.08.2010 og 21.08.2011	15	15	77,9 – 134,0
9_S Figgjo		21.10.2006 og 28.08.2011	15	15	78,3 – 131,8
10_T Flotåna		22.10.2006	10	0	71,3 – 110,4
11_T Lerangsbekken		27.05.2012	0	30	97,4 – 123,6
12_T Skeivikbekken		22.08.2010 og 20.08.2011	10	20	97,1 – 134,1
13_T Svinesbekken		22.10.2006 og 19.08.2011	15	15	67,1 – 104,0
14_S Oselva		24.05.2012	0	30	49,7 – 144,1
15_S Grytelva		07.07.2009	10	0	102,1 – 128,0
16_T Dragstelva		31.08.2009 og 18.09.2010	13	0	64,7 – 110,8
17_T Borråselva		13.10.2010 og 01.06.2011	60*	15	77,5 – 108,5
18_S Mossa	5 - Stokkleivvatn	20.05.2010 og 05.08.2011	4	30	91,2 – 144,6
19_S Mossa	14 - L. Meltingen	05.08.2011	0	30	87,6 – 136,3
20_S Figga	Sagmo	28.06.2009	10	0	88,3 – 130,2
21_S Figga	Lø	28.06.2009	10	0	72,3 – 114,7
22_T Ogna	Skillegrind	28.06.2009	15	0	81,4 – 105,2
23_S Ogna	Hyllbrua	28.06.2009	15	0	96,3 – 136,5
24_S Ogna	Brandsegg	28.06.2009	10	0	102,9 – 140,4
25_S Ogna	Hornemann	28.06.2009	10	0	72,5 – 125,0
26_S Forneselva		07.09.2011	0	30	91,7 – 151,9
27_T Aursunda	25 – Gammelsagelva	24.08.2009 og 04.08.2011	10	20	69,2 – 103,7
28_S Aursunda	6 – Svartfossen	24.08.2009 og 04.08.2011	10	20	58,9 – 110,0
29_S Bjøra		04.08.2011	0	30	75,2 – 126,6
30_T Mellingelva		10.07.2011	0	30	81,7 – 119,6
31_T Hestadelva		07.07.2011	0	30	56,8 – 106,6
32_S Karpelva		28.09.2010	15	0	70,6 – 109,2
33_T Skjellbekken		26.09.2010	15	0	49,3 – 109,9

* inkluderer vevsbit lukkemuskel (15), vevsbit kappe (15), fotskrap (15) og haemolymfe (15)

Populasjonsstrukturen ble også undersøkt ved individuell diskriminering til et gitt antall antatte populasjoner ved hjelp av programmet STRUCTURE (Pritchard mfl. 2000). Vi utførte 50.000 repetisjoner som "burn-in" og nye 100.000 repetisjoner etter "burn-in" uten å priori informasjon om opprinnelsespopulasjonen til muslingene. Enkelt beskrevet så ble muslingene sortert i et på forhånd bestemt antall populasjoner ut fra deres genotyper slik at avvik fra Hardy-Weinberg genotype-fordeling og koblings-ulikevekt mellom genetiske markører ble minimert. For hvert individ ble det oppnådd en sannsynlighet for å tilhøre de ulike antatte populasjonene. Det mest sannsynlige antall populasjoner som kunne avdekkes ved hjelp av denne metoden ble undersøkt ved å repetere analysene med forskjellig antall antatte populasjoner, og for hver analyse ble den estimerte logaritmiske sannsynligheten av data notert etterfulgt av estimering av sannsynligheter for forskjellige antall populasjoner i henhold til Pritchard mfl. (2000).

I fire forskjellige elver hadde vi prøver fra to eller flere populasjoner/delpopulasjoner (Mossa, Figga, Ognå og Aursunda), og fra to vassdragssystemer hadde vi prøver fra to lokaliteter innad i vassdraget (Figgjo-vassdraget og Namsen-vassdraget) (**figur 1**). Mulige forskjeller i allelrikdom og forventet heterozygositet mellom par av muslingstasjoner ble undersøkt med *Wilcoxon signed rank test* (ikke-parametrisk test) med hjelp av SPSS Statistics 18 (<http://www.spss.com/>) og genetisk differensiering (F_{ST}) ble estimert og testet i Genepop v.4 (Raymond & Rousset 1995). Lokaliteten «Hyllbrua» i Ognåvassdraget ble spesielt undersøkt for mulig innblanding av ørretmuslinger fra «Skillegrind» eller laksemuslinger fra «Brandegg» og «Hornemann». For dette ble den mest sannsynlige lokalitetstilhørigheten til de enkelte individene fra «Hyllbrua» angitt ved hjelp av en bayesiansk beregningsmetode (Rannala & Mountain 1997), implementert i GeneClass ver. 2.0 (Piry mfl. 2004).

2.3 Resultater

Trettisv individene av totalt 812 hadde mislykket genotyping for mer enn en av de åtte mikrosatellitt-markørerne. Disse ble ekskludert i videre analyser. Av de gjenværende 775 individene ble 657 genotypet for alle åtte markører og 118 manglet genotype for en markør. To markører (MarMa4726 og MarMa5167) hadde en tendens til underskudd av heterozygoter. Dette antyder at det er problemer med genotypingen i form av såkalte null-alleler, det vil si at en av to eksisterende genvarianter ikke blir oppdaget. Dette medfører at individet genotypes som homozygot selv om det i virkeligheten er heterozygot. Dette indikeres også av programmet MICRO-CHECKER. Disse to markørerne ble ekskludert i videre analyser.

Den genetiske variasjonen i form av gjennomsnittlig forventet heterozygositet innen lokaliteter/delpopulasjoner varierte fra 0,035 (22_T Ognå-Skillegrind) til 0,592 (20_S Figga-Sagmo) og i form av allelrikdom fra 1,2 (1_T Hunnselva og 22_T Ognå-Skillegrind) til 4,1 (25_S Ognå-Hornemann) (**tabell 3**). De fleste ørretmusling-lokalitetene hadde en lavere genetisk variasjon enn laksemusling-lokalitetene (**figur 2 og 3**), og som grupper hadde ørretmusling-lokalitetene en signifikant lavere heterozygositet og allelrikdom sammenliknet med laksemusling-lokalitetene. Det var imidlertid en større genetisk differensiering mellom de ulike ørretmusling-lokalitetene sammenliknet med de ulike laksemusling-lokalitetene (**tabell 4**).

Genetisk differensiering mellom lokaliteter er visualisert i **figur 4**. I grove trekk danner lakse- og ørretmusling-populasjonene atskilte kluster. Unntakene fra dette synes å være ørretmuslinger fra Simoa, Dragstelva og Skjellbekken som ligger i utkanten av gruppen med laksemuslinger. **Figur 4** viser også at ørretmusling-lokalitetene er betydelig mer genetisk adskilt fra hverandre enn de ulike laksemusling-lokalitetene. Forskjellen mellom ørretmusling- og laksemusling-lokaliteter som grupper var også tydelig, da 11,43 % av den totale genetiske variasjonen kunne tilskrives forskjeller mellom gruppene (**tabell 5**). De genetiske forskjellene mellom populasjoner innen vertsgruppe (laks eller ørret) var imidlertid større (15,16 %). Dette kan hovedsakelig tilskrives variasjonen mellom ørretmusling-lokaliteter (**tabell 4**).

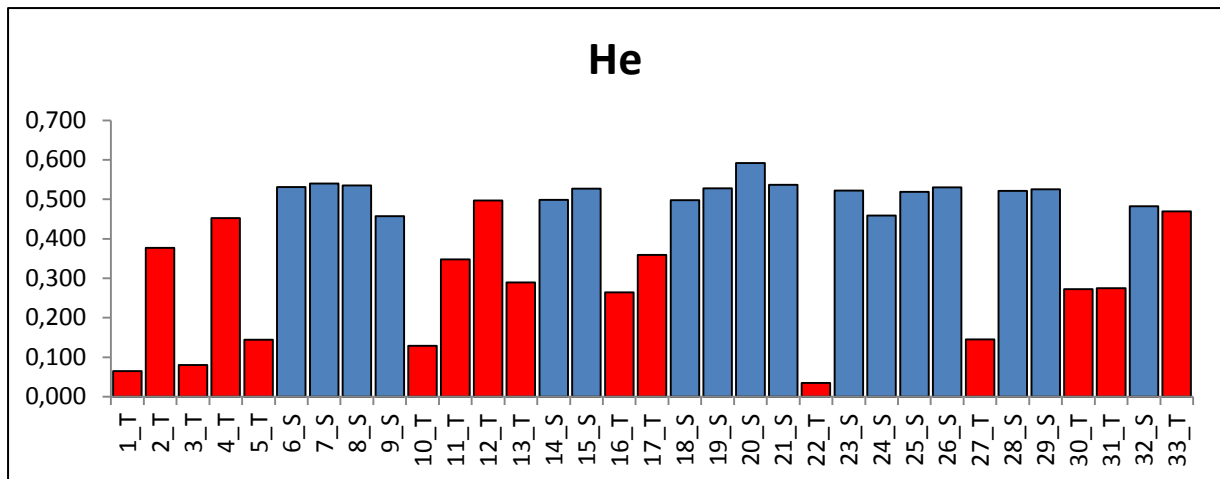
Populasjonsstrukturen ble ytterligere undersøkt ut fra individuelle genetiske profiler ved hjelp av STRUCTURE. Da samtlige prøver ble analysert var det mest sannsynlige antall populasjoner åtte ($P = 0,98$), men da bare ørretmuslingene ble analysert var det mest sannsynlige antall populasjoner 14 ($P = 0,99$). Da bare laksemuslinger ble inkludert i analysen kunne ingen populasjonsstruktur detekteres. **Figur 5** visualiserer resultatet med individuell diskriminering til åtte antatte populasjoner. Som vist i **figur 4** er ørretmusling-lokalitetene betydelig mer strukturert enn laksemusling-lokalitetene som ikke kan diskrimineres uten *a priori* gruppering til innsamlingslokalitet. Dette viser at man kan tilordne enkeltindivider av ørretmusling med relativt stor presisjon til «riktig» opphavspopulasjon. Enkeltindivider av laksemusling derimot kan ikke tilordnes til opphavspopulasjon. Unntaket er ørretmuslinger fra 4_T Simoa, 16_T Dragstelva og 33_T Skjellbekken som ikke blir tilordnet til diskrete populasjoner, og i så måte ligner laksemuslingene. Figuren viser også at laksemuslingene til en viss grad har en genetisk profil forskjellig fra de fleste ørretmuslingene. Alle laksemuslinger tilordnes i de fleste tilfeller i relativt

stor grad til én av populasjonene (populasjonen kodet med rød farge), mens ørretmuslingene i liten grad tilordnes til denne populasjonen.

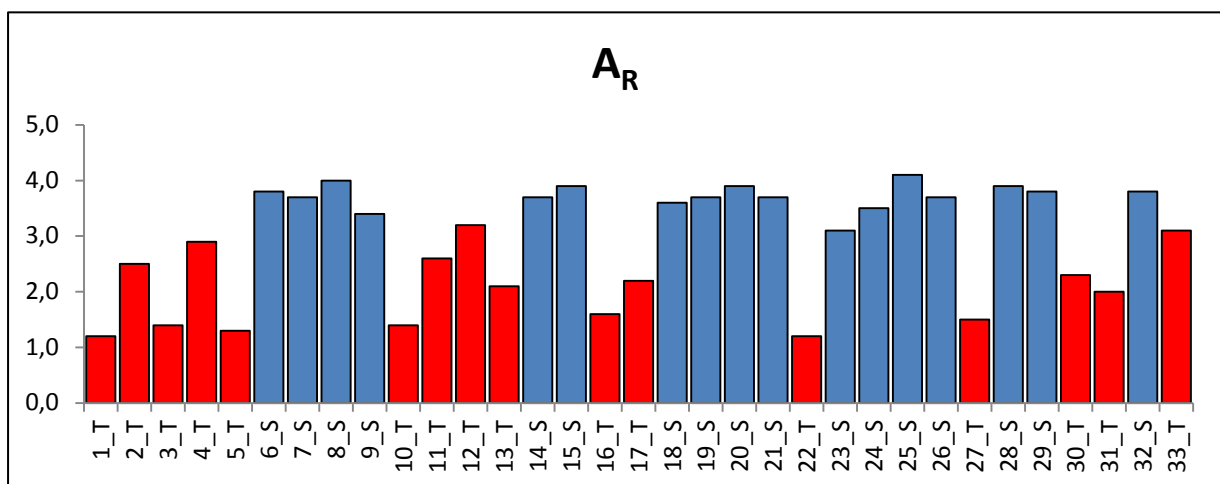
I en sammenlikning av lokaliteter innen samme vassdragssystem var det stor og signifikant genetisk differensiering mellom innsamlingsstasjoner med elvemusling med forskjellig vertstilhørighet (Figgjovassdraget; **tabell 6** og Namsenvassdraget; **tabell 7**). Dette var også tilfellet mellom ulike innsamlingslokaliteter i samme lokalitet (elv) med forskjellig vertstilhørighet (Ogna; **tabell 8** og Aursunda; **tabell 9**). På ulike innsamlingsstasjoner innen samme lokalitet (elv) med lik vertstilhørighet var det ingen signifikant genetisk differensiering (Mossa; **tabell 10** og Figga; **tabell 11**). Ørretmusling-lokalitetene oppviste signifikant lavere genetisk variasjon (heterozygositet og allelrikdom) enn laksemusling-lokalitetene innen samme vassdrag. Forskjellige laksemusling-lokaliteter innen samme vassdrag oppviste ikke genetiske forskjeller, unntatt lokaliteten 23_S Hyllbrua i Ognavassdraget (**tabell 8**). Denne lokaliteten var signifikant genetisk forskjellig fra 24_S Brandsegg ($P = 0,009$) og 25_S Hornemann ($P = 0,033$), og hadde en signifikant lavere allelrikdom ($P = 0,043$) enn 25_S Hornemann.

Tabell 3. Oppsummert statistikk fra seks mikrosatellitt-markører fra 33 lokaliteter og delpopulasjoner (egentlig innsamlingsstasjoner) med elvemusling. N er antall undersøkte muslinger, H_e er gjennomsnittlig forventet heterozygositet, H_o er gjennomsnittlig observert heterozygositet, $\#A$ er gjennomsnittlig observert antall ulike alleler, A_R er gjennomsnittlig allelrikdom (allelic richness) basert på syv diploide individer, P_{H-W} er sannsynlighet for Hardy-Weinberg likevekt.

