



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**INFECCIONES POR OOMYCETES EN  
POBLACIONES DE ANFIBIOS DE LA  
SIERRA DE GREDOS (ÁVILA). EFECTO DE  
LA RADIACIÓN UV-B**

**MARÍA JOSÉ FERNÁNDEZ BENÉITEZ**

**TESIS DOCTORAL**

**Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología  
y Química Agrícola**

**Salamanca, 2011**





VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA



El **Dr. Miguel Lizana Avia**, Profesor Titular del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca y el **Dr. Javier Diéguez Uribeondo**, Científico Titular del Departamento de Micología del Real Jardín Botánico - CSIC (Madrid)

INFORMAN

que la Tesis Doctoral titulada **“Infecciones por Oomycetes en Poblaciones de Anfibios de la Sierra de Gredos (Ávila). Efecto de la radiación UV-B”**, presentada por **María José Fernández Benítez** para optar al grado de Doctor se encuentra en disposición de ser defendida públicamente ante el tribunal correspondiente.

Fdo: El director de la Tesis Doctoral

Fdo: El director de la Tesis Doctoral

Dr. Miguel Lizana Avia

Dr. Javier Diéguez Uribeondo

Fdo: La doctoranda

María José Fernández Benítez



*A Marta*

*A Manu*

*A Paula*



Me gustaría agradecer este trabajo a todas las personas y entidades que, de una forma u otra, han colaborado en él.

- El Ministerio de Educación ha financiado el trabajo mediante los proyectos con referencia CGL2005-0372 y CGL2006-12732-C02-01.
- La Institución Gran Duque de Alba (Ávila) ha participado en la financiación de la tesis a través de una beca predoctoral.
- La Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León ha concedido los permisos pertinentes para la captura de ejemplares en el campo.

Y entrando en el plano personal...

- En primer lugar al Dr. Miguel Lizana y al Dr. Javier Diéguez-Uribeondo, tanto por su labor como directores como por la ayuda prestada a lo largo de todos estos años.
- A Enrique Monte, Isabel Grondona, Isabel, José Manuel Fernández Ábalos y Emma por toda la ayuda prestada al comienzo de esta tesis, hace algún tiempo ya, y por introducirme en el trabajo de laboratorio y el mundo de la genética.
- A la Dra. María Paz Martín por todo el tiempo invertido en la realización de la filogenia y al resto de compañeros del Real Jardín Botánico-CSIC: al Dr. Miguel Ángel García por aportar siempre la nota de buen humor y a los técnicos de laboratorio Fátima Durán y Emilio Cano.
- A Teresa, no sólo por tener siempre una respuesta a todas nuestras dudas, surgidas normalmente y de manera totalmente casual en el último momento, sino por ser la gran persona que eres.

- A Víctor, Roberto, Gonzalo y Mache, quien nos iba a decir que este momento llegaría por fin, muchas gracias por estar siempre ahí y darme apoyo psicológico cuando ha sido necesario.
- A Moisés, Fernando, Vanessa, Andrés, Javi, Pablo, Isa, Miguel, Laura y un largo etcétera de compañeros del departamento que han ido llegando y pasando a lo largo de este tiempo.
- A Íñigo, por confiar en mí cuando apenas me conocía y darme la oportunidad de trabajar con él.
- A mi familia, especialmente a mi hermana, por tener paciencia y fe en mí durante todo este tiempo.
- Y como no a Manu, no sólo en el plano personal (supongo que no habrá sido fácil aguantarme y tirar de mí en algunos momentos) sino por toda tu implicación en el trabajo. Gracias por estar siempre a mi lado.

Muchísimas gracias a todos!



## ÍNDICE

<b>Introducción</b> .....	11
El declive de los anfibios.....	13
El género <i>Saprolegnia</i> .....	27
<b>Objetivos</b> .....	35
<b>Materiales y Métodos</b> .....	39
Localización del área de estudio.....	41
Edafología.....	42
Biogeografía.....	43
Bioclimatología y vegetación.....	44
Medios acuáticos.....	47
Localidades de estudio.....	59
Especies de anfibios estudiadas.....	63
<b>Capítulo 1. Aislamiento, Identificación y Virulencia de las Especies de <i>Saprolegnia</i></b> .....	77
Introducción.....	79
Aislamiento e identificación de Saprolegniales:	
Materiales y métodos.....	81
Resultados.....	86
Estudio de la virulencia:	
Materiales y métodos.....	89
Resultados.....	92
Discusión.....	99
<b>Capítulo 2. Influencia del Estadío de Desarrollo Embrionario en la Susceptibilidad a <i>Saprolegnia</i></b> .....	105
Introducción.....	107
Materiales y métodos.....	108
Resultados.....	111
Discusión.....	115

<b>Capítulo 3. Diferencias entre Especies de Anfibios en la Susceptibilidad a <i>Saprolegnia</i></b> .....	121
Introducción.....	123
Materiales y métodos.....	125
Resultados.....	126
Discusión.....	127
<b>Capítulo 4. Influencia del Exceso de Nitrógeno en el Efecto de la Infección por <i>Saprolegnia</i></b> .....	135
Introducción.....	137
Materiales y métodos.....	140
Resultados.....	142
Discusión.....	146
<b>Capítulo 5. Influencia de la Radiación UV-B sobre la Tasa de Infección Embrionaria por Oomycetes</b> .....	151
Introducción.....	153
Materiales y métodos:	
Cálculo de la atenuación de la radiación a lo largo de la columna de agua.....	154
Seguimiento de puestas en el campo.....	158
Experimentos de exposición a la radiación UV-B.....	158
Análisis estadísticos.....	160
Resultados:	
Datos de campo.....	161
Experimentos de laboratorio.....	165
Discusión.....	168
<b>Discusión General</b> .....	177
<b>Conclusiones</b> .....	187
<b>Referencias</b> .....	193

## INTRODUCCIÓN



## *EL DECLIVE DE LOS ANFIBIOS*

---

Durante las últimas décadas se ha constatado una disminución de la biodiversidad a nivel mundial (p.ej. Leaky & Lewin, 1997; Wilson, 2003; Thomas *et al.*, 2004) que se atribuye mayoritariamente al incremento de la población humana y la consiguiente sobreexplotación de los recursos naturales, los cuales generan una gran cantidad de impactos sobre el medio natural. Los anfibios son especialmente sensibles a estas alteraciones debido a su ciclo vital característico. Este ciclo posee tanto fases acuáticas como terrestres, lo que los hace vulnerables a las alteraciones producidas en ambos medios. Además, su piel desnuda y permeable les puede hacer altamente vulnerables ante la presencia de agentes contaminantes en el medio. Por otra parte los anfibios, debido a su escasa capacidad de dispersión, están estrechamente ligados a sus hábitats de reproducción, y son así especialmente sensibles a cambios locales que impliquen la alteración de los mismos.

La UICN incluye en su Lista Roja (IUCN, 2010) 2030 especies de anfibios como globalmente amenazadas o extintas, lo que supone un 30,1% del total de las especies conocidas de este grupo. De estas especies, 1276 están consideradas en peligro (EN) o en peligro crítico (CR) y 38 aparecen como extintas (EX). De estas 38 extinciones, nueve han ocurrido desde 1980.

Durante las dos décadas transcurridas desde la constatación del declive global de los anfibios (Blaustein & Wake, 1990; Wake, 1991) se ha profundizado en el conocimiento de este problema (Alford & Richards, 1999; Houlahan *et al.*, 2000; Collins & Storfer, 2003; Storfer, 2003; Griffiths & Halliday, 2004; Stuart *et al.*, 2004; Wake & Vredenburg, 2008). Así los casos datados a nivel mundial se han visto incrementados considerablemente, y en la actualidad ya se cuenta con evidencias fundadas de esta tendencia regresiva en todos los continentes, siendo el número de casos especialmente elevado en



zonas tropicales de Centro y Sudamérica, Norteamérica y Australia (Corn, 2000).

El análisis de los factores que pueden estar implicados en este declive ha sido uno de los principales objetivos de los estudios sobre conservación de anfibios de las últimas décadas. En los últimos años ha crecido la idea de que sea una conjunción de factores con un denominador común la causante del declive global de los anfibios (Kiesecker *et al.*, 2001a; Wake & Vredenburg, 2008). De una manera más particular, se han citado diversas causas implicadas en el declive global de los anfibios, las cuales se resumen a continuación:

### ***Destrucción y alteración del hábitat***

La destrucción y alteración del hábitat constituyen la principal causa del declive de los anfibios (Dodd & Smith, 2003; IUCN, 2010).

La modificación de los hábitats terrestres ha tenido gran repercusión en muchos de los casos de este declive en todo el mundo. La transformación de zonas naturales en campos de cultivo conlleva de manera directa la reducción de la cobertura vegetal y, en consecuencia, de los recursos asociados a la vegetación, así como el aumento de la erosión y el descenso de la humedad del suelo. Por ejemplo, las explotaciones en los bosques templados de Norteamérica amenazan claramente a la salamandra de las montañas de Otter (*Plethodon hubrichti*) en Virginia, debido probablemente a la reducción del grado de humedad del suelo por debajo de los niveles tolerables para la especie (Sattler & Reichenbach, 1998). Además la eliminación de setos, barreras arbóreas y otras formaciones vegetales a causa de la intensificación de la agricultura y de la concentración parcelaria suponen la desaparición de refugios muy importantes para los anfibios. Gracias a la existencia de estas estructuras vegetales muchas especies de anfibios típicamente forestales han logrado sobrevivir en zonas alteradas por la agricultura.



Otra de las consecuencias de la alteración de los ecosistemas terrestres es la fragmentación de hábitats, que aumenta el riesgo de extinción de especies por procesos debidos al azar (estocásticos) (Reed, 2004; Cisneros-Heredia *et al.*, 2009). Las especies que manifiestan dinámicas metapoblacionales (distribución en parches), como es el caso de los anfibios, son especialmente sensibles a la fragmentación del hábitat debido a que sus subpoblaciones sufren periódicamente procesos de extinción y recolonización mediante la dispersión de individuos de subpoblaciones cercanas (Lehtinen *et al.*, 1999). En un hábitat fragmentado la efectividad de la dispersión puede verse disminuida por el aumento de la distancia entre zonas húmedas, y en consecuencia entre subpoblaciones. Este proceso de fragmentación se ve agravado por la construcción de infraestructuras viarias, que a menudo suponen una barrera para especies con poca movilidad como los anfibios (p.ej. Eigenbrod *et al.*, 2008).

Los incendios suponen otra fuente de impacto sobre los anfibios (Pleguezuelos *et al.*, 2002; Rochester *et al.*, 2010) al provocar tanto la muerte directa de los individuos como la destrucción de la vegetación de gran porte, lo que supone la pérdida de los recursos espaciales y tróficos disponibles. Además los incendios causan un aumento de la erosión y la disminución de la humedad del suelo.

Tan importante para los anfibios como la conservación de los hábitats terrestres es la existencia de medios acuáticos que permitan la reproducción y el desarrollo de las fases acuáticas de su ciclo biológico. Los principales impactos a los que se ven sometidos este tipo de medios por la presión humana son la desecación y la contaminación.

La desaparición de zonas acuáticas es un problema generalizado en todo el planeta. En España, se estima que la superficie ocupada por los humedales se redujo en un 60% en el periodo 1960-1999, desde las 280.000



hasta 114.000 ha (MMA, 1999). La sobreexplotación de los recursos hídricos para la irrigación de los campos de cultivo y el consumo humano, el abandono y destrucción de los abrevaderos para el ganado (Swan & Oldham, 1993), la construcción de infraestructuras y urbanizaciones y la reconversión de terrenos ocupados por humedales en zonas de cultivo o pastos para el ganado han supuesto la pérdida de una gran cantidad de medios acuáticos apropiados para los anfibios, lo que ha provocado la desaparición de poblaciones enteras de las especies que allí se reproducían.

El otro grave problema al que se ven sometidos los medios acuáticos es la contaminación de los mismos. Tanto las fuentes como los tipos de contaminación de los medios naturales son incontables. Quizás el problema más serio sea el carácter global de este tipo de impactos. Los cambios en la calidad ambiental han sido detectados no sólo en zonas de elevada población humana, que son los focos de contaminación habituales, sino también en zonas aparentemente libres del impacto humano como las áreas de montaña y las regiones polares.

Los productos químicos utilizados en agricultura se han propuesto como causas potenciales del declive de anfibios, ya sea por sí solos o en combinación con otros factores estresantes (Relyea & Mills, 2001). El seguimiento de ciertas poblaciones de anfibios ha permitido establecer correlaciones entre el declive de dichas poblaciones y su proximidad a campos agrícolas (Bishop *et al.*, 1999; LeNoir *et al.*, 1999; Davidson *et al.*, 2002; Houlihan & Findlay, 2003; Davidson, 2004). Además, muchas de las malformaciones encontradas en anfibios parecen ocurrir en áreas agrícolas donde se aplican extensivamente pesticidas y fertilizantes (Ouellet *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 2005). Gran parte del ciclo biológico de los anfibios tiene lugar en charcas o arroyos a menudo asociados con áreas agrícolas, por lo que pueden verse expuestos a estos productos. Además los periodos reproductor y larvario de la mayor parte





de las especies de anfibios de las zonas templadas se desarrollan en primavera y verano, coincidiendo con la aplicación de pesticidas y fertilizantes en los campos de cultivo, lo que los hace especialmente sensibles a sus posibles efectos (Mann *et al.*, 2009).

Los pesticidas constituyen probablemente el peligro más conocido a este respecto. Son muchos los pesticidas que se han utilizado en los últimos años, alguno de ellos como el DDT y su residuo el DDE son altamente persistentes, por lo que pueden alcanzar eventualmente concentraciones significativas incluso en regiones remotas del planeta. La práctica totalidad de los pesticidas cuya toxicidad ha sido evaluada en anfibios han mostrado algún tipo de efecto negativo sobre su supervivencia, crecimiento, desarrollo, reproducción o comportamiento (ver revisión en Mann *et al.*, 2009).

En los países más industrializados de Europa se ha constatado una acidificación de las precipitaciones en los últimos 30 años debido a la emisión de contaminantes a la atmósfera, especialmente dióxidos de azufre. La lluvia ácida ha producido el descenso del pH en muchos medios acuáticos utilizados por los anfibios para su reproducción, especialmente en zonas montañosas y latitudes altas. No obstante, el hecho de que ciertas especies se muestren muy resistentes a la acidificación del medio (Pierce, 1985; Bradford *et al.*, 1994) hace que existan dudas sobre la magnitud de sus efectos a nivel global, a pesar de que en algunos casos sí se ha comprobado la implicación directa de la acidificación sobre el declive de poblaciones, como ocurre con el sapo corredor (*Bufo calamita*) en Inglaterra (Beebee *et al.*, 1990). En general, parece que cada especie de anfibio puede tener una sensibilidad diferente frente a la acidificación, siendo en general los huevos y los embriones más susceptibles que las larvas y los adultos (Freda & McDonald, 1990; Whiteman *et al.*, 1995).

Otras fuentes que pueden afectar negativamente a los anfibios son los metales pesados (ver revisión en Linder & Grillitsch, 2000), o el exceso de



nutrientes como el nitrógeno o el fósforo, procedentes en su mayoría de la aplicación de fertilizantes (Rouse *et al.*, 1999). Concentraciones de nitrato por encima de 3 mg N/l reflejan contaminación antropogénica (Madison & Brunett, 1985) y son encontradas con frecuencia en charcas y pequeños arroyos situados en zonas agrícolas o urbanas.

En un estudio de las relaciones entre la distribución de anfibios y las características de los humedales, Weyrauch & Grubb (2004) encontraron que la concentración de amonio en el agua era una variable importante para predecir la riqueza de especies de tritones y salamandras. Por otra parte Ensabella *et al.* (2003) encontraron que la selección de lugares de puesta por parte del sapo verde (*Bufo viridis*) en Roma estaba relacionada con la concentración de nitrato. Dicha concentración fue significativamente más baja en los lugares elegidos por esta especie que en las áreas donde no se encontró.

Estudios llevados a cabo con especies ibéricas han encontrado que la sensibilidad de los anfibios al nitrato amónico varía en función de la especie y del estadio de desarrollo en el cual se produce la exposición al mismo. De esta manera, una exposición crónica a 22,6 mg N-NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub>/l causaba la muerte del 80% de las larvas de ranita de San Antonio (*Hyla arborea*), mientras que niveles cuatro veces superiores únicamente afectaban al crecimiento de las especies más tolerantes como el gallipato (*Pleurodeles waltl*), *B. calamita* o el sapo de espuelas (*Pelobates cultripes*) (Ortiz *et al.*, 2004). Sin embargo, la tolerancia mostrada por los individuos de estas dos últimas especies desaparecía cuando la exposición al fertilizante se producía durante los estadios más sensibles; diferencias significativas en la letalidad causada por el nitrato amónico aparecían en función de que el momento de exposición se modificara en tan solo 96 horas (Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2006).

Por otra parte, el aumento de nutrientes provocado por al adición de nitrógeno y fósforo procedentes de los fertilizantes puede alterar la dinámica



de comunidades favoreciendo el desarrollo de determinados patógenos. En este sentido, Johnson *et al.* (2007) demostraron como la eutrofización de los medios acuáticos favorecía la infección de larvas de anfibios por el trematodo *Ribeiroia ondatrae* mediante la proliferación de caracoles herbívoros, hospedadores intermediarios de este parásito.

### ***Especies alóctonas***

Una amenaza importante para la supervivencia de los anfibios es la introducción, accidental o intencionada, de especies alóctonas vegetales y animales. Las introducciones causan diversas alteraciones en la dinámica de las comunidades principalmente a través de la depredación, competencia, disminución de los recursos y modificación del hábitat. Otro efecto indirecto puede ser la introducción de nuevos patógenos y parásitos.

Las especies invasoras que con más frecuencia se citan entre los problemas de conservación de los anfibios son, por este orden, peces y crustáceos. La introducción de peces depredadores, usualmente con fines recreativos, ha hecho que muchas charcas hayan dejado de ser utilizadas por los anfibios y ha causado numerosas extinciones locales (Kats & Ferrer, 2003). La introducción en los años 80 de la gambusia (*Gambusia holbrooki*), el carpín dorado (*Carassius auratus*) y el cangrejo rojo americano (*Procambarus clarkii*) en embalses de Galicia ha provocado la práctica eliminación de la mayor parte de las poblaciones reproductoras de anfibios (Galán, 1997a). Otras especies alóctonas que ejercen una presión excesiva sobre los anfibios autóctonos son el visón americano (*Mustela vison*), que podría haber provocado la regresión de algunas poblaciones de rana patilarga (*Rana iberica*) (Galán, 1997b), o la culebra viperina (*Natrix maura*) en la isla de Mallorca, que supone una seria amenaza para la supervivencia del ferreret (*Alytes muletensis*) (Moore *et al.*, 2004).

La introducción de especies alóctonas de anfibios también pueden



suponer una amenaza para las poblaciones autóctonas. Hay indicios de que la introducción de la rana toro (*Lithobates catesbeianus*) ha tenido efectos dañinos para las especies nativas en varias zonas de Europa (Scocianti, 2001; Pleguezuelos *et al.*, 2002). Esta especie es una voraz depredadora de anfibios y pequeños vertebrados y cuando su número es abundante, constituye un cambio en el hábitat que puede suponer un serio impacto para la fauna autóctona.

Otro de los problemas asociados a la introducción de anfibios exóticos es la posible hibridación con las especies autóctonas y la consiguiente pérdida de la diversidad genética original. En España, el principal peligro para la conservación de la rana verde común (*Pelophylax perezi*) es la alteración de su integridad genética como consecuencia de la potencial hibridación con otras ranas verdes (Arano *et al.*, 1995).

La introducción de plantas alóctonas también puede suponer una amenaza para las poblaciones de anfibios, debido a que provocan la alteración del medio. En muchas zonas de dunas, donde las charcas efímeras constituyen un importante hábitat para los anfibios, la introducción de especies de matorral como *Hippophae rhamnoides* o *Rhododendrum ponticum* han producido el descenso del nivel freático y la eutrofización de las charcas (p.ej. Van der Meulen, 1982), lo que puede tener graves consecuencias para las poblaciones de anfibios de la zona.

### ***Muerte directa de ejemplares***

La captura directa de ejemplares supone otra de las causas implicadas en la disminución de muchas poblaciones de anfibios. La explotación de estas especies con fines alimenticios supone un problema de gran entidad. Originariamente este problema afectó a las ranas verdes europeas, pero la creciente demanda a causa de la mayor protección de estas especies provocó



un aumento de las exportaciones de las ranas verdes del este de Europa y, posteriormente, de otras especies como la rana toro de la India (*Hoplobatrachus tigerinus*). En España cabe destacar la acusada presión de captura a la que están sometidas algunas poblaciones de ranas pardas en el País Vasco y Navarra (Gosá, 2002) y, probablemente, de *P. perezi* en otras zonas.

Otra causa de captura directa es la recolección de individuos para investigación, educación o coleccionismo. Aunque en la actualidad el número de individuos afectados no suele ser lo suficientemente grande para provocar un efecto negativo en las poblaciones, existen excepciones. La recuperación de algunas poblaciones de ranas en Gran Bretaña, cuya abundancia se había visto afectada por la destrucción del hábitat, se asoció a la disminución de la tasa de recolección desde el 30-50% hasta menos del 25% a principios de los años 80 (Cooke, 1985). La recolección de individuos de poblaciones pequeñas o aisladas puede tener mayores consecuencias que una recolección a gran escala de individuos pertenecientes a poblaciones de gran tamaño.

El aumento de la intensidad del tráfico rodado ha provocado que los atropellos sean la principal causa de muerte directa de anfibios en muchas zonas del planeta. El problema es especialmente grave cuando las carreteras con mayor tráfico son atravesadas por los animales que migran a sus hábitats de reproducción. Sin embargo, en muchas vías se produce una tasa de atropellos elevada durante todo el año, debido a que los anfibios encuentran en las carreteras, cálidas y húmedas, un lugar adecuado para descansar.

El impacto que los atropellos pueden tener sobre las poblaciones de anfibios no está del todo claro. Las poblaciones de las especies con menor tasa de supervivencia pueden sufrir un descenso en el tamaño de la población reproductora (Fahrig *et al.*, 1995). En Europa, se ha observado que entre el 4 y el 50% de los adultos de sapo común (*Bufo bufo*) pueden morir atropellados al cruzar las carreteras durante sus migraciones reproductoras.



En España, según el Proyecto de Mortalidad de Vertebrados llevado a cabo por la Sociedad de Conservación de Vertebrados (2003), los anfibios representan el 22,9% de los vertebrados atropellados y detectados en nuestras carreteras. Los anuros constituyen el 90% del total de los anfibios atropellados, siendo *B. bufo* la especie más afectada, registrándose un total de 7413 individuos atropellados. A pesar de esto, es destacable el tiempo durante el que persisten las poblaciones cuyos individuos vuelven a cruzar las carreteras año tras año, resultando raras las extinciones locales como consecuencia de la mortalidad en carretera.

Una última causa de muerte directa es la persecución por aversión o por ser consideradas especies dañinas, que se remonta a épocas históricas. En España, las especies más afectadas son la salamandra común (*Salamandra salamandra*) y sobre todo, *B. bufo*. Sin embargo, debido a sus hábitos, generalmente nocturnos, los anfibios suelen pasar desapercibidos y, salvo casos puntuales, la mortalidad por esta causa es probablemente muy baja.

### ***Cambio climático y radiación ultravioleta***

Las condiciones climáticas inusuales pueden estresar a los anfibios (Reading, 2007) alterando su desarrollo y haciéndolos más susceptibles a muchas enfermedades (Kiesecker *et al.*, 2001a; Rohr & Raffel, 2010) como la quitridiomycosis, causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Pounds *et al.* (2006a) propusieron que la dispersión de esta enfermedad podría estar favorecida por el calentamiento global, ya que las temperaturas se acercarían al óptimo para el patógeno.

Alford *et al.* (2007) estudiaron el grado de estrés, en términos de asimetrías morfológicas, en diversas poblaciones de dos especies de ranas arborícolas en Australia (género *Litoria*). Los autores detectaron un alto grado de estrés en algunas poblaciones que entre 15 y 19 meses después sufrieron un



declive. La hipótesis de la quitridiomycosis como causa directa del declive fue descartada debido a que las teorías sobre la expansión de las epidemias causadas por *B. dendrobatidis* apuntan a que el colapso de las poblaciones afectadas se produce 4-6 meses después de la colonización por parte del hongo (p.ej. Pounds *et al.*, 2006b). Los resultados del estudio de Alford *et al.* (2007) no son suficientemente extensos en el tiempo como para asociar el declive en las poblaciones de las especies de *Litoria* con el cambio climático, pero el periodo de mayor regresión de dichas poblaciones coincidió con una época en la que se produjo un calentamiento severo en la región.

Bosch *et al.* (2007) encontraron una asociación entre el cambio ocurrido en determinadas variables climáticas locales, especialmente el aumento de la temperatura, y la aparición de la quitridiomycosis en el Parque Natural de Peñalara, Madrid.

Rohr & Raffel (2010) encontraron evidencias de que los fenómenos climáticos relacionados con El Niño son responsables de casos de pérdidas de anfibios del género *Atelopus* al aumentar la variabilidad de la temperatura regional, lo que puede reducir las defensas de los anfibios frente a los patógenos. Ya que el cambio climático parece aumentar la variabilidad de la temperatura, extremar los fenómenos climáticos y la fuerza de los episodios de El Niño en la zona del Pacífico central, podría estar relacionado con el declive de anfibios al aumentar la sensibilidad a las enfermedades.

El cambio climático podría actuar como causa de declive de anfibios al combinarse, además de con la aparición de diversas patologías, con otros tipos de deterioro ambiental como la desaparición de hábitats idóneos o la contaminación (p.ej. Fagotti *et al.*, 2005).

Otro fenómeno global cuya relevancia está creciendo en los últimos años es el incremento de la intensidad de radiación ultravioleta que incide sobre la superficie terrestre y, en consecuencia, sobre las puestas de anfibios



depositadas en las charcas sin ningún tipo de protección. Los residuos de productos químicos catalíticos, especialmente los CFCs, que son liberados a la atmósfera, dañan la capa ozono disminuyendo su capacidad para filtrar la radiación ultravioleta B (UV-B) (Tevini, 1993), la cual presenta una longitud de onda más corta y, por tanto, un mayor riesgo para los organismos vivos debido a su mayor energía potencial. Blaustein *et al.* (1994a) analizaron los efectos de la radiación UV-B ambiental sobre tres especies de anfibios en el noroeste de los Estados Unidos. Tanto la rana de las Cascades (*Rana cascadae*) como el sapo boreal (*Bufo boreas*), especies para las que se había constatado un declive poblacional, se mostraron tremendamente sensibles a la radiación, mientras que la rana arborícola del Pacífico (*Pseudacris regilla*), especie sin aparentes problemas de conservación, se mostró muy resistente. Los autores detectaron además en huevos de *P. regilla* una elevada actividad de la enzima fotoliasa, la cual repara los daños producidos por la radiación UV-B sobre el ADN. En los últimos años se ha incrementado considerablemente el número de estudios que demuestran como la radiación UV-B afecta a la supervivencia de las fases acuáticas de muchas especies de anfibios (p.ej. Blaustein *et al.*, 1998; Lizana & Pedraza, 1998; Häkkinen *et al.*, 2001; Bancroft *et al.*, 2008).

### ***Enfermedades***

En épocas recientes se ha descubierto que algunas poblaciones de anfibios están siendo afectadas por diversas enfermedades, aunque se conoce realmente muy poco sobre las patologías que afectan a los anfibios. De manera general, se ha señalado que el estrés ambiental puede reducir la capacidad de los anfibios para resistir las enfermedades y que algunas de ellas han podido ser transmitidas por especies exóticas (Carey *et al.*, 1999; Torchin *et al.*, 2003).

Ocasionalmente, las enfermedades pueden aparecer en circunstancias naturales cuando la densidad de población es alta, produciendo un descenso





en el número de individuos que vendrá seguido por recuperaciones y nuevos descensos en una serie infinita de ciclos estocásticos. Lo más normal es que su aparición sea el resultado de un estrés exterior originado por el deterioro ambiental. Así, los factores ambientales que se proponen como causantes directos del declive global de los anfibios podrían ver incrementados sus efectos perjudiciales al promover distintas enfermedades.

Desde los años 70 hay numerosas apariciones bien documentadas de la enfermedad conocida como síndrome de las patas rojas en muchas especies de anfibios de Europa y Norteamérica. Se trata de una enfermedad bacteriana sistémica generalizada asociada con eritema cutáneo localizado, generalmente en el vientre o las extremidades (Densmore & Green, 2007). El agente etiológico más frecuente es *Aeromonas hydrophila*, de amplia distribución (p.ej. Hird *et al.*, 1981; Márquez *et al.*, 1995). No obstante, actualmente se cree que muchos de los casos de mortalidad masiva de anfibios atribuidos a las patas rojas son realmente debidos a otros patógenos y que la infección producida por la bacteria es un efecto secundario originado por la debilitación del organismo infectado.

También ciertos virus han sido aislados a partir de pieles de animales muertos (p.ej. Collins *et al.*, 2004). El género *Ranavirus* (familia Iridoviridae) comprende varias especies ampliamente descritas como patógenos de peces, anfibios y reptiles (Densmore & Green, 2007) y se ha relacionado con altas tasas de mortalidad de salamandra tigre (*Ambystoma tigrinum*) en Estados Unidos y Canadá (Jancovich *et al.*, 1997, 2001; Bollinger *et al.*, 1999) y de rana común (*Rana temporaria*) en el Reino Unido (Cunningham *et al.*, 1996).

Las infecciones causadas por hongos se están revelando en los últimos años como una de las mayores amenazas para los anfibios. El máximo exponente de esta amenaza es la quitridiomycosis, infección producida por el hongo *B. dendrobatidis*, que afecta a los individuos al degradar la queratina del



cuerpo. En las larvas, la única parte del cuerpo queratinizada es la boca, por lo que los efectos de la quitridiomycosis son reducidos; sin embargo, con la metamorfosis, la cubierta queratinosa se extiende por todo el cuerpo formando parte de la piel de los juveniles. Es entonces cuando la infección por el hongo se extiende a todo el cuerpo produciendo la muerte de la totalidad de los individuos en aquellas especies más sensibles. Hasta hace poco tiempo se desconocían los mecanismos a través de los cuales el hongo producía la muerte de los individuos. Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que la causa última de la muerte de los animales infectados sería la disrupción de la función de osmorregulación de la piel, lo que produciría una alteración del equilibrio osmótico que terminaría por causar fallo cardíaco (Voyles *et al.*, 2009). La quitridiomycosis fue observada por vez primera en anfibios en Australia y Panamá durante los años 90 (Berger *et al.*, 1998), y en los últimos años los casos de infección se han ido describiendo en diferentes partes del mundo (ver revisiones en Johnson, 2006; Kilpatrick, 2010). El primer caso europeo de quitridiomycosis fue detectado en el Parque Natural de Peñalara, en Madrid, donde el sapo partero común (*Alytes obstetricans*) estuvo al borde de la extinción a causa de la enfermedad (Bosch *et al.*, 2001), la cual afectó a la práctica totalidad de la población en apenas tres años.

Además de estas enfermedades, habría que destacar la saprolegniosis, enfermedad emergente producida por representantes del género *Saprolegnia* que se ha relacionado con episodios de mortalidad de anfibios en varias regiones del planeta. En este sentido, las infecciones por *Saprolegnia* han sido asociadas con la extinción de poblaciones de rana leopardo septentrional (*Lithobates pipiens*) y sapo meridional (*Bufo terrestris*) (Bragg, 1962), el aumento de mortalidad de salamandra moteada (*Ambystoma maculatum*) (Walls & Jaeger, 1987) y episodios de mortalidad masiva de *B. calamita* y *R. temporaria* en Inglaterra (Banks & Beebee, 1988; Beattie *et al.*, 1991). En Oregón (Estados



Unidos), se ha relacionado el declive de *B. boreas* con la infección masiva de huevos por este hongo (Blaustein *et al.*, 1994b). Estudios experimentales han puesto de manifiesto los efectos negativos del género *Saprolegnia* sobre los estadios acuáticos de varias especies de anfibios (Kiesecker & Blaustein, 1999; Kiesecker *et al.*, 2001b; Romansic *et al.*, 2007, 2009; Fernández-Benéitez *et al.*, 2008; Sagvik *et al.*, 2008a; Ruthig, 2009), así como su interacción con factores ambientales como la radiación UV-B, el nitrato o la temperatura (Kiesecker & Blaustein, 1995; Romansic *et al.*, 2006; Sagvik *et al.*, 2008a).

La enfermedad se manifiesta por la aparición de manchas de aspecto algodonoso debidas al crecimiento del micelio. En general, se sabe muy poco acerca de cuáles son las especies de *Saprolegnia* causantes de mortalidad en anfibios, del mecanismo de actuación del hongo o del impacto ecológico que la saprolegniosis puede tener sobre las poblaciones de anfibios. Con este trabajo se pretende contribuir al conocimiento de estas incógnitas. Para introducir el tema se presenta, a continuación, una descripción más detallada del género *Saprolegnia*.

## **EL GÉNERO SAPROLEGNIA**

---

El género *Saprolegnia* pertenece al orden Saprolegniales, dentro de la clase Oomycetes y encuadrado en el reino Chromista. Información detallada sobre el grupo se puede consultar en Hudson (1986), Carlile *et al.* (2001) y Lamour & Kamoun (2008).

Los Oomycetes y los hongos superiores son un ejemplo de convergencia evolutiva. Ambos se asemejan en que crecen en células tubulares con pared celular, carecen de clorofila, su alimentación es por absorción, y se dispersan por esporas. Algunas características que los diferencian de los hongos verdaderos son:

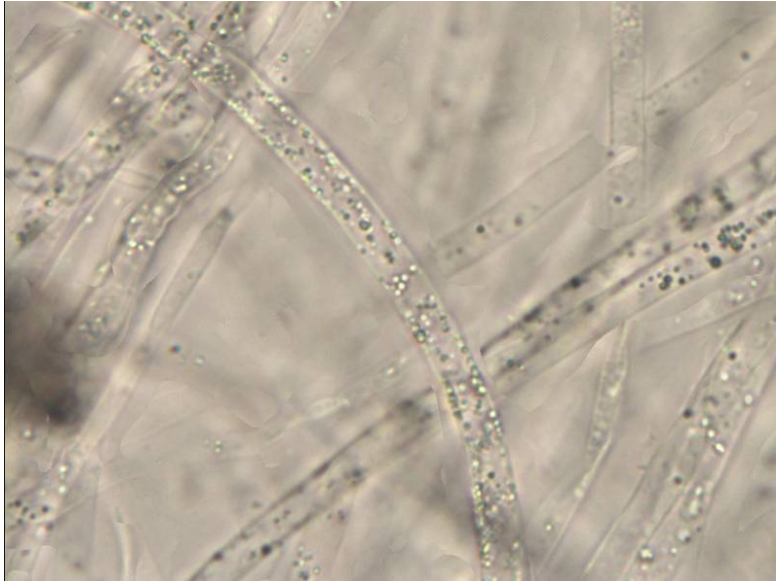


- Zoosporas biflageladas; uno de los flagelos se dirige hacia delante y posee una hilera de pelos en cada lado mientras que el otro se dirige hacia atrás y es liso.
- El componente principal de sus paredes celulares es el  $\beta$ -glucano, frente a la quitina de los hongos verdaderos.
- Poseen crestas mitocondriales tubulares, a diferencia de los hongos verdaderos en los que las crestas mitocondriales tienen forma de plato.
- La biosíntesis de lisina se lleva a cabo mediante la vía del ácido diaminopimélico, mientras que en los hongos verdaderos se lleva a cabo a través de la vía del ácido  $\alpha$ -aminodiapídico

Los miembros del orden Saprolegniales están presentes en la mayoría de los hábitats de agua dulce, ya sean ríos, lagos, arroyos o charcas y en suelos húmedos o estacionalmente irrigados. Al igual que en el resto de Oomycetes, las hifas del género *Saprolegnia* carecen de septos transversales y los núcleos aparecen dispersos por el citoplasma (Fig. 1), es decir, son organismos coenocíticos. La fase sexual de su ciclo biológico tiene una clara diferenciación en grandes estructuras femeninas denominadas oogonios y pequeñas estructuras masculinas llamadas anteridios (Fig. 2). Dentro de los oogonios tiene lugar la meiosis y, dependiendo de la especie, se producen una o varias oosferas cada una de las cuales contiene un único núcleo haploide. La meiosis también tiene lugar en los anteridios; éstos crecen hacia los oogonios y penetran en ellos mediante una estructura denominada tubo de fertilización, a través del cual un único núcleo haploide es transferido al oogonio y se fusiona con el núcleo haploide de una de las oosferas. Una vez fecundada, la oosfera se desarrolla en una oospora característica del grupo, que contiene un único núcleo diploide. Cuando la oospora germina produce un tubo de germinación que puede dar lugar a un micelio diploide.



**Figura 1.** Micelio de *Saprolegnia diclina*

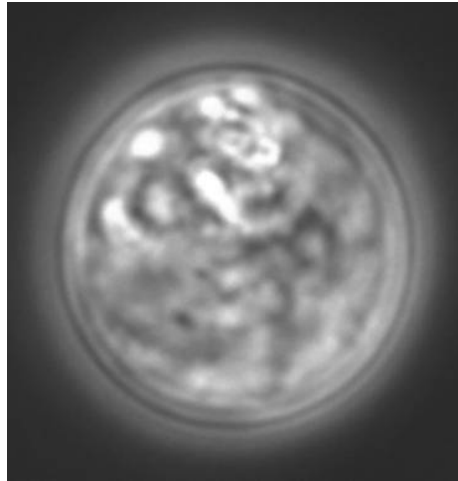


**Figura 2.** Estructuras sexuales de *S. diclina*: oogonio (O) y anteridio (A)





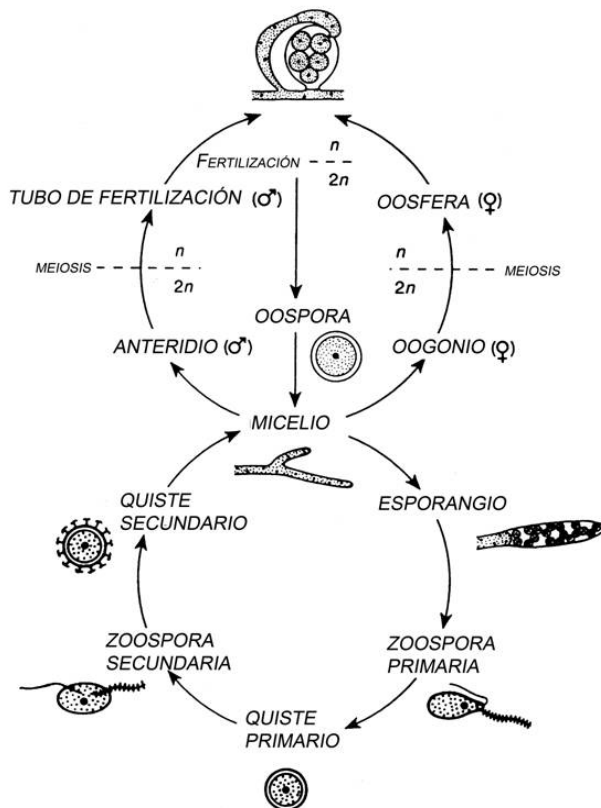
**Figura 3.** Quiste secundario de *Saprolegnia diclina*



En el extremo de las hifas del micelio se pueden formar esporangios, a partir de los cuales se liberan zoosporas. Cuando se produce la descarga de las zoosporas, denominadas primarias, éstas tienen forma elíptica con los dos flagelos situados en la parte anterior y se caracterizan por moverse de manera bastante lenta. Las zoosporas primarias enseguida se transforman en quistes denominados quistes primarios. Estos quistes germinan liberando zoosporas secundarias con forma arrañada y con los flagelos situados en posición lateral. Estas zoosporas nadan de manera mucho más vigorosa y constituyen el principal medio de dispersión, pudiendo formar quistes secundarios después de algunas horas (Fig. 3). Los quistes secundarios, en ocasiones, germinan dando lugar a una delgada hifa, denominada tubo de germinación, que muestra quimiotropismo hacia aminoácidos facilitando el encuentro de un sustrato u hospedador adecuado. En ocasiones, el quiste secundario puede germinar para dar lugar a una nueva zoospora, en lugar de un tubo de germinación. Esta nueva zoospora es idéntica a la zoospora secundaria en cuanto a estructura y actividad. Este ciclo de enquistamiento y liberación de zoosporas se puede repetir varias veces (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 1994) y



**Figura 4.** Esquema del ciclo biológico de *Saprolegnia*. Adaptado de Carlile *et al.* (2001)



parece representar un proceso fisiológico de adaptación al parasitismo, ya que aparece en la mayoría de las especies parásitas de Saprolegniales (Cerenius & Söderhäll, 1985; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 1994, 2007, 2009) (Fig. 4).

Los Oomycetes pueden ser homotálicos (un solo micelio produce estructuras reproductoras masculinas y femeninas) o heterotálicos (las estructuras reproductoras masculinas y femeninas son producidas por micelios diferentes). *Saprolegnia* parece ser un género homotálico. Los oogonios normalmente se disponen de manera aislada, frecuentemente en las puntas de las ramas de las hifas. Los anteridios se pueden desarrollar en la misma hifa que el oogonio o en otra hifa. Las oosporas que se desarrollan a partir de las oosferas fertilizadas tienen paredes gruesas y pueden sobrevivir durante largos periodos en condiciones adversas de temperatura, sequedad, etc.



El género incluye tanto especies saprotróficas como especies parásitas de organismos dulceacuícolas, en los que produce una enfermedad denominada saprolegniosis. La saprolegniosis es muy común en peces, afectando prácticamente a todas las especies de agua dulce en todos los grupos de edad y causando grandes pérdidas económicas en piscifactorías (Willoughby, 1978; Hatai & Hoshiai, 1992; Kiesecker *et al.*, 2001b; Espeland & Hansen, 2004; Zaror *et al.*, 2004; van West, 2006; Diéguez-uribeondo *et al.*, 2007). Como ya se ha comentado en el apartado anterior, la saprolegniosis se ha relacionado también con casos de mortalidad de anfibios en distintas regiones (Bragg, 1962; Banks & Beebee, 1988; Beattie *et al.*, 1991; Blaustein *et al.*, 1994b). Pese a la existencia de varios trabajos, que ponen de manifiesto los efectos de la saprolegniosis sobre los diferentes estadios del ciclo biológico de los anfibios (Kiesecker & Blaustein, 1999; Kiesecker *et al.*, 2001b; Fernández-Benéitez *et al.*, 2008; Romansic *et al.*, 2007, 2009; Sagvik *et al.*, 2008a), se sabe muy poco acerca de las especies de *Saprolegnia* implicadas en los episodios de mortalidad. En la mayoría de los casos el patógeno es referido exclusivamente como *Saprolegnia* sp., no llevándose a cabo una identificación a nivel específico.

La identificación de las especies de *Saprolegnia* se basa en las características morfológicas de las estructuras reproductoras (oogonios, zoosporas y anteridios) (Seymour, 1970; Johnson *et al.*, 2002a). Este tipo de identificación presenta una serie de problemas debidos fundamentalmente a que muchas especies presentan características muy similares y que a menudo se superponen. Por otro lado, recientes estudios parecen indicar que muchos de esos caracteres son polifiléticos, es decir que son comunes a grupos filogenéticamente distintos (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007, 2009). Además los aislamientos procedentes de animales a menudo son estériles, es decir, no generan estructuras sexuales en condiciones “*in vitro*” (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007). Esto hace, por lo tanto, que la asignación de un aislamiento a una





especie concreta sea muy complicada.

