

Analyser av miljø-DNA og strykeprøver for overvåking av soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Akershus

Annette Taugbøl, Børre K. Dervo, Hege Brandsegg og Frode Fossøy



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 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. 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.

Analyser av miljø-DNA og strykeprøver for overvåking av soppen *Batrachochytrium* *dendrobatidis* (Bd) i Akershus

Annette Taugbøl
Børre K. Dervo
Hege Brandsegg
Frode Fossøy

Taugbøl, A., Dervo, B.K., Brandsegg, H. & Fossøy, F. 2019. Analyser av miljø-DNA og strykeprøver for overvåking av soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Akershus. NINA Rapport 1660. Norsk institutt for naturforskning

Lillehammer, Mars 2019

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-3405-4

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

Åpen

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

KVALITETSSIKRET AV

Kim Magnus Bærum

ANSVARLIG SIGNATUR

Forskningsjef Jon Museth (sign.)

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Fylkesmannen i Oslo og Akershus

OPPDRAGSGIVERS REFERANSE

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Ingrid Regina Reinkind

FORSIDEBILDE

Annette Taugbøl

NØKKEWORD

- Norge, Østfold
- *Triturus cristatus*
- *Lissotriton vulgaris*
- Amfibier
- Artspåvisning
- Kartlegging
- Miljø-DNA

KEY WORDS

- Norway
- Great crested newt
- Smooth newt
- e-DNA
- Surveillance
- Amphibians

KONTAKTOPPLYSNINGER

NINA hovedkontor

Postboks 5685 Torgarden
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

Vormstuguvegen 40
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., Brandsegg, H. & Fossøy, F. 2019. Analyser av miljø-DNA og strykeprøver for overvåking av soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Akershus. NINA Rapport 1660. Norsk institutt for naturforskning.

Analyser av miljø-DNA er en forholdsvis ny metode for overvåking av arter og økosystemer der innsamling av prøver ikke er avhengig av langvarig innsats eller taksonomisk ekspertise i felt. Denne metoden har vist seg å være svært effektiv med tanke på overvåking av truede arter og arter som det er vanskelig å oppdage visuelt i felt. En slik art er soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), som parasitterer huden til amfibier og som kan gi utfall i infeksjonssykdommen chytridiomykose. Det ble for første gang påvist Bd i Norge i 2017, og patogenet ble påvist i fem av femten ulike amfibiedammer i Akershus, sør for Oslo, ved hjelp av miljø-DNA-analyser. I denne rapporten oppsummerer vi prøveinnsamling og analyser for 2018. I tillegg til miljø-DNA-prøver ble det også fange dyr og tatt strykeprøver fra huden. Det ble samlet inn vann fra de 5 kjente infiserte dammene og fem kontrolldammer ved fem ulike tidspunkt, med en forventning om økt utslag av Bd utover sesongen basert på resultater fra 2017. Resultatene fra 2018 viser derimot en motsatt effekt, med lavere konsentrasjoner av Bd inn mot de varmere sommermånedene i de to prøvene som er positive fra samme dam (Østre Støkken) og ingen positive utslag fra den siste innsamlingsrunden. Det ble påvist Bd i en ny dam med vannprøver for 2018, i Nordre Holstad, mens Garderenga ikke fikk utslag på Bd i 2018. Det ble også påvist smitte på dyr i 4 av 5 dammer da ingen av de innfangede dyrene slo positivt ut på Bd i Garderenga.

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. Usikkerheten rundt en negativ prøve er derimot mer uvisst, og det at Bd ikke ble påvist i miljø-DNA prøvene selv om strykeprøver hadde positive utslag kan skyldes flere årsaker, som for eksempel vannkvalitet i lokaliteten, temperatur, tetthet av arten, prøvevolumet 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. Med tanke på de spesielt høye temperaturforholdene sommeren 2018 og lite kunnskap om hvordan livssyklusen til Bd opptrer i våre nordlige dammer, er det gode grunner til å tro at vi enten kan ha samlet inn fra dammene på et ugunstig tidspunkt på dagen, at en forhøyet dam-temperatur kan ha ført til atferdsendringer hos vertedyrene slik at vi ikke fanger opp sporstoffer fra huden i like stor grad som i 2017, eller at syke dyr har hatt kortere oppholdstid i dammene i 2018.

Forfattere:

- **Annette Taugbøl¹, Annette.Taugbol@nina.no**
- Børre K. Dervo¹, Borre.Dervo@nina.no
- Hege Brandsegg², Hege.Bransegg@nina.no
- Frode Fossøy², Frode.Fossoy@nina.no

¹) NINA Lillehammer, Fakkeltgården, Vormstuguvegen 40, 2624 Lillehammer

²) NINA Trondheim, Postboks 5685, Sluppen, 7485 Trondheim

Innhold

Sammendrag	3
Innhold	4
Forord	5
1 Innledning.....	6
1.1 Miljø-DNA.....	6
1.2 Bakgrunn for prosjektet	6
2 Materialer og metoder	8
2.1 Utvelgelse av dammer for positive kontroller	8
2.2 Utvelgelse av tidspunkt for innsamling av vannprøver.....	8
2.3 Innsamling av vannprøver	8
2.4 Innsamling av styrkeprøver	8
2.5 DNA isolering.....	9
2.6 Digital dråpe PCR (ddPCR) og kvantitativ PCR (qPCR).....	9
3 Resultater	11
3.1 Resultater fra vannprøver innsamlet i Akershus 2018	11
3.1.1 ddPCR og qPCR av Bd	11
3.1.2 ddPCR av småsalamander og storsalamander.....	12
3.1.3 qPCR og ddPCR av padde og frosk.....	13
3.2 Resultater fra strykeprøver innsamlet i Akershus 2018	14
4 Diskusjon.....	16
4.1 Påvisning av arter i lokalitetene ved vannprøver	16
4.2 Påvisning av Bd på hudprøver	17
4.3 Oppsummering og videre anbefalinger	17
5 Referanser.....	19
6 Vedlegg.....	21
6.1 Tilleggsmateriale Tabell 1.....	21
6.2 Tilleggsmateriale Tabell 2.....	22
6.3 Tilleggsmateriale Tabell 3.....	23

Forord

Soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) ble for første gang påvist i Norge i 2017, i fem dammer i Akershus. Bd er et patogen som har forårsaket store nedganger i amfibiebestander verden over med sykdommen chytridiomykose, og flere arter har trolig blitt utryddet i blant annet Australia og Sør Amerika. Selv om det per i dag ikke ser ut til at Bd påvirker våre skandinaviske arter i like stor grad er det allikevel grunn til bekymring- vi vet ikke hvor lenge Bd har infisert dammene, i hvilket omfang dyr påvirkes eller hvordan soppen eventuelt vil kunne bli sykdomsfremkallende også hos norske arter gitt varmere klima.

