

Genetisk analyse av opprinnelsen til *Gyrodactylus salaris*-infeksjonen på laksunger i Lærdalselva.

Marek S. Ziętara
Bjørn Ove Johnsen
Jaakko Lumme



NINAs publikasjoner

NINA Rapport

Dette er en ny, elektronisk serie fra 2005 som erstatter de tidligere seriene NINA Fagrapport, NINA Oppdragsmelding og NINA Project Report. Normalt er dette NINAs rapportering til oppdragsgiver etter gjennomført forsknings-, overvåkings- eller utredningsarbeid. I tillegg vil serien favne mye av instituttets øvrige rapportering, for eksempel fra seminarer og konferanser, resultater av eget forsknings- og utredningsarbeid og litteraturstudier. NINA Rapport kan også utgis på annet språk når det er hensiktsmessig.

NINA Temahefte

Som navnet angir behandler temaheftene spesielle emner. Heftene utarbeides etter behov og serien favner svært vidt; fra systematiske bestemmelsesnøkler til informasjon om viktige problemstillinger i samfunnet. NINA Temahefte gis vanligvis en populærvitenskapelig form med mer vekt på illustrasjoner enn NINA Rapport.

NINA Fakta

Faktaarkene har som mål å gjøre NINAs forskningsresultater raskt og enkelt tilgjengelig for et større publikum. De sendes til presse, ideelle organisasjoner, naturforvaltningen på ulike nivå, politikere og andre spesielt interesserte. Faktaarkene gir en kort framstilling av noen av våre viktigste forskningstema.

Annen publisering

I tillegg til rapporteringen i NINAs egne serier publiserer instituttets ansatte en stor del av sine vitenskapelige resultater i internasjonale journaler, populærfaglige bøker og tidsskrifter.

Norsk institutt for naturforskning

Genetisk analyse av opprinnelsen til
Gyrodactylus salaris-infeksjonen på
laksunger i Lærdalselva.

Marek S. Ziętara
Bjørn Ove Johnsen
Jaakko Lumme

Ziętara, M.S, Johnsen, B.O. & Lumme, J. 2008. Genetisk analyse av opprinnelsen til *Gyrodactylus salaris*-infeksjonen på laksunger i Lærdalselva. - NINA Rapport 371. 14 s.

Trondheim, november 2008

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-1935-8

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

Åpen

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

REDAKSJON

Bjørn Ove Johnsen

KVALITETSSIKRET AV

Kjetil Hindar

ANSVARLIG SIGNATUR

Odd Terje Sandlund (sign.)

OPPDRAGSGIVER(E)

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER

FORSIDEBILDE

NØKKEWORD

Norge, Sogn og Fjordane, Lærdal, Laks, *Gyrodactylus salaris*, parasitter, fiskesykdommer, vertsskifte, molekylære markører.

KEY WORDS

Norway, Sogn & Fjordane, Lærdal, Atlantic salmon, *Gyrodactylus salaris*, parasites, fish diseases, host switch, molecular markers.

KONTAKTOPPLYSNINGER

NINA hovedkontor

7485 Trondheim
Telefon: 73 80 14 00
Telefaks: 73 80 14 01

NINA Oslo

Gaustadalléen 21
0349 Oslo
Telefon: 73 80 14 00
Telefaks: 22 60 04 24

NINA Tromsø

Polarmiljøsentret
9296 Tromsø
Telefon: 77 75 04 00
Telefaks: 77 75 04 01

NINA Lillehammer

Fakkeltgården
2624 Lillehammer
Telefon: 73 80 14 00
Telefaks: 61 22 22 15

www.nina.no

Referat

Ziętara, M.S, Johnsen, B.O. & Lumme, J. 2008. Genetisk analyse av opprinnelsen til *Gyrodactylus salaris*-infeksjonen på laksunger i Lærdalselva. – NINA Rapport 371, 14 s.

Et eldre materiale av *Gyrodactylus salaris* fra Lærdalselva (1996) ble analysert ved hjelp av molekylære markører (mitokondrie-DNA (mtDNA) og kjerne-DNA (ADNAM1)) (Ziętara et al. 2006).

Ved hjelp av DNA-undersøkelser er det tidligere påvist at i mange av de *G. salaris* infiserte elvene i Norge forekommer det en *G. salaris* type som tilhører en mtDNA-utviklingslinje som er spesifikk for Baltisk laks (Hansen et al. 2003, 2006). Men i tre av elvene (Lærdalselva, Drammenselva og Lierelva) ble det funnet en mtDNA-utviklingslinje som skilte seg fra de øvrige ved 3 % sekvensforskjell i mtDNA (Hansen et al 2003). Den samme mtDNA-utviklingslinjen var vidt utbredt som en klon på oppdrettet regnbueaure (*Oncorhynchus mykiss*) som Ziętara et al. (2006) kalte RBT-klonen. For å sjekke identiteten til parasittene i Lærdalselva, analyserte vi 30 parasittindivider fra en sterkt infisert laksunge som ble fanget i 1996. Formålet med undersøkelsen var å undersøke forholdet mellom Lærdalselva parasittene og RBT-klonen og andre stammer av *G. salaris*.

