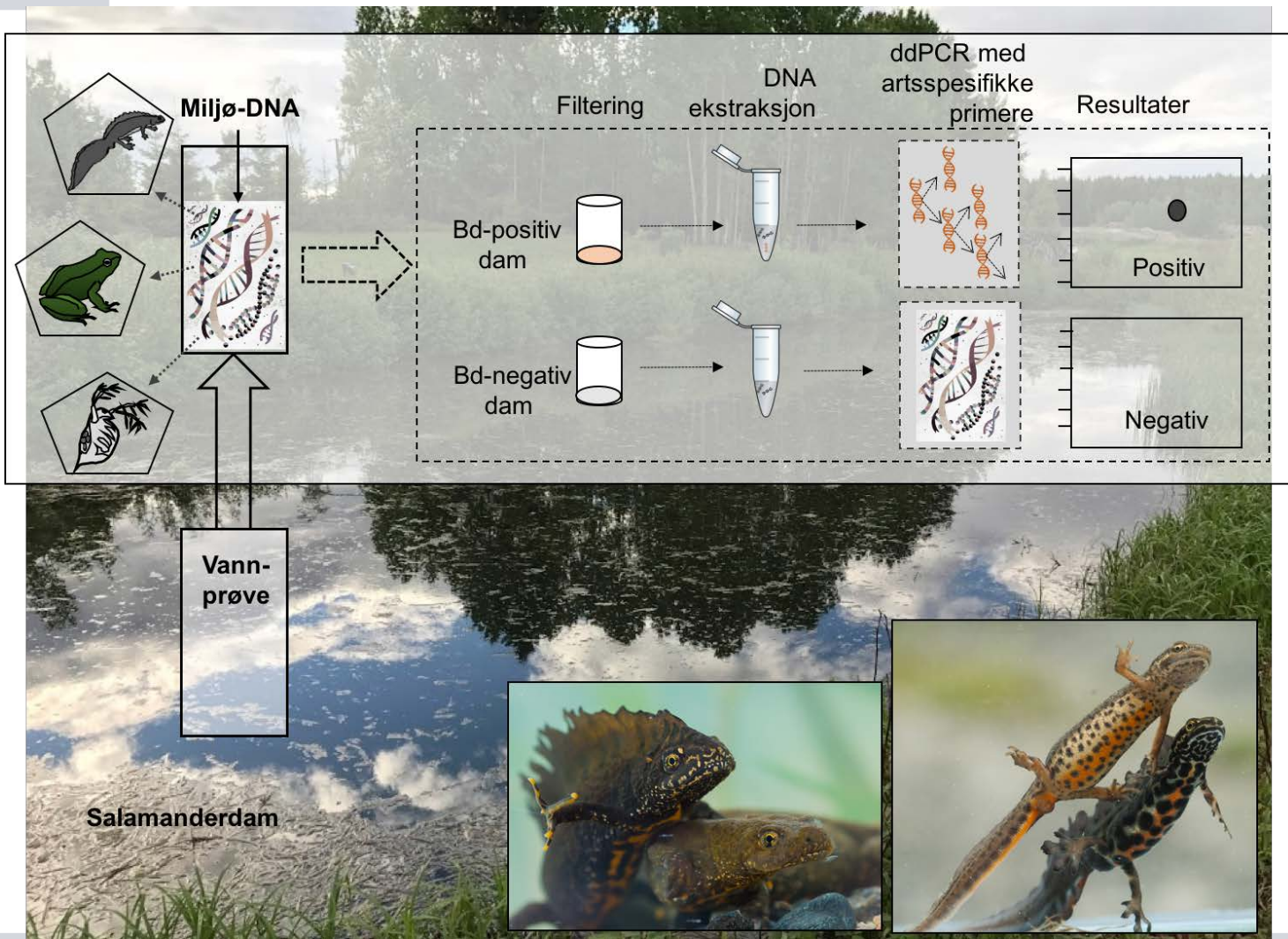


# Første påvisning av den patogene soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Norge

Bruk av miljø-DNA for påvisning av fremmede arter

Annette Taugbøl, Børre K. Dervo, Kim Magnus Bærum, Hege Brandsegg, Rolf Sivertsgård, Bjørnar Ytrehus, Andrea Miller & Frode Fossøy



## **NINAs publikasjoner**

### **NINA Rapport**

Dette er en 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.

# Første påvisning av den patogene soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Norge

Bruk av miljø-DNA for påvisning av fremmede arter

Annette Taugbøl  
Børre K. Dervo  
Kim Magnus Bærum  
Hege Brandsegg  
Rolf Sivertsgård  
Bjørnar Ytrehus  
Andrea Miller  
Frode Fossøy

Taugbøl, A., Dervo B.K., Bærum, K.M., Brandsegg, H., Sivertsgård, R., Ytrehus, B., Miller, A. og Fossøy, F. 2017. Første påvisning av den patogene soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Norge- Bruk av miljø-DNA for påvisning av fremmede arter - NINA Rapport 1399, 25 s.

Lillehammer, oktober 2017

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-3126-8

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

Åpen

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

REDAKSJON

Annette Taugbøl

KVALITETSSIKRET AV

Forskningsjef Jon Museth

ANSVARLIG SIGNATUR

Adm. direktør Norunn S. Myklebust (sign.)

OPPDRAKSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Miljødirektoratet

OPPDRAKSGIVERS REFERANSE

M-850 | 2017

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Ingrid Regine Reinkind

FORSIDEBILDE

Annette Taugbøl (bakgrunnsbilde og figur) & Børre K. Dervo © (salamanderbilder)

NØKKEWORD

- Norge, Akershus, Buskerud
- *Batrachochytrium dendrobatidis*
- Bd
- Storsalamander,
- Småsalamander
- Miljø-DNA
- Chytridiomykose
- Amfibieovervåking
- Amfibier

KEY WORDS

- Norway
- e-DNA
- Crested newt
- Smooth newt

KONTAKTOPPLYSNINGER

**NINA hovedkontor**

Postboks 5685 Torgard  
7485 Trondheim  
Tlf: 73 80 14 00

**NINA Oslo**

Gaustadalléen 21  
0349 Oslo  
Tlf: 73 80 14 00

**NINA Tromsø**

Postboks 6606 Langnes  
9296 Tromsø  
Tlf: 77 75 04 00

**NINA Lillehammer**

Fakkeltgården  
2624 Lillehammer  
Tlf: 73 80 14 00

**NINA Bergen**

Thormøhlensgate 55  
5006 Bergen  
Tlf: 73 80 14 00

www.nina.no

## Sammendrag

Taugbøl, A., Dervo B.K., Bærum, K.M., Brandsegg, H., Sivertsgård, R., Ytrehus, B., Miller, A. og Fossøy, F. 2017. *Første påvisning av den patogene sopp *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Norge- Bruk av miljø-DNA for påvisning av fremmede arter* - NINA Rapport 1399, 25 s.

NINA har som del av et forskningsprosjekt finansiert av Miljødirektoratet samlet inn vannprøver fra 34 ulike dammer i Akershus og Buskerud for analyser av miljø-DNA. Formålet har vært å undersøke om DNA isolert fra vannprøver kan brukes til å anslå tetthet av stor (*Triturus cristatus*) og liten salamander (*Triturus vulgaris*) og å teste ut om metodikken kan brukes til fremtidig overvåking av soppene *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) og *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal), som parasitterer amfibier. Resultatene som omhandler salamanderenes miljø-DNA blir oppsumert i egen rapport. Ved bruk av artsspesifikke markører for Bd og Bsal i en digital-dråpe-PCR (ddPCR) ble det påvist Bd i fem lokaliteter i Akershus kommune. Lokalitetene dekker til sammen et relativt stort område fra nord på Nesodden og sørover mot Vestby, og vi mistenker derfor at Bd kan finnes i flere lokaliteter. Dammene har relativt lave konsentrasjoner av Bd, men ulike prøver tatt fra samme lokalitet gir samme prøvesvar. Vi finner ingen tegn til nedgang i salamanderpopulasjonene i de smittede dammene, men siden vi ikke vet hvor lenge dammene har vært infisert, er det for tidlig å si hvilken konsekvens denne sopp kan ha for våre salamanderarter. Hovedverten for Bd er antatt å være frosker, men vi har dessverre ingen data på froskepopulasjonene i disse lokalitetene. Vi har så langt ikke påvist Bd i noen av vannprøvene fra Lier kommune. Dette kan tyde på at utbredelsen fortsatt er begrenset til Akershus, men vi vil presisere at negative prøvesvar ikke utelukker at Bd likevel finnes i noen av disse lokalitetene. DNA-konsentrasjonene vi finner i slike vannprøver er ofte lave, og vi vet per i dag ikke hvor mange infiserte dyr en dam må inneholde før vi får et signal i våre prøver. Alle dammene var negative for Bsal. Vi konkluderer med at miljø-DNA er en velegnet metode for å påvise patogener i vannmiljøer, og vi presenterer her den første påvisningen av Bd i Norge.

### Forfattere:

- Annette Taugbøl, NINA, Vormstuguvegen 40, 2624 Lillehammer, Annette.taugbol@nina.no
- Børre K. Dervo, NINA, Vormstuguvegen 40, 2624 Lillehammer, borre.dervo@nina.no
- Kim Magnus Bærum, NINA, Vormstuguvegen 40, 2624 Lillehammer, Kim.Barum@nina.no
- Hege Brandsegg, NINA, Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim, Hege.Brandsegg@nina.no
- Rolf Sivertsgård, NINA, Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim, Rolf.Sivertsgard@nina.no
- Bjørnar Ytrehus, NINA, Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim, Bjornar.Ytrehus@nina.no
- Andrea Miller, NINA, Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim, Andrea.Miller@nina.no
- Frode Fossøy, NINA, NINA, Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim, Frode.Fossoy@nina.no

## Abstract

Taugbøl, A., Dervo B.K., Fossøy, F., Bærum, K.M., Sivertsgård, R., Brandsegg, H., Miller, A. og Ytrehus, B. 2017. Første påvisning av den patogene soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Norge- Bruk av miljø-DNA for påvisning av fremmede arter – NINA Report 1399, 25 pp.

