

Ursachen für den Rückgang der Geburtshelferkröte in der Schweiz – Genetik und/oder Pilzerkrankung?

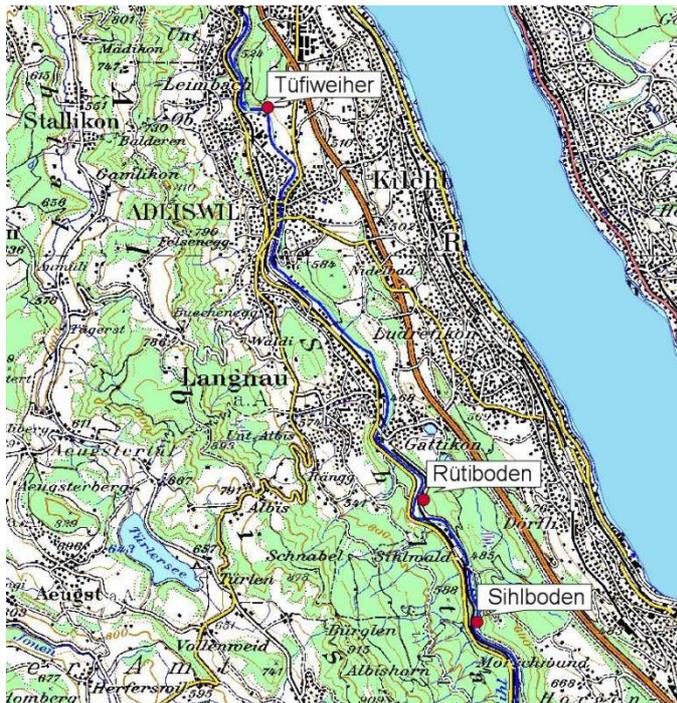
Kurzbericht zur Dissertation

Ursina Tobler

Institut für Evolutionsbiologie und Umweltwissenschaften (IEU)

Universität Zürich

Weltweit sind Amphibien die am stärksten bedrohten Wirbeltiere, über ein Drittel der etwa 6000 bekannten Arten sind im Rückgang begriffen oder sogar direkt vom Aussterben bedroht. In der Schweiz sieht die Lage sogar noch schlechter aus: Rund 70% der heimischen Amphibienarten befinden sich auf der roten Liste. Übernutzung der Bestände für Terrarienhandel oder als Lebensmittelressource, Habitatverlust und -verschlechterung, und Infektionskrankheiten führen die Liste der verantwortlichen Faktoren an. Während Übernutzung der Bestände in Europa kaum ein Problem darstellt, sind die beiden letzteren Punkte eine umso dringendere Sorge. Habitatverlust und -verschlechterung führen zu einer Verkleinerung der Bestände, zusätzlich gehen sie einher mit Fragmentierung des Lebensraumes, so dass kein Austausch zwischen isolierten Beständen mehr stattfinden kann. Inzucht und die Anhäufung schädlicher Mutationen, und damit die Verringerung des Fortpflanzungserfolgs, sind die Folge. Zudem wurden durch den globalen Handel mit Amphibien Infektionskrankheiten eingeschleppt, allen voran die Pilzerkrankung Chytridiomykose. Weltweit wurden starke Reduktionen der Bestände und sogar deren komplettes Aussterben beobachtet, wenn die Krankheit in „naive“ Bestände eingeschleppt wurde, die vorher noch nie mit dem Erreger in Kontakt gekommen waren. Die Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*) ist eine jener europäischen Amphibienarten mit den kürzesten Wanderdistanzen. Neubesiedlungen von Gewässern werden häufig nur beobachtet, wenn die Distanz zum nächsten besiedelten Fortpflanzungsgewässer deutlich unter 1km liegt. Zudem war die Art die erste, die in Spanien Massensterben aufgrund der Chytridiomykose aufwies, nachdem die Krankheit erstmals eingeschleppt worden war. Da die Geburtshelferkröten in der Schweiz seit Mitte der 1980er Jahre um über 60% zurückgegangen sind, liegt die Frage nahe, ob einerseits genetische Ursachen oder erhöhte Sterblichkeit durch die Chytridiomykose für die Bestandesrückgänge verantwortlich sind. Diese Fragen möchte ich in der vorliegenden Arbeit klären.



