



Flodpärlmusslan i Blekinge

Undersökning av genetisk populationsstruktur



Rapport, år och nr: 2008:8

Rapportnamn: Flodpärlmusslan i Blekinge – undersökning av genetisk populationsstruktur.

Författare: Amra Hadzihalilovic-Numanovic och Björn Arvidsson, Karlstads Universitet

Utgåva: Endast publicerad på webben.

Utgivare: Länsstyrelsen Blekinge län, 371 86 Karlskrona.

Dnr: 502-5625-06

Kontaktperson: Therese Asp

Omslag: Monika Puch, Bilder: Karlstads Universitet och Monika Puch

Layout: Karlstads Universitet

ISSN: 1651–8527

Länsstyrelsens rapporter: www.k.lst.se/k/publikationer

© Länsstyrelsen Blekinge län

Flodpärlmusslan i Blekinge – undersökning av genetisk populationsstruktur

Amra Hadzihalilovic-Numanovic & Björn Arvidsson



Karlstads universitet
Avdelningen för biologi
Rapport 1: 2007

Sammanfattning

Som ett led i arbetet med att bevara flodpärlmusslan *Margaritifera margaritifera* i Blekinge gjordes en undersökning av den genetiska strukturen i kvarvarande populationer. Eftersom populationerna är små kan det bli aktuellt att förstärka dessa genom inplantering av musslor från andra populationer eller genom att flytta musslor mellan populationer. För att öka sannolikheten att en sådan åtgärd lyckas bör man sätta ut musslor som är genetiskt relativt närbesläktade för att bibehålla anpassningen till den aktuella miljön.

Musslor eftersöktes i 5 vattendrag men i ett av dessa, Lyckebyån, hittades inga musslor. I övriga hittades musslor men i två av dessa, Nättrabyån och Mieån, var antalet litet. I de övriga två, Silletorpsån och Bräkneån, hittades ett större antal. Prov togs på samtliga musslor som togs upp genom att en spruta stacks in mellan skalhalvorna i foten, där mellan 0,1 – 0,3 ml hemolymfa samlades in. Från dessa prover extraherades DNA som sedan analyserades med arts specifika primers. Varje primer (locus) genererade 12-14 band (alleler) vilka därefter analyserades statistiskt.

Den genetiska variationen i populationerna var stor, ett mönster som stämmer väl med tidigare genetiska studier på flodpärlmussla. Populationerna var relativt sett ganska olika genom att 27 % av variationen fanns mellan olika populationer. Ytterligare analyser visade att tre populationer, Silletorpsån, Bräkneån och Nättrabyån, var närbesläktade. Mieån däremot skilde sig mycket från de övriga men antalet individer som undersöktes var få vilket kan ha påverkat resultatet.

För att bevara flodpärlmusslan i Blekinge behövs olika åtgärder. Som första åtgärd behöver man säkerställa miljön i Silletorpsån och Bräkneån för att få livskraftiga stammar. Ett potentiellt problem är att inga riktigt små musslor hittades i dessa vattendrag vilket kan tyda på att rekryteringen inte fungerar tillfredsställande. Andra studier har visat att igenslamning är det stora problemet, och åtgärder för att förbättra bottenarna bör göras. Båda vattendragen hade bottenar som var igenslammade av humus vilket skulle kunna leda till båda populationerna försvinner på sikt. En möjlig åtgärd skulle kunna vara att man lägger ner träd i vattendraget, vilket visat sig förbättra bottenkvaliteten i Silverån. En andra åtgärd på sikt skulle kunna vara att plantera in musslor från ovanstående populationer eller andra livskraftiga populationer i Nättrabyån, Mieån och Lyckebyån. Men innan en sådan åtgärd sker måste man skapa bra bottenförhållanden på de platser man gör utsättningen. En undersökning av tillgången på lämplig värd fisk (öring främst 0+) behöver också utföras. Åtgärder som syftar till att förbättra bottenmiljön för flodpärlmusslan innebär också förbättrade möjligheter för värd fisken att reproducera sig.

