

2406

NINA Rapport

Metodeuttesting for skånsom DNA-innsamling fra amfibier

Annette Taugbøl



NINAs publikasjoner

NINA Rapport

Dette er NINAs ordinære 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 engelsk, som NINA Report.

NINA Temahefte

Heftene utarbeides etter behov og serien favner svært vidt; fra systematiske bestemmelsesnøkler til informasjon om viktige problemstillinger i samfunnet. Heftene har vanligvis en populærvitenskapelig form med vekt på illustrasjoner. NINA Temahefte kan også utgis på engelsk, som NINA Special Report.

NINA Fakta

Faktaarkene har som mål å gjøre NINAs forskningsresultater raskt og enkelt tilgjengelig for et større publikum. 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 forskningsresultater i internasjonale vitenskapelige journaler og i populærfaglige bøker og tidsskrifter.

Metodeuttesting for skånsom DNA-innsamling fra amfibier

Annette Taugbøl

Taugbøl, A. 2024. Metodeuttesting for skånsom DNA-innsamling fra amfibier. NINA Rapport 2406. Norsk institutt for naturforskning.

Lillehammer, januar 2024

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-5214-0

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

Åpen

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

KVALITETSSIKRET AV

Jon Museth

ANSVARLIG SIGNATUR

Forskningsjef Kristin Evensen Mathiesen

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Miljødirektoratet

OPPDRAGSGIVERS REFERANSE

M-2685|2024

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Ingrid Regina Reinkind

FORSIDEBILDE

Padder på vei til gytedammen © Annette Taugbøl

NØKKEWORD

Amfibier

Batrachochytrium dendrobatidis

Bufo bufo

DNA-kvalitet

Kvantitativ PCR

qPCR

Rana temporaria

KONTAKTOPPLYSNINGER

NINA hovedkontor
Postboks 5685 Torgarden
7485 Trondheim
Tlf: 73 80 14 00

NINA Oslo
Sognsveien 68
0855 Oslo
Tlf: 73 80 14 00

NINA Tromsø
Postboks 6606 Langnes
9296 Tromsø
Tlf: 77 75 04 00

NINA Lillehammer
Vormstuguvegen 40
2624 Lillehammer
Tlf: 73 80 14 00

NINA Bergen
Thormøhlens gate 55
5006 Bergen
Tlf: 73 80 14 00

www.nina.no

Sammendrag

Taugbøl, A. 2024. Metodeuttesting for skånsom DNA-innsamling fra amfibier NINA Rapport 2406. Norsk institutt for naturforskning.

Genetisk variasjon er nøkkelfaktoren til en sunn populasjon, men for å få kunnskap om genetisk diversitet må det samles inn DNA-prøver av god nok kvalitet for faktisk å kunne teste genetiske markører. I dette prosjektet ble det samlet 171 prøver fordelt på fem ulike prøvetyper fra frosk og padde: (1) strykeprøver fra hud med bomull-svaber (hudsvaber); (2) strykeprøver av hud med fint sandpapir; (3) strykeprøver av munnhule med svaber; (4) vevsprøver fra hud mellom tær fra overkjørte dyr og (5) filtrerte vannprøver fra akvarie-vann der individuelle dyr hadde oppholdt seg i ca. 15 minutter. Resultatene viste at de beste artsspesifikke DNA-prøvene ble samlet inn fra svømmehud mellom tær og munnhulesvabring.

Ved innsamling av DNA-prøver er det en fordel å kunne bruke de samme prøvene til flere tester. Siden det også er påvist ulike hudsykdommer på norske amfibier som også må påvises genetisk, slik som f.eks. den parasittiske soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (bd), vil synergieffekter av prøveinnsamling både vil redusere håndtering av dyrene, gi økonomiske fordeler, samt kreve mindre lagringsplass etter analyse. Ved analyse av funn for sykdom på de samme prøvene som ble testet for DNA-kvalitet (minus munnhulesvabring), viste resultatene at filtrerte vannprøver var den mest egnede metoden for Bd-påvisning, men prøvene samlet inn fra svømmehud hadde også høye konsentrasjoner av Bd. Innsamling med hudsvaber var desidert dårligst, da hele 64% av prøvene gav falske negative prøveresultater. Fremtidig prøveinnsamling på frosk og padde bør teste for Bd-påvisning på svømmehud, da denne prøvetypen tilsynelatende vil gi god deteksjon av Bd og samtidig gi gode DNA-resultater. En lignende samkjøring av analyser fra én DNA-prøve er trolig mindre sannsynlig for salamander, da storsalamander ikke har svømmehud, eller har svømmehud i mye mindre omfang fordi de er vesentlig mindre enn en frosk/ padde. Denne rapporten omfatter ikke uttesting av DNA-kvalitet for prøver samlet inn på salamander.

Forfatter

Annette Taugbøl, annette.taugbol@nina.no, Vormstuguvegen 40, 2624 Lillehammer



Innhold

Innledning

| | | |
|-----|--|---|
| 1.1 | Kort bakgrunn..... | 6 |
| 1.2 | Hvorfor er det viktig med kartlegging av genetisk struktur?..... | 7 |
| 1.3 | Hvorfor trenger vi DNA-prøver av høy kvalitet?..... | 7 |
| 1.4 | Alternative innsamlingsmetoder av genetikkprøver fra amfibier..... | 7 |

Materialer og Metoder

| | | |
|-----|---------------------------------|---|
| 2.1 | Innsamling av prøver..... | 8 |
| 2.2 | Ekstraksjon av DNA og qPCR..... | 8 |

Resultater

| | | |
|-----|--|----|
| 3.1 | Fiksering av strykeprøver fra hud i lysis-buffer i forhold til tørket | 9 |
| 3.2 | Resultater for mengde DNA og artsspesifikt DNA fra ulike innsamlingsmetoder | 9 |
| 3.3 | Individuelle smitte-resultater og resultater for påvisning av Bd | 9 |
| 3.4 | Meget høye falske negativt på Bd-testing for prøver samlet inn med hudsvaber | 10 |

