

**Utvikling av mikrosatellitt
multipleks PCR for genetiske
studier av
*Margaritifera margaritifera***

Silje Garlie



Høgskolen i Hedmark

Masteroppgave

HØGSKOLEN I HEDMARK

2010

Innholdsfortegnelse

FORORD	5
NORSK SAMMENDRAG.....	6
ENGELSK SAMMENDRAG (ABSTRACT)	7
1. INNLEDNING	8
1.1 ELVEMUSLING.....	8
1.1.1 <i>Utbredelse i Norge</i>	8
1.1.2 <i>Elvemuslingens livssyklus</i>	9
1.1.3 <i>Genetiske studier på elvemusling</i>	10
1.1.4 <i>Trusler</i>	11
1.1.5 <i>Nasjonal handlingsplan</i>	12
1.2 GENETISKE MARKØRER	12
1.3 MIKROSATELLITT DNA SOM GENETISKE MARKØRER	12
1.3.1 <i>Generelt om mikrosatellitt sekvenser</i>	12
1.3.2 <i>Mikrosatellitt loci som genetiske markører</i>	14
1.3.3 <i>Identifisering og isolering av mikrosatellittsekvenser</i>	14
1.3.4 <i>Multipleks PCR</i>	16
1.3.5 <i>Utfordringer ved mikrosatellitter som genetiske markører</i>	16
1.4 BEVARINGSGENETIKK	18
1.5 MÅLSETNINGER.....	20
2. MATERIALER OG METODER	21
2.1 IDENTIFISERING AV MIKROSATELLITT SEKVENSER I <i>M. MARGERITIFERA</i>	21
2.2 DESIGN AV PRIMERE.....	21
2.2.1 <i>Primer design for amplifisering av mikrosatellitt DNA</i>	21

2.3	EVALUERING AV PRIMERSETT	22
2.4	VERIFISERING AV AMPLIFISERTE PCR PRODUKT VED KLONING OG SEKVENSERING	23
2.4.1	<i>Koloni PCR</i>	24
2.4.2	<i>Isolering av plasmid-DNA og verifisering av insert DNA ved restriksjonskutting</i>	24
2.4.3	<i>Sekvensering</i>	24
2.5	MULTIPLEKS PCR DESIGN	25
2.5.1	<i>Multipleks I</i>	25
2.5.2	<i>Multipleks II</i>	26
2.5.3	<i>Kappilærelektroforese av multipleks PCR reaksjoner</i>	27
2.6	DATA ANALYSER.....	27
2.7	BIOLOGISK MATERIALE.....	27
2.7.1	<i>Innsamlinger av prøver</i>	27
2.7.2	<i>DNA-isolering</i>	28
3.	RESULTATER	29
3.1	UTVIKLING AV NYE MIKROSATELITTMARKØRER.....	29
3.1.1	<i>Primerdesign</i>	29
3.1.2	<i>Uttesting av nye primere</i>	30
3.1.3	<i>Polymorfi</i>	32
3.1.4	<i>Verifisering av mikrosatellittsekvens komposisjon</i>	32
3.1.5	<i>Utvikling av multipleks PCR (Multipleks I)</i>	33
3.2	UTVIKLING AV MULTIPLEKS PCR MED ETABLERTE <i>M.MARGARITFERA</i> MARKØRER (MULTIPLEKS II)	36
3.3	OPTIMALISERING AV 2 MULTIPLEKS REAKSJONER.....	38
3.3.1	<i>Optimalisering av allelscoring i GeneMapper</i>	41

3.4	GENETISK VARIASJON OG KARAKTERISERING AV LOCI.....	42
3.4.1	<i>Allelantall og allelrekkevidde.....</i>	42
3.4.2	<i>Test av koblingslikevekt.....</i>	43
3.4.3	<i>Genetisk variasjon innad i populasjonene</i>	43
3.4.4	<i>Genetisk variasjon mellom populasjoner.....</i>	46
4.	DISKUSJON	48
4.1	MIKROSATELLITTISOLASJON	48
4.2	UTVIKLING AV 2 MULTIPLEKS PCR REAKSJONER.....	51
4.2.1	<i>Evaluering av mikrosatellittmarkører for populasjonsstudier</i>	53
4.3	POPULASJONGENETISKE STUDIER	55
4.4	VIDERE ARBEID	58
5.	KONKLUSJON	59
	APPENDIKS A: GELBILDER FRA GRADIENT PCR PÅ NYUTVIKLEDE PRIMERSETT	60
	LITTERATURLISTE	67

Forord

Denne masteroppgaven er utført ved Høgskolen i Hedmark, avdeling for lærerutdanning og naturfag (LUNA), i perioden januar 2009 til august 2010.

Jeg ønsker å rette en spesielt stor takk til min veileder førsteamanuensis Wenche Johansen for all veiledning, hjelp og støtte med det praktiske arbeidet og ved oppgaveskrivingen. Jeg har hatt stort faglig utbytte av å være din masterstudent.

Jeg vil også rette en stor takk til førsteamanuensis Arne Linløkken for hjelp med prøveinnsamling, støtte underveis og innspill ved oppgaveskrivingen.

Jeg vil også takke de ansatte ved bioteknologistudiet og Biohus Hamar, stipendiater og medstudenter for hjelp og støtte underveis.

Takk også til mine gode venner som har støttet meg, oppmuntret meg og trodd på meg.

Til slutt vil jeg takke min kjære datter Eline for hennes tålmodighet og forståelse, og resten av min familie som har stått bak meg og støttet meg: uten dere hadde ikke dette vært mulig.

Hamar, 1. september 2010

Silje Garlie

Norsk sammendrag

Den utrydningstruede elvemuslingen (*Margaritifera margaritifera*) er en viktig nøkkeart i økosystemet den lever i. De siste hundre årene har det imidlertid vært en sterk nedgang i antall individer og populasjoner av elvemusling over hele Europa. Utvikling av polymorfe mikrosatellittmarkører vil kunne benyttes til kartlegging av genetisk variasjon for norske elvemusling populasjoner, og være et viktig verktøy til utarbeidelse av bevaringsbiologiske tiltak for elvemusling i Norge.

Ved bruk av 454-sekvenseringsteknikk fikk vi identifisert 201 mikrosatellittloci, hvor 17 ble evaluert for inkludering i et multipleks PCR-oppsett. Kostnader ved genotyping er betydelige, derfor utviklet og optimaliserte vi to multipleks PCR-reaksjoner med henholdsvis 6 nyutviklede og 5 etablerte markører i PCR-reaksjonene. Et begrenset populasjonsstudie på 132 individer fra 5 populasjoner ble utført. Resultater viser at alle markørene er polymorfe, med gjennomsnittlig allelantal på 4,5 allel per loci. 4 av populasjonene viste svært liten genetisk variasjon og hadde flere monomorfe loci (gjennomsnittlig H_e : 0,02 – 0,15), mens den siste populasjonen viste god genetisk variasjon (gjennomsnittlig H_e : 0,53). Tester og analyser viste at markørene ga reproducerbare resultater med lav feilrate, utenom for to av markørene (*Mm2235* og *MarMa5167*), som bør evalueres mer nøye. Dette studiet viser at det å utvikle multipleks PCR-oppsett for genotyping av elvemusling er oppnåelig.

Engelsk sammendrag (abstract)

The threatened freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) plays an important role in the freshwater ecosystem. During the last century there has been a dramatic decline in freshwater pearl mussel populations all over Europe. Development of polymorphic microsatellite markers has the potential to estimate genetic variations in Norwegian pearl mussel populations, and be an important tool in developing conservation plans for the species.

By using a 454-sequencing technique we were able to identify 201 microsatellite loci, where 17 of these were evaluated for use in a multiplex PCR system. The costs of genotyping are substantial, due to this reason we developed and optimized 2 multiplex PCR reactions with 6 new markers and 5 established markers. A limited population study was performed with results showing that all the markers are polymorphic, with average allele numbers of 4,5 alleles per loci. 4 of the population showed low genetic variation and had several monomorphic loci (average H_e : 0,02 – 0,15), while the last population had good genetic variation (average H_e : 0,53). Test and analysis showed that the markers gave reproducible results with a low margin of errors. This was not the case for 2 of the markers (*Mm2235* and *MarMa5167*), which should be more thoroughly evaluated. This study shows that development of multiple PCR system for genotyping of fresh water pearl mussel is achievable.

1. Innledning

1.1 Elvemusling

Den utrydningstruede elvemuslingen *Margaritifera margaritifera* er en viktig nøkkelart for økosystemet den lever i. Muslingen filtrerer ca 50 liter vann i døgnet (Geist and Kuehn, 2005), og denne vannrensingen er viktig for overlevelsen av bunndyr og ørretyngel, og har generelt stor betydning for økosystemet som helhet (Geist and Kuehn, 2005, Larsen, 2005). (Treasurer et al., 2006).

M. margaritifera tilhører ordenen Unionoida i klassen bivalvia – muslinger, og lever i klare, kalde elver, og bekker med lavt næringsinnhold i regioner med ørret og/eller laks (Young and Williams, 1983). Den finnes i dag i store deler av Europa, fra nord i Portugal (Reis, 2003) til Russland (Bauer, 1992, Reis, 2003, Geist and Kuehn, 2005) og i Nord-Amerika (Strayer et al., 2004). I løpet av det 20. århundre har antallet elvemuslinger blitt redusert med mer enn 90 % i Europa, og mange steder er den helt utryddet (Buddensiek, 1995). Flere studier viser at den dramatiske nedgangen i antall elvemuslinger skyldes faktorer som blant annet forurensing, perlefiske, reduksjon i antall vertsfisk, og modifisering av elveløpet (Cosgrove and Hastie, 2001). Utvikling av genetiske markører for *M. margaritifera* er avgjørende for å kunne kartlegge den genetiske variasjonen for populasjoner av elvemusling i Norge, og legge en mest mulig hensiktsmessig bevaringsplan for å sikre overlevelse av elvemuslingen i fremtiden.

1.1.1 Utbredelse i Norge

I Norge finnes populasjoner av elvemuslingen spredt over hele landet i et belte langs kysten, men også i enkelte vassdrag i innlandet (Figur 1). Reproduksjonsrike populasjoner finnes i fylkene Møre og Romsdal, Sør-Trøndelag, Nord-Trøndelag og Nordland. Det er anslagsvis et sted mellom 350 og 400 lokaliteter av elvemusling i Norge (Larsen, 2005).

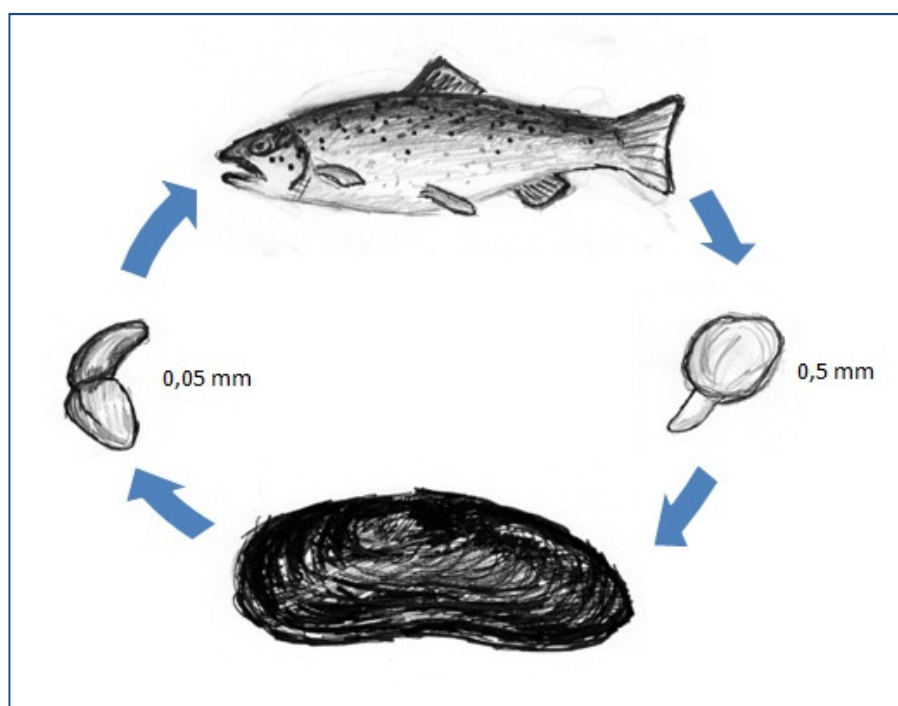


Figur 1. EIS kart (European Invertebrate Survey) over funn av elvemusling i Norge.

1.1.2 Elvemuslingens livssyklus

Elvemusling kjennetegnes ved nyreformede skjell som har mørk brunlig farge hos eldre individer, og kan bli opp til 15 cm lange. Muslingen har en fot den stikker ut av skallet som den bruker til å forankre seg med, og forflytte seg med på elvebunnen (Larsen, 2005). Som for alle Unionoida muslinger, har elvemuslingen en kompleks livssyklus (Figur 2). Elvemuslinger er normalt særkjønnet, men hunnene er observert til å bli hermafroditter for å sikre reproduksjon ved lav populasjonstetthet (Bauer, 1987). De formerer seg ved at hannene slipper ut sperma i vannet som videre blir ført inn til de modnede eggene i hunnens gjeller gjennom innstrømningsåpningen. Hver hunn kan slippe mellom 1 til 10 millioner glochidier (elvemuslinglarver) ved hver forplantning. Dødeligheten er stor, og larvene er avhengig av å finne en passende vert(fisk) å infisere innen få dager etter at de er sluppet. Larvene til elvemuslingen har en obligatorisk parasittfase på fiskegjeller som varer i 9 - 11 mnd for

populasjoner i Norge (1350 døgngrader) (Larsen, 2005). Parasittfasens lengde er avhengig av temperaturen i vannet, og i mellom Europa er denne fasen 2 - 4 mnd (Bauer, 1987). Larvene foretrekker vert fra arten salamonidene med preferanse for brunørret. Når de fester seg er de ca 0,05 mm lange (Figur 2). Når larvene har blitt ca 0,45 – 0,50 mm, slipper de seg fra fisken og graver seg ned i grus på elvebunnen hvor de lever i ca 5 år (Geist and Kuehn, 2005). Elvemuslingen kjønnsmodnes ved 12 – 15 års alderen (50 – 75 mm), og den reproduserer seg resten av livet. Elvemuslinger i Skandinavia og Russland kan bli opp mot 200 år, mens den i de mer sørlige delene av Europa lever kortere med en snittalder på 35 år (Geist and Kuehn, 2005).



Figur 2 Livssyklusen til elvemuslingen. Glochidiene (0,05mm) slippes fra elvemusling-hunnen, for deretter å parasittifere en vertsfisk i 9-11 måneder, før ungdoms-muslingen (0,5 mm,) slipper seg fra vertsfisken og graver seg ned i gruslag på elvebunnen. i ca 5 år. Elvemuslingen kjønnsmodnes når de er ca 12 år.

1.1.3 Genetiske studier på elvemusling

Gjennom studier i 5 sentrale Europeiske hovedvannløp i Tsjekkia, Østerrike, Belgia og Tyskland, ble det funnet at genetisk variasjon mellom populasjoner av elvemusling varierte sterkt, og bare svakt sammenfalt med populasjonsstørrelsen (Geist and Kuehn, 2005). Et av

funnene fra dette studiet var at flere populasjoner hadde et høyt antall monomorfe mikrosatellitt loci, som sammen med høye F - verdier, kunne tyde på at populasjonene hadde gjennomgått en flaskehalshendelse. Populasjonsstudier i Spania, utført med samme mikrosatellittmarkører som studier i Sentral-Europa, viste svært liten genetisk variasjon hvor de konkluderer med at dette i hovedsak skyldes selvfertilisering og små populasjonsstørrelser (Bouza, 2006). Fra genetiske populasjonsstudier i Sverige har populasjonsbestandene vist god genetisk variasjon, undersøkt ved 6 forskjellige populasjoner i 2007 (Arvidsson, 2007), og 14 forskjellige populasjoner i 2009 (Geist et al., 2010). Status for genetisk variasjon for norske populasjoner av elvemusling er per i dag ikke kjent, og bakgrunnen for dette studiet er å utvikle pålitelige polymorfe mikrosatellittmarkører som kan være et bidra til økt kunnskap om elvemusling populasjoner i Norge.

1.1.4 Trusler

Den sterke nedgangen av elvemusling både i Norge og resten av Europa skyldes i hovedsak forurensing av vassdragene den lever i ved eutroforering, og ødeleggelse av habitat ved skogsdrift og vassdragregulering (Cosgrove and Hastie, 2001, Strayer et al., 2004, Geist and Kuehn, 2005, Larsen, 2005). Tidligere var overdreven perlefiske en stor trussel, og fiske av elvemusling ble forbudt i Norge fra 1993. Senere har habitatforstyrrelser og økt forurensing bidratt til å svekke levevilkårene for elvemusling i Norge (Larsen, 2005).

De første årene er veldig kritisk for unge elvemuslinger, og 95 % dør de første 5 – 8 årene (Larsen, 2005). Nedgravde, unge elvemuslinger er spesielt sårbare for eutroforering og nedslamming fra elver med høy turbiditet (Martin Österling et al., 2008), og derfor avhengig av god gjennomstrøm av vann i gruslaget (Buddensiek, 1995).

En annen sekundær trussel for elvemusling, som holder til i lakseførende elvestrekninger, er *Gyrodactylus salaris* (Gyro) som infiserer og dreper vertsfisk. Dette går ut over rekrutteringen av elvemusling. Behandling med rotenon dreper lakseunger og da også elvemuskinglarvene som har infisert vertsfisken, slik at hele årskull blir utryddet (Larsen, 2008).

1.1.5 Nasjonal handlingsplan

Elvemusling kom på ”rødlisten” i 2000 i Norge, og er oppført som ”sårbar” (Kålås, 2006). I handlingsplanen utarbeidet av DN for forvaltning av elvemusling i Norge, er det oppført som langsiktig mål at det skal finnes levedyktige populasjoner i hele Norge. Det ble i perioden 2000 - 2005 gjennomført basisundersøkelser på utbredelse og tetthet av populasjoner av elvemusling i 16 vassdrag. Disse skal brukes som referanse for fremtidige undersøkelser. Kartleggingen er også viktig internasjonalt, siden i underkant av en tredjedel av alle kjente lokaliteter av elvemusling finnes i Norge, og mer en halvparten av alle elvemuslingindivider i Europa finnes i Norge. Dette gjør Norge til et ansvarland for elvemusling (DN, 2006).

1.2 Genetiske markører

En genetisk markør er en DNA-sekvens som er assosiert med en gitt fenotype eller genotype og som kan benyttes til å skille individer, arter og høyere taksonomiske grupper fra hverandre på bakgrunn av deres genetiske variasjon som følge av mutasjoner over tid (Liu and Cordes, 2004). Genetiske markører har blitt et svært viktig redskap innen spesielt akvakultur, landbruk og human helse. Markørene benyttes i populasjons- og evolusjonsbiologiske studier, i bevaringsbiologi, innen kriminalteknisk etterforskning, ved farskapstesting, som diagnostikk verktøy for sykdom og innen plante- og dyreforedling (Chistiakov et al., 2006). Innen akvakultur og populasjonsbiologi benyttes for eksempel genetiske markører til å studere den genetiske variasjonen i og mellom populasjoner. Dette for å beregne effektiv populasjonsstørrelse og migrasjonsrate mellom populasjoner og for å identifisere herkomst, art og stamme (Oconnell and Wright, 1997).