Lokalitet	N	H_e	H_o	$\#A$	A_R	P_{H-W}
1_T Hunnselva	30	0,065	0,017	1,3	1,2	-
2_T Fallselva	15	0,377	0,400	3,0	2,5	0,878
3_T Begna	30	0,080	0,090	1,7	1,4	1
4_T Simoa	15	0,452	0,520	3,5	2,9	0,769
5_T Hoenselva	30	0,144	0,122	1,3	1,3	0,04
6_S Numedalslågen	15	0,531	0,519	5,2	3,8	0,203
7_S Ogna	40	0,540	0,542	6,8	3,7	0,509
8_S Håelva	30	0,535	0,562	7,2	4,0	0,663
9_S Figgjo	30	0,457	0,395	5,3	3,4	~0
10_T Flotåna	10	0,129	0,050	1,5	1,4	na
11_T Lerangsbekken	30	0,348	0,389	4,5	2,6	0,026
12_T Skeivikbekken	30	0,497	0,489	4,2	3,2	0,785
13_T Svinesbekken	30	0,289	0,288	2,8	2,1	0,534
14_S Oselva	30	0,499	0,478	6,3	3,7	0,022
15_S Grytelva	9	0,527	0,419	4,3	3,9	0,726
16_T Dragstelva	13	0,264	0,237	1,7	1,6	0,982
17_T Borråselva	56	0,359	0,339	3,2	2,2	0,161
18_S Mossa-5	33	0,498	0,509	5,5	3,6	0,657
19_S Mossa-14	29	0,528	0,516	6,3	3,7	0,998
20_S Figga-Sagmo	10	0,592	0,557	4,3	3,9	0,929
21_S Figga-Lø	9	0,537	0,486	4,0	3,7	0,707
22_T Ogna-Skillegrind	14	0,035	0,012	1,3	1,2	na
23_S Ogna-Hyllbrua	15	0,522	0,517	4,0	3,1	0,921
24_S Ogna-Brandsegg	10	0,459	0,517	4,0	3,5	1
25_S Ogna-Hornemann	8	0,519	0,500	4,3	4,1	0,844
26_S Forneselva	30	0,530	0,492	5,7	3,7	0,551
27_T Aursunda-25	29	0,145	0,086	1,7	1,5	~0
28_S Aursunda-6	29	0,521	0,525	6,3	3,9	0,866
29_S Bjøra	27	0,525	0,449	6,2	3,8	0,051
30_T Mellingelva	30	0,272	0,272	3,5	2,3	0,130
31_T Hestadelva	30	0,275	0,303	2,3	2,0	0,931
32_S Karpelva	14	0,482	0,369	5,0	3,8	0,030
33_T Skjellbekken	15	0,469	0,515	3,8	3,1	0,996



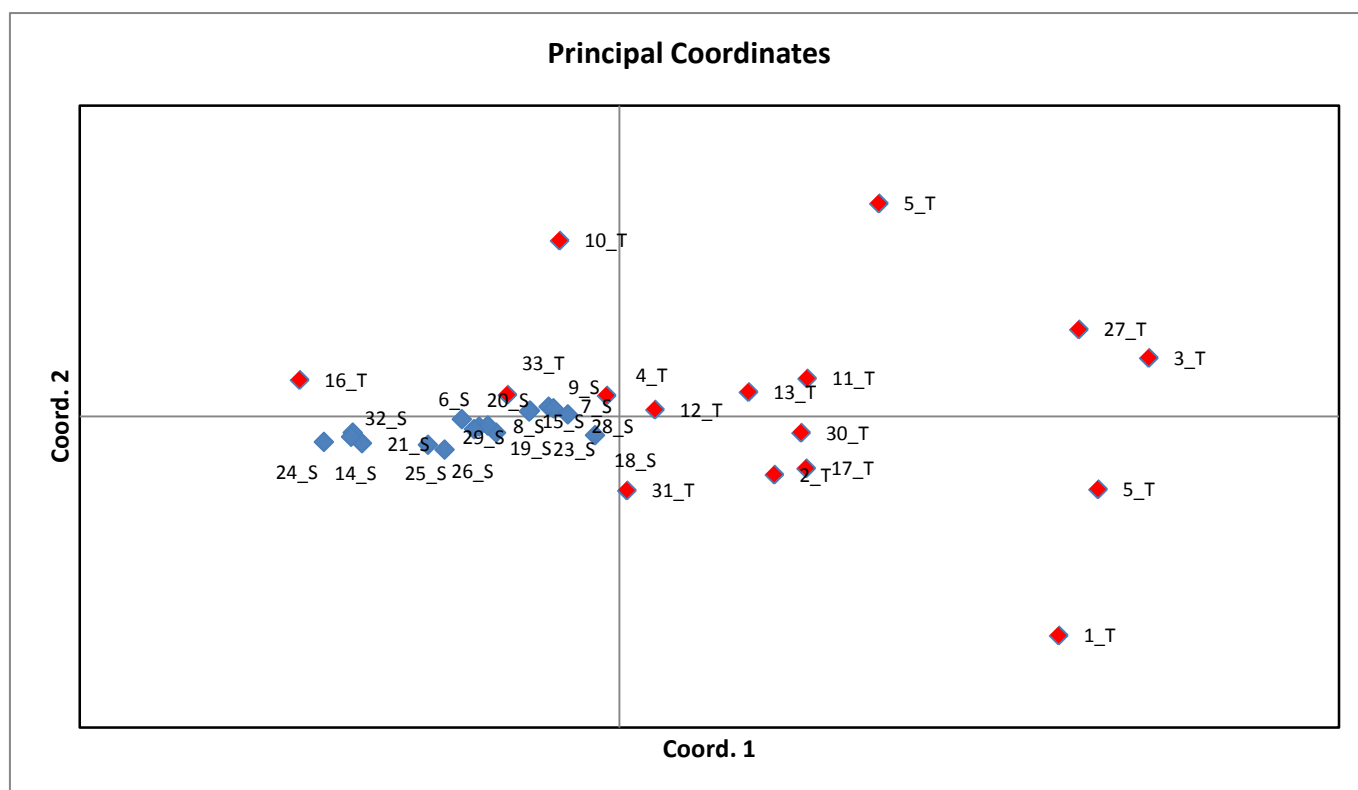
Figur 2. Gjennomsnittlig forventet heterozygositet estimert fra seks mikrosatellitt markører i 33 ulike bestander av elvemusling. Blå stolper er laksemusling og røde stolper er ørretmusling.



Figur 3. Gjennomsnittlig allelrikdom (allelic richness) estimert utfra syv diploide individer og seks markører for mikrosatellitter i 33 ulike bestander av elvemusling. Blå stolper er laksemusling og røde stolper er ørretmusling.

Tabell 4. Estimer og tester av forskjeller i allelrikdom (allelic richness), forventet heterozygositet og F_{ST} innen grupper av elvemusling-populasjoner som har laks eller ørret som primærvert for muslinglarvene.

Statistikk	Laks	Ørret	P-Verdi
Allelrikdom (allelic richness)	3,919	2,094	0,001
Forventet heterozygositet	0,513	0,267	0,001
F_{ST} (mellom populasjoner innen laks- og ørret-grupper)	0,025	0,345	0,001



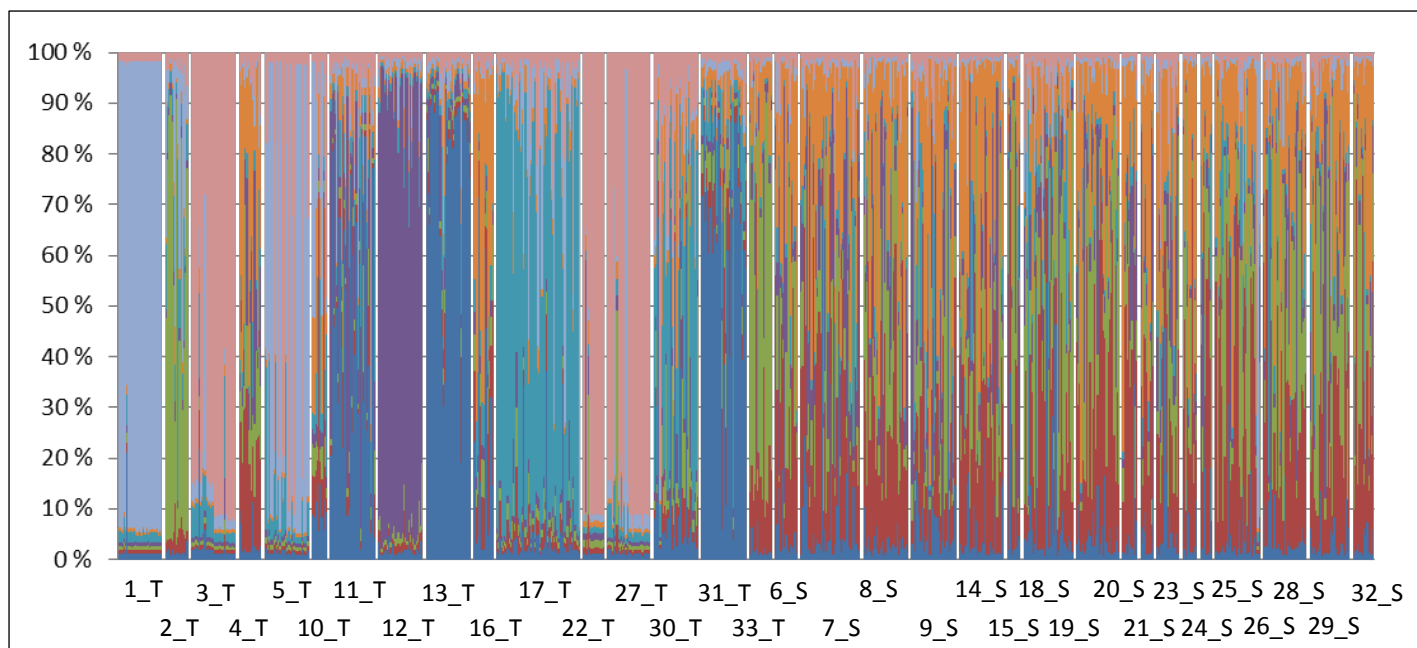
Figur 4. Prinsipalkomponentanalyse (PCA, principal component analysis) basert på Neis par-vise genetiske distanser fra 33 lokaliteter og delpopulasjoner (egentlig innsamlingsstasjoner) med elvemusling, estimert fra seks mikrosatellitt markører. Røde og blå diamanter er henholdsvis ørretmusling- og laksemusling-populasjoner. Navn og lokalisering av lokaliteter er gitt på **figur 1**.

Tabell 5. Analyse av molekylærgenetisk variasjon (AMOVA) ved bruk av seks mikrosatellitt markører i 33 lokaliteter og delpopulasjoner (egentlig innsamlingsstasjoner) med elvemusling. Populasjonene/delpopulasjonene er gruppert etter vertstilhørighet for å estimere hvor stor andel av den totale variasjonen som kan tilskrives vertstilhørighet, variasjon mellom populasjoner innen vertsgruppe og variasjon innen populasjoner/delpopulasjoner.

Alle populasjoner strukturert utfra vert	Prosent av total variasjon	P-Verdi
Mellom vert	11,43	~0
Mellom populasjoner innen vert	15,16	~0
Innen populasjoner/delpopulasjoner	73,50	~0

Tabell 6. Estimer og tester av forskjeller i allelrikdom (allelic richness), forventet heterozygositet og F_{ST} mellom to lokaliteter i Figgjovassdraget med ulik vertsart.

Statistikk	9_S Figgjo	10_T Flotåna	P-Verdi
Allelrikdom (Allelic richness)	3,353	1,450	0,043
Forventet heterozygositet	0,457	0,129	0,043
F_{ST}	0,2323		~0



Figur 5. Individuell genetisk tilordning til åtte antatte populasjoner fra 33 elvemusling-bestander ved bruk av STRUCTURE. Hver farge representerer ulike antatte populasjoner (åtte ulike farger). Individene er ordnede etter bestand. De første 15 bestandene er ørretmuslinger og de siste 18 er laksemuslinger.

Tabell 7. Estimer og tester av forskjeller i allelrikdom (allelic richness), forventet heterozygositet og F_{ST} mellom to lokaliteter i Namsenvassdraget med ulik vertsart.

Statistikk	30_T Mellingelva	29_S Bjøra	P-Verdi
Allelrikdom (Allelic richness)	2,262	3,844	0,028
Forventet heterozygositet	0,272	0,525	0,075
F_{ST}	0,2237		~0

Tabell 8. Estimer og tester (P-verdi i parentes) av forskjeller i allelrikdom (allelic richness), forventet heterozygositet og F_{ST} mellom fire delpopulasjoner (innsamlingsstasjoner) i Ognå med ulik vertsart på Skillegrind sammenlignet med Hyllbrua, Brandsegg og Hornemann.

Statistikk	Lokalitet	22_T Skillegrind	23_S Hyllbrua	24_S Brandsegg
A_R	23_S Hyllbrua	3,1/1,2 (0,043)		
	24_S Brandsegg	3,5/1,2 (0,043)	3,5/3,1 (0,983)	
	25_S Hornemann	4,1/1,2 (0,043)	4,1/3,1 (0,043)	4,1/3,5 (0,255)
H_e	23_S Hyllbrua	0,52/0,035 (0,043)		
	24_S Brandsegg	0,46/0,035 (0,043)	0,46/0,52 (0,255)	
	25_S Hornemann	0,52/0,035 (0,043)	0,52/0,52 (0,686)	0,52/0,46 (0,08)
F_{ST}	23_S Hyllbrua	0,361 (P~0)		
	24_S Brandsegg	0,597 (P~0)	0,076 (P=0,009)	
	25_S Hornemann	0,568 (P~0)	0,037 (P=0,033)	0,029 (P=0,232)

Tabell 9. Estimer og tester av forskjeller i allelrikdom (allelic richness), forventet heterozygositet og F_{ST} mellom to delpopulasjoner (innsamlingsstasjoner) i Aursunda med ulik vertsart.

Statistikk	27_T Aursunda – 25	28_S Aursunda-6	P-Verdi
Allelrikdom (Allelic richness)	1,472	3,884	0,028
Forventet heterozygositet	0,145	0,521	0,028
F_{ST}	0,3645		~0

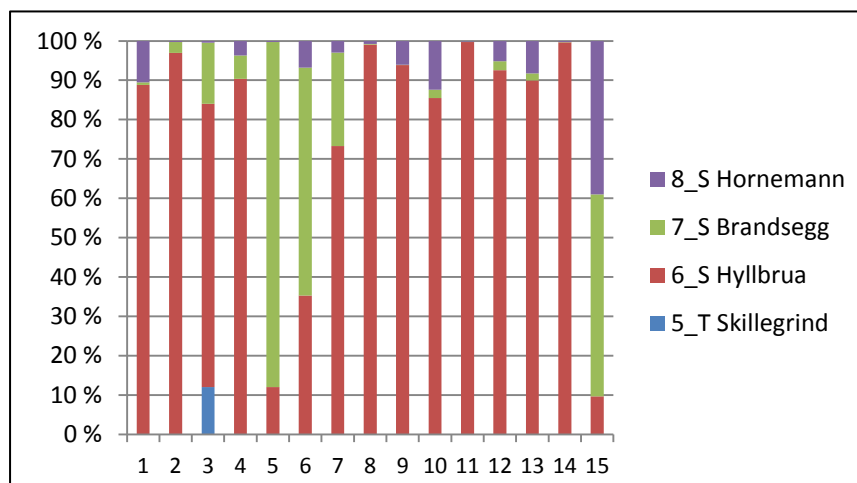
Tabell 10. Estimer og tester av forskjeller i allelrikdom (allelic richness), forventet heterozygositet og F_{ST} mellom to delpopulasjoner (innsamlingsstasjoner) i Mossa med samme vertsart.

Statistikk	19_S Mossa – 14	18_S Mossa – 5	P-Verdi
Allelrikdom (Allelic richness)	3,744	3,557	0,249
Forventet heterozygositet	0,528	0,498	0,345
F_{ST}	0,013		0,080

Tabell 11. Estimer og tester (P-verdi i parentes) av forskjeller i allelrikdom (allelic richness), forventet heterozygositet og F_{ST} mellom to delpopulasjoner (innsamlingsstasjoner) i Figga med samme vertsart.

Statistikk	20_S Figga-Sagmo	21_S Figga-Lø	P-Verdi
Allelrikdom (Allelic richness)	3,948	3,712	0,500
Forventet heterozygositet	0,592	0,537	0,249
F_{ST}	-0,0241		0,959

For å undersøke hvorvidt prøvene fra 23_S Hyllbrua kunne inneholde individer med opphav fra 22_S Skillegrind eller fra to av de andre delpopulasjonene med laksemusling nedstrøms Hyllbrua (24_S Brandsegg og 25_S Hornemann), ble enkeltindivider genetisk tilordnet de fire ulike delpopulasjonene i Ognavassdraget (**figur 6**). Tolv av 15 individer fra Hyllbrua hadde en genetisk sammensetning som med størst relativ sannsynlighet var tilordnet Hyllbrua som populasjon, mens to individer ble tilordnet Brandsegg og ett individ ble med like stor score tilordnet Brandsegg og Hornemann. Ingen individ ble tilordnet delpopulasjonen med ørretmusling på Skillegrind.



Figur 6. Individuell genetisk tilordning av elvemusling fra Hyllbrua til fire delpopulasjoner i Ognavassdraget.