Denne rapporten oppsummerer resultater fra vannprøver samlet inn fra 10 dammer i Akershus ved fem ulike prøvetidspunkt. Prøvene ble testet på markører for Bd, storsalamander, småsalamander, buttsnutefrosk, spiss-snutefrosk og padde. Det ble også fanget dyr i ruser ved flere tidspunkt for å identifisere hvilke(n) art(er) som er infiserte av soppen, og for å kvantifisere prevalensen av smittede dyr.

Prosjektet har vært finansiert av Miljødirektoratet og ledet av undertegnede med hjelp av Frode Fossøy, Hege Brandsegg og Børre Dervo. Vi ønsker å takke Dag Dolmen og Åge Brabrand for tilsending av vevsprøver for frosk og padde og Ingrid Regina Reinkind hos Miljødirektoratet for god tilrettelegning av prosjektet.

Lillehammer, Mars 2019

Annette Taugbøl
Prosjektleder



Figur 1.1 "feltbil" med vannfiltreringsutstyr

1 Innledning

1.1 Miljø-DNA

En arts tilstedeværelse i et økosystem kan måles på mange ulike måter, der rapporteringene kan svinge fra kun påvisning av positive funn (tilstedeværelse av en art) til faktiske populasjonsdata. For mange arter kan det være krevende å dokumentere tilstedeværelse med tanke på arbeidsinnsats og økonomi. Dette kan også gjelde for vannlevende dyr, der estimater og påvisning av arter kan avvike fra faktiske forhold på grunn av lav fangbarhet eller sesongbetonte adferdsvariasjoner. Det er viktig å vite arters utbredelse, slik at man bedre forstår artenes økologiske krav og hva endringer i økologiske forhold kan forårsake over tid.

Miljø-DNA, fra det engelske *environmental* DNA (eDNA), brukes i denne rapporten om alt DNA isolert fra vann. Dette er en kompleks blanding av DNA-fragmenter fra ulike organismer i det gitte miljøet (Thomsen et al. 2012). Miljø-DNA representerer ideelt sett alle arter i et bestemt økosystem, der det isolerte DNAet kan analyseres med arts-spesifikke genetiske markører om arten er tilstede i miljøet, og DNA-et fra denne er fanget opp i prøven. Påvisning av arter er den metoden som er mest brukt i dag. Mengde DNA fra artene kan også brukes til å estimere antall individer eller biomasse av arten i lokaliteten, men dette er i mindre grad testet ut i naturlige systemer. Siden mengde DNA for en art i praksis avhenger av individenes kroppsstørrelse, "DNA-lekkasje", aktivitetsnivå, habitatvalg og temperatur kan ulike prøver tatt ved ulike tidspunkt igjennom sesongen eller ved ulike steder innen habitatet gi svært variable resultater med hensyn til populasjonsberegninger. For de fleste akvatiske dyr har man funnet ut at mengde miljø-DNA øker ved høyere tetthet, temperatur og aktivitet. Samtidig blir DNA brutt ned av sollys (UV-lys), extracellulære enzymer og ulike kjemikalier, og vil også sedimenteres fra vannsøylen.

NINA har i løpet av de siste årene utviklet både prøvetakingsutstyr og molekylære verktøy for analyser av miljø-DNA og har verifiserte protokoller for mange akvatiske organismer (Fossøy et al. 2017, Taugbøl et al. 2017, Taugbøl et al. 2018).

1.2 Bakgrunn for prosjektet

Patogenet *Batrachochytrium dendrobatidis*, en algesopp som heretter omtales som Bd, ble for første gang påvist i Norge i 2017 ved positive funn av miljø-DNA i fem lokaliteter i Akershus (Taugbøl et al. 2017) og Norge hadde fått en ny fremmed art. Med fremmede arter menes arter, underarter og bestander av arter, som ved hjelp av mennesker har blitt introdusert utenfor det området de normalt lever i. Fremmede arter kan ha en stor økologisk påvirkning, og på verdensbasis regnes fremmede skadelige arter som den nest største årsaken til tap av biologisk mangfold. Fremmede arter trenger nødvendigvis ikke være skadelige, men ved at Bd kan påføre amfibier infeksjonssykdommen chytridiomykose regnes Bd som en skadelig fremmed art.

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). Til tross for at Bd er påvist over store geografiske områder og i forholdsvis høye konsentrasjoner hos smittede individer, er det foreløpig 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, 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. I tillegg er det få eller ingen kartleggingsprogrammer i de skandinaviske landene, av verken Bd eller samtlige amfibiearter, og Bd kan derfor ha eller ha hatt evolusjonær påvirkning uten at det hittil har blitt dokumentert. Det er også nylig påvist at overlevelse med Bd mest trolig viser en ikke-lineær sammenheng mellom smittedose og overlevelse, noe som vil si at en liten forskjell i mengde infeksjon (antall zoosporangier i huden), kan ha høy innvirkning på overlevelse (Wilber et al. 2017). Per i dag vet vi ingenting om hvilke konsentrasjoner av Bd-sporene vi har i de smittede dammene, og vi vet derfor også lite om potensielle fremtidige konsekvenser.

Bd har trolig spredt seg til Sverige relativt nylig ettersom det ikke ble påvist Bd hos noen av de 197 undersøkte konserverte froskene fra 1994-2004 (Garner et al. 2005). De første positive funnene i Sverige ble funnet i 2009 (Hallengren), og i 2017 ble det bekreftet at Grøn-flekkspadder i Sverige bar på en av de mest virulente stammene av Bd (BdGPL). Eksperimentelle studier på frosk og padde i Sverige viser også at eksponering og smitte av denne Bd-varianten fører til høy dødelighet hos vanlig padde, da over halvparten av 100 smittede dyr døde i et eksponeringsforsøk utført i Uppsala, mens ingen av paddene i kontrollgruppen døde (S. Meurling, upubliserte resultater). Ved å ta hudprøver av svenske frosk og padde i felt som senere ble isolert for DNA har det blitt dokumentert en prevalens av smittede dyr på mellom 1-64%, en variasjon som både er avhengig av art og dam. Det er ingen som vet hvorfor det er så stor variasjon mellom smittede individer, eller hvorfor noen dammer blir smittet mens andre ser ut til å ha en større motstandsdyktighet eller mer gunstig plassering.

I Norge er Bd kun påvist i Akershus i vannprøver som ble samlet inn i 2017. Lokalitetene i Akershus hvor det ble påvist Bd ligger relativt spredt og representerer dammer av ulike størrelser. De positive prøvene hadde forholdsvis lave konsentrasjoner av Bd, men ettersom resultatene var konsistente mellom ulike replikate prøver fra dammene, er det liten tvil om at dammene er infiserte. En av lokalitetene (Ottarsrud) ble prøvetatt ved tre ulike tidspunkter, der 13 av 14 enkeltprøver gav positivt utslag for Bd (Taugbøl et al. 2017). Den ene negative prøven var tatt i den første innsamlingsrunden i Akershus og ble tolket som et resultat av lav infeksjon i dammene tidlig på året. Dette var gjeldende for alle dammene, da det var signifikant økning av Bd med tidspunkt for innsamling senere i sesongen. Dette var også delvis forventet, gitt økt temperatur og aktivitet på dyrene, men resultatet kan også skyldes metodiske svakheter. Dyrene vi fanget i 2017 viste ingen tegn til infeksjon, men det kan være svært vanskelig å identifisere Bd-infiserte individer visuelt. Frosk er hovedvert for Bd og frem mot denne rapporten var det ikke gjort noe forsøk på å finne ut av hvilke amfibiearter i dammene som var bærere av smitten.

