

LIFE12 NAT/ES/001091

"Conservación de fauna fluvial de interés europeo en la Red Natura 2000 de la cuenca de los ríos, Fluvià y Muga"



A.4 – PROTOCOLOS DE CRIA, REFORZAMIENTOS POBLACIONALES Y PROTECCIÓN CONTRA LA AFANOMICOSI DEL CANGREJO DE RIO AUTÓCTONO

**Protocolo para el diseño de experimentos de afectación de
la afanomicosi sobre *Austropotamobius pallipes***

ABRIL 2014





(LIFE12 NAT/ES/001091)

"Conservación de fauna fluvial de interés europeo en la red Natura 2000 de las cuencas de los ríos Ter, Fluvià y Muga"

Beneficiarios:



Cofinanciadores:



Diputació de Girona



Ajuntament de Banyoles



AJUNTAMENT DE PORQUERES



Dirección de la oficina técnica:

Plaça dels Estudis, 2
17820 - Banyoles (Girona)

Tel. / Fax: 972.57.64.95
correu-e: consorci@consorcidelestany.org

web: www.lifepotamofauna.org

A.4 – PROTOCOLOS DE CRÍA, REFORÇAMIENTOS POBLACIONALES Y PROTECCIÓN CONTRA LA AFANOMICOSI DEL CANGREJO DE RIO AUTÓCTONO

Protocolo para el diseño de experimentos de afectación de la afanomicosi sobre *Austropotamobius pallipes*

ABRIL 2014

Equipo de redacción:

Daniel Carrillo, Biólogo, CEBCAT - La Balca S.L.

Lluís Benejam, Biólogo, CEBCAT - La Balca S.L.

Sandra Saura-Mas, CEBCAT - La Balca S.L.

Fina Torres, Técnica, Forestal Catalana S.A.

Miquel Macies, Técnico, Forestal Catalana S.A.

Joan Montserrat, Ingeniero forestal, Parc Natural de la Zona Volcànica de la Garrotxa (DAAM)



Promotor:



Seguimiento i direcció:

Joan Montserrat, Parc Natural de la Zona Volcànica de la Garrotxa (DAAM)

Quim Pou i Rovira, Consorci de l'Estany

Índice

	pàg.
RELACIÓN DE FIGURAS	1
1.- RESÚMENES	2
1.1.- RESUM (CATALÀ)	2
1.2.- RESUMEN (ESPAÑOL)	3
1.3.- ABSTRACT (ENGLISH)	4
2.- INTRODUCCIÓN	5
3.- OBJETIVOS	7
3.1.- OBJETIVO GENERAL	7
3.2.- OBJETIVO CONCRETO	7
4.- METODOLOGÍA	7
4.1.- CONSIDERACIONES PRÉVIAS	7
4.2.- MATERIAL	8
4.3.- CRONOGRAMA DE LOS EXPERIMENTOS	8
4.4.- PREPARACIÓN DEL EXPERIMENTO	9
4.4.1.- CAPTURA DE LOS EXEMPLARES DE CANCREJO Y TRANSPORTE	9
4.4.2.- CUIDADO DE LOS CANGREJOS	9
4.4.2.1.- ALIMENTACIÓN	9
4.4.2.2.- AGUA I FILTROS	10
4.4.3.- CEPA APHANOMYCES ASTACI	10
4.5.- EXPERIMENTACIÓN	10
4.5.1.- TOMA DE MUESTRAS DE CUTÍCULA	12
4.6.- ESQUEMA GENERAL DE LOS EXPERIMENTOS	13
5.- TRATAMIENTO DE DATOS	14
6.- BIBLIOGRAFÍA	14



Protocolo para el diseño de los experimentos de
afectación de la afanomicosi sobre
Austropotamobius pallipes



ANEJOS

A-I.- Ficha de campo para la recogida de ejemplares de *Austropotamobius pallipes* en libertad

A-II.- Tabla de observación de los efectos de la infección para afanomicosi

RELACIÓN DE FIGURAS

	pàg.
Figura 1.- Cronograma de las diferentes fases del experimento	8
Figura 2.- Imagen de la extracción de muestra de la placa abdominal de la cutícula	12
Figura 3.- Esquema general del procedimiento que se llevará a cabo durante el protocolo	13