2.4 Diskusjon

Hovedkonklusjonene fra denne utvidede studien av genetisk variasjon innen og mellom elvemusling-lokaliteter avviker ikke fra de i et tidligere pilotprosjekt (Larsen mfl. 2011a). A priori klassifisering av elvemuslinger som enten ørretmusling eller laksemusling ut fra infeksjonsgrad på vertsfisk, fikk støtte i den observerte fordelingen av genetisk variasjon mellom de to gruppene. Ørretmuslinger hadde generelt lavere genetisk variasjon enn laksemuslinger, men det var en betydelig større genetisk differensiering mellom forskjellige ørretmusling-populasjoner enn det var mellom forskjellige laksemusling-populasjoner. Det ble vist at en stor andel av den totale genetiske variasjonen kunne tilskrives genetisk variasjon mellom ørretmusling- og laksemusling-populasjoner som grupper. Dette, sammen med observasjoner av ørretmusling- og laksemusling-populasjoner som to mer eller mindre atskilte genetiske ansamlinger, antyder at elvemusling i Norge bør inndeles i to separate grupper. Det er imidlertid viktig å påpeke at ørretmuslinger som er undersøkt hovedsakelig begrenser seg til områder med stasjonære ørretbestander, og anadrome lokaliteter med sjørørret er bare unntaksvis undersøkt. Vi kan derfor ikke konkludere med at ørretmuslinger fra anadrome områder («sjørørretmuslinger») er forskjellige fra laksemuslinger.

I det avsluttede pilotprosjektet ble det vist at populasjonsstrukturen ikke var regionvis fordelt (Larsen mfl. 2011a), og vi har ikke repetert dette i denne rapporten.

De genetiske forskjellene mellom ørretmusling- og laksemusling-populasjoner var like tydelige for ørretmusling- og laksemusling-lokaliteter innen samme vassdrag som på tvers av vassdrag til tross for mulig genflyt i form av drift av ørretmusling-larver, nedstrøms vandring av ørret (med muslinglarver) eller transport av voksne ørretmuslinger (ved for eksempel flom) nedover i vassdraget til lokaliteter med laksemusling. Dette kan bety at det faktisk finnes en reproduktiv barriere utover de fysiske hindringene som hindrer genflyt.

Det var ingen genetiske forskjeller mellom laksemusling-lokaliteter innen samme vassdrag, og det er derfor rimelig å anta at disse heller ikke er reproduktivt isolerte. Spredning av laksemuslinglarver på vandrende laksunger eller voksenlaks vil da også normalt være mulig både oppover og nedover på lakseførende strekning. I Aursunda (Nord-Trøndelag) har det siden 1960-tallet (siste gang i 1996) blitt gjort tiltak i fosser og vandringshindre for laks i et forsøk på å lette laksens vandring til de øvre delene av vassdraget. Dette vil dermed muliggjøre genflyt mellom laksemusling-lokaliteten i nedre del og ørretmusling-lokaliteten i øvre del (Gammelsagelva). Til tross for dette observerte vi meget store genetiske forskjeller mellom disse delpopulasjonene, og det har aldri blitt observert muslinglarver på gjellene til laksunger i de øvre delene (27_T Aursunda-25) (Larsen & Berger 2004a, Larsen & Saksgård 2011).

Elvemuslingbestanden i 30_T Mellingelva (Nord-Trøndelag) er spesiell, da denne naturlig har tilgang på både stasjonær ørret og laks (Namsblanken). Likevel er det bare funnet muslinglarver på ørret (B.M. Larsen upublisert materiale). Selv om tre årsklasser av laks ble undersøkt, ble det ikke påvist en eneste muslinglarve. Den genetiske sammensetningen til bestanden av elvemusling i Mellingelva var da også forskjellig fra alle muslingpopulasjoner som er angitt som laksemuslinger, også de fra 29_S Bjøra i samme vassdragsystem (Namsenvassdraget).

26_S Forneselva (Nord-Trøndelag) som renner ut i Snåsavatnet har historisk vært ei lakseelv, men laks er i dag forhindret fra å komme opp i vassdraget på grunn av kraftverksdammer ved Byafossen (Rikstad & Julien 2010). Det ble gjort forsøk med utsetting av laksunger i Forneselva i 2011, men dette hadde ingen effekt på rekrutteringen av elvemusling i 2012 (Larsen & Saksgård 2012b). Det ble imidlertid ikke avklart om det var ørret eller laks som var foretrukket vertsort for elvemuslingens larver, da ørretungene også hadde samme lave prevalens og infeksjonsintensitet. Genetisk lignet imidlertid elvemuslingen i Forneselva mest på det som kan karakteriseres som laksemusling, og hadde ingen likheter med ørretmusling fra andre lokaliteter.



Det er bare små morfologiske forskjeller hos elvemusling fra ulike lokaliteter eller mellom ulike populasjoner i samme vassdrag. Genetiske analyser og feltstudier av hvilken fiskeart som er primærvert for muslingenes larver har imidlertid bekreftet at dette er to funksjonelt forskjellige typer: Laksemusling (til venstre) og ørretmusling (til høyre) fra Aursunda. Foto: Bjørn Mejdell Larsen.

I forbindelse med bekjempelse av lakseparasitten *Gyrodactylus salaris* har man i Figga (Nord-Trøndelag) konstruert ei fiskesperre (1988) for å hindre laks fra å vandre opp til de øvre delene av vassdraget. Ørreten i de øvre delene av vassdraget (20_S Figga-Sagmo) fungerte imidlertid ikke som vert i fravær av laks, da muslinglarver bare i liten grad er observert på ørret (bl.a. Larsen mfl. 2011b, Larsen & Saksgård 2012a). Genetisk er da også muslinger både nedenfor og ovenfor sperra i Figga like, og kan karakteriseres som laksemusling i hele vassdraget opp til Leksdalsvatnet.

I Ogna (Nord-Trøndelag) ble det undersøkt fire delpopulasjoner av elvemusling. Den øverste innsamlingsstasjonen (22_T Ogna-Skillegrind) lå ovenfor anadrom strekning, og muslingbestanden var genetisk distinkt og svært forskjellig fra de tre lokalitetene som ble betegnet som laksemusling lengre ned i vassdraget. Muslinger ved Skillegrind karakteriseres da også som ørretmuslinger. For å øke oppvekstarealet til laks i Ogna ble det først bygget ei fisketrapp i fossen ved Støa i 1974. Noe senere ble det også bygget ei trapp i Hyttfossen som gjorde det mulig for laks å komme seg opp til Skillegrind. Når vi nå vet at muslingene ved Skillegrind er ørretmusling, er det forvaltningsmessig uheldig å tillate etablering av laks ovenfor Hyttfossen. Ut fra et ønske om å bevare de genetiske særegenhetene til denne delpopulasjonen, anbefales det derfor at laksetrappa i Hyttfossen blir fjernet eller stengt for oppgang av laks.

De øvrige tre muslingstasjonene i Ogna hadde genetiske signaturer som var lik laksemuslingpopulasjoner i andre vassdrag, men til forskjell fra andre eksempler med laksemuslingbestander i samme vassdrag (f. eks. Mossa og Figga) var stasjonen 23_S Hyllbrua signifikant genetisk forskjellig fra 24_S Brandegg og 25_S Hornemann, og hadde også mindre genetisk variasjon. En sannsynlig årsak til denne forskjellen er Støafossen mellom Hyllbrua og Brandegg. Fossen er et vandringshinder for laks i dag, men det behøver ikke alltid å ha vært slik. For noen tusen år siden (anslagsvis 6000-9000 år) kan laks naturlig ha vandret opp til Hyllbrua og bragt laksemuslingen med seg. Hvor lenge laksemuslingene ved Hyllbrua har vært isolert fra

laksemuslingene nedenfor Støafossen vet vi ikke. I moderne tid gjorde bygging av laksetrappa i Støafossen det mulig for laks å passere fossen igjen fra 1974, men bare i en kort periode (fram til 1986) da trappa ble stengt igjen for å hindre spredning av lakseparasitten *Gyrodactylus salaris*.

Det ble forsøkt å reetablere laks ved Hyllbrua ved utsetting av laksyngel i 2010 og utlegging av lakserogn i 2011. Laksunger ble undersøkt våren 2011 og 2012 med hensyn til påslag av muslinglarver på gjellene (Larsen & Saksgård 2012a; 2013). De ettårige laksungene var bare i liten grad infisert, og ingen av de toårige laksungene var bærere av muslinglarver (Larsen & Saksgård 2012a; 2013). På noe over 40 % av ørretungene derimot ble det funnet muslinglarver, og selv om påslaget av larver var lavere enn forventet, kan det likevel være stort nok til å opprettholde en svak rekruttering ved Hyllbrua (jf. Larsen mfl. 2011b). Muslinglarvene på laks vokste også noe dårligere enn muslinglarvene som ble funnet på ørret, og indikerer at ørret var en bedre vertsart enn laks ved Hyllbrua.

Det er gjort forsøk på å detektere mulig spredning av muslinger/gener fra Hornemann, Brandsegg og Skillegrind til Hyllbrua ved en såkalt genetisk tilordning. Ingen individ fra Hyllbrua hadde en genetisk sammensetning som skulle tilsi at bestanden hadde opphav fra Skillegrind, men tre av individene hadde større sannsynlighet til å tilhøre Brandsegg og Hornemann enn Hyllbrua. En slik begrenset genflyt kan blant annet ha forekommet i de årene som fisketrappa i Støafossen var åpen. Ett scenario er at voksen laks har bragt med seg muslinglarver fra nedre del av Ogna og forårsaket en motstrøms genflyt opp til Hyllbrua. På grunn av et lite antall prøver må resultatet tolkes forsiktig, og analyser av et større antall muslinger er nødvendig for å kunne gi et mer nøyaktig bilde. Foreløpige resultater tyder likevel på at muslingbestanden ved Hyllbrua i utgangspunktet representerer en laksemusling som ikke lenger har laks som primærvert. Muslingene ovenfor fossen har over tid blitt isolert fra sin opprinnelige primærvert. Generasjonstiden hos elvemusling er svært lang, og vi kan tenke oss at muslingene på tross av lang tids isolasjon fortsatt ikke har adaptert seg fullstendig til ørret som ny vertsart.

Eksempelet fra Ogna er omtalt i detalj fordi det illustrerer så tydelig hvilken kunnskap vi behøver og hvilke utfordringer vi må forholde oss til om vi fullt ut ønsker å ta vare på genetiske forskjeller og mangfoldet av elvemusling-populasjoner. Nedenfor Støafossen er det riktig å forvalte muslingene som laksemuslinger, og legge til rette for en god laksebestand. Mellom Støafossen og Hyttfossen representerer muslingene i utgangspunktet en laksemusling som ikke lenger har laks som primærvert. Det kan være en sannsynlig seleksjon i gang som langsomt adapterer muslingene til ørret som ny vertsart for larvene. Skal vi da «hjelp» muslingene til å bli laksemuslinger igjen ved å åpne for oppgang av laks i Støafossen, eller skal vi la naturlig seleksjon og genetisk drift utvikle populasjonen i en annen retning? Ovenfor Hyttfossen (ved Skillegrind) er det riktig å forvalte muslingene som ørretmuslinger, og legge til rette for en god ørretbestand.

Hvorvidt de observerte genetiske forskjellene mellom ørretmusling og laksemusling representerer en funksjonell lokal tilpasning og/eller to ulike evolusjonære linjer med forskjellig innvandringsbakgrunn lar seg ikke besvare med det eksisterende datasettet. Observasjoner i naturen (bl.a. Larsen & Saksgård 2011, Larsen mfl. 2002a; 2011b) og resultater fra eksperimenter under kontrollerte forsøk (Larsen mfl. 2012b) viser at ulike muslingpopulasjoner nesten uten unntak bare utnytter enten ørret eller laks selv om begge arter er til stede. Dette får oss til å anta at den mest nærliggende forklaringen er at det finnes to typer elvemusling i Norge som er funksjonelt forskjellige med hensyn til vertsutnyttelse. Mikrosatellitter som genetiske markører er godt egnet til å studere genetiske forskjeller og tap av genetisk variasjon innen populasjoner, og til å detektere reproduktiv isolasjon mellom populasjoner. For å undersøke den fylogeografiske historien til ørretmusling og laksemusling vil imidlertid genetiske markører i det mitokondrielle arvestoffet være bedre egnet. I framtidige genetiske studier av elvemusling må dette derfor inkluderes. Genetisk variasjon i mitokondrielt DNA må da analyseres fra mange elvemusling-populasjoner fra en betydelig større del av artens geografiske utbredelsesområde enn det vi foreløpig har hatt muligheten til.

Observasjoner av vertsspesifisitet og vertsavhengig genetisk variasjon er meget viktig kunnskap i forvaltningen av elvemusling. Den store genetiske forskjellen mellom ørretmusling-bestander kan indikere et større potensiale for lokale tilpasninger hos disse bestandene enn hos laksemusling-bestander. Det er derfor rimelig at man spesielt ved re-etablering av ørretmusling gjennom utsetting av dyr fra andre bestander, viser ekstra stor forsiktighet med hensyn til valg av donorbestand.

3 Utprøving av metoder for innsamling av DNA fra elvemusling

Sten Karlsson, Bjørn Mejdell Larsen, Line Eriksen & Merethe Hagen

Oversatt og bearbeidet fra Karlsson et al. Four methods of non-destructive DNA sampling from freshwater pearl mussels *Margaritifera margaritifera* L. (Bivalvia: Unionoida). – Freshwater Science. In press.

3.1 Innledning

Elvemusling har vist en dramatisk negativ trend med hensyn til antall individer og populasjoner i Europa (Larsen 2005). Genetiske analyser av truede arter kan i fravær av ikke-skadelige prøvetakingsmetoder være problematiske, da det kan sette begrensninger på antall prøver som er mulig å samle inn. Dette vil gå ut over kvaliteten på resultatene. Til å begynne med ble det tatt vevsprøver av levende muslinger i Norge, og antall prøver ble begrenset til 10-15 prøver fra hver lokalitet. Prøvene ble normalt samlet inn i forbindelse med andre prosjekter; hovedsakelig knyttet til innsamling av referansemateriale til det nasjonale overvåkningsprogrammet for elvemusling (Larsen mfl. 2000b). Genetiske studier av elvemusling utenfor Norge har i stor utstrekning benyttet seg av prøvetaking av haemolymfe væske (Geist & Kuehn 2005, Geist & Kuehn 2008, Cauwelier mfl. 2009, Geist mfl. 2010, Cauwelier mfl. 2012) eller biopsi fra kappekanten (J. Taskinen, Universitetet i Jyväskylä). Haemolymfe er også forsøkt i Norge (Garlie 2010, B.M.Larsen, NINA). Metoden betraktes som ikke-skadelig, men krever opplæring og en del erfaring for å kunne utføres på riktig måte. Det kan være en viss risiko for å skade muslingene, og utbyttet av DNA er ofte variabelt og dårlig (erfaringer fra NINAs genetikklaboratorium).

I denne studien var formålet å prøve ut forskjellige ikke-skadelige prøvetakingsmetoder for å finne en metode som var enkel å bruke i felt, effektiv for DNA-ekstraksjon og som ga DNA av stabilt høy kvalitet. Vi testet følgende fire metoder: 1) Prøvetaking av haemolymfe-væske, 2) Skraping av fot, 3) Kappe-biopsi og 4) Q-tip. Effektiviteten til disse metodene ble vurdert med hensyn til DNA utbytte, DNA kvalitet, genotypingssuksess, praktisk bruk i felt og DNA ekstraksjonsprosedyrer på genetikklaboratoriet. I tillegg målte vi mulige effekter av prøvetaking på overlevelse og tilvekst hos muslingene.