Inledning

Populationer där antalet individer minskar tenderar att förlora genetisk variation genom genetisk drift (slumpmässig dödlighet av individer) och genom inavelsdepression (Frankham et al. 2002). Skälet till detta är att i en liten population finns det färre kopior av olika genetiska varianter (alleler) och att antalet sådana varianter minskar kontinuerligt när individer dör och populationen minskar. Detta leder till att antalet heterozygoter (individer med två olika alleler på samma locus) minskar vilket anses betyda att populationens anpassningsförmåga minskar (Frankham et al. 2002).

Flodpärlmusslan är en art där antalet individer i många populationer minskat kraftigt under en lång följd av år på grund av att rekryteringen av nya musslor inte fungerar (Eriksson et al. 1997, Österling et al. 2007). Det viktigaste skälet att många populationer minskar idag verkar vara en stor sedimenttransport i vattendragen och en ökad sedimentation i bottenarna. Sedimenten tycks ha en hämmande effekt på rekryteringen av nya musslor (Österling et al. 2007). Därför finns det också risk att genetisk drift och inavelsdepression får en stor effekt på den fortsatta sannolikheten att populationer överlever. En möjlighet att öka sannolikheten att populationer överlever skulle kunna vara förstärka populationen med individer från andra livskraftiga populationer med fler individer. Om detta skall ske bör de individer som utplanteras vara genetisk lika så att lokala miljöanpassningar inte går förlorade. Det är därför viktigt att både populationen som skall förstärkas och potentiella populationer att hämta musslor från undersöks genetiskt innan en sådan åtgärd utförs.

Populationerna av flodpärlmussla har likt många andra populationer minskat och antalet är nu så få att flera av populationerna inte kan hämta sig utan hjälp av utplantering från andra populationer.

Material och metod

Insamling

Prover från musslor i 4 vattendrag i Blekinge och 2 i Kalmar samlades in i oktober 2006 (redovisas tillsammans som jämförelse). Vattendragen i Blekinge var Silletorpsån, Bräkneån, Nättrabyån och Micån. Även Lyckebyån undersöktes men inga musslor kunde hittas (5 individer fördelade på tre platser hade noterats i maj 2006 men ingen av dessa återfanns i oktober samma år trots noggrant eftersök). Efter att populationens fördelning i vattendraget undersökt togs musslor från olika delar av populationen slumpmässigt upp ur vattnet, placerades in en hink med vatten och hemolympha (blodprov) togs från levande musslor direkt på plats med hjälp av sterila sprutor och kanyler (0, 80x 50 mm). Metoden är enkel och riskfri för musslorna (Geist et al. 2006). Man tar musslan i handen och sticker försiktigt in en kanyl mellan skalhalvorna in i foten (figur 1).



Figur 1. Prov tas genom att sticka in en kanyl mellan skalhalvorna in i foten där en liten mängd blod (hemolymfa) tas.

Mellan 0,1-0,3 ml of hemolympha tas per mussla, vilket är tillräckligt för att utföra genetiska analyser. Musslorna läggs tillbaka i hinken och när blodprov tagits från samtliga (10-15 musslor åt gången) läggs de tillbaka på sin ursprungliga plats. Totallängd och längden på ligamentet tas på samtliga musslor för att kunna göra en ungefärlig ålderbestämning. Hemolymphan samlas i sterila endorfrör, som placeras på is för att hållas kylda tills man kan utföra DNA extraktionen. I Silletorpsån fick vi bra prover från 46 individer (av 50), i Bräkneån från 41 (av 44) individer, i Nättrabyån från 21 individer (samtliga som fanns) och i Mieån från 4 individer (av 5 som hittades).