Im Sihlthal habe ich die folgenden drei Bestände beprobt (Abbildung 1):

ZH-Rüti (Rütiboden): 684177/236636

ZH-Sihl (Sihlboden): 684937/234934

ZH-Tüfi (Tüfiweiher): 682073/242014

Abbildung 1: Karte der beprobten Standorte an der Sihl

1. Populationsgenetik

Zwischen 2007 und 2009 habe ich in fünf Regionen der Schweiz – Region Liestal (BL), Emmental (BE), Entlebuch (LU), St.Gallen (SG) und Sihltal (ZH) Gewebeproben von ca. 25 Kaulquappen aus durchschnittlich 10 Weihern pro Region gesammelt. Diese habe ich mit 12 genetischen Markern (Mikrosatelliten) analysiert, um die genetische Diversität und die Strukturierung der Bestände innerhalb eines Gebietes zu untersuchen und Unterschiede zwischen den Gebieten festzustellen. Für St.Gallen und das Entlebuch erwartete ich eine geringere genetische Diversität und eine stärkere Strukturierung der Bestände, da diese Gebiete die stärkeren Rückgänge der Art aufweisen und die einzelnen Bestände weit auseinander liegen. Für die Region Liestal und Emmental erwartete ich, dass die Bestände besser verknüpft sind, da hier die Teiche näher beieinander liegen. Die Sihltalpopulationen sollten wiederum besser verknüpft sein, da sie sich entlang eines Flusses ausbreiten und durchmischen können.

1.1 genetische Diversität

Zur Bestimmung der genetischen Diversität habe ich vier Werte berechnet:

- 1) Alleldiversität: Allele sind Varianten von Genen. Die Alleldiversität beschreibt, wie viele Genvarianten sich durchschnittlich an einem der untersuchten 12 Genorte befinden. Je höher dieser Wert ist, umso genetisch diverser ist ein Bestand.
- 2) genetischer Polymorphismus: Anteil der Genorte, die mehr als eine Genvariante in einem bestimmten Vorkommen der Geburtshelferkröte aufweisen
- 3) Heterozygotie: Alle Wirbeltiere sind diploid, d.h. sie haben einen doppelten Gensatz, von dem jeweils einer durch den Vater, der andere durch die Mutter vererbt wird. Sind die Genvarianten an einem bestimmten Genort im mütterlichen und väterlichen Gensatz unterschiedlich, spricht man von Heterozygotie. Heterozygotie ist also ein Mass für die genetische Diversität innerhalb eines Individuums.
- 4) F_{IS} : F_{IS} ist ein Mass für die Inzucht innerhalb eines Bestandes. Werte über 0 (bis 1) bedeuten, dass Inzucht vorhanden ist, Werte zwischen unter 0 (bis -1) bedeuten, dass ein Bestand eine höhere Heterozygotie aufweist als erwartet, also keine Inzucht herrscht.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die genetische Diversität in den verschiedenen Regionen. Gezeigt sind die Mittelwerte pro Region über alle Teiche plus die Einzelwerte der Sihlpopulationen.

Tabelle1: Mittelwerte der Alleldiversität, des Polymorphismus, der Heterozygotie und F_{IS} der Bestände in den verschiedenen Regionen ± 1 Standardfehler

	Stichprobe	Alleldiversität	Polymorphismus	Heterozygotie	F_{IS}
BE		2.106 \pm 0.097	0.570 \pm 0.028	0.251 \pm 0.010	-0.121 \pm 0.051
BL		2.750 \pm 0.150	0.570 \pm 0.027	0.297 \pm 0.017	-0.018 \pm 0.012
LU		2.280 \pm 0.091	0.620 \pm 0.024	0.279 \pm 0.016	-0.022 \pm 0.022
SG		2.229 \pm 0.152	0.625 \pm 0.036	0.288 \pm 0.024	-0.044 \pm 0.016
ZH		1.615 \pm 0.090	0.444 \pm 0.056	0.193 \pm 0.025	-0.040 \pm 0.041
ZH-Rüti	26	1.535	0.333	0.163	-0.119
ZH-Sihl	26	1.795	0.500	0.242	-0.021
ZH-Tüfi	24	1.516	0.500	0.174	-0.019

Auffällig ist, dass sich die Regionen kaum unterscheiden. In allen Gegenden liegen pro Genort 2-3 Genvarianten vor, der Anteil der variablen Genorte liegt bei ca. 50% und der Anteil heterozygoter Individuen pro Genort bei ca. 30%. Keine Gegend weist Inzucht auf. Diese Werte sind durchaus typisch für Amphibien, nur die Heterozygotie liegt etwas tiefer als durchschnittliche Werte für Amphibien.