3.2 Materiale og metoder

3.2.1 Prøvetaking

Prøvetaking av elvemusling ble gjort i Borråselva, Nord-Trøndelag (lokalitet 17_T Borråselva; se **figur 1**) som er ett av vassdragene i det nasjonale overvåkingsprogrammet (se Larsen mfl. 2008). For hvert individ som ble benyttet i studien ble det målt total skallengde (nærmeste 0,01 mm) og foretatt individmerking ved å risse inn et nummer på skallet for senere identifikasjon. For hver prøvetakingsmetode ble det tatt prøver fra 15 individer. I tillegg ble 15 individer inkludert som kontrollgruppe ved at de fikk samme behandling, men uten prøvetaking. Haemolymfe-væske (250 - 350 µl) ble tatt fra foten med en sprøyte som ble stukket inn mellom skallhalvdelen som beskrevet av Geist & Kuehn (2005). For de andre tre metodene ble det samlet inn muslinger som ble plassert på land, og da lukkemuskelen begynte å slappe av ble de forsiktig åpnet og prøver tatt. Fotskrap ble gjort ved hjelp av en skalpell som ble benyttet til å skrape vev forsiktig fra overflaten av foten. Skalpellbladet med vevsprøve ble deretter plassert i 96 % etanol. Vevsprøve av kappen ble tatt ved å kutte en liten bit av den ytterste delen og plassere denne direkte i 96 % etanol. Det ble tatt tre Q-tip prøver ved å stryke på overflaten av de indre bløtdelene (fot og kappe) med bomullspinnen. To Q-tip prøver ble plassert i separate rør med 600 µl lysis buffer (E.Z.N.A.™, Omega Bio-Tek Inc, Norcross), og en Q-tip prøve ble plassert i skjellkonvolutt for inntørking. Etter prøvetaking ble muslingene (60 individ pluss kontrollgruppe

på 15 individ) plassert i tre forskjellige bur (klekkekasser). Burene hadde et areal på 42x42 cm og var 15 cm dype. Bunnen og den siden som vendte oppstrøms var perforert. For at muslingene ikke skulle unnsnippe eller drifte ut av buret, ble det lagt netting på toppen. Burene ble fylt med grus og sand fra elva, og plassert nedgravd på elvebunnen slik at nivået på substratet inne i buret var lik det omgivende substratet i elva. Prøvetaking og utplassering av muslinger ble gjort 1. juni 2011, og forsøket ble avsluttet 7. oktober 2011. Etter at forsøket ble avsluttet ble muslingene undersøkt med hensyn til overlevelse, og det ble foretatt en ny lengdemåling. Mulige forskjeller i vekst mellom kontrollgruppen og de ulike prøvetakingsmetodene ble undersøkt ved en ANCOVA med avsluttende lengde som variabel og opprinnelig lengde som co-variant (SPSS, version 19.0, Armonk, NY: IBM Corp).

3.2.2 DNA analyser

Haemolymfeprøvene ble sentrifugert ved 17.700 ganger i 10 minutter. Pelleten i bunn av rørene ble tørket i en time ved 37 °C. Prøver fra fotskrap og kappe ble tørket for å fjerne etanol. DNA ble ekstrahert fra haemolymfe, fotskrap og kappe med E.Z.N.A.TM tissue DNA kit i henhold til protokollen. For DNA ekstraksjon fra Q-tip prøver ble det benyttet E.Z.N.A.TM microelute genomic DNA kit i henhold til protokollen. DNA konsentrasjoner (utbytte) ble målt med en nano-drop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham) og mulig degradering av DNA (kvalitet) ble vurdert ved agarose gel elektroforese med 1 % agarose, 1X TAE buffer, 4,67 volt/cm og visualisert med GelredTM stain. Mulige forskjeller i DNA utbytte (konsentrasjon) mellom de forskjellige prøvetakingsmetodene ble testet med en ANOVA. Kvaliteten til DNA ble også undersøkt ved genotyping av fire forskjellige mikrosatellitt markører (Geist mfl. 2003: MarMa3050, MarMa3621, MarMa4322 og MarMa4726).

3.3 Resultater

Etter at forsøket var avsluttet (128 dager) var samtlige individer i live, og i naturlig posisjon i substratet. Alle individer unntatt fire i Q-tip gruppen hadde en positiv vekst (**tabell 12**), og for alle prøvetakingsgrupper, unntatt Q-tip gruppen ($P=0,01$), var det ingen signifikant forskjell i vekst sammenliknet med kontrollgruppen.

Tabell 12. Skallvekst i løpet av 128 dager hos elvemusling prøvetatt for DNA med fire forskjellige metoder. Gjennomsnittlig vekst signifikant forskjellig fra kontrollgruppen er angitt med asterisk (*).

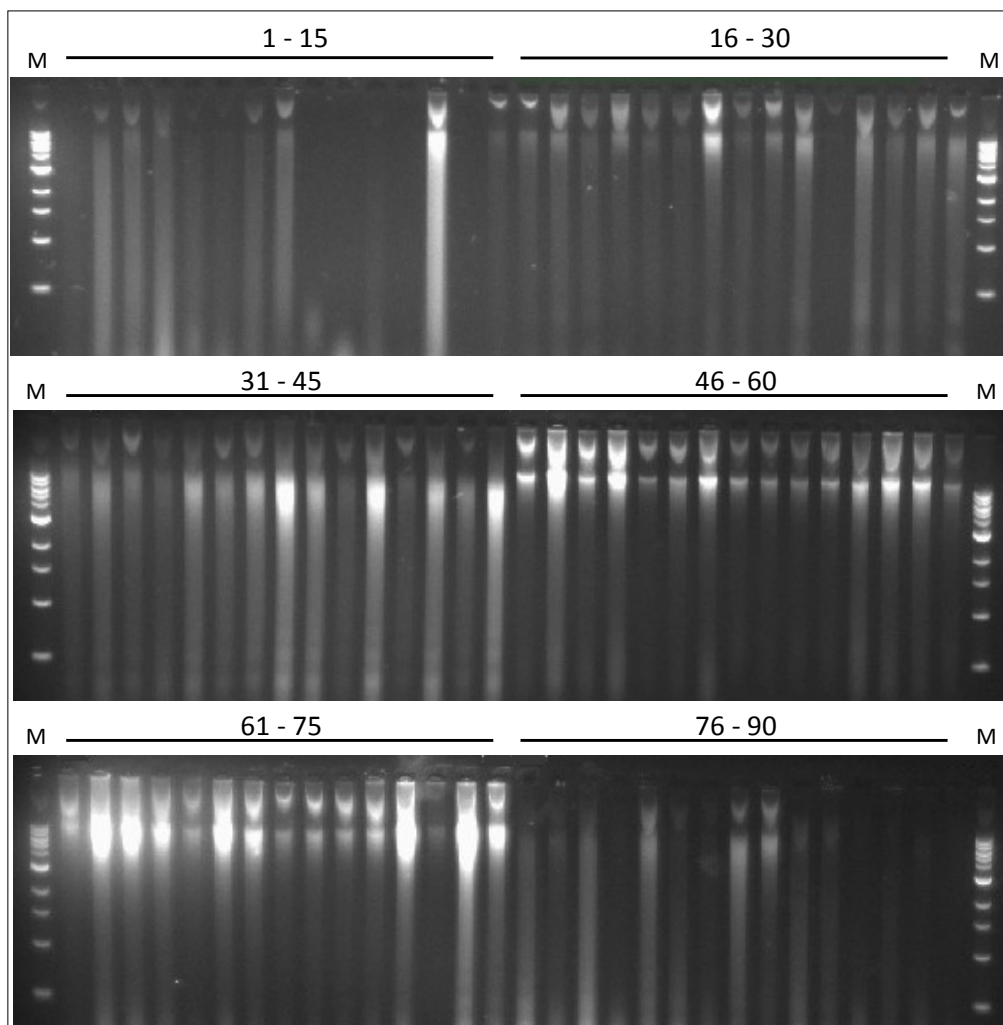
Metode	N	Gjennomsnittlig start lengde	Gjennomsnittlig slutt lengde	Gjennomsnittlig vekst	Vekst min - maks
		(mm)	(mm)	(mm, \pm sd)	(mm)
Haemolymfe	15	95,7	96,8	$1,0 \pm 0,7$	0,2 - 3,3
Fotskrap	15	90,4	91,2	$1,0 \pm 0,5$	0,3 - 1,8
Kappe	15	90,2	91,2	$1,1 \pm 0,4$	0,6 - 2,0
Q-tip	15	96,4	96,5	$0,5 \pm 0,7^*$	-0,3 - 2,3
Kontroll	15	92,6	93,6	$1,0 \pm 0,6$	0,2 - 2,1

DNA-utbyttet varierte mye mellom prøvetakingsmetoder (**tabell 13**). Haemolymfe-prøver gav det laveste gjennomsnittlige DNA-utbyttet, og det var signifikant lavere enn utbyttet fra kappe og Q-tip (med unntak av utbyttet fra Q-tip-prøver lagret i kjøleskap). Prøver av kappe og Q-tip-prøver lagret ved romtemperatur ga det største DNA-utbyttet. Q-tip lagret ved romtemperatur ga signifikant høyere DNA-utbytte enn Q-tip prøver lagret i kjøleskap og tørkede Q-tip-prøver. Det relativt dårlige DNA-utbyttet fra haemolymfe, fotskrap og tørkede Q-tip-prøver ble også vist

ved hjelp av en agarose gel (**figur 7**). Det var imidlertid ingen åpenbare forskjeller i degradering av DNA mellom ulike typer av prøver.

Tabell 13. DNA utbytte (ng/μl) fra elvemusling fra fire forskjellige prøvetakingsmetoder. For Q-tip prøver er det presentert resultater av DNA utbytte fra hver av de tre lagringsmetodene. Gjennomsnittlig DNA utbytte med samme forhøyet bokstav er ikke signifikant forskjellige.

Metode	N	Gjennomsnittlig utbytte ± sd	Maks - min
Haemolymfe	15	28,9 ± 13,7 ^{a,b}	7,4 – 55,3
Fotskrap	15	23,0 ± 10,5 ^b	8,5 – 41,2
Kappe	15	73,8 ± 32,0 ^c	27,4 – 127,8
Q-tip, kjøleskap	15	42,4 ± 18,5 ^{a,d}	19,3 – 81,1
Q-tip, romtemperatur	15	85,7 ± 45,8 ^c	33,7 – 190,3
Q-tip, tørket	15	46,0 ± 19,8 ^d	17,2 – 86,5



Figur 7. Agarose gel med DNA fra prøver av elvemusling tatt med fire forskjellige metoder: Haemolymfe (1-15), Fotskrap (16-30), Kappe (31-45), Q-tip (46-90). For Q-tip er prøvene 46-60 lagret i kjøleskap, prøvene 61-75 lagret i romtemperatur og prøvene 76-90 er tørket.

I tillegg til lavt utbytte av DNA fra haemolymfe-prøver var det også lav genotypingsuksess for disse prøvene (**tabell 14**). Prøvene fra kappe gav også lav genotypingsuksess, mens Q-tip-prøvene hadde den høyeste genotypingsuksessen, uavhengig av hvordan disse prøvene var lagret før DNA ekstraksjon.

Tabell 14. Genotypingsuksess (rate for genotyping) av fire mikrosatellitt markører fra prøver av elvemusling innsamlet med fire forskjellige metoder. For Q-tip prøver er det presentert resultater fra hver av de tre lagringsmetodene.

Metode	N	MarMa3050	MarMa3621	MarMa4322	MarMa4726
Haemolymfe	15	0,60	0,67	0,73	0,67
Fotskrap	15	1	0,93	0,93	1
Kappe	15	0,93	0,67	0,40	0,86
Q-tip, kjøleskap	15	1	1	1	1
Q-tip, romtemperatur	15	1	1	1	1
Q-tip, tørket	15	1	0,93	1	1



Innsamling av DNA prøver ved hjelp av Q-tip. Utføres ved å stryke på overflaten til de indre bløtdelene (fot og kappe). Metoden er skånsom, gir høyt DNA-utbytte og høy genotyping-suksess. Foto: Bjørn Mejdell Larsen.

3.4 Konklusjon

1. Haemolymfe ble vurdert som en vanskelig prøvetakingsmetode i felt, og ga også det dårligste DNA-utbyttet og den laveste genotypingsuksessen. Risiko for skade på dyret ved prøvetaking ble vurdert som mulig.

2. Fotskrap ble vurdert som en effektiv og enkel metode i felt, men med dårlig DNA-utbytte. Genotypingsuksessen var relativt høy. Risiko for skade på dyret ved prøvetaking ble vurdert som liten.
3. Kappe ble vurdert som relativt vanskelig i felt, ga høyt utbytte av DNA, men dårlig genotypingsuksess. Risiko for skade på dyret ved prøvetaking ble vurdert som mulig.
4. Q-tip ble vurdert som en effektiv og enkel metode i felt, ga høyt DNA utbytte og høy genotypingsuksess. DNA ekstraksjonen fra disse prøvene var mer effektiv enn fra de andre prøvetypene, da det ikke var nødvendig med inntørking av etanol og/eller kutting av vevsprøver. Risiko for skade på dyret ved prøvetaking ble vurdert som liten. Redusert tilvekst hos enkelte individer i gruppen kan skyldes at det uheldigvis ble tatt tre parallelle prøver (stryk) fra hvert individ. Denne effekten vil sannsynligvis bortfalle når det som normal rutine bare tas ett stryk fra hvert individ.

Basert på de samlede resultatene fra denne studien anbefaler vi prøvetaking med Q-tip som metode for gjennomføring av en mest mulig skånsom DNA-prøvetaking hos elvemusling eller andre store ferskvannsmuslinger. NINA har implementert denne prøvetakingsmetoden. Dette har gjort oss i stand til å øke antall prøver, og samtidig stabilt oppnå DNA av høy kvalitet for genetiske analyser.

4 Betydningen av antall prøver ved innsamling og analyser av DNA fra elvemusling

Sten Karlsson

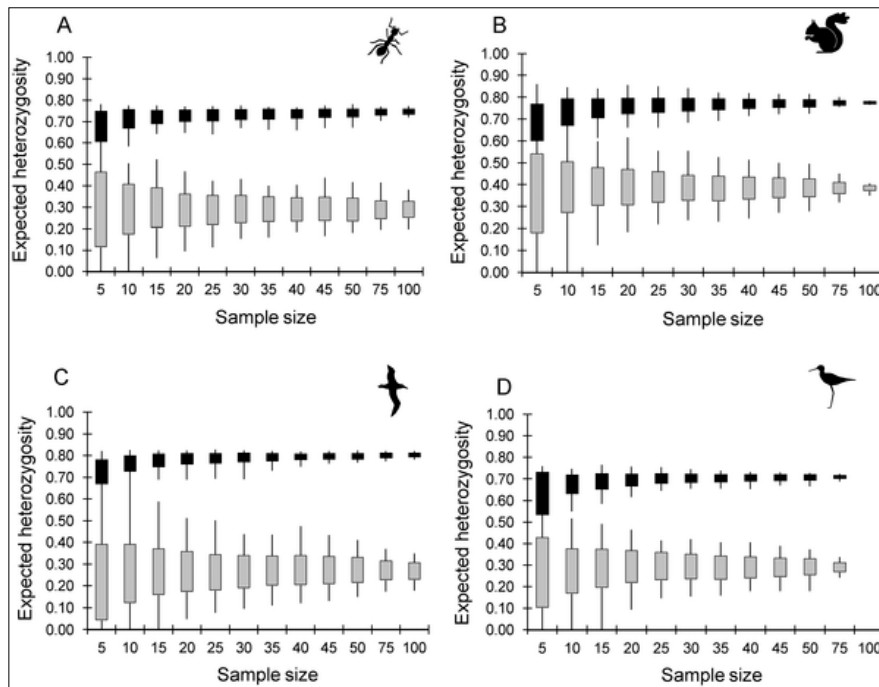
4.1 Innledning

Hva som er et tilstrekkelig antall individer for molekylærgenetiske studier av naturlige populasjoner avhenger i hovedsak av problemstillingen, hvilken type og hvor mange genetiske markører som benyttes, og av den faktiske genetiske sammensetningen i populasjonene. For standard populasjonsgenetiske parametere som heterozygositet, antall alleler, allelfrekvenser og F_{ST} (genetisk variasjon mellom populasjoner), finnes det flere teoretiske og empiriske studier. Estimerer av antall ulike alleler og heterozygositet forventes å bli underestimert i større grad i populasjoner med høy genetisk variasjon enn i populasjoner med lav genetisk variasjon ved et gitt antall prøver (Pruett & Winker 2008). For genetiske markører med forventet lav heterozygositet er det vist for flere empiriske datasett at presisjonen i estimatet av heterozygositet var lavere for disse enn for genetiske markører med forventet høy heterozygositet (Hale mfl. 2012) (**figur 8**). Presisjonen i estimat av den gjennomsnittlige heterozygositeten for flere genetiske markører, viste seg for de samme datasettene å øke med økt antall prøver, men med en forholdsvis liten økning i presisjon når antall prøver var over 20 (**figur 9**). Sannsynligheten for å detektere et allel beror ikke bare på hvor mange individer som undersøkes, men også med hvilken frekvens et allel opptrer i populasjonen. For markører med mange lavfrekvente alleler i populasjonen kreves et veldig stort antall individer, og i ekstreme tilfeller må alle individer undersøkes for å være sikker på å detektere samtlige alleler (B-Rao 2001). Dette er spesielt relevant for mikrosatellitt-markører som ofte er meget variable med mange lavfrekvente alleler. I de fleste studier er det ikke avgjørende å finne samtlige alleler i en populasjon, men å kvantifisere genetisk variasjon i form av heterozygositet og allelrikdom (relativt antall alleler uavhengig av antall prøver), og til dette vil sjeldne (eller svært sjeldne) alleler bidra lite.