Para resolver esta problemática en los estudios taxonómicos y filogenéticos en Saprolegniales, se han comenzado a aplicar técnicas moleculares. La más empleadas han sido aquellas basadas en secuencias de los “Internal Transcribed Spacer” (ITS) y la región 5,8 S del ADN ribosómico nuclear (ADNr). Las técnicas moleculares tienen varias ventajas sobre la identificación morfológica, ya que permiten la identificación de aislamientos que no producen estructuras sexuales “in vitro”, así como la detección de especies crípticas o no descritas previamente (Johnson *et al.*, 2008).

La identificación de las especies de *Saprolegnia* relacionadas con infecciones en anfibios y el estudio de su virulencia es todavía un tema pendiente. Esta carencia de información dificulta el conocimiento sobre los procesos de la enfermedad y hace imposible determinar la importancia relativa de las especies de *Saprolegnia* en la mortalidad de anfibios, así como detectar posibles casos de especificidad patógeno-hospedador, que pueden afectar a las interacciones interespecíficas e influir en la estructura de las comunidades de anfibios o conocer cuáles son los factores ambientales que pueden favorecer o dificultar la infección por determinadas especies de *Saprolegnia*.

Como vimos en el apartado anterior, los anfibios están experimentando un severo declive de sus poblaciones en todo el planeta, y las enfermedades se están revelando como uno de los factores implicados en dicho declive. Por tanto, avanzar en el escaso conocimiento del papel de las especies de *Saprolegnia* en el declive de anfibios es una tarea necesaria que será acometida en el presente trabajo. Para ello se han planteado una serie de objetivos que se detallan a continuación.



## OBJETIVOS



- Identificar las especies del orden Saprolegniales capaces de colonizar huevos de anfibios anuros.
- Determinar el carácter patógeno de las especies de *Saprolegnia* aisladas.
- Establecer si existe relación entre la susceptibilidad a la saprolegniosis y el estadio de desarrollo embrionario.
- Determinar si existen diferencias entre especies de anfibios en la susceptibilidad a la saprolegniosis.
- Analizar la influencia del exceso de nitrógeno en el efecto de *Saprolegnia* sobre los embriones.
- Conocer la tasa de infección de puestas de anuros en el campo y su relación con la dosis de radiación UV-B recibida.



## *MATERIALES Y MÉTODOS*





## LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

El Sistema Central constituye una barrera de aproximadamente 500 km de longitud que actúa como divisoria general de las cuencas hidrográficas de los ríos Duero y Tago y separa la Meseta Norte de la Sur con una dirección aproximada ENE-OSO. La cordillera está formada por una serie de sierras dispuestas de manera continua desde la Serra da Estrela en Portugal, que constituye su límite occidental, hasta las Sierras de Somosierra y Ayllón, entre las provincias de Segovia, Madrid y Guadalajara, que constituyen su límite oriental.

En el centro de este eje montañoso se halla la Sierra de Gredos, ubicada en su mayoría dentro de la provincia de Ávila, aunque también forma parte de las provincias de Salamanca y Cáceres. La Sierra de Gredos tiene una longitud de unos 140 km y una anchura de 40 km en un corte Norte-Sur de la sierra (Pedraza & López, 1980). La altitud máxima corresponde al Pico Almanzor, con 2592 m.

La estructura física del territorio conocido como Gredos ha hecho que existan diferentes concepciones del término en lo que a distribución geográfica se refiere (Feliu & Rituerto, 1994). Lo más habitual es incluir dentro de la Sierra de Gredos en sentido amplio una serie de sierras separadas por los valles de los ríos Adaja, Alberche, Tiétar, Tormes y Jerte, que constituyen por sí mismas unidades geológicas, botánicas y zoológicas independientes (Pedraza & López, 1980):

- Macizo oriental: desde el límite oriental de Gredos, constituido por los puertos de Mijares, Serranillos y Naval Moral, en lo que supone su zona de contacto con la Sierra de Guadarrama, hasta el Puerto del Pico.
- Macizo central: desde el Puerto del Pico hasta el Puerto de Tornavacas, con una longitud de 50 km. Es la zona más importante de la Sierra,



presentando las mayores altitudes de todo el Sistema Central (Pico Almanzor, 2592 m). La línea de cumbres constituye un límite administrativo y geográfico ya que separa las provincias de Ávila (provincia corológica Carpetano-Ibérico-Leonesa) y Cáceres (provincia corológica Luso-Extremadurensis). Esta zona de la sierra es la que para algunos autores constituye la Sierra de Gredos en sentido estricto.

- Macizo occidental: desde el Puerto de Tornavacas hasta el corredor de Béjar, por el que discurre el río Cuerpo de Hombre, que constituye el límite occidental de Gredos y su confluencia con la Sierra de Francia. Este macizo recibe el nombre de Sierra de Béjar y es la segunda sierra en importancia del Sistema Central, con una altitud máxima de 2453 m en el Canchal de la Ceja. Se encuentra ubicado entre las provincias de Salamanca, Ávila y Cáceres y presenta una dirección NE-SO, de manera que la mitad occidental de la sierra forma parte de la cuenca del Tajo, mientras que la mitad oriental está dividida, por el Puerto de Tornavacas, entre las cuencas de los ríos Tajo (al sur) y Duero (al norte).

## **EDAFOLOGÍA**

---

Una revisión general de la edafología de la zona puede encontrarse en García-Rodríguez (1988) y Gil-Martín (1999). Los suelos existentes en la Sierra de Gredos se pueden diferenciar en tres grupos, atendiendo al substrato sobre el que se desarrollan: suelos sobre el complejo granito-gneis, suelos sobre pizarras y suelos sobre sedimentos terciarios y cuaternarios.

La gran mayoría de la superficie de la zona está representada por los suelos que se desarrollan sobre el complejo plutónico hercínico granito-gneiss; éstos son los cambisoles gleicos, que se localizan en zonas bajas y alternan frecuentemente con afloramientos de la roca madre, siendo generalmente



aprovechados para el cultivo cuando la homogeneidad del terreno lo permite; los rankers, que ocupan la mayor parte de las laderas de las montañas en los pisos meso y supramediterráneo, ocupados generalmente por encinares, robledales y pinares de repoblación; en determinadas zonas del macizo occidental en las que aparece un mayor espesor del suelo, los rankers alternan con cambisoles húmicos. Los litosoles dominan en los estratos superiores de la sierra, en los que las condiciones climáticas unidas a la escasa profundidad del sedimento edáfico en este tipo de suelos sólo permiten el crecimiento de matorrales y pastos.

Debido a la pobreza en sustratos metamórficos de tipo pizarras, los cambisoles dístricos desarrollados sobre este material se reducen a pequeñas manchas en la vertiente sur de la sierra, mientras que los suelos que se desarrollan sobre sedimentos terciarios y cuaternarios son de tipo luvisoles y se reducen a zonas con una topografía llana o suave en el macizo oriental y en la vertiente sur del macizo central.

Finalmente, de forma puntual, aparecen otros tipos de suelos tales como los fluvisoles sobre llanuras aluviales en los valles del Tormes y Tiétar, y los suelos con hidromofía, entre los que dominan gleysoles e histosoles.

## **BIOGEOGRAFÍA**

---

La Sierra de Gredos se encuentra dentro de la región mediterránea, constituyendo la frontera natural entre dos provincias biogeográficas, la Carpetano-Ibérico-Leonesa (al norte) y la Luso-Extremadurensis (al sur). La vertiente sur forma parte del sector Toledano-Tagano, y es bastante homogénea desde el punto de vista biogeográfico; la vertiente norte constituye en su totalidad el sector Bejarano-Gredense, el cual está dividido en tres subsectores (Rivas Martínez *et al.*, 1987, 1990):



- Paramero-Serrotense: en las sierras exteriores situadas al norte del macizo central, se subdivide en:
  - Distrito Paramero-Avilés, incluyendo la sierra de la Paramera.
  - Distrito Paramero-Serrotense, que incluye las sierras de Villafranca y La Serrota.
- Gredense, subdividido en dos distritos:
  - Distrito Gredense oriental, que corresponde al macizo oriental.
  - Distrito Altogredense, formado por el macizo central.
- Bejarano-Tormantino, que corresponde al macizo occidental de la sierra y zonas limítrofes, se subdivide en:
  - Distrito Tormantino, ubicado en las zonas de contacto entre los macizos central y occidental, incluye la sierra del Barco y el curso alto del río Tormes.
  - Distrito Bejarano, se corresponde con la sierra de Béjar propiamente dicha.

## **BIOCLIMATOLOGÍA Y VEGETACIÓN**

Una revisión general de la vegetación de la zona puede encontrarse en Sánchez-Mata (1999). La marcada asimetría de la sierra origina diferencias importantes entre la bioclimatología de las vertientes norte y sur. La primera diferencia es un gradiente climático mucho más acusado en la vertiente meridional debido al mayor desnivel de dicha vertiente. También en la parte sur de la sierra son más frecuentes las precipitaciones, puesto que se encuentra en zona de barlovento respecto a los vientos del sur y suroeste, principales responsables de las lluvias en esta región. Esta vertiente presenta un carácter mucho más atlántico que la norte debido a que la disposición transversal de la cordillera actúa de barrera impidiendo la influencia de los aires polares



procedentes del norte, más frecuentes en invierno y que confieren un carácter continental (Gavilán-García, 1999).

También existen ligeras diferencias entre las zonas occidentales y orientales de la sierra, siendo por lo general la parte oeste menos fría y con una mayor cantidad de precipitaciones.

En Gredos encontramos, como es típico de la región mediterránea, una zonación altitudinal de la vegetación, que se distribuye en cuatro pisos bioclimáticos (Ozenda, 1975; Rivas-Martínez, 1981, 1984):

a) Mesomediterráneo: caracterizado por una temperatura media anual entre 13° y 17°C y una precipitación muy elevada, especialmente en las zonas occidentales. Se limita exclusivamente a la vertiente sur y abarca desde las zonas basales hasta los 900-950 m.

La vegetación potencial de esta zona corresponde, excepto en las áreas orientales menos húmedas, a melojares mesomediterráneos (*Arbutum unedonis-Quercetum pyrenaicae*) sustituidos en el fondo de los valles por fresnedas mesomediterráneas (*Ficario ranunculoidis-Fraxinetum angustifoliae*) y en las zonas riparias por alisedas (*Scrophulario scorodoniae-Alnetum glutinosae*) y saucedas (*Salicion salvifoliae*). Las zonas en las que se mantienen los melojares son escasas, apareciendo en gran parte del territorio sus etapas de sustitución, tales como piornales mesomediterráneos (*Cytiso multiflori-Sarothamnetum eriocarpi*) en zonas mejor conservadas y brezales (*Halimio ocymoidis-Ericetum umbellatae*) y brezal-jarales (*Polygalo microphyllae-Cistetum populifolii*) en zonas alteradas y deforestadas.

b) Supramediterráneo: con una temperatura media anual entre 8° y 13°C, aparece en ambas vertientes desde los 900-950 m hasta los 1750-1800 m. Es el piso basal de la vertiente norte y el de mayor extensión en toda la sierra.

En este piso la vegetación potencial corresponde al melojar supramediterráneo (*Festuco elegantis-Quercetum pyrenaicae*), aunque en la



actualidad se conservan muy pocos ejemplos de estas formaciones forestales autóctonas. Como primeras etapas seriales se extienden en los niveles inferior y medio de este piso los piornales de piorno blanco (*Thymo mastichinae-Cytisetum multiflori*), mientras que en las zonas altas aparecen formaciones de piorno serrano con aliaga cinérea (*Genisto cinerascentis-Cytisetum oromediterranei*). En las zonas en las que se produce la destrucción de los piornales por el fuego aparecen pastizales pirófilos denominados cerrillares (*Leucanthemopsis pallidae-Festucetum elegantis*). En suelos muy degradados el piornal puede ser sustituido por jarales de estepa y manzanilla de perro (*Artemisio-Santolinion rosmarinifoliae*). Finalmente, como última etapa de degradación de la serie encontramos pastizales vivaces de tipo cervunal con aliaga (*Genisto anglicae-Nardetum strictae*).

c) Oromediterráneo: se caracteriza por una temperatura media anual entre 4° y 8°C y abarca las zonas comprendidas entre los 1750-1800 m y los 2200-2300 m. En gran parte de la sierra es el piso superior.

La vegetación natural en los macizos central y oriental corresponde a enebrales rastreros con piorno serrano y cambrión (*Cytiso oromediterranei-Echinopartetum barnadesii*). En el macizo occidental son más frecuentes los enebrales con piorno serrano y cambrión rastrero (*Echinoparto pulviniformis-Cytisetum oromediterranei*). En las sierras de Paramera, Villafranca y La Serrota, debido a su carácter más continental, el cambrión deja de ser frecuente, siendo la vegetación natural la formada por enebrales rastreros y piorno serrano (*Senecioni carpetani-Cytisetum oromediterranei*). Actualmente y debido en gran parte a los incendios provocados por el hombre, estas comunidades se encuentran muy degradadas y apenas quedan enebros. Las zonas de enebros han pasado a ser claros en los que se desarrollan pastizales vivaces de tipo joragales (*Arenario querioidis-Festucetum summilusitanicae*), o en zonas con balance hídrico favorable, cervunales (*Campanulo herminii-Nardion strictae*).



Especial atención merecen en este piso las comunidades saxícolas entre las que destacan las propias de pedreras y derrubios móviles con dedaleras (*Digitali carpetanae-Senecionetum carpetani*) y las de canchales con grandes bloques en depósitos morrénicos (*Cryptogrammo-Dryopteridium oreadis-Doronicetosum kuepferi*).

d) Crioromediterráneo: presenta temperaturas medias inferiores a 4°C y se limita a zonas por encima de los 2200-2300 m, por lo que únicamente aparece en las zonas de cumbres más altas de los macizos central y occidental.

La vegetación potencial en estos territorios corresponde a comunidades vivaces cespitosas (*Agrostio rupestris-Armerietum bigerrensis*). Sin embargo, debido al largo periodo de innivación al que están sometidas estas zonas, dichas comunidades han quedado reducidas a lugares en los que la permanencia de la nieve es mucho menor, tales como los espolones y crestas rocosas. La mayoría de la extensión del piso crioromediterráneo está ocupada por céspedes densos higrófilos o quionófilos de tipo cervunales (*Campanulo herminii-Nardion strictae*). Al igual que en el piso oromediterráneo, también en este caso adquieren especial importancia una serie de comunidades vegetales características de fisuras (*Saxifragion wilkommiae*), pedreras (*Linario-Senecionion carpetani*) y canchales formados por depósitos morrénicos (*Dryopteridion oreadis*).

## **MEDIOS ACUÁTICOS**

---

Una revisión sobre las características generales de los medios acuáticos de Gredos puede encontrarse en Toro (2001). Debido a la importancia que representan para la reproducción de los anfibios de la zona, consideramos importante dedicar un espacio a las lagunas de la sierra.



### ***Formación y evolución***

Hace aproximadamente 100.000 años comenzó la etapa glacial en Gredos (Pedraza & López, 1980), durante la cual probablemente se sucedieron varios periodos de avance y retroceso de los hielos. Las masas glaciares que circulaban desde las cumbres de la sierra hacia el valle fueron excavando y modelando las cuencas, sus lechos y laderas, formando depresiones y generando morrenas con los materiales arrastrados. Tras la retirada de los hielos de forma definitiva, hace unos 10.000 años, se inicia la formación de las lagunas por dos causas principales: el llenado de las depresiones sobreexcavadas por los glaciares con el agua del deshielo y la retención de este mismo agua por las morrenas laterales y frontales que actuaron a modo de presas naturales. La erosión fluvial jugó un papel muy importante a lo largo de estos últimos 10.000 años, remodelando algunos de los lechos de las lagunas, especialmente los ubicados a menor altitud en el fondo de los valles y gargantas (Toro, 2001).

Las lagunas de la Sierra de Gredos se localizan en su totalidad en su cara norte. Esta situación, relacionada con la ubicación de los antiguos glaciares en dicha vertiente, determina marcadamente algunos parámetros ambientales climatológicos que influyen en la limnología de las lagunas. Uno de estos parámetros es la radiación solar, condicionada por el relieve circundante de los circos y valles glaciares, que proyectan su sombra sobre las lagunas. Este fenómeno es especialmente marcado en los meses de invierno, cuando el sol alcanza una menor altura en el cielo, quedando parte o casi la totalidad de algunas lagunas sin recibir los rayos del sol durante largos periodos de tiempo. Las temperaturas inferiores de la cara norte y los vientos del N y O, son otros aspectos que contribuyen a aumentar las condiciones extremas de las masas de agua al favorecer, entre otros aspectos, una mayor duración de las cubiertas de hielo, así como los fenómenos de mezcla de la





columna de agua y la ausencia de estratificación estival de la misma (Toro, 2001).

Las lagunas de la sierra se podrían clasificar, en función de los factores geomorfológicos de la cuenca y la propia morfología de la cubeta de la laguna, en cuatro tipos (Pedraza & López, 1980; Toro, 2001):

- Lagunas de circo en sentido estricto: originadas por una sobreexcavación del sustrato rocoso por parte de los hielos que se concentraron en los circos. Se localizan en los circos glaciares de las cabeceras de los valles que presentan fuertes pendientes. Tienen grandes profundidades en relación a su superficie y muestran perímetros más o menos redondeados o elípticos.
- Lagunas de hoyas o de fondo de valle glaciar: cuyo origen responde a una fuerte erosión provocada por los hielos en zonas más llanas de las cabeceras de los valles o en las salidas de grandes circos glaciares, previas a fuertes escalones u obstáculos del valle, mostrando pendientes algo menos acusadas que las anteriores, al menos en las entradas y salidas de los mismos. En este caso la superficie es mayor respecto a la profundidad de la laguna. Tienen formas alargadas pudiendo presentar una o más cubetas según la estructura del sustrato rocoso y la longitud del rellano que ocupan.
- Lagunas de carácter fluvial: localizadas en pequeños rellanos o escalones de cauces de torrentes, donde pequeñas depresiones del terreno originadas por la erosión glaciar y hoy casi colmatadas, permiten una acumulación más o menos patente de masas de agua de reducidas dimensiones y poco profundas (menos de 2 m). Se caracterizan porque la renovación de sus aguas es muy alta, especialmente durante el deshielo o tras fenómenos tormentosos con fuerte precipitaciones.
- Lagunas de morrena: pequeñas lagunas asociadas a depósitos



morrénicos que encierran depresiones del terreno donde se acumula el agua. Debido a la naturaleza más permeable del sustrato, suelen mostrar una temporalidad acusada. Son de escasa profundidad y presentan una gran profusión de macrófitos y otras plantas asociadas a humedales de montaña.

La evolución natural de los lagos y lagunas de alta montaña es su colmatación por llenado de las cubetas con sedimentos o materiales arrastrados procedentes de sus cuencas vertientes. Los procesos erosivos son característicos de las cabeceras de las cuencas montañosas; el deshielo y las precipitaciones tormentosas, unidos a las fuertes pendientes y los marcados contrastes climáticos (especialmente la temperatura), favorecen la meteorización de las rocas y el terreno y su transporte por las aguas de escorrentía y torrentes. Las cubetas lacustres actúan como trampas de retención de estos materiales, produciéndose un proceso natural de colmatación cuya velocidad es directamente proporcional al tamaño de la cuenca y a la disponibilidad de materiales fácilmente erosionables y transportables (Toro, 2001).

El resultado de la disminución progresiva del volumen y la profundidad de las lagunas es la alteración del funcionamiento del propio ecosistema acuático. A medida que la profundidad y el volumen disminuyen, la superficie de los lagos aumenta considerablemente respecto a su volumen, incrementándose el intercambio entre la masa de agua y el exterior, y evolucionando hacia características más propias de un humedal (Casado & Montes, 1995). Cuando la profundidad de la laguna es mayor, gran parte de los nutrientes procedentes de la escorrentía de la cuenca (cuyas fuentes son la propia lluvia, los suelos y la vegetación) van a parar al sedimento, especialmente el fósforo por su carácter más insoluble respecto al nitrógeno, donde son fijados en diferentes formas químicas. Esto provoca que no estén



tan fácilmente disponibles para el crecimiento de las algas de las zonas fóticas de la columna de agua. Cuando la profundidad de la laguna disminuye por colmatación, la zona fótica llega a alcanzar el fondo de la cubeta, favoreciendo un mayor reciclado de los nutrientes fijados en el sedimento (Moss, 1998).

## *Características del agua*

### **La cubierta de hielo**

La formación de una cubierta de hielo durante la época invernal es la característica que se ha utilizado tradicionalmente para definir a los lagos y lagunas de alta montaña. La duración de esta cubierta de hielo depende de la profundidad media del lago, la temperatura y humedad relativa del aire, la velocidad del viento, la radiación solar, la nubosidad y la precipitación (Vavrus *et al.*, 1996). En el caso de la Sierra de Gredos estas variables se resumen en la altitud a la que se sitúa la laguna, la orografía circundante y su tamaño. La formación de la cubierta suele producirse en el mes de noviembre o principios de diciembre. El deshielo, por regla general, se produce desde marzo para las lagunas de menor altitud y más someras hasta finales de mayo o incluso principios de junio en las lagunas situadas a mayor altitud y con un fuerte efecto de sombra por las montañas circundantes (Toro, 2001).

Durante la época con cubierta de hielo el agua de las lagunas permanece en casi total oscuridad, sin entradas ni salidas apreciables de agua y aisladas del intercambio atmosférico. La duración de esta cubierta determina el tiempo disponible en el ciclo anual para la producción primaria, más largo cuanto menor sea la duración de ésta. Además, durante la época con cubierta de hielo se degrada heterotróficamente gran parte de la materia orgánica producida en la laguna o procedente de la cuenca. Cuanto más tiempo dure la cubierta más amplios serán los cambios que, como consecuencia de esta metabolización de materia orgánica, se producen en el oxígeno disuelto, la



alcalinidad, el pH y el intercambio de nutrientes entre los sedimentos y la columna de agua.

Cuando se empieza a producir el deshielo, empieza a entrar en las lagunas gran cantidad de agua. Esto produce tensiones sobre la cubierta, originándose fracturas y grietas en la misma, favorecidas además por las oscilaciones de temperatura entre el día y la noche (hasta 20°C en el inicio de la primavera). Más adelante la cubierta empieza a desaparecer, primero en las zonas más soleadas o sometidas a cierta corriente (cercañas de arroyos de entrada y salida) y después en toda la laguna.

### **Transparencia**

Durante la mayor parte del periodo con cubierta de hielo la laguna permanece en completa oscuridad. Solamente el hielo de las primeras fases de la cubierta permite la transmisión de gran parte de la radiación incidente al agua.

Durante el resto del año la radiación lumínica suele alcanzar la totalidad de la columna de agua debido a la escasa profundidad de las lagunas. Sin embargo, la intensidad y tipo de radiación que alcanza cada profundidad de la laguna es variable. El agua absorbe la luz mucho más eficazmente que el aire, por lo que en pocos metros se observa una atenuación muy marcada de la luz incidente. A esto hay que añadir el efecto de la sombra que produce el fitoplancton y las partículas en suspensión. De este modo se crea una heterogeneidad en cuanto a las condiciones lumínicas a diferentes profundidades (Toro, 2001).

### **Régimen térmico**

La evolución térmica de la columna de agua puede determinar la disposición de los nutrientes necesarios para la producción primaria, controla en gran medida la concentración y distribución del oxígeno disuelto en el agua y es un



factor clave en la historia vital de numerosas especies, regulando procesos como la sucesión de especies o la emergencia de insectos (Toro, 2001).

En las lagunas de mayor envergadura hay que destacar la presencia de dos épocas muy diferentes: por un lado, durante el periodo libre de hielo la temperatura del agua es prácticamente homogénea en toda la columna. Tan sólo en los días soleados puede detectarse un ligero incremento en superficie por efecto de la radiación solar, equilibrándose la columna de agua durante la noche.

Por otra parte, con la aparición de la capa de hielo se produce un gradiente de la temperatura, con la capa de agua en contacto con el hielo a casi 0°C y una capa profunda a 4°C. Esta estratificación, unida a que la cubierta de hielo impide el efecto de mezclado por el viento, provoca una situación de elevada estabilidad en la columna de agua, siendo el componente horizontal del movimiento del agua bastante mayor que el componente vertical. Esta asimetría en la temperatura se ve frecuentemente acompañada por una asimetría en las características químicas del agua. En las lagunas más someras, durante la época con cubierta invernal, esta estratificación inversa es poco evidente debido a la reducida columna de agua que queda entre el hielo y los sedimentos.

### **Oxígeno disuelto y composición química**

La concentración de oxígeno disuelto en el agua depende de dos factores. El primero es la temperatura, la concentración máxima de oxígeno disuelto en equilibrio es mayor cuanto menor es la temperatura del agua. El segundo mecanismo se refiere al papel esencial que el oxígeno desempeña en el metabolismo, la degradación aeróbica de la materia orgánica lo consume mientras que la fotosíntesis oxigénica lo produce.

El oxígeno disuelto se incrementa durante el día como consecuencia de



la fotosíntesis oxigénica de la comunidad fitoplactónica, mientras que por la noche se produce una disminución del mismo al predominar la respiración heterotrófica en ausencia de producción. Con el aumento de la temperatura en el deshielo, se observa un descenso de la concentración de oxígeno según se va calentando el agua, e inversamente, un aumento de la concentración al enfriarse el agua después del máximo estival (Toro, 2001).

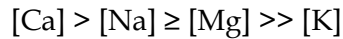
Durante la época en que la laguna permanece cubierta de hielo se impide la entrada de oxígeno desde la atmósfera a las lagunas, por lo que la formación de la cubierta encierra una determinada cantidad de oxígeno disuelto que va a ser el único disponible para la respiración heterotrófica, ya que esta misma cubierta impide prácticamente el paso de luz y, por tanto, la fotosíntesis oxigénica. De esta manera se observa un descenso continuo y progresivo de la cantidad de oxígeno disuelto en el agua según avanza esta situación, especialmente en el fondo de las lagunas, donde sedimenta la materia orgánica presente en la columna de agua.

La composición química de las lagunas es el resultado del lavado de las rocas de la cuenca de drenaje (meteorización), de los aportes atmosféricos y del balance de entrada y salida de agua de las lagunas. En general, el pH de las lagunas es ligeramente ácido, con un valor medio de 6,6.

Cabe destacar una cierta uniformidad con respecto a los porcentajes iónicos como consecuencia de la práctica homogeneidad en la litología de las diferentes cuencas. Respecto a los aniones, el bicarbonato supone más del 50% de las cargas negativas aportadas en el equilibrio químico del agua. Este predominio del bicarbonato no se debe a una elevada concentración sino a la bajísima concentración del resto de las formas aniónicas. Respecto del resto de aniones, predomina el sulfato sobre el cloruro en casi todas las lagunas. Es muy posible que este hecho sea una expresión de la acusada continentalidad de la sierra, lejos de la influencia del aerosol marino de cloruro sódico.



En cuanto a la composición catiónica, en la mayoría de las lagunas se cumple:



El potasio es en todos los casos el catión que se halla presente en menor concentración. Esto es debido a que a pesar de que en las rocas ígneas se encuentra en proporciones similares al sodio, es liberado con mayor dificultad de los minerales y además muestra una fuerte tendencia a ser incorporado en arcillas (Hem, 2005).

Otro catión a considerar es el amonio. Hay varias posibles fuentes de amonio en la columna de agua: la entrada vía atmosférica (lluvia, nieve, deposición seca), la excreción de organismos acuáticos, la descomposición de materia orgánica (principalmente proteínas) por bacterias heterotróficas, la resuspensión desde el sedimento en condiciones anaeróbicas o la presencia de ganado en las cercanías de las lagunas (Catalán *et al.*, 1994).

Si se considera la concentración absoluta de iones, todas las lagunas de Gredos están extremadamente diluidas. Los valores de conductividad son extremadamente bajos, oscilando entre los 5  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y los 18  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a 25°C. En cuanto al grado trófico, la mayor parte de las lagunas son oligotróficas (<10  $\mu\text{g}/\text{l}$  de fósforo).

Las proporciones iónicas son relativamente constantes a nivel interanual, sin embargo, el grado de mineralización presenta variaciones tanto a nivel intraanual como interanual. El factor principal que controla la mineralización es la tasa de renovación. Durante las lluvias de otoño se reduce la mineralización como consecuencia de la rápida entrada de gran cantidad de agua. Con la formación de la cubierta de hielo se produce una gran estabilidad de la columna de agua así como la metabolización de la materia orgánica generada en el periodo estival. Esta metabolización produce en muchas ocasiones las condiciones para que haya una liberación de calcio desde los



sedimentos, apreciándose un incremento de la mineralización en las capas de agua próximas a éstos. En las fases iniciales del deshielo puede observarse un ligero incremento de la mineralización del agua debido a una fusión temprana de aquellas capas más cargadas de iones, sin embargo, el resultado a la larga es la entrada de gran cantidad de agua en la laguna, lo que produce un efecto de dilución en el medio. Durante el verano, una vez que cesa la entrada de agua de deshielo, la mineralización vuelve a aumentar progresivamente hasta llegar de nuevo las lluvias otoñales e iniciarse un nuevo ciclo hidrológico.

### **Vegetación acuática**

La mayor parte de las plantas acuáticas de las lagunas de Gredos son rizófitos, es decir, plantas que viven con sus raíces fijas a un sedimento de arenas o limos del que extraen gran parte de los nutrientes requeridos para su desarrollo. La presencia de estas plantas y su interacción con otros grupos de organismos acuáticos va a condicionar en gran medida las características físicas de la propia laguna; así en aquellas lagunas donde existe una dominancia de las plantas acuáticas o macrófitos el crecimiento del fitoplancton se encuentra muy limitado, presentando aguas muy claras o transparentes al actuar estas plantas como barreras para la circulación de las corrientes de agua y los fenómenos de resuspensión del sedimento. Además proporcionan un valioso refugio para el zooplancton frente a posibles depredadores, lo que favorece el desarrollo de estas especies, controladoras del crecimiento de las algas. En caso de no hallarse presentes las comunidades de macrófitos se produciría una dominancia de las algas, lo que daría lugar a aguas más turbias y a una menor estabilidad del sedimento (Moss, 1998).

En función de que la planta se encuentre total o parcialmente sumergida se pueden considerar tres grupos o tipos de comunidades (Margalef, 1983):





- Limnófitos o hipohidrófitos: macrófitos con las hojas sumergidas. Entre otros, pertenecen a este grupo todos los briófitos y pteridófitos acuáticos (*Isoetes* sp.), *Callitriche* y *Myriophyllum*.
- Anfífitos o epihidrófitos: presentan hojas en contacto total o parcial con el aire. Es el caso de *Potamogeton natans* y *Antinorea agrostidea*.
- Helófitos o hiperhidrófitos: tienen hojas totalmente emergidas directamente sobre tallos. Son típicas de este grupo *Juncus* y *Carex*.

El grado de temporalidad o de fluctuación de las aguas de las lagunas va a determinar la composición de las comunidades de macrófitos. En lagunas estables encontramos tanto especies típicas de medios acuáticos de alta montaña como *Subularia aquatica*, *Isoetes velatum*, *Callitriche palustris*, *Myriophyllum alternifolium* o *Sparganium angustifolium*, como otras de ambientes menos alpinos como *Potamogeton natans*, *Ranunculus peltatus* o *Antinorea agrostidea*. En el caso de las lagunas o charcas someras encontramos plantas como *Ranunculus peltatus*, *Antinorea agrostidea*, *Potamogeton natans* y *Juncus bulbosus*, y una serie de briófitos como *Sphagnum fimbriatum*, *S. papillosum*, *S. subsecundum*, *S. denticulatum*, *S. compactum*, *Bryum latifolium*, *Aulacomnium palustris*, *Wanstorfia exannulata*, *Philnotis seriata*, *Polytrichum* sp., *Fontinalis squamosa* y *F. antipirética*.

La presencia de ganado en alguna de las lagunas aumenta la mineralización de las aguas y su concentración en nutrientes, favoreciendo a algunas especies como *Scapania undulata*, *Wanstorfia exannulata*, *Philnotis seriata* o *Calliergon stramineum* y haciendo desaparecer a otras como los *Sphagnum* sp. (Gorham & Janssens, 1992).

### ***Problemas de conservación***

En las lagunas de la sierra es especialmente relevante la concentración de



bicarbonatos, que en este tipo de aguas de carácter ácido es, en la práctica, equivalente a la alcalinidad (Psenner & Catalán, 1994). Dado que este ión es un componente del sistema tamponador carbónico-carbonatos, la alcalinidad va a determinar la capacidad de tamponamiento del agua. Las alcalinidades registradas en estas lagunas son muy bajas, por lo que son frecuentes los cambios bruscos de pH en respuesta a distintos factores ambientales como la entrada de aniones ácidos durante el deshielo o la actividad fotosintética. Además, su sensibilidad frente a la entrada vía atmosférica de aniones ácidos es muy alta, lo que hace que uno de los principales riesgos para este tipo de lagunas lo constituya la lluvia ácida, aunque de momento, a partir de los valores de pH encontrados no son apreciables síntomas regionales de acidificación.

Otro de los posibles problemas de conservación de estos ecosistemas acuáticos está relacionado con la capacidad de disolución del fósforo, elemento regulador de la producción primaria. Los lagos ubicados en cuencas de naturaleza calcárea presentan una elevada concentración de calcio, que precipita junto con el fósforo disuelto limitando la producción primaria del ecosistema acuático. Por el contrario, las lagunas de la Sierra de Gredos se caracterizan por tener bajas concentraciones de calcio y un pH ligeramente ácido, por lo que cualquier entrada contaminante con elevadas concentraciones de nutrientes iniciará un rápido proceso de eutrofización. Frente a este hecho, este tipo de lagunas tiene a su favor el poseer una tasa de renovación muy elevada, que favorece el rápido reciclaje del agua y el arrastre de gran parte del fósforo. En la sierra, la máxima entrada de nutrientes por impacto turístico y ganadero se produce en verano, cuando el tiempo de residencia es alto. Esto puede dar lugar a periodos puntuales de eutrofización, aunque sus efectos suelen ser en parte reversibles y temporales gracias al intercambio de las aguas producido por las lluvias otoñales y posteriormente por el deshielo primaveral



(Toro, 2001).

También es importante considerar el aumento de la radiación UV-B ( $\lambda = 280\text{-}315\text{ nm}$ ) que incide sobre la superficie de los medios acuáticos debido a la disminución de la capa de ozono. Se ha demostrado que el aumento de este tipo de radiación tiene efectos negativos sobre el fitoplancton, las algas y las cianobacterias, así como en comunidades de invertebrados e incluso de vertebrados acuáticos como peces y anfibios, sobre todo en sus primeros estadios de desarrollo (Häder & Worrest, 1997). Este problema puede ser especialmente grave en los medios acuáticos de alta montaña debido al aumento natural del flujo de la radiación ultravioleta con la altitud. Este aumento es consecuencia del menor recorrido de la luz a través de la atmósfera y, por lo tanto, de la menor dispersión y absorción (Broomhall *et al.*, 2000). En este sentido medidas de la radiación ultravioleta en los Alpes entre 577 y 3576 m de altitud indicaron un aumento de la media anual de radiación UV-B de aproximadamente el 19% cada 1000 m (Sommaruga, 2001). Además, la baja concentración de materia orgánica disuelta que suele caracterizar a este tipo de medios provoca una escasa absorción a lo largo de la columna de agua de la radiación incidente en la superficie.

## ***LOCALIDADES DE ESTUDIO***

---

Para la realización del estudio se seleccionaron una serie de medios acuáticos situados en zonas altas de la vertiente norte del Sistema Central, Ávila (Fig. 5). La elección de estas localidades se ha realizado en base a una serie de criterios tales como:

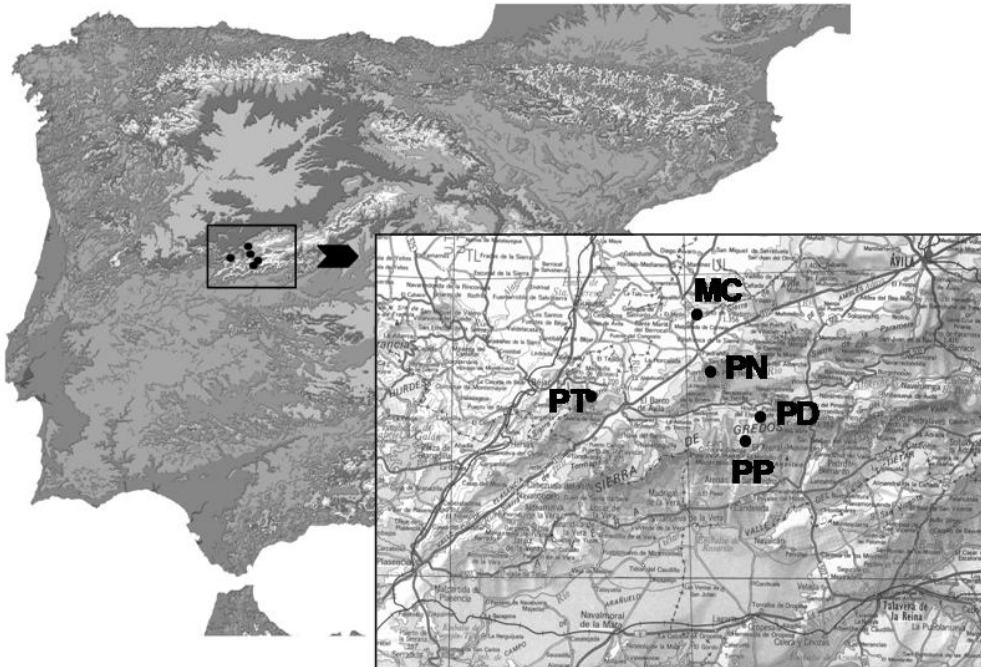
- Reproducción de varias especie de anfibios.
- Observación de puestas afectadas por Oomycetes.
- Diferentes rangos de altitud, que se traducen en diferencias en la



intensidad de radiación UV-B superficial.

- Existencia previa de varios estudios de herpetofauna (p.ej. Lizana *et al.*, 1988, 1991; Lizana & Pedraza, 1998; Lizana & Ciudad, 1999).

**Figura 5.** Ubicación de las localidades de estudio en la Península Ibérica. Ver Tabla 1 para más detalles



Las localidades seleccionadas fueron (Fig. 6 y Tabla 1):

- Malpartida de Corneja: se trata de una fosa excavada para la extracción de áridos que se inunda con las primeras lluvias y mantiene agua hasta finales de primavera o principios de verano. Su profundidad máxima no supera los 50 cm y carece de vegetación en la orilla. Se encuentra localizada junto a una carretera comarcal, en una zona de encinar
- Puente del Duque: Son dos pequeñas charcas utilizadas como abrevadero para el ganado. Se encuentran ubicadas dentro del Parque Regional de la Sierra de Gredos, a unos 100 m de la carretera a la



**Figura 6.** Imágenes de cuatro de las cinco localidades de estudio: **1)** Malpartida de Corneja, **2)** Puerto del Tremedal, **3)** Puerto de Peña Negra, **4)** Prado de las Pozas



plataforma de Gredos, en la zona inundable de un prado. La charca más grande tiene una profundidad máxima de aproximadamente un metro, mientras que la pequeña no supera los 20 cm. Ambas charcas poseen una abundante vegetación flotante y sumergida, que alcanza importantes densidades al final de la primavera. Apenas existe vegetación de orilla.

- Puerto del Tremedal: conjunto de pequeñas charcas agrupadas en dos zonas en las proximidades del Puerto del Tremedal, en su vertiente norte, en una zona cubierta de pastizales de cervuno. De las 13 charcas que componen el conjunto, únicamente en la de mayor volumen y superficie la profundidad llega a superar los 60 cm de profundidad en su parte central y mantiene agua durante todo el año. El resto de las charcas varía desde muy



someras (profundidades máximas no superiores a 15 cm), que se secan a principios de verano, hasta charcas que pueden alcanzar 30-40 cm en su parte más profunda y que pueden mantener algo de agua durante la mayor parte del verano. En las charcas de mayor entidad se puede observar un crecimiento excesivo de la vegetación sumergida hacia el final de la primavera. En todas ellas la vegetación de orilla es muy poco abundante.

- Puerto de Peña Negra: se trata de tres charcas intercomunicadas situadas junto a la carretera, en la misma cima del puerto, en un pequeño prado que se abre entre laderas cubiertas completamente por piornos. Una de las charcas, la de mayor volumen, puede alcanzar los 40 cm de profundidad en su parte central, y mantiene agua durante la mayor parte del verano. Las otras dos tienen un carácter muy somero, con profundidades raramente superiores a los 20 cm; una de estas dos charcas puede mantener agua durante algún tiempo tras el final de la primavera, produciéndose un gran desarrollo de la vegetación sumergida, al igual que ocurre en la de mayor volumen. La otra se suele secar al inicio del verano.

- Prado de las Pozas: conjunto formado por dos charcas y una serie de pozas que aparecen en dos tramos del Arroyo de las Pozas, en la parte central del Parque Regional de la Sierra de Gredos. Todo el conjunto aparece rodeado de prados de cervuno, no existiendo ningún tipo de vegetación de orilla. Las dos charcas son de similares características, con profundidades que pueden superar los 50 cm, y que pueden mantener agua de modo permanente, aunque su superficie y volumen se reduce considerablemente durante el verano. En el tramo bajo del arroyo aparece una poza de grandes dimensiones, con profundidades que pueden superar los 120 cm. En el tramo alto hay fundamentalmente tres zonas en las que aparecen anfibios; dos pozas de pequeñas dimensiones (profundidades inferiores a los 90 cm), y una zona remansada que corresponde a la



desembocadura de un pequeño regato en el arroyo principal, y cuya profundidad no supera los 20 cm. En esta zona la vegetación sumergida es muy abundante.

**Tabla 1.** Poblaciones seleccionadas y especies de anfibios estudiadas en cada una de ellas

Población	Código	Altitud (m)	Coordenadas geográficas	Especies estudiadas
Malpartida de Corneja	MC	1046	40° 31' 40'' N	<i>Bufo calamita</i>
			5° 20' 24'' W	<i>Pelobates cultripipes</i>
Puente del Duque	PD	1383	40° 20' 10'' N	<i>Hyla arborea</i>
			5° 10' 40'' W	<i>Pelophylax perezi</i>
Puerto del Tremedal	PT	1614		<i>Bufo calamita</i>
			40° 21' 47'' N	<i>Pelobates cultripipes</i>
			5° 36' 35'' W	<i>Hyla arborea</i>
Puerto de Peña Negra	PN	1920		<i>Pelophylax perezi</i>
			40° 25' 20'' N	<i>Bufo calamita</i>
Prado de las Pozas	PP	1927	5° 17' 57'' W	
			40° 16' 10'' N	<i>Bufo calamita</i>
			5° 14' 47'' W	<i>Bufo bufo</i>

### ***ESPECIES DE ANFIBIOS ESTUDIADAS***

En cada una de las localidades se ha llevado a cabo el seguimiento de las puestas de diferentes especies de anuros. La elección de este grupo de anfibios se debe a la facilidad para detectar sus puestas, lo que facilita la observación de fenómenos de infección. Revisiones generales de la biología de las especies estudiadas pueden encontrarse en Barbadillo *et al.* (1999), Lizana & Ciudad



(1999), García-París *et al.* (2004), Velasco *et al.* (2005), Diego-Rasilla & Ortiz-Santaliestra (2009), Egea-Serrano (2009), Gómez-Mestre (2009) y Recuero (2010), y se describen brevemente a continuación.