Det var derfor ønskelig å øke omfanget av Bd-kartleggingen i 2018 for å øke kunnskapsnivået i de fem infiserte dammene mht. prevalens (smitteomfanget) av Bd på frosk, padde og begge salamanderartene gjennom fangst av dyr og strykeprøver av hud. Det var også ønskelig med mer kunnskap om hvordan konsentrasjonen av Bd i vannet utvikler seg igjennom sesongen for å se om tendensen av økt miljø-DNA av Bd speilet resultatene observert i Ottarsrud for 2017, med signifikant økning fra første til siste innsamling.

2 Materialer og metoder

2.1 Utvelgelse av dammer for positive kontroller

Alle de fem dammene med positive utslag på Bd for 2017 ble også prøvetatt i 2018 (**Figur 2.1**, denne rapporten). For å undersøke om Bd eventuelt påvirker tilstedeværelsen av de ulike amfibieartene i de infiserte dammene ved mengden miljø-DNA ved ulike tidspunkt (se punkt 2.2), valgte vi i tillegg ut 7 ulike friske dammer som vi samlet inn samtidig som de infiserte. Grunnen til at vi valgte 7 dammer var risikoen for at en eller flere av de dammene vi valgte skulle vise seg å være infiserte og at vi dermed skulle få et for lite utvalg av kontrolldammer. **Figur 2.1** viser dammene som ble samlet inn i 2018.

2.2 Utvelgelse av tidspunkt for innsamling av vannprøver

Da en av de fem dammene som ble samlet inn i 2017, Ottarsrud, viste indikasjoner på at mengden av Bd økte utover sesongen, valgte vi fem ulike innsamlingstidspunkt for vannprøvene med hovedfokus på juni og juli. Datoene for innsamling av vannprøvene kan sees i **Tilleggsmateriale Tabell 1**.

2.3 Innsamling av vannprøver

Alle dammer ble samlet inn på samme måte:

- Det ble samlet inn 0,2 L vann fra 10-15 punkter i en oppsamlingskanne. Grunnen til at det samles inn vann fra flere punkter er å øke sannsynligheten for å kunne påvise DNA fra Bd samt å forsøksvis redusere naturlig variasjon mellom prøver da miljø-DNA har vist seg å ha en klumpvis fordeling i vannmassene
- Fra oppsamlingskannen ble vannet filtrert ved hjelp av en batteridrevet peristaltisk pumpe og et 0.45 µM filter (Thermo Scientific Nalgene CN 145-0045) som deretter ble preservert i 1440 µl ATL-buffer (Qiagen).
- Vi testet også et 2.0 µm glassfiberfilter ved enkelte tidspunkt. Disse filtrene ble preservert i 4050 µl ATL buffer.

2.4 Innsamling av styrkeprøver

Vi satte ruser i flere omganger for innsamling av amfibier for å ta strykeprøver av huden. En slik prøver kan indikere om dyret er smittet av Bd eller ikke via DNA-analyser, se **Tilleggsmateriale Tabell 2** for rusefangstdatoer. Ved å samle inn prøver fra ulike amfibiearter var målet å finne ut av hvilke arter som er smittet av Bd og hvor mange individer innen hver art som er smittet, såkalt prevalens. Kunnskap om prevalens vil også kunne gi indikasjoner på hvor mange smittede dyr som må til i en dam for å få positive signaler i vannprøven.

En av hovedutfordringene med innsamling av dyr er at mengden Bd så ut til å øke med sesong, basert på 2017-dataene, samtidig som dyrene blir mindre fangbare grunnet redusert reproduksjonsaktivitet. Økt smittetrykk utover i sesongen gir trolig er høyere antall smit-

tede dyr utover i sesongen, i tillegg til at smitteområde (infisert hud) på enkeltdyr sannsynligvis også øker utover sesongen. Hvert fanget individ ble derfor strøket godt rundt føttene og munn med en q-tips som ble lagret i ATL-buffer for DNA-analyser.

2.5 DNA isolering

For isolering av DNA fra q-tips ble det benyttet DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen). Fra 0,45 µM filtrere ble DNA isolert ved hjelp av en modifisert DNeasy Blood & Tissue protokoll beskrevet av (Spens et al. 2017). For 2,0 µM glassfiberfiltre ble DNA isolert ved hjelp av en modifisert NucleoSpin Plant II Midi (Macherey-Nagel) protokoll.

2.6 Digital dråpe PCR (ddPCR) og kvantitativ PCR (qPCR)

For å påvise miljø-DNA, samt kvantifisere mengden DNA fra stor og liten salamander ble det kjørt ddPCR med artsspesifikke primere. ddPCR er en PCR metode som gir en absolutt måling av DNA molekyler i prøven ved at hver prøve deles opp i inntil 20 000 små oljedråper der det foregår en separat PCR-reaksjon. Etter endt PCR-reaksjon blir hver dråpe avlest som et positiv (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 kan få bedre avleste prøver mht. totalkonsentrasjon av originalt DNA-innputt. Ved å kombinere flere kjøringar vil man anta at antall DNA-kopier per dråpe vil danne en Poisson fordeling hvor punktsannsynligheten er gitt ved:

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

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:

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

Ved å bruke ligning 2) oppnås et standardisert mål på DNA-mengde i prøve kontrollert for filtrert vannvolum, samt ulike volumendringer og fortynninger i lab. Det er spesielt viktig å kontrollere for mengde vann filtrert for prøver samlet inn i salamanderdammer da dette ofte er vann med variabelt innhold av partikler. Vi bruker derfor dette målet gjennomgående i denne rapporten for å gjøre tolkningen av dataene lettere. For å unngå falske positive signaler, har vi satt en grense på minst tre positive dråper i analysen. Alle prøver med 1-3 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 en eller i sjeldne tilfeller to positive dråper.

Prøvene ble også analysert ved hjelp av real-time PCR (q-PCR) med genetiske markører artsspesifikk for Bd, spissnutfrosk, buttsnutfrosk og padde. Dette er en kvantitativ PCR metode hvor amplifisering av PCR produktet avleses for hver PCR syklus (real-time), i motsetning til ddPCR som er en end-point avlesning. Mengde DNA fra arten som undersøkes vil teoretisk doubles for hver PCR syklus og avleses vha. fluorescens. Når økningen når eks-

ponentiell fase, vil man ved hjelp av en standardkurve fra positiv kontroll med kjent konsentrasjon, kunne beregne mengde DNA fra hhv. Bd, spissnutefrosk, buttsnutefrosk og padde i prøven.

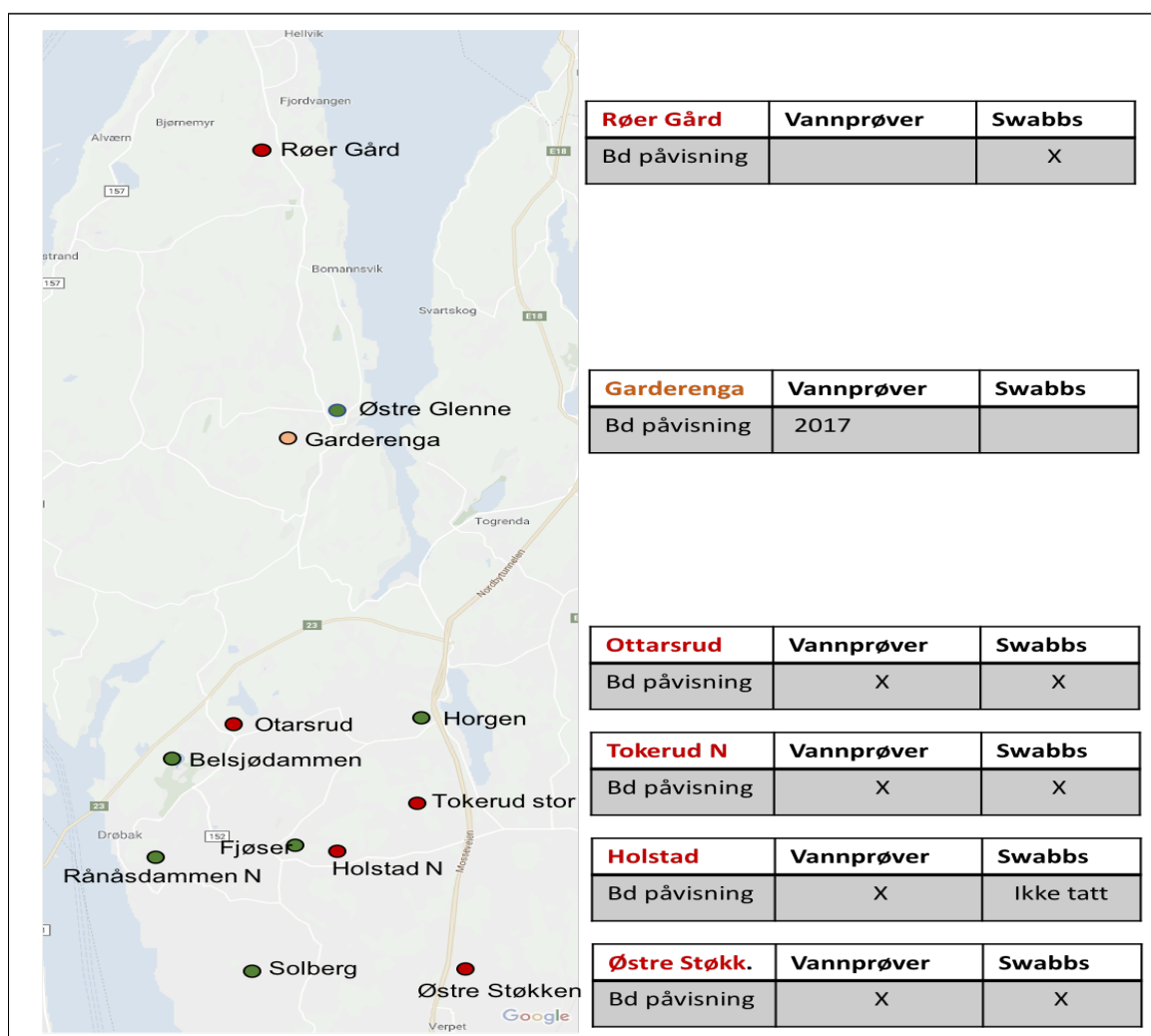
3 Resultater

Det ble samlet inn totalt 47 vannprøver fordelt på 5 innsamlingsperioder og 12 lokaliteter for 2018, se **Tilleggsmateriale Tabell 1** for resultatene fra ddPCR og qPCR på småsalamander, storsalamander og Bd for de ulike lokalitetene og innsamlingsdatoene. Hovedresultatet for 2018 er et nytt funn av Bd i en ny i Akershus, i Nordre Holstad, med en positiv prøve. En av utfordringene med å samle inn vannprøver er å få tatt en prøve som representerer kilden det er tatt fra da dyr og miljø-DNA kan ha en klumpvis fordeling. Mengden DNA per liter vann i denne analysen vil derfor kun til en viss grad reflektere tettheten av dyr i lokaliteten.

3.1 Resultater fra vannprøver innsamlet i Akershus 2018

3.1.1 ddPCR og qPCR av Bd

Bd ble påvist i totalt 3 vannprøver med ddPCR, en i Tokerud og 2 i Østre Støkken, og 7 vannprøver med qPCR, de samme tre som ble positive med ddPCR, og i tillegg en positiv prøve i Nordre Holstad, en i Østre støkken og to i Ottarsrud, se **Figur 3.1** for en oppsummering av hvor Bd ble detektert med de ulike metodene.



Figur 3.1. Kart som viser lokaliteter med positive prøver for Bd merket i rødt (fem påviste dammer i 2018), samt en oversikt over hvilke prøvetyper som har slått positivt ut til høyre for hver av lokalitetene. Garderenga har ingen positive prøver for 2018 men hadde positive vannprøver i 2017 og er derfor skissert som oransje, mens grønn indikerer Bd-frie dammer. Holstad Nord er ny for 2018.

3.1.2 ddPCR av småsalamander og storsalamander

Alle vannprøvene samlet inn ble også kjørt på småsalamander og storsalamander. Nordre Rånåsdammen og Holstad var preget av veldig lite vann og ble kun samlet inn to ganger, Fjøser ble tappet ned i jordbærsesongen og fikk tilført vann fra flere dammer i rør, så denne ble heller ikke samlet inn under siste innsamlingsrunde. Resultatene for de ulike dammene og innsamlingstidene er oppsummert i **Tilleggsmateriale tabell 1** og i **Figur 3.2**.

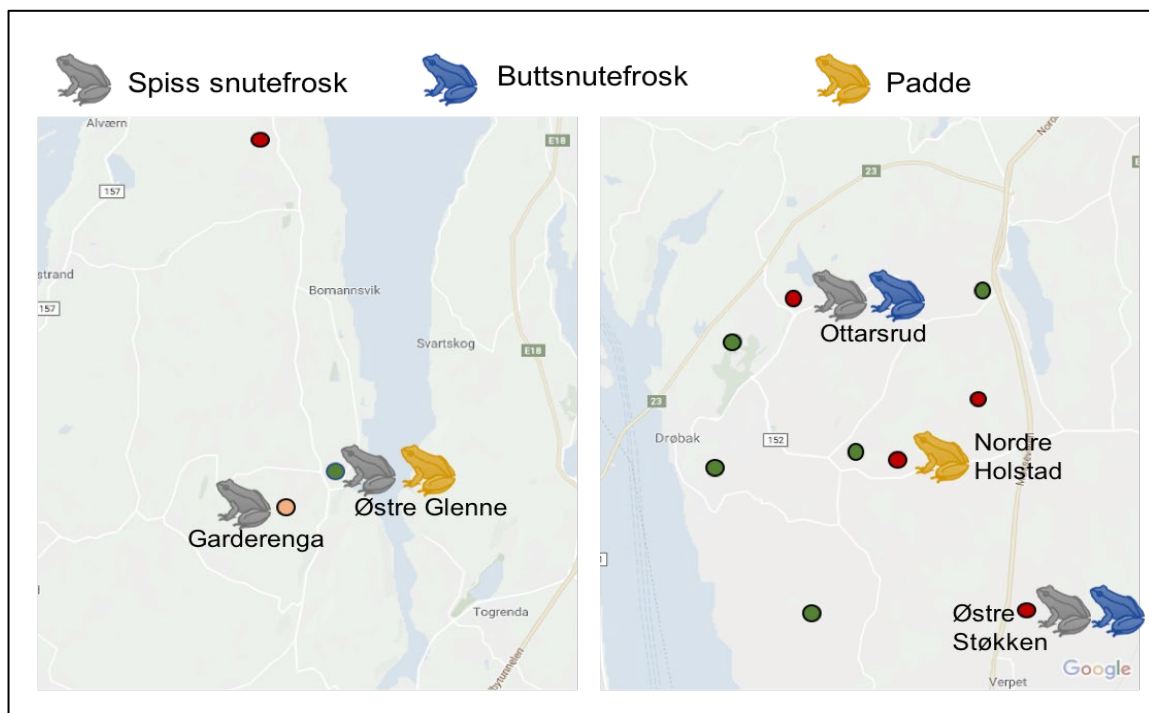


Figur 3.2 viser miljø-DNA (kopier per liter) resultatene for småsalamander (blått) og storsalamander (grått) for de ulike innsamlingstidspunktene. Rød kant rundt plott indikerer Bd-smittede dammer.

3.1.3 qPCR og ddPCR av padde og frosk

For hver art ble det analysert en 1:10 fortynningsserie på DNA isolert fra en ren vevsprøve fra de tre artene undersøkt. Denne fortynningsserien har kjent konsentrasjon og standardkurven fra disse benyttes til å beregne konsentrasjonen av de tre artene i prøvene.

For hver art ble det kjørt en fortynningsserie på 7 ganger 1:10 basert på DNA isolert fra en ren vevsprøve. Ut fra dette satte vi følgende CT-grenser for å karakterisere en prøve som positiv basert på formen på standardkurven: Padde: 37.9; Buttsnutfrosk: 38.7; og Spiss-snutfrosk: 38.8. Dataene er oppsummert i **Tilleggsmateriale Tabell 3** og oppsummert i **Figur 3.3**.



Figur 3.3. Kart som viser distribusjonen av frosk og padde ifølge miljø-DNA resultater oppsummert fra **Tilleggsmateriale Tabell 3**.



Figur 3.4. Frosk fanget i Ottarsrud

3.2 Resultater fra strykeprøver innsamlet i Akershus 2018

Det ble tatt strykeprøver av de to salamanderartene ved to ulike tider grunnet is på vannet på dammen ved Røer gård og Østre støyken, se **Tabell 3.2** og **Figur 3.4**. Innsamlingen av frosk og padde var svært tidkrevende og gav lite fangst, se **Tilleggstabell 2** for antall innsamlede dyr. Av artene var det kun storsalamander som slo ut positivt på Bd, og det ble samlet inn positive prøver for 4 av 5 lokaliteter, se **Tabell 3.2**. Av dammene hadde Røer Gård den høyeste prosenten med smittede storsalamandere med 7 av 10 smittede dyr. Når det gjelder faktisk antall smittede dyr er det vanskelig å vurdere om alle de 7 dyrene som slo ut på smitte faktisk er smittet, da konsentrasjonen av Bd-DNA på mange av dyrene er svært lav og de positive utfallene f.eks. kan komme av en smitte-effekt inne i rusene gitt at et eller flere smittede dyr er i nærkontakt med friske dyr. I ddPCR kjøres svært mange PCRer samtidig (opp mot 20 000), og når kun f.eks. 3 av disse er positive er det en avveining å anse prøvene som positive eller ikke, og resultatene oppgitt i **Tabell 3.2**. er dermed trolig en overestimering av antall smittede dyr per lokalitet. Oppsummert slo 4 av 15 storsalamandere ut på Bd i Ottarsrud, 7 av 10 i Røer Gård, 1 av 7 i Tokerud og 6 av 10 i Østre Støyken.

Tabell 3.2. Tabellen oppsummerer de positive funnene av Bd på hud av de innsamlede dyrene. Se Tilleggs tabell 2 for en fullstendig liste av innsamlede dyr.

Lokalitet	Dato	Art	Positives
Ottarsrud	25/04/2018	Storsalamander	258
Ottarsrud	25/04/2018	Storsalamander	10
Ottarsrud	25/04/2018	Storsalamander	3
Ottarsrud	25/04/2018	Storsalamander	18
R.Gård	12/05/2018	Storsalamander	71
R.Gård	12/05/2018	Storsalamander	188
R.Gård	12/05/2018	Storsalamander	6
R.Gård	12/05/2018	Storsalamander	16
R.Gård	12/05/2018	Storsalamander	3
R.Gård	12/05/2018	Storsalamander	4
R.Gård	12/05/2018	Storsalamander	36
R.Gård	12/05/2018	Storsalamander	8
Tokerud	26/04/2018	Storsalamander	102
Østre Støyken	26/04/2018	Storsalamander	2278
Østre Støyken	26/04/2018	Storsalamander	10
Østre Støyken	26/04/2018	Storsalamander	7
Østre Støyken	26/04/2018	Storsalamander	4
Østre Støyken	26/04/2018	Storsalamander	7



Figur 3.5. Året 2018 var preget av et raskt skifte fra vinter til vår og raske forandringer i lokale forhold; bilde a) viser en isbelagt Garderenga der det ikke ble fangst i noen av ortmannsfellene som ble satt ut 24.04.2018, mens bilde b) og c) viser Ottarsrud på samme dato, der det er full aktivitet og det ble innfanget hele 57 storsalamandere fordelt på seks ortmannsfeller. Avstanden mellom dammene er ca. 11 Km.

4 Diskusjon

Det ble filtrert vannprøver fra 12 dammer og fanget inn dyr for DNA-analyser av hudprøver fra 5 dammer i 2018. Dette resulterte i positive funn av Bd i 4 dammer med vannprøver og 4 med strykeprøver fra storsalamandere, oppsummert til totalt fem dammer som hadde positive prøver for Bd i 2018, se **Figur 3.1**. Garderenga, som slo ut positiv på Bd med vannprøver for 2017 hadde ingen positive prøver for Bd i 2018.

4.1 Påvisning av arter i lokalitetene ved vannprøver

Bd ble kun påvist i to lokaliteter når vannprøvene ble kjørt på ddPCR og fire lokaliteter når prøvene ble kjørt på qPCR. Tidligere testing viste at punktprøver tatt på samme tid og sted kunne være svært variable med hensyn på miljø-DNA-konsentrasjonen for de to salamanderartene (Taugbøl et al. 2018). Ved å samle inn vann fra flere punktprøver i en oppsamlingskanne har vi tidligere påvist en klar reduksjon i variasjonen mellom prøver, og resultatene blir dermed mer pålitelige (Taugbøl et al. 2018). Når vi allikevel har så få positive prøver på Bd ved miljø-DNA-analyser kan dette tyde på at de varme forholdene i 2018 kan ha redusert forekomsten eller smittetrykket av Bd i Akershus. Men det skal også nevnes at det er høy usikkerhet rundt årets negative prøver, spesielt for de lokalitetene der det er påvist smitte på dyr. At en art ikke blir påvist kan skyldes flere årsaker, som for eksempel vannkvalitet i lokaliteten, temperatur, tetthet av arten, prøvevolumet som ble innsamlet samt behandling og analysering av prøven på lab.

Sommeren 2018 var en over gjennomsnittlig varm sommer og vannprøvene som ble samlet inn i juli kan ha gitt dam-temperaturer som overstiger optimumet til Bd som ligger på ca. 17-25° C (Piotrowski et al. 2004). En annen årsak kan være at dyrene kan ha samlet seg mer ned mot bunnen og kjøligere vannmasser for å redusere energibruk, slik at kantsonene, der vannprøvene ble samlet inn har blitt mindre eksponert for amfibie-DNA, og dermed også DNA fra Bd. Og selv om dyrene ved varmere vann må oftere opp for å puste var det trolig mindre omrøring i vannmassene i 2018 sammenlignet med 2017, men vi har ikke data for å analysere om dette stemmer. Mer stillestående vann vil i så fall gi mer opphopninger av miljø-DNA og stor variasjon i konsentrasjoner innad i vannet. I tillegg vil den solrike sommeren ha gitt økt UV-innstråling til dammene, som igjen bryter ned miljø-DNA og reduserer oppholdstiden til miljø-DNA-et (Rees et al. 2014). Tidligere studier har også vist at amerikanske oksefrosker hadde en høyere infeksjonsgrad av Bd 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. Dammene i Akershus hadde en temperatur som oversteg 20 grader flere ganger i juni (Taugbøl & Dervo 2019), så en negativ miljø-DNA-prøve bør derfor ikke sees på som et endelig bevis for arten ikke finnes i lokaliteten.

I 2017 indikerte resultatene fra tre vannprøver innsamlet i Ottarsrud fra mai til juni at mengden av Bd så ut til å øke gjennom sesongen, mens miljø-DNA konsentrasjonen av salamanderartene avtok i samme periode. Med så få positive prøver av Bd (kun to prøver i Østre Støkken) har vi ikke grunnlag for å kjøre de samme testene på årets data, men når det gjelder storsalamander og småsalamander i de infiserte dammene ser vi ingen tegn til nedgang av miljø-DNA i de Bd-infiserte dammene for 2018, se **Figur 3.2**. Når det gjelder kontrolldammene er det vanskeligere å se et mønster. I Nordre Holstad, som i utgangspunktet var en kontrolldam ble det påvist Bd med qPCR lenge etter felt-sesongen var over, og i Fjører ble det oppdaget at grunneier tappet inn vann fra tre andre nærliggende dammer. Nordre Rånåsdammen og Holstad tørket inn i så stor grad at det var vanskelig å komme til

vannet da breddene besto av et tykt gjørmelag. I Østre Glenne fant vi ikke miljø-DNA fra hverken storsalamander- eller småsalamander i prøvene tatt i juni og tidlig juli.

Når det gjelder frosk og padde illustrerer **Figur 3.3** lab resultatene som har verdier over falske positive på kart. Av Bd-infiserte dammer er det kun Rør gård og Tokerud som ikke slår ut på noen av de tre artene, mens kun Østre Glenne slår ut av kontrolldammene. Garderenga slår ut på spiss-snutfrosk. Ingen av kontrolldammene har lab-verdier som er sikre nok til å slå fast at de mest sannsynlig har frosk eller padde, men dette er resultater som har høy usikkerhet og bør testes videre.

4.2 Påvisning av Bd på hudprøver

Av de 91 prøvene som ble samlet inn på storsalamander, småsalamander og frosk var det kun storsalamander som hadde vevsprøver som slo positivt ut på Bd. At de smittede dyrene ikke virker svekket kan indikere at storsalamander kan være bærere (vektorer) av Bd uten å selv bli nevneverdig påvirket, men dette må undersøkes nærmere i egnede forsøk. Mange av de positive Bd-prøvene på storsalamander har lav konsentrasjon. Dette kan forklares med lav smitte på individene eller at smittede individer i rusene de er fanget smitter over Bd på andre dyr. Hvis dette var tilfelle ville vi også forvente at småsalamandre i de samme rusene også hadde hatt lave infeksjonsverdier men dette er ikke tilfelle da ingen småsalamandre slår positivt ut. Positive prøver er generelt pålitelige med metoden vi har brukt i denne analysen, og selv om enkelte individer kanskje er registrert som falske positive er det allikevel meget høy grunn til å tilsi at dammene med påvist smitte på storsalamander er smittet av Bd.

4.3 Oppsummering og videre anbefalinger

Det ble for første gang lett etter Bd i Norge i 2017, og patogenet ble påvist i fem av femten ulike storsalamanderdammer i Akershus (Taugbøl et al. 2017). I 2017 ble Bd påvist ved å kun filtrere en halv liter vann for miljø-DNA. I 2018 ble det i tillegg til filtrerte vannprøver også tatt strykeprøver direkte fra dyr i de infiserte dammene i Akershus (denne rapporten). Sesongen 2018 kan oppsummeres i en lang, snørik vinter med en kort vår og en meget varm sommer. Enkelte av dammene som skulle samles inn frem mot august tørket så mye inn at det var vanskelig eller umulig å nå vannkanten grunnet tykke lag med gjørme, og vannet som var igjen hadde høyere temperaturer enn for vanlige år. Det at vi finner lite, eller ingen positive prøver av Bd som i Garderenga, kan indikere at det er mindre Bd i vannet og da sannsynligvis også på dyrene i 2018 sammenlignet med 2017. Andre studier har også funnet meget lite Bd i de varmeste sommermånedene (Olori et al. 2018), så det kan tenkes at den unormalt varme sommeren kan ha påvirket enten oppholdstiden til vertedyrene i vannet slik at de har trekt mot land før de friske dyrene, eller at det har vært for varmt for typen av Bd som oppholder seg i dammene slik at de ikke har vokst optimalt. Vi vet lite om hvordan livssyklusen til Bd er i våre nordlige dammer. En negativ miljø-DNA-prøve bør derfor ikke sees på som et endelig bevis for arten ikke finnes i lokaliteten. I kontekst med at hovedinnsamlingen av prøver i 2018 foregikk da det var minst sannsynlighet for å detektere Bd (Olori et al. 2018) er det derfor meget høy risiko for at dataene våre innehar en stor andel falske negative og at Bd mest sannsynlig har en høyere utbredelse enn vi i dag har data på.

Vi vil derfor anbefale å videreføre prosjektet over flere år for å få økt kunnskap om hvordan miljø-DNA konsentrasjonen for Bd og amfibier utvikler seg i smittede dammer igjennom sesongen da ett år ikke danner nok grunnlag for kunnskap om Bd har en smitteeffekt eller ikke. Vi anbefaler videre å øke antall hudprøver (swabbs) av dyr i de smittede dammene, samt også å inkludere swabbs i dammer som tilsynelatende er friske for å forsøksvis prøve å

utelukke at de kan ha Bd. Vi anbefaler også å innhente vannprøver fra et utvidet område i Norge for å få en større innsikt i utbredelsen til Bd.

5 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., 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.
- 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.
- 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 artsspesifikke markører for gjedde, mort og ørekyt. NINA-Rapport 1299. Norsk Institutt for Naturforskning.
- Garner, T.W.J., Walker, S., Bosch, J., Hyatt, A.D., Cunningham, A.A. & Fisher, M.C. 2005. Chytrid Fungus in Europe. *Emerg Infect Dis* 11(10): 1639-41.
- 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.
- Hallengren, A. Chytridiomykosis- Ett hot mot svenska groddjur?
- 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.
- 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.
- Olori, J.C., Netzbänd, R., McKean, N., Lowery, J., Parsons, K. & Windstam, S.T. 2018. Multi-year dynamics of ranavirus, chytridiomycosis, and co-infections in a temperate host assemblage of amphibians. *Dis Aquat Organ* 130(3): 187-197.
- 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.
- Rees, H.C., Maddison, B.C., Middleditch, D.J., Patmore, J.R.M. & Gough, K.C. 2014. REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology* 51(5): 1450-1459.
- Spens, J., Evans, A.R., Halfmaerten, D., Knudsen, S.W., Sengupta, M.E., Mak, S.S.T., Sigsgaard, E.E., Hellström, M. & Yu, D. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution* 8(5): 635-645.
- Taugbøl, A. & Dervo, B.K. 2019. Nasjonal overvåking av storsalamander *Triturus cristatus* – resultater fra Oslofjordområdet i 2018. Norsk institutt for naturforskning (NINA).
- Taugbøl, A., Fossøy, F. & Dervo, B.K. 2018. Bruk av miljø-DNA for deteksjon av arter. Vann(01-2018).
- Taugbøl, A., Dervo, B.K., Sivertsgård, R., Brandsegg, H. & Fossøy, F. 2018. Bruk av miljø-DNA til overvåking 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., Kielgast, J., Iversen, L.L., Møller, P.R., Rasmussen, M. & Willerslev, E. 2012. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. PLoS ONE 7.
- 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.
- Wilber, M.Q., Knapp, R.A., Toothman, M. & Briggs, C.J. 2017. Resistance, tolerance and environmental transmission dynamics determine host extinction risk in a load-dependent amphibian disease. Ecology Letters 20(9): 1169-1181.

6 Vedlegg

6.1 Tilleggsmateriale Tabell 1

Tilleggsmateriale Tabell 1 viser innsamlingsdatoer for de ulike lokalitetene og antall DNA kopier per liter for Bd (i rødt), småsalamander (i grønt) og storsalamander (i gult), samt antall positive dråper for de ulike ddPCRene. Antall positive dråper må være over 3 for at prøven regnes med som en positiv prøve.

Lokalitet	Dato	BD DNA/L	Positives	Småsalam. DNA/L	Positives	Storsalam. DNA/L	Positives
Belsjødammen	12/05/2018	0	0	21829	245	203429	2134
Belsjødammen	24/05/2018	0	0	20267	223	14400	159
Belsjødammen	08/06/2018	0	0	21333	209	8800	87
Fjøser	12/05/2018	66	1	28329	436	4518	70
Fjøser	24/05/2018	0	0	63680	976	6880	109
Fjøser	08/06/2018	0	0	18700	269	17000	245
Fjøser	03/07/2018	0	0	16853	249	57280	823
Garderenga	13/07/2018	0	0	5943	40	434	3
Garderenga	23/05/2018	0	0	8356	68	1227	10
Garderenga	08/06/2018	0	0	60800	372	0	0
Garderenga	03/07/2018	0	0	15000	91	7000	43
Horgen	24/05/2018	0	0	60800	293	35733	173
Horgen	08/06/2018	0	0	183200	642	13600	49
N. Holstad	13/07/2018	0	0	1011	17	328	6
N. Holstad	25/05/2018	160	2	57300	895	1500	24
N. Holstad	08/06/2018	0	0	1200	21	112	2
N. Holstad	03/07/2018	0	0	1360	23	560	8
N.Rånådammen	24/05/2018	0	0	113600	293	35733	93
N.Rånådammen	08/06/2018	0	0	150000	529	29200	105
Ottarsrud	12/05/2018	0	0	40000	439	29067	321
Ottarsrud	13/07/2018	0	0	57231	590	167385	1758
Ottarsrud	24/05/2018	93	1	6933	73	9733	102
Ottarsrud	08/06/2018	0	0	42200	579	29900	413
Ottarsrud	03/07/2018	0	0	52042	701	60632	805
Rør gård	13/07/2018	0	0	48080	941	72800	1262
Rør gård	23/05/2018	0	0	46880	470	10400	106
Rør gård	08/06/2018	0	0	33600	251	4600	34
Rør gård	03/07/2018	0	0	53800	793	4800	47
Solberg	12/05/2018	0	0	10000	111	1333	15
Solberg	13/07/2018	0	0	9400	128	6600	99
Solberg	24/05/2018	0	0	117647	1669	50635	740
Solberg	08/06/2018	0	0	14080	193	10240	141
Solberg	03/07/2018	0	0	26600	69	115000	832
Tokerud	13/07/2018	0	0	82526	1296	112000	1755
Tokerud_N	12/05/2018	0	0	124	2	320	5
Tokerud_N	24/05/2018	64	1	7040	131	3680	69
Tokerud_N	08/06/2018	536	9	4800	90	1680	32
Tokerud_N	03/07/2018	0	0	95200	1508	71200	1166
Ø. Glenne	13/07/2018	0	0	7733	76	5467	56
Ø. Glenne	25/05/2018	173	2	11867	119	4933	49
Ø. Glenne	08/06/2018	0	0	0	0	0	0
Ø. Glenne	03/07/2018	0	0	0	0	0	0
Østre Støkken	13/07/2018	0	0	15040	213	233600	2927
Østre Støkken	12/05/2018	4000	44	130667	1456	81600	652
Østre Støkken	24/05/2018	116	1	66618	654	128145	1236
Østre Støkken	08/06/2018	400	4	70933	753	26667	287
Østre Støkken	03/07/2018	0	0	48862	475	323692	3015

6.2 Tilleggsmateriale Tabell 2

Tilleggsmateriale Tabell 2 viser lokalitet, dato for innsamling av dyr, hvilken art som er fanget inn for hudprøveanalyse av Bd-sporer og hvor mange Bd-DNA kopier som var positive i dd-PCRen.

Lokalitet	Dato	Art	Bd-positives	Lokalitet	Dato	Art	Bd-positives
Garderenga	12/05/2018	frosk	0	R.Gård	12/05/2018	storsalamander	2
Garderenga	12/05/2018	småsalamander	1	R.Gård	12/05/2018	storsalamander	2
Garderenga	12/05/2018	småsalamander	1	R.Gård	12/05/2018	storsalamander	2
Garderenga	12/05/2018	småsalamander	0	R.Gård	12/05/2018	storsalamander	1
Garderenga	12/05/2018	småsalamander	0	R.Gård	12/05/2018	storsalamander	1
Garderenga	12/05/2018	småsalamander	0	R.Gård	12/05/2018	storsalamander	0
Garderenga	12/05/2018	småsalamander	0	R.Gård	12/05/2018	storsalamander	0
Garderenga	12/05/2018	småsalamander	0	R.Gård	12/05/2018	storsalamander	0
Garderenga	12/05/2018	småsalamander	0	R.Gård	12/05/2018	storsalamander	0
Garderenga	12/05/2018	storsalamander	0	R.Gård	12/05/2018	storsalamander	0
Garderenga	12/05/2018	storsalamander	0	Tokerud	26/04/2018	småsalamander	2
Garderenga	12/05/2018	storsalamander	0	Tokerud	26/04/2018	småsalamander	1
Garderenga	12/05/2018	storsalamander	0	Tokerud	26/04/2018	småsalamander	1
Garderenga	12/05/2018	storsalamander	0	Tokerud	26/04/2018	småsalamander	0
Ottarsrud	25/04/2018	frosk	0	Tokerud	26/04/2018	småsalamander	0
Ottarsrud	26/04/2018	frosk	0	Tokerud	26/04/2018	småsalamander	0
Ottarsrud	25/04/2018	småsalamander	2	Tokerud	26/04/2018	småsalamander	0
Ottarsrud	25/04/2018	småsalamander	1	Tokerud	26/04/2018	småsalamander	0
Ottarsrud	25/04/2018	småsalamander	0	Tokerud	26/04/2018	småsalamander	0
Ottarsrud	25/04/2018	småsalamander	0	Tokerud	26/04/2018	småsalamander	0
Ottarsrud	25/04/2018	småsalamander	0	Tokerud	26/04/2018	småsalamander	0
Ottarsrud	25/04/2018	småsalamander	0	Tokerud	26/04/2018	storsalamander	102
Ottarsrud	25/04/2018	småsalamander	0	Tokerud	26/04/2018	storsalamander	1
Ottarsrud	25/04/2018	småsalamander	0	Tokerud	26/04/2018	storsalamander	1
Ottarsrud	25/04/2018	småsalamander	0	Tokerud	26/04/2018	storsalamander	0
Ottarsrud	25/04/2018	småsalamander	0	Tokerud	26/04/2018	storsalamander	0
Ottarsrud	25/04/2018	småsalamander	0	Tokerud	26/04/2018	storsalamander	0
Ottarsrud	25/04/2018	storsalamander	258	Tokerud	26/04/2018	storsalamander	0
Ottarsrud	25/04/2018	storsalamander	18	Ø Stokken	26/04/2018	småsalamander	2
Ottarsrud	25/04/2018	storsalamander	10	Ø Stokken	26/04/2018	småsalamander	1
Ottarsrud	25/04/2018	storsalamander	3	Ø Stokken	26/04/2018	småsalamander	0
Ottarsrud	25/04/2018	storsalamander	2	Ø Stokken	26/04/2018	småsalamander	0
Ottarsrud	25/04/2018	storsalamander	2	Ø Stokken	26/04/2018	småsalamander	0
Ottarsrud	25/04/2018	storsalamander	0	Ø Stokken	26/04/2018	småsalamander	0
Ottarsrud	25/04/2018	storsalamander	0	Ø Stokken	26/04/2018	storsalamander	2278
Ottarsrud	25/04/2018	storsalamander	0	Ø Stokken	26/04/2018	storsalamander	10
Ottarsrud	25/04/2018	storsalamander	0	Ø Stokken	26/04/2018	storsalamander	7
R.Gård	12/05/2018	storsalamander	188	Ø Stokken	26/04/2018	storsalamander	7
R.Gård	12/05/2018	storsalamander	71	Ø Stokken	26/04/2018	storsalamander	4
R.Gård	12/05/2018	storsalamander	36	Ø Stokken	26/04/2018	storsalamander	2
R.Gård	12/05/2018	storsalamander	16	Ø Stokken	26/04/2018	storsalamander	2
R.Gård	12/05/2018	storsalamander	8	Ø Stokken	26/04/2018	storsalamander	1
R.Gård	12/05/2018	storsalamander	6	Ø Stokken	26/04/2018	storsalamander	1
R.Gård	12/05/2018	storsalamander	4	Ø Stokken	26/04/2018	storsalamander	0
R.Gård	12/05/2018	storsalamander	3				

6.3 Tilleggsmateriale Tabell 3

Den laveste C_T -verdien fra qPCR per lokalitet og det høyeste antall positive dråper fra ddPCR per lokalitet er oppgitt. Resultater i rød skrift må sees på som usikre og kan representere falske positiver.

Lokalitet	Padde		Buttsnutefrosk		Spissnutefrosk	
	C_T	Positive dråper	C_T	Positive dråper	C_T	Positive dråper
Bellsjødammen						1
Fjøser	38.80					
Garderenga					36.51	
Horgen						2
N. Holstad	31.78	71		1		1
N. Rånådammen	38.39	1				
Ottarsrud			29.94	210	33.27	14
Røer gård		2	40.61		39.98	
Solberg						
Tokerud					39.27	
Ø. Glenne	38.09	8		1	36.35	2
Ø. Støkken	39.81	1	38.39		35.49	1

*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 fors–kning
og utredning, miljøovervåking, rådgivning og
evaluering. NINA har stor bredde i kompetanse og
erfaring med både naturvitere og sam–funnsvitere
i staben. Vi har kunnskap om artene, naturtypene,
samfunnets bruk av naturen og sammenhenger
med de store drivkreftene i naturen.*

ISSN:1504-3312
ISBN: 978-82-426-3405-4

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