Den mitokondrielle DNA-sekvensen hos seks parasitteksemplarer var forskjellig fra den tilsvarende sekvensen hos den regnbueaurespesifikke *G. salaris* i Finland (RBT-klonen) i en enkelt av 1623 nukleotider. I de ca. 800 basepar som er sekvensert tidligere, var parasittene fra Lærdalselva identiske med RBT-klonen.

En kjerne-DNA markør ADNAM1 forekom i to ulike utgaver (genotyper) i Lærdalselva, mens den er permanent heterozygot i RBT-klonen som er analysert i detalj i Finland (Ziętara et al. 2006). Seks av tretti individer var identiske med RBT-klonen, noe som bekrefter at RBT-klonen selv var involvert i det nære moderlige opphavet til Lærdalselvainfeksjonen. Tjuefire individer var rekombinasjoner med bakgrunn i kjønnnet formering. Disse hadde ikke det diagnostisk korte allelet som karakteriserer den moderlige RBT-klonen, men hadde et allel som finnes i den patogene parasittstammen av baltisk opprinnelse (e.g., i Vefsna; Kuusela et al. 2007).

Den genetiske sammensetningen hos parasittene i Lærdalselva viser at parasittene var fremavlet ved krysning av lakseparasitten (som hann) med regnbueaureparasitten (som hunn). Nye betraktninger av IGS resultatene hos Cunningham et al. (2003) og Hansen et al. (2006) bekrefter et slikt scenario og antyder at også parasittene i Oslofjord populasjonene mest sannsynlig er lignende eller parallelle rekombinasjoner.

Marek S. Ziętara^{1,3}, Bjørn Ove Johnsen² og Jaakko Lumme³

¹Gdańsk University Biological Station, Laboratory of Comparative Biochemistry, PL-80-680 Gdańsk-Sobieszewo, Poland,

²Norwegian Institute for Nature Research (NINA), Tungasletta 2, 7485 Trondheim, Norway

³Department of Biology, University of Oulu, POB 3000, FI-90014 University of Oulu, Finland

Abstract

Ziętara, M.S, Johnsen, B.O. & Lumme, J. 2008. Genetic analysis of the origin of the *Gyrodactylus salaris*-infection on juvenile Atlantic salmon in River Lærdalselva. – NINA Report 371. 14 pp.

An old sample of *Gyrodactylus salaris* from Lærdalselva (1996) was analyzed by molecular markers mitochondrial DNA (mtDNA) and nuclear DNA (ADNAM1) (Ziętara et al. 2006).

A Baltic salmon specific mitochondrial lineage of *G. salaris* was responsible for the main gyrodactylosis epidemic in Norway (Hansen et al. 2003; 2006). A 3 % divergent mitochondrial lineage of parasite was present on Atlantic salmon in Norwegian rivers Lærdalselva, Drammenselva and Lierelva (Hansen et al. 2003). The same mtDNA was widespread as an "RBT clone" on farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) according to Ziętara et al. (2006). To check the clonal identity of the parasites in Lærdalselva river, we analyzed 30 worms found on a heavily infected Atlantic salmon parr caught in 1996. The main purpose of this investigation was to look at the relationship between the parasites found in the river Lærdalselva and the RBT-clone and other strains of *G. salaris*.

The mitochondrial DNA-sequence in six parasite specimens was different from the corresponding sequence in the rainbow trout specific *G. salaris* from Finland (RBT clone) in one single of 1623 nucleotides. In the about 800 base pairs which have been sequenced earlier, the parasites from Lærdalselva were identical with the RBT clone.

The nuclear DNA marker ADNAM1 had segregated and occurred in two different genotypes in the river Lærdalselva, while it is permanently heterozygous in the RBT clone analyzed in detail in Finland (Ziętara et al. 2006). Six of thirty specimens were identical with the standard RBT clone, confirming that RBT clone itself was involved in the near maternal ancestry of the infection in the river Lærdalselva. Twenty four specimens were sexual recombinants, which had lost the diagnostic short allele of the maternal RBT clone and gained an allele found in the pathogenic parasite strains of Baltic origin (e.g., in river Vefsna; Kuusela et al. 2007).