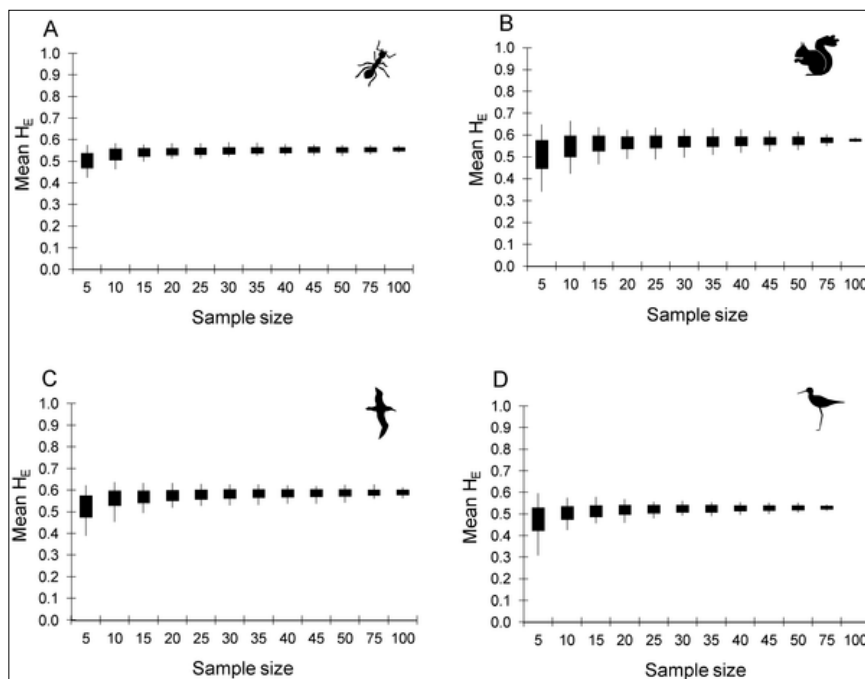
Naturlige populasjoner karakteriseres og sammenliknes i avgjørende grad ved allelfrekvenser. For å kunne beskrive populasjonsstrukturen og teste for mulige forskjeller, er det derfor viktig at disse estimatene er tilfredsstillende riktige, og den statistiske teststyrken må være tilstrekkelig stor for å detektere eventuelle forskjeller. Sampling variansen av allelfrekvenser ($\text{Var}(P)$) i diploide organismer er en funksjon av antall prøver (N) og allelfrekvensen til allelet (P), i henhold til:

$$\text{Var}(P) = P(1-P) \times (2N-1)^{-1}$$

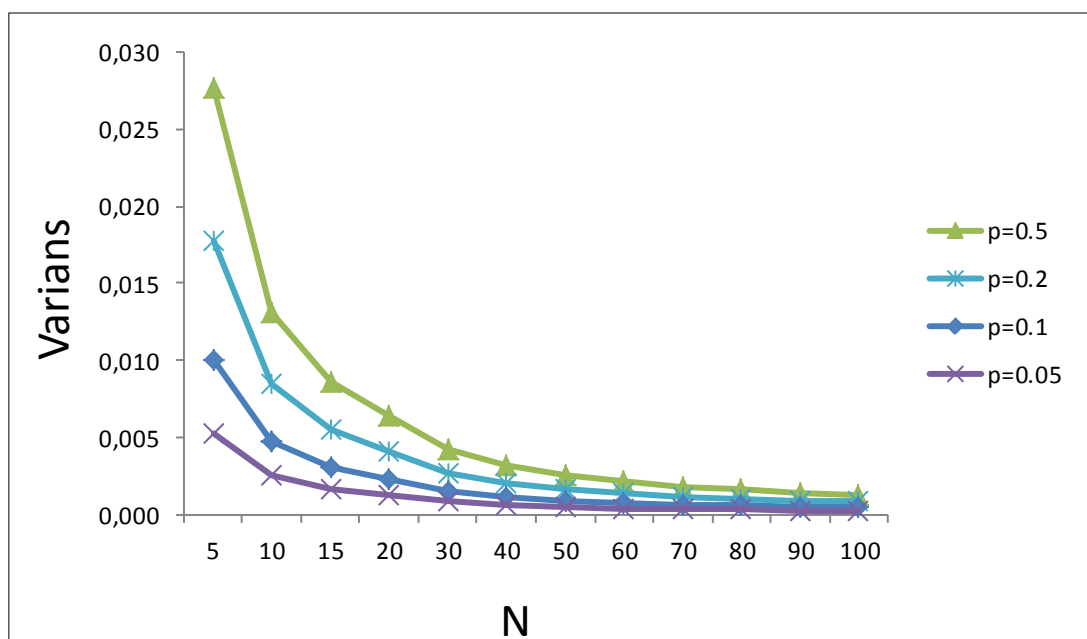
Figur 10 illustrerer hvordan variansen i estimerer av allelfrekvens varierer avhengig av antall prøver og allelfrekvens. Variansen er størst ved allelfrekvenser rundt 0,5, og mindre ved lave eller høye allelfrekvenser. **Figur 10** illustrerer også at variansen avtar raskt når antall prøver når opp til om lag 50 individer, slik at det er relativt liten forskjell mellom 50 og 100 prøver. Denne effekten er også vist med empiriske data (**figur 11**). F_{ST} , som er et relativt mål på genetisk variasjon mellom subpopulasjoner, tar utgangspunkt i estimatet av allelfrekvenser, og er også påvirket av antall prøver med hensyn til presisjon og variasjon (**figur 12**). Ved antall prøver opp til 30 er det en tendens til at F_{ST} blir overestimert, og det er store variasjoner mellom stikkprøvegrupper av samme størrelse. Imidlertid har det relativt liten effekt å øke antall prøver fra 30 til 100 individer. En effektiv måte å kompensere for små stikkprøvegrupper er å øke antall genetiske markører. Willing mfl. (2012) viste at for å oppnå presise estimat av F_{ST} er det mulig å minske antall prøver betraktelig om antall markører samtidig økes.



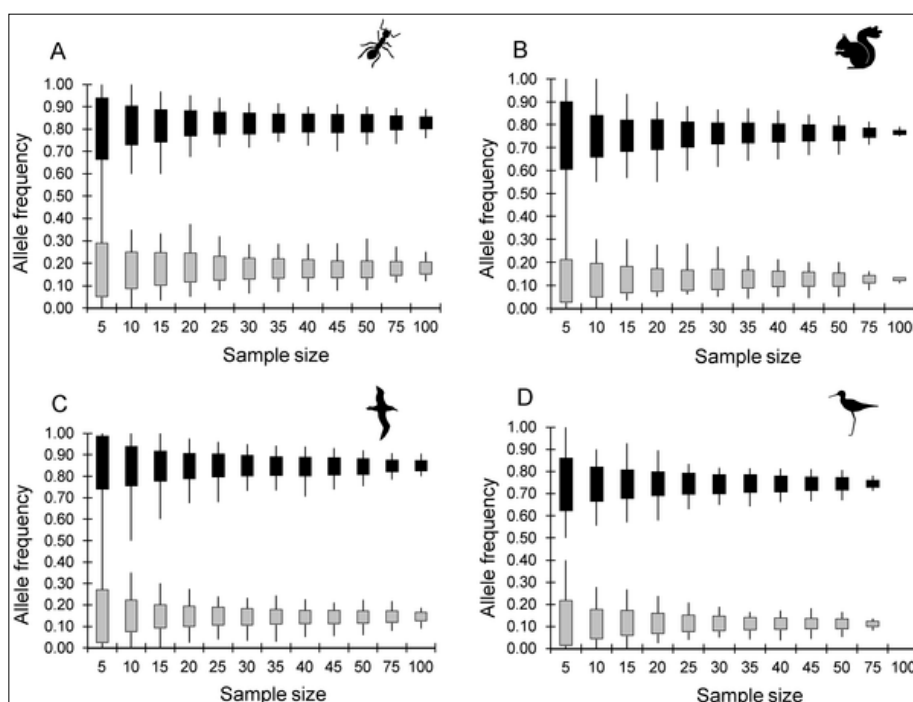
Figur 8. Presisjon av estimat av forventet heterozygositet for en genetisk markør med lavt (grå) og høyt (svart) forventet nivå av heterozygositet ved forskjellige antall prøver for fire empiriske datasett. Vertikal linje er observert område (maks/min), og boksene angir gjennomsnitt \pm standardavvik. Kilde: Figur 4 i Hale mfl. 2012. PLoS ONE 7(9): e45170. doi:10.1371/journal.pone.0045170.



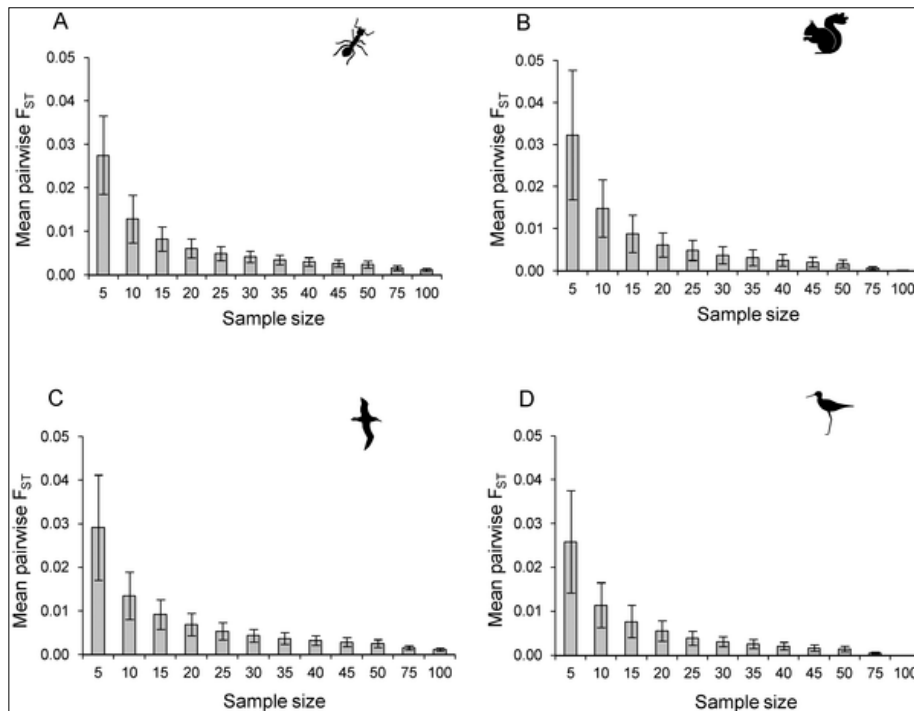
Figur 9. Presisjon av estimat av gjennomsnittlig forventet heterozygositet over flere markører ved forskjellige antall prøver for fire empiriske datasett. Vertikal linje er observert område (maks/min), og boksene angir gjennomsnitt \pm standardavvik. Kilde: Figur 5 i Hale mfl. 2012. PLoS ONE 7(9): e45170. doi:10.1371/journal.pone.0045170.



Figur 10. Forventet varians av allelfrekvens som en funksjon av antall prøver ved ulike allelfrekvensnivå.



Figur 11. Presisjon av allelfrekvensestimater for et lavfrekvent (grå) og et høyfrekvent (svart) allel ved forskjellige antall prøver fra fire forskjellige empiriske datasett. Vertikal linje er observert område (maks/min), og boksene angir gjennomsnitt \pm standardavvik. Kilde: Figur 3 i [Hale m fl. 2012. PLoS ONE 7\(9\): e45170. doi:10.1371/journal.pone.0045170](#).



Figur 12. Gjennomsnittlige parvise F_{ST} estimat mellom repetert sampling av forskjellige antall prøver fra fire forskjellige empiriske datasett. Vertikal linje er observert område (maks/min), og boksene angir gjennomsnitt \pm standardavvik. Kilde: Figur 6 i Hale m fl. 2012. *PLoS ONE* 7(9): e45170. doi:10.1371/journal.pone.0045170.

Målet med denne studien var å undersøke betydningen av å øke antall DNA-prøver fra et lite datasett til et større datasett med hensyn til presisjon i ulike estimater av populasjonsgenetiske parametere. Det skulle også danne grunnlag for å finne en ønsket standard for antall prøver som skal samles inn fra lokaliteter/delpopulasjoner med elvemusling i forbindelse med prøvetaking av DNA. Resultatene fra undersøkelser gjennomført i elleve ulike lokaliteter er rapportert her.

4.2 Metoder og resultater

Det ble undersøkt effekter av størrelsen på stikkprøvegrupper på estimatet av antall alleler, heterozygositet, genetisk variasjon mellom populasjoner (F_{ST}) og populasjonsstruktur. Til dette benyttet vi et eget datamateriale fra elvemusling bestående av genotyper fra seks mikrosatelitt-markører fra elleve forskjellige populasjoner (eller innsamlingsstasjoner) (tabell 15). Et lite datasett ($n = 4-15$) fra hver lokalitet ble supplert med flere individer fra den samme lokaliteten til et større datasett ($N = 29-56$). Dette datasettet ble så sammenliknet med det opprinnelige datasettet.

Tabell 15. Sammenlikning av estimert gjennomsnittlig heterozygositet og observert antall alleler fra seks mikrosatellitt-markører fra elleve forskjellige populasjoner (eller innsamlingsstasjoner) med elvemusling med utgangspunkt i to forskjellige stikkprøvegrupper. *n* er liten stikkprøvegruppe og *N* er stor stikkprøvegruppe. Den store stikkprøvegruppen inkluderer individene fra den lille stikkprøvegruppen.

