

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Artenschutz einer gefährdeten Amphibienart:  
Krankheitsbefall und genetische  
Populationsstrukturierung bei Gelbbauchunken  
(*Bombina variegata*)



Endbericht

DBU-AZ: 33169\_01

Verfasst von apl. Prof. Dr. Heike Pröhl

Dr. Johara Bourke

MSc. Pia Oswald

Dr. Ariel Rodríguez

Dr. Norman Wagner

Dr. Holger Buschmann



 Universität Trier



Hannover Februar 2018

Ein Projekt der Tierärztlichen Hochschule Hannover

In Kooperation mit:

NABU Niedersachsen

Fachgebiet Biogeographie, Universität Trier

Kontakt:

Prof. Dr. Heike Pröhl

Institut für Zoologie

TiHo Hannover

Bünteweg 17

30559 Hannover

Tel: 0511 9538431

Email: [heike.proehl@tiho-hannover.de](mailto:heike.proehl@tiho-hannover.de)

## Inhalt

Zusammenfassung	02
Einführung/Motivation	03
Methodik	05
Ergebnisse	07
Diskussion	13
Veröffentlichungen	17
Fazit/Ausblick	17
Danksagung	17
Literatur	18

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Lage des Studiengebiets, der Subpopulationen und der Metapopulationen von <i>Bombina variegata</i> im Nördlichen Weserbergland.	09
Abb. 2 Variabilität in der Wahrscheinlichkeit der Anwesenheit und <i>Bd</i> und der <i>Bd</i> Intensität in sieben Subpopulationen in Abhängigkeit mehrerer Einflussgrößen.	11
Abb. 3 Modell Selektion und durchschnittliche Bedeutung jeder Einflussgröße für die Anwesenheit der Infektion und der <i>Bd</i> Infektionsrate.	13

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Indices zur genetischen Diversität für Subpopulationen von <i>Bombina variegata</i> im Nördlichen Weserbergland.	08
Tab. 2 Prävalenz und Infektionsintensität in 16 Subpopulationen der Gelbbauchunke im Nördlichen Weserbergland.	10
Tab. 3 Modellselektion für den Zusammenhang zwischen vier Einflussgrößen (Standort, Beprobungszeitraum, residueller Körperindex, und standardisierte multilokus Heterozygotie) und <i>Bd</i> Präsenz (Infektionsstatus) und <i>Bd</i> Infektionsintensität.	12

## Zusammenfassung

Der parasitäre Pilz *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) infiziert weltweit sehr viele Amphibienarten und es wird vermutet, dass er für Populationsrückgänge und Aussterbeereignisse verantwortlich ist. In früheren Studien wurde er auch auf Amphibien, die in Deutschland heimisch sind, gefunden. Das Ziel dieser Studie war die Infektion mit *Bd* bei der stark bedrohten Gelbbauchunke *Bombina variegata* in ihrem nördlichsten Verbreitungsgebiet zu analysieren. Die Prävalenz und Stärke der Infektion sollten mit verschiedenen morphologischen, genetischen und ökologischen Variablen in Verbindung gebracht werden. Dazu wurden insgesamt 17 Standorte in einem Vorkommen im Nördlichen Weserbergland zwischen Mai und Oktober 2016 aufgesucht und Unken beprobt. Die sieben größten Sub-Populationen wurden drei Mal, am Anfang, in der Mitte und am Ende der Fortpflanzungszeit beprobt. Die populationsgenetischen Analysen erfolgten mit neun artspezifischen molekularen Mikrosatelliten-Markern. Der molekulare Nachweis von *Bd* und die Bestimmung der Intensität der Infektion erfolgte mit *Bd* spezifischen Primern und quantitativer real-time PCR. Die Bestimmung der Körperkondition der Unken beruhte auf Größe und Gewicht der Unken.

Biostatische Analysen ergaben, dass die Gelbbauchunken im nördlichen Weserbergland drei genetischen Gruppen bzw. Metapopulationen zugeordnet werden können. Eine Metapopulation (12 Standorte) erstreckt sich entlang des Wesergebirges und der vorgelagerten Bückeberge, eine zweite (3 Standorte) liegt im Südwesten davon und eine dritte (2 Standorte) befindet sich im Südosten im Süntel. Die zweite Metapopulation war trotz räumlicher Nähe von der ersten genetisch isoliert und wies eine geringe genetische Diversität und einen hohen Inzuchtskoeffizienten auf. In diesem Gebiet wurde auch die zweithöchste Prävalenz und die höchste Infektionsintensität gemessen. Insgesamt waren Prävalenzen und Intensitäten der Infektion in dieser Studie wesentlich höher als in früheren Studien zu *Bd* in Deutschland. Weiterhin variierte die Stärke der *Bd* Infektion zwischen den Standorten und Beprobungszeiträumen. Trotz hoher Prävalenz und Infektionsintensität konnte bei keiner Unke ein Ausbruch der Krankheit Chytridiomykose beobachtet werden.

Auf der individuellen Ebene war die Präsenz der *Bd*-Infektion bestimmt durch den Beprobungszeitraum, Standort und der genetischen Diversität (gemessen als standardisierte multilocus Heterozygotität sMLH), aber weniger durch die Körperkondition der Individuen. Die individuelle genetische Diversität gemessen als sMLH korrelierte negativ mit der *Bd*-Präsenz, was daraufhin deutet, dass eine „gute genetische Verfassung“ helfen könnte, dem Pilzbefall entgegenzuwirken. Die Wahrscheinlichkeit einer *Bd* Infektion nahm über die Fortpflanzungsperiode zu, was auf neue Infektionen bzw. Übertragungen des Pilzes während Interaktionen zwischen den Unken während der Reproduktion in den Gewässern spricht. Die individuelle *Bd*-Intensität dagegen variierte signifikant nur zwischen den Standorten. Die große Variabilität in der Prävalenz und Intensität der Infektion lässt auch auf stochastische Einflüsse in der Infektionsausbreitung schließen. Daher empfehlen wir ein regelmäßiges *Bd*-Monitoring insbesondere vor Artenschutzmaßnahmen wie Umsiedlungen bzw. Wiederansiedlungen. Da geographische Isolation und geringe genetische Diversität die Infektion zu fördern scheinen, sollten weitere Artenschutzmaßnahmen darauf ausgerichtet sein, Vernetzung, Genfluss und genetische Diversität in und zwischen den Metapopulationen zu fördern.

## Einführung/Motivation

Amphibien sind von Populationsrückgängen betroffen oder sogar vom Aussterben bedroht, zählen daher zu den am stärksten bedrohten Tiergruppen (Stuart et al. 2004) und stehen im Fokus vieler Artenschutzprojekte (ANGELONE & HOLDEREGGER 2009; LE LAY et al. 2015). In den letzten Jahrzehnten wurde die Infektionskrankheit *Chytridiomykose* als eine wichtige Ursache des weltweiten Amphibiensterbens identifiziert (STUART et al. 2004; SKERRATT et al. 2007). Ausgelöst wird die Krankheit durch den Chytridpilz *Batrachochytrium dendrobatidis* (kurz *Bd*, BERGER et al. 1998), der die keratinisierten Hautpartien der Amphibien infiziert und überdauerungsfähige Zoosporen zur Ausbreitung und Vermehrung bildet. Bisher tritt der Pilz bei mindestens 520 Amphibienarten auf (Global *Bd* mapping Project 2017). Der Pilz stört den Elektrolyttransport sowie das osmotische Gleichgewicht über die Haut und kann bei Ausbruch der Chytridiomykose zum Tod der Amphibien führen (VOYLES et al. 2007, 2009). Der Pilz ist temperaturabhängig, wobei das Wachstumsoptimum zwischen 17-25°C liegt (PIOTROWSKI et al. 2004) bzw. ist anfällig gegenüber Austrocknung und Temperaturen über 28°C (WOODHAMS et al. 2003; Piotrowski). Seine Verbreitung erstreckt sich hauptsächlich auf Regionen und Zeiträume, in denen die optimale Temperatur für seine Vermehrung herrscht (Berger et al. 2004; Whitfield et al. 2012). Der Verlauf der Infektion ist dabei von vielen Faktoren wie etwa von Temperatur- und Wetterbedingungen (WOODHAMS et al. 2003; BERGER et al. 2004), dem Wirt selbst (GERVASI et al. 2013) bzw. seiner Kondition (siehe unten) oder auch von genetischen Variablen (SPIELMAN et al. 2004) abhängig.

Amphibien treten häufig in Metapopulationen auf, also in einzelnen miteinander vernetzten lokalen Vorkommen, zwischen denen Genfluss und Migration besteht und in denen es zu Extinktionsereignissen aber auch zur Besiedlung neuer Habitats kommt (LEVINS 1969, 1970). Diese Populationsdynamik beeinflusst die genetische Diversität innerhalb und zwischen Vorkommen. Die genetische Diversität wiederum spielt eine wichtige Rolle bei Inzuchteffekten (FRANKHAM & RALLS 1998; FRANKHAM 2005), sowie bei Krankheitsresistenz (SPIELMAN et al. 2004) und Anpassungsfähigkeit (BIJLSMA & LOESCHKE 2012) als Indikatoren der allgemeinen Fitness (REED & FRANKHAM 2003; ALLENTOFT & O'BRIEN 2010; LUQUET et al. 2011). Der genaue Zusammenhang zwischen genetischer Diversität an neutralen Markern, die zur Abschätzung der Populationsstruktur und Genfluss genutzt werden, und der Infektion mit dem Chytridpilz innerhalb von Amphibien-Populationen ist bisher allerdings unklar. Vorherige Studien mit mehreren Amphibienarten präsentierten widersprüchliche Ergebnisse, denen zufolge positive (Addis et al. 2015), inverse (LUQUET et al. 2012) oder keinerlei Korrelationen zwischen der genetischen Diversität und der Chytrid-Infektion bestanden (WAGNER et al. 2017). Auch die Körperkondition kann einen Einfluss auf die Stärke von Infektionen bzw. den Krankheitsverlauf haben. So wiesen beispielsweise Individuen einiger Krötenarten (*Bufo boreas*, *Bufo bufo*) mit höheren Körpermasse oder -größe eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit bei einer Infektion mit *Bd* auf (CAREY et al. 2006; GARNER et al. 2009).

Viele der heute bestehenden Amphibienpopulationen sind oft stark isoliert und es findet kein genetischer Austausch statt, der notwendig wäre, die genetische Diversität und damit die Adaptationsfähigkeit an eine sich ändernde Umwelt aufrecht zu erhalten (CUSHMAN et al. 2006). Eine Art, die in Deutschland besonders gefährdet ist, ist die Gelbbauchunke *Bombina variegata*. (NÖLLERT & GÜNTHER 1996, WEIHMANN et al. 2009). Viele Populationen der Gelbbauchunke sind sehr klein und isoliert. Straßen und Ortschaften bilden Barrieren zwischen den Gelbbauchunkenhabitats und es fehlen Trittsteinbiotop, welche die Unken zur Migration nutzen könnten (NADJAFZAHDEH & BUSCHMANN 2014). Aufgrund der starken Isolierung ihrer Habitats ist die Gelbbauchunke heute stark

gefährdet. Sie befindet sich in einem schlechten Erhaltungszustand (BfN 2008a) und wird in der Fauna-Flora-Habitat-Richtlinie (FFH) in den Anhängen II und IV aufgeführt (BfN 2008b). Laut der Roten Liste Deutschlands ist sie „stark gefährdet“, und in Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen und Thüringen „vom Aussterben bedroht“ (PODLOUCKY & FISCHER 1994, SCHLÜPMANN & GEIGER 1999, NÖLLERT et al. 2001, KÜHNEL et al. 2009).