1.3 Mikrosatellitt DNA som genetiske markører

1.3.1 Generelt om mikrosatellitt sekvenser

Mikrosatellitter, også kjent som ”Short Tandem Repeats” (STRs) eller ”Simple Sequence Repeats” (SSR), er DNA sekvenser som består av en repeterende enhet på mellom 2-6 nukleotider, hvor den repeterende enheten gjentas etter hverandre i genomet. En mikrosatellittsekvens kan ha en total lengde opp mot 1 kb (Chambers and MacAvoy, 2000). Et eksempel på en mikrosatellittsekvens er vist i figur 3. Figuren viser en

mikrosatellittsekvens med flankerende område, med repetisjonsmønster (CATA)₂₁, hvor CATA er repetert 21 etterfølgende ganger. Mikrosatellittsekvenser finnes i alle levende organismer undersøkt til nå. De betraktes som kodominante og viser generelt høy grad av allelpolymorfisme (Chistiakov et al., 2006). Dette skyldes at mutasjonsfrekvensen i mikrosatellittsekvenser er svært høy (estimert til 10^{-2} til 10^{-6} per locus per generasjon) (Ellegren, 2004) sammenlignet med mutasjonsfrekvensen til ikke-repeterende DNA, som er estimert til ca. 10^{-9} per locus per generasjon (Li et al., 2002). Polymorfisme i repeterende DNA skyldes hovedsakelig variasjon i sekvenslengde snarere enn fra forskjell i basesammensetning. Mutasjoner skjer i hovedsak ved DNA-polymerase-glidning under DNA-replikasjon, hvor det oppstår en adskillelse av de to replikerende DNA-trådene etterfulgt av feilkobling ved re-assosiasjon. Dette fører til innsetting eller utkutting av en eller flere repetisjoner. Replikasjonsglidning er ofte mer frekvent ved større antall etterfølgende repetisjoner, og mikrosatellittloci med flere repetisjoner er derved mer polymorfe enn kortere mikrosatellittloci. Mikrosatellitter er fordelt i hele genomet på alle kromosomer og alle regioner av kromosomer, og finnes både i proteinkodende og ikke-kodende DNA (Liu and Cordes, 2004). I eukaryote organismer har mikrosatellitter vist seg å være i overskudd i ikkekodende regioner. De opptrer sjelden i kodende regioner, bortsett fra mikrosatellitter med trinukleotid repetisjoner (Metzgar et al., 2000). Den lave frekvensen av mikrosatellitter i kodende regioner kan forklares med negativ seleksjon mot mutasjoner som vil forstyrre leserammen i translaterede sekvenser (Li et al., 2002). Trinukleotid motiver finnes, i motsetning til andre mikrosatellittmotiv, både i kodende og ikkekodende genomiske regioner. Utvidelse av trinukleotid motiver i ekson er forbundet med alvorlige sykdommer/syndromer, som Fragil X syndrom og Huntington`s sykdom (Brown and Brown, 2004). I menneske er (A)_n og (AC)_n det mest vanlige repetisjonsmotivet og den sistnevnte er også det mest vanlige dinukleotid motivet i eukaryoter. I genomet til bivalves er AC/TG det mest utbredte mikrosatellitt mønsteret, og dinukleotid repetisjoner er i stor overvekt sammenlignet med tri- og tetranukleotider (Cruz et al., 2005).

mikrosatellitt amplifisering på tvers av artsgrenser (Selkoe and Toonen, 2006). Et eksempel på dette er primersett utviklet for hvitting, stingsild og torsk, og som ble testet ut på 14 fiskearter. Resultatet viste at markørene kunne benyttes over artsgrenser, selv for arter som hadde skiltes for 470 millioner år siden (Rico et al., 1996). Identifisering av mikrosatellittsekvenser hos organismer der tilstrekkelig sekvens informasjon ikke er tilgjengelig er en arbeidskrevende prosess og innebærer Southern hybridisering, kloning og sekvensering. Ulike varianter basert på disse teknikkene er utviklet (Zane et al., 2002), men den generelle fremgangsmåten er som følger:

Genomisk DNA blir fragmentert ved restriksjonskutting, og DNA separert ved agarose gelelektroforese. DNA-fragmenter i størrelsesorden 300 – 700 bp blir deretter selektert, adaptorer ligert til fragmentene, og de resulterende DNA fragmenter klonet inn i plasmidvektor og transformert til *Escherichia coli*. Det blir deretter utført en kolonihybridisering med en DNA-probe. Proben består av repeterende sekvensmotiv for å detektere plasmidkloner som innehar plasmider med mikrosatellittsekvenser. Plasmidene i disse klonene blir deretter sekvensert for å verifisere mikrosatellitt komposisjon (Zane et al., 2002).

En annen metode er å benytte neste generasjons sekvenserings teknologi, som 454-pyrosekvensering (Droege and Hill, 2008). Formålet med metoden er å produsere genomisk sekvensdata som deretter analyseres ved bruk av bioinformatiske verktøy for å identifisere mikrosatellittsekvenser. Utfordringen ved bruk av denne metoden er å få sekvensert tilstrekkelig antall tilfeldige sekvenser, slik at man får et tilfredsstillende antall repeterende motiver (Abdelkrim et al., 2009). Ingen hybridiserings- eller kloningssteg er nødvendig, og hele prosessen med 454-sekvensering, screening og design av primere til 10 – 15 loci, kan utføres på 2 uker (Abdelkrim et al., 2009). Den generelle fremgangsmåten er som følger: Genomisk DNA blir fragmentert (300 – 800bp) ved en mekanisk deleprosess, og adaptorer ligert til fragmentene. Hvert fragment blir fiksert til en kule og amplifisert opp ved PCR. Syntese og sekvensering gjøres i en og samme prosess, og produserer sekvens-reads med en gjennomsnittlig lengde på 400 bp. (Droege and Hill, 2008, Blazewicz et al., 2009). En variant av 454-metoden er å implementere et anrikningstrinn for å øke andelen repetitivt DNA før genom sekvensering. Dette gjøres ved å fiske ut repeterende DNA ved hjelp av

hybridisering av genomisk DNA fragmenter til prober bestående av mikrosatellitt-motiv (Santana et al., 2009).

1.3.4 Multipleks PCR

Mikrosatellitt-basert genotyping innebærer bruk av PCR. En variant av PCR er såkalt multipleks PCR hvor flere ulike loci amplifiseres i en og samme PCR-reaksjon. Multipleks PCR vil redusere kostnadene og maksimere effektiviteten ved amplifisering av mikrosatellitter (Johnson et al., 2007).

Ved utvikling av en multipleks PCR-reaksjon øker sannsynligheten for interaksjoner mellom primerne som tilsettes reaksjonen (Henegariu et al., 1997). Alle primersett som er planlagt benyttet i en multipleks reaksjon bør derfor først analyseres ved simpleks PCR. Ved tilsetting av nye primersett til PCR reaksjonen må amplifiseringsproduktet analyseres med hensyn på om det oppstår tap eller tilførsel av alleler som følge av henholdsvis primer-primer interaksjoner og uspesifikk amplifisering (Porta et al., 2006). En annen utfordring ved multipleks PCR er å finne den optimale annealingstemperaturen for alle primersett som brukes i reaksjonen. Dette kan gjøres ved å analysere reaksjonene ved gradient PCR. Videre vil en optimalisering av en multipleks PCR-reaksjon kreve at man tilpasser konsentrasjonen av de ulike primersettene for å oppnå et relativt likt amplifiseringsnivå over alle loci. Utvikling av en multipleks PCR-reaksjon krever vanligvis mer tid til tilpasning enn simpleks PCR, men til populasjonsgenetiske studier hvor man skal analysere hundrevis av individer over flere populasjoner, vil både de økonomiske fordelene, den reduserte tidsbruken og den reduserte faren for handlingsfeil, veie opp for dette (Porta et al., 2006).

1.3.5 Utfordringer ved mikrosatellitter som genetiske markører

Når man har utviklet en multipleks PCR-reaksjon og optimalisert denne, er det viktig å validere metoden ved å undersøke om valgte loci er egnet til ønsket bruk (Johnson et al., 2007).

Det er viktig å undersøke om et mikrosatellittlocus er selektivt nøytralt hvis det skal benyttes som markør i populasjonsstudier. Mikrosatellittsekvenser kan være under seleksjonspress

både ved å være lokalisert i genomiske sekvenser som har funksjonell rolle innenfor genregulering og kromatin organisering, og ved å være i nærheten av et gen under seleksjon og dermed opptre ikke-nøytralt pga "hailing" (Charlesworth et al., 1993, Selkoe and Toonen, 2006). Mikrosatellitloci kan være koblet nært sammen i genomet, og loci bør derfor testes parvis for å se etter koblingsulikevekt. Når to loci er lokalisert tett på et kromosom, er sjansen for at de fordeles uavhengig til avkommet liten, men sjansen for at de blir nedarves som et par stor. Ved signifikant koblingsulikevekt bør et av lociene forkastes fra videre analysen (Selkoe and Toonen, 2006).

En utfordring ved bruk av mikrosatellitdata i statistiske analyser, er at mutasjonsprosessen er sammensatt og mekanismene kan være komplekse (Comeron, 2001, Ellegren, 2004). En mutasjonsmodell som ofte er brukt i populasjonsstudier er den trinnvise mutasjonsmodellen (SMM) som trekker fra eller legger til en repetisjonsenhet ved en konstant rate, for å etterligne feil som oppstår ved DNA replikasjon (Ellegren, 2004). En annen modell er infinit allel modell (IAM) hvor hver mutasjon skaper et nytt allel. Dette er en enkel og generell modell som har vært et foretrukket valg for mange populasjonsgenetikere (Ruzzante, 1998). Et annet problem som kan oppstå som følge av den høye mutasjonsfrekvensen er homoplasy, hvor individer har like allel, oppstått ved parallelle mutasjoner uavhengig av hverandre, og ikke på bakgrunn av felles opphav (Morin et al., 2004). Dersom homoplasy ikke oppdages i genetiske studier vil man kunne underestimere allel forskjeller i og mellom populasjoner (Jarne and Lagoda, 1996). En utbredt grunn til falsk heterozygot underskudd i populasjonsstudier er mutasjoner i primersetet til et locus, hvor enkelte alleler ikke vil bli amplifisert (null allel). Ofte vil mutasjonene som forårsaker null allel bare forekomme i en eller noen få populasjoner (Cock Van et al., 2004). En enkel måte å undersøke et null allel problem på er å undersøke om noen individer ikke amplifiserer et allel ved et bestemt locus ved gjentatte analyser, mens det amplifiserer opp ved andre locus. Dette indikerer at det ikke er kvaliteten av DNA som er problemet, men at individet kan være homozygot for et null allel. Det finnes også statistiske programmer for å teste for null allel (Selkoe and Toonen, 2006).

Det eksisterer også noen tekniske utfordringer ved bruk av mikrosatellitter som genetiske markører. Et av disse er uspesifikk hybridisering av primere til andre genomsekvenser enn målområdet. Dette kan unngås ved å analysere unikheten til primeren og/ eller ved å

optimalisere PCR forholdene ved å tilpasse annealingtemperaturen, slik at primerne binder spesifikt til målsekvensen (Liu and Cordes, 2004). Et annet teknisk problem er såkalte ”stutter bånd” som oppstår på grunn av ”DNA-polymerase-slippage” under PCR-amplifisering, og fører til PCR-produkt som er en eller flere repetisjoner kortere enn det primære produktet. Dette vil kunne føre til feil ved automatisert allelscoring, og medføre manuelt etterarbeid (Fishback et al., 1999). Dette er et problem hovedsaklig knyttet opp mot mikrosatellitter med dinukleotidmotiv (Selkoe and Toonen, 2006). Pluss A topper er også et teknisk problem som kan oppstå ved genotypings PCR. Grunnen er at Taq DNA-polymerasen adderer ikke-templat nukleotid (prinsipielt adenosine) til 3`-enden av det PCR-amplifiserte produktet (Brownstein et al., 1996). Dette kan føre til at ikke alle PCR-produkter fra et gitt locus er av lik størrelse (skiller en bp) og kan fører til allelscoringsproblemer ved bruk av automatisert allelscorings-software (Qiagen, 2008).

1.4 Bevaringsgenetikk

Levende organismer blir utrydningstruet når deres normale habitat forsvinner eller endres. Vitenskapen om bevaringsbiologi undersøker individer og populasjoner som har blitt påvirket av habitat tap, utnyttelse og/eller miljømessige endringer. Denne informasjonen brukes til å fatte beslutninger som skal sikre overlevelse av organismer i fremtiden. Vitenskapen om genetikk er studier av arv og gener som er ansvarlige for arvelige egenskaper. Setter man bevaringsbiologi og genetikk sammen får man vitenskapen om bevaringsgenetikk (Hedrick, 2001).

Viktige temaer i bevaringsgenetikk og bevaringsbiologi er som følger (Frankham, 2003):

- Skadelige effekter av innavl på reproduksjon og overlevelse (innavls depresjon).
- Tap av genetisk variasjon og redusert evne til tilpassing på miljømessige endringer.
- Fragmentering av populasjoner og reduksjon i genflyt.
- Genetisk drift vil overstyre naturlig seleksjon i små populasjoner.
- Akkumulering og tap av skadelige alleler.
- Genetisk tilpasning til et liv i fangenskap, og hvordan denne tilpasningen påvirker reintroduksjon.

- Avdekke underliggende slektskapsgrupperinger, som kan eksistere under de taksonomiske inndelingene.
- Reduksjon av fitness som noen ganger opptrer ved utkryssing (utkryssingsdepresjon).
- Bruk av molekylær-genetiske analyser for å forstå bakenforliggende genetiske mekanismer av artsbiologi.

Nye molekylære metoder, som bruk av mikrosatellittmarkører, har gjort genetiske undersøkelser på utrydningstruede arter gjennomførbart ved at man kan gjøre genetiske analyser fra blant annet fra avføring og hår (Morin et al., 1994). Analyse av store mengder data fra markør loci eller DNA-sekvensdata kan benyttes til å skille mellom artsgrupper, populasjoner eller individer. For å oppnå en effektiv bevaring av utrydningstruede populasjoner, er det viktig å få gjort undersøkelser av den genetiske variasjonen. Variasjoner innad i en populasjon er i hovedsak påvirket av genetisk drift, mulighet for innavl, og opprettholdelse og tap av sjeldne allel. Mens variasjon mellom populasjoner er påvirket av lokal tilpasning, seleksjon, genflyt og isolasjon (Hedrick, 2001).

Den vanligste analysen som benyttes for å studere genetisk diversitet i en populasjon er overensstemmelse av alleldiversiteten med Hardy-Weinberg likevekten (H-W likevekten), hvor forventet heterozygositet kan beregnes ut fra allelfrekvensen ved et locus i en populasjon (Guo and Thompson, 1992). H-W likevekten sier at både allel og genotypefrekvens i en populasjon er konstant fra en generasjon til neste generasjon, med mindre populasjonen blir utsatt for evolusjonære krefter (Crow, 1988). For at en populasjon skal være i H-W likevekt må følgende forutsetninger være oppfylt:

1. Panimixi (tilfeldig parring)
2. Ingen mutasjon
3. Uendelig stor populasjon (dvs. ingen genetisk drift)
4. Ingen genflyt
5. Ingen seleksjon

Et heterozygot overskudd opptrer når populasjonen inneholder færre homozygoter enn forventet og et heterozygot underskudd opptrer når det er flere homozygote individer enn forventet under H-W likevekt. Underskudd av heterozygoter fra H-W likevekten skyldes ofte avvik fra forutsetningene, som høy grad av innavl eller seleksjon for eller mot et bestemt

allel (Selkoe and Toonen, 2006). For arter som er utrydningstruet, som elvemusling, fører ofte små populasjoner til fragmentering og isolasjon, som igjen kan føre til innavl og reduserer genflyt mellom populasjoner. Dette skyldes at i små populasjoner som er innavlet vil genetisk drift overstyre naturlig seleksjon, og føre til tilfeldig fiksering av enkelte alleler og fører til lavere genetisk variasjon. Dette vil igjen resultere i at populasjonens evner til tilpasning reduseres. Innavl og selvfertilisering fører til endring i snittfenotypene i en retning som fører til redusert fitness (Charlesworth and Charlesworth, 1987, Reed and Frankham, 2003). Sterkt innavlede populasjoner kan lide under innavlsdepresjon, hvor skadelige recessive alleler vil kunne bli uttrykt i populasjonen (Fenster and Galloway, 2000).

1.5 Målsetninger

Hovedmålsetningen for dette studiet er å isolere og utvikle polymorfe mikrosatellittmarkører for populasjonsgenetiske studier av elvemusling i Norge. Mikrosatellittmarkører er et viktig verktøy for å kunne studere genetisk variasjon i og mellom populasjoner og dermed bidra til en mer effektiv strategi for bevaring av den utrydningstruet elvemuslingen *M. margaritifera*.

Fra et publisert studie på elvemusling i Sverige (Arvidsson, 2007) viste bare 6 av 13 etablerte mikrosatellittmarkører (Geist et al., 2003) tilfredsstillende amplifiseringsresultater. Det var derfor ønskelig å utvikle flere mikrosatellittmarkører i tillegg til å teste ut de 6 som ga tilfredsstillende resultater fra det svenske studiet.

Det foreligger lite tilgjengelig genomisk sekvensdata for arter av bivalves i databasene til GeneBank, derfor ønsket vi å genomsekvensere DNA fra et individ av elvemusling ved 454-pyrosequenseringsteknikk og benytte bioinformatisk verktøy til å isolere og identifisere mikrosatellittsekvenser. Videre ønsket vi å utvikle mikrosatellittmarkører ved å designe primersett for å amplifisere disse mikrosatellittsekvensene, verifisere sekvensene ved sekvensering og å utføre ulike analyser for å teste markørens egenskaper i populasjonsgenetiske studier. Til slutt ønsket vi å sette markørene sammen i en multipleks PCR-reaksjon og å benytte multipleks PCR-reaksjonen til å utføre populasjonsgenetiske studier på 5 forskjellige populasjoner av elvemusling.

2. Materialer og Metoder

2.1 Identifisering av mikrosatellitt sekvenser i *M. margeritifera*

Mikrosatellittsekvenser i *M. margeritifera* ble identifisert ved bruk av genomisk 454 sekvensdata. Genomisk DNA for sekvensering ble isolert fra et *M. margeritifera* individ høstet i Sørkedalselven (individ S2). DNA ble isolert ved bruk av "Blood & Tissue DNA purification kit" (Qiagen). Isoleringen ble utført i henhold til produsentens anbefalinger fra 200 mg muskulært vev. Integriteten til isolert DNA ble undersøkt ved standard agarose gel-elektroforese (0,8 % agarose/0,5x TAE buffer). Konsentrasjon av, og renhet til isolert DNA ble bestemt spektrofotometrisk ved bruk av NanoDrop instrumentering. 5 µg DNA (1 µg/µl) ble sekvensert ved bruk av FLX Titanium Serie Reagenser. Sekvenseringen ble utført ved Universitetet i Oslo.

WebSat (<http://wsmartins.net/websat/>; Wellington S. Martins, Brasil) ble benyttet for å identifisere mikrosatellitt DNA i 454 genererte genom sekvenser fra *M. margeritifera*. Søket i WebSat ble utført med "default"-parametre og satt til å identifisere di-, tri-, tetra-, penta- og hexa-nukleotid repetisjoner. DNA-sekvenser i størrelsesorden 100 – 300 basepar (bp) innholdene minimum 9 etterfølgende repetisjoner og med flankerende områder både oppstrøms (5') og nedstrøms (3') for mikrosatellittsekvensen ble valgt ut og deretter importert til CLC Genomic Workbench (<http://www.clcbio.com/index.php?id=92>) for primer design.

2.2 Design av primere

2.2.1 Primer design for amplifisering av mikrosatellitt DNA

Til primerdesign ble programvaren i CLC Genomic Workbench benyttet. Følgende parameter ved primerdesign ble valgt:

- Primerlengde: 18 – 24 bp
- Smeltepunkt (T_m): 56 – 60°C
- G/C innhold: 40 – 60 %
- Maksimalt 3 G eller C-baser i de 5 siste nukleotider i 3`enden av primeren
- For øvrig ble ”default” parametrene benyttet

De ulike primerne og primersettene ble også analysert med hensyn på intra- og intermolekylære interaksjoner for å redusere sannsynligheten for henholdsvis selv-komplimentering og primer-dimer dannelse.

I tillegg til de overnevnte innstillinger og analyser ble følgende vurderinger ved primer design satt:

- Setet for primerhybridiseringen: minimum 10 bp fra mikrosatellittsekvensen
- Primere med repetisjoner i seg selv (eks. CTCTCT) skulle unngås
- Unikheten til primersekvensene ble undersøkt ved å utføre et nBLAST søk med primersekvenser mot en lokalt opprettet database i CLC Genomic Workbench bestående av all tilgjengelig 454-sekvensdata fra *M. marginifera* individ S2.
- Primersettet skulle ha en primerscore over 35 poeng, hvor 100 poeng er maksimal score.

2.3 Evaluering av primersett

Spesifisiteten til de ulike primersettene ble testet ved gradient PCR ved å benytte genomisk DNA (25 ng) fra individ S2 som templat. Gradient PCR ble satt opp i et totalvolum på 20 µl med følgende komponenter og konsentrasjoner: 1x AmpliTaq Gold PCR-buffer, 1,5mM MgCl₂, 0,2 mM av hver dNTPs, 0,3 µM forward og revers Mm primere og 0,025U AmpliTaq Gold DNA-polymerase (ABI). PCR ble utført på GeneAmp® PCR System 9700 (ABI) med følgende temperaturprofil: initialt aktiveringssteg ved 95°C i 10 min, deretter 35 syklener med denaturering ved 94°C i 30 sek., primerhybridisering ved 54 - 60°C i 30 sek., og DNA-syntese ved 72°C i 1 min. PCR ble avsluttet med et forlenget syntesesteg på 72°C i 5 min. For hver PCR-reaksjon ble en negativ kontroll benyttet hvor DNA-templat ble utelatt fra reaksjonen. 10 µl av hver av PCR-reaksjonene ble analysert ved agarose-gelelektroforese

(2,5 % agarose/ 0,5 x TEA) tilsatt Ethidium Bromid til en sluttkonsentrasjon på 0,5 µg/ml. PCR-produkter ble visualisert ved UV-illuminisering og dokumentert ved bruk av Kodak deteksjon system (Molecular Imagin System, Eastman Kodak Company, USA).

I tilfeller hvor et primersett gav lav eller ingen detekterbar DNA-amplifisering over hele den gitte gradient betingelsen, ble ny gradient PCR utført hvor MgCl₂-konsentrasjonen i reaksjonen ble økt fra 1,5 til 2mM.

For å undersøke om de ulike *Mm*-primersettene også gav opphav til spesifikke PCR-produkter av forventet størrelse ved bruk av DNA-templat fra andre *M. margaritifera* individer enn S2, og for å undersøke graden av polymorfi ved de ulike loci, ble DNA (10 – 25 ng) fra 7 ulike individer fra 2 elver analysert ved PCR og agarose gel-elektroforese. PCR-reaksjoner og betingelser samt analyse ved agarose-gelelektroforese ble utført som beskrevet over med unntak av at primerhybridisering ble satt til 55°C.