DNA extraktion och analys av mikrosatelliter

Hemolymphan centrifugerades på lab i 14 000 g (5 min) för att fälla ut DNA. Därefter extraherades DNA med hjälp av NucleSpin Tissue-Kit (Macherey-Nagel), enligt instruktion för preparation av vävnadsmaterial. Isolerad DNA löstes upp i bufferten och sparades i frys (kan sparas i flera månader) tills analys kunde ske. Sammanlagt testades 13 olika artspecifika mikrosatelliter (Geist et al. 2003) och av dessa valdes 6 för vidare analys (MarMa 5167, 4277, 4143, 4315, 3621 och 3116). Övriga gav inga eller osäkra resultat. PCR reaktion gjordes i 10 µl total volym i vilken blandades 2 µl DNA, 0,35 µl 2,5 mM dNTP, 1 µl 10XB och 0,075 µl Taq DNA polymeras (med MgCl₂ i bufferten) och olika mängder av

primers (från 0,1 till 0,4 μ l). Två olika PCR reaktioner användes för de 6 mikrosatelliterna. TD 55-45 för MarMa 5167,4277,4143 och 4315) och TD 60-50 för MarMa 3621 och 3116. PCR produkter separerades i polyakrylamidgel och fragmenten analyserades i CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter).

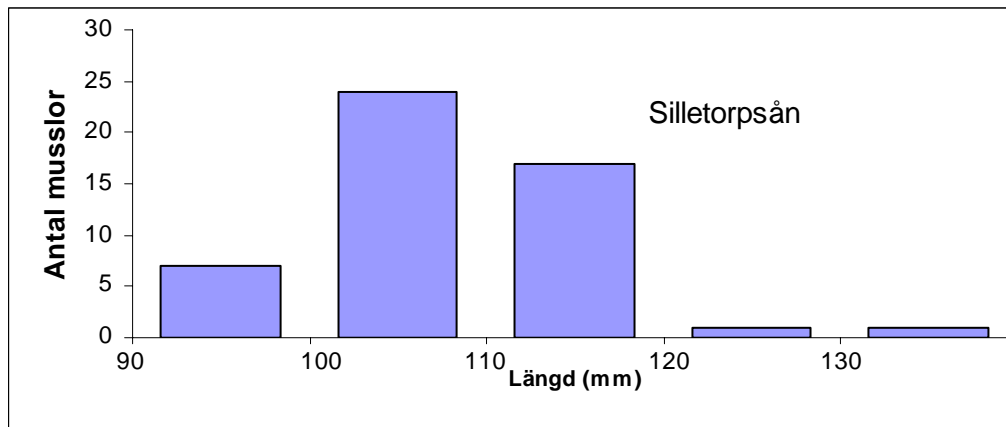
Statistik och populationsgenetik

Fragmentanalysen genererade i mellan 12-14 olika alleler per locus (mikrosatellit). GenAlEx6 användes för att beräkna Hardy-Weinberg jämvikt, allelfrekvens, observerad och förväntad heterozygositet, andel gemensamma släktingar, genetisk differentiering mellan populationer och genetiskt distans mellan populationer (Peakall & Smouse 2006). Distansmatrisen användes för att konstruera ett träd-diagram med hjälp av metoden 'neighbour-joining' i Mega version 4 (Tamura et al. 2007). Musslors åldrar beräknades utifrån en funktionen $\text{Ålder} = 6,447 \times \text{ligamentets längd}^{0,484}$. Denna funktion baseras på medeltillväxten i 11 populationer i Västra Götalands- och Örebro län (Karlsson 2003). Variationen i tillväxt mellan olika populationer var ± 7 år, dvs de beräknade åldrarna på musslor i Blekinge kan ha överskattats (se diskussionen för ytterligare synpunkter).