Diskusjon

| | | |
|-----|--|----|
| 4.1 | Vev- og munnhuleprøver med høyest arts-konsentrasjon av DNA..... | 11 |
| 4.2 | Innsamling av prøver for deteksjon av sykdom | 12 |
| 4.3 | Videre anbefalinger | 12 |

| | |
|-------------------------|-----------|
| Referanser | 13 |
|-------------------------|-----------|

Forord

Norge trenger mer informasjon om tilstanden til norske amfibier. Innsamling og uttesting av DNA-prøver er en metode som kan avdekke isolasjon og mulig innavlsproblemer i populasjoner, men det er gjort lite uttesting av hvordan prøvene helst bør samles inn for å oppnå gode resultater.

Innsamling av DNA-prøver fra amfibier kan være krevende fordi prøvetakingen kan omfattes av «Forskrift om bruk av dyr i forsøk» og det faktum at flere av artene er sjeldne slik at innsamling av dyr krever særskilt tillatelse fra miljømyndighetene. Målet med dette prosjektet var derfor å forsøke å teste ut prøvetakningsmetoder som vil være bedre for dyrene, men allikevel gi DNA-prøver av god nok kvalitet. Denne rapporten oppsummerer derfor resultater fra DNA-prøveinnsamling for fem innsamlings-protokoller; hudsvabring, munnsvabring, hudprøver samlet inn med fint sand-papir, svømmehud og filtrering av vannprøver fra akvarier som har holdt en padde eller frosk i 10-15 minutter. Resultatene viser at svømmehud og munnhulesvabring klart gir best deteksjon av artsspesifikt DNA, men der vevsprøver fra svømmehud trolig også er en god kandidat for samkjøring på uttesting av den parasittiske soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (bd).

Jeg ønsker å takke Miljødirektoratet som har finansiert prosjektet, med Ingrid Regina Reinkind som kontaktperson. Prøvene ble sendt til Universitetet i Krakow, Polen, da enkelte av prøvene skal videre-analyseres med RAD-tag-sekvensering og jeg ønsker å takke Marzena Marszaek for DNA-ekstraksjon og Ida Pernille Øystese Andersskog på NINAGEN som har kjørt prøvene på qPCR. Tusen takk!

Lillehammer, januar 2024.

Annette Taugbøl
Prosjektleder

1 Innledning

1.1 Kort bakgrunn

Genetisk variasjon er nøkkelfaktoren til en sunn populasjon. Genetisk variasjon innenfor en art vil variere fra populasjon til populasjon og fra individ til individ (Jorde & Wooding 2004). En viss grad av genetisk isolasjon (få migranter) er en forutsetning for at en populasjon kan utvikle en genetisk unik profil som skiller seg fra andre populasjoner. Genetisk variasjon mellom populasjoner kan komme fra tilpasninger til miljøet individene lever i via seleksjon på allerede eksisterende gen-varianter, eller mer sjelden, mutasjoner. Genetiske ulikheter mellom populasjoner kommer ofte til uttrykk via tilfeldig tap av genetisk variasjon, kalt genetisk drift, som over tid kan gi de samme konsekvensene som ved innavl. Genetisk drift er en viktigere prosess i små populasjoner enn i store, da den genetiske variasjonen som oftest er lavere i små populasjoner (Whitlock 2000). Det virker logisk at en stor populasjon har en høy genetisk variasjon, men dette er ikke alltid tilfelle. Det er heller ikke den totale populasjonsstørrelsen som er viktig når det gjelder den fremtidige genetiske variasjonen til populasjonen, men den effektive populasjonsstørrelsen (N_e) til bestanden, da dette er andelen i populasjonen som faktisk reproducerer og fører genene sine videre til neste generasjon. Hvis en høy andel av populasjonen går igjennom tilfeldig reproduksjon er det mindre sjanse for innavl og genetisk drift i populasjonen, noe som gir en bedre forutsetning for at populasjonen skal overleve. Tilfeldig reproduksjon mellom kjønnsmodne individer, samt lik overlevelse for avkommene er en ideell populasjon som dette finnes få eksempler av i virkeligheten. I en bestand der de kjønnsmodne individene har stor ulikhet i reproduktivt utfall vil dette minske den effektive populasjonsstørrelsen betraktelig. Dette vil for eksempel være vanlig for en art der en dominant hann ofte parrer seg med flere hunner, slik at N_e i en typisk naturlig populasjon vil være lavere enn potensialet til populasjonen. Informasjon om genetisk variasjon innad i populasjonen kan med andre ord være med på å kartlegge «genetisk tilstand/sårbarhet» i populasjonen, og videre, hvordan metapopulasjoner eventuelt er strukturert i landskapet; om det er gode forhold for genflyt mellom områder, eller om det bør gjennomføres tiltak slik at populasjonene kan få en større genetisk «ryggsekk» for fremtidige hendelser.