1.- RESÚMENES

1.1.- RESUM (EN CATALÀ)

Amb l'objectiu d'avaluar el grau de resistència de diverses poblacions d'*Austropotamobius pallipes* envers la infecció produïda per *Aphanomyces astaci*, aquest protocol descriu la metodologia a seguir per a la realització d'experiments amb aquest fi. Aquesta metodologia inclou des de la recollida d'individus salvatges de cranc autòcton al seu medi natural dins l'àrea del **LIFE Potamo Fauna**, fins al disseny de l'experiment d'infecció i observació del seus efectes, passant pel transport dels animals vius fins a les instal·lacions del CSIC a Madrid, on es duran a terme. En aquest cas, el fet de dur a terme els experiments a una ubicació fora de l'àrea del projecte és necessària per 2 motius:

- 1) Degut a l'alt risc d'infecció que representa treballar a la vegada amb poblacions salvatges d'*Austropotamobius pallipes* i amb individus infectats per *Aphanomyces astaci*.
- 2) La necessitat de treballar amb l'equip i instal·lacions del Dr. Diéguez-Urbeondo, ja que són referència mundial en el camp de l'afanomicosi.

Com que la principal causa del declivi d'*Austropotamobius pallipes* és l'afanomicosi, aquests experiments tenen una gran importància per tal de cercar una potencial resistència a la infecció produïda per *Aphanomyces astaci* que, d'arribar a trobar-se, podria significar un gran ajut per a la recuperació del cranc de riu autòcton a nivell europeu.

1.2.- RESUMEN (EN ESPAÑOL)

Con el objetivo de evaluar el grado de resistencia de diversas poblaciones de *Austropotamobius pallipes* hacia la infección producida por *Aphanomyces astaci*, este protocolo describe la metodología a seguir para la realización de experimentos con este fin. Esta metodología incluye desde la recogida de individuos salvajes de cangrejo de río autóctono en su medio natural dentro del área del **LIFE Potamo Fauna**, hasta el diseño del experimento de infección y observación de sus efectos, pasando por el transporte de los animales vivos hasta las instalaciones del CSIC en Madrid, donde se llevaran a cabo. En este caso, el hecho de llevar a cabo los experimentos en una ubicación fuera del área del proyecto es necesario por dos motivos:

- 1) Debido al alto riesgo de infección que representa trabajar a la vez con poblaciones salvajes de *Austropotamobius pallipes* y con individuos infectados por *Aphanomyces astaci*.
- 2) La necesidad de trabajar con el equipo y las instalaciones del Dr. Diéguez-Urbeondo, ya que son referencia mundial en el campo de la afanomicosis.

Como la principal causa del declive de *Austropotamobius pallipes* es la afanomicosis, estos experimentos tienen una gran importancia para buscar una resistencia potencial a la infección producida por *Aphanomyces astaci* que, si llega a descubrirse, podría significar una gran ayuda para la recuperación del cangrejo de río autóctono a nivel europeo.

1.3.- ABSTRACT (ENGLISH)

In order to assess the resistance degree of different populations of *Austropotamobius pallipes* infected by *Aphanomyces astaci*, this protocol describes the methodology to make the experiments for this purpose. This protocol includes: the collection of crayfish on rivers (into the area of Potamo Fauna LIFE Project), the transport of live animals to the lab of CSIC in Madrid and the methodology to make the experiments of resistance to *Aphanomyces astaci*.

These experiments will carry out at location outside of the project area for two reasons:

- 1) Due to the high risk of infection that represents to work, in the same time, with natural crayfish populations, and individuals of *Austropotamobius pallipes* infected by *Aphanomyces astaci*.
- 2) The need to work with the staff and lab of Dr. Diéguez-Uribeondo, because they are a world reference in the crayfish plague topic.

The main cause of the decline of *Austropotamobius pallipes* is the crayfish plague, for this reason these experiments are very important to deepen on the knowledge of *Aphanomyces astaci*. The results of these experiments could be very relevant for our study area and also for all European regions.