The genetic composition of parasites in Lærdalselva river show that the parasite was bred by crossing the Atlantic salmon parasite (as a male) with the parasite strain on rainbow trout (female). Reinspection of the IGS results of Cunningham et al. (2003) and Hansen et al. (2006) confirms this scenario and suggests that also the parasites in Oslo fjord populations are most probably similar or parallel recombinants.

Marek S. Ziętara^{1,3}, Bjørn Ove Johnsen² og Jaakko Lumme³

¹Gdańsk University Biological Station, Laboratory of Comparative Biochemistry, PL-80-680 Gdańsk-Sobieszewo, Poland,

²Norwegian Institute for Nature Research (NINA), Tungasletta 2, 7485 Trondheim, Norway

³Department of Biology, University of Oulu, POB 3000, FI-90014 University of Oulu, Finland

Innhold

Referat	3
Abstract	4
Innhold.....	5
Forord.....	6
1 Innledning.....	7
2 Materiale og metoder.....	8
2.1 Molekulære metoder	8
3 Resultater	9
3.1 Lærdalselvparasittenes mitokondrielle haplotype.....	9
3.2 Lærdalselvparasittenes kjerne-DNA genotype	9
4 Diskusjon.....	10
5 Referanser	13

Forord

Høsten 1996 ble lakseparasitten *Gyrodactylus salaris* funnet på laksunger i Lærdalselva.

Ungfiskundersøkelser satt i gang for å kartlegge utbredelsen av *G. salaris*, undersøke tetthet av laks- og aureunger på ulike strekninger av elva og analysere parasittens spredningsmønstre.

Undersøkelsene viste at parasittens utbredelse hadde sitt tyngdepunkt i vassdragets nedre deler med avtakende infeksjonsintensitet oppover i vassdraget. Sammen med data om tettheten av laksunger tydet disse resultatene på at parasitten først ble introdusert til vassdragets nedre deler og at dette hadde skjedd i perioden sommeren 1994 - våren 1995.

Ti år senere ble det gjennomført genetiske analyser av *G. salaris* fra Lærdalselva . Resultatene fra dette arbeidet, som er et samarbeid mellom polske, finske og norske forskningsmiljøer, presenteres i denne rapporten.

November 2008

Bjørn Ove Johnsen

1 Innledning

Bruk av molekylærgenetiske metoder innenfor økologi og bevaringsbiologi har økt mye de senere år. Ved hjelp av molekylære metoder har man kunnet utlede utviklingshistorien til gener og organismer (molekylær fylogeni) og metodene kan anvendes for å finne fram til slektskapsforhold mellom nært beslektede arter og mellom populasjoner av samme art.

Polymerasekjedereaksjonen (PCR) er en sentral teknikk i molekylærbiologisk forskning. Ved hjelp av denne teknikken er det mulig å kopiere opp DNA eller å "oppformere" ett gitt område av et gen selv om man kun har tilgjengelig et begrenset materiale som for eksempel ved undersøkelser av små dyr som *Gyrodactylus salaris*. "Oppformeringen" skjer ved hjelp av en spesifikk "DNA-primer" eller "DNA-markør" som initierer dannelsen av en ny, identisk DNA-streng, som etter hvert blir duplisert så mange ganger ved hjelp av PCR at mengden DNA blir egnet for mange slags molekylærgenetiske analyser. PCR-teknikken har ofte blitt brukt innenfor populasjonsgenetikk for å studere polymorfe loci. Et locus (eller et sted på kromosomet, loci er flertal) sies å være polymorft hvis to eller flere alleler (genvarianter) eksisterer sammen i populasjonen. Allelene kan skille seg fra hverandre ved én eller flere punktmutasjoner (dvs at et basepar er byttet ut med et annet), eller ved at de har ulik lengde. Slik genetisk variasjon kan avdekkes på flere måter, blant annet ved sekvensering av baserekkefølgen i DNAet. Dersom genvariantene har ulik lengde, kan forskjellen mellom dem bestemmes ved raskere metoder, siden vandringshastigheten til en DNA-tråd gjennom et spenningsfelt er avhengig av lengden på tråden.

Analyser av mitokondrie-DNA er en vanlig brukt metode for å undersøke slektskapsforhold mellom nært beslektede arter og mellom populasjoner av samme art. Mitokondrie-DNA nedarves fra mor til avkom i én utgave (dvs at det er haploid), har en enkel struktur og er den best kjente delen av genomet (den samlede arvemassen) hos dyr. Enkelte mitokondrie-gener er mer variable enn andre, f.eks CO1-genet hos *G. salaris*. Finske forskere har utviklet en "primer" som kan brukes til oppformering av dette genet (Meinilä et al. 2002). En DNA-sekvens fra det haploide mtDNAet, kalles en haplotype.

