



UPPSALA
UNIVERSITET

Chytridiomykos - sjukdomen som hotar att utrota amfibierna



Sara Andersson

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2014
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Världens amfibier hotas av utrotning. Idag är 41% av jordens 7242 groddjursarter hotade enligt IUCNs rödlista. Ett av de största hoten mot ett flertal amfibiearter är chytridiomykos, en svampinfektion som drabbar groddjurens hud och har ofta dödlig utgång. Chytridiomykos orsakas av *Batrachochytrium dendrobatidis*, en pisksvamp som idag finns över stora delar av jorden. I detta arbete redogör jag för *B. dendrobatidis* ursprung, spridning samt hur svampen infekterar amfibierna och vilka symptom som uppstår hos de infekterade individerna. Jag sammanställer även de åtgärder som utvecklas och används för att försöka hindra en fortsatt spridning av chytridiomykos. Idag finns det ännu inte någon ultimata åtgärd mot sjukdomen. Flera lyckade försök har utförts under kontrollerade förhållanden i laboratoriemiljö där man med värmebehandlingar och svampdödande medel lyckats bota groddjur från chytridiomykos, dock har de försök som utförts i fält i amfibiernas naturliga miljö inte gett några större framgångar. Forskare har även funnit att vissa arter av amfibier producerar ämnen på sin hud som har en inhiberande verkan på *B. dendrobatidis* tillväxt och gör groddjuret resistent mot chytridiomykos. Denna upptäckt kan vara mycket viktig i arbetet att ta fram preventiva behandlingar mot chytridiomykos. Chytridiomykos och dess inverkan på amfibiepopulationer är ett aktivt forskningsfält och det utvecklas samarbetsprojekt mellan länder som ska arbeta förebyggande mot sjukdomens spridning. Det utförs även ökade arbetsinsatser för att göra allmänheten medveten om amfibiernas situation. Detta ger hopp om utveckling av framgångsrika åtgärder mot chytridiomykosens spridning.

Inledning

Fem gånger under jordens historia har massutdöenden ägt rum. Ett massutdöende inträffar då över 75% av jordens alla arter dör ut under en kortare tidsperiod (Barnosky *et al.* 2011). Flera forskare menar att ett sjätte massutdöende kommer drabba jorden inom en snar framtid eller att massutrotningen redan har inletts (Vitousek *et al.* 1997, Myers & Knoll 2001, Barnosky *et al.* 2011). Att arter dör ut är en naturlig del av evolutionen (Barnosky *et al.* 2011) men studier av Pimm *et al.* (1995) visar att arter idag dör ut 100 till 1000 gånger snabbare än vad de gjorde innan människan började dominera på jorden. Enligt Internationella naturvårdsunionens (IUCN) rödlistor är 13 % av jordens fågelarter och 25% av jordens däggdjur hotade (Birdlife International 2013) (IUCN 2013). Den värst drabbade djurgruppen är amfibierna där 41 % av arterna är hotade eller utrotade (IUCN 2013). Det finns även vissa risker för underskattningar i bedömningen av amfibiernas situation då för få studier har utförts på 9 % av arterna för att kunna uppskatta deras bestånd (IUCN 2013). Sedan 1500-talet har enbart 38 amfibiearter utrotats, vilket kan ge en uppfattning om att situationen inte är så allvarlig trots allt. Dock har nio av dessa utrotningar inträffat sedan 1980-talet vilket tyder på att det sker en acceleration av amfibiearters utdöende (IUCN 2008). Det finns även 120 amfibiearter som är listade som ötroligtvis utrotade under kategorin öakut hotad på IUCNs rödlista. Dessa arter har inte påträffats under en längre period men för få undersökningar har utförts för att kunna säkerställa att arterna verkligen är utrotade (IUCN 2008). De senaste åren har stora insatser gjorts för att få en klarare bild över amfibiernas tillstånd. Mellan år

2000 till 2013 ökade antalet kända hotade amfibier från 146 till 1950. Detta ska inte enbart ses som en faktiskt avspeglning av amfibiernas förvärrade situation över åren utan även som ett resultat av den ökade arbetsinsatsen som lagts på att kartlägga antalet hotade amfibier (IUCN 2013).

Uppmärksammandet av amfibiernas situation gjordes under 1970- och 80-talet då antalet amfibier minskade kraftigt i olika delar av världen (Stuart *et al.* 2004). I ett naturområde nära staden Monteverde i Costa Rica försvann 20 arter av grodor och paddor under en kort period i slutet av 80-talet. Detta motsvarade 40 % av den totala amfibiefaunan. Det som var ytterligare oroväckande var att dessa händelser observerades i skyddade områden som var orörda av människan (Pounds *et al.* 1997).

Idag är det känt att flera faktorer ligger till grund för hotet mot amfibierna. Ett av de största hoten är förstörelse och fragmentering av amfibiernas habitat (Davidson *et al.* 2001, Stuart *et al.* 2004). En majoritet av världens amfibiarter lever i länder med tropisk regnskog (Amphibiaweb 2014) och en stor del av denna miljö skövlas och exploateras av människan (Souza *et al.* 2013). Försurning av lekvatten och ansamlingar av giftiga föroreningar, som tungmetaller från gruvor och kvävegödsel från jordbruk, är också problem som drabbar amfibierna (Blaustein *et al.* 2003). Amfibier kan även drabbas av flera dödliga sjukdomar. De två allvarligaste sjukdomarna är ranavirus och chytridiomykos (Daszak *et al.* 1999). Ranavirus är en virusinfektion som invaderar och orsakar celldöd i flera av groddjurets organ. Synliga symptom hos groddjuret är bland annat hudrodnad, blödningar och uppsvullna lemmar. Ranavirus har orsakat kraftiga nedgångar i antalet amfibier i Europa, Asien och Nord- och Sydamerika (Gray *et al.* 2009). Mellan 2000 och 2005 orsakade ranavirus 43 % av de fall i USA där man observerade kraftigt minskande populationsstorlekar hos amfibier under en kort tid (Muths *et al.* 2006). Chytridiomykos är en svampinfektion som drabbar groddjurets hud och har ofta dödligt utgång. Sjukdomen har på senare tid fått en ökad spridning och flera forskare menar att chytridiomykos nu är det största hotet mot groddjuren (Skerratt *et al.* 2007). Pounds *et al.* (2006) föreslår att den ökade spridningen av chytridiomykos är ett resultat av den globala uppvärmningen. Detta efter att Pounds *et al.* (2006) observerat ett signifikant samband mellan ökande temperaturer och minskningar i antalet amfibier. Hotet från chytridiomykos har tydligt visats hos den troligtvis utdöda grodarten *Taudactylus acutirostris*. Dess populationer i Afrika och Australien fick plötsligt kraftiga nedgångar under 1980-talet och den sista levande individen påträffades 1997. Studier av hudprover från döda individer visade att populationsminskningen var en följd av chytridiomykos (Schloegel *et al.* 2006).

Syftet med detta arbete är att förklara vad chytridiomykos är samt att göra en sammanställning över vilka metoder som idag utvecklas för att försöka hindra infektionens spridning och på så sätt arbeta för att kunna säkerställa amfibiernas bevarande och fortlevnad. Jag kommer även diskutera den globala uppvärmningens påverkan på chytridiomykosens spridning samt kort redogöra för chytridiomykosens situation i Sverige.