Resultat

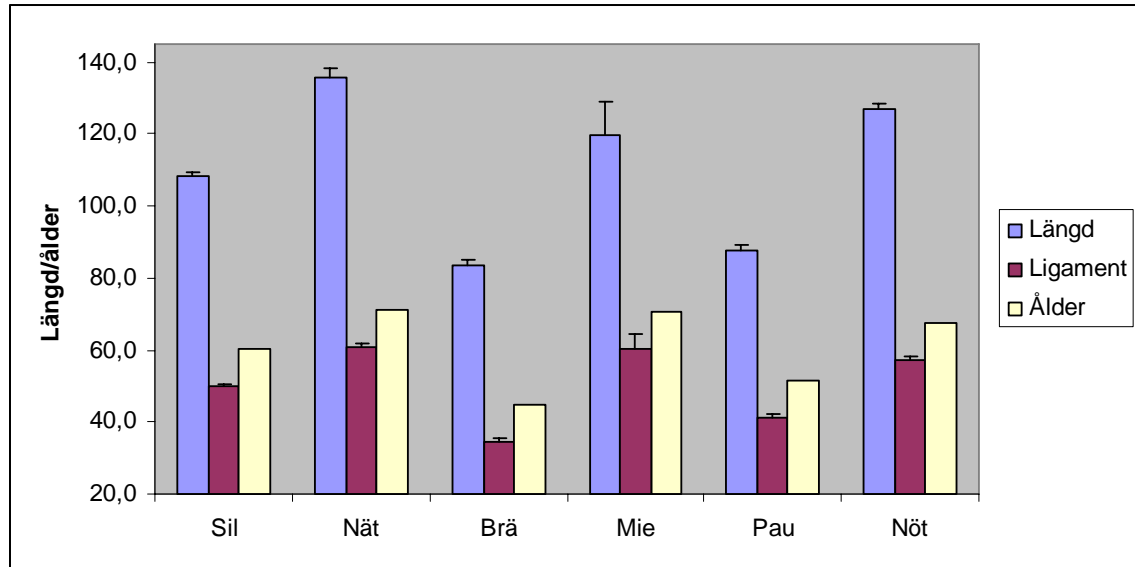
Storleksfördelning och beräknad ålder på insamlade musslor

I Silletorpsån samlades musslorna vid lokalen KA2 Mitt och i en del av KA2 Stockbro (S12, S13). Den minsta musslan som hittades var 97 mm och den längsta 137 mm. Trots en relativt grundlig undersökning hittades inga små musslor på dessa lokaler. Det fanns relativt mycket fina sediment (humus) på delar av botten vilka kan ha gjort det svårt att hitta små musslor trots eftersök. Storleksfördelningen antyder att populationen inte haft rekrytering på många år (figur 2).



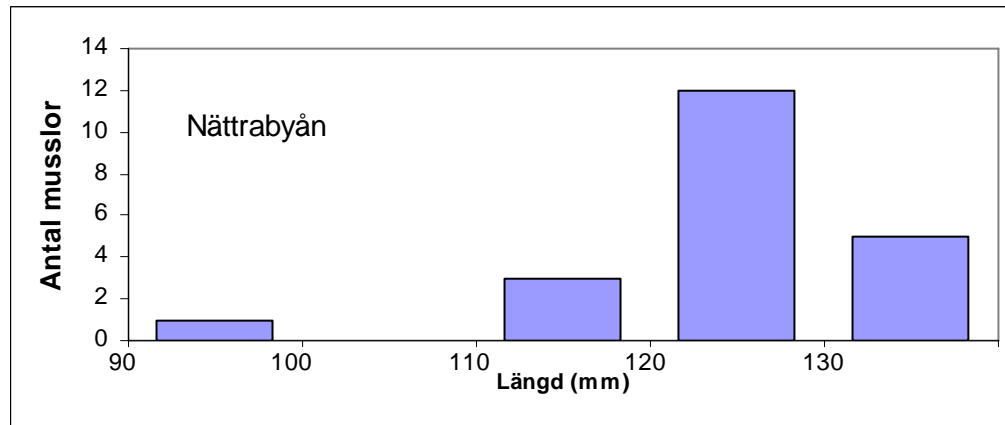
Figur 2. Storleksfördelning av provtagna flodpärlmusslor i Silletorpsån 2006.

Utifrån mätta ligament beräknades en medelålder för samtliga musslor av drygt 60 år (figur 3, notera att åldern sannolikt är överskattad) med en lägsta ålder av 51 år och högsta 71 år.