2.- INTRODUCCIÓN

El cangrejo de río autóctono (*Austropotamobius pallipes*) es un invertebrado típicamente bentónico, poco adaptado a la natación, aunque a veces puede alcanzar grandes velocidades de desplazamiento, especialmente cuando se ve atacado. Tiene el cuerpo subcilíndrica, comprimido lateralmente, y los tres primeros pares de pereopodios terminan con una pinza. Son de costumbres sedentarios y suelen vivir en grupos de aproximadamente 10 individuos. Salen de sus escondites para alimentarse durante la noche y se consideran prácticamente omnívoros. El número de huevos que pone cada hembra es relativamente pequeño (de 50 a 100) y el desarrollo es directo.

El cangrejo de río autóctono es una especie de gran importancia ecológica en los ríos donde se distribuye, ya que durante su fase juvenil actúa como presa de un gran número de depredadores fluviales y, principalmente como adulto, ya que interviene de forma activa en el reciclaje de nutrientes en el río gracias a su régimen alimentario, en gran parte carroñero. Esta especie, además de ayudar a mantener los ríos en buen estado, es un buen bioindicador de la calidad de las aguas fluviales, ya que no sobrevive en aguas contaminadas.

Durante las últimas tres décadas, se ha producido una disminución alarmante de las poblaciones de cangrejo de río autóctono en toda Europa. Esta regresión se debe a la contaminación, destrucción del hábitat y principalmente a la introducción de la afanomicosis, enfermedad de la que son portadoras varias especies de cangrejo de río americano (y a la que son resistentes). La enfermedad producida por este hongo (*Aphanomyces astaci*) es la causante de la desaparición de poblaciones enteras de cangrejo de río autóctono. Estudios realizados durante los últimos treinta años muestran la disminución de las poblaciones de *A. pallipes*, Paralelamente a la expansión del cangrejo de río americano, *P. clarkii*, en aquellos hábitats que le son favorables.

La regresión de *A. pallipes* se encuentra a dos niveles: reducción del número de poblaciones observadas y fragmentación de las mismas. La continua e incontrolada expansión del cangrejo de río americano, implica, en muchos lugares, la colonización de aquellos hábitats ocupados anteriormente por *A. pallipes*. Además, debido al hecho de ser portadores de afanomicosis, estos hábitats colonizados por la afanomicosis quedan normalmente inservibles para una posible recuperación, ya

sea natural o artificial por parte de *A. pallipes*, el cual se ve forzado a reducir su nicho ecológico en aquellos ecosistemas no aptos para *P. clarkii*.

Durante los años 90 del siglo XX, y en vistas a la alarmante declive de las poblaciones de cangrejo de río autóctono, se empezó a gestionar la especie en Catalunya, mediante el monitoreo de sus poblaciones. A principios del 2000 (en las cuencas del Fluvià, Ter y Muga) se iniciaron otras acciones de conservación, incluyendo la cría en cautividad y los reforzamientos poblacionales. En la actualidad y gracias a la inclusión del cangrejo de río en el proyecto **LIFE Potamo Fauna**, se ampliarán los esfuerzos para conservar y recuperar esta especie. Este proyecto, con el título "Conservación de fauna fluvial de interés europeo en red Natura 2000 de las cuencas de los ríos Ter, Fluvià y Muga", y una duración total de cuatro años (2014-2017), tiene como principal objetivo la conservación y mejora de las poblaciones de varias especies de fauna fluvial amenazada del nordeste de Catalunya, incluyendo el cangrejo de río (*Austropotamobius pallipes*). En cuanto al cangrejo de río, se han proyectado una serie de acciones, entre las que se incluyen su seguimiento (Acción D5), cría en cautividad (Acción C6), reforzamientos poblacionales (Acción C7), seguimientos y control de cangrejos exóticos (Acciones D5 y C9), protección frente a la afanomicosis (Acción C8) y experimentación con afanomicosis (Acción A10).

En el presente protocolo se indica la metodología para la realización de experimentos con la afanomicosis (Acción A10), enfermedad causada por el oomicete *Aphanomyces astaci*. Estos experimentos tienen una gran importancia, ya que esta infección es la principal causa del declive de *Austropotamobius pallipes*.