***Pelobates cultripipes* (Cuvier, 1829). Sapo de espuelas**



Sapo de tamaño medio, con ojos grandes de pupilas verticales e iris plateado, amarillento o verde. El tímpano es inapreciable. Se trata de un sapo robusto, de patas cortas. En los miembros posteriores presenta un tubérculo metatarsal grande, bastante engrosado y de color negro que forma una espuela bien visible. Los machos presentan una glándula de forma elíptica en la zona del antebrazo, bien distinguible cuando el miembro anterior está estirado. La coloración dorsal es variable, desde muy clara, amarillenta o blanquecina hasta tonos pardo-oliváceos, es característica la presencia de manchas oscuras grandes y bien definidas de color verdoso o pardo. La zona ventral es de color claro, a veces teñida con colores más oscuros y con pequeñas manchas grisáceas en la zona de la garganta y la parte posterior del cuerpo. La piel presenta un aspecto liso y brillante, a excepción de la parte posterior de la





cabeza. En esta zona la piel está adherida al cráneo, lo que le confiere un aspecto rugoso.

Su distribución se limita a la Península Ibérica y litoral mediterráneo de Francia, con algunas poblaciones en la zona meridional de la costa atlántica francesa. En la Península Ibérica está ausente en la cornisa Cantábrica, Pirineos y las zonas más áridas del sudeste peninsular.

Es una especie de hábitos muy terrestres, que sólo acude al agua en el momento de la reproducción. Habita en lugares abiertos y generalmente llanos, en zonas de suelo arenoso o, al menos, no muy compactado; con cierta independencia del tipo y de la cobertura de vegetación. Durante los periodos de inactividad los animales permanecen enterrados en galerías que ellos mismos excavan con la ayuda de las espuelas.

Generalmente se reproduce en charcas temporales de gran tamaño, aunque también puede utilizar lagunas pequeñas de poca profundidad y, excepcionalmente, ríos y pozos. En menor medida se reproduce en abrevaderos y fuentes.

La duración del periodo reproductor es muy variable en función de las condiciones climáticas y suele coincidir con días de lluvia con temperaturas templadas, en primavera o a finales del otoño. En la meseta norte el periodo reproductor es relativamente corto, comenzando a finales de febrero y extendiéndose como máximo hasta mayo. El amplexo es de tipo inguinal, las hembras depositan las puestas bien en alguna planta del fondo o sobre el propio sustrato. La puesta consiste en un largo cordón gelatinoso que puede contener hasta 6000 huevos, aunque el número medio varía entre 2000 y 2500, dispuestos en varias filas y de forma más o menos desordenada.

En España, está considerado como "Casi Amenazado" (NT). El principal problema para su conservación es la desaparición de medios acuáticos adecuados para su reproducción. En Castilla y León las poblaciones de la zona



noreste están muy amenazadas debido a su aislamiento, de hecho, los pocos datos históricos que se poseen ponen de manifiesto una clara regresión de la especie en la provincia de Burgos. Experimentalmente se ha demostrado que las larvas de *P. cultripes* son bastante susceptibles a la contaminación por agroquímicos. Por otra parte, es uno de los anfibios más atropellados en las carreteras, aunque se desconoce el impacto real que este fenómeno puede tener sobre sus poblaciones.

***Bufo bufo*** (Linnaeus, 1758). Sapo común



Es un sapo robusto de tamaño grande, aunque el tamaño promedio varía en función de su origen. Los animales adultos, especialmente las hembras, pueden alcanzar e incluso superar los 200 mm de longitud. La cabeza es más larga que ancha, con ojos grandes y prominentes de pupila ovalada horizontal, el iris suele presentar colores cobrizos o anaranjados con manchas finas oscuras que pueden formar un retículo. El tímpano es redondeado y poco



aparente, con un diámetro inferior a la mitad del diámetro del ojo. Las glándulas paratoideas son muy prominentes, de forma alargada y elíptica y divergen en la parte posterior. Las extremidades son cortas y robustas, con membranas interdigitales claramente visibles en los miembros posteriores. El tegumento está generalmente cubierto de grandes verrugas, que en el dorso suelen poseer la cúspide córnea y oscura. La coloración de la piel es muy variable, desde pardusca hasta rojiza o anaranjada. El diseño dorsal puede ser totalmente uniforme o presentar un intenso jaspeado de colores marrones oscuros intercalados con manchas irregulares blancas o amarillentas. El vientre suele ser amarillento, pudiendo adquirir también tonos grisáceos. Al igual que la zona dorsal, el color del vientre puede ser uniforme o presentar un jaspeado oscuro.

Se extiende por el noroeste de África, toda Europa hasta el Círculo Polar Ártico y buena parte del norte de Asia, alcanzando por el este el lago Baikal. Ocupa la totalidad de la Península Ibérica, además de Ceuta y Melilla.

En la Península Ibérica se distribuye desde el nivel del mar hasta los 2600 m de altitud en los Pirineos. Ocupa todo tipo de hábitats, desde bosques perennifolios y caducifolios hasta praderas y pastizales, zonas de matorral, estepas, vegas de ríos, zonas de cultivo y áreas urbanas.

Se reconocen tres subespecies:

*Bufo bufo bufo*, de pequeño tamaño y coloración uniforme. Su distribución en la Península Ibérica coincide con la franja cantábrico-pirenaica de la región Eurosiberiana. En Castilla y León ocuparía la zona norte de las provincias de León y Palencia.

*Bufo bufo gredosicola*, de tamaño intermedio y diseño muy contrastado, con jaspeados oscuros y manchas claras en la región dorsal. Su distribución se circunscribe a los circos glaciares de la sierra de Gredos, donde ocupa praderas higroturbosas por encima de 1800 m de altitud.



*Bufo bufo spinosus*, es la subespecie de mayor tamaño y se caracteriza por la posesión de numerosos tubérculos dorsales más o menos puntiagudos con el extremo negro. Ocupa la mayor parte de la Península y también de Castilla y León, coincidiendo su distribución con la región mediterránea.

Para la reproducción requiere de puntos de agua profundos y permanentes, con vegetación abundante y corriente no demasiado fuerte. Utiliza generalmente lagunas de cierta entidad y estanques, aunque también aprovecha los remansos de los ríos.

Los adultos visitan el agua sólo para la reproducción, pudiendo recorrer varios kilómetros para volver, año tras año, al mismo punto. En la época reproductora es relativamente sencillo observar a los animales dentro del agua, tanto de noche como de día. Debido a su amplia distribución, la variación en el ciclo reproductor entre localidades es muy amplia. En zonas bajas de Castilla y León la reproducción puede comenzar a principios de primavera, mientras que en áreas de montaña el inicio de la temporada coincide con el deshielo; así, en zonas altas del Sistema Central, la especie se reproduce entre mediados de mayo y principios de junio. El amplexo es axilar. La razón de sexos de la población reproductora está muy sesgada, pudiendo haber en ocasiones cuatro o cinco machos por cada hembra. Esto ocasiona una competencia entre machos muy elevada, que desemboca en amplexos múltiples, en los que varios machos se agarran a la misma hembra. Esto provoca que las hembras puedan morir ahogadas o exhaustas al no poder soportar el peso de tantos machos agarrados a ellas.

Las puestas consisten en cordones gelatinosos dobles de hasta varios metros de longitud, que suelen depositarse sobre la vegetación. Los animales suelen escoger zonas profundas y bien insoladas para depositar las puestas. Cada puesta consta de varios millares de huevos, normalmente entre 3000 y 5000, aunque algunas puestas superan claramente los 10.000 huevos.



La especie está considerada de "Preocupación Menor" (LC) en España; aunque la subespecie *B. b. gredosicola* se considera "Vulnerable" (VU), debido a su reducida área de distribución y al carácter fragmentado de sus poblaciones. En Castilla y León parece haber una tendencia regresiva de sus poblaciones en toda la zona central, donde la intensificación agrícola y urbanística han reducido la superficie ocupada por humedales, y los que quedan apenas reúnen los requisitos de la especie para su reproducción. Sufre una elevada tasa de atropellos en carretera, habiendo constancia de la existencia de puntos negros donde la mortalidad de la especie es muy alta.

***Bufo calamita*** (Laurenti, 1768). Sapo corredor



Es un sapo de mediano tamaño. Los miembros posteriores están adaptados a la marcha, son relativamente cortos y robustos, con membranas interdigitales muy reducidas. La cabeza es muy ancha y redondeada, con ojos prominentes con pupila elíptica horizontal y tímpano apenas apreciable. Las glándulas



paratoideas son conspicuas y paralelas entre sí. La piel del dorso presenta gran cantidad de verrugas, de tamaños muy dispares y dispuestas de manera irregular. La coloración dorsal es muy variable, en las hembras es frecuente que las verrugas presenten tonos rojizos. También es característica, aunque en ocasiones puede estar ausente, la presencia de una línea media de color amarillo claro que recorre el dorso del animal desde la base de los ojos hasta la cloaca. La región ventral es de color crema y de aspecto granulado, especialmente en la zona pélvica.

Se distribuye desde la Península Ibérica hasta Estonia. Alcanza las costas suecas, algunas islas bálticas y las islas Británicas. En la Península Ibérica falta en la zona central de la costa cantábrica y en algunas zonas de los Pirineos. Ocupa una gran variedad de hábitats, desde zonas costeras hasta zonas montañosas por encima de los 2500 m de altitud. Es capaz de colonizar áreas con una alta influencia antrópica, como cultivos y graveras. Los adultos tienen preferencia por áreas abiertas y bien soleadas, con poca vegetación o de porte reducido, con suelos arenosos o blandos que les permitan excavar galerías en las que refugiarse.

En cuanto a los lugares de reproducción, utilizan medios acuáticos someros, bien soleados y con orillas de pendiente suave y escasa vegetación como prados inundados, canteras abandonadas, cunetas, charcos efímeros o rodadas de vehículos en pistas de tierra. También pueden utilizar cuerpos de agua de mayor tamaño, como charcas y lagunas con o sin vegetación acuática, aunque en este caso siempre depositan las puestas en zonas con escasa profundidad.

El periodo reproductor no es continuo, sino que está muy asociado a episodios de lluvia. En la mitad septentrional de la Península Ibérica, la reproducción suele tener lugar entre febrero y principios de junio. El amplexo es axilar, las hembras depositan sobre el fondo un largo cordón gelatinoso que





puede contener entre 1500 y 5600 huevos dispuestos en una o dos filas.

En España está considerado como de "Preocupación Menor" (LC). La desaparición de medios acuáticos es una de las principales amenazas para su conservación. Además, debido al carácter explosivo de su reproducción, es frecuente que un gran número de individuos se dirijan al mismo tiempo a las zonas de reproducción lo que provoca altas tasas de mortalidad por atropellos en carretera.

*Hyla arborea* (Linnaeus, 1758). Ranita de San Antonio



Especie de tamaño pequeño. Su cabeza es redondeada con ojos prominentes de pupila elíptica horizontal, con el iris dorado moteado de negro. El tímpano es bien patente, con un diámetro aproximado a la mitad del diámetro del ojo. Las extremidades anteriores son cortas, mientras que las posteriores son largas, con



membranas interdigitales reducidas. Los dedos de ambas extremidades presentan discos adhesivos en sus extremos, siendo los de los miembros anteriores algo más grandes. La piel del dorso es lisa y muy brillante, mientras que en la zona ventral pueden aparecer algunos gránulos. La coloración es muy variable, normalmente el dorso es de un color verde claro intenso, aunque pueden aparecer tonos grisáceos, amarillentos o incluso azules. Presentan una banda lateral que recorre los flancos del animal desde el ojo y el tímpano hasta la base de las patas posteriores, con una pequeña prolongación hacia el dorso a la altura de las ingles. La coloración ventral es blanca o amarillenta.

Se distribuye prácticamente por toda Europa, desde el Atlántico hasta el mar Caspio y desde el Mediterráneo hasta el sur de Escandinavia. En la Península Ibérica se distribuye por todo el noroeste alcanzando la parte occidental de Aragón y Castilla la Mancha por el este y Sierra Morena por el Sur, aunque en Portugal llega hasta el Cabo de San Vicente. En Castilla y León está presente en todas las provincias.

Ocupa sobre todo enclaves húmedos y con buena cobertura vegetal. Abunda en setos, saucedas, carrizales y zarzales, siempre que en las inmediaciones exista un punto de agua adecuado para la reproducción. Suelen preferir charcas de una cierta entidad con abundante vegetación acuática, evitando aquellas excesivamente someras y por tanto con alto grado de desecación.

El ciclo reproductor comienza en primavera, especialmente cuando la temperatura ya es superior a 10°C y ha habido lluvias recientes. El amplexo es axilar. Las hembras depositan hasta 50 pequeños paquetes de unos 10 a 60 huevos, hasta completar un total de 200 a 1400 huevos. Estos paquetes normalmente son fijados a la vegetación acuática a unos pocos centímetros de profundidad.

Está considerada en España como especie "Casi Amenazada" (NT).





Muchas poblaciones, sobre todo aquellas de las zonas más áridas dentro del rango geográfico de la especie se encuentran en regresión. El progresivo aumento de la aridez y de las temperaturas ha sido propuesto como una de las claves para explicar dicha tendencia. La reducción de los medios acuáticos con vegetación abundante es otra de las amenazas para esta población. Los embriones y larvas de esta especie son muy sensibles a la contaminación por exceso de fertilizantes químicos.

*Pelophylax perezii* (Seoane, 1885). Rana verde común



Especie de tamaño mediano. Presenta ojos prominentes, próximos entre sí y situados en posición dorsal. El tímpano es muy patente, con un diámetro aproximadamente igual a dos tercios del tamaño del ojo. En ambos flancos del dorso presenta un pliegue glandular moderadamente desarrollado. En las extremidades posteriores presentan membranas interdigitales ampliamente desarrolladas. La coloración dorsal es muy variable, aunque por regla general



es verde con manchas negras. Suele presentar una línea vertebral clara. Las extremidades presentan barras negras más o menos irregulares. La coloración ventral es blanca o jaspeada de negro. Los machos presentan sacos vocales en las comisuras de la boca, que cuando están en reposo tienen la apariencia de manchas grisáceas.

Se distribuye por toda la Península Ibérica, los archipiélagos balear y canario (donde ha sido introducida) y el sur de Francia.

Es una especie estrictamente acuática, aunque presenta cierta capacidad de dispersión en tierra firme. Ocupa todo tipo de medios acuáticos tanto temporales como permanentes y tanto lóticos, en los que selecciona zonas con escasa corriente, como lénticos; independientemente de su cobertura vegetal o profundidad. Es una especie con escasos requerimientos ecológicos, lo que la convierte en colonizadora temprana de ambientes perturbados por la acción del hombre. Soporta muy bien la contaminación, por lo que muchas veces es el único anfibio en zonas muy degradadas como cultivos o charcas eutrofizadas.

Se distribuye desde el nivel del mar hasta los 2380 m de altitud, aunque prefiere cuerpos de agua situados a altitudes medias. El periodo reproductor es más tardío que en la mayor parte de especies de anfibios ibéricas. Para la reproducción selecciona fundamentalmente medios acuáticos que conserven agua suficiente a finales de primavera y en verano, aunque también se ha citado su reproducción, de forma ocasional, en medios temporales. Prefiere cuerpos de agua con abundante vegetación de ribera y vegetación sumergida. El amplexo es axilar y las hembras depositan masas de huevos sujetas a la vegetación sumergida, normalmente cerca de la superficie del agua. Las masas de huevos pueden contener entre 1950-2700 huevos, con un número medio de 2309 huevos, distribuidos en varios glomérulos.

Está considerada como especie de "Preocupación Menor" (LC). La desaparición de medios acuáticos y la introducción de especies exóticas como



peces y crustáceos han provocado la regresión de diversas poblaciones. La captura de ejemplares para consumo humano supone una seria amenaza a nivel local. Finalmente, la capacidad de hibridación con otras especies europeas pertenecientes al mismo género, supone un riesgo de contaminación genética. Además, la forma híbrida *P. kl. grafi*, resultante del cruce entre *P. perezi* y *P. ridibundus*, presenta un alto éxito de fertilización y viabilidad embrionaria y larvaria, así como una mayor fecundidad y velocidad de crecimiento que *P. perezi*, lo que puede conducir al desplazamiento y la desaparición de la especie parental.



CAPÍTULO 1  
AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y  
VIRULENCIA DE LAS ESPECIES DE  
SAPROLEGNIA

Fernández-Benítez, M.J. *et al.* (2008). *Saprolegnia diclina*: another species responsible for the emergent disease 'Saprolegnia infections' in amphibians. FEMS Microbiol Lett 279, 23-29.



## 1.1 INTRODUCCIÓN

---

Una de las enfermedades emergentes más importantes relacionadas con mortalidad de anfibios es la Saprolegniosis. El género *Saprolegnia* pertenece al orden Saprolegniales, clase Oomycetes (conocidos como mohos acuáticos) e incluye especies patógenas de adultos, larvas y huevos de animales de agua dulce. Alguna de las especies de *Saprolegnia* son responsables de casos de mortalidad masiva de peces tanto en el medio natural como en piscifactorías, donde generan unos costes económicos muy elevados (Willoughby, 1978; Lategan *et al.*, 2004; Zaror *et al.*, 2004; van West, 2006). En anfibios, las diferentes especies del género *Saprolegnia* producen mortalidad en embriones (Kiesecker *et al.*, 2001b; Warkentin *et al.*, 2001; Sagvik *et al.*, 2008a; Ruthig, 2009), larvas (Bragg & Bragg, 1958; Romansic *et al.*, 2006, 2009) y recién metamorfoseados (Romansic *et al.*, 2007) y sus efectos se han relacionado con la extinción de poblaciones de rana leopardo septentrional (*Lithobates pipiens*) y sapo meridional (*Bufo terrestris*) (Bragg, 1962) y la mortalidad masiva de embriones de sapo corredor (*Bufo calamita*), rana bermeja (*Rana temporaria*) (Banks & Beebee, 1988; Beattie *et al.*, 1991) y sapo boreal (*Bufo boreas*) (Blaustein *et al.*, 1994b).

A pesar de las cada vez más numerosas evidencias de casos de mortalidad en anfibios provocados por cepas de *Saprolegnia*, se sabe muy poco acerca de cuáles son las especies implicadas en las infecciones. En la mayoría de los casos el patógeno se identifica como *Saprolegnia* sp. (p.ej. Kiesecker & Blaustein, 1995, 1999; Gomez-Mestre *et al.*, 2006; Romansic *et al.*, 2007; Sagvik *et al.*, 2008a,b) y sólo unos pocos estudios han llevado a cabo una determinación a nivel específico. Blaustein *et al.*, (1994b) identificaron *S. ferax* como el agente responsable de la mortalidad masiva de embriones de *B. boreas* en Oregón, aunque no proporcionaron detalles sobre el método usado para tal



identificación.

La identificación a nivel específico de los Oomycetes es complicada. Estudios moleculares recientes han demostrado que el uso de criterios taxonómicos tradicionales basados en la morfología de las estructuras sexuales (anteridios, oogonios y oosporas) no permite la correcta identificación de las especies (Diéguez Uribeondo *et al.*, 2007).

El conocimiento de las especies de *Saprolegnia* implicadas en las infecciones de anfibios es todavía una tarea pendiente. Uno de los principales problemas a la hora de establecer el posible impacto ecológico de la saprolegniosis sobre los anfibios radica precisamente en esta falta de información. Al no conocerse con precisión las especies implicadas en las infecciones, resulta muy complicado establecer su carácter patógeno; incluso, en muchos casos, se desconoce si la mortalidad de los embriones es consecuencia de la infección o por el contrario es la muerte por otras causas la que favorece el crecimiento de *Saprolegnia*. Johnson *et al.* (2008) y Petrisko *et al.* (2008) identificaron las especies de *Saprolegnia* que crecían sobre puestas de varias especies de anfibios en los Estados Unidos utilizando técnicas moleculares. En ambos estudios se identificaron siete especies de *Saprolegnia* diferentes sobre un total de ocho especies de anfibios. Sin embargo, en ninguno de ellos se llevaron a cabo ensayos experimentales para determinar si las especies identificadas eran patógenas o simplemente organismos saprófitos que crecían sobre los huevos muertos. Por ello, los principales objetivos de este capítulo son:

- Identificar y caracterizar mediante técnicas moleculares las especies del orden Saprolegniales que crecen sobre las puestas de anfibios anuros que se reproducen en las localidades objeto de estudio (ver tabla 1 en página 63).
- Llevar a cabo ensayos experimentales que permitan determinar el





carácter patógeno de las cepas pertenecientes al género *Saprolegnia* sobre los huevos de las especies de anfibios de las que se aislaron, estando implicadas, quizás, en episodios de mortalidad de estos huevos.

## 1.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE SAPROLEGNIALES

---

### 1.2.1 Materiales y Métodos

#### Toma de muestras y aislamiento de Saprolegniales

Para llevar a cabo los aislamientos se recolectaron huevos con síntomas de infección por Saprolegniales de puestas de sapo de espuelas (*Pelobates cultripes*), sapo común (*Bufo bufo*), *B. calamita*, ranita de San Antonio (*Hyla arborea*) y rana verde común (*Pelophylax perezi*) (ver tabla 1 en página 63).

Los síntomas de la infección son fácilmente reconocibles ya que el crecimiento del micelio alrededor del huevo le confiere un aspecto algodonoso (Fig. 1.1). Los huevos infectados se lavaron con una solución de 100 mg/l de penicilina C en agua destilada. Una vez lavados, se tomó un fragmento del huevo y se colocó en el interior de un anillo de cristal estéril de 3 cm de diámetro colocado sobre una placa de peptona glucosa agar (PG1). Para evitar el crecimiento de bacterias, se añadió penicilina C al agar en una concentración de 100 mg/l. Los aislamientos se mantuvieron en PG1 + penicilina C y se encuentran almacenados en la colección de cultivos del Real Jardín Botánico (Madrid).

Así mismo, se recogieron muestras de agua en los puntos de reproducción de anfibios. En cada una de estas muestras se introdujo una semilla de cañamón previamente autoclavada. Al cabo de unos días, cuando el crecimiento del micelio sobre la semilla fue detectable, se extrajo la semilla del



agua y se siguió el mismo procedimiento que con los huevos para llevar a cabo los aislamientos.

**Figura 1.1.** Aspecto de los embriones infectados por *Saprolegnia* sp.



### **Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación**

Previo al análisis molecular, se sembraron fragmentos de micelio en cultivos en gota de peptona glucosa (PG1) (Cerenius & Söderhäll, 1985). A partir de estos cultivos se llevó a cabo el aislamiento de ADN total y el análisis de las regiones ITS del ADN ribosómico nuclear (ADNr). Este proceso se llevó a cabo en el Laboratorio de Sistemática Molecular del Real Jardín Botánico por los Drs. Javier Diéguez-Uribeondo y María P. Martín y su equipo, siguiendo los protocolos descritos en Martín *et al.* (2004) y Diéguez-Uribeondo *et al.* (2007). La amplificación de las regiones ITS, incluida la subunidad 5.8 S del ADNr, se realizó con el par de iniciadores ITS5/ITS4 (White *et al.*, 1990) y en un volumen final de 25  $\mu$ l mediante Ready-To-Go® Beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Una vez obtenidas las secuencias lineales con

**Tabla 1.1.** Aislamientos de Saprolegniales obtenidos en la zona de estudio. La identificación a nivel de género o especie se realizó mediante el análisis de caracteres moleculares (ITS ADNrn)

Aislamiento	Especie identificada	Población	Origen
SAP243	<i>S. diclina</i>	PT	<i>B. calamita</i>
SAP244	<i>S. diclina</i>	PT	<i>P. cultripes</i>
SAP433	<i>Leptolegnia</i> sp.	MC	<i>P. cultripes</i>
SAP434	<i>Leptolegnia</i> sp.	MC	<i>B. calamita</i>
SAP435	<i>S. diclina</i>	PT	<i>P. cultripes</i>
SAP436	<i>S. diclina</i>	PT	<i>P. cultripes</i>
SAP440	<i>S. diclina</i>	PP	<i>B. calamita</i>
SAP441	<i>S. diclina</i>	PP	<i>B. bufo</i>
SAP442	<i>S. ferax</i>	PT	<i>P. cultripes</i>
SAP443	<i>S. diclina</i>	PP	<i>P. perezi</i>
SAP444	<i>Saprolegnia</i> sp.	PP	<i>P. perezi</i>
SAP445	<i>Leptolegnia</i> sp.	MC	<i>P. cultripes</i>
SAP446	<i>Leptolegnia</i> sp.	MC	<i>P. cultripes</i>
SAP447	<i>S. ferax</i>	MC	<i>B. calamita</i>
SAP448	<i>S. ferax</i>	MC	<i>B. calamita</i>
SAP450	<i>S. ferax</i>	MC	<i>B. calamita</i>
SAP452	<i>S. diclina</i>	PT	<i>P. cultripes</i>
SAP455	<i>Achlya flagellata-caroliniana</i>	PN	<i>B. calamita</i>
SAP456	<i>S. diclina</i>	PT	<i>H. arborea</i>
SAP457	<i>Leptolegnia</i> sp.	MC	<i>P. cultripes</i>
SAP458	<i>Leptolegnia</i> sp.	MC	<i>P. cultripes</i>
SAP461	<i>Saprolegnia</i> sp.	PT	<i>H. arborea</i>
SAP463	<i>S. diclina</i>	PP	<i>B. bufo</i>
SAP464	<i>Saprolegnia</i> sp.	PP	<i>P. perezi</i>
SAP465	<i>S. diclina</i>	PT	<i>P. perezi</i>
SAP479	<i>S. ferax</i>	MC	<i>B. calamita</i>
SAP480	<i>S. diclina</i>	PT	<i>B. calamita</i>
SAP482	<i>Achlya flagellata-caroliniana</i>	PN	<i>B. calamita</i>
SAP483	<i>S. diclina</i>	PT	<i>P. cultripes</i>

**Tabla 1.1.** (cont)

<b>Aislamiento</b>	<b>Especie identificada</b>	<b>Población</b>	<b>Origen</b>
SAP484	<i>S. diclina</i>	PT	<i>P. cultripes</i>
SAP597	<i>S. diclina</i>	PT	<i>P. cultripes</i>
SAP611	<i>S. ferax</i>	PT	Agua
SAP612	<i>S. diclina</i>	PP	Agua
SAP613	<i>S. ferax</i>	PT	Agua
SAP614	<i>S. ferax</i>	PT	Agua
SAP615	<i>S. diclina</i>	PT	Agua
SAP616	<i>S. ferax</i>	PT	Agua
SAP617	<i>S. ferax</i>	PN	Agua
SAP618	<i>S. diclina</i>	PP	<i>B. calamita</i>
SAP619	<i>S. ferax</i>	PN	<i>B. calamita</i>
SAP623	<i>S. ferax</i>	MC	<i>B. calamita</i>
SAP624	<i>Leptolegnia</i> sp.	MC	<i>P. cultripes</i>
SAP625	<i>Leptolegnia</i> sp.	MC	<i>P. cultripes</i>
SAP626	<i>Leptolegnia</i> sp.	MC	<i>B. calamita</i>
SAP627	<i>S. diclina</i>	PT	<i>B. calamita</i>
SAP628	<i>S. ferax</i>	MC	<i>B. calamita</i>
SAP630	<i>S. diclina</i>	PT	<i>P. cultripes</i>
SAP634	<i>S. diclina</i>	PP	<i>B. calamita</i>
SAP637	<i>S. diclina</i>	PT	<i>H. arborea</i>

cada uno de los iniciadores por separado (Secugen, Madrid; Macrogen, Seúl, Corea del Sur), se ensambló la secuencia consenso utilizando el programa Sequencher® (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, Estados Unidos) y se realizó una primera identificación mediante una búsqueda BLAST con las secuencias contenidas en la base de datos de nucleótidos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Tras confirmar que las secuencias pertenecían al orden Saprolegniales, se alinearon con las secuencias



**Tabla 1.2.** Resumen de los aislamientos de Saprolegniales obtenidos a partir de huevos de las diferentes poblaciones de anfibios y clado en el que se agrupan. Los cladros I al VI han sido descritos por Diéguez-Uribeondo *et al.* (2007), los cladros VII al IX han sido descritos por Johnson *et al.* (2008)

Localidad	Hospedador	Aislamiento	Especie identificada	Clado
MC	<i>P. cultripes</i>	+	<i>Leptolegnia</i> sp.	VII
MC	<i>B. calamita</i>	+	<i>Leptolegnia</i> sp.	VII
			<i>S. ferax</i>	II
PD	<i>H. arborea</i>	-		
PD	<i>P. perezii</i>	-		
PN	<i>B. calamita</i>	+	<i>S. ferax</i>	II
			<i>Achlya flagellata-caroliniana</i>	
PP	<i>B. calamita</i>	+	<i>S. diclina</i>	III
PP	<i>B. bufo</i>	+	<i>S. diclina</i>	III
PP	<i>P. perezii</i>	+	<i>Saprolegnia</i> sp.	IX
			<i>S. diclina</i>	III
PT	<i>P. cultripes</i>	+	<i>S. ferax</i>	II
			<i>S. diclina</i>	III
PT	<i>H. arborea</i>	+	<i>Saprolegnia</i> sp.	IX
			<i>S. diclina</i>	III
PT	<i>P. perezii</i>	+	<i>S. diclina</i>	III

de la base de datos del Real Jardín Botánico, que incluye secuencias publicadas en el GenBank (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007) y secuencias inéditas procedentes de aislamientos de distintos países del mundo (p.ej. Argentina,



Chile, Ecuador, España, Polonia, Chequia). La asignación de identidad se realizó tras el análisis filogenético mediante el programa 4.0b PAUP\* (Swofford, 2003) y la posición en uno de los clados descritos en Diéguez-Uribeondo *et al.* (2007) o en Johnson *et al.* (2008).

**Tabla 1.3.** Resumen de los aislamientos de Saprolegniales obtenidos a partir de las muestras de agua y clado en el que se agrupan. Los clados I al VI han sido descritos por Diéguez-Uribeondo *et al.* (2007), los clados VII al IX han sido descritos por Johnson *et al.* (2008)

Localidad	Aislamiento	Especie identificada	Clado
MC	-		
PD	-		
PN	+	<i>S. ferax</i>	II
PP	+	<i>S. diclina</i>	III
PT	+	<i>S. ferax</i>	II
		<i>S. diclina</i>	III

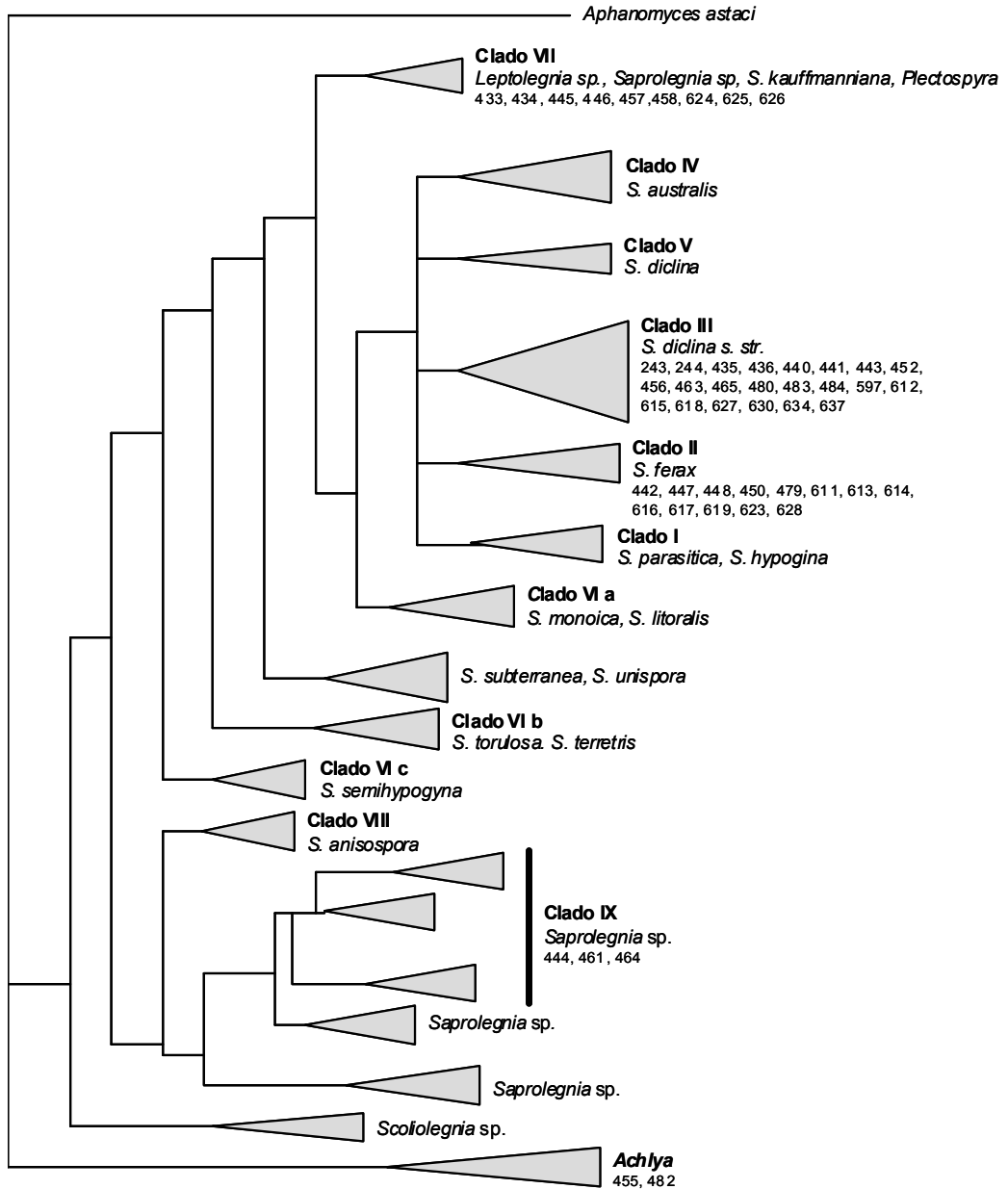
### 1.2.2 Resultados

A partir de las muestras recogidas se obtuvieron un total de 49 aislamientos de Saprolegniales, 42 procedentes de huevos infectados y 7 procedentes de muestras de agua. Se obtuvieron aislamientos en todas las localidades estudiadas a excepción de Puente del Duque (Tabla 1.1).

Las secuencias de las cepas obtenidas se distribuyeron en cinco clados del análisis filogenético realizado (Tablas 1.2 y 1.3) (Fig. 1.2). La mayor parte de los aislamientos (22 procedentes de huevos y 2 procedentes de agua) se agruparon dentro del clado III, descrito por Diéguez-Uribeondo *et al.* (2007) y que corresponde a la especie *S. diclina sensu stricto*. En este clado encontramos secuencias obtenidas a partir de huevos de todas las especies de anfibios,



**Figura 1.2.** Árbol filogenético de las especies de Saprolegniales aisladas en la zona de estudio. Los clados I al VI han sido descritos por Diéguez-Uribeondo *et al.* (2007), los clados VII al IX han sido descritos por Johnson *et al.* (2008). Los números de identificación de las muestras obtenidas en la zona de estudio se recogen debajo de cada uno de los clados en los que se agrupan. Realizado por J. Diéguez-Uribeondo y M.P. Martín *et al.* (datos no publicados)





aunque sólo se han aislado en dos de las poblaciones estudiadas, Puerto del Tremedal y Prado de las Pozas. No se han aislado muestras correspondientes al clado V de Diéguez-Uribeondo *et al.* (2007), el otro gran grupo que contiene secuencias de *S. diclina*.

El resto de los aislamientos se agruparon dentro de los clados VII y IX (descritos por Johnson *et al.* (2008)), el clado II (descrito por Diéguez-Uribeondo *et al.* (2007)) y el clado correspondiente al género *Achlya*.

El clado VII encuadra secuencias de *Saprolegnia* sp., *Leptolegnia* sp., *S. kauffmaniana* y *Plectospyra* sp. Dentro de este clado se agrupan aislamientos obtenidos a partir de huevos de *P. cultripes* y de *B. calamita* procedentes de Malpartida de Corneja. Ésta es la única localidad en la que se han aislado muestras correspondientes a este clado. Los aislamientos forman un grupo consistente con la secuencia del GenBank AY310502, identificada como *Leptolegnia* sp. Ninguno de los aislamientos obtenidos a partir de muestras de agua se encuadró dentro de este clado.

El clado IX incluye secuencias de *Saprolegnia* sp. En este clado aparecen secuencias de muestras obtenidas a partir de huevos de *H. arborea* y *P. perezii* procedentes de Puerto del Tremedal y del Prado de las Pozas, respectivamente. Estas secuencias se agruparían, dentro de este clado, con la secuencia del GenBank EU124759 aislada a partir de huevos de *B. boreas* e identificada como *Saprolegnia* sp. (Johnson *et al.*, 2008). Ninguna de las secuencias obtenidas a partir de muestras de agua se agrupó dentro de este clado.

El clado II corresponde a secuencias de *S. ferax*, *S. bulbosa*, *S. mixta*, *S. longicaulis*, *S. litoralis* y *S. anomalies*. Dentro de este clado encontramos aislamientos procedentes de huevos de *P. cultripes* de Puerto del Tremedal y de *B. calamita* originarios del Puerto de Peña Negra y de Malpartida de Corneja, así como de muestras de agua recogidas en el Puerto de Peña Negra y en el Puerto del Tremedal.





Finalmente, en el clado correspondiente al género *Achlya* se encuentran secuencias aisladas de huevos de *B. calamita* del Puerto de Peña Negra, identificadas como *Achlya flagellata-caroliniana*. Al igual que en el caso anterior, no aparecen secuencias obtenidas a partir de muestras de agua.

Como ya se ha citado anteriormente, no se han aislado muestras correspondientes al clado V (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007), así como tampoco al clado I (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007), correspondiente a *S. parasitica* - *S. hypogyna* ni al clado IV (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007), correspondiente a *S. australis*. Estas especies de *Saprolegnia* se obtienen con frecuencia a partir de casos de mortalidad masiva en peces (Hatai & Hoshiai, 1992; Hussein *et al.*, 2001).

## **1.3 ESTUDIO DE LA VIRULENCIA**

---

### **1.3.1 Materiales y Métodos**

Para llevar a cabo este objetivo se recogieron huevos recién depositados (<24h, estadio <10 según Gosner, 1960) en las mismas localidades en las que se obtuvieron los aislamientos. Se recolectaron huevos sin síntomas de infección de varias puestas de cada una de las especies de anfibios estudiadas (Tabla 1 en página 63). Todos los experimentos tuvieron un diseño similar, 20 huevos (5 huevos x 4 puestas) fueron depositados en contenedores experimentales de 100 ml de capacidad que contenían 90 ml de agua mineral. En el caso de *H. arborea* y *P. perezi*, se utilizaron solamente 10 huevos por contenedor (2 huevos x 5 puestas) debido al menor tamaño de las puestas. Los contenedores se sumergieron parcialmente en un baño con 30 litros de agua cuya temperatura se mantuvo a 14°C con un refrigerador Selecta 285W (J.P. Selecta SA, Abrera, Barcelona). La temperatura del agua en los contenedores experimentales se midió todos los días, las variaciones de temperatura con respecto al baño



fueron menores de 1°C. El fotoperiodo se mantuvo en un ciclo de 14:10 h de luz/oscuridad.

Cada contenedor experimental se asignó al azar a uno de los tratamientos: control (sin zoosporas añadidas) o *Saprolegnia* (adición de zoosporas). Cada tratamiento se replicó tres veces, a excepción del experimento de *B. calamita* procedente del Puerto del Tremedal en el que cada tratamiento se replicó seis veces. El número de réplicas en cada tratamiento se determinó en función del espacio disponible en el baño a temperatura controlada.

La obtención de zoosporas se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Diéguez-Uribeondo *et al.* (1994). Brevemente, pequeños trozos de los aislamientos se sembraron en cultivos en gota de PG1 + penicilina C (100 mg/l) y se dejaron crecer durante 72 horas a temperatura ambiente (20°C). Transcurrido este tiempo se procedió a eliminar el medio de cultivo para inducir la esporulación. Para ello, cada cultivo se lavó tres veces con agua mineral autoclavada, con un intervalo de una hora entre cada lavado. La recolección de zoosporas se llevó a cabo 12 horas después del último lavado y las concentraciones de las mismas se calcularon utilizando una cámara de recuento Blaubrand® Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania).

Los huevos de cada población de anfibios fueron expuestos a las zoosporas producidas por las cepas de *Saprolegnia* aisladas de esa misma población (Tabla 1.4), con la excepción de *P. perezii* de Puerto del Tremedal y *B. calamita* del Puerto de Peña Negra. Para estas poblaciones, aunque se obtuvieron aislamientos de *Saprolegnia* y se identificó la especie de la que se trataba, los experimentos de exposición no se llevaron a cabo debido a la imposibilidad de hacer crecer los cultivos para la producción de zoosporas.

La concentración final de zoosporas utilizada en cada experimento se calculó en base a los resultados de pruebas previas para determinar la

**Tabla 1.4.** Cepa de *Saprolegnia* y concentración de zoosporas utilizada en cada uno de los experimentos de exposición

Localidad	Especie de anfibio	Especie de <i>Saprolegnia</i>	zoos/ml
MC	<i>B. calamita</i>	<i>S. ferax</i>	2698
PT	<i>B. calamita</i>	<i>S. diclina</i>	10.000
PP	<i>B. calamita</i>	<i>S. diclina</i>	3000
PP	<i>B. bufo</i>	<i>S. diclina</i>	10.000
PT	<i>P. cultripipes</i>	<i>S. diclina</i> <i>S. ferax</i>	3000 15.000
PT	<i>H. arborea</i>	<i>Saprolegnia</i> sp. <i>S. diclina</i>	4286 20.000
PP	<i>P. perezii</i>	<i>Saprolegnia</i> sp. <i>S. diclina</i>	1388 1388

capacidad de esporulación de las diferentes cepas de *Saprolegnia* a temperatura ambiente (20°C). Para cada cepa se prepararon 21 placas petri con tres gotas de PG1 + penicilina C en cada una de las cuales se depositó un pequeño fragmento de micelio. La obtención de zoosporas se llevó a cabo como se ha explicado anteriormente. Una vez medida la concentración de zoosporas en cada placa, se determinó la concentración experimental como el valor medio obtenido para las 21 placas (Tabla 1.4).

Los experimentos se revisaron diariamente, registrándose el número de embriones muertos en cada contenedor experimental. Los experimentos finalizaron cuando todos los embriones fueron capaces de nadar. Una vez



finalizado cada experimento se estudió la presencia de *Saprolegnia* en los individuos muertos. En el caso de observarse crecimiento de micelio, se procedió a su aislamiento y caracterización molecular para identificar la especie de *Saprolegnia* y comprobar que se trataba de la misma utilizada para la infección.

Para analizar el efecto de las zoosporas en la supervivencia de los embriones, se utilizaron ANOVAs de medidas repetidas con el incremento de la mortalidad (transformada mediante el arcoseno de la raíz cuadrada) como variable dependiente. Para determinar el tiempo de aparición de los síntomas después de la adición de las zoosporas se utilizaron ANOVAs de una vía con la tasa de mortalidad diaria (transformada mediante el arcoseno de la raíz cuadrada) como variable dependiente. Para llevar a cabo los análisis se utilizó el programa SPSS 11.5 para Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).

