

Elvemusling - evaluering av en kultiveringsmetode

Sten Karlsson
Bjørn Mejdell Larsen
Torveig Balstad
Line Eriksen
Merethe Hagen



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 Kortrapport

Dette er en enklere og ofte kortere rapportform til oppdragsgiver, gjerne for prosjekt med mindre arbeidsomfang enn det som ligger til grunn for NINA Rapport. Det er ikke krav om sammendrag på engelsk. Rapportserien kan også benyttes til framdriftsrapporter eller foreløpige meldinger til oppdragsgiver.

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.

Elvemusling - evaluering av en kultiveringsmetode

Sten Karlsson
Bjørn Mejdell Larsen
Torveig Balstad
Line Eriksen
Merethe Hagen

Karlsson, S., Larsen B.M., Balstad, T., Eriksen, L. & Hagen, M.
2016. Elvemusling - evaluering av en kultiveringsmetode. - NINA
Rapport 1257. 22 s.

Trondheim, april 2016

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-2908-1

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

Åpen

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

REDAKSJON

Sten Karlsson

KVALITETSSIKRET AV

Kjetil Hindar

ANSVARLIG SIGNATUR

Forskningsleder Ingeborg Palm Helland (sign.)

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Fylkesmannen i Hordaland

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Olav Overvoll

FORSIDEBILDE

Elvemusling produsert ved kultiveringsanlegget på Austevoll, Hordaland. Foto: Bjørn Mejdell Larsen

NØKKEWORD

- Nord-Trøndelag
- Utvikelva
- Elvemusling
- Kultivering
- Genetikk

KEY WORDS

- Nord-Trøndelag County
- River Utvikelva
- Freshwater pearl mussel
- Stocking
- Genetics

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

Fakkelgården
2624 Lillehammer
Telefon: 73 80 14 00

www.nina.no

Sammendrag

Karlsson, S., Larsen B.M., Balstad, T., Eriksen, L. & Hagen, M. 2016. Elvemusling - evaluering av en kultiveringsmetode. - NINA Rapport 1257. 22 s.

Elvemusling (*Margaritifera margaritifera*) står oppført som en trua art på IUCNs rødliste. Elvemuslingen har vist en sterk tilbakegang i hele Europa. I Norge er den kategorisert som sårbar i Norsk Rødliste. Norge har mer enn to tredeler av antall elvemuslinger i Europa, men flere av våre bestander har også sviktende rekruttering og står i fare for å bli utryddet.

Miljødirektoratet etablerte i 2011 et oppdrettsanlegg for elvemusling på Austevoll utenfor Bergen. Målet var å sikre bestander av elvemusling ved å oppformere dem i anlegg og sette ut et større antall avkom i bestander med dårlig eller ingen naturlig rekruttering. Genetisk materiale for oppformering kan sikres ved å samle inn voksne muslinger (normalt 30-50 stammuslinger) som overføres til anlegget der de holdes under kontrollerte forhold og produserer muslinglarver for infeksjon av fisk. Avkommet som produseres dyrkes videre til små muslinger som senere tilbakeføres til naturen. For å evaluere denne kultiveringsstrategien (bruk av stammusling) har vi benyttet molekylærgenetiske metoder for å identifisere foreldre til avkommet produsert i anlegget, og estimert relativt bidrag fra hver stammusling og effektivt antall stammuslinger. Videre undersøkte vi hvorvidt den genetiske variasjonen representert i stammuslingene ble videreført til avkommet ved å sammenlikne genetisk variasjon i form av antall alleler og forventet heterozygositet mellom stammuslinger og avkom.

Vi undersøkte 179 avkom fra 33 potensielle stammusling-foreldre. Det ble identifisert 28 forskjellige stammusling-foreldre med et varierende antall avkom, fra 1 til 124. Én av stammuslingene bidro med om lag en tredel av de anleggsproduserte individene, tre stammuslinger bidro med mellom 5 % og 10 %, 15 med mellom 1 % og 5 % og 14 med mindre enn 1 %. Ut fra relativt bidrag og kjønnsfordeling ble effektivt antall stammusling beregnet til 5,42. Avkommet viste en signifikant lavere genetisk variasjon enn stammuslingene i form av antall alleler og en nesten signifikant lavere genetisk variasjon i form av forventet heterozygositet. Resultatet fra analysene viste at en stor andel av stammuslingene bidro til produksjon av muslinger i anlegget, men på grunn av skjev kjønnsfordeling (26:7) og et meget ujevnt bidrag fra hver stammusling ble effektivt antall stammuslinger lavt ($N_e/N = 0,15$). Et så lavt effektivt antall foreldre i utsetningsmaterialet utgjør en potensiell risiko for økt innavl i populasjonen og redusert effektiv bestandsstørrelse i naturen. Dette avhenger imidlertid av hvor stor andel utsetningsmaterialet vil utgjøre av den naturlige reprodukerende bestanden når de når reproduktiv alder. Det finnes ikke kunnskap om hvor stor overlevelsen til de små muslingene som settes ut er frem til reproduktiv alder. Det er derfor ikke mulig å forutsi om kultivering ved bruk av stammuslinger vil oppnå den ønskede effekten om å bygge opp igjen en truet bestand og samtidig ta vare på den genetiske variasjonen. Med bakgrunn i dette foreslår vi derfor en kultiveringsstrategi der man i størst mulig grad kontrollerer bidraget fra hver enkelt stammusling slik at dette blir så likt som mulig, og at man setter ut et moderat antall muslinger fordelt på flere årsklasser produsert over et lengre tidsperspektiv. I mangel av erfaringsbasert kunnskap er dette en bedre strategi enn å sette ut et stort antall muslinger basert på bare én produksjon (årsklasse).

Denne studien har kun analysert én av kultiveringsstrategiene som er benyttet på kultiveringsanlegget på Austevoll og er basert på bare én bestand og ett produksjonsår. Vi kan derfor ikke si noe om effekten av variasjon mellom år i denne bestanden, eller om vi ville fått samme resultat i andre bestander. For å vurdere hvilken strategi som er mest hensiktsmessig bør også tilsvarende analyser gjøres for alternative strategier. Dette kan for eksempel være å samle inn naturlig infisert fisk og dyrke avkom fra disse videre i anlegg, å infisere fisk under kontrollerte forhold i felt ved å holde musling og fisk i lukkede enheter, eller å høste muslinglarver i felt som senere infiserer fisk direkte i anlegget.

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

Abstract

Karlsson, S., Larsen B.M., Balstad, T., Eriksen, L. & Hagen, M. 2016. Freshwater pearl mussel – evaluation of a stocking method. - NINA Report 1257. 22 pp.

Freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) is listed as an endangered species by IUCN. Throughout Europe, the freshwater pearl mussel is extinct or is at the brink of extinction in many watersheds. Norway holds more than two-thirds of all individuals of freshwater pearl mussels in Europe, but many of the Norwegian populations are also at risk of extinction from low or no natural reproduction. The species is listed as vulnerable on the Norwegian red list.

In 2011 a hatchery program for freshwater pearl mussel was established by the Norwegian Environment Agency at Austevoll outside of Bergen. The goal was to prevent threatened populations from going extinct by hatchery production and release of freshwater pearl mussel juveniles into local populations. One way of collecting genetic material from nature for production in hatchery is to collect a number of brood-mussels (normally 30-50 specimens), let them spawn and infect fish naturally in the hatchery, and breed juvenile mussels until release. The goal of this project was to evaluate this method genetically.

We used molecular genetic markers for parentage assignment of hatchery-produced mussels from 33 potential brood-mussels. From variance in reproductive success and sex ratio we estimated the effective number of brood-mussel. Genetic variation in terms of number of alleles and expected heterozygosity was compared between brood-mussels and their offspring.

We analysed 179 offspring from 33 potential brood-mussels. We identified contribution from 28 different brood-mussels with number of offspring varying between 1 and 124. One brood-mussel contributed with about one-third of all offspring produced, each of three brood-mussels between 5% and 10%, each of 15 brood-mussels between 1% and 5%, and 14 brood-mussels contributed with less than 1% of the offspring. From the observed variance in reproductive success and the sex ratio, the effective number of brood-mussel was estimated at 5.42. The offspring had significantly lower genetic variation than the brood-mussels, measured as number of alleles and an almost significant ($P = 0.055$) lower genetic variation measured as expected heterozygosity. A large proportion of the brood-mussels contributed to the production but because of very large variations in reproductive success and skewed sex ratio (26:7) the effective number of brood-mussel was low compared to the actual number ($N_e/N = 0.15$). Based on these observations there is a potential risk for an increase in the rate of inbreeding and loss of genetic variation, should these contribute in reproduction after release into the natural population. There is no knowledge of the survival of hatchery produced and released freshwater pearl mussel until age of reproduction. At this stage, it is therefore not possible to predict if the stocking of mussels will lead to a restoration of threatened populations both in terms of population size and in terms of genetic variation. We suggest a precautionary approach whereby the contribution from each brood-mussel is controlled to maximize the effective number of brood-mussel, and that a moderate number of hatchery-produced mussels are being released from many production years.

Here we have analysed only one method of hatchery production of freshwater pearl mussel, exemplified by one population and one year of production. There is likely variation between years of production and between populations, none of which are explored here. Because effective number of breeders and sex ratio are likely to vary, results presented in the present study are not generic, but suggest a need to improve the ratio of effective number to the actual number of breeders among brood-mussels. Other methods remain to be explored in a similar way to find the most appropriate one for future stocking of freshwater pearl mussel.