Mediante esta acción se pretende evaluar los diferentes grados de resistencia de varias poblaciones de cangrejo autóctono presentes dentro del **LIFE Potamo Fauna**, incluyendo la población del río Arnera, que con anterioridad ha demostrado presentar un cierto grado de resistencia, o al menos, un tiempo más elevado al comenzar a presentar síntomas de infección y de supervivencia. El hallazgo de una población que presentara resistencia al afanomicosis podría significar un avance muy importante para la conservación de la especie, que de otro modo, y a pesar de los esfuerzos que se han llevado y se llevarán a cabo, presenta un futuro incierto.

Las acciones detalladas en este protocolo se deben realizar con la colaboración del equipo y personal del CSIC de Madrid, dirigidos por el Dr. Diéguez-Uribeondo, los cuales tienen una gran experiencia en el campo de la afanomicosis y son una referencia a nivel estatal y mundial.

3.- OBJETIVOS

3.1.- OBJETIVO GENERAL

Este protocolo diseña cómo se deben realizar los experimentos para evaluar los diferentes grados de resistencia de diversas poblaciones de *Austropotamobius pallipes* al afanomicosis (*Aphanomyces astaci*).

3.2.- OBJETIVOS CONCRETOS

Confirmar y evaluar la resistencia aparentemente superior al afanomicosis de la población de *Austropotamobius pallipes* del Arnera, en comparación a las otras poblaciones de cangrejo de río autóctono de la zona de estudio.

4.- METODOLOGÍA

4.1.- CONSIDERACIONES PRÉVIAS

Uno de los objetivos de los experimentos es evaluar la resistencia aparentemente superior al afanomicosis de la población de *Austropotamobius pallipes* del Arnera (situada en el SCI Alta Garrotxa-Macizo de las Salinas (ES5120001)), en comparación a las otras poblaciones de cangrejo de río autóctono de la zona de estudio. Esta suposición previa es consecuencia de dos hechos observados durante los últimos años:

- 1) En agosto del año 2007 el afanomicosis entró en el Centro de Reproducción de Olot, los ejemplares provenientes de la población del Arnera fueron los últimos en presentar síntomas de infección y los últimos en morir.
- 2) En otoño de 2011 se detectó un brote de afanomicosis en la parte inferior de esta población del Arnera y un año después sólo había afectado a unos 800 metros de la misma, quedando aún hoy unos 7 km de río aguas arriba en perfectas condiciones. Este hecho se contrapone con la progresión habitual de los brotes de afanomicosis en otras poblaciones que desaparecen enteras con pocos días o semanas.

4.2.- MATERIAL

- **9 acuarios (80L), filtros y oxigenadores** para establecer los cangrejos durante los experimentos.
- **Agua autoclavada** para asegurar que el único agente infeccioso que afectará a los cangrejos será la cepa de afanomicosis que será introducida en los acuarios durante los experimentos.
- **Graba y refugios para cangrejo (ladrillos) autoclavados** para reproducir las condiciones del hábitat de los cangrejos.
- **Microscopio óptico** para la realización de las observaciones de melanización de la cutícula de los cangrejos infectados.
- **Cepa conocida de *Aphanomyces astaci*.**
- **Pinzas, bisturí y agujas enmangadas** para la extracción y manipulación de muestras.

4.3.- CRONOGRAMA DE LOS EXPERIMENTOS

A continuación se propone el cronograma a seguir para aplicar este protocolo. Las semanas que durará el experimento no se puede saber a priori, pero difícilmente superará las semanas aquí descritas.

El experimento debería realizarse fuera de los periodos de reproducción o de baja actividad de invierno.

Tarea\Semana	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Captura de los ejemplares i traslado al CSIC-Madrid														
Aclimatación de los cangrejos en los acuarios														
Infección de cangrejos														
Observaciones diarias (Anejo 2)														
Incorporación en la base de datos														

Figura 1. Cronograma de las diferentes fases del experimento.

