



**Arne N. Linløkken, Kjell Langdal, Kirsten
Frydenlund og Robert Wilson**

Genetisk diversitet og struktur

**i en metapopulasjon av storsalamander (*Triturus cristatus*)
i seks kunstig anlagte dammer**

Skriftserien 13 - 2019

Online utgave
Utgivelsessted: Elverum

© Forfatterne/Høgskolen i Innlandet, 2019

Det må ikke kopieres fra publikasjonen i strid med Åndsverkloven eller i strid med avtaler om kopiering inngått med Kopinor.

Forfatteren er selv ansvarlig for sine konklusjoner.
Innholdet gir derfor ikke nødvendigvis uttrykk for høgskolens syn.

I Høgskolen i Innlandets skriftserie publiseres både internt og eksternt finansierte FoU-arbeider.

ISBN elektronisk versjon: 978-82-8380-111-8
ISSN elektronisk versjon: 2535-5678

Innhold

Sammendrag	2
Abstract	2
Forord	3
1. Innledning	4
2. Metode.....	5
2.1. Områdebeskrivelse og innsamling av prøver	5
2.2. Prøvetaking og analyser	9
2.3. Mikrosatellitter	9
2.4. Statistikk	10
3. Resultater og diskusjon	10
3.1. Damm areal, alder og genetisk variasjon	11
3.2. Topografi, mikroklima og genetisk struktur	13
Konklusjon	17
Referanser:	17

Sammendrag

Det ble tatt vevsprøver fra 190 storsalamandere (*Trituritus cristatus*) fra seks kunstig anlagte dammer (0,21-4,4 da overflate) med en antatt metapopulasjon struktur, i Stange kommune i Hedmark. Det ble analysert på 10 mikrosatellitter, og genetisk diversitet, uttrykt ved allel «richness» og heterozygositet, varierte fra henholdsvis 2,99 – 3,83 og 0,429 – 5,47. Diversiteten var høyest i de to største dammene (2,0-4,4 da overflate), og var på nivå med verdier som er funnet i naturlige dammer i Norge. Den nest største dammen var 10 år gammel, og den nyeste av alle de seks dammene, men hadde likevel høyest genetisk diversitet.

Genetiske forskjeller var minst mellom dammer som lå 100-200 m fra hverandre, og bekreftet andre undersøkelser ved at genetiske forskjeller gjenspeiler topografi og vegetasjonsdekke. Salamandere beveger seg helst i fuktige områder med skogdekke, og unngår grusveier og åpne flater. Det var liten utveksling mellom populasjonene, og signifikante F_{ST} verdier unntatt mellom de som lå med < 200 m avstand.

Abstract

Tissue samples were taken from 190 Northern crested newts (*Trituritus cristatus*) from six artificially constructed ponds (0,21-4,4 da surface) with an assumed metapopulation structure, in Stange municipality in Hedmark. Ten micro-satellites were analyzed, and genetic diversity, expressed by allele richness and heterozygosity, expressed as allelerichness and heterozygosity (expected) was highest in the two largest ponds (2,0-4,4 da surface), and was similar to values found in natural ponds in Norway. The second largest pond was 10 years old, and was the newest one, still holding the highest genetic diversity.

Genetic differences were lowest between ponds that were 100-200 m apart, and confirmed other studies by genetic differentiation being affected by topography and vegetation cover. Newts prefer to move in moist areas with forest cover, avoiding gravel roads and open areas. There was little interchange between the populations, and significant F_{ST} values except between those with a distance of <200 m.

Forord

Denne undersøkelsen av genetisk variasjon hos storsalamander i kunstig gravde dammer i Stange ble gjennomført i 2018 av ansatte ved Høgskolen i Innlandet, Fakultet for Anvendt Økologi, Landbruk og Bioteknologi. Vi har mottatt økonomisk støtte fra Miljødirektoratet ved Fylkesmannen i Hedmark etter søknad (refnr. 18S61E86). Vi vil takke grunneier Trond M. Ruud Olsen for positiv holdning til arbeidet.

Alle bilder er tatt av Arne N. Linløkken

1. Innledning

Amfibier generelt er sårbare for miljøendringer, enten det skyldes endrede temperatur- og nedbørsforhold eller menneskelige inngrep i naturmiljøet (Baillie, Griffiths-Lee, Turvey, Loh, & Collen, 2010). De har en livshistorie som gjør dem avhengige av vannforekomster, små og store dammer, og et miljø rundt dette hvor de tilbringer det meste av tiden. Egnede steder for overvintring er ikke minst viktig (Langton, Beckett, & Jim, 2001). Amfibier har også en noe begrenset evne til bevegelse, det går langsomt, og det gjør dem utsatt for påkjørsel ved kryssing av veier (Glista, DeVault, & Dewoody, 2008), og for naturlige predatorer når de oppholder seg utenfor skjul. Dyregruppen er generelt i tilbakegang i verden, og det gjøres betydelig innsats mange steder for å bevare arter og populasjoner (Collins & Storfer, 2003). Graving av dammer der de kan reprodusere er utført med hell flere steder (Brand & Snodgrass, 2010), også i Norge (Linløkken, 2017; Vedum et al., 2004).

Små populasjoner ansees generelt for å være utsatt for genetisk innavl, med mulige negative følger for bl.a. reproduksjonsevnen (Castle, Carpenter, Clark, Mast, & Barrows, 1906; Wilson, 1948), og liten genetisk diversitet er også betenkelig med hensyn til generell tilpasningsevne og motstandsdyktighet mot infeksjoner og sykdommer (Hoffmann & Willi, 2008; Willi, Buskirk, & Hoffmann, 2006). Parasitter kan introduseres med vertsorganismer som ikke er opprinnelige i miljøet, og kan komme som følge av klimaendringer eller som følge av menneskelig aktivitet, bevisst eller utilsiktet (Cunningham et al., 2015). Nylig introduserte arter eller underarter kan også vise seg å hybridisere med opprinnelige arter, og det er som regel ikke ønskelig (Maletzky, Kaiser, & Mikulíček, 2010).

Det er grunner til å kartlegge genetisk variasjon i enkelt populasjoner og å kartlegge genetisk struktur i populasjoner innen et område, dels for å finne ut hva som er «vanlig» og naturlig for arter og populasjoner, og for å ha en referanse for senere sammenlikninger. Det er interessant å undersøke populasjoner i kunstig gravde dammer for å se hvordan genetisk variasjon utvikler seg fra etablering og hvordan den eventuelt påvirkes ved kontakt med andre populasjoner. Det vil være nyttig hvis det blir behov for genetiske «isolater»; små eller store populasjoner som opprettes på isolerte steder som et bevaringstiltak for å hindre utveksling av individer med andre populasjoner i tilfelle smittespredning.