Eine Analyse der Verteilung der genetischen Diversität auf verschiedene Ebenen (AMOVA) zeigt, dass die genetische Diversität vor allem innerhalb von Individuen eines Bestandes vorliegt, nämlich 62.0%. 19.5% der genetischen Diversität liegt zwischen Beständen innerhalb einer Region vor, und 18.5% zwischen den Regionen. Dies weist darauf hin, dass die Bestände nicht an Inzucht leiden, was auch mit den beobachteten F_{IS} -Werten übereinstimmt.

1.2 genetische Strukturierung

Eine Cluster-Analyse mit dem Programm STRUCTURE ergab, dass die Populationen im Emmental und Entlebuch nahe miteinander verwandt sind, dass die Baselbieter ein einzelnes Cluster bilden, während die St. Galler und Sihltaler Populationen zusammen ein Cluster bilden. In weiteren Schritten spalteten sich dann auch die Emmentaler und Entlebucher sowie die St. Galler und Sihltaler Populationen in separate Cluster auf (Abbildung 2).

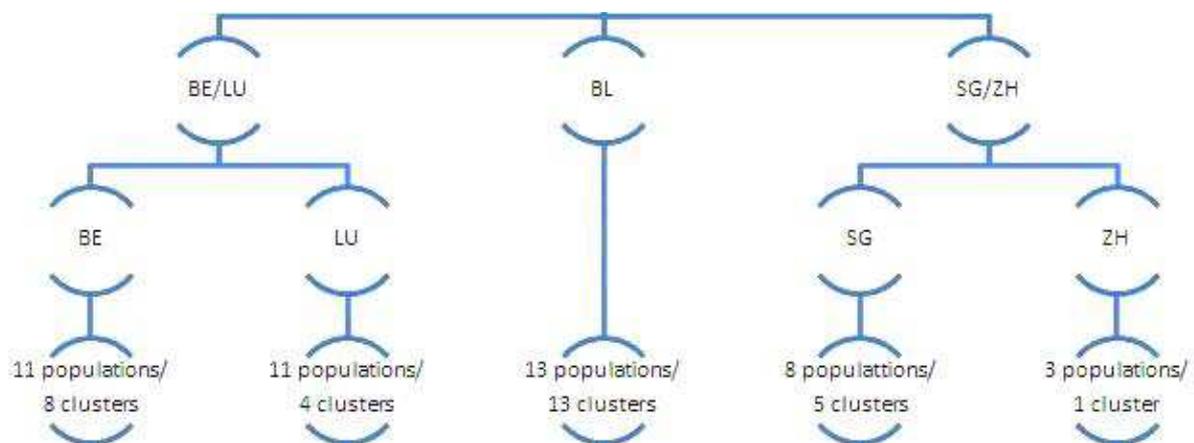


Abbildung 2: Cluster-Analyse aller beprobten Populationen. Die Populationen werden eindeutig ihrer Herkunftsregion zugeordnet; die Populationen innerhalb einer Region werden in unterschiedliche Anzahl Cluster unterteilt.

F_{ST} ist ein Wert, der die Differenzierung von Beständen wiedergibt. F_{ST} -Werte können zwischen 0 und 1 liegen, und je höher sie sind, umso stärker unterscheiden sich zwei Bestände in ihrer genetischen Zusammensetzung (Tabelle 2). Ein Test der F_{ST} -Werte innerhalb der Regionen ergab, dass alle signifikant sind, d.h. dass alle Bestände deutlich voneinander differenziert sind. Dies stimmt mit den Resultaten der Migrationsraten überein. Anhand der genetischen Daten wurden Migrationsraten berechnet, die im Mittelwert sogar unter 1% Individuen mit „Migrationshintergrund“ pro Teich liegen. Höhere Migrationsraten traten nur entlang von Flusspopulationen auf. Das bedeutet, dass kaum Genfluss von einem Bestand in den anderen stattfindet. Die Bestände sind also sogar innerhalb einer Region sehr stark voneinander differenziert und isoliert. Das ist vor allem für die Bestände in Basel und im Emmental ein überraschendes Resultat, da hier die Fortpflanzungsgewässer relativ nah beieinander liegen und ein Austausch von Individuen wahrscheinlicher gewesen wäre als in St.Gallen oder im Entlebuch, wo die Distanzen grösser sind.