4.4.- PREPARACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS

4.4.1.- CAPTURA DE LOS EXEMPLARES DE CANGREJO Y TRANSPORTE

- Se capturarán 12 ejemplares machos de gran tamaño de cada una de las cuencas de estudio del LIFE Potamo Fauna (cuencas del Río Ter, Fluvià y Muga, de esta última pertenecientes a la población de Arnera). Se especificará la procedencia de los cangrejos, así como los colaboradores que hayan efectuado su captura, llenando la tabla adjunta en el Anexo 1.
- Las poblaciones seleccionadas serán poblaciones con información precisa de su genética.
- Los cangrejos serán transportados de forma separada para cada población en el CSIC de Madrid (Real Jardín Botánico, CSIC. Plaza de Murillo, 2. Madrid E-28014).
- El transporte se llevará a cabo en depósitos de 30 litros, llenos de agua autoclavada y con oxigenadores, ya que el transporte será bastante largo.
- Una vez llegados a destino, los animales serán introducidos en acuarios para su aclimatación.
- Se debe desinfectar todo el material antes y después del transporte.

4.4.2.- CUIDADO DE LOS CANGREJOS

4.4.2.1-ALIMENTACIÓN

Durante el periodo en que los cangrejos vivan en los acuarios se les alimentará con una dieta similar a lo que se les proporciona a los cangrejos presentes en el Centro de Reproducción de Olot. Esta consistirá en el aporte de sardinas e hígado de cordero troceados para simular la parte de la dieta carnívora y en patata hervida y troceada por la parte herbívora. Habrá que adecuar las cantidades de alimento y su renovación durante todo el procedimiento, ya que a medida que la infección vaya avanzando los cangrejos se alimentarán en menor cantidad.

4.4.2.2.- AIGUA I FILTROS

Gracias a la instalación de filtros de acuario automáticos, sólo será necesario supervisar su correcto funcionamiento. En caso de que los cangrejos sobrevivieran durante un período largo de tiempo, se deberían limpiar los filtros y se valoraría la posibilidad de renovar el agua de los acuarios.

4.3.3.- CEPA APHANOMYCES ASTACI

Se utilizarán los cultivos puros de diferentes cepas de *Aphanomyces astaci* procedentes de la colección del Dr. Diéguez-Urbeondo del CSIC Madrid. Esta colección dispone de cultivos puros de *Aphanomyces astaci* de las cepas asociadas a las diferentes especies vectores de cangrejo exóticas: *Procambarus clarkii*, *Pacifastacus leniusculus* y *Orconectes limosus*.

Inicialmente los experimentos se realizarán con la cepa proveniente de *Procambarus clarkii*, ya que es la cepa que está causando más mortalidades en la zona de actuación del LIFE Potamo Fauna. Sin embargo, en función de los resultados, se podría repetir el mismo experimento con las otras cepas provenientes de *Pacifastacus leniusculus* y *Orconectes limosu*. De ese modo, se podría comparar las diferentes virulencia de las cepas y la resistencia que realizan los cangrejos.

4.5.- EXPERIMENTACIÓN

- Se utilizarán 9 acuarios (3 por cada población). Cada acuario tendrá 3 cangrejos provenientes de la misma población. De ese modo se obtendrán 3 réplicas (cada acuario) del experimento por población.
- Cada cangrejo deberá poder ser distinguido de forma individualizada para poder seguir en detalle su evolución (Anexo 2). En el caso de que los individuos sean muy parecidos entre ellos se realizará una pequeña marca con pintauñas para poderlos identificar.
- Aunque se capturan 12 cangrejos de cada población sólo se utilizan 9. Los otros 3 son de seguridad, por si algún individuo muere durante el transporte y / o aclimatación.

- Se infectaran al mismo tiempo todos los ejemplares de las 3 poblaciones con la misma cepa. El procedimiento de infección consistirá en realizar un raspado sobre la cutícula de los ejemplares de *Austropotamobius pallipes* con la cepa de *Aphanomyces astaci* seleccionada (apartado 4.3.3 de este protocolo).

- Revisiones diarias de efectos subletales (Mathews & Reynolds, 1990) de *Aphanomyces astaci* a todos los individuos, recogidos en la tabla adjunta en el **Anejo 2:**

Saludable: Cuando es perturbado se esconde rápidamente. Activo durante la noche y permanece escondido durante el día. Movimiento de las antenas a menudo, alimentación con normalidad. Si se le Coloca boca arriba volverá a la posición natural con coletazos en menos de 5 segundos.