Figur 3. Medelvärden för längd (mm), ligament (mm) och ålder i vattendrag i Blekinge och Kalmar län (Pauliström och Nötån) undersökta 2006

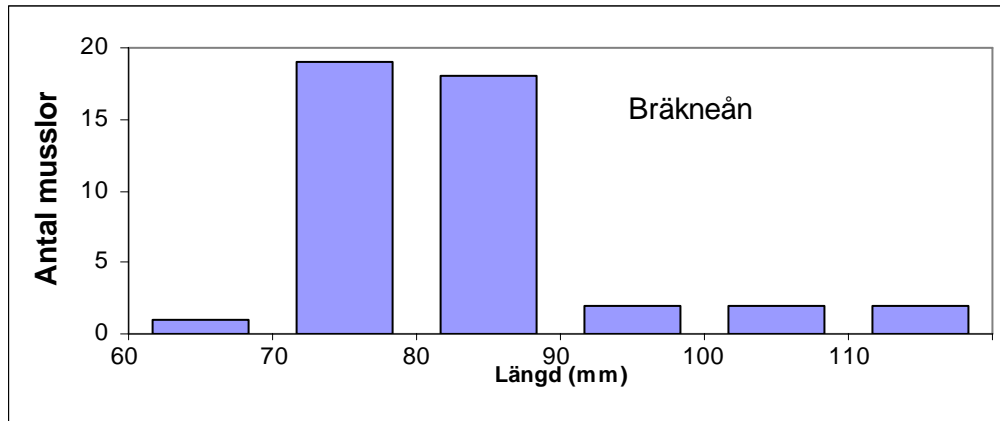
I Nättrabyån togs prover från 21 musslor funna vid Marielund, vilket tycks vara allt som finns kvar i ån. Den minsta musslan var 91 mm och den största var 150 mm (figur 4).



Figur 4. Storleksfördelning av provtagna flodpärlmusslor i Nättrabyån 2006.

Den beräknade åldern på dessa musslor var mellan 57 och 80 år med medelålder av 70 år (figur 3).

I Bräkneån togs proverna vid Lillagärde och medellängden på musslorna var drygt 83 mm med en variation mellan 67 och 115 mm (figur 5). Botten var relativt fri från sediment och en noggrannare undersökning skulle kunna avslöja ännu yngre musslor. Den beräknade åldern på musslorna varierade mellan 37 och 64 år med en medelålder av 45 år (figur 3).



Figur 5. Storleksfördelning av provtagna flodpärlmusslor i Bräkneån 2006.

I Mieån letade vi efter musslor vid Grimsmåla, Loberget norra och södra där musslor fanns i mitten-slutet av 90-talet (sammanlagt drygt 160 musslor). Trots en noggrann undersökning av dessa lokaler hittades inte mer än 5 musslor (3 vid Loberget och 2 vid Grimsmåla). Dessa var mellan 96 och 144 mm, vilket skulle ge en ålder av 57 till 80 år (de yngsta fanns vid Grimsmåla)

Genetisk variation

Samtliga populationer hade loci som visade signifikanta avvikelser från Hardy-Weinberg jämvikt men efter korrektion för att man gör flera tester (Bonferroni) fanns det bara signifikanta avvikelser för tre loci i Silletorpsån. Detta kan tyda på att befruktning inte sker slumpmässigt på grund av att den effektiva populationsstorleken (de individer som bidrar med genetiskt material vid fortplantningen) är liten.

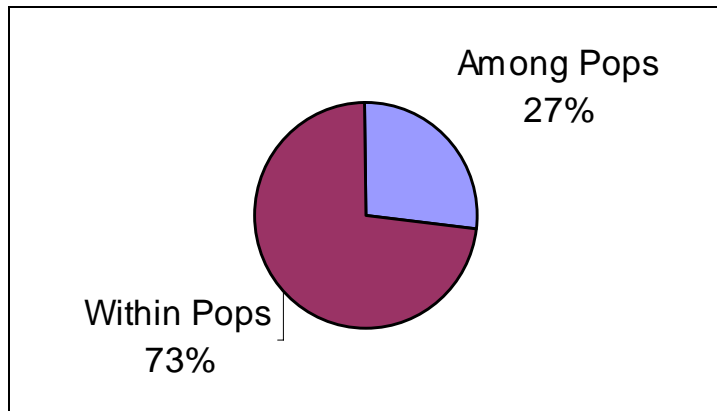
I genomsnitt noterades mellan 2,2 och 5,2 alleler i de olika populationerna (tabell 1) och det effektiva antalet alleler varierade mellan 1,5 och 2,9. Antalet unika alleler varierade mellan 0 och 3 (tabell 1). Man kan notera att dessa värden var högre i populationerna i Kalmar län men dessa populationer är också betydligt mycket individrikare.