Tabelle 2: F_{ST} -Werte (Zahlenwerte) und deren Signifikanz (Sterne) zwischen den Vorkommen entlang der Sihl. Sterne in der Signifikanztabelle bedeuten, dass die Differenzierung zwischen zwei Vorkommen signifikant ist.

	ZH-Rüti	ZH-Sihl	ZH-Tüfi
ZH-Rüti	0	*	*
ZH-Sihl	0.0847	0	*
ZH-Tüfi	0.1393	0.0929	0

1.3 Schlussfolgerung

Die genetischen Daten belegen, dass die Bestände der Geburtshelferkröte in der Schweiz stark voneinander differenziert und isoliert sind und kaum Austausch zwischen Beständen besteht, auch nicht innerhalb von Regionen. Trotzdem scheinen sie nicht an Inzucht oder genetischer Verarmung zu leiden, so dass Inzucht bzw. die Anhäufung schädlicher Mutationen als Ursache für die Rückgänge unwahrscheinlich sind. Viel wahrscheinlicher ist, dass die Bestände aufgrund starker Schwankungen im Fortpflanzungserfolg oder aufgrund von Zufallsereignissen wie dem Abrutschen eines Hanges, in dem der grösste Teil der Adulttiere sass, stark dezimiert werden und erlöschen. Da sie aber so stark voneinander isoliert sind, findet danach keine Neubesiedlung aus benachbarten Beständen mehr statt, und geeignete Lebensräume bleiben unbesetzt.

Eine stärkere Vernetzung der Bestände könnte hier Abhilfe schaffen, jedoch müsste diese sehr kleinräumig erfolgen (die Teiche sollten nicht weiter als 1km auseinander liegen). Dies würde das Risiko minimieren, dass kleine Bestände durch Zufallsschwankungen in den Bestandeszahlen aussterben, bzw. eine Neubesiedlung des Lebensraumes wäre wahrscheinlicher.

2. Chytridiomykose

Die Chytridiomykose ist eine Pilzerkrankung der Amphibien, die durch den mikroskopisch kleinen Töpfchenpilz *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) hervorgerufen wird. Der Erreger befällt nur verhornte Hautteile; bei den Kaulquappen sind das die Mundfelder, bei metamorphosierten Tieren die ganze Körperhaut. Die lokal begrenzte Infektion des Mundfeldes ist für die Kaulquappen kein Problem; während der Metamorphose kann sich die Infektion jedoch auf den ganzen Körper ausbreiten. Bei anfälligen Arten wie der Geburtshelferkröte kann dies zum Tod führen. Übertragen wird die Krankheit im Wasser durch schwimmfähige Pilzsporen. Neue, unpublizierte Resultate belegen, dass die Krankheit schon seit mindestens 1986 in der Schweiz vorkommt, und dass die Schweiz mit 52.8% befallener Gewässer das Land in Europa mit der höchsten Verbreitung ist (Abbildung 3).