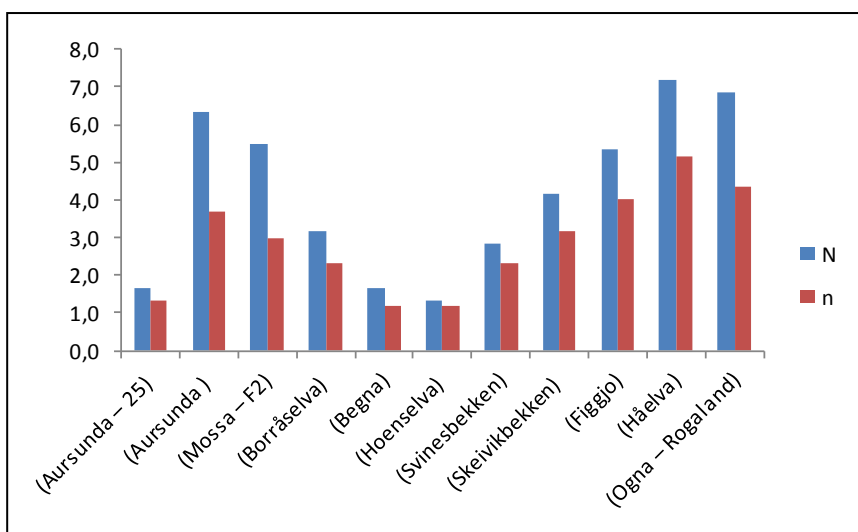
Lokalitet	Antall prøver		Heterozygositet (He)		Antall alleler (#A)	
	<i>n</i>	<i>N</i>	<i>He-n</i>	<i>He-N</i>	#A- <i>n</i>	#A- <i>N</i>
3_T Begna	15	30	0,012	0,080	1,2	1,7
5_T Hoenselva	15	30	0,086	0,144	1,2	1,3
7_S Ognå	12	40	0,509	0,540	4,3	6,8
8_S Håelva	15	30	0,532	0,535	5,2	7,2
9_S Figgjo	15	30	0,444	0,457	4,0	5,3
12_T Skeivikbekken	10	30	0,456	0,497	3,2	4,2
13_T Svinesbekken	15	30	0,288	0,289	2,3	2,8
17_T Borråselva	14	56	0,365	0,359	2,3	3,2
18_S Mossa – 5	4	33	0,464	0,498	3,0	5,5
27_T Aursunda – 25	10	29	0,115	0,145	1,3	1,7
28_S Aursunda - 6	9	29	0,494	0,521	3,7	6,3

4.2.1 Effekt på antall alleler og heterozygositet

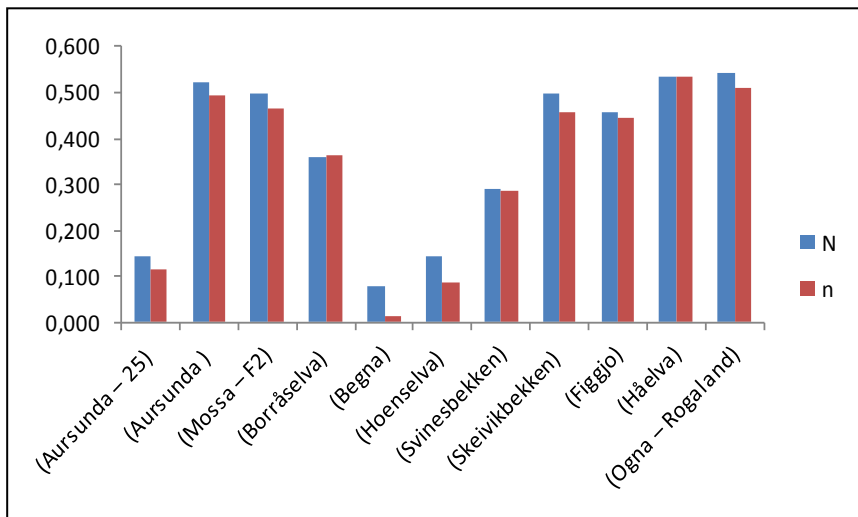
Som vist i andre studier (Pruett & Winker 2008, Hale mfl. 2012) ble det også i denne studien detektert flere alleler jo flere individer som ble undersøkt i samtlige elleve populasjoner som ble undersøkt (**tabell 15, figur 13**). Effekten på forventet heterozygositet var ikke like fremtredende, men alle populasjoner, foruten 17_T Borråselva, viste økte estimater av heterozygositet når antall prøver økte (**tabell 15, figur 14**).

4.2.2 Effekt på F_{ST} og populasjonsstruktur

Gjennomsnittlige parvise F_{ST} estimat mellom de elleve elvemusling-populasjonene var som forventet høyere fra estimat med få prøver ($F_{ST} = 0,281$) sammenlignet med estimat som inkluderte flere prøver ($F_{ST} = 0,232$).



Figur 13. Gjennomsnittlig observert antall alleler fra seks mikrosatellitt-markører i elleve ulike populasjoner (eller innsamlingsstasjoner) med elvemusling med liten (*n*) og stor (*N*) stikkprøvestørrelse. For detaljer se **tabell 15**.



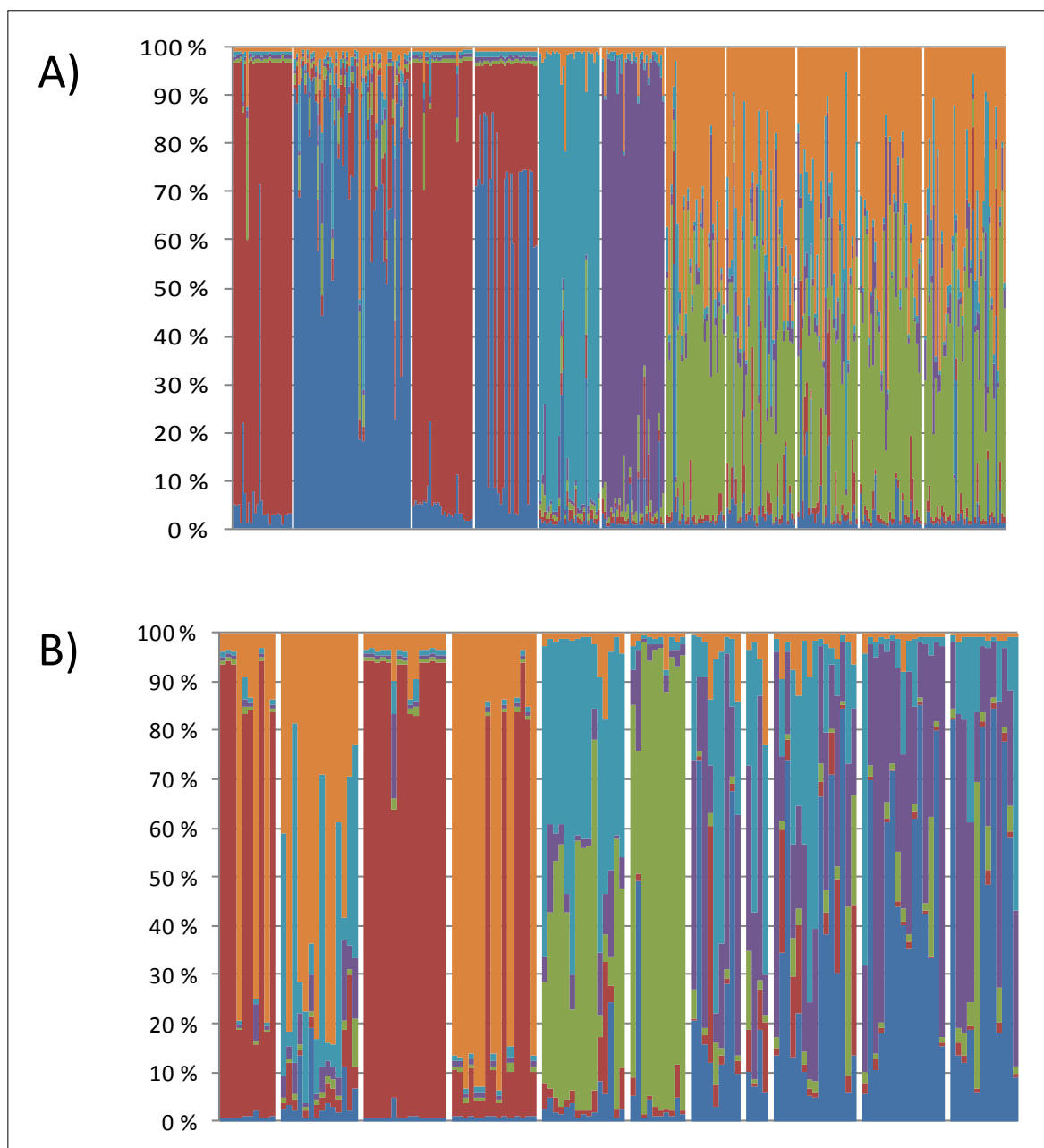
Figur 14. Gjennomsnittlig forventet hete-rozygositet fra seks mikrosatellitt-markører i elleve ulike populasjoner (eller innsamlingsstasjoner) med elvemusling med liten (n) og stor (N) stikkprøve-størrelse. For detaljer se **tabell 15**.

En måte å undersøke populasjonsstruktur på, er uten a priori informasjon om innsamlingslokalisitet, å allokere individer til et på forhånd bestemt antall populasjoner slik at avvik fra Hardy-Weinberg likevekt og koblingsulikevekt minimeres. Dette ble gjort i STRUCTURE (Pritchard mfl. 2000). Vi utførte 50.000 repetisjoner som "burn-in" og nye 100.000 repetisjoner etter "burn-in". Det mest sannsynlige antall populasjoner som kunne avdekkes ved hjelp av denne metoden ble undersøkt ved å repetere analysene med forskjellig antall antatte populasjoner. For hver analyse ble den estimerte logaritmiske sannsynligheten av data notert, etterfulgt av en estimering av sannsynligheter for forskjellige antall populasjoner i henhold til Pritchard mfl. (2000).

Med datasettene ble det beregnet at det mest sannsynlige antall populasjoner var seks. For hvert individ ble det oppnådd en sannsynlighet for å tilhøre de ulike antatte populasjonene, og disse ble plottet for å undersøke hvorvidt den detekterte populasjonsstrukturen var i samsvar med de ulike lokalitetene (**figur 15**). Både med det lille og det store datasettet ble det vist en relativt god gruppering av individer fra ulike lokaliteter, men det store datasettet viste et tydeligere skille mellom lokaliteter, og i de fleste tilfellene også en større likhet mellom individer innen samme lokalitet. Som vist i en tidligere studie (Larsen mfl. 2011a) og i denne rapporten (se kapittel 2), er laksemusling-populasjonene mindre strukturert enn ørretmusling-populasjonene. Laksemusling-populasjonene fremstår som like i denne analysen. Imidlertid viser **figur 15** at man med et større stikkprøvemateriale er bedre i stand til å skille mellom laksemuslinger og ørretmuslinger på individnivå, da laksemuslinger i det store datasettet i hovedsak ble allokert til to ulike populasjoner (oransje og grønn). Ørretmuslingene derimot ble bare i svært liten grad allokert til disse populasjonene.

4.3 Diskusjon og konklusjon

Studien har vist at det er viktig å vurdere antall prøver når man skal undersøke standard populasjonsgenetiske parametere hos elvemusling. Vi har fokusert på bruk av et begrenset sett av mikrosatellitter. Til tross for de samme prinsippene, vil forventningene ved bruk av bi-alleliske genetiske markører (for eksempel SNPer) være noe forskjellige fra høyvariable mikrosatellitter. Bi-alleliske markører (SNPer) er ofte identifisert fra sekvensdata der polymorfismen er definert ut fra et minimum frekvensnivå (ofte 0,05). Det vil derfor i de fleste tilfeller være tilstrekkelig med et mindre antall individer for å observere de to allelene sammenliknet med de mange allelene i mikrosatellitter, som også ofte er lavfrekvente. Antall individer som kreves for pålitelige estimer av allelfrekvenser vil også være mindre for bi-alleliske markører enn for høyvariable markører. Økt antall genetiske markører kan i stor grad kompensere for et lite antall individer, og bør vurderes for de tilfeller der det er vanskelig å samle inn prøver av et tilstrekkelig antall individer.



Figur 15. Individuell genetisk tilordning av elvemusling fra elleve lokaliteter (innsamlingsstasjoner) til seks antatte populasjoner ved bruk av STRUCTURE med (A) et stort datasett og (B) et lite datasett. Hver farge representerer ulike antatte populasjoner (seks ulike farger). Merk at populasjonene representert med farger ikke nødvendigvis representerer de samme populasjonene i de to figurene. Individene er ordnet etter lokaliteter (innsamlingsstasjoner) atskilt med de loddrette hvite linjene. De første seks lokalitetene er ørretmusling-lokaliteter og de siste fem lokalitetene er laksemusling-lokaliteter.

Den generelle sammenhengen mellom antall prøver og estimat av standard populasjonsgenetiske parametere er godt kjent og beskrevet. Dette forholdet forutsetter imidlertid at små og store prøvegrupper er tilfeldige utvalg fra en tilfeldig fordelt gruppe individer, det vil si ved loddrekning. Dersom denne forutsetningen ikke oppfylles, bør man nøye vurdere på hvilken måte prøvene blir hentet inn. Alternativt må man øke antallet prøver (individer) fra et større område

(eller over tid) for med sikkerhet å favne om alle mulige, ikke tilfeldige, fordelinger av genetisk variasjon.

Ut fra resultatene i denne og andre studier, anbefaler vi å undersøke minimum 30 individer fra hver elvemusling-populasjon for å oppnå nødvendig presisjon i estimatene av standard populasjonsgenetiske parametere med et begrenset sett med mikrosatellitt-markører. For den true-de elvemuslingen er dette mulig, da det samtidig er utviklet effektive metoder for innsamling av DNA-prøver uten å drepe eller skade individene (se kapittel 3 i denne rapporten).

5 Oppsummering

Mikrosatellitt-markører er mye brukt som genetiske markører til studier innen populasjonsgenetikk, bevaringsbiologi og evolusjonær biologi. For å oppnå en effektiv bevaring av utrydningstruede populasjoner, er det viktig å gjøre undersøkelser av den genetiske variasjonen. Genetiske markører er effektive verktøy for å identifisere reproduktivt isolerte populasjoner, og for å måle genetisk variasjon innen populasjoner. Kunnskap om dette bør alltid inngå som et viktig beslutningsgrunnlag i forvaltning av elvemusling.

Kunnskap om ertsutnyttelse hos ulike elvemusling-populasjoner i Norge koplet opp mot genetiske analyser av et utvalg av disse populasjonene, inkludert enkelte delpopulasjoner, har gitt sterke indikasjoner på at det eksisterer to funksjonelle grupper av elvemusling: «ørretmusling» og «laksemusling». Dette har tilført en ny og viktig dimensjon i forvaltningen av den sterkt truede muslingen i Norge. Det blir ekstra viktig å vurdere konsekvensene av introduksjoner av laks ovenfor naturlig anadrom strekning, og hvilke uønskede effekter en uønsket spredning av fremmede fiskearter (ørrekyte, gjedde mfl.) kan få. Resultatene har også vist behovet for en integrert felles forvaltning av elvemusling og dens ertsart, ikke minst i forbindelse med reetablering av elvemusling i vassdrag der den er utdødd eller der arten bare forekommer i tynne bestander.

Genetisk variasjon innen ørretmusling-populasjoner i form av heterozygositet og antall alleler var generelt lavere enn det som ble funnet innen laksemusling-populasjoner. Som gruppe var den genetiske variasjonen hos ørretmuslingene signifikant lavere enn hos laksemuslingene. Den genetiske differensieringen mellom ørretmusling-populasjoner var meget høy ($F_{ST} = 0,345$) og signifikant høyere enn mellom laksemusling-populasjoner ($F_{ST} = 0,025$).

Det er problematisk å måtte drepe individer av en truet art som elvemusling for å kunne ta prøver til genetiske analyser. For å finne fram til en mest mulig skånsom metode som ikke skulle skade muslingene ble det undersøkt fire ulike metoder for innsamling av DNA prøver: 1) Prøvetaking av haemolymfe-væske, 2) Skraping av fot, 3) Kappe-biopsi, 4) Q-tip. Basert på de samlede resultatene fra denne studien anbefaler vi Q-tip som metode for DNA-prøvetaking hos elvemusling eller andre store ferskvannsmuslinger. Q-tip ble vurdert som en effektiv og enkel metode i felt, ga høyt DNA utbytte og høy genotypingsuksess. DNA ekstraksjonen fra disse prøvene var mer effektiv enn fra de andre prøvetypene, da det ikke var nødvendig med inntørring av etanol og/eller kutting av vevsprøver. Risiko for skade på dyret ved prøvetaking ble vurdert som liten.