Størsteparten av arvematerialet finnes i kjerne-DNAet, som hos de fleste organismer er diploid, dvs at det nedarves i to utgaver, én fra far og én fra mor. I gener i kjerne-DNAet kan et individ være homozygot (dvs at begge utgaver er genetisk like) eller heterozygot (ulike). Individets genetiske sammensetning kalles en genotype. Ved analysene av *Gyrodactylus*-materialet fra Lærdalselva ble det benyttet én kjerne-DNA-markør, ADNAM1 (Ziętara et al. 2006), som blant annet skiller ulike genotyper fra hverandre ved at allelene kan ha ulikt antall basepar i samme locus.

Ved hjelp av molekylære metoder ble lakseparasitten *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 nylig vist å være en heterozygot hybrid mellom to separate *Gyrodactylus*-stammer som parasiterer på harr (*Thymallus thymallus*) (Kuusela et al. 2007). Hybriden, som er vertsspesifikk for laks, blir antatt å være resultatet av en hybridiseringshendelse som fant sted for om lag 130 000 år siden i en mellomistidsperiode da Kvitsjøen og Østersjøen var knyttet sammen (Meinilä et al. 2004, Kuusela et al. 2007). Denne mitokondrisk monofyletiske (har felles stammor), men variable utviklingslinjen antas å være endemisk (stedegen) for laksunger i Østersjøen inkludert de store innsjøene Ladoga og Onega i den russiske delen av Karelen. Da parasitter fra denne stammen ble introdusert til laksepopulasjonene i norske elver (Johnsen & Jensen, 1991) og til en elv (Keret) i Kvitsjøebassenget (Kudersky et al. 2003), ble ungfiskbestandene i elvene sterkt redusert på grunn av dødelighet som følge av de kraftige parasittangrepene på laksungene som til da ikke hadde vært eksponert for denne parasitten.

Basert på sekvensering av mtDNA delte Meinilä et al. (2002) og Hansen et al. (2003) *Gyrodactylus salaris* i ulike utviklingslinjer eller klader som i sin tur ble delt inn i ulike haplotyper av *G. salaris* på Atlantisk laks, Baltisk laks, regnbueaure og sjørøye. På laksunger i norske vassdrag ble det påvist tre haplotyper hvorav haplotypene A og B tilhører samme utviklingslinje:

Haplotype A forekommer i de fleste infiserte vassdrag i Norge (f.eks Røssåga, Vefsna, Steinkjervassdraget, Batnfjordelva, Driva, Litledalselva, Usma, Henselva, Rauma, Innfjordelva). I tillegg ble den påvist i to elver (Surtan, Åtran) på den svenske vestkysten.

Haplotype B ble funnet i Skibotnelva og Signaldalselva. Denne haplotypen er også påvist i Torneälven og Vindelälven i Sverige.

Haplotype F tilhører en annen utviklingslinje (klad) av *G. salaris* og er funnet på laksunger i de norske elvene Drammenselva, Lierelva, Lærdalselva (Hansen et al. 2003) og i innsjøen Kuito, som drenerer til Kvitsjøen i den russiske delen av Karelen (Meinilä et al. 2004). Denne utviklingslinjen atskilte seg fra *G. salaris* på Baltisk laks med omkring 3 % i mitokondrie-DNA sekvensen.

Denne haplotypen av *G. salaris* ble også funnet å være vanlig i finske regnbueaureanlegg som en aseksuell regnbueaure-klon (RBT- klon) (kloner = genetisk like individer) (Ziętara et al. 2006). Den samme sammensetningen i mitokondrie-DNA er også funnet i Danmark og i Sverige blant annet i innsjøen Bullaren (Hansen et al. 2003).

Formålet med undersøkelsen var å undersøke forholdet mellom Lærdalselva parasittene og RBT-klonen og andre stammer av *G. salaris*. For å sjekke identiteten til parasittene i Lærdalselva, analyserte vi 30 parasittindivider fra en sterkt infisert laksunge som ble fanget i 1996.

2 Materiale og metoder

Tretti eksemplarer av *G. salaris* fra en laksunge ble undersøkt. Materialet var spritfiksert og var innsamlet ved elfiske på et område (stasjon 2) i nedre del av Lærdalselva den 1. november 1996 (kfr. figur 1 i Johnsen & Jensen 1997). Den molekylære analysen ble utført i juli 2007 og dette viser at spritfiksert materiale holder seg tilstrekkelig godt til at det kan brukes i slike analyser i minst 10 år.