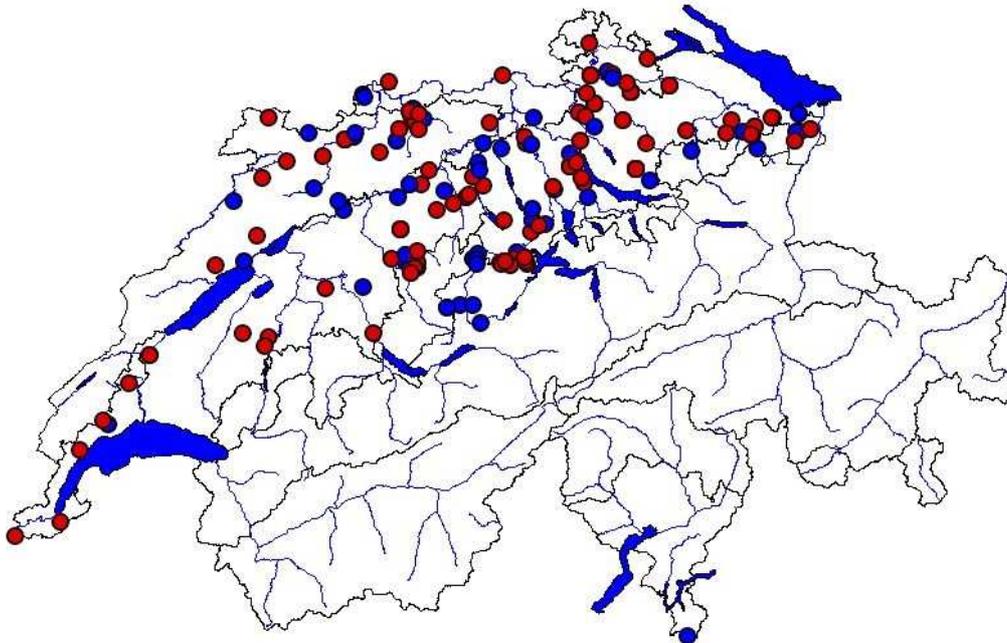


Abbildung 3: Verbreitung von *Bd* in der Schweiz. Blaue Symbole markieren Gewässer, in denen der Erreger nicht nachgewiesen werden konnte; rote Symbole markieren Gewässer, die vom Erreger befallen sind.

Die Chytridiomykose wurde in allen drei Populationen an der Sihl nachgewiesen. Ebenfalls nachgewiesen wurde der Erreger beim Versuch, ihn zu isolieren, in Gamlikon (nicht Teil dieser Arbeit). Aufgrund einer genetischen Analyse des isolierten Erregers ist bekannt, dass es sich beim Erreger in Gamlikon um einen Schweizer Stamm handelt, der bisher nirgends sonst auf der Welt isoliert wurde. Ob es sich beim Erreger im Sihltal ebenfalls um den Schweizer Stamm oder um einen globalen Stamm handelt, ist nicht bekannt.

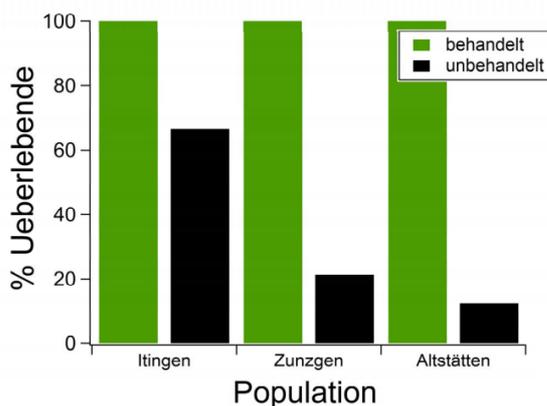
Im Sihltal wiesen die Populationen Prävalenzen zwischen 4 und 38% auf (Tabelle 3). Da infizierte Kaulquappen nicht an Chytridiomykose erkranken und somit über Monate überleben können, sind Prävalenzen von 100% nicht auszuschliessen. Die Infektionsschwere beschreibt die Anzahl der isolierten Pilzsporen auf einem Abstrich. Im Rütiboden ist das Individuum, das positiv getestet wurde, eher stark infiziert. Die Infektionsschwere im Sihlboden und Tüfiweiher sind dagegen eher im unteren Bereich der für *Alytes*-Kaulquappen beobachteten Infektionsschweren (Tabelle 3).

Tabelle 3: Resultate der Chytridtests von *Alytes*-Kaulquappen im Sihltal. Die Prävalenz ist der Prozentsatz der infizierten Individuen. Die Infektionsschwere beschreibt die durchschnittliche Pilzbelastung (in Anzahl Pilzsporen) der infizierten Individuen.

Population	Anzahl Proben	Anzahl positiv	Prävalenz (%)	Infektionsschwere (± 1 SE)
Rütiboden	26	1	3.8	232.73
Sihlboden	26	10	38.5	40.18 \pm 12.71
Tüfiweiher	24	2	8.3	0.38 \pm 0.26

2.1 Sterblichkeit aufgrund von Chytridiomykose

In zwei Populationen aus dem Baselbiet und einer Population aus dem St. Gallischen quantifizierte ich die Mortalität von mit *Bd* infizierten Geburtshelferkröten nach der Metamorphose. Dazu fing in natürlicherweise infizierte Kaulquappen von drei verschiedenen Populationen und zog sie im Labor auf. Die Kaulquappen wurden in drei Behandlungsgruppen eingeteilt: 1) Die *Bd*-negative Kontrolle befreite ich durch die Behandlung mit dem fungiziden Medikament Itraconazol von der Infektion. 2) Die Stresskontroll-Gruppe behandelte ich nach dem gleichen Protokoll wie die *Bd*-negative Kontrolle, verzichtete aber auf das Itraconazol während der Behandlung. Diese Gruppe erfuhr also denselben Behandlungsstress wie die Itraconazol-behandelte Gruppe, blieb aber infiziert. 3) Die letzte Gruppe wurde nicht behandelt und nur die regulären Wasserwechsel und Fütterungen, die bei allen Versuchsgruppen stattfanden, wurden vorgenommen. Auch diese Gruppe blieb demnach infiziert. Die Resultate zeigten, dass die Mortalität durch *Bd*-Infektion hoch war (44.4% aller infizierten Tiere starben), aber dass es grosse Unterschiede zwischen den verschiedenen Populationen gab (die Sterblichkeit schwankte zwischen 27% und 90%; Abbildung 4). Die Unterschiede, die wir beobachteten, könnten auf unterschiedliche symbiontische Hautbakterien, unterschiedliche Erregerstämme oder Umwelteffekte vor dem Fang im natürlichen Lebensraum zurückzuführen sein. Umwelteffekte lassen jedoch über kurze Zeit nach und Hautbakterien und Erregerstämme wurden aufgrund unseres Laborprotokolls zwischen den Populationen vermutlich vermischt. Daher gehen wir davon aus, dass genetische Unterschiede zwischen den Populationen die Unterschiede in der Mortalität bewirkt haben.



welteffekte vor dem Fang im natürlichen Lebensraum zurückzuführen sein. Umwelteffekte lassen jedoch über kurze Zeit nach und Hautbakterien und Erregerstämme wurden aufgrund unseres Laborprotokolls zwischen den Populationen vermutlich vermischt. Daher gehen wir davon aus, dass genetische Unterschiede zwischen den Populationen die Unterschiede in der Mortalität bewirkt haben.

Abbildung 4: Sterblichkeit der verschiedenen Populationen aufgrund von Chytridiomykose im Laborversuch.

2.2 Auswirkungen des Chytridpilzes auf die Überlebenswahrscheinlichkeit einer Population

Die hohe Sterblichkeit, die im Labor beobachtet wurde, legt nahe, dass die Anwesenheit des Erregers die Aussterbewahrscheinlichkeit einer Geburtshelferkrötenpopulation erhöht. Um diese Frage zu beantworten, versuchte ich einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *Bd* in einer Population und dem lokalen Aussterben der Geburtshelferkröte herzustellen. Dazu benutzten wir Daten aus der Erhebung, die im Rahmen der Aktualisierung der Roten Liste in 2003 und 2004 durchgeführt wurde. Anhand dieser Daten wählten wir 79 Teiche, verteilt über das gesamte Verbreitungsgebiet der Geburtshelferkröte in der Schweiz, von denen wir wussten, dass sie um 1985 herum Geburtshelferkrötenpopulationen beherbergt hatten. Wir besuchten diese Teiche in 2008 und testeten sie auf das Vorkommen von *Bd*, indem wir Hautabstriche von Amphibien sammelten, die wir an den Teichen fingen. Gleichzeitig führten wir eine erneute Erhebung über die Anwesenheit von Geburtshelferkröten an den Teichen durch. Dabei zeigte sich, dass das Vorkommen bzw. die lokale Aussterbewahrscheinlichkeit der Geburtshelferkröte unabhängig vom Vorkommen von *Bd* ist (Abbildung 5).