2.4 Verifisering av amplifiserte PCR produkt ved kloning og sekvensering

Amplifiserte produkter fra hver PCR-reaksjon, med DNA fra individ S2 som templat, ble klonet og deretter sekvensert for å verifisere motivkomposisjonen og sekvens på amplifisert produkt.

Til kloning av PCR-produkter ble pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) benyttet. Ligeringsreaksjonen ble utført i et totalt volum på 10 µl og inneholdt 1X "Rapid Ligation Buffer", 3 Weiss Units T4 DNA-ligase og 50 ng pGEM®-T Vector tilsatt 2 µl PCR-produkt. Ligeringsreaksjoner ble inkubert i en time ved romtemperatur. Deretter ble 2 µl ligeringsreaksjon tilsatt til 50 µl kjemisk kompetente *Escherichia coli* celler (One Shot® Mach 1™ T1R, Invitrogen). Transformasjonsreaksjonene ble inkubert på is i 30 min før varmesjokk-behandling ved 42°C i 30 sek og deretter inkubert på is i 2 min før SOC-medium (250 µl) forvarmet til 37°C, ble tilsatt. Cellene ble deretter inkubert ved 200 rpm ved 37°C i en time. Celler suspensjon (25 - 40 µl) fra hver transformasjon ble platet ut på Luria Broth (LB) medium tilsatt ampicillin (100µg/ml), IPTG (0,5 mM) og X-gal (80 µg/ml). Skålene ble inkubert over natt ved 37°C.

2.4.1 Koloni PCR

Sju ampicillin-resistente kolonier fra hver klonings/transformerings reaksjon ble analysert ved koloni PCR og agarose gel-elektroforese. Primersett benyttet til hver av koloni PCR-reaksjonene var identisk med de benyttet for amplifisering av insert DNA. Templat (*E.coli* celler) ble tilsatt til PCR-reaksjonen ved å overføre litt cellematerialet fra en koloni med en steril tannpirker. PCR-reaksjoner og betingelser samt analyse ved agarose-gelelektroforese ble utført som beskrevet under punkt 2.3.

2.4.2 Isolering av plasmid-DNA og verifisering av insert DNA ved restriksjonskutting

Koloni PCR positive celler ble dyrket over natt i flytende LB medium tilsatt ampicillin til en sluttkonsentrasjon på 100 µl/ml, og plasmid DNA isolert, ved bruk av PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, USA). Plasmid isoleringen ble utført i henhold til produsentens anbefalinger. Renhet av (vurdert ved A260/A280), og konsentrasjon av plasmid DNA ble analysert spektrofotometrisk, ved bruk av NanoDrop instrumentering (Wilmington).

For å verifisere insert DNA, ble plasmid DNA restriksjonsbehandlet med *Eco*-R1, og reaksjonen analysert ved agarose gel-elektroforese. Til hver reaksjon med et totalvolum på 10 µl ble det tilsatt 1µl 10 X *Eco*RI buffer, 8µl plasmid DNA (~ 200 ng) og 1 µl (10U) *Eco*RI-enzym (New England BioLabs®). Reaksjonene ble inkubert ved 37°C i en time før prøvene ble analysert ved 2 % agarose gel-elektroforese.

2.4.3 Sekvensering

Sekvensering av positive plasmid kloner ble utført i et totalvolum på 10 µl og bestod av følgende komponenter: 2 µl 5 X Big Dye sekvenseringsbuffer II, 3,2 pmol M13 revers primer, 200 ng plasmid DNA, 0,5 µl BigDye Terminator mix v3.1. Sekvenserings PCR-programmet fulgte ST_eP (Platt et al., 2007) og ble utført ved bruk av en ABI 9700 Fast Thermal Cycler. Sekvenseringsprodukter ble opprenset ved bruk av BigDye XTerminator® Purification kit (ABI), i følge produsentens anbefalinger. Sekvenseringen ble utført ved

kapillær elektroforese på ABI Prism 3130xl Genetic Analyser. Sekvenseringsdata ble analysert i CLC Main Workbench.

2.5 Multipleks PCR design

Fargesett G5 (ABI) bestående av HEX, 6-FAM, NED og VIC (og LIZ-merket størrelses markør) ble benyttet til merking av forward primere for utvalgte mikrosatellitt loci. Loci med overlappende størrelser på alleler ble merket med ulike farger (Tabell 1).

2.5.1 Multipleks I

Templat for PCR-reaksjonene var genomisk DNA fra 7 ulike individer. Til hver av reaksjonene ble det inkludert en negativ kontroll hvor DNA-templat ble utelatt. DNA ble først analysert ved dupleks PCR i et totalvolum på 10 µl bestående av templat DNA (25 ng), 1x Amplitaq Gold PCR-buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM av hver dNTPs, 0,3 µM av forward og revers primere og 0,025U Amplitaq Gold DNA-polymerase (ABI). Program for PCR var som beskrevet under punkt 2.3. For hver addering av et nytt primersett til PCR-reaksjonen ble multilocus-profilen sammenlignet med produkter fra dupleks PCR, for å se etter tap eller tilførsel av produkt som følge av interaksjoner mellom primere. PCR-reaksjonene ble optimalisert ved justering av primer- og MgCl₂- konsentrasjon, og ved å teste ut ulike tider på primerhybridisering og DNA-syntese. (se punkt 3.2).

Tabell 1: Oversikt over fluorescence-merking av primere (forward) for multipleks-PCR

Forward primer	Farge	Observerte allel størrelse (bp)
<i>Mm2209</i>	PET	211
<i>Mm2230</i>	6FAM	239
<i>Mm2233</i>	PET	161
<i>Mm2235</i>	VIC	233
<i>Mm2236</i>	NED	225
<i>Mm2238</i>	6FAM	122
<i>Mm2239</i>	NED	119
<i>Mm2240</i>	PET	108

2.5.2 Multipleks II

5 etablerte mikrosatellittmarkører, *MarMa3116*, *MarMa3621*, *MarMa4277*, *MarMa4315* og *MarMa5167* av 13 tilgjengelige for *M.margaritifera* (Geist et al., 2003), ble valgt ut til design av multipleks PCR (Tabell 2). Valget var basert på tidlige publiserte resultater ved genotyping av *M.margaritifera*-populasjoner i Sverige (Arvidsson, 2007). Mikrosatellittmarkør *MarMa4143* ble forkastet fra multipleks PCR-reaksjonen grunnet for lav mengde PCR-produkt amplifisert fra primersettet. Utvikling av multipleks PCR design for etablerte markører ble innledet ved at DNA ble analysert ved simpleks PCR, før addering av et nytt primersett til reaksjonen. PCR-reaksjon og betingelser var som beskrevet i avsnitt 2.5.1. Fluorekrom merking av de ulike primerne (forward primer), mikrosatellitt-motiv og primersekvens er ført opp i tabell 2. Genomisk DNA fra 7 ulike individer (10 – 30 ng) ble brukt som templat. PCR ble satt opp i et reaksjonsvolum på 10 µl bestående av 1x Amplitaq Gold PCR-buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM av hver dNTPs, 0,5 µM forward og revers primere og 0,025U Amplitaqe Gold DNA-polymerase (ABI). Program for PCR ble utført som beskrevet under 2.3. PCR-reaksjonene ble optimalisert ved samme prosedyre som beskrevet under 2.5.1.

Tabell 2: Mikrosatellittmarkør, repetisjonsmønstre, merking på forward primer og forward og revers primersekvens på 6 etablerte markører valgt ut til design av multipleks PCR

Locus	Motiv	Farge	Primersekvens (5' →3')
<i>MarMa3116</i>	(GT) ₃ ..(GT) ₃ ...(CA) ₅ CG(CA) ₁₅	PET	F: TTAGCCGCTATTACAAAACG R: AGAATGAAACATTCGACAGC
<i>MarMa3621</i>	(CAA) ₂ (GA) ₂₂	NED	F: TGGTGTTATCCTCAACATGC R: TGGCATTCTATAAAAAGTTTACCAA
<i>MarMa4143</i>	(TC) ₁₆	-Forkastet-	F: TCAAAACCACTTGTTGTATGGT R:TGGAGCTTGTAATAAATCCTGT
<i>MarMa4277</i>	(CT) ₂₀ (CA) ₁₆	6FAM	F: TGTCGGAAATCTTAGCTTGG R: GGCGAAATTGAATGCTCTAA
<i>MarMa4315</i>	(CTAT) ₃ (CT) ₁₂ (AT) ₁₅ AAA (CA) ₇ CT(AT) ₃	VIC	F:TCATTGTGTCCATTAGCAATTTTTG R: CCATTGCACTTAGCTGGAAA
<i>MarMa5167</i>	(CAA) ₃ CAG(CAA) ₁ (CA) ₁₄	PET	F:AAAGGTCGTTCTTCACATCAA R:GCAACCAAGACCCGAATTA

2.5.3 Kappilærelektroforese av multipleks PCR reaksjoner

For klargjøring til kapillærelektroforese ble 1 µl PCR-reaksjon tilsatt til 10 µl formamid (Formamid Hi-Di™ ABI) og 0,5 µl 500 LIZ størrelsesmarkør (GeneScan™ 500Liz™ Size standard ABI). Prøvene ble inkubert ved 95°C i 5 min og deretter inkubert på is. I kapillærelektroforesesystemet ble 1 µl prøve injisert ved 15kV i 1 sekund, og separasjon av PCR-fragmenter ble utført ved hjelp av et femfarget laserindusert fluorescenskapillærelektroforese system (Prism 3130xl Genetic Analyzer). Elektroforesen foregikk i POP7 polymer, 1x TAE buffer og en 36 cm x 50 µm kappilær ved 15 kV i 15 minutter.

2.6 Data analyser

GenePop v.4.10 (ROUSSET, 2008) ble benyttet til å bestemme allelfrekvens (A), forventet (H_e) og observert (H_o) heterozygositet for hvert locus, for alle individer. Estimat av avvik fra Hardy-Weinberg likevekt (H-W likevekt) ble gjort ved Markov-chain algoritme (Guo and Thompson, 1992) og test av koblingslikevekt mellom loci ble gjort ved Fisher`s metode (Fisher, 1955). Kalkulering av parvis F_{ST} verdier mellom alle par av populasjoner ble utført ved standard ANOVA (Weir and Cockerham, 1984) i GenePop, P-verdi for hvert populasjonspaar ble beregnet ved Fisher`s metode. Forutsatt at avvik fra HWE var på grunn av innavl produsert ved selvfertilisering, ble selfing-raten S estimert ved det klassiske forholdet $S = 2 F_{IS}/(1+ F_{IS})$ (David et al., 2007). Analyse av null allel ble utført ved softwareprogrammet Micro-Checker (Cock Van et al., 2004).

2.7 Biologisk materiale

2.7.1 Innsamlinger av prøver

Lymfeprøver fra til sammen 132 elvemuslinger ble samlet inn fra 5 ulike populasjoner (elver) fra østlandsområdet i perioden september – november 2009 (Tabell 3). Prøvetaking ble gjort etter forskrifter for fangst av elveperlemusling av 1992. (<http://www.lovddata.no/for/sf/md/xd-19921230-1230.html>).

Tabell 3: Oversikt over prøveinnsamling av biologisk materiale

Fylke	Elv	Antall individer
Akershus	Kampåa	31
Akershus	Leira	36
Hedmark	Bråtaåa	24
Hedmark	Finsrudåa	34
Oppland	Fallselven	7*

*Av 34 innsamlede prøver ble det bare isolert DNA fra 7 stk. grunnet feil i isoleringsprosedyren.

Individer av elvemusling ble samlet opp 10 og 10 og oppbevart i en bøtte med vann før prøvetaking. Innsamling av prøver ble gjort på en skånsom og ikke-dødelig måte (Geist and Kuehn, 2005, Arvidsson, 2007). Prøver ble tatt ved å bruke en sprøytekanyle med sprøytespiss (1 ml: 1,1 x 40 mm) som ble stukket forsiktig inn i foten mellom de lukkede skjell-delene og deretter ble 100 - 300 µl lymfевæske sugd ut av foten og overført til Eppendorfrør inneholdende 400µl RNALater (Applied Biosystems, USA). Prøvene ble oppbevart på is før videre DNA-isolering.

2.7.2 DNA-isolering

Celler i lymfевæske (100 - 300µl) ble høstet ved sentrifugering ved 13000 rpm i 8 min ved romtemperatur. Supernatanten ble fjernet og cellene løst i 0,2 ml fosfat bufret saltvann (PBS). DNA ble deretter isolert ved bruk av DNAeasy blood og tissue kit (Qiagen) i følge produsentens anbefalinger. Det isolerte DNA ble oppbevart ved -20°C før videre analyser.

3. Resultater

I dette studiet har det blitt utviklet mikrosatellittmarkører for bruk innen populasjonsgenetiske studier av elvemusling (*M. margaritifera*). Etter uttesting og verifisering av mikrosatellittmarkørene, har utvalgte markører blitt satt sammen til en multipleks reaksjon (reaksjon I). Det har også blitt testet ut etablerte mikrosatellittmarkører, og disse er satt sammen til en multipleks reaksjon (reaksjon II), og begge multipleks reaksjoner har blitt optimalisert med mål å gi lik signalintensitet på de forskjellige loci. De to multipleks reaksjonene har blitt brukt til genotyping av 132 *M. margaritifera* individer fra 5 elver.

3.1 Utvikling av nye mikrosatellittmarkører.

3.1.1 Primerdesign

Fra 454-sekvensdata ble det identifisert 201 mikrosatellitt sekvenser med 9 eller flere repetisjoner som hadde flankerende områder med mulighet for primerdesign. Av disse var 22 dinukleotid, 134 var trinukleotid, 39 var tetranukleotid og 6 var pentanukleotid-repetisjoner (data ikke vist). Primere ble designet for amplifisering av 28 mikrosatellitt-sekvensene, hvor 18 var trinukleotid, 8 tetranukleotid og 2 var pentanukleotid-repeterende mikrosatellitter. Av disse 28 ble 17 primersett valgt ut (Tabell 4) etter følgende kriterier:

1. Primere for amplifisering av mikrosatellittlocuset skulle gi høy score ved primerdesign (se punkt 2.2.).
2. De utvalgte locusene skulle gi opphav til PCR-produkter med ulik størrelse (fra 100 til 300 basepar).
3. Optimalt skulle primersekvensene være komplementære kun mot mikrosatellittsekvensen den ble designet til å amplifisere.

Sistnevnte ble undersøkt ved å utføre et nBLAST søk mot en lokalt opprettet database bestående av alle 454-sekvensdata fra individ S2. Resultatet fra dette søket viste unikhhet på minst en av primerene i primersettet for alle primersett bortsett fra på mikrosatellittmarkør

Mm2219 hvor henholdsvis 2 ulike treff på forward og 3 treff på revers primersete ble identifisert. På primersett *Mm2211* ble ett treff på forward og 2 på revers primer identifisert.

Tabell 4: Mikrosatellittmarkør, repetisjonsmønstre, forward og revers primersekvens samt forventet allelstørrelse ved PCR for alle de 17 ulike primersettene som ble designet.

Locus	Repetisjons-mønster	Primersekvens (5' →3')	Forventet allelstørrelse (bp)
<i>Mm2201</i>	(CATA) ₂₁	F: TCCGCCTACCTTACTACCTG R: GACCGTGGAGTGGTTCTT	261
<i>Mm2207</i>	(TTA) ₂₀ (TTG) ₈	F: CATTATCATCCACACGCTT R:ACAACAGTCTGCCACTC	255
<i>Mm2209</i>	(ATTT) ₁₃	F:GGCACCTTCTTGGTAATTCT R:CCTTCACCTGATACTCACAC	211
<i>Mm2210</i>	(TATTA) ₂₅	F:GCGCTGCTACAAATTACCT R:CCAAATACAAACCAAACCGAAC	261
<i>Mm2211</i>	(TAA) ₃₅	F:GAGAACAGCACATACGCATA R:ACCATGCACCGAAAATCC	248
<i>Mm2213</i>	(TAT) ₁₃	F:TATGGTGTGCGAAGTCTGG R:ATCTAAACTTGTCTGGGGGAA	181
<i>Mm2219</i>	(TAAA) ₁₂	F:AGCTCTCCAACAGGCA R:TGCATTGACCTTGTCTCT	202
<i>Mm2230</i>	(CTAC) ₁₀	F:ATGACGTCCCGATAAACTG R:CATTGTACCCTCTCTCACGA	239
<i>Mm2231</i>	(GATA) ₁₃	F:GATGAGGAACGGTATAGGG R:TACAGCAGCAAGAGACTAAC	161
<i>Mm2233</i>	(ATT) ₁₄	F:GATGAGGAACGGTATAGGG R:TACAGCAGCAAGAGACTAAC	161
<i>Mm2235</i>	(TATG) ₁₅	F:AGTTTGAGGATGGGTTTTG R:TTTACCTTTAGTTTGGCACC	233
<i>Mm2236</i>	(ATCT) ₁₄	F:CCAGAACTGCGATTAATGA R:GGGAAAAGCTGCAAATAA	225
<i>Mm2238</i>	(TGG) ₁₀	F:GAAAAATCGGTATGGGGTTAG R:TTTACGACGAAGCTGCAC	122
<i>Mm2239</i>	(TGT) ₁₀	F:CGTTGAAATGGCCGTAGA R:AATGGGGGAGAAAGAGAAATAG	119
<i>Mm2240</i>	(AAT) ₁₀	F:ATCCCCAAAAGCAAGAA R:AGTATGGTCTGGGTTTGT	108
<i>Mm2242</i>	(TATG) ₁₇	F:GTGAGCAGGGGAAAAGGA R:GTTTACAAAGCCAAGGGT	258

3.1.2 Uttesting av nye primere

Primersettene for amplifisering av de 17 ulike mikrosatellittsekvensene i *M. margaritifera* ble testet ved gradient PCR med DNA fra individ S2 som templat for å undersøke spesifisiteten til primerene og for å finne optimal annealingstemperatur for PCR-

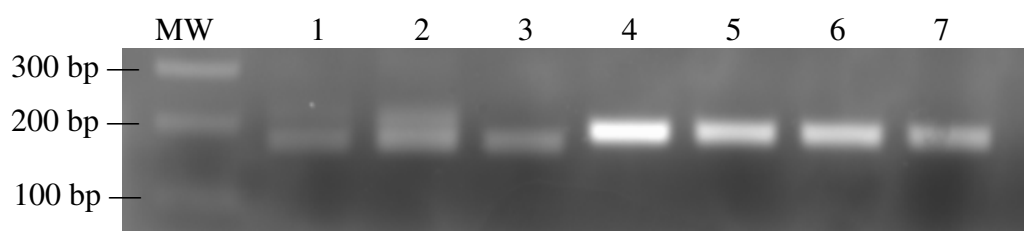
reaksjonene. Analyse av PCR-produkt ved agarose-gelelektroforese viste at 15 av 17 primersett gav et unikt PCR-produkt av forventet størrelse (Appendiks A). Primersett *Mm2213* og *Mm2231* ble forkastet fra videre analysering på grunn av henholdsvis manglende amplifisering av PCR-produkt og uspesifikk amplifisering (data ikke vist). $MgCl_2$ -konsentrasjonen ble økt fra 1,5 til 2,0 mM i PCR-reaksjonen for primersett *Mm2219*, *Mm2240* og *Mm2242*, mens for primersett *Mm2211* ble primerkonsentrasjonen økt til 0,4 μM . Disse justeringene resulterte i en høyere konsentrasjon av PCR-produkt, sett på gel (data ikke vist). Av 15 primersett var det 2 (*Mm2211* og *Mm2230*) som amplifiserte opp ett PCR-produkt av forventet størrelse over hele temperaturgradienten (fra 54 til 60 °C), mens de resterende 13 primersett viste PCR-amplifisering ved et litt smalere temperaturområde (Tabell 5). På bakgrunn av resultatene ble 55 °C bestemt som felles annealingtemperatur og ble benyttet ved all videre PCR. Resultatet av uttesting av de 17 primersettene er oppsummert i tabell 5.

Tabell 5: Oppsummering av uttesting av primersett. Navn på primersett, temperaturområde for amplifisering av PCR-produkt for de ulike primersettene analysert ved gradient PCR (54 – 60 °C), $MgCl_2$ og primerkonsentrasjon etter justering, og forkastede markører.

Primernavn	Gradient PCR (°C)	$MgCl_2$ kons. (mM)	Primerkons. (μM)
<i>Mm2201</i>	54,4 - 58	1,5	0,3
<i>Mm2207</i>	54,4 - 58	1,5	0,3
<i>Mm2209</i>	54,4 - 58	1,5	0,3
<i>Mm2210</i>	54,0 - 59,5	1,5	0,3
<i>Mm2211</i>	Hele området	1,5	0,4
<i>Mm2213</i>	-Forkastet-	—	—
<i>Mm2218</i>	54,4 - 59,9	1,5	0,3
<i>Mm2219</i>	54,0 - 58,0	2,0	0,3
<i>Mm2230</i>	Hele området	1,5	0,3
<i>Mm2231</i>	-Forkastet-	—	—
<i>Mm2233</i>	54 - 58	1,5	0,3
<i>Mm2235</i>	54 - 56	1,5	0,3
<i>Mm2236</i>	54 - 58	1,5	0,3
<i>Mm2238</i>	54 - 59	1,5	0,3
<i>Mm2239</i>	54 - 58,5	1,5	0,3
<i>Mm2240</i>	54 - 58	2,0	0,3
<i>Mm2242</i>	54 - 58	2,0	0,3

3.1.3 Polymorfi

For å undersøke spesifisiteten til primerene mot andre individer enn S2 og for å undersøke om mikrosatellittlocusene var polymorfe, ble 7 ulike vilkårlige individer fra 2 elver (Sørkedalen og Kampåa) analysert ved PCR med hver av de 15 ulike primersettene. PCR-produktene ble analysert ved standard agarose gel-elektroforese. Resultatet viste at alle primersettene amplifiserte opp PCR-produkt fra de 7 ulike individene, og dermed var spesifikke (Appendiks B). Videre viste analysen at locus *Mm2201*, *Mm2207*, *Mm2209*, *Mm2230* og *Mm2236* var polymorfe (Appendiks B). For de andre undersøkte mikrosatellittloci ga ikke undersøkelsen resultater som kunne konkludere om de var polymorfe siden de analyserte PCR-produktene var vanskelig å skille på agarose gel (Appendiks B). Et eksempel på analysen er vist i Figur 4, som viser resultatet for analyse på mikrosatellittloci *Mm2209*. Individ 1 og 2 er tydelig heterozygote, mens individ 3 og 4 viser tydelig forskjell i fragmentlengden for dette lociet.