2.1 Molekylære metoder

DNA fra *G. salaris* ble ekstrahert ved å legge enkeltindivider i en løsning bestående av 0.45 % Tween, 0.45% Igepal and 60 µg/ml proteinase K i en konsentrert PCR buffer. Ekstraheringen ble gjennomført i en PCR-maskin i 25 min ved 65 °C, fulgt av inaktivering av proteinase K i 10 min ved 95 °C og avkjøling ved 4 °C. To µl av det urensede DNAet ble brukt som grunnlag (mal) for PCR oppformering.

Det mitokondrielle cytochrom c oksidase I (COI) genet hos *G. salaris* ble sekvensert som tidligere (Ziętara et al. 2006; Kuusela et al. 2007) fra seks eksemplarer fra Lærdalselva (eksemplar nr .10 - 15 i øvre rad i Fig. 1). Lengden på mtDNA-sekvensen som ble oppnådd var 1623 basepar.

En kjerne-DNA-markør, ADNAM1, ble undersøkt ved hjelp av primere utviklet for *G. salaris* (Ziętara et al. 2006; Kuusela et al. 2007). Vi oppformerte et kort segment av DNA markøren for å skille størrelsesforskjellen mellom de "korte" og de "lange" allelene umiddelbart etter første gangs PCR. Disse primerne var: Forover FB (5'- GCCCT TCCTA TAACT CAAAA-3') og bakover RB (5'- CTGAA CGAGA CCGAA AAATG) og oppformerer et DNA segment som er < 200bp langt (Fig. 1). PCR produktet synliggjorde de lange og korte allelene på 2 % agarose gel (Fig. 1). De lange sekvensene ble utviklet som i Ziętara et al. (2006). GenBank tilgangsnr for ADNAM1 genotypene som ble funnet i Lærdalselva er: O1 – EU223244 og S3 – EU223245.

Alle detaljene om de molekylære metodene er beskrevet i Ziętara et al. (2006) og Kuusela et al. (2007).

3 Resultater

3.1 Lærdalselvparasittenes mitokondrielle haplotype

Den mitokondrielle sekvensen hos seks parasitteksemplarer var forskjellig fra den tilsvarende sekvensen hos den regnbueaurespesifikke *G. salaris* i Finland (RBT-klonen) i en enkelt nukleotide. Forskjellen var en synonym transisjon (C til T) i tredje posisjon av det 68. Kodon (fenylalanin UUC /UUU). GenBank sitt tilgangsnummer for Lærdalselva mtDNA er EU223246. Sekvensene framkom ved direkte sekvensering.

Den nye DNA-substitusjonen var oppstrøms (5') fra de ~ 800 bp lange sekvensene som er publisert tidligere fra lakseparasitter i Lærdalselva, Drammenselva og Lierelva (Hansen et al. 2003), fra røyeparasitter i Pålbufjorden (Robertsen et al. 2007), og fra regnbueaureparasiiter i Bullaren (Hansen et al. 2003).

3.2 Lærdalselvparasittenes kjerne-DNA genotype

Kjerne-DNA markøren, ADNAM1, viste to genotyper i Lærdalselva. PCR-resultatene er vist i Fig. 1. Seks parasitter viste et sterkt bånd i det lange allelet (191 bp) og et svakere bånd i det korte allelet (168 bp). Disse seks eksemplarene med to bånd var lik eksemplarene av RBT-klonen fra Finland hvor alle de 237 eksemplarene var identiske (Kuusela et al. 2007). De øvrige 24 eksemplarene hadde bare det sterke båndet i det lange allelet. Dette mønsteret tilsvarer resultatene fra "standard baltisk" *G. salaris*, og det ble også funnet i innsjøen Kuito hos de to klonene med mtDNA bakgrunn fra det finske RBT-klonet (Ziętara et al. 2006).

Begge ADNAM1-fenotypene av Lærdalselvparasittene ble sekvensert (de seks eksemplarene #10 - #15 i øvre rad i Fig. 1). Tolkningen av resultatene av direkte sekvensering kan gjøres med basis i samlingen av elleve alleler (haplotyper) som er klonet og sekvensert tidligere (Ziętara et al. 2006, Kuusela et al. 2007). Den direkte sekvensavlesningen av fenotypen med det korte allelet var TMRTCRWWT¹, hvilket passer med O1-klonet funnet på *Oncorhynchus mykiss* og også på Ohrid aure (*Salmo letnica*). Genotypen ble avledet å være (del23) TCATCGTTT / TCATCATAT / TAGTCAAAT (Fig. 2 i Kuusela et al. 2007).

¹ The marking of heterozygous nucleotides using IUPAC code:
<http://www.dna.affrc.go.jp/misc/MPsrch/InfoIUPAC.html>

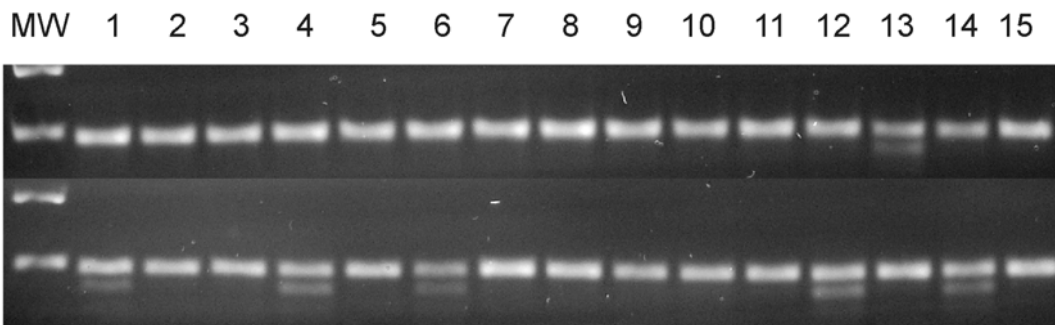


Fig 1. ADNAM1 variasjon hos tretti eksemplarer av *Gyrodactylus salaris* fra en laksunge fra Lærdalselva. Gelen med etidiumbromidfarget DNA (i UV-lys) viser fenotypene av alle tretti eksemplarene slik som de framstår ved hjelp av PCR. MW = molekylvekt standard 200 bp. Eksemplar #13 i øvre rad og nr. 1, 4, 6, 12 og 14 i nedre rad viser det korte allelet (168 bp) typisk for regnbueauretypen av *G. salaris*, i tillegg til et par av lange alleler (191 bp), som er karakteristiske for standardtypen av lakseparasitten. Det lange båndet er omtrent dobbelt så sterkt som det korte.

Den direkte sekvensavlesningen av genotypen som bærer bare lange alleler var TMRTCATAT, hvilket passer med genotypen S3 som tidligere er funnet i *G. salaris*-populasjonene fra Vefsna (Kuusela et al. 2007) og i Torneälven, Finland (Kuusela et al. 2008). I disse populasjonene forekom genotypen S3 sammen med ulike mtDNA-haplotyper som begge tilhørte mtDNA utviklingslinjen (kladen) spesifikk for en standard baltisk laks. Genotypen S3 består av vidt utbredte alleler, TCATCATAT and TAGTCATAT, som ikke finnes hos harrparasitter, men hos spesifikke lakseparasitter (Fig. 2. i Kuusela et al. 2007). I Lærdalselva, ble kjerne-DNA genotypen S3 funnet på en ny mitokondriell bakgrunn. Dette viser at den var en rekombinasjon med moderlig opphav fra regnbueauretypen av parasitten.

4 Diskusjon

Det er tidligere gjennomført en omfattende kartlegging av den norske *G. salaris*-epidemien ved hjelp av sekvensering av mitokondrie-DNA (mtDNA) fra en rekke lokaliteter (Hansen et al. 2003). Basert på mtDNA ble det klarlagt at det var minst tre forskjellige "under-epidemier" av gyrodactylose (sykdom forårsaket av *Gyrodactylus*) på norske laksunger og at disse "under-epidemiene" var forårsaket av ulike stammer av *G. salaris*. De ulike stammene av *G. salaris* var forskjellige med hensyn til mtDNA og ble beskrevet som ulike haplotyper. Parasittene i Lærdalselva (og også i Drammenselva og Lierelva) var av samme mtDNA-haplotype (haplotype F) av *G. salaris* som er funnet på oppdrettet regnbueaure i Finland, Sverige og Danmark (Hansen et al. 2003; Meinilä et al. 2004). Denne mtDNA-haplotypen, som er spesifikk for regnbueaure, viste seg å forekomme som triploid hybrid i finske fiskeanlegg i form av en aseksuell RBT-klon (Ziętara et al. 2006). Ved analyse ved hjelp av en kjerne-DNA markør, ADNAM1, viste det seg at RBT-klonen i de finske fiskeanleggene alltid forekom i den samme heterozygote formen i tre ADNAM1-alleler (Ziętara et al. 2006). Alt i alt ble mer enn 237 eksemplarer innsamlet fra mange finske fiskeoppdrettsanlegg med lange tidsintervall og alle var identiske (Kuusela et al. 2007). Tatt i betraktning parasittens korte generasjonstid (Cable & Harris, 2002), betyr likheten hos alle prøvene fravær av seksuell formering, fordi de undersøkte individene er forbundet i tid gjennom tusener av mellomliggende generasjoner.

Formålet med denne undersøkelsen var å undersøke forholdet mellom Lærdalselva parasittene og RBT-klonen og andre stammer av *G. salaris*.

