

Miljø-DNA som overvåkningsverktøy av fremmede ferskvannsfisker

Av Annette Taugbøl og Frode Fossøy

Annette Taugbøl og Frode Fossøy er forskere ved Norsk institutt for naturforskning.

Summary

Environmental-DNA as a surveillance tool to detect invasive freshwater fish. By following traditional sampling approaches for invasive freshwater fish with for instance fishing nets, the monitoring effort will in most instances effect the local population in a negative way through bycatch. Further, the surveillance effort is very time consuming per site and has a high risk of false negative results, especially in the early phase of settlement when the number of invasive species per site usually is low. Environmental-DNA (eDNA/ miljø-DNA in Norwegian) is becoming increasingly accepted as an effective method for detecting species in a variety of ecosystems, including soil, sea- and freshwater. The use of eDNA is especially useful in aquatic environments, where visual detection and quantification of both plants and wildlife can be challenging. In this study we filtered a total of 46 water samples taken from nine locations in the Oslofjord-area in Norway and tested the samples on pumpkinseed fish (*Lepomis gibbosus*) that has previously been identified in the locations to a varying degree. The results indicate the importance of performing regular monitoring and combine the traditional methods with techniques such as eDNA to detect and potentially react to possible harmful invasive species early in their invasion phase.

Sammendrag

Overvåkning av fremmede fiskearter kan ofte være utfordrende da fiskene kan ha lav fangbarhet tidlig i etableringsfasen. Tradisjonell overvåkning med f.eks. garnfiske kan gjøre stor skade på lokale arter i form av uønsket bifangst. Overvåkning av mange lokaliteter er også svært tidkrevende og kan gi falske negative resultater. Det har derfor vært ønskelig å teste ut nye metoder som kan brukes, både i forbindelse med overvåking av kjente utbredelser, men også for å kartlegge nye lokaliteter. Filtrering av miljø-DNA er en forholdsvis ny metode for å påvise arter i vann. I dette studiet ble det filtrert 46 vannprøver fra totalt ni lokaliteter i Oslofjordområdet. Resultatene indikerer at dette er en lovende metode for å enkelt kunne påvise tilstedeværelse av fremmede fiskearter. Dette studiet



Illustrasjonstegning av en rødgellet solabbor. Etter tillatelse fra Sakke Yrjola.

bruker solabbor som eksempel, men metodene kan enkelt overføres til andre arter av interesse ved bruk av andre artsspesifikke markører.

Introduksjon

Fremmede arter utgjør en av de større truslene mot biologisk mangfold i dag og det blir stadig rapportert om nye arter i Norge som ikke hører hjemme i norsk natur (Berntsen et al. 2018; Taugbøl et al. 2017). Med klimaforandringer og høyere gjennomsnittstemperaturer blir det lettere for mange arter å etablere seg i nordligere områder (Berg et al. 2010), samt at handel, reisevirksomhet og forflytning har vist å være faktorer som alle bidrar til spredning av arter, både tilsikt og utilsiktet. Spredning av fremmede og regionalt fremmede ferskvannsfisk er et økende problem i Norge (Hesthagen & Sandlund 2016; 2012). En fiskeart betegnes som regionalt fremmed når den har forflyttet seg til nye områder og vassdrag den tidligere ikke har disponert eller hatt mulighet til å forflytte seg til ved egen hjelp. Spredning av ferskvannsfisk skjer hovedsakelig av mennesker, der utsetting av f.eks. ørret har hatt en lang tradisjon. Den eldste dokumentasjonen på fiskeutsetting i Norge stammer fra en runestein ved gården Lie i Gausdal datert til ca. år 900, der det står skrevet ”Eilif Elg bar fisk år Raudsio”, mens ørretbein fra Hardangervidda datert til å være 5000 år gamle vitner om at utsetting av fisk mellom vassdrag er en tradisjon som trolig strekker seg tilbake til menneskets innvandring i Norge (Mjærum, 2016). På landsbasis regnes så mye som 26% av alle fiskebestandene å ha opphav i menneskelig aktivitet (Hesthagen & Sandlund, 2007).