Figur 4. Undersøkelse av allelrikdom ved de forskjellige loci ble undersøkt ved PCR analyse på 7 forskjellige individer som ble analysert ved agarose gelelektroforese. Individ 1- 4 fra Sørkedalselva og individ 5-7 fra Kampåa. Bildet viser analyse på mikrosatellitt loci *Mm2209*.

3.1.4 Verifisering av mikrosatellittsekvenss komposisjon

Hver av de ulike PCR-produktene ble verifisert ved sekvensering. Dette ble gjort ved først å klonere de ulike PCR-produktene inn i plasmidet pGem T-Easy. Tentativt positive kloner ble identifisert ved koloni PCR (data ikke vist). Fra positive kloner ble det isolert plasmid DNA fra overnatte kulturer, og plasmid DNA ble videre restriksjonskuttet med *EcoRI* for å identifisere plasmid DNA med insert (data ikke vist). En insert positiv klon fra hver av de ulike kloningsreaksjonene ble sekvensert.

Sekvensering av 7 av klonene gav forventede sekvenser, mens 5 hadde noen repetisjoner for lite eller mye ut fra det som var forventet fra 454-genomsekvensdataene (Tabell 6). Sekvensering av de resterende 3 kloner (*Mm2211*, *Mm2218* og *Mm2219*) viste ikke forventet sekvens (data ikke vist). Sekvensering av *Mm2211* og *Mm2219* viste at PCR produktet ikke inneholdt mikrosatellitt DNA mens *Mm2218* inneholdt en ufullstendig mikrosatellittsekvens og ingen flankerende områder som stemte med forventet resultat. Disse 3 ble dermed utelatt fra det videre arbeidet.

*Tabell 6: Sekvensering av insert DNA hvor sekvensene stemte med det som var forventet. På locus merket med * var det avvik fra observert i forhold til forventet motiv.*

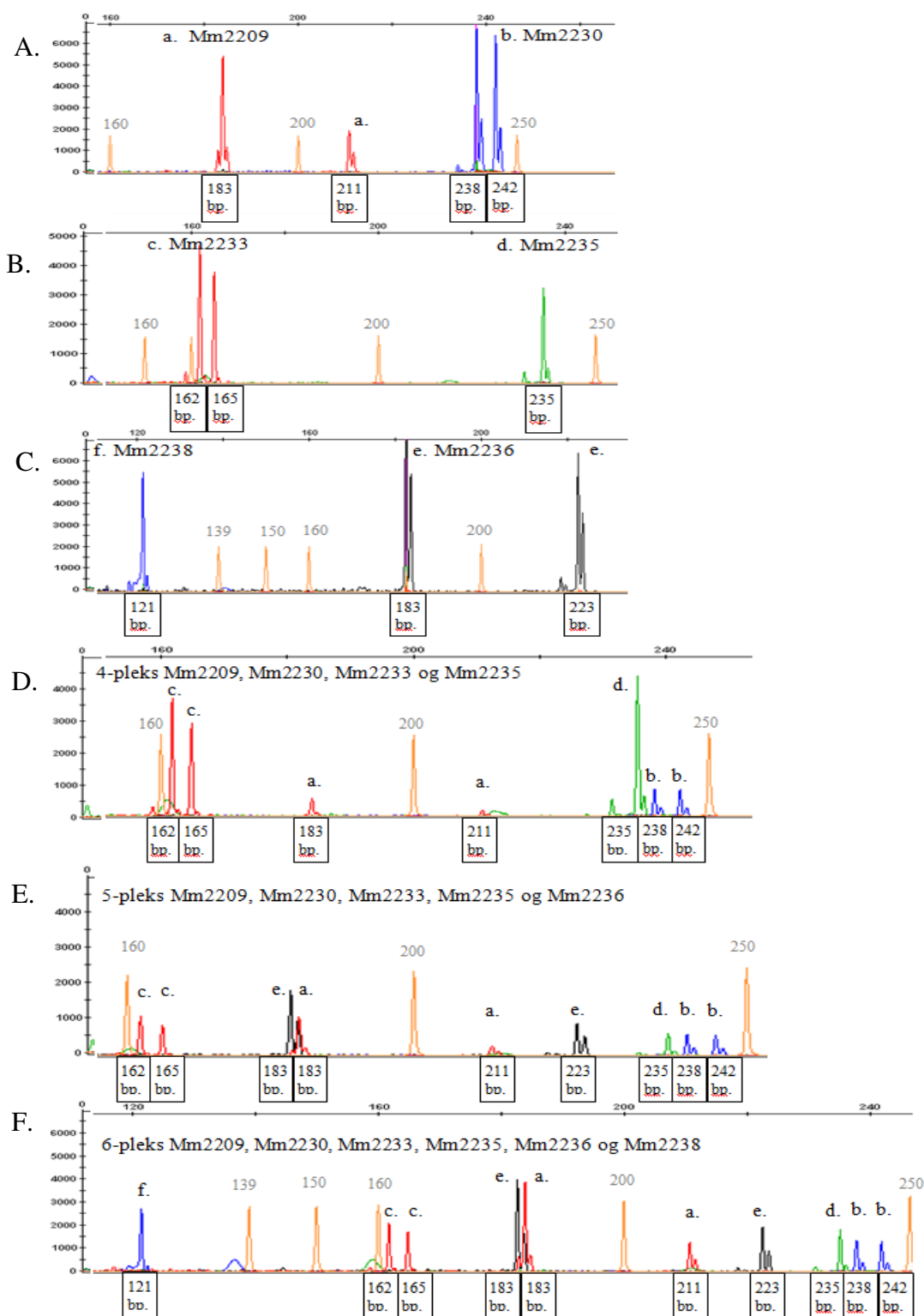
Locus	Forventet motiv	Observed motiv
<i>Mm2201</i>	(CATA) ₂₁	(CATA) ₂₁
<i>Mm2207*</i>	(TTA) ₂₀ (TTG) ₈	(TTA) ₂₁ (TTG) ₈
<i>Mm2209*</i>	(ATTT) ₁₃	(ATTT) ₆
<i>Mm2210*</i>	(TATTA) ₂₅	(TATTA) ₂₄
<i>Mm2230</i>	(CTAC) ₁₀	(CTAC) ₁₀
<i>Mm2233*</i>	(ATT) ₁₄	(ATT) ₁₂
<i>Mm2235</i>	(TATG) ₁₅	(TATG) ₁₅
<i>Mm2236</i>	(ATCT) ₁₄	(ATCT) ₁₄
<i>Mm2238</i>	(TGG) ₁₀	(TGG) ₁₀
<i>Mm2239*</i>	(TGT) ₁₀	(TGT) ₅
<i>Mm2240</i>	(AAT) ₁₀	(AAT) ₁₀
<i>Mm2242</i>	(TATG) ₁₇	(TATG) ₁₇

3.1.5 Utvikling av multipleks PCR (Multipleks I)

8 av 12 mikrosatellittsekvenser ble valgt ut til multipleks PCR design. Valget av markørsekvenser var basert på primerscore (37 – 62 poeng, data ikke vist) og loci som hadde gitt allellengder i et bredt størrelses spekter (fra 100 – 300 bp). Tabell 7 viser hvilke markørsekvenser som ble valgt og hvilke fluorekrom som ble festet på forward primersekvens.

Utvikling av multipleks PCR for nye mikrosatellittmarkører ble utført ved at DNA fra 7 ulike individer ble analysert ved dupleks PCR, hvor to og to primersett ble satt sammen i en

og samme PCR-reaksjon. Resultatene av dupleks PCR-analysene for et vilkårlig individ (S2) er vist i figur 5. I hver dupleks PCR-reaksjon (Figur 5A-5C) ble det amplifisert opp primerspesifikke PCR-produkt fra hver av de to bortsett fra på analysen for *Mm2239* og *Mm2240* hvor bare *Mm2239*-spesifikke PCR-produkter ble amplifisert (data ikke vist). Ved neste trinn ble 4 primersett (*Mm2209*, *Mm2230*, *Mm2233*, *Mm2235*) benyttet i en og samme PCR-reaksjon og de samme 7 individer ble analysert (Figur 5D). Resultatet viste locus-spesifikk amplifisering av PCR-produkter av samme størrelse som på dupleks PCR-analysen. 5-pleks PCR-reaksjon med *Mm2209*, *Mm2230*, *Mm2233*, *Mm2235* og *Mm2236* (Figur 5E) viste også de samme PCR-produkt størrelser som ble amplifisert ved dupleks PCR. Primerkonsentrasjonen ble deretter justert for å få mest mulig lik signalintensitet. Denne prosedyren ble fulgt til det var bygd opp en PCR-reaksjon hvor 6 ulike primere satt sammen i en og samme PCR-reaksjon (Figur 5F). Primersett *Mm2239* ble utelatt fra multipleks-oppsettet siden PCR-amplifiseringen fra de andre primersettene ga svært lave signaler når *Mm2239* ble tilsatt PCR-reaksjonen (data ikke vist). Primersett *Mm2240* ga ikke entydige og spesifikke PCR-produkt i multipleks PCR-reaksjonen selv ikke etter flere optimaliseringsforsøk hvor primer- og $MgCl_2$ konsentrasjonen ble variert (data ikke vist), og ble derfor utelatt fra videre analyser.

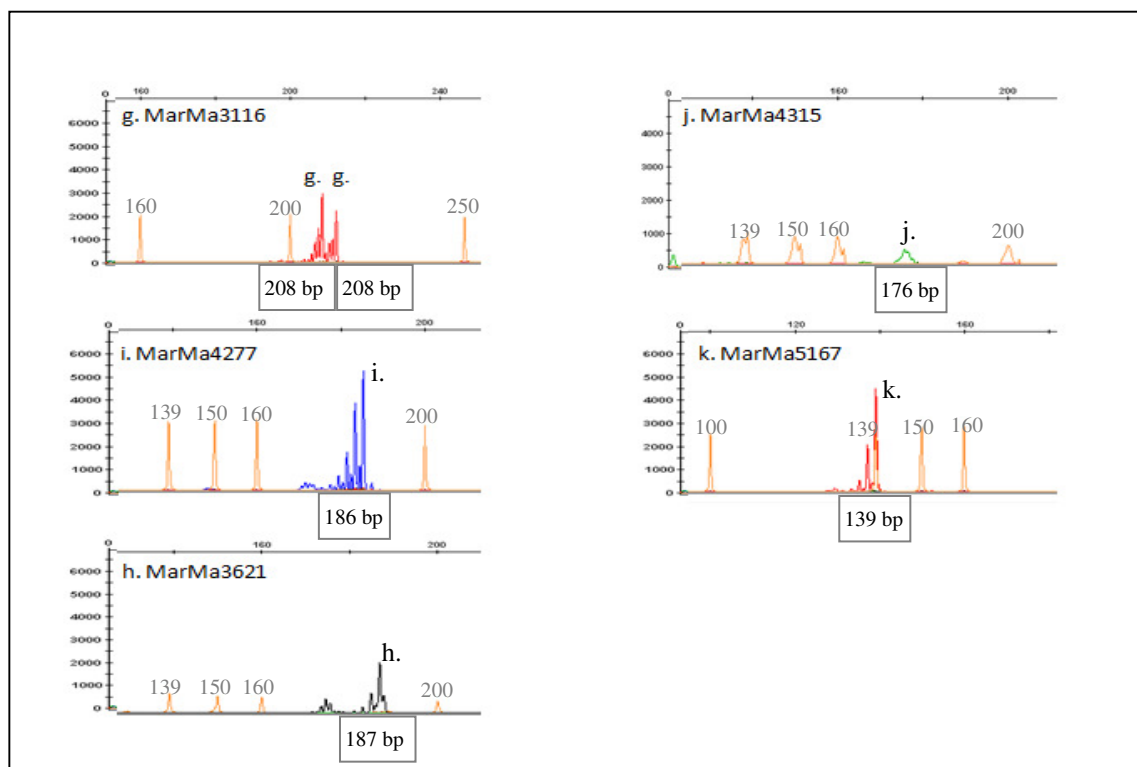


Figur 5. Utviklingen av multipleksPCR-reaksjon I bestående av markørene a. Mm2209, b. Mm2230, c. Mm2233, d. Mm2235, e. Mm2236 og f. Mm2238, ble innledet med dupleks PCR-analyse (5 A-C). I neste steg ble 4 primere analysert sammen (5 D), deretter ble et 5 primersett tilsatt reaksjonen (5 E), og i siste steg ble 6 primersett analysert sammen i en multipleks PCR-reaksjon (5 F). De oransje signalene er størrelsesstandarder. X-aksen angir størrelse (antall bp) mens Y-aksen viser intensitet. Figuren viser elektroferogram fra individ S2.

3.2 Utvikling av multipleks PCR med etablerte *M.margaritfera* markører (Multipleks II)

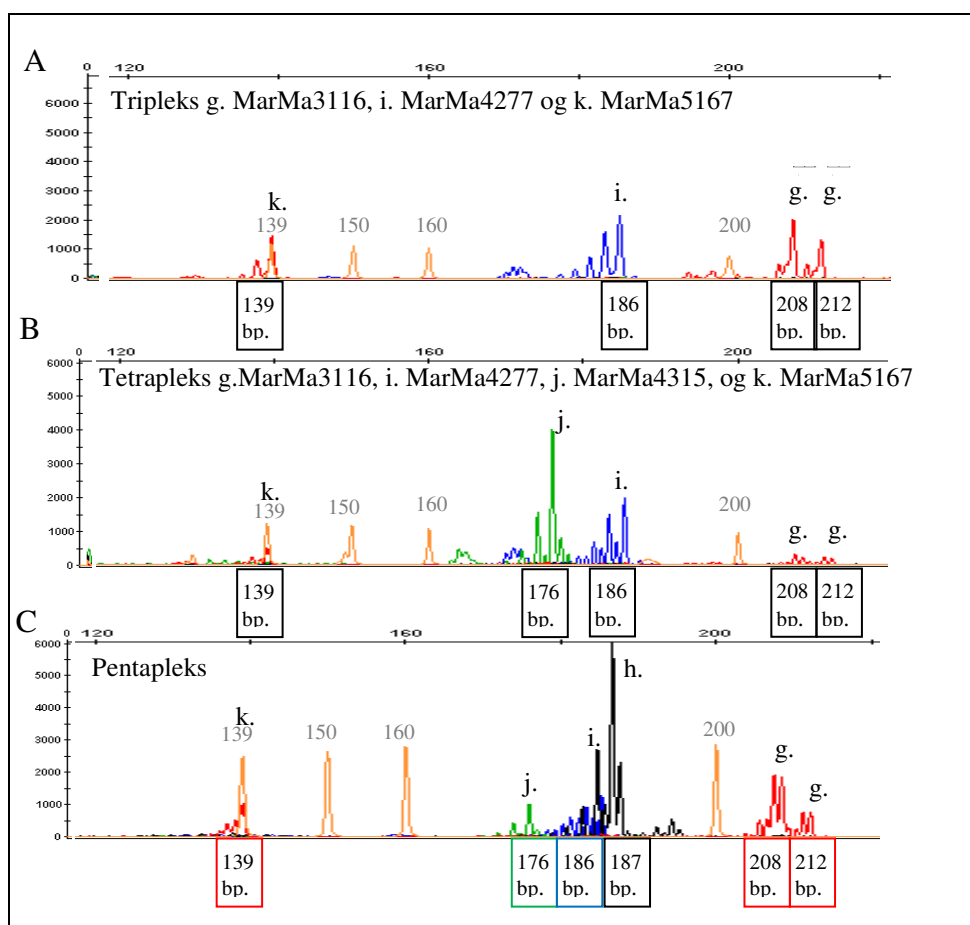
Annealingtemperatur for oppsett av multipleks PCR for primersettene *MarMa3116*, *MarMa3621*, *MarMa4277*, *MarMa4315* og *MarMa5167* (Geist et al., 2003) ble bestemt til 55 °C etter gradientanalyse (Data ikke vist). *MarMa4143* ble forkastet fra videre testing på grunn av lav PCR-amplifisering sett over hele gradienten (data ikke vist). Primersettene ble benyttet i simpleks PCR-reaksjoner på 6 individer fra 2 elver for å undersøke om PCR-produkter av forventet lengde ble amplifisert. Resultatet av standard agarose gelelektroforese viste at alle 5 markører ga spesifikke PCR-produkt ved forventet lengde (Appendiks B).

Utvikling av multipleks PCR for etablerte markører ble innledet med å analysere 7 ulike individer i simpleks PCR-reaksjoner ved kappelær gelelektroforese. Resultatene av simpleks PCR-analysene for et vilkårlig individ (S2) er vist i figur 6. I hver simpleks PCR ble det amplifisert primerspesifikke PCR-produkt ved hvert loci.



Figur 6. Utvikling av multipleks PCR-reaksjon II ble innledet ved simpleks PCR for hvert av primersettene. g.*MarMa3116*, h.*MarMa3621*, i.*MarMa427*, j.*MarMa4315* og k.*MarMa5167*. De oransje toppene er størrelses-standarer. X-aksen angir størrelse (antall bp) mens Y-aksen viser intensitet. Elektroferogrammene viser fra analyser på individ S2.

I neste trinn ble 3 primersett benyttet i en og samme PCR-reaksjon, og de samme 7 individer ble analysert. Resultat for tripleks PCR for et vilkårlig individ (S2) er vist i Figur 7A. Resultatet fra analysen viste lokus-spesifikk amplifisering av PCR-produkter av samme størrelse som på simpleks PCR-analysen. Primerkonsentrasjonen ble justert for å få en mest mulig lik signalintensitet. Denne prosedyren ble fulgt til det var bygd opp en multipleks reaksjon med 5 ulike primere i en og samme reaksjon (Figur 7 A-C).



Figur 7. Utvikling av multipleks PCR-reaksjon for etablerte markører. Tre forskjellige primersett ble analysert i samme PCR-reaksjon (7 A), i neste trinn ble et fjerde primersett satt til reaksjonen (7 B) og i siste trinn ble 5 primersett analysert i samme PCR-reaksjon (7 C). De forskjellige markørene er merket med bokstaver: g. MarMa3116, h. MarMa3621, i. MarMa427, j. MarMa4315 og k. MarMa5167. De oransje toppene er størrelses-standarer. X-aksen angir størrelse (antall bp) mens Y-aksen viser intensitet. Figuren viser analyse på individ S2.