Materialet fra Lærdalselva som er undersøkt, er lite. Kun 30 individer av *G. salaris*, hentet fra én og samme laksunge. Det er imidlertid 6 - 30 ganger større enn tidligere materialer fra Lærdalselva som er undersøkt ved hjelp av molekylære metoder (Cunningham et al. 2003; Hansen et al. 2003, 2006).

Det viste seg at *G. salaris*-parasittene fra Lærdalselva hadde en ny kombinasjon av de genetiske markørene. MtDNA-segmentet var forskjellig fra RBT-klonen i Finland bare i en enkelt nukleotid. Innenfor ~800 bp som var sekvensert tidligere fra andre *G. salaris* stammer på laks og røye var mtDNA-segmentet imidlertid identisk (Hansen et al. 2003, Robertsen et al. 2007). Tatt i betraktning en evolusjonsrate på minimum 7 % sekvensforskjell pr. million år i mitokondrie-DNA hos *Gyrodactylus* (Kuusela et al. 2007), så er en forskjell i et enkelt nukleotid av 1623 basepar noe som man kan forvente å finne i en såvidt stor parasittpopulasjon som den som opprettholdes av europeisk regnbueaueoppdrett.

En av de to forskjellige ADNAM1-genotypene i Lærdalselva var O1 som tidligere er beskrevet fra regnbueaure i fiskeanlegg i Finland (Ziętara et al. 2006) og også hos Ohrid ørret (Kuusela et al. 2007). Dette viser at RBT-klonen var tilstede i parasittpopulasjonen som ga opphav til infeksjonen i Lærdalselva. Observasjonen fra Lærdalselva utvider signifikant klonens utbredelsesområde og styrker antagelsen om at den er i hovedsak aseksuell (så lenge den forekommer alene på verten).

Den andre ADNAM1-genotypen (N = 24) i Lærdalselva hadde en ny kombinasjon av kjerne-DNA og mitokondrie-DNA: i kjerne-DNA hadde disse parasittene genotype S3 tilsvarende den som er beskrevet i stammer fra Vefsna og Torneälven (Kuusela et al. 2007, 2008). MtDNA-haplotypen var imidlertid den samme som hos de andre parasittene i Lærdalselva (dvs. en variant av RBT-klonen) og forskjellig fra den mtDNA-haplotypen som vanligvis finnes sammen med genotype S3 (haplotype A).

Er det så mulig å rekonstruere historien bak denne rekombinasjonshendelsen? Materialet som vi har undersøkt her var fra 1996. I Valdres, som ikke er langt fra Lærdalselva, har det vært og er fortsatt oppdrett av regnbueaure i flere anlegg. Begnavassdraget som renner gjennom Valdres hører til Drammensvassdraget hvor også mtDNA-RBT-typen av *G. salaris* er funnet (Hansen et al. 2003). Det er imidlertid ikke langt fra Valdres til Lærdalselva og en av teoriene om forekomsten av *G. salaris* i Lærdalselva er at den stammer fra regnbueaure i Valdresområdet. I forbindelse med soppangrep (*Saprolegnia*) på innlandsfisk i området i 2001 (Johnsen & Ugedal, 2001), ble flere distriktsveterinærer som arbeidet eller hadde arbeidet i området intervjuet. En av veterinærene rapporterte at i slutten av 1980-årene ble det også produsert laksesmolt i Valdresregionen og at laksen kom fra et eller annet sted i Vest-Norge. Det hadde også forekommet flere transporter av regnbueaure fra Vest-Norge til Valdres-regionen. Den samme personen hadde observert laksunger infisert med *Gyrodactylus* i Valdres. Begge vertene (laks og regnbueaure) ble observert med *G. salaris*-infeksjon i det samme anlegget i innsjøen Tyrifjorden, som ligger nedstrøms Valdres-regionen (Mo, 1991). Dermed var alle komponentene tilstede i området og *G. salaris* stammene hadde mulighetene til å møtes og å rekombinere.

Store og ofte tette populasjoner av tamme dyr og planter skaper optimale omgivelser for utvikling av nye sykdomsfremkallende organismer. Ikke-stedegne fiskearter som blir oppdrettet i fiskeanlegg antas å være særlig produktive i så måte siden de kan utgjøre et slags forsøksområde for de lokale parasittene slik at disse kan utvikle genetiske nyskapninger ved rekombinasjoner (Taraschewski, 2006). Evolusjon av sykdomsfremkallende organismer i oppdrett blir videre understøttet ved at de nyskapede rekombinasjonene kan overføres tilbake til de opprinnelige vertene eller spres videre innenfor den nye vertspopulasjonen. Denne menneskeskapede prosessen blant ferskvannsorganismer etterligner storskala geologiske hendelser, men i sterkt aksellerert tempo.