De første restriksjonene i forhold til utsetting av fisk kom med laks- og innlandsfiskekloven av 6. mars 1964. Denne loven innførte bestemmelser om godkjenning av utsetting av fremmede arter i et vassdrag (Næstad, 1973). I 1984 ble loven ytterligere innskjerpet med krav om godkjenning av alle utsettinger. Forskriften, som ble gitt med hjemmel i samme lov, åpnet imidlertid for utsetting av innlandsfisk som forekom i vassdraget fra før, samt utsettinger av laks, sjørret og sjørøye av stedegeen stamme.

Først med den nye loven om laks- og innlandsfisk i 1992 (revidert 2013), med tilhørende forskrifter, fikk vi dagens bestemmelser med hensyn til utsetting av fisk. Alle fiskeutsettinger er nå forbudt uten godkjenning av offentlig fiskeforvaltning.

For å sette inn tiltak mot ulovlig utsetting av ferskvannsfisk er det viktig å oppdage artene så raskt som mulig. Dette er ofte vanskelig, spesielt i etableringsfasen hvor det som regel er få individer av den uønskede arten, og visuell deteksjon via f.eks. fangst i garn kan gi skadeomfang for lokale ønskede arter ved at de inngår i bifangst. Tradisjonell fangst er også tidkrevende og vil til en viss grad kreve taksonomisk kompetanse i felt for å identifisere ønskede og uønskede arter i fangsten.

En forholdsvis ny metode for overvåkning av fremmede fiskearter er å analysere vannet fiskene bor i (Jerde et al. 2011). Alle organismer mister ulike celler til omgivelsene sine, og dermed også arvestoffet DNA (deoksyribonukleinsyre). DNA frigitt til miljøet kalles på norsk miljø-DNA og består i teorien av DNA fra alle organismene som lever i miljøet (Thomsen & Willerslev 2015). Ulike arter eller artsgrupper i prøven kan videre påvises ved ulike arts-spesifikke markører (primere) i laboratoriet. Ved å filtrere en representativ vannprøve fra et vann kan man i teorien bekrefte tilstedeværelse av de fleste dyreartene som oppholder seg i vannmassen. Miljø-DNA har derfor vist seg å være en godt egnet metode for påvisning av både sjeldne og/eller fremmede arter (Fossøy et al. 2017, Strand et al. 2014, Taugbøl et al., 2017).

Per i dag kjenner vi til 11 eksotiske fiskearter som har blitt satt ut i norske vann og vassdrag og som har etablert levedyktige populasjoner (Hesthagen & Sandlund 2007, Forsgren et al. 2018). Enkelte arter er blitt satt ut som sportsfisk, eller vært brukt som agnfisk under fiske. Disse kan ha rømt fra fiskernes provisoriske oppbevaringsinnretninger, eller blitt satt ut med vilje etter endt fiske. Andre utsettinger har trolig vært et forsøk på å øke produksjon og avkastning av fiskekjøtt, som f.eks. ved utsetting av vanlig karpe (*Cyprinus carpio*), som også har en

lang spredningshistorie i Norge med funn tilbake til 1500 tallet (Kleiven, 2007). Rødgjellet solabbor (*Lepomis gibbosus*) er en annen fremmed ferskvannsfisk for Norge da den opprinnelig kommer fra Nord-Amerika. Solabboren ble trolig importert til Norge som akvariefisk på 1990-tallet. Den ble først oppdaget i vill tilstand i 2004, nærmere bestemt i Einedammen i Asker. Det ble påvist individer av mange generasjoner, noe som tyder på at den trolig ble satt ut kort tid etter første import på 1990-tallet (Cucherousset et al. 2009, Stenrud & Jørgensen 2006). Solabboren har senere blitt oppdaget i flere lokaliteter i Oslofjordområdet der mange av lokalitetene har vært undersøkt flere ganger med negativt resultat (Holmen & Flydal 2013, Lindholm & Myhre 2012). Spørsmålet er om dette skyldes at fisken faktisk er utdødd fra de ulike dammene, eller om resultatet skyldes mislykket fangst ved innsamlingsstidspunkt og slik gir et falskt negativt resultat (Gu & Swihart 2004). Hensikten med dette studiet var derfor å benytte miljø-DNA i dammene som tidligere hadde testet positivt på solabbor for å sikre fastslå nåværende utbredelse i Oslofjord-området.