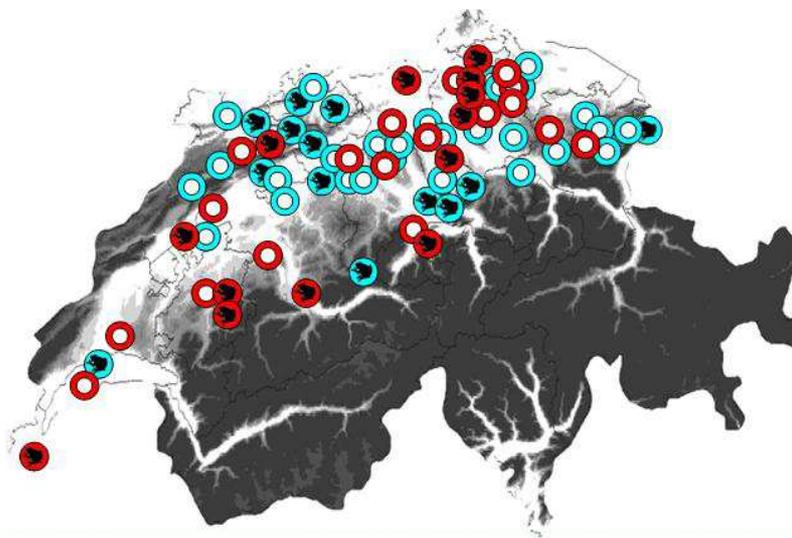


Abbildung 5: Vorkommen der Geburtshelferkröte und der Chytridiomykose in der Schweiz. Blaue Kreise: kein Nachweis der Chytridiomykose; rote Kreise: positiver Nachweis der Chytridiomykose; schwarze Symbole: Geburtshelferkröten konnten 2008 nachgewiesen werden; weisse Kreise: kein Geburtshelferkrötennachweis in 2008.

2.3 Auswirkungen des Chytridpilzes auf das Wachstum der Population

Oftmals führen Krankheitserreger nicht zum Aussterben eines Wirtes, sondern bewirken nur ein verringertes Populationswachstum bzw. einen Bestandesrückgang, v.a. bei dichteabhängiger Übertragung. Adrian Borgula stellte grosszügigerweise jährliche Ruferzählungen von 26 Teichen im Kanton Luzern von 2002 bis 2009 zur Verfügung. Für jede dieser Populationen modellierte ich den Populations-trend in Abhängigkeit des Vorkommens von *Bd* und der Häufigkeit nachgewiesener Fortpflanzung. Wiederum fanden wir keinen negativen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *Bd* und den Wachstumsraten der Geburtshelferkrötenpopulationen (Abbildung 6). Das Fehlen eines Zusammenhangs zwischen dem Vorkommen von *Bd* und lokalen Bestandesabnahmen (Kapitel 4) oder lokalem Aussterben (Kapitel 3) der Geburtshelferkröte kann durch mehrere Mechanismen zustande kommen, die einander nicht zwingend ausschliessen: 1) Möglicherweise begünstigen die herrschenden Umweltbedingungen keine Krankheitsausbrüche; Krankheitsausbrüche in Spanien stehen nämlich in engem Zusammenhang mit Kaltlufteinbrüchen während der Phase der Metamorphose. 2) Andererseits kann *Bd* sowohl als enzootische (die Sterblichkeit ist kompensatorisch, es sterben also nicht mehr Individuen durch die Krankheit, als sonst aufgrund anderer Ursachen (z.B. Konkurrenz, Prädati-

on) sterben würden) als auch als epizootische (aufgrund der Krankheit sterben zusätzliche Individuen) Infektion vorliegen. Während epizootische Krankheitsdynamik meist additive, d.h. zusätzliche, Mortalität bewirkt, kann die Mortalität bei enzootischer Infektion kompensiert werden. *Bd* in der Schweiz könnte mehrheitlich enzootische Infektionen bewirken. 3) *Bd* verringert möglicherweise nicht die Überlebenswahrscheinlichkeit, sondern wirkt sich auf andere Fitnessparameter von Individuen aus. Ist das Leistungsvermögen in einem Fitnessbereich reduziert, kann möglicherweise eine gesteigerte Effizienz in anderen Fitnessbereichen für die Verluste kompensieren. 4) Möglich ist auch, dass *Bd* zu Beginn nach dem ersten Auftreten eine Bestandesabnahme bewirkt hat und dass sich die Populationen jetzt auf einem geringeren Niveau stabilisiert haben.