Um die Situation der Gelbbauchunke in Deutschland zu fördern wurde ein Artenschutzprojekt vom NABU Niedersachsen ins Leben gerufen. Es umfasst unterschiedliche Projektpartner (darunter NABU und Bio-Stationen, als auch das Institut für Zoologie der TiHo Hannover) und wird durch das „Bundesprogramm Biologische Vielfalt“ gefördert (Förderzeitraum 12.2011 bis 02.2018). Mit der Gelbbauchunke als Zielart sollen ihre Habitate, die auch vielen anderen bedrohten Arten als Heimat dienen, langfristig geschützt werden. Um das zu erreichen, werden in geeigneten Habitaten Pflegemaßnahmen ergriffen und Fortpflanzungsgewässer geschaffen, isolierte Populationen durch Schaffung von Trittsteinbiotopen miteinander verbunden und vereinzelt aktive Wiederansiedlungen gemäß IUCN-Kriterien (IUCN 1998) stattfinden (NADJAFZAHDEH & BUSCHMANN 2014). Für diese Maßnahmen ist es wichtig, die genetische Populationsstruktur zu kennen, um größere Metapopulationen zu schaffen, in denen Tiere zwischen den Subpopulationen migrieren und den Genfluss fördern. Basierend auf dem Metapopulationskonzept wurden bereits Erhaltungsmaßnahmen für viele verschiedene Amphibienarten wie etwa aus der Gruppe der Australischen Laubfrösche (*Litoria raniformis*, HEARD et al. 2012) durchgeführt.

Hinsichtlich der genetischen Gruppierung auf größerer geographischer Ebene wurden im Rahmen des NABU Projektes für die Gelbbauchunken-Vorkommen in Deutschland zwei genetische Cluster nachgewiesen, die eine geographische Trennlinie im Nördlichen Weserbergland entlang einer historischen Handelsroute aufweisen (AUFFARTH, unveröffentlichtes Material; Nadjafzadeh et al., im Druck). Auch die Gelbbauchunken-Vorkommen im Nördlichen Weserbergland wurden hinsichtlich ihrer Metapopulationsstruktur untersucht (BUSCHMANN et al. 2013), wobei eine Gliederung in fünf geographisch lokale Metapopulationen angenommen wurde (HÖPPNER et al. 2017), die allerdings noch nicht mit lokalen genetischen Untersuchungen untermauert wurden.

Ebenfalls wurden für die Gelbbauchunke in früheren Untersuchungen Infektionen mit dem Chytridpilz gefunden (OHST et al. 2013; SPITZEN-VAN DER SLUIJS et al. 2014, 2017; WAGNER et al. 2017). Ob es temporäre Unterschiede in Bezug auf die Prävalenz und Stärke der Infektion gibt, oder ob genetische Variablen innerhalb der Meta- oder Subpopulationen bzw. die körperliche Verfassung der Unken einen Einfluss auf den Chytridbefall bzw. die Intensität der Infektion haben, ist unbekannt. Im Rahmen dieser Studie sollte die Metapopulationsstruktur und der Befall mit dem Chytridpilz im nördlichen Weserbergland - dem nördlichsten Verbreitungsgebiet der Gelbbauchunke - untersucht werden. Zusammenhänge zwischen Genetik und Chytridbefall sollten beleuchtet und folgende Hypothesen überprüft werden:

1. Das Gelbbauchunken-Vorkommen im Nördlichen Weserbergland ist genetisch strukturiert, d.h. es liegen mehrere genetische Gruppen vor, die Metapopulationen entsprechen.
2. Die Prävalenz und die Intensität der Chytridinfektion unterscheiden sich zwischen den Meta- bzw. Subpopulationen und zwischen mehreren Beprobungszeiträumen während der Fortpflanzungszeit.
3. Die Prävalenz und die Intensität der Chytridinfektion sind abhängig von der individuellen genetischen Diversität.

#### 4. Die Intensität der Chytridinfektion korreliert mit der individuellen Körperkondition.

Für die hier beschriebene Untersuchung wurden Speichelproben für die genetische Untersuchung und Hautabstriche für die *Bd*-Analyse von Gelbbauchunken aus 17 verschiedenen Gebieten im Nördlichen Weserbergland genommen und anschließend im Labor untersucht und die erzeugten Daten statistisch analysiert.

#### **Methodik/Vorgehensweise/Projektablauf**

Die Standorte mit Gelbbauchunken sind in den (Land-)Kreisen Schaumburg, Minden-Lübbecke und Hameln-Pyrmont im nördlichen Weserbergland lokalisiert (Abb. 1). Dort leben Subpopulationen unterschiedlicher Größe und zwischen einigen der Subpopulationen besteht aufgrund der räumlichen Nähe die Möglichkeit der Zu- und Abwanderung und damit des genetischen Austausches (Buschmann et al. 2013).

Insgesamt wurden 577 Gelbbauchunken (*Bombina variegata*) in 17 Gebieten zwischen Mai und September 2016 im nördlichen Weserbergland beprobt (Abb. 1). Innerhalb dieses Vorkommens wurden von 2013 bis 2016 vom NABU Unken aus Liekwegen und Edler/Brinkmeyer in vorher vier unkenlosen Standorten (Bernsen, Rohden, Segelhorst, Wülper Egge; HÖPNER *pers.com.*) wiederangesiedelt. Für jede Unke wurde die Körperlänge mit einer Schieblehre (Mitutoyo) und das Gewicht mit einer digitalen Waage (JOSHSMR1) bestimmt. Für die populationsgenetische Analyse wurden Mundschleimhautabstriche (nach PIDANCIER et al. 2003) und Hautabstriche (nach HYATT et al. 2007) für die Chytridpilz-Analysen genommen. Alle Proben wurden zunächst luftgetrocknet, dann in Eppendorf Tubes verstaut und im Labor bei -20°C für weitere Analysen aufbewahrt. Nach dem Fangen und Beprobieren wurden alle Unken an ihrem Fangort wieder frei gelassen. Körperlänge und Gewicht wurden genutzt, um die Kondition (residual body index RBI) durch Berechnen der Residuen der Regression von  $\log(\text{Gewicht})$  auf  $\log(\text{Körperlänge})$  nach JAKOB et al. (1996), DENOËL et al. (2002) und BÄNCILĂ et al. (2010) mit dem Programm R (R Developmental Core Team 2012) abzuschätzen. Es wurden keine Hautabstriche am Standort Waldwiese (WW) genommen. Um die *Bd*-Variabilität während der Fortpflanzungszeit zu erfassen wurden in sieben Standorten (BE, ED, BM, LI, MB, PA, PB, Abb. 1) während drei Zeiträumen Beprobungen durchgeführt. Einmal zu Beginn (I: 09.05.2016-16.06.2016), in der Mitte (II: 12.07.2016-05.08.2016) und zum Ende (III: 09.08.2016-22.09.2016) der Fortpflanzungszeit.

#### **Populationsstruktur und genetische Diversität**

Insgesamt wurden 300 DNA Proben aus Mundschleimhautabstrichen mit dem Invisorb® Spin Swab Kit (Stratec Molecular GmbH) nach dem Herstellerprotokoll extrahiert. Die extrahierte DNA wurde bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Neun artspezifische Mikrosatelliten Loci wurden durch PCR amplifiziert (STUCKAS & TIEDEMANN, 2006; HAUSWALDT et al. 2007). Die Genotypisierung der PCR –Produkte fand auf dem ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) statt und die Fragmentlängen wurden mit dem Programm GENEMAPPER Version 5 (Life Technologies) bestimmt. Die Qualität der Daten wurde durch mehrere Analysen überprüft: auf eine Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht wurde mit der Software ARLEQUIN v. 3.5.2.2 (EXCOFFIER et al. 2005) mit 1000000 Iterationen einer Markov Kette geprüft. Eine sequentielle Bonferroni Korrektur (RICE 1989)

wurde zur Festlegung der Signifikanz der Abweichung angewandt. Ein Test auf Kopplungsungleichgewicht für alle Paare von Loci und die Berechnung des durchschnittlichen Allelreichtums als auch die Anzahl der Allele (unabhängig von der Anzahl der Proben innerhalb einer Subpopulation) wurden mit dem Programm FSTAT v. 2.9.3.2 (GOUDET 1995) durchgeführt.

Die individuelle genetische Kondition wurde als standardisierte multilocus Heterozygotie (sMLH) berechnet. Diese ist definiert als der Anteil der heterozygoten Loci dividiert durch die durchschnittliche Heterozygotie der untersuchten Loci (COLTMANN et al. 1999). Diese Berechnungen wurden mit dem Paket inbreedR (STOFFEL et al. 2016) in R durchgeführt. Auf der Populationsebene wurde die genetische Diversität als Heterozygotie, Gendiversität und Inzucht-Koeffizient gemessen. Beobachtete und erwartete Heterozygotie ( $H_o$  and  $H_e$ ) wurden mit dem Programm ARLEQUIN v. 3.5.2.2 (EXCOFFIER et al. 2005), die Gendiversität mit FSTAT v. 2.9.3.2 (GOUDET 1995) und die Anzahl privater Allele mit GenAEX (PEAKALL & SMOUSE 2012) berechnet. Die globale genetische Distanz zwischen allen Subpopulationen (global FST), der Inzuchtskoeffizient (FIS), paarweise genetische Distanzen (FST) wurden im Package hierfstat in R (GOUDET 2004) mit 10000 bootstraps (FIS und FST) berechnet. Geographische Distanzen zwischen den Standorten wurden mit Geodetic Geometry im Geographic Distance Matrix Generator (ERSTS, accessed 2017) bestimmt.

Um herauszufinden, ob paarweise genetische und geographische Distanzen miteinander korrelieren wurde ein Mantel-Test für abhängige Variablen in R gerechnet. Die entsprechenden Abbildungen wurden mit den Paketen ggpubr (KASSAMBRA 2017) und ggplot2 (WICKHAM 2009) in R produziert. Um die Anzahl der genetischen Gruppen, also der Metapopulationen, zu bestimmen, wurde eine bayesianische Analyse mit dem Programm STRUCTURE v. 2.3.4 (PRITCHARD et al. 2000; FALUSH et al. 2003) durchgeführt, welches das wahrscheinlichste Modell für die Populationsstruktur identifiziert. Dabei wurden Modelle für  $K = 1$  bis 20 für das *admixture Model* mit *Prior Population Information* über die Standorte eingesetzt. 500000 Iterationen nach einem burn-in von 100000 Iterationen mit jeweils 20 Wiederholungen für jedes  $K$  bestimmten die Wahrscheinlichkeit für jedes Modell. Die wahre Anzahl der genetischen Gruppen ( $K$ ) wurde mit der Evanno-Methode (EVANNO et al. 2005) bestimmt.

### **Bd Prävalenz und Intensität**

Insgesamt wurde die DNA aus 577 Hautabstriche mit dem PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA; SHIN et al. 2014) extrahiert. Die Präsenz und Intensität der *Bd* Infektion (gemessen als „zoospore genomic equivalents“: GE) wurde mittels quantitativer real time PCR (qRT-PCR) unter Einsatz von *Bd*-Standards (Microsynth AG, Switzerland) verschiedener Konzentrationen (0.1 GE, 1 GE, 10 GE und 100 GE Verdünnung; BOYLE et al. 2004; HYATT et al. 2007) ermittelt. Dies erfolgte in einem AriaMx Realtime PCR System (Agilent). Die PCR Konditionen waren eine anfängliche Denaturierung bei 95°C für 10 min, gefolgt von 50 Zyklen von 10 s bei 95°C und 1 min at 60°C. Jede Probe wurde zweimal analysiert bei gleichzeitiger Analyse der Standards, einer negativen und einer positiven Kontrolle.

Proben, die einen mittleren GE  $> 0.05$  aufwiesen, wurden von uns als infiziert betrachtet, also die Infektion als präsent betrachtet (Infektionsstatus positiv). Die Prävalenz pro Subpopulation wurde als das Verhältnis von infizierten Individuen zu beprobten Individuen berechnet. Das 95% Konfidenzintervall der Prävalenz wurde mithilfe des R-Pakets „prevalence“ mit der Jeffreys/Bayesian



Methode (DEVLEESSCHAUWER et al. 2014) bestimmt. Die Intensität der *Bd* Infektion ist der Mittelwert beider Analysen für jedes Individuum.

Mit multivariaten statistischen Analysen wurde die Bedeutung von vier Einflusswerten auf die *Bd* Präsenz (binomial, 1: infiziert und 0: nicht infiziert) und *Bd* Intensität (kontinuierlich in GE) modelliert: Beprobungszeitraum I, II oder III, Standort/Subpopulation, wobei nur die sieben größten Subpopulationen in die Analysen eingingen (BE, ED, BM, PA, PB, MB und LI), die drei Mal beprobt wurden; weiterhin die individuelle Körperkondition (RBI) und die individuelle standardisierte multilocus Heterozygotie (sMLH). Die *Bd* Präsenz wurde mit einem generalisierten, linearen Model (GLM) mit Binomialverteilung und log-it link (logistische Regressionsanalyse) analysiert. Die *Bd* Intensität wurde log transformiert und mit GLMs, unter Annahme einer Normalverteilung analysiert.

Wir benutzen einen Ansatz der Informationstheorie, um den Zusammenhang zwischen den vier Einflussgrößen und den *Bd* Variablen zu berechnen. Die Informationstheorie bewertet mehrere plausible Hypothesen basierend auf der Datenlage und liefert quantitative Messungen für die Stärke der Evidenz, die die der Nullhypothese übertreffen. Das R-Paket 'glmulti' generiert automatisch alle Modelle erster Ordnung (ohne Interaktionen), wobei alle Einflussgrößen mit jeder *Bd* Variable getestet wurden (8 Modelle in jedem Fall) und führten dann eine automatische Modellselektion durch (CALCAGNO & DE MAZANCOURT 2010). Die Güte der Modelle wurden aufgrund des Akaike Informations Kriteriums (AICc) und ihre Akaike Gewichte bewertet. Für jedes Modell berechneten wir auch  $\Delta AICc$  und das Evidenz-Verhältnis als eine Messung der Selektions-Unsicherheit (MAZEROLLE 2006). Wir benutzen weiterhin eine *multi-model inference* Methode in glmtli, um die relative Bedeutung jeder Einflussgröße (Verhältnis der kumulativen Gewichte aller Modelle einschließlich aller Variablen zu solchen, die die Einflussgröße nicht einhielten) und dem Regressionskoeffizient ( $\beta$ ) als auch die assoziierten Konfidenzintervalle (CI). Die Einflussgrößen, welche wir als signifikant ansehen, liegen oberhalb des Schwellenwertes von 80%. Das 80% Level minimiert die Wahrscheinlichkeiten für Fehler des Types I und II in Simulationen bei Analysen mit einer Probenanzahl ähnlich zu unseren (CALCAGNO & DE MAZANCOURT 2010).

Weiterhin schätzten wir die „*Bd* Infektionsdistanz“ basierend auf der Euklidischen Distanz zwischen den Standorten bezüglich Prävalenz und Intensität. Korrelationen zwischen *Bd* Distanz, geographischer Distanz und genetischer Distanz wurden mit dem Paket "vegan" in R berechnet für Standorte, an denen mehr als 5 Individuen beprobt wurden.

## **Ergebnisse**

### **Genetische Diversität in den Subpopulationen**

Insgesamt waren die erhobenen genetischen Daten von guter Qualität und waren für die weiteren Analysen geeignet. Sieben der neun untersuchten Mikrosatelliten waren für fast alle Subpopulationen polymorph, während zwei Loci nur für die Hälfte der Gebiete polymorph und für die andere Hälfte monomorph waren. Diese Loci konnten für die Gebiete, in denen sie monomorph waren, bei dem Test hinsichtlich des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts nicht berücksichtigt werden. Bei diesem Test und auch in Hinblick auf das Kopplungsungleichgewicht zeigte sich, dass nur in 16 von insgesamt 119 Tests eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und in keinem Fall ein Kopplungsungleichgewicht detektiert wurde. Nullallele traten in nur einem Locus (in

einer Subpopulation) auf. Der Allelreichtum variierte von 1,39 bis 1,57 Allelen pro Locus und die Allelfrequenz reichte von 0,08 bis 0,20.

Die genetische Diversität, gemessen an verschiedenen Diversitätsindices, zeigte Variation zwischen den Populationen (Tab. 1), war relativ gering und entsprach damit weitestgehend den Ergebnissen aus vorherigen Studien über die Gelbbauchunke in Niedersachsen (WEIHMANN et al. 2009) und Hessen (GUICKING et al. 2017). Das Gebiet Edler (ED) hatte dabei die niedrigste Heterozygotie ( $H_o$ ), und einen sehr hohen  $F_{IS}$ -Wert, der auf einen hohen Grad an Inzucht hindeutet. In mehr als der Hälfte der Populationen traten private Allele auf. Wegen der zu geringen Stichprobengröße gibt es keine Diversitätsindices für das Gebiet Waldwiese (WW). Die paarweisen genetischen Distanzen ( $F_{ST}$ ) zwischen den Gebieten variierten von 0 bis 0,27 mit einem globalen Wert von 0,1 über alle paarweisen Vergleiche.

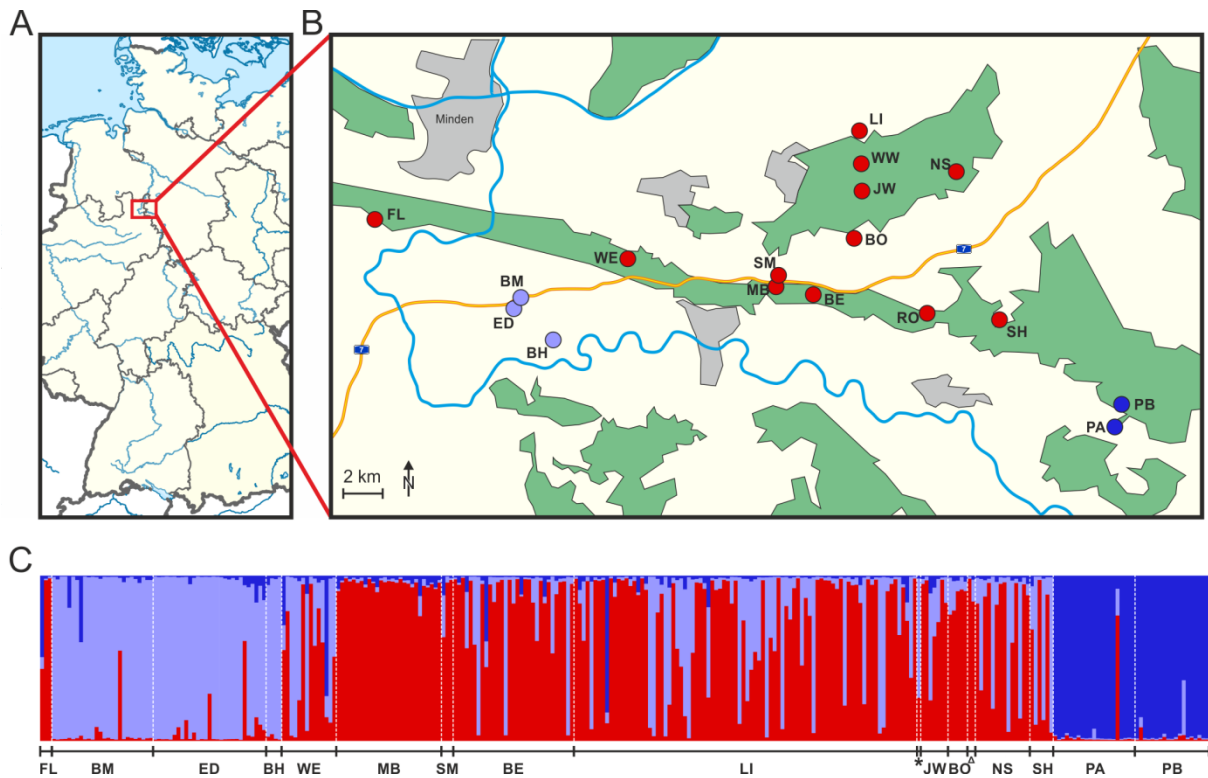
**Tab. 1** Indices der genetischen Diversität an neun Mikrosatelliten in *Bombina variegata* im Nördlichen Weserbergland mit Informationen zur Stichprobengröße N, zur Gendiversität (GenDiv) zur beobachteten und erwarteten Heterozygotie ( $H_o$  und  $H_e$ ), zum Inzuchtkoeffizienten ( $F_{IS}$ ), zur Anzahl privater Allele ( $N_p$ ) sowie zum Allelreichtum, berechnet über alle Loci. Beprobungsgebiete (BG): Liekwegen (LI); JBF-Wiese (JW); Segelhorst (SH); Borstel (BO); Messingsberg (MB); Nato-Station (NS); Pötzen Steinbruch (PA); Pötzen Militärplatz (PB); Rohden (RO); Bernsen (BE); Edler (ED); Brinkmeyer (BM); Borstel (BO); Wülpker Egge (WE); Fuchsloch (FL) and Bokshorn (BH), Schlingmühle (SM).

Standort	N	GenDiv	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$	$N_p$	Allelreichtum
LI	88	0.55	0.45	0.55	0.18	6	1.59
JW	7	0.49	0.52	0.55	-0.06	0	1.52
SH	6	0.39	0.48	0.50	-0.23	0	1.44
BO	5	0.40	0.51	0.51	-0.28	1	1.45
MB	27	0.54	0.55	0.61	-0.02	3	1.58
NS	14	0.52	0.73	0.65	-0.40	0	1.58
PA	21	0.44	0.42	0.49	0.05	3	1.49
PB	19	0.44	0.38	0.49	0.14	2	1.48
RO	2	0.64	0.50	0.67	0.22	0	1.65
WW	1						
BE	31	0.50	0.46	0.55	0.08	4	1.55
ED	29	0.46	0.34	0.50	0.26	3	1.51
BM	26	0.46	0.45	0.57	0.02	2	1.51
SM	3	0.57	0.37	0.59	0.35	0	1.55
WE	14	0.50	0.41	0.54	0.18	2	1.51
FL	3	0.51	0.64	0.61	-0.25	1	1.58
BH	4	0.39	0.54	0.51	-0.38	2	1.45

### Populationsstruktur der Gelbbauchunken im Nördlichen Weserbergland

Die Analyse der Populationsstruktur ergab, dass das Vorkommen im Nördlichen Weserbergland in drei genetische Gruppen, also drei Metapopulationen eingeteilt ist (Abb. 1): eine genetische Gruppe (rot) umschließt die Subpopulationen LI, JW, SH, BO, MB, NS, RO, WW, BE, SM, WE und FL. Eine zweite Gruppe (in lila) umfasst drei Subpopulationen im Südwesten, ED, BM und BH. Eine dritte

Gruppe (in blau) gibt es im Südosten mit PA und PB. Alle drei Gruppen bzw. Metapopulationen teilen genetische Anteile miteinander, wobei die größte Vermischung in der größten (roten) Metapopulation zu erkennen ist (Abb.1). Diese Metapopulation umfasst auch alle wiederangesiedelten Subpopulationen.



**Abb. 1** Lage des Studiengebietes in Deutschland (A); Lage der beprobten Standorte bzw. der Metapopulationen (lila, rot, blau) der Gelbbauchunke im Nördlichen Weserbergland (B) im Verhältnis zur Populationsstruktur (C). Auf den Karten sind Flüsse als blaue Linien, Straßen als gelbe Linien, Städte als graue Flächen und Wälder als grüne Flächen dargestellt. In B und C präsentiert jede Farbe (lila, rot, blau) eine genetische Gruppe. In C ist jede Unke als eine vertikale Linie dargestellt, die entsprechend ihrer genetischen Komposition anteilig jedem Cluster zugeordnet wird. Die weißen Linien trennen Beprobungsgebiete. Beprobungsgebiete sind: Liekwegen (LI); JBF-Wiese (JW); Segelhorst (SH); Borstel (BO); Messingsberg (MB); Nato-Station (NS); Pötzen Steinbruch (PA); Pötzen Militärplatz (PB); Rohden (RO); Bernsen (BE); Edler (ED); Brinkmeyer (BM); Wülperker Egge (WE); Fuchsloch (FL) und Bokshorn (BH), Schlingmühle (SM). In C \* = Waldwiese (WW),  $\triangle$  = Rohden (RO).