Materialer og metoder

Utvelgelse av dammer

Det ble samlet inn vannprøver fra totalt 9 lokaliteter i Oslofjord-området der det tidligere har vært påvist eller meldt om observasjoner av solabbor (se Figur 1 for en oversikt over lokalitetene).

Vannprøver

Miljø-DNA-prøver for lokalitetene ble samlet inn i tidsrommet 09.08.18-12.08.18. Siden miljø-DNA kan ha en ujevn fordeling i vannmassene (Taugbøl, 2018a) samlet vi inn vann fra flere ulike steder i dammen som vi blandet sammen til en oppsamlingsprøve pr. lokalitet. Innsamlingsområdene for de ulike lokalitetene er vist som stiplede linjer i kartutsnittene for enkeltlokalitetene i Figur 1, mens Figur 2 skjematisert illustrerer oppsamlingsprøvene og prøvetagningsutstyret. Innsamling av flere små vannprøver til en oppsamlingsprøve har tidligere gitt gode resultater med tanke på replikater fra samme vann

(Taugbøl et al. 2018b). For hver lokalitet ble det samlet inn 4 oppsamlingsprøver, bortsett fra i Sværsvann der det ble samlet inn 10 oppsamlingsprøver. Fra hver oppsamlingsprøve ble det filtrert en prøve på 0,5-3,5 L vann ved hjelp av en batteridrevet peristaltisk pumpe som presset vannet igjennom et 2.0 µm glassfiberfilter. Glassfiberfiltrene ble lagret på 4050 µl animal tissue lysis (ATL)-buffer (Qiagen).

DNA ekstraksjon og ddPCR

Prøverørene med glassfiberfiltrene ble tilsatt 450 µl proteinase-K (Qiagen), blandet godt og inkubert ved 56°C over natt. DNAet i prøvene ble videre ekstrahert med NucleoSpin Plant II Midi kit (Macherey-Nagel) etter produsentens protokoll, men med lysering- og vaskebufferne fra Qiagen.

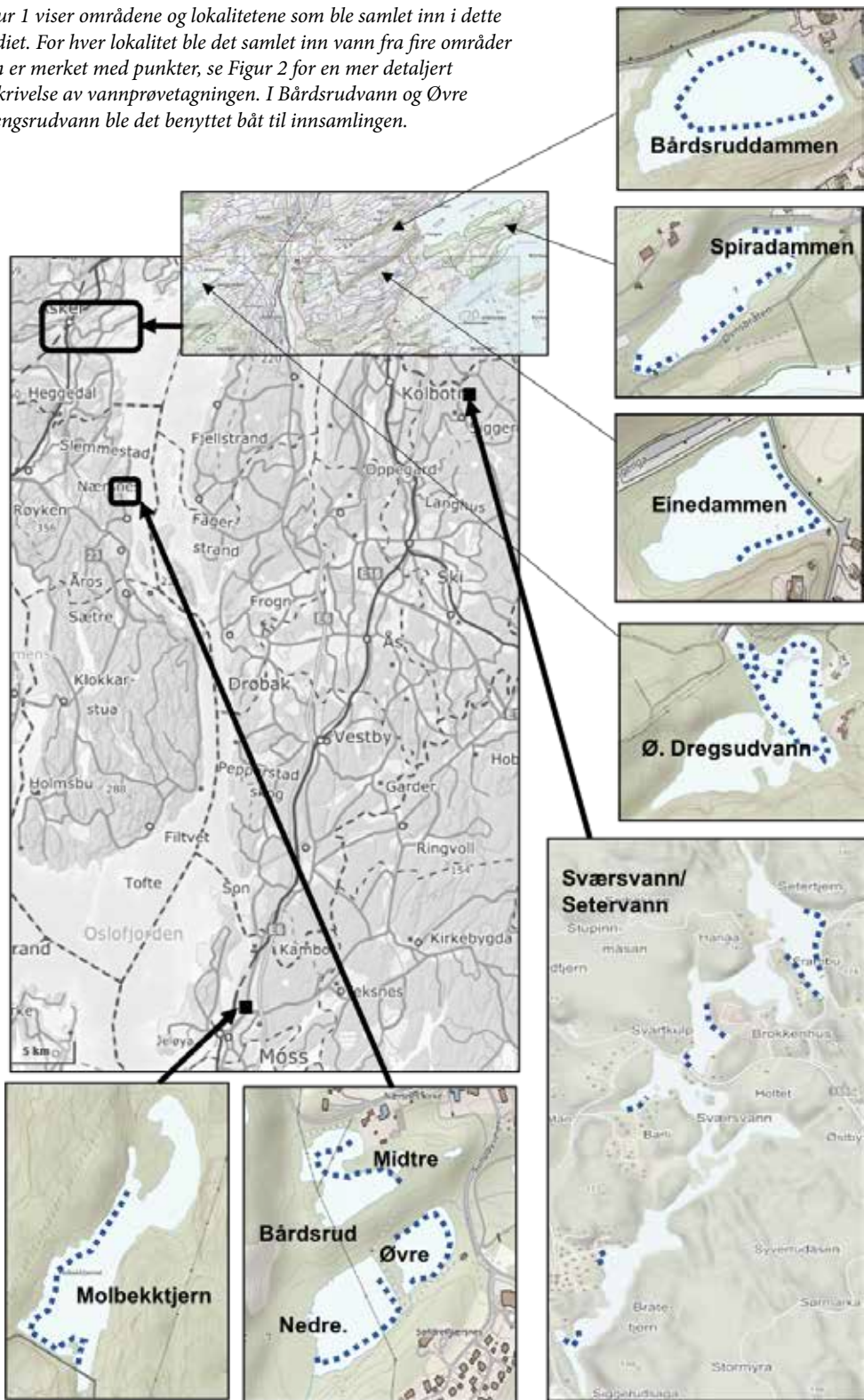
For å detektere og kvantifisere DNA fra solabbor ble det kjørt en dråpe digital PCR (ddPCR) med artsspesifikke «primere» og «probe» (Jens Thaulow, upubliserte resultater). En ddPCR reaksjon besto i «primere/probe», ddPCR mastermix, dH₂O og DNA templat. Denne PCR-miksen ble videre delt inn i opp mot 20.000 oljedråper i en automatisk dråpegenerator, før det ble utført en PCR reaksjon i hver av disse oljedråpene. Etter endt PCR, ble hver dråpe avlest som positiv eller negativ for tilstedeværelse av DNA fra solabbor. Alle prøver med mer enn tre positive dråper regnes som positive.

Resultater

Det ble påvist solabbor i seks av de ni undersøkte lokalitetene, se Figur 3 og Tabell 2 for en oppsummering av resultatene for de ulike lokalitetene. Analysemetoden brukt i dette studiet sier også noe om mengde fiske-DNA i de ulike prøvene. I dette studiet hadde Nedre Bårdsrud høyeste gjennomsnittsverdi av solabbor, mens Øvre Dregsrudvann hadde lavest.

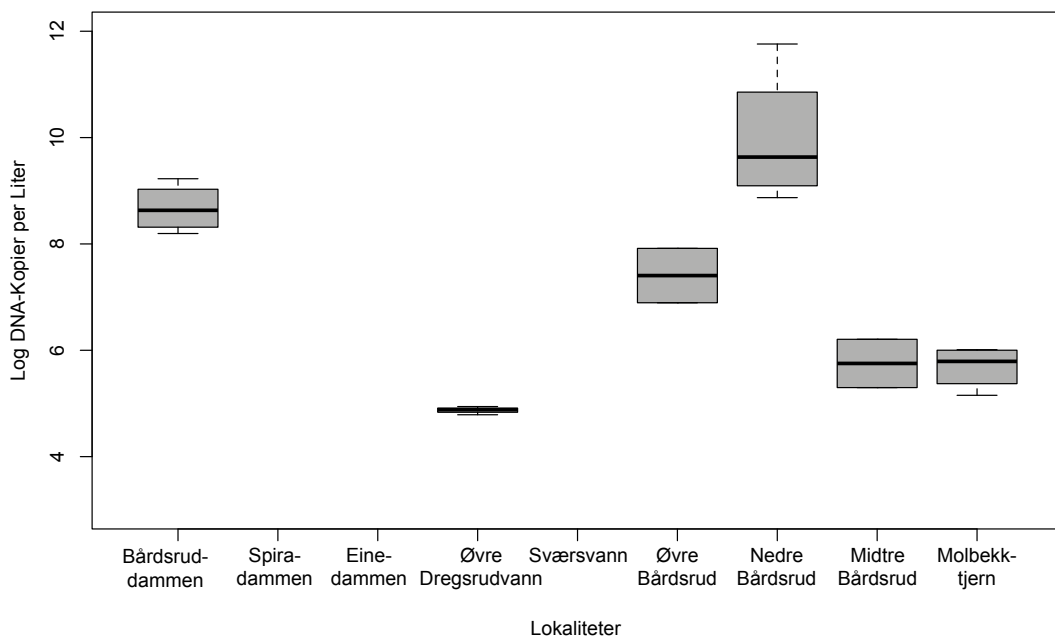
Sammenlignet med tidligere studier som har benyttet seg av tradisjonell fangst med bl.a. garn, ruse, stangfiske og snorkling ser miljø-DNA resultatene ut til å gi god indikasjon på tilstedeværelse av arten (se Tabell 1 for sammenligning av dette og tidligere studier).

Figur 1 viser områdene og lokalitetene som ble samlet inn i dette studiet. For hver lokalitet ble det samlet inn vann fra fire områder som er merket med punkter, se Figur 2 for en mer detaljert beskrivelse av vannprøvetagningen. I Bårdsrudvann og Øvre Dregsvudvann ble det benyttet båt til innsamlingen.





Figur 2 illustrerer innsamlingsstrategi og prøvetakingsutstyr. For hver lokalitet ble det samlet inn fire blandeprøver. Blandeprøvene ble laget ved å samle inn ca 0.5 L vann fra flere steder langs et strekke der antall småprøver varierte mellom 6-12 avhengig av tilkomstmuligheter til vannet. Fra hver blandeprøve ble det så pumpet en vannprøve igjennom et filter i ved hjelp av en peristaltisk pumpe. Filteret ble så lagt på ATL-buffer for ekstraksjon av DNA i laboratoriet til NINA i Trondheim.



Figur 3 oppsummerer resultatene for miljø-DNA prøvene som ble samlet inn og filtrert i de ni ulike lokalitetene (dataene er log-transformerte) der seks lokaliteter testet positivt for solabbor. Bårdsrud-dammen og Nedre Bårdsrud hadde flest DNA kopier av solabbor i prøvene og dammene har trolig en veletablert bestand av solabbor.

Diskusjon

Deteksjon av fremmede arter i etableringsfasen kan være tidkrevende og ofte gi falske negativiteter med tradisjonelle fangstmetoder (Gu & Swihart 2004). Ved å filtrere en innsamlet blandeprøve av vann påviste vi solabbor i seks lokaliteter med

miljø-DNA. Positive prøver er generelt pålitelige med metoden vi har brukt i denne analysen, og vår erfaring tilsier at falske positive (påvisning av en art selv om det ikke finnes i lokaliteten) er svært sjeldne. Vi kan derfor med ganske sikkert grunnlag si at det finnes solabbor i Bårdsrud-

Tabell 1 oppsummerer tidligere funn av solabbor for de undersøkte lokalitetene referert til ved årstall. Kolonnen merket 2019 er resultater fra dette studiet. Grønn indikerer tilstedeværelse, rød indikerer ikke tilstedeværelse og grå indikere ikke undersøkt. Se fullstendig referanse i referanselisten for mer informasjon om innsamlingsmetoder.

Lokalitet	2004	2006	2011	2011b)	2012	2019
Bårdsruddammen						
Spiradammen						
Einedammen						
Ø. Dregsrudvann						
Sværsvann						
Øvre Bårdsrud						
Midre Bårdsrud						
Nedre Bårdsrud						
Molbekktjern						

Referanser: 2004: Stenrud, E. & Jørgensen, A. (2006) ; **2006:** Cucherousset et.al. (2009); **2011 :** Personlig kommentar fra Fylkesmannen hentet fra Artsdatabanken.no; **2011b:** Lindholm og Myhre (2012); **2012:** Holmen og Flydal (2013)

dammen, Øvre Dregsrudvann, Øvre-, Midtre og Nedre Bårdsrud og Molbekktjern.

Hvor store populasjonene av fiskeartene er kan vi foreløpig ikke beregne med denne metodikken. Et positivt funn indikerer kun at arten er har vært tilstede for forholdsvis kort tid siden (England et al. 2005), og funnet kan skyldes så lite som en levende fisk eller en død fisk i vannmassene. Det er mange variabler som påvirker mengde miljø-DNA i et miljø, som f.eks. temperatur, tetthet, utbredelse i lokaliteten, adferd og størrelser av organismene man leter etter (Barnes et al. 2014, Jo et al. 2019). Miljø-DNA har derfor gjerne en ujevn fordeling i vannmassene, og konsentrasjonen av DNA fra hver enkelt art vil avhenge av hvor vannprøven ble tatt (Taugbøl et al. 2018a). Denne variasjonen er redusert i dette oppsettet ved at vi samlet inn blandeprøver fra et større område, og ved at prøvene er samlet inn under samme værforhold innenfor et kort tidsrom. Vi kan derfor forvente en bedre sam-

menheng mellom mengden miljø-DNA og biomasse enn om de hadde vært samlet inn ved ulike tidspunkt (Taugbøl et al. 2018). Tidligere uttesting av gjedde (*Esox lucius*), mort (*Rutilus rutilus*) og ørekyt (*Phoxinus phoxinus*) viser også at innsamlingstidspunkt på et senere tidspunkt enn juli er gunstige for å estimere biomasse (Fossøy et al. 2017). Ut i fra resultatene i dette studiet kan det derfor se ut til at den største biomassen av solabbor befinner seg i Bårdsruddammen (Asker) og Nedre Bårdsrud (Røyken). I mangel av dokumenterte kilder på solabbor og fangst i Bårdsruddammen fra tidligere, er det vanskelig å si om dette stemmer. En beboer ved vannet opplyste at fisken lar seg fange ved å lokke den inn mot land med brødbiter i vannet, slik at den lot seg håve. Dette kan indikere at populasjonen er relativt stor. Solabbor ble først påvist ved til dels høye tettheter i Nedre Bårdsrud i 2011, men den ble fanget her allerede i 2006 (Lindholm & Myhre 2012). Det ble på samme

tidspunkt ikke observert solabbor i Øvre Bårdsrud, heller ikke under en systematisk innsamling året før. I 2010 hadde solabbor blitt observert i denne lokaliteten (Lindholm & Myhre 2012) mens i 2012 ble det fanget ett individ (Holmen & Flydal 2013). Ved å sammenligne fangstdata med miljø-DNA prøvene ser det ut til at Øvre- og Midtre Bårdsrud trolig bare har noen få tilstedeværende individer av solabbor. Molbekktjern og Øvre Drengsrudvann er større lokaliteter, så her er forholdet mellom mengde miljø-DNA og biomasse mer usikkert ved at en lavere andel av vannet er prøvetatt. Samtlige dammer bør uansett overvåkes videre ved ulike tidspunkt for å se om disse tendensene er stabile for å kunne trekke noen endelige vurderinger om biomassen av solabbor.

Prøver fra Einedammen, Spriadammen og Sværsvann viste ingen positive utslag på solabbor. Usikkerheten rundt en negativ prøve er derimot mer uvisst. At en art ikke blir påvist kan skyldes flere årsaker, som for eksempel vannkvalitet i lokaliteten, temperatur, tetthet av arten, prøvolumet som ble innsamlet, samt behandling og analysering av prøven på lab. En negativ miljø-DNA-prøve bør derfor ikke sees på som et endelig bevis for arten ikke finnes i lokaliteten. Prøvene i Einedammen ble samlet inn på et noe begrenset område (se Figur 1) som kan ha ført til falske negative resultater om solabbor kun opptrer veldig lokalt i de motsatte endene av dammen. Solforhold og liten omrøring i vannmassene kan også ha virket inn på resultatene herfra. For Spiradammen ble det samlet inn vann fra nesten hele strandsonen, og det antas derfor at det ble samlet inn vann fra de fleste egnede oppholdsstedene for solabbor. Totalt sett kan se ut som at arten er utdødd eller nær utryddelse i disse dammene, ettersom den heller ikke har vært påvist med tradisjonelle metoder i de senere undersøkelsene (Holmen & Flydal 2013, Lindholm & Myhre 2012). Ingen av de ti filtrerte prøvene fra Sværsvann var positive for solabbor. Tidligere dokumenterte observasjoner i dette vannet er kun nevnt i Jonsson og Jonsson (2011) uten referanse, så vi har per i dag ingen informasjon om omfang, eller hvor i Sværsvann

observasjonene ble gjort. Sværsvann er et forholdsvist stort vann med mange bukter og vik der vi prøvetok kun et utvalg av disse. Vi tok også alle prøvene innenfor en dag. Sværsvann bør derfor prøvetas jevnlig før det eventuelt konkluderes med at det trolig ikke finnes solabbor i vannet.

Dette studiet viser at det er mange fordeler med miljø-DNA som innsamlingsmetode sammenlignet med de tradisjonelle overvåkningsmetodene. For det første er det en veldig effektiv metode i felt. I dette studiet ble samlet inn 46 prøver fordelt på ni lokaliteter over en periode på fire dager. Prøvene ble kun testet genetisk for solabbor, men de samme prøvene kan også brukes for å detektere andre dyr og planter som avgir DNA til vannmassene. De filtrerte prøvene og det isolerte DNA-et kan også lagres lenge, og derfor bidra med data i fremtidige prosjekter. Videre er ikke innsamlingen skadelig for øvrig flora eller fauna i habitatet som overvåkes. Dette studiet viser derfor at miljø-DNA representerer en velegnet metode for deteksjon av arter innen et gitt miljø, der det isolerte DNA-et avleses med genetiske markører som indikerer tilstedeværelse eller fravær av artene det ønskes informasjon om. For deteksjon tidlig i etableringsfaser, eller for sjeldne arter er miljø-DNA derfor en velegnet metode som bør benyttes mer i arts-kartleggingsprosjekter.

Takksigelser

Vi vil gjerne takke Fylkesmann Catrine Curle i Oslo og Akershus (nå Viken) for tilretteleggelse av prosjektet.

Referanser

- Barnes, M.A., Turner, C.R., Jerde, C.L., Renshaw, M.A., Chadderton, W.L. & Lodge, D.M. 2014. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science & Technology* 48(3): 1819-1827.
- Berg, M.P., Kiers, E.T., Driessen, G., van der Heijden, M., Kooi, B.W., Kuenen, F., Liefing, M., Verhoef, H.A. & Ellers, J. 2010. Adapt or disperse: understanding species persistence in a changing world. *Global Change Biology* 16(2): 587-598.

- Berntsen, H.H., Sandlund, O.T., Ugedal, O., Thorstad, E.B., Fiske, P., Urdal, K., Skaala, Ø., Fjeldheim, P.T., Skoglund, H., Florø-Larsen, B., Muladal, R. & Uglem, I. 2018. Pukkellaks i Norge, 2017. NINA-Rapport 1571. Norsk institutt for naturforskning.
- Cucherousset, J., Copp, G.H., Fox, M.G., Sterud, E., van Kleef, H.H., Verreycken, H. & Zahorska, E. 2009. Life-history traits and potential invasiveness of introduced pumpkinseed *Lepomis gibbosus* populations in north-western Europe. *Biological Invasions* 11(9): 2171-2180.
- England, L.S., Pollok, J., Vincent, M., Kreutzweiser, D., Fick, W., Trevors, J.T. & Holmes, S.B. 2005. Persistence of extracellular baculoviral DNA in aquatic microcosms: extraction, purification, and amplification by the polymerase chain reaction (PCR). *Molecular and Cellular Probes* 19(2): 75-80.
- Forsgren E, Hesthagen T, Finstad AG, Wienerroither R, Nedreaas K og Bjelland O (2018, 5. juni). *Lepomis gibbosus*, vurdering av økologisk risiko. Fremmed-artslista 2018. Hentet (2019, 27. mai) fra <https://artsdatabanken.no/Fab2018/N/42>
- Fossøy, F., Dahle, S., Eriksen, L.B., Spets, M.H., Karlsson, S. & Hesthagen, T. 2017. Bruk av miljø-DNA for overvåking av fremmede fiskearter. Utvikling av arts-spesifikke markører for gjedde, mort og ørekyt. NINA-Rapport 1299. Norsk institutt for naturforskning.
- Gu, W. & Swihart, R.K. 2004. Absent or undetected? Effects of non-detection of species occurrence on wildlife-habitat models. *Biological Conservation* 116(2): 195-203.
- Hesthagen, T. & Sandlund, O.T. 2007. Non-native freshwater fishes in Norway: history, consequences and perspectives. *Journal of Fish Biology* 71: 173-183.
- Hesthagen, T. & Sandlund, O.T. 2016. Tiltaksrettet kartlegging og overvåking av fremmed ferskvannsfisk - en tilstandsvurdering av spredningen pr. 2016. NINA-Rapport 1302. Norsk institutt for naturforskning.
- Hesthagen, T.H. & Sandlund, O.T. 2012. Gjedge, sørv og suter: status, vektorer og tiltak mot uønsket spredning. NINA-Rapport 669. Norsk institutt for naturforskning.
- Holmen, J. & Flydal, K. 2013. Rødgjellet solabbor i Asker og Røyken kommuner - En statusrapport om forekomst og vurdering av utrydningstiltak. Fylkesmannen i Oslo og Akershus. Rapport nr. 6/2013
- Jerde, C.L., Mahon, A.R., Chadderton, W.L. & Lodge, D.M. 2011. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters* 4(2): 150-157.
- Jo, T., Murakami, H., Yamamoto, S., Masuda, R. & Minamoto, T. 2019. Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecology and Evolution* 9(3): 1135-1146.
- Jonsson, N. & Jonsson, N. 2011. Rødgjellet solabbor: ny art i norsk fauna. *Naturen* 135(05): 203.
- Kleiven, E. 2007. Historiske opplysninger frå Bergen om karuss *Carassius carassius*, karpe *Cyprinus carpio*, brasme *Abramis brama* og gjedde *Esox lucius*. *Fauna* 60(1): 36-43.
- Lindholm, M. & Myhre, L.C. 2012. Rødgjellet solabbor (*Lepomis gibbosus*) i Asker- status og mulige tiltak. Fylkesmannen i Oslo og Akershus, Miljøvernvedlingen. Rapport nr. 5/2012
- Mjærum, A. 2016. De første fiskerene i fjellet publisert i: Fjellfiske i fortiden- årtusener med svømmende rikdom. 303 sider. Kulturhistoriks Museum/Portal. .
- Næstad, H. 1973. Loven om laksefiske og innlandsfiske av 6. mars 1964 med kommentarer av Henry Næstad. Grødahl & søns forlag, Oslo.
- Stenrud, E. & Jørgensen, A. 2006. Pumpkinseed *Lepomis gibbosus* (Linnaeus, 1758) (*Centrarchidae*) and associated parasites introduced to Norway. *Aquatic Invasions* 1(4): 278-280.
- Strand, D.A., Jussila, J., Johnsen, S.I., Viljamaa-Dirks, S., Edsman, L., Wiik-Nielsen, J., Viljugrein, H., Engdahl, F. & Vralstad, T. 2014. Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *Journal of Applied Ecology* 51(2): 544-553.
- Taugbøl, A., Fossøy, F. & Dervo, B.K. 2018a. Bruk av miljø-DNA for deteksjon av arter. Vann(01-2018)
- Taugbøl, A., Dervo, B.K., Sivertsgård, R., Brandsegg, H. & Fossøy, F. 2018b. Bruk av miljø-DNA til overvåkning av små- og storsalamander. NINA-Rapport 1476. Norsk institutt for naturforskning.
- Taugbøl, A., Dervo, B.K., Bærum, K.M., Brandsegg, H., Sivertsgård, R., Ytrehus, B., Miller, A. & 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. Norsk institutt for naturforskning.
- Thomsen, P.F. & Willerslev, E. 2015. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183 (Supplement C): 4-18.