

## Convocatoria AEET-SIBECOL de ayudas a proyectos de investigación ERC en ecología (10ª ed., 2020)

### 1. Datos de identificación.

<b>Título de la propuesta</b>	Non-native crayfish species as potential vectors of chytridiomycosis
<b>Categoría</b>	Ganando independencia
<b>Nombre y apellidos del Beneficiario</b>	Francisco J. Oficialdegui Aladrén
<b>Datos de contacto: e-mail y teléfono</b>	fran.oficialdegui@gmail.com 650868468
<b>Departamento/Instituto/Grupo de Investigación/Otros</b>	Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Biología, Universidad de Murcia
<b>Dirección, código postal, provincia</b>	Universidad de Murcia, Campus de Espinardo 30100 Murcia

### 2. Memoria Técnica. Actividades y resultados de investigación

#### 2.1. Introducción (Planteamiento, objetivos y justificación)

Las enfermedades infecciosas emergentes son una amenaza para la fauna silvestre. Los anfibios son los vertebrados más amenazados a nivel mundial, ya que son muy susceptibles al cambio climático, la fragmentación del hábitat, la sobreexplotación, la introducción de especies no autóctonas y, además, se ven afectados por la panzootia más devastadora hasta el momento, la quitridiomycosis de los anfibios, causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). A pesar de que se han realizado importantes avances en el conocimiento desde el descubrimiento del Bd, su dinámica de infección en entornos acuáticos sigue siendo desconocida, con poca información sobre posibles reservorios no anfibios.

Aunque la viabilidad del patógeno Bd disminuye a lo largo de las estaciones en zonas donde la temperatura del agua supera los 30°C y los cuerpos de agua se secan durante la estación seca, el patógeno Bd es capaz de sobrevivir gracias a ciertos reservorios. Individuos o especies de anfibios, animales muertos, así como huéspedes no anfibios sirven como tales reservorios biológicos, manteniendo el patógeno Bd y transmitiendo potencialmente la quitridiomycosis a las poblaciones de anfibios. Los cangrejos de río cohabitan en los mismo cuerpos de agua con muchas especies de anfibios, causándoles graves impactos directos; sin embargo, también podrían afectar indirectamente a las poblaciones de anfibios funcionando como reservorios, con un papel potencial en la transmisión de la enfermedad. Por lo tanto, la

identificación de reservorios alternativos y el papel del cangrejo de río como vector de la quitridiomycosis es esencial desde una perspectiva epidemiológica y aplicada, proporcionando ideas sobre las estrategias de control de la enfermedad para preservar las poblaciones de anfibios.

El objetivo general de este proyecto era el de investigar el papel de las especies de cangrejos de río no nativos en la dinámica de la infección de la quitridiomycosis. Para lograr este objetivo principal, dos objetivos específicos fueron propuestos: (1) evaluar la susceptibilidad de cuatro especies de cangrejos de río presentes en España a ser infectados por el patógeno Bd y (2), analizar si son capaces de transmitir el patógeno Bd a los anfibios que coexisten en ambientes de agua dulce. Estos resultados pretendían arrojar luz sobre la comprensión de los diferentes papeles que desempeñan los hospedadores alternativos en la epidemiología de la quitridiomycosis y cómo pueden ayudar a dilucidar la aparición de la quitridiomycosis.