As part of a research project financed by the Norwegian Environment Agency (Miljødirektoratet), NINA has collected water samples from 34 different ponds in Akershus and Buskerud County for analysis of environmental DNA (eDNA). The goal of this research project was to determine if eDNA isolated from water samples could be used to estimate the population of the northern crested newt (*Triturus cristatus*) and the common newt (*Triturus vulgaris*), results that will be summarized in a second report. A second goal was to determine if this method could be used for surveillance of the pathogenic fungi *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) and *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) that parasitize amphibian skin. By using droplet digital PCR (ddPCR) and species-specific markers for Bd and Bsal, Bd was identified in five localities in Akershus County. These five ponds are distributed over a rather large area from the north of Nesodden to Vestby (see figure 2.1, infected ponds are marked with red circles). Therefore, we suspect that Bd is spread over several more water bodies within this area. Although results from these samples indicate very low concentrations of Bd, the results are consistent between the different samples. We see no signs of a decrease in the salamander populations in the infected ponds. However, because we do not know how long these ponds have been infected, it is too early to comment on how this fungus is affecting these Norwegian salamander species. The main host for Bd is in actuality frogs, but we unfortunately do not have information on the frog populations in these areas. So far, there have been no positive samples from Buskerud county. This may mean that the spread of Bd is confined to the Akershus County. However, it should also be stressed that we can not exclude the possibility that Bd is present in unsampled localities. In addition, we are still unsure of how many infected animals must be in the water to obtain a positive result using ddPCR. This means that we may have ponds where Bd is present in very low concentrations that will still test negative with this method. All the ponds were negative for Bsal. From these results, we conclude that eDNA is a suitable method for identifying pathogens in the water environment, and we report the first identification of Bd in Norway.

### Authors:

- Annette Taugbøl, NINA, Vormstuguvegen 40, 2624 Lillehammer, Annette.taugbol@nina.no
- Børre K. Dervo, NINA, Vormstuguvegen 40, 2624 Lillehammer, borre.dervo@nina.no
- Kim Magnus Bærum, NINA, Vormstuguvegen 40, 2624 Lillehammer, Kim.Barum@nina.no
- Hege Brandsegg, NINA, Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim, Hege.Brandsegg@nina.no
- Rolf Sivertsgård, NINA, Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim, Rolf.Sivertsgard@nina.no
- Bjørnar Ytrehus, NINA, Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim, Bjornar.Ytrehus@nina.no
- Andrea Miller, NINA, Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim, Andrea.Miller@nina.no
- Frode Fossøy, NINA, Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim, Frode.Fossoy@nina.no

# Innhold

<b>Sammendrag</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>Innhold</b> .....	<b>5</b>
<b>Forord</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Innledning</b>	
1.1. Hva er Bd.....	7
1.2. Hva er chytridiomykose? .....	7
1.3. Hvordan er sykdomsforløpet til amfibiene som er smittet? .....	8
1.4. Hvor kommer Bd fra og hvor er den påvist? .....	9
1.5. Hvordan smittes lokaliteter ved BD? .....	10
1.6. Påvisning av Bd direkte fra dyr og fra vannprøver .....	10
<b>2 Materialer og metoder</b>	
2.1. Utvelgelse av dammer i Lier, Oslo og Akershus.....	12
2.2. DNA ekstraksjon og ddPCR.....	12
2.3. Test av strykepørver ("skin swabs") fra storsalamander.....	13
2.4. Innsamling av positiv Bd-dam i Sverige.....	13
2.5. Tradisjonell Innsamling av salamandere i ruser.....	13
2.6. Predikering av fangst pr innsats.....	13
<b>3. Resultater og Diskusjon</b>	
3.1. Bd påvist i Norge .....	15
3.2. Geografisk spredning av Bd i Norge.....	15
3.3. Bd og sykdomsforløp i europeiske arter .....	17
3.4. Andre aktuelle sykdomsforløp for amfibier .....	19
3.4.1. <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> .....	19
3.4.2. Ranavirus .....	19
3.5. Veien fremover .....	20
<b>4 Referanser</b> .....	<b>21</b>

## Forord

NINA har som del av et forskningsprosjekt finansiert av Miljødirektoratet samlet inn vannprøver fra 34 ulike smådammer og vannlokaliteter i Akershus og Buskerud for analyser av miljø-DNA.

Formålet med dette prosjektet var å undersøke om DNA isolert fra vannprøver kan brukes til å anslå tetthet av stor og liten salamander, samt å teste ut om metodikken kan brukes til fremtidig overvåking av spredning av fremmede arter som *Batrachochytrium dendrobatidis* og *Batrachochytrium salamandrivorans*. Disse soppene (heretter omtalt som Bd og Bsal) gir sykdommen chytridiomykose, som mistenkes å være en av de viktigste årsakene til den omfattende bestandsnedgangen en har sett hos mange arter av frosk, padde og salamandre i store deler av verden. Denne rapporten omhandler kun delprosjektet knyttet til påvisning av Bd, mens resultatene for salamander og mulig bruk av miljø-DNA som metode i populasjonsberegninger kommer i egen rapport.

Anette Taugbøl har vært prosjektleder og hatt ansvaret for innsamlingen av miljø-DNA prøver i felt og skrevet førsteutkastet til rapporten. Børre Dervo og Kim Magnus Bærum har hatt ansvaret for salamanderovervåkingen og bestandsmodelleringen. Frode Fossøy har hatt ansvaret for organisering av miljø-DNA analysene. Rolf Sivertsgård har bidratt med innsamlingen av miljø-DNA prøver i felt. Hege Brandsegg har hatt ansvaret for lab analysene. Andrea Miller og Bjørnar Ytrehus har bidratt med slutføring av rapporten.

Vi ønsker å takke Hilde-Marit Dervo for hjelp i felt, Per Nyström for innsamling av vannprøver i Skåne, Anssi Laurila og Sara Meurling for oversendelse av DNA fra infisert frosk fra Uppsala og Jon Museth for gjennomlesning og kommentarer.

Lillehammer, oktober 2017

Annette Taugbøl,  
Prosjektleder



# 1 Innledning

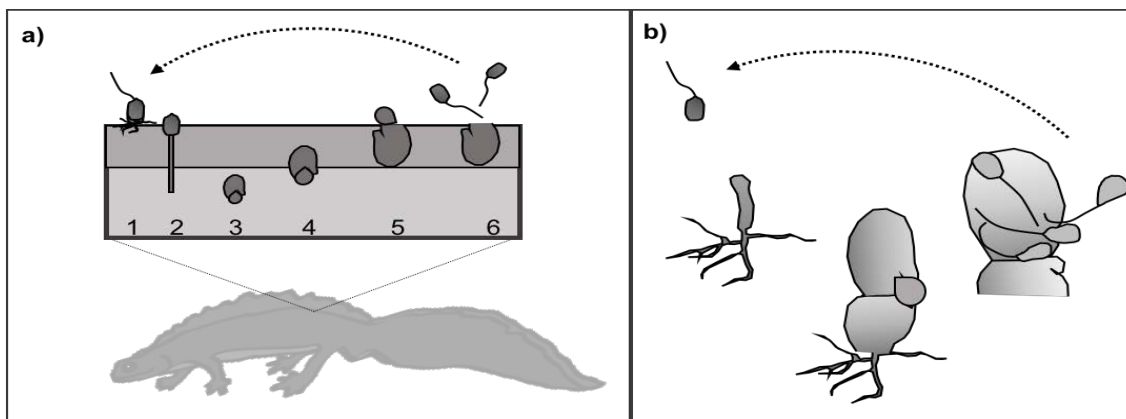
## 1.1 Hva er Bd?

Bd (*Batrachochytrium dendrobatidis*) er en algesopp i rekken Chytridiomycota, en av de mer primitive typene av sopp vi kjenner til i dag. Det finnes omtrent 1 000 algesopparter der de fleste av disse lever i ferskvann, men det finnes også arter som lever i jord, eller som parasitter på planter. Algesopper formerer seg som regel både kjønnnet og ukjønnnet. Ved kjønnnet formering dannes det sporangier og hvileceller som sender ut kjønnsceller som siden vokser opp til gametofytter som utveksler kjønnsceller. Denne delen av formeringssyklusen er så langt ikke observert hos Bd i laboratorier. Det er funnet indikasjoner på hvileceller fra en enkelt lokalitet (Rosa et al. 2007) men funnene regnes som usikre. Genomsekvensering av flere ulike Bd-linjer støtter også at ukjønnnet formering via mitose er den viktigste årsaken til genetisk variasjon selv om det ikke utelukkes at seksuell formering eller hybridisering med andre, nært beslektede arter, kan ha forekommet (Rosenblum et al. 2013).

Den ukjønnede livssyklusen til Bd omfatter to stadier; et mobilt via zoosporer som er avhengig av vann og et fastsittende ved et zoosporangie som slipper ut zoosporer (se **figur 1.1** for illustrasjon). Zoosporene er kortlevde og lever typisk kun opp mot 24 timer. Selv om den har kort levetid og kun svømmer korte avstander, ser de ut til å kunne respondere med positiv bevegelse mot sukker, proteiner og aminosyrer (Moss et al. 2008). Når zoosporene kommer i kontakt med en vert, reabsorberes flagellen og det utvikles en cellevegg slik at zoosporen omdanner seg til en spore (Berger et al. 2005, Laurance et al. 1996). Sporen fester seg med rhizoidlignende tråder på overflaten av huden og danner en slags tube som trenger inn i en levende celle dypere ned i huden. Tuben svulmer opp til å danne en thallus som igjen sender ut nye tuber som infiserer flere celler. Herfra sprer infeksjonen seg i cellegagene, mens de infiserte cellene transporteres mot hudoverflaten ettersom huden fornyes. Når cellene når overflaten og zoosporangiet er modent, frigis zoosporene gjennom et rør (discharge tube) som sees som et lite hull i epidermiscellene. Opptil tre zoosporangier er observert i en enkel epidermiscelle (Berger et al. 2005). At Bd utvikler seg i synkront med vertscellenes vei mot det ytre hudlaget kan tyde på at Bd har spesialisert seg som parasitt i vev gjennom en langvarig evolusjon med vertsdyr (Berger et al. 2005). Bd kan også vokse og spre seg uten vert, selv om det er uvisst hvor lenge den kan overleve i bl.a. jord (Johnson & Speare 2005). Soppen kan også utvikle seg videre selv om vertsdyret dør (Laurance et al. 1996).

## 1.2 Hva er chytridiomykose?

Bd påfører amfibier infeksjonssykdommen chytridiomykose via zoo-sporer da amfibier fungerer som vertskap for Bd og blir bærere av zoosporangier. Selve soppen ble først beskrevet i 1998 (Berger et al. 1998, Longcore et al. 1999) etter at det ble påvist at chytridiomykose var årsaken til massive nedganger av froskepopulasjoner i fjellområder i Australia på 1970-tallet (over 90% nedgang av antall eller total utryddelse av arter) (Berger et al. 1998, Laurance et al. 1996, Longcore et al. 1999, Mendelson et al. 2006). Chytridiomykose er også senere knyttet til dramatiske, raske populasjonsnedganger og utryddelse av amfibier blant annet i Nord-Amerika, Sør-Amerika, Australia og Europa (Fisher et al. 2009, Skerratt et al. 2007) og har per i dag infisert over 500 arter av amfibier (Olson et al. 2013). Sykdommen regnes i dag som en av de viktige årsakene til tapet av biologisk mangfold blant amfibier (Daszak et al. 2003, Kilpatrick et al. 2010).