Hvor mange muslinger må det tas DNA-prøver fra for å få gode svar? Basert på annen litteratur og egne dataanalyser konkluderer vi med at en stikkprøvegruppe på minimum 30 individer som oftest er tilstrekkelig for standard populasjonsgenetiske parametere (heterozygositet, antall ulike alleler og estimert genetisk variasjon mellom populasjoner (F_{ST})).

5.1 Bevaring av genetisk variasjon

Et viktig grunnleggende prinsipp for bevaring av elvemusling bør være å gjøre tiltak som i størst mulig grad bevarer den genetiske variasjonen og integriteten. Med bakgrunn i observasjoner av en nesten polarisert infeksjon av muslinglarver på enten laks eller ørret, og samsvarende observasjoner av genetisk variasjon, foreslår vi at forekomster av elvemusling i første rekke grupperes til laksemusling og ørretmusling. Deretter grupperes populasjoner av enten laksemusling eller ørretmusling med likt genetisk opphav, og til sist beskrives bestander som er reproduktivt isolert fra hverandre (populasjoner). I den grad det er mulig bør populasjon være den enheten som skal være gjenstand for bevaringstiltak hos elvemusling i Norge.

Elvemuslingbestander er i stor grad reproduktivt isolerte fra hverandre. Dette gjelder i særdeleshet bestander av ørretmusling som lever i vassdragene ovenfor anadrom strekning. Disse forventes også å ha ubetydelige muligheter for utveksling av genetisk materiale med andre populasjoner. Liten eller ingen mulighet for genflyt forventes over tid å føre til store genetiske forskjeller mellom populasjoner, men også lav genetisk variasjon innen populasjonene. Dette er da også vist for ørretmusling-populasjoner i Norge. Det er rimelig å anta at de fleste ørretmusling-populasjonene har utviklet seg uavhengig av hverandre i relativt lang tid, og at det derfor er et stort potensiale for lokale, funksjonelle genetiske tilpasninger.

Laksemusling-populasjoner oppviser en mindre grad av genetisk differensiering, og i de undersøkte eksemplene med to eller flere bestander av laksemusling innen samme vassdrag, ser de ut å tilhøre en og samme populasjon. Laksemusling-populasjoner har generelt også en høyere genetisk variasjon innen hver enkelt populasjon. Ut fra den observasjonen er det rimelig å anta at det til en viss grad forekommer en naturlig genflyt mellom laksemusling-populasjoner.

Det er i all hovedsak to argumenter som er sentrale for å påstå at bevaring av genetisk variasjon mellom populasjoner er viktig: 1) En struktur i form av flere isolerte populasjoner bevarer på en effektiv måte den totale eksisterende genetiske variasjonen hos arten. 2) Reproductiv isolasjon muliggjør evolusjon av genetiske sammensetninger som er tilpasset det lokale miljøet, og en nedbrytning av disse i form av innkryssing av individer fra andre populasjoner (utavlsdepresjon) kan føre til mindre levedyktige individer. De observerte genetiske forskjellene som er gjort fra nøytrale genetiske markører er ikke ensbetydende med lokale tilpasninger, men indikerer at det finnes et potensial for at slike tilpasninger skjer eller har skjedd.

Bevaring av genetisk variasjon innen populasjoner er viktig for å sikre at det finnes en genetisk variasjon som er tilstrekkelig stor for naturlig seleksjon, og dermed gjøre det mulig for populasjonen å respondere og tilpasse seg til skiftende miljøer. Tilfeldig genetisk drift er en evolusjonær kraft som fører til forandring i allelfrekvens og tap av genetisk variasjon. Effekten av genetisk drift er tett koplet til bestandsstørrelse, eller den effektive populasjonsstørrelsen (N_e). Genetisk drift forventes derfor å føre til økt genetisk forskjell mellom populasjoner, men en reduksjon i genetisk variasjon innen populasjoner. På den andre siden forventes det at genflyt vil redusere forskjellen mellom populasjoner, og øke genetisk variasjon innen populasjoner. Lav genetisk drift og genflyt vil derfor sikre genetisk variasjon innen populasjoner, men ut fra en ambisjon om å bevare genetisk variasjon både innen og mellom populasjoner, er det ikke ønskelig med økt genflyt for å sikre genetisk variasjon innen populasjoner, da dette samtidig vil minske variasjonen mellom populasjoner. Det viktigste tiltaket for å bevare genetisk variasjon innen populasjoner, er derfor å opprettholde en stor bestand og derved redusere effekten av genetisk drift.

5.2 Re-etableringer og kompensasjonsutsettinger

Re-etableringsstiltak eller utsettinger av muslinger for å berge en truet bestand av elvemusling (kompensasjonsutsetting) bør ta utgangspunkt i prinsippet om bevaring av genetisk variasjon innen og mellom populasjoner.

For re-etableringer av utdødde bestander bør man benytte seg av andre nærliggende bestander som er så nært beslektet som mulig med den opprinnelige bestanden.

Ved kompensasjonsutsettinger bør man ut fra prinsippet om bevaring av genetisk variasjon mellom populasjoner, benytte reproduktivt aktive individer som fortsatt finnes i bestanden. Ut fra prinsippet om bevaring av genetisk variasjon innen populasjoner bør utsettinger gjøres på en slik måte at de individer som settes ut har en så bred genetisk variasjon som mulig. For eksempel bør flere familiegrupper være representert.

5.3 Hva om utgangsmaterialet har for liten genetisk variasjon?

Hva er «for lite genetisk variasjon»? Dette kan man på generelt grunnlag ha en formening om, men når det gjelder elvemusling spesielt, har man i dag ikke tilstrekkelig kunnskap. Stor grad av innavl er ofte forbundet med redusert levedyktighet (reproduktivitet og overlevelse), og lav genetisk variasjon gir et mindre grunnlag som den naturlige seleksjonen kan virke på og dermed sikre overlevelse av populasjonen på kort og lang sikt. For re-etableringer og kompensasjonsutsettinger kan det for visse populasjoner derfor være fristende å benytte seg av ikke nært beslektede populasjoner for å sikre en større genetisk variasjon. Denne strategien kan være nødvendig, men bør nøye vurderes i hvert enkelt tilfelle.

Hovedregelen må likevel være at re-etableringsstiltak eller utsettinger av muslinger for å berge en truet bestand av elvemusling (kompensasjonsutsettinger) bør ta utgangspunkt i prinsippet om bevaring av genetisk variasjon både innen og mellom populasjoner.

5.4 Kunnskapsmangel og utfyllende kartlegging

Finnes det en «sjørretmusling»? Det er viktig å påpeke at ørretmuslinger som er analysert i denne undersøkelsen begrenser seg hovedsakelig til områder med stasjonære ørretbestander. Lokalteter med sannsynlig forekomst av sjørret er bare unntaksvis undersøkt (Skeivikbekken). Vi kan derfor ikke konkludere med at ørretmuslinger fra anadrome vassdrag er det samme som ørretmuslinger fra innlandsvassdrag. Sjørretmusling kan på samme måten som laksemusling, ha høyere genetisk variasjon og lavere genetisk differensiering mellom populasjoner enn det vi finner hos ørretmusling. Er det sannsynlig at laksemusling og sjørretmusling kan ha større genetisk likhet enn det vi har funnet når vi sammenligner ørretmusling og laksemusling? På bakgrunn av disse spørsmålene er det ønskelig å inkludere et antall anadrome lokaliteter der sjørret er sannsynlig vert for å avklare dette spørsmålet.

DNA-prøver fra elvemusling er foreløpig bare studert med hensyn til genotyping av et lite antall markører for mikrosatellitter. Mikrosatellitter som genetiske markører er godt egnet til å studere genetiske forskjeller og tap av genetisk variasjon innen populasjoner, og til å detektere reprodutiv isolasjon mellom populasjoner. Men det er ikke mulig å beskrive eller kvantifisere den evolusjonære historien til de to gruppene av muslinger. Det er derfor usikkert hvilken systematisk status de to genetisk atskilte gruppene skal gis. For å undersøke fylogeografisk historie til ørretmusling og laksemusling må vi undersøke et større antall elvemusling-populasjoner fra en større del av artens geografiske utbredelsesområde med et større repertoar av genetiske markører som også inkluderer mitokondrielt DNA (mtDNA). I framtidige genetiske studier av elvemusling må dette derfor inkluderes. Sekvenser for deler av det mitokondrielle DNA (16S rRNA og COI; Machordom mfl. 2003) foreligger, og gjør det mulig å implementere sekvensering av mtDNA på NINAs genetiske laboratorium i Trondheim. Målet må være å finne analysemetoder og et tilstrekkelig referansemateriale som kan gjøre oss i stand til å plassere tilfeldige muslinger til riktig gruppe basert på en eller noen få DNA-prøver.

Bruk av mitokondrielt DNA kan også fortelle oss noe om innvandringshistorien til elvemusling til Norge. Har for eksempel elvemuslinger i Finnmark (både laksemuslinger og ørretmuslinger) kommet østfra? Kan det bety at det er en annen tilhørighet av disse populasjonene enn muslingpopulasjoner ellers i Norge?

Vi har nå materiale fra 33 uavhengige datasett samlet inn fra 27 elvemusling-lokaliteter i vårt DNA-register. Det må være et mål å øke dette antallet, og i det minste få inkludert alle lokaliteter i det nasjonale overvåkingsprogrammet for elvemusling i DNA-registeret. Vi mangler for øyeblikket fire lokaliteter (Enningdalselva, Sørkedalselva, Lilleelv og Åelva). I Enningdalselva er det allerede påvist både laksemusling og ørretmusling som begge bør inngå i prøvetakingen. Dette utgjør til sammen 150 prøver når vi legger til grunn en anbefaling om 30 prøver fra hver lokalitet/delpopulasjon. I tillegg må det suppleres med en delpopulasjon i Grytelva (30

prøver) og en delpopulasjon i Karpelva (30 prøver). For de lokalitetene som det allerede finnes prøver fra, kan det være nødvendig å supplere antall prøver for tre lokaliteter for å få det opp til anbefalt antall på 30 prøver (Grytelva 20 prøver, Skjellbekken 15 prøver og Karpelva 15 prøver). Totalt omfatter dette innsamling og bearbeiding av 260 prøver.

Som et tiltak for å bevare og bygge opp igjen reduserte bestander av elvemusling ble det våren 2011 startet med forsøksdyrking av elvemusling i Norge, og produksjonsdyrking i 2012 (Jakobsen mfl. 2013). Allerede etter ett år er 19 truede muslingbestander og ca. 9000 små muslinger under kultivering på Austevoll. For å se hvordan den genetiske sammensetningen til den opprinnelige restbestanden av muslinger i de ulike lokalitetene ser ut, for senere å kunne evaluere utsettingsmaterialet, er det viktig å inkludere genetiske prøver fra alle populasjoner som blir tatt inn på kultiveringsanlegget på Austevoll. Det er ikke laget noe organisert opplegg for dette, og foreløpig er bare tre av lokalitetene analysert (Lerangsbekken, Skeivikbekken og Dragstelva). I tillegg er det samlet inn DNA-prøver fra Haukåsvassdraget og Semselva (Langhammerelva), men disse er ikke analysert. Det betyr at det mangler DNA-prøver fra 13-15 elver (Kvassheimsåna, Steinslandselva, Hopselva, Fossa, Åreidselva, Fossingelva, Slira, Tylda, Sagelva, Lena, Slørdalselva, Lennaelva, Utvikelva og eventuelt Lomsdalselva og Rausjøbekken). Det må dessuten suppleres med ytterligere prøver fra Dragstelva. Totalt omfatter dette innsamling og bearbeiding av 400-450 prøver.

Kartlegging og overvåking av genetisk variasjon i norske elvemusling-populasjoner vil være et viktig verktøy for å utarbeide bevaringsbiologiske tiltak for elvemusling i Norge.

6 Referanser

- Araujo, R. & Ramos, M.A. 2000. Action plan for *Margaritifera margaritifera* in Europe. – Council of Europe. T-PVS (2000) 10. 38 s.
- Bauer, G. 1987a. The parasitic stage of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). III. Host relationships. - Arch. Hydrobiol., Suppl. 76: 413-423.
- Bauer, G. 1987b. The parasitic stage of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). II. Susceptibility of brown trout. - Arch. Hydrobiol., Suppl. 76: 403-412.
- Bouza, C., Castro, J., Martínez, P., Amaro, R., Fernández, C., Ondina, P., Outerio, A. & San Miguel, E. 2007. Threatened freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. in NW Spain: low and very structured genetic variation in southern peripheral populations assessed using microsatellite markers. – Conserv. Genet. 8: 937-948.
- B-Rao, C. 2001. Sample size considerations in genetic polymorphism studies. - Human Heredity 52: 191-200.
- Cauwelier, E., Verspoor, E., Tarr, E.C., Thompson, C. & Young, M. 2009. Genetic diversity and differentiation of freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) populations in the UK. - Scottish natural Heritage Commissioned report no.344 [Confidential].
- Cauwelier, E., Boon, P., Hastie, L.C., Sime, I., Tarr, E.C., Thompson, C., Verspoor, E. & Young, M. 2012. Demographic structure, sampling and the inferred genetic structure of Scottish freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) populations. – s. 81-96 i Henrikson, L., Arvidsson, B. & Österling, M. (red.). Aquatic conservation with focus on *Margaritifera margaritifera* Karlstad University Studies 2012: 40, Karlstad, Sweden.
- Cunjak, R.A. & McGladdery, S.E. 1991. The parasite-host relationship of glochidia (Mollusca: Margaritiferidae) on the gills of young-of-the-year Atlantic salmon (*Salmo salar*). - Can. J. Zool. 69: 353-358.
- Direktoratet for naturforvaltning 2006. Handlingsplan for elvemusling, *Margaritifera margaritifera*. – DN-Rapport 2006-3: 1-24.
- Dunca, E., Mörrth, C.-M. & Larsen, B.M. 2010. Skaltillväxt och kemiska analyser av flodpärlmusslor från Ognå och Figga, Norge. – Bivalvia Rapport 2010. 28 s.
- Garlie, S. 2010. Utvikling av mikrosatellit multipleks PCR for genetiske studier av *Margaritifera margaritifera*. – Masteroppgave, Høgskolen i Hedmark. 71 s.
- Geist, J. & Kuehn, R. 2005. Genetic diversity and differentiation of central European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) populations: implications for conservation and management. – Mol. Ecol. 14: 425-439.
- Geist, J. & Kuehn, R. 2008. Host-parasite interaction in oligotrophic stream ecosystems: the role of life-history strategy and ecological niche. – Mol. Ecol. 17: 997-1008.
- Geist, J., Rottmann, O., Schröder, W. & Kühn, R. 2003. Development of microsatellite markers for the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. (Bivalvia: Unionidea). – Mol. Ecol. Notes 3: 444-446.
- Geist, J., Porkka, M. & Huehn, R. 2006. The status of host fish populations and fish species richness in European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) streams. - Aquatic Conserv. 16: 251-266.
- Geist, J., Söderberg, H., Karlberg, A. & Kuehn, R. 2010. Drainage-independent genetic structure and high genetic diversity of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) in northern Europe. – Conserv. Genet. 11: 1339-1350.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). - Available from <http://www.unil.ch/lizea/software/fstat.html>.
- Hadzihalilovic-Numanovic, A. 2005. Genetic variation and relatedness of freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. populations. – Licentiate thesis. Karlstad university Studies 2005: 55. 20 s.
- Hadzihalilovic-Numanovic, A. & Arvidsson, B. 2007. Flodpärlmusslan i Blekinge – undersökning av genetisk populationsstruktur. – Karlstad universitet, Avdelningen för biologi. Rapport 1-2007. 11 s.
- Hale, M.L., Burg, T.M., & Steeves, T.E. 2012. Sampling for Microsatellite-Based Population Genetic Studies: 25 to 30 Individuals per Population Is Enough to Accurately Estimate Allele Frequencies. - PLoS ONE 7(9): e45170. doi:10.1371/journal.
- Hastie, L.C. & Young, M.R. 2001. Freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) glochidiosis in wild and farmed salmonid stocks in Scotland. – Hydrobiologia 445: 109-119.