### 1.3.2 Resultados

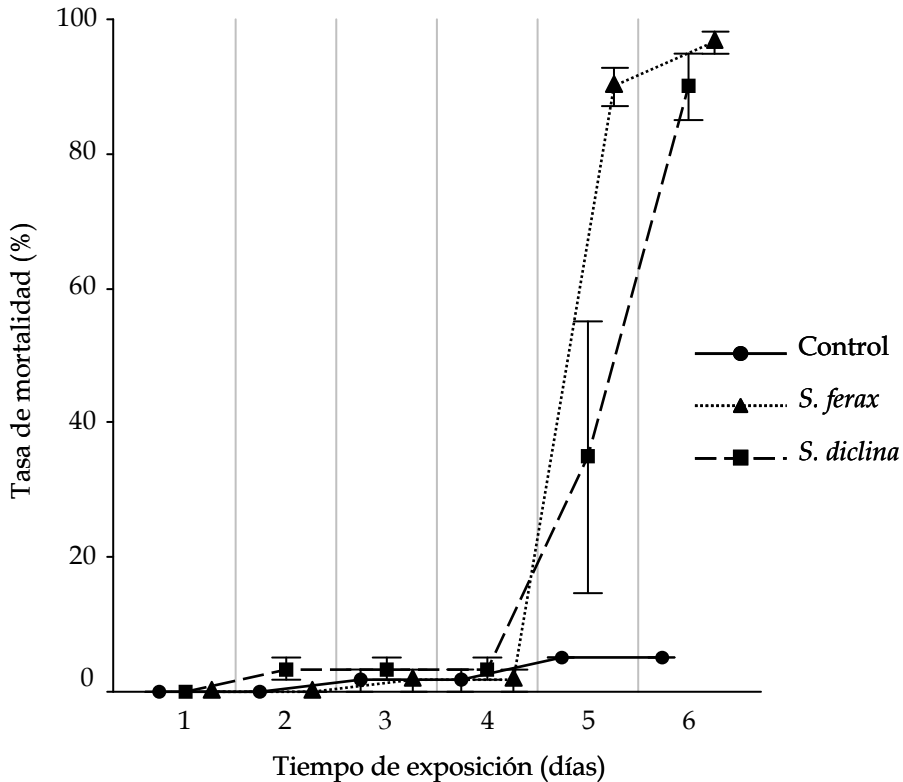
#### *Pelobates cultripes*

Como se ha comentado anteriormente sólo se obtuvieron aislamientos de *Saprolegnia* en el Puerto del Tremedal. En esta localidad se identificaron dos especies de *Saprolegnia*: *S. diclina* y *S. ferax*.

Ambas especies de *Saprolegnia* aumentaron significativamente la mortalidad de embriones sanos de *P. cultripes* (*S. diclina*:  $F_{1,4} = 78,062$ ;  $P = 0,001$ . *S. ferax*:  $F_{1,4} = 51,516$ ;  $P = 0,002$ ). Así, mientras que la mortalidad de los controles fue menor del 5%, la tasa de mortalidad de los embriones expuestos a zoosporas fue del 90% el día 6 de exposición en el caso del experimento de *S. diclina* ( $F_{1,4} = 66,390$ ;  $P = 0,001$ ) y el día 5 para el caso de *S. ferax* ( $F_{1,4} = 427,66$ ;  $P < 0,001$ ) (Fig. 1.3).



**Figura 1.3.** Tasas de mortalidad media ( $\pm$  ES) de los embriones de *Pelobates cultripes* de Puerto del Tremedal expuestos a 3000 zoosporas/ml de *Saprolegnia diclina* o 15.000 zoosporas/ml de *S. ferax*



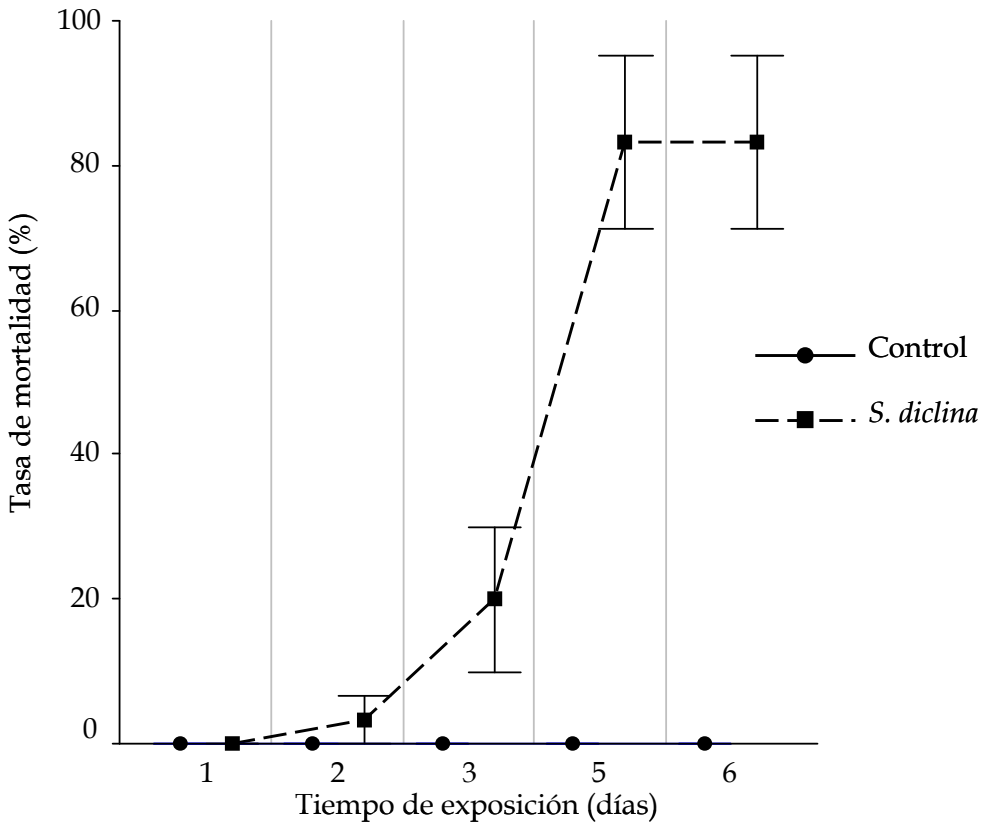
### *Bufo bufo*

A partir de los huevos infectados de la única población de *B. bufo* incluida en este estudio, localizada en el Prado de las Pozas, se identificó una sola especie de *Saprolegnia*: *S. diclina*. La mortalidad de los embriones expuestos a zoosporas de esta especie aumentó de manera significativa a lo largo del tiempo ( $F_{1,4} = 88,463$ ;  $P = 0,001$ ). El efecto de las zoosporas sobre la supervivencia de los embriones fue detectado el día 5 de exposición ( $F_{1,4} = 2,289$ ;  $P = 0,003$ ), en este momento no se registró mortalidad en los embriones control mientras que el 83,3 % de los embriones expuestos a zoosporas habían



muerto (Fig. 1.4).

**Figura 1.4.** Tasa de mortalidad media ( $\pm$  ES) de los embriones de *Bufo bufo* de Prado de las Pozas expuestos a 10.000 zoosporas/ml de *Saprolegnia diclina*



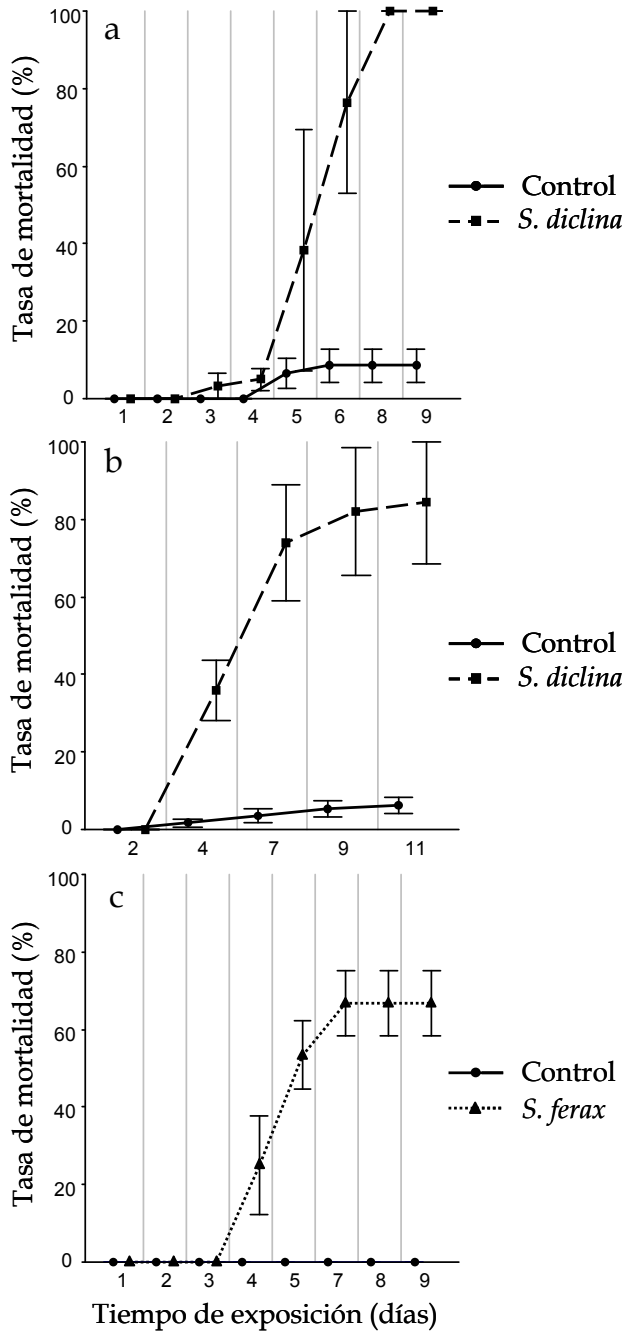
### *Bufo calamita*

En el caso de esta especie se obtuvieron aislamientos de *Saprolegnia* en todas las poblaciones estudiadas. Esto permitió identificar *S. diclina* en el Prado de las Pozas y en el Puerto del Tremedal y *S. ferax* en Malpartida de Corneja y el Puerto de Peña Negra.

Los ANOVAs de medidas repetidas mostraron que la exposición a zoosporas de *S. diclina* procedentes de ambas poblaciones aumentó



**Figura 1.5.** Tasas de mortalidad media ( $\pm$  ES) de los embriones de *Bufo calamita* expuestos a zoosporas de *Saprolegnia*: **a)** embriones del Prado de las Pozas expuestos a 3000 zoosporas/ml de *S. diclina*; **b)** embriones del Puerto del Tremedal expuestos a 10.000 zoosporas/ml de *S. diclina*; **c)** embriones de Malpartida de Corneja expuestos a 2698 zoosporas/ml de *S. ferax*





significativamente la mortalidad de los embriones sanos de *B. calamita* ( $F_{1,4} = 17,702$ ;  $P = 0,014$  en el caso del Prado de la Pozas y  $F_{1,10} = 19,225$ ;  $P = 0,001$  en el caso del Puerto del Tremedal). En cuanto al tiempo necesario para la manifestación de los síntomas después de la adición de las zoosporas, éste fue de seis días en el caso del Prado de las Pozas ( $F_{1,4} = 7,854$ ;  $P = 0,049$ ). En este momento un 8,61% de los controles había muerto frente a un 76,47% de los embriones expuestos. En cuanto al Puerto del Tremedal, las diferencias en cuanto a mortalidad se detectaron el día 4 de exposición ( $F_{1,10} = 15,397$ ;  $P = 0,003$ ), cuando había muerto el 1,7% de los embriones control y el 35,85% de los embriones expuestos (Figs. 1.5a,b).

Como ya se ha comentado en materiales y métodos, no se llevaron a cabo experimentos de exposición a *S. ferax* procedente del Puerto de Peña Negra debido a la imposibilidad de volver a crecer los aislamientos para llevar a cabo la producción de zoosporas. En lo referente a *S. ferax* procedente de Malpartida de Corneja, la exposición a zoosporas aumentó significativamente la mortalidad de los embriones ( $F_{1,4} = 55,773$ ;  $P = 0,002$ ). Los efectos de las zoosporas aparecieron el día 5 ( $F_{1,4} = 82,771$ ;  $P = 0,001$ ); en ese momento, no se registraba mortalidad entre los embriones control mientras que el 53,3% de los embriones expuestos había muerto (Fig. 1.5c).

### *Hyla arborea*

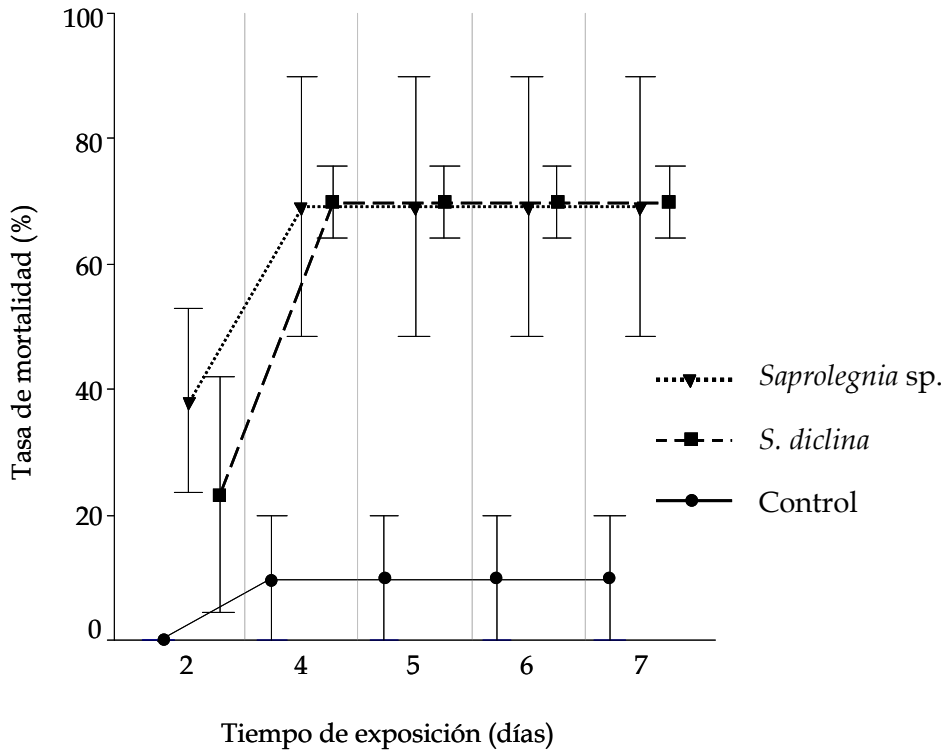
En el caso de la población de *H. arborea* del Puerto del Tremedal se aislaron dos especies de *Saprolegnia*, identificadas como *Saprolegnia* sp. y *S. diclina*. En el caso de la población del Puente del Duque no se identificó ninguna especie de *Saprolegnia*.

Los experimentos de exposición pusieron de manifiesto que las dos especies de *Saprolegnia* analizadas aumentaron la mortalidad de embriones de *H. arborea* (*Saprolegnia* sp.:  $F_{1,4} = 7,568$ ;  $P = 0,050$ . *S. diclina*:  $F_{1,4} = 16,839$ ;  $P =$





**Figura 1.6.** Tasas de mortalidad media ( $\pm$  ES) de los embriones de *Hyla arborea* de Puerto del Tremedal expuestos a 4286 zoosporas/ml de *Saprolegnia sp* o 20.000 zoosporas/ml de *S. diclina*



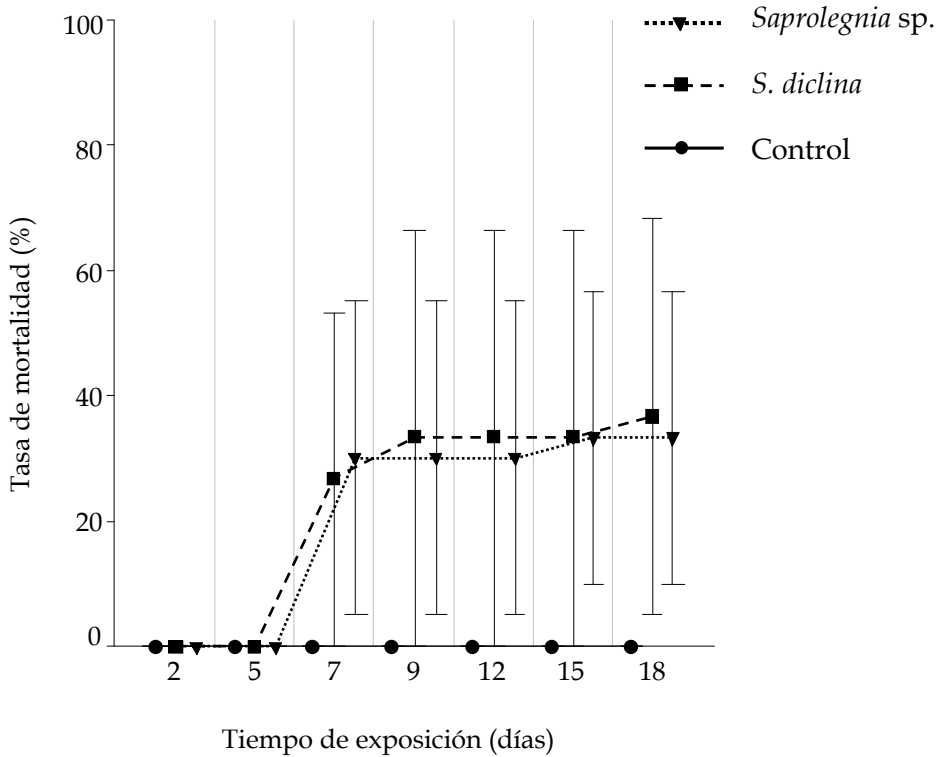
0,015). Las tasas de mortalidad estadísticamente significativas aparecieron el día 2 de exposición a *Saprolegnia sp.* ( $F_{1,4} = 14,741$ ;  $P = 0,018$ ), cuando el 38,15% de los embriones expuestos había muerto, y el día cuatro de exposición a *S. diclina* ( $F_{1,4} = 15,517$ ;  $P = 0,017$ ), cuando la tasa de mortalidad de los embriones expuestos era del 70%. En ambos casos la mortalidad de los controles fue menor al 10% (Fig. 1.6).

### *Pelophylax perezi*

De las especies de *Saprolegnia* aisladas a partir de huevos de *P. perezi*, sólo se llevaron a cabo experimentos de exposición a las dos especies aisladas en el Prado de las Pozas (*Saprolegnia diclina* y *Saprolegnia sp.*) ya que, como ocurrió



**Figura 1.7.** Tasas de mortalidad media ( $\pm$  ES) de los embriones de *Pelophylax perezi* de Prado de las Pozas expuestos a 1388 zoosporas/ml de *Saprolegnia* sp. o *S. diclina*



con *S. ferax* en el Puerto de Peña Negra, fue imposible volver a obtener cultivos a partir de los aislamientos de la cepa de *S. diclina* procedente del Puerto del Tremedal.

En ambos casos las tasas de mortalidad al final del experimento fueron más altas para los individuos expuestos a las zoosporas que para los controles, si bien este aumento no fue significativo (*S. diclina*:  $F_{1,4} = 1,076$ ;  $P = 0,358$ . *Saprolegnia* sp.:  $F_{1,4} = 2,639$ ;  $P = 0,180$ ) (Fig. 1.7).

En todos los casos a partir de los embriones expuestos a zoosporas se obtuvieron aislamientos de las cepas utilizadas para dicha exposición.



## 1.4 DISCUSIÓN

El uso de técnicas taxonómicas tradicionales basadas en caracteres morfológicos no posibilita una correcta identificación de las especies de Oomycetes, ya que los caracteres utilizados para la identificación suelen ser plásticos desde un punto de vista fenotípico (Willoughby, 1978) y se solapan entre las especies descritas (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007). La utilización de secuencias ITS de DNA y el análisis filogenético de dichas secuencias facilitan la identificación precisa de las especies (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007).

En este trabajo se han determinado, mediante técnicas moleculares, las especies del orden Saprolegniales que crecen sobre los huevos de anfibios anuros que se reproducen en cinco localidades situadas en la Sierra de Gredos (Ávila). Los aislamientos se agruparon dentro de los clados II y III, descritos previamente por Diéguez-Uribeondo *et al.* (2007), los clados VII y IX descritos por Johnson *et al.* (2008) y el clado correspondiente al género *Achlya* (Fig. 1.2).

Las muestras que se agrupan con la secuencia AY320502 identificada como *Leptolegnia* sp. proceden solamente de una de las localidades estudiadas, Malpartida de Corneja, aunque han sido aisladas de las dos especies de anfibios de las que se recogieron muestras en dicha localidad. Este género ha sido previamente relacionado con puestas de anfibios, Czezuga *et al.* (1998) identificaron morfológicamente *L. caudata* a partir de huevos de cinco especies de anfibios en Polonia, y Petrisko *et al.* (2008), en el noroeste de los Estados Unidos, aislaron este género a partir de huevos de cuatro de las seis especies de anfibios estudiadas (*Ambystoma macrodactylum*, *Rana cascadae*, *Rana luteiventris* y *Rana pretiosa*) y en todas las localidades muestreadas.

Otro género aislado frecuentemente de huevos de anfibios es *Achlya* (Czezuga *et al.*, 1998; Petrisko *et al.*, 2008). En nuestra zona de estudio sólo dos de los aislamientos, procedentes del Puerto de la Peña Negra, han sido



identificados como pertenecientes a este grupo. La mayoría de los trabajos filogenéticos sugieren que el género *Achlya* no sería una unidad monofilética (Green & Dick, 1972; Dick *et al.*, 1999; Riethmuller *et al.*, 1999; Leclerc *et al.*, 2000). En el mismo sentido Leclerc *et al.* (2000) indicaron que *Saprolegnia* podría no ser un grupo monofilético, lo que dificultaría la asignación genérica de algunas especies de *Achlya* y *Saprolegnia*.

*S. diclina* (clado III) parece ser la especie más abundante de *Saprolegnia* en el área de estudio, ya que la mayor parte de los aislamientos se agrupan dentro de este clado. Además, esta especie es capaz de colonizar huevos de todas las especies de anfibios estudiadas. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Petrisko *et al.* (2008), quienes encontraron que gran parte de los aislamientos procedentes de huevos de anfibios en el noroeste de los Estados Unidos correspondían a la especie *S. diclina*.

*Saprolegnia ferax* (clado II) parece estar más relacionada con especies de anfibios (*P. cultripipes* y *B. calamita*) que depositan largas cadenas con varios miles de huevos, generalmente cerca de la superficie. Además estas especies a menudo depositan los huevos comunamente, encontrándose numerosas puestas muy próximas entre sí, y concentradas en una zona concreta de la charca. *S. ferax* ha sido descrita como una especie abundante y ampliamente distribuida (Czezuga *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2002a). Esta especie ha sido aislada a partir de huevos de *B. boreas* en el noroeste de los Estados Unidos (Blaustein *et al.*, 1994b; Kiesecker & Blaustein, 1995). Posteriormente, Johnson *et al.* (2008), utilizando técnicas moleculares, identificaron *S. ferax* en huevos de salamandra moteada (*Ambystoma maculatum*), pero no de *B. boreas*, en el estado de Whashington. Sin embargo, Petrisko *et al.* (2008), también mediante técnicas moleculares, no encontraron esta especie a partir de huevos de anfibios procedentes de la misma región. Cabe destacar que en el trabajo de Petrisko *et al.* (2008) *S. ferax* constituía un grupo relacionado con *S. hypogina* (bootstrap



100), mientras que *S. bulbosa*, *S. oliviae*, *S. longicaulis* y *S. anomalies* constituían un grupo independiente. En nuestro trabajo, al igual que en el de Johnson *et al.* (2008), estas especies de *Saprolegnia* se agrupan en el mismo clado que *S. ferax*, mientras que *S. hypogina* forma un clado independiente, aunque relacionado con *S. parasitica*. Esto podría implicar que las muestras de anfibios identificadas por Petrisko *et al.* (2008) como pertenecientes al grupo *bulbosa / oliviae / longicaulis / anomalies* fueran en realidad *S. ferax*.

Al contrario que *S. ferax*, las especies de *Saprolegnia* que se agrupan en el clado IX han sido aisladas de especies de anfibios que depositan pequeñas masas de huevos, a menudo sujetas a la vegetación acuática, tales como *H. arborea* y *P. perezi*.

Entre las especies de *Saprolegnia* citadas en el trabajo llevado a cabo por Czezug *et al.* (1998) se encuentra *S. ferax*, pero no *S. diclina*. Por el contrario otras especies de *Saprolegnia* aisladas de huevos de anfibios como *S. parasitica*, *S. australis* (Czezug *et al.*, 1998; Petrisko *et al.*, 2008) o *S. anisospora* (Johnson *et al.*, 2008) no han sido encontradas en nuestras poblaciones de anfibios, si bien el clado IX parece estar relacionado con esta última especie.

Las especies de *Saprolegnia* aisladas a partir de las muestras de agua fueron las que aparecían con una mayor frecuencia en los huevos de anfibios presentes en cada localidad. Así, *S. diclina* se obtuvo de las muestras de agua del Puerto del Tremedal y del Prado de las Pozas, localidades en las que dicha especie se obtuvo a partir de los huevos de todas las especies de anfibios. Igualmente, en el Puerto de Peña Negra *S. ferax* fue la única especie aislada de huevos de anfibios, y también la única que apareció en las muestras de agua. Sólo hemos encontrado una excepción a este paralelismo; *S. ferax* se obtuvo del agua de las charcas del Puerto del Tremedal, localidad en la que, sin embargo, esta especie sólo se aisló de huevos de *P. cultripes*, no apareciendo entre las muestras correspondientes a los otros tres anfibios allí estudiados. Ni en



Malpartida de Corneja ni en Puente del Duque se obtuvieron aislamientos de *Saprolegnia* a partir de las muestras de agua.

Cabe señalar que en Estados Unidos se han aislado, a partir de huevos de anfibios, secuencias pertenecientes a todos los clados en los que se agrupan las muestras obtenidas en la Sierra de Gredos (Johnson *et al.*, 2008; Petrisko *et al.*, 2008).

En cuanto al estudio de virulencia, todas las especies de *Saprolegnia* aisladas se han comportado como patógenas de huevos de anfibios. Todas las especies de anfibios sufrieron un incremento significativo en la tasa de mortalidad embrionaria cuando se expusieron a zoosporas de las especies de *Saprolegnia* aisladas a partir de ellas, con excepción de *P. perezi*.

La virulencia de *S. diclina* sobre embriones de anfibios parece haber sido descrita hasta el momento sólo en las poblaciones de estudio en la Sierra de Gredos. Aunque parte de los resultados para *B. calamita* ya han sido publicados (Fernández-Benítez *et al.*, 2008) el número de especies de anfibios afectadas por esta especie de *Saprolegnia* sería mayor, ya que la adición de zoosporas incrementó significativamente la mortalidad de embriones de *B. bufo*, *P. cultripes* e *H. arborea*.

Al contrario que *S. diclina*, *S. ferax* ya había sido previamente relacionada con casos de mortalidad de anfibios. Esta especie ha sido identificada como el agente responsable de la mortalidad masiva de embriones de *B. boreas* en el noroeste de los Estados Unidos (Blaustein *et al.*, 1994b). En Europa, aunque *S. ferax* ha sido identificada mediante técnicas morfológicas a partir de huevos de anfibios (Czezuga *et al.*, 1998), no hay estudios que prueben su virulencia. En nuestro trabajo la adición de zoosporas de *S. ferax* aumentó significativamente la mortalidad de embriones de *B. calamita* y *P. cultripes*.

Hay que destacar la virulencia de la cepa de *Saprolegnia* sp. aislada a



partir de huevos de *H. arborea* en el Puerto del Tremedal. Como se ha comentado más arriba, la secuencia de esta cepa se agruparía con *Saprolegnia* sp. obtenida de huevos de *P. perezii* en el Prado de las Pozas y con una de las muestras aisladas por Johnson *et al.* (2008) a partir de huevos de *B. boreas*, si bien sólo se han llevado a cabo pruebas de virulencia con las dos especies nativas de la Península Ibérica. Los resultados obtenidos con *H. arborea* ponen de manifiesto la importancia de realizar estudios de identificación y virulencia de las especies de *Saprolegnia* ya que especies no identificadas de este género pueden estar relacionadas con casos de mortalidad de anfibios en diferentes zonas del planeta.

La mortalidad de los embriones de *P. perezii* no aumentó con la adición de zoosporas de *S. diclina* o *Saprolegnia* sp. aisladas a partir de huevos de la misma población. Esto podría ser debido a una mayor resistencia de esta especie a las infecciones por *Saprolegnia*; sin embargo, estas dos cepas fueron precisamente las que mostraron una menor capacidad de esporular a temperatura ambiente (Tabla 1.4), lo que podría estar detrás de una menor capacidad infecciosa. Lamentablemente, no existen datos que relacionen la capacidad de esporulación de las especies de *Saprolegnia* con su virulencia.

El efecto negativo de las infecciones por *Saprolegnia* ha sido demostrado experimentalmente sobre diferentes estados del ciclo biológico de los anfibios (p.ej. Kiesecker & Blaustein, 1999; Romansic *et al.*, 2007, 2009; Sagvik *et al.*, 2008a) aunque en la mayor parte de los casos no se ha llevado a cabo una identificación de la especie de *Saprolegnia* implicada en dichas infecciones. En el medio natural esta enfermedad ha sido relacionada con la extinción de poblaciones de *L. pipiens* y *B. terrestris* (Bragg & Bragg, 1958; Bragg, 1962), aumento de la mortalidad en *A. maculatum* (Walls & Jaeger, 1987) y casos de mortalidad masiva de embriones de *B. calamita*, *R. temporaria* (Banks & Beebee, 1988; Beattie *et al.*, 1991) y *B. boreas* (Blaustein *et al.*, 1994b).



Con este estudio, la mortalidad debida a exposición a zoosporas de *Saprolegnia* se ha demostrado por primera vez para embriones de *B. bufo*, *P. cultripes* e *H. arborea*. En algunas regiones de España, las poblaciones de estas especies parecen estar en regresión (García-París *et al.*, 2004), habiéndose demostrado, para el caso particular de *B. bufo*, dicha tendencia regresiva a nivel local (Montori *et al.*, 2009) por lo que el impacto de las infecciones por *Saprolegnia* podría ser especialmente importante en estas poblaciones en declive.

La precisa identificación de las especies de *Saprolegnia* que crecen sobre los anfibios en diferentes áreas geográficas así como el estudio de su virulencia son necesarios para entender los mecanismos de acción de las diferentes especies de *Saprolegnia* y para detectar diferencias de virulencia o casos de especificidad huésped-hospedador con las especies de anfibios a las que infectan en diferentes ambientes.



CAPÍTULO 2  
INFLUENCIA DEL ESTADÍO DE  
DESARROLLO EMBRIONARIO EN LA  
SUSCEPTIBILIDAD A SAPROLEGNIA

Fernández-Benítez, M.J. *et al.* (in press). Differences in susceptibility to *Saprolegnia* infections among embryonic stages of two anuran species. *Oecologia*  
DOI 10.1007/s00442-010-1889-5



## 2.1 INTRODUCCIÓN

---

La mayor o menor sensibilidad de un organismo a las infecciones por determinados patógenos puede variar en función del estadio de desarrollo. En este sentido, se ha demostrado que los embriones de sapo boreal (*Bufo boreas*) y rana arborícola del Pacífico (*Pseudacris regilla*) son sensibles a las infecciones por *Saprolegnia* (Kiesecker & Blaustein, 1995; Kiesecker *et al.*, 2001b), mientras que los recién metamorfoseados y las larvas parecen tolerar la exposición a zoosporas de *Saprolegnia* (Romansic *et al.*, 2006, 2007). Romansic *et al.* (2009) propusieron la importancia de evaluar cómo los patógenos afectan a los anfibios a lo largo de los diferentes estadios del ciclo biológico con el fin de estimar sus efectos a nivel de población. Smith *et al.* (2007) pusieron de manifiesto la existencia de diferencias durante el desarrollo en la sensibilidad de las larvas de la rana de arroyo de Drakensberg (*Amietia fuscigula*) a sufrir infecciones por *Batrachochytrium dendrobatidis*. Sin embargo, no tenemos constancia de la existencia de estudios sobre la sensibilidad a *Saprolegnia* dependiente del estadio de desarrollo en embriones de anfibios.

Los huevos de los anfibios están protegidos por una serie de capas gelatinosas y una capa de fertilización que se degradan progresivamente a medida que el embrión crece y se desarrolla (Yamasaki *et al.*, 1990). Estas capas podrían actuar como una barrera contra ciertos patógenos, tal y como sugieren algunos autores (Gomez-Mestre *et al.*, 2006). Esto podría determinar que los embriones fueran más sensibles a las infecciones a medida que crecen debido a la menor protección proporcionada por las capas protectoras. Así, el desarrollo embrionario podría conllevar cambios en el riesgo de los individuos a sufrir infecciones por *Saprolegnia*.

En este capítulo analizamos la hipótesis de que los embriones más desarrollados son más sensibles a la infección por *Saprolegnia* que los más



jóvenes. Para ello, estudiamos cómo varía la mortalidad producida por este patógeno a lo largo del desarrollo embrionario del sapo corredor (*Bufo calamita*) y del sapo de espuelas (*Pelobates cultripes*).

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

---

Para llevar a cabo este estudio se recolectaron huevos recién depositados de *B. calamita* y *P. cultripes* (<24h, estadio <10 según Gosner, 1960) de cuatro puestas diferentes para cada especie. Los huevos no presentaban ningún síntoma de infección por *Saprolegnia*. Los huevos de *B. calamita* se colectaron en el Prado de las Pozas y los de *P. cultripes* en el Puerto del Tremedal (ver Tabla 1 en página 63 para información detallada sobre la situación geográfica y la altitud de las localidades).

Los huevos se transportaron al laboratorio y se depositaron en contenedores de 100 ml de capacidad con 90 ml de agua mineral. Todos los contenedores experimentales se sumergieron parcialmente en un acuario con 30 litros de agua cuya temperatura se mantuvo a 14°C con un refrigerador Selecta 285W (J.P. Selecta SA, Abrera, Barcelona). La temperatura del agua de los contenedores experimentales se revisó diariamente, variando en menos de 1°C con respecto de la temperatura del acuario grande. El fotoperiodo se mantuvo en un ciclo de 14:10 horas de luz/oscuridad.

En ambos casos los huevos se expusieron a las cepas de *Saprolegnia* aisladas de su misma población. De esta manera los huevos de *B. calamita* fueron expuestos a zoosporas del aislamiento SAP440 correspondiente a *S. diclina* y los de *P. cultripes* a zoosporas de los aislamientos SAP436 y SAP442 correspondientes a *S. diclina* y *S. ferax* respectivamente.

En cada contenedor de 90 ml se depositaron 20 huevos (5 huevos x 4 puestas). En cada experimento, los contenedores se dividieron en cuatro



grupos, dependiendo del tratamiento. En los contenedores del primer grupo las zoosporas se añadieron cuando los embriones estaban en el estadio de desarrollo 12 según Gosner (1960), correspondiente a la gástrula tardía; en los contenedores del segundo grupo las zoosporas se añadieron cuando los embriones estaban en estadio 15, correspondiente a la rotación del embrión; en los contenedores del tercer grupo, las zoosporas se añadieron cuando los embriones estaban en estadio 19, cuando el corazón comienza a latir. Cada uno de estos tres grupos se replicó tres veces en el caso de *B. calamita* y seis en el de *P. cultripes*, asignándose tres de estas réplicas a *S. diclina* y las otras tres a *S. ferax*. Por último, en los contenedores del cuarto grupo no se añadieron zoosporas, siendo utilizados como controles. Este grupo control contó en ambos experimentos con nueve réplicas que se dividieron en tres subgrupos de tres réplicas cada uno. Cada subgrupo control se asignó a uno de los tres estadios de desarrollo citados arriba, añadiéndose agua mineral en lugar zoosporas cuando los embriones alcanzaron el estadio de desarrollo correspondiente.

El experimento comenzó cuando todos los embriones estaban en estadio 12, momento en el cual se añadieron las zoosporas al primer grupo. Tres días después de iniciarse el experimento, cuando los embriones estaban en estadio 15, se añadieron las zoosporas al segundo grupo. Seis días después de iniciarse el experimento, cuando todos los embriones estaban en estadio 19, se añadieron las zoosporas a los contenedores del tercer grupo. La producción de zoosporas se llevó a cabo según la metodología descrita por Diéguez-Uribeondo *et al.* (1994) y resumida en el capítulo 1.

Las concentraciones finales de zoosporas en los contenedores experimentales de *P. cultripes* fueron de 3000 zoosporas/ml para *S. diclina* y 15.000 zoosporas/ml para *S. ferax*. En el caso de *B. calamita*, se utilizaron dos concentraciones de zoosporas, 300 zoosporas/ml y 3000 zoosporas/ml. El



método para seleccionar las concentraciones experimentales ha sido descrito en el capítulo 1. En el caso de *B. calamita* este procedimiento se utilizó para determinar la concentración más alta y la baja se estableció en un orden de magnitud menor.

Para llevar a cabo la adición de zoosporas en los tanques experimentales se utilizó una solución stock de concentración conocida. Antes de la adición de la solución, se sacó cuidadosamente de los contenedores experimentales un volumen de agua igual al volumen de solución stock que sería incorporado para obtener la concentración de zoosporas deseada. Este procedimiento también se siguió para los controles, con la diferencia de que en este caso en lugar de solución de zoosporas se añadió agua mineral.

Los contenedores fueron revisados diariamente durante el periodo de 72 horas posterior a la adición de zoosporas en cada caso, anotándose el número de embriones muertos. Este periodo de 72 horas se seleccionó por dos razones; en primer lugar, para que no hubiera un solapamiento entre las fases del desarrollo analizadas en cada uno de los grupos, y en segundo lugar, porque, con base a observaciones previas, se estimó que los individuos del tercer grupo comenzarían a nadar a partir de las 72 horas post-exposición, lo que en condiciones naturales podría influir significativamente en el riesgo de contraer una infección por *Saprolegnia*. Los embriones muertos fueron analizados para detectar la presencia de *Saprolegnia*. En el caso de observarse crecimiento de micelio, se llevaron a cabo aislamientos del mismo para identificar la especie de *Saprolegnia* mediante técnicas moleculares, y comprobar que se trataba de la misma que se había usado en los experimentos.

Se calcularon las tasas de mortalidad tras 24, 48 y 72 horas de exposición a los patógenos. Estas tasas de mortalidad se transformaron mediante el arcoseno de la raíz cuadrada antes de llevar a cabo los análisis estadísticos. Para analizar el efecto de las zoosporas en la supervivencia de los



embriones en función del estadio de desarrollo se utilizó un análisis de la varianza de medidas repetidas (ANOVA) con el incremento de la mortalidad a lo largo del tiempo como variable dependiente y la concentración de zoosporas (incluyendo el control como una concentración más) y el estadio de desarrollo de los embriones en el momento de la adición de zoosporas como factores categóricos. Para determinar el momento después de la adición de zoosporas en el que se detectaban diferencias de sensibilidad entre los diferentes grupos de edad, se usó un ANOVA de una vía con la tasa de mortalidad cada 24 horas como variable dependiente. Para simplificar este análisis, se realizó una comparación de las tasas de mortalidad entre los tres subgrupos control, no obteniéndose diferencias significativas entre ellos ( $F_{2,6} = 2,6; P = 0,154$ ), por lo que fueron tratados en conjunto. De este modo, el factor del ANOVA se construyó con cuatro valores, tres de ellos correspondientes a cada grupo de edad expuesto a las zoosporas (estadios de inicio de la exposición 12, 15 ó 19), y un cuarto valor correspondiente al conjunto de todos los subgrupos control. Las diferencias entre tratamientos fueron analizadas mediante pruebas post hoc HSD de Tukey. Para llevar a cabo los análisis estadísticos se utilizó el programa SPSS 11.5 para Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).

## 2. 3 RESULTADOS

---

### *Pelobates cultripes*

Los ANOVAs de medidas repetidas mostraron diferencias en la susceptibilidad a las zoosporas de ambas especies de *Saprolegnia* en relación con el estadio de desarrollo (Tabla 2.1). En ambos casos los individuos expuestos en el estadio 12 mostraron una mayor resistencia a la infección que los expuestos en estadios posteriores. La mortalidad de los embriones expuestos a *S. diclina* en el estadio 12 no varió significativamente respecto de la

**Tabla 2.1.** Resultados de los análisis de la varianza de medidas repetidas para analizar el efecto de la adición de zoosporas de *Saprolegnia* y del estadio de desarrollo sobre el incremento en la tasa de mortalidad de los embriones de *Pelobates cultripes*

Especie	Fuente de variación	gl	Media cuadrática	F	P
<i>S. diclina</i>	Zoosporas	1	3,329	77,857	<0,001
	Estadio	2	0,688	16,092	<0,001
	Zoosporas x Estadio	2	0,700	16,381	<0,001
	Error	12	0,043		
<i>S. ferax</i>	Zoosporas	1	4,554	548,819	<0,001
	Estadio	2	1,275	153,678	<0,001
	Zoosporas x Estadio	2	1,167	140,622	<0,001
	Error	12	0,008		

de los controles después de 72 horas, siendo solamente del 3,3%. Las diferencias significativas entre grupos de edad aparecieron 48 horas después de la adición de las zoosporas ( $F_{3,14} = 14,204$ ;  $P < 0,001$ ). Los análisis post hoc revelaron que, en este momento, la tasa de mortalidad de los embriones expuestos en el estadio 15 (33,6%) y en el estadio 19 (66,7%) era significativamente mayor que la de los controles (Fig. 2.1a). A pesar de la gran diferencia de mortalidad entre los embriones expuestos desde los estadios 15 y 19, los análisis posc hoc no mostraron diferencias significativas entre ellos.

Al igual que ocurrió con *S. diclina*, en el caso de *S. ferax* no se observaron efectos sobre los embriones expuestos en el estadio 12 después de 72 horas, siendo la mortalidad del 1,7%. Los efectos letales significativos se

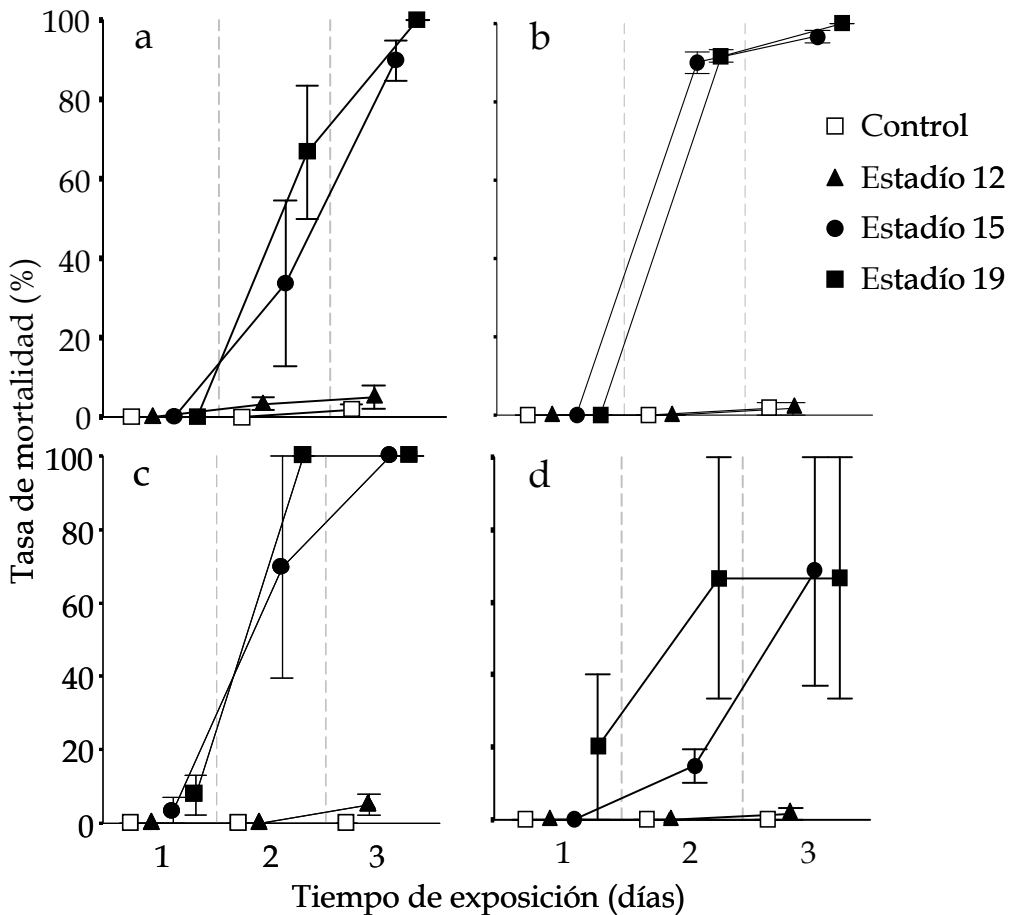




observaron después de 48 horas de exposición ( $F_{3,14} = 282,622$ ;  $P < 0,001$ ), momento en el cual el 90% de los embriones expuestos en el estadio 15 y el 91,7% de los expuestos en el estadio 19 habían muerto (Fig. 2.1b).

En ambos experimentos se obtuvieron aislamientos de las especies de *Saprolegnia* utilizadas para la infección a partir de los embriones expuestos.

**Figura 2.1.** Tasas de mortalidad media ( $\pm$  ES) de embriones expuestos a zoosporas de *Saprolegnia* en diferentes estadios de desarrollo según Gosner (1960): **a)** *Pelobates cultripes* expuestos a 3000 zoosporas/ml de *S. diclina*; **b)** embriones de *P. cultripes* expuestos a 15.000 zoosporas/ml de *S. ferax*; **c)** embriones de *Bufo calamita* expuestos a 3000 zoosporas/ml de *S. diclina*; **d)** embriones de *B. calamita* expuestos a 300 zoosporas/ml de *S. diclina*





### *Bufo calamita*

En el experimento con embriones de *B. calamita* la mortalidad media de los controles fue menor del 2% y no se observaron síntomas de infección. El ANOVA de medidas repetidas mostró que la adición de zoosporas aumentó la tasa de mortalidad de los embriones, y que dicho aumento fue dependiente del estadio embrionario en el cual se añadieron las zoosporas (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2.** Resultados del análisis de la varianza de medidas repetidas para analizar el efecto de la adición de zoosporas de *Saprolegnia diclina* y del estadio de desarrollo sobre el incremento en la tasa de mortalidad de los embriones de *Bufo calamita*

Fuente de variación	gl	Media cuadrática	F	P
Zoosporas	2	3,074	13,448	<0,001
Estadio	2	2,831	12,383	0,001
Zoosporas x Estadio	4	0,738	3,229	0,037
Error	18	0,229		

Como ocurrió con *P. cultripipes*, el menor efecto del patógeno se observó en los individuos expuestos en el estadio 12, con una tasa de mortalidad inferior al 5% 72 horas después de la adición de ambas concentraciones de zoosporas. Las diferencias en la tasa de mortalidad entre estadios de desarrollo se manifestaron 48 horas después de la exposición a la concentración de zoosporas más alta ( $F_{3,14} = 28,806$ ;  $P < 0,001$ ). En ese momento todos los embriones expuestos en el estadio 19 y el 69,7% de los expuestos en el estadio 15 habían muerto (Fig. 2.1c). Para la concentración de zoosporas más baja, las diferencias en la tasa de mortalidad aparecieron también tras 48 horas de exposición ( $F_{3,14} = 6,497$ ;  $P = 0,006$ ), aunque en este caso solamente los



embriones expuestos en el estadio 19 sufrieron una tasa de mortalidad significativamente más alta que los controles (66,7%). Después de 72 horas de exposición, también la tasa de mortalidad de los embriones expuestos en el estadio 15 (68,5%) fue significativamente superior a la de los controles ( $F_{3,14} = 6,641$ ;  $P = 0,005$ ) (Fig. 2.1d). Aunque hay una tendencia que indica que los embriones expuestos en el estadio 19 son más sensibles que los expuestos en el 15, los análisis post hoc no revelaron diferencias significativas entre estos dos grupos de edad en ningún caso.

A partir de los embriones expuestos al patógeno se obtuvieron aislamientos de *S. diclina*.

## 2.4 DISCUSIÓN

---

El estadio de desarrollo embrionario parece jugar un papel fundamental en la susceptibilidad de ambas especies de anfibios a las infecciones por *Saprolegnia*. Además, al utilizar dos concentraciones de zoosporas, se ha puesto de manifiesto una relación dosis-respuesta de los efectos de *Saprolegnia* en *B. calamita*, tanto en lo que se refiere a la mortalidad final de los embriones como en el tiempo de aparición de los síntomas de la infección.

La mayor parte de los estudios sobre los efectos de *Saprolegnia* sp. sobre la mortalidad de anfibios utilizan fragmentos de micelio como fuente de exposición, sin llevar a cabo una cuantificación de la cantidad de zoosporas que pueden estar implicadas en el proceso de infección (p.ej. Gomez-Mestre *et al.*, 2008; Sagvik *et al.*, 2008b; Karraker & Ruthig, 2009). Aunque en estos casos se podría asumir una consistencia en la cantidad de zoosporas producidas por los fragmentos de micelio, la identificación de concentraciones letales o subletales se torna difícil. Sólo unos pocos estudios han llevado a cabo una cuantificación *a priori* de las zoosporas utilizadas en los ensayos de virulencia



(Romansic *et al.*, 2007; Fernández-Benéitez *et al.*, 2008). Sin embargo, en estos estudios sólo se utilizó una concentración experimental, de tal modo que no es posible determinar la existencia de relaciones dosis-efecto. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de conocer la concentración de zoosporas para poder establecer con precisión la virulencia de los patógenos.

En lo que se refiere al estadio de desarrollo, los embriones expuestos en los estadios de Gosner 15 y 19 sufrieron un aumento significativo en la tasa de mortalidad después de 72 horas de exposición, mientras que los embriones expuestos en el estadio de Gosner 12 resistieron los efectos de las zoosporas durante ese periodo de tiempo.

En línea con estos resultados, Blaustein *et al.* (1994b) observaron en el campo que los embriones de *B. boreas* se desarrollaban normalmente hasta el estadio de Gosner 13. En este estadio, las hifas de *Saprolegnia* se hacían claramente visibles sobre los embriones y comenzaban a crecer a través de la membrana vitelina. Sin embargo, estos autores también observaron que la mortalidad embrionaria era especialmente alta cuando el patógeno infectaba a los embriones antes del desarrollo de la cresta neural (estadio de Gosner 16), por lo que propusieron que los individuos infectados después del desarrollo de la cresta neural podrían sobrevivir al patógeno. De acuerdo con esta asunción, los embriones expuestos en el estadio 19 deberían haber tolerado los efectos de *Saprolegnia*; sin embargo, con la excepción de los embriones de *B. calamita* expuestos a la concentración más baja de *S. diclina*, la mortalidad fue total en todos los casos transcurridas 72 horas desde la adición de las zoosporas. Según nuestros resultados, la formación de la cresta neural no es un estadio importante en la determinación del impacto de las infecciones por *Saprolegnia*.

Este estudio es el primero, hasta donde tenemos constancia, que analiza experimentalmente el efecto de especies de *Saprolegnia* en particular y de los



Oomycetes en general, a lo largo del desarrollo embrionario en anfibios. La susceptibilidad relacionada con el estadio de desarrollo ha sido estudiada para otros patógenos como *B. dendrobatidis*; en este caso se observó que el hongo infecta más fácilmente a las larvas de mayor edad que a las larvas más jóvenes (Smith *et al.*, 2007). De todas maneras el mecanismo de infección de *B. dendrobatidis* es muy diferente al de *Saprolegnia* (Nichols *et al.*, 2001) por lo que las comparaciones entre estos patógenos tienen poca relevancia.

Uno de los muchos factores que podría determinar la variación en la tolerancia a los patógenos a lo largo de la ontogenia es el desarrollo del sistema inmunológico, aunque apenas existen estudios publicados sobre esta materia en anfibios. Por ejemplo, Du Pasquier *et al.* (1989) descubrieron que la respuesta inmunológica en *Xenopus laevis* empezaba a ser funcional después de la eclosión. Recientemente se ha demostrado en la misma especie la existencia de transferencia materna de anticuerpos a los embriones (Poorten & Kuhn, 2009).

Ya sea que los organismos no son capaces de mostrar una respuesta inmune hasta la eclosión, que haya una transferencia materna de anticuerpos, o ambas cosas, no se esperarían cambios en la susceptibilidad a los patógenos durante el desarrollo embrionario. Además, si algún componente de la respuesta inmune se tornara funcional durante la fase embrionaria, los estadios más tardíos deberían ser más resistentes a la infección por *Saprolegnia* que los más jóvenes, al contrario de lo que hemos observado. Todo ello indica que ha de haber otros mecanismos que jueguen un papel importante en la resistencia de los embriones más jóvenes a la infección por *Saprolegnia*.

Las diferencias observadas en la susceptibilidad a las infecciones por *Saprolegnia* podrían estar causadas por cambios en la envuelta gelatinosa que rodea al embrión. Esta matriz gelatinosa podría actuar como una barrera que protege a los embriones del patógeno durante los primeros estadios, cuando la



capa de gelatina es especialmente gruesa. A medida que el embrión se desarrolla, esta cobertura se hace más delgada (Yamasaki *et al.*, 1990), lo que facilitaría el contacto físico con el patógeno. Gomez-Mestre *et al.* (2006) encontraron que los huevos de salamandra moteada (*Ambystoma maculatum*) con sus capas de gelatina intactas eran resistentes a la infección por mohos acuáticos pertenecientes a los géneros *Saprolegnia* y *Achlya*, mientras que los huevos a los que se les eliminó la cubierta gelatinosa sufrieron altas tasas de mortalidad. De esta manera, la mayor susceptibilidad a *Saprolegnia* de los estadios embrionarios más tardíos podría ser atribuida, al menos en parte, a la mayor protección conferida por la capa de gelatina durante los primeros estadios de desarrollo, cuando dicha capa es especialmente gruesa.

Otras defensas contra las infecciones por hongos, tales como las sustancias producidas por bacterias simbiotas descritas en algunos taxones (ver revisión en Hamdoun & Epel, 2007), no han sido estudiadas en embriones de anfibios. Sin embargo, se ha observado que en algunos moluscos las bacterias simbiotas que les protegen de las infecciones fúngicas están generalmente asociadas a la capa de gelatina que recubre a los huevos (Kaufman *et al.*, 1998). Habría que llevar a cabo futuras investigaciones para determinar si la cubierta de gelatina de los huevos de anfibios alberga algún tipo de microorganismo simbiote que pudiera contribuir a la defensa contra infecciones por *Saprolegnia* y otros patógenos, y estudiar cómo esta protección varía a lo largo del desarrollo.

Las diferencias de susceptibilidad a *Saprolegnia* entre estadios de desarrollo pueden ser importantes para entender los efectos causados por el patógeno cuando actúa junto a otros estresantes, tales como la radiación UV-B o los contaminantes. Por ejemplo, el incremento ambiental de nitrógeno inorgánico se ha relacionado con brotes de varias enfermedades en anfibios (Johnson *et al.*, 2007). Sin embargo, los pocos estudios que han analizado los



efectos combinados de *Saprolegnia* y nitrógeno inorgánico no han encontrado evidencias claras de efectos sinérgicos (Romansic *et al.*, 2006; Puglis & Boone, 2007). Ortiz-Santaliestra *et al.* (2006), estudiando embriones y larvas jóvenes de varias especies de anfibios, incluyendo *P. cultripes* y *B. calamita*, describieron que variaciones de edad de sólo cuatro días provocaban grandes diferencias en la sensibilidad de los individuos al nitrato amónico. Además, en el caso de *P. cultripes*, los individuos expuestos en el estadio de Gosner 19 fueron los más sensibles, tal como ocurrió con la exposición a *Saprolegnia*. La aparición de efectos combinados de *Saprolegnia* y nitrógeno inorgánico podría depender del estadio de desarrollo en el cual los animales son expuestos a los estresantes.

Al contrario de lo que ocurre con el nitrógeno inorgánico, los efectos sinérgicos de la radiación UV-B y *Saprolegnia* sobre los embriones de anfibios sí han sido demostrados (Kiesecker & Blaustein, 1995). En algunas especies, la envuelta de gelatina parece absorber radiaciones con longitudes de onda en el rango del UV-B (Ovaska *et al.*, 1997), por lo que jugaría un papel importante en la determinación de la cantidad de radiación dañina que alcanza el embrión (Smith *et al.*, 2002). A medida que el embrión crece y la cubierta de gelatina se hace más delgada, su eficiencia en el bloqueo de la radiación UV-B podría disminuir, lo que provocaría que los estadios embrionarios más tardíos fueran más sensibles, no sólo al impacto de *Saprolegnia*, sino al efecto dañino del UV-B. Si los estadios sensibles a dos estresantes que actúan sinérgicamente son coincidentes, los efectos de dichos estresantes se verán fuertemente magnificados si aparecen en el campo al mismo tiempo.





CAPÍTULO 3  
DIFERENCIAS ENTRE ESPECIES DE  
ANFIBIOS EN LA SUSCEPTIBILIDAD A  
SAPROLEGNIA



### 3.1 INTRODUCCIÓN

---

Las enfermedades emergentes constituyen una de las principales amenazas para la conservación de la biodiversidad (Daszak *et al.*, 2003; Woodhams *et al.*, 2006). Aunque los patógenos por sí solos pueden tener un efecto importante sobre las poblaciones existen diversos factores que pueden condicionar su impacto; por ejemplo, los cambios ambientales globales o locales pueden estresar a los organismos haciéndolos más sensibles a dichas enfermedades (Kiesecker & Blaustein, 1995, 1997; Smith *et al.*, 2009). Por otra parte, la distribución y densidad de las poblaciones también pueden determinar su sensibilidad a una determinada enfermedad (Dobson & May, 1986); así, una mayor agregación de individuos o un aumento de la densidad de las poblaciones puede aumentar la probabilidad de transmisión de las enfermedades (Kiesecker & Blaustein, 1997; Koprivnikar *et al.*, 2008).

No todas las especies de una comunidad tienen por qué ser sensibles a un determinado patógeno; de hecho, los patrones de distribución del declive de poblaciones de anfibios en varias regiones del mundo muestran como algunas especies están en declive a causa de alguna enfermedad, mientras que otras no muestran dicha tendencia (Johnson *et al.*, 2002b; Woodhams & Alford, 2005; Woodhams *et al.*, 2007; Kilpatrick *et al.*, 2010). La presencia de especies resistentes a un patógeno puede tener efectos importantes en las comunidades ya que éstas pueden actuar como reservorios del mismo contribuyendo a aumentar el efecto sobre las especies más sensibles (Holt & Lawton, 1994; McCallum & Dobson, 1995; Hudson & Greenman, 1998; Daszak *et al.*, 2004). Además, numerosos estudios sugieren que los patógenos pueden jugar un papel importante en la composición de especies e influenciar la estructura de las comunidades (Price *et al.*, 1986, 1988; Hudson & Greenman, 1998; Kiesecker & Blaustein, 1999). La presencia de patógenos que afectan de manera diferente



a varias especies puede resultar en alteraciones de las interacciones interespecíficas (Grosholz, 1992; Schall, 1992; Power *et al.*, 1996), pudiendo, por ejemplo, permitir la coexistencia de especies competitivamente inferiores al disminuir la presencia de los competidores dominantes si son éstos los más sensibles a la enfermedad.

En este sentido Kiesecker & Blaustein (1999) demostraron que la presencia de *Saprolegnia ferax* podía revertir los efectos competitivos entre la rana de las Cascades (*Rana cascadae*) y la rana arborícola del Pacífico (*Pseudacris regilla*). En ausencia de *Saprolegnia*, las larvas de *R. cascadae* tuvieron fuertes efectos negativos sobre el crecimiento, el desarrollo y la supervivencia de las larvas de *P. regilla* como consecuencia de la competencia interespecífica; sin embargo, estos efectos se vieron anulados en presencia de *Saprolegnia*, debido a la alta tasa de mortalidad por saprolegniosis que sufrieron los embriones de *R. cascadae*, lo que disminuyó su densidad larvaria y, por tanto, el impacto sobre *P. regilla*.

Así mismo, Bosch & Rincón (2008) observaron la expansión del sapo común (*Bufo bufo*) en el Parque Natural de Peñalara (Madrid) después de que la quitridiomycosis casi produjera la extinción del sapo partero común (*Alytes obstetricans*) de la zona. Estos autores demostraron que *B. bufo* incrementó su número de lugares de reproducción en el Parque al colonizar los medios de los que *A. obstetricans* había desaparecido.

En este capítulo se analizan posibles diferencias en la susceptibilidad a *Saprolegnia* entre dos especies de anfibios, el sapo de espuelas (*Pelobates cultripes*) y el sapo corredor (*Bufo calamita*), procedentes de Malpartida de Corneja. En esta población se han obtenido aislamientos de *S. ferax* a partir de los huevos de *B. calamita*, pero no de los de *P. cultripes*. La imposibilidad de obtener aislamientos de *S. ferax* a partir de los embriones de *P. cultripes* podría ser debida a una mayor resistencia de esta población a las infecciones por



dicho patógeno. Diferencias en el grado de sensibilidad a un patógeno pueden tener consecuencias sobre las interacciones naturales entre ambas especies.

### **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

---

Para llevar a cabo el estudio se recogieron huevos recién depositados (<24h, estadio <10 según Gosner, 1960) y sin síntomas de infección por *Saprolegnia* de cuatro puestas de *B. calamita* y de *P. cultripes*. Los huevos de ambas especies fueron recolectados en la misma charca, situada en Malpartida de Corneja (ver Tabla 1 en página 63).

Una vez en el laboratorio los huevos se depositaron en contenedores experimentales de 100 ml de capacidad con 90 ml de agua mineral. En cada uno de los contenedores se sumergieron 20 huevos de una de las dos especies (5 huevos x 4 puestas). Todos los contenedores experimentales se dispusieron en un acuario de 30 litros de capacidad cuya temperatura se mantuvo a 14°C con un refrigerador Selecta 285W (J.P. Selecta SA, Abrera, Barcelona). La temperatura de los contenedores experimentales se comprobó diariamente. Dicha temperatura varió menos de 1°C con respecto a la temperatura del baño. El fotoperiodo se mantuvo en un ciclo de 14:10 horas de luz/oscuridad.

Cada contenedor experimental se asignó aleatoriamente a uno de los dos tratamientos utilizados, control (sin zoosporas añadidas) o *Saprolegnia* (adición de zoosporas). Cada tratamiento se replicó tres veces.

La cepa de *Saprolegnia* elegida para la exposición de los embriones fue SAP447, identificada como *S. ferax*. Esta cepa fue aislada a partir de huevos de *B. calamita* procedentes de la misma charca de la que se recogieron los huevos utilizados en este experimento y se ha demostrado que es patógena para los embriones de esta población (ver capítulo 1).

La obtención y el cálculo de la concentración experimental de



zoosporas se llevaron a cabo siguiendo la metodología citada en el capítulo 1. De esta manera, la concentración de zoosporas que se añadió en cada contenedor destinado al tratamiento *Saprolegnia* fue de 3000 zoosporas/ml.

Los contenedores experimentales se revisaron todos los días y se registró el número de embriones muertos en cada uno de ellos. El experimento finalizó cuando los embriones fueron capaces de nadar libremente, lo que ocurrió a los nueve días del experimento. Una vez finalizado el experimento se analizaron los embriones muertos para detectar el crecimiento de *Saprolegnia*. En caso de observarse crecimiento de micelio, se procedió a su aislamiento e identificación por técnicas moleculares para comprobar que se trataba de la misma especie utilizada para la exposición.

Para determinar las posibles diferencias en la sensibilidad a *S. ferax* entre las dos especies analizadas se utilizó un ANOVA de medidas repetidas con la evolución de las tasas de mortalidad (transformadas mediante el arcoseno de la raíz cuadrada) a lo largo del tiempo como variable dependiente y la concentración de zoosporas (entendiendo el control como una concentración más) y la especie como variables categóricas. Para analizar el efecto del patógeno sobre cada una de las especies se llevaron a cabo ANOVAs univariados. Para llevar a cabo los análisis se utilizó el programa SPSS 11.5 para Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).

### **3.3 RESULTADOS**

---

El ANOVA de medidas repetidas reveló un efecto significativo de la interacción entre la concentración de zoosporas y la especie expuesta sobre la supervivencia embrionaria (Tabla 3.1), lo que pone de manifiesto una diferencia en cuanto a la sensibilidad a *S. ferax* entre las dos especies estudiadas. Al analizar los efectos del patógeno para cada una de las especies,



**Tabla 3.1.** Resultados del análisis de la varianza de medidas repetidas para analizar las diferencias en la sensibilidad a *Saprolegnia* entre *Bufo calamita* y *Pelobates cultripes* procedentes de Malpartida de Corneja. Los embriones fueron expuestos a 3000 zoosporas/ml de *S. ferax*

Fuente de variación	gl	Media cuadrática	F	P
Especie	1	0,911	7,192	0,028
Zoosporas	1	2,497	19,712	0,002
Especie x Zoosporas	1	0,911	7,192	0,028
Error	8	0,127		

se observó que en el caso de *P. cultripes* no hubo diferencias significativas entre las tasas de mortalidad de los embriones control y los expuestos a *Saprolegnia* ( $F_{1,4} = 1$ ;  $P = 0,374$ ). Estas diferencias sí que aparecieron en el caso de *B. calamita* ( $F_{1,4} = 55,773$ ;  $P = 0,002$ ), como ya se había visto en el capítulo 1. Al finalizar el experimento, la mortalidad de los embriones de *B. calamita* expuestos a *Saprolegnia* fue del 66,7%, mientras que la de los embriones de *P. cultripes* fue del 15% (Fig. 3.1).

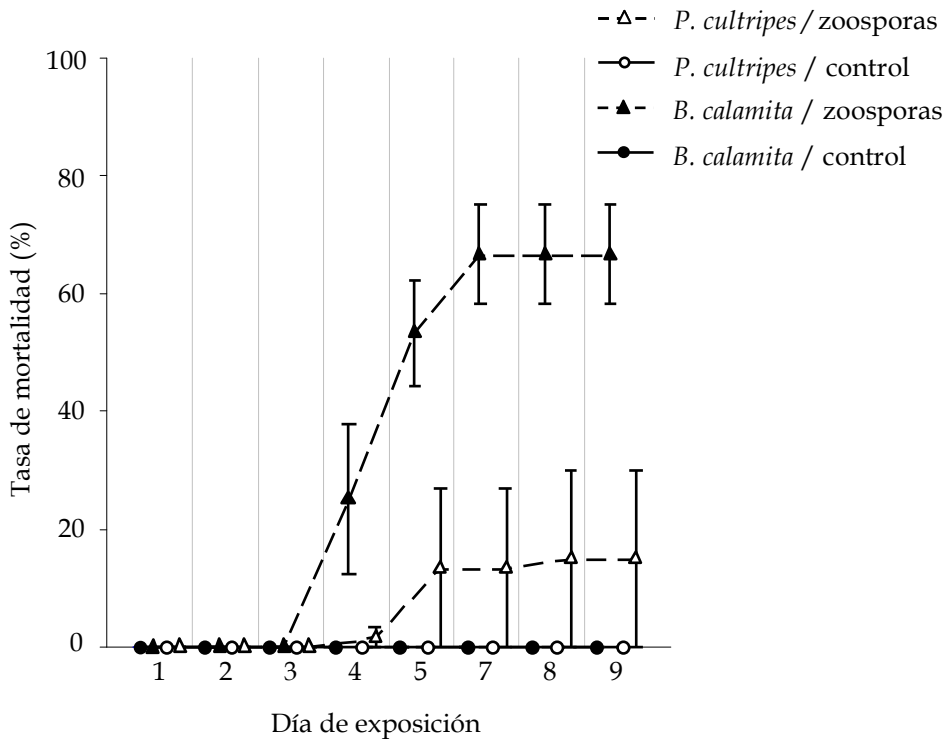
A partir de los embriones de *B. calamita* expuestos al patógeno se obtuvieron aislamientos de *Saprolegnia*. Dichos aislamientos no se obtuvieron en ningún caso a partir de los embriones de *P. cultripes*.

### 3.4 DISCUSIÓN

En este capítulo se ha puesto de manifiesto una diferencia significativa en la sensibilidad a *Saprolegnia* entre las dos especies de anfibios estudiadas. Mientras que la tasa de mortalidad embrionaria de *B. calamita* aumentó significativamente con la presencia de *Saprolegnia*, la de *P. cultripes* no mostró



**Figura 3.1.** Tasas de mortalidad medias ( $\pm$  ES) de los embriones de *B. calamita* y *P. cultripipes* procedentes de Malpartida de Corneja expuestos a 3000 zoosporas/ml de *S. ferax*



un aumento significativo a causa del patógeno. Cabe recordar una vez más que la cepa de *Saprolegnia* utilizada en este experimento fue aislada a partir de embriones de *B. calamita*, mientras que ninguna cepa de *Saprolegnia* se consiguió aislar de los embriones de *P. cultripipes* de la misma localidad.

Las diferencias a nivel específico en la sensibilidad a un determinado patógeno, así como sus efectos ecológicos, han sido descritas en varias ocasiones. Uno de estos casos afecta a las poblaciones de nuestro cangrejo autóctono *Austrapotamobius pallipes*. A principio de los años 70 las poblaciones de *A. pallipes* se vieron drásticamente reducidas a causa de una enfermedad causada por el oomyceto *Aphanomyces astaci*, originario de Norteamérica e introducido en nuestro país a principios de la década de los 70 a partir de varias especies de cangrejo procedentes de esta región (*Procambarus clarkii* y





*Pacifastacus leniusculus*) (Cuéllar & Coll, 1983; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 1997a, b). Las especies norteamericanas son muy resistentes a la enfermedad, actuando como reservorios del patógeno, mientras que los individuos de *A. pallipes* afectados por la enfermedad mueren rápidamente (Diéguez-Uribeondo, 2006). La rápida dispersión de las especies alóctonas, debida principalmente a actuaciones humanas, facilitó la extensión de la enfermedad y con ello la práctica extinción del cangrejo autóctono.

En lo referente a *Saprolegnia*, los resultados de estos experimentos están en la misma línea que los de Kiesecker & Blaustein (1999), quienes detectaron una diferencia interespecífica en la sensibilidad de los embriones de *P. regilla* y *R. cascadae* a las infecciones por *Saprolegnia* en el noroeste de los Estados Unidos. En el caso de *R. cascadae*, la tasa media de supervivencia en el momento de la eclosión se vio reducida en un 60% en presencia de *Saprolegnia*. Por el contrario, las tasas medias de eclosión de los embriones de *P. regilla* estuvieron próximas al 100% independientemente de que dichos embriones hubiesen estado expuestos o no a *Saprolegnia*.

Los factores que pueden determinar estas diferencias entre especies en la sensibilidad a *Saprolegnia* se desconocen hasta el momento, y podrían estar relacionados con ciertas características ecológicas. En el medio natural, pequeñas variaciones en la temperatura habitual de las puestas podrían motivar diferencias en la capacidad de crecimiento y dispersión del patógeno. Por ejemplo, las puestas de *B. calamita* aparecen a pocos centímetros de la superficie del agua, mientras que *P. cultripes* deposita sus huevos a mayor profundidad, lo que significa que la temperatura del agua en el entorno de los huevos de una y otra especie va a ser diferente. Esta diferencia podría ser clave en la capacidad del patógeno de infectar a los embriones de una u otra especie. Gomez-Mestre *et al.* (2006) observaron en Massachusetts (Estados Unidos) como sólo las puestas de rana de bosque (*Lithobates sylvaticus*) depositadas al



final de la estación reproductora, cuando la temperatura del agua era mayor, sufrían infección por Oomycetes. Del mismo modo, el 62,5% de las puestas de sapo americano (*Bufo americanus*), que se reproduce más tardíamente y por tanto con temperaturas del agua mayores, se vieron afectadas por este tipo de infección. En experimentos de crecimiento de Oomycetes bajo temperatura controlada, estos autores comprobaron que los Oomycetes crecían 2,7 veces más rápido a 11-15°C (temperatura noche-día), correspondiente a las temperaturas del agua registradas durante el periodo de reproducción de *B. americanus* que a 6,5-8,5°C, correspondiente a la temperatura registrada durante el periodo reproductor de *L. sylvaticus*. Sin embargo, en el caso de *B. calamita* y *P. cultripes*, las diferencias entre especies en la sensibilidad a *S. ferax* se mantuvieron en los experimentos de laboratorio, en los cuales los embriones de ambas especies estuvieron sometidos a las mismas condiciones. Estos resultados indicarían que las diferencias en la sensibilidad se deberían a características intrínsecas de los hospedadores, que harían que cada especie de anfibio mostrara una particular sensibilidad o tolerancia al patógeno, o a características propias del patógeno, el cual mostraría una especificidad hacia un hospedador concreto.

Hasta el momento son pocos los trabajos en los que se han llevado a cabo el aislamiento y la identificación de las especies de *Saprolegnia* que afectan a los embriones de los anfibios (Johnson *et al.*, 2008; Petrisko *et al.*, 2008) y no se tienen datos de especificidad patógeno-hospedador. Sin embargo, en los trabajos citados anteriormente se puede observar que algunas especies de *Saprolegnia* sólo son aisladas a partir de determinadas especies de anfibios. Por ejemplo, Johnson *et al.* (2008) únicamente aislaron *S. ferax* a partir de huevos de salamandra noroccidental (*Ambystoma gracille*), pero no de sapo boreal (*Bufo boreas*) o *P. regilla*. Así mismo, sólo obtuvieron aislamientos de *S. diclina* a partir de huevos de *B. boreas*.



El desarrollo de las defensas antimicrobianas podría constituir una importante fuente de variación interespecífica en la tolerancia embrionaria a *Saprolegnia*. Desafortunadamente, apenas se conoce nada acerca de la composición de dichas defensas en embriones de anfibios. La barrera antimicrobiana más evidente que protege a los embriones es la envuelta gelatinosa. Las propiedades físicas y químicas de dicha envuelta son diferentes entre especies (Altig & McDiarmid, 2007), lo cual puede constituir una evidente fuente de variabilidad interespecífica en la sensibilidad de los embriones a la infección por *Saprolegnia*. En este sentido Gomez-Mestre *et al.* (2006) observaron que los embriones de salamandra moteada (*Ambystoma maculatum*) no se veían afectados por infecciones por Oomycetes, pese a que esta especie se reproduce en las mismas charcas que otras especies de anfibios que sí son susceptibles de infección y a que su desarrollo embrionario es muy largo, lo que supone que al final del periodo de desarrollo los embriones se ven sometidos a temperaturas que facilitan el rápido crecimiento de los Oomycetes (15-18°C). Sin embargo, los embriones de esta especie están protegidos por una gruesa capa de gelatina que actúa como escudo protector frente a este tipo de patógenos. Gomez-Mestre *et al.* (2006) comprobaron como al eliminar la envuelta gelatinosa que protege a los embriones la supervivencia frente a la infección por Oomycetes disminuyó drásticamente (embriones sin gelatina: 21% de supervivencia; embriones con gelatina: 98 % de supervivencia). La envuelta gelatinosa que protege a los huevos de *P. cultripes* es más gruesa que la que rodea a los embriones de *B. calamita*, lo que podría dificultar la penetrabilidad de las zoosporas de *S. ferax* en las puestas de *P. cultripes* y motivar así la ausencia de infecciones en los embriones de esta especie.

También se ha descrito que los embriones de algunas especies de anfibios están protegidos por anticuerpos transferidos desde el organismo materno (Poorten & Kuhn, 2009), pero se desconoce si esta característica es



común a todas las especies. Un importante mecanismo de protección frente a las infecciones por microorganismos que presentan los anfibios son las secreciones de péptidos cutáneos. Por ejemplo, se ha demostrado el papel fundamental que este tipo de sustancias juegan a la hora de determinar la susceptibilidad de cada especie a verse afectada por la quitridiomycosis (Woodhams *et al.*, 2007). Los péptidos cutáneos son efectivos no solo frente a *Batrachochytrium dendrobatidis*, el hongo causante de la quitridiomycosis, sino también frente a otros patógenos (p.ej. Schädlich, 2009), por lo que es muy probable que también lo sean frente a *Saprolegnia*. Sin embargo, se desconoce si dichas sustancias aparecen también en el tegumento de los embriones.

Los patógenos pueden actuar indirectamente como factores fundamentales a la hora de determinar la estructura de las comunidades al alterar las relaciones entre las distintas especies que comparten un mismo medio (Power *et al.*, 1996). Por ejemplo, Bosch & Rincón (2008), pusieron de manifiesto la expansión de *B. bufo* en el parque Natural de Peñalara (Madrid) después de que la quitridiomycosis produjera la práctica extinción de *A. obstetricans* en la zona. Dichos autores demostraron, mediante técnicas experimentales, que los adultos de *B. bufo* evitan poner en puntos de agua que contienen larvas de *A. obstetricans*. Esto puede ser debido a que la presencia de larvas de *A. obstetricans* tiene efectos negativos sobre el crecimiento y la supervivencia de las larvas de *B. bufo* como consecuencia de la competencia entre ambas especies (Ritcher-Boix *et al.*, 2007). El drástico declive de *A. obstetricans* en Peñalara dejaría a disposición de *B. bufo* nuevos puntos de agua adecuados para su reproducción, facilitando dicha expansión.

De esta manera, los patógenos pueden actuar como especies clave (Power *et al.*, 1996) al disminuir el desarrollo de los competidores dominantes y por tanto permitir la coexistencia de especies competitivamente inferiores, tal y como observaron Kiesecker & Blaustein (1999), quienes describieron cómo la



presencia de *Saprolegnia* revertía los efectos competitivos de *R. cascadae* sobre la masa, la supervivencia y el tiempo de metamorfosis de *P. regilla*. Aunque en este caso no se ha llevado a cabo un estudio para determinar cómo puede influir esta diferencia en las relaciones interespecíficas, es muy probable que éstas se puedan ver afectadas, sobre todo teniendo en cuenta que las dos especies de anfibios comparten el medio y la época de reproducción en la localidad estudiada.



CAPÍTULO 4:  
INFLUENCIA DEL EXCESO DE  
NITRÓGENO EN EL EFECTO DE LA  
INFECCIÓN POR SAPROLEGNIA





## 4.1 INTRODUCCIÓN

---

Uno de los principios subyacentes en el estudio de las enfermedades emergentes es determinar el porqué de la aparición y desarrollo de dichas enfermedades. En algunos casos, estos fenómenos tienen como origen la introducción de un patógeno en un nuevo hábitat, que desencadena un proceso de infección de los organismos presentes en dicho hábitat (p.ej. Rachowitz, 2005). En otras ocasiones, los efectos de los patógenos son dependientes del contexto, es decir, de factores ambientales que determinan cambios en la relación entre patógeno y hospedador, o directamente comprometen la capacidad del hospedador de combatir al patógeno (p.ej. Grossholz, 1992; Kiesecker & Skelly, 2001; Mitchell *et al.*, 2002). Por ejemplo, tanto los estresantes bióticos como los abióticos pueden actuar sinérgicamente con los patógenos incrementando sus efectos adversos sobre los hospedadores, de tal modo que si el estresante y el patógeno coinciden, su impacto sobre el hospedador se verá magnificado en relación con los efectos de cada factor por separado (p.ej. Guth *et al.*, 1977; Brown & Pascoe, 1989).

La información disponible sobre las causas del declive global de las poblaciones de anfibios revela claramente la existencia de múltiples factores implicados en este fenómeno, incluyendo factores tanto bióticos como abióticos (Alford & Richards, 1999; Blaustein & Kiesecker, 2002; Collins & Storfer, 2003; Stuart *et al.*, 2004). Además, también ha quedado demostrado que los efectos de los patógenos potencialmente relacionados con el declive de anfibios están influenciados por la existencia de cofactores como la contaminación química o la radiación ultravioleta (Kiesecker, 2002; Taylor *et al.*, 2005; Collins, 2010; Searle *et al.*, 2010). En el caso particular de las infecciones por *Saprolegnia* en anfibios, parece existir una relación entre la presencia de estresantes abióticos y la mortalidad asociada a dichas infecciones



(Strijbosch, 1979; Banks & Beebee, 1988; Kiesecker & Blaustein, 1995; Kiesecker *et al.*, 2001a).

La contaminación por exceso de nitrógeno se ha convertido en un problema ambiental de primera magnitud. A finales del siglo XX, se estimaba que la cantidad de nitrógeno liberada al medio como consecuencia de las actividades humanas era de 140 millones de toneladas anuales (Vitousek *et al.*, 1997). La aplicación de fertilizantes químicos constituye la principal fuente de adición artificial de nitrógeno al ambiente. A nivel global, el uso de fertilizantes se multiplicó por siete en el periodo comprendido entre 1960 y 2000 (FAO, 2005). Más de la mitad del fertilizante aplicado sobre los cultivos nunca es utilizado por las plantas, por lo que buena parte de su exceso puede ser lavado del suelo hasta llegar a los ríos, lagos o lagunas (Crews & Peoples, 2004). Esto implica que los mayores impactos producidos por el exceso de nitrógeno inorgánico disuelto procedente de los fertilizantes se observen en los medios acuáticos, pudiendo darse casos de eutrofización debido a las elevadas cantidades de nutrientes que se escapan de las zonas agrícolas y van a parar a dichos medios (Matson *et al.*, 1997; Tilman, 1999).

El exceso de nitrógeno puede promover el desarrollo de microorganismos en el medio acuático, siendo uno de los impactos que con mayor frecuencia se proponen como cofactores en el desarrollo de enfermedades emergentes en anfibios (Johnson *et al.*, 2010). Además, los efectos negativos del exceso de nitrógeno sobre los anfibios son de sobra conocidos y van desde la muerte de embriones y larvas hasta diversos efectos subletales como retrasos en el crecimiento y desarrollo, reducción de las diferentes actividades vitales y alteraciones de la conducta (ver revisión en Marco & Ortiz-Santaliestra, 2009).

Hasta la fecha, solo se han encontrado en la literatura dos estudios que analizan el efecto combinado de los fertilizantes nitrogenados con la



exposición a *Saprolegnia* en anfibios. Puglis & Boone (2007) no encontraron ningún efecto ni del nitrato amónico (6,45-12,9 mg/l) ni de *Saprolegnia ferax* al estudiar el desarrollo embrionario y larvario de la rana toro (*Lithobates catesbeianus*). Romansic *et al.* (2006) encontraron respuestas diferentes en función de la especie al combinar *Saprolegnia* con niveles de nitrato, la principal forma de nitrógeno inorgánico presente en el medio natural, hasta 20 mg/l. Así, mientras que la supervivencia de la rana arborícola del Pacífico (*Pseudacris regilla*) y de la salamandra noroccidental (*Ambystoma gracile*) no se vio afectada por ninguno de los factores, se observó un efecto antagónico entre nitrato y *Saprolegnia* al analizar la supervivencia larvaria de la rana patirroja septentrional (*Rana aurora*). Estos autores proponen dos explicaciones para los resultados obtenidos. Por un lado, el nitrato afectaría directamente al microorganismo, reduciendo su supervivencia o su capacidad de producir zoosporas; por otra parte, el fertilizante podría inducir una respuesta metabólica en los anfibios.

Con el objetivo de dilucidar la naturaleza del efecto combinado de *Saprolegnia* y nitrato sobre los embriones de las poblaciones en estudio, se realizaron dos ensayos de exposición a ambos factores con un diseño en bloque. Dichos ensayos se llevaron a cabo con embriones de ranita de San Antonio (*Hyla arborea*) y de rana verde común (*Pelophylax perezi*). Los datos existentes sobre la sensibilidad de embriones de estas especies a los fertilizantes nitrogenados muestran una respuesta bien distinta, ya que mientras que poblaciones de *P. perezi* de la meseta castellana son capaces de tolerar concentraciones similares a las de las charcas afectadas por la escorrentía de los campos de cultivo (Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2010), individuos de *H. arborea* procedentes del oeste de la Península Ibérica resultan altamente sensibles a niveles similares a los permitidos para el agua potable (Ortiz *et al.*, 2004).



## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

---

Para llevar a cabo este estudio se recolectaron huevos recién depositados de *H. arborea* y *P. perezii* (<24h, estadio <10 según Gosner, 1960) de cinco puestas diferentes para cada especie. Los huevos no presentaban ningún síntoma de infección por *Saprolegnia*. Los huevos de *H. arborea* se colectaron en el Puerto del Tremedal y los de *P. perezii* en el Prado de las Pozas (ver Tabla 1 en página 63 para información detallada sobre la situación geográfica y la altitud de las localidades).

Los huevos se transportaron al laboratorio y se depositaron en contenedores de 100 ml de capacidad con 90 ml de agua mineral. Todos los contenedores experimentales se sumergieron parcialmente en un acuario con 30 litros de agua cuya temperatura se mantuvo a 14°C con un refrigerador Selecta 285W (J.P. Selecta SA, Abrera, Barcelona). La temperatura del agua de los contenedores experimentales se revisó diariamente, variando en menos de 1°C con respecto de la temperatura del acuario grande. El fotoperiodo se mantuvo en un ciclo de 14:10 horas de luz/oscuridad.

En ambos casos los huevos se expusieron a las cepas de *Saprolegnia* aisladas de su misma población. De esta manera los huevos de *H. arborea* fueron expuestos a zoosporas de los aislamientos SAP456 y SAP461 correspondiente a *S. diclina* y *Saprolegnia* sp. respectivamente, y los de *P. perezii* a zoosporas de los aislamientos SAP443 y SAP444 correspondientes a *S. diclina* y *Saprolegnia* sp. respectivamente.

En cada contenedor de 90 ml se depositaron 10 huevos (2 huevos x 5 puestas). Cada contenedor fue asignado aleatoriamente a un nivel de zoosporas (sin zoosporas, concentración baja o concentración alta) y a un nivel de nitrato (sin nitrato o con nitrato). El método para seleccionar las concentraciones experimentales de *Saprolegnia* ha sido descrito en el capítulo 1,



utilizándose dicho método en todos los casos para determinar la concentración más alta, mientras que la baja se estableció en un orden de magnitud menor. En el experimento de *H. arborea*, la concentración alta de zoosporas de *S. diclina* fue de 20.000 zoosporas/ml y la baja de 2000 zoosporas/ml, mientras que la concentración alta de *Saprolegnia* sp. fue de 4286 zoosporas/ml y la baja de 429 zoosporas/ml. En el experimento de *P. perezi*, las concentraciones fueron similares para ambas cepas, estableciéndose la alta en 1388 zoosporas/ml y la baja en 139 zoosporas/ml. La producción de zoosporas se llevó a cabo según la metodología descrita por Diéguez-Uribeondo *et al.* (1994) y resumida en el capítulo 1.

Las concentraciones experimentales de nitrato se establecieron en 22,6 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l para *P. perezi* y 11,3 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l para *H. arborea*. El hecho de emplear concentraciones diferentes en cada ensayo se fundamenta en la diferente sensibilidad mostrada por cada especie a la exposición a nitrógeno inorgánico según se describe en la literatura científica, y tal como se ha mencionado con anterioridad. La concentración utilizada para *H. arborea* corresponde al máximo de nitrato permitido para el agua potable (EU, 1998), mientras que la concentración de *P. perezi* constituye un nivel habitual en charcas que reciben el agua de escorrentía procedente de los campos de cultivo (p.ej. Scholefield *et al.*, 1996). Las concentraciones experimentales de nitrato se obtuvieron añadiendo al agua el volumen correspondiente de una solución stock de concentración conocida, preparada a partir de la disolución de sal de nitrato sódico 99% pura. Cada tratamiento (nivel de zoosporas x nivel de nitrato) se replicó tres veces.

El experimento comenzó cuando todos los embriones estaban en estadio 12 según Gosner (1960) y se prolongaron hasta que la totalidad de los supervivientes habían eclosionado y eran capaces de nadar. La duración de los ensayos fue de 7 días en el caso de *H. arborea* y 18 días en el caso de *P. perezi*.



Los contenedores fueron revisados diariamente. Los embriones muertos fueron analizados para detectar la presencia de *Saprolegnia*. En el caso de observarse crecimiento de micelio, se llevaron a cabo aislamientos del mismo para identificar la especie de *Saprolegnia* mediante técnicas moleculares, y comprobar que se trataba de la misma que se había usado en los experimentos.

Para analizar el efecto de las zoosporas y del nitrato en la supervivencia de los embriones se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas con la evolución diaria de las tasas de mortalidad, transformadas mediante el arcoseno de la raíz cuadrada, como variable dependiente y las concentración de zoosporas y nitrato como factores categóricos. En los casos en que se encontraron respuestas significativas, se utilizaron ANOVAs univariantes con las tasas diarias de mortalidad como variables dependientes, con el fin de determinar el momento en el que aparecían dichas respuestas. Para determinar qué concentración de zoosporas producía efectos significativos se utilizaron pruebas post hoc HSD de Tukey. Para llevar a cabo los análisis estadísticos se utilizó el programa SPSS 11.5 para Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).

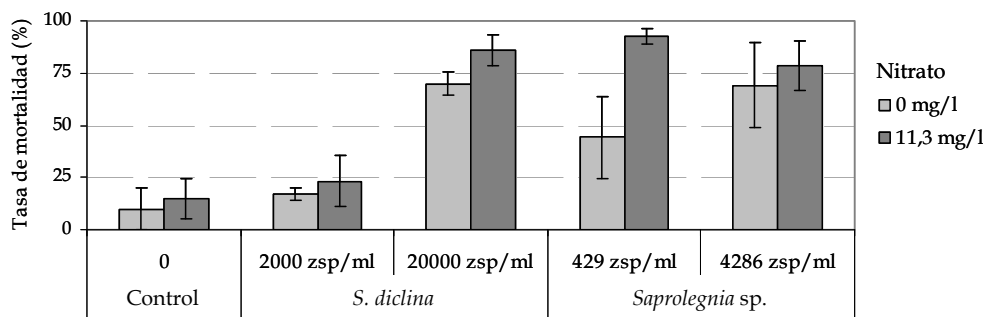
### 4.3 RESULTADOS

---

La mortalidad de los controles en el ensayo con embriones de *H. arborea* fue del 10% (Fig. 4.1). La exposición a ambas cepas de *Saprolegnia* incrementó significativamente la mortalidad en esta especie (Tabla 4.1). Tras únicamente 96 horas de exposición, la tasa de mortalidad ( $\pm$  ES) de los embriones expuestos a 20.000 zoosporas/ml de *S. diclina* era del 70,0 ( $\pm$  6,9) % ( $F_{2,12} = 18,812$ ;  $P < 0,001$ ). Las pruebas post hoc revelaron que únicamente esta concentración resultó significativamente letal para los embriones.



**Figura 4.1.** Tasa de mortalidad ( $\pm$  ES) de los embriones de *Hyla arborea* expuestos a dos concentraciones de zoosporas de *Saprolegnia diclina* y de *Saprolegnia* sp., así como a 11,3 mg N/l en forma de nitrato durante 7 días



**Tabla 4.1.** Resultados de los análisis de la varianza de medidas repetidas para analizar los efectos de la concentración de zoosporas y de la presencia de nitrato (11,3 mg N/l) sobre la supervivencia de los embriones de *Hyla arborea* del Puerto del Tremedal

Especie	Fuente de variación	gl	Media cuadrática	F	P
<i>S. diclina</i>	Zoosporas	1	5,392	18,973	<0,001
	Nitrato	2	0,336	1,182	0,298
	Zoosporas x Nitrato	1	0,068	0,241	0,790
	Error	12	0,284		
<i>Saprolegnia</i> sp.	Zoosporas	1	4,540	9,491	0,003
	Nitrato	1	0,153	0,320	0,582
	Zoosporas x Nitrato	1	0,145	0,303	0,744
	Error	8	0,478		

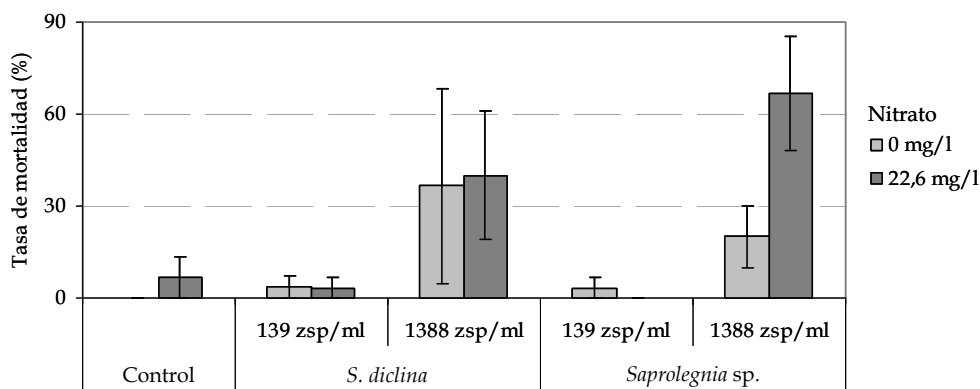
Resultados similares se obtuvieron al analizar el efecto de *Saprolegnia* sp.; tras 48 horas de exposición, la mortalidad de los embriones expuestos a la



concentración más alta (4286 zoosporas/ml) alcanzaba el 38,1 ( $\pm 17,8$ ) % ( $F_{2,12} = 4,481$ ;  $P = 0,035$ ). Las pruebas post hoc revelaron que, en este caso, también la concentración más baja produjo un incremento significativo de la mortalidad, causando la muerte del 44,2 ( $\pm 23,5$ ) % de los embriones expuestos al término del experimento ( $F_{2,12} = 10,733$ ;  $P = 0,002$ ) (Fig. 4.1).

La mortalidad sufrida por los individuos de *H. arborea* expuestos únicamente a 11,3 mg N-NO<sub>3</sub>/l fue del 14,8 ( $\pm 11,8$ ) %, y sólo en los embriones expuestos a 429 zoosporas/ml de *Saprolegnia* sp. se detectó un incremento notable de la mortalidad al añadir el fertilizante en el agua, pasando de un 44,2 ( $\pm 23,5$ ) % a un 92,5 ( $\pm 4,6$ ) % (Fig. 4.1). Sin embargo, la ausencia de interacción entre ambos estresantes (Tabla 4.1) indica que la exposición a nitrato no afectó a la susceptibilidad de los embriones de *H. arborea* a ninguna de las dos cepas de *Saprolegnia* analizadas.

**Figura 4.2.** Tasa de mortalidad ( $\pm$  ES) de los embriones de *Pelophylax perezi* expuestos a dos concentraciones de zoosporas de *S. diclina* y de *Saprolegnia* sp., así como a 22,6 mg N/l en forma de nitrato durante 18 días



En el experimento llevado a cabo con embriones de *P. perezi* no se detectó ningún caso de mortalidad entre los controles. A diferencia de lo sucedido con *H. arborea*, en este ensayo no se observó efecto alguno de la adición de zoosporas de *S. diclina* en los contenedores, ni por sí sola ni en





combinación con el nitrato, a pesar de que la mortalidad de los embriones expuestos a esta cepa estuvo en torno al 40% (Fig. 4.2).

**Tabla 4.2:** Resultados de los análisis de la varianza de medidas repetidas para analizar los efectos de la concentración de zoosporas y de la presencia de nitrato (22,6 mg N/l) sobre la supervivencia de los embriones de *Pelophylax perezi* del Prado de las Pozas

Especie	Fuente de variación	gl	Media cuadrática	F	P
<i>S. dielina</i>	Zoosporas	2	3,063	2,821	0,099
	Nitrato	1	0,028	0,026	0,874
	Zoosporas x Nitrato	2	0,110	0,101	0,904
	Error	12	1,086		
<i>Saprolegnia</i> sp.	Zoosporas	2	5,094	19,386	<0,001
	Nitrato	1	1,324	5,038	0,044
	Zoosporas x Nitrato	2	1,155	4,397	0,037
	Error	12	0,263		

Por el contrario, el efecto de la cepa identificada como *Saprolegnia* sp. fue bien distinto, detectándose una interacción significativa con la exposición a 22,6 N-NO<sub>3</sub>/l (Tabla 4.2). Tras 6 días de exposición, la mortalidad asociada a la presencia de *Saprolegnia* sp. en ausencia de nitrato era del 13,3 (± 16,0)% , mientras que con el fertilizante esta tasa subía hasta el 53,3 (± 14,4)%. Al final del experimento, las tasas de mortalidad de los individuos expuestos a 1388 zoosporas/ml de *Saprolegnia* sp. eran del 20 (± 12,0)% en ausencia de nitrato y del 67 (± 22,3)% en presencia del mismo (Fig. 4.2).



## 4.4 DISCUSIÓN

---

La presencia de concentraciones ambientalmente realistas de nitrato en el agua, por sí sola, no afectó de manera significativa a la supervivencia de los embriones de *H. arborea* y *P. perezi*. Sin embargo, la exposición al fertilizante produjo un incremento significativo de la susceptibilidad de los embriones de *P. perezi* a la letalidad causada por *Saprolegnia* sp.

Los efectos negativos de los fertilizantes nitrogenados sobre los embriones de anfibios han sido puestos de manifiesto en diferentes trabajos (p.ej. Schuytema & Nebeker, 1999; Griffis-Kyle & Ritchie, 2007). En lo que se refiere a las dos especies analizadas en el presente capítulo, Ortiz *et al.* (2004) detectaron una mortalidad superior al 80% en embriones y larvas jóvenes de *H. arborea* expuestas a 22,6 mg N/l en forma de nitrato amónico tras 8 días de exposición. En el presente estudio, si embargo, niveles similares de nitrógeno apenas causaron bajas en un 15% de los individuos en un tiempo de exposición de 7 días. La principal razón por la que los resultados del presente estudio no coinciden con los de Ortiz *et al.* (2004) habría que buscarla en la fuente de nitrato utilizada en cada caso. Estos autores emplearon nitrato amónico, un compuesto cuya principal fuente de toxicidad es el ion amonio, mientras que en los ensayos aquí descritos se ha empleado nitrato sódico. Schuytema & Nebeker (1999) demostraron en diferentes ensayos llevados a cabo con embriones de *P. regilla* y rana de uñas (*Xenopus laevis*) que las concentraciones letales medias (LC<sub>50</sub>) de nitrógeno en forma de nitrato amónico eran entre 10 y 27 veces más bajas que las LC<sub>50</sub> de nitrógeno en forma de nitrato sódico.

*Pelophylax perezi*, por el contrario, se ha mostrado una especie mucho más resistente que *H. arborea* a los fertilizantes nitrogenados según los estudios previos. Egea-Serrano *et al.* (2009) utilizando una concentración de nitrato casi cuatro veces superior a la empleada en el presente estudio (82,4 mg N/l)



observaron que la mortalidad en larvas de esta especie apenas superaba el 20% tras 21 días de exposición. Utilizando embriones de dos poblaciones diferentes, Ortiz-Santaliestra *et al.* (2010) vieron que la exposición a nitrato amónico por sí sola no generaba un incremento significativo de la mortalidad de los individuos.

Los únicos estudios que se han encontrado en la literatura que, hasta la fecha, analizan el efecto combinado de *Saprolegnia* con diferentes formas de nitrógeno inorgánico en los anfibios muestran unos resultados diferentes a los obtenidos en estos experimentos. Puglis & Boone (2007) expusieron larvas de *L. catesbeianus* a dos concentraciones de nitrato amónico (2,26 y 4,52 mg N/l) en combinación con *Saprolegnia*. Ninguno de los dos factores ni su interacción produjeron efecto alguno sobre la supervivencia larvaria. En el mismo estudio, se empleó también el insecticida carbaryl en combinación con *Saprolegnia*, no encontrándose tampoco en ese caso una interacción significativa, a pesar de que el insecticida por sí solo sí redujo la supervivencia de las larvas.

De la misma manera, Romansic *et al.* (2006) tampoco detectaron ningún efecto significativo de la exposición a dos concentraciones de nitrato (1,13 y 4.52 mg/l) y a *Saprolegnia ferax* sobre la supervivencia de las larvas de *A. gracile* y *P. regilla*, ni al actuar cada factor por separado ni cuando se combinaron ambos estresantes. En el caso de *R. aurora*, sin embargo, se observó como la exposición a *S. ferax* inducía la mortalidad de los individuos, pero únicamente en ausencia de nitrato. Cuando el fertilizante era añadido al agua, desaparecían los efectos letales del Oomycete, lo que podría estar indicando un efecto adverso del nitrato sobre el microorganismo o la inducción de una respuesta en las larvas que las haría más eficientes a la hora de evitar los daños asociados a la infección por *Saprolegnia*.

Al comparar los resultados del presente estudio con los de los otros trabajos mencionados arriba, resulta llamativo que se haya detectado un efecto



sinérgico entre nitrato y *Saprolegnia* sp. si se tiene en cuenta el estadio de desarrollo utilizado en cada caso. Mientras que en el presente estudio se han utilizado embriones, Romansic *et al.* (2006) y Puglis & Boone (2007) emplearon larvas como organismos modelos. Ortiz-Santaliestra *et al.* (2006) demostraron que los embriones de diversas especies de anfibios resultaban más resistentes al nitrato amónico que las larvas recién eclosionadas. Del mismo modo, y tal como hemos visto en el capítulo 2, los efectos letales de la exposición a *Saprolegnia* aparecen mucho más deprisa cuanto más avanzado está el desarrollo embrionario, aunque en este caso se desconoce la medida en que las infecciones por *Saprolegnia* podrían afectar a las larvas ya eclosionadas.

Se desconocen las razones por las que el nitrato podría estar incrementando la susceptibilidad a *Saprolegnia* sp. en embriones de *P. perezi*. El principal mecanismo de toxicidad del nitrato es la formación de metahemoglobina. En el intestino del animal, el nitrato es reducido a nitrito por la flora bacteriana; este nitrito es absorbido hacia el torrente sanguíneo donde transforma la hemoglobina en metahemoglobina por oxidación del ión férrico (Kross *et al.*, 1992; USEPA, 1986). La metahemoglobina es incapaz de transportar oxígeno, lo que produce una anemia funcional conocida como metahemoglobinemia. Por otra parte, la exposición a las diferentes formas de nitrógeno puede afectar a las reservas energéticas del organismo al motivar la puesta en marcha de procesos de detoxificación, tales como el ciclo de la urea (Wright & Wright, 1996), que consumen gran cantidad de energía. Es posible que el hospedador, debilitado por estos efectos directos del nitrato, pudiera ser infectado por el patógeno más fácilmente que un organismo sano. Sin embargo, lo poco que se conoce sobre los mecanismos de acción de ambos estresantes sobre los embriones no permite dilucidar la existencia de mecanismos que pudieran vincularse a ambos factores dando lugar así a la aparición de efectos sinérgicos.



Los resultados de este apartado ponen de manifiesto la importancia de conocer la medida en la que los diferentes estresantes ambientales pueden afectar a la susceptibilidad de los anfibios a las infecciones por *Saprolegnia*. Sin embargo, también es preciso considerar que los efectos de la interacción patógeno-estresante en los parámetros individuales no necesariamente se traducen en efectos a nivel de población. De hecho, se ha demostrado que en los casos en que un patógeno es específico de un hospedador, el incremento de la mortalidad del hospedador como consecuencia de la acción de un estresante externo termina por reducir el impacto de la enfermedad sobre el conjunto de la población, al desaparecer los individuos más débiles (Lafferty & Holt, 2003). Por el contrario, si el patógeno no es específico de un hospedador, tal y como ocurre en el caso de las diferentes cepas de *Saprolegnia* identificadas en el presente estudio, la acción de un estresante que genere un incremento de la mortalidad de los hospedadores terminará por magnificar el impacto de la enfermedad sobre el conjunto de la población (Lafferty & Holt, 2003).



CAPÍTULO 5

INFLUENCIA DE LA RADIACIÓN UV-B

SOBRE LA TASA DE INFECCIÓN

EMBRIONARIA POR OOMYCETES





## 5.1 INTRODUCCIÓN

---

En el capítulo anterior se ha estudiado la influencia del exceso del nitrógeno en la susceptibilidad de los embriones de las poblaciones de anfibios presentes en la zona de estudio a las infecciones por *Saprolegnia*. Los resultados de dicho capítulo muestran la importancia de considerar diferentes factores estresantes a los que los organismos se ven expuestos en la naturaleza, y que pueden hacerlos más sensibles a la infecciones.

Aparte del exceso de nitrógeno, otro de estos agentes estresantes es la radiación UV-B ( $\lambda = 280-315$  nm). La disminución de la capa de ozono como consecuencia de las actividades humanas se ha traducido en un incremento de la radiación UV-B que llega a la superficie de la Tierra (Kerr & McElroy, 1993; Madronich *et al.*, 1998; Solomon, 1999; Bancroft *et al.*, 2008). Además, otros factores tales como el calentamiento global o la acidificación de los medios acuáticos pueden contribuir al incremento de la incidencia de este tipo de radiación en los medios acuáticos (Schindler *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996).

La radiación UV-B afecta de manera negativa a numerosos organismos de agua dulce y marina (Bancroft *et al.*, 2007). En el caso de los anfibios, sus efectos han sido puestos de manifiesto para diferentes etapas del ciclo biológico de varias especies (ver revisión en Blaustein *et al.*, 1998; Marco *et al.*, 2009) e incluyen aumento de mortalidad, disminución del crecimiento, anomalías en el desarrollo, alteraciones de comportamiento y depresión del sistema inmune (Blaustein & Kiesecker, 2002). Aunque Palen & Schindler (2010), estudiando los niveles de radiación UV-B que reciben los embriones de salamandra de dedos largos (*Ambystoma macrodactylum*) y rana de las Cascades (*Rana cascadae*) en sus lugares de ovoposición en el Noroeste del Pacífico, encontraron que sólo un 1,1 % de las puestas de *A. macrodactylum* y ninguna de las puestas de *R. cascadae* se veían sometidas a niveles dañinos de radiación



## UV-B.

Por otra parte, los efectos combinados de la radiación UV-B y otros agentes estresantes han sido ampliamente estudiados en el caso de los anfibios (p.ej. Pahkala *et al.*, 2002; Blaustein *et al.*, 2003; García *et al.*, 2006; Suzuki & Inukai, 2006; Van Uitregt *et al.*, 2007; Bancroft *et al.*, 2008). En lo que se refiere a las posibles interacciones entre radiación UV-B e infecciones por *Saprolegnia*, Kiesecker & Blaustein (1995) encontraron que niveles ambientales de radiación UV-B produjeron un incremento en el porcentaje de embriones de sapo boreal (*Bufo boreas*) y *R. cascadae* afectados por el patógeno, incremento que, por el contrario, no se produjo en el porcentaje de infección de embriones de rana arborícola del Pacífico (*Pseudacris regilla*). Por otra parte, Kiesecker *et al.* (2001a) encontraron que la disminución en la profundidad de la columna de agua debida a fluctuaciones climáticas podía provocar altas tasas de mortalidad embrionaria al influenciar la exposición de los embriones a la radiación UV-B y, en consecuencia, a las infecciones por *Saprolegnia*.

En este capítulo se ha relacionado el porcentaje de infección que sufren las puestas de los anfibios en los lugares de reproducción de la zona de estudio con la intensidad de radiación UV-B que reciben. En los casos en los que se ha observado una correlación entre ambos factores, se han desarrollado experimentos de laboratorio que permitan corroborar la implicación de la radiación UV-B en el incremento de la tasa de infección.

## 5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 5.2.1 Cálculo de la atenuación de la radiación a lo largo de la columna de agua

Las propiedades ópticas de los medios acuáticos dependen en gran medida de la materia disuelta y en suspensión que hay en el agua, que van a determinar



la absorción y dispersión de la radiación solar incidente. La suma de la absorción y la dispersión de la radiación se denomina atenuación. Dicha atenuación sigue una curva exponencial a lo largo de la columna de agua, según el modelo de Lambert-Beer (Bracchini *et al.*, 2005) (ecuación 1):

$$I_{\lambda} = I_{0,\lambda} \exp(-K_{d,\lambda} (z-z_0)) \quad (1)$$

donde  $I_{0,\lambda}$  e  $I_{\lambda}$  son la irradiancia espectral a una profundidad  $z_0$  y  $z$ , respectivamente y  $K_{d,\lambda}$  es el coeficiente de atenuación de la radiación incidente a lo largo de la columna de agua. Dicho coeficiente depende de las características físicas y químicas de la columna de agua en la que se determina.

Mediante la ecuación (1) se puede calcular el coeficiente de atenuación para cada cuerpo de agua simplemente transformándola mediante logaritmos naturales

$$\ln (I_{\lambda}/I_{0,\lambda}) = -K_{d,\lambda} (z-z_0) \quad (2)$$

de esta forma el coeficiente de atenuación es:

$$-K_{d,\lambda} = \ln (I_{\lambda}/I_{0,\lambda})/(z-z_0) \quad (3)$$

conociendo la intensidad de radiación a distintas profundidades se puede calcular  $K_{d,\lambda}$  como la pendiente de la recta de regresión.

Para calcular el coeficiente de atenuación en el rango del UV-B en los distintos medios acuáticos muestreados se realizaron medidas de radiación UV-B a lo largo de la columna de agua utilizando un espectroradiómetro International Light® (Massachusetts, Estados Unidos), constituido por un lector modelo IL 1400A y un detector sumergible modelo SVL 240; para medir en el rango del UV-B se utilizó un filtro UVB-1 24228. Las medidas se realizaron en la superficie, justo por debajo de la de la línea de agua (0,02 cm) y cada cinco centímetros hasta llegar al fondo de la masa de agua y fueron repetidas quincenalmente a lo largo del periodo reproductor de las especies estudiadas.



Una vez calculado el coeficiente de atenuación para cada cuerpo de agua, es posible calcular la intensidad de radiación que recibe cada puesta ( $I_\lambda$ ) a partir de la ecuación 1, simplemente conociendo su profundidad. Para llevar a cabo este cálculo es necesario conocer la intensidad de radiación UV-B que llega a la superficie ( $I_{0,\lambda}$ ) durante los días de desarrollo de las puestas; estos valores fueron estimados, para evitar posibles errores de medición del espectrorradiómetro, mediante la opción Quick TUV Calculador del modelo "Tropospheric Ultraviolet and Visible (TUV) radiative transfer column model" proporcionado por el National Center for Atmospheric Research (NCAR) (página de acceso <http://cprm.acd.ucar.edu/Models>). Este modelo permite, conociendo las coordenadas geográficas y la altitud de una determinada localidad, calcular la intensidad de radiación incidente para cada uno de los tipos de radiación solar. Los datos proporcionados por el modelo corresponden a un día despejado ( $UV-B_0$ ), no teniendo en cuenta la presencia o ausencia de nubes en un determinado momento. Para corregir este error es necesario aplicar un factor de corrección que tenga en cuenta tanto la cantidad como el tipo de nubes.

Para calcular este factor de corrección hemos aplicado el índice propuesto por Foyo-Moreno *et al.* (2001) (4), que tiene en cuenta la existencia de diferentes tipos de nubes (bajas, medias y altas) y que es la combinación de factores de corrección individuales para cada uno de los tipos de nubes:

$$CMF = \prod_{i=1}^n CMF_i \quad (4)$$

donde  $CMF_i$  representa el factor de corrección para cada tipo de nubes. Este factor varía en función de la cantidad de nubes ( $C_i$ ) asociada a cada capa, dicha cantidad se calcula como los octavos de cielo cubiertos por cada tipo de nube. Para realizar este cálculo se divide la bóveda celeste en ocho fracciones iguales



y se estima el número de fracciones cubiertas por cada tipo de nube.

Según estos parámetros, la radiación UV-B recibida en la superficie ( $I_{0,\lambda}$ ) sería:

$$I_{0,\lambda} = \text{CMF UV-B}_0 = \text{CMF}_{\text{lm}} \text{CMF}_{\text{h}} \text{UV-B}_0 \quad (5)$$

donde  $\text{CMF}_{\text{lm}}$  es el factor de corrección para las nubes bajas y medias y  $\text{CMF}_{\text{h}}$  es el factor de corrección para las nubes altas.

El valor de dichos factores de corrección es, según el trabajo de Foyo-Moreno *et al.* (2001),

$$\text{CMF}_{\text{lm}} = 1 - b_{\text{lm}} C_{\text{lm}} (\exp a_{\text{lm}}) \text{ siendo } b_{\text{lm}} = 0,480 \text{ y } a_{\text{lm}} = 1,74$$

$$\text{CMF}_{\text{h}} = 1 - b_{\text{h}} C_{\text{h}} (\exp a_{\text{h}}) \text{ siendo } b_{\text{h}} = 0,190 \text{ y } a_{\text{h}} = 2,25$$

Así mismo,  $C_{\text{lm}}$  es la cantidad de nubes medias y bajas y  $C_{\text{h}}$  la cantidad de nubes altas. Ambos valores medidos como los octavos de cielo cubierto por cada tipo de nube.

Los octavos de cielo cubiertos por cada tipo de nube se obtuvieron de los datos proporcionados por la agencia estatal de meteorología, utilizando las mediciones realizadas a las 7:00, las 13:00 y las 18:00 horas en las fechas en las que se observaron puestas en el campo. Los datos corresponden a la estación meteorológica de Ávila. Para cada una de las puestas se calculó el factor de corrección medio para cada uno de los días del periodo comprendido entre la puesta y la eclosión. Una vez calculado el factor de corrección se calculó la intensidad de radiación UV-B incidente en la superficie simplemente modificando la intensidad correspondiente al día despejado por su factor de corrección.

Una vez corregida la radiación UV-B en superficie con el factor de corrección y calculado el coeficiente de atenuación del agua, es posible conocer la intensidad que recibe cada puesta utilizando la ecuación (1).



### ***5.2.2 Seguimiento de puestas en el campo***

Para relacionar el porcentaje de infección embrionaria con la intensidad de radiación UV-B recibida, se llevó a cabo el seguimiento de las puestas de las especies de anfibios estudiadas en las localidades seleccionadas (ver Tabla 1 en página 63). Cada puesta se siguió desde el momento de la ovoposición hasta la eclosión de los embriones, midiéndose para cada una de ellas el porcentaje de embriones que mostraban síntomas de infección por Oomycetes; como ya se ha comentado anteriormente, estos embriones son fácilmente identificables ya que aparecen cubiertos por el micelio, lo que les confiere un aspecto algodonoso. Además del porcentaje de embriones infectados se midió la profundidad de cada puesta a lo largo del desarrollo embrionario, calculada como la media de las profundidades obtenidas durante los diferentes días de seguimiento de cada puesta. Las profundidades de puesta se midieron utilizando como referencia el punto medio de la masa de huevos.

### ***5.2.3 Experimentos de exposición a la radiación UV-B***

Los experimentos de exposición a radiación UV-B en el laboratorio se llevaron a cabo con individuos de las poblaciones de sapo común (*Bufo bufo*) de Prado Pozas y sapo de espuelas (*Pelobates cultripes*) del Puerto del Tremedal, ya que, como se detalla en los resultados de este capítulo, éstas fueron las poblaciones para las que se observó en el campo una relación positiva entre la intensidad de radiación UV-B recibida y la tasa de infección de embriones. En el caso de la población de sapo corredor (*Bufo calamita*) de Peña Negra, pese a haberse obtenido también una relación significativa entre ambos parámetros, no se han llevado a cabo experimentos en el laboratorio debido a la imposibilidad de hacer crecer los cultivos de *Saprolegnia ferax* procedentes de ésta.

Para llevar a cabo los experimentos se recogieron huevos sin síntomas



de infección de puestas recién depositadas (<24h, estadio <10 según Gosner, 1960) de las dos poblaciones mencionadas. Al igual que en los capítulos anteriores los huevos fueron transportados al laboratorio y depositados en contenedores de 100 ml de capacidad rellenos con 90 ml de agua mineral. En cada contenedor se depositaron 20 huevos procedentes de cuatro puestas diferentes (4 puestas x 5 huevos). Todos los contenedores se sumergieron parcialmente en un baño con 30 litros de agua cuya temperatura se mantuvo a 14°C con un refrigerador marca Selecta 285W (J.P. Selecta SA, Abrera, Barcelona). La temperatura del agua en los contenedores experimentales se midió todos los días. Las variaciones de temperatura en los contenedores experimentales con respecto a la del agua del baño fueron menores de 1°C. El fotoperiodo se mantuvo en un ciclo de 14:10 h de luz/oscuridad.

Cada contenedor individual se asignó al azar a uno de los tratamientos: control (sin zoosporas ni UV-B), *Saprolegnia* (zoosporas sin UV-B), UV-B (UV-B sin zoosporas) o *Saprolegnia* + UV-B (zoosporas y UV-B).

La producción y exposición a las zoosporas se llevó a cabo según la metodología explicada en los capítulos anteriores. Las cepas y concentraciones experimentales utilizadas fueron 20.000 zoosporas/ml de *S. ferax* en el caso de *P. cultripes* y 5000 zoosporas/ml de *S. diclina* en el caso de *B. bufo*.

La exposición a la radiación se llevó a cabo con lámparas Philips Ultraviolet-B TL 20W/12R, que emiten luz en la radiación de onda correspondiente al UV-B. Los embriones que no habían de ser expuestos a la radiación UV-B (tratamientos control y *Saprolegnia*) también se colocaron debajo de este tipo de lámparas, pero éstas fueron cubiertas con un filtro de acetato de celulosa, que bloquea el paso del UV-B en su totalidad. Para evitar que la luz de las lámparas no cubiertas afectara a los embriones no expuestos a la radiación UV-B, ambos grupos fueron separados por una plancha opaca que impidiera el paso de la radiación. Los embriones fueron irradiados durante



quince minutos al día en el caso de *P. cultripes* y 2 horas en el caso de *B. bufo*. Estos valores fueron elegidos en función de los resultados de experimentos previos que permitieron determinar, para cada una de las especies, dosis de radiación que no causaran unos efectos letales tan altos que pudiesen enmascarar los posibles efectos sinérgicos entre los dos factores estudiados. Los contenedores se colocaron a 30 cm de las lámparas, lo que supuso una intensidad de radiación de 5,6 W/m<sup>2</sup>. Los contenedores individuales se revisaron cada día y se registró el número de individuos muertos en cada uno de ellos. Los experimentos terminaron cuando los embriones supervivientes fueron capaces de nadar o todos los embriones de alguno de los tratamientos hubieron muerto, lo que ocurrió a los cinco días de exposición para *P. cultripes* y a los nueve días para *B. bufo*. Una vez finalizado el experimento se analizaron los embriones muertos para detectar el crecimiento de *Saprolegnia*. En caso de observarse crecimiento de micelio, se procedió a su aislamiento e identificación por técnicas moleculares para comprobar que se trataba de la misma especie utilizada para la exposición.

#### **5.2.4 Análisis estadísticos**

Para analizar la relación existente entre la intensidad de radiación UV-B recibida por las puestas en el campo y el porcentaje de infección observado se realizaron análisis de regresión lineal, de manera que, en el caso de obtener valores significativos, se pudieran establecer los parámetros de la recta que determina dicha relación. Se realizaron pruebas para cada una de las especies en cada una de las localidades estudiadas. La bondad de ajuste de cada modelo se calculó mediante un contraste de hipótesis utilizando una prueba F de Snedecor cuyo estadígrafo se obtuvo a partir del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) del modelo.

Para analizar el posible efecto de interacción entre los dos factores

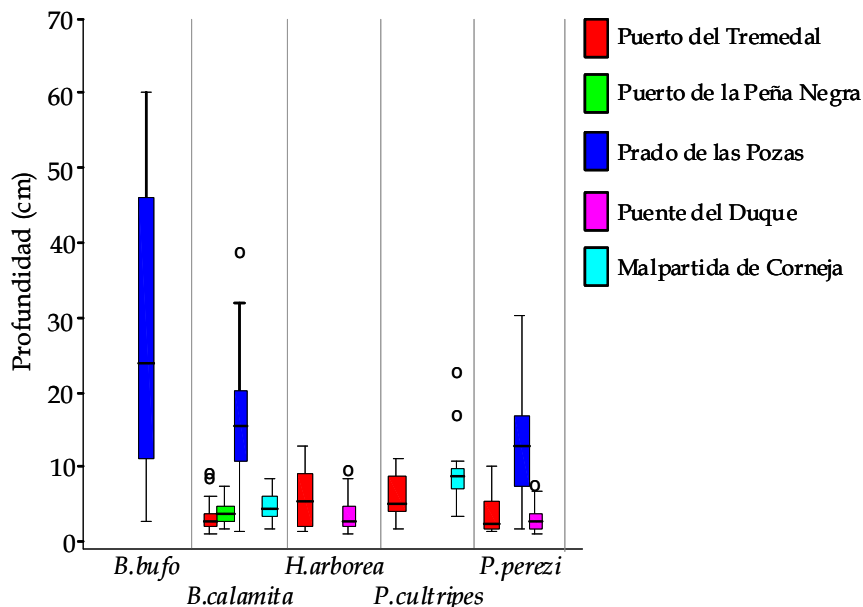




estudiados en el laboratorio, se llevaron a cabo ANOVAs de medidas repetidas con la evolución temporal de las tasas de mortalidad, transformadas mediante el arcoseno de la raíz cuadrada, como variable dependiente y la concentración de zoosporas y el UV-B como factores categóricos.

Los análisis se llevaron a cabo con el paquete estadístico del SPSS 11.5 para Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).

**Figura 5.1.** Distribución de las profundidades de las puestas de las especies de anfibios en las localidades de estudio. Las cajas representan los cuartiles, las líneas verticales los valores extremos y la línea horizontal el valor de la mediana para cada una de las especies. Los círculos representan valores atípicos



## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Datos de campo

#### *Pelobates cultripes*

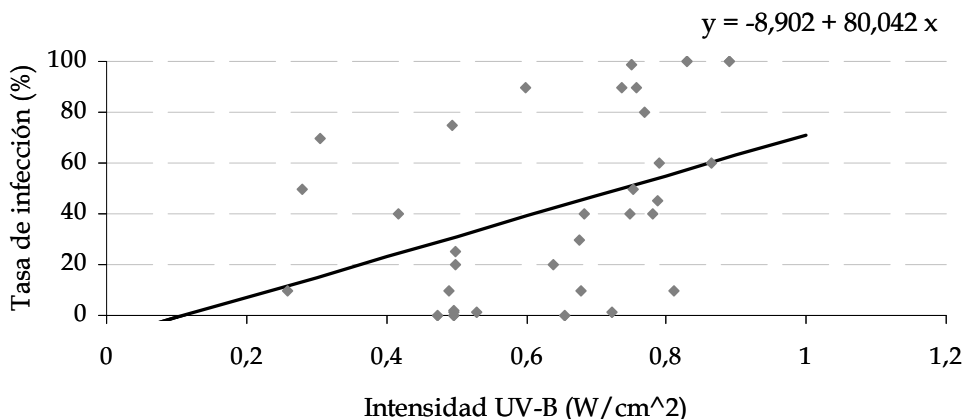
En el caso del Puerto del Tremedal las puestas estudiadas se depositaron



dentro de los 10 primeros centímetros de profundidad (Fig. 5.1), a lo largo de este rango de distribución se observó una relación significativa entre la intensidad de radiación UV-B recibida y el porcentaje de infección de las puestas ( $R^2 = 0,158$ ;  $F_{31} = 5,83$ ;  $P = 0,022$ ) (Fig. 5.2). La tasa media ( $\pm$  error estándar) de infección embrionaria observada en esta población fue del  $41,181 \pm 6,032\%$ .

En el caso de Malpartida de Corneja las puestas se distribuyeron en un rango de hasta 22 cm de profundidad (Fig. 5.1). En esta población la tasa de infección de los huevos fue muy baja, con un valor medio del  $0,316 \pm 0,110\%$ . No se observó relación alguna entre la radiación recibida y la tasa de infección.

**Figura 5.2.** Tasa de infección embrionaria de *Pelobates cultripes* en el Puerto del tremedal en función de la intensidad de radiación UV-B recibida, y ajuste de la recta de regresión entre ambos parámetros



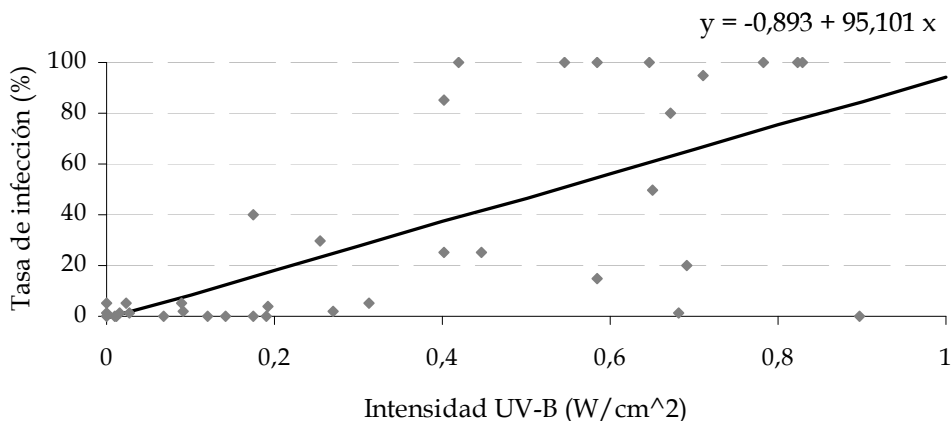
### *Bufo bufo*

Las puestas de *B. bufo* en el Prado de las Pozas aparecieron desde los 2 a los 60 cm de profundidad (Fig. 5.1). Los porcentajes de infección observados en el campo alcanzaron valores muy elevados, con una tasa media del  $32,351 \pm 6,763\%$ . En esta población, el análisis estadístico puso de manifiesto una relación significativa entre la intensidad de radiación UV-B recibida y el



porcentaje de huevos infectados ( $R^2 = 0,461$ ;  $F_{35} = 29,89$ ;  $P < 0,001$ ) (Fig. 5.3).

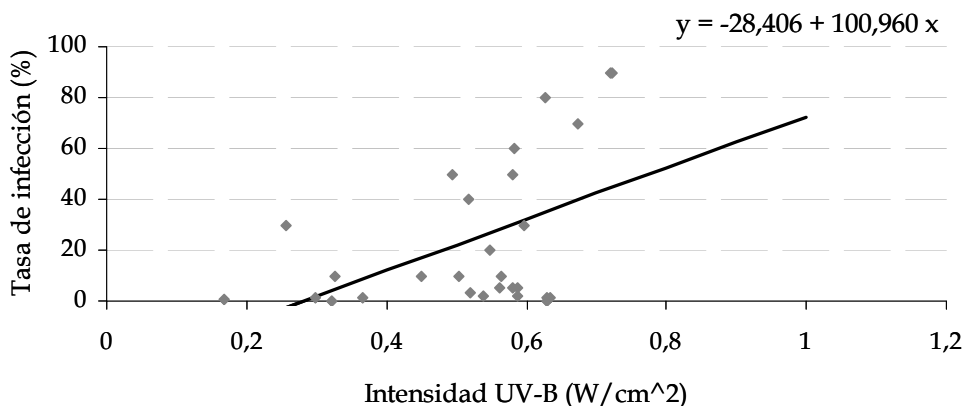
**Figura 5.3.** Tasa de infección embrionaria de *Bufo bufo* en el Prado de las Pozas en función de la intensidad de radiación UV-B recibida, y ajuste de la recta de regresión entre ambos parámetros



### *Bufo calamita*

Como es habitual en la especie, las puestas se localizaron en los primeros centímetros de la columna de agua, aunque en el Prado de las Pozas la profundidad de puesta fue algo mayor, pudiendo alcanzar en ocasiones los 30 cm (Fig. 5.1). A excepción de la población de Malpartida de Corneja, en la que

**Figura 5.4.** Tasa de infección embrionaria de *Bufo calamita* en el Puerto de la Peña Negra en función de la intensidad de radiación UV-B recibida, y ajuste de la recta de regresión entre ambos parámetros





la tasa de infección fue baja ( $2,680 \pm 2,397\%$ ), las tasas de infección alcanzaron valores elevados ( $22,984 \pm 3,126$  en el Puerto del Tremedal,  $24,161 \pm 5,640$  en el Puerto de la Peña negra y  $35,259 \pm 4,328$  en el Prado de las Pozas). Solamente en el Puerto de la Peña Negra se detectó una relación significativa entre la intensidad de radiación UV-B y el porcentaje de huevos infectados ( $R^2 = 0,225$ ;  $F_{26} = 4,54$ ;  $P = 0,011$ ) (Fig. 5.4).

### *Hyla arborea*

En las dos localidades en las que se estudió la especie las puestas se encontraron relativamente cerca de la superficie, no superando los 12 cm de profundidad (Fig. 5.1). Las tasas de infección embrionaria en ambas poblaciones fueron relativamente bajas, con valores medios del  $14,333 \pm 7,582$  en el Puerto del Tremedal y del  $3,333 \pm 1,479$  en Puente del Duque. En ninguna de las localidades se detectó una correlación entre la intensidad de radiación y la tasa de infección.

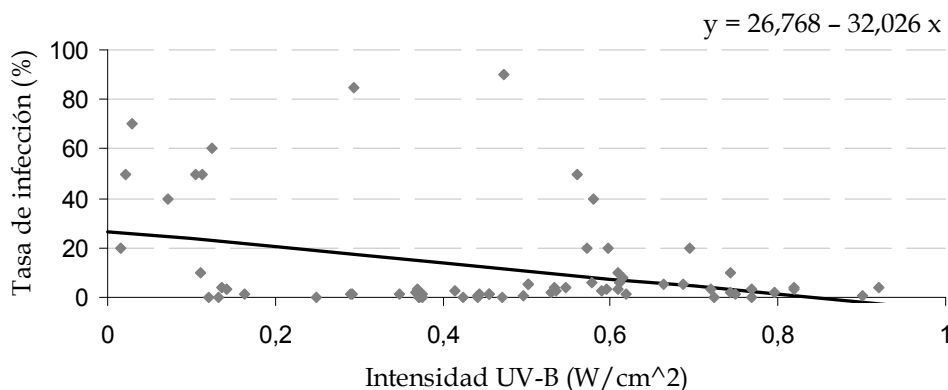
### *Pelophylax perezi*

Esta especie se estudió en tres de las localidades seleccionadas. Las puestas se distribuyeron en los primeros 10 cm de la columna de agua en el Puerto del Tremedal y el Puente del Duque, mientras que en el Prado de las Pozas alcanzaron profundidades mayores, pudiéndose llegar a encontrar hasta a 30 cm de profundidad (Fig. 5.1). Hay que señalar que solamente en la población del Prado de las Pozas se observaron porcentajes elevados de infección, con valores medios del  $11,854 \pm 2,558$ , mientras que tanto en la población del Puerto del Tremedal como en la del Puente del Duque los porcentajes de infección fueron más bajos, con valores medios del  $4,000 \pm 1,272$  y  $0,730 \pm 0,316$ , respectivamente. Sólo en la población del Prado de las Pozas se observó una relación significativa entre el porcentaje de infección embrionario y la



intensidad de radiación UV-B recibida, si bien esta es una relación inversa ya que fueron las puestas sometidas a una mayor intensidad de radiación las que sufrieron menores tasas de infección ( $R^2 = 0,126$ ;  $F_{66} = 9,53$ ;  $P = 0,003$ ) (Fig. 5.5).

**Figura 5.5.** Tasa de infección embrionaria de *Pelophylax perezii* en el Prado de las Pozas en función de la intensidad de radiación UV-B recibida, y ajuste de la recta de regresión entre ambos parámetros



### 5.3.2 Experimentos de laboratorio

Como ya se comentó en la metodología, los experimentos de laboratorio se llevaron a cabo con *P. cultripis* y *B. bufo*.

En el caso de *P. cultripis* el ANOVA de medidas repetidas corroboró la interacción entre los dos factores estudiados (Tabla 5.1). Dicha interacción se observó tras tan solo 2 días de exposición, cuando la mortalidad de los embriones expuestos a cualquiera de los dos estresantes por sí solos era nula, mientras que la de los embriones expuestos a la combinación entre UV-B y *Saprolegnia* fue del 75% ( $F_{1,8} = 12,250$ ;  $P = 0,008$ ). A los cinco días de exposición, la mortalidad de los embriones expuestos tanto a UV-B como a *Saprolegnia* fue del 96,7%, mientras que en el caso de los embriones expuestos sólo a *Saprolegnia* la mortalidad fue del 21,7%. En el caso de los embriones control y los expuestos sólo a UV-B la mortalidad fue inferior al 4% (Fig. 5.6).

La interacción entre ambos factores también se observó en el caso de *B.*



**Tabla 5.1.** Resultados de los análisis de la varianza de medidas repetidas para analizar el efecto de interacción entre *Saprolegnia* y radiación UV-B en la tasa de mortalidad de los embriones de *Pelobates cultripipes* sometidos a 20.000 zoosporas/ml de *S. ferax* y 15 minutos diarios de radiación UV-B y de *Bufo bufo* sometidos a 5000 zoosporas/ml de *S. diclina* y 2 horas diarias de radiación UV-B

Especie	Fuente de variación	gl	Media cuadrática	F	P
<i>P. cultripipes</i>	UV	1	3,660	32,622	<0,001
	Zoosporas	1	5,336	47,564	<0,001
	UV x Zoosporas	1	3,335	29,725	0,001
	Error	8	0,112		
<i>B. bufo</i>	UV	1	0,999	146,522	< 0,001
	Zoosporas	1	1,538	225,541	< 0,001
	UV x Zoosporas	1	0,076	11,186	0,010
	Error	8	0,055		

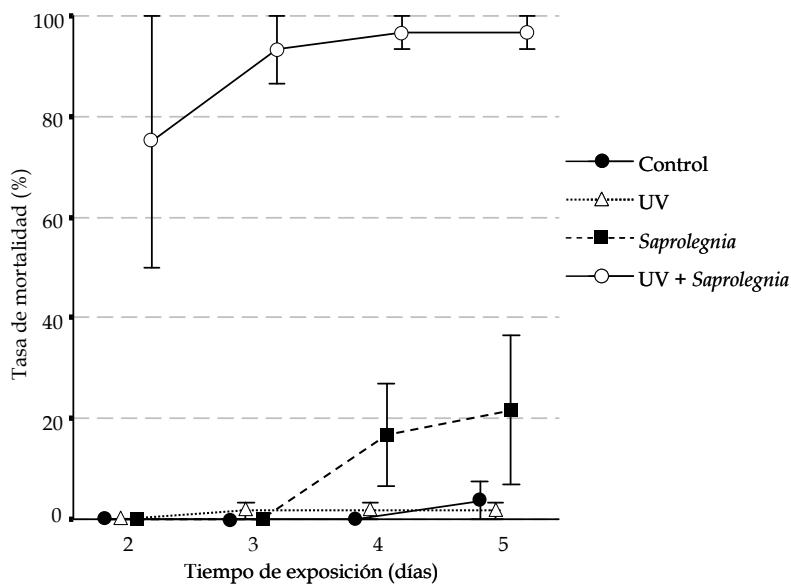
*bufo* al finalizar los nueve días de exposición (Tabla 5.1). La mortalidad de los embriones de esta especie sometidos a los dos factores fue del 96,3% a los siete días de exposición, mientras que la de los embriones expuestos sólo a *Saprolegnia* fue del 22,2% y los sometidos sólo a UV-B fue del 24,1% para el mismo periodo de tiempo, pese a lo cual el efecto de la interacción en ese momento del experimento no fue significativo, aunque se puede considerar bastante indicativo ( $F_{1,8} = 5,056$ ;  $P = 0,055$ ). En el caso de los controles no se detectó ningún caso de mortalidad (Fig. 5.7).

Para ambas especies, a partir de los embriones expuestos al patógeno se obtuvieron aislamientos de *Saprolegnia*, *S. ferax* en el caso de *P. cultripipes* y *S. diclina* en el caso de *B. bufo*. Dichos aislamientos no se obtuvieron en ningún

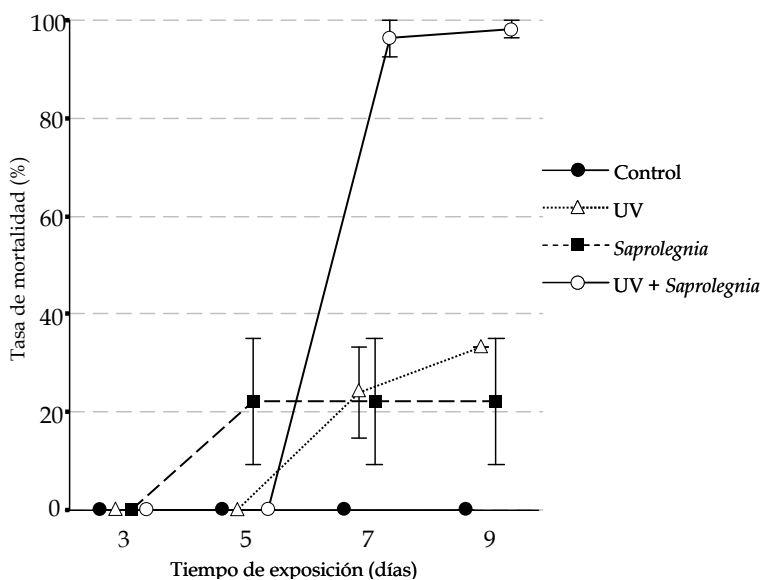


caso a partir de los embriones control.

**Figura 5.6.** Tasas de mortalidad medias ( $\pm$  ES) de los embriones de *Pelobates cultripes* del Puerto del Tremedal expuestos a 20.000 zoosporas/ml de *Saprolegnia ferax* y a 15 minutos diarios de radiación UV-B a una intensidad de 5,6 W/m<sup>2</sup>



**Figura 5.7.** Tasas de mortalidad medias ( $\pm$  ES) de los embriones de *Bufo bufo* del Prado de las Pozas expuestos a 5000 zoosporas/ml de *Saprolegnia diclina* y a 2 horas diarias de radiación UV-B a una intensidad de 5,6 W/m<sup>2</sup>





## 5.4 DISCUSIÓN

---

Los datos de infección de puestas en el campo, en combinación con la determinación de las especies de Oomycetes aisladas a partir de los huevos infectados (ver capítulo 1), sugieren que no existe una relación directa entre la presencia de determinadas cepas de *Saprolegnia* y el riesgo de infección embrionaria en el campo. El caso más significativo sería el de *B. calamita*, para este anfibio se aislaron dos especies de *Saprolegnia*: *S. diclina* en el Puerto del Tremedal y el Prado de las Pozas y *S. ferax* en el Puerto de Peña Negra y Malpartida de Corneja. Sin embargo, con excepción de la población de Malpartida de Corneja en la que las tasas de infección embrionaria fueron muy bajas (2,680%), los porcentajes medios de infección son muy similares en todas las poblaciones (22,984% en el Puerto del Tremedal, 24,161% en el Puerto de la Peña Negra y 35,259% en el Prado de las Pozas).

Los porcentajes de infección embrionaria en el campo alcanzaron valores bastante elevados en los casos de *P. cultripes*, *B. bufo* y *B. calamita*, siendo muy frecuentes las puestas en las que se observó un porcentaje de embriones infectados superior al 50%. Solamente las poblaciones de Malpartida de Corneja sufrieron bajas tasas de infección, pese a que en el caso de *B. calamita* se aisló *S. ferax*, que en los experimentos de laboratorio produjo una disminución significativa de la supervivencia embrionaria de esta población (33,3% de los individuos expuestos a *S. ferax* frente al 100% de los individuos control, ver capítulo 1). Por el contrario, en las dos poblaciones estudiadas de *Hyla arborea*, la tasa de infección de embriones fue relativamente baja.

La tasa de infección de huevos en las poblaciones de *P. perezi* estudiadas fue bastante baja. Así, en el Puerto del Tremedal, donde solo se obtuvieron aislamientos de *S. diclina*, el porcentaje de infección de huevos fue





del 4%, mientras que en el Prado de las Pozas, donde además de *S. diclina* se aisló *Saprolegnia* sp., dicho porcentaje fue del 12%. Estas bajas tasas de infección coinciden con los resultados de los ensayos de virulencia llevados a cabo con las cepas de *Saprolegnia* aisladas a partir huevos de *P. perezi*, en los que no se detectaron efectos letales significativos de la adición de zoosporas sobre los embriones de esta especie (ver capítulo 1).

El comportamiento de puesta de las especies estudiadas puede tener relación con los porcentajes de infección observados en el campo. Las tres primeras especies depositan largas cadenas de huevos, concentrándose muchas veces un gran número de puestas en el mismo lugar, lo que podría facilitar la colonización de los huevos por parte del patógeno. Por el contrario, *H. arborea* y *P. perezi* depositan grupos de unos pocos huevos normalmente aislados unos de otros, lo que podría actuar como barrera para la colonización de los embriones.

Kiesecker & Blaustein (1997) observaron resultados similares en varias localidades de Oregón (Estados Unidos) para tres especies de anfibios con comportamientos de puesta diferentes. Los embriones de *B. boreas*, especie que deposita sus huevos comunalmente, sufrieron tasas de infección iguales o superiores al 50% en todas las localidades muestreadas. Por el contrario, las tasas de infección de los embriones de *P. regilla*, que nunca deposita sus huevos comunalmente, no superaron el 6% en ninguna de las localidades. La tercera especie objeto de estudio fue *R. cascadae*, los porcentajes de infección de sus puestas variaron en función de que se encontraran dispuestas comunalmente o de manera aislada. En el primero de los casos se observaron porcentajes de infección de al menos el 40% de los embriones, mientras que en el segundo caso los porcentajes de infección no superaron el 15%. Además estos autores llevaron a cabo experimentos de manipulación de distancia de las puestas a las masas comunales para *B. boreas* y *R. cascadae*, observándose como el aumento



de esta distancia disminuía el porcentaje de huevos infectados.

En lo que se refiere a la interacción con la radiación UV-B, en tres de las poblaciones estudiadas se observó en el campo una interacción positiva entre la intensidad de radiación UV-B recibida y la tasa de infección embrionaria. Estas poblaciones son: *P. cultripes* del Puerto del Tremedal, *B. bufo* del Prado de las Pozas y *B. calamita* del Puerto de la Peña Negra. Dichos resultados fueron corroborados en el caso de *P. cultripes* y *B. bufo*, mediante los experimentos de laboratorio. En el caso de *B. calamita* del Puerto de la Peña Negra no se han llevado a cabo experimentos de laboratorio debido a la imposibilidad de hacer crecer los cultivos de la cepa de *S. ferax* aislada en esta población para la producción de zoosporas (ver Tabla 1.2 en página 85).

Hay que destacar el caso de la población de *P. perezi* del Prado de las Pozas. Para esta población se observó una interacción negativa entre ambas variables, lo que supone que fueron las cepas expuestas a una mayor intensidad de radiación las que sufrieron una menor tasa de infección. Este hecho podría estar relacionado con la temperatura, ya que las puestas que recibieron una mayor intensidad de radiación se corresponden con las más tardías en el periodo reproductor y, por lo tanto, estuvieron sometidas a temperaturas del agua más elevadas. Esto favorece un rápido desarrollo de los embriones, disminuyendo el tiempo de exposición al patógeno.

Para el resto de las poblaciones estudiadas no se observó una interacción entre ambos factores. Estas diferencias entre especies en la sensibilidad al efecto combinado de la radiación UV-B y la mortalidad causada por *Saprolegnia* ya fueron apuntadas por Kiesecker & Blaustein (1995), quienes demostraron la existencia de una interacción entre ambos factores en embriones de *R. cascadae* y *B. boreas* pero no en los de *P. regilla*, si bien las tres especies fueron sensibles a las infecciones por el patógeno. La ausencia de interacción en *P. regilla* podría estar relacionada con una mayor tolerancia de



esta especie a la radiación UV-B. Tanto los embriones de *R. cascadae* como los de *B. boreas* sufrieron incrementos de mortalidad cuando se expusieron a intensidades ambientales de radiación UV-B, mientras que las tasas de mortalidad embrionaria de *P. regilla* no se vieron afectadas por este tipo de radiación (Blaustein *et al.*, 1994a).

En lo que se refiere a las especies en estudio, sólo se tienen datos de sensibilidad a niveles de radiación UV-B ambientales para cuatro de ellas (todas menos *P. cultripes*). Langhelle *et al.* (1999) expusieron en el laboratorio embriones de *H. arborea* a intensidades de radiación UV-B equivalentes a los niveles naturales que se detectan en verano en Suecia, lugar de procedencia de los embriones, no observándose efectos de la radiación sobre la supervivencia embrionaria. Esta ausencia de sensibilidad de *H. arborea* a la radiación UV-B estaría en concordancia con la hipótesis de que la tolerancia al UV-B sería la razón por la cual no existe relación entre la intensidad de radiación recibida por los embriones y su tasa de infección en el campo.

Los datos disponibles para *P. perezi* corresponden al trabajo de Macías *et al.* (2007) y se refieren al periodo embrionario y larvario en conjunto, lo que dificulta la comparación con los resultados de este trabajo. El estudio fue llevado a cabo al aire libre en dos localidades, el Parque Nacional de Doñana (Huelva) y el Prado de las Pozas (Sierra de Gredos, Ávila). En este caso la mortalidad fue del 100% de los individuos expuestos a la radiación UV-B en ambas localidades, mientras que la mortalidad de los controles fue del 19% en la población del Parque Nacional de Doñana y del 15% en la población del Prado de las Pozas. Desafortunadamente, los autores no aportan datos sobre la tasa de mortalidad correspondiente únicamente al periodo embrionario. No obstante, los individuos fueron ubicados en contenedores sumergidos a una profundidad de agua de 5 cm, mientras que en el presente trabajo se ha observado que, en el Prado de las Pozas, la profundidad media de las puestas



de *P. perezi* es de 12,5 cm, y que sólo el 20% de las puestas aparece en los primeros 5 cm. Esto supone que los individuos utilizados por Macías *et al.* (2007) recibieron dosis de radiación UV-B superiores a las que habitualmente reciben en condiciones naturales, por lo que la elevada tasa de mortalidad descrita en ese trabajo es seguramente una sobreestimación de los efectos del UV-B en embriones y larvas de *P. perezi* en el Prado de las Pozas.

Lizana & Pedraza (1998) analizaron, mediante experimentos *in situ*, los efectos de la radiación UV-B ambiental en embriones de *B. bufo* y *B. calamita* del Prado de las Pozas. Estos autores observaron que los embriones de *B. bufo* expuestos a la radiación UV-B sufrieron una tasa de mortalidad del 84%, mientras que, para los que estaban protegidos de la radiación, dicha tasa fue de tan solo el 20%. En el caso de *B. calamita*, no se encontraron efectos de la radiación UV-B sobre la mortalidad embrionaria, que varió entre el 13 y el 40% independientemente del tratamiento de UV-B recibido. Estas diferencias en la sensibilidad a la radiación UV-B podrían explicar los resultados obtenidos para las dos especies en esta localidad. Para *B. bufo*, especie sensible a la radiación UV-B, se ha observado un claro efecto de interacción entre los dos factores estudiados. Por el contrario, para *B. calamita*, especie resistente a la radiación UV-B no se ha encontrado tal relación. De los resultados obtenidos por Lizana & Pedraza (1998) destacan las altas tasas de mortalidad sufridas por los embriones de *B. bufo* expuestos a la radiación UV-B (84%), estos resultados pueden explicarse nuevamente en función de la profundidad de las puestas. Estos autores hablan de una profundidad de 15 cm en ambos experimentos. Sin embargo, en el caso de *B. bufo* únicamente el 37% de las puestas aparecieron en los 15 cm superiores de la columna de agua. Estas puestas van a ser, lógicamente, las que reciban una mayor intensidad de radiación UV-B y, como se ha visto, este hecho está directamente relacionado con la aparición de tasas muy elevadas de infección.



A diferencia de lo que sucedió con la población del Prado de las Pozas, en la población de *B. calamita* del Puerto de la Peña Negra sí se ha observado una interacción positiva entre la intensidad de UV-B recibida y la tasa de infección de huevos. Tales diferencias podrían estar relacionadas con la especie de *Saprolegnia* aislada en cada una de las poblaciones, en el caso del Puerto del Tremedal y del Prado de las Pozas se aisló *S. diclina*, mientras que en el caso del Puerto de la Peña Negra se aisló *S. ferax*. Sin embargo, para otras poblaciones, como *B. bufo* del Prado de las Pozas o *P. cultripes* del Puerto del Tremedal, en las que se ha aislado *S. diclina* sí se ha observado una interacción entre los dos factores estudiados.

La existencia o no de una relación entre ambos factores va a depender en gran medida, además de la sensibilidad de las especies y poblaciones a cada uno de los estresantes, de la exposición a un rango de radiación UV-B lo suficientemente amplio como para que se puedan detectar variaciones. Por ejemplo, la única población de *B. calamita* para la que se encontró una relación directa entre la intensidad de radiación UV-B recibida y la tasa de infección de huevos fue la del Puerto de la Peña Negra. En el Puerto del Tremedal y el Prado de las Pozas, la intensidad de radiación UV-B que recibieron las puestas de *B. calamita* se encontraba comprendida en un estrecho margen (0,6-0,9 W/cm<sup>2</sup> en el Puerto del Tremedal y 0,1-0,4 W/cm<sup>2</sup> en el Prado de las Pozas). Por el contrario, en el Puerto de la Peña Negra la intensidad de radiación UV-B que recibieron las puestas de la especie mostró un espectro mucho más amplio (entre 0,2 y 0,8 W/cm<sup>2</sup>). En el caso de *P. cultripes* del Puerto del Tremedal y de *B. Bufo* del prado de las pozas, las otras dos poblaciones en las que se observó una interacción entre los dos factores estudiados, las intensidades registradas también mostraron una amplia variación, con rangos de 0,3-0,9 y 0-0,9 W/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Así, en las poblaciones de *B. calamita* del Puerto del Tremedal y del Prado de las Pozas, donde se ha registrado una mortalidad considerable



como consecuencia de la infección por Oomycetes, el hecho de no haberse detectado una relación de dicha mortalidad con la radiación UV-B no significaría que ésta no pudiera estar facilitando las infecciones, sino que los efectos podrían no ser detectados al estar sometidas todas las puestas a niveles similares de radiación.

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto como, al menos para determinadas especies, la exposición a niveles ambientales de radiación UV-B favorecen las infecciones por Oomycetes en la naturaleza. Como ya se ha comentado en la introducción, dichos niveles de radiación han aumentado en los últimos años como consecuencia de la disminución de la capa de ozono. Pero además existen otros factores, relacionados con el cambio climático, que pueden aumentar la exposición de los organismos acuáticos a dosis biológicamente efectivas de radiación UV-B, pudiendo actuar de manera sinérgica con la disminución de la capa de ozono (Schindler *et al.*, 1996). En este sentido, Kiesecker *et al.* (2001a) encontraron que el porcentaje de mortalidad de embriones de *B. boreas* asociado con infecciones por *S. ferax* a lo largo de los años estaba relacionado con la profundidad a la que se desarrollaban los embriones. Dicha profundidad está directamente relacionada con la precipitación caída durante el invierno, que a su vez está inversamente relacionada con los fenómenos de El Niño. De esta manera el incremento en la frecuencia y magnitud de los fenómenos de El Niño debidos al calentamiento global pueden aumentar la incidencia y severidad de los brotes de Saprolegniosis al disminuir la profundidad de la columna de agua en la cual se desarrollan los embriones y, por tanto, aumentar la dosis de radiación UV-B que reciben.

Otro de los fenómenos que pueden estar influenciando las dosis de radiación UV-B que reciben los embriones en el campo, sobre todo en zonas de alta montaña, es la acidificación de los medios acuáticos, que reduce la materia



orgánica en suspensión y en consecuencia la capacidad de filtrado de la radiación UV-B a lo largo de la columna de agua (Schindler *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996).

Debido a que la supervivencia de los anfibios está estrechamente relacionada con la existencia de medios acuáticos, los cambios ambientales que afectan a la hidrología o a la calidad del agua, incluyendo la capacidad de absorción de la columna de agua, junto con la disminución de la capa de ozono pueden estar contribuyendo a episodios de mortalidad que, a la larga, pueden conducir al declive de las poblaciones.





## *DISCUSIÓN GENERAL*



En este trabajo se han determinado, mediante técnicas moleculares, las especies del orden Saprolegniales que crecen sobre los huevos de anfibios anuros que se reproducen en cinco localidades situadas en la Sierra de Gredos (Ávila).

La precisa identificación de las especies de *Saprolegnia* que crecen sobre los anfibios en diferentes áreas geográficas así como el estudio de su virulencia son necesarios para entender sus mecanismos de acción y para detectar diferencias de virulencia o casos de especificidad patógeno-hospedador con las especies de anfibios a las que infectan en diferentes ambientes.

De las especies de *Saprolegnia* identificadas en este estudio *S. diclina* parece ser la especie más abundante, ya que la mayor parte de los aislamientos se agrupan en el clado III, correspondiente a *S. diclina* s. str. (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007). Además, esta especie es capaz de colonizar huevos de todas las especies de anfibios estudiadas. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Petrisko *et al.* (2008) para aislamientos procedentes de huevos de anfibios en el noroeste de los Estados Unidos.

La especie *S. ferax* parece estar relacionada con especies de anfibios (*Pelobates cultripes* y *Bufo calamita*) que depositan largas cadenas con varios miles de huevos, generalmente cerca de la superficie. Además, estas especies a menudo depositan los huevos comunalmente, encontrándose numerosas puestas muy próximas entre sí, y concentradas en una zona concreta de la charca. Por el contrario, las especies de *Saprolegnia* identificadas como *Saprolegnia* sp. han sido aisladas de especies de anfibios que depositan pequeñas masas de huevos, a menudo sujetas a la vegetación acuática, tales como *Hyla arborea* y *Pelophylax perezi*.

En cuanto al estudio de virulencia, todas las especies de *Saprolegnia* aisladas se han comportado como patógenas de huevos de anfibios. Todas las especies de anfibios sufrieron un incremento significativo en la tasa de mortalidad embrionaria cuando se expusieron a zoosporas de las especies de



*Saprolegnia* aisladas a partir de ellas, con excepción de *P. perezii*.

La virulencia de *S. diclina* sobre embriones de anfibios parece haber sido descrita hasta el momento sólo en las poblaciones de estudio en la Sierra de Gredos. Aunque parte de los resultados para *B. calamita* ya han sido publicados (Fernández-Benítez *et al.*, 2008) el número de especies de anfibios afectadas por esta especie de *Saprolegnia* sería mayor, ya que la adición de zoosporas incrementó significativamente la mortalidad de embriones de *Bufo bufo*, *P. cultripipes* e *H. arborea*.

Al contrario que *S. diclina*, *S. ferax* ya había sido previamente relacionada con casos de mortalidad de anfibios en Estados Unidos (Blaustein *et al.*, 1994b). Con este trabajo se ha probado la virulencia de esta especie sobre anfibios europeos ya que la exposición a zoosporas de *S. ferax* aumentó significativamente la mortalidad de embriones de *B. calamita* y *P. cultripipes*.

Hay que destacar la virulencia de la cepa de *Saprolegnia* sp. aislada a partir de huevos de *H. arborea* en el Puerto del Tremedal. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia de realizar estudios de identificación y virulencia de las especies de *Saprolegnia*, ya que especies no identificadas de este género pueden estar relacionadas con casos de mortalidad de anfibios en diferentes zonas del planeta.

Los datos de infección de puestas en el campo, en combinación con la determinación de las especies de Oomycetes aisladas a partir de los huevos infectados, sugieren que no existe una relación directa entre la presencia de determinadas cepas de *Saprolegnia* y el riesgo de infección embrionaria en el campo. El caso más significativo sería el de *B. calamita*, para este anfibio se aislaron dos especies de *Saprolegnia*: *S. diclina* en el Puerto del Tremedal y el Prado de las Pozas y *S. ferax* en el Puerto de Peña Negra y Malpartida de Corneja. Sin embargo, con excepción de la población de Malpartida de Corneja en la que las tasas de infección embrionaria fueron muy bajas (2,68%), los



porcentajes medios de infección son muy similares en todas las poblaciones (22,98% en el Puerto del Tremedal, 24,16% en el Puerto de la Peña Negra y 35,26% en el Prado de las Pozas).

El comportamiento de puesta de las especies estudiadas puede tener relación con los porcentajes de infección observados en el campo. *P. cultripes*, *B. bufo* y *B. calamita* depositan largas cadenas de huevos, concentrándose muchas veces un gran número de puestas en el mismo lugar, lo que podría facilitar la colonización de los huevos por parte del patógeno. Para estas especies fueron muy frecuentes las puestas en las que se observó un porcentaje de embriones infectados superior al 50%. Por el contrario, *H. arborea* y *P. perezii* depositan grupos de unos pocos huevos normalmente aislados unos de otros, lo que podría actuar como barrera para la colonización de los embriones por *Saprolegnia*.

Kiesecker & Blaustein (1997) observaron resultados similares en varias localidades de Oregón (Estados Unidos) para tres especies de anfibios con comportamientos de puesta diferentes, demostrando una clara relación entre el carácter comunal de las puestas y la sensibilidad de los embriones a la infección por *Saprolegnia*.

Se ha visto que la susceptibilidad de los embriones a la infección por *Saprolegnia* varía claramente en función tanto de la especie como del estadio de desarrollo del hospedador, siendo los embriones más sensibles cuanto más avanzado era su estadio de desarrollo.

Los resultados de estos experimentos están en la misma línea que los de Kiesecker & Blaustein (1999), quienes detectaron una diferencia interespecífica en la sensibilidad de los embriones de rana arborícola del Pacífico (*Pseudacris regilla*) y rana de las Cascades (*Rana cascadae*) a las infecciones por *Saprolegnia* en el noroeste de los Estados Unidos. En el caso de *R. cascadae*, la tasa media de supervivencia en el momento de la eclosión se vio reducida en un 60% en



presencia de *Saprolegnia*. Por el contrario, las tasas medias de eclosión de los embriones de *P. regilla* estuvieron próximas al 100% independientemente de que dichos embriones hubiesen estado expuestos o no a *Saprolegnia*.

El desarrollo de las defensas antimicrobianas podría constituir una importante fuente de variación interespecífica en la tolerancia embrionaria a *Saprolegnia*. Desafortunadamente, apenas se conoce nada acerca de la composición de dichas defensas en embriones de anfibios. La barrera antimicrobiana más evidente que protege a los embriones es la envuelta gelatinosa. Las propiedades físicas y químicas de dicha envuelta son diferentes entre especies (Altig & McDiarmid, 2007), lo cual puede constituir una evidente fuente de variabilidad interespecífica en la sensibilidad de los embriones a la infección por *Saprolegnia*.

También se ha descrito que los embriones de algunas especies de anfibios están protegidos por anticuerpos transferidos desde el organismo materno (Poorten & Kuhn, 2009), pero se desconoce si esta característica es común a todas las especies.

Los patógenos pueden actuar como especies clave (Power *et al.*, 1996) al disminuir el desarrollo de los competidores dominantes, y por tanto permitir la coexistencia de especies competitivamente inferiores, tal y como observaron Kiesecker & Blaustein (1999), quienes describieron cómo la presencia de *Saprolegnia* revertía los efectos competitivos de *R. cascadae* sobre la masa, la supervivencia y el tiempo de metamorfosis de *P. regilla*. Aunque en este caso no se ha llevado a cabo un estudio para determinar cómo puede influir esta diferencia en las relaciones interespecíficas, es muy probable que éstas se puedan ver afectadas, sobre todo teniendo en cuenta que las dos especies de anfibios estudiadas (*B. calamita* y *P. cultripes*) comparten el medio y la época de reproducción en la localidad estudiada.

En cuanto a las diferencias observadas en la susceptibilidad a las



infecciones por *Saprolegnia* a lo largo del desarrollo embrionario, éstas podrían estar causadas por cambios en la envuelta gelatinosa que rodea al embrión. Esta matriz gelatinosa podría actuar como una barrera que protege a los embriones del patógeno durante los primeros estadios, cuando la capa de gelatina es especialmente gruesa. A medida que el embrión se desarrolla, esta cobertura se hace más delgada (Yamasaki *et al.*, 1990), lo que facilitaría el contacto físico con el patógeno. Gomez-Mestre *et al.* (2006) encontraron que los huevos de salamandra moteada (*Ambystoma maculatum*) con sus capas de gelatina intactas eran resistentes a la infección por mohos acuáticos pertenecientes a los géneros *Saprolegnia* y *Achlya*, mientras que los huevos a los que se les eliminó la cubierta gelatinosa sufrieron altas tasas de mortalidad. De esta manera, la mayor susceptibilidad a *Saprolegnia* de los estadios embrionarios más tardíos podría ser atribuida, al menos en parte, a la mayor protección conferida por la capa de gelatina durante los primeros estadios de desarrollo, cuando dicha capa es especialmente gruesa.

Las diferencias de susceptibilidad a *Saprolegnia* entre estadios de desarrollo pueden ser importantes para entender los efectos causados por el patógeno cuando actúa junto a otros estresantes que también muestran efectos de diferente magnitud en función del estadio de desarrollo del individuo, tales como la radiación UV-B o los contaminantes (Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2006).

En relación con los contaminantes, se ha observado que la mortalidad de los embriones de *P. perezi* aumentó de manera significativa cuando fueron expuestos conjuntamente a 1388 zoosporas/ml de *Saprolegnia* sp. y 22,6 mg N-NO<sub>3</sub>/l. Este efecto sinérgico contrasta con los resultados obtenidos en otros estudios; así, Puglis & Boone (2007) no encontraron efectos de interacción entre nitrato amónico y *Saprolegnia* sobre las larvas de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) mientras que Romansic *et al.* (2006) encontraron un efecto antagónico entre nitrato y *Saprolegnia* sobre la supervivencia de las larvas de



rana patirroja septentrional (*Rana aurora*). Los resultados obtenidos en el ensayo con *P. perezii* son llamativos ya que, a diferencia de los dos estudios citados, fue llevado a cabo con embriones, que suelen ser más resistentes al nitrato amónico que las larvas recién eclosionadas (Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2006).

En cuanto a la intensidad de la radiación UV-B que reciben las puestas, en algunas poblaciones se ha revelado como un cofactor fundamental a la hora de explicar la incidencia de las infecciones en el campo. En tres de las poblaciones estudiadas se observó *in situ* una interacción positiva entre la intensidad de radiación UV-B recibida y la tasa de infección embrionaria, interacción que fue corroborada experimentalmente para las dos poblaciones para las que se analizó dicha interacción.

Al igual que en el presente estudio, Kiesecker & Blaustein (1995) demostraron la existencia de una interacción entre ambos factores en embriones de *R. cascadae* y sapo boreal (*Bufo boreas*). Por el contrario, esta interacción no se detectó para los embriones de *P. regilla*, si bien éstos fueron sensibles a las infecciones por el patógeno. Estas diferencias entre especies en la sensibilidad al efecto combinado de la radiación UV-B y la mortalidad causada por *Saprolegnia* coinciden también con nuestros resultados.

Evidentemente, una mayor tolerancia de los organismos a cualquiera de los dos estresantes podría motivar la ausencia de efectos sinérgicos. Así, una revisión de la literatura sobre los efectos de la radiación UV-B en las especies objeto de estudio revela que los embriones de *H. arborea* y *B. calamita* serían más resistentes a dicho impacto mientras que los de *B. bufo* serían más sensibles (Lizana & Pedraza, 1998; Langhelle *et al.*, 1999). En el caso de *P. perezii*, el estudio que evalúa la sensibilidad de sus individuos al UV-B (Macías *et al.*, 2007) no permite extraer conclusiones relativas al periodo embrionario, mientras que para *P. cultripipes* no conocemos datos publicados. Nuestros





resultados sobre la interacción UV-B-Oomycetes coinciden con lo publicado sobre el impacto de la radiación UV-B en el caso de *H. arborea* y *B. bufo*.

El aumento de los niveles de ambientales de radiación UV-B como consecuencia de la disminución de la capa de ozono favorece las infecciones por *Saprolegnia* en algunas poblaciones de anfibios. Kiesecker *et al.* (2001a) encontraron que el porcentaje de mortalidad de embriones de *B. boreas* asociado con infecciones por *S. ferax* a lo largo de los años estaba relacionado con la profundidad a la que se desarrollaban los embriones. Dicha profundidad va a determinar, lógicamente, la intensidad de radiación UV-B que reciben los embriones. Sin embargo, los factores que determinan la profundidad de la puesta (y en consecuencia la intensidad de radiación recibida) parecen depender de factores climáticos que influyen en el régimen anual de precipitaciones y, en consecuencia, en el volumen de agua disponible para las puestas. En el caso de la zona de estudio de Kiesecker *et al.* (2001a), el régimen de precipitaciones está influenciado por fenómenos de El Niño. De esta manera, el incremento en la frecuencia y magnitud de dichos fenómenos como consecuencia del calentamiento global puede aumentar la incidencia y severidad de las infecciones por *Saprolegnia* al disminuir la profundidad de la columna de agua en la cual se desarrollan los embriones y, por tanto, aumentar la dosis de radiación UV-B que reciben.

Las enfermedades emergentes se han convertido en un problema de gran importancia en la conservación de los anfibios a nivel mundial. Según los últimos datos publicados por la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza, alrededor de 500 especies de anfibios estarían amenazadas de declive o extinción como consecuencia del impacto de diferentes patógenos. El caso más llamativo, el de la quitridiomycosis, ha afectado a poblaciones de más de 200 especies en todo el planeta (ver revisiones en Daszak *et al.*, 2003 y Kilpatrick *et al.*, 2010). Enfermedades de origen vírico han causado también



mortalidades masivas de individuos de diferentes especies y regiones geográficas (Cunningham *et al.*, 1996; Jancovich *et al.*, 1997, 2001; Bollinger *et al.*, 1999).

La magnitud real del efecto de las infecciones por *Saprolegnia* sobre las poblaciones en las que aparecen dichas infecciones es desconocida. A diferencia de otras enfermedades emergentes como las citadas arriba, que actúan sobre fases adultas, las infecciones por *Saprolegnia* afectan sobre todo a las fases acuáticas, y fundamentalmente a los embriones. Esto hace muy complicado establecer con precisión el impacto que estas infecciones pueden causar sobre la estructura y dinámica de las poblaciones. No obstante, a lo largo del presente trabajo, el primero que se lleva a cabo en España sobre este tema, se han observado puestas completamente infectadas por *Saprolegnia*, lo que conduce a pensar en un potencial efecto severo sobre las poblaciones.

Mediante este estudio se han identificado las especies de Saprolegniales que infectan a los embriones de anfibios en sus hábitats naturales, se ha determinado la virulencia de las especies de *Saprolegnia* aisladas y se han investigado posibles fuentes de variación en la severidad de dichas infecciones. Además, se ha establecido, para algunas poblaciones, el papel de la radiación UV-B como cofactor en las infecciones. Estudios futuros deben encaminarse a analizar las consecuencias de estas infecciones, cuya dinámica y magnitud se han determinado, sobre la supervivencia de las poblaciones de anfibios en la Sierra de Gredos.

## CONCLUSIONES



1ª) Los aislamientos de Saprolegniales obtenidos en la zona de estudio se agrupan dentro de cinco clados del árbol filogenético.

2ª) *Saprolegnia diclina* es la especie más abundante en la zona de estudio, siendo capaz además de colonizar huevos de todas las especies de anfibios estudiadas.

3ª) *Saprolegnia ferax* parece estar relacionada con especies de anfibios que depositan largas cadenas de miles de huevos, frecuentemente de forma comunal, como *Pelobates cultripes* y *Bufo calamita*. Por el contrario, *Saprolegnia* sp. parece estar relacionada con las especies de anfibios que depositan pequeñas masas de huevos a menudo sujetas a la vegetación acuática, como *Hyla arborea* y *Pelophylax perezi*.

4ª) Todas las especies de *Saprolegnia* aisladas se comportaron como patógenas de huevos de anfibios. Además, todas las especies de anfibios, a excepción de *P. perezi*, sufrieron un incremento significativo de la tasa de mortalidad embrionaria cuando fueron expuestas a zoosporas de las especies de *Saprolegnia* aisladas a partir de ellas.

5ª) Se ha puesto de manifiesto una relación dosis-efecto, tanto en el tiempo de aparición de los síntomas de la infección como en la tasa de mortalidad final de los embriones de *B. calamita* expuestos a distintas concentraciones de *S. diclina*.

6ª) El estadio de desarrollo embrionario juega un papel fundamental en la susceptibilidad de *P. cultripes* y *B. calamita* a las infecciones por *Saprolegnia*. Los individuos expuestos en estadios de desarrollo más tardíos (Gosner 15 y 19) sufrieron mayores tasas de mortalidad tras 72 horas de exposición que los expuestos en estadio 12 de Gosner. Las diferencias observadas en la



susceptibilidad a *Saprolegnia* en función del estadio de desarrollo podrían estar causadas por cambios en la envuelta de gelatina que rodea a los embriones.

7ª) Embriones de *B. calamita* y *P. cultripes* procedentes de la misma localidad presentan diferencias en su susceptibilidad a *S. ferax*. Tales diferencias podrían ser debidas a características propias de los hospedadores que los harían en cada caso más o menos susceptibles, y/o a características propias del patógeno, que mostraría una especificidad hacia un hospedador concreto. Estas diferencias podrían influir en las relaciones ecológicas entre especies simpátricas de anfibios.

8ª) La adición de nitrato a concentraciones ambientalmente relevantes aumentó significativamente la mortalidad de los embriones de *P. perezi* expuestos a zoosporas de *Saprolegnia* sp.

9ª) No se ha detectado una relación entre la presencia de determinadas cepas de *Saprolegnia* y el riesgo de infección embrionaria en el campo.

10ª) Los porcentajes de infección embrionaria en el campo alcanzan valores bastante elevados en los casos de *P. cultripes*, *Bufo bufo* y *B. calamita*. Dichos porcentajes podrían estar relacionados con el comportamiento de puesta de estas especies, que facilitaría la colonización de los embriones por parte del patógeno.

11ª) Existe una relación directa entre la tasa de infección de embriones en el campo y la intensidad de radiación UV-B recibida por las puestas de las poblaciones de *P. cultripes* del Puerto del Tremedal, *B. bufo* del Prado de las Pozas y *B. calamita* del Puerto de la Peña Negra.



12<sup>a</sup>) El papel de la radiación UV-B como cofactor en la infección por *Saprolegnia* se confirma al detectarse experimentalmente una interacción en los efectos letales de ambos estresantes sobre los embriones de las poblaciones mencionadas.

13<sup>a</sup>) Existe una relación inversa entre la tasa de infección de embriones en el campo y la intensidad de radiación UV-B recibida por las puestas de la población de *P. perezi* del Prado de las Pozas. Las puestas que recibieron una mayor intensidad de radiación UV-B fueron las más tardías en el periodo reproductor, y por tanto las que estarían sometidas a temperaturas del agua más elevadas, lo que favorecería un rápido desarrollo de los embriones, disminuyendo el tiempo de exposición al patógeno.

14<sup>a</sup>) El rango de intensidad de radiación UV-B recibida por el conjunto de las puestas puede ser determinante en la detección de la relación entre este factor y la tasa de infección embrionaria, dado que en las poblaciones en las que se observó dicha relación el rango de UV-B registrado fue más amplio que en las que no se detectó relación alguna. En consecuencia, la ausencia de relación no necesariamente significaría que ésta no exista, sino que los efectos podrían no ser detectados al estar sometidas todas las puestas a niveles similares de radiación UV-B.

15<sup>a</sup>) Los primeros datos sobre el efecto de la saprolegniosis en anfibios ibéricos demuestran la importancia de llevar a cabo estudios que permitan la determinación y el estudio de la virulencia de las especies de *Saprolegnia* en particular, y de Oomycetes en general, que puedan estar implicados en casos de mortalidad de anfibios. Este tipo de estudios, desarrollados a escalas temporales adecuadas y sobre las diferentes fases del ciclo biológico, son



importantes para conocer el verdadero alcance que la saprolegniosis puede estar teniendo sobre las poblaciones de anfibios y relacionar su incidencia con posibles casos de declive.



## REFERENCIAS



- Alford, R. A. & Richards, S. J. 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30: 133-165.
- Alford, R. A., Bradfield, K. S. & Richards, S. J. 2007. Global warming and amphibian losses. *Nature* 447: E3-E4.
- Altig, R. & McDiarmid, R. W. 2007. Morphological diversity and evolution of egg and clutch structure in amphibians. *Herpetological Monographs* 21: 1-32.
- Arano, B., Llorente, G. A., García-París, M. & Herrero, P. 1995. Species translocation menaces iberian waterfrogs. *Conservation Biology* 9: 196-198.
- Bancroft, B. A., Baker, N. J. & Blaustein, A. R. 2007. The effects of UV-B radiation in marine and freshwater organisms: a synthesis through meta-analysis. *Ecology Letters* 10: 332-345.
- Bancroft, B. A., Baker, N. J. & Blaustein, A. R. 2008. A meta-analysis of the effects of ultraviolet B radiation and its synergistic interactions with pH, contaminants, and disease on amphibian survival. *Conservation Biology* 22: 987-996.
- Banks, B. & Beebee, T. J. C. 1988. Reproductive success of natterjack toads *Bufo calamita* in two contrasting habitats. *Journal of Animal Ecology* 57: 472-492.
- Barbadillo, L. J., Lacomba, J. I., Pérez-Mellado, V., Sancho, V. & López-Jurado, L. F. 1999. *Anfibios y Reptiles de la Península Ibérica, Baleares y Canarias*. Geoplaneta, Barcelona.
- Beattie, R. C., Aston, R. J. & Milner, A. G. P. 1991. A field study of fertilization and embryonic development in the common frog *Rana temporaria* with particular reference to acidity and temperature. *Journal of Applied Ecology* 28: 346-357.



- Beebee, T. J. C., Flower, R. J., Stevenson, A. C., Patrick, S. T., Appleby, P. G., Fletcher, C., Marsh, C., Natkanski, J., Rippey, B. & Battarbee, R. W. 1990. Decline of the natterjack toad *Bufo calamita* in Britain: palaeoecological, documentary and experimental evidence for breeding site acidification. *Biological Conservation* 53: 1-20.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., Slocombe, R., Ragan, M. A., Hyatt, A. D., McDonald, K. R., Hines, H. B., Lips, K. R., Marantelli, G. & Parkes, H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 9031-9036.
- Bishop, C. A., Mahony, N. A., Struger, J., Ng, P. & Pettit, K. E. 1999. Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in the Holland River watershed, Ontario, Canada (1990-1992). *Environmental Monitoring and Assessment* 57: 21-43.
- Blaustein, A. R. & Kiesecker, J. M. 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters* 5: 597-608.
- Blaustein, A. R. & Wake, D. B. 1990. Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trends in Ecology and Evolution* 5: 203-204.
- Blaustein, A. R., Hoffman, P. D., Hokit, D. G., Kiesecker, J. M., Walls, S. C. & Hays, J. B. 1994a. UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: a link to population declines? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 1791-1795.
- Blaustein, A. R., Hokit, D. G. & O'Hara, R. K. 1994b. Pathogenic fungus



- contributes to amphibian losses in the Pacific Northwest. *Biological Conservation* 67.
- Blaustein, A. R., Kiesecker, J. M., Chivers, D. P., Hokit, D. G., Marco, A., Belden, L. K. & Hatch, A. C. 1998. Effects of ultraviolet radiation on amphibians: field experiments. *American Zoologist* 38: 799-812.
- Blaustein, A. R., Romansic, J. M., Kiesecker, J. M. & Hatch, A. C. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* 9: 123-140.
- Bollinger, T. K., Mao, J., Schock, D., Brigham, R. M. & Chinchar, V. G. 1999. Pathology, isolation and preliminary molecular characterization of a novel iridovirus from tiger salamanders in Saskatchewan. *Journal of Wildlife Diseases* 35: 413-429.
- Bosch, J. & Rincón, P. A. 2008. Chytridiomycosis-mediated expansion of *Bufo bufo* in a montane area of Central Spain: an indirect effect of the disease. *Diversity and Distributions* 14: 637-643.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I. & García-París, 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: 331-337.
- Bosch, J., Carrascal, L. M., Durán, L., Walker, S. & Fisher, M. C. 2007. Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: 253-260.
- Bracchini, L., Cózar, A., Dattilo, A. M., Picchi, M. P., Arena, C., Mazzuoli, S. &



- Loiselle, S. A. 2005. Modelling the components of the vertical attenuation of ultraviolet radiation in a wetland lake ecosystem. *Ecological Modelling* 186: 43-54.
- Bradford, D. F., Graber, D. M. & Tabatabai, F. 1994. Population declines of the native frogs, *Rana muscosa*, in Sequoia and Kings Canyon National Parks, California. *The Southwestern Naturalist* 39: 323-327.
- Bragg, A. N. 1962. *Saprolegnia* on tadpoles again in Oklahoma. *The Southwestern Naturalist* 7: 79-80.
- Bragg, A. N. & Bragg, W. N. 1958. Parasitism of spadefoot tadpoles by *Saprolegnia*. *Herpetologica* 14: 34.
- Broomhall, S. D., Osborne, W. S. & Cunningham, R. B. 2000. Comparative effects of ambient ultraviolet-B radiation on two sympatric species of Australian frogs. *Conservation Biology* 14: 420-427.
- Brown, A. F. & Pascoe, D. 1989. Parasitism and host sensitivity to cadmium: an acanthocephalan infection of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Journal of Applied Ecology* 26: 473-488.
- Carey, C., Cohen, N. & Rollins-Smith, L. 1999. Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 459-472.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C. & Goodday, G. W. 2001. *The Fungi*. Academic Press, Londres.
- Casado, S. & Montes, C. 1995. *Guía de los Lagos y Humedales de España*. J.M. Reyero, Madrid.



- Catalán, J., Camarero, L., Gacía, E., Ballesteros, E. & Felip, M. 1994. Nitrogen in the Pyrenean lakes (Spain). *Hydrobiologia* 274: 17-27.
- Cerenius, L. & Söderhäll, K. 1985. Repeated zoospore emergence as a possible adaptation to parasitism in *Aphanomyces*. *Experimental Mycology* 9: 259-263.
- Cisneros-Heredia, D. F., Delia, J., Yáñez-Muñoz, M. H. & Ortega-Andrade, H. M. 2009. Endemic ecuadorian glassfrog *Cochranella mache* is critically endangered because of habitat loss. *Oryx* 44: 114-117.
- Collins, J. P. 2010. Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to learn. *Diseases of Aquatic Organisms* 92: 93-99.
- Collins, J. P. & Storfer, A. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 8: 89-98.
- Collins, J. P., Brunner, J. L., Jancovich, J. K. & Schock, D. M. 2004. A model host-pathogens system for studying infectious disease dynamics in amphibians: tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*) and *Ambystoma tigrinum* virus. *Herpetological Journal* 14: 195-200.
- Cooke, A. S. 1985. The deposition and fate of spawn clumps of the common frog *Rana temporaria* at a site in Cambridgeshire 1971-1983. *Biological Conservation* 32: 165-187.
- Corn, P. S. 2000. Amphibian decline: review of some current hypotheses. In Sparling, D. W., Linder, G. & Bishop, C. A. (Eds) *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. SETAC Press, Pensacola, Florida, pp. 663-696.
- Crews, T. E. & Peoples, M. B. 2004. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoff and human needs. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 102: 279-297.



- Cuéllar, L. & Coll, M. 1983. Epizootiology of the crayfish plague (Aphanomycosis) in Spain. *Freshwater Crayfish* 5: 545-547.
- Cunningham, A. A., Langton, T. E. S., Bennett, P. M., Lewin, J. F., Drury, S. E. N., Gough, R. E. & Macgregor, S. K. 1996. Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 351: 1529-1557.
- Czeczuga, B., Muszynska, E. & Krzeminska, A. 1998. Aquatic fungi growing on the spawn of certain amphibians. *Amphibia-Reptilia* 19: 239-251.
- Daszak, P., Cunningham, A. A. & Hyatt, A. D. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* 9: 141-150.
- Daszak, P., Strieby, A., Cunningham, A. A., Longcore, J. E., Brown, C. C. & Porter, D. 2004. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetological Journal* 14: 201-207.
- Davidson, C. 2004. Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecological Applications* 14: 1892-1902.
- Davidson, C., Shaffer, H. B. & Jennings, M. R. 2002. Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, ultraviolet-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. *Conservation Biology* 16: 1588-1601.
- Densmore, C. L. & Green, D. V. 2007. Diseases of amphibians. *ILAR Journal* 48: 235-254.
- Dick, M. W., Vick, M. C., Gibbings, J. G., Hedderson, T. A. & López Lastra, C. C. 1999. 18S rDNA for species of *Leptolegnia* and other
- 200





- Peronosporomycetes: justification for the subclass taxa Saprolegniomycetidae and Peronosporomycetidae and division of the Saprolegniaceae *sensu lato* into the Leptolegniaceae and Saprolegniaceae. *Mycological Research* 103: 1119-1125.
- Diego-Rasilla, F. J. & Ortiz-Santaliestra, M. E. 2009. *Naturaleza en Castilla y León. Los Anfibios*. Caja de Burgos, Burgos.
- Diéguez-Uribeondo, J. 2006. The dispersion of the *Aphanomyces astaci*-carrier *Pacifastacus leniusculus* by humans represents the main cause of disappearance of the indigenous crayfish *Austropotamobius pallipes* in Navarra. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 380-381: 1303-1312.
- Diéguez-Uribeondo, J., Cerenius, L. & Söderhäll, K. 1994. Repeated zoospore emergence in *Saprolegnia parasitica*. *Mycological Research* 98: 810-815.
- Diéguez-Uribeondo, J., Rueda, A., Castián, E. & Bascones, J. C. 1997a. A plan of restoration in Navarra for the native freshwater crayfish species of Spain, *Austropotamobius pallipes*. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 347: 625-637.
- Diéguez-Uribeondo, J., Temiño, C. & Muzquiz, J. C. 1997b. The crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* in Spain. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 347: 753-763.
- Diéguez-Uribeondo, J., Fregeneda-Grandes, J. M., Cerenius, L., Pérez-Iniesta, E., Aller-Gancedo, J. M., Tellería, M. T., Söderhäll, K. & Martín, M. P. 2007. Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina*-*S. parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. *Fungal Genetics and Biology* 44: 585-601.



- Diéguez-Uribeondo, J., García, M. A., Cerenius, L., Kozubikova, E., Ballesteros, I., Windels, C., Weiland, J., Kator, H., Söderhäll, K. & Martín, M. P. 2009. Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology* 46: 365-376.
- Dobson, A. P. & May, R. M. 1986. Diseases and conservation. In Soulé, M. E. (Ed) *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts pp. 345-365.
- Dodd, C. K. & Smith, L. L. 2003. Habitat destruction and alteration: historical trends and future prospects for amphibians. In Semlitsch, R. D. (Ed) *Amphibian Conservation*. Smithsonian Institution, Washington, DC, pp. 94-112.
- Du Pasquier, L., Schwager, J. & Flanjnik, M. F. 1989. The immune system of *Xenopus*. *Annual Reviews of Immunology* 7: 251-275.
- Egea-Serrano, A. 2009. Rana común - *Pelophylax perezi*. In Salvador, A. & Martínez-Solano, I. (Eds) *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, <http://www.vertebradosibericos.org/>.
- Egea-Serrano, A., Tejedo, M. & Torralva, M. 2009. Populational divergence in the impact of three nitrogenous compounds and their combination on larvae of the frog *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885). *Chemosphere* 76: 869-877.
- Eigenbrod, F., Hecnar, S. J. & Fahrig, L. 2008. The relative effects of road traffic and forest cover on anuran populations. *Biological Conservation* 141: 35-46.
- Ensabella, F., Loriga, S., Formichetti, P., Isotti, R. & Sorace, A. 2003. Breeding



- site selection of *Bufo viridis* in the city of Rome (Italy). *Amphibia-Reptilia* 24: 396-400.
- Espeland, H. & Hansen, P. E. 2004. *Prevention of Saprolegnia on Rainbow Trout Eggs*. BSc Thesis, University of the Faroe Islands, Føroyar, Faroe Islands.
- EU [European Union]. 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities* 05/12/98: L330-32-L330/54.
- Fagotti, A., Morosi, L., Di Rosa, I., Clarioni, R., Simoncelli, F., Pascolini, R., Pellegrino, R., Guex, G. D. & Hotz, H. 2005. Bioaccumulation of organochlorine pesticides in frogs of the *Rana esculenta* complex in central Italy. *Amphibia-Reptilia* 26: 93-104.
- Fahrig, L., Pedlar, J. H., Pope, S. E., Taylor, P. D. & Wegner, J. F. 1995. Effect of road traffic on amphibian density. *Biological Conservation* 73: 177-182.
- FAO [Food and Agricultural Organization], 2005. *FAO Statistical Databases*. <http://faostat.fao.org/>. Acceso el 19 de Diciembre de 2009.
- Feliu, J. A. & Rituerto, A. 1994. *Crónicas de Gredos*. Caja de Salamanca y Soria, Salamanca.
- Fernández-Benítez, M. J., Ortiz-Santaliestra, M. E., Lizana, M. & Diéguez-Uribeondo, J. 2008. *Saprolegnia diclina*: another species responsible for the emergent disease 'Saprolegnia infections' in amphibians. *FEMS Microbiology Letters* 279: 23-29.
- Foyo-Moreno, I., Alados, I., Olmo, F. J., Vida, J. & Alados-Arboledas, L. 2001. On the use of a cloud modification factor for solar UV (290-385 nm) spectral range. *Theoretical and Applied Climatology* 68: 41-50.



- Freda, J. & McDonald, D. G. 1990. Effects of aluminum on the leopard frog, *Rana pipiens*: life stage comparisons and aluminum uptake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47: 210-216.
- Galán, P. 1997a. Declive de poblaciones de anfibios en dos embalses de La Coruña (noroeste de España) por introducción de especies exóticas. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 8: 38-40.
- Galán, P. 1997b. Presencia de poblaciones asilvestradas de visón americano (*Mustela vison* Schreber 1777) en La Coruña (NO de España). *Galemys* 9: 35-37.
- García T.S., Romansic, J. M. & Blaustein, A. R. 2006. Survival of three species of anuran metamorphs exposed to UV-B radiation and the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 163-169.
- García-París, M., Montori, A. & Herrero, P. 2004. *Amphibia, Lissamphibia*. In Ramos M. A. (Coord) *Fauna Ibérica*, Vol. 24. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- García Rodríguez, A. 1988. *Memoria del Mapa de Suelos de Castilla y León*. Junta de Castilla y León, Valladolid.
- Gavilán-García, R. 1999. Bioclimatología de las Sierras de Gredos. In Corrales Bermejo, L. (Coord) *Recursos Naturales de las Sierras de Gredos*. Institución Gran Duque de Alba. Diputación de Ávila, Ávila, pp. 53-59.
- Gil-Martín, J. 1999. Los suelos de las Sierras de Gredos. In Corrales Bermejo, L. (Coord) *Recursos Naturales de las Sierras de Gredos*. Institución Gran Duque de Alba. Diputación de Ávila, Ávila, pp. 43-51.



- Gómez-Mestre, I. 2009. Sapo corredor - *Epidalea calamita*. In Salvador, A. & Martínez-Solano, I. (Eds) *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, <http://www.vertebradosibericos.org/>.
- Gomez-Mestre, I., Touchon, J. C. & Warkentin, K. M. 2006. Amphibian embryo and parental defenses and a larval predator reduce egg mortality from water mold. *Ecology* 87: 2570-2581.
- Gomez-Mestre, I., Touchon, J. C., Saccoccio, V. M. & Warkentin, K. M. 2008. Genetic variation in pathogen-induced early hatching of toad embryos. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 791-800.
- Gorham, E. & Janssens, J. A. 1992. Concepts of fen and bog re-examined in relation to bryophyte cover and the acidity of surface waters. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 61: 7-20.
- Gosá, A. 2002. *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840. Rana ágil. In Pleguezuelos, J. M., Márquez, R. & Lizana, M. (Eds) *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza - Asociación Herpetológica Española, Madrid, pp. 120-122.
- Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
- Green, B. R. & Dick, M. W. 1972. DNA base composition and the taxonomy of the Oomycetes. *Canadian Journal of Microbiology* 18: 963-968.
- Griffis-Kyle, K. L. & Ritchie, M. E. 2007. Amphibian survival, growth and development in response to mineral nitrogen exposure and predator cues in the field: an experimental approach. *Oecologia* 152: 633-642.



- Griffiths, R. A. & Halliday, T. R. 2004. Global amphibian declines: is current research meeting conservation needs? *Herpetological Journal* 14: 165-166.
- Grosholz, E. D. 1992. Interactions of intraspecific, interspecific, and apparent competition with host-pathogen population dynamics. *Ecology* 73: 507-514.
- Guth, D. J., Blankespoor, H. D. & Cairns, J., Jr. 1977. Potentiation of zinc stress caused by parasitic infection of snails. *Hydrobiologia* 55: 225-229.
- Häder, D. P. & Worrest, R. C. 1997. Consequences of the effects of increased solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. In Häder, D. P. (Ed) *Environmental Intelligence Unit. The Effects of Ozone Depletion on Aquatic Ecosystems*. Academic Press - R.G. Landes Company, Austin, Texas, pp. 11-30.
- Häkkinen, J., Pasanen, S. & Kukkonen, J. V. K. 2001. The effects of solar UV-B radiation on embryonic mortality and development in three boreal anurans (*Rana temporaria*, *Rana arvalis* and *Bufo bufo*). *Chemosphere* 44: 441-446.
- Hamdoun, A. & Epel, D. 2007. Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 1745-1750.
- Hatai, K. & Hoshiai, G. 1992. Mass mortality in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* coker. *Journal of Wildlife Diseases* 28: 532-536.
- Hem, J. D. 2005. *Study and Interpretation of the Chemical Characteristics of Natural Water*. University Press of the Pacific, Honolulu, Hawaii.
- Hird, D. W., Diesch, S. L., McKinnell, R. G., Gorham, E., Martin, F. B., Kurtz, S.



- W. & Dubrovlny, C. 1981. *Aeromonas hydrophila* in wild-caught frogs and tadpoles (*Rana pipiens*) in Minnesota. *Laboratory Animal Science* 31: 166-169.
- Holt, R. D. & Lawton, J. H. 1994. The ecological consequences of shared natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25: 495-520.
- Houlahan, J. E. & Findlay, C. S. 2003. The effects of adjacent land use on wetland amphibian species richness and community composition. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60: 1078-194.
- Houlahan, J. E., Findlay, C. S., Schmidt, B. R., Meyer, A. H. & Kuzmin, S. L. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404: 752-755.
- Hudson, H. J. 1986. *Fungal Biology (Contemporary Biology)*. Hodder Arnold H&S, Londres.
- Hudson, P. & Greenman, J. 1998. Competition mediated by parasites: biological and theoretical progress. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 387-390.
- Hussein, M. M. A., Hatai, K. & Nomura, T. 2001. Saprolegniosis in salmonids and their eggs in Japan. *Journal of Wildlife Diseases* 37: 204-207.
- IUCN [International Union for Conservation of Nature]. 2010. *The IUCN Red List of Threatened Species*. 2010.4. <http://www.iucnredlist.org/about/publications-links>. Acceso el 20 de Febrero de 2010.
- Jancovich, J. K., Davidson, E. W., Morado, J. F. , Jacobs, B. L. & Collins, J. P. 1997. Isolation of a lethal virus from the endangered tiger salamander



- Ambystoma tigrinum stebbinsi*. *Diseases of Aquatic Organisms* 31: 161-167.
- Jancovich, J. K., Davidson, E. W., Seiler, A., Jacobs, B. L. & Collins, J. P. 2001. Transmission of the *Ambystoma tigrinum* virus to alternative hosts. *Diseases of Aquatic Organisms* 46: 159-163.
- Johnson, P. T. J. 2006. Amphibian diversity: decimation by disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 3011-3012.
- Johnson, T. W. Jr., Seymour, R. L. & Padgett, D. E. 2002a. *Biology and Systematics of the Saprolegniaceae*. <http://dl.uncw.edu/digilib/biology/fungi/taxonomy%20and%20systematics/padgett%20book>. Acceso el 15 de Marzo de 2010.
- Johnson, P. T. J., Lunde, K. B., Thurman, E. M., Ritchie, E. G., Wray, S. N., Sutherland, D. R., Kapfer, J. M., Frest, T. J., Bowerman, J. & Blaustein, A. R. 2002b. Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. *Ecological Monographs* 72: 151-168.
- Johnson, P. T. J., Chase, J. M., Dosch, K. L., Hartson, R. B., Gross, J. A., Larson, D. J., Sutherland, D. R. & Carpenter, S. R. 2007. Aquatic eutrophication promotes pathogenic infection in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.
- Johnson, J. E., Belmont, S. F. & Wagner, R. S. 2008. DNA barcoding as a mean to identify organisms associated with amphibian eggs. *Herpetological Conservation and Biology* 3: 116-127.
- Johnson, P. T. J., Townsend, A. R., Cleveland, C. C., Gilbert, P. M., Howarth, R. W., McKenzie, V. J., Rejmankova, E. & Ward, M. H. 2010. Linking





- environmental nutrient enrichment and disease emergence in humans and wildlife. *Ecological Applications* 20: 16-29.
- Karraker, N. E. & Ruthig, G. R. 2009. Effect of road deicing salt on the susceptibility of amphibian embryos to infection by water molds. *Environmental Research* 109: 40-45.
- Kats, L. B. & Ferrer, R. P. 2003. Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. *Diversity and Distributions* 9: 99-110.
- Kaufman, M. R., Ikeda, Y., Patton, C., van Dykhuizen, G. & Epel, D. 1998. Bacterial symbionts colonize the accessory nidamental gland of the squid *Loligo opalescens* via horizontal transmission. *Biological Bulletin* 194: 36-43.
- Kerr, J. B. & McElroy, T. C. 1993. Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. *Science* 262: 1032-1034.
- Kiesecker, J. M. 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 9900-9904.
- Kiesecker, J. M. & Blaustein, A. R. 1995. Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 11049-11052.
- Kiesecker, J. M. & Blaustein, A. R. 1997. Influences of egg laying behaviour on pathogenic infection of amphibian eggs. *Conservation Biology* 11: 214-220.
- Kiesecker, J. M. & Blaustein, A. R. 1999. Pathogen reverses competition between larval amphibians. *Ecology* 80: 2442-2448.



- Kiesecker, J. M. & Skelly, D. K. 2001. Effects of disease and pond drying on gray tree frog growth, development, and survival. *Ecology* 82:1956-1963.
- Kiesecker, J. M., Blaustein, A. R. & Belden, L. K. 2001a. Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410: 681-683.
- Kiesecker, J. M., Blaustein, A. R. & Miller, C. L. 2001b. Transfer of a pathogen from fish to amphibians. *Conservation Biology* 15: 1064-1070.
- Kilpatrick, A. M., Briggs, C. J. & Daszak, P. 2010. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians . *Trends in Ecology and Evolution* 25: 109-118.
- Koprivnikar, J., Forbes, M. R. & Baker, R. L. 2008. Larval amphibian growth and development under varying density: are parasitized individuals poor competitors? *Oecologia* 155: 641-649.
- Kross, B. C., Ayebo, A. D. & Fuortes, L. J. 1992. Methemoglobinemia: nitrate toxicity in rural America. *American Family Physician* 46: 183-188.
- Lafferty, K. D. & Holt R. D. 2003. How should environmental stress affect the population dynamics of disease? *Ecology Letters* 6: 654-664.
- Lamour, K. & Kamoun, S. 2008. *Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tools*. Wiley-Blackwell, Hoboken, Nueva Jersey.
- Langhelle, A., Lindell, M. J. & Nystrom, P. 1999. Effects of ultraviolet radiation on amphibian embryonic and larval development. *Journal of Herpetology* 33: 449-456.
- Lategan, M. J., Torpy, F. R. & Gibson, L. F. 2004. Biocontrol of saprolegniosis in silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) by *Aeromonas media* strain A199.



- Aquaculture* 235: 77-88.
- Leaky, R. E. & Lewin, R. 1997. *La Sexta Extinción. El Futuro de la Vida y la Humanidad*. Tusquets, Barcelona.
- Leclerc, M. C., Guillot, J. & Deville, M. 2000. Taxonomic and phylogenetic analysis of Saprolegniaceae (Oomycetes) inferred from LSU rDNA and ITS sequence comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek* 77: 369-377.
- Lehtinen, R. M., Galatowitsch, S. M. & Tester, J. R. 1999. Consequences of habitat loss and fragmentation for wetland amphibian assemblages. *Wetlands* 19: 1-12.
- LeNoir, J. S., McConnell, L. L., Fellers, G. M., Cahill, T. M. & Seiber, J. N. 1999. Summertime transport of current-use pesticides from California's Central Valley to the Sierra Nevada mountain range, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 2715-2722.
- Linder, G. & Grillitsch, B. 2000. Ecotoxicology of metals. In Sparling, D. W., Linder, G. & Bishop, C. A. (Eds) *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. SETAC Press, Pensacola, Florida, pp. 325-459.
- Lizana, M. & Ciudad, M. J. 1999. Herpetofauna. In Corrales Bermejo, L. (Coord) *Recursos Naturales de las Sierras de Gredos*. Institución Gran Duque de Alba. Diputación de Ávila, Ávila, pp. 201-222.
- Lizana, M. & Pedraza, E. M. 1998. The effects of UV-B radiation on toad mortality in mountainous areas of Central Spain. *Conservation Biology* 12: 703-707.
- Lizana, M., Ciudad, M. J. & Pérez-Mellado, V. 1988. Distribución altitudinal de la herpetofauna en el macizo central de la Sierra de Gredos. *Revista*



*Española de Herpetología* 3: 55-67.

- Lizana, M., Ciudad, M. J., Gil, M., Guerrero, F., Pérez-Mellado, V. & Martín-Sánchez, R. 1991. Nuevos datos sobre la distribución de la herpetofauna en el Macizo Central de la Sierra de Gredos. *Revista Española de Herpetología* 6: 61-80.
- Macías, G., Marco, A. & Blaustein, A. R. 2007. Combined exposure to ambient UVB radiation and nitrite negatively affects survival of amphibian early life stages. *Science of the Total Environment* 385: 55-65.
- Madison, R. J. & Brunett, J. O. 1985. *Overview of the Occurrence of Nitrate on Ground Water of the United States*. Water Supply Papers, Vol. 2275. United States Geological Survey, Denver, Colorado.
- Madronich, S., Mckenzie, R. L., Björn, L. O. & Caldwell, M. M. 1998. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 46: 5-19.
- Mann, R. M., Hyne, R. V., Choung, C. B. & Wilson, S. P. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* 157: 2903-2927.
- Marco, A. & Ortiz-Santaliestra, M. E. 2009. Pollution: Impact of reactive nitrogen on amphibians (nitrogen pollution). In Heatwole, H. & Wilkinson, J. W. (Eds) *Amphibian Biology, Vol. 8. Amphibian Decline: Diseases, Parasites, Maladies and Pollution*. Surrey Beatty & Sons, Baulkham Hills, Australia, pp. 3145-3185.
- Marco, A., Bancroft, B. A., Lizana, M. & Blaustein, A. R. 2009. Ultraviolet-B radiation and amphibians. In Heatwole, H. & Wilkinson, J. W. (Eds)



- Amphibian Biology, Vol. 8. Amphibian Decline: Diseases, Parasites, Maladies and Pollution.* Surrey Beatty & Sons, Baulkham Hills, Australia, pp. 3112-3144.
- Margalef, R. 1983. *Limnología*. Omega, Barcelona.
- Márquez, R., Olmo, J. L. & Bosch, J. 1995. Recurrent mass mortality of larval midwife toad in a lake in the Pyrenean Mountains. *Herpetological Journal* 5: 287-289.
- Martín, M. P., Raidl, S. & Tellería, M. T. 2004. Molecular analysis confirm the relationship between *Stephanospora caroticolor* and *Lidtneria trachyspora*. *Mycotaxon* 90.
- Matson, P. A., Parton, W. J., Power, A. G. & Swift, M. J. 1997. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science* 277: 504-509.
- McCallum, H. & Dobson, A. 1995. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 190-194.
- Mitchell, C. E., Tilman, D. & Groth, J. V. 2002. Effects of grassland species diversity, abundance, and composition on foliar fungal disease. *Ecology* 83: 1713-1726.
- MMA [Ministerio de Medio Ambiente]. 1999. *Plan Estratégico Español para la Conservación y el Uso Racional de los Humedales*. [http://www.mma.es/secciones/biodiversidad/conservacion\\_humedas/estrategias\\_iniciativas/pdf/pan\\_humedales.pdf](http://www.mma.es/secciones/biodiversidad/conservacion_humedas/estrategias_iniciativas/pdf/pan_humedales.pdf). Acceso el 21 de Febrero de 2010.
- Montori, A., Franch, M., Llorente, G. A., Richter, A., Sansebastian, O., Garriga,



- N. & Pascual, G. 2009. Declivi de les poblacions d'amfibis al Delta del Llobregat. *Materials del Baix Llobregat* 15: 65-70.
- Moore, R. D., Griffiths, R. A. & Román, A. 2004. Distribution of the Mallorcan midwife toad (*Alytes muletensis*) in relation to landscape topography and introduced predators. *Biological Conservation* 116: 327-332.
- Moss, B. 1998. Shallow lakes, biomanipulation and eutrophication. *Scope Newsletter* 29: 1-45.
- Nichols, D. K., Lamirande, E. W., Pessier, A. P. & Longcore, J. E. 2001. Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in Dendrobatid frogs. *Journal of Wildlife Diseases* 37 : 1-11.
- Ortiz, M. E., Marco, A., Saiz, N. & Lizana, M. 2004. Impact of ammonium nitrate on growth and survival of six european amphibians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47: 234-239.
- Ortiz-Santaliestra, M. E., Marco, A., Fernández, M. J. & Lizana, M. 2006. Influence of developmental stage on sensitivity to ammonium nitrate of aquatic stages of amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 105-111.
- Ortiz-Santaliestra, M. E., Fernández-Benéitez, M. J., Lizana, M. & Marco, A. 2010. Adaptation to osmotic stress provides protection against ammonium nitrate in *Pelophylax perezi* embryos. *Environmental Pollution*, 158: 934-940.
- Ouellet, M., Bonin, J., Rodrigue, J., Desgranges, J. L. & Lair, S. 1997. Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats . *Journal of Wildlife Diseases* 33: 95-104.
- Ovaska, K., Davis, T. M. & Novales, I. 1997. Hatching success and larval



- survival of the frogs *Hyla regilla* and *Rana aurora* under ambient and artificially enhanced solar ultraviolet radiation. *Canadian Journal of Zoology* 75: 1081-1088.
- Ozena, P. 1975. Sur les étages de végétation dans les montagnes du bassin méditerranéen. *Documents de Cartographie Écologique* 16: 1-32.
- Pahkala, M., Räsänen, K., Laurila, A., Johanson, U., Björn, L. O. & Merilä, J. 2002. Lethal and sublethal effects of UV-B/pH synergism on common frogs embryos. *Conservation Biology* 16: 1063-1073.
- Palen, W. J. & Schindler, D. E. 2010. Water clarity, maternal behavior, and physiology combine to eliminate UV radiation risk to amphibians in a montane landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 9701-9706.
- Pedraza, J. & López, J. 1980. *Gredos. Geología y Glaciarismo*. Trazo-editorial, Madrid.
- Petrisko, J. E., Pearl, C. A., Pilliod, D. S., Sheridan, P. P., Williams, C. F., Peterson, C. R. & Bury, R. B. 2008. Saprolegniaceae identified on amphibian eggs throughout the Pacific Northwest, USA, by internal transcribed spacer sequences and phylogenetic analysis. *Mycologia* 100: 171-180.
- Pierce, B. A. 1985. Acid tolerance in amphibians. *Bioscience* 35: 239-243.
- Pleguezuelos, J. M., Márquez, R. & Lizana, M. 2002. *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza - Asociación Herpetológica Española, Madrid.
- Poorten, T. J. & Kuhn, R. E. 2009. Maternal transfer of antibodies to eggs in



*Xenopus laevis*. *Developmental and Comparative Immunology* 33: 171-175.

Pounds, J. A., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P. L., Foster, P. N., La Marca, E., Masters, K. L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S. R., Sánchez-Azofeifa, G. A., Still, C. J. & Young, B. E. 2006a. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439: 161-167.

Pounds, J. A., Carnaval, A. C., Puschendorf, R., Haddad, C. F. B., Masters, K. L., Mendelson, J. R. I., Lips, K. R., Diffendorfer, J. E., Gagliardo, R. W., Rabb, G. B., Collins, J. P., Daszak, P., Ibañez, D. R., Zippel, K. C., Stuart, S. N., Gascon, C., Da Silva, H. R., Burrowes, P. A., Lacy, R. C., Bolaños, F., Coloma, L. A., Wright, K. M. & Wake, D. B. 2006b. Responding to amphibian loss. *Science* 314: 1541-1542.

Power, M. E., Tilman, D., Estes, J. A., Menge, B. A., Bond, W. J., Mills, L. S., Daily, G., Castilla, J. C., Lubchenco, J. & Paine, R. T. 1996. Challenges in the quest for keystones. Identifying keystone species is difficult - but essential to understanding how loss of species will affect ecosystems. *Bioscience* 46: 609-620.

Price, P. W., Westoby, M., Rice, B., Atsatt, P. R., Fritt, R. S., Thompson, J. N. & Moberly, K. 1986. Parasitic mediation in ecological interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17: 487-505.

Price, P. W., Westoby, M. & Rice, B. 1988. Parasite-mediated competition: some predictions and tests. *American Naturalist* 131: 544-555.

Psenner, R. & Catalán, J. 1994. Chemical composition of lakes in crystalline basins: a combination of atmospheric deposition, geologic background, biological activity and human action. In Margalef, R. (Ed) *Limnology Now*:





- A Paradigm of Planetary Problems*. Elsevier Science, Nueva York, pp. 255-314.
- Puglis, H. J. & Boone, M. D. 2007. Effects of a fertilizer, an insecticide, and a pathogenic fungus on hatching and survival of bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 2198-2201.
- Rachowicz, L. J., Hero, J. M., Alford, R. A., Taylor, J. W., Morgan, J. A. T., Vredenburg, V. T., Collins, J. P. & Briggs, C. J. 2005. The novel and endemic pathogen hypotheses: competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. *Conservation Biology* 19: 1441-1448.
- Reading, C. J. 2007. Linking global warming to amphibian declines through its effects on female body condition and survivorship. *Oecologia* 151: 125-131.
- Recuero, E. 2010. Sapo de espuelas - *Pelobates cultripes*. In Salvador, A. & Martínez-Solano, I. (Eds) *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, <http://www.vertebradosibericos.org/>.
- Reed, D. H. 2004. Extinction risk in fragmented habitats. *Animal Conservation* 7: 181-191.
- Relyea, R. A. & Mills, N. 2001. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 2491-2496.
- Richter-Boix, A., Llorente, G. A. & Montori, A. 2007. Hierarchical competition in pond-breeding anuran larvae in a Mediterranean area. *Amphibia-Reptilia* 28: 247-261.
- Riethmüller, A., Weiss, M. & Oberwinkler, F. 1999. Phylogenetic studies of



- Saprolegniomycetidae and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany* 77: 1790-1800.
- Rivas Martínez, S. 1981. Les étages bioclimatiques de la végétation de la Péninsule Ibérique. *Anales del Jardín Botánico* 37: 251-268.
- Rivas Martínez, S. 1984. Pisos bioclimáticos de España. *Lazaroa* 5: 33-43.
- Rivas Martínez, S., Fernández González, F. & Sánchez Mata, D. 1987. El Sistema Central: de la Sierra de Ayllón a Serra da Estrela. In Peinado, M. & Rivas Martínez, S. (Eds) *La Vegetación de España*. Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, pp. 419-451.
- Rivas Martínez, S., Canto, P., Fernández-González, F., Navarro, C., Pizarro, J. & Sánchez-Mata, D. 1990. Biogeografía de la Península Ibérica, Baleares y Canarias. *Folia Botanica Matritensis* 8: 1-6.
- Rochester, C. J., Brehme, C. S., Clark, D. R., Stokes, D. C., Hathaway, S. A. & Fisher, R. N. 2010. Reptile and amphibian responses to large-scale wildfires in Southern California. *Journal of Herpetology* 44: 333-351.
- Rohr, J. R. & Raffel, T. R. 2010. Linking global climate and temperature variability to widespread amphibian declines putatively caused by disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 8269-8274.
- Romansic, J. M., Diez, K. A., Higashi, E. M. & Blaustein, A. R. 2006. Effects of nitrate and the pathogenic water mold *Saprolegnia* on survival of amphibian larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 235-243.
- Romansic, J. M., Higashi, E. M., Diez, K. A. & Blaustein, A. R. 2007. Susceptibility of newly-metamorphosed frogs to a pathogenic water mould (*Saprolegnia* sp.). *Herpetological Journal* 17: 161-166.



- Romansic, J. M., Diez, K. A., Higashi, E. M., Johnson, J. E. & Blaustein, A. R. 2009. Effects of the pathogenic water mold *Saprolegnia ferax* on survival of amphibian larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 83: 187-193.
- Rouse, J. D., Bishop, C. A. & Struger, J. 1999. Nitrogen pollution: An assessment of its threat to amphibian survival. *Environmental Health Perspectives* 107: 799-803.
- Ruthig, G. R. 2009. Water molds of the genera *Saprolegnia* and *Leptolegnia* are pathogenic to the North American frogs *Rana catesbeiana* and *Pseudacris crucifer*, respectively. *Diseases of Aquatic Organisms* 84: 173-178.
- Sagvik, J., Uller, T., Stenlund, T. & Olsson, M. 2008a. Intraspecific variation in resistance of frog eggs to fungal infection. *Evolutionary Ecology* 22: 193-201.
- Sagvik, J., Uller, T. & Olsson, M. 2008b. A genetic component of resistance to fungal infection in frog embryos. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275: 1393-1396.
- Sánchez-Mata, D. 1999. Flora y vegetación cormofítica. In Corrales Bermejo, L. (Coord) *Recursos Naturales de las Sierras de Gredos*. Institución Gran Duque de Alba. Diputación de Ávila, Ávila, pp. 110-149.
- Sattler, P. & Reichenbach, N. 1998. The effects of timbering on *Plethodon hubrichti*: short-term effects. *Journal of Herpetology* 32: 399-404.
- Schadich, E. 2009. Skin peptide activities against opportunistic bacterial pathogens of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) and three *Litoria* frogs. *Journal of Herpetology* 43: 173-183.
- Schall, J. J. 1992. Parasite-mediated competition in *Anolis* lizards. *Oecologia* 92: 58-64.



- Schindler, D. W., Curtis, P. J., Parker, B. R. & Stainton, M. P. 1996. Consequences of climate warming and lake acidification for UV-B penetration in North American boreal lakes. *Nature* 379: 705-708.
- Scholefield, D., Lord, E. I., Rodda, H. J. E. & Webb, B. 1996. Estimating peak nitrate concentrations from annual nitrate loads. *Journal of Hydrology* 186: 355-373.
- Schuytema, G. S. & Nebeker, A. V. 1999. Comparative effects of ammonium and nitrate compounds on Pacific treefrog and African clawed frog embryos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36: 200-206.
- Scoccianti, C. 2001. *Amphibia: Aspetti di Ecologia della Conservazione*. Guido Persichino Grafica. Florencia.
- Searle, C. L., Belden, L. K., Bancroft, B. A., Han, B. A., Biga, L. M. & Blaustein, A. R. 2010. Experimental examination of the effects of ultraviolet-B radiation in combination with other stressors on frog larvae. *Oecologia* 162: 237-245.
- Seymour, R. L. 1970. The genus *Saprolegnia*. *Nova Hedwigia* 19: 1-124.
- Smith, M. A., Berrill, M. & Kapron, C. M. 2002. Photolyase activity of the embryo and the ultraviolet absorbance of embryo jelly for several Ontario amphibians species. *Canadian Journal of Zoology* 80: 1109-1116.
- Smith, K. G., Weldon, C., Conradie, W. & du Preez, L. H. 2007. Relationships among size, development, and *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in African tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms* 74: 159-164.
- Smith, K. F., Acevedo-Whitehouse, K. & Pedersen, A. B. 2009. The role of



- infectious diseases in biological conservation. *Animal Conservation* 12: 1-12.
- Sociedad de Conservación de Vertebrados 2003. *Mortalidad de Vertebrados en Carreteras*. Documentos Técnicos de Conservación Vol. 4. Sociedad de Conservación de Vertebrados, Majadahonda.
- Solomon, S. 1999. Stratospheric ozone depletion: a review of concepts and history. *Reviews of Geophysics* 37: 275-316.
- Sommaruga, R. 2001. The role of solar UV radiation in the ecology of alpine lakes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 62: 35-42.
- Storfer, A. 2003. Amphibian decline: future directions. *Diversity and Distributions* 9: 151-163.
- Strijbosch, H. 1979. Habitat selection of amphibians during their aquatic phase. *Oikos* 33: 363-372.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L. & Waller, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783-1786.
- Suzuki, T. & Inukai, M. 2006. Effects of nitrite and nitrate on DNA damage induced by ultraviolet light. *Chemical Research in Toxicology* 19: 457-462.
- Swan, M. J. S. & Oldham, R. S. E. 1993. *Herptile Sites. Vol. 1: National Amphibian Survey*. English Nature Research Reports, Vol. 38. English Nature, Peterborough.
- Swofford, D. L. 2003. *PAUP\* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.



- Taylor, B., Skelly, D., Demarchis, L. K., Slade, M. D., Galusha, D. & Rabinowitz, P. M. 2005. Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformation. *Environmental Health Perspectives* 113: 1497-1501.
- Tevini, M. 1993. *UV-B Radiation and Ozone Depletion: Effects on Humans, Animals, Plants, Micro-organisms, and Materials*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Thomas, C. D., Cameron, A., Green, R. E., Bakkenes, M., Beaumont, L. J., Collingham, Y. C., Erasmus, B. F. N., Ferreira de Siqueira, M., Grainger, A., Hannan, L., Hughes, L., Huntley, B., Van Jaarsveld, A. S., Midgley, G. F., Miles, L., Ortega-Huerta, M. A., Peterson, A. T., Phillips, O. L. & Williams, S. E. 2004. Extinction risk from climate change. *Nature* 427: 145-148.
- Tilman, D. 1999. Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 5995-6000.
- Torchin, M. E., Lafferty, K. D., Dobson, A. P., McKenzie, V. J. & Kuris, A. M. 2003. Introduced species and their missing parasites. *Nature* 421: 628-630.
- Toro, M. 2001. *Las Lagunas del Parque Regional de la Sierra de Gredos*. Junta de Castilla y León, Valladolid.
- USEPA [United States Environmental Protection Agency]. 1986. *Quality Criteria for Water*. Report EPA 440/5-86-001. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Van der Meulen, F. 1982. Vegetation changes and water catchment in a Dutch coastal dune system. *Biological Conservation* 24: 305-316.
- Van Uitregt, V. O., Wilson, R. S. & Franklin, C. E. 2007. Cooler temperatures



- increase sensitivity to ultraviolet B radiation in embryos and larvae of the frog *Limnodynastes peronii*. *Global Change Biology* 13: 1114-1121.
- van West, P. 2006. *Saprolegnia parasitica* an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* 20: 99-104.
- Vavrus, S. J., Wynne, R. H. & Foley, J. 1996. Measuring the sensitivity of southern Wisconsin lake ice to climate variations and lake depth using a numerical model. *Limnology and Oceanography* 41: 822-831.
- Velasco, J. C., Lizana, M., Román, J., Delibes, M., Fernández Gutiérrez, J. & Sánchez Alonso, C. 2005. *Guía de los Peces, Anfibios, Reptiles y Mamíferos de Castilla y León*. Náyade Editorial, Medina del Campo.
- Vitousek, P. M., Aber, J., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., Schlesinger, W. H. & Tilman, D. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. *Issues in Ecology* 1: 1-16.
- Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W. F., Dinudom, A., Cool, D., Webb, R., Alford, R. A., Skerratt, L. F. & Speare, R. 2009. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science* 326: 582-585.
- Wake, D. B. 1991. Declining amphibian population. *Science* 253: 860.
- Wake, D. B. & Vredenburg, V. T. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 11466-11473.
- Walls, S. C. & Jaeger, R. G. 1987. Aggression and exploitation as mechanisms of competition in larval salamanders. *Canadian Journal of Zoology* 65: 2938-



2944.

- Warkentin, K. M., Currie, C. R. & Rehner, S. A. 2001. Egg-killing fungus induces early hatching of red-eyed treefrog eggs. *Ecology* 82: 2860-2869.
- Weyrauch, S. L. & Grubb, T. C. 2004. Patch and landscape characteristics associated with the distribution of woodland amphibians in an agricultural fragmented landscape: an information-theoretic approach. *Biological Conservation* 115: 443-450.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (Eds) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, California, pp. 315-322.
- Whiteman, H. H., Howard, R. D. & Whitten, K. A. 1995. Effects of pH on embryo tolerance and adult behavior in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum tigrinum*. *Canadian Journal of Zoology* 73: 1529-1537.
- Willoughby, L. G. 1978. Saprolegnias of salmonid fish in Windermere: a critical analysis. *Journal of Fish Diseases* 1: 51-67.
- Wilson, E. O. 2003. *The Future of Life*. Vintage, Nueva York.
- Woodhams, D. C. & Alford, R. A. 2005. Ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conservation Biology* 19: 1449-1459.
- Woodhams, D. C., Rollins-Smith, L. A., Carey, C., Reinert, L., Tyler, M. J. & Alford, R. A. 2006. Population trends associated with skin peptide defenses against chytridiomycosis in Australian frogs. *Oecologia* 146: 531-





540.

Woodhams, D. C., Ardipradja, K., Alford, R. A., Marantelli, G., Reinert, L. K. & Rollins-Smith, L. A. 2007. Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Animal Conservation* 10: 409-417.

Yamasaki, H., Katagiri, C. & Yoshizaki, N. 1990. Selective degradation of specific components of fertilization coat and differentiation of hatching gland cells during the two phase hatching of *Bufo japonicus* embryos. *Development, Growth and Differentiation* 32: 65-72.

Yan, N. D., Keller, W., Scully, N. M., Lean, D. R. S. & Dillon, P. J. 1996. Increased UV-B penetration in a lake owing to drought-induced acidification. *Nature* 381: 141-143.

Zaror, L., Collado, L., Bohle, H., Landskron, E., Montaña, J. & Avedaño, F. 2004. *Saprolegnia parasitica* in salmon and trout from Southern Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 36: 71-78.