Amfibier

Amfibier (Amphibia) är en djurklass med stor diversitet som har funnits på jorden i ca 360 miljoner år (Halliday *et al.* 1986). Idag finns 7242 kända arter av amfibier. Dessa är uppdelade i tre underklasser; Anura - stjärtlösa groddjur (grodor och paddor), Caudata - stjärtgroddjur (salamandrar) och Gymnophiona ó lemlösa groddjur (maskgroddjur). Anura är den största underklassen med 6384 arter, Caudata består av 659 arter och minst är Gymnophiona, bestående av 199 arter (Amphibiaweb 2014).

De flesta amfibier lever både i vatten och på land. Amfibiers ägg, som saknar skal, måste placeras i vatten eller en annan fuktig miljö för att inte torka ut. När äggen sedan kläcks lever amfibierna under det första stadiet av sin livscykel som yngel i vatten innan de genomgår en metamorfos och utvecklar lemmar och kan då vandra upp på land. Amfibier måste även hålla sin hud fuktig för att överleva som adulta individer (Pough *et al.* 2004). Huden är ett vitalt organ hos amfibier och den är, till skillnad från huden hos de flesta kräldjur, mjuk och permeabel. Detta gör att amfibierna kan absorbera vatten och utföra gasutbyte med omgivningen. Om huden inte hålls fuktig torkar den snabbt ut, vilket leder till att gasutbytet upphör och groddjuret dör inom några timmar. På huden hos ett flertal amfibier finns även körtlar som producerar slem och gift, vilket är ett viktigt försvar mot predatorer (Pough *et al.* 2004).

Chytridiomykos

Chytridiomykos orsakas av *Batrachochytrium dendrobatidis*, en svamp tillhörande klassen chytridiomyceter. *B. dendrobatidis* beskrevs första gången av Longcore *et al.* (1999). Chytridiomyceter tillhör pisksvampar (Chytridiomycota), ett fylum av svampar som finns över hela jorden. Pisksvampar utmärks av att deras sporer är mycket små och utrustade med en flagell, vilket gör att sporererna har den unika förmågan att kunna vara mobila i vatten. Sporer av denna sort kallas zoosporer. Chytridiomyceter lever både i terrestra miljöer och i vatten där svampen ofta agerar som nedbrytare (Nationalencyklopedin 2014). *B. dendrobatidis* lever på att bryta ned keratin (Marantelli *et al.* 2004). Man finner även chytridiomyceter som parasiterar på flera organismer, bl.a. alger, växter, nematoder och insekter (Nationalencyklopedin 2014). *B. dendrobatidis* är den första chytridiomyceten man funnit som parasiterar på en vertebrat (Berger *et al.* 1998).

Zoosporerna från *B. dendrobatidis* påbörjar utvecklingen till ett sporgömme genom att kapsla in sig. Zoosporen tillbakabildar sin flagell och bildar en rigid cellvägg som innesluter sporen (Berger *et al.* 2005a). Därefter initieras utvecklingen av små rhizoider som används för att ge sporen fäste och möjlighet att ta näring från sin omgivning. När detta, tidigt utvecklade, sporgömme sedan tillväxer blir dess cytoplasma allt mer komplex och inuti bildas ett flertal cellkärnor genom mitos. Hela cytoplasman klyver sig sedan och bildar små zoosporer. Det har nu utvecklats till ett moget zoosporgömme. Under utvecklingen bildas även blockerade kanaler i sporgömmets cellvägg. När zoosporerna är färdigutvecklade löses blockaden upp och sporererna släpps ut (Figur 1) (Berger *et al.* 2005a). På grodhud har man observerat hur

bakterier utnyttjar de tömda sporgömmena genom att använda dem som plats för replikering (Berger *et al.* 2005a).

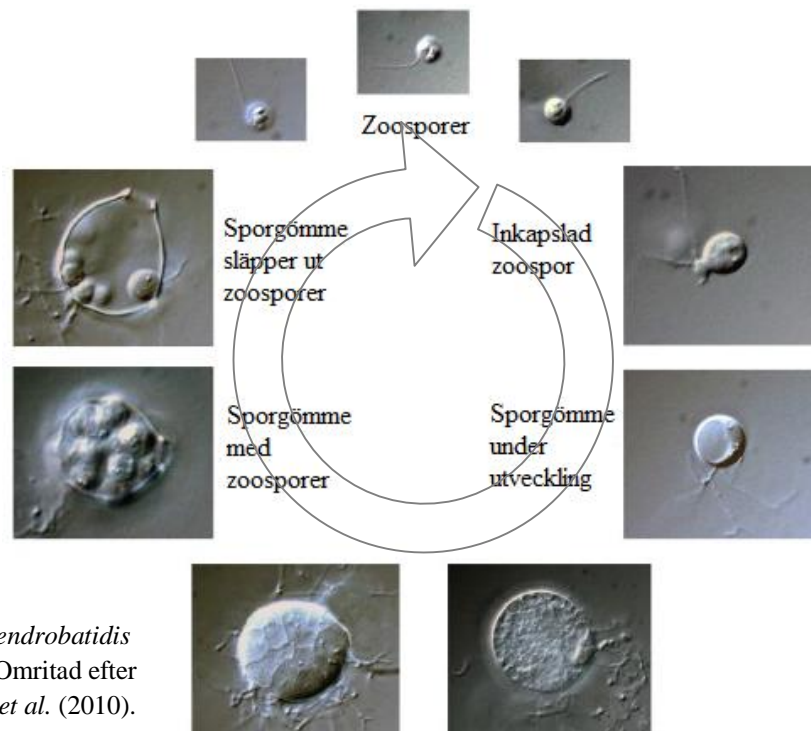


Fig 1. *B. dendrobatidis* livscykel. Omritad efter Kilpatrick *et al.* (2010).

Första upptäckten av chytridiomykos

Under 80- och början av 90-talet minskade antalet amfibier i regnskogarna i östra Australien kraftigt. Fjorton arter som tidigare observerats försvann helt eller minskade i antal med över 90 % (Laurance *et al.* 1996). Under samma period inträffade liknande händelser i västra Panama där tio amfibiearter plötsligt slutade påträffas under inventeringar (Berger *et al.* 1998). Ytterligare alarmerande var att båda dessa händelser inträffade i naturreservat (Berger *et al.* 1998). Studier av insamlade döda individer visade att huden var kraftigt tillväxt och vid elektronmikroskopi hittades spår av zoosporer i den tillväxta huden. DNA-analys visade att sporena var från en chytridiomycet och forskarna kunde då dra slutsatsen att den plötsligt nedåtgående trenden i beståndet av amfibier troligtvis var ett resultat av en dödlig svampinfektion (Berger *et al.* 1998).