**Figur 1.1** Ukjønnet livssyklus for *Bd* hos a) vertedyr og b) utenfor vertedyr. I figur a) vises 1) den vannbårne, kortlevde zoosporen som har funnet en vert og fester seg til overflaten av epidermis (keratinlaget eller stratum corneum, representert med mørkegrå farge) ved hjelp av rhizoidlignende tråder og reabsorberer flagellen, 2) gjennom boring av hudvev til den 3) når de dypere lagene av huden (stratum granulosum og stratum mucosum, representert med lysegrå farge) der den 4) utvikler seg i takt med at den fraktes ut mot overflaten av epidermis og 5) slipper en plugg som 6) frigjør modne, mobile zoosporer (Berger et al. 2005). Zoosporene kan enten infisere nye vertedyr eller feste seg på vertedyret de kom fra. Figur b) illustrerer livssyklusen til *Bd* kjent fra dyrkning i laboratorium, der zoosporene reabsorberer flagellen og danner ferdigvokste zoosporangier etter typisk 4-5 dager ved 20° C (Berger et al. 2005). Figuren er tilpasset fra Berger et. al. 2005 (Berger et al. 2005).

### 1.3 Hvordan er sykdomsforløpet til amfibiene som er smittet?

Selv om chytridiomykose hos amfibier nå har vært kjent i snart tjue år, er det ennå relativt lite man vet om sykdomsforløpet til amfibiene, hvorfor de dør og om alle amfibiegrupper eller arter (frosk, salamandere m.m.) påvirkes likt. Noen ganger dør dyrene akutt, uten tydelige sykdomsforandringer, mens en andre ganger ser klassiske hudlesjoner med hyperplasi og erosjoner (Bosch & Martínez-Solano 2006, Bosch et al. 2001). Andre synlige tegn på infeksjon kan være hudflassing og misfarging av huden, ofte i rødlige fargetoner. Hos frosk er særlig mageregionen, føtter og tær utsatt for infeksjon (Berger et al. 2005, Puschendorf & Bolaños 2006), mens nedre del av mage, for- og bakben og undersiden av halen er mer utsatt hos salamandere (Van Rooij et al. 2011)

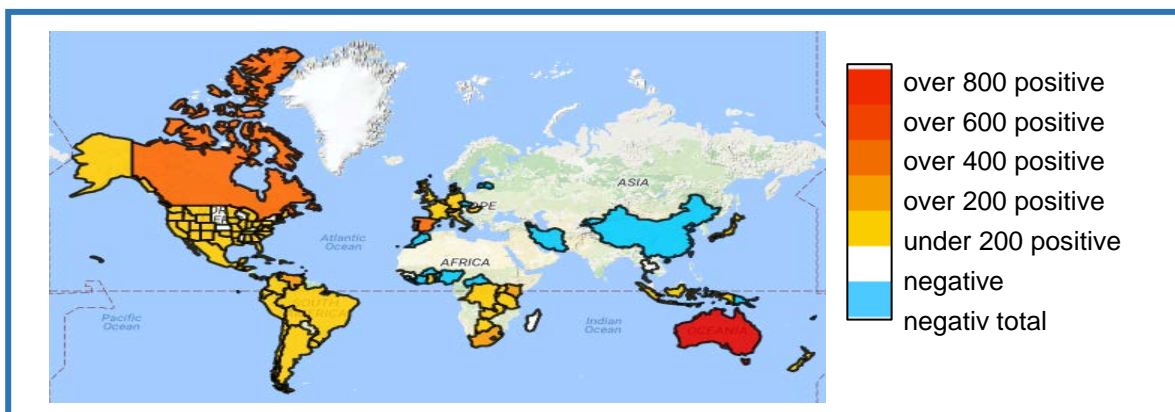
Det vises ofte til at antall zoosporangier som har infisert og utviklet seg i vertedyret er avgjørende (Kinney et al. 2011, Vredenburg et al. 2010), men det virker også som de ulike livsstadiene blir påvirket forskjellig. Siden *Bd* kun ser ut til å infisere keratiniserte celler, begrenser infeksjonen hos rumpetroll seg til munndelene. Spredning til føttene skjer etter metamorfose, da cellene her også keratiniserer seg til hudvev. Hos voksne frosker tror man at skadene i huden påvirker osmoreguleringen og/eller elektrolyttbalansen i dyras vev og blod (Voyles et al. 2007). Dette kan tenkes å gi akutt død som følge av hjertestans. Soppinfeksjonen ser også ut til å påvirke fødeinntak og gir dermed dårlig tilvekst (Hanlon et al. 2015). Celler som har inneholdt zoosporangier

kan også fungerer som festepunkt og inngangsport for bakterier (Berger et al. 2005), slik at allerede svekkede dyr kan omkomme av andre typer infeksjoner. Enkelte arter, særlig salamanderarter, ser ut til å kunne tåle infeksjon av Bd bedre enn andre og kan fungere som tilsynelatende friske smittebærere (Davidson et al. 2003, Weinstein 2009).

## 1.4 Hvor kommer Bd fra og hvor er den påvist?

Det er noe usikkert hvor Bd stammer fra. Genetiske og historiske data tyder på at algesoppen mest sannsynlig kommer fra Brasil (Rodriguez et al. 2014, Rosenblum et al. 2013), men det er også indikasjoner på at soppen kan stamme fra Afrika (Weldon et al. 2004), østlige deler av USA (James et al. 2009), eller Japan (Goka et al. 2009). Per i dag er det beskrevet minimum seks ulike Bd-isolater (Rosenblum et al. 2008) og det er ikke utenkelig at ulike isolater av Bd kan ha ulike evolusjonære historier. Det ble bekreftet funn på to ville frosk i Danmark 2007 (Scalera et al. 2008). Soppsykdommen ble bekreftet på ville frosker i Sverige i 2010, fra lokaliteter i Skåne og Blekinge sør i landet (Hallengren) og er funnet så langt nord som Uppsala (Anssi Laurila, muntlig meddelelse). Det hersker stor usikkerhet om hvor lenge Bd har eksistert og i hvilken grad Bd har påvirket de danske og svenske populasjonene (Hallengren).

Rett etter at Bd ble oppdaget, ble det lagt frem to hypoteser for hvordan Bd hadde klart å spre seg så hurtig. Tilhengere av «tilsynkommende patogen-hypotesen» («Emerging pathogen hypothesis») argumenterer for at Bd kun har eksistert i et visst område, der regionens amfibier har vært evolusjonært tilpasset. Bd har så bli spredt rundt til nye områder, der amfibiene har vært evolusjonært og/eller immunologisk naive ovenfor smitten. Den "endemiske patogen"-hypotesen argumenterer for at Bd har vært tilstede i miljøet over lang tid, men at ulike faktorer fører til at den nå har blitt mer virulent (Kilpatrick et al. 2010, Rachowicz et al. 2005). Det er fortsatt usikkerheter om hvilke av hypotesene som best beskriver de faktiske hendelsene, og trolig er det en kompleks mosaikk av begge teoriene (Rosenblum et al. 2013), avhengig av hvilken verdensdel eller hvilken Bd-isolat det gjelder. Dette gjelder spesielt hvis det viser seg at enkelte isolater også er ulike arter, noe det spekuleres i utfra en nylig genomsekvensering av 29 ulike linjer av Bd (Rosenblum et al. 2013). Per i dag eksisterer Bd i samtlige verdensdeler der det eksisterer amfibier, den har infisert minst 520 amfibiarter og den blir stadig observert i nye områder (Olson et al. 2013), se **figur 1.2** for minimum utbredelse ([www.bd-maps.net](http://www.bd-maps.net)).



**Figur 1.2** Illustrasjon av minimum utbredelse av Bd. Kartet viser minimum utbredelse av Bd og hvor mange positive prøver som er analysert og registrert hos [www.bd-maps.net](http://www.bd-maps.net) per 2017. Bd er blant annet også oppdaget i Sverige og Norge, og utbredelsen av Bd er trolig langt høyere enn man har dokumentert så langt.

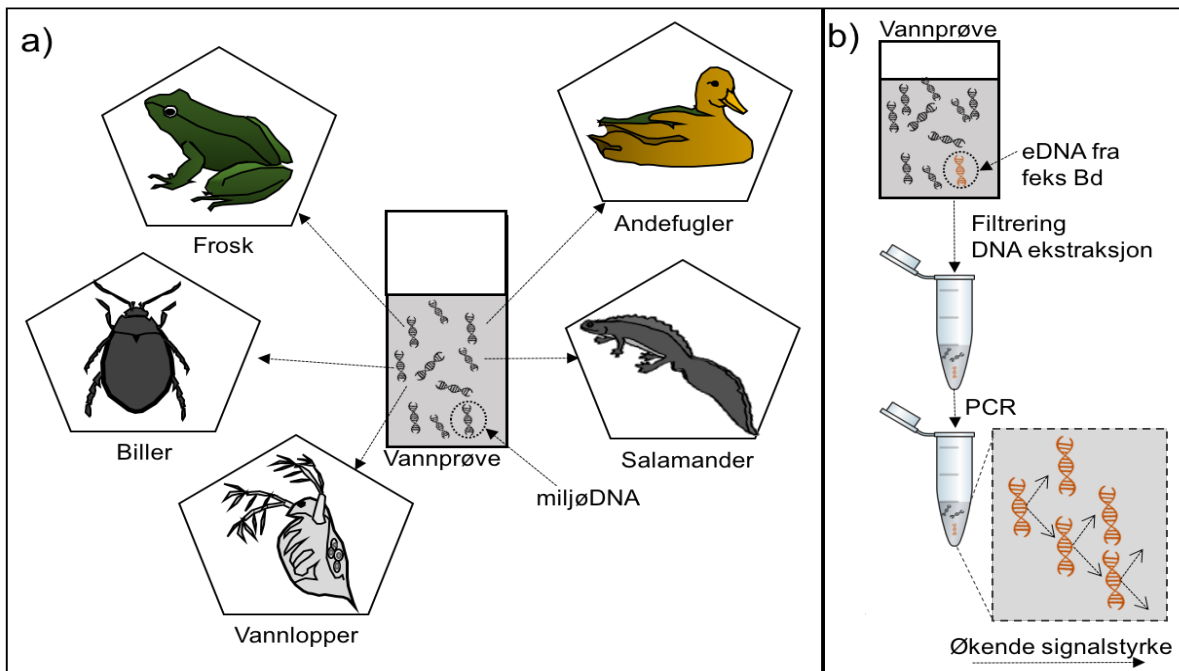
## 1.5 Hvordan smittes lokaliteter ved BD?

Optimal temperatur for Bd i laboratorier er mellom 17 og 25° C, og den vokser svært sakte ved temperaturer ned mot og under 10° C (Piotrowski et al. 2004). Til tross for dette ble det funnet mye høyere konsentrasjoner av Bd på amerikanske oksefrosker i april (med gjennomsnittstemperatur på 8.5° C) enn juli (gjennomsnittstemperatur på 15° C) (Tinsley et al. 2015), så det kan virke som andre miljøfaktorer og/eller langvarig dvale av allerede infiserte individer, kan være fordelaktig for Bd i naturlig miljø. Bd har vist seg å være svært tolerant for pH og kan vokse i medier med pH fra 5 til 9, med preferanse for pH mellom 6 og 7.5 (Johnson & Speare 2005, Piotrowski et al. 2004). Zoosporene er helt avhengige av et vannholdig miljø for forflytning.

Det finnes en del teorier om hvordan Bd kan spre seg fra kontinent til kontinent og fra lokalitet til lokalitet. Det er imidlertid stor usikkerhet knyttet til hvilken spredningsmetode som er viktigst. Infeksjon med Bd skjer som nevnt via zoosporer (**figur 1.1**). Både zoosporangiene og zoosporene må ha et fuktig miljø, men zoosporangiene kan overleve opp mot sju uker i damvann uten amfibier (Johnson & Speare 2003), i sterilt vann opptil 2 uker med pH 5.6 (Johnson & Speare 2005) og opptil fire uker i pH 7 (Johnson & Speare 2003). Det er vist at zoosporangier kan overleve opp mot 2.5 timer i fjær fra vannfugl og opp mot to timer i fjær av landfugl, samt at zoosporer kan overleve en til to timer på begge fjærtypene etter kun ett minutt eksponering for aktive zoosporer (Johnson & Speare 2005). Når det gjelder spredning ved fuktig jord har dette vist seg å både være avhengig av pH og jordtype, da ren pottejord med pH 4.1 gav null vekst, mens våt sandjord med pH 5.8 gav fortsatt levedyktige zoosporer etter 12 uker i isolat (Johnson & Speare 2005). Handel med smittede amfibier kan spre smitte på tvers av miljøer ved at man f.eks. henter inn vann fra hagedammer med infisert utstyr eller dyr rømmer/slippes ut i naturen. Det er blant annet fanget inn flere eksemplarer av infiserte amerikanske oksefrosker i Storbritannia som gir støtte for denne spredningshypotesen (Garner et al. 2005, Tinsley et al. 2015). Smitte og virulens, er både avhengig av hvilket isolat av Bd det dreier seg om. Blant annet har de ulike isolatene ulike vertspreferanser (Bielby et al. 2015, Van Rooij et al. 2012, Van Rooij et al. 2015).

## 1.6 Påvisning av Bd direkte fra dyr og fra vannprøver

Bd kan påvises på flere måter. Den mest sensitive metoden er ved hjelp av molekylærgenetisk påvisning av DNA fra Bd. Ved å ta vevsprøver fra døde dyr eller en hudprøve ved å stryke en bomullspinne over huden til levende dyr ("skin swabs"), kan en isolere DNA og identifisere soppen ved hjelp av artsspesifikke genetiske markører (**figur 1.3b**) i en polymerase kjedereaksjon (fra engelsk: polymerase chain reaction, PCR). Bd-DNA kan også påvises ved filtrering av vann (Hyman & Collins 2012), se **figur 1.3**. Ved å påvise soppen direkte fra vannet først via miljø-DNA, kan man redusere fangsttynnsatsen i disse dammene når man går ut og fanger individer for å kvantifisere omfanget av smitten. Dette reduserer både kostnader, tidsbruk og det er dyrevelferdsmessig gunstig å unngå mest mulig håndtering av amfibiene. Ved å bruke genetiske prøver tatt fra levende dyr kan man mest sannsynlig påvise Bd ved lavere konsentrasjoner enn fra vannprøver, som f.eks. tidlig i spredningsforløpet når de fleste infiserte dyra bare er i tidlig fase av sykdommen (Boyle et al. 2004). Andre metoder som kan brukes til påvisning av Bd er histologisk undersøkelse av biopsier eller døde dyr og dyrking av vann- eller vevsprøver. Dette kan være nødvendig for å fastslå om tilstedeværelsen av soppen forårsaker sykdom hos amfibiene.



**Figur 1.3** Illustrasjon av a) miljø-DNA og b) artsspesifikke genetiske markører. a) Miljø-DNA er alt DNA isolert fra jord, vann og luft, og er derfor en kompleks blanding av DNA-fragmenter fra ulike organismer i det gitte miljøet (både fra mitokondriet og cellekjernen, intra- og extracellulært). b) Ved bruk av artsspesifikke markører som kun amplifiserer og kopierer DNA fra ønsket art får man en eksponentiell vekst av DNA-kopier fra organismen man ønsker å detektere, resten av DNAet sender ikke ut noe signal og blir dermed ikke avlest. Resultatet fra en PCR kan avleses på flere måter, enten via separering i agarose eller direkte i kvantitativ PCR (qPCR) eller digital-dråpe-PCR (ddPCR). Figuren er utarbeidet av Annette Taugbøl for denne rapporten.

## 2 Materialer og Metoder

### 2.1 Utvelgelse av dammer i Lier, Oslo og Akershus

Det ble valgt ut 17 dammer i Lier og 15 dammer i Buskerud og Akershus der det kunne samles inn vann forholdsvis enkelt, se kart i **figur 2.1**. Det ble også samlet inn vann fra én lokalitet i Søgne i Vest-Agder og én i Lillehammer i Oppland. I hver dam ble det samlet inn 1 L vann fra 15 stasjoner langs bredden av dammen der det årlig også fanges salamandere med ruser. De 15 prøvene ble så blandet sammen på en stor kanne hvor fra to prøver på ca. 0.5 L vann ble filtrert gjennom et 0.45 µl filter (Thermo Scientific Nalgene CN 145-0045). Vannet ble filtrert ved hjelp av en manifold (Pall filter funnel manifold) og en vakuumpumpe (Sartorius Microsart e.jet), drevet av et bilbatteri. Dersom filtreringen av 0.5 L tok for lang tid ble filtreringen avbrutt og vannvolum notert. Filtrene ble så brettet og lagret i 1400-1440 µl ATL-buffer før de ble sent i post til NINAs genetikklaboratorium i Trondheim. En av dammene som gav utslag på Bd ble prøvetatt tre ganger i løpet av felt-sesongen 2017 (Ottarsrud), de andre fire ble prøvetatt én gang.

### 2.2 DNA-ekstraksjon og ddPCR

DNA oppsamlet i filtrene ble isolert ved hjelp av DNA Blood and Tissue kit (Qiagen). For å de-tektere Bd og Bsal ble det kjørt digital-dråpe-PCR (ddPCR) med artsspesifikke markører som kun gir signal dersom DNA fra disse artene er tilstede i prøven (se mer informasjon om Bsal nedenfor). ddPCR er en PCR-metode som gir en absolutt måling av DNA-molekyler i prøven. I motsetning til qPCR (kvantitativ-PCR), der konsentrasjonen av DNA måles ved avlesning av økende PCR-produkt på en kurve, vil prøven i en ddPCR deles opp i inntil 20 000 små oljedråper der det i hver oljedråpe foregår en separat PCR-reaksjon. Etter endt PCR-reaksjon blir hver dråpe avlest som et positivt (1) eller negativt (0) resultat (ingen DNA-molekyler i dråpen). Det er flere fordeler med en ddPCR-analyse, både at resultatene er lite påvirket av effektiviteten til PCR-reaksjonen og de genetiske markørene, og at flere PCR-reaksjoner kan slås sammen slik at man får et bedre estimat med hensyn til totalkonsentrasjon av DNA i prøven. Ved å kombinere flere kjøringar vil man anta at antall DNA-koper per dråpe vil danne en Poisson-fordeling gitt ved:

$$\text{Ligning 1) } [DNA] = \frac{-\log(\text{antall negative dråper}) / (\text{totalt antall dråper})}{\text{dråpevolum}}$$

Videre, for å kunne kontrollere for filtrert vannvolum og mengde DNA-ekstrakt brukt i hver analyse har vi laget et mål på antall DNA-kopier per liter gitt ved:

$$\text{Ligning 2) } DNA \text{ kopier pr L vann} = \frac{[DNA] / (\text{ddPCR volum} * \text{DNA ekstrakt volum})}{\text{mengde vann}}$$

Ved å bruke ligning 2) oppnås et standardisert mål på DNA-mengde i prøven kontrollert for filtrert vannvolum, samt ulike volumendringer og fortyninger i lab. For å unngå falske positive signaler, har vi satt en grense på minst fire positive dråper i analysen. Alle prøver med opp til 3 positive dråper er altså antatt negative i våre analyser. Dette er en grense som har blitt satt ut i fra tidligere erfaringer fra negative kontroller på laben der det har vist seg at disse noen ganger kan ha én eller i sjeldne tilfeller to positive dråper.

## 2.3 Hudprøver ("skin swabs") fra storsalamander

Som ledd i en uttesting av DNA-profilering av enkeltindivider gjorde vi tilfeldigvis en test av hudprøver «skin-swabs» fra 34 voksne storsalamandere fordelt på to lokaliteter i Lier. Hudprøver består her i å dra bomullspinner forsiktig over huden til levende dyr for å fange opp løse hudceller som inneholder DNA. Dette er en metode som er brukt tidligere for å påvise Bd hos amfibier. DNA oppsamlet på bomullspinnen ble isolert og kjørt i ddPCR på samme måte som vannfiltrene.

## 2.4 Innsamling fra positiv Bd-dam i Sverige

For å sikre at metoden fanger opp Bd ble det også tatt vannprøver fra to dammer i Skåne, Sverige, der en av dammene var registret som positiv i 2016 etter DNA-analyse av slim av padde, mens den andre var negativ, se kart i Figur 2.1. Prøvetakningen ble her gjennomført noe annerledes: en enkelt punktprøve på 0.5 L ble samlet inn og filtrert gjennom et vannfilter (Sterivex-GP 0.22 µm filter unit). Prøven ble så tilsatt ATL buffer og sendt i post til NINAs genetikklaboratorium i Trondheim.

## 2.5 Overvåking av salamander

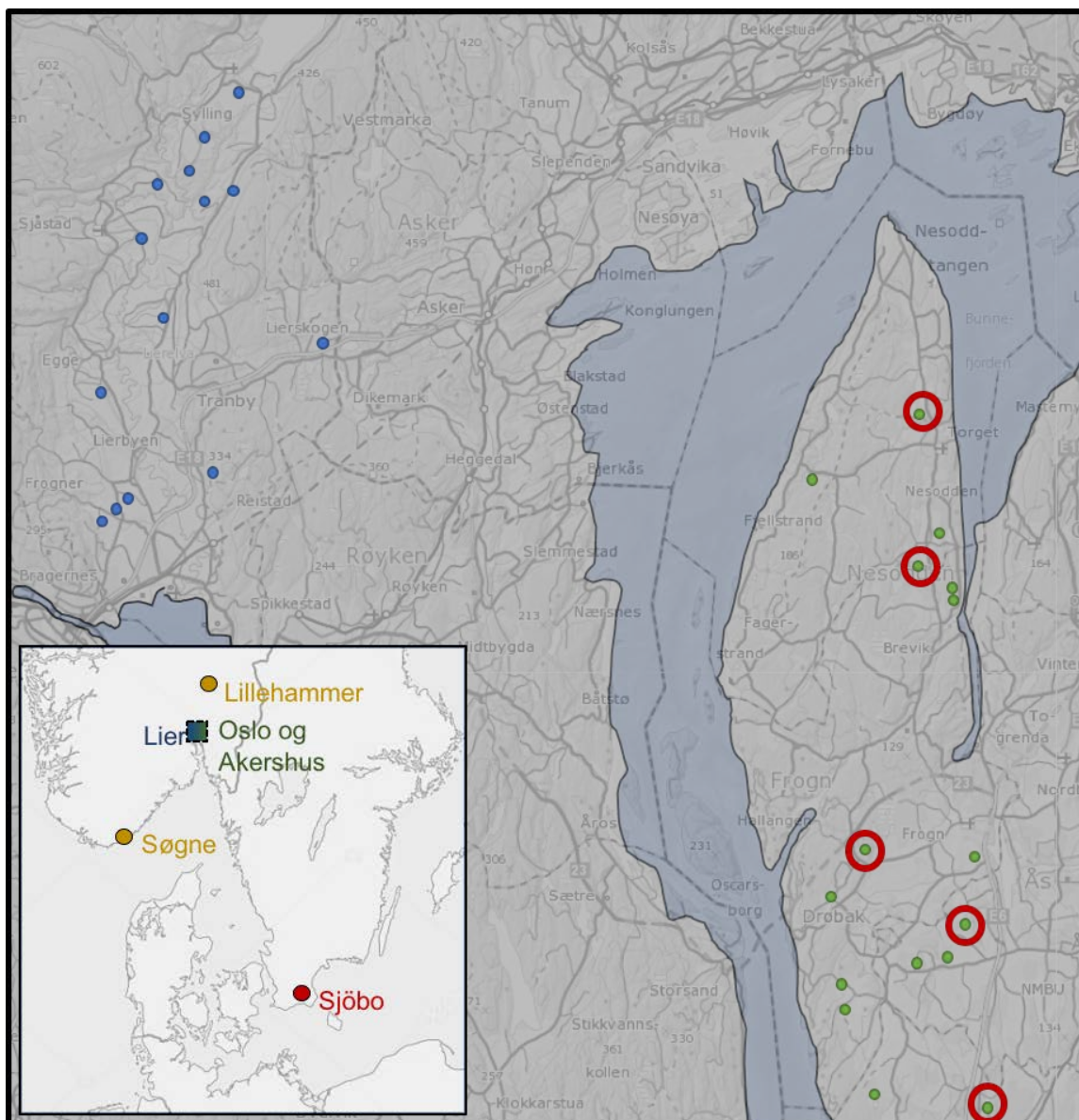
Overvåking av småsalamander (*Lissotriton vulgaris*) og storsalamander (*Triturus cristatus*) ble gjennomført med en standardisert rusefangst (Dervo et al. 2014, Dervo et al. 2013). NINA har overvåket samtlige dammer inkludert i denne rapporten med rusefangst av salamandere siden 2008 i Lier og siden 2013 i Akershus (Dervo et al. 2015, Dervo et al. 2012). Det er også målt temperatur i dammene slik at fangst per innsats kan korrigeres noe for aktivitet (salamander viser lavere aktivitet og fangst ved lavere temperatur) (Dervo et al. 2016).

## 2.6 Predikering av fangst pr innsats

Selv om prosedyrene rundt innsamling av salamander er standardiserte er det flere ytre variable og tilfeldigheter som spiller inn på hvor mange individer som blir fanget, og som kan gi endringer i observert fangst som ikke nødvendigvis stemmer med faktiske populasjonsendringer. Eksempel på en slik kjent variabel er vanntemperatur. For å prøve å korrigere noe for slike tilfeldigheter i fangsten, samt effekten av temperatur, har vi konstruert en statistisk modell som predikerer individer fanget per innsats, basert på et utvalg av miljøvariabler. Modellen ble konstruert som en generalisert lineær mikset effekt-modell, med Poissonfordeling. Variabler som ble inkludert i modellstrukturen var temperatur, areal, år, antall rusetimer, dam og påvist forekomst av Bd. Konkret, så standardiserer vi temperatur til gjennomsnittstemperaturen rundt fangsttidspunktet for



alle dammene av interesse når vi predikerer fangst. Predikert fangst vil derfor bli justert opp eller ned som følge av estimert forhold til temperatur fra modellen. Vi tror derfor at predikert fangst basert på modellen med standardiserte temperaturer gir et mer nyansert forhold av populasjons-utviklinger enn rådata av observasjoner. Det er i midlertidig viktig å merke seg at det fremdeles er knyttet usikkerhet rundt slike prediksjoner, og at fangsttrender basert på disse skal tolkes som indikasjoner på populasjonsendringer og ikke som absolutte mål.



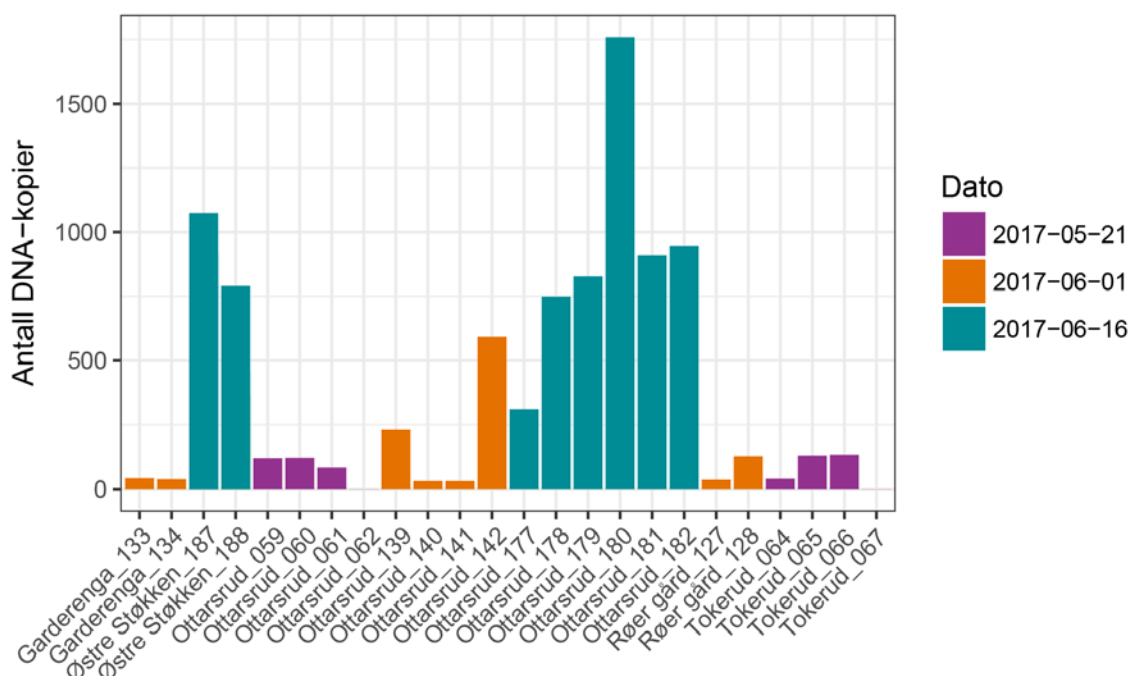
**Figur 2.1** Kartet viser de innsamlede lokalitetene for 2017 der Lier er merket med blå og Akershus med grønne sirkler. Kartutsnittet nederst til venstre indikerer posisjonen til dammene innsamlet i Lillehammer, Agder og Sjøbo. Av de totalt 34 lokalitetene ble det påvist Bd i fem dammer i Akershus, merket med røde sirkler.



## 3 Resultater og Diskusjon

### 3.1 Påvisning av Bd i Norge

Bd ble påvist i fem lokaliteter i Akershus i 2017 (**figur 3.1 og 3.2**). Alle dammene viste negative resultater for Bsal. Vi finner relativt lave konsentrasjoner av Bd i vannprøvene, men resultatene er konsistente mellom ulike duplikate prøver fra en eller flere oppsamlingskanner innsamlet i de fem ulike dammene (se **figur 3.1**). For en av lokalitetene (Ottarsrud) har vi tatt prøver ved tre ulike tidspunkter med til sammen 14 enkeltprøver. Bare en av disse var negativ for Bd (**figur 3.1**). For de andre fire aktuelle lokalitetene gjennomførte vi bare én prøvetaking. Konsentrasjonen av miljø-DNA er avhengig av mange faktorer, blant annet temperatur og aktivitet på dyrene, og vi ser at DNA-konsentrasjonene er høyest ved den siste prøvetakingen 16. juni (**figur 3.1**). Dette er som forventet.



**Figur 3.1** DNA-konsentrasjon av Bd i forhold til dato ved prøvetaking i fem ulike lokaliteter i Akershus ved hjelp av vannprøver og miljø-DNA-analyser.

### 3.2 Geografisk spredning av Bd i Norge

Lokalitetene hvor vi har påvist Bd ligger relativt spredt og representerer dammer av ulike størrelser (se **figur 2.1** for kart). Disse dammene representerer den første påvisningen av Bd i Norge, men vi kan ikke si noe om hvor lenge Bd har vært tilstede i disse lokalitetene. Fangstdata for de samme dammene viser ingen tydelige endringsmønstre i populasjonsstørrelser, se **figur 3.2**, og det er uvisst om Bd nettopp har etablert seg i dammene og dermed kan bli mer fremtredende og gi sykdomstegn i fremtiden. Fra **figur 3.2** kan det se ut til at dammene der det nå er påvist Bd

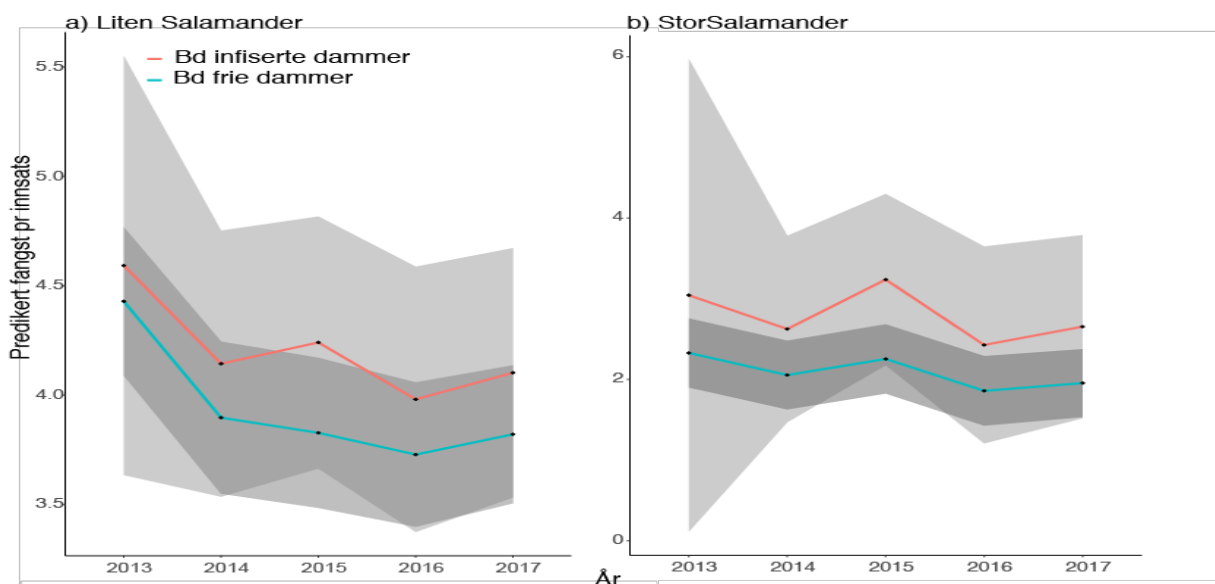
hadde noe en større nedgang i bestanden i 2016, enn for de dammene vi ikke påviste Bd. Usikkerheten i bestandsanslaget er også større for Bd lokalitetene, enn for de uten Bd (det grå feltet i figur 3.2). Modellen som beregner bestandsutviklingen er imidlertid utviklet for å vise endringer over tid i et større område (15 til 20 forekomster), og mindre egnet til å vurdere bestandsutvikling for enkeltlokaliteter. Forskjellene i **figur 3.2** skyldes trolig mer metodiske enn reelle forskjeller i bestandsutvikling. Det er derfor grunn til å tro at det ikke er signifikante forskjeller mellom lokaliteter med og uten Bd. Dyrene vi fanget i 2017 viste ingen tegn til infeksjon, men det kan være svært vanskelig å peke ut Bd-infiserte individer på grunnlag av kliniske funn (Bosch & Martínez-Solano 2006) (se **figur 1.1**). Det må her påpekes at det ikke er gjort noen studier eller overvåking av froskepopulasjonene som lever i de samme dammene.

Den geografiske spredningen til Bd peker i retning av at det kan finnes flere infiserte lokaliteter. Dette kan både være lokaliteter som ikke ble prøvetatt i 2017, og prøvetatte lokaliteter som har gitt falskt negativt resultat. Dette kan skje når smittenivået er lavt (vi vet per i dag ikke hvor mange infiserte dyr et vannvolum må inneholde før vi får et signal i våre analyser), når hovedkilden til smitten forekommer i andre deler av dammene enn den vi har prøvetatt, eller når prøvene har blitt samlet inn på ugunstige tider i forhold til zoospore-aktiviteten. Det kan med andre ord ikke utelukkes at flere av dammene vi undersøkte faktisk har en lav eller begynnende smitte av Bd.

Det er ikke påvist Bd på vestsiden av Oslofjorden eller i den nordligste kjente storsalamanderlokaliteten i Oppland (lokaliteten i Søgne slo ikke ut på verken Bd, stor- eller liten salamander). I tillegg til vannprøver, ble det også testet for Bd på hudprøver tatt direkte fra 34 dyr med en bomullspinne ("skin swabs") fra to lokaliteter i Lier. Samtlige slimprøver gav negative resultater som tilsier at dyrene med høy sikkerhet ikke var smittet. Dette styrker indikasjonen på at utbredelsen fortsatt er begrenset til Akershus, men vi vil presisere at vi fortsatt ikke kan konkludere med at Bd ikke finnes i noen av disse lokalitetene.

Hvordan Bd har kommet til Norge og hvordan Bd har blitt overført til de ulike dammene er vanskelig å si på dette tidspunktet, potensielle introduksjonsveier kan være:

- transport med fugl
- utsetting av infiserte amfibier
- transport med jord, planter e.l.
- transport med infisert vann
- overføring med vått prøvetakingsutstyr, hov, garn eller fiskeutstyr



**Figur 3.2** Bestandsutvikling i Akershus for a) liten og b) stor salamander. Figuren viser hvordan fangst per innsats varierer fra 2013 til 2017 i dammer med påvist Bd (merket i rødt) og hittil registrerte Bd-frie dammer (merket blått), med 90% konfidens intervaller (merket lyst grått for bd-infiserte dammer og mørkt grått for bd-frie dammer). Fangst per innsats-tallene er korrigert for temperatur (se materialer og metoder punkt 2.6. for mer informasjon).

### 3.3 Bd og sykdomsforløp hos europeiske arter

Til tross for at Bd er påvist over store geografiske områder og i forholdsvis høye konsentrasjoner hos smittede individer, er det hittil registrert forholdsvis få dramatiske populasjonsnedganger i Europa. Det kan virke som europeiske arter er mer robuste (Chiari et al. 2013, Pasmans et al. 2013) eller innehar en alternativ livshistoriestrategi med færre dager i vann eller fuktig miljø som gir mer motstand mot Bd-smitte (Garner et al. 2005). Per 2011 var minst 44 amfibiearter i Europa infisert med Bd (Baláz et al. 2014), men ingen europeisk art har så langt vi vet hittil blitt utryddet av Bd-smitte. Det er derimot flere svært sårbare arter, der videre eksistens kan avhenge av om en klarer å forhindre at bestandene smittes med Bd.

Det har blitt påvist Bd i europeiske arter lagret i laber og museum fra 1998, med særlig høy forekomst i Spania og Sveits (Garner et al. 2005). Fra et beskyttet fjellområde i Spania har det vært dokumentert massiv nedgang i populasjoner av "jordmorpadder" (*Alytes obstetricans*) siden 1997 (Bosch et al. 2001) og jevn nedgang av nordpadde (*Bufo bufo*) og ildsalamander (*Salamandra salamandra*) siden 1999 (Bosch & Martínez-Solano 2006). Bestandsnedgangen er i begge tilfellene assosiert med chytridiomykose. Dyrene som ble obdusert hadde ikke tydelige hudlesjoner, men Bd ble påvist over hele hudoverflaten. Det samme var tilfelle for de døde salamanderne. I det spanske eksemplet så man at mens frosken hadde vært tilstede i 35 dammer før 1997, ble det etter 1997 bare funnet rumpetroll i fem dammer.

Ved smitteforsøk av nordpadde og buttsnutefrosk (*Rana temporaria*) fant man at det var høyere dødelighet ved høyere doser av Bd og ved lav startvekt for nordpadde, noe som tyder på at økt immunrespons mot Bd er svært kostbart (Bielby et al. 2015). Smitteforsøk av buttsnutefrosk førte ikke til infeksjon, men høy dose gav lavere vekst og enkelte individ ble tynnere, noe som trolig

kommer av økt aktivitet og energiforbruk til immunforsvaret. Dette indikerer at frosk som lever i miljøer der det forekommer Bd kan bli negativt påvirket selv om de selv ikke utvikler sykdom. Også for nordpadde var kroppsmasse en til dels bedre indikator for dødelighet ved lavere dose-smitte enn selve infeksjonen da tynnere dyr hadde større dødelighet ved smitte enn dyr i god kondisjon (Bielby et al. 2015). Det samme forsøket fant også økt smittespredning mellom individer av nordpadde ved høyere tetthet av dyr, noe som kan forklares ved at flere dyr gir mer omrøring i vannmassene som igjen kan gi zoosporene større bevegelighet.

Det foreligger foreløpig lite litteratur og studier på hvordan Bd kan påvirke amfibieartene vi har i Norge, se **figur 3.3** for artsoversikt. Det foreligger heller ingen informasjon om hvilken Bd-isolater som forekommer på de ulike stedene Bd er observert i Europa, selv om dette er svært viktig informasjon da disse kan ha ulike konsekvenser gitt ulike arter (Dang et al. 2017, Piovia-Scott et al. 2015, Woodhams et al. 2007). Smitteforsøket beskrevet over fant indikasjoner på at buttsnutefrosk ikke blir infisert etter fem timers eksponering for smitte (Bielby et al. 2015), mens det er funnet infiserte individer i Sveits (Sztatecsny & Glaser 2011). Andre studier viser at damfrosk (*Rana lessonae*) også kan være motstandsdyktige mot Bd, selv om de blir infiserte (Woodhams et al. 2012).

Når det gjelder nordpadde ser denne ut til å kunne bli svært svekket av Bd (Bielby et al. 2015, Bosch & Martínez-Solano 2006), og nordpadde var også en av de få amfibieartene som ble påvist infisert i Storbritannia fra prøver tatt i 2011 (Tinsley et al. 2015), trolig smittet fra utsatte eller ville infiserte oksefrosker (oksefrosk er en introdusert art i Storbritannia som har etablert seg flere steder i landet). Det kan se ut til at nordpadden er mest utsatt under metamorfosen og at kort oppholdstid i vann (ca. 4 måneder) og høy fekunditet minsker risikoen for utryddelse (Bosch & Martínez-Solano 2006, Bosch & Rincón 2008).

Det ble ikke påvist Bd hos noen av salamanderartene i Storbritannia under innsamling i 2008 (Tinsley et al. 2015), men det ble funnet enkelte infiserte individer i Sveits av begge artene vi har i Norge (Sztatecsny & Glaser 2011). Det kan fra litteraturen også se ut til at salamandere generelt ser ut til å klare seg bedre mot Bd-infeksjon enn frosk og paddearter, noe som kanskje delvis kan forklares av alternative livshistoriestrategier, slik som en lengre periode på land, og/eller bedre forsvarsmekanismer mot infeksjoner.

Fra det lille materialet som er publisert til nå, i tillegg til egne observasjoner (**figur 3.2**), har vi ikke indikasjoner på at de norske amfibieartene vil få dramatiske nedganger i nær fremtid. Isolater av Bd blir også karakterisert som mer eller mindre virulente gitt ulike amfibiearter (Dang et al. 2017, Piovia-Scott et al. 2015, Woodhams et al. 2007), og det kan virke som de fleste tilfellene av infiserte amfibier i Europa har "snillere" varianter. Det er imidlertid viktig å understreke at kunnskapen er mangelfull og at det i tillegg er andre algesopper som er mer spesialiserte på salamandere, slik som Bsal (mer informasjon lengre ned). Vi må også påpeke at ved enhver infeksjon vil det være summen av enkeltindividenes egenskaper (kondisjon, immunstatus, fysiologisk status), egenskapene ved smittestoffet (stamme, dose mv.) og den samtidige påvirkningen av andre miljøfaktorer (stress, andre smittestoffer, toksiner, temperatur, lys, vannforhold osv.) som avgjør utfallet av eksponering for smittestoff.



Figur 3.3 Bilder av norske amfibier, artsnavn i de ulike bildene. © Børre K. Dervo.

## 3.4 Andre aktuelle sykdomsforløp for amfibier

### 3.4.1 Batrachochytrium salamandrivorans (Bsal)

Batrachochytrium salamandrivorans (Bsal) er en slektning av Bd og har mange av de samme egenskapene, men den er trolig mer spesialisert på salamanderarter. Den kommer sannsynligvis fra Japan, der den ble påvist i mer enn 150 år gamle individer lagret i et museum (Martel et al. 2014). Bsal har trolig hatt en koevolusjon med lokale arter i Asia, da den ikke er like virulent der som i andre deler av verden (Martel et al. 2014). Bsal ble påvist i Nederland i 2013, etter at det hadde vært observert dramatiske nedgang i populasjoner av ildsalamander i de sørlige delene av landet (Martel et al. 2013, Spitzen-van der Sluijs et al. 2013). Bsal er nå også påvist i Belgia (Martel et al. 2014) og Tyskland (Sabino-Pinto et al. 2015). Det er ingen kjente påvisninger av Bsal i Norge per 2017, men med en optimaltemperatur mellom 10 og 15 °C (Bloom et al. 2015, Martel et al. 2013) er den trolig godt tilpasset norske forhold om den skulle spre seg hit, noe som kanskje kan skje fortere enn ønsket (Spitzen-van der Sluijs et al. 2016). Våre analyser med artsspesifikk markør for Bsal kunne ikke påvise denne arten i noen av våre lokaliteter.

### 3.4.2 Ranavirus

Ranavirus er et virus som for det meste er kjent for å ramme froskearter, men som også kan ramme andre amfibier (Chinchar & Waltzek 2014) og reptiler. Ranaviruset har, i likhet med Bd, en global utbredelse og kan forårsake sykdomsutbrudd med høy mortalitet, vanligvis på larvestadiet (Bollinger et al. 1999). Det er per i dag ingen kjente påvisninger av ranavirusinfeksjoner av amfibier i Norge, men dette har i liten grad blitt undersøkt så langt.

### 3.5 Veien fremover

NINA har drevet med overvåkning av salamandere i Akershus og Buskerud i over 10 år (Dervo et al. 2016), og det foreligger gode data på bestandsmål av stor og liten salamander i samtlige dammer omtalt i dette notatet, samt en del flere dammer i samme område. Vi kan per i dag ikke si om Bd har påvirket bestandene. Selv om nordiske arter kan se ut til å bli mindre påvirket av Bd enn en del tropiske og subtropiske arter, vil vi understreke at dette kan være på grunn av at sykdommen har vært tilstede i et kort tidsrom, at det foreløpig kan ha vært lave konsentrasjoner av Bd, og at Bd-isolat(ene) kan være av de mindre virulente typene. I tillegg kan det ha vært gunstige klimamessige forhold som har bremsset oppformeringen og spredningen av zoosporer. Dette er faktorer som kan endres svært fort, og det er viktig å kartlegge den geografiske utbredelsen av sykdommen før forholdene eventuelt endres. Kartlegging av den geografiske utbredelsen vil også være svært viktig for å unngå smitteoverføring med mennesker.

#### **Vi vil blant annet anbefale:**

1. Å gjøre en genetisk sekvensanalyse av de norske Bd-isolatene. Ved å sekvensere ulike gener/ områder i genomet til Bd får vi informasjon om oppbygningen til nukleotidene i DNA-molekylene til Bd. Denne informasjonen kan så brukes til å finne ut om det dreier seg om mer eller mindre virulente stammer av Bd, hvor mange ulike isolater av Bd vi nå har i Norge og hvor de kommer fra.
2. Å overvåke populasjoner av stor og liten salamander i de samme områdene til neste år, med innsats i et større geografisk område og antall dammer for å avdekke eventuelt flere infiserte Bd-lokaliteter. Prøvetakningen bør gjøres både via vannprøver og hudprøver fra dyr slik at vi kan si noe om hvor mange dyr som eventuelt er smittet per lokalitet (prevalens). Prøvene bør også testes for Bsal.
3. Å inkludere overvåkning og kartlegging av frosk, da Bd ser ut til å ha frosk som hovedvert. Prøvetakningen bør gjøres via hudprøver fra levende dyr.
4. Å lage en informasjonskampanje inkludert et faktaark som omhandler hvordan en best kan unngå videre smitte mellom lokaliteter.
5. At Miljødirektoratet gir ut informasjon om Bd når det gis tillatelse til fangst av amfibier.
6. At Mattilsynet oppretter kontrollområder eller soner etter Matlovens § 19 for å forhindre videre spredning av Bd på tilsvarende vis som det er gjort for krepsepest.
7. At Mattilsynet setter opp skilt ved kjente infiserte dammer for å forhindre videre spredning.

## 4 Referanser

- Baláz, V., Vörös, J., Civis, P., Vojar, J., Hettyey, A., Sos, E., Dankovics, R., Jehle, R., Christiansen, D. G., Clare, F., Fisher, M. C., Garner, T. W. J. & Bielby, J. 2014. Assessing risk and guidance on monitoring of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Europe through identification of taxonomic selectivity of infection. - *Conservation Biology* 28 (1): 213-223.
- Berger, L., Marantelli, G., Skerratt, L. F. & Speare, R. 2005. Virulence of the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, varies with the strain. - *Dis Aquat Organ* 68.
- Berger, L., Hyatt, A. D., Speare, R. & Longcore, J. E. 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. - *Diseases of Aquatic Organisms* 68 (1): 51-63.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., Slocombe, R., Ragan, M. A., Hyatt, A. D., McDonald, K. R., Hines, H. B., Lips, K. R., Marantelli, G. & Parkes, H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. - *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (15): 9031-9036.
- Bielby, J., Fisher, M. C., Clare, F. C., Rosa, G. M. & Garner, T. W. J. 2015. Host species vary in infection probability, sub-lethal effects, and costs of immune response when exposed to an amphibian parasite 5: 10828.
- Blooi, M., Martel, A., Haesebrouck, F., Vercammen, F., Bonte, D. & Pasmans, F. 2015. Treatment of urodelans based on temperature dependent infection dynamics of *Batrachochytrium salamandrivorans*. - *Sci Rep* 5.
- Bollinger, T. K., Mao, J. H., Schock, D., Brigham, R. M. & Chinchar, V. G. 1999. Pathology, isolation, and preliminary molecular characterization of a novel iridovirus from tiger salamanders in Saskatchewan. - *Journal of Wildlife Diseases* 35 (3): 413-429.
- Bosch, J. & Martínez-Solano, I. 2006. Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Peñalara Natural Park, Spain. - *Oryx* 40 (1): 84-89.
- Bosch, J. & Rincón, P. A. 2008. Chytridiomycosis-mediated expansion of *Bufo bufo* in a montane area of Central Spain: an indirect effect of the disease. - *Diversity and Distributions* 14 (4): 637-643.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I. & García-París, M. 2001. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. - *Biological Conservation* 97 (3): 331-337.
- Boyle, D., Boyle, D., Olsen, V., Morgan, J. & Hyatt, A. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. - *Diseases of aquatic organisms* 60 (2): 141-148.
- Chiari, Y., van der Meijden, A., Mucedda, M., Wagner, N. & Veith, M. 2013. No detection of the pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Sardinian cave salamanders, genus *Hydromantes*. - *Amphibia-Reptilia* 34 (1): 136-141.
- Chinchar, V. G. & Waltzek, T. B. 2014. Ranaviruses: not just for frogs. - *PLOS Pathogens* 10 (1): e1003850.

- Dang, T. D., Searle, C. L. & Blaustein, A. R. 2017. Virulence variation among strains of the emerging infectious fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) in multiple amphibian host species. - *Diseases of Aquatic Organisms* 124 (3): 233-239.
- Daszak, P., Cunningham, A. A. & Hyatt, A. D. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. - *Diversity and Distributions* 9 (2): 141-150.
- Davidson, E. W., Parris, M., Collins, J. P., Longcore, J. E., Pessier, A. P. & Brunner, J. 2003. Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). - *Copeia* 2003 (3): 601-607.
- Dervo, B. K., Dokk, T. & Dokk, J. G. 2015. Nasjonal overvåking av storsalamander *Triturus cristatus* – resultater fra Oslofjorden i 2014, Fylkesmannen i Oslo og Akershus, Miljøvern avdelingen - rapport 1/2015.
- Dervo, B. K., Skei, J. K., van der Kooij, J. & Skurdal, J. 2013. Bestandssituasjon og opplegg for overvåking av storsalamander (*Triturus cristatus*) i Norge. - *Vann* (4): 480-490.
- Dervo, B. K., Bærum, K. M., Skurdal, J. & Museth, J. 2016. Effects of temperature and precipitation on breeding migrations of amphibian species in southeastern Norway. - *Scientifica*.
- Dervo, B. K., Museth, J., Skurdal, J., Berg, O. K. & Kraabøl, M. 2014. Comparison of active and passive sampling methods for detecting and monitoring the smooth newt (*Lissotriton vulgaris*) and the endangered northern crested newt (*Triturus cristatus*). - *Herpetology Notes* 7: 265-272.
- Dervo, B. K., Skei, J. K., van der Kooij, J., Olstad, K., Sloreid, S. & Kraabøl, M. 2012. Nasjonalt overvåkingsprogram for storsalamander. Fylkesmannen i Oslo og Akershus, Miljøvern avdelingen, rapportnummer 9/2012. 45 s.
- Fisher, M. C., Garner, T. W. J. & Walker, S. F. 2009. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. - *Annual Review of Microbiology* 63: 291-310.
- Garner, T. W. J., Walker, S., Bosch, J., Hyatt, A. D., Cunningham, A. A. & Fisher, M. C. 2005. Chytrid fungus in Europe. - *Emerging Infectious Diseases* 11 (10): 1639-1641.
- Goka, K., Yokoyama, J. U. N., Une, Y., Kuroki, T., Suzuki, K., Nakahara, M., Kobayashi, A., Inaba, S., Mizutani, T. & Hyatt, A. D. 2009. Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. - *Molecular Ecology* 18 (23): 4757-4774.
- Hallengren, A. Chytridiomykosis- Ett hot mot svenska groddjur?
- Hanlon, S. M., Lynch, K. J., Kerby, J. & Parris, M. J. 2015. *Batrachochytrium dendrobatidis* exposure effects on foraging efficiencies and body size in anuran tadpoles. - *Dis Aquat Organ* 112.
- Hyman, O. J. & Collins, J. P. 2012. Evaluation of a filtration-based method for detecting *Batrachochytrium dendrobatidis* in natural bodies of water. - *Diseases of Aquatic Organisms* 97 (3): 185-195.
- James, T. Y., Litvintseva, A. P., Vilgalys, R., Morgan, J. A. T., Taylor, J. W., Fisher, M. C., Berger, L., Weldon, C., du Preez, L. & Longcore, J. E. 2009. Rapid global expansion of the fungal disease chytridiomycosis into declining and healthy amphibian populations. - *Plos Pathogens* 5 (5).
- Johnson, M. L. & Speare, R. 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. - *Emerging infectious diseases* 9 (8): 922.



- Johnson, M. L. & Speare, R. 2005. Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. - *Diseases of Aquatic Organisms* 65 (3): 181-186.
- Kilpatrick, A. M., Briggs, C. J. & Daszak, P. 2010. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. - *Trends in Ecology & Evolution* 25 (2): 109-118.
- Kinney, V. C., Heemeyer, J. L., Pessier, A. P. & Lannoo, M. J. 2011. Seasonal pattern of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and mortality in *Lithobates areolatus*: affirmation of Vredenburg's "10,000 zoospore rule". - *PLOS ONE* 6 (3): e16708.
- Laurance, W. F., McDonald, K. R. & Speare, R. 1996. Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. - *Conservation Biology* 10 (2): 406-413.
- Longcore, J. E., Pessier, A. P. & Nichols, D. K. 1999. *Batrachochytrium Dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. - *Mycologia* 91 (2): 219-227.
- Martel, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M. C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F. & Pasmans, F. 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. - *Proc Natl Acad Sci U S A* 110.
- Martel, A., Blooi, M., Adriaensen, C., Van Rooij, P., Beukema, W., Fisher, M. C., Farrer, R. A., Schmidt, B. R., Tobler, U., Goka, K., Lips, K. R., Muletz, C., Zamudio, K. R., Bosch, J., Lötters, S., Wombwell, E., Garner, T. W. J., Cunningham, A. A., Spitzen-van der Sluijs, A., Salvidio, S., Ducatelle, R., Nishikawa, K., Nguyen, T. T., Kolby, J. E., Van Boclaer, I., Bossuyt, F. & Pasmans, F. 2014. Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. - *Science* 346 (6209): 630-631.
- Mendelson, J. R., Lips, K. R., Gagliardo, R. W., Rabb, G. B., Collins, J. P., Diffendorfer, J. E., Daszak, P., Ibanez, R., Zippel, K. C., Lawson, D. P., Wright, K. M., Stuart, S. N., Gascon, C., da Silva, H. R., Burrowes, P. A., Joglar, R. L., La Marca, E., Lotters, S., du Preez, L. H., Weldon, C., Hyatt, A., Rodriguez-Mahecha, J. V., Hunt, S., Robertson, H., Lock, B., Raxworthy, C. J., Frost, D. R., Lacy, R. C., Alford, R. A., Campbell, J. A., Parra-Olea, G., Bolanos, F., Domingo, J. J. C., Halliday, T., Murphy, J. B., Wake, M. H., Coloma, L. A., Kuzmin, S. L., Price, M. S., Howell, K. M., Lau, M., Pethiyagoda, R., Boone, M., Lannoo, M. J., Blaustein, A. R., Dobson, A., Griffiths, R. A., Crump, M. L., Wake, D. B. & Brodie, E. D. 2006. Biodiversity - Confronting amphibian declines and extinctions. - *Science* 313 (5783): 48-48.
- Moss, A. S., Reddy, N. S., Dortaj, I. M. & San Francisco, M. J. 2008. Chemotaxis of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* and its response to a variety of attractants. - *Mycologia* 100 (1): 1-5.
- Olson, D. H., Aanensen, D. M., Ronnenberg, K. L., Powell, C. I., Walker, S. F., Bielby, J., Garner, T. W. J., Weaver, G., The Bd Mapping, G. & Fisher, M. C. 2013. Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. - *PLOS ONE* 8 (2): e56802.
- Pasmans, F., Van Rooij, P., Blooi, M., Tessa, G., Bogaerts, S., Sotgiu, G., Garner, T. W. J., Fisher, M. C., Schmidt, B. R., Woeltjes, T., Beukema, W., Bovero, S., Adriaensen, C., Oneto, F., Ottonello, D., Martel, A. & Salvidio, S. 2013. Resistance to chytridiomycosis in European *Plethodontid Salamanders* of the genus *Speleomantes*. - *PLOS ONE* 8 (5): e63639.

- Piotrowski, J. S., Annis, S. L. & Longcore, J. E. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. - *Mycologia* 96.
- Piovia-Scott, J., Pope, K., Joy Worth, S., Rosenblum, E. B., Poorten, T., Refsnider, J., Rollins-Smith, L. A., Reinert, L. K., Wells, H. L., Rejmanek, D., Lawler, S. & Foley, J. 2015. Correlates of virulence in a frog-killing fungal pathogen: evidence from a California amphibian decline. - *ISME J* 9 (7): 1570-1578.
- Puschendorf, R. & Bolaños, F. 2006. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Eleutherodactylus fitzingeri*: effects of skin sample location and histologic stain. - *Journal of wildlife diseases* 42.
- Rachowicz, L. J., Hero, J.-M., Alford, R. A., Taylor, J. W., Morgan, J. A. T., Vredenburg, V. T., Collins, J. P. & Briggs, C. J. 2005. The novel and endemic pathogen hypotheses: competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. - *Conservation Biology* 19 (5): 1441-1448.
- Rodriguez, D., Becker, C. G., Pupin, N. C., Haddad, C. F. B. & Zamudio, K. R. 2014. Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. - *Molecular Ecology* 23 (4): 774-787.
- Rosa, I. D., Simoncelli, F., Fagotti, A. & Pascolini, R. 2007. Ecology: The proximate cause of frog declines? - *Nature* 447 (7144): E4-E5.
- Rosenblum, E. B., Stajich, J. E., Maddox, N. & Eisen, M. B. 2008. Global gene expression profiles for life stages of the deadly amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. - *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (44): 17034-17039.
- Rosenblum, E. B., James, T. Y., Zamudio, K. R., Poorten, T. J., Ilut, D., Rodriguez, D., Eastman, J. M., Richards-Hrdlicka, K., Joneson, S., Jenkinson, T. S., Longcore, J. E., Parra Olea, G., Toledo, L. F., Arellano, M. L., Medina, E. M., Restrepo, S., Flechas, S. V., Berger, L., Briggs, C. J. & Stajich, J. E. 2013. Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. - *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (23): 9385-9390.
- Sabino-Pinto, J., Bletz, M., Hendrix, R., Bina Perl, R. G., Martel, A., Pasmans, F., Lötters, S., Mutschmann, F., Schmeller, D. S., Schmidt, B. R., Veith, M., Wagner, N., Vences, M. & Steinfartz, S. 2015. First detection of the emerging fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* in Germany. - *Amphibia-Reptilia*.
- Scalera, R., Adams, M. J. & Galvan, S. K. 2008. Occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian populations in Denmark. - *Herpetological Review* 39 (2): 199-200.
- Skerratt, L. F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K. R., Phillott, A. D., Hines, H. B. & Kenyon, N. 2007. Spread of Chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. - *EcoHealth* 4 (2): 125.
- Spitzen-van der Sluijs, A., Spikmans, F., Bosman, W., de Zeeuw, M., van der Meij, T., Goverse, E., Kik, M., Pasmans, F. & Martel, A. 2013. Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*Salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the Netherlands. - *Amphibia-Reptilia* 34 (2): 233-239.
- Spitzen-van der Sluijs, A., Martel, A., Asselberghs, J., Bales, E. K., Beukema, W., Bletz, M. C., Dalbeck, L., Goverse, E., Kerres, A., Kinet, T., Kirst, K., Laudelout, A., Marin da Fonte, L. F., Nöllert, A., Ohlhoff, D., Sabino-Pinto, J., Schmidt, B. R., Speybroeck, J., Spikmans, F., Steinfartz, S., Veith, M., Vences, M., Wagner, N., Pasmans, F. &

- Lötters, S. 2016. Expanding distribution of lethal amphibian fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. - *Emerging Infectious Diseases* 22 (7): 1286-1288.
- Sztatecsny, M. & Glaser, F. 2011. From the eastern lowlands to the western mountains: first records of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild amphibian populations from Austria. - *Herpetological Journal* 21 (1): 87-90.
- Tinsley, R. C., Coxhead, P. G., Stott, L. C., Tinsley, M. C., Piccinni, M. Z. & Guille, M. J. 2015. Chytrid fungus infections in laboratory and introduced *Xenopus laevis* populations: assessing the risks for U.K. native amphibians. - *Biological Conservation* 184: 380-388.
- Van Rooij, P., Martel, A., Haesebrouck, F. & Pasmans, F. 2015. Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. - *Veterinary Research* 46 (1): 137.
- Van Rooij, P., Martel, A., Nerz, J., Voitel, S., Immerseel, F., Haesebrouck, F. & Pasmans, F. 2011. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Mexican bolitoglossine salamanders using an optimal sampling protocol. - *EcoHealth* 8.
- Van Rooij, P., Martel, A., D'Herde, K., Brutyn, M., Croubels, S., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. & Pasmans, F. 2012. Germ tube mediated invasion of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian skin is host dependent. - *PLoS One* 7.
- Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Webb, R., Warner, J., Rudd, D., Campbell, R. & Skerratt, L. F. 2007. Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. - *Diseases of Aquatic Organisms* 77 (2): 113-118.
- Vredenburg, V. T., Knapp, R. A., Tunstall, T. S. & Briggs, C. J. 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. - *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (21): 9689-9694.
- Weinstein, S. B. 2009. An aquatic disease on a terrestrial salamander: individual and population level effects of the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, on *Batrachoseps attenuatus* (Plethodontidae). - *Copeia* 2009 (4): 653-660.
- Weldon, C., du Preez, L. H., Hyatt, A. D., Muller, R. & Speare, R. 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. - *Emerging Infectious Diseases* 10 (12): 2100-2105.
- Woodhams, D. C., Bigler, L. & Marschang, R. 2012. Tolerance of fungal infection in European water frogs exposed to *Batrachochytrium dendrobatidis* after experimental reduction of innate immune defenses. - *BMC Veterinary Research* 8 (1): 197.
- Woodhams, D. C., Ardipradja, K., Alford, R. A., Marantelli, G., Reinert, L. K. & Rollins-Smith, L. A. 2007. Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. - *Anim Conserv* 10.





*Norsk institutt for naturforskning, NINA, er en uavhengig stiftelse som forsker på natur og samspillet natur-samfunn.*

*NINA ble etablert i 1988. Hovedkontoret er i Trondheim, med avdelingskontorer i Tromsø, Lillehammer og Oslo. NINA er i ferd med å etablere et kontor i Bergen. I tillegg driver NINA Sæterfjellet avlsstasjon for fjellrev på Oppdal, og forskningsstasjonen for vill laksefisk på lms i Rogaland.*

*NINAs virksomhet omfatter både forskning og utredning, miljøovervåking, rådgivning og evaluering. NINA har stor bredde i kompetanse og erfaring med både naturvitere og samfunnsvitere i staben. Vi har kunnskap om artene, naturtypene, samfunnets bruk av naturen og sammenhenger med de store drivkreftene i naturen.*

ISSN:1504-3312  
ISBN: 978-82-426- 3126-8

## Norsk institutt for naturforskning

NINA Hovedkontor

Postadresse: Postboks 5685 Torgard, 7485 Trondheim

Besøks-/leveringsadresse: Høgskoleringen 9, 7034 Trondheim

Telefon: 73 80 14 00, Telefaks: 73 80 14 01

E-post: [firmapost@nina.no](mailto:firmapost@nina.no)

Organisasjonsnummer 9500 37 687

<http://www.nina.no>