### **Bd Prävalenz und Infektionsintensitäten**

In 15 von 16 beprobten Gebieten wurde *Bd* auf den Unken gefunden (94,1%, Tabelle 1). Die einzige Subpopulation in der kein *Bd* gefunden wurde, wurden nur 3 Unken untersucht. Die Prävalenz variierte zwischen 0% bis 85,7% zwischen den anderen Standorten. Von den 15 infizierten Subpopulationen zeigten sechs eine Prävalenz von über 50%. Die Gebiete mit der höchsten Prävalenz waren NS, ED und BM. Die Infektionsintensität lag im Durchschnitt bei 0.83GE. Die höchste individuelle Infektionsintensität (570,6 GE) fanden wir in der südwestlichen Subpopulation ED.

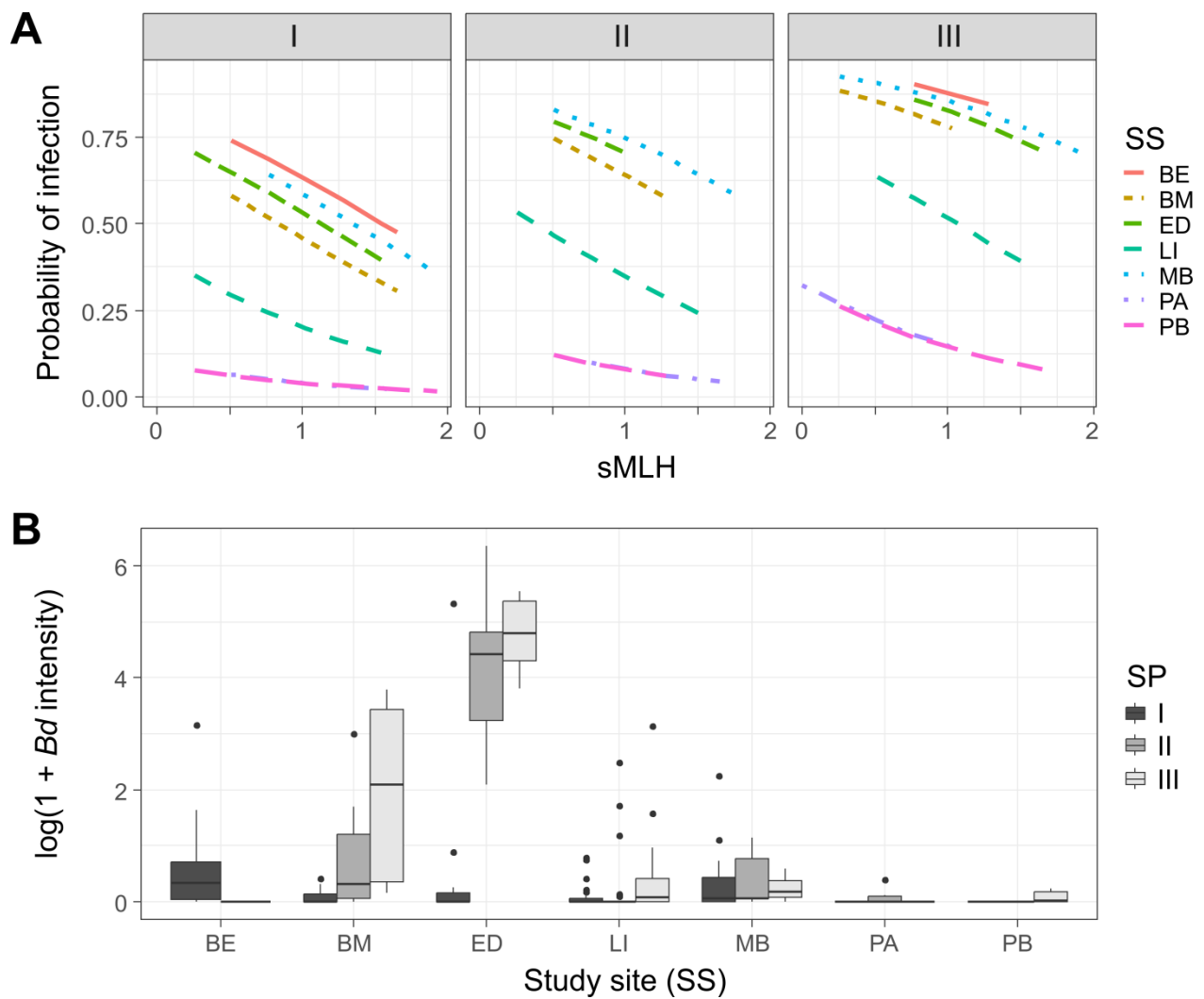
Die paarweise *Bd* Distanz (Prävalenz+Intensität) war weder mit der genetischen Distanz (paarweiser  $F_{ST}$ ) (Mantel Test;  $r=0.013$ ;  $p=0.4412$ ) noch mit der geographischen Distanz (Mantel Test;  $r=0.1949$ ;  $p=0.2698$ ) korreliert. Die Intensität der Infektion variierte zwischen den sieben

Subpopulationen und den drei Beprobungszeiträumen (Abb. 2). Die Wahrscheinlichkeit für *Bd* Präsenz und *Bd* Intensität war während des letzten Zeitraumes in den meisten Subpopulationen höher. Vor allem im letzten Zeitraum war die Infektionswahrscheinlichkeit hoch.

**Tab. 2 Prävalenz und *Bd* Infektionsintensität in 16 Subpopulationen der Gelbbauchunke im nördlichen Weserbergland.**

Die Anzahl der infizierten Individuen zur Anzahl der beprobten Individuen (Inf/Total). Prävalenz ist angegeben in Prozent (%) und ihre 95% Konfidenzintervalle (CI). Die Infektionsintensität in GE ist als Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) angegeben. Der Infektionsbereich (Inf. Bereich) gilt nur für Unken, die infiziert waren. Beprobungsgebiete (BG): Liekwegen (LI); JBF-Wiese (JW); Segelhorst (SH); Borstel (BO); Messingsberg (MB); Nato-Station (NS); Pötzen Steinbruch (PA); Pötzen Militärplatz (PB); Rohden (RO); Bernsen (BE); Edler (ED); Brinkmeyer (BM); Wülpker Egge (WE); Fuchsloch (FL) and Bokshorn (BH), Schlingmühle (SM).

BG	Inf/Total	%	95% CI	MW GE ± SD	Inf. Bereich
LI	98/238	41.18%	34.30-46.67	1.80 ± 0.92	0.07-56.80
JW	2/7	28.57%	8.22-64.11	0.07 ± 0.16	0.24-0.28
SH	1/6	16.67%	0.86-56.35	0.05 ± 0.03	0.28-0.28
BO	1/8	12.50%	0.64-47.09	0.02 ± 0.06	0.13-0.13
MB	27/43	62.79%	47.86-75.62	1.64 ± 0.31	0.05-23.68
NS	12/14	85.71%	60.06-95.99	0.56 ± 0.12	0.08-1.88
PA	12/61	19.67%	10.38-29.47	1.00 ± 0.47	0.05-62.18
PB	2/28	7.14%	1.98-22.64	0.02 ± 0.02	0.05-0.26
RO	4/7	57.14%	25.05-84.18	0.47 ± 0.23	0.12-2.45
BE	20/52	38.46%	26.50-52.04	0.73 ± 0.57	0.07-22.40
ED	32/44	72.73%	58.15-83.65	63.14 ± 14.57	0.08-570.57
BM	28/39	71.79%	47.86-75.62	18.31 ± 5.06	0.08-233.83
SM	0/3	0.00%	0.00-56.15	0.00 ± 0.00	0.00-0.00
WE	13/20	65.00%	43.30-81.90	1.11 ± 0.34	0.06-14.75
FL	1/3	33.33%	1.70-79.23	0.00 ± 0.19	0.05-0.05
BH	1/4	25.00%	1.28-69.94	0.00 ± 0.05	0.21-0.21



**Abb. 2 Variabilität in der Wahrscheinlichkeit (A) der Anwesenheit von *Bd* in Abhängigkeit von der multilocus Heterozygotie während der drei Beprobungszeiträume (I, II, III) und für sieben Subpopulationen; und (B) *Bd* Intensität ( $\log(1+GE)$ ) in sieben Subpopulationen und drei Zeiträumen während der Fortpflanzungszeit.**

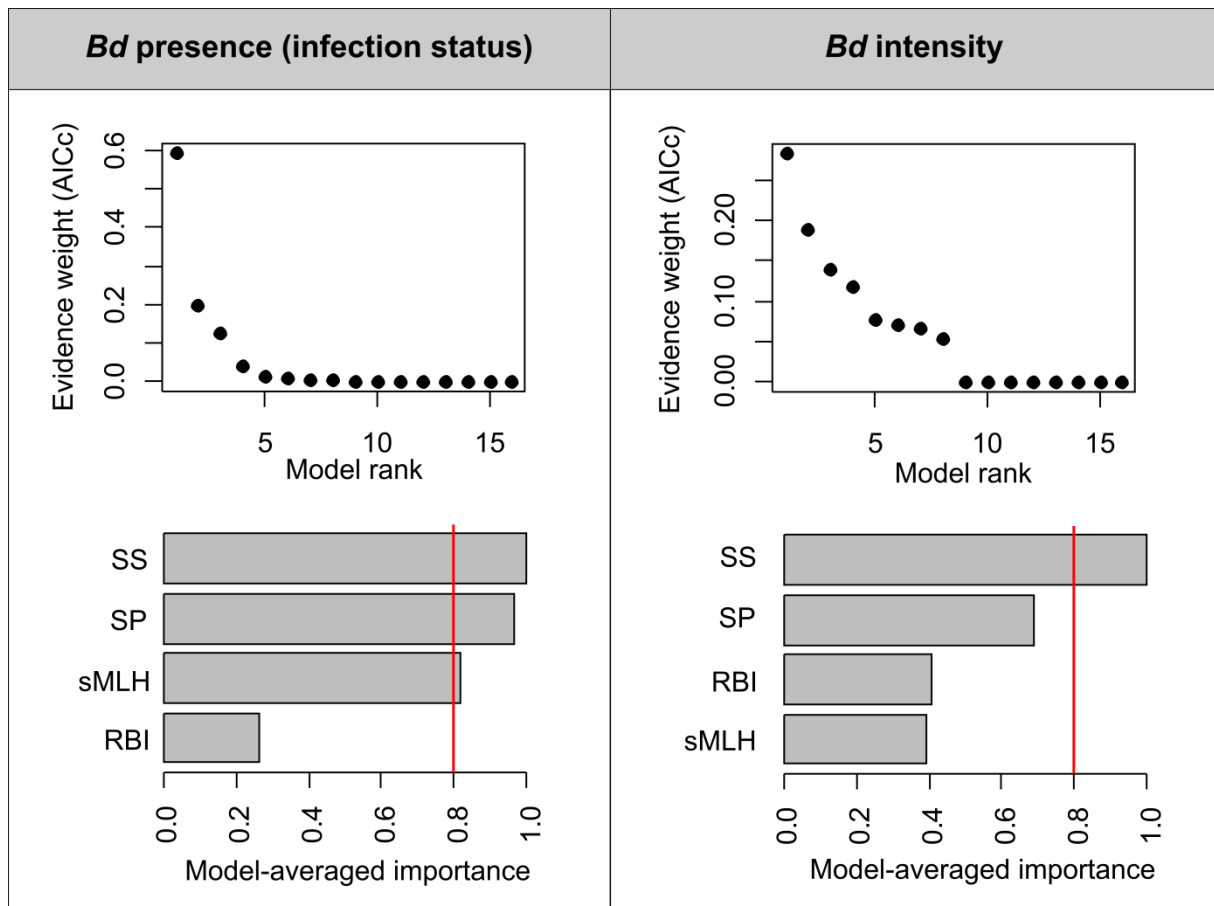
Beprobungszeiträume (SP = sampling period): schwarz= Mai bis früher Juni (I), dunkel grau = Juli bis früher August (II), hell grau = Mitte August bis September (III). In die Analyse eingeschlossene Standorte (SS = study sites): Bernsen (BE); Brinkmeyer (BM); Edler (ED); Liekwegen (LI); Messingsberg (MB); Pötzen Steinbruch (PA) und Pötzen Militärplatz (PB).