Mikrosatellittanalyser er en utbredt metode for genetiske studier (Dufresnes et al., 2016; Maletzky et al., 2010), og i et mastergradsarbeid ved Universitetet i Sørøst-Norge ble det gjort genetiske undersøkelser av storsalamander basert på mikrosatellitter i 13 naturlige skogsdammer i Telemark (Haugen, 2018). Ti av de samme markørene ble brukt i våre analyser. Haugens (2018) undersøkelse bekreftet blant annet resultater fra andre undersøkelser om at salamandernes spredning/genutveksling var begrenset av grusveier (David M. Marsh & Beckman, 2004), av åpne sør

og sørvest vendte flater og sterkt hellende terreng med stigning på > 30 grader (D. M. Marsh, Milam, Gorham, & Beckman, 2005).

Målet med denne undersøkelsen var å beskrive genetisk diversitet og struktur i seks dammer som er anlagt de siste 10 til 25 år. Dette er tiltak for å øke det biologiske mangfoldet med særlig hensyn til amfibier og fugler, og tiltakene er gjort med økonomisk støtte fra Miljødirektoratet og medvirkning fra [Våtmarksgruppa](#) i Hedmark avdeling av Norsk Ornitologisk Forening. Dammene ligger i kupert kulturlandskap med grusveier, åkerland, beitemark og skog. Det er spesielt interessant å se på den genetiske variasjonen i forhold til dammenes størrelse og alder, og genetisk struktur i forhold til landskapsform og veier som mulige barrierer for salamandernes utveksling mellom populasjoner som gir seg uttrykk i genetiske forskjeller mellom populasjonene.

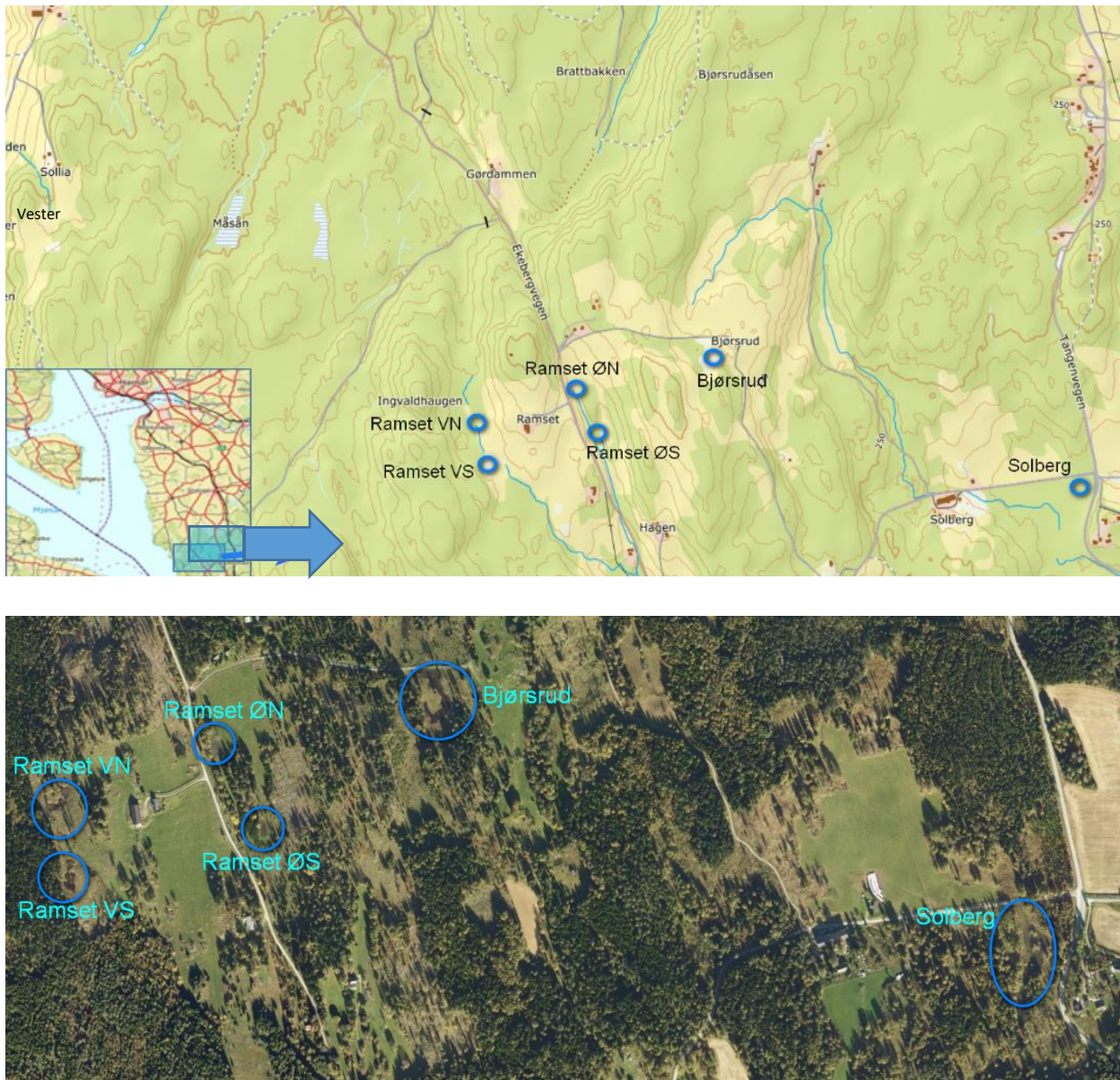
2. Metode

2.1. Områdebeskrivelse og innsamling av prøver

Det er gravd mange dammer i Stange kommune de siste 30 årene, og det er storsalamander i de aller fleste som ligger mellom E6 og Mjøsa, sør i kommunen. Storsalamanderen må ha innvandret fra kilde populasjoner i naturlige dammer i området (Linløkken, 2017). Enkelte, både kunstige og naturlige dammer, ligger isolert, mens noen ligger i grupper innenfor et begrenset område, for eksempel mellom Solberg og Ramset vest for Tangenvegen sør i Stange kommune (Figur 1). Seks av disse dammene inngår i denne undersøkelsen. Solbergdammen, som ble gravd i et fuktig landbruksområde i 1995, er den eldste av dammene som inngår i denne undersøkelsen. Naturlige dammer med storsalamander i dammens nærområde (innen 1 km) som kan ha vært kilde til denne populasjonen er ikke kjent. Nærmeste kjente forekomst som antas å være naturlige, er ved

Tabell 1. Seks dammer i Stange kommune der det ble fanget larver i 2018, med geografisk posisjon, overflateareal, høyde over havet, anleggsår og antall larver C fanget per felle- og rusenatt.

Lokalitet/da	Kartreferanse		Areal m ²	M o.h.	Anlagt	C/fellenatt	C/rusenatt
Ramset VS	60,65650°N	11,17602°Ø	710	278	2000	-	2,43
Ramset VN	60,65759°N	11,17552°Ø	550	277	2000	-	1,23
Ramset ØS	60,65643°N	11,17596°Ø	210	245	2000	4,50	1,58
Ramset ØN	60,65856°N	11,18022°Ø	370	251	2000	2,64	2,00
Bjørsrud	60,65991°N	11,18670°Ø	2000	285	2009	0,50	0,20
Solberg	60,65679°N	11,20539°Ø	4400	226	1995	0,26	0,19



Figur 1. Topografisk kart med veier og stedsnavn i studieområdet (øverst, målestokk 1:16000) og flyfoto over en mindre del av området (nederst, målestokk: 1:9580) med de undersøkte dammene inntegnet. Tangenvegen til høyre i begge figurene er Fylkesveg 222 («gamle» E6).