Tabell 1. Antal individer (N), medelantal alleler/locus (A_m), medelrikedom av alleler/population (A_p), antal unika alleler (A_u), beräknad heterozygoti (H_e), observerad heterozygoti (H_o) och andelen gemensamma förfäder (F).

Vattendrag	N	A_m	A_p	A_u	H_e	H_o	F
Silletorpsån	46	5,2	2,8	1	0,608	0,508	0,156
Nättrabyån	21	4,7	2,9	3	0,643	0,529	0,174
Bräkneån	41	5,0	2,5	3	0,559	0,554	0,011
Mieån	4	2,2	1,5	0	0,313	0,319	saknas
Pauliström (H-län)	46	5,3	2,4	7	0,513	0,462	0,132
Nötån (H-län)	46	7,0	3,0	13	0,599	0,517	0,143

Den förväntade heterozygotin (H_e) varierade mellan 0,313 i Mieån och 0,643 i Nättrabyån medan den observerad heterozygotin (H_o) varierade mellan 0,319 och 0,554. Proportionen av gemensamma anfäder i de olika populationerna varierade mellan 0 (Mieån) och 0,174 (Nättrabyån). Ovanstående siffror tyder på en bra genetisk variation trots små populationsstorlekar

Av den totala genetiska variation finns 73% inom populationer och 27% mellan populationer (figur 6), vilket visar att populationerna är relativt sett ganska olika.



Figur 6. Fördelning av genetisk variation inom och mellan populationer.

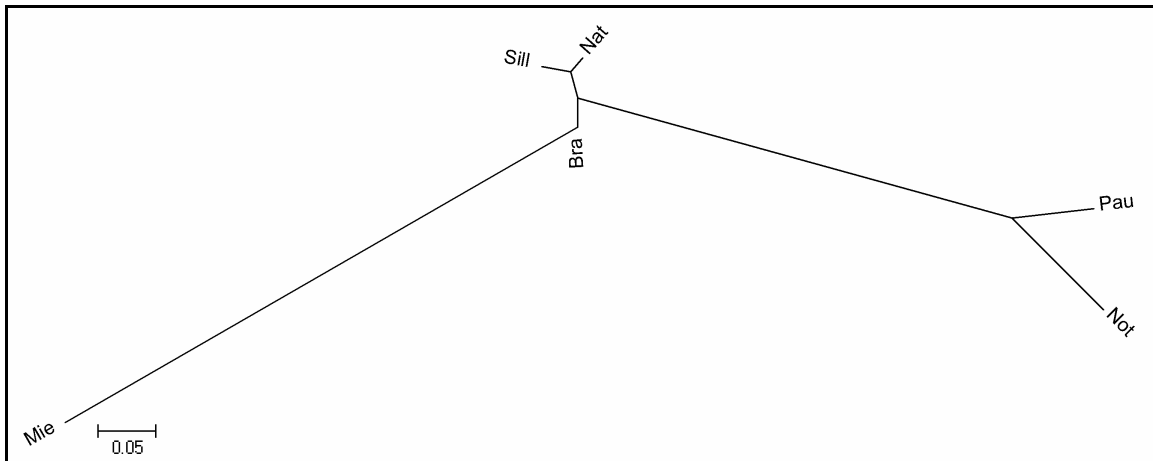
Släktskap mellan populationer

De använda mikrosatelliterna avslöjade en hög grad av genetisk differentiering mellan populationer (Tabell 2). F_{ST} -värden antyder att de tre populationerna Silletorpsån, Nättrabyån och Bräkneån är relativt lite differentierade. Mieån tycks skilja sig mer från de två vattendragen i Emåns vattensystem än de tre vattendragen i Blekinge.

Tabell 2. Parvis genetisk differentiering (F_{ST}) under diagonalen och genetiskt avstånd ($Nei D_A$) ovanför diagonalen.