## 2.2. Descripción de la ejecución- Metodología

### **Configuración y procedimiento del experimento**

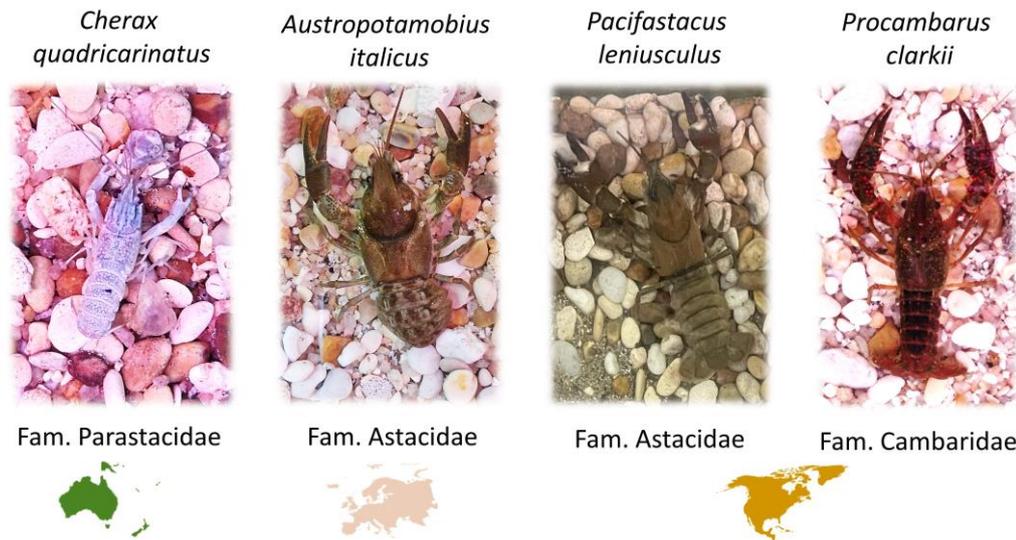
El experimento consistió de dos fases: la transmisión del patógeno Bd desde anfibios Bd-positivos a cangrejos para estudiar su susceptibilidad a la infección (Fase A) y transmisión del patógeno de esos mismos cangrejos a anfibios Bd-negativos (Fase B). Para la Fase A se introdujeron larvas Bd-positivas o Bd-negativas en contacto directo con los cangrejos experimentales o los controles, respectivamente. Con el fin de reducir el número de individuos experimentales al máximo posible sin perder poder estadístico en los análisis posteriores, para cada especie de cangrejo se utilizaron ocho cangrejos como controles y el resto (12 para *Austropotamobius italicus* y *Cherax quadricarinatus*, y 17 para *Pacifastacus leniusculus*) como experimentales ya que el objetivo principal era encontrar la transmisión del patógeno.

Se usaron acuarios con agua en circulación donde se realizaron los experimentos y correspondientes controles, con una temperatura entorno a los 10-12 °C, a la cual las zoosporas del hongo quitridio tienen gran movilidad. En la Fase 1, el tiempo de exposición de las larvas de anfibio en el mismo acuario varió según cuánto tiempo tardaron los cangrejos en depredar las larvas de anfibios. Sin embargo, en la Fase 2, los anfibios se mantuvieron alrededor de 10 días de media, con un periodo mínimo de exposición de 6 días y un máximo de 42 días. Dado que el ciclo de vida del patógeno Bd es relativamente corto, en un periodo de una semana debería

completar el ciclo y, por tanto, llegar a transmitirse. Sin embargo, varias larvas se mantuvieron por un tiempo más prolongado con el fin de aumentar las probabilidades de transmisión.

### Obtención de cangrejos y anfibios

Cuatro especies distintas de cangrejos de río pertenecientes a tres familias cada una nativa a tres continentes distintos fueron utilizadas para los experimentos (Figura 1).



**Figura 1.** Especies de cangrejo de río usadas en el experimento. Las familias y el rango nativo de las especies es indicado en la parte inferior.

En concreto, 20 individuos de cangrejo de patas blancas (*Austropotamobius italicus*) nativo de Europa obtenidos del centro de astacicultura ‘El Chaparillo’ en Ciudad Real; 20 individuos de cangrejo de pinzas rojas, *Cherax quadricarinatus*, nativo del noreste de Australia y sur de Nueva Guinea obtenidos de una tienda online de mascotas; y finalmente, 25 individuos de cangrejo señal, *Pacifastacus leniusculus*, nativo del oeste de Norte América; y un individuo de cangrejo rojo, *Procambarus clarkii*, nativo del sur de Estados Unidos y Noreste de México fueron capturados en un arroyo cercano. Por otro lado, más de dos centenares de larvas de sapo partero, *Alytes obstetricans*, (Figura 2a) fueron utilizadas en los acuarios para los experimentos de transmisión del patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). En particular, al menos 85 larvas consideradas positivas a Bd (ausencia de discos orales, ver Figura 2b) fueron capturadas en un pilón ganadero (lugar con alta prevalencia de Bd en larvas de *A. obstetricans* a lo largo del año, Fernández-Beaskoetxea et al. 2015), mientras que al menos 122 larvas potencialmente negativas a Bd (presencia de discos orales, ver Figura 2c) fueron obtenidas del centro de cría en cautividad. Notar que algunos

cangrejos fueron emparejados con más de una larva o éstas pudieron ser reemplazadas por nuevas larvas en estadios tempranos del experimento si un punto final fue alcanzado.