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 |
| Abstract | 4 |
| Innhold | 5 |
| Forord | 6 |
| 1 Innledning | 7 |
| 1.1 Bakgrunn..... | 7 |
| 1.2 Kultivering av elvemusling som bevaringstiltak..... | 9 |
| 2 Materiale og metoder | 11 |
| 2.1 Test av sikkerhet i genetisk tilordning ved simulering..... | 11 |
| 2.2 Utvikling av nytt mikrosatellitt assay..... | 12 |
| 2.3 Genetisk tilordning..... | 13 |
| 2.4 Beregning av effektivt antall stammuslinger..... | 13 |
| 2.5 Analyser av genetisk variasjon..... | 14 |
| 3 Resultater | 15 |
| 3.1 Genetisk tilordning ved utvetydig ekskludering..... | 15 |
| 3.2 Genetisk tilordning ved relativ sannsynlighet..... | 16 |
| 3.3 Effektivt antall stammuslinger..... | 16 |
| 3.4 Genetisk variasjon | 17 |
| 4 Diskusjon | 18 |
| 5 Referanser | 21 |

Forord

I handlingsplanen for elvemusling er målet for arbeidet med forvaltning av elvemusling i et langsiktig perspektiv at den skal finnes i livskraftige populasjoner i hele Norge. Alle nåværende naturlige populasjoner skal opprettholdes eller forbedres. Ut fra en slik målsetting er det nødvendig med tiltak i mange av vassdragene med elvemusling for å bedre levevilkårene, øke rekrutteringen og bygge opp igjen bestanden av elvemusling.

Mange land i Europa (Tsjekkia, Tyskland, Irland, Luxembourg, England, Frankrike, Spania og Østerrike) har etablert kultiveringsanlegg for oppdrett av elvemusling. Innsamling og oppbevaring av stammuslinger i anlegg fungerer også som genbank for akutt truede populasjoner. Basert på metodene som benyttes er det nå fullt mulig å produsere et stort antall unge muslinger for å opprettholde utvalgte populasjoner. Kultivering og utsetting av muslinger er ikke ment å erstatte andre nødvendige restaureringstiltak, men kan være et viktig supplement for å reetablere utarmede og truede bestander. Kultivering av elvemusling er relativt nytt i Norge, og metodevalg og driftsformer har endret seg i takt med økt kunnskap. Det har samtidig vært fokus på hvordan kultiveringsarbeidet best skal ivareta den genetiske sammensetningen og variasjonen til hver enkelt populasjon.

For å undersøke hvordan kultiveringsstrategien for elvemusling i anlegget på Austevoll påvirker genetisk variasjon i utsettingsmaterialet søkte NINA om midler til å gjennomføre prosjektet «Elvemusling – evaluering av en kultiveringsmetode» fra Fylkesmannen i Hordaland. Fylkesmannen vurderte prosjektet som en viktig del av det pågående kultiveringsarbeidet, og prosjektet ble finansiert gjennom tilskuddsposten til truede arter i 2015.

Kontaktperson hos Fylkesmannen i Hordaland har vært Olav Overvoll. Ragnhild Jakobsen og Janhavi Marwaha utførte arbeidet med å filtrere og sortere ut de små muslingene fra substratet i oppvekstrennene på kultiveringsanlegget på Austevoll for deretter å fiksere dem enkeltvis på etanol for midlertidig lagring. En stor takk til dem begge, og ikke minst til ansvarlig leder på anlegget, Per Jakobsen, for all hjelp og god tilrettelegging som gjorde prøvetakingen effektiv og vellykket.

Trondheim, april 2016

Sten Karlsson
Prosjektleder

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Elvemusling, *Margaritifera margaritifera*, ble angitt med status «sårbar» på den norske rødlisten både i 2006, 2010 og 2015 (Henriksen & Hilmo 2015). Bestandsstatus er imidlertid ytterligere forverret i nesten hele dens utbredelsesområde i Europa, og elvemusling er oppført som «kritisk truet» på den europeiske naturvernunionens (IUCN) liste over truede dyrearter (Cuttelod mfl. 2011). I tillegg er den ført opp på Bern-konvensjonens liste III over arter som det skal tas spesielt hensyn til, og den er listet opp i EUs habitatdirektiv (vedleggene II og V).



Elvemusling oppnår normalt en størrelse på 10-13 cm. Skallet er mørkt, nesten svart hos eldre individer, og som oftest nyreformet. Foto: Bjørn Mejdell Larsen.

I likhet med mange andre land i Europa er det laget en egen handlingsplan for elvemusling i Norge (Direktoratet for naturforvaltning 2006). Ett hovedmål i handlingsplanen er at alle nåværende naturlige populasjoner skal opprettholdes eller forbedres.

Elvemuslingens livssyklus omfatter et larvestadium på gjellene til laks eller ørret, et ungt stadium nedgravd i grusen og et voksent stadium synlig på elvebunnen (se **faktaboks 1**). Omfattende studier har vist at ulike muslingpopulasjoner er tilpasset enten laks eller ørret som vertsfisk (bl.a. Karlson & Larsen 2013). Det er også vist at elvemuslingens larver utvikler seg ulikt på ulike ørretstammer (Larsen 2009, Österling & Larsen 2013).

De voksne muslingene forflytter seg i liten grad etter at de har etablert seg på elvebunnen. Spredning innad i vassdrag og mellom vassdrag skjer derfor mens muslinglarvene er festet til fisken.

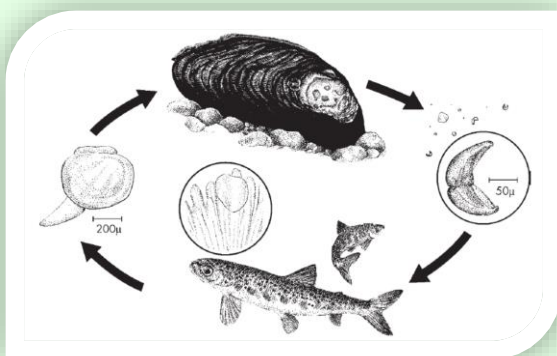
Faktaboks 1: Elvemusling *Margaritifera margaritifera*. Fra Larsen(2005).

KJENNETEGN:

Normal størrelse på en voksen elvemusling er 7-15 cm, og de eldste muslingene kan bli over 200 år gamle. Skallet er mørkt brunlig, nesten svart hos eldre individer, og som oftest nyreformet. Skallet beskytter de myke kroppsdelenene. Muslingen har en muskuløs fot som den kan bruke til å forflytte seg med eller forankre seg i substratet med.

LEVESETT:

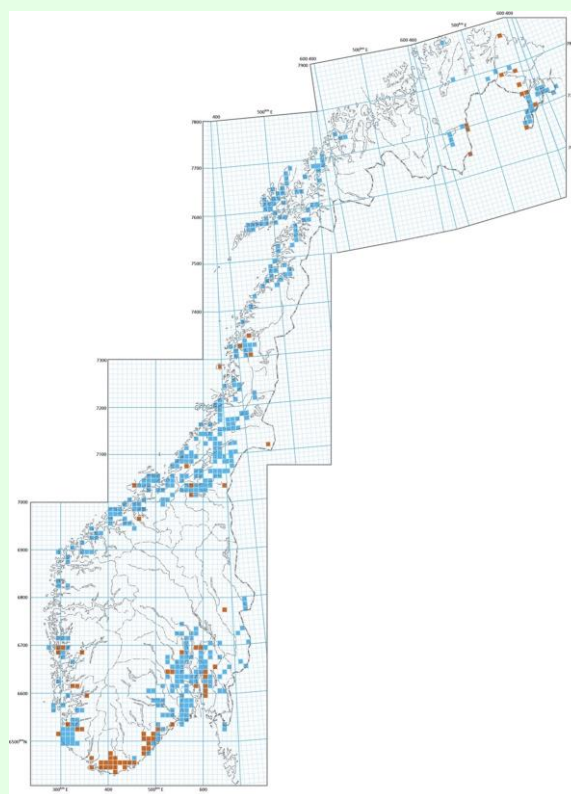
Elvemuslingens livssyklus omfatter et larvestadium på gjellene til laks eller ørret, et ungt stadium nedgravd i grusen og et voksent stadium synlig på elvebunnen. Gjellene til de voksne muslingene fungerer som «yngel-kammer» for larvene i om lag fire uker tidlig på høsten. Larvestadiet (0,04 mm lange) på gjellene til laks eller ørret varer normalt 9-11 måneder, og er helt nødvendig for at larven skal utvikle seg til en ferdig musling. Larvene er 0,45 mm når de slipper seg fra fiskegjellene. I de første leveårene (opp til en lengde på minst 15-30 mm) lever muslingene fullstendig nedgravd i substratet. Elvemuslingen blir normalt kjønnsmoden i 12-15-årsalder (50-75 mm lang), og vil kunne formere seg resten av livet. Veksthastigheten til muslingen avhenger av vanntemperatur, vannkvalitet og tilgang på næring. Den filtrerer 50 liter vann over gjellene hvert døgn. Dette bidrar til å rense vannet.



Elvemuslingens livssyklus. Fra Skinner mfl. (2003).

UTBREDELSE:

Elvemusling er kjent fra store deler av Europa og den østlige delen av Nord-Amerika, men har vist en sterk tilbakegang i hele Europa. Norge har mer enn en firedel av alle kjente lokaliteter med elvemusling og mer enn to tredeler av alle elvemuslinger i Europa. Arten finnes i et belte langs kysten, og er kjent fra om lag 525 lokaliteter. Elvemusling har imidlertid dødd ut i nær en femdel av disse lokalitetene.



Utbredelse av elvemusling i Norge angitt i 10x10 km ruter. Områder med levende muslinger har blå farge. Områder med bare utdøde bestander har rød farge.

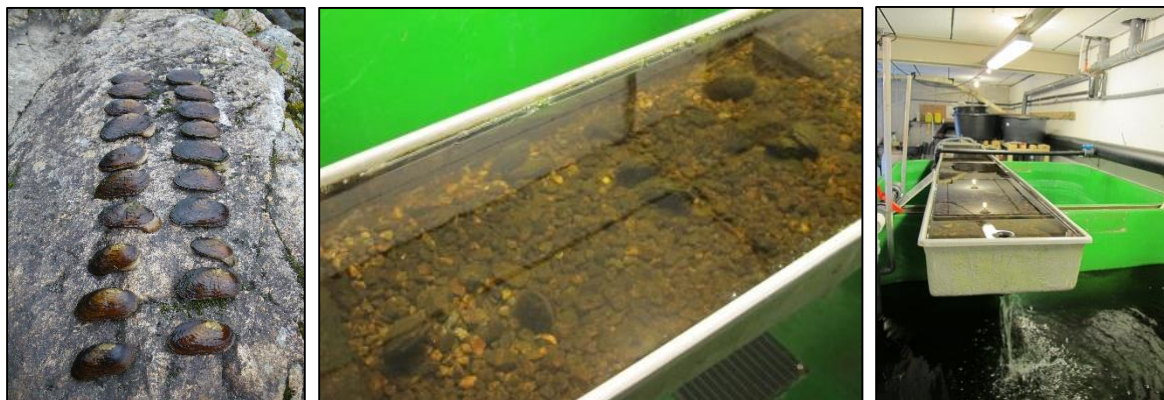
1.2 Kultivering av elvemusling som bevaringstiltak

Direktoratet for naturforvaltning (nåværende Miljødirektoratet) etablerte i 2011 et kultiveringsanlegg for elvemusling på Austevoll utenfor Bergen. Målet var å sikre bestander av elvemusling ved å dyrke dem opp og sette ut et større antall avkom i bestander med dårlig eller ingen naturlig rekruttering. Anlegget som er det største i sitt slag i Europa, har kapasitet til å huse anslagsvis 80 truede bestander av elvemusling.

Det er benyttet fire ulike måter å hente inn materiale til anlegget (se bl.a. Jakobsen mfl. 2015):

1. Elfiske: Innsamling av fiskeunger (laks eller ørret) som er naturlig infisert med muslinglarver fra en aktuell lokalitet
2. Karinfeksjon i felt: Infeksjon av laks- eller ørretunger i felt ved å holde muslinger og fisk sammen i en lukket enhet i elva eller i kar på land
3. Innsamling stammuslinger: Innsamling av voksne muslinger i felt (normalt 30-50 individ) som overføres til anlegget der de holdes for infeksjon av fisk direkte i kultiveringsanlegget
4. Innsamling glochidier: Høsting av muslinglarver direkte i felt og overføring til anlegget der de overføres til kar med fisk som blir infisert.

For å unngå problemer med villfisk (bl.a. sykdomsagens) i anlegget ble det i 2014 i større grad satset på innsamling av stammuslinger og bruk av fisk fra oppdrettsanlegg (ørret fra Botsvann for ørretmuslinger og laks fra Bjoreiostammen for laksemuslinger). Det er senere valgt å supplere med ytterligere to ørretstammer da ulike ørretmuslinger åpenbart har ulik preferanse for ulike ørretstammer (jf. Österling & Larsen 2013). Det er anbefalt å holde mellom 20 og 50 muslinger fra hver bestand for å sikre at både hunner og hanner er representert i avlsbestanden (Jakobsen mfl. 2015), og at muslingene samles fra en lengre strekning i moderlokaliteten for å sikre en så stor genetisk variasjon som mulig. Muslingene holdes i kunstige «elver» i anlegget der avstanden mellom muslingene er liten nok til å sikre en god befruktning av eggene.



Innsamling av stammuslinger i felt blir overført til kunstige «elver» på kultiveringsanlegget. Avløpsvannet som inneholder muslinglarver renner ned i kar med fisk som muslinglarvene kan feste seg til. Foto: Bjørn Mejdell Larsen.

Kultivering i form av å oppformere avkom i et anlegg og tilbakeføre disse til det naturlige miljøet er en potensielt meget effektiv metode for oppnå ønskede, men også uønskede genetiske effekter. Det kan være mange forskjellige grunner til kultivering, men for en truet art som elvemusling handler kultivering om å ta vare på og forhindre at bestander utrykkes. Et mål i denne sammenhengen er å bevare genetisk integritet og genetisk variasjon for de ulike bestandene. Det er derfor avgjørende at muslinger som benyttes i oppdrett har riktig opphav i forhold til den opprinnelige bestanden som deres avkom blir tilbakeført til.

Kultiveringsanlegget for elvemusling på Austevoll hadde i 2014 stammuslinger fra 16 ulike lokaliteter i anlegget, og Utvikelva i Nord-Trøndelag var en av disse (Larsen 2015). Trettitue elvemusling ble samlet inn fra Utvikelva 19. august 2012 for oversendelse til kultiveringsanlegget på Austevoll (A. Rikstad, Fylkesmannen i Nord-Trøndelag, pers. medd.). Muslingene var i god form ved ankomst anlegget, og infiserte ørret i anlegget (Jakobsen mfl. 2013). Infeksjonen ble imidlertid mislykket uten at årsaken til dette er kjent, og det ble derfor ikke produsert avkom våren 2013 som forventet. Høsten 2013 ble det på nytt bekreftet at Utvik-muslingene hadde infisert ørret i anlegget (Jakobsen & Jakobsen 2014). Dette resulterte i at det ble høstet 8956 muslinger våren 2014 (Jakobsen mfl. 2015). Sommeren 2014 var et utfordrende år for anlegget med ekstremt høy temperatur i vannkilden og en uheldig høy tilførsel av organisk materiale som ga redusert oksygenmetning og høye nitritkonsentrasjoner i vanntilførselen til anlegget (Jakobsen mfl. 2015). Det var likevel fortsatt ca. 2700 avkom av muslinger fra Utvikelva i anlegget høsten 2014 (Jakobsen & Jakobsen 2016). Avkom produsert fra stammuslinger fra Utvikelva hadde nær avsluttet sin andre vekstsesong ved innsamlingen i oktober 2015, og hadde rukket å bli nærmere halvannet år gamle (alder 1+).

En uaktsom kultivering kan føre til en reduksjon i effektiv populasjonsstørrelse (Ryman-Laikre-effekten; Ryman & Laikre 1991), og som en følge av dette også medføre tap av genetisk variasjon. Ryman-Laikre-effekten oppstår ved å gi avkommet til et begrenset antall stammuslinger en høy overlevelse fram til utsetting slik at de utgjør en stor andel av den naturlige bestanden. Den effektive populasjonsstørrelsen forventes å bli redusert i en slik situasjon til tross for at det totale antallet muslinger økes. Det er derfor viktig å benytte et tilstrekkelig antall stammuslinger i forhold til hvor stor andel avkommet til disse vil utgjøre i den naturlige bestanden. Det er imidlertid ikke det faktiske antall stammuslinger, men det *effektive antall stammuslinger* som avgjør det relative genetiske bidraget fra kultivering i forhold til den naturlige bestanden. Den effektive bestandsstørrelsen vil kunne avvike mye fra observert antall stammuslinger, først og fremst på grunn av skjev kjønnsfordeling og variasjon i antall avkom fra hver familie. For eksempel vil effektivt antall stammusling bli nesten halvert ved en kjønnsfordeling på 1:5 i forhold til en lik kjønnsfordeling. Videre vil en høy variasjon i antall avkom fra de ulike stammuslingene kunne redusere effektivt antall stammusling ytterligere (Karlsson mfl. 2016). I et kultiveringsprogram for elvemusling vil en oversikt over disse viktige faktorene gjøre det mulig å foreta justeringer for å maksimere det effektive antallet av stammusling og unngå negative konsekvenser, og isteden oppnå en positiv effekt på genetisk variasjon.

Siden kultivering av elvemusling ikke har vært forsøkt tidligere i Norge ble det vurdert som viktig og nødvendig å evaluere metodene for så tidlig som mulig å kunne korrigere eventuelle svakheter i metodikk og utsettingsplaner. I denne omgang var hovedformålet med prosjektet å evaluere strategien med innsamling av stammusling (voksne elvemusling, normalt 30-50 individ) som overføres til anlegget på Austevoll. Etter naturlig gyting i anlegget tidlig på høsten og påfølgende infeksjon av en egnet vertsfisk vil muslinglarvene slippe seg av vertsfisken våren etter. Fra ferdig utviklet muslinglarve blir småmuslingene drettet opp til en alder og størrelse som egner seg for utsetting i den opprinnelige elva. Utvikelva i Nord-Trøndelag ble valgt ut som eksempel-populasjon til en slik evaluering.

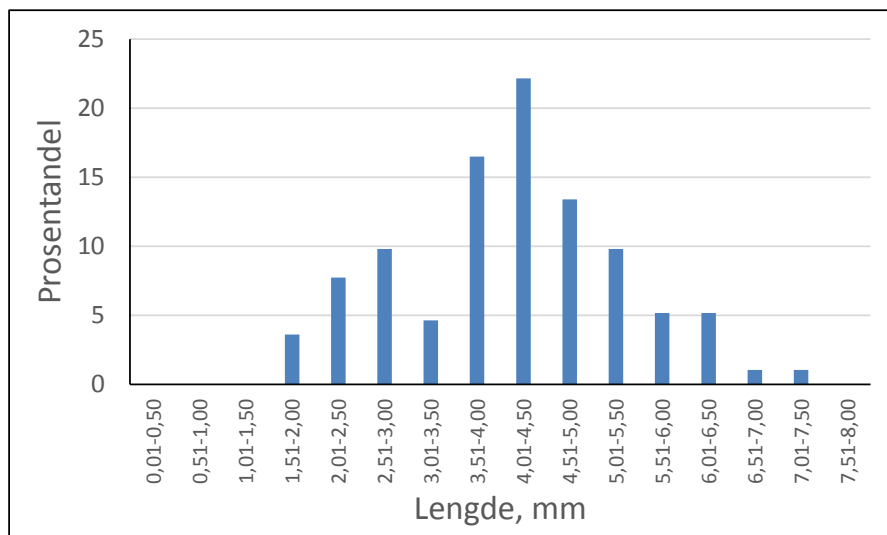
Prosjektet har angitt følgende delmål:

- Beregne den effektive beholdningen av stammusling ved å undersøke kjønnsfordeling blant stammuslingene og estimere variasjon i antall avkom fra hver stammusling (ved genetisk å tilordne avkom til riktig forelder (mor og far))
- Sammenlikne den genetiske variasjonen blant utsatt musling fra anlegget med den genetiske variasjonen i elva representert ved stammuslingene
- Gi konkrete og generelle råd for i størst mulig grad å ta vare på den genetiske variasjonen i elvemuslingbestander ved bruk av denne kultiveringsstrategien.

Resultatet av dette arbeidet presenteres i denne rapporten.

2 Materiale og metoder

Stammuslinger fra Utvikelva i Nord-Trøndelag samlet inn i 2012 hadde vellykket produksjon av avkom første gang våren 2014. Til sammen 194 småmuslinger (avkom) produsert fra disse stammuslingene ble samlet inn fra oppvekst-rennene på kultiveringsanlegget på Austevoll 28.-29. oktober 2015. Muslingene ble lagt på sprit for senere lengdemåling og ekstraksjon av arvestoffet (DNA). De små muslingene var mellom 1,8 og 7,4 mm lange (**figur 1**) med en gjennomsnittlig lengde på 4,1 mm. Ved lengdemåling av muslingene ble det gjort anmerkninger om at minst 12 av individene kunne være døde eller sannsynlig døde ved innsamling.



Figur 1. Lengdefordeling av 194 småmuslinger (avkom) av elvemusling oppdrettet på kultiveringsanlegget på Austevoll fra 33 stammuslinger tatt inn fra Utvikelva i Nord-Trøndelag i 2012.

Det var potensielt 33 foreldremuslinger (stammuslinger) til disse avkommene. Stammuslingene var 81-110 mm lange med et gjennomsnitt på 98 mm (SD = 8, N = 33). Det ble tatt DNA-prøver av alle disse ved å stryke på overflaten av de indre bløtdelene (fot og kappe) med en bomullspinne (Q-tip) som beskrevet av Karlsson mfl. (2013). Senere ble DNA ekstrahert på NINAs genetikklaboratorium som beskrevet av Karlsson mfl. (2013) ved bruk Dneasy tissue kit fra Qiagen.

Individene ble i første omgang analysert for genetisk variasjon for åtte mikrosatellitt-markører utviklet av Geist mfl. (2003) som beskrevet av Karlsson & Larsen (2013). Genotyping ble mislykket for 15 av de små muslingene. Årsaken til dette kan i noen grad forklares med at noen av de små muslingene var døde ved innsamling, og i realiteten bare var tomme muslingskall uten organiske deler.

2.1 Test av sikkerhet i genetisk tilordning ved simulering

Sikker tilordning av foreldre til avkom forutsetter at et tilstrekkelig antall genetiske markører benyttes og at det er tilstrekkelig stor genetisk variasjon blant de potensielle foreldrene, slik at bare ett spesifikt foreldrepar har en genetisk profil som matcher den genetiske sammensetningen til et avkom (Jones & Ardren 2003, Vandeputte mfl. 2006, Karlsson mfl. 2008). Vi undersøkte først hvorvidt de åtte markørene som var analysert med hensyn til genetisk variasjon, var tilstrekkelig for sikker tilordning av foreldre hos en art som elvemusling som har så lav genetisk variasjon (Karlsson mfl. 2014). Dette ble gjort ved å simulere 200 avkom fra genotyper i disse åtte mikrosatellittene hos de 33 stammuslingene. For hvert individ og mikrosatellitt ble det trukket tilfeldig

en av to gener slik at vi konstruerte gameter (egg og spermier) som siden tilfeldig smeltet sammen til avkom (R-script ved Ola Diserud, NINA). De kunstig genererte genotypene til avkommet ble siden genetisk tilordnet til stammuslingene, og sikkerheten til tilordningen ble vurdert. Resultatet fra denne simuleringen viste at de åtte mikrosatellittene som var tilgjengelige ikke ga tilstrekkelig sikker tilordning av riktig foreldrepar til avkom. Bare 32 avkom ble tilordnet et spesifikt foreldrepar, mens de resterende 168 individene ble tilordnet to eller opp til 23 ulike foreldrepar.

Panelet av genetiske markører ble derfor utvidet med syv nye mikrosatellitter beskrevet av Geist mfl. 2003 og Garlie (2010), og simuleringsprosedyren for å teste sikkerheten i tilordning av foreldre ble gjennomført på nytt, men denne gangen med 15 mikrosatellitter. Med det nye og utvidede markørsettet ble hver og en av 147 simulerte avkom genetisk tilordnet ett spesifikt foreldrepar, mens 51 avkom kunne tilordnes mellom 2 og 6 forskjellige foreldrepar. Alle avkom fra stammuslingene fra Utvikelva forventes derfor ikke med 100 prosent sikkerhet å kunne tilordnes til riktig foreldrepar, og muligheten for å utvide settet med markører ytterligere er begrenset med de relativt få markørene som er beskrevet for elvemusling. Vi vurderte imidlertid sikkerheten av genetisk tilordning som tilstrekkelig for å nå hovedmålet i denne studien som skulle være å estimere effektivt antall stammuslinger, sammenlikne genetisk variasjon blant avkom med den genetiske variasjonen hos stammuslingene og evaluere denne typen kultiveringsmetode.

2.2 Utvikling av nytt mikrosatellitt assay

NINA har i mange studier genotypet åtte mikrosatellitter fordelt på to PCR multiplekser som beskrevet av Karlsson mfl. (2013). To av mikrosatellittene har imidlertid vist signifikante avvik fra Hardy-Weinberg likevekt som tilskrives usikker genotyping. Disse har derfor ikke blitt inkludert i de videre analysene. De seks resterende mikrosatellittene har imidlertid blitt brukt i mange studier, og en stor database med genotyper fra disse foreligger. Det var derfor ønskelig å beholde disse seks markørene ved en utvidelse av antall markører. Samtidig var det ønskelig å ta ut de to upålitelige markørene fra protokollen og erstatte disse med så mange nye som mulig. Ni nye markører ble inkludert fra primer-sekvenser fra Geist mfl. (2003) og Garlie (2010) fordelt i to ulike PCR multiplekser (**tabell 1**).

Tabell 1. PCR protokoll utviklet for 15 mikrosatellitter fordelt på to multiplexer (A og B). $\mu\text{l}/\text{primer}$ er volum av hver forward og revers primersekvens tilsatt fra en arbeidsløsning på 100 μM , Merking er fluorescens-merking brukt for deteksjon av oppformerte fragmenter, Fragmentlengde er forventede oppformerte fragmentstørrelser angitt i basepar (bp), Type er påviste repeterte enheter. Flere detaljer er tilgjengelige i oppgitte referanser.

| Mikrosatellitt id | $\mu\text{l}/\text{primer}$ | Merking | Fragmentlengde (bp) | Type | Referanse |
|---------------------|-----------------------------|---------|---------------------|---|------------------|
| Multipleks A | | | | | |
| MarMa3050 | 0,1 | 6FAM | 71-92 | (CA) ₁₄ | Geist m fl. 2003 |
| MarMa3621 | 0,15 | NED | 164-227 | (CAA) ₂ (GA) ₂₂ | Geist m fl. 2003 |
| MarMa4322 | 0,1 | 6FAM | 198-214 | (TAT) ₁₀ AAT(TAT) ₂ | Geist m fl. 2003 |
| Mm2230 | 0,2 | 6FAM | 230-245 | (CTAC) ₁₀ | Garlie 2010 |
| Mm2235 | 0,2 | VIC | 195-247 | (TATG) ₁₅ | Garlie 2010 |
| MarMa4277 | 0,15 | PET | 175-195 | (CT) ₂₀ (CA) ₁₆ | Geist m fl. 2003 |
| Mm2240 | 0,1 | NED | 97-107 | (AAT) ₁₀ | Garlie 2010 |
| Mm2201 | 0,08 | VIC | 260-286 | (CATA) ₂₁ | Garlie 2010 |

Tabell 1 fortsetter.

| Mikrosatellitt id | µl/primer | Merking | Fragment-lengde (bp) | Type | Referanse |
|---------------------|-----------|---------|----------------------|---|------------------|
| Multipleks B | | | | | |
| MarMa2671 | 0,1 | 6FAM | 145-149 | (GA) ₈ AA(GA) ₆ | Geist m fl. 2003 |
| MarMa4143 | 1 | 6FAM | 179-220 | (TC) ₁₆ | Geist m fl. 2003 |
| MarMa5280 | 0,1 | NED | 194-205 | (CT) ₉ (CA) ₉ (GT) ₂ (AC) ₃ | Geist m fl. 2003 |
| Mm2233 | 0,1 | PET | 160-167 | (ATT) ₁₄ | Garlie 2010 |
| Mm2236 | 0,12 | PET | 180-245 | (ATCT) ₁₄ | Garlie 2010 |
| Mm2207 | 0,1 | VIC | 245-270 | (TTA) ₂₀ (TTG) ₈ | Garlie 2010 |
| Mm2210 | 0,12 | 6FAM | 225-277 | (TATTA) ₂₅ | Garlie 2010 |

For hver multipleks ble det tilsatt 4 µl Qiagen multiplex mastermix, 0,8 µl primermix, 1,6 µl RNase fritt vann og 2,0 µl DNA templat. PCR ble kjørt med et denatureringssteg ved 95 °C i 15 minutter, deretter med 30 sykluser av: 95 °C i 30 sekunder, 57 °C i 90 sekunder og 72 °C i 60 sekunder. PCR ble avsluttet med 60 °C i 30 minutter.

2.3 Genetisk tilordning

Prinsippet for genetisk tilordning av et foreldrepar til et avkom er at avkommet arver ett av to gener fra mor og far. Man har derfor en forventning om hvilke genotyper et avkom etter et foreldrepar kan ha, og dersom man undersøker et tilstrekkelig antall gener kan man med tilnærmet 100 % sikkerhet identifisere foreldrene til avkommet. Foreldre-avkom-match (eller mismatch) for de ulike genetiske markørene ble i denne analysen utført ved hjelp av et script i Visual Basic (Thomas Moen, AquaGen AS, upublisert). For avkom der flere enn ett spesifikt foreldrepar matchet avkommets genotype, ble en av foreldrene identifisert som forelder dersom denne var med i alle matchende foreldrepar. Utfra denne metoden ble stammuslinger med sikkert bidrag med avkom identifisert. Siden ikke alle avkom kunne tilordnes et stammuslingpar med tilstrekkelig sikkerhet ble programmet Cervus 3.0.7. benyttet (Marshall mfl. 1998, Kalinowski mfl. 2007) for å identifisere de mest sannsynlige foreldrene ved å beregne likelihood score ved hjelp av allelfrekvenser. Siden elvemusling kan være en hermafrodit med en mulighet for selvbefruktning (Bauer 1987), gjorde vi den genetiske tilordningen slik at dette skulle være mulig. Utfra den genetiske tilordningen ble kjønnsgruppene utledet ved å anta ett kjønn for en spesifikk stammusling og angi motsatt kjønn for alle de som produserte avkom med denne. Deretter ble kjønn utledet for de stammuslinger som dannet par med disse igjen, til alle stammuslinger ble gitt et kjønn. Hvilket kjønn som i utgangspunktet ble antatt for denne utledningen kan være feil, men for beregningene av effektivt antall stammuslinger er dette uvesentlig.

2.4 Beregning av effektivt antall stammuslinger

Effektiv bestandsstørrelse er et standardisert mål. Effektiv bestandsstørrelse er det samme som faktisk bestandsstørrelse i en idealisert bestand der det er like mange hunner og hanner, der parring skjer tilfeldig og der antall avkom fra hver familie er to; den samme som forventningsverdien i antall avkom per familie i en bestand som opprettholder seg selv (Falconer & Mackay 1996). Med kjennskap til relativt bidrag fra hver stammusling kan man utfra variasjon i antall avkom benytte dette for å beregne det effektive antall stammuslinger (N_{eb}) i henhold til likning 14 i Caballero (1994):

$$N_{be} = (N\mu - 1)/(\mu - 1 + \sigma^2/\mu) \quad (\text{Likning 1})$$

Der N er antall stammuslinger, μ er gjennomsnittlig avkom per stammusling og σ^2 er variansen i antall avkom blant stammuslingene. Vi skalerte variansen i antall avkom til 2 tilsvarende gjennomsnittlig antall avkom for en stabil populasjonsstørrelse, og satte $\mu=2$. Effektivt antall stammuslinger ble beregnet separat for hunner og hanner med likning 1 og utfra disse estimatene ble totalt effektivt antall stammuslinger beregnet i henhold til likning 2:

$$N_e = (4 \times N_{eb\text{♀}} \times N_{eb\text{♂}})/(N_{eb\text{♀}} + N_{eb\text{♂}}) \quad (\text{Likning 2})$$

I tillegg til å beregne effektivt antall stammuslinger utfra genetisk tilordning av foreldre til avkom som beskrevet ovenfor, benyttet vi en såkalt «Sibship» metode (Wang 2009) implementert i programmet Colony 2.0.2.3 (Jones & Wang 2010). Enkelt forklart identifiseres på denne måten halv- og hel-søsken utfra forventet genotypisk likhet, og utfra denne sammensetningen i stikkprøven beregnes det hvor mange effektive foreldre dette tilsvarer.

2.5 Analyser av genetisk variasjon

Genetisk variasjon i form av forventet heterozygositet og allelrikdom ble estimert ved programvaren FSTAT v. 2.9.3 (Goudet 2001). Allelrikdom er et mål på antall forskjellige alleler uavhengig av den reelle sample-størrelsen. For å sammenligne allelrikdom mellom stammuslingene, som representerte en tilfeldig stikkprøve av bestanden i Utvikelva, med avkommet, tok vi derfor utgangspunkt i stikkprøven med det laveste antall muslinger (i vårt tilfelle var dette 33 stammuslinger). Statistisk test av forskjeller i genetisk variasjon mellom stammusling og avkom ble testet ved en Wilcoxon signed rank test som implementert i SPSS Statistics 18 (<http://www.spss.com/>).

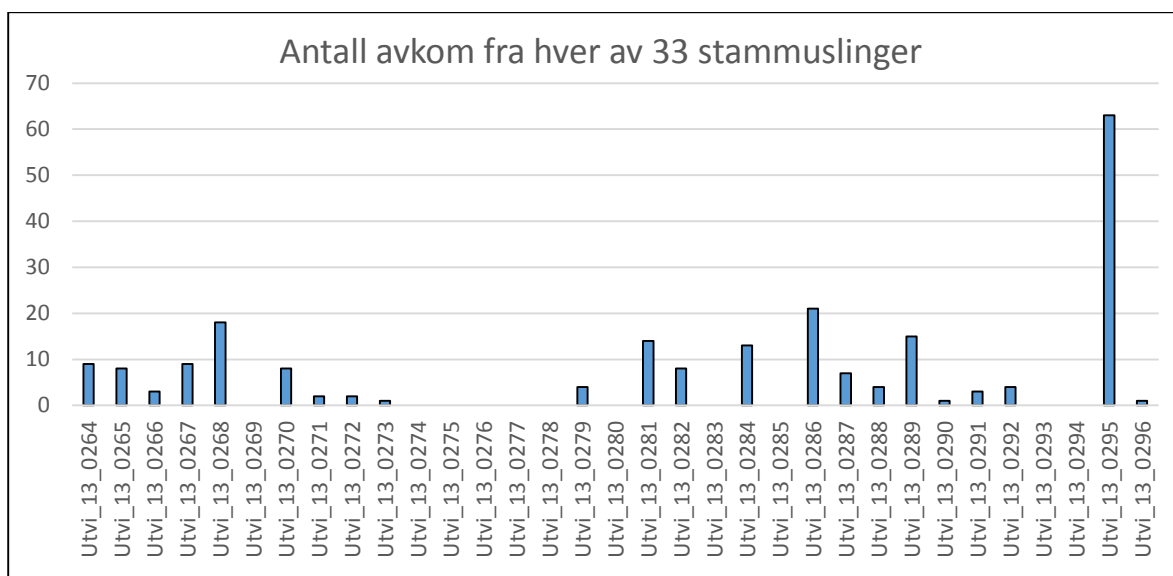
3 Resultater

Av 194 avkom som ble samlet inn ble genotypen vellykket bestemt for 179 avkom. Av de 15 individene som ikke ble genotypet, hadde 12 av dem anmerkninger etter lengdemålingen om at de var døde eller sannsynlig døde ved innsamling. Disse individene var 1,8-2,6 mm lange og tilhørte de minste lengdegruppene. Dette kan være forenlig med at de har dødd tidlig i vekstsesongen.

Siden antall tilgjengelige markører i forhold til den genetiske variasjonen ikke var tilstrekkelig for å kunne tilordne samtlige avkom til foreldre med tilnærmet 100 % sikkerhet, har vi valgt å presentere resultatene først ved genetisk tilordning av de avkom der det kun var match for ett mulig foreldrepar og én eller flere mismatch for andre. Deretter presenterer vi resultater av genetisk tilordning av samtlige avkom til de mest sannsynlige stammusling-foreldrene.

3.1 Genetisk tilordning ved utvetydig ekskludering

Av 179 avkom kunne 88 av dem tilordnes til 22 spesifikke foreldrepar, det vil si at de utfra mismatch i genotype ikke kunne tilordnes andre foreldrepar. Blant disse familiene var 22 forskjellige stammuslinger representert slik at det var fire forskjellige halvsøskengrupper og tre helsøskengrupper med unike foreldre. I situasjoner der en stammusling kunne være en forelder i kombinasjon med andre stammuslinger der det ikke var mismatch i genotype, ble i tillegg 42 avkom tilordnet en av de to foreldrene. Antall avkom fra hver av de 22 stammuslingene som ble identifisert utfra fravær av mismatch i genotype, og der andre kunne utelukkes ved mismatch i genotype, varierte mellom ett (0,5 %) og 61 (28,9 %) avkom (**figur 2**).



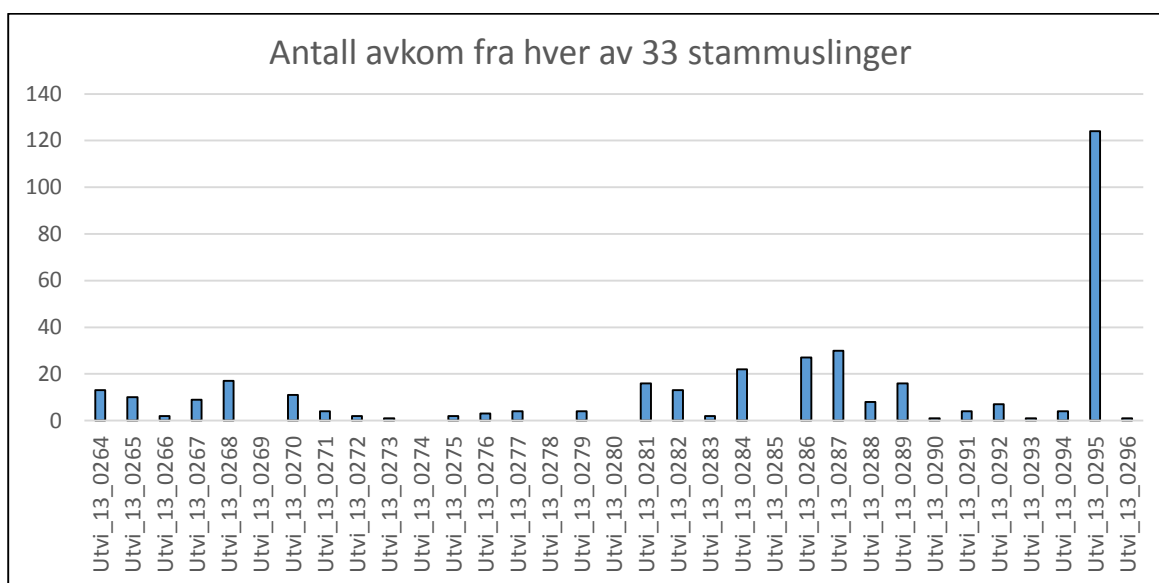
Figur 2. Genetisk tilordning av avkom til 33 stammusling fra Utvikelva, kun inkludert de avkom som hadde genetisk match til kun én mulig stammusling. Dette inkluderte 88 avkom tilordnet spesifikke foreldrepar og 42 avkom tilordnet en av de to foreldrene. På x-aksen er stammusling id.nr. og på y-aksen antall avkom fra hver av disse.

Genetisk tilordning ved å tillate for selvbe-fruktning gav null mismatch til fem avkom og mellom én og seks mismatch som beste match for de resterende 174 avkommene. Fire av avkommene med null mismatch involverte en og samme stammusling (ind. nr. 284), og det femte avkommet en annen stammusling (ind. nr. 292). Stammusling nr. 284 og nr. 292 var også de som viste null

mismatch i flere kombinasjoner med andre stammuslinger. Det er derfor ikke mulig å konkludere med at disse individene produserte avkom ved selvbefruktning. Vi kan imidlertid konkludere med at 31 stammuslinger ikke produserte avkom ved selvbefruktning blant de resterende 174 avkommene. Det er derfor sannsynlig at ingen stammusling produserte avkom ved selvbefruktning.

3.2 Genetisk tilordning ved relativ sannsynlighet

Alle 179 avkom ble genetisk tilordnet utfra høyest 'relative likelihood score' til 40 forskjellige foreldrepar. Blant disse var det 28 forskjellige stammuslinger representert, fordelt på 19 halv-søskengrupper. Antall avkom fra hver tilordnet stammusling varierte mellom ett (0,3 %) og 124 (34,6 %) avkom (**figur 3**).



Figur 3. Genetisk tilordning av avkom til 33 stammusling fra Utvikelva, ved hjelp av relative likelihood score. På x-aksen er stammusling id og på y-aksen antall avkom fra hver av disse.

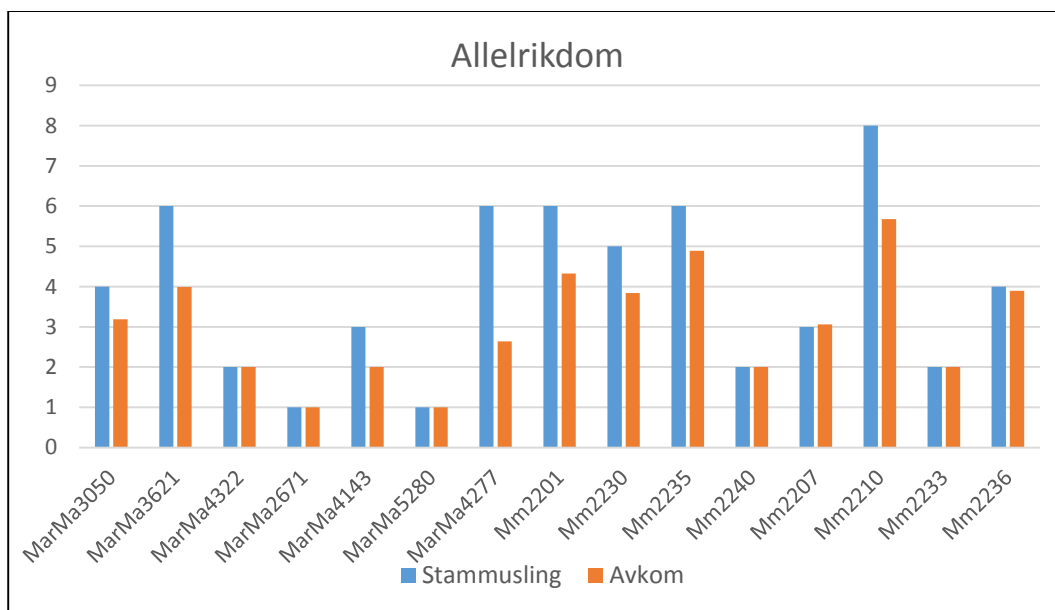
Basert på resultater av genetisk tilordning til foreldrepar ble hann- og hunn-grupper utledet med 22 stammuslinger av det ene kjønnnet og 6 av det andre kjønnnet. Fem stammuslinger ble ikke identifisert med avkom, og kjønn kunne derfor ikke utledes for disse. Om vi antar den samme relative kjønnsfordelingen hos disse muslingene som den observerte kjønnsfordelingen, blir kjønnsfordelingen for alle stammuslingene 26:7.

3.3 Effektivt antall stammuslinger

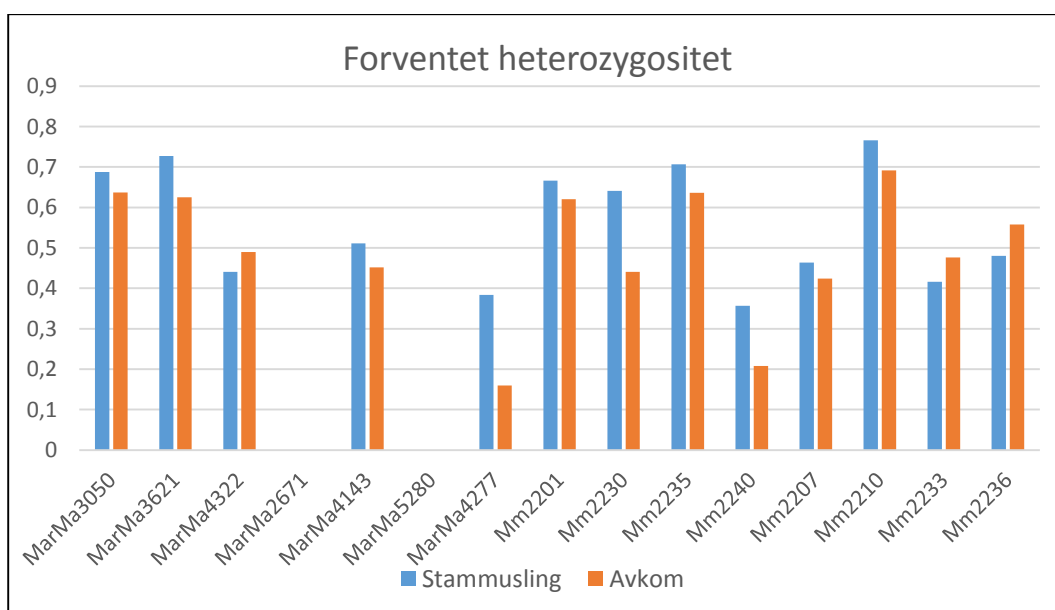
Effektivt antall stammuslinger ble beregnet til 7,17 utfra variasjon i antall avkom mellom stammuslinger og kjønnsfordeling basert på de avkom som utvetydig kunne tilordnes foreldre utfra genetisk mismatch. Effektivt antall stammuslinger ble beregnet til 5,42 utfra genetisk tilordning av foreldre til samtlige avkom ved hjelp av beregnet 'relative likelihood score'. Effektivt antall stammusling ble beregnet til 18 (95% CI: 10 – 34) utfra genetisk identifisering av halv- og helsøsken blant avkommet. Beregningene antyder at man kan forvente at forholdstallet mellom effektivt antall stammuslinger og faktisk antall muslinger ligger mellom 0,16 og 0,22. At det effektive antall stammuslinger ikke ble høyere skyldtes i all hovedsak den ene stammuslingen som stod for en tredjedel av alle avkom, men også den skjeve kjønnsfordelingen (26:7).

3.4 Genetisk variasjon

Genetisk variasjon i form av allelrikdom var signifikant lavere ($P = 0,007$) og forventet heterozygositet var nær signifikant lavere ($P = 0,055$) i avkom sammenliknet med stammusling. Gjennomsnittlig allelrikdom i avkom og stammusling var henholdsvis 3,03 og 3,93. Allelrikdom var lavere i avkommet i 10 mikrosatellitter og på samme nivå i tre mikrosatellitter, mens to mikrosatellitter var monomorfe (**figur 4**). Gjennomsnittlig forventet heterozygositet i avkom og stammusling var henholdsvis 0,43 og 0,48. Forventet heterozygositet var lavere i avkommet i 10 mikrosatellitter og høyere i tre mikrosatellitter, mens to mikrosatellitter var monomorfe (**figur 5**).



Figur 4. Allelrikdom i stammuslinger (blå) fra Utvikelva og deres avkom (oransje) i 15 mikrosatellitt-markører, beregnet fra en minste stikkprøvestørrelse på 33.



Figur 5. Forventet heterozygositet i stammuslinger (blå) fra Utvikelva og deres avkom (oransje) i 15 mikrosatellitt-markører.

4 Diskusjon

I denne studien har vi vist relative bidrag i antall avkom fra 33 stammuslinger tatt inn fra Utvikelva i Nord-Trøndelag for produksjon i oppdrettsanlegget på Austevoll. Avkom fra denne produksjonen skal etter planen settes ut i Utvikelva som et tiltak for å berge en truet bestand. Blant de 33 stammuslingene som potensielt bidro til produksjonen fant vi avkom fra 28 stammuslinger. Dette betyr at fem stammuslinger ikke har bidratt eller har bidratt med en mindre andel enn det som kunne spores blant 179 undersøkte avkom. Utfra genetisk tilordning av foreldre til avkom ble effektivt antall stammuslinger estimert til å være mellom 5,42 og 7,17. Utfra en slektskapsanalyse blant avkommet ble effektivt antall stammuslinger estimert til 18. Det siste estimatet er usikkert og sannsynligvis et overestimat, mens estimatene basert på genetisk tilordning til stammuslinger der faktisk slektskap og bidrag fra stammuslingene er benyttet, representerer en direkte og mer eksakt beregning.

En tredel av avkommet stammet fra én enkelt stammusling. Slike skjeve bidrag fører til en reduksjon i effektivt antall stammuslinger og en skjev representasjon av den genetiske variasjonen i bestanden. Det ble også funnet at avkommet hadde en lavere genetisk variasjon sammenliknet med stammuslingene. Ved å sette ut et stort antall av disse avkommene vil en uforholdsmessig stor andel, relativt til en begrenset vill bestand, kunne bidra i neste generasjons naturlige reproduksjon. Dette gjør at man risikerer økt innavl og en redusert total effektiv bestandsstørrelse som følge av utsettingene; det vil si en såkalt Ryman-Laikre-effekt. I denne studien kan vi ikke si hvorvidt det store bidraget fra den ene stammuslingen har oppstått ved befruktningen og siden vedvart, eller om det har oppstått ved seleksjon i anlegget. Vi kan heller ikke si noe om hvordan overlevelsen til de ulike familiegruppene etter at de er satt ut i elva vil føre til økte eller reduserte forskjeller i bidrag fra de ulike stammuslingene frem til reproduktiv alder.

Den observerte kjønnsfordelingen med 26 av det ene og sju av det andre kjønn bidro også til det lave effektive antall stammuslinger. Siden elvemusling kan være en hermafrodit med mulighet til å utvikle både spermier og egg (enten ved at det ene eller det andre kjønn, eller begge, er funksjonelt utviklet ved gyting og at enkelte muslinger har mulighet å skifte kjønn (Bauer 1987)), kan vi ikke sikkert si hvorvidt den observerte skjeve kjønnsfordelingen stammer fra uttaket av muslinger fra elva, eller om kjønnsfordelingen har oppstått ved kjønnskifte i anlegget. Utfra genetisk tilordning og utledning av kjønnsgrupper observerte vi imidlertid ingen foreldrekombinasjoner som skulle tilsi at enkelte stammuslinger agerte som både hunn og hann. Videre var det kun to stammuslinger som utfra genetisk tilordning kunne ha produsert avkom ved selvbefruktning, men disse to stammuslingene kunne også ha produsert de samme avkommene i krysning med andre stammuslinger. Selvbefruktning kan teoretisk ha forekommet i noen grad, men mest sannsynlig ikke i det hele tatt.

En mulig forklaring på det skjeve bidraget i antall avkom og den skjeve kjønnsfordelingen kan avhenge av plasseringen av stammuslingene i gytekaret. Det kan for eksempel tenkes at hunnmuslinger som tilfeldigvis står oppstrøms alle hannmuslingene ikke blir befruktet og dermed ikke bidrar med avkom, eller at hannmuslinger i karet på grunn av individenes plassering ikke befrukter like mange hunnmuslinger. Gytekar med en sirkulær vannstrøm der spermier fra hannmuslingene blir fordelt til alle hunnmuslingene, istedenfor dagens rektangulære kanaler med en vannstrøm fra den ene enden til den andre, kan muligens redusere denne effekten.

For å vurdere hvorvidt utsettinger av små muslinger fra et begrenset sett av stammuslinger vil kunne føre til økt innavl og redusert genetisk variasjon, trenger vi kunnskap om hvor stor den naturlige bestanden er, hvor stor andel av den naturlige bestanden muslinger fra utsettingene vil utgjøre ved reproduktiv alder, og om den effektive bestanden av utsatte muslinger ved reproduktiv alder. Kunnskap om dette finnes ikke i dag for noen muslingbestand. Elvemusling er en langlivet organisme med overlappende generasjoner. Dette gjør det enda mer komplisert å forutsi genetiske effekter av utsettinger. I en naturlig populasjon som reproducerer hvert år vil variasjon i antall avkom og eventuelle skjeve bidrag fra enkelte muslinger i enkelte år kunne bli utlignet over tid. Antall avkom fra hver enkelt musling i bestanden kan derfor bli relativt stabilt over tid,

mens en enkeltutsetting i ett enkelt år vil kunne bidra med et stort antall avkom fra noen veldig få stammuslinger. Dette vil kunne forårsake negative konsekvenser i form av en Ryman-Laikre-effekt. En forsiktig praksis i mangel på kunnskap om overlevelse og tilslag er tilrådelig. Det anbefales små utsettinger i flere (påfølgende) år basert på et så bredt genetisk materiale som mulig. Metoden som er blitt analysert her ser ut til å kunne gi et lavt effektivt antall stammuslinger i forhold til antall muslinger som er tatt inn i anlegget med en høy risiko for at enkeltindivider kan gi et uforholdsmessig stort bidrag. For å unngå innavl og økt tap av genetisk variasjon er det viktig at slike høye enkeltbidrag enten blir forsøkt utjevnet ved små utsettinger i flere år basert på ulike stammuslinger, alternativt at man utfra kjennskap om relativt bidrag kan ta ut stammuslinger som tidligere har bidratt uforholdsmessig mye. En annen tilnærming, hvis praktisk mulig, kan være å splitte opp produksjonen i familiegrupper og kontrollere hvor mange individer som settes ut fra hver familiegruppe.