Vester (sørvest for Sollia i Fig. 1), 1,2 til 2 km nordvest for undersøkelsesområdet (Sørensen, 2015) (Fig. 1). Det er skogkledde områder med relativt slake helninger fra Vester og opp til dammene ved Ramset og Bjørsrud, og området burde være framkommelig som salamandere.

De undersøkte dammene utgjør et kompleks av dammer og populasjoner som kan betraktes som en metapopulasjon, og er en mulig modell for oppbygging av en robust forekomst av storsalamander i kunstig anlagte habitater.



Figur 2. Ramset VN (mot vest, øverst) og Ramset ØS (mot nord, nederst).

Dammene ved Ramset ligger i to dalsøkk, adskilt av en forhøyning med gårdsbygninger og et stort sett treløst jorde/beiteområde og en grusvei som kan utgjøre vandringshindre (David M. Marsh & Beckman, 2004; Richardson, 2012)(Figur 2). Bjørsrud ligger høyest i terrenget av alle de undersøkte dammene, og er omgitt av barskog og åpen mark og er mindre produktiv enn Solbergdammen som ligger lavest i terrenget (Figur 3). Solbergdammen er omgitt av lauvskog og har rik kant- og vannvegetasjon, og i sommerhalvåret påtreffes alltid stokkand og av og til kvinand i dammen. Den rike makrovegetasjonen i Solbergdammen gir storsalamanderen rikelig med steder for å legge egg, som



Figur 3. Bjørsrud- (mot sør, øverst) og utsnitt av Solbergdammen (mot sør, nederst). Sammenlikn tettheten av tjønnaks i dammene.

pakkes inn i blad. Stokkanda beiter på plantene, og også salamandereggene følger med (Kinne, 2006). Dette kan ha betydning for reproduksjonssuksessen.

Salamanderlarver ble fanget med ørekyteruser og feller (Vedlegg 1), og fangst pr. fellenatt varierte fra 0,26 til 4,5 larver, og fangst pr. rusenatt varierte fra 1,19 til 2,43 larver (Tabell 1).

Fangst pr. innsats var klart lavere i de to største dammene, Bjørsrud og Solberg, og de var lavere i ruser enn i feller (forholdet ca. 3:5).

Det ble tatt 12 prøver av kjønnsmodne storsalamander hunner fra Ramset ØN den 7. juli. Resten av de til sammen 190 prøvene ble tatt av larver i perioden 4. august til 7. september. Det ble gjort undersøkelser i tre andre dammer som ligger lengre sør og øst, men to av disse var uttørket i løpet av forsommeren 2018, og i den tredje ble det ikke registret larver, sannsynligvis som en følge av lav vannstand i løpet av sommeren. Det er verdt å merke seg at ingen av seks dammene hvor det ble tatt prøver, ble tørre i løpet av den ekstremt tørre sommeren 2018.

2.2. Prøvetaking og analyser

Det ble kuttet en liten vevsbit av haletippen av ca. 30 individer fra hver dam (haletippen regenereres (Arntzen, Smithson, & S. Oldham, 1999). DNA ble isolert fra vevsbiten, og det ble analysert på 10 mikrosatellitter fra totalt 190 prøver. Forsøksdyrforvaltningens tilsyns- og søknadssystem (FOTS), ved Mattilsynet, har gitt tillatelse til prøvetaking (FOTS id. 8823).

2.3. Mikrosatellitter

Genomisk DNA ble isolert fra 190 vevsprøver ved hjelp av «E.Z.N.A Tissue DNA kit» (Omega Bio-tek, USA) i følge produsentens standardprotokoll. Det isolerte DNA ble deretter benyttet til mikrosatellitt-basert genotyping. Ti mikrosatellitter, beskrevet av Drechsler et al. (2013), som også er brukt i en masteroppgave ved Universitetet i Sørøst-Norge (Haugen, 2018), ble analysert i to multipleksreaksjoner: Multipleks I (Tc50, Tc60, Tc68b, Tc70 og Tc81) og multipleks II (Tcri13, Tcri27, Tcri35 og Tcri36). De ti mikrosatellitt markørene ble PCR-amplifisert i to separate 10 µL multipleks PCR reaksjoner med ved hjelp av «Qiagen Multiplex PCR kit» (Qiagen, Tyskland) i følge produsentens standard protokoll; primerkonsentrasjoner på 0,2 µM og templat-DNA konsentrasjoner på 0,3-1,0 ng/µL ble benyttet.

Etter amplifiseringen ble PCR produktene separert ved kapillær elektroforese (Genetic Analyzer 3130xl, Applied Biosystems, USA) for størrelsesbestemmelse mot «Orange DNA

Size Standard» (MC Lab, USA) ved hjelp av analyseprogrammet GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems).

2.4. Statistikk

Data matrisene ble konvertert til filformatet for GENEPOP software (Rousset, 2008) ved hjelp av Excel tillegget Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001), og videre med programvaren CONVERT (Glaubitz, 2004) til formater tilpasset ARLEQUIN (Excoffier & Lischer, 2010) og STRUCTURE (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000) software. Observert (H_o) og forventet (H_e) heterozygositet, parvis genetisk differensiering ved F_{ST} (Slatkin & Voelm, 1991) og Nei's indeks (Nei, 1972), og innavlskoeffisient (F_{IS}) (Wright, 1933) ble estimert med ARLEQUIN software. ARLEQUIN ble også brukt for å påvise eventuelle bindingsulikevekter og loci som kunne være under seleksjon. Genetisk struktur i materialet ble undersøkt med STRUCTURE, og resultatene ble behandlet i STRUCTURE Harvest (online: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) for å finne det antall (K) klustre («populasjoner») som gir minst variasjon innad i klustre og størst mulig variasjon mellom klustre. CLUMPP software (Jakobsson & Rosenberg, 2007) ble så benyttet for å beregne individers og populasjoners gjennomsnittlige tilhørighet (sannsynlighet for tilhørighet eller score) til hvert enkelt kluster. Programvaren BAPS versjon 6.0 (Corander & Marttinen, 2006) ble brukt for å kartlegge utveksling mellom populasjonene. Excel tillegget GenAEx (Peakall & Smouse, 2012) ble brukt for å påvise private alleler (alleler som bare ble påvist i en av de undersøkte gruppene) og for Mantel test for å undersøke i hvilken grad genetisk ulikhet skyldes geografisk avstand («isolation by distance»). Søskenpar deteksjon ble gjort med MLRelate (Kalinowski, Wagner, & Taper, 2006), og effektiv populasjonsstørrelse (N_e), i dette tilfelle antall foreldre (N_b) fordi alle er av samme årsklasse, basert på bindingsulikevekter ble beregnet med NeEstimator software (Do et al., 2014). Genetisk tre (denrogram, gaffeldiagram) basert på F_{ST} og Nei's indeks ble framstilt ved hjelp av r – program pakken APA (Paradis, Claude, & Strimmer, 2004).

3. Resultater og diskusjon

Scoringssuksessen ved mikrosatellittanalysene var 7,5 %, og analyser i Arlequin programmet viste ingen signifikante bindingsulikevekter eller locus under seleksjon, etter Boferroni korreksjon.

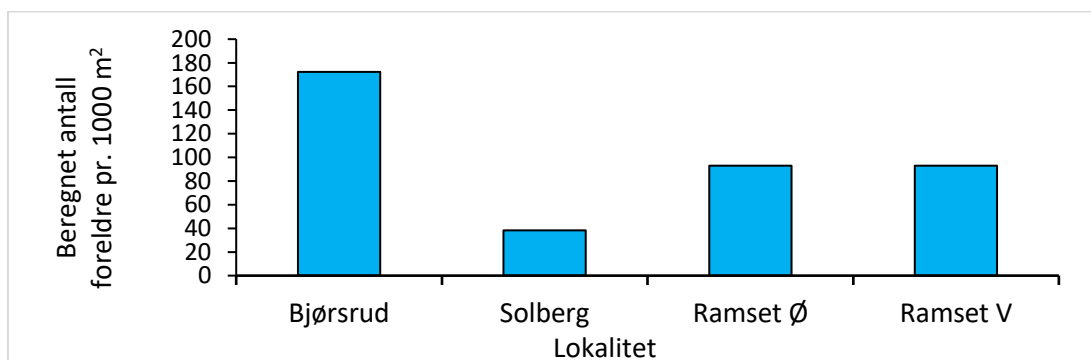
3.1. Damm areal, alder og genetisk variasjon

Allelantallet pr. locus varierte fra 3,3 til 4,2, og var høyest i de to største dammene, Bjørsrud som er den «yngste» og Solberg som er den «eldste» dammen (Tabell 2). Allel «richness» (allelantall pr. locus, justert for antall prøver i gruppa) varierte fra 2,99 til 3,83 og viste samme fordeling. Observert og forventet heterozygositet (H_O og H_E) var også høyest i de to største dammene, og observert heterozygositet var signifikant lavere enn den forventede i alle dammer (dvs. ikke HW likevekt), unntatt i to, Bjørsrud og Ramset VS. Beregnet antall foreldre (N_b) var høyest i Ramset VS (nb! øvre konfidensintervall er uendelig), men beregnet for de to Ramset V dammene

Tabell 2. Antall prøver (n), antall alleler pr. locus (A_L), allel«richness» (A_R), antall private alleler (A_P) observert (H_O) og forventet (H_E) heterozygositet, innavlskoeffisient (F_{IS}) og antall foreldre N_b i de undersøkte dammene.

Dam	n	A_L	A_R	A_P	H_O	H_E	F_{IS}	N_e
Ramset SV	33	3,5	3,28	0	0.445	0.460	0,028	615,6 (44,1-infin.)
Ramset NV	32	3,6	3,33	0	0.425*	0.461	0,110*	33,5 (16,6-112,7)
Ramset SØ	36	3,5	3,16	3	0.383*	0.465	0,195*	143,5 (32,9-infin.)
Ramset NØ	30	3,3	2,99	1	0.382*	0.429	0,145*	23,4 (1,8-89,2)
Bjørsrud	29	4,1	3,83	3	0.501	0.525	0,058	344,7 (42,8-infin.)
Solberg	30	4,2	3,72	4	0.494*	0.547	0,101*	168,1 (36,1-infin.)
Ramset Ø ¹⁾	66	3,9	3,09	4	0.382*	0.456	0.179	54,0 (29,7-133,7)
Ramset V ²⁾	65	3,4	3,33	0	0.433*	0.461	0.069	117,2 (52,8-1799,5)

¹⁾ = Ramset NØ+SØ, ²⁾ = Ramset NV+SV



Figur 4. Estimert antall foreldre pr. 1000 m² damareal for til de undersøkte larvene.

kombinert, var det lavere; 117,2, som er et mer realistisk tall, og øvre kofidensintervall kunne beregnes. Fangst pr. felle- og rusenatt tydet på at tettheten av larver var lavere i de største dammene, men antall foreldre var høyere (N_b pr. areal, Fig. 4), og det kan tyde på at egg/larver har høyere dødelighet i de store dammene. I Solbergdammen kan dette ha sammenheng med at det jevnt er beitende ender der.

N_b i dammene øst og vest for Ramset slått sammen (Tabell 2), var høyere enn 50 som har vært ansett som en kritisk grense for en populasjons muligheter til å bevare sin genetiske variasjon (Franklin, 1980), men blant andre Frankham et al. (2014) mener at dette tallet er for lavt for å sikre bevaring av genetisk mangfold, og innavlsdepresjon kan ramme. Underskudd av heterozygoter i forhold til forventet tydet på innavl, og genutveksling med hverandre er spesielt viktig for de små populasjonene.

Det var overaskende at både genetisk variasjon og N_b var så høyt i Bjørsruddammen som er bare 10 år gammel, og det kan ikke ha vært mer enn tre generasjoner storsalamandere siden dammen ble anlagt i 2009. Storsalamandre kjønnsmodnes ved tre til fem års alder. De foretar første overvintring nær oppvekstdammen, men vi vet lite om hva de foretar seg i sesongene fram til kjønnsmodning. Det er imidlertid vist at de har tendes til å vandre (Kinne, 2006). Det må ha foregått en rask etablering og bestandsoppbygging i Bjørsruddammen, og tilsvarende har sannsynligvis skjedd i de andre dammene tidligere. Vi kan tenke oss en årlig strøm av vandrende juvenile salamandere som kan etablere seg i nye habitater. Disse kan i dette tilfelle ha felles opphav, for eksempel nord vest for de undersøkte dammene, der storsalamander er påvist (Sørensen, 2015).

Tabell 3. Resultater fra Bottleneck (flaskehals) testing mot tre mutasjonsmodeller (IAM, TPM og SMM) og Garza-Williamson's index og modifisert indeks (\pm S.D)

Dam	Heterozygositet overskudd testet mot			Garza-Williamson	
	IAM	TPM	SMM	Index	Modified Index
Ramset VS	n.s.	n.s.	n.s.	0.48	0.34 (\pm 0.11)
Ramset VS	n.s.	n.s.	n.s.	0.46	0.36 (\pm 0.11)
Ramset ØS	n.s.	n.s.	n.s.	0.48	0.35 (\pm 0.09)
Ramset ØN	n.s.	n.s.	n.s.	0.39	0.34 (\pm 0.10)
Bjørsrud	< 0.01	n.s.	n.s.	0.48	0.40 (\pm 0.12)
Solberg	< 0.01	n.s.	n.s.	0.50	0.42 (\pm 0.16)

Mulige flaskehalshendelser ble bare påvist i de to største dammene med Bottleneck programmet, og bare sammenliknet med en av de tre mutasjonsmodellene (Tabell 3). Derimot var Garza-Williamson indeksen lav, ≤ 0.42 for alle populasjonene, og den var ≤ 0.36 for de fire minste dammene. Dette indikerer at bottleneck hendelser har forekommet siden minst sju loci med indeks < 0.68 mest sannsynlig betyr at det har vært en flaskehals, i følge Garza-Williamson (2001). Metoden som brukes av Bottleneck programmet undersøker om det er overskudd av heterozygoter ved de undersøkte lociene. Det kan oppstå hvis en stor andel av populasjonen dør ved katastrofe, det vil si ikke selektiv dødelighet. Da vil noen alleler forsvinne, men

heterozygositeten forblir den samme, som resultat av den allelrikdom som var, inntil ny Hardy-Weinberg likestilling inntreier, og da med lavere heterozygositet. De undersøkte populasjonene hadde imidlertid overskudd av homozygote, et mulig resultat av innavl, og dette kan skygges for påvisning av mulige flaskehalseffekter beregnet med denne metoden.

Garza-Williams indeksen beregnes som forholdet mellom gjennomsnittlig allel størrelse og spennet fra minste til største allele ved et locus, og antakelse om mulig flaskehals bygger på at hvis spennet er stort, slik at alleler med størrelse som ligger mellom minste og største mangler (bimodal fordeling), så skyldes det tilfeldig bortfall på grunn av en flaskehals situasjon (ikke selektiv dødelighet). Det vil også kunne oppstå ved blanding av populasjoner, hvis en populasjon har små alleler og den andre populasjon har store ved samme locus. I vårt materiale var det trolig ikke slik, ettersom det gjaldt alle loci, noe som framgår av små standardavvik.

Det er derfor rimelig å anta at populasjonene har gjennomgått en eller flere flaskehals situasjoner i nær fortid, for eksempel i forbindelse med første innvandring og etablering. Dette vil ha ført til genetisk drift som kan forklare noe av den genetiske forskjellen mellom dammene.

Innslaget av helsøsken varierte fra 2,0 til 4,8 % av mulige par, og antall halvsøsken varierte 7,2 og 18,2 %, det vil si 3-4 ganger så mange halv som helsøsken (Tabell 4), og antyder at hunnene befruktes av ulike hanner i en sesong.

Tabell 4. Antall indikerte søskenrelasjoner (FS = helsøsken, HS=halvsøsken) og antallet i prosent av antall mulige par i de seks populasjonene etter analyse i ML Relate programmet.

Dam	FS	HS
Ramset VS	21 (4,8 %).	79 (18,2 %)
Ramset VN	18 (3,6 %)	61 (12,3 %)
Ramset ØS	23 (4,4 %)	86 (16,3 %)
Ramset ØN	13 (2,1 %)	39 (6,2 %)
Ramset ØN adulte	2 (3,0 %)	2 (3,0 %)
Ramset ØN larver	3 (2,0 %)	11 (7,2 %)
Bjørsrud	12 (3,0 %)	52 (12,8 %)
Solberg	13 (3,0 %)	52 (12,0 %)

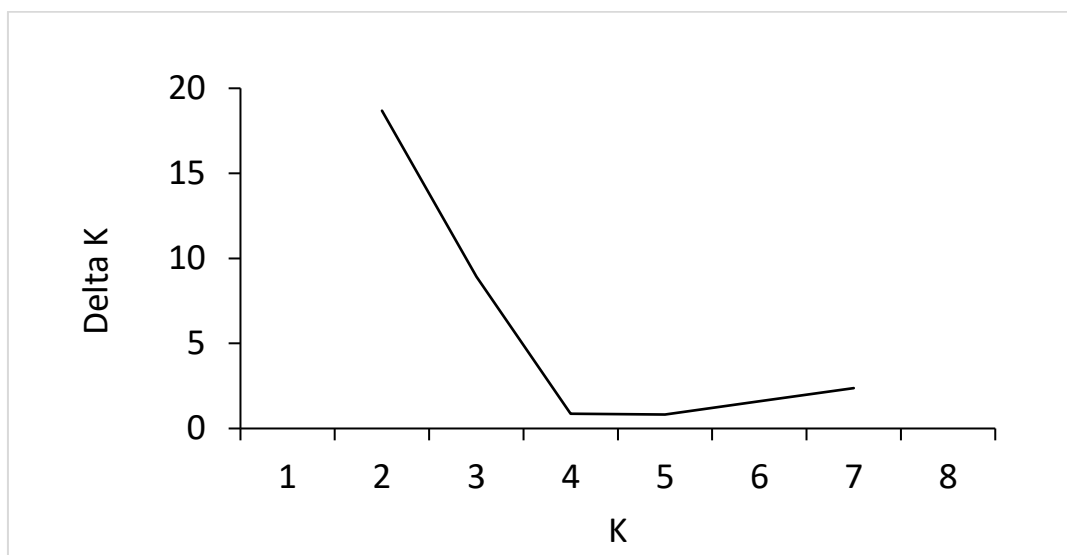
3.2. Topografi, mikroklima og genetisk struktur

Med topografi menes her terrengformer; helning og hellningers retning (sør/sørvest eller nord/øst), dalsøkk og veikanter og -skråninger. Mikroklima avhenger av fuktighet; bekker og

myrdrag og vegetasjonsdekke; kulturmark, skog, veier som har betydning for salamanderes habitatvalg og vandringsruter. Det er påfallende at det i løpet av relativt kort tid er etablert populasjoner med signifikante genetiske forskjeller, for eksempel mellom Bjørsrud og Ramset ØN (Tabell 5). Terreng, veier og vegetasjonsdekke har sannsynligvis gitt forskjellige vandringsruter, og skilt Ramset V dammene fra Ramset Ø dammene. Vi vet imidlertid ikke sikkert hvor de har innvandret fra, og om de kommer fra samme retning. Det er derfor også usikkert om de genetiske forskjellene har utviklet seg ved delvis isolasjon mellom de undersøkte dammene, eller om de skyldes ulikt opphav.

Tabell 5. Parvis genetisk ulikhet F_{st} mellom dammene. Alle verdier er signifikant forskjellige fra 0, **fet type** = signifikant etter Bonferroni korreksjon.

	Ramset SV	Ramset NV	Ramset SØ	Ramset NØ	Bjørsrud
Ramset NV	0.016				
Ramset SØ	0.020	0.06			
Ramset NØ	0.045	0.103	0.045		
Bjørsrud	0.024	0.031	0.029	0.041	
Solberg	0.047	0.066	0.071	0.095	0.024



Figur 5. Delta K plottet mot K (antall klustre) ifølge STRUCTURE Harvester programmet.

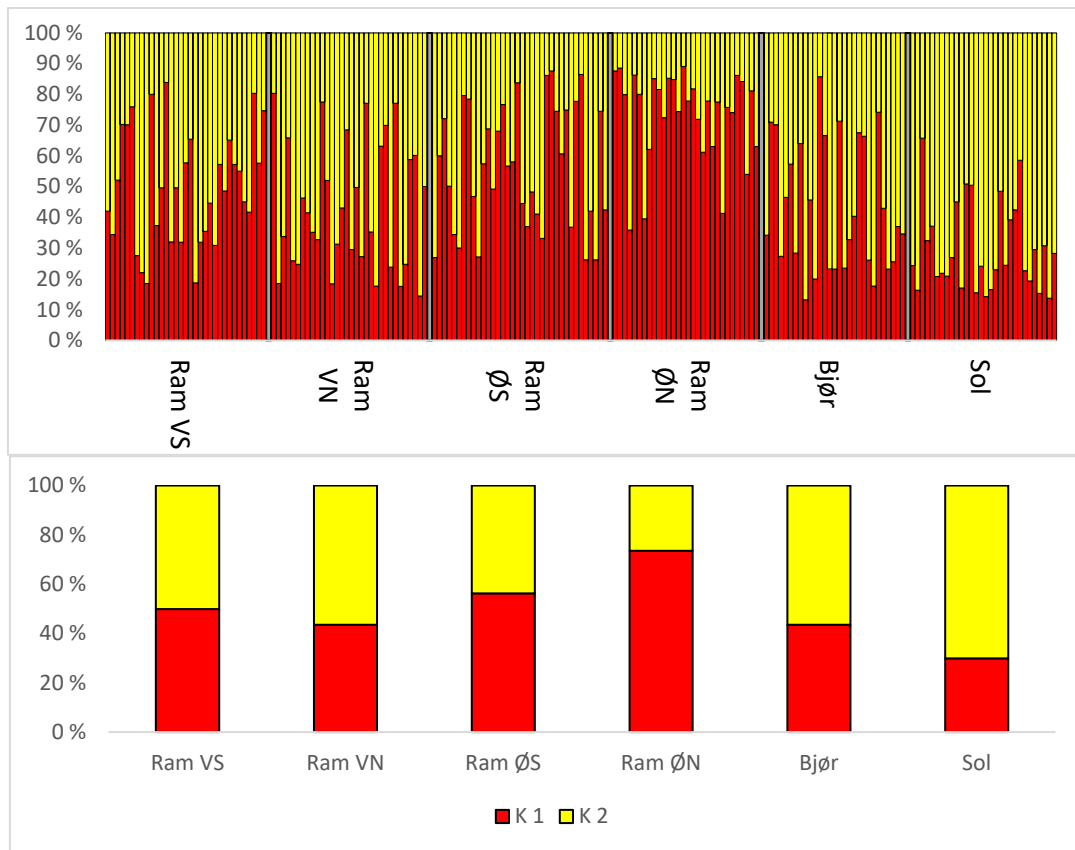
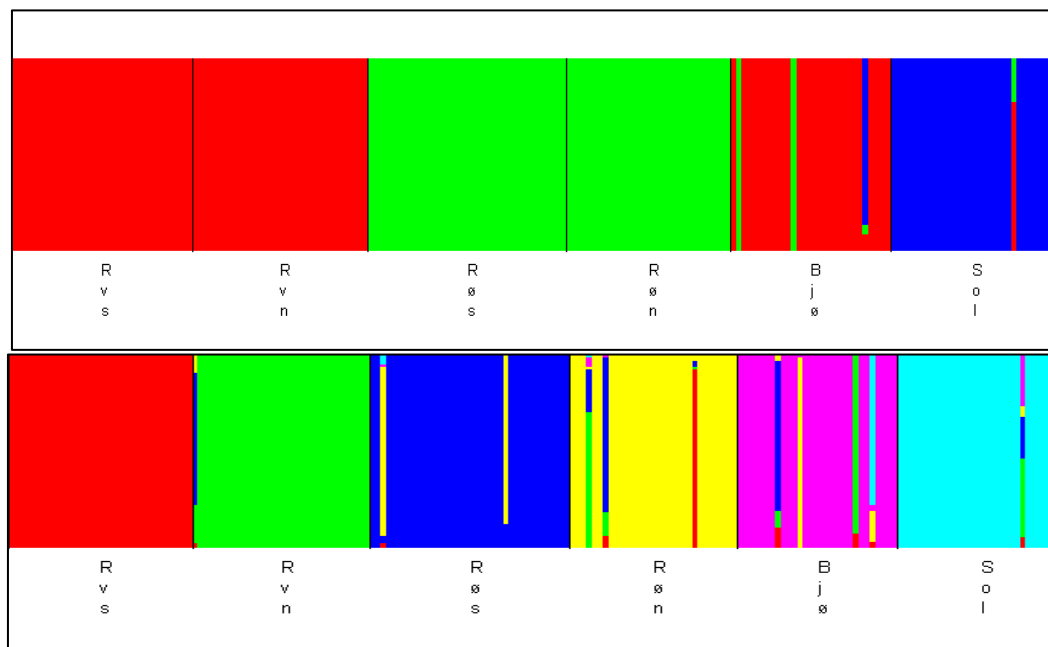


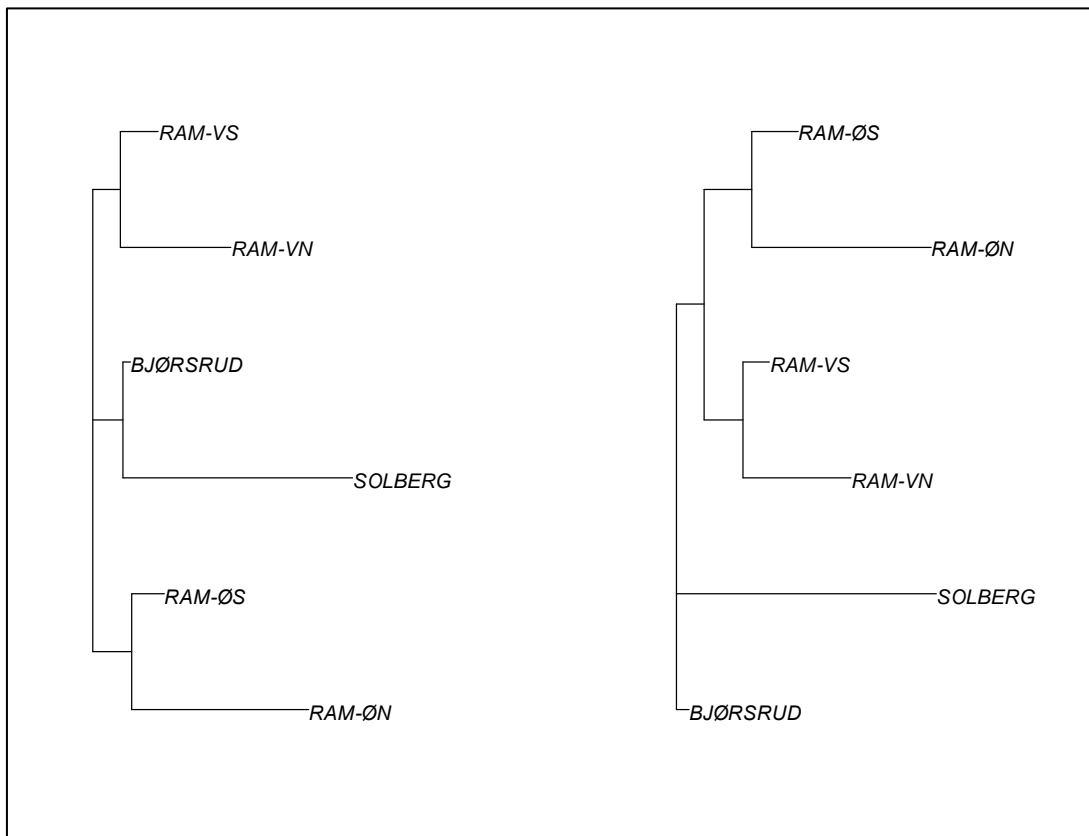
Fig. 6. De to klustre som ble funnet som beste inndeling i STRUCTURE programmet fordelt på de seks dammene/populasjonene, individuelt (en søyle = ett individ, øverst) og populasjonsvis (nederst).



Figur 7. Klustrings analyse av materialet fra de seks dammene ved hjelp av BAPS programmet (øverst) og admixture («innblandings») kluster analyse (nederst). På x-aksen: Rvs = Ramset VS, Rvn = Ramset VN osv.

STRUCTURE Harvester analysene viste at $K = 2$ klustre var best egnet, og det viser at alle populasjonene har mye felles gemateriale (Fig. 5). Parvis F_{st} var imidlertid signifikante i alle sammenlikninger før Bonferroni korreksjon. Etter Bonferroni korreksjon var to verdier ikke-signifikante, og det var mellom dam parene Ramset VS og VN, og mellom VS og ØS. Kluster 1 var mest representert i Ramset ØN og minst i Solbergdammen, mens det var mindre forskjeller mellom de øvrige fire dammene (Figur 6).

Baps programmet ga 3 klustre, ett var dominerende i de to dammene vest for Ramset (VS og VN) og i Bjørssruddammen, ett kluster dominerte i de to dammene øst for Ramset (ØS og ØN), og det tredje klusteret dominerte i Solbergdammen (Fig. 7). Bjørssrud- og Solbergdammen hadde enkelte innslag fra nabo-populasjonene. Bapsanalyser med fastsatte klustre, en for hver dam, viste også noe innblanding fra nabopopulasjoner, spesielt i Ramset-ØN og Bjørssrud (Fig. 7 nederst). Mantel test for å undersøke sammenhengen mellom geografisk avstand og genetisk forskjell var ikke signifikant hverken med F_{ST} eller Nei's indeks ($p > 0.05$), og styrker forklaringen av terreng og mikroklima som bestemmende for valg av vandringsveier mer enn korteste vei imellom.



Figur 8. Gaffeldiagram/tre som viser genetiske ulikheter mellom populasjonene, basert på F_{ST} (til venstre) og Nei's indeks (til høyre).

Gaffeldiagram (denrogram) basert på to indekser for genetisk forskjell, F_{ST} og Nei's index, demonstrerer at det er minst genetisk forskjell mellom de dammene som ligger nærmest hverandre, paret Ramset VS og VN, og paret Ramset ØS og ØN (Fig. 8). Det er ingen hindre mellom disse dammene, mens det mellom Ramset V og Ramset Ø er en vei og et jordbruksområde som virker som stengsel. De to største dammene, Bjørsrud og Solberg, plasseres for seg, men litt ulikt avhengig av hvilken indeks som brukes.

Konklusjon

I de seks undersøkte, kunstig anlagte dammene i kultur- og skoglandskap, var genetisk diversitet høyest i de to største dammene, og den var på nivå med det som er beregnet for storsalamandere i naturlige skogdammer. Diversiteten var størst i Bjørsrud dammen som var 10 år gammel og den yngste av de undersøkte dammene. Det var Hardy Weinberg likevekt (H_o/H_e) i bare to av dammene, Ramset VS og Bjørsrud, og det var signifikant innavlskoeffisient (F_{IS}) i alle dammene unntatt de to nevnte. Ved å slå sammen materialet fra parene av dammer som lå nærmest hverandre, blir F_{IS} ikke signifikant og antyder at innavl kan motvirkes av genetisk utveksling mellom nærliggende dammer. Den genetiske strukturen tydet på at et høydedrag med jordbruksland og en grusvei, hemmet utveksling, men det er usikkert hvorvidt genetiske forskjeller skyldes innvandring fra ulike kildepopulasjoner, eller om den har utviklet seg etter innvandring. Analyser tydet på at utveksling mellom populasjonene ikke var veldig stor, og at etablerte salamandere har en utpreget «homing» adferd, det vil si de søker tilbake til eget fødested for å reproducere. Dette fordi utavlskoeffisienten F_{ST} var signifikant i alle parvise sammenlikninger, riktignok ikke mellom Ramset VS og VN, og Ramset VS og ØS. Eventuelt vender de tilbake til samme dam når de har etablert seg, som ikke nødvendigvis er der den ble klekket, ettersom de kan spre seg til nye områder. Det må være et betydelig antall juvenile som tar seg til andre lokaliteter enn fødestedet før de kjønnsmodnes og reproducerer siden nye bestander synes å etablere seg raskt.

Referanser:

Arntzen, J., Smithson, A., & S. Oldham, R. (1999). *Marking and Tissue Sampling Effects on Body Condition and Survival in the Newt Triturus cristatus* (Vol. 33).

- Baillie, J., Griffiths-Lee, J., Turvey, S., Loh, J., & Collen, B. (2010). *Evolution Lost: Status and Trends of the World's Vertebrates*.
- Brand, A. B., & Snodgrass, J. W. (2010). Value of Artificial Habitats for Amphibian Reproduction in Altered Landscapes El Valor de Hábitats Artificiales para la Reproducción de Anfibios en Paisajes Alterados. *Conservation Biology*, 24(1), 295-301. doi:10.1111/j.1523-1739.2009.01301.x
- Castle, W. E., Carpenter, F. W., Clark, A. H., Mast, S. O., & Barrows, W. M. (1906). The Effects of Inbreeding, Cross-Breeding, and Selection upon the Fertility and Variability of *Drosophila*. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*, 41(33), 731-786. doi:10.2307/20022155
- Collins, J. P., & Storfer, A. (2003). Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions*, 9(2), 89-98. doi:doi:10.1046/j.1472-4642.2003.00012.x
- Corander, J., & Marttinen, P. (2006). Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. *Mol Ecol*, 15, 2833-2843.
- Cunningham, A. A., Beckmann, K., Perkins, M., Fitzpatrick, L., Cromie, R., Redbond, J., . . . Fisher, M. C. (2015). Emerging disease in UK amphibians. *Veterinary Record*, 176(18), 468-468. doi:10.1136/vr.h2264
- Do, C., Waples, R. S., Peel, D., Macbeth, G. M., Tillett, B. J., & Ovenden, J. R. (2014). NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*, 14(1), 209-214. doi: 10.1111/1755-0998.12157
- Dufresnes, C., Pellet, J., Bettinelli-Riccardi, S., Thiébaud, J., Perrin, N., & Fumagalli, L. (2016). Massive genetic introgression in threatened northern crested newts (*Triturus cristatus*) by an invasive congener (*T. carnifex*) in Western Switzerland. *Conservation Genetics*, 17(4), 839-846. doi:10.1007/s10592-016-0825-6
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567.
- Frankham, R., Bradshaw, C. J. A., & Brook, B. W. (2014). Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation*, 170(0), 56-63. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2013.12.036>

- Franklin, I. R. (1980). Evolutionary change in small populations. In M. E. S. B. Wilcox (Ed.), *In: Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective* (pp. 135-149). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associate, pp. 135-149.
- Garza, J. C., & Williamson, E. G. (2001). Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol Ecol*, *10*(2), 305-318. doi: doi: 10.1046/j.1365-294x.2001.01190.x
- Glaubitz, J. C. (2004). CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, *4*, 309-310.
- Glista, D. J., DeVault, T., & Dewoody, A. J. (2008). *Vertebrate mortality predominantly impacts amphibians* (Vol. 3).
- Haugen, H. (2018). *Microclimate and topography influence genetic differentiation in northern crested newt (Triturus cristatus) in a boreal forest ecosystem*. (Master Master), University of South-Eastern Norway, Kongsberg. Retrieved from https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/2584641/2018_Master_Haugen.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Hoffmann, A. A., & Willi, Y. (2008). Detecting genetic responses to environmental change. *Nat Rev Genet*, *9*(6), 421-432. doi:10.1038/nrg2339
- Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, *23*, 1801-1806.
- Kalinowski, S. T., Wagner, A. P., & Taper, M. L. (2006). ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, *6*, 576-579.
- Kinne, O. (2006). Successful re-introduction of the newts *Triturus cristatus* and *T. vulgaris*. *Endangered Species Research*, *1*, 25-40.
- Langton, T., Beckett, C., & Jim, F. (2001). *Great Crested Newt Conservation Handbook*. Retrieved from Suffolk IP19 8AY: https://www.froglife.org/wp-content/uploads/2013/06/GCN-Conservation-Handbook_compressed.pdf
- Linløkken, A. N. (2017). *Registrering av salamanderforekomster i Hamar og Stange kommuner 2015-2017 med vekt på forekomster i kunstig gravde dammer* (5). Retrieved from Hamar: https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/2473526/opprapp05_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Maletzky, A., Kaiser, R., & Mikulíček, P. (2010). Conservation Genetics of Crested Newt Species *Triturus cristatus* and *T. carnifex* within a Contact Zone in Central Europe: Impact of Interspecific Introgression and Gene Flow. *Diversity*, *2*, 28-46. doi:10.3390/d2010028
- Marsh, D. M., & Beckman, N. (2004). Effects of forest roads on the abundance and activity of terrestrial salamanders. *Ecological Applications*, *14*, 1882-1891. doi:10.1890/03-5179
- Marsh, D. M., Milam, G. S., Gorham, N. P., & Beckman, N. G. (2005). Forest Roads as Partial Barriers to Terrestrial Salamander Movement. *Conservation Biology*, *19*(6), 2004-2008. doi:10.1111/j.1523-1739.2005.00238.x
- Nei, M. (1972). Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist*, *106*(949), 283-292. doi:10.2307/2459777
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, *20*, 289-290.
- Park, S. D. E. (2001). *Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection*. Ph.D. dissertation. (PhD PhD), University of Dublin, Dublin, Ireland,
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – and update. *Bioinformatics*, *28*, 2537-2539.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*: 945-959. *Genetics*, *155*, 945-959.
- Richardson, J. L. (2012). Divergent landscape effects on population connectivity in two co-occurring amphibian species. *Mol Ecol*, *21*(18), 4437-4451. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05708.x
- Rousset, F. (2008). Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, *8*, 103-106.
- Slatkin, M., & Voelm, L. (1991). FST in a hierarchical island model. *Genetics*, *127*(3), 627-629.
- Sørensen, S. (2015). *Lokaliteter med stor salamander på Hedmarken. Vurdering av tilstand og trusselbilde for de kjente forekomstene av stor salamander Triturus cristatus på Hedmarken*. Retrieved from Hhamar:
- Vedum, T. V., Hofstad, H., Åstrøm, S., Ødegaard, R., Dolmen, D., Sørensen, S., . . . Bryhn, K. Ø. (2004). *Dammer i kulturlandskapet - til glede og nytte for alle. Veileder for miljøtiltak*. Retrieved from Hamar:
<http://fylker.miljostatus.no/Global/Hedmark/Kulturminner%20og%20kulturmilj%C3%B8er/Dammer%20i%20kulturlandskapet%20-%20veileder.pdf>

Willi, Y., Buskirk, J. V., & Hoffmann, A. A. (2006). Limits to the Adaptive Potential of Small Populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37(1), 433-458. doi:10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110145

Wilson, W. O. (1948). Egg Production Rate and Fertility in Inbred Chickens*. *Poultry Science*, 27(6), 719-726. doi:10.3382/ps.0270719

Wright, S. (1933). Inbreeding and Recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 19(4), 420-433.



Vedlegg 1. Feller som ble brukt til fangst av salamanderlarver

Det ble tatt vevsprøver fra 190 storsalamandere (*Triturus cristatus*) fra seks kunstig anlagte dammer (0,21-4,4 da overflate) med en antatt metapopulasjon struktur, i Stange kommune i Hedmark. Det ble analysert på 10 mikrosatellitter, og genetisk diversitet, uttrykt ved allel «richness» og heterozygositet, varierte fra henholdsvis 2,99 – 3,83 og 0,429 – 5,47. Diversiteten var høyest i de to største dammene (2,0-4,4 da overflate), og var på nivå med verdier som er funnet i naturlige dammer i Norge. Den nest største dammen var 10 år gammel, og den nyeste av alle de seks dammene, men hadde likevel høyest genetisk diversitet.

Genetiske forskjeller var minst mellom dammer som lå 100-200 m fra hverandre, og bekreftet andre undersøkelser ved at genetiske forskjeller er preget av topografi og vegetasjons dekke. Salamandere beveger seg helst i fuktige områder med skogdekke, og unngår grusveier og åpne flater. Det var liten utveksling mellom populasjonene, og signifikante FST verdier unntatt mellom de som lå med < 200 m avstand.

Tissue samples were taken from 190 Northern crested newts (*Triturus cristatus*) from six artificially constructed ponds (0,21-4,4 da surface) with an assumed metapopulation structure, in Stange municipality in Hedmark. Ten micro-satellites were analyzed, and genetic diversity, expressed by allele richness and heterozygosity, expressed as allelerichness and heterozygosity (expected) was highest in the two largest ponds (2,0-4,4 da surface), and was similar to values found in natural ponds in Norway. The second largest pond was 10 years old, and was the newest one, still holding the highest genetic diversity.

Genetic differences were lowest between ponds that were 100-200 m apart, and confirmed other studies by genetic differentiation being affected by topography and vegetation cover. Newts prefer to move in moist areas with forest cover, avoiding gravel roads and open areas. There was little interchange between the populations, and significant FST values except between those with a distance of <200 m.