Bezüglich der *Bd* Präsenz war nur ein Modell deutlich besser ( $\Delta AIC > 2$ ) als die anderen (Tabelle 2). Von den vier Einflussgrößen, zeigten Standort, Beprobungszeitraum und Heterozygotie (sMLH) Werte von  $> 80\%$  (=Schwellenwertes) (Abb. 3). Die Modelle ergaben, dass insbesondere drei Standorte (LIE,  $\beta = -1.87$ , 95% CI:  $-2.50 - -1.24$ ; PA,  $\beta = -3.64$ , 95% CI:  $-5.42 - -1.86$ ; PB  $\beta = -3.67$ , 95% CI:  $-5.45 - -1.89$ ), die letzten beiden Zeiträume (SP II,  $\beta = 0.69$ , 95% CI:  $0.30-1.08$  und SP III,  $\beta = 1.35$ , 95% CI:  $0.91-1.79$ ) und die Heterozygotie ( $\beta = -0.82$ , 95% CI:  $-1.41 - -0.24$ ) einen starken Effekt auf die *Bd* Präsenz hatten. Der spätere Zeitraum und eine geringere Heterozygotie hatten einen positiven Effekt auf die Präsenz von *Bd*. Die Effekte der Körperkondition auf *Bd* können dagegen als schwach angesehen werden.

Unter den GMLs, die den Zusammenhang zwischen *Bd* Intensität auf den Unken mit Standorte, Beprobungszeitraum, den residualen Körperindex und multilocus Heterozygotie untersuchten, rangierten vier unter den besten Modellen innerhalb des Modellkandidaten (Tabelle 2, Abb. 3) und zeigten dabei ähnliche AICs Werte bzw. delta AIC = 2 oder kleiner (BURNHAM & ANDERSON (2002)).

**Tab. 3 Modellselektion für den Zusammenhang zwischen vier Einflussgrößen (Standort, Beprobungszeitraum, residualer Körperindex, und standardisierte multilokus Heterozygotie) und *Bd* Präsenz (Infektionsstatus) und *Bd* Infektionsintensität.** Die Modelle wurden aufgrund ihres Akaike Informationskriterium eingeordnet (AIC), dem Unterschied zwischen dem besten und den nachfolgenden Modellen ( $\Delta AICc$ ), dem Modellgewicht (weight) und dem Evidenzverhältnis (ER), welches das Verhältnis zwischen dem Gewicht des besten Modells und den anderen Modellen angibt. Es sind nur Modelle mit einem Gewicht von  $> 0.01$  angegeben.

Rank	Model	AICc	$\Delta AIC$	weight	ER
<b><i>Bd</i> presence (infection status)</b>					
1	Infected $\sim 1 + SP + SS + sMLH$	255.82	0.00	0.59	1.00
2	Infected $\sim 1 + SP + SS + RBI + sMLH$	257.99	2.17	0.20	2.96
3	Infected $\sim 1 + SP + SS$	258.88	3.06	0.13	4.61
4	Infected $\sim 1 + SP + SS + RBI$	261.07	5.25	0.04	13.77
5	Infected $\sim 1 + SS + RBI + sMLH$	263.30	7.48	0.01	42.19
6	Infected $\sim 1 + SS + sMLH$	263.61	7.79	0.01	49.12
7	Infected $\sim 1 + SS$	265.25	9.43	0.01	111.57
<b><i>Bd</i> intensity</b>					
1	$\log(Bd \text{ intensity}) \sim 1 + SP + SS$	405.48	0.00	0.28	1.00
2	$\log(Bd \text{ intensity}) \sim 1 + SP + SS + sMLH$	406.28	0.81	0.19	1.50
3	$\log(Bd \text{ intensity}) \sim 1 + SP + SS + RBI$	406.89	1.41	0.14	2.03
4	$\log(Bd \text{ intensity}) \sim 1 + SS + RBI$	407.20	1.72	0.12	2.37
5	$\log(Bd \text{ intensity}) \sim 1 + SP + SS + RBI + sMLH$	408.05	2.58	0.08	3.62
6	$\log(Bd \text{ intensity}) \sim 1 + SS + RBI + sMLH$	408.23	2.75	0.07	3.96
7	$\log(Bd \text{ intensity}) \sim 1 + SS$	408.37	2.89	0.07	4.25
8	$\log(Bd \text{ intensity}) \sim 1 + SS + sMLH$	408.75	3.27	0.05	5.13



**Abb. 3 Modell Selektion und durchschnittliche Bedeutung jeder Einflussgröße für die Anwesenheit der Infektion (*Bd* presence = infection status) und *Bd* Infektionsrate (*Bd* intensity) auf *Bombina variegata* in sieben Gebieten im Nördlichen Weserbergland.** Die oberen Graphiken zeigen die Gewichte (evidence weight) für 15 berechnete Modelle, während die unteren Graphiken die Bedeutung der Einflussgrößen zeigt (Schwellenwert 80%). SS = Standort, SP = Beprobungszeitraum, sMLH = multilocus Heterozygotie, RBI = Körperkondition.

## Diskussion

Das Ziel dieser Studie war für die bedrohte Art Gelbbauchunke *Bombina variegata* die genetische Populationsstruktur als auch die Infektion mit dem Chytridpilz (*Bd*) im nördlichen Niedersachsen zu untersuchen. Prävalenz und Intensität der *Bd* Infektion im nördlichsten Verbreitungsgebiet, dem nördlichen Weserbergland, wurden dabei in Zusammenhang mit potentiellen Einflussgrößen wie Standort, genetische Diversität, Körperkondition, und unterschiedliche Zeiträume während der Fortpflanzungszeit gebracht. Diese Informationen sind wichtig für Arterhaltungsmaßnahmen, da die Art in diesem Gebiet äußerst gefährdet ist. Die Ergebnisse zeigen, dass die genetische Diversität innerhalb der Vorkommen klein bis moderat ausfällt und die Zusammensetzung der Allele relativ arm ist. Dieses stimmt überein mit früheren Studien zur Gelbbauchunke in Deutschland (Süd-Niedersachsen; WEIHMANN et al. (2009) Nordhessen; GUICKING et al. (2017)). Eine Möglichkeit die geringe genetische Diversität in diesem Gebiet zu erklären ist, dass es sich um Populationen im Randbereich des Gesamt-Verbreitungsgebietes handelt. Norddeutschland wurde nach dem

Abschmelzen der Gletscher von Süden her wieder besiedelt. Die Refugialgebiete im Pleistozän der Gelbbauchunke lagen auf dem Balkan und während der Rückbesiedlung von Mittel- und Nordeuropas können viele genetische Varianten verloren gegangen sein (FIJARCYK et al. 2011).

Diese Wiederbesiedlung war wahrscheinlich durch wiederholte Flaschenhalseffekte, wobei Populationen genetische Diversität verlieren, begleitet (HEWITT 1999, 2004). Weiterhin ist die genetische Verarmung sicherlich auch auf die rezente Populationsfragmentierung und Isolation in Deutschland durch großflächige Zerstörung von Primärhabitaten, wie natürliche Auen (KÜHNEL et al. 2009, GOLLMANN & GOLLMANN 2012), zurückzuführen. Die verbliebenen Gelbbauchunken Vorkommen in Deutschland sind auf isolierte Sekundärhabitats wie Steinbrüche oder Militärübungsplätze (auch hier in unserem Studiengebiet), wo anthropogene Störungen brauchbare Habitats für die Gelbbauchunke schaffen, angewiesen (GOLLMANN & GOLLMANN 2012).

Unsere Analyse mit STRUCTURE zeigte, dass im Studiengebiet drei genetische Gruppen vorliegen, ein nördliches (wo die meisten Vorkommen zu gehören), ein südöstliches (PA und PB) und ein südwestliches (ED, BM, BH). Das letzte zeigte den höchsten Inzuchtkoeffizienten. Eine frühere Arbeit (AUFFARTH et al. unpublished data) deckte auf, dass es in Deutschland für die Gelbbauchunke zwei genetische Cluster gibt: ein nördliches Cluster (zu dem die meisten unserer Subpopulationen zählen) und ein südliches, in das PA und PB fallen. Die Tatsache, dass ED, BM und BH genetisch unterschiedlich von allen anderen Subpopulationen im nördlichen Cluster sind, hebt ihre genetische und geographische Isolation hervor und zeigt begrenzten Genfluss zu anderen Gebieten mit Gelbbauchunken im Studiengebiet an. Diese Isolierung könnte eine Erklärung für den hohen Inzuchtkoeffizienten sein.

Die hier untersuchten Gebiete wurden basierend auf ihrer geographischen Lage in einer früheren Studie fünf verschiedenen Metapopulationen zugeordnet (HÖPPNER et al. 2017). In dieser Studie stellte sich heraus, dass drei von HÖPPNER et al. (2017) angenommene Metapopulationen tatsächlich nur eine genetische Gruppe bilden und damit als eine Metapopulation betrachtet werden sollten (Abb. 1, „rote Metapopulation“). Die lila und blaue Metapopulation entsprechen jeweils einer der beiden anderen von HÖPPNER et al. (2017) angenommenen Metapopulationen.

Die Analysen zur *Bd* Infektion offenbarten höhere *Bd* Prävalenzen als vorher für Gelbbauchunken in Deutschland berichtet wurden. OHST et al. (2013) sammelte 108 Proben von *B. variegata* zwischen 2003 und 2011. Die Analysen ergaben dass 13,9% der Individuen und 38,5% der beprobten Standorte (N=13) befallen waren. Im Bundesland Hessen wurden im Sommer 2011 und 2012 19 Standorte beprobt, wobei in 14 (73,7%) *Bd* anwesend war. Allerdings wurden in den nichtinfizierten Populationen nur sehr wenige Unken beprobt (< 4), so dass die Anwesenheit des Pilzes nicht ausgeschlossen werden kann. Dasselbe könnte auf unsere Subpopulation SM zutreffen, wo nur 3 Individuen beprobt wurden und keines davon mit *Bd* befallen war. Das heißt, die Nichtdetektion der Infektion an diesem Standort könnte falsch-negativ sein (siehe auch die Konfidenzintervalle für die Infektion). Die Infektionsprävalenz pro Standort lag bei WAGNER et al. (2017) bei 4.8% bis 66%, und an einem Standort war die Prävalenz über 50%. In Belgien und den Niederlanden waren in 2005 5,3% der beprobten Populationen bzw. 7,5% der Unken befallen (SPITZEN-VAN DER SLUIJS et al. 2014). In einem weiteren Monitoring zwischen 2010 und 2016 in den Niederlanden fluktuierte die Infektionsprävalenz zwischen 0,5 in 2011 bis 22,2% in 2012 und 2016 (SPITZEN-VAN DER SLUIJS et al. 2017). Die Infektionsintensität für *B. variegata* in ED in unserer Studie ist



die höchste bisher für Deutschland berichtete mit einem Mittelwert für GE von 63,14, verglichen mit einem maximalen Durchschnittswert von 2,86 in WAGNER et al. (2017).