Amfibier er gode modellorganismer for å studere genetisk variasjon i ville bestander som er under press fra menneskelig aktivitet (Beebee 2005; Shaffer et al. 2015). Klimaendringer (Bernatchez et al. 2023), tap av habitat (Brooks et al. 2002) og fragmentering av leveområder (Hanski 2011) er hovedårsakene til reduksjon av biologisk mangfold. Konsekvensene av fragmentering og hvordan den genetiske variasjonen i populasjonen eventuelt påvirkes, vil i stor grad avhenge av populasjonens størrelser og spredningsmuligheter. Noen arter og habitattyper er naturlig fragmentert, andre er mer sammenhengende. Akvatiske habitater kan være naturlig fragmentert i form av dammer og innsjøer, men også ha ulike grad av vandringsmuligheter, for eksempel via bekker og elver. Selv om det foreligger få langtids-serier på populasjonsdynamikk over tid for norske amfibier, er det en generell konsensus om at det blir færre lokaliteter og individer, selv om det blir flere registreringer på Artskart (www.artskart.artsdatabanken.no) Som et eksempel ble det registrert flere yngel-lokaliteter for storsalamander etter det bl.a. ble bevilget penger til kartlegging av storsalamander-populasjoner i 2012 (Dervo et al. 2012), mens rusefangst over år fra de samme lokalitetene viser svak nedgang av antall individer per populasjon (Dervo et al. 2017). Samlet er det beregnet at det årlige tapet av yngel-lokaliteter for storsalamander de siste 30 årene er på litt under én prosent (Dervo et al. 2016). Økt urbanisering og tap av habitater gir videre en økende isoleringstrend i hele utbredelsesområdet i Europa for storsalamander, med rapportering om jevn populasjonsnedgang fra de fleste europeiske land som har overvåkningsdata. I Polen er det f.eks. registrert nedgang for de fleste amfibiene som er under overvåkning, der nedgangen i storsalamanderbestander er signifikant ($P > 0.05$), med tap av yngelhabitat (enten som direkte inngrep eller indirekte, som f.eks. uttørking ved reduserte mengder grunnvann), forurensing fra jordbruk og utbygging av veier som de viktigste årsakene til nedgangen (Pabijan & Ogielska 2019; Pabijan et al. 2023).

1.2 Hvorfor er det viktig med kartlegging av genetisk struktur?

Å ivareta genetisk mangfold er nedfelt i Naturmangfoldloven, som sier at: "målet er at artene og deres genetiske mangfold ivaretas på lang sikt og at artene fremkommer i levedyktige bestander i sine naturlige utbredelsesområder" (§ 5). Det er vanskelig å bevare genetisk mangfold uten å vite hva slags genetisk variasjon som er tilgjengelig. Nedgang i populasjonsstørrelse korrelerer ofte med lavere genetisk variasjon. Dette er også funnet for storsalamander i Norge, der en publisert studie fra Notodden viser klare genetiske effekter av menneskelig påvirkning, ved at dammer i områder med økt menneskelig aktivitet har lavere genetisk diversitet sammenlignet med nærliggende bestander i urørte gammelskogsområder (Haugen et al. 2020). Det er ellers gjennomført få genetiske studier på amfibier i Norge linket mot menneskelig utbygging. Studier fra naturlige populasjoner viser liten/lav genflyt mellom dammer som ligger ca. 2,6 km fra hverandre (Paulsen 2006) og sub-grupperingen i Norge ser ut til å fordele seg over fire genetiske klustere (Kilde 2010).

1.3 Hvorfor trenger vi DNA-prøver av høy kvalitet?

Utvikling av skånsom innhenting av DNA-prøver er særdeles viktig for allerede sårbare arter (Zemanova 2020). Prøvene som samles inn må være av god nok kvalitet for å faktisk kunne brukes til genetiske analyser, der man bl.a. kan se på genetisk diversitet (eller mangel av denne som følge av genetisk isolering), evolusjonært slektskap mellom dammer i samme område og mellom områder satt i kontekst av bl.a. urbanisering. Resultatene av genetiske studier på amfibier kan gi viktige svar på hvordan de ulike artene bør forvaltes i nåværende og fremtidige forvaltningsplaner; hvor det eventuelt kan være behov for støtteutsettinger og hvilke (nærliggende) populasjoner som i så fall bør brukes til utsettingene, eller hvor dammer og vandringskorridorer bør etableres og/eller restaureres hvis populasjonene som bruker dammene har svært liten genetisk diversitet.

Det er også påvist flere amfibi-sykdommer i Norge (Taugbøl et al. 2021; Origgi & Taugbøl 2023), som sammen med fremtidige klimaendringer kan gi økt dødelighet og lavere bestandsstørrelser og utbredelse. Positive prøver fra filtrerte vannprøver påviste den parasittiske soppen i Norge for første gang i 2017 (Taugbøl et al. 2017). Senere er det også oppdaget *Ranid herpesvirus 3* på buttsnutefrosk flere steder i Norge (Taugbøl et al. 2023). Siden det per i dag ikke eksisterer genetiske studier av amfibier og effekter av sykdom i Norge, gis det her et eksempel fra Sverige. Smitteforsøk av Bd utført på svenske padder viste at padder i nord-Sverige hadde større dødelighet (<40% overlevelse) i forhold til padde i sør-Sverige (Meurling 2019). Videre viser MHC-genotyping og RAD-tag sekvensering av svenske padde-populasjoner at det er mindre genetisk variasjon dess lengre nord i Sverige man kommer (Thörn et al. 2021). Det er derfor grunn til å tro at også de norske populasjonene vil ha ulik grad av genetisk variasjon og evne til å tåle en Bd-infeksjon.

1.4 Alternative innsamlingsmetoder av genetikkprøver fra amfibier

Det er i hovedsak fire ulike metoder for å samle inn prøvemateriale fra amfibier i naturlige populasjoner: (1) Innsamling av vev fra hale (salamander), tå-vev eller svømmehud (frosk og padde); (2) blodprøver; (3) strykeprøve fra hud og (4) strykeprøve fra munnhule. Man kan benytte vevsprøver fra døde dyr, men disse er naturlig nok ikke tilgjengelige i høyt nok antall i naturlige populasjoner, så sant de ikke ligger i nærheten av f.eks. en trafikkert vei. Innsamling av egg eller yngel kan være formålstjenlig, og fordelene med innsamling av larver/rumpetroll er at det som regel er mange av de tidlig i klekkeperioden. Ulempen med innsamling av juvenile er at de ikke har gjennomgått eventuelle seleksjonstrykk som kan inntre ved ulike livshistorieendringer og dermed gi noe høyere genetisk variasjon enn i adulte årsklasser. En annen ulempe er at man uheldigvis samler inn larver som har klekt fra samme egg-klase (frosk/padde), og dette vil i så fall gi utslag som sterk innavl i analysene (i enkelte tilfeller kan det også være slik at mange egg-klaser f.eks. tørker ut og at derfor mesteparten av yngelen kommer fra noen få parringer).

2 Materialer og metoder

2.1 Innsamling av prøver

Det ble samlet inn fem typer prøver i dette studiet; (1) strykeprøver fra hud med bomull-svaber (hudsvaber); (2) strykeprøver av hud med fint sandpapir; (3) strykeprøver av munnhule med svaber; (4) vevsprøver fra hud mellom tær fra overkjørte dyr og (5) filtrerte vannprøver fra vann der individuelle dyr hadde oppholdt seg i ca. 15 minutter, se **tabell 1** for oversikt over antall prøver fra hver type. De fleste prøvene ble lagt i lysis-buffer, mens enkelte strykeprøver fra hud også ble testet som tørket (ingen buffer).

2.2 Ekstraksjon av DNA og qPCR

Prøvene ble isolert for DNA ved hjelp av saltekstraksjonsmetoden på Universitetet i Krakow, der også total mengde DNA ble målt med Nanodrop (total mengde DNA; inkluderer også DNA fra andre organismer). prøvene ble så kjørt på arts-spesifikke primere for padde og frosk på NINAGEN. qPCR-resultatene sier noe om mengde DNA fra ønsket organisme ved at primerene kun amplifiserer DNA fra arten de er designet for. Prøver som har mye DNA fra organismen det testes for vil gi signal etter færre qPCR-sykluser, og vil derfor gi signaler ved færre antall PCR-sykluser enn prøver som har mindre DNA fra målorganismen, som vil kreve flere qPCR-sykluser før signalet avleses. Enkelte prøver ble også kjørt på den parasittiske soppen Bd da et utvalg av prøvene ble samlet inn fra områder der soppen tidligere er påvist. Hver prøve ble kjørt i tre qPCR-replikater, der det i tillegg ble testet for mengde DNA; 1 ng (padde og Bd), 2.5 ng (frosk) og 5 (bd) ng DNA.

Tabell 1. Oversikt over antall prøver tatt med ulike metoder fra frosk og padde

| Art | (1) Strykep. | (2) Sandp. | (3) Munnhule | (4) Vev | (5) Vannfilter |
|-------|--------------|------------|--------------|---------|----------------|
| Frosk | 8 | 7 | 0 | 6 | 5 |
| Padde | 20 | 7 | 8 | 105 | 5 |

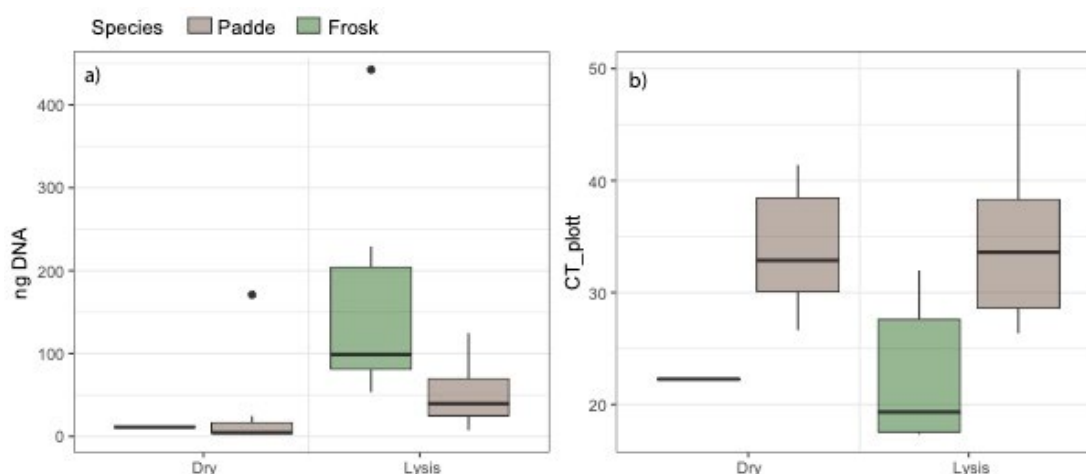


Foto: «akvariumsvann» med amfibier © Annette Taugbøl

3 Resultater

3.1 Fiksering av strykeprøver fra hud i lysis-buffer i forhold til tørket

Det ble samlet inn totalt 28 prøver fra hudsvabere, der 8 ble testet som tørre (1 fra frosk, 7 fra padde). Mengde innsamlet DNA (fra «alle» kilder, for eksempel bakterier mm) varierte fra (median) 11.2 – 204.5 ng DNA for froskeprøvene (boksplott 1 og 3 i figur 1a) og 4.5 – 39.5 ng DNA for paddeprøvene (boksplott 2 og 4 i figur 1a), for svaberprøver lagret henholdsvis tørt og i buffer (**figur 1a**). Forskjellene ble mindre ved testing på artsspesifikke markører, der median-resultatene fra frosk var 22.2 – 19.3 (boksplott 1 og 3 i figur 1b) og for padde 32.8 – 33.6 (boksplott 2 og 4 i figur 1b), for henholdsvis tørre prøver og prøver lagret på buffer (lavere tall = høyere mengde artsspesifikt DNA i prøven, **figur 1b**). Da det ikke var signifikante forskjeller mellom artene for de ulike konserveringsmetodene ble dataene analysert samlet på «hudsvaber» for senere sammenligninger.



Figur 1 Prøvelagringsmetode for svaber-prøver lagret uten buffer («dry»-kun plassert i eppendorf-rør) og prøver lagret i lysis-buffer («lysis»). a) viser total mengde DNA ekstrahert fra prøvene, mens b) viser konsentrasjonen av DNA fra padde og frosk for svaber lagret tørt og i buffer, der lavere verdier tilsvarer høyere konsentrasjon.

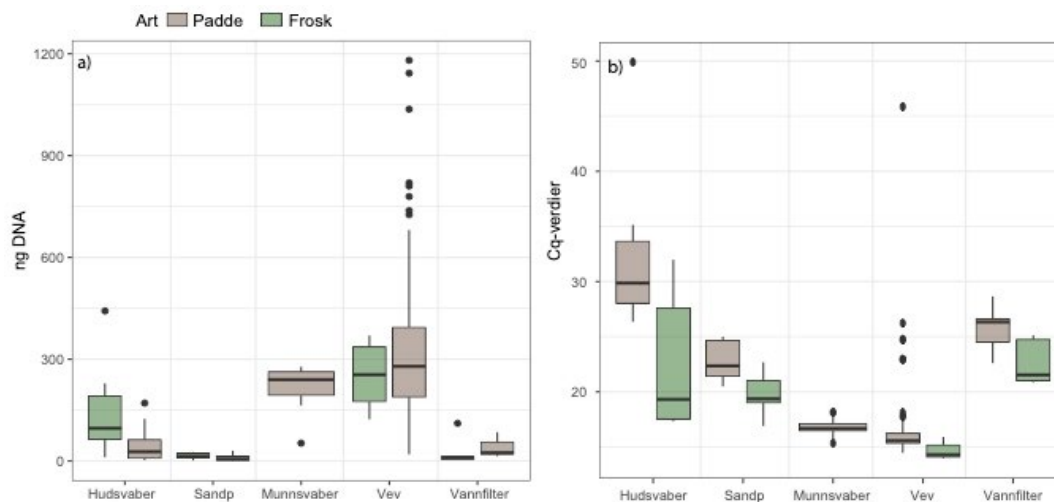
3.2 Resultater for mengde DNA og artsspesifikt DNA fra ulike innsamlingsmetoder

Ved sammenligning av mengde DNA ble det ekstrahert mest DNA fra munnsvaber- og vevsprøvene (**figur 2a**), og metoden som gav de høyeste konsentrasjonene fra mål-organismen var også fra munnsvaber og vevsprøver fra svømmehud (**figur 2b**). Selv om resultatene fra vevsprøvene gav de høyeste gjennomsnittlige konsentrasjonene, var det også mye variasjon i resultatene (median 15.4, laveste syklus ved signal: 14.5, høyeste syklus ved signal: 45.8). Resultatene fra munnsvaber-prøvene hadde lavere varians (median 16.5, lavest syklus med signal: 15.4, høyest syklus med signal: 18.2, men med resultater fra bare 8 prøver kan det ikke utelukkes at dette delvis er tilfeldig (**tabell 1**).

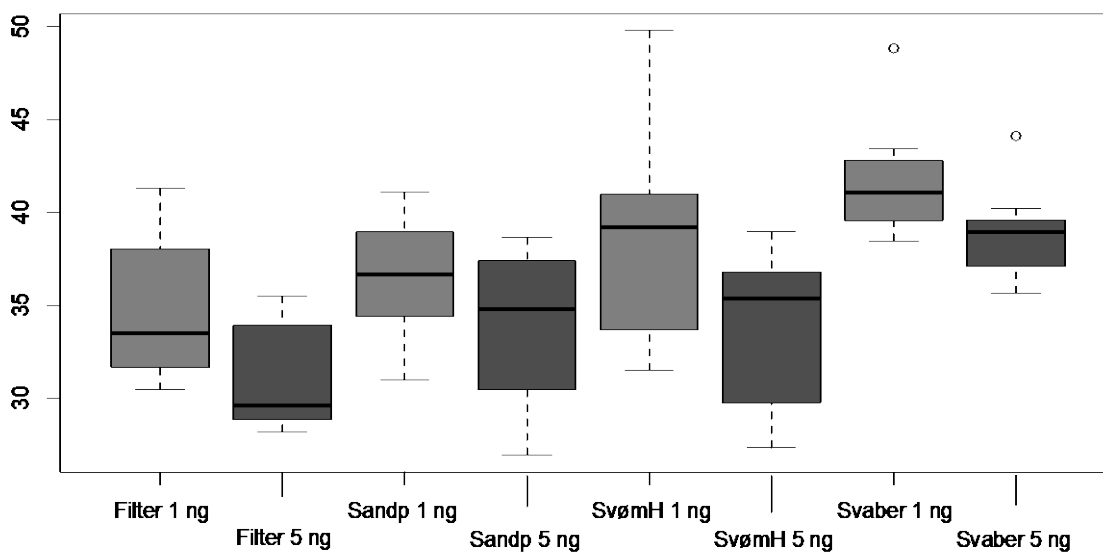
3.3 Individuelle smitte-resultater og resultater for påvisning av Bd ved ulike innsamlingsmetoder

Prøvene ble også testet for Bd (**figur 3**). Etter at dyrene som kun fikk påvist Bd ble analysert, og da kun for de positive prøve-resultatene, hadde prøvene samlet inn fra vannfilter (filtrert vannprøve fra vann der padden har oppholdt seg i 10-15 minutter) i snitt hadde lavere antall qPCR-runder (gjennomsnitt 32.9 sykluser) mot hudsvaber, som med gjennomsnittlige 39.4

sykluser også kom opp sist av de ulike metodene (**figur 3**). Innputt av 5 ng DNA i analysene gav også lavere antall sykluser for Bd-deteksjon enn 1 ng innputt (**figur 3**).



Figur 2 Resultater. a) total mengde DNA ekstrahert fra prøvene med de ulike innsamlingsmetodene, b) qPCR for padde- og froskeprøvene etter testing på artsspesifikke markører, der lavere verdier tilsvare høyere konsentrasjon. Alle prøvene fra padde er testet på 1 ng DNA, mens prøvene for frosk er testet på 2.5 ng DNA.



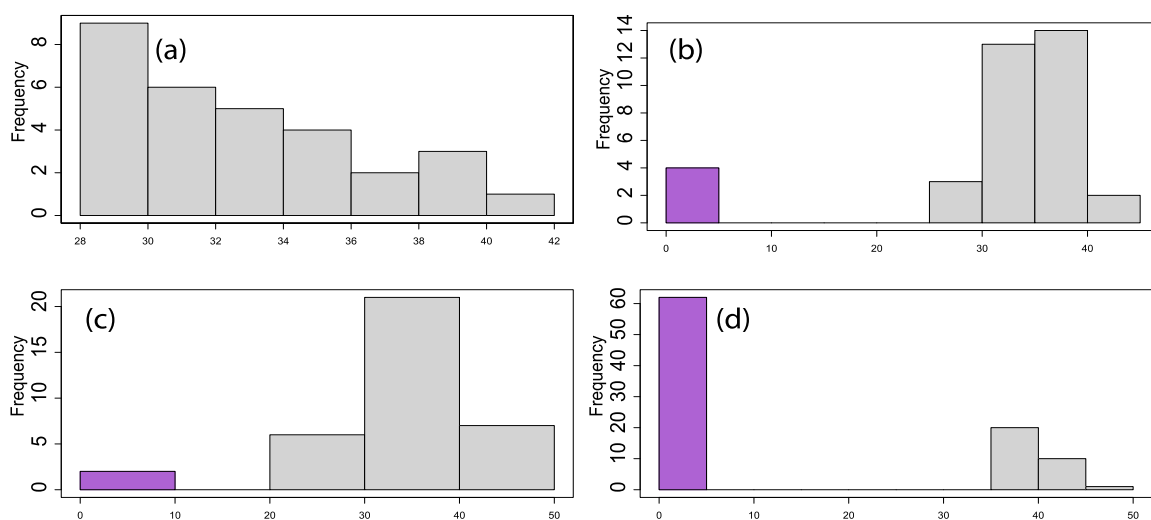
Figur 3 Resultater Bd-påvisning for seks padder. Figuren viser resultatene av Bd-positive prøver fra vannbadfilter, sandpapir, svømmehud og hudsvaber av padde oppdelt i prøver kjørt med 1 ng DNA (lys grå) og 5 ng DNA (mørk grå) DNA i qPCR-repetisjonene. Lavere Cq-verdier (y-aksen) tilsvare høyere konsentrasjon. Dette plottet er kun for prøver positive for Bd, se også plott 4 for muligheten for falske negative.

3.4 Meget høye falske negative på Bd-testing for prøver samlet inn med hudsvaber

Av individene som testet positivt på Bd ble det påvist en høy andel falske negative fra hudsvaber-prøvene (**figur 4**). Så mange som 60 av totalt 94 kjørte qPCRer på hudsvaber slo ut negativt (64% falske negative), da to eller flere andre prøvetyper tilsa Bd-positivt dyr.

4 Diskusjon

Det eksisterer per i dag få genetiske studier på amfibier i Norge. Det er ingen genetiske studier av frosk; ett genetisk studie av padde (Roth & Jehle 2016); tre av storsalamander (Kilde 2010; Linlokken et al. 2019; Haugen et al. 2020); og ingen av småsalamander. Vi vet noe mer om bestandsutvikling, men da også kun for storsalamander innenfor et begrenset geografisk område, der trendene stort sett er nedadgående. Samtlige amfibiepopulasjoer i Norge er trolig sårbare, både ved at Norge er ytterpunktet av utbredelsen for de norske artene i europeisk sammenheng, samt ved et økende tap av egnede habitater (Derovo et al. 2016). Fragmentering av leveområder og populasjoner er en hovedårsak til tap av biologisk mangfold og genetisk variasjon. Konsekvensene av slik fragmentering vil i stor grad avhenge av populasjonens størrelse og spredningsmuligheter, da dette legger rammene for ulike typer av metapopulasjonsdynamikk. For å kunne ivareta arter, og arters genetiske mangfold, må vi ha datagrunnlag for analyser, der en av innsamlingsmulighetene er DNA-prøver. Videre vil ikke alle DNA-prøver være konsentrerte nok til å kunne brukes inn i moderne genetiske analyser; da det er nødvending med *minimum* 20 ul templat som har over 50 ng/μl (for RAD-sekvensering bør kvaliteten helst være ca. 100 ng/μl).



Figur 4 Frekvenshistogram av qPCR-sykluser (x-aksen) for prøvetyper samlet inn som (a) filt-rerte vannbadprøver (ingen falske negative), (b) strykeprøver med mykt sandpapir (4 falske negative; lilla farge), (c) svømmehud (2 falske negative, lilla farge) og (d) hudsvaber-prøver (60 falske negative etter re-analyse av flere prøver, lilla farge).

4.1 Vev- og munnhuleprøver med høyest artskonsentrasjon av DNA

Resultater fra dette studiet viser at små vevsprøver fra svømmehud, samt svaberprøver av munnhule (kun testet for padde), gir de beste DNA-prøvene med henholdsvis 266 og 240 ng DNA (median; **figur 2a**), og som også inneholdt mest arts-spesifikt DNA (**figur 2b**). Vevsprøver er en forholdsvis vanlig innsamlingsmetode for salamander der det klippes en liten bit av hale-spissen eller parrings-kammen til hannene. Innsamling av små haletipper kan også brukes til fangst/gjenfangst innen samme år (det er vist at halen gror ut igjen etter ca. 8 måneder (Arntzen et al. 1999)). Adulte frosk og padde har ikke hale. Ved behov for innsamling av vevsprøver har det derfor tidligere vært vanlig med tå-klipp for vevsinnsamling (og for fangst-gjenfangst prosedyrer). Tå-klipp representerer et større inngrep enn innsamling av halevev (Perry et al. 2011), men det er vist at inngrepet gir høy overlevelse (Grafe et al. 2011), og få individer får betente sår etter klipp (Ginnan et al. 2014). I dette studiet testet vi en mindre innovativ innsamlingsmetode for frosk og padde ved innsamling av en liten flik av svømmehuden mellom to tær. Det ble ikke testet for forskjeller mellom mengde vev i tær og svømmehud da det uansett ikke blir aktuelt å samle inn tå-prøver i Norge.