I dette prosjektet har vi utviklet en laboratorieprotokoll med et utvidet sett med markører bestående av 15 mikrosatellitter. Dette var nødvendig for å kunne gjøre genetisk tilordning av foreldre til avkom. For de fleste organismer er 15 mikrosatellitter mer enn tilstrekkelig for å oppnå tilnærmet 100 % sikker genetisk tilordning (for eksempel; Karlsson mfl. 2008). Disse 15 markørene var imidlertid ikke tilstrekkelig for en slik sikker genetisk tilordning i dette materialet, hvilket skyldes en generelt lav genetisk variasjon i elvemusling og spesielt i ørretmusling-bestander (Karlsson mfl. 2014). Vi kan derfor ikke utelukke at noen individer kan ha blitt tilordnet feil foreldre, men ikke i en slik grad at vi forventer store avvik i estimatet av effektivt antall stammuslinger. Beregninger av genetisk variasjon (allelrikdom, heterozygositet) er også uavhengig av den genetiske tilordningen. Genetisk tilordning med det utvidede markørsettet brukt i denne rapporten forventes å gi sikrere resultater i bestander med høyere genetisk variasjon, fortrinnsvis for laksemusling-bestander, men kanskje utilfredsstillende sikker genetisk tilordning i ørretmusling-bestander med lavere genetisk variasjon enn Utvikelva.

Målet om å vurdere kultiveringsmetoden, der et antall stammuslinger blir tatt inn i anlegg for produksjon av avkom for deretter å beregne effektivt antall stammusling og sammenlikne genetisk variasjon mellom stammuslingene og avkommet, ble oppfylt. Kultiveringsmetoden er imidlertid kun analysert for én bestand og for ett produksjonsår. Vi kan derfor ikke si noe om variasjon i bidrag fra stammuslinger mellom år og mellom ulike bestander. For å vurdere hvilke produksjonsmetoder av muslinger som i dag benyttes eller potensielt kan benyttes, og som i størst mulig grad ivaretar den genetiske variasjonen til bestander, gjenstår det å gjøre liknende undersøkelser, som i denne studien, på avkom fra de andre måtene det er samlet inn materiale til anlegget på:

- Innsamling av fiskeunger (laks eller ørret) i felt som er naturlig infisert med muslinglarver fra en aktuell populasjon
- Infeksjon av laks- eller ørretunger i felt ved å holde muslinger og fisk sammen i en lukket enhet i elva eller i kar på land
- Høste muslinglarver direkte i felt som senere overføres til anlegget der de infiserer fisk under kontrollerte forhold.

Valg av metode avhenger av resultater av hvordan genetisk variasjon ivaretas og hvordan metoden lar seg gjennomføre i praksis. Men en minst like viktig vurdering er omfanget av utsettinger, det vil si hvor mange avkom som bør settes ut i de ulike bestandene fra hver årsklasse og hvor mange produksjonsår og utsettinger man tar sikte på å gjennomføre.

Som beskrevet ovenfor så er det vanskelig å gi konkrete råd om utsettinger av elvemusling. Hovedgrunnen til dette er mangel på kunnskap om overlevelse og tilslag av utsettinger i forhold til den naturlige bestanden og hvor stor den naturlige effektive bestandsstørrelsen er. Dersom den naturlige bestanden ikke reproduserer i det hele tatt vil det være nødvendig å utarbeide en kultiveringsplan som på lang sikt ivaretar hele den genetiske bredden i bestanden, hvis ikke vil kun de få effektive stammuslingene i anlegget bli representert i fremtidige generasjoner og genetisk variasjon vil gå tapt. Uansett om bestanden har eller ikke har en naturlig reproduksjon,

bør effektivt antall stammuslinger i forhold til faktisk antall stammuslinger maksimeres, slik at dette forholdstallet er høyere enn det er i den naturlige gytebestanden. Hvis ikke, forventes en reduksjon i effektiv bestandsstørrelse eller ingen endring i total effektiv bestandsstørrelse som følge av kultivering. Effektivt antall stammuslinger i forhold til faktisk antall stammuslinger var lavt i eksemplet analysert i denne studien. Tiltak som forbedrer dette forholdstallet vil være viktige for videre utvikling av denne kultiveringsmetoden.

På bakgrunn av observasjoner i denne studien og generelle teoretiske betraktninger foreslår vi inntil videre en forsiktig kultiveringspraksis der antall muslinger som settes ut fordeles på flere produksjonsår med enten ny stammusling for hvert produksjonsår eller med kontroll av bidrag fra hver stammusling for hvert produksjonsår slik at stammuslinger med stort bidrag kan tas ut, og/eller at man holder separate familiegrupper slik at likt antall fra hver gruppe kan settes ut. Dersom man velger, eller er nødt til, å bruke de samme stammuslingene flere ganger istedenfor å ta inn nye for hvert produksjonsår, er det ekstra viktig å kontrollere bidraget fra hvert enkelt individ. Dersom dette bidraget er tilfeldig skal man forvente at bidraget blir likt fra hver musling over tid, men dersom bidraget skyldes seleksjon i anlegget, bør dette i størst mulig grad kontrolleres og unnvikes.

5 Referanser

- Bauer, G. 1987. Reproductive strategy of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. – J. Anim. Ecol. 56: 691-704.
- Caballero, A. 1994. Developments in the prediction of effective population size. – Hered. 73: 657-679.
- Cuttelod, A., Seddon, M. & Neubert, E. 2011. European Red List of Non-marine Molluscs. – European Commission, Luxembourg. Publications Office of the European Union. 97 pp.
- Direktoratet for naturforvaltning 2006. Handlingsplan for elvemusling, *Margaritifera margaritifera*. – DN-Rapport 2006-3: 1-24.
- Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. Longman, Essex, U.K., 4th edition.
- Garlie, S. 2010. Utvikling av mikrosatelitt multipleks PCR for genetiske studier av *Margaritifera margaritifera*. – Masteroppgave, Høgskolen i Hedmark.
- Geist, J., Rottmann, O., Schröder, W. & Kühn, R. 2003. Development of microsatellite markers for the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. (Bivalvia: Unionidea). – Mol. Ecol. Notes 3: 444-446.
- 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>
- Henriksen, S. & Hilmo, O. (red.) 2015. Norsk rødliste for arter 2015. – Artsdatabanken, Norge.
- Jakobsen, P. & Jakobsen, R.A. 2014. Rapport 2013 for prosjektet: Storskala kultivering av elvemusling som bevaringstiltak. – Rapport til Miljødirektoratet. 32 s.
- Jakobsen, P. & Jakobsen, R.A. 2016. Årsrapport 2015: Kultivering av elvemusling for utsetting. – Rapport til Miljødirektoratet. 17 s.
- Jakobsen, P., Bjånesøy, T & Marwaha, J. 2013. Storskala produksjon av elvemusling (*Margaritifera margaritifera*) for gjenutsetting. – Rapport til Direktoratet for naturforvaltning. 17 s.
- Jakobsen, P., Jakobsen, R.A. & Bjånesøy, T. 2015. Årsrapport 2014. Kultivering av elvemusling for gjenutsetting. – Rapport til Miljødirektoratet. 39 s.
- Jones, G. & Ardren, W. R. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. – Mol. Ecol. 12: 2511-2523.
- Jones, O. R. & Wang, J. 2010. COLONY: a program for parentage assignment and sibship inference from multilocus genotype data. – Mol. Ecol. Res. 10: 551-555.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L. & Marshall, T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. – Mol. Ecol. 16: 1099-1106.
- 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.
- Karlsson, S., Saillant, E., Bumguardner, B. W., Vega, R. R. & Gold, J. R. 2008. Genetic identification of hatchery-released red drum (*Sciaenops ocellatus*) in Texas bays and estuaries. – North. Am. J. Fish. Mana. 28:1294-1304.
- 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 32: 525-530.
- Karlsson, S., Larsen, B.M. & Hindar, K. 2014. Host-dependent genetic variation in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). – Hydrobiologia 735: 179-190.
- Karlsson, S., Bjørn, B., Holthe, E., Lo, H. & Ugedal, O. 2016. Veileder for utsetting av fisk for å ivareta genetisk variasjon og integritet – NINA Rapport, under utarbeidelse.
- 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. 2009. Elvemusling i Hunnselva - forsøk med infeksjon av muslinglarver på ulike ørretstammer. - NINA Rapport 509. 24 s.
- Larsen, B.M. 2015. Innsamling og sikring av DNA-prøver fra elvemusling som er benyttet som stammuslinger ved kultiveringsanlegget på Austevoll. – NINA Minirapport 583. 26 s.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B. & Pemberton, J. M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Mol. Ecol. 7: 639-655.

- Ryman, N. & Laikre, L. 1991. Effects of supportive breeding on the genetically effective population size. – *Conserv. Biol.* 5:325–329.
- Skinner, A., Young, M. & Hastie, L. 2003. Ecology of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. – *Conserving Natura 2000 Rivers. Ecology Series No. 2.* English Nature, Peterborough. 16 pp.
- Österling, M. & Larsen, B.M. 2013. Impact of origin and condition of host fish (*Salmo trutta*) on parasitic larvae of *Margaritifera margaritifera*. – *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 23: 564-570.



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: 978-82-426-2908-1

Norsk institutt for naturforskning

NINA Hovedkontor

Postadresse: Postboks 5685 Sluppen, 7485 Trondheim

Besøks/leveringsadresse: Hogskoleringen 9, 7034 Trondheim

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

E-post: firmapost@nina.no

Organisasjonsnummer 9500 37 687

<http://www.nina.no>

Samarbeid og kunnskap for framtidens miljøløsninger