	Sill	Nät	Brä	Mie	Pau	Nöt
Sill		0,041	0,040	0,618	0,532	0,513
Nät	0,012		0,070	0,541	0,522	0,532
Brä	0,015	0,024		0,496	0,514	0,465
Mie	0,208	0,191	0,194		0,908	1,128
Pau	0,138	0,127	0,140	0,287		0,183
Nöt	0,114	0,110	0,112	0,296	0,057	

Det är ett relativt litet genetiskt avstånd mellan Silletorpsån, Nättrabyån och Bräkneån. Det genetiska avståndet från dessa tre är stort både till vattendragen i Kalmar län och till Mieån (figur 7).



Figur 7. Fenogram (NJ) baserat på $Nei D_A$ genetiskt avstånd för musselpopulationer i Blekinge och Kalmar län

Diskussion

Musselpopulationerna i Blekinge tycks med undantag för Bräkneån ha en hög medelålder och inga småmusslor. De undersökta populationerna har letats igenom efter för att hitta småmusslor men eftersom vi inte fann sådana tyder det på att småmusslor är ovanliga. Detta förhållande tycks vara vanligt i många svenska musselpopulationer (Eriksson et al. 1998, Österling et al. 2007). Ett problem i detta sammanhang är att åldersbestämningen baseras på tillväxtkurvor från mer nordliga populationer. Det finns ett klart samband mellan breddgrad och tillväxthastighet (Bauer 1992). Ju längre söderut man kommer ju snabbare växer musslorna vilket innebär att den tillväxtkurva som använts för åldersbestämningen här förmodligen överskattar musslornas ålder. Dessutom visar tidigare studier att tillväxthastigheten varierar mellan vattendrag på samma breddgrad (Karlsson 2003). Detta skulle sammantaget kunna betyda att åldern på musslorna i Blekinge överskattats med minst 15-20 år. Det enda sättet att få fram mer exakta åldersbestämningar är att analysera tillväxten i skalen (vintertillväxten syns som mörka band) men eftersom populationerna är små kan man inte göra detta genom att samla in musslor för analys utan man måste söka efter nyligen döda individer och använda dessa skal för att bestämma den årliga tillväxten.

Den genetiska variation i de olika populationerna var stor, ett mönster som går igen från andra studier i Sverige (Hadzihalilovic-Numanovic et al 2007) och i Europa (Geist & Kuhn 2005). Jämfört med andra ryggradslösa djur tycks flodpärlmusslor vara betydligt mer genetiskt variabla (Hartl & Clark 2007). Skälen till detta kan vara flera. Dels kan olika populationer av flodpärlmussla ha varit isolerade från varandra under istiden vilket givit upphov till stora genetiska skillnader. Något som talar för detta är att musslans värd fisk (öring) tycks ha flera olika ursprung i Sverige genom invandring efter istiden från flera sk. refugier (platser där dessa funnits under istiden) (Nilsson et al. 2001). Dels kan populationerna efter att dom etablerats snabbt blivit isolerade genom att värd fisken inte haft möjlighet att sprida sig mellan olika vattendrag. Detta kan ha lett till en snabb selektion för

de specifika miljöfaktorer som fanns i de olika vattendragen. Öring tycks också variera genetiskt mellan olika vattendrag i ungefär samma omfattning som flodpärlmusslan.

Den relativt stora genetiska skillnaden mellan olika populationer utgör ett problem om man avser att flytta musslor från livskraftiga bestånd till utdöende bestånd. Det finns en risk att de musslor som flyttas är dåligt anpassade till den lokala miljön och stammarna av värdfisk. I Blekinge tycks åtminstone 3 av populationerna vara relativt lika men alla dessa består också av relativt få individer. Att flytta individer framstår därför inte som en möjlig åtgärd för tillfället. Man bör istället försöka förbättra uppväxtmiljön för unga musslor i de vattendrag som har de individrikaste bestånden (Silletorpsån och Bräkneån). För att om möjligt rädda några av bestånden kan en del praktiska åtgärder göras. Att fälla eller lägga i hela träd i vattendraget där musslorna finns tycks ha positiva effekter på flera olika sätt. Genom att trädet rör sig på grund av strömmen rörs bottensedimenten upp och spolats rena från fina sediment. Man kan nedströms dessa träd få fina lekbottnar för öring vilket också är gynnsamt för flodpärlmusslan eftersom tätheten av värdfisk ökar och möjligheterna att överleva i bottnarna förbättras (en metod som använts i Silverån i Småland). En fördel med metoden är att den inte utgör någon risk för musslorna.