Batrachochytrium dendrobatidis ursprung

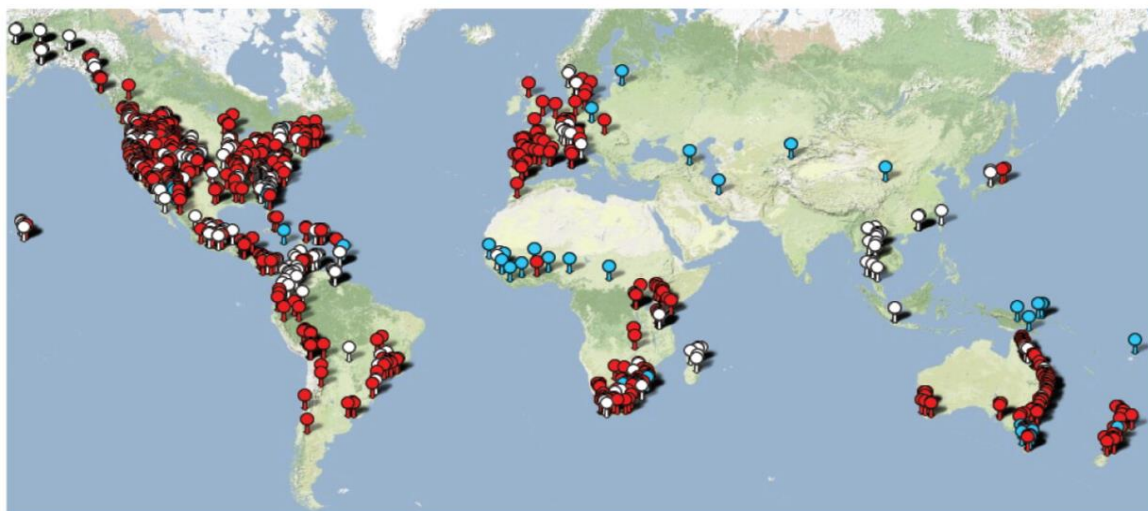
Då *B. dendrobatidis* är vanligt förekommande hos amfibier i flera länder i Afrika, samt att det har exporterats ett stort antal groddarter från Afrika till flera delar av världen under 1900-talet (Weldon *et al.* 2007), föreslog forskare att *B. dendrobatidis* härstammade från Afrika (Weldon *et al.* 2004). För att testa denna hypotes undersökte Weldon *et al.* (2004) hudprov från 697 konserverade exemplar av *Xenopus gilli*, *X. muelleri*, och *X. laevis* som samlats in i olika områden i södra Afrika mellan 1897 till 1999. Resultatet visade att ett exemplar av *X. laevis* (afrikansk klogroda) från 1938 bar på det som utgör det tidigast noterade fallet av chytridiomykos (Weldon *et al.* 2004). Svampen har sedan kunnat spridas till stora delar av

världen då det under 1930-talet exporterades ett omfattande antal av just *X. laevis* från Afrika (Weldon *et al.* 2007). Grodorna användes som graviditetstest hos människor. Urin från en kvinna injicerades in i bukhålan på grodan. Om grodan började ovulera tydde detta på att kvinnan var gravid, då hormoner från urinet påverkade grodan (Shapiro & Zwarenstein 1934, refererad i Weldon *et al.* 2004). Klogrodan började även användas som vetenskaplig modellorganism under 1970-talet och blev under 1990-talet den mest använda modellorganismen för amfibier och är så än idag (Major & Wassersug 1998). Fortfarande sker en stor handel av amfibier vilket försvårar kontrollen av chytridiomykos (Schlaepfer *et al.* 2005). Bortsett från Antarktis, där det inte lever några amfibier (Amphibiaweb 2014), finns chytridiomykos på jordens alla kontinenter (Tabell 1) (Figur 2).

Tabell 1. Sammanställning av de första kända fallen av chytridiomykos på respektive kontinent.

År	Kontinent	Referenser ¹
1938	Afrika	(Weldon <i>et al.</i> 2004)
1961	Nordamerika (Kanada)	(Ouellet <i>et al.</i> 2005)
1978	Oceanien (Australien)	(Berger <i>et al.</i> 1999)
1983	Centralamerika (Mexiko)	(Rollins-Smith <i>et al.</i> 2002)
1986	Sydamerika (Venezuela)	(Weldon <i>et al.</i> 2004)
1997	Europa (Spanien)	(Bosch <i>et al.</i> 2001)
1999	Oceanien ² (Nya Zeeland)	(Waldman <i>et al.</i> 2001)
2006	Asien (Japan)	(Une <i>et al.</i> 2008)

¹Notera att många fall har upptäckts långt efter man funnit den infekterade individen. Det kan bero på att man först senare har kunnat koppla chytridiomykos till dödsfallen eller att man senare har analyserat hud hos bevarade exemplar. ²Oceanien nämns två gånger då det kan vara intressant att se tidsintervallet mellan dessa två upptäckter.



📍 Område som testats positivt för Bd
📍 Område som testats negativt för Bd (Exakt plats)
📍 Område som testats negativt för Bd (Ungefärlig plats)

Fig. 2 Karta över *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) kända utbredning över världen idag. Modifierad från (Bd-Maps 2014)

Hur infekteras groddjuret?

Batrachochytrium dendrobatidis infekterar de keratiniserade vävnaderna i huden hos groddjur (Berger *et al.* 1998, Berger *et al.* 2005b). Keratin är ett fibröst protein som utgör de stödjande filamenten i de yttre hudcellerna (Nationalencyklopedin 2014). Hos grodyngel är det endast mundelarna som innehåller keratin och således är det endast där infektionen av chytridiomykos sker. Infektionen är dock inte dödlig hos grodyngel, vilket gör dem till potentiella smittspridare (Berger *et al.* 1998). Vid studier har man sett hur chytridiomykosen sprider sig från mundelarna till huden i takt med att grodynglet genomgår metamorfos och utvecklar den keratiniserade huden (Marantelli *et al.* 2004). Zoosporer från *B. dendrobatidis* fäster till groddjurs hud och bildar sporrör som penetrerar huden (Greenspan *et al.* 2012). Zoosporen för sedan över sitt cellulära innehåll till en cell i djuret. Exakt hur detta sker är inte känt (Greenspan *et al.* 2012). Cellen bildar sedan ett sporgömme som producerar nya zoosporer (Figur 3), vilka sedan släpps ut från sporgömmet och rör sig antingen mot utsidan av värdens hud för att spridas till nya värdar eller så rör sig sporen till intercellulära utrymmen där den infekterar nya värdceller (Berger *et al.* 2005a).

Alla amfibiearter infekteras dock inte av chytridiomykos. Den afrikanska klogrodan (*X. laevis*) är ett exempel på en art som inte infekteras men som ändå kan agera smittbärare då grodan fortfarande kan bära på sporer från *B. dendrobatidis* (Weldon *et al.* 2004).

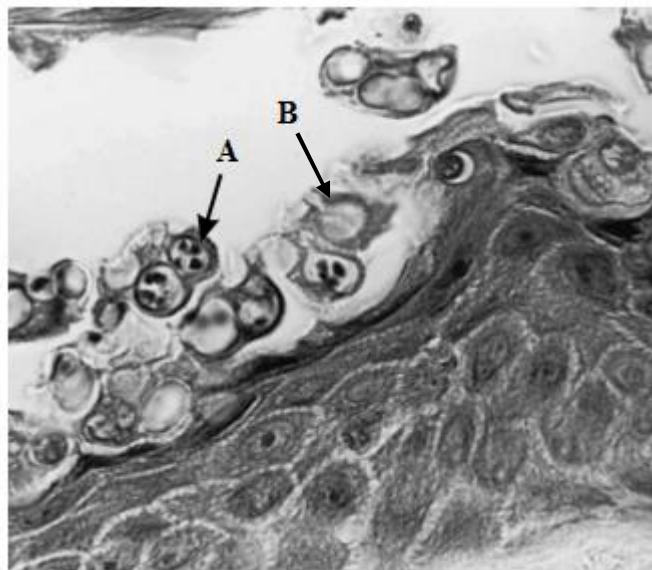


Fig. 3. Hudprov från en korallfingerroda (*Litoria caerulea*) drabbad av chytridiomykos. A) Sporgömme innehållande zoosporer. B) Tömt sporgömme med synlig kanal där zoosporerna har släppts ut. Omritad efter Berger *et al.* (2005a).