Den genetiske sammensetningen hos parasittene i Lærdalselva viser at parasittene var fremavlet ved krysning av lakseparasitten (som hann) med regnbueaureparasitten (RBT-klonen)

(som hunn). Nye betraktninger av IGS resultatene hos Cunningham et al. (2003) og Hansen et al. (2006) bekrefter et slikt scenario og antyder at også parasittene i Oslofjord-området mest sannsynlig er lignende eller parallelle rekombinasjoner.

5 Referanser

Cable, J. & Harris, P.D. 2002. Gyrodactylid developmental biology, historical review, current status and future trends. - *International Journal for Parasitology* 32: 255 - 280.

Cunningham C.O., Collins C.M., Malmberg G. & Mo T.A. 2003. Analysis of ribosomal RNA intergenic spacer (IGS) sequences in species and populations of *Gyrodactylus* (*Platyhelminthes: Monogenea*) from salmonid fish in northern Europe. - *Diseases of Aquatic Organisms* 57: 237-246.

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.

Hansen H., Martinsen L., Bakke T.A. & Bachman L. 2006. The incongruence of nuclear and mitochondrial DNA variation supports conspecificity of the monogenean parasites *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli*. - *Parasitology* 133: 639-650.

Johnsen B.O. & Jensen A.J. 1991. The *Gyrodactylus* story in Norway. - *Aquaculture* 98: 289-302.

Johnsen B.O. & Jensen A.J. 1997. Tetthet av laksunger og forekomst av *Gyrodactylus salaris* i Lærdalselva høsten 1996. NINA Oppdragsmelding 459: 1-17. (In Norwegian, with an English Abstract).

Johnsen B.O. & Ugedal, O. 2001. Soppinfeksjoner (*Saprolegnia* spp.) på laksefisk i Norge. - NINA Oppdragsmelding 716: 1-34 (In Norwegian with an English abstract).

Kudersky L.A., Ieshko E. & Schulman B. 2003. Distribution and range formation history of the monogenean *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 – a parasite of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* Linnaeus, 1758. - In *Atlantic Salmon Biology, Conservation and Restoration* (ed. Veselov A. Je, Ieshko E. P., Nemova N.N., Sterligova O.P., Shustov Yu.A.), pp. 77-83. Petrozavodsk, 2003.

Kuusela J., Ziętara M.S. & Lumme J. 2007. Hybrid origin of Baltic salmon-specific parasite *Gyrodactylus salaris*: a model for speciation by host switch for hemiclinal organisms. - *Molecular Ecology* 16: 5234-5245

Kuusela, J., Holopainen, R., Meiniälä M., Anttila, P., Koski, P., Ziętara M.S., Veselov, A., Primmer, C.R. & Lumme J. 2008. Clonal structure of salmon parasite *Gyrodactylus salaris* on a co-evolutionary gradient on Fennoscandian salmon (*Salmo salar*). - *Ann. Zool. Fennici* 00: 00 - 00 (in print).

Mo T.A. 1991. Variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris*, Malmberg, 1957 (*Monogenea: Gyrodactylidae*) on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) in fish farm, with comments on the spreading of the parasite in south-eastern Norway. - *Systematic Parasitology* 20: 1-9.

Meiniälä M., Kuusela J., Ziętara M.S. & Lumme J. 2002. Primers for amplifying ~820 bp of highly polymorphic mitochondrial COI gene of *Gyrodactylus salaris*. - *Hereditas* 137: 72 - 74.

Meiniälä M., Kuusela J., Ziętara M.S. & Lumme J. 2004. Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (*Monogenea: Gyrodactylidae*). - *International Journal for Parasitology* 34: 515-526.

Robertsen G., Hansen H., Bachman L. & Bakke T.A. 2007. Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) is a suitable host for *Gyrodactylus salaris* (*Monogenea, Gyrodactylidae*) in Norway. - *Parasitology* 134: 257-267.

Taraschewski H. 2006. Hosts and parasites as aliens. - *Journal of Helminthology*, 80: 99-128.

Ziętara M.S., Kuusela J. & Lumme J. 2006. Escape from an evolutionary dead-end: a triploid clone of *Gyrodactylus salaris* is able to revert to sex and switch host (*Platyhelminthes, Monogenea, Gyrodactylidae*). - *Hereditas* 143: 86-92.

NINA Rapport 371

ISSN:1504-3312

ISBN: 978-82-426-1935-8



Norsk institutt for naturforskning

NINA hovedkontor

Postadresse: 7485 Trondheim

Besøks/leveringsadresse: Tungasletta 2, 7047 Trondheim

Telefon: 73 80 14 00

Telefaks: 73 80 14 01

Organisasjonsnummer: NO 950 037 687 MVA

www.nina.no