Undersökningar tyder på att det stora problemet i många populationer inte är brist på värdfisk utan alltför mycket fina bottensediment som omöjliggör för små nedgrävda musslor att överleva (brist på syre). I Blekinge utgörs "sedimenten" till största delen av utfälld humus som en följd av humufieringen av vattendragen (Lars Bengtsson i mail). Speciellt höga färgvärden har uppmätts i år i alla Blekinges recipientkontrollerade åar!. Effekten av humusutfällningen är i första hand en igentäppning av sand/grusbankars porer och därmed en minskad vattengenomströmning samtidigt som nedbrytningen av humusämnen förbrukar syre dvs. den så viktiga syretillgången för de nedgrävda småmusslorna blir dålig och avtar med sedimentdjupet.

Det vore också önskvärt att ta fram uppgifter om storleksfördelningen (ligamentets längd och totallängd) baserad på fler individer än vad som redovisas i denna rapport. Man behöver även kontrollera bestånden av öring (om inte detta redan gjorts).

Som sammanfattning kan man konstatera att den genetiska variationen i samtliga vattendrag utom Mieån är stor. Bevarandearbetet bör inriktas mot de två mest individrika populationerna, Silletorpsån och Bräkneån. Populationerna i Nättrabyån, Mieån och Lyckebyån är så små att det förefaller omöjligt att rädda dessa utan att plantera in musslor från andra populationer. De lämpligaste bestånden vore i så fall Silletorpsån och Bräkneån men dessa populationer är knappast livskraftiga och det är knappast lämpligt att ta musslor från dessa innan man säkertställt deras överlevnad. Det enda som återstår i så fall är att hämta musslor från någon individrik population, som exempelvis Sällevadsån i Emåns avrinningsområde.

Referenser

- Bauer, G. 1992. Variation in the life-span and size of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. *Journal of Animal Ecology* 61: 425-436.
- Eriksson, M.O.G., Henriksson, L. & Söderberg, H.. (red). 1998. Flodpärlmusslan i Sverige. SNV Rapport 4887.
- Frankham, R, Ballou, J.D. & Briscoe, D.A. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge.
- Geist, J, Rottmann, O, Schröder, W. & Kühn, R. 2003. Development of microsatellite markers for the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. (Bivalvia: Unionoidea). *Molecular Ecology Notes* 3: 444-446.
- Geist, J. & Kühn, R. 2005. Genetic diversity and differentiation of central European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) populations: implications for conservation and management. *Molecular Ecology* 14: 425-439.
- Hadzihalilovic-Numanovic, A., Arvidsson, B., Österling, M.E. & Hultman, J. 2007. Genetic variability in populations of freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) in relation to population size, age structure and isolation. Submitted manuscript.
- Hartl, D.L. & Clark, A.G. 2007. Principles of population genetics. Sinauer, 4:ed
- Karlsson, J. 2003. Åldersbestämning, tillväxthastigheter och åldersstruktur hos flodpärlmussla (*Margaritifera margaritifera*) i Västar Götalands och Örebro län. Projektarbete 03:59.
- Nilsson, J, Gross, R., Asplund, T., Dove, O., Jansson, H., Kelloniemi, J., Kohlmann, K., Löytynoja, A., Nielsen, E.E., Paaver, T., Primmer, C.R., Titov, S., Vasemägi, A., Veselov, A., Östs, T. & Lumme, J. 2001.. Matrilinear phylogeography of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Europe and postglacial colonization of the Baltic Sea area. *Molecular Ecology* 10: 89-102.
- Peakall, R. & Smouse, P.E. 2006. GENALEX6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA). Version 4.0.
- Österling, M.E., Arvidsson, B. & Greenberg, L. 2007. Influence of turbidity and sedimentation on recruitment patterns of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*). Submitted manuscript.