3.3 Optimalisering av 2 multipleks reaksjoner

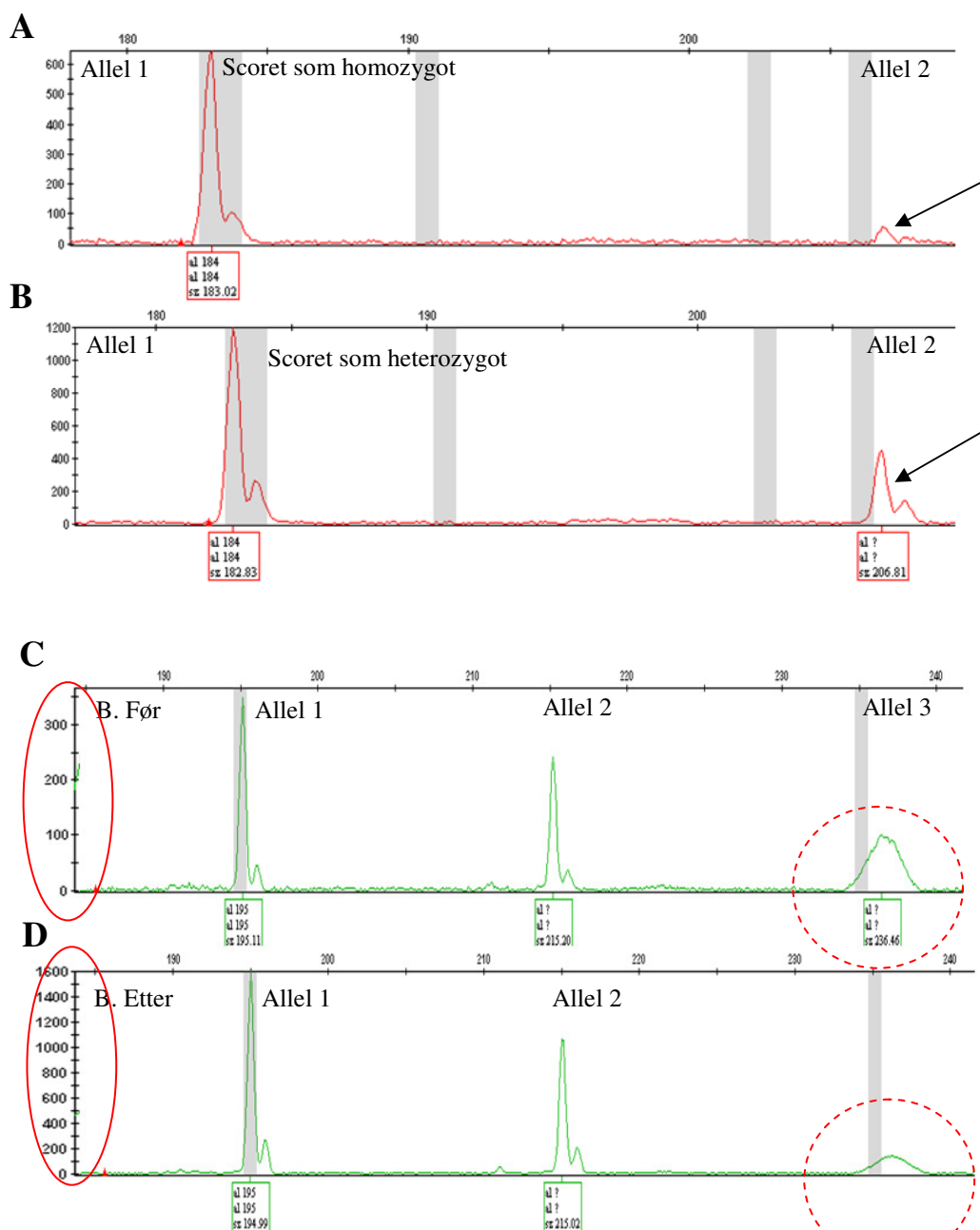
Multipleks PCR-reaksjon I og II ble optimalisert ved å teste ut ulike kombinasjoner av $MgCl_2$ -, og primerkonsentrasjon samt ulike enheter av DNA-polymerase. PCR-betingelser ble også optimalisert ved å variere lengden av primerhybridisering og DNA-syntese. Hensikten med optimaliseringen var å oppnå mest mulig lik PCR-amplifisering fra de ulike loci, samt minst mulig uspesifikk amplifisering.

Optimalisert PCR-reaksjon for reaksjon I (6-pleks) var 10 - 100 ng genomisk DNA, i et totalvolum på 10 μ l bestående av 1 x Amplitaq Gold PCR-buffer, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM av hver dNTPs, 0,1 - 0,3 μ M forward og revers primere (Tabell 7) og 0,025U Amplitaq Gold DNA-polymerase (ABI). For multipleks II (5-pleks) resulterte optimaliseringen i en 10 μ l PCR-reaksjon bestående av genomisk DNA (10 - 100 ng), 1 x Amplitaq Gold PCR-buffer, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM av hver dNTPs, 0,1 - 0,2 μ M forward og revers primere (Tabell 7) og 0,025U Amplitac Gold DNA-polymerase (ABI).

Tabell 7. Navn på markør, fluorescense-merking, Annealing-temperatur, primerkonsentrasjon og $MgCl_2$ -konsentrasjon for 2 multipleks PCR-reaksjoner utviklet i dette studiet.

Locus	Farge	T _a °C	Primer kons. μ M	$MgCl_2$
6 - plex				
<i>Mm2209</i>	PET	55	0,30	1,5
<i>Mm2230</i>	6FAM	55	0,15	1,5
<i>Mm2233</i>	PET	55	0,12	1,5
<i>Mm2235</i>	VIC	55	0,15	1,5
<i>Mm2236</i>	NED	55	0,10	1,5
<i>Mm2238</i>	6FAM	55	0,20	1,5
5 - plex				
<i>MarMa3116</i>	PET	55	0,15	2,5
<i>MarMa3621</i>	NED	55	0,10	2,5
<i>MarMa4277</i>	6FAM	55	0,10	2,5
<i>MarMa4315</i>	VIC	55	0,12	2,5
<i>MarMa5167</i>	PET	55	0,20	2,5

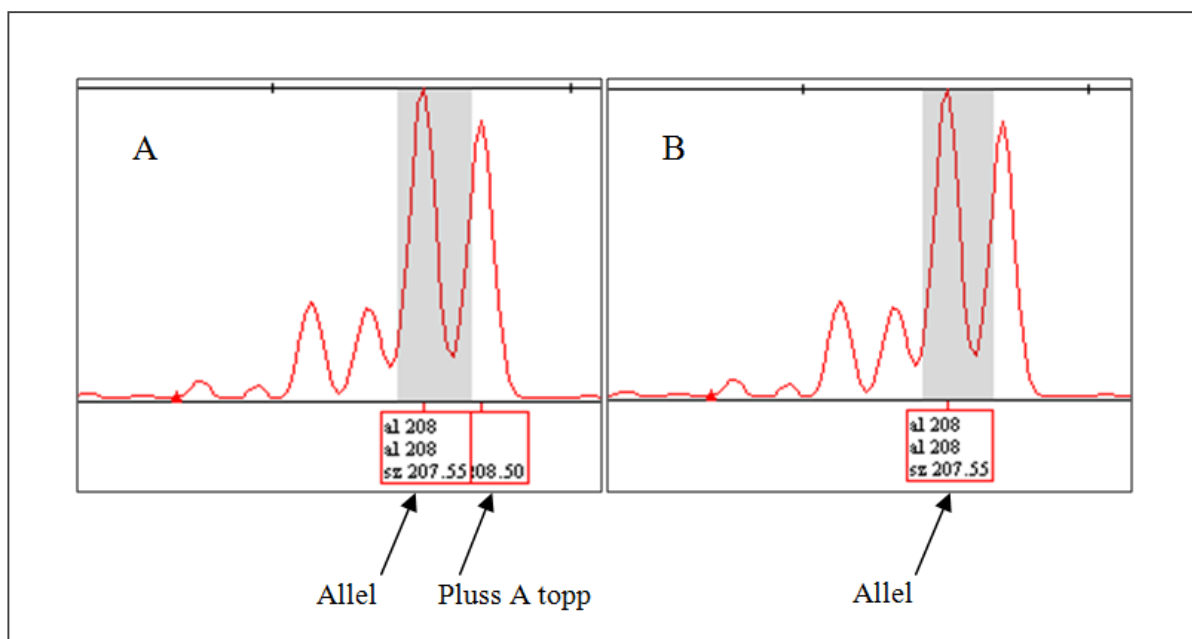
Optimalisert PCR-betingelser for begge multipleks reaksjoner var et innledende aktiveringssteg på 95°C i 10 min, deretter 35 sykler med denaturering ved 94°C i 30 sek., annealing ved 55°C i 90 sek., og syntese ved 72°C i 1 min. PCR ble avsluttet med et forlenget syntesesteg på 72°C i 15 min. Annealing steget ble økt fra 30 til 90 sek. for å øke signal intensiteten. Resultatet av dette var høyere signaltopper og mindre ”artifakke” signaler. Et eksempel på et optimaliseringsresultat er vist i Figur 8 A-D. Problemer med lave signaltopper gjorde at individer som var heterozygote ble scoret som homozygot, siden allel 2 (det lengste (bp) allelet) ikke ble detektert av den automatiske allelscoringen (Figur 8A). Ved å øke tiden på syntesetrinnet fra 30 til 90 sekunder, økte signalintensiteten for allel 2 betydelig (fra 100 til 400). Dette gjorde at avstanden i forholdstallet mellom de to allelene ble mindre og allel 2 ble scoret som allel (Figur 8B). Et annet problem var ”artifakke” signal som noen ganger ble scoret som allel (Figur 8C). Ved å øke tiden på syntesetrinnet fra 30 til 90 sekunder øket signalintensitet slik at kun de reelle allelene ble detektert og scoret som allel. Hva som var reelt allel ble vurdert ut i fra formen på mikrosatellitt-allelene, som kjennetegnes ved en spesifikk form på toppen (Figur 8D).



Figur 8. Optimalisering av PCR-betingelser ga høyere signalintensitet og mer presis allelscoring. X - akse angir størrelse (antall bp) mens Y-aksen viser intensitet. A: Før. Individet blir scoret som homozygot og bare ett allel blir detektert. B: Etter. Optimalisering førte til at intensiteten på signalthøyden økte slik forholdstallet mellom de to allelene minket, og begge ble scoret som allel (svart pil). C: Før optimalisering. "Artifakke" signaler gir problemer med allelscoring. D: Etter optimalisering. Signalintensitet på reelle alleler økte betydelig (vist ved intensitets-skala, rød heltrukket ring) og førte til at "artifakke" topper (rød stiplet linje) ikke ble detektert som allel. Figuren viser optimaliseringsresultat på individ 4 fra Fallselven, på locus Mm2209 (A-B) og Mm2235 (C-D).

3.3.1 Optimalisering av allelscoring i GeneMapper

Optimalisering av sensitivitets parametre i GeneMapper ble endret for å redusere problemer med pluss A toppen (Fishback et al., 1999) (polymerasen legger til en ekstra A på enden av PCR-produktet). For markør *MarMa3116* og *MarMa5167* var det før optimalisering problemer med at GeneMapper-programmet scoret pluss A toppen som allel, selv om disse bare var 1 bp lengre enn det "ekte" allelet. Optimaliseringen bestod i å redusere sensitiviteten ved å øke innstilling for window size fra 15 (default) til 19. Et eksempel på et resultat er vist i Figur 9. Før optimalisering ble to alleltopper detektert som allel (Figur 9A), mens etter optimalisering var sensitiviteten redusert og kun ett allel ble detektert (Figur 9B). Resultatet av dette var mer presis allelscoring og 71 % mindre manuell korrigering i etterkant av analysen i GeneMapper (Appendiks).



Figur 9. Optimalisering av allelscoring på loci *MarMa3116* på individ 3 fra Leira, som ble utført i GeneMapper for å redusere problem med feilscoreing grunnet pluss A addering. Dette ble gjort ved å redusere sensitiviteten, ved å øke innstilling for window size fra 15 (default) (Bilde A), til 19 (Bilde B). Etter endring scoret dataprogrammet kun den ene toppen som et allel.

3.4 Genetisk variasjon og karakterisering av loci

3.4.1 Allelantall og allelrekkevidde

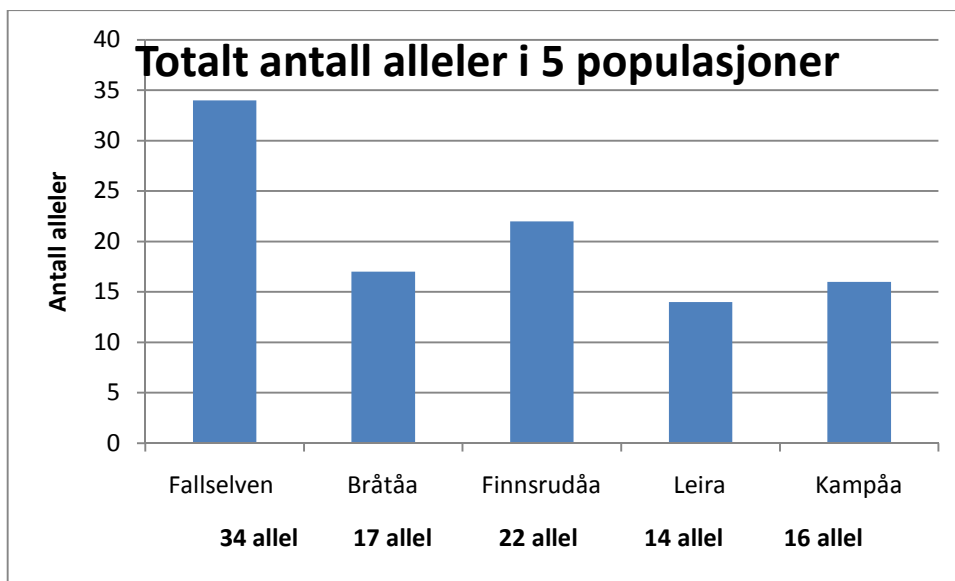
Totalt 132 individer fra 5 elver ble genotypet ved 11 mikrosatellittloci. Genotypingen var vellykket for 123 (93 %) prøver for markører fra multipleks I, utenom for loci *Mm2235* hvor 85 % var vellykket (Appendiks C). For multipleks II var genotypingen vellykket for 118 (89 %) av prøvene, utenom for loci *MarMa5167*, hvor bare 78 % var vellykket. Antall alleler og allelrekkevidden for de forskjellige loci er vist i tabell 8. Resultatet viser at det laveste antallet alleler ble observert ved locus *Mm2233* og *Mm2238* (2 allel hver), mens høyest observerte allelantall ble funnet ved locus *MarMa3621* og *MarMa4277* (7 allel hver). Gjennomsnittlig antall alleler over alle 11 mikrosatellittmarkører var 4,5 allel / locus. Lavest allelrekkevidde ble observert for locus *Mm2233* og *Mm2238* (3 bp.). Locus *Mm2235*, *Mm2236*, og *MarMa3621* hadde alle allelrekkevidde over 40 bp (Tabell 8).

Tabell 8. Allelrekkevidde (bp) og allelantall observert for 11 mikrosatellittloci for 5 *M.margaritifera* populasjoner.

Locus	Allel -rekkevidde (bp)	Totalt antall alleler observert i 5 populasjoner
<i>Mm2209</i>	183-211	4
<i>Mm2230</i>	238 - 246	3
<i>Mm2233</i>	162 - 165	2
<i>Mm2235</i>	195 - 239	6
<i>Mm2236</i>	183 - 223	3
<i>Mm2238</i>	118 - 121	2
<i>MarMa3116</i>	178 – 216 (206 - 250*)	6
<i>MarMa3621</i>	171 – 216 (173 – 201*)	7
<i>MarMa4277</i>	176 – 192 (176 – 196*)	7
<i>MarMa4315</i>	174 – 188 (174 – 220*)	5
<i>MarMa5167</i>	127 – 141 (126 – 142*)	5

*allelstørrelse observert i studier fra 5 sentraleuropeiske elver (Geist and Kuehn, 2005).

Totalt antall alleler observert i de 5 populasjoner er vist i figur 10. Fallselven har høyest antall alleler (34 stk.) fra analyse av 7 individer, fra Finsrudåa ble det observert 22 allel fra analyse av 34 individer, fra Bråtaåa 17 allel ved analyse på 24 individer, for Kampåa 16 allel ved analyse på 31 individer, mens det laveste allelantallet ble observert for Leira (14 stk.) ved analyse på 36 individer (Figur 10).



Figur 10. Antall alleler funnet på 11 forskjellige loci i elvene Fallselven, Bråtaåa, Finsrudåa, Leira og Kampåa.

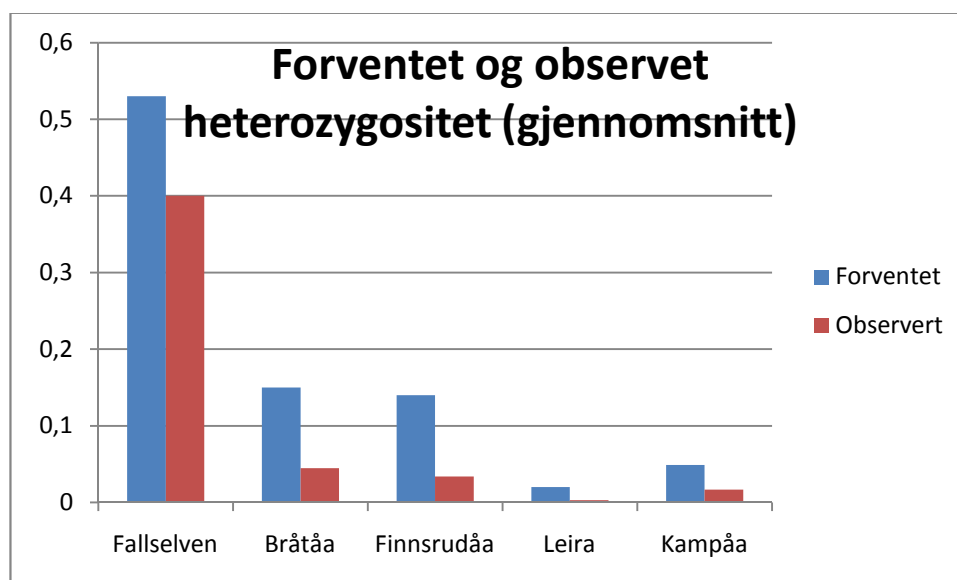
3.4.2 Test av koblingslikevekt

Pavis test for koblingslikevekt mellom de forskjellige loci ble undersøkt i hver populasjon (elv) ved GenePop, og viste for Fallselven at alle 11 loci var i koblingslikevekt (data ikke vist). For de 4 andre elvene ga denne testen ingen svar på koblingslikevekt mellom loci da resultatet viste "ikke tilgjengelig data" (data ikke vist). Dette skyldes for lav allelrikdom for de forskjellige loci i disse populasjonene (Tabell 9).

3.4.3 Genetisk variasjon innad i populasjonene

Beregnet forventet og observert heterozygositet (H_e/H_o) for hver populasjon over alle loci er vist i Figur 11. Forventet heterozygositet (H_e) for Fallselven var i gjennomsnitt 0,53 (0,28 – 0,71) mens observert var i gjennomsnitt 0,40 (0 – 0,86). For populasjonen Bråtaåa og Finsrudåa var gjennomsnittet på forventet heterozygositet henholdsvis 0,15 og 0,14 (0 –

0,65), og observert var på 0,045 og 0,034 (0 – 0,17) i gjennomsnitt. For Leira og Kampåa var gjennomsnittlig forventet heterozygositet på 0,02 og 0,05 (0 – 0,38) mens observert var på 0,003 og 0,017 (0 – 0,15) i gjennomsnitt (Figur 11). Signifikante avvik fra Hardy-Weinberg likevekten (H-W likevekt), det vil si avvik mellom forventet (H_e) og observert (H_o) homozygositet, ble observert i 14 av 55 tilfeller (Tabell 9). For Fallselven var avvik fra H-W likevekten signifikant ($P < 0,05$) for to av elleve loci, for Bråtåa og Finsrudåa for 4 av 11 loci, og for Leira og Kampåa for 2 av 11 loci (Tabell 9). Undersøkelser av selfing-estimerer for de forskjellige populasjoner var 0,4 for Fallselven, 0,81 for Bråtåa, 0,85 for Finsrudåa, 0,94 for Leira og 0,84 for Kampåa (Tabell 9).



Figur 11. Gjennomsnittlig forventet (H_e) og observert (H_o) heterozygositet observert i 5 undersøkte populasjoner. De blå søylene viser forventet (H_e) og de røde observert (H_o) heterozygot frekvens.

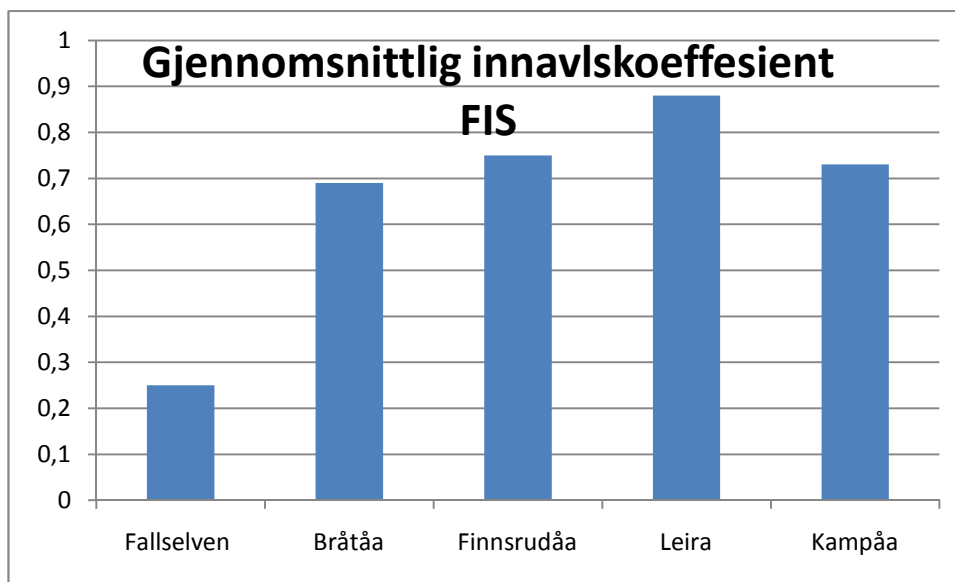
Tabell 9 Sammendrag av statistikk for 11 polymorfiske mikrosatellitt locus analysert i 5 populasjoner av elvemusling i Norge.

LOCUS		FA	BR	FI	LE	KA
Mm2209	N	7	24	34	36	31
	A	4	1	1	1	1
	H_e	0,57	0	0	0	0
	H_o	0,43	0	0	0	0
	H-W	is	id	id	id	id
Mm2230	F_{IS}	0,26	id	id	id	id
	A	2	2	3	2	1
	H_e	0,53	0,5	0,13	0,03	0
	H_o	0	0,2	0,04	0,03	0
	H-W	*	**	*	id	id
F_{IS}	1	0,61	0,66	id	id	

<i>Mm2233</i>	A	2	1	1	1	1
	He	0,5	0	0	0	0
	Ho	0,43	0	0	0	0
	H-W	is	id	id	id	id
	F _{IS}	0,14	id	id	id	id
<i>Mm2235</i>	A	4	1	2	1	1
	He	0,71	0	0,04	0	0
	Ho	0,86	0	0,04	0	0
	H-W	Is	id	id	id	id
	F _{IS}	-0,24	id	id	id	id
<i>Mm2236</i>	A	3	1	1	1	1
	He	0,28	0	0	0	0
	Ho	0,28	0	0	0	0
	H-W	is	id	id	id	id
	F _{IS}	-0,04	id	id	id	id
<i>Mm2238</i>	A	2	1	1	1	1
	He	0,43	0	0	0	0
	Ho	0,29	0	0	0	0
	H-W	is	id	id	id	id
	F _{IS}	0,33	id	id	id	id
<i>MarMa3116</i>	A	3	1	2	1	1
	He	0,5	0	0,39	0	0
	Ho	0,43	0	0,17	0	0
	H-W	is	id	*	id	id
	F _{IS}	0,17	id	0,56	id	id
<i>MarMa3621</i>	A	3	2	4	1	2
	He	0,57	0,48	0,65	0	0,08
	Ho	0,57	0,15	0,04	0	0
	H-W	Is	**	***	Id	*
	F _{IS}	0	0,69	0,93	id	1
<i>MarMa4277</i>	A	5	4	2	2	3
	He	0,64	0,53	0,04	0,18	0,38
	Ho	0,57	0,15	0,04	0	0,15
	H-W	is	***	id	***	**
	F _{IS}	0,11	0,72	id	1	0,76
<i>MarMa4315</i>	A	3	1	2	1	2
	He	0,61	0	0,04	0	0,04
	Ho	0,43	0	0,04	0	0,04
	H-W	is	id	id	id	id
	F _{IS}	0,32	id	id	id	id
<i>MarMa5167</i>	A	3	2	3	2	2
	He	0,5	0,1	0,24	0,06	0,04
	Ho	0,14	0	0	0	0,04
	H-W	*	*	***	*	id
	F _{IS}	0,74	1	1	1	id
Antall allel	34	17	22	14	16	
Gj. snitt antall alleler pr locus	3,0	1,5	2,0	1,3	1,5	
Gj.snitt F _{IS}	0,25	0,69	0,75	0,88	0,73	
S	0,40	0,81	0,85	0,94	0,84	

Statistiske avvik fra H-W forventninger (H₀ = tilfeldig fordeling av gameter) er indikert ved *(p<0.05); ***(p<0.001) og ***(p<0.001) Antall individer testet (N), allelnummer (A), forventet (He) og observert (Ho), heterozygositet og F_{IS}verdi for testing av HWE fra populasjoner av elvemusling i Fallselven (FA), Bråtaåa (BR), Finsrudåa (FI), Leira (LE) og Kampåa (KA), ikke signifikant (is). For hver populasjon er gjennomsnittlig F_{IS} og estimat av selfing-rate (S) vist nederst, ikke detekterbar (id)

Gjennomsnittlige verdier for innavlskoeffisienten (F_{IS}) for de forskjellige populasjoner er vist i Figur 12. F_{IS} for Fallselven var i gjennomsnitt 0,25, mens for populasjonene i de andre 4 elvene viste resultatene av analysene gjennomsnittlig F_{IS} verdi på 0,69 for Bråtåa, 0,75 for Finsrudåa, 0,88 for Leira og 0,73 for Kampåa.



Figur 12 Gjennomsnittlig innavlskoeffisient (F_{IS}) beregnet for 11 loci i 5 populasjoner viser lave verdier for Fallselven (F_{IS} 0,25), noe som tyder tilfeldig parring. For de andre elvene er F_{IS} verdiene høye og tyder på stor grad av innavl, med minst variasjon i Leira (F_{IS} 0,88).

3.4.4 Genetisk variasjon mellom populasjoner

Analyse av parvis genetisk distanse (F_{ST}) mellom populasjonene i de 5 elvene viste at individer testet fra Fallselven var svært genetisk ulike de andre 4 populasjonene (F_{ST} fra 0,62 – 0,80), mens testede individer fra Kampåa og Leira var genetisk svært like (F_{ST} 0,01) (Tabell 10). Individer testet fra populasjoner i Finsrudåa og Bråtåa var mer genetisk like enn individer i de andre populasjonene (F_{ST} 0,32). Den genetiske variasjonen mellom populasjonene var statistisk signifikant ($P < 0,05$) (Fisher's metode) for alle populasjoner utenom for Leira og Kampåa ($P = 0,37$).

*Tabell 10 Parvis genetisk distanse (F_{ST}) beregnet for de 5 undersøkte populasjonene ved 11 loci. *: $P < 0,01$.*

Populasjon	Fallselven	Bråtaåa	Finsrudåa	Leira
Bråtaåa	0,62 *	0		
Finsrudåa	0,65 *	0,32 *	0	
Leira	0,80 *	0,53 *	0,45 *	0
Kampåa	0,74 *	0,44 *	0,38 *	0,01

4. Diskusjon

4.1 Mikrosatellittisolasjon

Av 13 mikrosatellittmarkører utviklet for populasjonsgenetiske studier av elvemusling (*Margaritifera m.*) i et tysk studie (Geist et al., 2003), ga bare 6 tilfredsstillende amplifiseringsresultater ved et populasjonsstudie i Sverige (Arvidsson, 2007). Det var derfor ønskelig å utvikle flere polymorfe mikrosatellittmarkører til populasjonsgenetiske studier av elvemusling i Norge, i tillegg til å teste ut de 6 som ga tilfredsstillende resultater fra det svenske studiet.

Lite genomisk sekvensdata er tilgjengelig for mikrosatellitt identifisering og isolering i databasen til GenBank for arter av bivalves (Saavedra and Bachère, 2006). Det ble derfor bestemt å benytte 454-pyrosekvenserings teknikk (Droege and Hill, 2008) av genomisk DNA fra elvemusling. Våre resultater av identifisering og isolering av mikrosatellitt loci ved skanning av genomisk sekvensdata produsert ved 454-sekvensering ga mange potensielt amplifiserbare mikrosatellittmarkører. Våre funn er i samsvar med andre studier som har benyttet samme metode til identifisering av mikrosatellitt loci for populasjonsstudier i arter av blå and (Abdelkrim et al., 2009) og sommerfugl (Mikheyev et al., 2010), hvor genomisk sekvensdata ikke var tilgjengelig for disse artene. I våre studier ble det ved denne teknikken funnet flest mikrosatellittsekvenser med trinukleotid repetisjonsmønstre (69 %), mens andelen dinukleotid repetisjoner var på kun 11 %. Disse tallene er også samsvarende med resultater fra Abdelkrim et al. (2009) hvor andelen dinukleotid repetisjonsmønstre var på 32 % mot 46 % for trinukleotid repetisjonsmønstre. Disse resultatene er ikke i samsvar med studier som har benyttet laboratorietekniske metoder (Zane et al., 2002), som involverer anrikning av mikrosatellittsekvenser, kloning og sekvensering, hvor resultatet har vært isolering av loci som i hovedsak har mønstre med dinukleotid repetisjoner (Jerry et al., 2006, MacAvoy et al., 2008). I studier av mikrosatellitter i bivalves, konkluderer Cruz et al., (2005) med at dinukleotid repetisjoner er mer utbredt en tri- og tetranukleotid repetisjoner i bivalves, og således er våre resultater kontroversielle med dette. Spriket mellom disse resultatene kan skyldes forskjeller i metodene som er benyttet for å identifisere mikrosatellittsekvenser. 454-teknikken baserer seg på PCR-amplifisering før direkte

sekvensering under syntese av DNA-fragmentene (Droege and Hill, 2008). Det er kjent fra flere studier at DNA-polymerasen har en økt tendens til å ha en høyere glippe rate ved korte motiv (mono- og dinukleotid repetisjoner) sammenlignet med lengre (Kruglyak et al., 1998). 80 % av sekvensene med dinukleotid repetisjoner isolert i WebSat i vårt studie måtte forkastes grunnet mangel på flankerende side(r) (data ikke vist), mest sannsynlig som følge av brudd mellom templat og DNA-polymerase under syntese-sekvensering. I teknikken brukt ved standard metodene (Zane et al., 2002), blir potensielle mikrosatellitt-fragmenter ligert inn i en vektor og blir flerfoldiggjort ved kloning, før sekvensering ved Sanger metoden (1977). Sanger sekvensering baserer seg på å separere fragmenter etter størrelse ved elektroforese og detektere baserekkefølgen på templatet ved fluorescensemerkede kjedestoppende dideoksynukleotider (ddNTP) i enden på templat-kjeden. Hvis polymerasen hopper av under sekvenserings PCR vil ikke DNA-fragmentet få tilsatt noen ddNTP i enden, og vil ikke bli detektert. Det lave antallet med dinukleotid repetisjoner isolert i vårt studie utgjorde ikke noe problem siden vi i utgangspunktet ikke ønsket å utvikle markører med dinukleotid repetisjoner grunnet utbredte problemer med "stuttere" forbundet med disse, hvilket kan gi opphav til problemer med automatiske allelscoringen (Fishback et al., 1999, Chambers and MacAvoy, 2000, Liu and Cordes, 2004, Jerry et al., 2006, Lerceteau-Köhler and Weiss, 2006, Porta et al., 2006).

Nedre grense for antall repetisjoner i dette studiet ble satt til ni etterfølgende repetisjoner siden studier viser at mikrosatellitter med mange etterfølgende repetisjoner er mer polymorfe (Liu and Cordes, 2004). Fordelene ved 454-metoden er muligheten til å få isolert lengre mikrosatellittsekvenser, som potensielt er mer polymorfe (på grunn av flere etterfølgende repetisjoner), enn ved standard metoden hvor det er størrelsesbegrensninger på grunn av bakterie kloning (Zane et al., 2002).

Ved utvikling av mikrosatellittmarkører er det anbefalt å velge loci som har perfekt, eller nær perfekt repetisjonsmønster siden disse har mer sannsynlighet for å følge en stegvis mutasjonsmodell (SMM), og inneha større grad av polymorfi (Jarne and Lagoda, 1996). Våre resultater fra 454-genomsekvens data ga, med få unntak, mikrosatellittmarkører med perfekt repetisjonsmønster (Tabell 4). Disse resultatene er sammenfallende med andre studier som har benyttet samme teknikken til å identifisere og isolere mikrosatellittmarkører (Abdelkrim et al., 2009, Santana et al., 2009, Mikheyev et al., 2010, Takundwa et al., 2010),

hvor de i hovedsak har funnet mikrosatellittmarkører med perfekte mønstre. De fleste publiserte studier som baserer mikrosatellittmarkør identifiseringen på standard metoden har isolert markører med større eller mindre grad av uperfekthet innen aquatiske arter som elvemusling (*Margaritifera m.*) (Geist et al., 2003), grønnskjell-muslinger (*Perna canaliculus*) (MacAvoy et al., 2008), brunørret (*Salmon trutta*) (Lerceteau-Köhler and Weiss, 2006) og Ezo abalone (Sekino et al., 2005). Resultatene fra våre studier (og andre som har benyttet samme teknikk) tyder på at man har større sannsynlighet for å utvikle markører med perfekte eller nær perfekte repetisjonsmønstre, ved å skanne sekvensdata med dataprogrammer designet til å finne perfekte eller nær perfekte mønstre, enn ved standard metoden.

Ved bruk av dataprogrammet WebSat (Martins, 2009), fikk vi identifisert sekvenser med mikrosatellitt repetisjoner fra genomisk 454-sekvensdata. WebSat er et webbasert program som ikke krever tid til ressurskonsumerende software installasjoner. Men siden programmet er webbasert er det begrensninger på opplastingskapasiteten, og dette gjorde at vi måtte bruke tid på å dele input filene med genomsekvens-data opp i mindre filer for ikke å overstige behandlingskapasiteten i programmet. Andre studier som har identifisert mikrosatellittsekvenser fra 454-genomsekvens data har benyttet programmer som er stasjonære og krever nedlasting og installasjon av dataprogrammet (Thurston, 2005, Faircloth, 2008). Et slikt gratisprogram brukt er MsatFinder (Thurston, 2005) hvor det er mulig å laste inn alt 454-sekvensdata i en stor fil (Santana et al., 2009). Begge de to nevnte programmer finner mikrosatellitter med perfekte repetisjonsmønstre (Merkel and Gemmell, 2008), mens programmet MsatFinder tilbyr utenom default settinger tre søkernivåer, en basisk, en intermediat og en avansert med økende mengde av parameter fleksibilitet (Thurston, 2005) hvor man kan velge å finne repetisjonsmønstre som er nær perfekt. Når det primære målet er deteksjon av mikrosatellittsekvenser for primer design, vil et program som finner perfekt repetisjonsmønstre være å foretrekke siden disse har vist seg å være mest egnet til populasjonsstudier (Merkel and Gemmell, 2008).

4.2 Utvikling av 2 multipleks PCR reaksjoner

Ved utvikling av multipleks PCR oppsett, er det viktig at de ulike primersettene i PCR-oppsettet fungerer optimalt ved omtrentlig den samme annealingtemperaturen. Med optimal menes at temperaturen er høy nok til å minimere uspesifikk hybridisering, og lav nok til at ikke noen alleler tapes (Edwards and Gibbs, 1994). Resultater fra genotypings PCR viser at den valgte annealingtemperatur, bestemt ved gradient PCR, gir spesifikke alleler sett ved alle loci, uten tap av alleler eller uspesifikk hybridisering (Figur 5, Figur 6 og Figur 7). Primersett designet til mikrosatellittlociene ble verifisert ved kloning og sekvensering. Sekvenseringsresultater viser forventet mikrosatellittmønstre, forward og revers primerbindings-seter, utenom for 3 markører (*Mm2211*, *Mm2218* og *Mm2219*), som dermed ble forkastet fra videre testing. Årsaken til at det forventede PCR-produkt ikke ble amplifisert i disse tre kan skyldes at primersettene designet til disse lociene ikke var målspesifikke nok. Re-design av primersett på mer konserverte områder er benyttet i andre studier hvor primerene har vist seg å ikke være målspesifikke nok (Reece et al., 2004, MacAvoy et al., 2008).

Et mikrosatellittlocus sin evne til å skille individer fra hverandre i en populasjon er høyt korrelert med det alleliske mangfoldet for locuset (Estoup et al., 1998). Siden merking med fluorescence er kostbart var det ønskelig å undersøke om markørene var polymorfe før bestilling av merkede primere. Bruk av agarose gelelektroforese er beskrevet i tidligere studier for å se etter grad av polymorfi for mikrosatellitt loci (Porta et al., 2006). Denne metoden ble også benyttet i våres studie, men feilet å gi noe tydelig svar på allel-diversitet, utenom for loci *Mm2209* og *Mm2236* (Appendiks B). Grunnen til at metoden feilet er mest trolig på grunn av at individene vi benyttet til undersøkelsen var genetisk veldig like, sett senere ved genotypingsresultatene. Ved utvikling av flere markører bør grad av polymorfi undersøkes fra en gruppe individer som fra genotypingsresultater har vist stor genetisk variasjon ved allerede etablerte mikrosatellittmarkører, slik at det er mer sannsynlig for å se større allel-diversitet ved lociet. En annen metode er å benytte polyacrylamid gelelektroforese, som gir bedre oppløsning.

Nylig testet Arvidsson m.fl (2007) ut 13 publiserte mikrosatellittmarkører (Geist et al., 2003) for genotyping av *M. margaritifera* -individer i Sverige, og kun 6 av disse ga tilfredsstillende

amplifiseringsresultater, og ble inkludert i det svenske studiet (Arvidsson, 2007). Disse 6 markørene (*MarMa3116*, *MarMa3621*, *MarMa4143*, *MarMa4277*, *MarMa4315* og *MarMa5167*) ble derfor valgt ut og testet i våres studie. En av disse (*MarMa4143*) ble ikke inkludert i det endelige multipleks oppsettet grunnet lav amplifisering. Resultatene fra vårt og Arvidsson (2007) demonstrerer begrensninger som kan oppstå med å bruke publiserte mikrosatellittmarkører på populasjoner som er skilt over store geografiske områder, siden prosentandelen amplifiserbare loci med et gitt primersett kan reduseres når populasjoner har vært skilt over lang tid (Jarne and Lagoda, 1996).

De undersøkte mikrosatellittmarkørene ble satt sammen i 2 multipleks reaksjoner bestående av 6 nyutviklede mikrosatellittmarkører og 5 etablerte (Geist et al., 2003). Reaksjonene er utviklet basert på allelstørrelse og valg av primersett som hadde gitt høy score ved primerdesign. 2 av de nye primersettene (*Mm2239* og *Mm2240*) ble utelatt fra reaksjonene på grunn av problemer med å oppnå samme signalintensitet som de andre primersettene, selv ved optimaliseringsforsøk. Optimalisering av PCR-reaksjon og PCR-protokoll gjør at de forskjellige mikrosatellittmarkører i reaksjon I etter optimalisering gir tydelige, spesifikke signaler med korrekt allelscoring som minker behovet for manuell korrigerings (Figur 5). Problemer med allelscoring grunnet "artifakke" topper ble eliminert ved optimalisering av PCR-protokollen. Våre resultater viser at økt annealingstid (fra 30 til 90 sek) og forlenget slutt-syntesesteg (fra 5 til 15 min) gir signaler opp i mot 4 gangers intensitet (Figur 8). For multipleks reaksjon II (etablerte markører) var problemer med pluss-A topper som ble scoret som allel et utbredt problem for markørene *MarMa3116* og *MarMa5167*. Andre studier har redusert dette problemet ved optimalisering av PCR-reaksjonen ved reduksjon av primerkonsentrasjonen og økt konsentrasjon av DNA-polymerase, og forlenget syntesesteg (Fishback et al., 1999, Porta et al., 2006). Vi optimaliserte ikke PCR-reagenser for å redusere dette problemet, men fikk redusert 71 % av feilscoringene ved endring av sensitivitetsparametre i GeneMapper (Figur 9/Appendix D). En kombinasjon av spesifikk optimalisering av PCR-reagenser og sykler, samt redusert sensitivitet i GeneMapper vil trolig redusere problemer ytterligere. Utvikling, testing og optimalisering av multipleks PCR for genotyping er tidkrevende arbeid, men kostnadene og tiden man sparer gjør innsatsen til en god investering (Lerceteau-Köhler and Weiss, 2006).

Genotyping av elvemusling ved multipleks PCR-reaksjon er tidligere beskrevet (Arvidsson, 2007), med multipleks reaksjonen med 2 og 4 primersett i hver reaksjon. For studier på elvemusling i Sentral-Europa (Geist and Kuehn, 2005) og Spania (Bouza, 2006) ble alle prøvene analysert ved simpleks PCR-reaksjoner. Dette studiet demonstrerer at selv om man må være nøye av valg av locus og PCR-optimalisering så er det å utvikle multipleks PCR-oppsett for raskere genotyping av elvemusling, bestående av 11 loci, på henholdsvis 5 og 6 primersett, oppnåelig.

4.2.1 Evaluering av mikrosatellittmarkører for populasjonsstudier

Ved utvikling av mikrosatellittmarkører til populasjonsgenetiske studier er det flere grunnleggende tester som bør utføres før man inkluderer markørene i analyser. Markøren bør testes for selektivt nøytralitet, ikke være kandidat for null allel, score nøyaktig ved genotyping, og ikke være kandidat for homoplasy (Selkoe and Toonen, 2006). Inkludering av loci i analyser som bryter med noen av disse forutsetningene, kan føre til ukorrekte og skjeve genetiske estimater. Med bakgrunn i dette har det blitt gjennomført en evaluering av mikrosatellittmarkørene utviklet i dette studiet ved å benytte markørene i analysere av 132 individer fra 5 populasjoner.

Analyse for koblingslikevekt mellom mikrosatellittloci i Fallselven viste at alle lociene var i koblingslikevekt, men siden analysen bare ble utført på 7 individer er ikke dette resultatet statistisk robust nok til å ta en konklusjon ut i fra disse resultatene. Analyse mellom loci i de 4 andre populasjonene (Bråtaåa, Finsrudåa, Leira og Kampåa) ga ikke noe resultat av analysen. Dette skyldes at de fleste loci er fiksert for ett allel i populasjonene (Tabell 9).

Det er i tidligere studier av marine muslinger rapportert om høy andel av null allel. Null allel er alleler som ikke amplifiseres i en PCR, enten på grunn av at PCR-forholdene ikke er optimale eller at primer bindingssetet inneholder mutasjoner som fører til mindre effektiv hybridisering mellom templat og primer. I muslingarter som Stillehavs-østers (Hedgecock et al., 2004) ble det rapportert at 51 % av de undersøkte loci var påvirket av null allel, og for Stillehavs-øreskjell (*Haliotis*) ble dette problemet observert til å være på hele 71 % (Li et al., 2003). Andel null allel er mindre frekvent hos andre arter, som for regnbueørret, hvor det er observert å være på 16 % (Ardren et al., 1999) og 25 % for mennesker (Callen et al., 1993). Resultatene fra analyser på genotypingsdata fra Fallselven viste at ingen av lociene var

kandidater for null allel, men siden bare 7 individer ble undersøkt er ikke analysen statistisk sikker nok til å kunne konkludere at dette ikke er et tilstedeværende problem i denne populasjonen. Analysen ble ikke utført på de andre populasjonene. Dette skyldes at det ikke lyktes å konvertere datafilene i riktig format, og dataene fra Fallselven ble manuelt ført opp i riktig format i Excel. Dette ble ikke utført for de andre populasjonene, på grunn av begrensning med tid. En annen metode for å teste for null allel er foreslått av Selkoe & Toonen (2006). Null allel kan testes ved re-genotyping av individer som ikke amplifiserer noen allel ved et locus, men som amplifiserer PCR-produkt ved andre. Dersom man ved re-genotyping oppnår det samme resultat kan man konkludere med at individet er homozygot for null allel. Ved gjennomgang av alle genotypingsresultater i dette studiet feilet to av mikrosatellittloci, *Mm2235* og *MarMa5167*, i å amplifisere noe produkt ved henholdsvis 9 og 13 % av prøvene, samtidig som man oppnådde amplifisering ved de andre loci. Dette kan tyde på at det ikke er DNA kvalitet/kvantitet som er årsaken, men at disse lociene kan være kandidater for null allel. Det ble ikke gjennomført re-genotyping av disse prøvene for å se etter om man oppnådde samme resultat, grunnet begrenset med tid. En annen kilde til feil ved *Mm2235* kan være at forward primersekvens inneholder for mange etterfølgende thymin (T)-nuklotider (Tabell 4), samt at begge primersekvensene (forward og revers) har lavt G/C-innhold (41%) (data ikke vist). Dette kan føre til redusert og uspesifikk hybridisering mellom primer og målsekvens. At dette kan være feilkilden styrkes av observasjoner av at markøren (*Mm2235*) gir lavere signal-topper hos alle individer sammenlignet med de andre markørene, selv etter flere optimaliseringsforsøk (data ikke vist). Dette viser betydningen av å være nøye med primerdesign for å oppnå spesifikk amplifisering ved PCR-reaksjon. Begge disse markørene (*Mm2235* og *MarMa5167*) bør evalueres bedre for å finne kilden til feilraten, og eventuelt forkaste de hvis feilraten overstiger 1 % (Selkoe and Toonen, 2006).

15 % vilkårlige prøver ble re-genotypet for å identifisere genotypingsfeil ved multipleks oppsettet og estimere den underliggende feilraten i datasettet, som foreslått av Selkoe og Toonen (2006). Resultatet av re-genotyping av 11 loci viste ingen avvik mellom første og andre genotyping. Dette tyder på at de to multipleks PCR-reaksjonene gir pålitelige genotypingsresultater, som er reproducerbare.

Det ble ikke foretatt undersøkelser av tilstedeværelsen av homoplasy i dette studiet, på grunn av begrensninger på tid og siden det ikke er grunn til å tro at dette er et problem i vårt

genotypingsmaterieill. Dette er rapportert å være utbredt ved loci som innehar stor grad av polymorfi, hvor høy mutasjonsfrekvens gir økt sannsynlighet for dette fenomenet. Homoplasy kan bli avdekket ved å sekvensere en allel-lengde sett ved flere individer fra forskjellige populasjoner for å se etter forskjeller i sekvensen (Selkoe and Toonen, 2006). Test av selektiv nøytralitet for lociene ble heller ikke undersøkt på grunn av begrensinger med tid. Mikrosatellit-DNA kan ha en funksjonell rolle ved kromatin organisering, regulering av genaktivitet og rekombinasjon, og dermed være under seleksjon (Li et al., 2002). Mikrosatellitter kan også sitte i nærheten av et gen under seleksjon, og vil kunne opptre ikke-nøytralt på grunn av "hiking". En ofte brukt test for å undersøke nøytraliteten til et locus er Ewens-Watterson-testen, som baserer seg på at et locus som ikke er under seleksjonspress vil opptre med en frekvens som er innenfor en gitt fordeling. Svakheten med denne testen er at den bare avdekker tilfeller med sterkt avvik fra nøytralitets-fordelingen (Slatkin, 1994).

Det lyktes ikke helt i dette studiet å få gjennomført grundige tester av markørene. Dette skyldes i hovedsak at flere av lociene var fiksert for et bestemt allel i populasjonene, og begrensinger med tid førte til at markørene ikke kunne testes ut på mer genetisk varierte populasjoner.

4.3 Populasjonsgenetiske studier

Alle 11 mikrosatellitmarkører er polymorfe, med 2 – 7 alleler per locus, med et allelgjennomsnitt på 4,5 allel per locus (Tabell 8). Antall alleler innad i populasjonene er høyest for Fallselven, med 34 alleler (analysert på 7 individer), og lavest for Leira, med 14 alleler (analysert på 36 individer) (Figur 11). Den genetiske variasjonen for 4 av populasjonene, (Bråtaåa, Finsrudåa, Leira og Kampåa) er svært lav (gjennomsnittlig H_e : 0,02 – 0,15), sammenlignet med den siste populasjonen (Fallselven) (gjennomsnittlig H_e : 0,53) (Figur 10). Resultater fra genotyping viser at andel monomorfe loci i 4 av populasjonene (Bråtaåa, Finsrudåa, Leira og Kampåa) er høy, mens alle i den siste populasjonen (Fallselven) er polymorfe (Tabell 9). Fra populasjonsgenetiske studier i Spania (Bouza, 2006) og Sentral-Europa (Geist and Kuehn, 2005) er det rapportert om et høyt antall monomorfe loci i flere av de undersøkte populasjonene. Disse sammenfallende resultatene tyder på at den genetiske variasjonen for elvemuslingbestander i Europa er generelt lav, og at

arten som helhet er sårbar (Buddensiek, 1995, Cosgrove and Hastie, 2001, Reis, 2003, Hastie, 2006, Treasurer et al., 2006).

Lav genetisk variasjon for elvemusling kan generelt forklares ut fra forskjellige faktorer. De har en komplisert livssyklus, med en obligatorisk parasittfase på vertsfisk, hvor bare en liten prosentandel overlever de første 5 – 8 årene (Larsen, 2005). Elvemuslingen har høy reproduksjonsrate og hunnen kan slippe mellom 1 – 10 millioner elvemuslinglarver ved hver forplantning. Ikke alle kjønnsmodne elvemuslinger reproducerer seg hvert år (Bauer, 1987), slik at noen individers reproduksjonssuksess kan øke størrelsen for noen familier. Denne effekten kan i kombinasjon med habitatforstyrrelser redusere populasjonsstørrelsen og redusere den genetiske variasjonen. En teori om hva som har ført til denne lave genetiske variasjonen sett i de 4 elvene (Bråtaåa, Finsrudåa, Kampåa og Leira), er at de har blitt utsatt for en eller flere flaskehals-hendelse(r) som har redusert bestanden kraftig. Flaskehals-hendelsen kan være innledet med tidligere overdreven perlefiske og fortsatt med habitatødeleggelse grunnet økt sivilisasjon. Elvemuslingen het før elveperlemusling, og perlene var veldig ettertraktet. Fiske av perlemusling i Norge var så utbredt at i 1733 ble det innført en midlertidig fredningsbestemmelse av elvemusling for å øke bestanden. Perlefiske fra elvemusling ble ført forbudt i 1993. I senere tid har landbruksvirksomhet, sur nedbør og vassdragregulering før til ytterligere nedgang i bestandene. Landbruksvirksomhet har før til eutroforering og nedslamming av vassdrag, og gjort oppvekstforholdene til de nedgravde, unge muslingene dårlige (Bauer, 1992, Cosgrove and Hastie, 2001). Regulering av enkelte vassdrag har påvirker vandring av fisk, og bygging av demninger skaper vandringshindre for fisk. Dette hindrer genflyt/spredning av elvemusling og kan også påvirke rekrutteringen av elvemuslingene negativt gjennom mangel på vertsfisk. Sur nedbør har ført til fiskedød mange steder, og har vært med å hindre rekruttering av elvemusling grunnet mangel på vertsfisk. Kalking av vassdrag har hatt positiv effekt på leveforholdene til fisk og har også vist seg å ha positiv effekt på rekrutteringen for elvemusling (Larsen, 2005).

Populasjoner som har lav genetisk variasjon er mer utsatt og sårbare til å stå i mot ytre påvirkninger som sykdom, flom og miljøpåvirkninger (Charlesworth and Charlesworth, 1987, Reed and Frankham, 2003). De er også mer utsatt for innavlsdepresjon, hvor skadelige recessive alleler vil kunne bli uttrykt i populasjonen og føre til redusert fitness (Fenster and Galloway, 2000). Organismer som har høy reproduksjonsrate, som elvemusling, har vist seg

å inneha høyere grad av genetisk last (skadelige/ dødelige alleler). Dette kan ha sammenheng med det store antall celledelinger som må til for å produsere titalls millioner egg og sperm hvert år, og som øker sjansen for mutasjoner (Launey and Hedgecock, 2001). Utkryssing mellom populasjoner som har lav genetisk variasjon har ofte vist positiv effekt på fitness-relaterte egenskaper. Men utkryssing kan også gi nedgang i fitness for populasjonene grunnet brudd av ko-tilpassede genkomplekser. Dette kan føre til avkom med en mellom-fenotype som er mindre tilpasset det lokale habitatet (Lynch, 1991). Dette kalles utavlsdepresjon, og fører ofte til ikke-levedyktig eller infertilt avkom sett i F_1 eller F_2 generasjonen (Sagvik et al., 2005). Elvemuslingen er svært tilpasset det miljøet de lever i (Machordom et al., 2003, Geist and Kuehn, 2005), og forsøk på å flytte voksne individer av elvemusling til en annen lokalitet har ofte endt med at elvemuslingene har dødd ut ganske raskt etter flytting (Buddensiek, 1995, Cosgrove and Hastie, 2001). I handlingsplan for elvemusling i Norge (Larsen, 2005) er oppdrett av elvemusling i bur nevnt som en metode å ”produsere” musling for senere utsetting i vassdrag. For at en slik metode skal bli vellykket er det avgjørende at man bruker genetisk verktøy for å sikre at individer som settes ut er lik genetisk den eksisterende populasjon, slik at man unngår problemer med at individene ikke er genetisk tilpasset habitatet, og problemer med redusert fitness på avkom grunnet brudd av ko-tilpassede genkomplekser.

I hele Europa har reproduksjonssuksessen til elvemusling gått kraftig ned de siste 30 – 50 årene grunnet forsurening, habitatødeleggelse, nedgang i vertsfisk og andre menneskeskapt årsaker (Bauer, 1992, Buddensiek, 1995, Cosgrove and Hastie, 2001, Geist and Kuehn, 2005). Dette ført ofte til fragmenterte, isolerte populasjoner. Men elvemuslinger har et stor reproduksjonspotensiale gjennom sin evne til å reprodusere gjennom hele sitt lange liv (>100 år) og ved høyt reproduksjonspotensial per voksen musling, selv i forurensede elver (Bauer, 1987). Det er derfor viktig å få kunnskap om habitatkrav ved elvemuslingens forskjellige livsfaser (glocidier, larve, ung-musling og voksen), for å kunne legge til rette for gode forhold til rekruttering (Geist and Kuehn, 2005, Martin Österling et al., 2008). Det er satt i gang kartlegging og overvåking av elvemusling i Norge, og i den sammenheng vil bruk av genetiske verktøy til studier være et svært viktig for å legge en best mulig bevaringsstrategi.

4.4 Videre arbeid

De to multipleks reaksjonene (reaksjon I og II) bør analyseres på individer fra populasjoner som innehar større genetisk variasjon, for å få gjort grunnleggende tester av markørene før de inkluderes i populasjonsgenetiske studier.

Av de 201 mikrosatellittsekvensene som ble isolert er bare 60 undersøkt for primerdesign, og det er derfor mange flere potensielt polymorfe markører som kan utvikles fra dette materiale. Blant mikrosatellittsekvensene hvor det ikke er designet primersett er det flere svært lange repetisjonsmønstre (25 – 40 repetisjoner), som kan vise seg å inneha en nødvendig høyere grad av polymorfi for å kunne skille bedre mellom individer i populasjoner som har særlig lav genetisk variasjon.

Det er rapportert om at bestander av elvemusling i Møre og Romsdal og i Trøndelags og Nordlandfylkene har god rekruttering og virker sunne og mindre sårbare (Larsen, 2005). Det hadde vært vesentlig for videre bevaringsstrategi å få sett på deres genetiske variasjon for å sette en ”standard” for genvariasjonen i en ”sunn” elvemuslingbestand som man kan måle mer sårbare populasjoner opp mot. Det er også avgjørende å få klarhet i den taksonomiske statusen på elvemuslinger som foretrekker ørret som vertsfisk kontra de som foretrekker laks. Hvis disse er forskjellige underarter vil det ha mye å si for bevaringsarbeidet for elvemuslingen (Larsen, 2005).

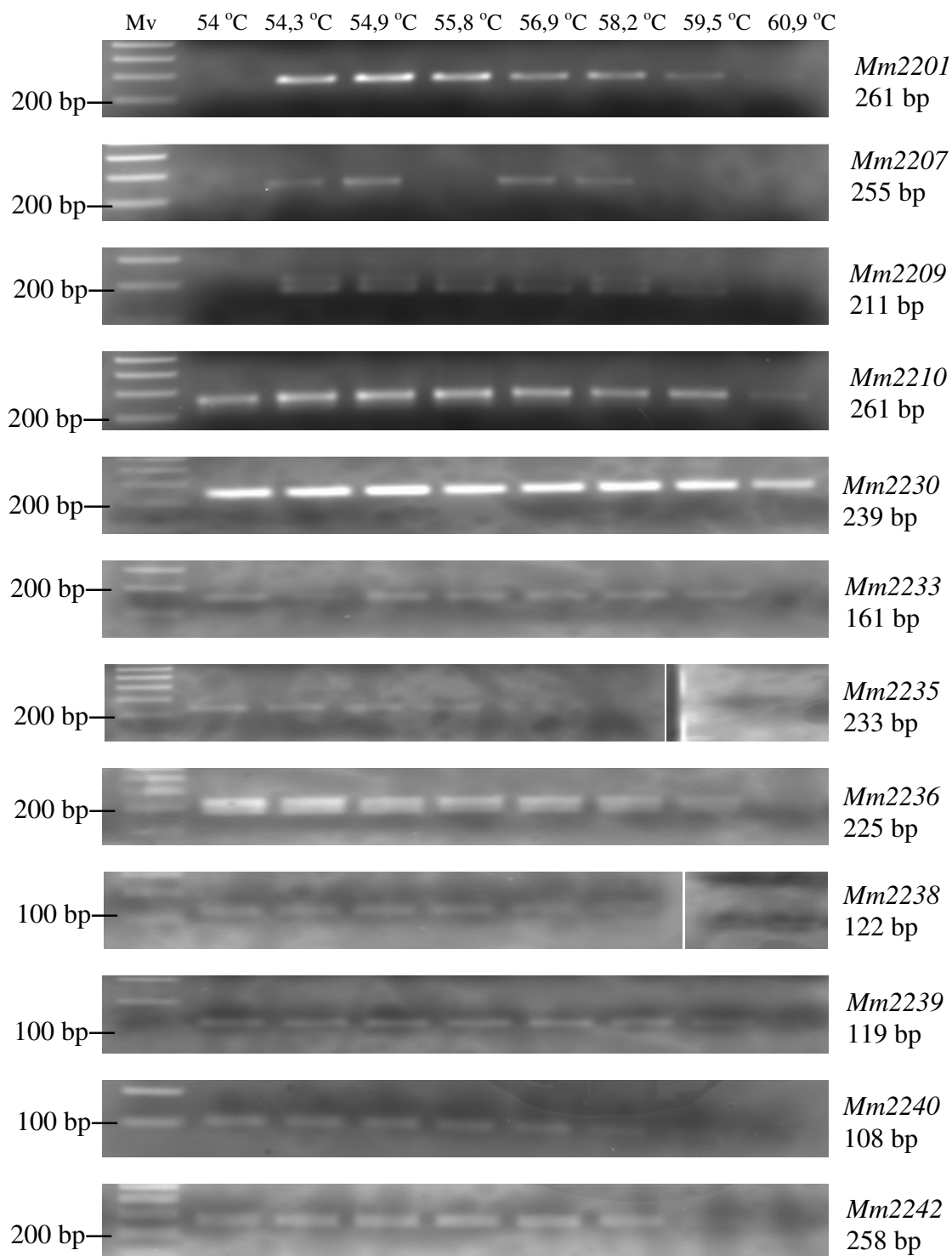
Genetiske studier på populasjoner bør sammenfattes med biologiske undersøkelser utført i de samme vassdragene av antall og alderssammensetning på elvemuslinger, rekrutteringsstatus av elvemusling, forekomst og ferdsel av vertsfisk, vannkvalitet, grad av fragmentering/isolasjon og eventuell regulering av vassdraget. Dette gjør at man får en mer helhetlig oversikt, og lettere kan se hvilke tiltak som må igangsettes for å bedre situasjonen for de mer sårbare populasjonene av elvemusling, og verne om og opprettholde forholdene for de ”sunne” populasjonene. Etter igangsatte tiltak bør det etableres jevnlig oppfølgingsanalyser av unge elvemuslinger i alder 5 – 10 år for å kunne følge den genetiske utviklingen i elvene og evaluere virkningen av eventuelle tiltak som er satt i gang i vassdraget den lever i.

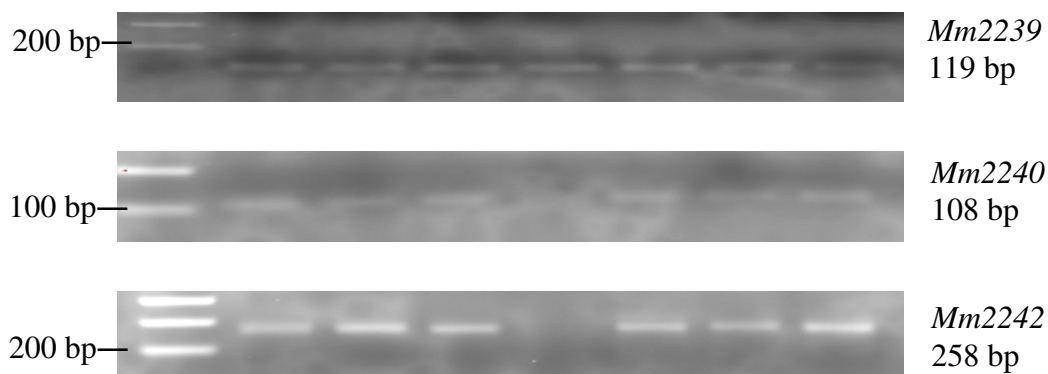
5. Konklusjon

I forbindelse med dette studiet har vi ved bruk av 454-pyrosekvenseringsteknikk og bioinformatisk verktøy fått identifisert og utviklet mikrosatellittmarkører for genotyping av elvemusling (*M. margaritifera*).

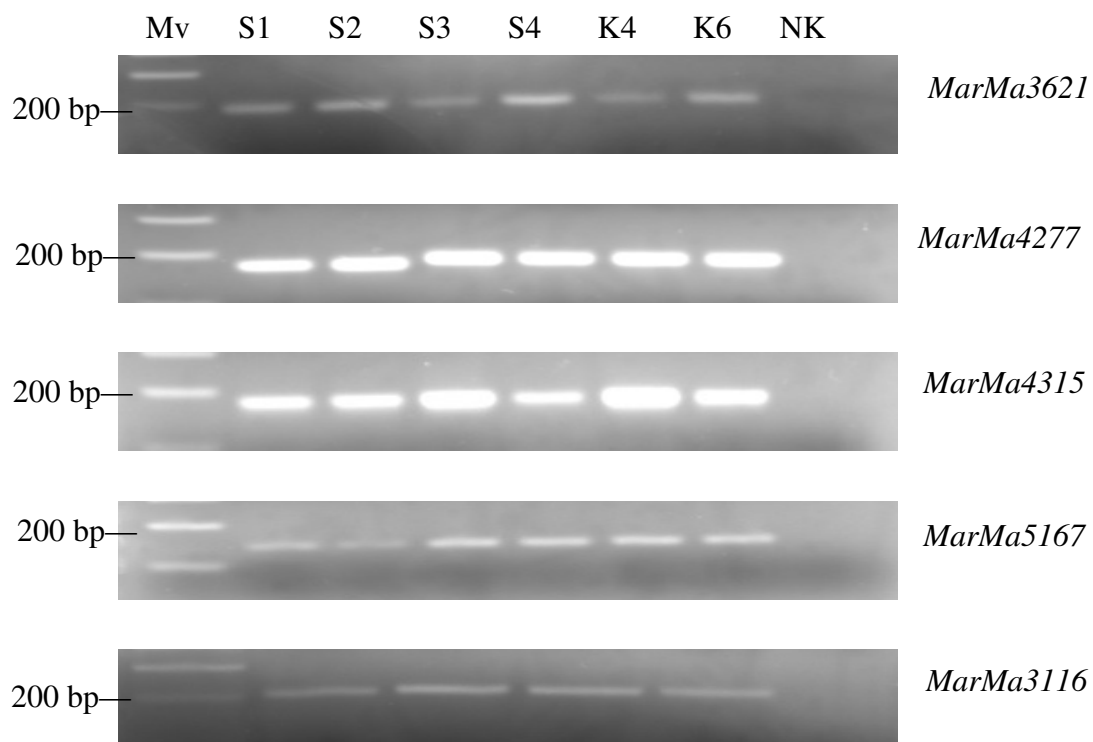
Vi har bygd opp 2 multipleks PCR-reaksjoner med henholdsvis 6 nyutviklede og 5 etablerte markører. Markørene i multipleks PCR-reaksjonene har vist seg å være pålitelige, med lav feilrate, utenom for markørene *mm2235* og *MarMa5167* som må evalueres bedre. Det bør i tillegg utføres grunnleggende tester av markørene før de inkluderes i genetiske analyser.

Appendiks A: Gelbilder fra gradient PCR på nyutviklede primersett





Analyse av etablerte markører (Geist et al., 2003) på 6 forskjellige individer



Appendiks C: Resultater av genotyping på 132 individer med reaksjon I og II

Reaksjon 1 (nyutviklede markører)		
Lokalitet	Uten resultat	Totalt
Fallselvea	0	7
Bråtaåa	2	24
Finsrudåa	2	34
Kampåa	2	31
Leira	3	36
Totalt	9	132

Reaksjon 2 (etablerte markører)		
Lokalitet	Uten resultat	Totalt
Fallselva	0	7
Bråtaåa	2	24
Finsrudåa	5	34
Kampåa	3	31
Leira	4	36
Totalt	14	132

Reaksjon I. Manglende amplifiserings-resultat fra genotyping

Ingen resultat		Ingen resultater på Mm2235	
Populasjon	Prøve nr.	Populasjon	Prøve nr.
Leira	1	Kampåa	8
Leira	3	Kampåa	12
Leira	20	Kampåa	13
Kamåpa	10	Kampåa	16
Kamåpa	23	Kampåa	32
Bråtaåa	90	Kampåa	33
Bråtaåa	12	Bråtaåa	2
Finsrudåa	7	Bråtaåa	6
Finsrudåa	14	Bråtaåa	14
		Finsrudåa	2
		Finsrudåa	11

Reaksjon II. Manglende amplifiserings-resultat fra genotyping

Ingen resultater		Ingen resultater	
Populasjon	Prøve nr.	<i>MarMa5167</i>	
Populasjon	Prøve nr.	Populasjon	Prøve nr.
Leira	1	Leira	15
Leira	5	Leira	18
Leira	23	Leira	20
Leira	35	Leira	30
Kampåa	10	Kampåa	7
Kampåa	13	Kampåa	8
Kampåa	32	Kampåa	12
Bråtaåa	4	Kampåa	16
Bråtaåa	12	Kampåa	17
Finsrudåa	7	Kampåa	30
Finsrudåa	11	Bråtaåa	2
Finsrudåa	14	Bråtaåa	3
Finsrudåa	20	Bråtaåa	15
Finsrudåa	31	Bråtaåa	19
		Bråtaåa	22

Appendiks D: Optimalisering av parametre i GeneMapper

Før optimalisering

polynormal degree 3 (default)

window size 15 (default)

010 [Microsatellite] - Administrator Is Logged In Database HH03793

Help

Table Setting: By marker

Sample File	Sample Name	Panel	Marker	Dye	SNP	Allele 1	Allele 2
A01_1_A01_001.fsa	1	Multipleks I	3116	R		?	214
A02_1_A02_002.fsa	9	Multipleks I	3116	R		208	212
A03_1_A03_001.fsa	17	Multipleks I	3116	R		208	?
A04_1_A04_002.fsa	25	Multipleks I	3116	R		208	?
A05_1_A05_001.fsa	33	Multipleks I	3116	R		208	?
A06_1_A06_002.fsa	41	Multipleks I	3116	R		208	?
A07_1_A07_001.fsa	49	Multipleks I	3116	R			
A08_1_A08_002.fsa	57	Multipleks I	3116	R		208	
A09_1_A09_001.fsa	65	Multipleks I	3116	R		208	
A10_1_A10_002.fsa	73	Multipleks I	3116	R		208	?
A11_1_A11_001.fsa	01	Multipleks I	3116	R		208	?
A12_1_A12_002.fsa	09	Multipleks I	3116	R		208	?
B01_1_B01_003.fsa	2	Multipleks I	3116	R		?	212
B02_1_B02_004.fsa	10	Multipleks I	3116	R		208	242
B03_1_B03_003.fsa	18	Multipleks I	3116	R		208	?
B04_1_B04_004.fsa	26	Multipleks I	3116	R		208	?
B05_1_B05_003.fsa	34	Multipleks I	3116	R		208	
B06_1_B06_004.fsa	42	Multipleks I	3116	R		208	
B07_1_B07_003.fsa	50	Multipleks I	3116	R		208	?
B08_1_B08_004.fsa	58	Multipleks I	3116	R		208	
B09_1_B09_003.fsa	66	Multipleks I	3116	R		208	
B10_1_B10_004.fsa	74	Multipleks I	3116	R		208	?
B11_1_B11_003.fsa	02	Multipleks I	3116	R		208	?
B12_1_B12_004.fsa	10	Multipleks I	3116	R		208	?
C01_1_C01_005.fsa	3	Multipleks I	3116	R		212	212
C02_1_C02_006.fsa	11	Multipleks I	3116	R		208	242
C03_1_C03_005.fsa	19	Multipleks I	3116	R			
C04_1_C04_006.fsa	27	Multipleks I	3116	R		208	
C05_1_C05_005.fsa	35	Multipleks I	3116	R		208	?
C06_1_C06_006.fsa	43	Multipleks I	3116	R		208	?
C07_1_C07_005.fsa	51	Multipleks I	3116	R		208	?
C08_1_C08_006.fsa	59	Multipleks I	3116	R			
C09_1_C09_005.fsa	67	Multipleks I	3116	R		208	?
C10_1_C10_006.fsa	75	Multipleks I	3116	R		208	?
C11_1_C11_005.fsa	03	Multipleks I	3116	R		208	
C12_1_C12_006.fsa	11	Multipleks I	3116	R		208	?
D01_1_D01_007.fsa	4	Multipleks I	3116	R		212	?
D02_1_D02_008.fsa	12	Multipleks I	3116	R		208	
D03_1_D03_007.fsa	20	Multipleks I	3116	R		208	?
D04_1_D04_008.fsa	28	Multipleks I	3116	R		208	
D05_1_D05_007.fsa	36	Multipleks I	3116	R		208	?

Etter Optimalisering

Polynomial degree 3 (default)

Window size 19

010 [Microsatellite] - Administrator Is Logged In Database HH03793

Help

Table Setting: By marker

Sample File	Sample Name	Panel	Marker	Dye	SNP	Allele 1	Allele 2
66 A02_1_A02_002.fsa	9	Multipleks I	3116	R		208	212
67 A03_1_A03_001.fsa	17	Multipleks I	3116	R		208	
68 A04_1_A04_002.fsa	25	Multipleks I	3116	R		208	
69 A05_1_A05_001.fsa	33	Multipleks I	3116	R		?	
70 A06_1_A06_002.fsa	41	Multipleks I	3116	R		208	
71 A07_1_A07_001.fsa	49	Multipleks I	3116	R			
72 A08_1_A08_002.fsa	57	Multipleks I	3116	R		208	
73 A09_1_A09_001.fsa	65	Multipleks I	3116	R		208	
74 A10_1_A10_002.fsa	73	Multipleks I	3116	R		208	
75 A11_1_A11_001.fsa	01	Multipleks I	3116	R		208	
76 A12_1_A12_002.fsa	09	Multipleks I	3116	R		?	
77 B01_1_B01_003.fsa	2	Multipleks I	3116	R		?	212
78 B02_1_B02_004.fsa	10	Multipleks I	3116	R		208	242
79 B03_1_B03_003.fsa	18	Multipleks I	3116	R		208	
80 B04_1_B04_004.fsa	26	Multipleks I	3116	R		208	
81 B05_1_B05_003.fsa	34	Multipleks I	3116	R		208	
82 B06_1_B06_004.fsa	42	Multipleks I	3116	R		208	
83 B07_1_B07_003.fsa	50	Multipleks I	3116	R		208	
84 B08_1_B08_004.fsa	58	Multipleks I	3116	R		208	
85 B09_1_B09_003.fsa	66	Multipleks I	3116	R		208	
86 B10_1_B10_004.fsa	74	Multipleks I	3116	R		208	
87 B11_1_B11_003.fsa	02	Multipleks I	3116	R		?	
88 B12_1_B12_004.fsa	10	Multipleks I	3116	R		?	
89 C01_1_C01_005.fsa	3	Multipleks I	3116	R		212	
90 C02_1_C02_006.fsa	11	Multipleks I	3116	R		208	242
91 C03_1_C03_005.fsa	19	Multipleks I	3116	R			
92 C04_1_C04_006.fsa	27	Multipleks I	3116	R		208	
93 C05_1_C05_005.fsa	35	Multipleks I	3116	R		208	
94 C06_1_C06_006.fsa	43	Multipleks I	3116	R		208	
95 C07_1_C07_005.fsa	51	Multipleks I	3116	R		208	
96 C08_1_C08_006.fsa	59	Multipleks I	3116	R			
97 C09_1_C09_005.fsa	67	Multipleks I	3116	R		208	
98 C10_1_C10_006.fsa	75	Multipleks I	3116	R		208	
99 C11_1_C11_005.fsa	03	Multipleks I	3116	R		208	
100 C12_1_C12_006.fsa	11	Multipleks I	3116	R		?	
101 D01_1_D01_007.fsa	4	Multipleks I	3116	R		212	?
102 D02_1_D02_008.fsa	12	Multipleks I	3116	R		208	
103 D03_1_D03_007.fsa	20	Multipleks I	3116	R		208	
104 D04_1_D04_008.fsa	28	Multipleks I	3116	R		208	
105 D05_1_D05_007.fsa	36	Multipleks I	3116	R		208	
106 D06_1_D06_008.fsa	44	Multipleks I	3116	R		208	

Litteraturliste

- Abdelkrim, #160, Jawad, Robertson, C. B, Stanton, L. J-A, Gemmell, J. N (2009) Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. Natick, MA, ETATS-UNIS: Eaton.
- Ardren WR, Borer S, Thrower F, Joyce JE, Kapuscinski AR (Inheritance of 12 microsatellite loci in *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Heredity* 90:529-536.1999).
- Arvidsson AH-NoB (Flodpärlmusslan i Blekinge - Undersökning av genetisk populationsstruktur. Karlstad universitet Avdelning för biologi 11.2007).
- Bauer G (Reproductive Strategy of the Freshwater Pearl Mussel *Margaritifera margaritifera*. *Journal of Animal Ecology* 56:691-704.1987).
- Bauer G (Variation in the Life Span and Size of the Freshwater Pearl Mussel. *Journal of Animal Ecology* 61:425-436.1992).
- Blazewicz J, Bryja M, Figlerowicz M, Gawron P, Kasprzak M, Kirton E, Platt D, Przybytek J, Swiercz A, Szajkowski L (Whole genome assembly from 454 sequencing output via modified DNA graph concept. *Computational Biology and Chemistry* 33:224-230.2009).
- Bouza C, Castro, Jaime.,Martinez., Amargo, Rafaela., Fernandez, Carlos., Ondina, Paz., Outeiro, Adolfo. and Miguel,S., Eduardo. (Threatened freshwater pea. rl mussel *Margaritifera margaritifera* L in NW Spain: low and very structured genetic variation in southern peripheral populations assessed using microsatellite markers 8:937-948.2006).
- Brown LY, Brown SA (Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats. 20:51-58.2004).
- Brownstein, #160, J. M, Carpten, D., Smith, R. J (1996) Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase : Primer modifications that facilitate genotyping. Natick, MA, ETATS-UNIS: Eaton.
- Buddensiek V (The culture of juvenile freshwater pearl mussels *Margaritifera margaritifera* L. in cages: A contribution to conservation programmes and the knowledge of habitat requirements. *Biological Conservation* 74:33-40.1995).
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RI, Mulley JC, Sutherland GR (Incidence and origin of null alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics* 52:922-927.1993).
- Chambers GK, MacAvoy ES (Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 126:455-476.2000).
- Charlesworth B, Morgan MT, Charlesworth D (The Effect of Deleterious Mutations on Neutral Molecular Variation. *Genetics* 134:1289-1303.1993).
- Charlesworth D, Charlesworth B (Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:237-268.1987).
- Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM (Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255:1-29.2006).
- Cock Van O, William F H, Derek P. M W, Peter S (micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535-538.2004).

- Cameron JM (What controls the length of noncoding DNA? *Current Opinion in Genetics & Development* 11:652-659.2001).
- Cosgrove PJ, Hastie LC (Conservation of threatened freshwater pearl mussel populations: river management, mussel translocation and conflict resolution. *Biological Conservation* 99:183-190.2001).
- Crow JF (Eighty years ago: The beginnings of population genetics. *Genetics* 119:473-476.1988).
- Cruz F, Pérez M, Presa P (Distribution and abundance of microsatellites in the genome of bivalves. *Gene* 346:241-247.2005).
- David P, Pujol B, Viard F, Castella V, Goudet J (Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Mol Ecol* 16:2474-2487.2007).
- DN (2006) Handlingsplan for elvemusling, *Margaritifera margaritifera*. p 28.
- Droege M, Hill B (The Genome Sequencer FLX(TM) System--Longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *Journal of Biotechnology* 136:3-10.2008).
- Edwards MC, Gibbs RA (Multiplex PCR - advantages, development, and applications. *Pcr- Methods and Applications* 3:S65-S75.1994).
- Ellegren H (Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5:435-445.2004).
- Estoup A, Gharbi K, SanCristobal M, Chevalet C, Haffray P, Guyomard R (Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55:715-725.1998).
- Faircloth BC (msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Mol Ecol Notes* 8:92-94.2008).
- Fenster CB, Galloway LF (Inbreeding and Outbreeding Depression in Natural Populations of *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae). *Conservation Biology* 14:1406-1412.2000).
- Fishback AG, Danzmann RG, Sakamoto T, Ferguson MM (Optimization of semi-automated microsatellite multiplex polymerase chain reaction systems for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 172:247-254.1999).
- Fisher R (Statistical Methods and Scientific Induction. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 17:69-78.1955).
- Frankham R (Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies* 326:22-29.2003).
- Geist J, Kuehn R (Genetic diversity and differentiation of central European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) populations: implications for conservation and management. *Mol Ecol* 14:425-439.2005).
- Geist J, Rottmann O, Schroder W, Kuhn R (Development of microsatellite markers for the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. (Bivalvia : Unionoidea). *Mol Ecol Notes* 3:444-446.2003).
- Geist J, Soderberg H, Karlberg A, Kuehn R (Drainage-independent genetic structure and high genetic diversity of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) in northern Europe. *Conservation Genetics* 11:1339-1350.2010).
- Guo SW, Thompson EA (Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics* 48:361-372.1992).
- Hastie LC (Determination of mortality in exploited freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) populations. *Fisheries Research* 80:305-311.2006).

- Hedgecock D, Li G, Hubert S, Bucklin K, Ribes V (Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research* 23:379-385.2004).
- Hedrick PW (Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology & Evolution* 16:629-636.2001).
- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH (1997) Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol.
- Jarne P, Lagoda PJJL (Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11:424-429.1996).
- Jerry DR, Evans BS, Kenway M, Wilson K (Development of a microsatellite DNA parentage marker suite for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 255:542-547.2006).
- Johnson NA, Rexroad Iii CE, Hallerman EM, Vallejo RL, Palti Y (Development and evaluation of a new microsatellite multiplex system for parental allocation and management of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstocks. *Aquaculture* 266:53-62.2007).
- Kruglyak S, Durrett RT, Schug MD, Aquadro CF (Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:10774-10778.1998).
- Kålås JA, Viken, Å. og Bakken, T. (red.) (Norsk Rødliste 2006 – 2006 Norwegian Red List. Artsdatabanken, Norway.2006).
- Larsen BM (Handlingsplan for elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Norge. NINA Rapport 122:33.2005).
- Larsen BM (Overvåkning av elvemusling i Ogna, Steinkjervassdraget i forbindelse med kjemisk behandling for å fjerne *Gyrodactylus salaris* fra vassdraget i 2006 og 2007. Nina Rapport 39.2008).
- Launey S, Hedgecock D (High Genetic Load in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics* 159:255-265.2001).
- Lerceteau-Köhler E, Weiss S (Development of a multiplex PCR microsatellite assay in brown trout *Salmo trutta*, and its potential application for the genus. *Aquaculture* 258:641-645.2006).
- Li Q, Park C, Kobayashi T, Kijima A (Inheritance of microsatellite DNA markers in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Marine Biotechnology* 5:331-338.2003).
- Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11:2453-2465.2002).
- Liu ZJ, Cordes JF (DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238:1-37.2004).
- Lynch M (The Genetic Interpretation of Inbreeding Depression and Outbreeding Depression. *Evolution* 45:622-629.1991).
- MacAvoy ES, Wood AR, Gardner JPA (Development and evaluation of microsatellite markers for identification of individual Greenshell(TM) mussels (*Perna canaliculus*) in a selective breeding programme. *Aquaculture* 274:41-48.2008).
- Machordom A, Araujo R, Erpenbeck D, Ramos MA (Phylogeography and conservation genetics of endangered European *Margaritiferidae* (Bivalvia : Unionoidea). *Biol J Linnean Soc* 78:235-252.2003).

- Martin Österling E, Greenberg LA, Arvidsson BL (Relationship of biotic and abiotic factors to recruitment patterns in *Margaritifera margaritifera*. *Biological Conservation* 141:1365-1370.2008).
- Martins SW (WebSat - A web software for microsatellite marker development. *Bioinformatics* 3 (6).2009).
- Merkel A, Gemmell N (Detecting short tandem repeats from genome data: opening the software black box. *Brief Bioinform* 9:355-366.2008).
- Metzgar D, Bytof J, Wills C (Selection Against Frameshift Mutations Limits Microsatellite Expansion in Coding DNA. *Genome Research* 10:72-80.2000).
- Mikheyev AS, Vo T, Wee B, Singer MC, Parmesan C (Rapid Microsatellite Isolation from a Butterfly by *De Novo* Transcriptome Sequencing: Performance and a Comparison with AFLP-Derived Distances. *PLoS ONE* 5:e11212.2010).
- Morin P, Moore J, Chakraborty R, Jin L, Goodall J, Woodruff D (Kin selection, social structure, gene flow, and the evolution of chimpanzees. *Science* 265:1193-1201.1994).
- Morin PA, Luikart G, Wayne RK, the SNPwg (SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 19:208-216.2004).
- Oconnell M, Wright JM (Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7:331-363.1997).
- Platt AR, Woodhall RW, George AL (Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *Biotechniques* 43:58-+.2007).
- Porta J, María Porta J, Martínez-Rodríguez G, del Carmen Alvarez M (Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture* 256:159-166.2006).
- Qiagen (2008) QIAGEN® Multiplex PCR Handbook.
- Reece KS, Ribeiro WL, Gaffney PM, Carnegie RB, Allen SK, Jr (Microsatellite Marker Development and Analysis in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*): Confirmation of Null Alleles and Non-Mendelian Segregation Ratios. *J Hered* 95:346-352.2004).
- Reed DH, Frankham R (Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* 17:230-237.2003).
- Reis J (The freshwater pearl mussel [*Margaritifera margaritifera* (L.)] (*Bivalvia*, *Unionoida*) rediscovered in Portugal and threats to its survival. *Biological Conservation* 114:447-452.2003).
- Rico C, Rico I, Hewitt G (470 Million Years of Conservation of Microsatellite Loci among Fish Species. *Proceedings: Biological Sciences* 263:549-557.1996).
- ROUSSET F (genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103-106.2008).
- Ruzzante DE (A comparison of several measures of genetic distance and population structure with microsatellite data: bias and sampling variance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55:1-14.1998).
- Saavedra C, Bachère E (Bivalve genomics. *Aquaculture* 256:1-14.2006).
- Sagvik J, ouml, rgen, Uller T, Olsson M (Outbreeding depression in the common frog, *Rana temporaria*. *Conservation Genetics* 6:205-211.2005).
- Santana QC, Coetzee MPA, Steenkamp ET, Mlonyeni OX, Hammond GNA, Wingfield MJ, Wingfield BD (Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries. *Biotechniques* 46:217-223.2009).

- Sekino M, Saido T, Fujita T, Kobayashi T, Takami H (Microsatellite DNA markers of Ezo abalone (*Haliotis discus hannai*): a preliminary assessment of natural populations sampled from heavily stocked areas. *Aquaculture* 243:33-47.2005).
- Selkoe KA, Toonen RJ (Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9:615-629.2006).
- Slatkin M (An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. *Genetical Research* 64:71-74.1994).
- Strayer DL, Downing JA, Haag WR, King TL, Layzer JB, Newton TJ, Nichols SJ (Changing Perspectives on Pearly Mussels, North America's Most Imperiled Animals. *BioScience* 54:429-439.2004).
- Taberlet P, Waits LP, Luikart G (Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* 14:323-327.1999).
- Takundwa M, Chimwamurombe PM, Kunert K, Cullis CA (Isolation and characterization of microsatellite repeats in Marama bean (*Tylosema esculentum*). *African Journal of Agricultural Research* 5:561-566.2010).
- Tautz D (Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl Acids Res* 17:6463-6471.1989).
- Thurston MI, Field, D. (Msatfinder: detection and characterisation of microsatellites.2005).
- Treasurer JW, Hastie LC, Hunter D, Duncan F, Treasurer CM (Effects of (*Margaritifera margaritifera*) glochidial infection on performance of tank-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 256:74-79.2006).
- Weir BS, Cockerham CC (Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. *Evolution* 38:1358-1370.1984).
- Young M, Williams J (The status and conservation of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* Linn. in Great Britain. *Biological Conservation* 25:35-52.1983).
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol* 11:1-16.2002).