- Hastie, L.C. & Young, M.R. 2003. Conservation of the Freshwater Pearl Mussel 2: Relationship with Salmonids. – Conserving Natura 2000 Rivers Conservation Techniques Series No. 3 English Nature, Peterborough. 44 s.
- Ieshko, E.P., Larsen, B.M., Pavlov, U.U., Barskaya, U.U., Lebedev, D.I. & Novohatskaya, O.V. 2009. Population dynamics of glochidia of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L., parasitizing on juvenile Salmonidae fishes in northern water reservoirs. - Biology Bulletin 36: 624-629.
- IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>.
- Jakobsen, P., Bjånesøy, T. & Marwaha, J. 2013. Storskala produksjon av elvemusling (*Margaritifera margaritifera*) for gjenutsetting. – Universitetet i Bergen, Institutt for biologi. Rapport. 17 s.
- Karlsson, S., Larsen, B.M., Eriksen, L. & Hagen, M. 2013. Four methods of non-destructive DNA sampling from freshwater pearl mussels *Margaritifera margaritifera* L. (Bivalvia: Unionoida). – Freshwater Science. In press.
- Kålås, J.A., Viken, Å., Henriksen, S. & Skjelseth, S. (red.) 2010. Norsk Rødliste for arter 2010. – Artsdatabanken.
- Laikre, L., Allendorf, F.W., Aroner, L.C., Baker, C.S., Gregovich, D.P., Hansen, M.M., Jackson, J.A., Kendall, K.C., McKelvey, K., Neel, M.C., Oliveri, S., Ryman, N., Schwartz, M.K., Bull, R.S., Stetz, J.B., Tallmon, D.A., Taylor, B.L., Vojta, C.D., Waller, D.A. & Waples, R.S. 2010. Neglect of genetic diversity in implementation of the conservation on biological diversity. - Conservation Biology 24: 86-88.
- Larsen, B.M. 1998. Utbredelse av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Østre og Vestre Toten kommuner, Oppland. - NINA Oppdragsmelding 570: 1-22.
- Larsen, B.M. 2000. Utbredelse og bestandsstatus for elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Begna, Oppland. – Fylkesmannen i Oppland, Miljøvernavdelingen. Rapport nr. 5/2000. 19 s.
- Larsen, B. M. 2005. Handlingsplan for elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Innspill til den faglige delen av handlingsplanen. - NINA Rapport 122. 33 s.
- Larsen, B.M. 2006. Overvåking av vannkvalitet, fisk og elvemusling i Hammerbekken, Aust-Agder i forbindelse med E18 - utbygging Brokelandsheia – Vinterkjær 2000-2005. – NINA Rapport 149. 37 s.
- Larsen, B.M. 2009. Kalking i laksevassdrag. Effektkontroll 2008: Overvåking av elvemusling i Ognå, Rogaland. – NINA Rapport 486. 38 s.
- Larsen, B.M., 2010. Distribution and status of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in Norway. - s. 35-43 i: Ieshko, E.P. & Lindholm, T. (red.). Conservation of freshwater pearl mussel, *Margaritifera margaritifera* populations in Northern Europe. Proceedings of the International workshop. Karelien Research Centre of RAS.
- Larsen, B.M. 2011. Overvåking av elvemusling i Norge. Årsrapport 2010: Ereviksbekken og Svinesbekken, Rogaland. - NINA Rapport 691. 35 s.
- Larsen, B.M. & Aspholm, P.E. 2005. Skjellbekken (Skal'zujåkka), Finnmark (vassdragsnr. 246.E3Z). – s. 33-46 i Larsen, B.M. (red.). Overvåking av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Årsrapport 2003. NINA Rapport 37.
- Larsen, B.M. & Aspholm, P.E. 2007. Karpelva (Siidejohka), Finnmark (vassdragsnr. 247.3Z). – s. 28-45 i Larsen, B.M. (red.). Overvåking av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Årsrapport 2005. NINA Rapport 309.
- Larsen, B. M. & Aspholm, P. E. 2011. Overvåking av elvemusling i Norge. Årsrapport 2010: Skjellbekken, Finnmark. - NINA Rapport 729. 26 s.
- Larsen, B.M. & Berger, H.M. 2004a. Aursunda, Nord-Trøndelag (vassdragsnr. 138.5Z). – s. 22-33 i Larsen, B.M. (red.). Overvåking av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Årsrapport 2002. NINA Oppdragsmelding 824.
- Larsen, B.M. & Berger, H.M. 2004b. Håelva (=Hååna), Rogaland (vassdragsnr. 028.3Z). – s. 34-49 i Larsen, B.M. (red.). Overvåking av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Årsrapport 2002. NINA Oppdragsmelding 824.
- Larsen, B.M. & Berger, H.M. 2005a. Ereviksbekken (Skeiviksbekken), Rogaland (vassdragsnr. kystfelt 032.1). – s. 9-17 i Larsen, B.M. (red.). Overvåking av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Årsrapport 2003. NINA Rapport 37.
- Larsen, B.M. & Berger, H.M. 2005b. Svinesbekken, Rogaland (vassdragsnr. kystfelt 032.2). – s. 18-27 i Larsen, B.M. (red.). Overvåking av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Årsrapport 2003. NINA Rapport 37.

- Larsen, B.M. & Berger, H.M. 2007a. Åelva (Roksdalsvassdraget), Nordland (vassdragsnr. 186.2Z). – s. 10-27 i Larsen, B.M. (red). Overvåking av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Årsrapport 2005. NINA Rapport 309.
- Larsen, B.M. & Berger, H.M. 2007b. Hestadelva, Nordland (vassdragsnr. 154.2Z). – s. 28-39 i Larsen, B.M. (red). Overvåking av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Årsrapport 2004. NINA Rapport 254.
- Larsen, B.M. & Berger, H.M. 2009a. Overvåking av elvemusling i Norge. Årsrapport for 2008: Hunnselva, Oppland. – NINA Rapport 443. 29 s.
- Larsen, B.M. & Berger, H.M. 2009b. Overvåking av elvemusling i Norge. Årsrapport for 2008: Hoenselva, Buskerud. – NINA Rapport 454. 29 s.
- Larsen, B.M. & Berger, H.M. 2010. Overvåking av elvemusling i Norge. Årsrapport for 2008: Håelva, Rogaland. – NINA Rapport 565. 35 s.
- Larsen, B.M. & Bjerland, J.M. 2012. Overvåking av elvemusling i Norge. Årsrapport 2011: Hestadelva, Nordland. – NINA Rapport 871. 28 s.
- Larsen, B.M. & Brørs, S. 1998. Elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Ogna, Rogaland - Utbredelse og bestandsstatus. – NINA Oppdragsmelding 537: 1-20.
- Larsen, B.M. & Hårsaker, K. 2001. Borråselva i Gråelvavassdraget, Nord-Trøndelag (vassdragsnr. 124.2Z). – s. 25-35 i Larsen, B.M. (red.). Overvåking av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Årsrapport 2000. NINA Oppdragsmelding 725.
- Larsen, B.M. & Hårsaker, K. 2002a. Hunnselva, Oppland (vassdragsnr. 002.DCZ). – s. 7-16 i Larsen, B.M. (red.). Overvåking av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Årsrapport 2001. NINA Oppdragsmelding 762.
- Larsen, B.M. & Hårsaker, K. 2002b. Hoenselva, Buskerud (vassdragsnr. 012.B2Z). – s. 16-25 i Larsen, B.M. (red). Overvåking av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Årsrapport 2001. NINA Oppdragsmelding 762.
- Larsen, B.M. & Karlsen, L.R. 2010. Overvåking av elvemusling i Norge. Årsrapport for 2008: Enningdalselva, Østfold. – NINA Rapport 566. 39 s.
- Larsen, B.M. & Saksgård, R. 2010. Overvåking av elvemusling i Norge. Årsrapport 2009: Grytelvavassdraget, Sør-Trøndelag. – NINA Rapport 581. 30 s.
- Larsen, B. M. & Saksgård, R. 2011. Overvåking av elvemusling i Norge. Årsrapport 2010: Aursunda, Nord-Trøndelag. – NINA Rapport 718. 29 s.
- Larsen, B.M. & Saksgård, R. 2012a. Utsetting av laksyngel i Figga og Ogna, Nord-Trøndelag i 2010 – et tiltak for å øke rekrutteringen hos elvemusling. – NINA Minirapport 365. 15 s.
- Larsen, B.M. & Saksgård, R. 2012b. Utsetting av laksyngel i Forneselva, Nord-Trøndelag i 2011 – et tiltak for å øke rekrutteringen hos elvemusling. – NINA Minirapport 393. 10 s.
- Larsen, B.M. & Saksgård, R. 2012c. Elvemusling i Mossa, Nord-Trøndelag etter regulering. – s. 128-143 i: Larsen, B.M. (red.). Elvemusling og konsekvenser av vassdragsreguleringer – en kunnskapsoppsummering. Rapport Miljøbasert Vannføring 8-2012.
- Larsen, B.M. & Saksgård, R. 2013. Reetablering av elvemusling i Figga og Ogna, Nord-Trøndelag. Forsøk med utsetting av laksyngel i 2011. – NINA Minirapport 424. 17 s.
- Larsen, B.M., Hårsaker, K., Bakken, J. & Barstad, D.V. 2000a. Elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Steinkjervassdraget og Figga, Nord-Trøndelag. Forundersøkelse i forbindelse med planlagt rotenonbehandling. – NINA Fagrapport 39: 1-39.
- Larsen, B.M., Sandaas, K., Hårsaker, K. & Enerud, J. 2000b. Overvåking av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Forslag til overvåkingsmetodikk og lokaliteter. – NINA Oppdragsmelding 651: 1-27.
- Larsen, B.M., Eken, M. & Hårsaker, K. 2002a. Elvemusling *Margaritifera margaritifera* og fiskeutsettinger i Hoenselva og Bingselva, Buskerud. – NINA Fagrapport 56: 1-33.
- Larsen, B.M., Karlsen, L.R. & Eggen, J.-E. 2002b. Enningdalselva, Østfold (vassdragsnr. 001.1Z). – s. 26-37 i Larsen, B.M. (red.). Overvåking av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Årsrapport 2001. NINA Oppdragsmelding 762.
- Larsen, B.M., Berger, H.M. & Øverland, T. 2004. Grytelvavassdraget, Sør-Trøndelag (vassdragsnr. 117.4Z). – s. 10-21 i Larsen, B.M. (red.). Overvåking av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Årsrapport 2002. NINA Oppdragsmelding 824.
- Larsen, B.M., Magerøy, J. & Jakobsen, P.J. 2007a. Oselvvassdraget, Hordaland (vassdragsnr. 055.7Z). – s. 10-27 i Larsen, B.M. (red). Overvåking av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. Årsrapport 2004. NINA Rapport 254.
- Larsen, B.M., Eken, M., Tysse, Å. & Engen, Ø. 2007b. Overvåking av elvemusling i Simoa, Buskerud. Statusrapport 2006. – NINA Rapport 314. 45 s.

- Larsen, B.M., Berger, H.M. & Julien, K. 2008. Borråselva i Gråelvavassdraget, Nord-Trøndelag (vassdragsnr. 124.2Z). – s. 39-54 i Larsen, B.M. (red). Overvåking av elvemusling i Norge. Årsrapport for 2006 og 2007. NINA Rapport 417.
- Larsen, B.M., Karlsson, S., Hindar, K. & Balstad, T. 2011a. Genetisk variasjon hos elvemusling *Margaritifera margaritifera* (L.) i Norge – en pilotstudie - NINA Minirapport 316. 20 s.
- Larsen, B. M., Dunca, E., Karlsson, S. & Saksgård, R. 2011b. Elvemusling i Steinkjervassdragene: Status etter 30 år med *Gyrodactylus salaris* og flere forsøk på å utrydde lakseparasitten i Ogna og Figga, Nord-Trøndelag. - NINA Rapport 730. 79 s.
- Larsen, B.M., Saksgård, R. & Bjerland, J.M. 2012a. Overvåking av elvemusling i Ogna, Rogaland. Tiltaksovervåking kalking 2011. - NINA Rapport 887. 38 s.
- Larsen, B.M., Forseth, T. & Saksgård, R. 2012b. Host specificity in freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* populations in Norway – experimental studies. - s. 57 i: International Meeting on Biology and Conservation of Freshwater Bivalves: Book of Abstracts. Instituto Politécnico de Bragança.
- Machordom, A., Araujo, R., Erpenbeck, D. & Ramos, M.-A. 2003. Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionoidea). – Biological Journal of the Linnean Society 78: 235-252.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. – Am. Nat. 106: 283-392.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J.M., Paetkau, D., Baudouin, L. & Estoup, A. 2004. GeneClass2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. – J. Hered. 95: 536-539.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. - Genetics 155: 945-959.
- Pruett, C.L. & Winker, K. 2008. The effects of sample size on population genetic diversity estimates in song sparrows *Melospiza melodia*. - Journal of Avian Biology, 39: 252-256.
- Rannala B. & Mountain, J.L. 1997. Detecting immigrants by using multilocus genotypes. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9197-9201.
- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. Genepop (version 2.1): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. – J. Hered. 86: 248-249.
- Rikstad, A. & Julien, K. 2010. Elvemusling i Steinkjer kommune – Nord-Trøndelag. – Fylkesmannen i Nord-Trøndelag, Miljøvern avdelingen. Rapport 2010-1. 20 s.
- Sandaas, K., Enerud, J. & Larsen, J.-I. 2012. Elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Numedalslågen 2004-2009. Utbredelse og populasjonsstatus. Vestfold fylke. - Fylkesmannen i Vestfold, Miljøvern avdelingen. Rapport 1-2012. 31 s.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. 2000. *Arlequin Ver. 2.0: A Software for Population Genetic data Analysis*. - Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.
- Smith, D.G. 1976. Notes on the biology of *Margaritifera margaritifera margaritifera* (Lin.) in Central Massachusetts. - Am. Midl. Nat. 96: 252-256.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. & Shipley, P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. – Mol. Ecol. Notes 4: 535-538.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. – Evol. 38: 1358-1370.
- Willing, E.-M., Dreyer, C. & van Oosterhout, C. 2012. Estimates of Genetic Differentiation Measured by F_{ST} Do Not Necessarily Require Large Sample Sizes When Using Many SNP Markers. - PLoS ONE 7(8): e42649. doi:10.1371/journal.pone.0042649
- Young, M. & Williams, J. 1984. The reproductive biology of the freshwater mussel *Margaritifera margaritifera* (Linn.) in Scotland. I. Field studies. - Arch. Hydrobiol. 99: 405-422.
- Ziuganov, V., Zotin, A., Nezhlin, L. & Tretiakov, V. 1994. The freshwater pearl mussels and their relationships with salmonid fish. – VNIRO Publishing House, Moscow. 104 s.



Norsk institutt for naturforskning (NINA) er et nasjonalt og internasjonalt kompetansesenter innen naturforskning. Vår kompetanse utøves gjennom forskning, utredningsarbeid, overvåking og konsekvensutredninger.

NINAs primære aktivitet er å drive anvendt forskning. Stikkord for forskningen er kvalitet og relevans, samarbeid med andre institusjoner, tverrfaglighet og økosystemtilnærming. Offentlig forvaltning, næringsliv og industri samt Norges forskningsråd og EU er blant NINAs oppdragsgivere og finansieringskilder.

Virksomheten er hovedsakelig rettet mot forskning på natur og samfunn, og NINA leverer et bredt spekter av tjenester gjennom forskningsprosjekter, miljøovervåking, utredninger og rådgiving.

ISSN:1504-3312
ISBN: 978-82-426-2530-4

Norsk institutt for naturforskning

NINA Hovedkontor

Postadresse: Postboks 5685 Sluppen, NO-7485 Trondheim

Besøks/leveringsadresse: Tungasletta 2, NO-7047 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