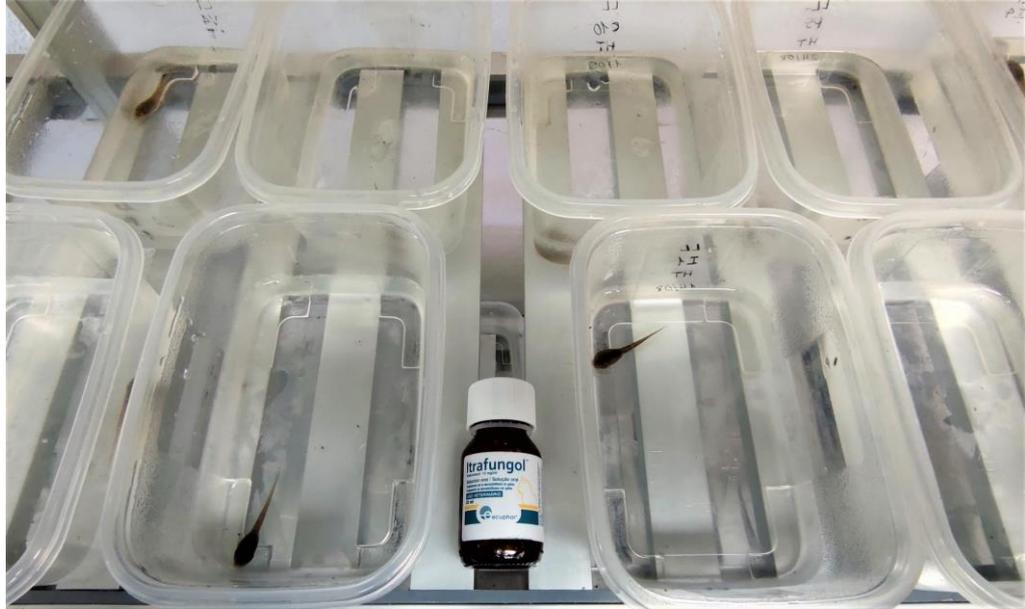
**Figura 2.** Fotos de una hembra de sapo partero, *Alytes obstetricans* (a), una larva positiva (b) y otra negativa (c) al hongo quitridio Bd, indicado por las flechas rojas que muestran la ausencia y presencia de discos orales en la boca de las larvas de anfibio, respectivamente.

### Manipulación de los animales en el laboratorio

Los cangrejos se aclimataron al menos dos semanas en tanques de 150 litros separados por especies, en una densidad de cangrejos/m<sup>2</sup> adecuada con comida *ad libitum* y refugio suficiente para todos los individuos con el fin de evitar interacciones agresivas entre individuos. Entre 3 y 5 días antes de su introducción en el experimento, se mantuvieron sin alimentar para potenciar la depredación sobre las larvas de anfibio. Con el fin de evitar contaminación de Bd en los cangrejos previa introducción al experimento, éstos fueron expuestos al antifúngico itraconazol durante el tiempo que estuvieron en el tanque a una concentración del 0,01% siguiendo el procedimiento de Hudson et al. (2016).

Los anfibios fueron manipulados en dos habitaciones distintas con distintos instrumentos para evitar contaminaciones cruzadas. Mientras los anfibios procedentes de la naturaleza, con señales visuales de presencia de Bd (ver Figura 2b), fueron aclimatados todos juntos (incrementando así la carga de Bd) en un tanque de 150 litros con comida *ad libitum* y refugio para evitar estrés; los anfibios Bd-negativos procedentes del centro de cría fueron mantenidos con comida *ad libitum* en contenedores individuales de 1L expuestos al antifúngico itraconazol igual que con

los cangrejos (Figura 3). Con el fin de afianzar la presencia o ausencia de Bd más allá de las señales visuales, antes de ser introducidos al experimento, recogimos ADN de los discos orales de todas las larvas usando un hisopo estéril, el cuál fue almacenado en tubos eppendorf con una gota de etanol 96% hasta la extracción de ADN.



**Figura 3.** Tratamiento con el fungicida itrafungol (componente: itraconazol) para asegurar la no presencia de Bd en los anfibios controles y negativos en ambas fases del experimento.

Para evitar sufrimiento animal, y en concordancia con los estándares de bioética, los anfibios utilizados en la Fase 1 fueron eutanasiados antes de ser introducidos en contacto con los cangrejos. Del mismo modo, al final del experimento, todos los animales (cangrejos y anfibios) fueron eutanasiados, en el caso de los cangrejos para extraer el tubo digestivo y en el caso de los anfibios para extraer los discos orales. Ambos tejidos fueron individualmente almacenados en eppendorf con etanol para su extracción de ADN en el laboratorio.

### **Análisis molecular**

Previamente a la extracción del ADN, como el hongo quitridio se adhiere a las paredes intestinales, los tubos digestivos de los cangrejos fueron lavados para vaciar el contenido estomacal y mejorar la amplificación del ADN del hongo. Se extrajo ADN a partir de las muestras recogidas, tanto para los hisopos, como para los tubos digestivo de los cangrejos y los discos orales de los anfibios al final del experimento. Una vez que el ADN fue extraído, se utilizó la PCR cuantitativa (qPCR) siguiendo el procedimiento de Boyle et al. (2004) para detectar las infecciones por Bd y estimar

las cargas de infección (equivalentes genómicos de las zoosporas, Blooi et al. 2013). Las extracciones se diluyeron 1:10 antes de la amplificación y se ejecutaron en una máquina myGo mini qPCR. Se incluyeron controles negativos y positivos (concentraciones conocidas de 10, 100 y 1000 ZE) para cada placa de PCR. Las cargas de infección iguales o superiores a 0,1 se consideraron positivas ( $Ct < 37$ ).

### **Obtención de permisos**

La obtención de permisos fue obtenida después de un largo proceso de casi 9 meses. Permisos de bioética fueron solicitados al comité de bioética de la Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC) para posteriormente trasladarse al del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid; permisos de muestreo de fauna silvestre se solicitaron a través de la Consejería de Medio Ambiente, Vivienda y Agricultura de la Comunidad de Madrid, y finalmente, también se obtuvieron los permisos de transporte entre el Centro de Astacicultura -CIAG - El Chaparrillo en Ciudad Real.

## 2.3. Resultados obtenidos (cumplimiento de objetivos)

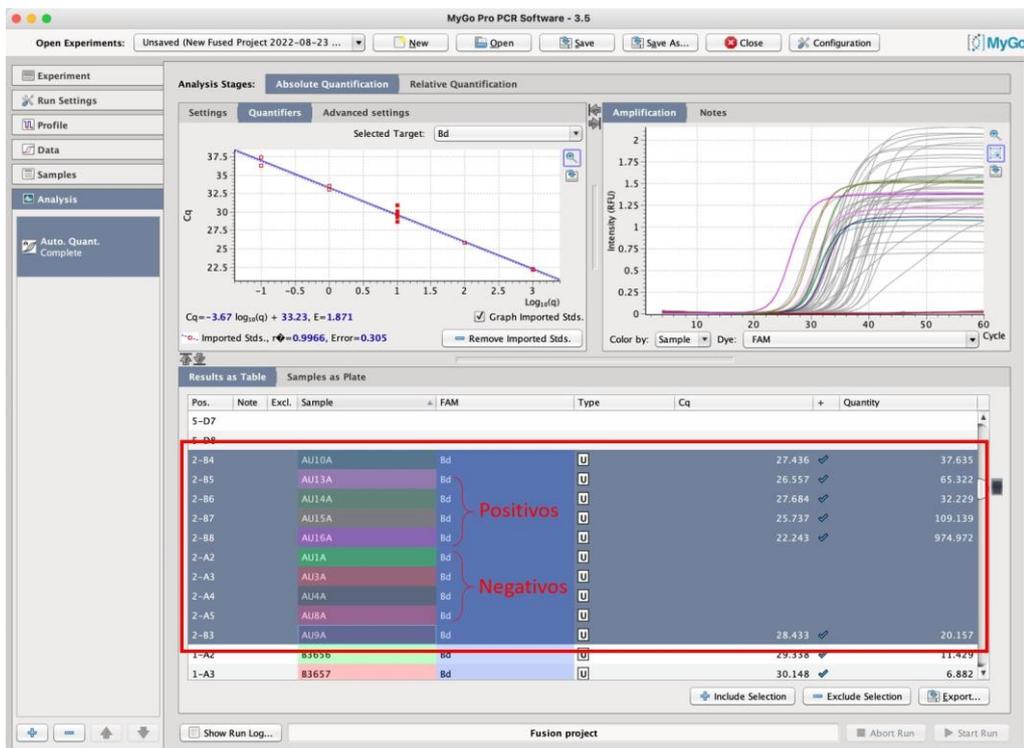
### **Cangrejos**

Los resultados mostraron la ausencia de quitridios en los 66 tubos digestivos de cangrejo analizados. No se amplificó ADN ni se encontró carga de Bd en ninguna de las especies de cangrejo analizadas. En el caso de *C. quadricarinatus* es posible que la baja temperatura mantenida para mejorar la movilidad de las zoosporas de Bd, perjudicase su supervivencia durante el experimento (óptimo de temperatura supera los 20 °C) porque tuvimos varias pérdidas.

### **Anfibios**

De las tres etapas en las que se recogieron muestras de ADN a partir de los anfibios, en la inmensa mayoría de muestras, no se obtuvieron resultados controvertidos (i.e. controles fueron siempre negativos e individuos de la Fase 2 negativos como los cangrejos), asegurando así que tanto el experimento como el análisis en el laboratorio se ejecutaron sin contaminaciones cruzadas (ver Figura 4). De todas las muestras analizadas sólo hubo tres excepciones con resultados discutibles. Por ejemplo, de los hisopos a partir de los anfibios eutanasiados (30 controles negativos y 55 positivos a Bd) que sirvieron como presa para los cangrejos, sólo un individuo control (debería haber sido negativo) dio positivo con una carga muy reducida de Bd

(Cq02 con una carga de 0.2 zoosporas equivalentes), sin embargo el cangrejo asociado a esta muestra fue Bd-negativo. En la segunda etapa al inicio de la Fase 2, cuando se realizaron los hisopos de las larvas de anfibios vivas que se pusieron en el mismo cuerpo de agua que los cangrejos pero no en contacto directo con los cangrejos para evaluar la potencial transmisión (80 larvas negativas), sólo una resultó ser positiva (Cq16 con una carga de 4.0 zoosporas equivalentes), por lo que este cangrejo fue retirado del experimento, incluso si éste resultó ser negativo a Bd. Y finalmente, al final del tiempo de exposición (i.e. final Fase 2), sólo dos larvas de anfibio resultaron ser Bd-positivas (Cq15 y Cq16 con una carga de 6.2 y 1.3 zoosporas equivalentes, respectivamente). Como en la muestra Cq15 del hisopo al inicio de la Fase 2 resultó negativa, esta fue considerada como falso negativo puesto que el cangrejo también resultó ser negativo.



**Figura 4.** Software para analizar los resultados de las amplificaciones de las qPCR. El cuadro rojo señala muestras positivas (AU13-16A y AU9A) y negativas (AU1A, AU3A, AU4A y AU8A) de anfibios analizados en el inicio de la Fase 1 cuando las larvas fueron ofrecidas, en este caso, a los cangrejos de patas blancas (*Austroptamobius italicus*).

#### 2.4. Conclusiones y valoración de la ejecución

Las conclusiones de este proyecto resaltan la enorme dificultad de estudiar y evaluar las dinámicas de las enfermedades emergentes en el laboratorio cuando existen múltiples factores a controlar (i.e. cangrejos, anfibios, quitridios, condiciones ambientales, entre otras). Al contrario de nuestra hipótesis, los resultados moleculares negativos podrían indicar que ninguna de las especies de cangrejo es susceptible a la infección por Bd (objetivo 1), y por consiguiente, no habría transmisión de Bd a anfibios (objetivo 2). Sin embargo, esto resulta altamente improbable ya que en publicaciones previas (e.g. Oficialdegui et al., 2019) hemos observado el hongo quitridio adherido a la pared intestinal, aunque siempre en condiciones naturales y no experimentales. Por lo tanto, hasta ahora surgen más preguntas que respuestas. Ya que no hubo aparentemente problemas de contaminación (ver arriba), otros factores podrían estar implicados en que nosotros no obtuviésemos resultados positivos en cangrejos. A continuación, se discuten varios factores que podrían influenciar y tendremos en cuenta en los próximos experimentos:

- Tamaño de los cangrejos: los cangrejos quizás deben ser de un tamaño más grande (e.g. el tamaño medio de los cangrejos de pinzas rojas fue 5-6 cm de longitud). Esto es porque hay más probabilidad de que los adultos ingieran mayor biomasa de anfibios (los juveniles son detritívoros) y, por tanto, haya más carga de Bd.
- Tamaño muestral: aunque podría ser posible, no creemos que un tamaño muestral mayor de 8 controles y 12 positivos, mejorase el resultado, ya que si hubiese transmisión, un mínimo de ADN hubiera sido detectado en la qPCR de los tubos digestivos de los cangrejos.
- La carga de Bd: usamos entre 1 y 2 larvas de renacuajo infectadas para cada cangrejo, es posible que la carga de Bd sea demasiado baja como para que varios miles de zoosporas se adhieran al tubo digestivo del cangrejo y formen esporangios viables. Probablemente en la naturaleza la densidad de anfibios en una charca es mayor, aumentando así la carga de Bd y facilitando la transmisión a los cangrejos con los que cohabitan. En futuros experimentos, se podría aumentar la carga de Bd con infecciones forzadas en anfibios ya infectados.
- El tiempo de exposición de los cangrejos y anfibios: A pesar de que los anfibios en la Fase 2 estuvieron entre 1 y 6 semanas en el mismo cuerpo de agua que los

cangrejos, el tiempo de exposición en la Fase 1 es probable que deba ser aumentado más allá del tiempo que tardan en depredar al anfibio. En cualquier caso, los tiempos de exposición en la naturaleza son superiores lo que podría resultar en una mayor exposición a zoosporas.

- La temperatura del agua: se trata de un factor sensible ya que las zoosporas son más móviles a temperaturas bajas, pero el óptimo de crecimiento del hongo es en torno a los 20°C. Esto hace pensar que futuros experimentos debería combinar temperaturas para mejorar la movilidad y luego el crecimiento del hongo en el hospedador.

A nivel personal, estoy tremendamente agradecido a este proyecto porque, a pesar de los resultados no positivos, ha enriquecido mis conocimientos sobre la dificultad de ejecutar experimentos cuando intervienen diversos factores, así como a hacerme más preguntas que serán respondidas en mi futura carrera investigadora. Además, aunque no estaba directamente entre los objetivos del proyecto, he ganado independencia y he fortalecido mi capacidad en la gestión de los proyectos. Por ejemplo, en la petición de permisos de bioética en primera persona, facturas con laboratorios, organización de tareas, presupuestos, etc.

## 2.5. Publicaciones resultantes

Este proyecto ha sido presentado como charlas orales en dos congresos internacionales:

Autores: Oficialdegui, F.J., Thumsová, B., Sánchez, M.I., & Bosch, J.

Título: Chytrids and freshwater crayfish, a scary combination for amphibians?

Tipo de participación: Oral communication

Congreso: 12th Symposium for European Freshwater Sciences (SEFS12)

Lugar del evento: Dublín, Irlanda (Online)

Fecha: 2021 (25-30 Julio)

Autores: Oficialdegui, F.J., Thumsová, B., Bosch, J.

Título: Chytridiomycosis and crayfish: more than a double threat to amphibian conservation?

Tipo de participación: Oral communication

Congreso: 23rd Symposium of the International Association of Astacology (IAA23)

Lugar del evento: Hluboká nad Vltavou, República Checa

Fecha: 2022 (20-25 Junio)

3. **Informe de gastos del proyecto.** Relación de partidas de gastos y sus importes. Se deberán aportar justificantes originales de los pagos realizados (tickets, recibos o facturas).

Facturas Laboratorios	1.926,79 €
Itraconazol y material	72,94 €
Compra cangrejos	104,00 €
Dietas en restauración	117,96 €
Gasolina	187,73 €
Coche Alquiler	79,20 €
Avión Amsterdam – Madrid – Amsterdam	98,66
	2.587,28 €

### **Justificación de gastos**

Adjunto un PDF con todos los pagos con las facturas y/o tickets, con los importes cargados en mi cuenta bancaria. Las facturas de laboratorio incluyen material necesario para realizar los análisis moleculares, ya que es imposible desde un particular pagar la extracción o qPCR por separado. Para ello, me apoyé en el laboratorio del Dr. Jaime Bosch en el Instituto Mixto de Investigación en Biodiversidad en Mieres, donde se realizaron los análisis moleculares. Algunos tickets de restauración no han sido incluidos por ausencia de ellos. También, se incluye el billete de avión para ir hasta Madrid desde el lugar de residencia hasta donde se realizaron los experimentos en el Centro de Cría de anfibios del Parque Nacional de Guadarrama.

Fdo: Francisco J. Oficialdegui

En Murcia, a 24 de Agosto de 2022