Letárgico: Se esconde lentamente cuando se le perturba, pero por otra parte es reacio a moverse. Si se le coloca boca arriba puede volver a su posición natural pero lentamente (más de 5 segundos).

Débil: Muy lento, movimientos laboriosos. Movimientos muy débiles de la cola. No se mueve, permanece sin esconderse. Poco movimiento de las antenas.

Errático: Inicio de la fase final de la enfermedad. Los animales caen y se levantan repetidamente. Pérdida de coordinación y de equilibrio. Rozan las pinzas u otros apéndices unos contra otros y deben utilizar el resto de apéndices o el telson para desplazarse.

Postrado: El animal está sobre la parte posterior o lateral del cuerpo y no puede enderezarse. Movimientos muy esporádicos y débiles. De vez en cuando las extremidades de un lado del cuerpo se paralizan.

Cercano a la muerte: Extremadamente débil. Los pereopodios cuelgan sin fuerzas si se saca el animal del agua. Si se pincha el animal la respuesta reflejo de las extremidades es difícilmente perceptible.

Muerte: Generalmente boca arriba y en espacio abierto.

- Revisión diaria de la mortalidad causada por *Aphanomyces astaci* y llenar la tabla adjunta en el Anejo 2.

- Revisión con microscopio del nivel de melanización de la cutícula de los cadáveres, siguiendo las instrucciones del apartado 4.4.1 "Toma de muestras de cutícula"

4.5.1.- TOMA DE MUESTRA DE CUTÍCULA

- Una vez el proceso de infección haya finalizado y se encuentren cangrejos muertos, se procederá a la extracción de muestras de cutícula para su observación posterior al microscopio para evaluar el nivel de melanización.
- Mediante la ayuda de pinzas y tijeras, se extraerá un trozo de cutícula, concretamente de la placa abdominal. (Figura 1)
- Cuando se haya extraído el fragmento de placa abdominal se procederá a la limpieza de su parte interior. Se retirarán los restos de músculo y otras partes de carne que puedan quedar enganchadas, rascando con el bisturí. Estas partes de carne y músculo se deberán tirar.
- En caso de que el análisis al microscopio no se realice inmediatamente después de la extracción de muestras de cutícula, se recomienda conservar estas en agua fría, indicando claramente el acuario de procedencia y la fecha y hora de la muerte de extracción.



Figura 2. Extracción de muestras de la placa abdominal de la cutícula.