Bruk av svaber i munnhulen gav gode resultater, men er bedre egnet for større arter, som f.eks. padde og frosk og til dels storsalamander. Svabring av munnhulen for artsspesifikke DNA-prøver vil videre ha en fordel mot hudsvaber da munnhulen har mindre sannsynlighet for å inneholde DNA fra andre artsfrender. For å kunne ta strykeprøver i munnhulen kreves det at dyret holdes fast og at munnen tvinges opp. Det er slik sett en mer tidkrevende innsamlingsmetode enn klipp av vev fra hale eller svømmehud, men innsamlingen går raskere med trening. En av ulempene med munnsvaber er at prøven ikke kan brukes til uttesting av sykdom, slik utvendig prøvetaking kan brukes til, for å redusere kostnader ved uttesting.

Strykeprøver fra hud kan tas på ulike måter, med ulike måter å «skrape» av hudceller på. I dette studiet ble vanlig q-tips (hudsvaber) testet opp mot fint sandpapir som ble strøket over føttene til frosk og padde. Resultatene viste at svabring med bomull gav høyere konsentrasjoner av DNA i prøvene, men det var allikevel noe mer DNA fra mål-organismen med fint sandpapir (**figur 2a og 2b**). Salamandere fanges i feller, og kommer slik i kontakt med hverandre. På den måten kan hudceller overføres mellom individer og føre til at individbaserte genetiske analyser ikke vil fungere, noe som også er vist genetisk (Müller et al. 2013). Ved slike resultater vil de innsamlede prøvene være nær ubrukelige da man ikke vil kunne få den individuelle genotype-profilen som statistikken krever. Prøvene kan derimot også brukes for å detektere bakterier og sopp på individuelle dyr. Prøvene ble ikke testet for individuelle populasjonsgenetiske markører i dette studiet.

Blodprøver er en innsamlingsmetode av DNA som kanskje er mindre inngripende enn å klippe en tå, men gir lave DNA-konsentrasjoner siden de røde blodcellene ikke har cellekjerne. For innsamling av blodprøver kreves også mer utstyr i felt, og risikoen for prøvene øker ved økt utstørsbehov (gitt at hver enkelt komponent har en viss risiko for å bli ødelagt o.l.). Studier har også vist at DNA konsentrasjonen ofte blir for lav for gode DNA-prøver, da mengde ekstrahert DNA typisk varierer fra ca. 0,5-9,4 ng/µl når det beste ekstraksjonskittet ble brukt (Mendoza et al. 2012). Konsentrasjonen av DNA fra blodprøver ble ikke testet i dette studiet.

4.2 Innsamling av prøver for deteksjon av sykdom

Resultatene viste at filtrering av vannprøver som hadde holdt en padde i ca 10-15 minutter gav høyere konsentrasjoner av Bd enn hudsvaber og sandpapir-prøver av hud (**figur 3a**). Prøvene samlet inn med hudsvaber hadde også mange falske negative resultater, så ved innsamling i felt anbefales styrkeprøver med mykt sandpapir om filtrering av vannbad ikke er mulig. Uttesting av ulik inputmengde av DNA viste også at 5 ng DNA igjen gav signal før prøver med 1 ng DNA (**figur 3b**).

4.3 Videre anbefalinger

Resultater fra dette studiet viser at munnsvaberprøver gir gode resultater for DNA-kvalitet, men disse prøvene kan ikke brukes i til sykdomsuttesting. Synergieffekter av innsamlede prøver kan redusere analysekostnadene og lagringskapasiteten av prøver på labben. For salamander vil det trolig uansett være vanskelig å samle inn en prøve som kan testes ut ved både individuelle genetiske analyser og sykdomstesting. Prøver fra salamander ble ikke testet i dette studiet, men tidligere uttesting av hudsvaber på storsalamander gav i gjennomsnitt 7.1 ng DNA (Taugbøl, upubliserte resultater). Disse prøvene ble ikke testet ut på artsspesifikke primere, men den lave mengden av totalt DNA tilsier at en liten bit halevev må samles inn for genetiske analyser av salamander.

For frosk og padde vil innsamling av svømmehudsvæv kunne svare ut testing av både Bd-smitte og individuelle genetiske tester, da føttene er et av områdene som har høy infeksjon av Bd. En annen mulighet vil være å ta munnsvaber før svaberen strykes over føttene, men resultater av denne innsamlingsmetoden må i så fall testes ut først, da ulike inhibitorer i hud eventuelt også kan redusere mengde innsamlet DNA. For videre sammenligninger bør prøvene også testes ut på individuelle markører, som f.eks. microsatellitter, slik at kvaliteten på prøvene kan vurderes ut ifra eventuelle forurensinger fra andre individer.

5 Referanser

- Arntzen JW, Smithson A, Oldham RS (1999) Marking and tissue sampling effects on body condition and survival in the newt *Triturus cristatus*. *Journal of Herpetology*, 33, 567-576.
- Beebee TJC (2005) Conservation genetics of amphibians. *Heredity*, 95, 423-427.
- Bernatchez L, Ferchaud A-L, Berger CS, Venney CJ, Xuereb A (2023) Genomics for monitoring and understanding species responses to global climate change. *Nature Reviews Genetics*.
- Brooks TM, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GAB, Rylands AB, Konstant WR, Flick P, Pilgrim J, Oldfield S, Magin G, Hilton-Taylor C (2002) Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation Biology*, 16, 909-923.
- Dervo BK, Bærum KM, Diserud OH (2017) Bruk av overvåkingsdata til beregning av bestandsutvikling hos storsalamander *Triturus cristatus* og småsalamander *Lissotriton vulgaris* i Norge. NiNA Rapport 1408. p. 50. Norsk Institutt for Naturforskning
- Dervo BK, Pedersen C, KM B (2016) Tap av ynglelokaliteter for storsalamander i Norge. NINA Rapport 1014.
- Dervo BK, Skei JK, van der Kooij J, Olstad K, Storeid S, Kraabøl M (2012) Nasjonalt overvåkingsprogram for storsalamander. Fylkesmannen i Oslo og Akershus, Miljøvernavdelingen, rapportnummer 9/2012. p. 45.
- Ginnan NA, Lawrence JR, Russell MET, Eggett DL, Hatch KA (2014) Toe clipping does not affect the survival of leopard frogs (*Rana pipiens*). *Copeia*, 650-653.
- Grafe TU, Stewart MM, Lampert KP, Rödel M-O (2011) Putting toe clipping into perspective: a viable method for marking anurans. *Journal of Herpetology*, 45, 28-35.
- Hanski I (2011) Habitat loss, the dynamics of biodiversity, and a perspective on conservation. *Ambio*, 40, 248-255.
- Haugen H, Linlokken A, Østbye K, Heggnes J (2020) Landscape genetics of northern crested newt *Triturus cristatus* populations in a contrasting natural and human-impacted boreal forest. *Conservation Genetics*, 21, 515-530.
- Jorde LB, Wooding SP (2004) Genetic variation, classification and 'race'. *Nature Genetics*, 36, S28-S33.
- Kilde I (2010) Genetic variation and postglacial dispersal of the great crested newt *Triturus cristatus* (*Amphibia*) in Norway. Norwegian university of science and technology
- Linlokken A, Landgdal K, Frydenlund K, Wilson R (2019) Genetisk diversitet og struktur i en metapopulasjon av storsalamander (*Triturus cristatus*) i seks kunstig anlagte dammer. In: *Skriftserien 13 - 2019*.
- Mendoza AM, García-Ramírez JC, Cárdenas-Henao H (2012) Blood puncture as a nondestructive sampling tool to obtain DNA in frogs: comparison of protocols and survival analysis. *Molecular Ecology Resources*, 12, 470-475.
- Meurling S (2019) The response in native wildlife to an invading pathogen: Swedish amphibians and *Batrachochytrium dendrobatidis*.
- Origi FC, Taugbøl A (2023) *Ranid herpesvirus 3* infection in common frog *Rana temporaria* tadpoles. *Emerging Infectious Diseases*, 29, 1228-1231.
- Pabijan M, Bąk-Kopaniarz S, Bonk M, Bury S, Oleś W, Antoł W, Dyczko I, Zając B (2023) Amphibian decline in a Central European forest and the importance of woody debris for population persistence. *Ecological Indicators*, 148, 110036.
- Pabijan M, Ogielska M (2019) Conservation and declines of amphibians in Poland. Pelagic Publishing, Exeter.
- Paulsen N (2006) Population structure of the great crested newts, *Triturus cristatus*, in Geitaknottane Nature reserve, Norway. University of Bergen
- Perry G, Wallace MC, Perry D, Curzer H, Muhlberger P (2011) Toe clipping of amphibians and reptiles: science, ethics, and the law. *Journal of Herpetology*, 45, 547-555.
- Roth S, Jehle R (2016) High genetic diversity of common toad (*Bufo bufo*) populations under strong natural fragmentation on a Northern archipelago. *Ecol Evol*, 6, 1626-1636.
- Shaffer HB, Gidiş M, McCartney-Melstad E, Neal KM, Oyamaguchi HM, Tellez M, Toffelmier EM (2015) Conservation genetics and genomics of amphibians and reptiles. *Annu Rev Anim Biosci*, 3, 113-138.
- Taugbøl A, Bærum KM, Dervo BK, Fossøy F (2021) The first detection of the fungal pathogen

- Batrachochytrium dendrobatidis* in Norway with no evidence of population declines for great crested and smooth newts based on modeling on traditional trapping data. *Environmental DNA*, 3, 760-768.
- Taugbøl A, Dervo BK, Bærum KM, 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.
- Taugbøl A, van der Kooij J, Origgj FC (2023) *Ranid herpesvirus 3* påvist på buttsnutefrosk- Ny amfibiesykdom konstantert på seks populasjoner av buttsnutefrosk, *Rana temporaria*, i Norge NINA Rapport 2247. Norsk institutt for naturforskning.
- Thörn F, Rödin-Mörch P, Cortazar-Chinarro M, Richter-Boix A, Laurila A, Höglund J (2021) The effects of drift and selection on latitudinal genetic variation in Scandinavian common toads (*Bufo bufo*) following postglacial recolonisation. *Heredity*, 126, 656-667.
- Whitlock MC (2000) Fixation of new alleles and the extinction of small populations: drift load, beneficial alleles, and sexual selection *Evolution*, 54, 1855-1861.
- Zemanova MA (2020) Towards more compassionate wildlife research through the 3Rs principles: moving from invasive to non-invasive methods. *Wildlife Biology*, 2020.

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, Bergen og Oslo. 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: 978-82-426-5214-0

Norsk institutt for naturforskning

NINA Hovedkontor

Postadresse: Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim

Besøks-/leveringsadresse: Høgskoleringen 9, 7034 Trondheim

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

E-post: firmapost@nina.no

Organisasjonsnummer 9500 37 687

<http://www.nina.no>



Samarbeid og kunnskap for framtidens miljøløsninger