Allerdings lag die durchschnittliche *Bd* Intensität in Belgien und den Niederlanden in 2009 bei 42,8 GE (SPITZEN-VAN DER SLUIJS et al. 2014) und in der Niederlande variierte die Intensität zwischen 4,74 und 34,9 GE für Unken, die zwischen 2010 und 2016 beprobt wurden (SPITZEN-VAN DER SLUIJS et al. 2017). Weiterhin war die maximale Infektionsintensität in ED und BM (südwestliches Cluster) ähnlich zu denen, die in den Niederlanden gemessen wurden (570.6 und 594 GE). Die höchste Intensität lag in den Niederlanden für eine adulte Unke bei 10820 GE (SPITZEN-VAN DER SLUIJS et al. 2014, 2017). Es wurde angenommen, dass eine Infektionsintensität über 10000 GE letal für Amphibien wäre (VREDENBURG et al. 2010; KENNEY et al. 2011), dieses wurde aber kürzlich von HORNER et al. (2017) widerlegt. Diese Studie fand enorm hohe Infektionsintensitäten bis zu mehreren Millionen GE in den USA auf *Hyla squirella*, *Notophthalmus perstriatus* und *Pseudacris ornata*. Solche starken Infektionen in klinisch gesunden Amphibien sind wahrscheinlich verbunden mit einer artspezifischen Toleranz gegenüber *Bd* (see VAN ROOIJ et al. 2015), das heißt ein generell letaler GE Schwellenwert kann nicht festgelegt werden. Unsere *Bd* Infektionswerte sind gering gegenüber den gerade genannten.

Weiterhin wurde bis jetzt kein *B. variegata* Individuum tot aufgefunden, weder in den Subpopulationen mit hohem noch in denen mit niedrigem *Bd* Befall. Wir nehmen an, dass Gelbbauchunken geringe Infektionen besser tolerieren als andere Arten (see VAN ROOIJ et al. 2015) und ein Reservoir für den Pilz darstellen könnten (DASZAK et al. 2004; WOODHAMS et al. 2008). Trotzdem starben zwei gefangene *B. variegata* in Belgien aufgrund von Chytridiomykose (SPITZEN-VAN DER SLUIJS et al. 2014) zusätzlich zu den Fällen, die in der Einleitung erwähnt wurden (im Feld in Tschechien: BALÁŽ et al. 2014; in Gefangenschaft: STAGNI et al. 2004; SPITZEN-VAN DER SLUIJS et al. 2017). Die hohe *Bd* Prävalenz in der süd-westlichen Metapopulation (ED, BM, BH) könnte mit der geographischen und genetischen Isolierung zusammenhängen. Der Einfluss der individuellen genetischen Diversität (sMLH) auf die Wahrscheinlichkeit der Anwesenheit von *Bd* unterstützt diese Argumentation, während kein Effekt der genetischen Diversität auf die *Bd* Intensität gefunden wurde.

Diese Studie zeigte eine hohe Variation in der *Bd* Prävalenz und Intensität zwischen den Standorten und Beprobungszeiträumen, und die linearen Regressionskoeffizienten des besten Modells deuten auf eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine *Bd* Infektion im späterem Sommer hin, während kein klarer Effekt auf die Infektionsintensität gefunden wurde. Diese Ergebnisse deuten auf neue Infektionen während der Fortpflanzungsperiode hin, möglicherweise bedingt durch Verhaltensinteraktionen und Kontakt bei der Fortpflanzung in den Gewässern. Variabilität in der *Bd* Infektion wurde für viele Arten in vielen Ländern gefunden wie in diesem Dokument schon zitiert. Für Deutschland wurde eine solche Variabilität noch nicht beschrieben. Die höhere Wahrscheinlichkeit für eine *Bd* Infektion in den späteren Beprobungszeiträumen könnte auch damit zusammenhängen, dass *Bd* hier optimale Bedingungen fand. *Bd* wächst optimal bei Temperaturen zwischen 17-25°C (PIOTROWSKI et al. 2004) und während der letzten beiden Zeiträume könnten die Temperaturen optimaler gewesen sein (tägliche Durchschnittstemperatur: SP I: 16.2°C, SP II: 19.5, SP III: 19.0°C; Datenbank der nächsten Wetterstation in Bückeberg, downloaded von <http://www.sklima.de/datenbank.php>). Eine Langzeitstudie fand heraus, dass Umweltfaktoren (v.a. die tägliche minimale Lufttemperatur in der Woche vor dem Monitoring) und Populationsdynamik (v.a. Dichte von Juvenilen) in Belgien und in den Niederlanden die *Bd* Infektion (SPITZEN-VAN DER SLUIJS

et al. 2017) beeinflussen. Für die Zukunft empfehlen wir weitere lokale Umweltkonditionen (z.B. Temperatur, Feuchtigkeit, Regenfall), Populationsdynamik und andere potentielle Einflussgrößen wie künstliches Management durch den Menschen in Gebieten mit infizierten Amphibien zu messen.

Unsere Modelle schätzen die Wahrscheinlichkeit einer Infektion, welche hauptsächlich durch drei Faktoren bestimmt war: das Beprobungsgebiet, der Beprobungszeitraum und die genetische Diversität (sMLH), während der Effekt der Körperkondition klein zu sein scheint. Auch in Hessen (gemessen als Hemmer's body index; WAGNER et al. 2017) und den Niederlanden (gemessen als scaled body mass; SPITZEN-VAN DER SLUIJS et al. 2017) wurde keine Korrelation zwischen Körperkondition und *Bd* gefunden. Die genetische Diversität (sMLH and  $H_e$ ) und *Bd* Infektion (Intensität und Prävalenz) waren in der Studie in Hessen nicht korreliert (WAGNER et al. 2017). Allerdings wurde in Hessen die sMLH mit einer anderen Methode geschätzt: Proben wurden über unterschiedliche Zeiträume genommen und in die Analyse (Korrelationen und GLMs) wurden auch Populationen eingeschlossen, die nur durch sehr wenige Individuen und nicht-infizierte Individuen vertreten waren. Hier haben wir unsere Modellselektion auf große Populationen beschränkt, welche drei Mal beprobt wurden. Dies erschien uns wichtig, da die *Bd* Infektion zeitlich während der Fortpflanzungszeit schwankt, wahrscheinlich aufgrund Veränderungen in den Umweltbedingungen.

Translokationen und Verbesserungen in der Konnektivität zwischen Populationen werden immer noch kontrovers diskutiert und werden insbesondere für Amphibien als wenig effizient erachtet (DODD & SEIGEL 1991), da sie mit *Outbreeding-Depression*, welche in einem Kollaps der lokal adaptierten Genkomplexe und einem Verlust von Krankheitsresistenz in Verbindung gebracht werden (GOLDBERG et al. 2005; EDMANDS 2007). Nichtsdestotrotz führen solche Maßnahmen zur Erhöhung des Genflusses und der genetischen Diversität. Frühere Studien zeigten auch die Bedeutung der genetischen Diversität für Toleranz und Adaptationsvermögen (BOOY et al. 2000). In dieser Studie war der Befall mit *Bd* invers korreliert mit der multilocus Heterozygotie. Daher ist es wichtig, zu kleinen genetischen Diversitäten entgegenzuwirken, und wir empfehlen Populationen, die in Artenschutzprojekte involviert sind in Bezug auf Populationsgenetik und Krankheitsprävention regelmäßig zu untersuchen.

Solche Maßnahmen zusammen mit weiteren Studien zur anti-*Bd*-Behandlung und Infektionsprävention sollte die Erhaltung von gesunden und stabilen Populationen zum Ziel haben. Weitere Artenschutzmaßnahmen sollten den Fokus auf den Erhalt höherer genetischer Diversitäten in den Vorkommen und die Verbesserung der Konnektivität durch Migration und Genfluss haben, da dieses der genetischen Verarmung entgegenwirken und damit die Krankheitsresistenz erhöhen sollte. Bezüglich unserer Hypothesen können wir feststellen:

- 1) Das Vorkommen im nördlichen Weserbergland lässt sich in drei Metapopulationen einteilen.
- 2) Die Wahrscheinlichkeit von *Bd* Infektionen unterschied sich zwischen den Subpopulationen und Metapopulationen und stieg während der Fortpflanzungsperiode an, war also am Ende des Sommers am höchsten.
- 3) Individuen mit einer geringeren genetischen Diversität sind mit einer höheren Wahrscheinlichkeit mit *Bd* infiziert, aber dieser Faktor konnte Unterschiede in der Infektionsintensität nicht erklären.
- 4) Die individuelle Körperkondition hatte keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die *Bd* Prävalenz bzw. *Bd* Infektionsintensität.

## Veröffentlichungen/Vorträge

Bourke J\*, Oswald P\*, Rodriguez A, Wagner N, de Buhr N, Buschmann H, von Köckritz-Blickwede M, Pröhl H. *Bd* infection presence in *Bombina variegata* populations from northern Germany is predicted by study site, sampling period and individual heterozygosity. Submitted to PlosOne.

\*Die ersten beiden Autoren haben die gleiche Leistung zum Manuskript beigetragen.

Oswald P, Buschmann H, Pröhl H. Genetische Analysen im Nördlichen Weserbergland. Eingereicht bei NABIV.

Oswald H, Bourke J, Buschmann H, Pröhl H. Chytridpilzbefall im Nördlichen Weserbergland. Eingereicht beim NABIV.

Bourke J, Oswald P (2018) Genetische Analysen und Chytridpilzbefall der Gelbbauchunkenpopulationen im Nördlichen Weserbergland. Vortrag, Endveranstaltung NABU Gelbbauchunkenprojekt, Leibniz Universität Hannover.

## Fazit/Ausblick

Unsere Studie hat gezeigt, dass die individuelle genetische Diversität mit dem Befall durch den Chytridpilz auf Gelbbauchunken korreliert. Weiterhin war die Prävalenz und Infektionsintensität in einer isolierten Population, die einen hohen Inzuchtkoeffizienten zeigte, besonders hoch. Das deutet daraufhin, dass die genetische Diversität für den *Bd* Befall bei Gelbbauchunken eine Rolle spielt. In weiteren Studien sollten die Zusammenhänge zwischen der genetischen Diversität und *Bd* Prävalenz und Intensität auf individueller oder Populationsebene noch genauer untersucht werden, in dem weit mehr als sieben Populationen und unterschiedliche Zeiträume betrachtet werden. Ähnliche Studien sind auch für andere Amphibien von Nöten. Besonders dringend ist es allerdings den Einfluss des *Bd* Befalls bzw. seiner Intensität auf die Fitness der Unken zu untersuchen, also z.B. ob Unken, die befallen sind, eine verkürzte Lebenszeit aufweisen, oder ob es bestimmte Stadien gibt (z.B. Kaulquappen, Juvenile) die besonders betroffen sind, und in wie weit die genetische Diversität dabei eine Rolle spielt.

## Danksagung

Zunächst danken wir der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, insbesondere Dr. Volker Wachendörfer, die das Projekt finanziell unterstützt hat. Wir danken Christian Höppner und Ilona Jentschke vom NABU Niedersachsen für ihre Hilfe bei der Feldarbeit und viele nützliche Informationen über die Gelbbauchunke. Die Naturschutzämter Umweltamt Kreis Minden-Lübbecke, Amt für Naturschutz Landkreis Schaumburg und Naturschutzamt Hameln-Pyrmont stellten Betretungs- und Sammelgenehmigungen aus. Die technischen Assistentinnen Sabine Sippel (TiHo) und Karin Fischer (Universität Trier) haben einen Großteil der Laborarbeit übernommen. Die Feldarbeit wurde von Damaris Riedner, Nicola Dernerova, Adelina Weißmann, Carla Schmutte, Daniela Rössler, Kathrin Wysocki, Julia Hense, Anders Sørensen, Benjamin Cejp, Bruno Scheel und Ralf Berkhan unterstützt. Schließlich danken wir Thomas Kutter für seine Mitwirkung an der Publikation der Daten.

## Literatur

- Addis BR, Lowe WH, Hossack BR, Allendorf FW. Population genetic structure and disease in montane boreal toads: more heterozygous individuals are more likely to be infected with amphibian chytrid. *Conserv Genet.* 2015; **16**(4): 833-844.
- Alford RA, Richards SJ. Global amphibian declines. A problem in applied ecology. *Ann Rev Ecol Syst.* 1999; **30**: 133-165.
- Allentoft ME, O'Brien J. Global amphibian declines, loss of genetic diversity and fitness: A review. *Diversity*, 2010; **2**(1): 47-71.
- Altizer S, Harvell D, Friedle E. Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trend Ecol Evol.* 2003; **18**(11): 589-596.
- Andre SE, Parker J, Briggs CJ. Effect of temperature on host response to *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in the mountain yellow-legged frog (*Rana mucosa*). *J Wildl Dis.* 2008; **44**(3): 716-720.
- Angelone S, Holderegger R. Population genetics suggests effectiveness of habitat connectivity measures for the European tree frog in Switzerland. *J Appl Ecol.* 2009; **46**: 879-887.
- Auffarth J. Unveröffentlichter Zwischenbericht zur Populationsgenetik der Gelbbauchunkenpopulationen im nördlichen Weserbergland. Forthcoming.
- Băncilă RI, Hartel T, Plăiașu R, Smets J, Cogălniceanu D. Comparing three body condition indices in amphibians: a case study of yellow-bellied toad *Bombina variegata*. *Amph-Rept.* 2010; **31**(4): 558-562.
- Bataille A, Cashins SD, Grogan L, Skerratt LF, Hunter D, McFadden M, et al. Susceptibility of amphibians to chytridiomycosis is associated with MHC class II conformation. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 2015; **282**(1805): 20143127.
- Beebee TJ, Griffiths RA. The amphibian decline crisis. A watershed for conservation biology? *Biol Conserv.* 2005; **125**: 271-285.
- Beldomenico PM, Telfer S, Gebert S, Lukomski L, Bennett M, Begon M. Poor condition and infection: a vicious circle in natural populations. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 2008; **275**(1644): 1753-1759.
- Beldomenico PM, Begon M. Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles? *Trend Ecol Evol.* 2010; **25**(1): 21-27.
- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, et al. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc Nat Acad Sci.* 1998; **95**(15): 9031-9036.
- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, et al. Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Austr Vet J.* 2004; **82**(7): 434-439.
- Bielby J, Cooper N, Cunningham AA, Garner TWJ, Purvis A. Predicting susceptibility to future declines in the world's frogs. *Conserv Lett.* 2008; **1**(2): 82-90.
- Bijlsma R, Loeschcke V. Genetic erosion impedes adaptive responses to stressful environments. *Evolutionary Applications* 2012; **5**(2): 117-129.
- Booy G, Hendriks RJJ, Smulders MJM, Groenendaal JM, Vosman B. Genetic diversity and the survival of populations. *Plant Biol.* 2000; **2**: 379-395.
- Boyle DG, Boyle DB, Olsen V, Morgan JAT, Hyatt AD. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis Aquat Organ.* 2004; **60**(2): 141-148.

- Brem, FM, Lips KR. *Batrachochytrium dendrobatidis* infection patterns among Panamanian amphibian species, habitats and elevations during epizootic and enzootic stages. *Dis Aquat Organ.* 2008; **81**(3): 189-202.
- Briggs CJ, Knapp RA, Vredenburg VT. Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *Proc Nat Acad Sci.* 2010; **107**(21): 9695-9700.
- Broquet T, Angelone S, Jaquier J, Joly P, Lena J.-P, Lengagne T, et al. Genetic bottlenecks driven by population disconnection. *Conserv Biol.* 2010; **24**: 1596-1605.
- Broquet T, Berset-Braendli L, Emaresi G, Fumagalli L. Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conserv Genet.* 2007; **8**(2): 509-511.
- Butchart SHM, Walpole M, Collen B, van Strien A, Scharlemann JPW, Almond REA, et al. Global biodiversity: Indicators of recent declines. *Science.* 2002; **328**: 1164-1168.
- Burnham KP, Anderson DR, Huyvaert K. AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations, and comparisons. *Behav Ecol Sociobiol.* 2011; **65**(1): 23-35.
- Buschmann H, Scheel B, Jacob A. Populationsstruktur und -entwicklung der Gelbbauchunke (*Bombina variegata*) in Schaumburg (Niedersachsen). *Zeitschrift für Feldherpetologie.* 2013; **20**: 11-36.
- Calcagno V, de Mazancourt C. glmulti: An R Package for Easy Automated Model Selection with (Generalized) Linear Models. *J Stat Softw.* 2010; **34**(12): 1-29.
- Canestrelli, D, Zampiglia M, Nascetti G. Widespread occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in contemporary and historical samples of the endangered *Bombina pachypus* along the Italian peninsula. *PLoS One.* 2013; **8**(5): e63349.
- Carey C, Bruzgul JE, Livo LJ, Walling ML, Kuehl KA, Dixon BF, et al. Experimental exposures of boreal toads (*Bufo boreas*) to a pathogenic chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth.* 2006; **3**(1): 5-21.
- Carey C, Cohen N, Rollins-Smith L. Amphibian declines: an immunological perspective. *Dev Comp Immunol,* 1999; **23**: 459-472.
- Castellano S, Cucco M, Ciacoma C. Reproductive investment of female green toads (*Bufo viridis*). *Copeia.* 2004; **2004**(3): 659-664.
- Chatfield MW, Moler P, Richards-Zawacki C.L. Elevated temperatures as a treatment for *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs. *Dis Aquat Organ.* 2011; **94**(3): 235-238.
- Chatfield MW, Moler P, Richards-Zawacki CL. The amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, in fully aquatic salamanders from southeastern North America. *PLoS One.* 2012; **7**(9): e44821.
- Coltman DW, Pilkington JG, Smith JA, Pemberton JM. Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free-living, island population. *Evolution.* 1999; **53**: 1259-1267.
- Cornetti L. Conservation genetics of the yellow-bellied toad (*Bombina variegata*) and the common lizard (*Zootoca vivipara*) in the Italian Alps. 2013 Doctoral dissertation, Università degli Studi di Ferrara.
- Cornuet JM, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics.* 1996; **144**: 2001-2014.
- Cushman SA. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians. A review and prospectus. *Biol Conserv.* 2006; **128**: 231-240.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science.* 2000; **287**(5452): 443-449.

- Daszak P, Strieby A, Cunningham AA, Longcore JE, Brown CC, Porter D. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetol J.* 2004; **14**: 201-207.
- Denoël M, Hervant F, Schabetsberger R, Joly P. Short-and long-term advantages of an alternative ontogenetic pathway. *Biol J Linn Soc.* 2002; **77**(1): 105-112.
- Develesschauer B, Torgerson P, Charlier J, Levecke B, Praet N, Roelandt S, et al. (2014): prevalence: Tools for prevalence assessment studies. R package version 0.4.0. Available from: <http://cran.r-project.org/package=prevalence>.
- Dodd CK, Seigel RA. Relocation, repatriation, and translocation of amphibians and reptiles: Are they conservation strategies that work? *Herpetologica.* 1991; **47**: 336-350.
- Drew A, Allen EJ, Allen LJS. Analysis of climatic and geographic factors affecting the presence of chytridiomycosis in Australia. *Dis Aquat Organ.* 2006; **68**: 245-260.
- Edmands S. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Mol Ecol.* 2007; **16**: 463-475.
- Ersts PJ. Geographic Distance Matrix Generator (Version 1.2.3). American Museum of Natural History. Center for Biodiversity and Conservation. Available from: [http://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/gdmg](http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg). Accessed 1<sup>st</sup> October 2017.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol.* 2005; **14**: 2611-2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online.* 2005; **1**: 47-50.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data. Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics.* 2003; **164**: 1567-1587.
- Fijarczyk A, Nadachowska K, Hofman S, Litvinchuk SN, Babik W, Stuglik M. et al. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the European fire-bellied toads *Bombina bombina* and *Bombina variegata* supports their independent histories. *Mol Ecol.* 2011; **20**: 3381-3398.
- Fisher MC, Garner TW, Walker SF. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Ann Rev Microbiol.* 2009; **63**: 291-310.
- Frankham R. Genetics and extinction. *Biol Conserv.* 2005; **126**: 131-140.
- Frankham R, Ralls K. Conservation biology. Inbreeding leads to extinction. *Nature.* 1998; **392**: 441-442.
- Garner TWJ, Walker S, Bosch J, Leech S, Rowcliffe JM, Cunningham AA, et al. Life history tradeoffs influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Oikos.* 2009; **118**(5): 783-791.
- Germano JM, Bishop PJ. Suitability of amphibians and reptiles for translocation. *Conserv Biol.* 2009; **23**: 7-15.
- Gervasi S, Gondhalekar C, Olson DH, Blaustein AR. Host identity matters in the amphibian-*Batrachochytrium dendrobatidis* system: fine-scale patterns of variation in responses to a multi-host pathogen. *PLoS One.* 2013; **8**(1): e54490.
- Global *Bd* mapping Project. Available from: <http://www.bd-maps.net>. Accessed 19<sup>th</sup> September 2017.
- Goldberg TL, Grant EC, Inendino KR, Kassler TW, Claussen JE, Philipp DP. Increased infectious disease susceptibility resulting from outbreeding depression. *Conserv Biol.* 2005; **19**(2): 455-462.
- Goudet J. FSTAT (Version 1.2). A computer program to calculate F-Statistics. *J Hered.* 1995; **86**: 485-486.
- Goudet J. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Mol Ecol Resour.* 2004; **5**(1): 184-186.

- Guicking D, Finke L, Wittich M, Pfeiffer I, Veith M, Geske C, et al. Conservation genetics of *Bombina v. variegata* (Anura: Bombinatoridae) in northern Hesse, Germany. *Salamandra*. 2017; **53**(2): 201-211.
- Hauswaldt JS, Schröder C, Tiedemann R. Nine new tetranucleotide microsatellite markers for the fire-bellied toad (*Bombina orientalis*). *Mol Ecol Notes*. 2007; **7**: 49-52.
- Heard GW, Scroggie MP, Malone BS. Classical metapopulation theory as a useful paradigm for the conservation of an endangered amphibian. *Biological Conservation*. 2012; **148**(1): 156-166.
- Höppner C, Nadjafzadeh M, Buschmann H. Wiederansiedlungsvorhaben für die Gelbbauchunke (*Bombina orientalis*) im Nördlichen Weserbergland. *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 2017; Supplement **20**: 1-36.
- Hewitt GM. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol J Linn Soc*. 1999; **68**:87-112.
- Hewitt GM. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004; **359**:183-195.
- Horner AA, Hoffman EA, Tye MR, Hether TD, Savage AE. Cryptic chytridiomycosis linked to climate and genetic variation in amphibian populations of the southeastern United States. *PLoS ONE*. 2017; **12**(4): e0175843.
- Hyatt AD, Boyle AHD, Olsen V, Boyle DB, Berger L, Obendorf D, et al. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Organ*. 2007; **73**(3): 175-192.
- Jakob EM, Marshall SD, Uetz GW. Estimating fitness: A comparison of body condition indices. *Oikos*. 1996; **77**(1): 61-67.
- Kassambara A. Package "ggpubr". "ggplot2" based publication ready plots. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/ggpubr/ggpubr.pdf>. Accessed 4<sup>th</sup> October 2017.
- Kilpatrick AM, Briggs CJ, Daszak P. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trend Ecol Evol*. 2010; **25**(2): 109-118.
- Kingsolver JG, Huey RB. Size, temperature, and fitness: three rules. *Evol Ecol*. 2008; **10**: 251-268.
- Kruger KM, Pereoglou F, Hero JM. Latitudinal variation in the prevalence and intensity of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *Conserv Biol*. 2007; **21**: 1280-1290.
- Kühnel K-D, Geiger A, Laufer H, Podloucky R, Schlüpmann M. Rote Liste und Gesamtartenliste der Lurche (Amphibia) und Kriechtiere (Reptilia) Deutschlands. In: Haupt H, Ludwig G, Gruttke H, Binot-Hafke M, Otto C, Pauly A, editors. Rote Liste gefährdeter Tiere, Pflanzen und Pilze Deutschlands. Band 1: Wirbeltiere. Bundesamt für Naturschutz: Naturschutz und biologische Vielfalt. 2009; **70** (1). pp. 259-288
- Le Lay G, Angelone S, Holderegger R, Flory C, Bolliger J. Increasing pond density to maintain a patchy habitat network of the European tree frog (*Hyla arborea*). *J Herpetol*. 2015; **49**: 217-221.
- Levins R. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *American Entomologist*. 1969; **15**(3), 237-240.
- Levins R. Extinction. In M. Gerstenhaber (Hrsg.): *Some Mathematical Problems in Biology*: 1970; P. 77-107. Providence, R.I.: American Mathematical Society.
- Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*. 1999; **91**(2): 219-227.
- Longo AV, Burrowes PA, Joglar RL. Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism for persistence. *Dis Aquat Organ*. 2010; **92**(2-3): 253-260.

- Luquet E, David P, Léna J-P, Joly P, Konecny L, Dufresnes C, et al. Heterozygosity-fitness correlations among wild populations of European tree frog (*Hyla arborea*) detect fixation load. *Mol Ecol*. 2011; **20**: 1877-1887.
- Luquet E, Garner TW, Léna JP, Bruel C, Joly P, Lengagne T, Grolet O, Plénet S. Genetic erosion in wild populations makes resistance to a pathogen more costly. *Evolution*. 2012; **66**(6): 1942-1952.
- Martin LB, Hopkins WA, Mydlarz LD, Rohr JR. The effects of anthropogenic global changes on immune functions and disease resistance. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; **1195**(1): 129-148.
- Mazerolle M. Improving data analysis in herpetology: using Akaike's Information Criterion (AIC) to assess the strength of biological hypotheses. *Amph-Rept*. 2006; **27** (2): 169-180.
- McKinney ML. Effects of urbanization on species richness. A review of plants and animals. *Urban Ecosyst*. 2008; **11**: 161-176.
- Moehrensclager A, Macdonald DW. Movement and survival parameters of translocated and resident swift foxes *Vulpes velox*. *Anim Conserv*. 2003; **6**: 199-206.
- Møller AP, Christe P, Erritzøe J, Mavarez J. Condition, disease and immune defense. *Oikos*. 1998; **83**(2): 301-306.
- Mora C, Sale PF. Ongoing global biodiversity loss and the need to move beyond protected areas: a review of the technical and practical shortcomings of protected areas on land and sea. *Mar Ecol Prog Ser*. 2011; **434**: 251-266.
- Murray DL. Differential body condition and vulnerability to predation in snowshoe hares. *J Animal Ecol*. 2002; **71**(4): 614-625.
- Nadjafeh M, Buschmann H. Stärkung und Vernetzung von Gelbbauchunken-Vorkommen in Deutschland. *Rana*. 2014; **15**: 67-74.
- Newman D, Tallmon DA. Experimental evidence for beneficial fitness effects of gene flow in recently isolated populations. *Conserv. Biol*. 2001; **15**(4): 1054-1063.
- Nöllert A. Verbreitung, Ökologie und Schutz der Gelbbauchunke. *Naturschutzreport*. 1996; **11**: 1-260.
- O'Brien SJ, Evermann JF. Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *Trend Ecol Evol*. 1988; **3**(10): 254-259.
- Ohst, T, Gräser Y, Plötner J. *Batrachochytrium dendrobatidis* in Germany: distribution, prevalences and prediction of high risk areas. *Dis Aquat Organ*. 2013; **107**: 49-59.
- Oswald P, Taddey K, Kirchoff J, Brandt T, Pröhl H. Conservation genetics of a mirrored population of the European tree frog (*Hyla arborea*). *Salamandra*. 2017; **53**(3): 368-378.
- Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate. A simulation-based exploration of accuracy and power. *Mol Ecol*. 2004; **13**: 55-65.
- Parris MJ, Cornelius TO. Fungal pathogen causes competitive and developmental stress in larval amphibian communities. *Ecology*. 2004; **85**(12): 3385-3395.
- Pasmans F, Van Rooij P, Blooi M, Tessa G, Bogaerts S, Sotgiu G, et al. Resistance to chytridiomycosis in European plethodontid salamanders of the genus *Speleomantes*. *PloS One*. 2013; **8**(5): e63639.
- Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 2012; **28**: 2537-2539.
- Pearman PB, Garner TW. Susceptibility of Italian agile frog populations to an emerging strain of *Ranavirus* parallels population genetic diversity. *Ecol Lett*. 2005; **8**(4): 401-408.
- Petersen CE, Lovich RE, Phillips CA, Dreslik MJ, Lannoo MJ. Prevalence and seasonality of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* along widely separated longitudes across the United States. *EcoHealth*. 2016; **13**(2): 368-382.



- Pidancier N, Miquel C, Miaud C. Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians. *Herpetol J.* 2003; **13**(4): 175-178.
- Pilliod DS, Muths E, Scherer RD, Bartelt PE, Corn PS, Hossack BR, et al. Effects of amphibian chytrid fungus on individual survival probability in wild boreal toads. *Conserv Biol.* 2010; **24**(5): 1259-1267.
- Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JE. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia.* 2004; **96**(1): 9-15.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A. GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *J Heredity.* 2004; **95**: 536-539.
- Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MPL, Foster PN, et al. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature.* 2006; **439** (7073): 161-167.
- Preuss JF, Lambertini C, Leite DDS, Toledo LF, Lucas EM. Crossing the threshold: an amphibian assemblage highly infected with *Batrachochytrium dendrobatidis* in the southern Brazilian Atlantic forest. *Stud Neotrop Fauna Environ.* 2016; **51**(1): 68-77.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000; **155**: 945-959.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2008.
- Reed DH, Frankham R. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology.* 2003; **17**(1): 230-237.
- Rice WR. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution.* 1989; **43**(1): 223-225.
- Ruggeri J, Longo AV, Gaiarsa MP, Alencar LRV, Lambertini C, Leite DS, et al. Seasonal variation in population abundance and chytrid infection in stream-dwelling frogs of the Brazilian Atlantic Forest. *PLoS One.* 2015; **10**(7): e0130554.
- Savage AE, Sredl MJ, Zamudio KR. Disease dynamics vary spatially and temporally in a North American amphibian. *Biol Conserv.* 2011; **144**: 1910-1915.
- Schröder C, Pokorný I, Dolgener N, Herden C, Drews H, Tiedemann R. Allochthonous individuals in managed populations of the fire-bellied toad *Bombina bombina*. Genetic detection and conservation implications. *Limnologica - Ecol Manag Inland Waters.* 2012; **42**: 291-298.
- Searle CL, Gervasi SS, Hua J, Hammond JI, Relyea RA, Olson DH, Blaustein AR. Differential host susceptibility to *Batrachochytrium dendrobatidis*, an emerging amphibian pathogen. *Conserv Biol.* 2011; **25**(5): 965-974.
- Shin J, Bataille A, Kosch TA, Waldman B. Swabbing often fails to detect an amphibian chytridiomycosis under conditions of low infection load. *PLoS One.* 2014; **9**(10): e111091.
- Skerratt LF, Berger L, Speare R, Cashins S, McDonald KR, Phillott AD, et al. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth.* 2007; **4**(2): 125-134.
- Spielman D, Brook BW, Briscoe DA, Frankham R. Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease disease resistance? *Conserv Genet.* 2004a; **5**(4): 439-448.
- Spielman D, Brook BW, Frankham R. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004b; **101**(42): 15261-15264.
- Spitzen-van der Sluijs A, Martel A, Hallmann CA, Bosman W, Garner TWJ, Van Rooij P, et al. Environmental determinants of recent endemism of *Batrachochytrium dendrobatidis* infections in amphibian assemblages in the absence of disease outbreaks. *Conserv Biol.* 2014; **28**: 1302-1311.

- Spitzen-van der Sluijs A, Canessa S, Martel A, Pasmans F. Fragile coexistence of a global chytrid pathogen with amphibian populations is mediated by environment and demography. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 2017; **284**: 20171444.
- Stoffel MA, Esser M, Kardos M, Humble E, Nichols H, David P, et al. InbreedR: an R package for the analysis of inbreeding based on genetic markers. *Meth Ecol Evol.* 2016; **7**(11): 1331-1339.
- Storfer A. Gene flow and endangered species translocations. A topic revisited. *BiolConserv.* 1999; **87**: 173-180.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues AS, Fischman DL. et al. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science.* 2004; **306**(5702): 1783-1786.
- Stuckas H, Tiedemann R. Eight new microsatellite loci for the critically endangered fire-bellied toad *Bombina bombina* and their cross-species applicability among anurans. *Mol Ecol Notes.* 2006; **6**: 150-152.
- Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Beaumont LJ, Collingham YC. Extinction risk from climate change. *Nature.* 2004; **427**: 145-148.
- Tobler U, Borgula A, Schmidt BR. Populations of a susceptible amphibian species can grow despite the presence of a pathogenic chytrid fungus. *PLoS One.* 2012; **7**(4): e34667.
- Van Rooij P, Martel A, Haesebrouck F, Pasmans F. Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host-interactions. *Vet Res.* 2015; **46**(1): 137.
- Voyles J, Berger L, Young S, Speare R, Webb R, Warner J, et al. Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Dis Aquat Organ.* 2007; **77**(2): 113-118.
- Voyles J, Young S, Berger L, Campbell C, Voyles WF, Dinudom A, et al. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science.* 2009; **326**(5952): 582-585.
- Vredenburg VT, Knapp RA, Tunstall TS, Briggs CJ. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proc Natl Acad Sci.* 2010; **107**(21): 9689-9694.
- Wagner N, Neubeck C, Guicking D, Finke L, Wittich M, Weising K, et al. No evidence for effects of infection with the amphibian chytrid fungus on populations of yellow-bellied toads. *Dis Aquat Organ.* 2017; **123**(1): 55-65.
- Wake DB, Vredenburg VT. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 2008; **105**(Supplement 1): 11466-11473.
- Weihmann F, Podlucky R, Hauswaldt S, Pröhl H. Naturschutzgenetische Untersuchungen von Populationen der Gelbbauchunke (*Bombina v. variegata*) im südlichen Niedersachsen. *Z. Feldherpetol.* 2009; **16**: 183-200.
- Whitfield SM, Kerby J, Gentry LR, Donnelly MA. Temporal variation in infection prevalence by the amphibian chytrid fungus in three species of frogs at La Selva, Costa Rica. *Biotropica.* 2012; **44**(6): 779-784.
- Wickham H. *ggplot2: Elegant graphics for data analysis.* Springer New York. 2009.
- Wirsing AJ, Steury TD, Murray DL. Relationship between body condition and vulnerability to predation in red squirrels and snowshoe hares. *J Mammalogy.* 2002; **83**(3): 707-715.
- Woodhams DC, Alford RA, Marantelli G. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Dis Aquat Organ.* 2003; **55**: 65-67.
- Woodhams DC, Ardipradja K, Alford RA, Marantelli G, Reinert LK, Rollins-Smith LA. Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Anim Conserv.* 2007; **10**(4): 409-417.
- Woodhams DC, Bosch J, Briggs CJ, Cashins S, Davis LR, Lauer A, et al. Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Front Zool.* 2011; **8**(1): 8.

- Woodhams, DC, Brandt H., Baumgartner S, Kielgast J, Küpfer E., Tobler U, et al. McKenzie, V. Interacting Symbionts and Immunity in the Amphibian Skin Mucosome Predict Disease Risk and Probiotic Effectiveness. PLoS ONE. 2014; **9**(4), e96375.
- Woodhams DC, Hyatt AD, Boyle DG, Rollins-Smith LA. The Northern Leopard Frog *Rana pipiens* is a widespread reservoir species harboring *Batrachochytrium dendrobatidis* in North America. Herpetol Review. 2008; **39**(1): 66-68.