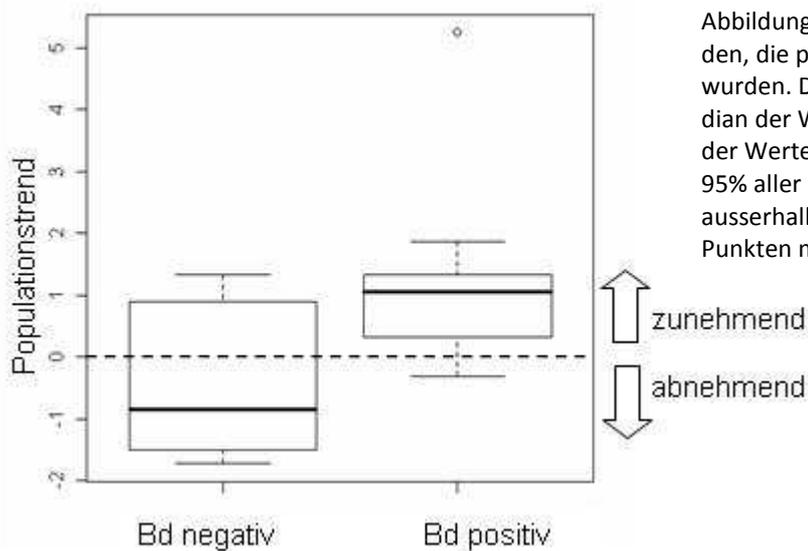


Abbildung 6: Populationstrends von Beständen, die positiv oder negativ auf *Bd* getestet wurden. Die schwarze Linie markiert den Median der Werte, die Boxen umschliessen 50% der Werte, und die Fehlerbalken umfassen 95% aller beobachteten Werte. Werte, die ausserhalb dieses Bereichs liegen, sind mit Punkten markiert.

2.4 Wodurch werden Prävalenz und Infektionsschwere bestimmt?

Viele Studien belegen, dass es nur dann zu Krankheitsausbrüchen kommt, wenn die Prävalenz und Infektionsschwere einen bestimmten Grenzwert übersteigen, also sehr viele Krankheitserreger in einer Wirtspopulation vorkommen. Da die Prävalenz und Infektionsschwere von *Bd* auch in den von mir getesteten Populationen stark schwankten, versuchte ich diese Unterschiede durch die Umwelteigenschaften der Gewässer zu erklären. Dazu wählte ich 19 Teiche in den drei Gebieten BE, BL und SG. An diesen 19 Teichen beprobte ich im Frühling und Sommer Kaulquappen der Geburtshelferkröte auf *Bd* und mass von April bis Oktober Umweltdaten. Eine höhere Wassertemperatur bewirkte eher tiefere Infektionsraten, während eine hohe Dichte an Wirten sich eher positiv auf die Prävalenz auswirkte. Beide Erkenntnisse können helfen, die Wahrscheinlichkeit von Krankheitsausbrüchen zu verringern: Warme Teiche begünstigen die Amphibien, während kalte Weiher eher dem Pilz zugute kommen. Ausserdem sollte eine genügend grosse Gewässerfläche zur Verfügung stehen, so dass die Amphibiendichte gering ist und die Übertragungsrate des Erregers tief bleibt.

2.5 Schlussfolgerungen

Während meiner Dissertation gelang es mir zu zeigen, dass *Bd* auf Individuenebene ein ernst zu nehmender Krankheitserreger sein kann und hohe Mortalität bewirkt. Auf Populationsebene jedoch beobachten wir keine negativen Auswirkungen von *Bd* auf die Populationen. Entweder können die Verluste kompensiert werden oder die Mortalität ist gering, da die Umweltbedingungen keine Krankheitsausbrüche begünstigen. Da die Abundanz des Erregers von den Umweltbedingungen abhängt, kann die Manipulation des Lebensraums der Geburtshelferkröte eine sinnvolle Massnahme zur Verringerung der Auswirkungen von *Bd* in Zukunft darstellen.