4.6.- ESQUEMA GENERAL DE LOS EXPERIMENTOS

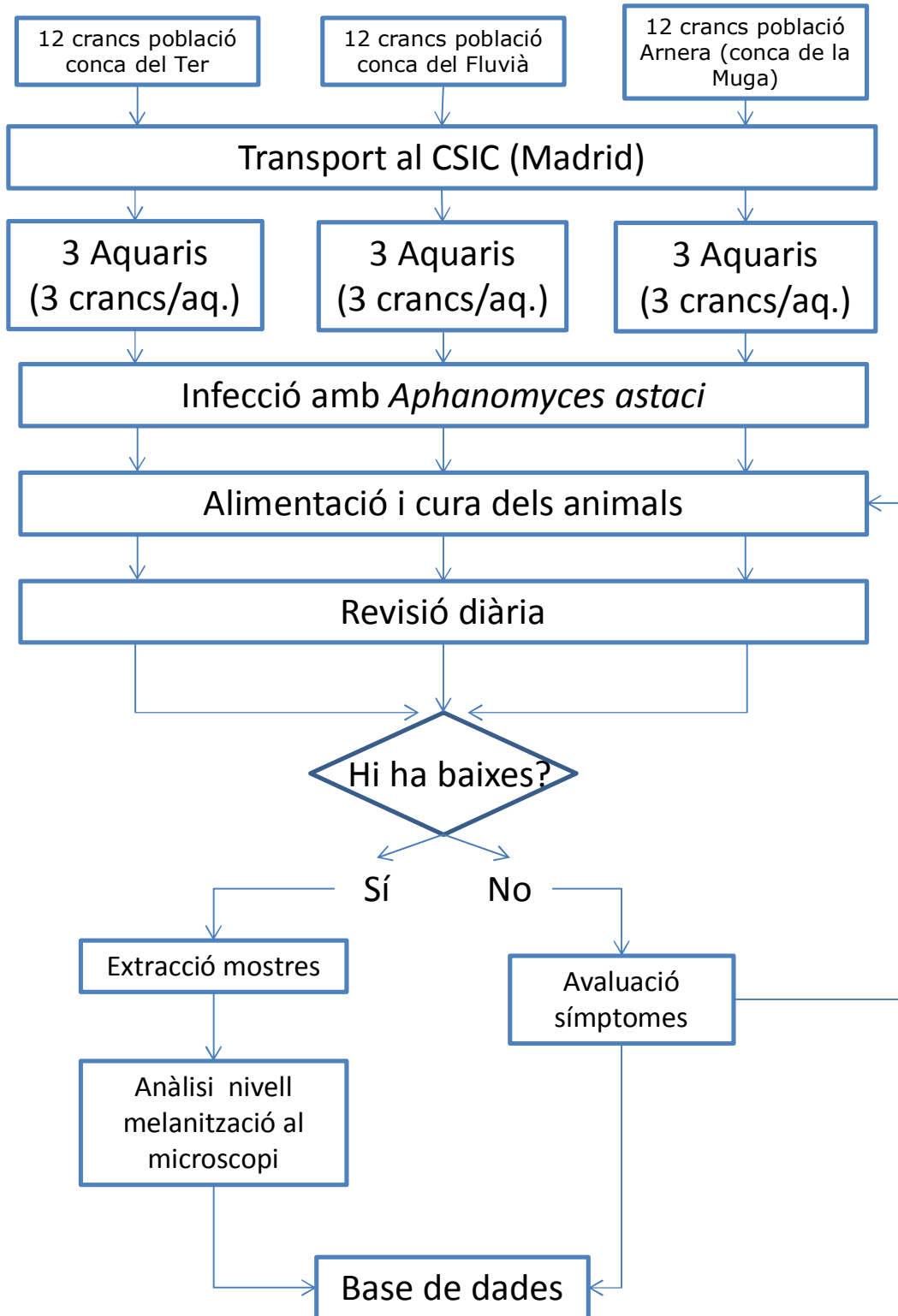


Figura 3. Esquema general del procediment que se llevarà a cabo durant el protocol

5.- TRATAMIENTO DE DATOS

- Se incluirán los datos obtenidos a una base de datos para realizar análisis estadísticos.
- En función de los resultados encontrados se valorará repetir el experimento, pero siempre manteniendo la población de Arnera y en todo caso cambiando las poblaciones del Ter y Fluvià.
- Asimismo, dependiendo de los resultados, se podría repetir el mismo experimento con las otras cepas provenientes de *Pacifastacus leniusculus* y *Orconectes limosus*. De ese modo, se podría comparar las diferentes virulencia de las cepas y la resistencia que realizan los cangrejos.

6.-BIBLIOGRAFÍA

ADL S.M., LEANDER B.S., SIMPSON A.G.B., ARCHIBALD J.M., ANDERSON O.R., BASS D., BOWSER S.S., BRUGEROLLE G., FARMER M.A., KARPOV S., LOLISKO M., LANE C.E., LODGE D.J., MANN D.G., MEISTERFELD R., MENDOZA L., MOESTRUP O.M., MOZLEY-STANBRIDGE S.E., SMIRNOV A.V., SPIEGEL F. (2005). Diversity, Nomenclature, and Taxonomy of Protists. *Syst. Biol.* 56(4)684-689, 2007.

ANDERSSON G, CERENIUS L (2002) Analysis of chitinase expression in the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. *Dis Aquat Organ* 51:139-147.

BENEJAM, LL. & SAURA-MAS, S. (2010). Pla pilot per a la conservació de la població de cranc de riu autòcton (*Austropotamobius pallipes*) de la riera de l'Arnera - Salines (conca de la Muga), 2010. Departament de Medi Ambient i Habitatge de Catalunya.

