

Genetisk variasjon og genetiske markører for motstandskraft mot *Gyrodactylus salaris* hos laks i infiserte vassdrag

Bjarne Gjerde, Celeste Jacq, M. Luqman Aslam, Kjetil Hindar, Tor A. Bakke og Hans B. Bentsen





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 390 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1433 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sunnalsøra:

Sjølsengvegen 22
NO-6600 Sunndalsøra

Alta:

Kunnskapsparken, Markedsgata 3
NO-9510 Alta

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140

E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

Rapport

<i>Tittel:</i> Genetisk variasjon og genetiske markører for motstandskraft mot <i>Gyrodactylus salaris</i> hos laks i infiserte vassdrag	ISBN 978-82-8296-648-1 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Title:</i> Genetic variation and genetic markers for resistance to <i>Gyrodactylus salaris</i> in Atlantic salmon in infected rivers	<i>Rapportnr.:</i> 18/2021
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Bjarne Gjerde ¹ , Celeste Jacq ¹ , Luqman Aslam ¹ , Kjetil Hindar ² , Tor A. Bakke ³ og Hans B. Bentsen ¹ ¹ Nofima, ² NINA, ³ NHM Universitetet i Oslo	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Avdeling:</i> Avl og genetikk	<i>Dato:</i> 21. mai 2021
<i>Oppdragsgiver:</i> Møre og Romsdal fylkeskommune	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 50
<i>Stikkord:</i> <i>Gyrodactylus salaris</i> , <i>Salmo salar</i> , Atlantisk laks, genetisk variasjon, resistens, evolusjon	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> 69058/2013/243 og 2018-0148
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Se kapittel 1.1	<i>Prosjektnr.:</i> 10767 og 12273
<i>English summary/recommendation:</i> See chapter 1.2	

Innhold

1	Sammendrag	1
1.1	Norsk sammendrag	1
1.2	English summary.....	2
2	Hovedmål	4
3	Delmål.....	4
4	Bakgrunn	5
5	Materiale og metoder	8
5.1	De tre Gs-infiserte stammene	8
5.2	De tre Gs-frie stammene	8
5.3	Villaks eller oppdrettslaks.....	9
5.4	Klekking og startfôring.....	9
5.5	Smittetest hos Nofima, Sunndalsøra	9
5.6	Smittetest hos HÅK, Hokksund.....	10
5.7	Genotyping	10
5.8	Estimering av genetiske parameter.....	11
5.9	Populasjonsgenetikk.....	11
5.10	GWAS – Genome-Wide Association Study.....	12
6	Resultater.....	14
6.1	Forskjeller i motstandskraft mellom stammer	14
6.2	Arvegrader for motstandskraft mot Gs.....	14
6.3	Populasjonsgenetikk.....	15
6.4	GWAS- Heil genom assosiasjon søk.....	16
6.5	Overlevelse for ulike SNP genotyper	17
7	Diskusjon.....	18
8	Konklusjon.....	21
9	Etterord.....	22
10	Referanser	23
11	Tabeller og figurer	26

1 Sammendrag

1.1 Norsk sammendrag

Laksunger etter villaks fra laksestammer infisert av *Gyrodactylus salaris* (*Gs*) (Skibotnelva, Driva og Drammenselva) og uinfiserte laksestammer (Altaelva, Eira/Surna/Toåa og Numedalslågen) i tre geografiske regioner ble testet for motstandskraft mot *Gs*. I smittetestene ble også inkludert laksunger fra den *Gs*-infiserte elva Neva som renner ut i Finskebukta og som er kjent for å ha høy motstandskraft mot *Gs*. For hver av de sju stammene ble 600 laksunger (avkom etter om lag 25 hannfisk og 25 hunnfisk, likt fordelt på to kar) naturlig infisert med *Gs* (haplotype A) fra *Gs*-infiserte laksunger fra Driva. Testen startet 29.10.2015, og ble avsluttet 84 dager etter oppsmitting. Overlevelsen av fisk i de to karene var da 33.2 % og 39.6 %. Døde og overlevende fisk ble ved hjelp av 1300 SNP-markører sporet til sine foreldre og stamme. Dårlig DNA kvalitet hos de som døde i testen, gjorde at 9.4 % av de døde og 5.7 % av både døde og overlevende ikke kunne spores til sine foreldre. De ble derfor ekskludert fra videre analyser.

Resultatene viser signifikant høyest overlevelse (69.3 %) hos laksunger fra den motstandsdyktige Nevastammen, noe som var 37.4 ± 2.2 %-poeng ($P < 0.001$) høyere enn gjennomsnittet for de tre norske *Gs*-infiserte stammene. Overlevelsen for laksunger fra de norske *Gs*-infiserte elvestammene var høyere sammenlignet med de norske *Gs*-uinfiserte stammene (6.1 ± 1.6 %-poeng, $P < 0.001$). Laksunger fra den *Gs*-infiserte Skibotnelva hadde signifikant høyere overlevelse enn laksunger fra den *Gs*-uinfiserte Altaelva (9.0 ± 2.9 %-poeng; $P=0.002$); og laksunger fra den *Gs*-infiserte Drammenselva hadde signifikant høyere overlevelse enn laksunger fra den *Gs*-uinfiserte Numedalslågen (6.7 ± 2.7 %-poeng; $P=0.014$).

Laksungene fra Driva hadde høyest overlevelse (37.1 %) av de seks undersøkte norske stammene, men ikke signifikant høyere overlevelse enn laksunger fra Eira/Surna/Toåa (2.8 ± 2.7 %-poeng; $P=0.30$). Dette resultatet kan skyldes at genetisk motstandskraft mot *Gs* har spredd seg med streifet gytefisk fra de seks *Gs*-infiserte elvene i Drivaregionen til Surna og Toåa, og fra de sju *Gs*-infiserte elvene i Raumaregionen til Eira, noe som er sannsynliggjort ved at det gjennomsnittlig slektskap mellom Driva-fiskene ble funnet å være bare marginalt høyere enn mellom Driva-fiskene på den ene siden og Eira/Surna/Toåa fiskene på den andre siden. En annen mulig forklaring kan være at streifing av laks fra uinfiserte laksestammer forsinket utviklingen av genetisk motstandskraft i Driva.

Disse resultatene kan tyde på at det har skjedd et naturlig utvalg for større motstandskraft mot *Gs* i de tre norske *Gs*-infiserte laksestammene siden stammene ble infiserte, gitt kun minimale forskjeller mellom stammene i motstandskraft mot *Gs* før *Gs*-infeksjonen. Dette er forventet da det i smittetestene ble funnet betydelig genetisk variasjon i motstandskraft mot *Gs* både for de tre norske *Gs*-infiserte stammene (arvegrad $h^2=0.29 \pm 0.06$ på observert skala; $h^2=0.47 \pm 0.07$ på den underliggende skalaen) og de tre norske *Gs*-uinfiserte stammene ($h^2=0.34 \pm 0.06$; $h^2=0.54 \pm 0.09$). Den høye genetiske korrelasjonen mellom motstandskraft mot *Gs* i de to smittetest karene (0.92 ± 0.08), er en ytterligere bekreftelse på betydelig genetisk variasjonen i motstandskraft mot *Gs* i de seks norske stammene.

Arvegraden for egenskapen «antall dager til død», var 0.25 ± 0.04 , og med en genetisk korrelasjon på 0.60 ± 0.10 til enten/eller egenskapen «død/levende» ved slutten av testen. Størrelsen på denne korrelasjonen tyder på at dette er to ulike egenskaper, men bør re-estimeres med en mer optimal

statistisk modell ettersom alle overlevende ikke har observasjon for egenskapen «antall dager til død». Denne genetiske korrelasjonen kan også være påvirket av størrelsen på den genetiske korrelasjonen mellom tilvekst og de to nevnte egenskapene, men som det ikke finnes noe estimat for.

Hos de seks undersøkte norske stammene ble det funnet to genetiske SNP-markører som hver for seg forklarte 27.1 % (ssa06) og 19.6 % (ssa26) (til sammen 37.6 %) av den genetiske variasjonen i overlevelse ved slutten av smittetesten. Denne betydelige forklaringsgraden muliggjør et direkte utvalg for økt motstandskraft mot *Gs* i *Gs*-inifiserte ville laksestammer, dersom utrydding av parasitten ikke er mulig.

Ettersom infeksjonstesten ble utført med *Gs*-inifisert yngel fra Driva (haplotype A), bør det undersøkes om de to nevnte SNP-ene har en lignende effekt på resistens mot *Gs* hos laksunger smittet med de to andre *Gs*-haplotypene i Norge: haplotype B som er funnet i Skibotnelva og haplotype F som finnes i Drammenselva, og om disse SNPene representerer en generell genetisk motstand mot *Gs*. En indikasjon på en slik generell effekt kan en få ved å lete etter seleksjonssignaturer for disse SNPene hos laksunger fra stammer inifisert med haplotype B og F.

1.2 English summary

Wild Atlantic salmon juveniles of three Norwegian river strains infected with *Gyrodactylus salaris* (*Gs*) (Skibotnelva, Driva and Drammenselva) and three Norwegian rivers strains uninfected with *Gs* (Altaelva, Eira/Surna /Toåa and Numedalslågen), each representing three geographical regions, were experimentally tested for resistance to *Gs*. The infection test also included juvenile Atlantic salmon from the *Gs*-infected River Neva that drains into the Gulf of Finland and that is known to have a strain of Atlantic salmon with high resistance to *Gs*. For each of the seven strains, 600 salmon juveniles (offspring from approximately 25 male and 25 female fish, equally divided into two tanks) were naturally infected with *Gs* haplotype A obtained from *Gs*-infected salmon juveniles from Driva. The test started on October 29, 2015 and was terminated 84 days after infection. At that time, the proportion of survivors in the two tanks was 33.2 % and 39.6 %. The dead and surviving fish were assigned to their parents and strain (river of origin) using 1300 SNP markers. Poor DNA quality from some samples meant that 5.7% of all samples (9.7% of the dead samples) were unable to be traced back to their parents and were thus excluded from further analyses.

The results show significantly greater survival (69.3%) in juveniles from the River Neva strain, which was 37.4 ± 2.2 %-points ($P < 0.001$) greater than the average for the three Norwegian *Gs*-infected strains. The survival of juveniles from the Norwegian *Gs*-infected river strains was greater compared to the Norwegian *Gs*-uninfected river strains (6.1 ± 1.6 %-points, $P < 0.001$). Juveniles from the *Gs*-infected Skibotnelva had significantly greater survival than juveniles from the neighbouring *Gs*-uninfected Altaelva (9.0 ± 2.9 %-points; $P = 0.002$); and salmon juveniles from the *Gs*-infected Drammenselva had significantly greater survival than juveniles from the neighbouring *Gs*-uninfected Numedalslågen (6.7 ± 2.7 %-points; $P = 0.014$).

Juveniles from Driva had the highest survival (37.1%) of the six Norwegian river strains examined, but not significantly higher survival than salmon juveniles from the neighbouring Eira/Surna/Toåa (2.8 ± 2.7 %-points; $P = 0.30$). This result may be due to introduced genetic resistance to *Gs* by strayers from the six *Gs*-infected rivers in the Driva region to Surna and Toåa, and from the seven *Gs*-infected rivers in the Rauma region to Eira, which is evidenced by the fact that the average pairwise genetic

relationship among the Driva parental fish was found to be only marginally higher than that between the Driva and the Eira/Surna/Toåa parental fish.

These results suggest that natural selection for improved resistance to *Gs* in the three investigated Norwegian *Gs*-infected river strains has occurred since the river strains became infected with *Gs*, given minor differences between the strains in resistance to *Gs* before the strains were infected with *Gs*. This is as expected since considerable genetic variation was found for resistance to *Gs* both in juveniles from the three Norwegian *Gs*-infected river strains (heritability $h^2 = 0.29 \pm 0.06$ on the observed scale; $h^2 = 0.47 \pm 0.07$ on the underlying scale) and juveniles from the three Norwegian *Gs*-uninfected river strains ($h^2 = 0.34 \pm 0.06$; $h^2 = 0.54 \pm 0.09$). The high genetic correlation between resistance to *Gs* in the two infection tanks (0.92 ± 0.08) is a further confirmation of the significant genetic variation for resistance to *Gs* in the six investigated Norwegian river strains.

The heritability for the trait «number of days to death» was 0.25 ± 0.04 , and this trait had a genetic correlation of 0.60 ± 0.10 to the binary trait "dead/alive" at the end of the test. The magnitude of this correlation suggests that these are different traits, but a more optimal statistical model should be applied as all survivors do not have observation for the trait «number of days to death». This genetic correlation may also be affected by the magnitude of the genetic correlation between growth and the two aforementioned traits, but for which there is no estimate.

In the six investigated Norwegian river strains, two genetic SNP markers were found which each explained 27.1% (ssa06) and 19.6% (ssa26), (and combined 37.6%) of the total genetic variation for survival at the end of the infection test. This significant proportion enables direct selection for increased resistance to *Gs* in *Gs*-infected wild salmon strains where eradication of the parasite may not be possible. As the infection test was carried out with *Gs*-infected fry from Driva (haplotype A) it should be investigated if the two mentioned SNPs have a similar effect on resistance to *Gs* in salmon juveniles infected with the other two *Gs* haplotypes in Norway: haplotype B which is found in e.g. Skibotnelva and haplotype F which is found for example in Drammenselva and Lærdalselva, and thus if these SNPs represent an overall genetic resistance to *Gs*. An indication of such an effect could be obtained by looking for selective sweeps for these SNPs in juvenile salmon from river strains infected with haplotype B and F.

2 Hovedmål

Undersøke om det skjer et naturlig utvalg for økt motstandskraft mot *Gyrodactylus salaris* (heretter kalt Gs) hos laks i infiserte vassdrag.

3 Delmål

1. Undersøke forskjeller i motstandskraft mot Gs hos avkom (F1) etter villaks fra tre Gs-infiserte og tre Gs-uinfiserte vassdrag.
2. Estimere grad av genetisk variasjon i motstandskraft mot Gs hos laksunger fra tre Gs-infiserte og tre Gs-uinfiserte vassdrag.
3. Undersøke tre ulike Gs-typers infektivitet, fekunditet og overlevelse overfor laksunger fra tre Gs-infiserte og tre Gs-uinfiserte vassdrag.
4. Søke etter QTL-effekter for motstandskraft mot gyro hos laksunger fra tre Gs-infiserte og tre Gs-uinfiserte vassdrag.

4 Bakgrunn

Gyrodactylus salaris (*Gs*) er en ektoparasitt på laksefisk i ferskvann som ble påvist for første gang i Norge i 1975 (Johnsen, 1978). Siden den gang har *Gs* forårsaket stor dødelighet hos mange ville norske laksestammer. I gjennomsnitt reduseres tettheten av laksunger med ca 85 % i *Gs*-inifiserte vassdrag, og fangsten av voksen laks reduseres tilsvarende (Johnsen m.fl., 1999). Det er imidlertid betydelig variasjon mellom inifiserte elver. I enkelte elver er tettheten redusert med opptil 99 % mens i andre er den kun redusert med ca 50 % (Johnsen m. fl. 1999); ett eksempel er Batnfjordselva der *Gs* ble påvist i 1980 og hvor ble det funnet høy tetthet av laksunger både i 1991 og 1992 (Mo, 1992).

Vi kjenner ikke årsakene til at det er variasjon i mottagelighet og respons mot *Gs* mellom laksestammer, men en nærliggende hypotese kan være at det er genetisk variasjon mellom laksestammer i motstandskraft mot parasitten. Dette understøttes av funn fra elver i våre naboland: I de Norrlandske elvene i Sverige som drenerer til Østersjøen, har laksungene et normalt antall av *Gs* (Malmberg, 1988); bl.a. i Torneälven har *Gs* ikke noen ødeleggende effekt på laksepopulasjonen (Antilla m.fl., 2008); laksunger av den russiske Neva-stammen har betydelig mer resistens mot *Gs* enn laksunger fra norske elver og Indalsälven i Sverige (Bakke m.fl., 1990, 1992, 2002; Jansen m.fl., 1996); i den russiske elva Keret der *Gs* har medført alvorlige epidemier tidligere, har situasjonen snudd og tettheten av laks er igjen høy noe som kan tyde på naturlig seleksjon og utvikling av resistens (Ieshko m.fl., 2008); og i Finland fører ikke parasitten til dødelighet eller skade på Baltisk laks og infeksjonsintensiteten er lav (Koski, 1996). Disse er noen av eksemplene som tyder på at det hos laks må være arvelig variasjon i motstandskraft mot *Gs*.

At det hos laks finnes en betydelig arvelig variasjon i overlevelse etter infeksjon med *Gs* ble dokumentert i en kontrollert infeksjonstest med laksunger fra Drammenselva (Salte m.fl., 2010). Hos et tilfeldig utvalg av de 11 % av laksungene som overlevde den to måneders lange testen, var gjennomsnitt antall parasitter per fisk 58 % lavere enn hos et tilfeldig utvalg av de som fortsatt levde en måned tidligere. Dette er i samsvar med Gilbey m.fl. (2006) som fant at medfødt og opparbeidet resistens mot *Gs* hos laks er under delvis genetisk kontroll noe som tyder på at i *Gs*-inifiserte vassdrag vil det naturlige utvalget mot parasitten over tid øke laksens evne til å overleve parasitten. Men det finnes ingen god og pålitelig dokumentasjon på at dette skjer og hvor fort det eventuelt skjer, noe vi har undersøkt i dette prosjektet ved å undersøke variasjon i overlevelse mellom stammer og mellom fisk innen både *Gs*-inifiserte og uinifiserte ville laksestammer med ulik infeksjonshistorikk.

På laksunger i norske vassdrag er det påvist tre ulike *Gs*-haplotyper (A, B og F). Haplotype A forekommer i de fleste inifiserte vassdrag i Norge (inkludert Driva), mens haplotype B er funnet i Skibotnelva og Signaldalselva, og haplotype F i Drammenselva og Lærdalselva (Hansen m.fl., 2003). Haplotype B er typisk i svenske inifiserte elver (Torneälven, Umeälven) som drenerer til Østersjøen og i russiske inifiserte elver som drenerer til Kvitsjøen og Finskebukta (Neva).

I Driva hvor *Gs* ble påvist i 1980 har det vært registrert en økning i laksefangsten de siste 10-15 årene, og i 2012 ble det fisket 9,3 tonn laks i elva. Til sammenlikning ble det fisket i gjennomsnitt 10,8 tonn laks i Driva i årene 1966-1975 og 2,0 tonn i årene 1994-1998 (Johnsen m.fl. 1999). Dette kan tyde på at den inifiserte laksebestanden i Driva over tid kan ta seg opp igjen. På den andre siden antyder studier av laksunger i Driva på at tettheten av eldre laksunger er svært lav. Mens det i 1977 ble funnet mer enn 30 eldre laksunger (1 år og eldre) pr. 100 m², var tettheten i 2012 litt over 2 laksunger/100 m² og i fire andre år på 2000-tallet har den ligget mellom 0,5 og 2,7 eldre laksunger/100 m² (Solem m.fl.,

2013, 2017). Beregning av smoltproduksjonen i Driva i 2008 viste også svært lav tetthet med 0,11 smolt pr. 100 m² (Arnekleiv m.fl., 2010). I årene 2013-2016 var fangstene av voksen laks i Driva forholdsvis beskjedne, med henholdsvis 2.6, 2.4, 2.0 og 5.0 tonn.

Strategien for villaksforvaltningen har siden 1986 vært å utrydde *Gs* fra norske elver, en strategi som er forankret i St. prp. nr. 1 2006-2007 (s. 168): «Regjeringa meiner målet for arbeidet med å nedkjempe *Gyrodactylus salaris* framleis skal vere å bli kvitt parasitten der dette er mogleg samtidig som risikoen for smittespreiing til nye område blir minimalisert». Siden 1975 er patogene varianter av *Gs* blitt påvist på laksunger i totalt 51 norske vassdrag (<https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/gyrodactylus-salaris>) inklusive på røye (*Salvelinus alpinus*) i flere innsjøer i Fustavassdraget i Nordland. Per 1. januar 2020 har 8 elver kjent forekomst av *Gs*, 38 elver er friskmelde etter behandling og 5 elver er under friskmelding (<https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/gyrodactylus-salaris>). Elvene som fortsatt er infisert, ligger i Driva-regionen og i Drammensregionen. En ikke-patogen variant av *Gs* er funnet på røye i flere vann med utløp i de øvre deler av Numedalslågen (Ramirez m.fl., 2014).

Fullskala rotenonbehandling har vært vellykket i små (nedslagsfelt <100 km²) og mellomstore (100-500 km²) vassdrag, men var tidligere lite vellykket i store (>500 km²) vassdrag. Det siste tiåret er flere store vassdrag behandlet. Blant disse ble Rana (nedslagsfelt 3800 km²) og Røssåga (2100 km²) friskmeldte i 2013. Men i Rana ble *Gs* igjen påvist 1. september 2014 og ble umiddelbart (4. oktober) behandlet med rotenon. I september 2015 ble andre og siste del av behandlingen gjennomført. Blant de nylig behandlede vassdragene er det utført rotenonbehandling i Steinkjervassdraget (nedslagsfelt 2100 km²) som ble friskmeldt i 2014, og i Vefsna (4100 km²) som ble friskmeldt i 2017. Lærdalselvi (nedslagsfelt 1200 km²) ble behandlet med kombinasjonsmetoden (surt aluminiumsulfat i hovedelva og rotenon i sideelver) i 2011-2012 og ble friskmeldt i 2017. Rauma (nedslagsfelt 1200 km²) ble behandlet med rotenon i 2013-2014 og ble friskmeldt i 2019.

De tre store vassdragene Driva, Drammenselva og Skibotnelva har vært infisert med *Gs* i om lag 30-40 år. I Driva er det bygget en fiskesperre som sto ferdig i 2017. Planen er å stoppe laksen ved fiskesperra i så mange år det tar før parasitten er dødd ut ovenfor sperra, og deretter kjemisk behandle elva nedenfor fiskesperra. I Drammenselva er det ingen fastlagt behandlingsplan, men det ble i 2015 nedsatt en arbeidsgruppe av Miljødirektoratet med formål å se på mulighetene for en fremtidig behandling av vassdraget. Arbeidsgruppen konkluderte med at *Gs* kunne utryddes fra regionen med kjent metodikk og anbefalte videre uttesting av en ny bekjempelsesmetode basert på klortilsetning (Hindar m.fl., 2018). Et lokalt settefiskanlegg er brukt til å produsere yngel for utsetting i sideelver i vassdraget ovenfor anadrom sone, samt smolt på anadrom strekning. Siste utsetting av smolt var fisk som ble tauet i merd ut av Drammensfjorden i 2018 og satt ut i vannlag med høyere saltinnhold. Skibotnelva ble behandlet med rotenon i 1988, i 1992 og 1995, og på nytt i 2015 og 2016 da parasitten ble igjen påvist i 1998.

Skulle det vise seg umulig å utrydde *Gs* i et eller flere store vassdrag er det mulig at laksen over tid vil kunne tilpasse seg parasitten (naturlig utvalg) ettersom det som nevnt ovenfor med stor sannsynlighet finnes betydelig arvelig variasjon i motstandskraft hos laks mot *Gs*.

I dette prosjektet undersøkte vi hvorvidt laksen i de tre elvene Driva, Drammenselva og Skibotnelva har opparbeidet økt motstandskraft mot parasitten gjennom naturlig seleksjon i elva (genetisk tilpassing) over flere laksegenerasjoner. Dette ønsket vi å påvise ved å undersøke grad av motstandskraft (målt som dødelighet i en kontrollert smittetest) og infeksjonsintensitet (antall

parasitter per fisk) hos laksunger etter laks fra de tre *Gs*-inifiserte vassdragene, og sammenlikne det vi finner med grad av motstandskraft hos laksunger etter laks fra *Gs*-uifiserte, nærliggende vassdrag for hvert av de tre *Gs*-inifiserte vassdragene.

5 Materiale og metoder

I smittetesten brukte vi laksunger etter villaks fra tre norske *Gs*-inifiserte (Skibotnelva, Driva og Drammenselva) og tre norske *Gs*-uifiserte (Altaelva, Eira/Surna/Toåa og Numedalslågen) laksestammer; dvs. en gyro-inifisert og en gyro-uifisert stamme i fra hver av tre geografiske regioner; i testen inkluderte vi også laksunger etter fisk fra den russiske elva Neva som renner ut i Finskebukta i Østersjøen og som er kjent for å ha en laksestamme med høg motstandskraft mot gyro (Tabell 1 og Appendiks I). Laksungene fra hver av de sju stammene var avkom etter 25 hannfisk og 25 hunnfisk. Stamfisken ble fanget i løpet av sommeren/høsten 2014, og strykning/befruktning ble gjort i løpet av oktober- november 2014 (Tabell 2).

5.1 De tre *Gs*-inifiserte stammene

Driva – avkom etter stamfisk fanget i kilenot ved Flåøya i Sunndalsfjorden (Figur 1). Stamfisken (35 hannfisk og 32 hunnfisk) ble fanget i løpet av juni-juli 2014 og ble oppbevart i et flytende kar nær kilenota (Figur 2) inntil de den 30. september ble transportert med båt til Nofima, Sunndalsøra, hvor de ble holdt i en 70 m² overbygd betongdam fram til kjønnsmodning. Den ny-befrukta rogn ble lagt inn i eget klekkeri hos Nofima, Sunndalsøra.

Drammenselva – avkom etter stamfisk fanga av Hellefoss-Åmot Kultiveringsanlegg, Hokksund, Buskerud (Figur 3). Etter at *Gs* ble påvist i 1987 har det blitt drevet en omfattende utsetting av klekkerilaks (yngel) ovenfor inifisert elv og i *Gs*-uifiserte sideelver, samt smolt i hovedvassdraget (til og med 2018).

Skibotnelva (Figur 4) – avkom etter stamfisk fra Haukvik genbank, Vinjeøra, Sør- Trøndelag.

Neva (Figur 5) – avkom etter stamfisk fra NINA Forskningsstasjon, Ims, Rogaland.

Ifølge Bakke m.fl. (1990) har *Neva*-fisken i dette smitteforsøket sin opprinnelse fra tre grupper fisk som ble klekket (i 1972, 1974 og 1976) ved Laukaa Central Hatchery Station, Finland og som var egg fra villaks fanget i elven *Neva* og som ble lagt inn og importert fra *Neva Hatchery Station*, Sovjetunionen. I mars 1983 ble egg fra Finland importert og klekket på Forskningsstasjon for ferskvannsfisk, Ims. To hundre av disse ble oppdrettet til foreldre for påfølgende generasjoner, det vil si at *Neva*-laksebestanden som ble brukt i de nåværende eksperimentene, representerer andre generasjon av de opprinnelige prøvene som ble oppdrettet i 1983.

5.2 De tre *Gs*-frie stammene

Eira/Surna/Toåa – avkom etter stamfisk fanga i disse tre elvene tilhører samme geografiske område som *Driva* (Figur 1). Den opprinnelige planen var å bruke materiale bare fra *Surna* (Figur 1), men fordi det ikke ble mulig å få tak i mange nok stamfisk fra *Surna*, ble det supplert med materiale i det vesentlige fra *Eira*, men også fra *Toåa* (Figur 1). *Toåa* renn ut i samme fjordsystemet (Todalsfjorden i Stangvikfjorden) som *Surna* (*Surnadalsfjorden* i Stangvikfjorden), mens *Eira* renn ut i et annet fjordsystem (*Eresfjorden/Langfjorden* i Romsdalsfjorden). Materialet fra *Surna* og *Toåa* fikk vi som øyerogn fra Statkraft Rossåa settefiskanlegg, Todalen, Møre og Romsdal, mens materialet fra *Eira* fikk vi som øyerogn fra Statkraft Energi Settefiskanlegg, Eresfjord.

Numedalslågen – avkom etter stamfisk fanga i Numedalslågen ved Hvitvingfoss (Figur 3). Numedalslågen tilhører samme geografiske område som Drammenselva. Dette materialet ble produsert av Lardal Jeger og Fiskerlag, Svarstad, Vestfold.

Altaelva (Figur 4) - avkom etter villaks som hadde gått en generasjon på NINA Forskningsstasjon, Ims. I 2009/2010 ble det strøket 6 hunner og 6 hanner (500 rogn per par) ved Alta (villfisk). Øyerogn (200 døgngader 16.3.2010) ble sendt til Ims og avkom etter 8 hunner og 8 hanner av dette materialet ble brukt som fisk i smitteforsøket. Den geografiske avstanden mellom Altaelva og Skibotnelva er større enn mellom de andre parene av *Gs*-uinfiserte og *Gs*-infiserte elver, men siden det ikke drives stamfiske etter laks i Troms fylke, var det ikke mulig å hente stamfisk nærmere.

5.3 Villaks eller oppdrettslaks

Fra hver av de 70 stamfiskene (35 hannfisk, 32 hunnfisk og tre med ukjent kjønn) som ble fanget i kilenot ved Flåøya, ble det ved ankomst Nofima, Sunndalsøra, tatt en vevsprøve (liten bit av fettfinnen) og en skjellprøve. Ved NINA, Trondheim ble disse prøvene brukt til å bestemme om fiskene var villaks eller oppdrettslaks. Rømt oppdrettslaks ble forkastet på bakgrunn av skjellkarakterer, og enkelte fisk klekket i naturen ble forkastet på bakgrunn av at de var genetisk mer lik oppdrettslaks enn villaks (Sten Karlsson, NINA, pers. medd.). Av de 70 stamfiskene ble seks (to hannfisk, én hunnfisk og tre med ukjent kjønn) klassifisert som oppdrettslaks og disse ble ikke brukt som foreldre ved produksjon av Driva-materialet.

Tilsvarende undersøkning ble gjort av NINA for stamfisken fanget i Surna/Toåa/Eira, Drammenselva og Numedalslågen. Fra Surna/Toåa/Eira fikk vi bare overført øyerogn etter villaks. Vevsprøve fra Drammenselva og Numedalslågen ble tatt ved strykning, men resultatene i ettertid viste at alle stamfiskene vi brukte fra Drammenselva og Numedalslågen var villaks.

5.4 Klekking og startfôring

Forsøksdesignet er vist i Figur 6. Materialet fra alle sju stammene ble lagt inn i eget klekkeri ved Nofima, Sunndalsøra. Materialet fra Driva ble lagt inn som ny-befrukta rogn, mens materialet fra de seks andre stammene kom til Nofima, Sunndalsøra som øyerogn i januar 2015 (Tabell 1). Rogna fra hver stamme ble lagt inn i mange identiske klekkebakker (Tabell 2), og ble startfôret i tre like 0.36 m² kar (i Hall 4) (Figur 7) med 280 yngel/kar for Altaelva og 1200 yngel/kar for de seks andre stammene. For grupperingen Surna/Toåa/Eira ble det startfôret totalt 1948 yngel; 958 (49.2 %) fra Surna, 279 (14.2 %) fra Toåa og 711 (36.5 %) fra Eira.

Da fisken var om lag 6 gram (15.09.2015) ble et tilfeldig utvalg av 100 fisk fra hvert 0.36 m² kar (300 fisk/stamme) overført til hvert av to 7 m² kar (i Hall 5). For Altaelva-stammen ble det overført 234 fisk til hvert av de to 7 m² kara. Forsøksoppsettet er vist i Figur 6. Fram til smitting med *Gs* 28.10.2015 døde 18 fisk i kar 5 (0.98 %) og 13 fisk i kar 6 (0.65 %).

5.5 Smittetest hos Nofima, Sunndalsøra

Den opprinnelige planen var å smitte fisken i de to karene med *Gs*-infiserte laksunger fra Driva. NINA fant i løpet av to dager med elektrofisking (80 laksunger 15.09.2015, 45 laksunger 24.09.2015), svært få parasitter på årsyngel i Driva og svært få eldre laksunger, som vanligvis er infisert med flere

parasitter. Vi brukte derfor de innfangete laksungene til å smitte og oppformere parasitter på et tilfeldig utvalg av 300 overskytende laksunger fra Drivastammen.

Etter et mislykket forsøk på smitting av laksen med Gs 29.09.2015, ble et nytt oppformeringsforsøk med de samme 300 fiskene startet 13.10.2015 med 80 infiserte laksunger som NINA fanget i Driva 8.10.2015. De 80 ble avlivet og satt sammen med de 300 fiskene i en 75 liters stamp med luftbobling. Etter ett døgn ble de 80 døde Driva-laksungene fjernet fra stampen etter at vi ikke fant noen parasitter på et sampel av dem, og luftboblinga ble erstattet med gjennomstrømmende vann. Oppformeringen pågikk i 16 dager i perioden 13.-29.10.2015.

De 2 x 2000 forsøksfiskene (i gjennomsnitt ca 17 gram) ble smittet torsdag 29.10.2015 i 2 kar, hvert med ca 550 liter vann (3,6 fisk/liter, 62 kg/m³) og 150 Gs-infiserte yngel. Etter ett døgn ble det satt på gjennomstrømmende vann i karet, og samme dag ble 150 Gs-infiserte fisk sjekket og funnet godt infiserte. Derfor ble det bestemt å la de 2 x 150 Gs-infiserte fiskene gå sammen med de 2 x 2000 fiskene til mandag 02.11.2015. Denne smittetesten ble avsluttet 20.01.2016, 84 dager etter smitte.

I løpet av den 84 dagers smittetesten ble død fisk fjernet fra hvert av de to smittekarene én gang per dag. De døde fiskene fra hver dag, ble lagt i en felles plastpose merket med dato og frosset for senere uttak av vevsprøver og måling av vekt og lengde. Det samme ble gjort for alle fiskene som overlevde testen.

I løpet av testen ble det tatt ut et tilfeldig utvalg av 50 fisk fra hvert kar på tre ulike tidspunkt: ved økende (dag 44 etter smitte), stor (dag 55 i kar nr. 5 og dag 63 i kar nr. 6) og avtakende (dag 63 i kr nr. 5 og dag 71 i kar nr. 6) dødelighet. Ved avslutning av forsøket ble det tatt ut et tilfeldig utvalg av 100 fisk fra hvert kar. Disse totalt 500 fiskene ble lagt på sprit for senere telling av antall parasitter per fisk.

5.6 Smittetest hos HÅK, Hokksund

For å undersøke i hvilken grad de sju stammene rangerer seg likt med hensyn til overlevelse når de ble smittet med haplotype A (fra laksunger i Driva) og F (fra laksunger i Drammenselva) ble 3005 yngel fra de sju stammene (200 fra Altaelva, 255 fra Surna/Toåa/Eira og 450 fra hver av de fem andre stammene) sendt til Hellefoss-Åmot Kultiveringsanlegg (HÅK), Hokksund, den 06.07.2015 der det ble gjennomførte en smittetest i to 1 m² kar med Gs-infisert yngel fra Drammenselva. Fisken ble smittet i 26 dager, fra 23.09.-til 18.10.2015 da alle så nær som tre fisk var døde, trolig på grunn av et svært høyt smittepress i de to små karene. Mangel på finansiering gjør at vi så langt ikke har fått genotypet (for sporing til stamme, far og mor) vevsprøvene fra disse fiskene. (Smittetesten var ikke definert som en del av prosjektet, men noe HÅK tilbød seg å gjøre på dugnad.)

5.7 Genotyping

I første del av prosjektet kunne vi spore 1304 av de totalt 1347 overlevende fiskene til rett laksestamme ved å genotype de med 12 mikrosatellitt-markører (i dette materialet med totalt 192 forskjellige alleler). Dårlig DNA-kvalitet i vevs-prøvene fra fiskene som døde i testen gjorde at det med disse mikrosatellitt-markørene ikke var mulig å regne ut separat overlevelse for Eira, Surna og Toåa, selv ikke når vi økte antall markører til 22 (med totalt 563 forskjellige alleler). Overlevelsen til laksungene fra disse tre stammene måtte derfor presenteres som et felles estimat for disse tre stammene (Eira/Surna/Toåa).

I den andre del av prosjektet genotypet vi totalt 442 foreldre og 4016 av deres avkom (2356 som døde i testen og 1705 som levde ved avslutning av testen) ved bruk av en ~ 55K aksiom Affymetrix SNP genotyping array (NOFSAL03). Av de døde kunne 2134 (eller 2013, se Tabell 3) (90.6 %) med høy sikkerhet spores til den ene eller begge av foreldrene, og tilsvarende 1697 (99.5%) av de levende; dvs. at 22 av de døde og 8 av de levende kunne ikke spores til sine foreldre. Dataene som kunne spores ble brukt for estimering av genetiske parametere (Tabell 3).

Da ganske mange (9.4 %) av de døde ikke kunne spores til sine foreldre, ble gjennomsnittlig overlevning ved slutten av testen for de sju undersøkte stammene, og forskjeller i overlevning mellom stammene, beregnet basert på antall fisk i hver stamme i hvert av de to smittekarene ved starten av testen og antall overlevende i hver stamme i hvert kar ved slutten av testen.

For GWAS (Genome-Wide Association Study) -analysen (se 5.10) fjernet vi i tillegg fisk med dårlige SNP signaler slik at vi for denne analysen satt igjen med SNP data om 636 av de døde og 1070 av de som overlevde testen, hver med ~23 631 SNPer etter filtrering.

5.8 Estimering av genetiske parameter

Arvegrader for motstandskraft mot *Gs* ble estimert med en såkalt lineær blandet individmodell med kar og stamme som faste effekter og dyr og feil som tilfeldige effekter (Modell 1), og ved bruk av program pakken ASReml (Gilmour m. fl., 2009), og som gir parameter estimater av motstandskraft mot *Gs* ved slutten av testen på den observerte (1=overlevde testen, 0=død i testen) skalaen. I tillegg brukte vi en ikke-lineær blandet far-mor modell med de samme to faste effektene som i den lineære modellen og med far-mor og feil som tilfeldige effekter (Modell 2), og som gir parameter estimater på den såkalte ikke-observerbare underliggende skalaen. I begge modellene ble slektskap mellom alle fiskene tatt hensyn til ved å addere den additive genetisk slektskapsmatrise (*A*) mellom fiskene til MME (Mixed Model Equations).

Hver modell ble brukt til å estimere arvegrad for motstandskraft mot *Gs* for hver av de sju stammene, et felles estimat for de tre norske *Gs*-uinfiserte stammene og et felles estimat for de tre norske *Gs*-infiserte stammene. I tillegg brukte vi Modell 1 med to egenskaper der motstandskraft mot *Gs* i hvert av de to smittekara ble sett på som to ulike egenskaper for på den måten å få et estimat av den genetiske korrelasjonen mellom disse to egenskapene.

Motstandskraft mot *Gs* kan også defineres som antall dager til en fisk dør. Fisker som lever ved slutten av testen vil da ikke ha fullstendige data for denne egenskapen (såkalte høyre sensurerte data). Den genetiske variasjonen for denne egenskapen, og av den genetiske korrelasjonen mellom denne egenskapen og motstandskraft mot *Gs* ved slutten av testen, estimerte vi for de norske stammene ved hjelp av en binær lineær individmodell med smittekar og stamme som faste effekter.

5.9 Populasjonsgenetikk

Naturlige genetiske forskjeller som av mange ulike årsaker kan oppstå mellom populasjoner, kan påvirke tolkninger av resultater fra genetiske assosiasjons analyser (se 3.10). For å kunne gi en god tolking av resultatene fra slike GWAS analyser (se 5.10) er det viktig å ha gode estimater av genetisk variasjon mellom fisk mellom og innen de aktuelle populasjonene. Til dette formål undersøkte vi genetisk variasjon innen og mellom foreldrefiskene med bruk av 3166 av de 50 000 SNPene med påvist

jevn og uavhengige fordeling over alle de 29 kromosomene. De 3166 SNPene ble analysert med en såkalt 'identity-by-state' analyse (IBS) i programmet Plink v1.7, og en flerdimensjonal skaleringsanalyse (MDS) for å identifisere genetisk struktur.

Hvor stor del av den totale genetiske variasjonen mellom fisk som er forklart av de fire geografiske regionene (Østersjøen, Nord-Norge, Sørøst-Norge, Vest-Norge) (AMOVA, F_{CT}), av de ulike stammene innen hver region (AMOVA, F_{SC}), og mellom fisk innen hver stamme (AMOVA, F_{ST}) ble analysert ved bruk av 5505 av de SNPene og programmet Arlequin v3.5. F_{ST} kan ha verdier fra 0.0 (ingen forskjell mellom to gitte regioner eller stammer, dvs. at de er genetisk like) til 1.0 (de to er helt ulike).

Genomisk slektskap mellom foreldrefisken i hver stamme og mellom foreldrefisk i ulike stammer ble estimert ved bruk av de samme 5505 SNPene ved hjelp av programmet Coancestry v1.0.19 (Wang, 2011) som estimerer slektskapet mellom alle par av individer ved hjelp av estimeringsmetoden Maximum Likelihood (Milligan, 2003). Innavlskoeffisienten til hver foreldrefisk ble beregnet ved hjelp av programmet Coancestry og metoden til Ritland (1996).

Naturlig utvalg kan etterlate seg et avtrykk i en populasjons genom. Genomiske regioner som er påvirket av seleksjon, kan ofte karakteriseres av redusert genetisk mangfold og lange områder med homozygote regioner rundt genet som har blitt påvirket av det naturlige utvalget, kjent som et "selective sweep". Stammer som utveksler gener på grunn av streifing, viser små forskjeller for nøytrale gener og gener som påvirkes av naturlig utvalg i begge stammer. Derimot kan det for gener som er påvirket av naturlig seleksjon i kun én av to gitte stammer, oppstå store forskjeller i allelfrekvenser mellom de to stammene. For å identifisere «selective sweeps» ble SNPene for forelderen til hver stamme filtrert med hensyn på deres kvalitet (signal, call-rate, Marees m.fl., 2018), unntatt av Eira og Surna som ble slått sammen til en gruppe (Toåa ble ekskludert pga. få foreldrefisk). Etter denne kvalitetssjekken satt vi igjen med 40985 SNPer for bruk i de videre analysene.

En såkalt "sliding window" analyse for hver foreldrestamme ble gjort for å identifisere regioner i genomet som har lange strekninger med homozygositet (ROH, Runs Of Homozygosity, regioner av homozygoti). Til dette formålet brukte vi programmet Plink v1.9 med standard innstillinger som identifiserer en ROH på et individ når det er minst 100 homozygote SNPer på en strekning av et kromosom som er lengre enn 1000 kbp. For hver stamme og hver SNP beregnet vi andelen individer der vi oppdaget homozygote regioner (ROH). Forskjeller i genetisk variasjon for den *Gs*-infiltrerte og *Gs*-uinfilerede stammen i hver av de tre regionene (Nord-Norge, Vest-Norge, og Sørøst-Norge) ble estimert for å identifisere SNPer som avviker fra nøytral populasjonsteori, og som derfor sannsynligvis er under seleksjon; noe som ble gjort ved hjelp av en såkalt FST avvik analyse (outlier-approach) i programmet Bayescan med standard innstillinger (Foll og Gaggioti, 2008).

5.10 GWAS – Genome-Wide Association Study

Helgenom assosiasjon søk etter QTL (Quantitative Trait Loci) for motstandskraft mot *Gs* målt som død/levende ($y=0/1$) ved slutten av testen ble gjort ved hjelp av en lineær blandet individmodell med en fast effekt av smittekar, en fast effekt av stamme og en fast effekt av de 20 første prinsippal komponentene beregnet fra en genomisk slektskapsmatrise av de ~23 631 SNPene; de partielle regresjonskoeffisientene (α =substitusjonseffekt) av y på hver SNP (kodet som 0=A1A1, 1=A1A2, 2=A2A2); og fisk og feil som tilfeldige effekter. Den genomiske slektskapsmatrisen (G) ble addert til de tilfeldige individ effektene i MME. De 20 prinsippalkomponentene ble inkludert for å redusere faren for

å få falske positive assosiasjoner pga. forskjeller i frekvenser av nøytrale genetiske markører (dvs. markører linket til gener med ingen funksjonell betydning) når vi som i denne studien analyserer data fra ulike populasjoner/stammer i samme analyse.

GWAS-resultatene er vist som såkalte "Manhattan-plot", et bilde av assosiasjonsbetydningen (Y-aksen) av enkelte SNPer fordelt på bestemte steder langs alle de 29 kromosomene (X-aksen). Når et gen har en sterk funksjonell betydning på en egenskap, kan dette komme til uttrykk som en signifikant assosiasjon hvis det er mange SNPer som er genotypet i det aktuelle området av genomet.

Hvor stor del av den genetiske variasjonen i overlevelse ved slutten av testen som blir forklart av hver SNP ble undersøkt ved hjelp av Modell 1 ved å kvantifisere hvor mye den genetiske variasjonen ble redusert når én eller flere av de fire mest signifikante SNPene (på kromosom ssa03, ssa06, ssa11 og ssa26) ble inkludert som klassevariabler i Modell 1. Det høye antall fisk i analysen med A-matrise (2134 døde og 1697 overlevende fisk) gjorde det mulig å få et estimat av hvor mye hver SNP forklarte av den totale genetiske variasjonen for hver stamme, noe som ikke var mulig med G-matrise (636 døde og 1070 overlevende) på grunn av det langt lavere antall fisk i denne analysen.

Fra Modell 1 (med hver SNP som klassevariabel) fikk vi også et estimat av overlevelsen for hver av de tre genotypene (A1A1, A1A2, A2, A2) for hver SNP, noe som gir et godt estimat av om effekten av hvert allel er additiv eller ikke. Resultatene fra denne modellen viste at effekten i stor grad var additiv og at vi derfor kunne estimere substitusjonseffekten (den additive genetiske effekten) for overlevelse for de to allelene i hver SNP ved hjelp av en tilsvarende modell (Modell 2), men der de fire SNPene (på kromosom ssa03, ssa06, ssa11 og ssa26) ble inkludert som kovariabler ($0=A1A1$, $1=A1A2=A2A1$, $2=A2A2$), og som gir et estimat av den partielle regresjonskoeffisienten (marginaleffekten) av de to allelene i hver SNP korrigert for den/de andre SNPene.

For hver av de to modellene brukte vi data fra a) hver av de sju undersøkte stammene, b) alle de seks norske stammene, c) alle de tre norske *Gs*-inifiserte stammene, og d) de tre norske *Gs*-uinifiserte stammene. Eira/Surna/Toåa ble behandlet som én stamme.

6 Resultater

6.1 Forskjeller i motstandskraft mellom stammer

Noen nevneverdig dødelighet i smittetesten ble ikke observert før 30-35 (kar 6) og 35-40 (kar 5) dager etter smitte (Figur 8 og Figur 9). Forsøket ble avsluttet 84 dager etter smitte etter at det bare ble registrert enkelte døde fisk de siste to (kar 6) og tre (kar 5) ukene av testen. Ved avslutning av forsøket levde fortsatt 33.2 % (kar 5) og 39.6 % (kar 6) av fiskene.

Estimater for prosent overlevende fisk for de sju undersøkte stammene (gjennomsnitt for de to karene) kan punktvis sammenfattes slik:

- Laksungene fra Driva hadde høyest overlevelse og de fra Alta lågest overlevelse av de seks undersøkte norske stammene: Driva 37.1 %, Eira/Surna/Toåa 34.9 %, Drammenselva 32.4 %, Skibotnelva 27.6 %, Numedalslågen 24.7 % og Alta 18.8 % (Figur 10).
- Som ventet klart høyest overlevelse hos laksunger av den motstandsdyktige Neva stammen (69.3%), noe som var 37.4 ± 2.2 %-poeng ($P < 0.001$) høyere overlevelse enn gjennomsnittet for de tre norske *Gs*-inifiserte stammene.
- Systematisk høyere overlevelse hos de norske *Gs*-inifiserte stammene sammenlignet med de norske *Gs*-uifiserte stammene (6.1 ± 1.6 %-poeng, $P < 0.001$).
- Laksunger fra den *Gs*-inifiserte Skibotnelva hadde statistisk signifikant høyere overlevelse enn laksunger fra den *Gs*-uifiserte Altaelva (9.0 ± 2.9 %-poeng; $P=0.002$); og laksunger fra den *Gs*-inifiserte Drammenselva hadde statistisk signifikant høyere overlevelsen enn laksunger fra den *Gs*-uifiserte Numedalslågen (6.7 ± 2.7 %-poeng; $P=0.014$).
- Laksunger fra den *Gs*-inifiserte Driva hadde høyere overlevelse enn laksunger fra *Gs*-uifiserte Eira/Surna/Toåa, men denne forskjellen var ikke statistisk signifikant forskjellig fra null (2.8 ± 2.7 %-poeng; $P=0.30$).

6.2 Arvegrader for motstandskraft mot *Gs*

For hver av de norske stammene ble det funnet en betydelig genetisk variasjon i motstandskraft mot *Gs* ved slutten av smittetesten, og med tilnærmet lik arvegrad for de tre norske *Gs*-inifiserte (0.29 og 0.47 på henholdsvis observert og underliggende skala) og de tre norske *Gs*-uifiserte (0.34 og 0.55) stammene (Tabell 4). For Neva var arvegraden mye lavere (0.09 og 0.11) og ikke statistisk forskjellig fra null ($P > 0.05$), mest trolig fordi denne stammen synes å være betydelig innavlet (Tabell 5).

Den genetiske korrelasjonen mellom motstandskraft mot *Gs* i de to smittetest karene var høy (0.92 ± 0.08 , for de seks norske stammene). Dette viser at familiene i de to smittetekarene rangerer seg svært likt med omsyn til motstandskraft mot *Gs*, og en ytterligere bekreftelse på en betydelig genetisk variasjon i motstandskraft mot *Gs* i de seks norske laksestammene.

For egenskapen antall dager til død, ble arvegraden funnet å være 0.25 ± 0.04 , og med en genetisk korrelasjon på 0.60 ± 0.10 til motstandskraft mot *Gs* ved slutten av testen. Denne relativt lave genetiske korrelasjonen kan tyde på at antall dager til død og overleving (1/0) er to ganske ulike egenskaper.

6.3 Populasjonsgenetikk

Genetisk struktur analysen av foreldrene (MDS) basert på SNPer, viser klart tre ulike fylogenetiske stammer; Baltiske hav: Neva, Nord-Norge: Altaelva og Skibotnelva, Vest-/Sørøst-Norge: Driva, Eira, Surna, Toåa, Numedalslågen og Drammen (Figur 11A), og noe genetisk differensiering mellom stammer i Sørøst-Norge (Drammen og Numedalslågen) og Vest-Norge/Møre og Romsdal (Driva, Eira, Surna, Toåa) (Figur 11B). Slike parvise F_{ST} verdier mellom elvene er vist som en såkalt 'heat-map' i Figur 12. Den viser at genetisk likhet er størst mellom to elver i samme region og minst mellom elver som er geografisk adskilt fra hverandre. Genetisk likhet var størst mellom de fire elvene i Møre og Romsdal, med Driva og Surna som de mest like ($F_{ST} = 0.001$). AMOVA resultatene viser at av den totale genomiske (SNP) variasjonen mellom fisk i hele datasettet, kunne 10.2% forklares ved forskjeller mellom de fire geografiske gruppene, 3.2% av forskjeller mellom elver innenfor de fire geografiske gruppene, mens hele 86.7% av denne SNP-variasjonen kunne forklares ved forskjeller mellom fisk i samme stamme. Dette tyder på at det som forventet skjer streifing i større grad av fisk mellom elver innenfor én region sammenlignet med mellom elver i ulike regioner. Grad av genomisk slektskap mellom fisk i samme stamme og mellom fisk fra ulike stammer, tyder på det samme (Tabell 5).

Den høye gjennomsnittlige slektskapen (Tabell 5) og den høye innavlskoeffisienten (Tabell 6) for dette fiskematerialet fra Nevastammen (fra Neva via Finland til NINA Forskningsstasjon, Ims), har sitt opphav i få foreldre og/eller at materialet én eller flere ganger er blitt reproduisert ved å krysse nære og få slektninger. Verdt å nevne er også den relative høye innavlskoeffisienten (F) for de to stammene som prosjektet fikk fra Haukvik genbank (Skibotnelva, $F=0.092$) og NINA Forskningsstasjon, Ims (Altaelva, $F=0.086$), sammenlignet med gjennomsnittet for de andre norske stammene ($F=0.038$), noe som også kan tyde på at disse to stammene er blitt laget og/eller reproduisert basert på få foreldre.

Identifisering av genom-regioner med lange strekninger av homozygositet (ROH) viste varierende antall ROH i hver stamme, og den *Gs*-inifiserte stammen i et geografisk område hadde i gjennomsnitt flere ROH enn den *Gs*-uifiserte stammen i det samme geografiske området (Tabell 7). ROH kan skyldes både innavl og seleksjon og det er derfor viktig å sammenligne de genomiske områdene der ROH forekommer både i den *Gs*-inifiserte og den *Gs*-uifiserte stammen for å kunne avgjøre om ROH er unik for en stamme eller forekommer parallelt hos den *Gs*-uifiserte stammen i samme region (parallell seleksjon). F_{ST} -avvik analysen identifiserte SNPer med store frekvensforskjeller mellom de *Gs*-inifiserte og den *Gs*-uifiserte stammene i hvert av de tre geografisk områdene; totalt 32 SNPer med signifikante forskjeller mellom Drammen og Numedalslågen, 160 mellom Skibotn og Altaelva, og 36 mellom Driva og Eira/Surna (Figur 13). Av disse SNPene ble 28 funnet i to av de tre geografiske områdene. På kromosom 26 var SNPer med signifikante avvik plassert på midten av den ROH-en som ble identifisert i alle de tre norske *Gs*-inifiserte stammene, i tillegg til Neva, men som ikke ble funnet i de *Gs*-frie stammene (Figur 14 og Figur 15). På kromosom 6 var det også en ROH som ble funnet i to av de tre norske *Gs*-inifiserte stammene (Skibotnelva og Drammenselva) og Neva, men ikke i Driva (Figur 15). SNP-er i disse områdene på genomet viste signifikante frekvensforskjeller mellom Skibotnelva og Alta, og store men ikke signifikante forskjeller mellom Drammenselva og Numedalslågen. Dette kan tyde på mulig parallell seleksjon; de vil si, naturlig utvalg som har funnet sted uavhengig av hverandre i de to elvene i hver region.

6.4 GWAS- Hel-Genom Assosiasjon Søk

Et felles «Manhattan-plot» for de seks norske stammene (Figur 16), viser sterke signaler fra fire (på kromosom 3, 6 og 26) og tre (på kromosom 11) signifikante SNP'er (Bonferroni-korrigert signifikant terskel på 2.12×10^{-6}), noen enslige signifikante SNP'er på kromosom 5, 10, 14, 15, 16 og 21, og to fjerntliggende signifikante SNP'er på hvert av de tre kromosomene 12, 23 og 25. Disse enslige signifikante SNP'ene kan skyldes at de ligger nær andre signifikante SNP'er, og kan derfor være falske SNP-assosiasjoner på grunn av heterogenitet i data fra flere stammer. Figur 17 viser at tilsvarende assosiasjoner for de samme SNP'er ble funnet hos både de tre norske *Gs*-infiltrerte og de tre norske *Gs*-uifiltrerte stammene. Et «Manhattan-plot» for hver av de sju undersøkte stammene er vist i Appendiks II, og viser i grove trekk det samme bildet som i Figur 16 og Figur 17, og er slik sett en ytterligere bekreftelse på at dette er QTL'er med signifikante effekter på motstandskraft mot *Gs*.

Figur 18 (G-matrise) viser at for alle de seks norske stammene forklarte den mest signifikante SNP'en på hvert av de fire kromosomene, fra om lag 30 til 60 % av den genetiske variasjonen i egenskapen overlevelse ved slutten av testen. Resultatet var likt for de *Gs*-uifiltrerte og de *Gs*-infiltrerte stammene. Tilsvarende estimater for de andre signifikante SNP'ene på de fire kromosomene er viste i Tabell 8, som også viser substitusjonseffekten for det ene allelet ($A1 = -A2$) på hver av disse signifikante SNP'ene.

Ved bruk av A-matrise i Model 1 (Figur 18) ble andelen av den genetiske variasjonen i overlevelse ved slutten av testen som kunne forklares av hver SNP, funnet å være betydelig lavere enn ved bruk av G-matrise, spesielt for SNP'en på kromosom 3 (ssa3) og 11 (ssa11) og som for de seks norske stammene sett under ett ikke var signifikant ($P > 0.05$) ved bruk av A-matrise. Disse resultatene stemmer med at de to kromosomene ssa03 og ssa06, og de to kromosomene ssa11 og ssa26, er antatt å være homologe kopier av hverandre (Lien m.fl., 2016).

De to signifikante SNP'ene på kromosom ssa06 og ssa26 forklarte hver for seg 27.1 % (ssa06) og 19.6 % (ssa26) av den totale genetiske variasjonen, og til sammen 37.6 % når begge disse SNP'ene var inkludert i modellen samtidig, dvs. også en betydelig lavere andel enn ved bruk av G-matrise. For de *Gs*-infiltrerte og de *Gs*-uifiltrerte stammene var prosentene henholdsvis 29.1 % og 25.2 % for ssa06, og 19.6 % og 15.2 % for ssa26 (ikke vist i noen figur). For hver stamme ble det for SNP'ene på kromosom ssa06 og ssa26, funnet tilsvarende resultater med to unntak der en inkludering av SNP'en på kromosom ssa06 i den statistiske modellen resulterte i en betydelig økning i den genetiske variasjonen, 20.8 % Eira/Surna/Toåa og 18.3 % for Neva (ikke vist i noen figur).

Figur 19 viser at for de seks norske stammene sett under ett er effekten av hver SNP på overlevelsen ved slutten av smittetesten tilnærmet additiv for de tre mest signifikante SNP'ene på kromosom ssa06, ssa11 og ssa26. Dette gjør at substitusjonseffekten av de to allelene i hver SNP kan estimeres ved å inkludere hver av de fire SNP'ene som kovariabler i den statistiske modellen og slik få estimert partielle regresjonskoeffisienter for de to allelene i hver SNP; dvs. marginaleffekten av allelene i hver SNP korrigert for effekten av de to allelene i de tre andre SNP'ene.

Figur 20 viser at den partielle regresjonskoeffisienten (substitusjonseffekten, Model 1 med A-matrise) for de to allelene for SNP'ene på kromosom ssa06 og ssa26, var ganske like for de seks norske stammene. De partielle regresjonskoeffisientene for allelene for SNP'ene på kromosom ssa03 og ssa11, var lave og ikke signifikant forskjellige fra null, noe som er i samsvar med den svært lave andelen av den totale genetiske variasjonen i overlevelse disse to SNP'ene forklarer (se Figur 18).

Størrelsen på de partielle regresjonskoeffisientene for de to signifikante SNPene tilsvarer en økning i overlevelsen på i gjennomsnitt 20.6 % for SNPen på ssa06 og 17.1 % for SNPen på ssa26 ved å bytte ut det ugunstige allelet i hver SNP med det gunstige, og med en samlet effekt på 37.7 % for disse to SNPene. Dette betyr at en fisk som er homozygot for det gunstige allelet vil ha 75.4 % (=2x37.7 %) økt sannsynlighet for å overleve testen sammenlignet med fisk som er homozygot for det ugunstige allelet.

Det var en tendens til at den partielle regresjonskoeffisienten for to allelene i SNPene på kromosom ssa06 var større for de tre norske *Gs*-inifiserte stammene enn for de tre norske *Gs*-uifiserte stammene, men denne forskjellen var ikke signifikant forskjellig fra null (0.043 ± 0.035 , $P > 0.05$).

For Neva var de partielle regresjonskoeffisientene for allelene i SNPene på kromosom ssa06 og ssa26 mindre eller av samme størrelsesorden som for de norske stammene, mens de tilsvarende regresjonskoeffisientene for allelene på kromosom ssa03 var vesentlig større enn for de norske stammene.

Figur 21 viser at Model 1 med G-matrise gir partielle regresjonskoeffisienter av om lag samme størrelsesorden for allelene for hver SNP på kromosom ssa03, ssa06, ssa11 og ssa26, og av samme størrelsesorden som de partielle regresjonskoeffisientene for allelene for hver SNP på kromosom ssa06 og ssa26 fra Model 1 med A-matrise; mens de partielle regresjonskoeffisientene for allelene for SNPene på kromosom ssa03 og ssa11 var vesentlig mindre som vist tidligere (Figur 20). Resultatene fra bruk av G-matrisen kan tyde på at de to kromosomene ssa03 og ssa06, og de to kromosomene ssa11 og ssa26, ikke nødvendigvis er homologe kopier av hverandre som antydnet tidligere (Lien m.fl., 2016), eller at det senere over mange generasjoner er blitt skapt ny genetisk variasjon gjennom mutasjoner.

6.5 Overlevelse for ulike SNP genotyper

Figur 21 og Figur 22 viser betydelige forskjeller i overlevelse (%) ved slutten av smittetesten for fisk med ulike genotyper for de to mest signifikante SNPene (ssa06/ssa26); med svært lav overlevelse for fisk som er homozygote for begge de to ugunstige SNP-allelene til 100 % overlevelse for fisk som er homozygote for begge de to gunstige SNP-allelene eller homozygot for den ene og heterozygot for den andre. Dette tyder på at seleksjon av stamfisk med omsyn til de mest gunstige av disse to SNP-genotypene vil kunne ha en betydelig effekt på overlevelse hos fisk i *Gs*-inifiserte laksestammer.

7 Diskusjon

Laksungene fra de tre norske *Gs*-inifiserte stammene hadde høyere overlevelse enn laksungene fra de tre norske *Gs*-uifiserte stammene. Hvis vi antar at det var minimale forskjeller i motstandskraft mot gyro mellom de seks norske laksestammene før tre av dem ble inifiserte med *Gs*, tyder våre resultater på at det har skjedd et naturlig utvalg for større motstandskraft mot gyro i de tre *Gs*-inifiserte laksestammene i perioden etter de ble inifiserte. Det er som forventet, da det i smittetesten ble funnet en betydelig genetisk variasjon i motstandskraft mot gyro, i alle de tre *Gs*-inifiserte norske stammene. Dette samsvarer også med resultater fra den tidligere nevnte smittetesten med fisk fra den *Gs*-inifiserte Drammenselva (Salte m.fl., 2010) hvor arvegraden for motstandskraft mot *Gs*, ble funnet å være 0.32 ± 0.10 på den underliggende skalaen (0.17 på den observerte $1/0$ skalaen), mens det tilsvarende estimatet for Drammenselva i denne studien var så høy som 0.87 ± 0.06 . Det kan være flere mulige årsaker til denne forskjellen, for eksempel ulike fiskematerialer, smittepresset eller den mye lavere overlevelsen ved slutten av testen (11.3 %) i den nevnte studien. En annen mulige årsak kan være at Salte m.fl. (2010) inifiserte fisken fra Drammenselva med *Gs*-haplotype F fra Drammenselva, mens fisken fra Drammenselva i denne studien ble inifisert med *Gs*-haplotype A fra Driva.

Den store genetiske variasjonen i motstandskraft mot *Gs* i hver av de seks norske stammene, viser at laksestammer i *Gs*-inifiserte vassdrag over tid vil kunne opparbeide seg større motstandskraft mot *Gs*, og slik vil kunne tilpasse seg et samliv med parasitten. Forskjellene i overlevelsen mellom laksunger fra inifiserte og uifiserte stammer i de tre geografiske gruppene (Skibotnelva og Altaelva, Drammenselva og Numedalslågen, og Driva og Eira/Surna/Toåa) kan skyldes: (a) større streifing av gytefisk med høy motstandskraft mot gyro mellom nærliggende laksestammer (Driva og Eira/Surna/Toåa) sammenlignet med mer fjerntliggende (Skibotnelva og Altaelva), (b) hvor lenge de tre *Gs*-inifiserte elvene har vært inifisert med *Gs*, (c) ulik praksis for kultivering med klekkerifisk som ikke har vært utsett for *Gs* (se faktaboks), og (d) ulikt innslag av rømt oppdrettslaks i elvene. For eksempel vil trolig to runder med rotenonbehandling av Skibotnelva og utsett av usmittet klekkeriyngel etter foreldre fra tre *Gs*-uifiserte elver (Målselva, Nordreisa og Altaelva) ha redusert effekten av den naturlige seleksjonen for større motstandskraft mot *Gs* i denne elven, og dermed redusert overlevelsen til laksungene fra Skibotnelva. Overlevelsen til laksungene fra Drammenselva ville trolig ha vært høyere visst ikke usmittet klekkeri-yngel har blitt satt ut hvert år i *Gs*-uifiserte sideelver (og smolt i hovedvassdraget), noe som trolig har redusert styrken på den naturlige seleksjonen for større motstandskraft mot parasitten. At overlevelsen av laksunger fra Driva ikke var signifikant høyere enn av laksunger fra Eira/ Surna/Toåa, var uventet. Men at laksungene fra Driva i smittetesten hadde høyest overlevelse av de seks undersøkte norske stammene, kan tyde på at det også har skjedd et naturlig utvalg for større motstandskraft mot *Gs* i Driva, spesielt etter 2002 – det siste året det ble satt ut usmittet klekkeri-yngel i Driva. Fisk med økt resistens kan ha streifet fra Driva og de fem andre *Gs*-inifiserte elvene i Driva-regionen, til spesielt Surna og Toåa, og fra de sju *Gs*-inifiserte elvene i Rauma-regionen til Eira (se faktaboks). At det gjennomsnittlige slektskapet mellom Driva-fiskene bare var marginalt høyere enn mellom Driva-fiskene på den ene siden og Eira/Surna/Toåa-fiskene på den andre siden, tyder også på betydelig utveksling av genetisk materiale ved streifing av fisk mellom Driva, Eira, Surna og Toåa. Det relativt høye slektskapet mellom fisk i Driva og Surna har nok også sin forklaring i utsett av smolt fra Surna i Driva tidlig på 1980-talet (se faktaboks). Høyt slektskap mellom laksestammer i denne regionen kan også skyldes at laksestammer i Møre og Romsdal lenge har hatt betydelig større innslag av oppdrettslaks enn laksestammer i de to andre regionene som er med i dette forsøket (Diserud m.fl., 2019). Resultatene i dette forsøket gir imidlertid ikke grunnlag for å kvantifisere

effekten av noen av de ovenfor nevnte faktorene på den observerte forskjellen i overlevelsen hos laksunger fra de seks norske laksestammene.

Størrelsen på den genetiske korrelasjonen mellom antall dager til død i smittetesten og egenskapen død/levende ved slutten av testen (0.60 ± 0.10), tyder på at dette er to forskjellige egenskaper, men ble på grunn av minst to ulike årsaker estimert fra en ikke optimal statistisk modell: manglende data for egenskapen antall dager til død for de fiskene som overlevde testen, og at noen av disse kunne være ikke-mottakelige for *Gs* (resistente) og derfor ikke ville dø av *Gs* selv om testperioden ble forlenget utover den 84 dagers testperioden. Derfor bør de estimerte genetiske parametre for egenskapen antall dager til død, re-estimeres ved hjelp av en klassisk overlevelsesmodell (survival analyses) som tar hensyn til de høyre sensurerte data for de fiskene som overlevde testen (Ducrocq og Sölkner, 1998), eller med en såkalt 'sequential threshold cure model' som også tar hensyn til at noen av de overlevende fiskene kan være resistente (Ødegård m.fl., 2011). Om den sistnevnte modellen er mer egnet enn en klassisk overlevelsesmodell, er avhengig av om antall dager til død er en viktigere egenskap enn død/levende ved slutten av en test der dødeligheten har flatet ut og svært få fisk dør. Hvis død/levende ved slutten av testen er den viktigste egenskapen, er feilen ved å bruke en klassisk overlevelsesmodell ubetydelig, men kan være av betydning hvis egenskapen antall dager til død viser stor genetisk variasjon og er lavt genetisk korrelert til død/levende ved slutten av testen (Ødegård m.fl., 2011).

Den genetiske korrelasjonen mellom antall dager til død og død/levende ved slutten av testen, kan også være påvirket av størrelsen på den genetiske korrelasjonen mellom tilvekst og de to nevnte egenskapene, men denne korrelasjonen finnes det ikke noe estimat for. I prosjektet har vi vekstdata på en gruppe fisk fra de samme familiene, men som ikke ble infisert med *Gs* og er slik sett et datasett som kan gi oss et estimat av denne genetiske korrelasjonen. Men disse fiskene må først genotypes slik at de kan spores til sine foreldre og stamme.

For en egenskap som viser genetisk variasjon og er under seleksjon i en populasjon, vil allelfrekvenser i det aktuelle området på genomet som påvirker egenskapen, endre seg over tid og til slutt føre til fiksering av de fordelaktige allelene (homozygositet) i populasjonen. I en nærliggende populasjon som ikke er påvirket av det samme seleksjonstrykket mot *Gs*, vil allelfrekvensene i det samme genområdet være stabile forutsatt at populasjonen er stor og det ikke skjer noen innkryssing med fisk fra andre populasjoner. Uavhengige deteksjoner av homozygositet i det samme området av kromosom 26 i mer enn 6 % av alle foreldre fra de *Gs*-infiserte elvene, og fraværet av homozygositet hos noen foreldre fra de *Gs*-uinfiserte elvene i det samme området, tyder på at det finnes genetisk variasjon for motstandskraft mot *Gs* i dette området av kromosom 26.

Påvisningen av SNP'er som viser betydelig avvik fra det vi kan vente å finne for nøytrale alleler i uavhengige parvise sammenligninger av *Gs*-infiserte og *Gs*-uinfiserte stammer indikerer også at seleksjon for økt motstandskraft mot *Gs* skjer parallelt i de *Gs*-infiserte stammene og med effekt på frekvensen av SNP'er i den aktuelle regionen på kromosom 26, noe som indikerer en selektiv egnethet av en genetisk variant i forhold til en annen. I en *Gs*-infisert stamme kan en derfor forvente at andelen individer med den gunstige genetiske varianten vil øke for hver ny generasjon.

I Nevastammen var andelen foreldre som hadde homozygositet på det aktuelle segmentet på kromosom 26 større enn 20 % (Figur 15). Det er videre interessant at den mest signifikante SNP'en på kromosom 26 hos de norske stammene ligger i det samme området på dette kromosomet som hos

Neva; og med unntak av Driva hadde de to andre *Gs*-inifiserte stammene homozygositet i samme region på kromosom 6. Foreldrene fra de to *Gs*-frie stammene i Møre & Romsdal (Eira og Surna) viste liten grad av homozygositet i denne regionen på kromosom 6, noe som ikke ble funnet i de to andre *Gs*-frie stammene (Alta og Numedalslågen). Forekomsten av denne regionen på kromosom 6 kan skyldes streifing av gytefisk fra de nærliggende *Gs*-inifiserte stammene i Driva og Raumaregionen.

GWAS analysen for de seks norske stammene viste at to SNPer som hver for seg forklarte 27.1 % (ssa06) og 19.6 % (ssa26), og til sammen (37.6 %) av den genetiske variasjonen i overlevelsen ved slutten av smittetesten. Dette er i samsvar med Gilbey m.fl. (2006) som hos avkom etter en F1 hann (som var avkom etter 2 stk skotsk River Cononhunner som ble krysset med 2 stk Nevahanner) og en skotsk Cononhunn og en Nevahunn fant 10 genomiske regioner som forklarte opptil 27.3% av den totale variasjonen i antall lus per fisk. En av disse markørene fra Gilbey m.fl. (2006) er plassert på Ssa06, en kort avstand (1.7 Mb) fra en av SNPene i denne studien (AX-87246192) som forklarte 13.9 % av variasjonen i overlevelse (Tabell 8). Sammenfallende resultater fra to uavhengige studier fungerer som en validering av den genetiske assosiasjonen av disse markørene med motstandskraft mot *Gs*. Dette er så betydelige andeler av den totale variasjonen i antall *Gs* per fisk at det muliggjør MAS (Markør Assistert Seleksjon) for økt motstandskraft mot *Gs* i *Gs*-inifiserte ville laksestammer hvor en utrydding av parasitten ikke er mulig. En måte å gjøre dette på er å fange en betydelig andel av de fiskene som kommer tilbake til elven og genotype disse for de to nevnte SNPene (for eksempel når de passerer en fiskefelle/fisketrapp nær sjøen), og bare slippe videre dem med de mest gunstige SNP-genotypene. Fordi frekvensen av de to SNP-allelene var om lag 50 %, kan en trolig oppnå en stor positiv effekt bare ved å ikke slippe videre de som er homozygote for det ugunstige allelet på begge SNPene eller homozygot for den ene og heterozygot for den andre. I det tidligere nevnte materialet fra Drammenselva (Salte m.fl., 2010) ble det derimot ikke funnet noen signifikante SNP-markør assosiert til prosent overleving eller dager til død i smittetesten (Karlsson m.fl., 2020).

Ettersom infeksjonstesten ble utført med *Gs*-inifisert yngel fra Driva (haplotype A), bør det undersøkes om de to nevnte SNPene har en lignende effekt på resistens mot *Gs* hos laksunger smittet med de to andre *Gs*-haplotypene i Norge: haplotype B som finnes i f.eks. Skibotnelva og haplotype F som finnes f.eks. i Drammenselva, og om disse SNPene representerer en genetisk motstand generelt mot *Gs*. En indikasjon på en slik generell effekt kan en få ved å lete etter seleksjonssignaturer for disse SNP-ene hos laksunger fra stammer inifisert med haplotype B og F.

I følge Hansen m.fl. (2003) tilhører haplotypene A, B og F forskjellige genetiske grupper: *Gs*-haplotype A og B tilhører klad (I) og haplotype F klad (III), noe som kan medføre at valg av *Gs*-haplotype i en smittetest ikke nødvendigvis er uvesentlig. Hvis laksunger fra den *Gs*-inifiserte Skibotnelva (klad I) og den *Gs*-inifiserte Drammenselva (klad III) hadde blitt smittet med sine respektive haplotyper som den naturlige seleksjonen spesifikt har virket mot, ville kanskje overlevelsen til laksungene i smittetesten fra disse to stammene ha vært større.

8 Konklusjon

Resultatene fra smittetestene i de to karene tyder på at det har skjedd et naturlig utvalg for større motstandskraft mot gyro i de tre *Gs*-inifiserte laksestammene, noe som er som forventet da det i de samme smittetestene ble funnet en betydelig genetisk variasjon i motstandskraft mot gyro målt som død/levende ved slutten av smittetesten. Det gjelder både for de tre norske *Gs*-inifiserte stammene ($h^2=0.47 \pm 0.07$ på den underliggende skalaen) og de tre norske *Gs*-uifiserte stammene ($h^2=0.54 \pm 0.09$). Den høye genetiske korrelasjonen mellom motstandskraft mot *Gs* i de to smittetest-karene (0.92 ± 0.08), er en ytterligere bekreftelse på betydelig genetisk variasjonen i motstandskraft mot *Gs* i de seks norske stammene.

For de seks norsk stammene ble det funnet to SNPer, én på kromosom ssa06 og én på kromosom ssa26, som til sammen (37.6 %) forklarte en betydelig del av den genetiske variasjonen i overlevelsen ved slutten av smittetesten. Dette er en så betydelig andel at det muliggjør MAS (Markør Assistert Seleksjon) for økt motstandskraft mot *Gs* i *Gs*-inifiserte ville laksestammer hvor en utrydding av parasitten ikke er mulig. Det vil høyst sannsynlig resultere i at stammen raskere opparbeider seg økt motstandskraft og resistens mot *Gs* enn hva som vil skje kun gjennom naturlig seleksjon.

9 Etterord

Prosjektet ble av ulike årsaker langt mer kostbart enn vi forutså på søknadstidspunktet (Appendiks III). De viktigste årsakene til dette er større kostnader ved innsamling av stamfisk fra Driva (bygging og utlegging av merd ved Flåøya), mer arbeid med planlegging og oppfølging av innsamling av materiale fra de andre stammene, og en forlenget smittetest fordi vi på grunn av lite Gs på yngel fanget i Driva, måtte oppformere parasitten på annen fisk noe som mislyktes i første forsøk. I del to av prosjektet fikk vi tildelt ekstra midler slik at vi kunne genotype også de døde fiskene i testen slik at vi kunne regne ut separat overlevelsen for Eira, Surna og Driva og dermed kunne estimere arvegrad for motstandskraft Gs.

I søknaden ble det sagt at Delmål 3 ikke kunne gjennomføres uten ekstra midler fra andre finansieringskilder, noe som planlagt skulle skje ved Avdeling for forsøksdyr, Nr. 166, ved NHM, UiO. Da denne avdelingen for forsøk med ferskvannsfisk ble avviklet i 2013, ble det ikke aktuelt å søke om midler til dette.

10 Referanser

- Arnekleiv, J.V., Rønning, L., Forseth, T., Fiske, P., Koksvik, J., Hindar, K., Kjærstad, G. 2010. Smoltundersøkelser i Driva i 2005-2009. *NTNU Vitenskapsmuseet Rapp. Zool. Ser.* 2010, 5, 1-42.
- Anttila, P., Romakkaniemi, A., Kuusela, J., Koski, P. 2008. Epidemiology of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea) in the River Tornionjoki, a Baltic wild salmon river. *Journal of Fish Diseases* 2008, 31, 373–382. doi:10.1111/j.1365-2761.2008.00916.x
- Bakke T.A., Jansen P.A., Hansen L.P. 1990. Differences in the host resistance of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., stocks to the monogenean *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957. *Journal of Fish Biology* 37, 577–587.
- Bakke, T.A., Harris, P.D., Jansen, P.A. 1992. The susceptibility of *Salvelinus fontinalis* (Mitchell) to *Gyrodactylus salaris* Malmberg (*Platyhelminthes; Monogenea*) under experimental conditions. *J. Fish Biol.* 41, 499-507.
- Bakke T.A., Harris P.D., Cable J. 2002. Host specificity dynamics: observations on *gyrodactylid monogeneans*. *Int. J. Parasitol.* 32, 281-308.
- Bourret, V., Kent, M.P., Primmer, C.R., Vasamagi, A., Karlsson, S., Hindar, K., McGinnity, P., Verspoor, E., Bernatchez, L., Lien, S. 2013. SNP-array reveals genome-wide patterns of geographical and potential adaptive divergence across the natural range of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Ecology* 22, 532–551.
- Diserud, O.H., Fiske, P., Sægvog, H., Urdal, K., Aronsen, T., Lo, H., Barlaup, B.T., Niemelä, E., Orell, P., Erkinaro, J., Lund, R.A., Økland, F., Østborg, G.M., Hansen, L.P. & Hindar, K. 2019. Escaped farmed Atlantic salmon in Norwegian rivers 1989-2013. *ICES Journal of Marine Science* 76: 1140-1150.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
- Foll, M., Gaggioti, O. 2008. A Genome-Scan Method to Identify Selected Loci Appropriate for Both Dominant and Codominant Markers: A Bayesian Perspective. *Genetics* 180(2), 977-99.
- Gilbey, J., Verspoor, E., Mo, T.A., Sterud, E., Olstad, K., Hytterød, S., Jones, C., Noble, L. 2006. Identification of genetic markers associated with *Gyrodactylus salaris* resistance in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 71, 119–129.
- Gilmour, A., Gogel, B.J., Cullis, B.R., Thompson R., 2009. *ASReml User Guide Release 3.0*. VSN International Ltd, Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK.
- Hansen, H., Bachmann, L., Bakke, T.A. 2003. Mitochondrial DNA variation of *Gyrodactylus* spp. (*Monogenea, Gyrodactylidae*) populations infecting Atlantic salmon, grayling, and rainbow trout in Norway and Sweden. *International Journal for Parasitology* 33, 1471–1478.
- Harris, P.D. 1997. Ecological and genetic evidence of clonal reproduction in *Gyrodactylus gasterostei* Gläser, 1974. *Int. J. Parasitol.*, 28, 1595-1607.
- Harris, P.D., Soleng, A., Bakke, T.A. 1998. Killing of *Gyrodactylus salaris* (*Platyhelminthes, Monogenea*) mediated by host complement. *Parasitology* 117, 137-143.
- Hindar, K., Mo, T. A., Eken, M., Hagen, A. Gjørwad, Hytterød, S., Sandodden, R., Vøllestad, A., Aamodt, K. O. 2018. Kan *Gyrodactylus salaris* utryddes fra Drammensregionen? - Sluttrapport fra arbeidsgruppen for Drammensregionen. NINA Rapport 1456. Norsk institutt for naturforskning.
- Hill, W.G., and Mackay, T.F.C. (2004). D. S. Falconer and Introduction to Quantitative Genetics. *Genetics* 167, 1529-1536.

- Hytterød, S., Lie Linaker, M., Hansen, H., Mo, T.A., Tavoranpanich, S., Bang Jensen, B. 2016. The surveillance programme for *Gyrodactylus salaris* in Atlantic salmon and rainbow trout in Norway 2015. Surveillance programmes for terrestrial and aquatic animals in Norway. *Annual report 2015*. Oslo: Norwegian Veterinary Institute.
- Ieshko, E.P., Shulman, B.S., Shchurov, I.L., Lulu, B. 2008. Long-term changes in the epizootic of juvenile salmon (*Salmo salar* L.) in the Keret River (White Sea basin) depending on the invasion of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957. *Parazitologija* 42,486-96. (In Russian.)
- Johnsen, B.O. 1978. Fiskeribiologiske undersøkelser i de lakseførende deler av Ranavassdraget. Direktoratet for vilt og ferskvannsfisk, Reguleringsundersøkelsene i Nordland. *Rapport 7-1978*, 1-54.
- Johnsen, B.O., Møkkelgjerd, P.I., Jensen, A.J., 1999. Parasitten *Gyrodactylus salaris* på laks i norske vassdrag, Statusrapport ved inngangen til år 2000 — *NINA Oppdragsmelding* 617, 1-129.
- Johnsen, B.O., Brabrand, Å., Jansen, P.A., Teien, H.-C., Bremset, G. 2008. Evaluering av bekjempelsesmetoder for *Gyrodactylus salaris*. Rapport fra ekspertgruppe. *Utredning for DN* 2008-7, 1-140.
- Johnsen, B.O., Jensen, A.J., Møkkelgjerd, P.I. 1999. *Gyrodactylus salaris* på laks i norske vassdrag, statusrapport ved inngangen til år 2000. *NINA Oppdragsmelding* 617: 1-129.
- Karlsson, S., Diserud, O.H., Fiske, P., Hindar, K. 2016. Widespread genetic introgression of escaped farmed Atlantic salmon in wild salmon populations. *ICES Journal of Marine Science*, doi: 10.1093/icesjms/fsw121.
- Karlsson, S., Bolstad, G.H., Hansen, H., Jansen, P.A., Moen, T. and Noble, L.R. 2020. The potential for evolution of resistance to *Gyrodactylus salaris* in Norwegian Atlantic salmon. NINA Report 1812. Norwegian Institute for Nature Research.
- Koski, P. 1996. Important parasites and diseases of freshwater and anadromous fish in northern Finland. P. 87-89 in Larsen, T., ed. Report from seminar on fish diseases and organization of the fish health service in the Finnish, Norwegian and Russian parts of the Barents region. *Høgskolen i Finnmark* 1996:12.
- Malmberg, G. 1988. *Gyrodactylus salaris* - infeksjoner, laxfisktransporter och odling i Norden. *Vattenbruk* 2, 22-29.
- Marees A.T., de Kluiver H., Stringer, S., Vorspan, F., Curis, E., Marie-Claire, C., Derks, E. M. 2018. A tutorial on conducting genome-wide association studies: Quality control and statistical analysis. *Int J Methods Psychiatr Res.* 27(2): e1608. doi:10.1002/mpr.1608.
- Lien, S., Koop, B., Sandve, S. et al. 2016. The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization. *Nature* 533, 200–205. <https://doi.org/10.1038/nature17164>
- Milligan, B.G. 2003. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics* 163, 1153–1167.
- Mo T.A. 1992. Seasonal variations in the prevalence and infestation intensity of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (*Monogenea, Gyrodactylidae*) on Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L., in the River Batnfjordselva, Norway. *Journal of Fish Biology* 41, 697-707.
- Ramirez, R., Bakke, T.A., Harris, P.D. 2014. Same barcode, different biology: differential patterns of infectivity, specificity and pathogenicity in two almost identical parasite strains. *International Journal for Parasitology* 44, 543–549.
- Ramírez, R., Bakke, T.A., Harris, P.D. 2015. Population regulation in *Gyrodactylus salaris* – Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) interactions: testing the paradigm. *Parasites & Vectors* 8:392. DOI 10.1186/s13071-015-0981-4.
- Ritland, K. 2009. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetic Research* 67 (2), 175-185. <https://doi.org/10.1017/S0016672300033620>

- Salte, R., Bentsen, H.B., Moen, T., Tripathy, S., Bakke, T.A., Ødegård, J., Omholt, S., Hansen, L.P. 2010. Prospects for a genetic management strategy to control *Gyrodactylus salaris* infection in wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) stocks. *Can. J. Fish Aquatic. Sci.* 67, 121-129.
- Solem, Ø., Johnsen, B.O., Arnekleiv, J.V., Hindar, K., Rønning, L., Kjærstad, G., Aalbu, F., Karlsson, S., Olstad, K. 2013. Kartlegging av ungfiskbestander i Drivavassdraget. - *NINA Rapport 742*, 1-29. Norsk institutt for naturforskning (NINA), Trondheim.
- Solem, Ø., Bremset, G., Aronsen, T., Kraabøl, M., Olstad, K., Aalbu, F. 2017. Fiskeundersøkelser i Drivavassdraget. Sammenstilling av resultater fra perioden 1977-2015. *NINA Rapport 1237*, 108 s.
- Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984. ESTIMATING F-STATISTICS FOR THE ANALYSIS OF POPULATION STRUCTURE. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- Yang, J., Hong Lee, S., Goddard, M.E., Visscher, P.M. 2011 GCTA: A Tool for Genome-wide Complex Trait Analysis. *American Journal of Human Genetics*. 88, 76-82.
- Ødegård, J., Madsen, P., Labouriau, L., Gjerde, B., Meuwissen, T.H.E. 2011. A sequential threshold cure model for genetic analysis of time-to-event data. *J. Anim. Sci.* 89, 943-950.
- Wang, J. 2011. coancestry: A program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources*, 11, 141–145.

11 Tabeller og figurer

Tabell 1 Genetisk materiale innsamlet sommer/høst 2014

Tre norske gyro infiserte stammer:

Skibotnelva (Haukvik) – Gyro påvist i 1979

Driva – Gyro påvist i 1980

Drammenselva – Gyro påvist i 1987

Fem stk 5x5 diallel sett

Hunnfisk nr	Hannfisk nr.				
	1	2	3	4	5
1	x	x	x	x	x
2	x	x	x	x	x
3	x	x	x	x	x
4	x	x	x	x	x
5	x	x	x	x	x

Tre norske gyro frie stammer:

Altaelva (Ims) - En stamme 'nær' Skibotnelva

Eira/Surna/Toåa - En stamme 'nær' Driva

Numedalslågen - En stamme 'nær' Drammenselva

Baltisk stamme med høg resistens mot gyro

Neva (Ims)

Avkom etter 25 hannfisk og 25 hunnfisk fra hver stamme

Tabell 2 Antall fedre, mødre og grupper i klekkeriet og strykedato og startfôringsdato, for hver stamme

Elvestamme	Antall fedre	Antall mødre	Antall grupper i klekkeriet	Strykedato	Til Nofima som øyerogn	Starfôringsdato
Skibotnelva	25	25	25	6. nov	6.01.14	9/4
Altaelva	23	23	23	11. nov	12.01.14	14/4
Driva	29	29	29	3. og 10. nov	*	23/3
Surna/Toåa/Eira	26	29	29	14. okt-24. nov	5. og 26.02.14	17/4, 28/4, 4/5
Drammenselva	25	25	25	24. nov	26. 01.14	15/4
Numedalslågen	30	30	30	8. nov	26. 01.14	15/4
Neva	25	25	25	11. nov	12. 01.14	14/4

* Kilenotfanget stamfisk fra Flå til Nofima, Sunndalsøra 30.09.2014.

Tabell 3 Antall foreldre og antall døde og overlevende avkom og totalt antall avkom i smittetesten

Stammer	Antall foreldre		Antall avkom i smittetesten		
	Fedre	Mødre	Døde	Overlevende	Totalt
Gs-frie	74	66	966	424	1391
- Altaelva	22	12	259	83	342
- Eira/Surna/Toåa	15/6/2	16/6/2	74/229/17	44/150/7	118/379/24
- Numedalslågen	29	30	387	140	527
Gs-infiserte	72	70	1047	909	1956
- Skibotnelva	24	24	348	153	501
- Driva	28	25	288	210	498
- Drammen	20	21	290	182	472
- Neva	23	23	121	364	485
Ukjent opphav			222	8	230

Tabell 4 Estimerte arvegrader ($h^2 \pm$ standardfeil) for motstandskraft mot gyro hos laks fra Gs-uinfiserte og Gs-infiserte elvestammer

	Lineær modell			Ikke-lineær modell		
	Gen. var.	Res. var.	$h^2 \pm se$	Gen. var.	Res. var.	$h^2 \pm se$
Norske stammer	0,0753	0,1473	$0,34 \pm 0,04$	0,1800	1,0	$0,55 \pm 0,06$
Gs-uinfiserte ¹	0,0720	0,1420	$0,34 \pm 0,06$	0,1832	1,0	$0,54 \pm 0,09$
- Altaelva	0,0771	0,1128	$0,41 \pm 0,14$	0,1948	1,0	$0,56 \pm 0,19$
- Eira/Surna/Toåa	0,0764	0,1712	$0,31 \pm 0,11$	0,1541	1,0	$0,47 \pm 0,15$
- Numedalslågen	0,0762	0,1231	$0,38 \pm 0,10$	0,2173	1,0	$0,61 \pm 0,13$
Gs-infiserte ¹	0,0648	0,1562	$0,29 \pm 0,05$	0,1516	1,0	$0,47 \pm 0,07$
- Skibotnelva	0,0639	0,1504	$0,30 \pm 0,05$	0,1497	1,0	$0,46 \pm 0,13$
- Driva	0,0569	0,1866	$0,23 \pm 0,07$	0,1187	1,0	$0,38 \pm 0,12$
- Drammenselva	0,1162	0,1169	$0,50 \pm 0,12$	0,3826	1,0	$0,87 \pm 0,16$
Neva, Gs-infisert	0,0171	0,1714	$0,09 \pm 0,06$	0,0291	1,0	$0,11 \pm 0,09$

¹ Norske stammer

Tabell 5 Estimer av gjennomsnitt og varians (i parentes) for genomisk slektskap mellom fisk innen og mellom stammer

	Skibotn.	Altaelva	Driva	Eira	Surna	Toåa	Drammens.	Numedals.	Neva
Skibotn.	0,11354 (0,01532)								
Altaelva	0,03037 (0,00077)	0,2093 (0,02606)							
Driva	0,00918 (0,0001)	0,00204 (0,00002)	0,04529 (0,00048)						
Eira	0,00433 (0,00005)	0,00056 (0,00001)	0,03546 (0,00026)	0,0716 (0,00518)					
Surna	0,00785 (0,00009)	0,00168 (0,00002)	0,04459 (0,00031)	0,03736 (0,00026)	0,04787 (0,00037)				
Toåa	0,0059 (0,00007)	0,00166 (0,00002)	0,03917 (0,00025)	0,04117 (0,00031)	0,04068 (0,00027)	0,04904 (0,00053)			
Drammens.	0,00038 (0)	0,00001 (0)	0,011 (0,00011)	0,01346 (0,00015)	0,01051 (0,00012)	0,0099 (0,0001)	0,13338 (0,00531)		
Numedals.	0,00189 (0,00002)	0,00027 (0)	0,02008 (0,00024)	0,02345 (0,00025)	0,02081 (0,00025)	0,02281 (0,0003)	0,05682 (0,00087)	0,05746 (0,00156)	
Neva	0,00014 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,00002 (0)	0,5651 (0,0051)

Tabell 6 Estimer av gjennomsnitt og varians for genomisk innavlskoeffisient (F) for hver stamme

Stamme	Gjennomsnitt	Varians
Skibotnelva	0,09164	0,00768
Altaelva	0,08602	0,00059
Driva	0,03764	0,00104
Eira	0,02742	0,00073
Surna	0,02615	0,00069
Toåa	0,03407	0,00048
Drammenselva	0,05687	0,00711
Numedalslågen	0,04796	0,00118
Neva	0,34545	0,00316

Tabell 7 Antall homozygote strekninger (ROH) i genomene for hver stamme

Stamme	Antall fisk	Antall ROH	Gjennomsnitt ROH/individ
Skibotnelva	59	211	3,576271
Altaelva	49	36	0,734694
Driva	33	19	0,575758
Eira + Surna	64	33	0,515625
Drammenselva	45	73	1,622222
Numedalslågen	59	36	0,610169
Neva	48	376	7,833333

Tabell 8 Beskrivende statistikk for SNPer med signifikant effekt på motstandskraft mot *G. salaris* fra GWAS analysen (for 636 av de døde og 1070 av de som overlevde testen) målt som død/levende (0/1) ved slutten av smittetesten basert på data med G-matrise.

Ssa	SNP	Pos	A1	A2	MAF	$\alpha \pm SE$	P	VarG, %
3	AX-87750615	56734719	T	C	0,492	0,345 ± 0,016	2,62E-104	66,2
3	AX-87527601	83714953	A	G	0,363	-0,300 ± 0,018	3,76E-63	46,2
3	AX-88257637	20952716	T	C	0,330	-0,239 ± 0,018	1,69E-41	28,1
3	AX-87644629	60601706	A	C	0,400	0,200 ± 0,017	6,74E-33	21,3
6	AX-98327128	24802414	A	T	0,471	0,300 ± 0,015	3,72E-90	49,7
6	AX-97898311	24789537	A	T	0,333	-0,285 ± 0,018	7,15E-58	40,0
6	AX-86951185	12146000	G	T	0,340	0,173 ± 0,016	9,12E-28	15,0
6	AX-87246192	37321555	C	T	0,420	-0,160 ± 0,016	4,49E-23	13,9
11	AX-87192887	24687183	C	A	0,316	-0,268 ± 0,019	1,45E-46	34,5
11	AX-88282806	32687604	C	A	0,442	-0,122 ± 0,018	3,06E-12	8,2
11	AX-87510238	20272984	T	G	0,457	0,101 ± 0,018	1,94E-08	5,6
26	AX-141928583	15362249	G	A	0,498	0,274 ± 0,015	1,95E-73	41,6
26	AX-87730353	14284860	A	C	0,486	0,268 ± 0,016	4,21E-62	39,8
26	AX-87890873	11023702	C	A	0,374	-0,234 ± 0,016	7,81E-48	28,5
26	AX-96466105	19079128	T	C	0,416	-0,091 ± 0,015	4,12E-10	4,5

MAF=Minor Allele Frequency = frekvensen av allelet med lavest frekvens.

α =substitusjonseffekten (additive genetisk effekt) for A1=-A2; %-enheter ($\alpha \times 100$) endring i overlevelse i populasjonen ved slutten av testen ved å bytte ut A1 med A2.

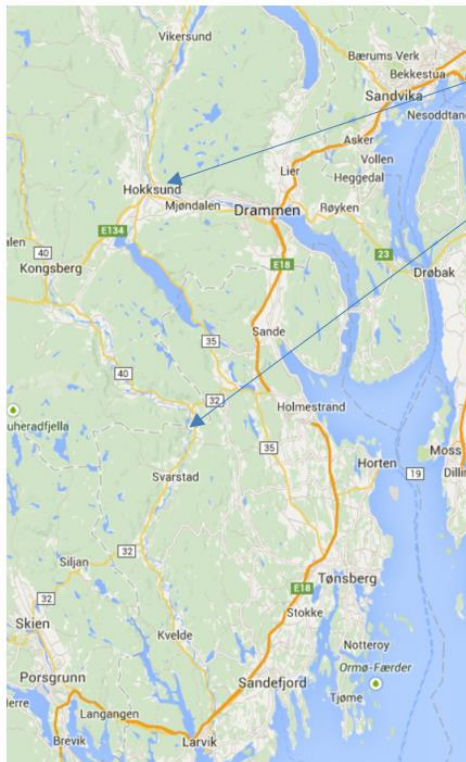
Andel av genetisk varians (**VarG, %**) forklart av hver SNP ble beregnet som produktet av genfrekvensene og substitusjons effekten: $2p_i q_i \alpha_i^2$ (Hill and Mackay, 2004). Variansene til de ulike SNPene bør ikke summeres da de ikke er uavhengige på grunn av koplingsulikevekt (LD) mellom SNPene.



Figur 1 Kartet viser lokaliseringen av Driva, Surna, Toåa og Eira.



Figur 2 Stamfisk fra Driva ble fanget i kilenot ved Flåøya i juni-juli 2014, og oppbevart i merd der fram til transport til Nofima, Sunndalsøra 30. september 2014.



Drammenselva

Numedalslågen



Figur 3 Kartet viser hvor stamfisken fra Drammenselva og Numedalslågen ble fanget.

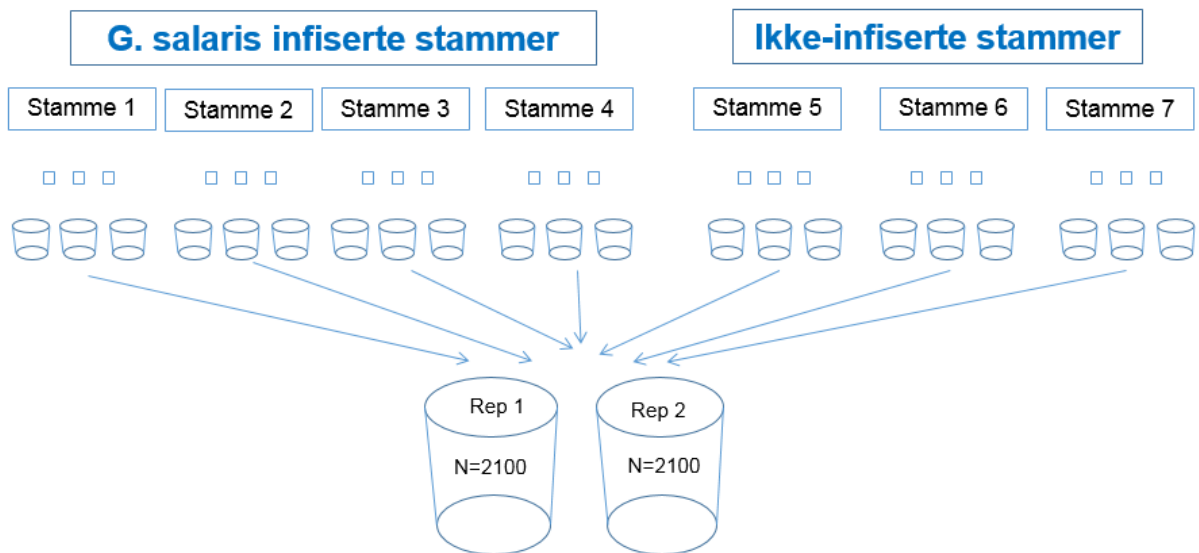
Skibotnelva - Alta



Figur 4 Kartet viser lokaliseringen av Skibotnelva og Altaelva. Materialet fra Skibotnelva ble hentet fra Genbank Haukvik, Møre og Romsdal, mens materialet fra Altaelva ble hentet fra NINA Forskningsstasjon, Ims, Rogaland.



Figur 5 Kartet viser lokaliseringen av Neva. Materialet fra Neva ble hentet fra NINA Forskningsstasjon, Ims, Rogaland.

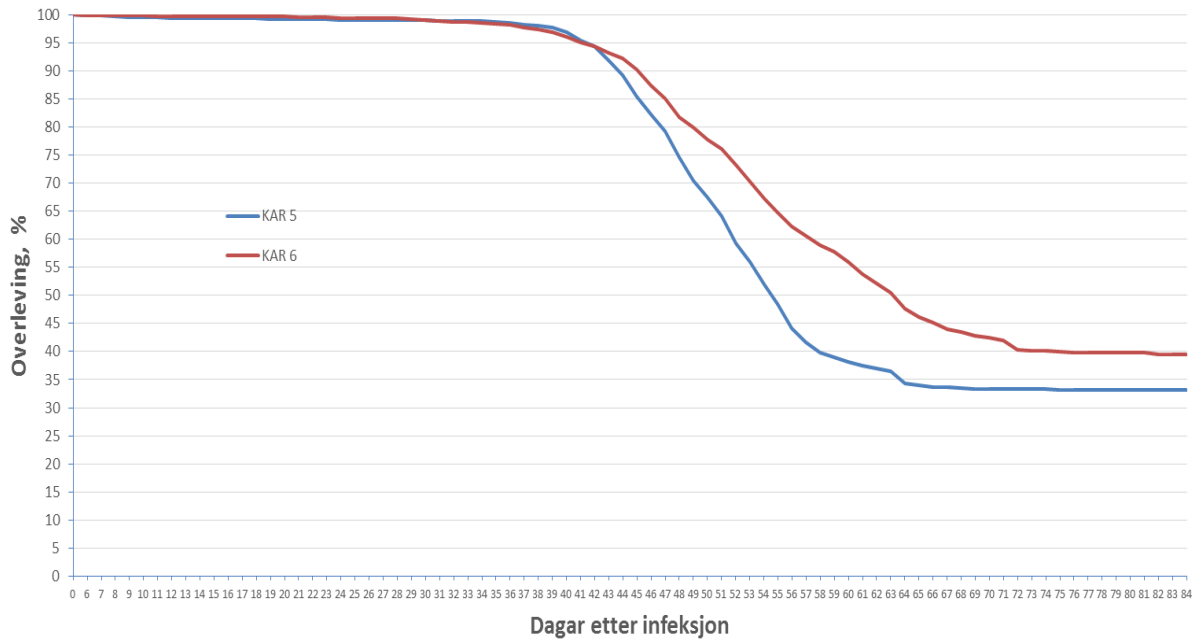


Ved 8-10 g til smittetest (haplotype A)
300 fisk fra hver stamme til hvert kar.

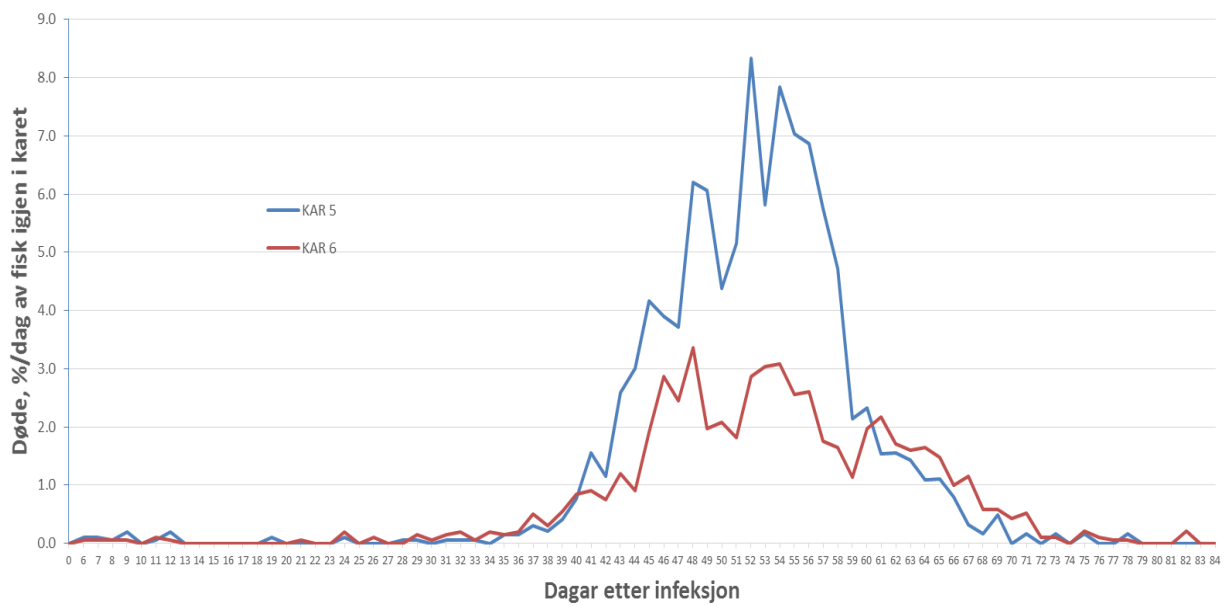
Figur 6 Forsøksdesignet.



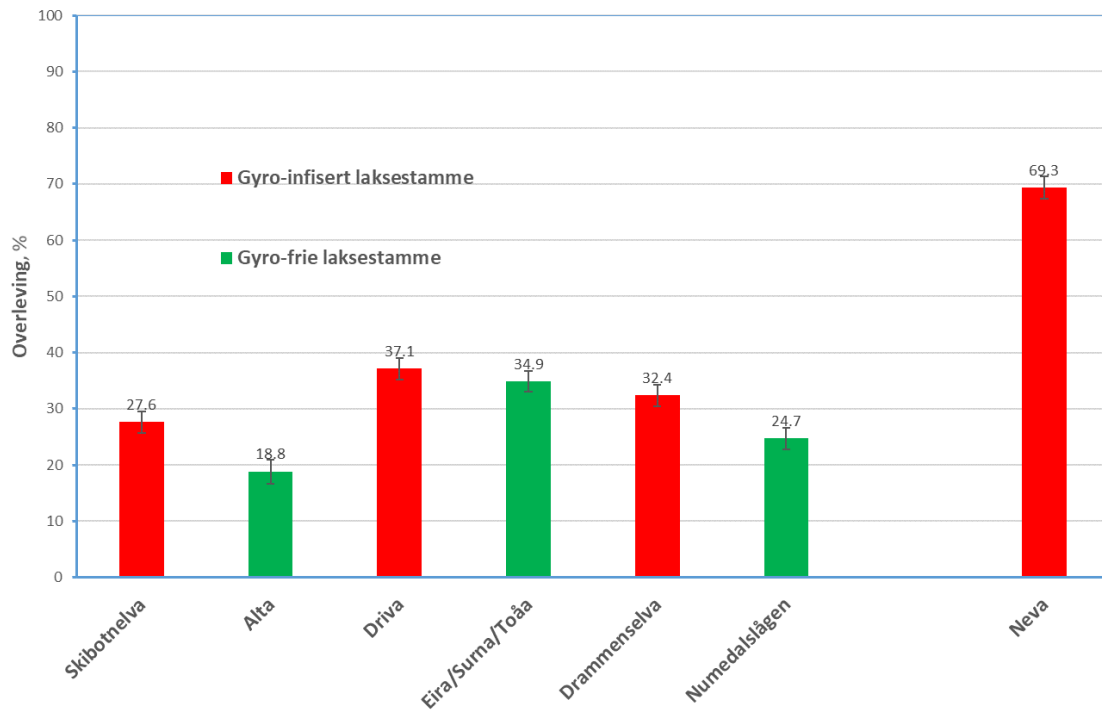
Figur 7 Yngelen fra hver stamme ble startfôret i tre 0.36 m² kar i Hall 4 hos Nofima, Sunndalsøra.



Figur 8 Prosent overlevende fisk til ulik tid etter infeksjon med Gs-infisert yngel fra Driva.

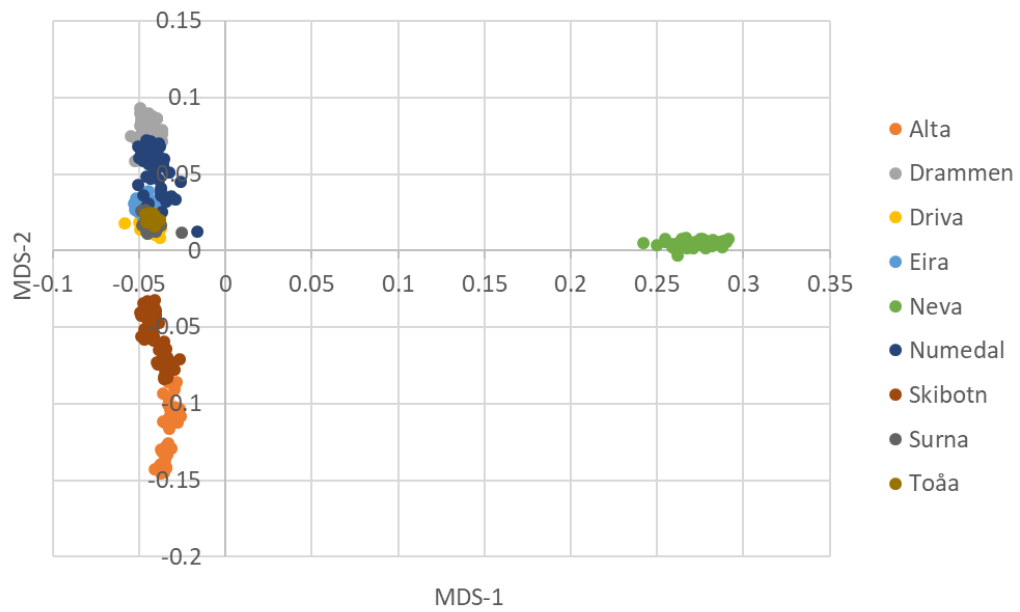


Figur 9 Prosent døde fisk per dag av antall fisk igjen på den aktuelle dagen.

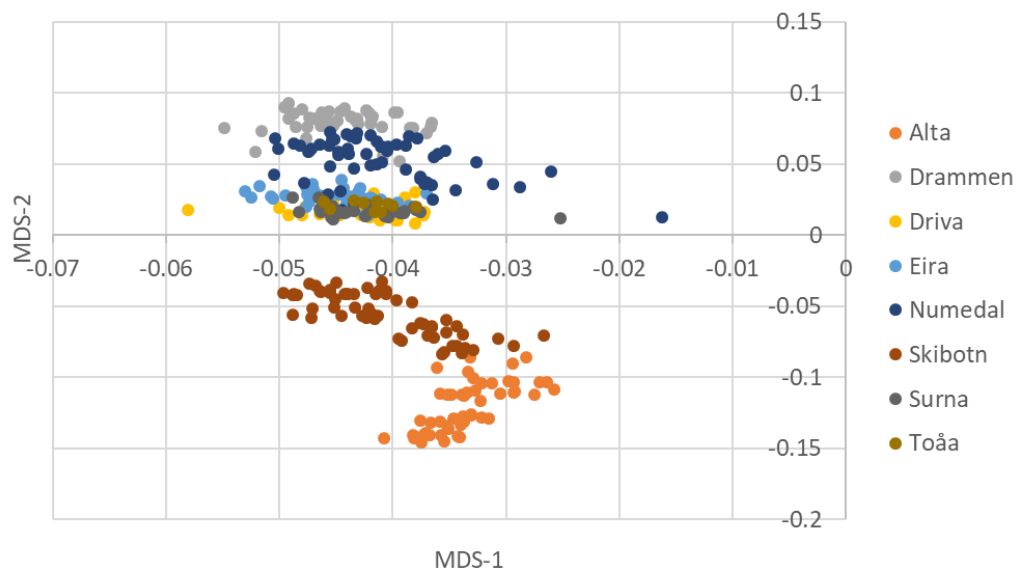


Figur 10 Prosent overlevende fisk per stamme i smittetesten hos Nofima, Sunndalsøra, hvor fisken ble infisert med Gs-infisert yngel fra Driva.

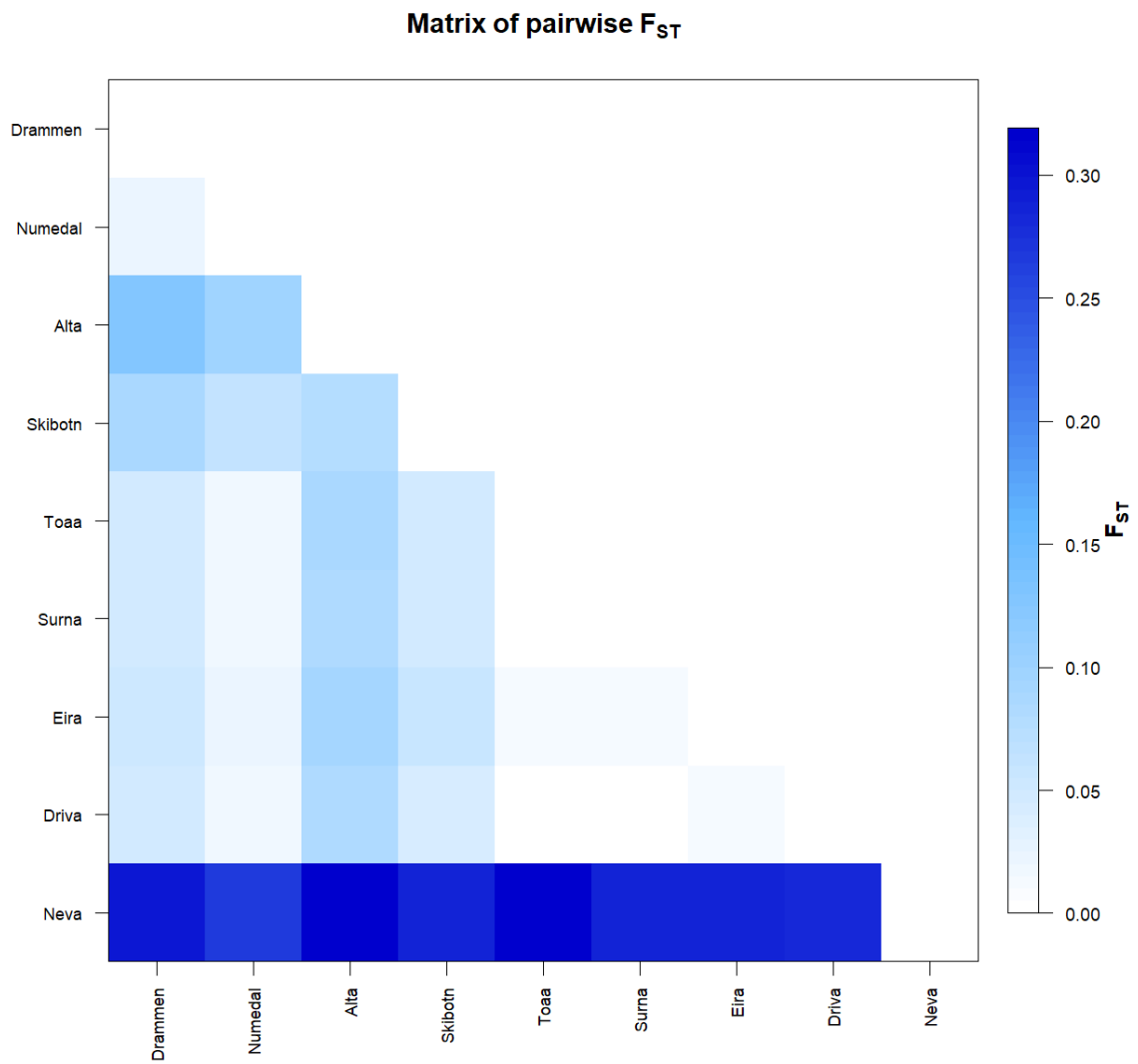
A. Flerdimensjonalskalerings analyse av genomiske IBS i foreldrefisk



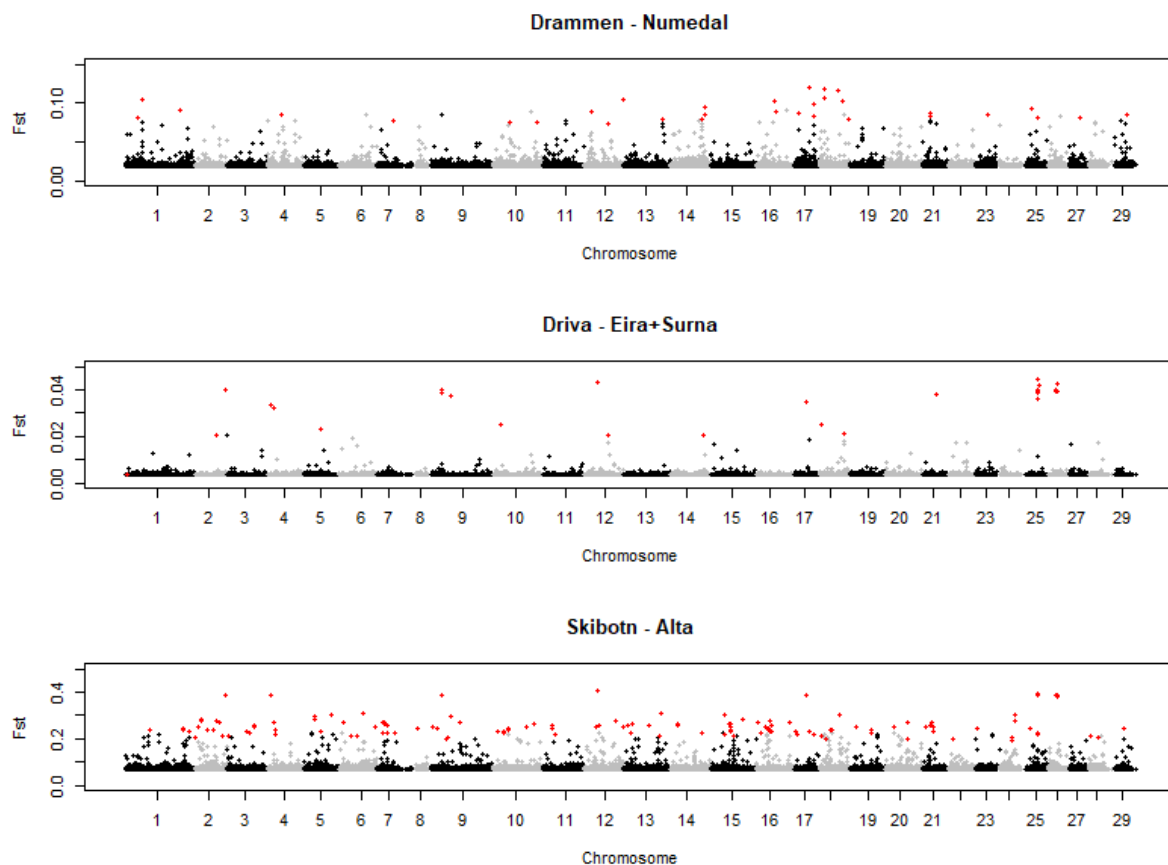
B. Flerdimensjonalskalerings analyse av genomiske IBS i foreldrefisk - uten Neva



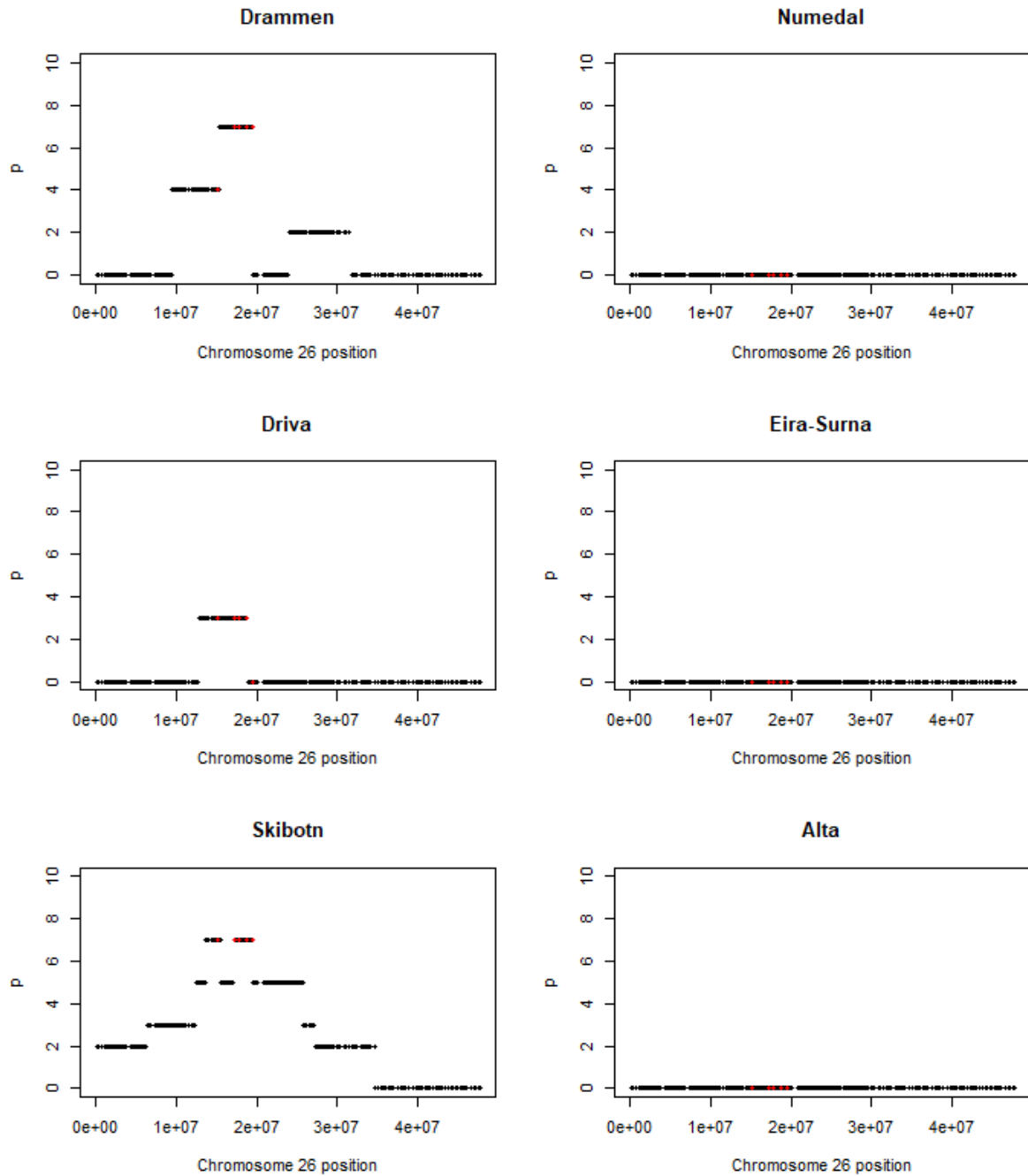
Figur 11 Flerdimensjonal skalerings analyser (MDS) av foreldrefisk med (A) og uten (B) Neva populasjonen.



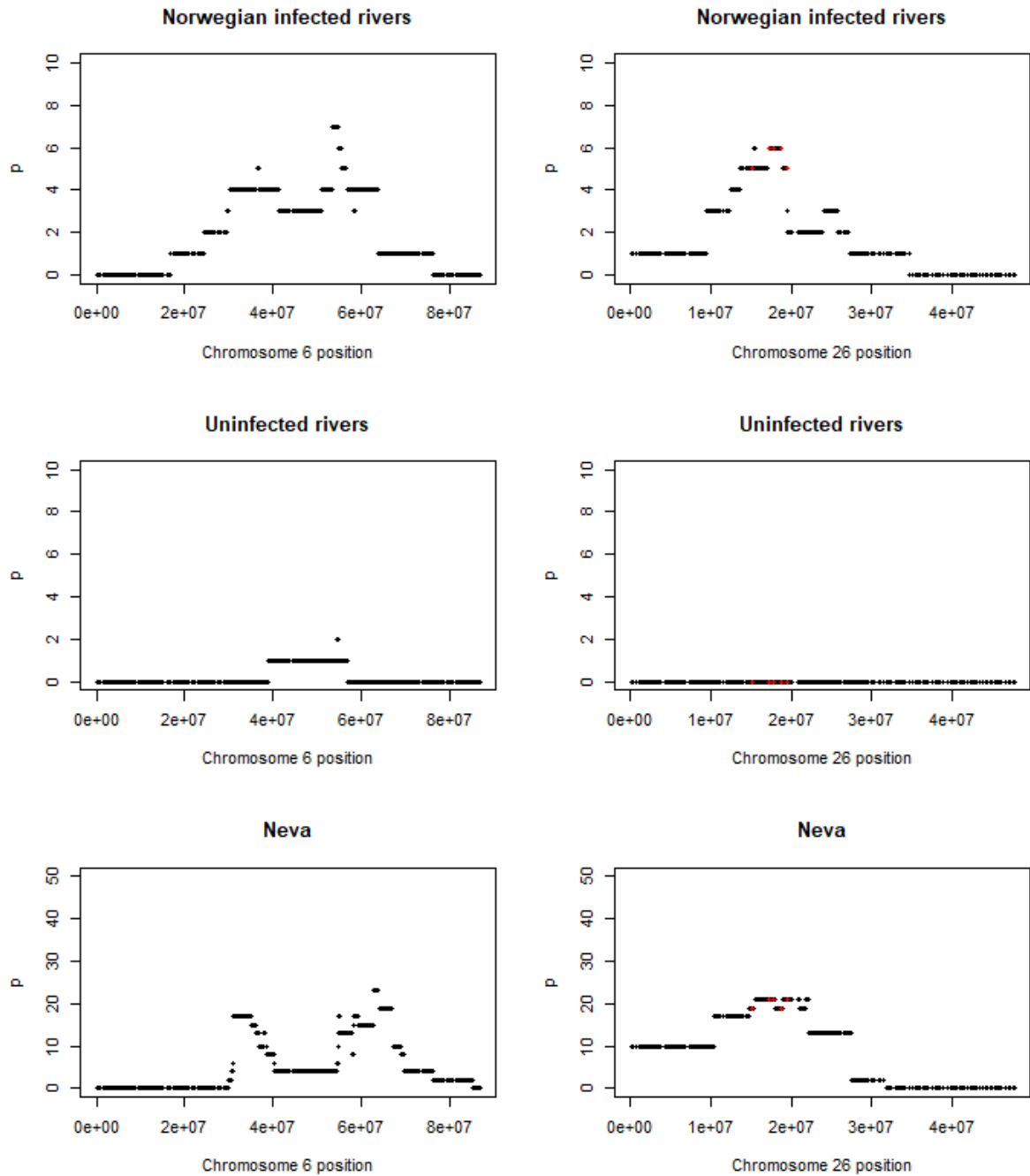
Figur 12 Estimer av genetisk variasjon (F_{ST} , 0.0=helt like, 1.0=helt ulike) mellom fisk fra ulike stammer basert på SNPer fra foreldrene.



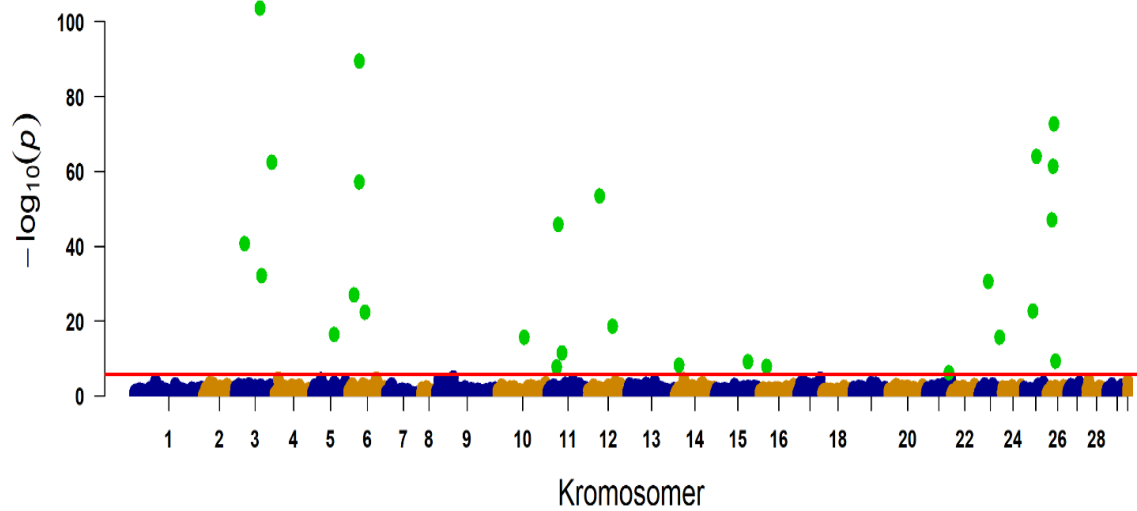
Figur 13 *Manhattan-plot av Bayesian FST avvik (Foll og Gaggioti, 2008) for SNP-frekvenser hos foreldrene til den Gs-infiserte og den Gs-uinfiserte foreldrestammen i hver av de tre regionene (Nord-Norge, Vest-Norge, Sørøst-Norge). FST-verdier er gitt på y-aksen (legg merke til at skalaen er ulike for hver figur), mens X-aksen angir disse SNPenes plassering på hvert kromosom. SNPer uthevet i rødt er de som FST avviks analysen viste signifikante forskjeller mellom den Gs infiserte og den Gs uinfiserte elven i hver region.*



Figur 14 Signaturer av seleksjon på kromosom 26 i norske Gs-infiserte elver (til venstre) sammenlignet tilsvarende signaturer i nærliggende Gs-uinfiserte elver (til høyre). Y-aksen angir prosent foreldrefisk (p) homozygot for gitte SNPer (ROH), mens X-aksen angir disse SNPenes plassering på kromosom 26. SNPer uthevet i rødt er de som FST avviks-analysen viste signifikante forskjeller mellom den Gs infiserte og den Gs-uinfiserte elven i hver region.



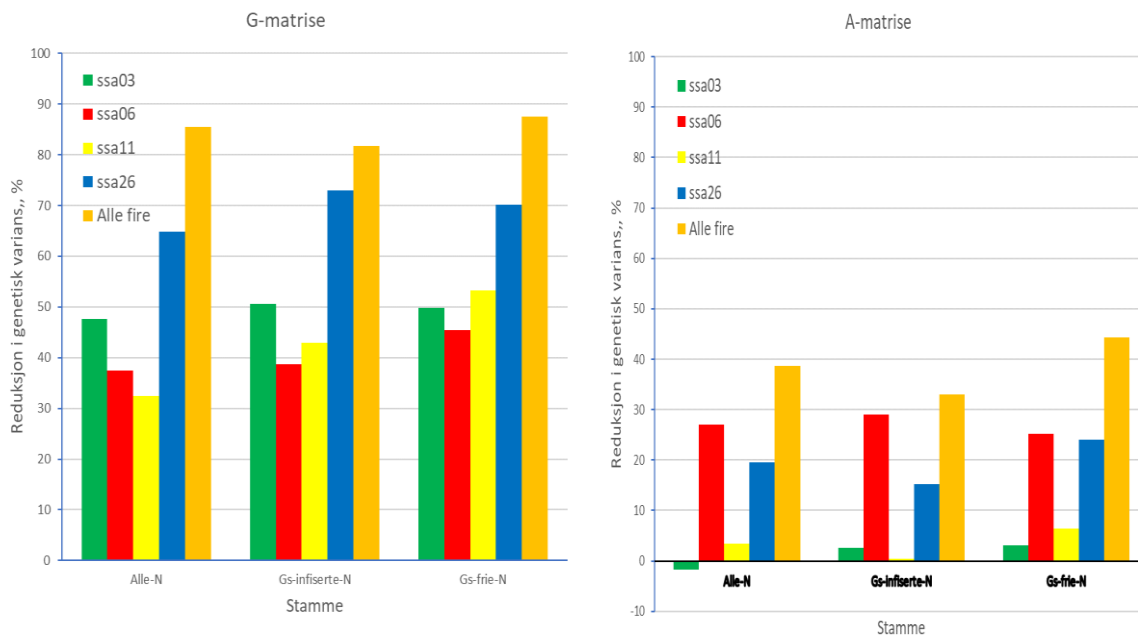
Figur 15 Signaturer av seleksjon (ROH) på kromosom 6 (til venstre) og 26 (til høyre) for alle norske Gs-infiserte og Gs-uinfiserte elver og for den Gs-infiserte Neva. Andelen (i prosent) av foreldrefisk som var homozygot for gitte SNPer gitt på Y-aksen (p) og kromosomposisjonen er på X-aksen. Y-aksen angir prosent foreldrefisk (p) homozygot for gitte SNPer (ROH), mens X-aksen angir disse SNPenes plassering på de to kromosomene. SNPer uthevet i rødt er de som FST avviks analysen (Foll og Gaggioti, 2008) viste signifikante forskjeller mellom den Gs-infiserte og den Gs-uinfiserte elven i hver region.



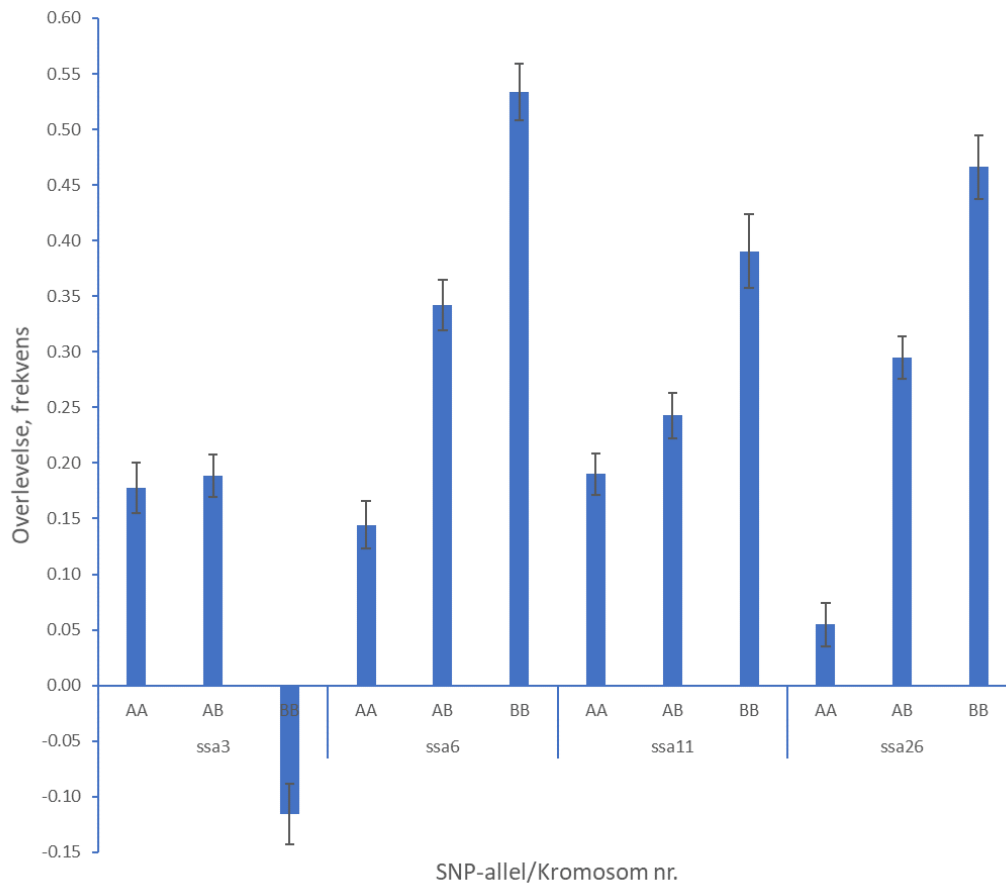
Figur 16 *Manhattan-plot som viser genomiske assosiasjoner for motstandskraft mot Gs i de seks norske villaks stammene.*



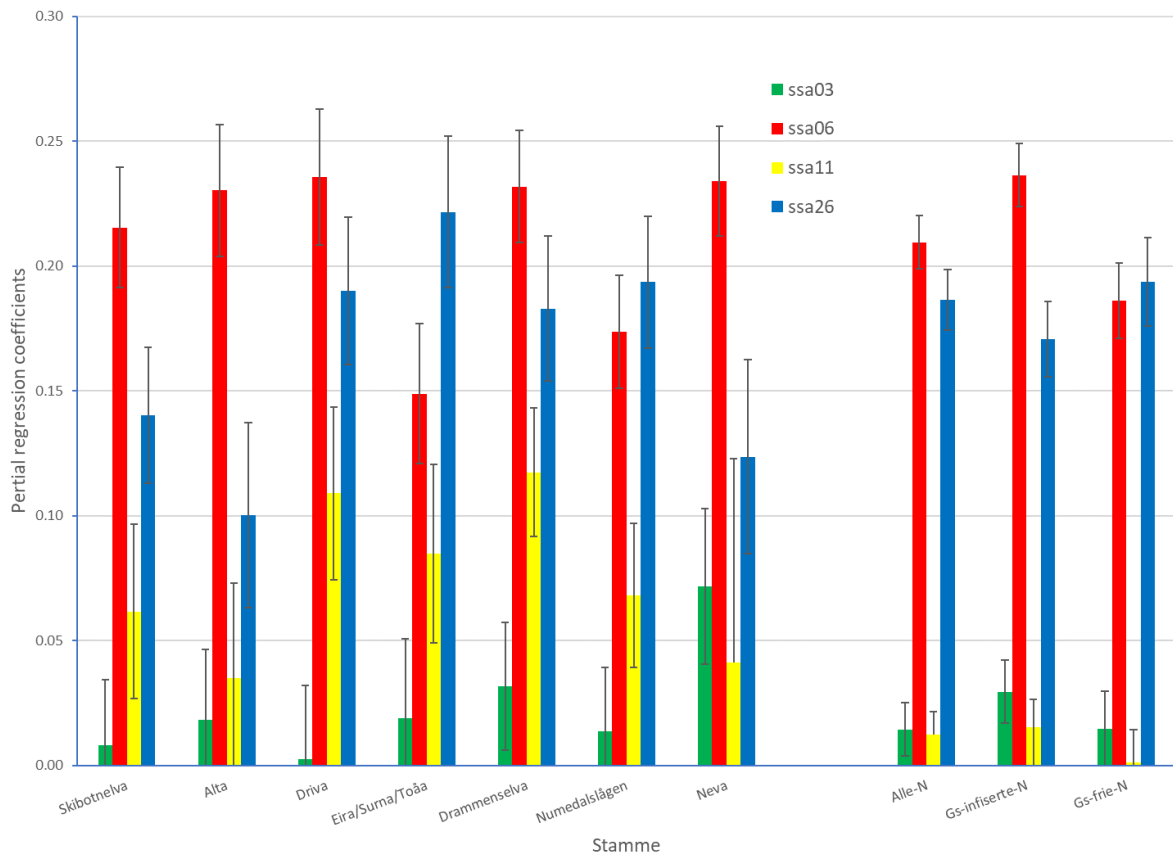
Figur 17 *Manhattan-plot som viser genomiske assosiasjoner for motstandskraft mot Gs i de tre Gs-infiserte og de tre Gs-uinfiserte norske villaks stammene.*



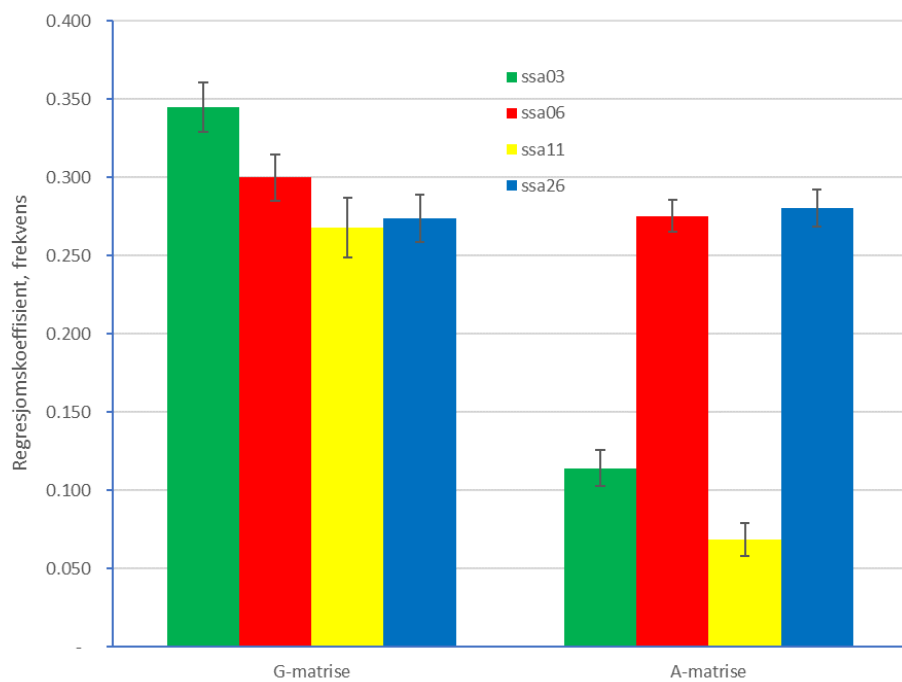
Figur 18 Reduksjon (%) i genetisk varians (for G-matrise og A-matrise) når den mest signifikante SNP'en på hvert av de fire kromosomene ssa3, ssa6, ssa11 og ssa26 ble inkludert i den statistiske modellen hver for seg, og når alle fire ble inkludert samtidig; for alle de seks norske stammene, for de tre Gs-infiserte norske stammene (Gs-infiserte-N) og for de tre norske Gs-uifiserte stammene (Gs-uifisert-N).



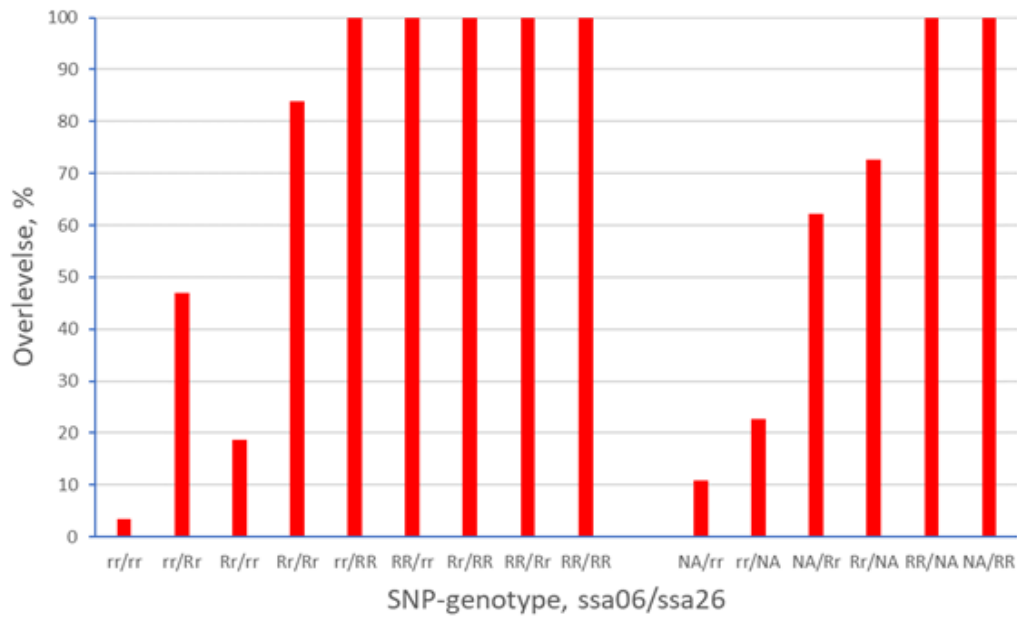
Figur 19 Estimert overlevelse (%=x100) ved slutten av testen for de tre genotypene for den mest signifikante SNP på hvert av de fire kromosomene basert på data (og A-matrise) fra alle de seks norske stammene.



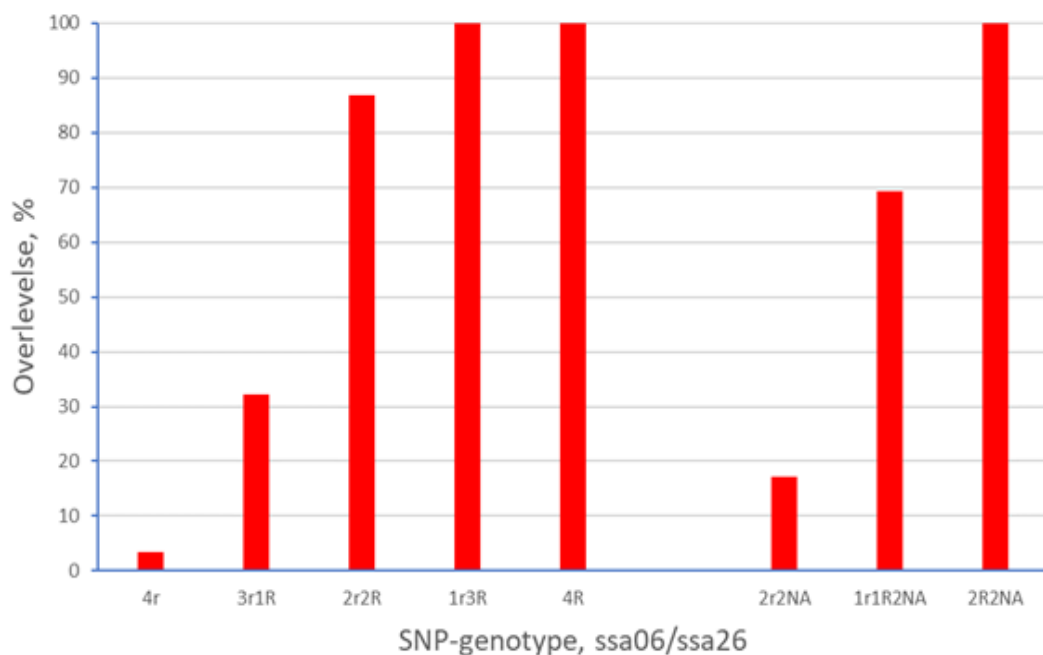
Figur 20 Partielle regresjonskoeffisienter (frekvens) fra Model 1 med A-matrise av egenskapen død/levende (0/1) ved slutten av smittetesten for den mest signifikante SNPen på kromosom ssa03, ssa06, ssa11 og ssa26 for hver av de syv stamme, for alle de seks norske stammene (Alle-N), for de tre Gs-infiserte norske stammene (Gs-infiserte-N), og for de tre norske Gs-uifiserte stammene (Gs-uifisert-N).



Figur 21 Partielle regresjonskoeffisienter (frekvens) av egenskapen død/levende (0/1) ved slutten av smittetesten for de to allelene i den mest signifikante SNPen på kromosom ssa03, ssa06, ssa11 og ssa26 basert på data for alle de seks norske stammene og en modell med G-matrise eller A-matrise.



Figur 22 Estimert overlevelse (%) ved slutten av smittetesten for fisk med ulike genotyper for de to mest signifikante SNPene (ssa06/ssa26) basert på data (og A-matrise) fra alle de seks norske stammene. NA=ukjent genotype.



Figur 23 Estimert overlevelse (%) ved slutten av smittetesten for fisk med ulike genotyper for de to mest signifikante SNPene (ssa06/ssa26) basert på data (og A-matrise) fra alle de seks norske stammene. 4r=rr/rr; 3r1R=rr/rR; 1r1R2NA=rR/NANA; NA=ukjent genotype.

APPENDIKS I

Informasjon om de fire *Gs*-infriserte laksestammene fram til fiskematerialet i smittetesten ble samlet inn sommeren/høsten 2014.

Skibotnelva

Gs påvist i 1977, 1992 og 1998. Behandlet med rotenon i 1988, 1995, 2015 og 2016. Utsett av klekkeri-yngel med foreldre fra Skibotnelva i 1982 (6600 stk.) og 1983 (10 100), og smolt i 1993 (9 000) og 1994 (7500); utsett av klekkeri-yngel etter foreldre fra Målselva i 1980 (45 000) og 1981 (35 000); utsett av klekkeri-yngel etter foreldre fra Nordreisa i 1984 (14 000); og klekkeri-smolt etter foreldre fra Altaelva i 1984 (6 000).

Driva

Gs påvist i 1980, og har ikke vært behandlet mot *Gs*. Utsett av klekkeri-yngel og smolt med til dels ukjent opphav fra tidlig på 1960-tallet til og med 1979. Utsett av klekkeri-yngel etter foreldre fra Driva, i både Driva og sideelver til Driva, i 1980, 1982, 1983, 1984, 1985 og 1995. Utsett av i gjennomsnitt 39 000 klekkeri-smolt med foreldre fra Driva fra og med 1993 til og med 2002. Utsett av klekkeri-smolt med foreldre fra Surna i 1981 (?), 1982 (32 000), 1983 (?), 1984 (?) og 1985 (35 000).

Drammenselva

Gs påvist i 1987, og har ikke vært behandlet mot *Gs*. Årlig utsett av klekkeri-avkom etter foreldre fra Drammenselva: Om lag 300 000 én-somrig yngel i *Gs*-frie sideelver og 100 000–120 000 to-somrig smolt i elva.

Neva

Neva renn ut i Finskebukta i Austersjøen og er kjent for å ha laks med høg motstandskraft mot *Gs*. De historiske infeksjonsforholdene med *Gs* er ukjent. Materialet brukt i smittetesten har sitt opphav fra egg tatt inn til lms i 1983 fra et klekkeri i Finland som igjen hadde tatt inn egg fra Neva i 1972, 1974 og 1976.

Andre *Gs*-infriserte elver i Driva- og Raumaregionen:

Drivaregionen

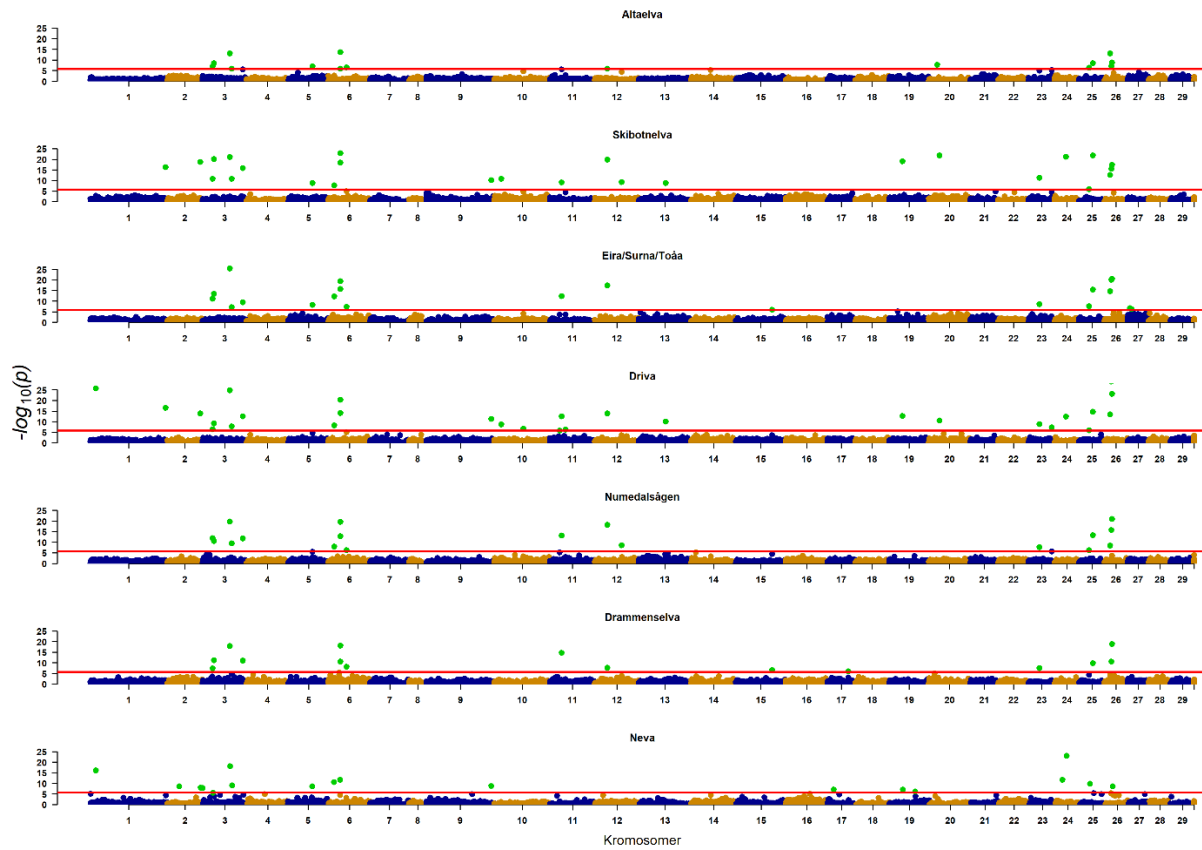
Gs påvist i 1980 (Usma, Batnfjordelva), 1981 (Litledalselva), Bøvra (1986) og 1989 (Storelva). Behandla med rotenon i 1986 og 1989 (Bøvra), 1991 (Storelva) og 1994 (Batnfjordelva). Friskmeldt i 1994 (Bøvra og Storelva) og 1999 (Batnfjordelva).

Raumaregionen

Gs påvist i 1980 (Rauma/Istra, Isa/ Glutra), 1982 (Skorga), 1985 (Måna), 1991 (Innfjordelva). Behandla med rotenon i 1992 (Rauma/Istra, Måna, Innfjordelva) og i 2013 og 2014 (alle elvene). Friskmeldt 1. november 2019.

APPENDIKS II

Manhattan-plot som viser genomiske assosiasjoner for motstandskraft mot *Gs* i de sju undersøkte villaks stammene.



Oversikt over FoU-partnere og finansieringskilder

FoU-partnere

Nofima
NINA
NHM, UIO
Driva elveeierlag
Hellefoss-Åmot Kultiveringsanlegg

Finansiering – kontanter (kr 1.725 000)

Marint miljøsikrings- og verdiskapingsfond i M&R (kr 1.245.000)
Driva elveeierlag
Sunndal kommune
Øvre Eiker kommune
Hellefoss-Åmot Kultiveringsanlegg
AquaGen AS
Marine Harvest AS
SalmoBreed AS

} kr 480 000

Dugnad (kr 460 000)

Hellefoss-Åmot Kultiveringsanlegg, Hokksund, Buskerud
Rossåa settefiskanlegg, Todalen, Møre og Romsdal
NINA Forskningsstasjon, Ims, Rogaland
Haukvik genbank, Vinjeøra, Sør- Trøndelag
Lardal Jeger og Fiskerlag, Svarstad, Vestfold.