Infektionens uttryck hos amfibier

Hos en infekterad amfibi är huden uppsvälld och ömsas i en onaturligt stor mängd (Nichols *et al.* 2001, Berger *et al.* 2005a). Färgen hos den infekterade huden förändras och groddjuret kan drabbas av anorexi och erhålla långsamma reflexer (Nichols *et al.* 2001). Hos infekterade amfibier med lemmar kan det även observeras att dess bakben befinner sig i en onormal

position (Figur 4). Detta sker oftast kort innan individen dör (Daszak *et al.* 1999). Under experimentella förhållanden dör den infekterade amfibien vanligtvis 18 ó 70 dagar efter inkubationstillfället (Berger *et al.* 2005a).

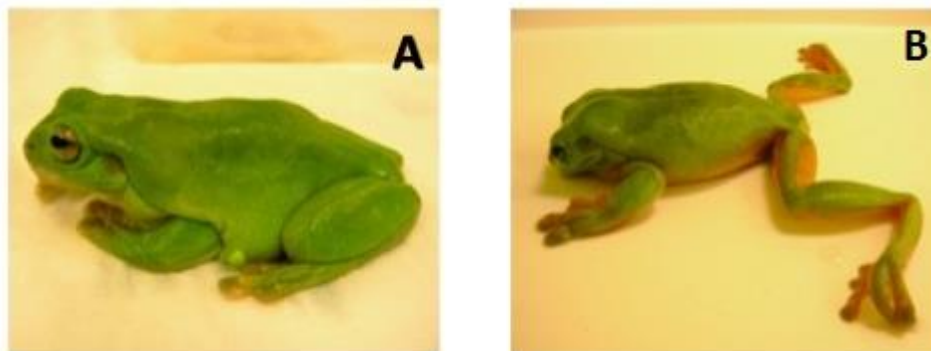


Fig. 4 A) En frisk korallfingergroda. (*Litoria caerulea*) B) En groda av samma art infekterad av chytridiomykos där man tydligt kan se bakbenens onormala position . Modifierad från Voyles *et al.* (2009).

Då huden sväller upp stoppas flera av de vitala transporterna som sker mellan huden och omgivningen. Det har därför varit svårt att avgöra vad som är den ultimata dödsorsaken av chytridiomykos hos amfibier. Undersökningar har visat att störningen av elektrolyttransporten över huden, vilket rubbar den osmotiska balansen, är den primära dödsorsaken (Voyles *et al.* 2009). För att upprätthålla sin osmotiska balans måste amfibier aktivt transportera joner mellan sin insida och omgivningen (Pough *et al.* 2004). Voyles *et al.* (2009) visade att denna transport minskade med 50% hos infekterade individer. Detta resulterade i en störning av den elektriska aktiviteten i hjärtat. Denna störning orsakade i sin tur hjärtstillestånd hos amfibierna.

Metoder för att hindra fortsatt spridning av chytridiomykos

Woodhams *et al.* (2011) menar att det ej bör vara ett mål i sig att helt utrota *B. dendrobatidis* då patogenen är mycket opportunistisk och visar på god anpassningsförmåga när den utsätts för påfrestningar. *B. dendrobatidis* har exempelvis visat sig kunna bilda biofilmer när svampen har odlats i kultur. Detta tyder på att *B. dendrobatidis* även kan ha möjlighet att bilda biofilmer under naturliga förhållanden för att motstå påfrestande förändringar i klimatet (Woodhams *et al.* 2010). *B. dendrobatidis* tillväxer optimalt i temperaturer mellan 17-25°C. I temperaturer över 30 °C slutar svampen tillväxa och dör till slut (Longcore *et al.* 1999). Woodhams *et al.* (2008) visade att svampens zoosporgömmen tillväxer och mognar fortare i högre temperaturer (17-25°C) men kunde även se att *B. dendrobatidis* sporgömmen producerade fler zoosporer under lägre temperaturer (7-10°C). Detta tyder på att det sker en trade-off mellan zoosporgömmets mognadshastighet och dess fekunditet då temperaturen i svampens omgivning förändras. Detta visar att *B. dendrobatidis* är välanpassad för att kunna hantera temperaturvariationer (Woodhams *et al.* 2008). Istället för att försöka arbeta för att utrota denna opportunistiska patogen menar Woodhams *et al.* (2011) att det istället bör

utvecklas metoder som låter amfibier och *B. dendrobatidis* att samexistera.

Idag finns det inte någon ultimata metod för att förhindra chytridiomykosens spridning. De metoder som används baseras främst på dessa två grundläggande strategier (Woodhams *et al.* 2011).

1. Hindra *B. dendrobatidis* spridning genom att anpassa habitat och amfibiepopulationer och göra dem till ofördelaktiga miljöer för svampen.
2. Behandla groddjur preventivt mot infektionen eller behandla groddjur som redan drabbats av chytridiomykos.

Här följer ett antal metoder som grundas i dessa två strategier.

Minskning av antalet mottagliga värdar i en population

Vanligtvis sprider sig sjukdomar lättare i stora och täta populationer (McCallum *et al.* 2001). Det har även visat sig finnas liknande tendenser för spridningen av *B. dendrobatidis* i amfibiepopulationer (Rachowicz & Briggs 2007). För att minska risken för sjukdomsspridning kan populationen gallras på individer som är extra mottagliga för sjukdomen. Detta kan exempelvis vara gamla individer (Woodhams *et al.* 2011).

Behandling av djur och habitat

Genom att behandla infekterade djur eller habitat kan risken minskas för fortsatt utbredning av sjukdomen (Woodhams *et al.* 2011). Försök har gjorts *in vitro* där man studerat *B. dendrobatidis* respons mot olika behandlingar. Desinfektionsmedel, stark UV-strålning, uttorkning och värmebehandling prövades av Johnson *et al.* (2003). Flera av de kemiska substanserna var effektiva, likaså uttorkningen och värmebehandlingen. UV-strålningen var dock ineffektiv som behandlingsmetod (Johnson *et al.* 2003). Andra försök har också visat att just värmebehandling är en effektiv metod. Woodhams *et al.* (2003) behandlade infekterade grodor (*Litoria chloris*) i 37 °C i 16 timmar vilket resulterade i att individerna blev helt fria från infektion. Även Chatfield och Richards-Zawacki (2011) samt Woodhams *et al.* (2012) lyckades bota groddjur med värmebehandlingar. En ytterligare metod är att behandla grodor med itraconazole (Garner *et al.* 2009). Itraconazole är ett läkemedel mot svampinfektioner som används i medicinskt bruk hos människor (Medicinenet 2014). Itraconazole har dock visat sig vara toxiskt för adulta individer vilket indikerar på att en annan lösning bör hittas (Woodhams *et al.* 2012). Det finns även risker för att *B. dendrobatidis* utvecklar resistens mot itraconazole (Ferreira *et al.* 2004).

Återintroducering av selekterade individer

Vid insamling av individer från ett sjukdomsdrabbat område finns det möjlighet att selektera på egenskaper kopplade till hög motståndskraft mot sjukdomen. Dessa individer kan sedan användas för att avla fram nya generationer som bär gener för en högre tolerans mot sjukdomen. Den nya generationen placeras sedan ut på ursprungsplatsen där de tidigare generationerna fångades in (Woodhams *et al.* 2011). En möjlighet är att välja ut individer som producerar en större mängd av antimikrobiella peptider (AMP) som produceras hos vissa

arter av amfibier. Dessa peptider utsöndras ur slemkörtlarna som finns på huden hos amfibien. Undersökningar har visat att AMP stoppar tillväxten av *B. dendrobatidis* *in vitro* (Woodhams *et al.* 2007). Det finns även vissa arter som lever symbios med bakterier som finns på groddjurens hud och producerar metaboliter som inhiberar *B. dendrobatidis* tillväxt och gör amfibien resistent mot chytridiomykos. Ett exempel är *Janthinobacterium lividum*, en proteobakterie som lever på huden hos bland annat *Plethodon cinereus* (rödryggad salamander). Denna bakterie producerar violacein, en svampdödande metabolit som resulterar i att amfibien i högre grad överlever chytridiomykos (Becker *et al.* 2009). Problem som kan uppstå vid dessa metoder är att de framavlade generationerna utvecklar olika anpassningar till laboratoriemiljö vilket leder till reducerad fitness när de sedan återförs till naturliga förhållanden. Hos andra djur har man exempelvis sett hur vissa arter efter ett antal generationer i fångenskap producerar ägg med mindre storlek eller utvecklar en tidigare könsmognad. Detta kan ge stora svårigheter när de återintroduceras till sina naturliga miljöer där det finns risk för att de mindre äggen inte klarar av de påfrestningar som de utsätts för i naturen. Den förändrade könsmognaden kan också skapa problem då detta kan leda till att arten reproducerar sig vid tidpunkter på året som inte är lämpade för avkommans överlevnad (Frankham 2007).

Immunisering av potentiella värdar

Att förstärka amfibiernas immunförsvar genom vaccinering kan resultera i att en infektion dämpas eller stoppas helt (Woodhams *et al.* 2011). Försök har redan gjorts där man har studerat mängden zoosporer som behövs för att infektionen av chytridiomykos ska bli dödlig (Carey *et al.* 2006). Longcore *et al.* (1999) observerade att enstaka zoosporer eller mycket små sporgömmen ofta inte tillväxer och fortsätter sin utveckling. Denna kunskap kan användas till att producera ett vaccin som hindrar zoosporerna från att tillväxa till en sådan storlek att de förökar sig (Woodhams *et al.* 2011).

Skyddade habitat

En metod för att hindra spridningen av chytridiomykos är att bilda skyddade habitat där chytridiomykosen inte kan få fäste. De skyddande faktorerna kan vara antingen en miljö som inte tillåter sjukdomen att sprida sig, eller en miljö som gör amfibierna mer resistent (Woodhams *et al.* 2011). I Costa Rica har studier visat att chytridiomykos oftare har dödlig utgång när infektionen drabbar populationer som lever på höga höjder. Amfibier på högre altituder infekterades allvarligt av chytridiomykos vilket nästan drev de lokala populationerna till utrotning. Samma amfibiarter som levde på lägre höjder kunde samexistera med *B. dendrobatidis* utan att de blev infekterade av chytridiomykos (Puschendorf *et al.* 2006). Denna upptäckt kan användas för att bilda lämpliga habitat där amfibier kan samleva med *B. dendrobatidis*.

Naturlig kontroll av svampsporor genom predation

Det finns naturliga predatorer av svampsporor. Både Kagami *et al.* (2004) och Searle *et al.* (2013) visar att mängden zoosporer i vattensamlingar minskar i närvaron av vattenloppor (*Daphnia*). Det tyder på att zooplankton skulle kunna användas för att kontrollera spridningen av *B. dendrobatidis*. Försöken har dock gjorts i laboratoriemiljö och det är inte

bekräftat om zooplankton prederar på *B. dendrobatidis* svampsporer då det finns annan föda tillgänglig (Woodhams *et al.* 2011).

Metoder som prövats i fält

I Spanien 1997 inträffade det första kända europeiska fallet av chytridiomykos som infekterade en population av *Alytes obstetricans* (barnmorskegroda) (Bosch *et al.* 2001). Sjukdomen drabbade nationalparken Peñalara där 30 av 35 dammar helt förlorade sina lokala populationer av grodor. I tre av de återstående fem dammarna hade populationerna minskat kraftigt (Bosch *et al.* 2001). Man fann tusentals döda eller döende grodor som befann sig i utvecklingsstadier men inga döda eller sjuka adulta individer kunde hittas. Detta resulterade i att undersökningar var tvungna att utföras på grodyngel (Woodhams *et al.* 2011). Infekterade grodyngel värmebehandlades i 21• C och blev helt fria från infektion. Efter detta framgångrika resultat insamlades samtliga grodyngel som kunde hittas och värmebehandlades. Efter att ynglena utvecklats till adulta individer släpptes de tillbaka till platsen där de tidigare samlats in (Woodhams *et al.* 2011). Metoden var dock inte så framgångsrik. År 2008 var populationsstorleken så liten att man bestämde sig för att fånga in de individer som kunde hittas och bevara dem i laboratoriemiljö i förebyggande syfte om den vilda populationen skulle utrotas (Woodhams *et al.* 2011). Det finns dock en chans att de infångade grodorna var individer som lyckats utveckla en resistens mot chytridiomykos. Detta gör dem lämpliga för att avla fram fler generationer som sedan kan återintroduceras till ursprungsområdet (Woodhams *et al.* 2011).

Kruger och Hero (2007) har visat att *B. dendrobatidis* oftare finns i vattensamlingar som är vattenfyllda året om, jämfört med de vattensamlingar som torkar ut under vissa perioderna av året. Denna upptäckt har väckt idén att aktivt tömma vattensamlingar en gång om året för att eliminera *B. dendrobatidis*. Metoden bör ej vara skadlig för amfibierna om den utförs under den period på året då grodynglen har utvecklats till adulta individer och amfibierna inte längre är helt beroende av att leva i vatten. Det finns dock arter som är beroende av vattensamlingar året om. Hos vissa arter övervintrar adulta individer på botten av sjöar och dammar. Detta visar att metoden inte är lämplig för alla amfibiearter (Woodhams *et al.* 2011). Metoden har prövats i de områden på Mallorca där den hotade grodarten *Alytes muletensis* (balearisk barnmorskegroda) lever (Kraaijeveld-Smit *et al.* 2005). Under en period av sex månader samlades alla grodyngel in för att behandlas med itraconazole i laboratorium. Sedan tömdes dammarna på vatten för att förhoppningsvis eliminera de zoosporer av *B. dendrobatidis* som befann sig i vattnet. När dammarna sedan åter fyllts av regn placerades de behandlade grodynglen tillbaka på den plats där de fångats in. Senare studier visade dock att de grodor som återintroducerats åter igen infekterades av *B. dendrobatidis*. Infektionen var dock inte lika kraftigt som den tidigare (Woodhams *et al.* 2011).

I nationalparken Rocky Mountain i Colorado, USA, har paddan *Bufo boreas boreas* länge levt men är nu hotad till följd av chytridiomykos (Muths *et al.* 2003). För att försöka bevara arten startades 2007 ett projekt där man samlade in paddor från området och födde upp dem i

laboratoriemiljö. Nya generationer avlades fram och återintroducerades sedan till utvalda områden. Områdena valdes ut efter noggranna studier utifrån huruvida platserna påverkades av människan och beroende på hur pass livskraftig den tidigare populationen av paddor varit på platsen. Man försökte även säkerställa att områdena var fria från chytridiomykos (Woodhams *et al.* 2011). Ett litet antal adulta individer sattes ut och märktes för att veckovis kontrolleras om de infekterades av chytridiomykos. Vid kontroller fann man spår av *B. dendrobatidis* hos ca 30% av individerna vilket indikerade att chytridiomykos fortfarande var närvarande i flera av de områden som valts ut. Under perioden 2007 ó 2009 har över 14 000 grodyngel släppts ut i områdena. Vid undersökningar 2009 hittades dock endast ett litet antal av ett- och tvååriga individer. Det beslutades då att fortsätta återintroduktioner ska genomföras men stor vikt då ska läggas vid att försöka kvantifiera just hur framgångsrik metoden är (Woodhams *et al.* 2011).

Chytridiomykos i Sverige

Chytridiomykos påträffades för första gången i Sverige år 2006 då forskare fann infektionen hos laboratoriedjur i Lund. De första fallen av chytridiomykos hos vilda populationer påvisades hos klockgroda (*Bombina bombina*), grönfläckig padda (*Bufo viridis*) och vanlig padda (*B. bufo*) år 2010 i Skåne och Blekinge. Chytridiomykosens situation i Sverige är ännu bristfälligt studerad. Det råder oklarheter om hur länge sjukdomen har funnits i Sverige och om det finns möjligheter att chytridiomykos skulle kunna ha funnits i landet under längre tid men utan att skada amfibier (Hallengren 2012). De direkta åtgärder som vidtagits är en större medvetenhet kring hantering av prover och rutiner i fält för att minska risken för spridning av chytridiomykos. Anders Hallengren på Länsstyrelsen i Skåne föreslår att Sverige bör söka samarbete med övriga institutioner i Europa som arbetar med chytridiomykos och som har större erfarenhet av att hantera sjukdomen (Hallengren 2012). Riskbedömning av Chytridiomykos hos Europeiska Amfibier (RACE) är ett samarbetsprojekt som övervakar och riskbedömer chytridiomykosens situation i Europa. RACE hjälper även till i europeiska länder som har bristfälliga resurser för att hantera chytridiomykos eller som har en dålig överblick över tillståndet hos sina inhemska amfibiearter (Hallengren 2012).

Diskussion

Tidigare har förstörelse och fragmentering av habitat setts som det enskilt största hotet mot amfibier men idag tyder mycket på att chytridiomykos är ett minst lika stort hot (Stuart *et al.* 2004). Chytridiomykos har på flera platser i världen skapat kraftiga och plötsliga minskningar av antalet amfibier (Laurance *et al.* 1996, Berger *et al.* 1998, Stuart *et al.* 2004) och har även på vissa platser helt utrotat arter (Schloegel *et al.* 2006). Trots en ökad medvetenhet om chytridiomykosens existens sedan början av 2000-talet (Skerratt *et al.* 2007) har man inte lyckats stoppa dess spridning vilket har resulterat i att den idag finns på jordens alla kontinenter (Bd-Maps 2014). Då det ännu finns stora områden som inte har undersökts, enligt Bd-Maps (2014), är dessutom omfattningen av *B. dendrobatidis* utbredning fortfarande

oklar. *B. dendrobatidis* har i undersökningar visat sig ha en god anpassningsförmåga till temperaturvariationer, vilket visar att den kan vara motståndskraftig då den utsätts för påfrestningar (Woodhams *et al.* 2008, Woodhams *et al.* 2011). Detta styrks även av resultaten från metoder som har prövats i fält och som tyvärr inte visat sig vara framgångsrika (Woodhams *et al.* 2011). Det verkar ännu inte finnas någon bra anpassad åtgärd som hindrar spridningen av chytridiomykos. De åtgärder mot chytridiomykos som utförs idag är främst fokuserade på insamlingar av infekterade individer som behandlas med värme (Johnson *et al.* 2003, Chatfield & Richards-Zawacki 2011, Woodhams *et al.* 2011) eller itraconazole (Garner *et al.* 2009, Woodhams *et al.* 2011) och sedan återintroduceras till sin ursprungliga miljö. Itraconazole verkar dock vara en ohållbar behandlingsmetod då den visat sig vara toxisk för adulta individer (Woodhams *et al.* 2012) och det finns risker för en utvecklad resistens hos *B. dendrobatidis* (Ferreira *et al.* 2004).

En metod som jag tror kan vara framgångsrik är selektion och utplacering av individer som producerar en stor mängd AMP eller violacein, vilket föreslås av Woodhams *et al.* (2011). Både AMP och violacein har i laboratorieförsök visat sig inhibera *B. dendrobatidis* tillväxt och dessutom produceras de svampdödande ämnena helt naturligt hos amfibier. Detta kan dock inte vara en allmän metod då dessa ämnen inte produceras hos alla arter men har ändå en potential att minska *B. dendrobatidis* spridning inom vissa områden.

Den framtida spridningen av *B. dendrobatidis* är svår att förutse. Enligt Pounds *et al.* (2006) finns ett tydligt samband mellan de minskade amfibiepopulationerna och den ökande globala temperaturen. Pounds *et al.* (2006) föreslår att detta beror på *B. dendrobatidis* ökade tillväxt i högre temperaturer (17 - 25°C) (Longcore *et al.* 1999). Innebär detta att vi kommer se en ökad spridning av chytridiomykos i framtiden då vi får ett varmare klimat? Resultat av Woodhams *et al.* (2008) tyder dock på att *B. dendrobatidis* lättare kan sprida sig i lägre temperaturer (7-10°C) då svampens sporgömmen producerar fler zoosporer och släpper ut dem tidigare. Detta kan även styrkas av Puschendorf *et al.* (2006) som visade att chytridiomykos drabbade amfibier i en större omfattning på höga altituder. Dessa undersökningar gjordes dock i ett tropiskt område där det ofta ligger dimma över de högre altituderna. Dimman kan ge *B. dendrobatidis* en fuktig miljö att sprida sig i. En förhöjd temperatur ger en ökad bildning av dimma och kan i detta fall ge möjlighet för en större utbredning av *B. dendrobatidis*.

En förhöjd temperatur kan ge ökad torka på andra plaster, vilket skulle försämra *B. dendrobatidis* förmåga till spridning. Det är även så att *B. dendrobatidis* helt slutar tillväxa och dör om den utsätts för alltför höga temperaturer (> 30°C) (Woodhams *et al.* 2003). Pounds *et al.* (2006) föreslår att en ökad temperatur och ett torrare klimat även påverkar amfibier negativt och utsätter dem för stress som ger dem ett minskat immunförsvar och gör dem mer mottagliga för chytridiomykos.

Varför ska vi bevara amfibier?

Amfibier har en betydande roll i våra ekosystem. De utgör en viktig del av näringskedjan där de är betydelsefulla som både predatorer och byten (Stebbins & Cohen 1995). Då amfibier är

ektoderma djur behöver de inte allokera energi för att reglera kroppsvärmen. Istället kan amfibier snabbt omsätta energi från födan till att producera mer kroppsmassa. Detta gör dem till energirik föda för exempelvis ormar, fiskar, däggdjur eller fåglar (Stebbins & Cohen 1995). Då amfibier är mycket diversa och varje art är specifikt anpassad till sin miljö blir de känsliga för förändringar i miljön. De har även flera egenskaper som gör att de kommer i direkt kontakt med sin omgivning. Amfibiers ägg, som saknar skal, ligger vatten under en längre period och groddjurens hud är permeabel. Detta gör amfibierna till viktiga indikatorer för miljöförändringar (Blaustein & Wake 1995) och kan på så sätt vara användbara för oss människor.

Amfibiernas utrotning skulle vara det största utdöende som skett på 65 miljoner år, då dinosaurierna dog ut (Barnosky *et al.* 2011). Detta skulle troligtvis betyda stora förändringar för våra ekosystem som vi ännu inte kan förutse. Därför är det viktigt att det snabbt genomförs bevarandeåtgärder innan amfibiernas populationer blir så små att de inte längre är livskraftiga. De inte så lovande resultaten från forskarna (Woodhams *et al.* 2011) och dystra siffrorna från IUCNs rödlista kan ge en känsla av uppgivenhet och då även resultera i att ingenting görs. Flera metoder som utförts i laboratorium har dock givit framgångsrika resultat och det är också viktigt att notera att chytridiomykos är ett förhållandevis nytt fenomen i många länder vilket ger förhoppningar om att det förebyggade arbetet mot chytridiomykos fortfarande är under utveckling. Amfibiernas situation har uppmärksamats mycket under de senaste åren och flera organisationer har bildats för att arbeta för bevarandet av amfibier (Savethefrogs 2014, Global Amphibian Assessment (GAA) 2014) vilket även har ökat allmänhetens kunskap om amfibiernas situation. Med en ökad kunskap kommer förhoppningsvis ett ökat engagemang vilket är mycket viktigt för att vi ska lyckas säkerställa amfibiernas bevarande.

Tack

Jag vill ge ett stort tack till min handledare Katariina Kiviniemi Birgersson som tålmodigt har hjälpt mig med detta arbete. Även ett stort tack till mina medstudenter Ludvig Orsén, Nathalie Kindbladh och Therese Jonsson för de fina och skarpa återkopplingarna och tankeväckande diskussionerna vi fört vid seminarierna. Även ett tack till Jacob Höglund som försåg mig med information om chytridiomykosens situation i Sverige. Slutligen ett tack till Dr. Vance T. Vredenburg som tillåtit mig att använda hans fotografi för framsidan till mitt arbete.

Referenser

Amphibiaweb: Information on amphibian biology and conservation. 2014. Berkeley, California: AmphibiaWeb. WWW-dokument:
<http://www.amphibiaweb.org/search/index.html> Hämtad: 2014-02-12
Barnosky AD, Matzke N, Tomiya S, Wogan GOU, Swartz B, Quental TB, Marshall

- C, McGuire JL, Lindsey EL, Maguire KC, Mersey B, Ferrer EA. 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* **471**: 51 ó 57.
- Bd-Maps 2014. WWW-dokument: <http://www.bd-maps.net/maps/> Hämtad: 2014-02-25
- Becker MH, Brucker RM, Schwantes CR, Harris RN, Minbiole KPC. 2009. The bacterially produced metabolite violacein is associated with survival of amphibians infected with a lethal fungus. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 6635 ó 6638.
- Berger L, Hyatt AD, Speare R, Longcore JE. 2005a. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* **68**: 51-63
- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, Slocombe R, Ragan MA, Hyatt AD, McDonald KR, Hines HB, Lips KR, Marantelli G, Parkes H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**: 9031 - 9036
- Berger L, Speare R, Hyatt A. 1999. Chytrid fungi and amphibian declines: Overview, implications and future directions. Campbell A (red). *Declines and disappearances of Australian frogs*, ss 23- 33. Biodiversity Group Environment Australia, Canberra, Australia
- Berger L, Speare R, Skerratt LF. 2005b. Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs *Litoria caerulea* with severe chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms* **68**: 65 - 70
- Birdlife International 2013. One in eight of all bird species is threatened with global extinction. WWW-dokument: <http://www.birdlife.org/datazone/sowb/casestudy/106>. Hämtad: 2014-02-25
- Blaustein AR, Romansic JM, Kiesecker JM, Hatch AC. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* **9**: 123-140.
- Blaustein AR, Wake DB. 1995. The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American* **272**: 52 - 57
- Bosch J, Martinez-Solano I, Garcia-Paris M. 2001. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation*. **97** : 331 ó 337.
- Carey C, Bruzgul JE, Livo LJ, Walling ML, Kuehl KA, Dixon BF, Pessier AP, Alford RA, Rogers KB. 2006. Experimental exposures of boreal toads (*Bufo boreas*) to a pathogenic chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *Ecohealth* **3**: 5 ó 21.
- Chatfield MWH, Richards-Zawacki CL. 2011. Elevated temperature as a treatment for *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs. *Diseases of Aquatic Organisms* **94**: 235 - 238
- Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE, Speare R. 1999. Emerging infectious disease and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases* **5**: 735- 748
- Davidson C, Shaffer HB, Jennings MR. 2001. Declines of the California red-legged frog: Climate, UV-B, habitat, and pesticides hypotheses. *Ecological Applications*. **11**: 464 ó 479
- Ferreira MED, Capellaro JL, Marques ED, Malavazi I , Perlin D, Park S, Anderson JB, Colombo AL, Arthington-Skaggs BA, Goldman MHS, Goldman GH. 2004. *In vitro*

- evolution of itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* involves multiple mechanisms of resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 4405 ó 4413.
- Frankham R. 2007. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology* **17**: 325 ó 333.
- Garner TWJ, Garcia G, Carroll B, Fisher MC. 2009. Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms* **83**: 257 ó 260.
- Global Amphibian Assessment 2014. WWW-dokument: <http://www.amphibians.org/>
Hämtad: 2014-02-26
- Grey MJ, Miller DL, Hoverman JT. 2009. Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*. **87**: 243 ó 266.
- Greenspan SE, Longcore JE, Calhoun AJK. 2012. Host invasion by *Batrachochytrium dendrobatidis*: fungal and epidermal ultrastructure in model anurans. *Diseases of Aquatic Organisms* **100**: 201 ó 210.
- Hallengren A. 2012. Chytridiomykosis ó Ett hot mot svenska groddjur? Rapport från länsstyrelsen i Skåne län.
- Halliday TR, Alder K. Groddjuren och kräldjuren. 1986. Bonniers Fakta Bokförlag AB.
- IUCN 2008. WWW-dokument:
http://www.iucnredlist.org/initiatives/amphibians/analysis/red-list-status#by_taxo_group
Hämtad 2014-02-25
- IUCN 2013. WWW-dokument:
http://cmsdocs.s3.amazonaws.com/summarystats/2013_2_RL_Stats_Table1.pdf
Hämtad 2014-03-07
- Johnson ML, Berger L, Philips L, Speare R. 2003. Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* **57**: 255 ó 260.
- Kagami M, Van Donk E, de Bruin A, Rijkeboer M, Ibelings BW. 2004. Daphnia can protect diatoms from fungal parasitism. *Limnology and Oceanography* **49**: 680 ó 685.
- Kilpatrick AM, Briggs CJ, Daszak P. 2010. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology & Evolutions* **25**: 109 ó 118.
- Kraaijeveld- Smit FJL, Beebe TJC, Griffiths RA, Moore RD, Schley L. 2005. Low gene flow but big genetic diversity in the threatened Mallorcan midwife toad *Alytes muletensis*. *Molecular Ecology*. **14**: 3307 ó 3315.
- Kruger KM, Hero JM. 2007. The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. *Diversity and Distribution* **13**:781 ó 788.
- Laurance WF, McDonald KR, Speare R. 1996. Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. *Conservation biology* **10**: 406 ó 413.
- Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov, a chytrid pathogenic in amphibians. *Mycologica* **91**: 219-227.
- Major N, Wassersug RJ. 1998. Survey of current techniques in the care and maintenance of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* **37**: 57 ó 60.

- Marantelli G, Berger L, Speare R, Keegan L. 2004. Distribution of the amphibians chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development. *Pacific Conservation Biology* **10**: 173 ó 179.
- McCallum H, Barlow N, Hone J. 2001. How should pathogen transmission be modelled? *Trends in Ecology & Evolution*. **16**: 295 ó 300.
- Medicinenet 2014. WWW-dokument: <http://www.medicinenet.com/itraconazole/article.htm>
Hämtad: 2014-02-26
- Muths E, Gallant AL, Campbell EHC, Battaglin WA, Green DE, Staiger JS, Walls SC, Gunzburger MS, Kearney RF. 2006. The amphibian research and monitoring initiative (ARMI): 5-year report. US Geological Survey Scientific Investigations Report 2006 ó 5224.
- Muths E, Corn PS, Pessier AP, Green DE. 2003. Evidence for disease-related amphibian decline in Colorado. *Biological Conservation* **110**: 357 ó 365.
- Myers N, Knoll AH. 2001. The biotic crisis and the future of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 5389 ó 5392.
- Nationalencyklopedin 2014. WWW- dokument:
<http://www.ne.se.ezproxy.its.uu.se/pisksvampar>. Hämtad: 2014-02-25
- Nationalencyklopedin 2014. WWW-dokument:
<http://www.ne.se.ezproxy.its.uu.se/lang/keratin> Hämtad: 2014-02-25
- Nichols DK, Lamirande EW, Pessier AP, Longcore JE. 2001. Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs. *Journal of Wildlife Diseases* **37**: 1-11
- Ouellet M, Mikaelian I, Pauli BD, Rodrigue J, Green DM. 2005. Historical evidence of widespread chytrid infection in North America amphibian populations. *Conservation Biology* **19** :1431 ó 1440.
- Pimm SL, Russell GJ, Gittleman JL, Brooks TM. 1995. The future of biodiversity. *Science*. **269**: 347 ó 350.
- Pough FH, Andrews RM, Cadle JE, Crump ML, Savitzky AH, KD Wells. 2004. Herpetology as a field of study. *Herpetology*. 3:e uppl. Life Sciences and Geosciences.
- Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MLP, Foster PN, La Marca E, Masters KL, Merino-Viteri A, Puchendorf R, Ron SR, Sanschez-Azofeifa GA, Still CJ, Young BE. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* **439**: 161 ó 167.
- Pounds JA, Fogden MPL, Savage JM, Gorman GC. 1997. Tests of null models for amphibian declines on a tropical mountain. *Conservation biology* **11**: 1307 ó 1322.
- Puschendorf R, Bolanos F, Chaves G. 2006. The amphibian chytrid fungus along an altitudinal transect before the first reported declines in Costa Rica. *Biological Conservation* **132**: 136 ó 142.
- Rachowicz LJ, Briggs CJ. 2007. Quantifying the disease transmission function: effects of density on *Batrachochytrium dendrobatidis* transmission in the mountain yellow-legged frog *Rana muscosa*. *Journal of Animal Ecology*. **76**: 711 ó 721.
- Rollins-Smith LA, Reinert LK, Miera V, Conlon JM. 2002. Antimicrobial defences of the Tarahumara frog, *Rana tarahumarae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **297**: 361 ó 367.

- Savethefrogs 2014. WWW-dokument. <http://www.savethefrogs.com/> Hämtad 2014-02-26
- Schlaepfer MA, Hoover C, Dodd CK. 2005. Challenges in evaluating the impact of the trade in amphibians and reptiles on wild populations. *Bioscience* **55**: 256 ó 264.
- Schloegel LM, Hero JM, Berger L, Speare R, McDonald K, Daszak P. 2006. The decline of the sharp-snouted day frog (*Taudactylus acutirostris*): The first documented case of extinction by infection in a free-ranging wildlife species? *Ecohealth* **3**: 35 ó 40.
- Searle CL, Mendelson JR, Green LE, Duffy MA. 2013. *Daphnia* predation on the amphibian chytrid fungus and its impacts on disease risk in tadpoles. *Ecology and Evolution* **3**: 4129 ó 4138.
- Skerratt LF, Berger L, Speare R, Cashins S, McDonald KR, Phillott AD, Hines HB, Kenyon N. 2007. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *Ecohealth* **4**: 125 ó 134.
- Souza CM, Siqueira JV, Sales MH, Fonseca AV, Ribeiro JG, Numata I, Cochrane MA, Barber CP, Roberts DA, Barlow J. 2013. Ten-year landsat classification of deforestation and forest degradation in the Brazilian Amazon. *Remote Sensing* **5**: 5493 ó 5513.
- Stebbins RC, Cohen NW. 1995. A natural history of amphibians. Princeton University Press, Princeton.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* **306**: 1783 ó 1786.
- Une Y, Kadokaru S, Tamukai K, Goka K, Kuroki T. 2008. First report of spontaneous chytridiomycosis in frogs in Asia. *Diseases of Aquatic Organisms* **82**: 157 ó 160.
- Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM. 1997. Human domination of Earth's ecosystems. *Science* **277**: 494 ó 499.
- Voyles J, Young S, Berger L, Campbell C, Voyles WF, Dinudom A, Cook D, Webb R, Alford RA, Skerratt LF, Speare R. 2009. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science* **326**: 582 ó 585.
- Waldman B, van de Wolfshaar KE, Klena JD, Andjic V, Bishop PJ, Norman RJdB. 2001. Chytridiomycosis in New Zealand frogs. *Surveillance*. **28** : 9ó11.
- Weldon C, De Villiers AL, Du Preez LH. 2007. Quantification of the trade in *Xenopus laevis* from South Africa, with implications for biodiversity conservation. *African Journal of Herpetology* **56**: 77 ó 83.
- Weldon C, du Preez LH, Hyatt AD, Muller R, Speare R. 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases*. **10**: 2100 ó 2105.
- Woodhams DC, Alford RA, Briggs CJ, Johnson M, and Rollins-Smith LA. 2008. Life - history trade-offs influence disease in changing climates: strategies of an amphibian pathogen *Ecology* **89**:1627ó1639
- Woodhams DC, Ardipradja K, Alford RA, Marantelli G, Reinert LK, Rollins-Smith LA. 2007. Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defences. *Animal Conservation*. **10**: 409 ó 417.
- Woodhams DC, Bosch J, Briggs CJ, Cashins S, Davis LR, Lauer A, Muths E, Puschendorf R, Schmidt BR, Sheafor B, Voyles J. 2011. Mitigating amphibians disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Frontiers in Zoology* **8**

Woodhams DC, Geiger CC, Reinert LK, Rollins-Smith LA, Lam B, Harris RN, Briggs CJ, Vredenburg VT, Voyles J. 2012. Treatment of amphibians infected with chytrid fungus: learning from failed trials with itraconazole, antimicrobial peptides, bacteria, and heat therapy. *Diseases of Aquatic Organisms*. **98**: 11 ó 25.