BENEJAM, LL. & SAURA-MAS, S. (2011). Desenvolupament del pla pilot per vetllar per l'estat de conservació i pervivència de la població de cranc de riu autòcton de la riera de l'Arnera - Salines, 2011 Departament de Medi Ambient i Habitatge de Catalunya.

BENEJAM, LL. & SAURA-MAS, S. (2012). Pla de xoc de l'afanomicosi per salvaguardar el cranc de riu de la Riera de l'Arnera (Massís de les Salines, Alt Empordà). Departament de Medi Ambient i Habitatge de Catalunya.

BENEJAM L., SAURA-MAS S. (2012) Seguiment de les poblacions de cranc de riu autòcton i de cranc roig americà al Parc de la Zona Volcànica de la Garrotxa, 2012.

DIEGUEZ-URIBEONDO J, HUANG T, CERENIUS L (1995) Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. Mycol Res 99:574-578.

DIÉGUEZ-URIBEONDO J. AND SÖDERHÄLL K. (1993). *Procambarus clarkia* Girard as a vector for the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* Schikora. Aqua. Fish. Manag. 24, 761-765.

DIÉGUEZ-URIBEONDO J., ROYO F., SOUTY-GROSSET C., ROPIQUET A. AND GRANDJEAN F. (2008). Low genetic variability of the white-clawed crayfish in the Iberian Peninsula: its origin and management implications. Aquat.Conserv., 18, 1, 19-31.

DIÉGUEZ-URIBEONDO, J., CO-AUTHORS: REZINCIUC, S., GALINDO, J., MONTSERRAT, J., (2013). AFLP- PCR and RAPD-PCR evidences of the transmission of the pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) to wild populations of European crayfish from the invasive crayfish species, *Procambarus clarkii*. Journal: Fungal Biology.

KOZUBÍKOVÁ E, FILIPOVA L, KOZAK P, _URIŠ Z, MARTIN MP, DIEGUEZ-URIBEONDO J, OIDTMANN B, PETRUSEK A (2009) Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in invasive American crayfishes in the Czech republic. Conserv Biol 23:1204-1213.

MAKKONEN, J. (2013) The crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*. Genetic diversity and adaptation to the host species. University of Eastern Finland. dissertations in forestry and natural sciences. no 105.

MATTHEWS, M. & REYNOLDS, J.D. (1990). Laboratory investigations of the pathogenicity of *Aphanomyces astaci* for Irish freshwater crayfish. Hydrobiologia 203: 121-126, 1990.

OIDTMANN B, HEITZ E, ROGERS D, HOFFMANN RW (2002) Transmission of crayfish plague. Dis Aquat Organ 52:159-167.

REYNOLDS J, SOUTY-GROSSET C (2012). Management of freshwater biodiversity: crayfish as bioindicators. Cambridge University Press. 384 pp.



Protocolo para el diseño de los experimentos de
afectación de la afanomiosi sobre
Austropotamobius pallipes



ANEJOS

ANEJO 1.- FICHA DE CAMPO PARA LA RECOJIDA DE EJEMPLARES DE *AUSTROPOTAMOBIOUS PALLIPES* EN LIBERTAD

**RECOJIDA DE EJEMPLARES DE *AUSTROPOTAMOBIOUS PALLIPES* EN
LIBERTAD**

Población		Data	
Coordenadas inicio tramo		Coordenadas fin tramo	
Colaboradores			
Nº machos grandes recogidos			

Observaciones:



Protocolo para el diseño de los experimentos de
afectación de la afanomicosi sobre
Austropotamobius pallipes



**ANEJO 2.- TABLA DE OBSERVACIÓN DEL EFECTO DE LA INFECCIÓN PARA
AFANOMICOSI**

TABLA DE OBSERVACIÓN DEL EFECTO DE LA INFECCIÓN DE AFANOMICOSI

Nº acuario	Población			Data de infección		Data revisión	
	Saludable	Letárgico	Débil	Errático	Postrado	Cercano a la muerte	Muerto
Cangrejo 1							
Cangrejo 2							
Cangrejo 3							

Observaciones: