

Gradu Amaierako Lana
Biologiako Gradua

***Rana dalmatina* erruteen eta mikroalga klorofitoen arteko sinbiosia: atariko karakterizazioa eta ikerketarako proposamenak**

Egilea:

Aroa Jurado Montesinos

Zuzendaria:

Aitor Laza eta Jose Ignacio Garcia

AURKIBIDEA

Abstract.....	2
Laburpena	2
Sarrera.....	3
Material eta metodoak	5
<i>Laginketa eremua</i>	5
<i>Mikroalga berdeen kolonizazioaren karakterizazioa</i>	6
<i>Denboran zeharreko alga berdeen dinamika</i>	7
Emaitzak	9
<i>Mikroalga berdeen kolonizazioaren karakterizazioa</i>	9
<i>Denboran zeharreko alga berdeen dinamika</i>	12
Eztabaida	16
Ondorioak	17
Etorkizunerako proposamenak	17
<i>Rana dalmatina-ren erruteen eta alga berdearen arteko sinbiosi mota</i>	18
<i>Alga berdeen eragina garapen enbrionarioan</i>	18
<i>Alga berdearen identifikazioa</i>	19
<i>Erruteen kolonizazioa putzuetan</i>	19
Bibliografia.....	20

Abstract

Taking into account the symbiosis between the North American *Ambystoma maculatum* salamander eggs and the *Oophila amblystomatis* green algae, the characterization of the colonization by green algae in *Rana dalmatina* frog eggs was made. To do so, a monitoring of the samples retrieved in different ponds was carried out with a digital camera, in order to analyze embryonic growth and algae development. At the same time, with the aim of evaluating accurately the invasion of green algae in the eggs masses, the chlorophyll a fluorescence was measured using a fluorimeter. On the other hand, samples of algae were extracted from the egg mass jelly and then cultivated to identify them. This analysis shows that green algae development of green algae occurs while the embryo is growing. In addition, it was concluded that the green algae that takes part in this phenomenon is part of the Chlorococcum genus of *Chlorococcaceae* family.

Laburpena

Ipar Amerikako *Ambystoma maculatum* arrabioaren arrautzen eta *Oophila amblystomatis* alga berdearen arteko sinbiosia oinarri gisa hartuz, *Rana dalmatina* igelaren erruteak kolonizatzen dituen alga berdearen karakterizazioa egin da. Horretarako, putzu ezberdinetatik jaso diren laginen jarraipena burutu da argazki kamera digitalen bidez. Modu honetan, garapen enbrionarioarekin batera alga berdeen hazkuntza aztertu da. Honekin bat, modu zehatzago batean alga berdearen kolonizazioaren emendioa behatzeko, fluorimetro bidez, a klorofilaren fluoreszentiaren emisioa neurtu da. Gainera, aipatutako alga berdearen identifikaziorako, arrautzaren gelatinan hazitako alga berdeen kulturak egin dira. Eginiko behaketak aztertuz, enbrionaren garapenarekin batera alga berdearen hazkuntza eman dela ikusi da, espezie bien artean sinbiosia dagoen seinale. Gainera, fenomeno honetan parte hartzen duen alga Chlorococcaceae familiako *Chlorococcum* generokoa dela ondorioztatu da.

Sarrera

Duela 120 urte, Ipar Amerikan, *Ambystomatidae* familiako arrabio (*Ambystoma gracile* eta *Ambystoma maculatum*) eta *Ranidae* familiako igel (*Lithobates sylvatica* eta *L. aurora*) espezie gutxiren arrautzak *Oophila amblystomatis* (Lambert ex White, 1909) alga berde flagelatuak kolonizatu zituztela ikusi zen (Graham *et al.*, 2014). Are gehiago, kolonizazio honen azpian, alga eta ornodunen arteko erlazio sinbiotikoa dagoela ikusi zen (Graham *et al.*, 2014). Fenomeno hau, besteak beste, Ipar Ameriketako *Ambystoma maculatum* (Shaw, 1802) arrabioaren arrautzen kapsulan beha daiteke, zeinak *Oophila amblystomatis* alga berde zelulabakarrarekin erlazio sinbiotiko mutualista erakusten duen (Small *et al.*, 2014).

Espezie honetako arrabio emeek ehunka arrautza jartzen dituzte udaberriro, babesa bermatzen dien gelatina matrizeetan antolatuak. Arrautzak putzuen gainazalean kokatzen dira, eta gehienetan, landaredia itsasten zaie. Hau honela, denbora aurrera joan ahala, aipatutako alga berdeak arrautza-masan barneratzen dira. Barnean, algaren bikoizketa eman, arrautzaren tarteko geruzara migratu eta arrautza bakoitzaren barne geruzara iristen dira. Gainera, azkeneko ikerketen arabera, bi espezie hauen artean, erlazio endosinbiotikoa ematen da. Izan ere, elkarrekintza enbrioi mailan ere ematen da, hau da, alga berdeen zenbait zelulek arrautzaren kapsula zeharkatu eta enbrioietara barneratzeko gai direla ikusi da (Graham *et al.*, 2014).

Bi espezie hauen arteko sinbiosia mutualista izanik, alga berde zein arrabioen arrautzek abantailak lortuko dituzte. Alde batetik, alga honen presentziak oxigenoaren presio partzialaren emendioa ekarriko du enbrioiaren kapsulan. Beraz, garapen enbrionario eta hazkuntza azkarragoa emango da (Graham *et al.*, 2014). Honekin bat, alge sortutako fotosintatoen transferentziaren emendioa ere emanez. Gainera, produktu antimikrobianoen igoera eta hondar nitrogenatuen eta CO₂-aren kanporaketan parte hartzen du, azken bi hauen kontzentrazioa murriztuz. Bestetik, algak amonio formako hondar nitrogenatuak, CO₂ kontzentrazioaren emendioa eta bere hazkuntzarako babesa lortuko du enbrioitik (Bishop eta Miller, 2014; Kim *et al.*, 2014).

Oophila amblystomatis alga berdeak *Ambystoma maculatum* espeziearen erruteak kolonizatzear gain, zenbait igel espezien arrautzak ere kolonizatzen ditu. Azken honen ebidentziak, Ipar Ameriketako soilik deskribatu dira. Hala ere, Europan ere antzeko fenomenoak gertatzen dela ikusi da, Polonia eta Vienan. Bertako zenbait putzu naturaletan

garapen enbrionario berantiarreko *Rana dalmatina* (Fitzinger, 1839) espeziearen arrautza-gelatinan alga berdeen kolonizazio nabaria ikusi da (Bonk *et al.*, 2012; Baumgartner *et al.*, 1996). Europan, Nafarroa eta Arabako hezeguneetan ere ikus daitekeen fenomeno da. Hala ere, erlazio sinbiotiko honen karakterizazioaren inguruan ez da lanik argitaratu orain arte.

Rana dalmatina, 40-80mm-ko luzera duen baso igel arrea da (Sarasola eta Gosá, 2014). Europa osoan zehar hedatzen da, Iberiar Penintsulan, hego-mendebaldean kokatzen delarik. Eskualde honetan, soilik, Nafarroa, Araba, Bizkaia eta Burgos inguruetara mugatzen den espeziea da.

Nahiz eta bizi zikloaren zati handi bat lurrean egiten duten ugalketa uretan ematen da, hainbat hezegune ezberdin erabiltzen dituztelarik. Orokorrean, bailaretan agertzen diren *Quercus robur* eta *Q. pyrenaica* haritzen zein mendikateen inguruko belardi hezetako putzu sareetan agertzen dira (Sarasola-Puente *et al.*, 2012). Hauek, landaredia nabariko eta sakonera handikoak izaten dira, arrainik gabekoak.

Azken hamarkadetan eman den deforestazioen ondorioz, ingurune hauen desagerpena eman da eta espezie honen banaketa gehiago mugatzea eragin du, geroz eta populazio isolatuagoak lortuz. Honek, *Rana dalmatina* espezie mehatxatuen zerrenda gorriaren barne egotea eragin du (Sarasola-Puente *et al.*, 2012).

Espeziearentzako baldintza onuragarriak direnean, hau da, putzua alga eta bestelako landarediaz kolonizatua dagoenean, emeak globo itxurako arrautzen pakete trinko bakarra askatuko du (Gosá, 2015). Hauek murgildutako adarretan edota uretako landaredien zurtoinetan atxikituta gertatzen dira. Azken ezaugarri hau, gainerako igel arreez bereizteko erabiltzen den ezaugarria da, hala nola, Iberiar Penintsulan agertzen den *Rana temporaria*-tik (Sarasola and Gosá, 2014). Arrautza bakoitza kapsula gelatinatsu batez babestua dago (Gosá, 2015) eta 1,5-2,5 mm-ko diametrokoak eta 12,7 mg-ko pisua dute batezbeste. Marroi kolorekoak dira, polo animala ia beltza eta polo begetatiboa zuriagoa izanik (Sarasola and Gosá, 2014).

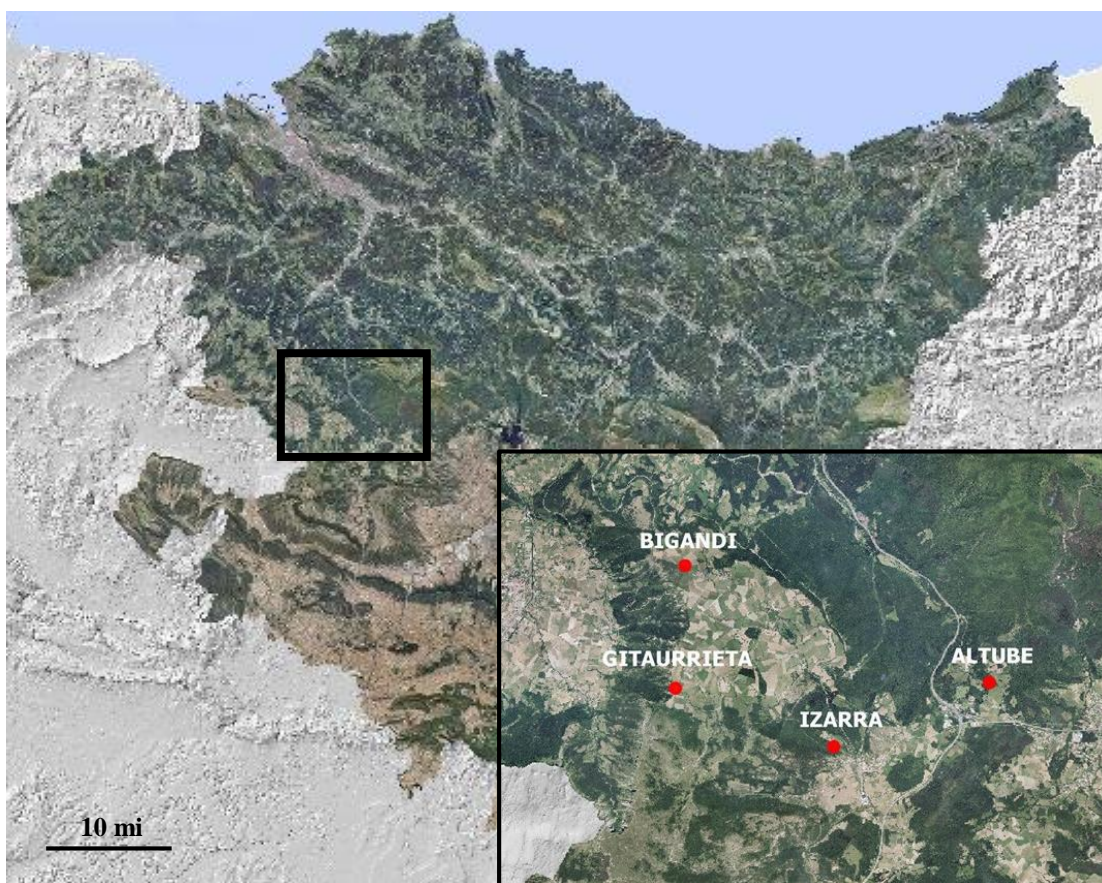
Lan honen helburuak *Rana dalmatina* igelaren erruteak kolonizatzen dituzten alga berdeen aurre-karakterizazioa eta denboran zehar alga berdeen kopuruaren aldaketaren azterketa burutzea dira. Modu honetan, algen identifikazioa, bizi-formen eta hauek duten antolaketa deskribatu dira. Gainera, arrautzen garapen enbriologikoa ematen den bitartean, alga berdeen kolonizazio maila determinatu da. Bestalde, besteak beste, bi

espezie hauen arteko sinbiosi mota eta espezie mailako algaren identifikaziorako etorkizunerako proposamenak aipatu dira azken atal batean.

Material eta metodoak

Laginketa eremua

Rana dalmatina espeziearen arrautzak Araban kokaturiko Urduña Altube zeharreko lautadan hartu ziren, 2016ko otsaila eta maiatza bitartean. Ingurune honetan lau hezegune aukeratu ziren, Bigandi, Altube, Gitaurrieta (Unza-unzaga) eta Izarra inguruko putzuak hain zuzen (1.irudia).



1. Irudia: Euskal Autonomi Erkidegoan, *Rana dalmatina* espeziearen arrautzen laginketa eremua eta laginketa puntuak.

Putzu hauetan, igel espezie bakarraren, *Rana dalmatina*, erruteak aurkitu ziren, *Rana Temporaria* goiztiarragoa baita. Hala ere, beste espezieen erruteetatik desberdintzeko putzu bazterretan agerian zein hondoratutako zurtoin eta hostoetara

itsatsita agertzen diren arrautza-masak hartzen dira kontuan. Gainera, espezie honen arrautza-masaren gainean alga berdeen kolonizazioa agertzen da (2.irudia).



2. Irudia: *Rana dalmatina* igelaren erruteak putzu ezberdinetan.

Aipatutako putzuetatik Gitaurrieta eta Izarrako putzuetako laginak erabili ziren algen berdeen hazkuntza denboran zehar behatzeko, Gitaurrietako sei lagin eta Izarrako bi lagin hartu zirelarik. Hauek, 20-40 arrautzez osatutako laginak ziren, garapen enbrionario ezberdinekoak, 1-12.5, 21-25, 26-30 faseetako arrautzak. Aipatutako garapen fase hauek Gosner faseetan oinarritzen dira, garapen enbrionarioa deskribatzen dituzten faseak. Gainerako putzuetatik hartutako laginak mikroalga berdeen karakterizazioa egiteko erabili ziren.

Mikroalga berdeen kolonizazioaren karakterizazioa

Alde batetik, Bigandiko putzutik hartutako arrautza-masen laginetik, arrautza bat isolatu eta bere osotasunean Nikon Eclipse T2000-UT alderantzizko mikroskopiorekin

eta luparen bidez behatu zen. Modu honetan, alga berdeen kolonizazioa non eman zen ikusi zen. Honekin batera, alga berdearen identifikazio taxonomikoa burutzeko helburuarekin, arrautza- gelatina zati txiki bat moztu, porta eta estalki artean jarri eta Leica DMRB mikroskopia zuzenarekin aztertu zen. Prozedura berdina jarraitu zen eklosionatu osteko arrautzaren kapsula eta gelatinako algekin. Horrela, arrautzaren gelatinaren kanpoaldean zein barnealdeko alga berdeen zelulak konparatu ziren.

Bestetik, algen zelulen isolamendua eta kulturak egin ziren. Horretarako, kolonizaturiko arrautzaren gelatina batetik abiatuz, alderantzizko mikroskopioan, beirazko kapilar baten laguntzaz gure intereseko zelulak harrapatu ziren. Bigandiko putzutik hartutako laginetik, lau zelula mota isolatu ziren, hiru zoospora (zelula flagelatuak), hiru hipnozigoto moduko zelula (zigoto mugiezina), zoosporangio bat (esporak biltzen dituen egitura) eta gainerakoak zelula txiki ez flagelatuak. Hauek, 24-ko mikroplaketan inokulatu eta inkubatu ziren, 1ml hazkuntza-medioarekin. Kulturen mantenurako, hazitako zelula klonalak saiodietara pasako ziren, 10mL-ko kultibo medio duena. Hauek, kultibo kameran mantendu ziren 17°C, 14 orduko argitasun eta 10 orduko iluntasunean, argi intentsitatea 50 L mol/m²/ s izanik. Prozedura berdina jarraitu zen Altubeko putzuetako laginekin. Kasu honetan eklosionatu ondorengo arrautzen gelatinako algen hiru zelula mota isolatu ziren, hiru zelula flagelatu txiki, zoosporangio bat eta zelula esferiko batzuk.

Denboran zeharreko alga berdeen dinamika

Arrautzetan emandako alga berdeen kolonizazioa eta hazkuntza aztertzeko, aipatutako bi putzuetatik 20-40 arrautzez osatutako laginak hartu ziren. Lagin bakoitza hamar arrautzez osaturiko bi azpilaginetan banatu zen. Egokiena, arrautzak, tenperatura hotzetan mantentzea zen, putzuetako negu-udaberriko baldintza naturalak erreproduzitzen. Helburu horrekin, Julabo F240 zirkuladore baten bidez bainu bat tenperatura hotzetan mantentzeko saiakera egin zen, baina aparatuaren funtzionamendu desegokiaren ondorioz, laborategian baldintza berezirik gabe mantendu ziren, baina ahal den neurrian tenperatura baxu eta argi naturalpean.

Denboran zehar alga berdeen kopuruaren aldaketa behatzeko metodo ezberdinak erabili ziren, hala nola, argazki digital (Olympus 790 SW) bidezko kolore-indizeen, a klorofilaren fluoreszentiaren emisioaren (Fo) neurketa eta, Fv/Fm parametroaren bidez, algen efizientzia fotosintetikoaren denboran zehar nola aldatzen den behatu zen.

Alde batetik, esan bezala, denboran zeharreko alga berdeen kolonizazioa aztertzeko, azpilagin bakoitzaren argazki digitalen bidezko behaketa jarraia burutu zen. Erruteen lagin bakoitzeko bi azpilagin izanik, guztira, hamasei lagin aztertu ziren. Gainera, lagin-argazki bakoitzeko arrautzen garapen-fasea determinatu zen garapen enbrionarioa deskribatzen duten Gosner faseetan oinarrituz. Laborategiko baldintzak kontuan hartuta, tenperatura altuak kasu, enbrioien garapen azkarra eman eta astebeteko epean enbriogenesi prozesua amaitu zen. Beraz, hau kontuan hartuz, argazkiak egunero hartu ziren, ordu jakinean eta laginaren eta argazki kameraren distantzia tartea mantenduz.

Behin argazkien bilduma lortuta, alga berdeen hazkuntza determinatzeko, berdetasun indizeak kalkulatu ziren. Horretarako, argazkiak ImageJ programa bidez tratatu eta Red-green-blue analisiak (RGB) burutu ziren. Programa honen bitartez, argazki bakoitzaren arrautzen eremua definitu eta lagin bakoitzeko gorri, berde eta urdin kolorearen informazioa lortu zen. Emaitza hauetatik abiatuz, gorritasun, berdetasun eta urdintasun indizeak kalkulatu ziren. Hauek kalkulatzeko, G kolore berdearen adierazle eta R eta B kolore gorri eta urdinarena izanik, hurrengo formulak erabili ziren (Junker & Ensminger, 2016):

$$\text{Berdetasun indizea (Gcc)} = G / (R + G + B)$$

$$\text{Gorritasun indizea (Rcc)} = R / (R + G + B)$$

$$\text{Urdintasun indizea (Bcc)} = B / (R + G + B)$$

Indize hauek, argazki bakoitzerako kalkulatu eta ondoren lagin bakoitzeko batezbestekoa egin zen. Bestetik, helburu berdinarekin, alga berdeen kolonizazioaren emendioa behatzeko, a klorofilaren fluoreszentiaren emisioa (Fo) neurtu zen fluorimetria bidez. Horretarako fase goiztiarrean dauden hiru arrautza zoriz aukeratuko

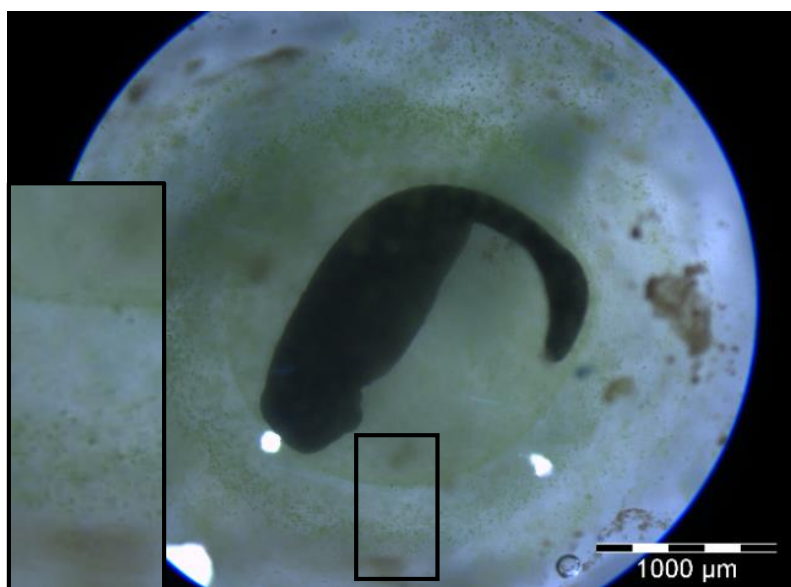
ziren eta FluorCam7 software bidez kontrolaturiko Handy Fluorcam irudi fluorimetroa erabiliz, egunero, fluorimetria egin zen.

Fluorimetria bidez lorturiko argazkiak FluorCam programaren bidez analizatu ziren. Bertan, interesekoa den arrautzen area eta ondoren, arrautza bakoitzaren area definitu zen. Modu honetan, pixel bakoitzeko eta markaturiko arrautzen Fo eta Fv/Fm parametroak lortu ziren. Fo parametroa a klorofilaren fluoreszentsia minimoaren emisioaren adierazlea da, Fv/Fm, aldiz, erreakzio fotokimikoen efizientziaren adierazlea, fotosintesiaren efizientziarekin erlazionatuta dagoena. Egunero ateratako argazki bakoitzarekin prozedura berdina jarraitu zen.

Emaitzak

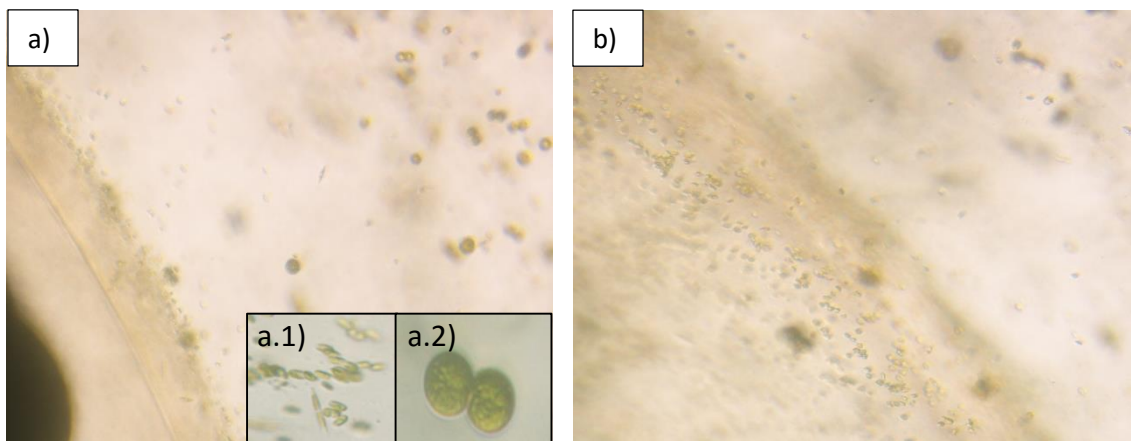
Mikroalga berdeen kolonizazioaren karakterizazioa

Bigandiko putzutik isolaturiko arrautza luparekin begiratu gero, gelatinan alga berdeen kolonizazioa zegoela ikusi zen, zelula kontzentrazio ezberdineko geruzak desberdintzen zirelarik. Batetik, alga berdeen zelulak gelatinaren kanpoaldean zein kapsularen inguruan agertzen ziren. Bestetik, gelatinan eta kapsularen artean zelula gutxiko geruza bat behatu zen (3. irudia).



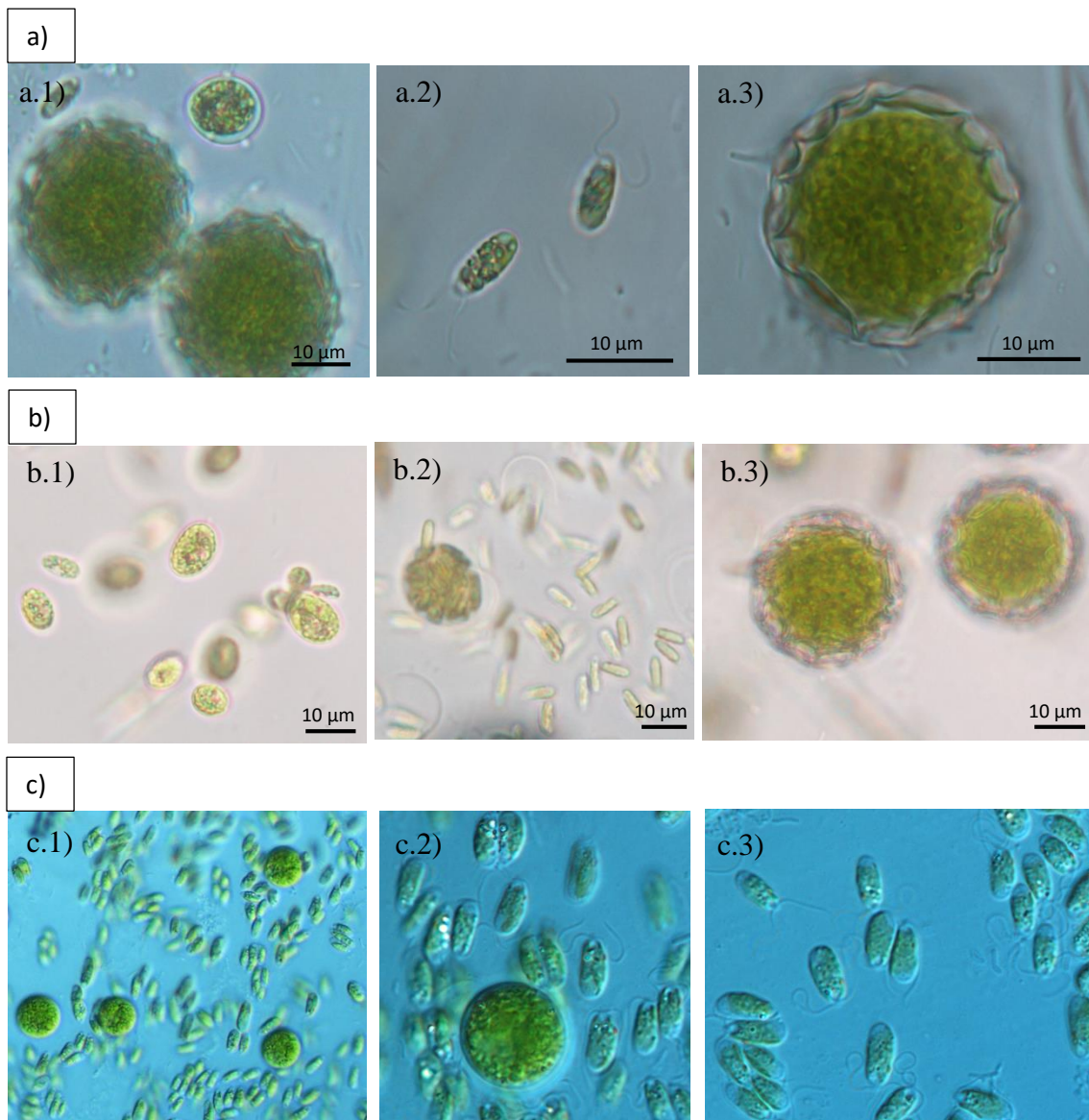
3. Irudia: Bigandiko putzutik isolaturiko arrautza lupa bidez aztertuta eta argazkiaren ezkerrean gelatinan zeharreko alga berdeen banaketaren handivena.

Alderantzizko mikroskopia bidez aztertuz, zelulek, tamainari dagokionez, gradiente bat jarraitzen dutela ikusi zen. Hau da, arrautzaren gelatinaren kanpoaldean, zelula handien kontzentrazioak ikusten ziren (4. b) irudia). Gelatinan sakondu ahala, tamaina berdineko zelula gutxi geruza behatu zen eta kapsula mailan, zelula txikien kontzentrazio handiak (4. a) irudia).



4. Irudia: Bigandiko putzutik isolaturiko arrautza alderantzizko mikroskopia erabiliz 10eko handipena erabilita a) arrautzaren kapsula eta zelula gutxi geruza a.1) mintz inguruko zelula txikiak 40ko handipenarekin a.2) gelatinan zeharreko zelula handiak.40ko handipenarekin b) gelatinaren kanpoaldean agertzen diren zelula handiak-

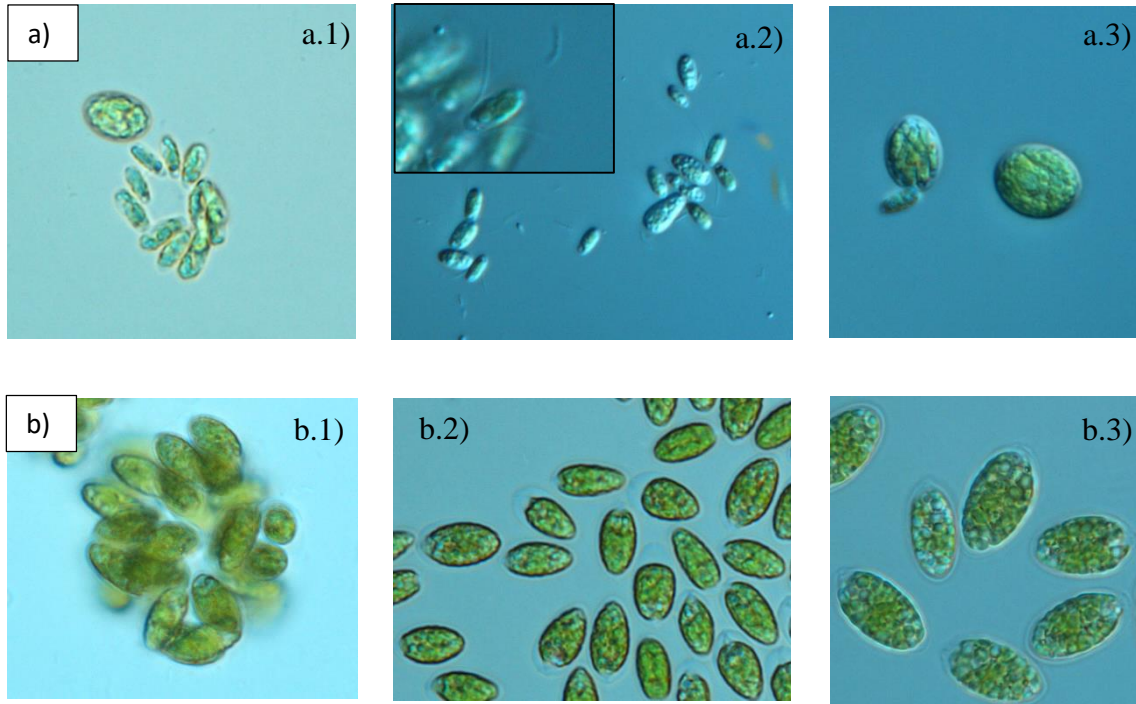
Bigandiko arrautzen garapen enbrionarioan zehar zein eklosio osteko gelatinatik alga berdeen lagin txiki bat hartuz eta mikroskopia bidez behatuz, bizi zikloaren fase ezberdinak behatu ziren. Hala nola, flagelatuak ez ziren zelula txikiak (5. a.1) eta b.1) irudiak); zoosporak diren zelula asexual biflagelatu txikiak (5. a.2) eta b.2) irudiak); zoosporangioak, zoosporak sortzen dituzten zelulak (5. b.2) irudia) eta hipnozigoto gisa sailkaturiko zelula handi biribilak (5. a.1), a.3) eta b.3) irudiak) . Hala ere, eklosio osteko kapsularen argazkiak behatuz, zelula esferikoak eta zoosporak soilik agertzen ziren (5. c) irudia).



5. Irudia: a) Bigandiko arrautzaren gelatinatik modu zuzenean mikroskopio bidez aztertutako alga berdeak a.1) hipnozigoak, zoosporak eta flagelatuak ez diren zelula txikiak 40ko handipenarekin a.2) zoosporak 100eko handipenarekin a.3) hipnozigoak. 100eko handipenarekin b) Bigandiko eklosio osteko arrautzaren gelatinatik modu zuzenean isolaturiko alga berdeak 40ko handipenarekin b.1) zelula txiki ez flagelatuak 20ko handipenarekin b.2) zoosporangioa eta zoosporak 40ko handipenarekin b.3) hipnozigoa 40ko handipenarekin. c) Bigandiko eklosio osteko arrautzaren kapsulatik modu zuzenean isolaturiko alga berdeak c.1) zoosporak eta zelula txikiak 40ko handipenarekin c.2) zoosporak eta zelula txikiak 100eko handipenarekin c.3) zoosporak 100eko handipenarekin.

Aurrez isolaturiko alga berdeen zelulak kultibatu ondoren, egitura antzekoak behatu ziren. Batetik, Bigandiko putzutik isolaturiko alga berdeen kasuan, kultibaturiko zelulen artean guztiak hazi zirela behatu zen, hau da, zoosporen (6. a) irudiak), zoosporangio (6 a.1) eta a.3) irudiak) eta zelula txiki ez flagelatuaren hazkuntza eman zen, salbuespena hipnosporaren lagina izanik. Bestetik, Altubeko putzutik isolaturiko

zoosporangio eta zelula txiki ez flagelatuak kultiboetan hauen hazkuntza eman zela ikusi zen, zelula esferikoen kultiboan, aldiz, ez zen hazkuntzarik behatu (6. b) irudia).

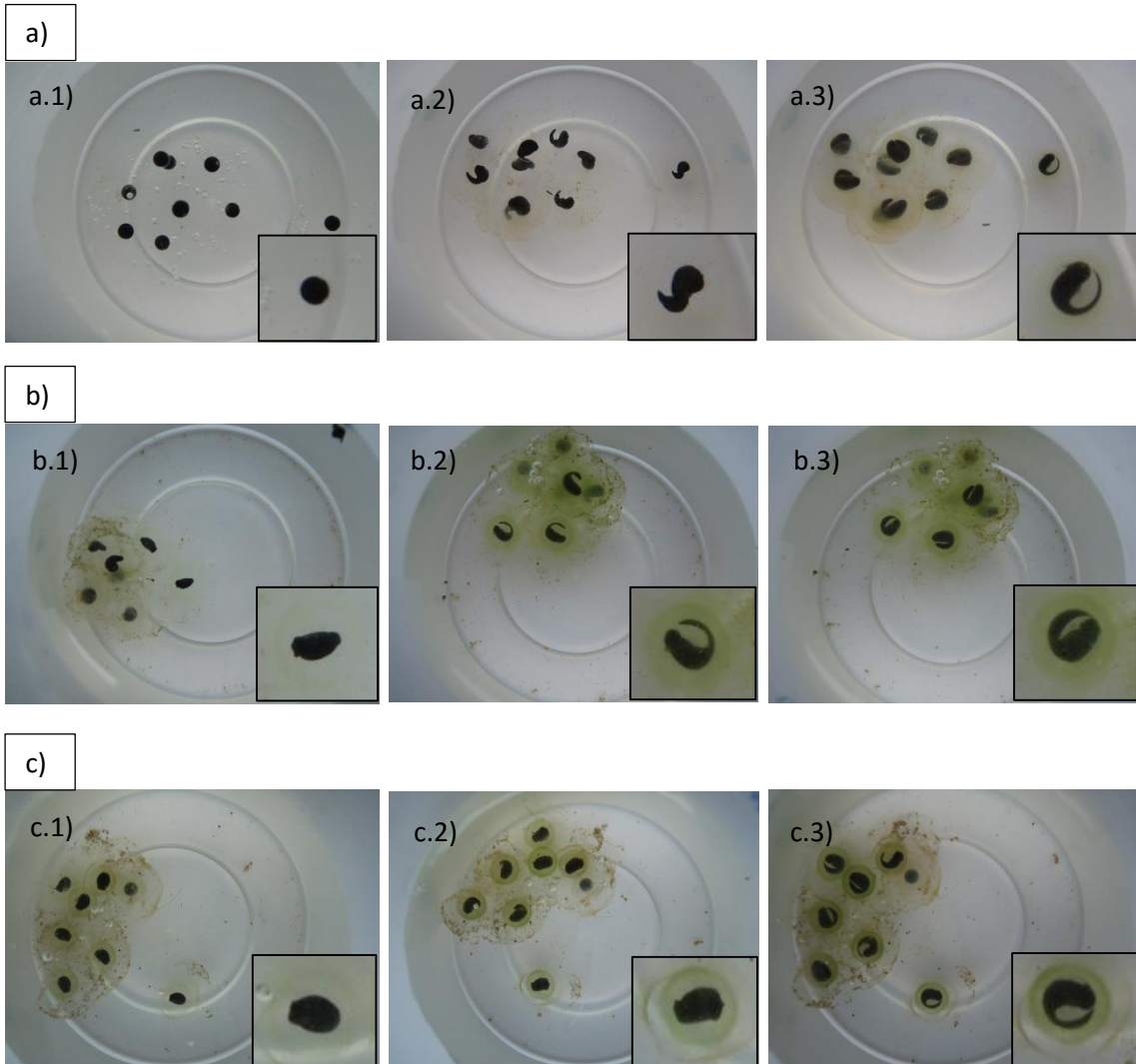


6. Irudia: isolaturiko alga berdeen zelulen kultiboak a) Bigandiko arrautzaren gelatinatik isolaturiko algen kultiboak a.1) zoosporangioa eta zoosporak 60ko handipenarekin a.2) zoosporak 60ko handipenarekin a.3) zoosporangioa eta zoosporak. 60ko handipenarekin b) Altubeko arrautzaren gelatinatik isolaturiko algen kultiboak b.1) zelula txiki ez flagelatuak multzoak 60eko handipenarekin b.2) zelula txiki ez flagelatuak 60eko handipenarekin b.3) zelula txiki ez flagelatuak 100eko handipenarekin.

Denboran zeharreko alga berdeen dinamika

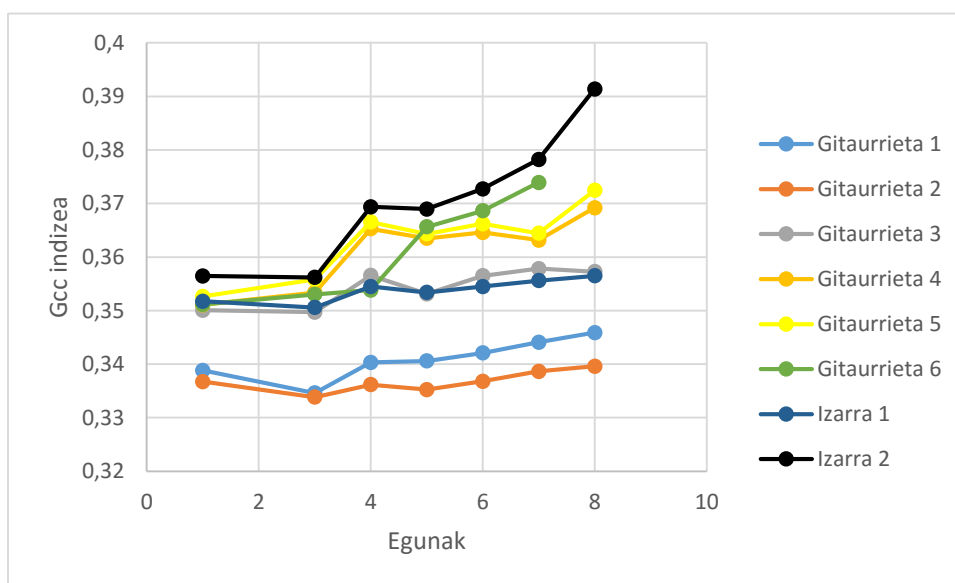
Alde batetik, argazki digitalen bidez eginiko jarraipenean, lagindutako bi putzuetan joera berdina ikusi zen, denboran zehar, garapen enbrionarioa ematen zen heinean, alga berdeen presentzia emendatzen zen. Hala ere, algen hazkuntza ez zen berdina kasu guztietan, garapen enbrionario maila ezberdinetako laginetan algen kolonizazio maila ezberdina eman zen. Putzuetatik hartutako 1-12.5 Gosner fasean zeuden arrautzetan (7 a) irudia) alga berdeen garapen gutxiago beha ziteken. 21-25 eta 26-30 faseetan zeuden enbrioietan, aldiz, algen garapen eta kolonizazio handiagoa (7. b) eta c) irudiak).

Bestetik, alga berdeen garapena soilik gelatina kanpoaldean eman beharrean, barnealdean eman zen, kapsula inguruan, alegia. Azken honetan ematen zen alga berde hauen garapena nahiko uniforme zela beha zitekeen. Hala ere, zenbait kasuetan, enbrioia garatzen hari zen gunean hazkuntza nabariagoa ikusi zen (7. c.2) eta c.3) irudiak). Alga berde hauen hazkuntzaz gain, enbriogenesi bukaeran, arrautzen gelatinaren kanpoko geruzetan alga arreen agerpena ematen zela behatu zen. (7.c) irudia).



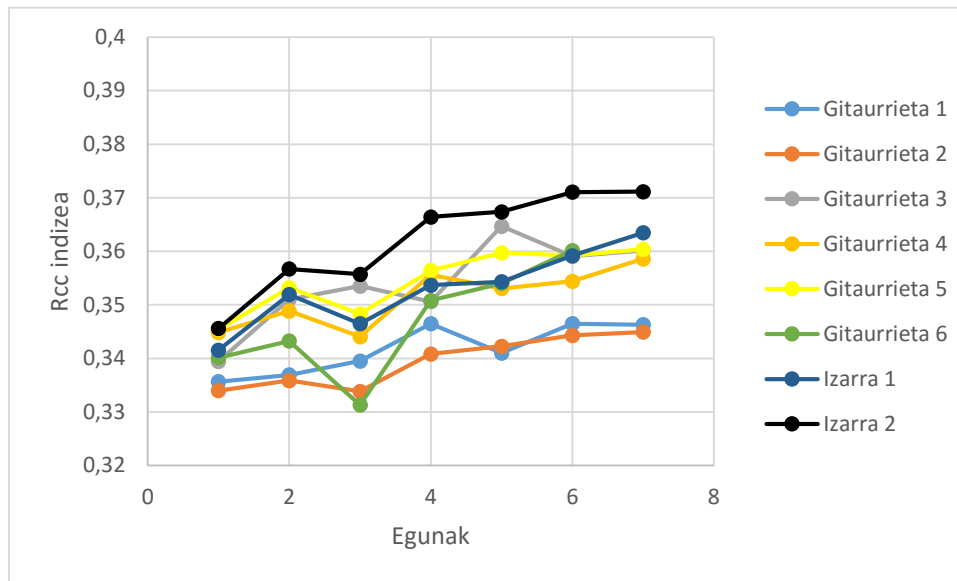
7. Irudia: 18 laginetik aukeraturiko hiru lagin errepresentagarrien alga berdeen hazkuntzaren jarraipena garapen enbriologikoan zehar. Lagin bakoitzeko zazpi argazkietatik hiru aukeratu dira eta argazki bakoitzerako bertako arrautza baten handipena egin da algaren hazkuntza hobeto ikusteko. a) Gitaurretako putzuan hartutako arrautzen jarraipena a.1) 1-12.5 faseko arrautzen argazkia, 2016/03/16 a.2) 31-35 faseko arrautzen argazkia, 2016/03/20 a.3) 36-44 faseko arrautzen argazkia, 2016/03/23 b) Gitaurretako putzuan hartutako arrautzen jarraipena b.1) 21-25 faseko arrautzen argazkia, 2016/03/16 b.2) 36-44 faseko arrautzen argazkia, 2016/03/20 b.3) 36-44 faseko arrautzen argazkia, 2016/03/21 c) Izarrako putzuan hartutako arrautzen jarraipena c.1) 26-30 faseko arrautzen argazkia, 2016/03/16 c.2) 26-30 faseko arrautzen argazkia 2016/03/19 c.3) 36-44 faseko arrautzen argazkia, 2016/03/21

Gitaurrieta zein Izarrako putzuetatik hartutako arrautzen lagin guztietan berdetasun indizearen (Gcc) emendioa behatu zen, nahiz eta igoera hau lagin guztietarako berdina ez izan. Izan ere, zenbait kasuetan berdetasun indizearen aldaketa nabariagoa zen, 21-25 eta 26-30 fasean bildutako arrautzetan hain zuzen ere, garapen enbrionario maila altuagoa zutelarik. Fase goiztiarreko arrautzetan, aldiz, berdetasun indizearen emendio lausoagoa eman zen. Gainera, azken hauen hasierako Gcc indizea baxuagoa zen enbriogenesi berantiarra zutenekin alderatuz gero (8.irudia).



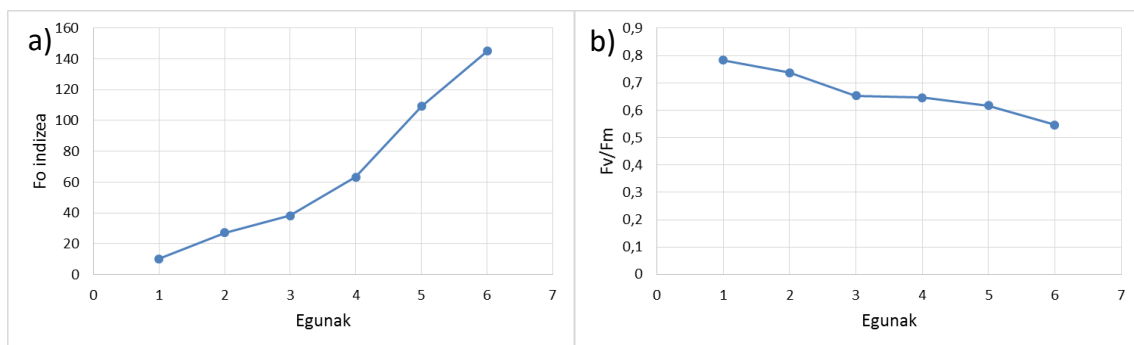
8. Irudia: Gitaurrieta eta Izarrako putzutik hartutako lagin ezberdinen berdetasun indizearen aldaketa denboran zehar. Gitaurrieta 1 eta 2 garapen enbrionario goiztiarreko laginak dira, 1-12.5 faseko arrautzak. Gitaurrieta 3 eta 4 21-25 faseko arrautzak eta Gitaurrieta 5 eta 6 eta Izarra 1 eta 2 laginak, 26-30 fasekoak. Geroz eta lagin-zenbaki altuagoa izan, orduan eta garapen enbrionario maila altuagoa da.

Berdetasun indizearen joera berdina jarraituz, lagin guztietan gorritasun indizearen emendioa ikusi zen. Berdetasun indizearen grafikaren antzera, hemen ere, aldaketa nabariagoak beha zitezkeen garapen enbrionario altuagoa zuten laginetan. Hala ere, joera ez zen beti goranzkoa, Gitaurrietako laginean kasu, gorabeherak behatu ziren (9. irudia).



9. Irudia: Gitaurrieta eta Izarrako putzutik hartutako lagin ezberdinen gorritasun indizearen (Rcc) aldaketa denboran zehar. Gitaurrieta 1 eta 2 garapen enbrionario goiztiarreko laginak dira, 1-12.5 faseko arrautzak. Gitaurrieta 3 eta 4 21-25 faseko arrautzak eta Gitaurrieta 5 eta 6 eta Izarra 1 eta 2 laginak, 26-30 fasekoak. Geroz eta lagin-zenbaki altuagoa izan, orduan eta garapen enbrionario maila altuagoa da.

Fluometria bidez kalkularituko Fo eta Fv/Fm indizeei erreparatu, Fo indizearen emendioa ematen zela ikusi zen, Fv/Fm-rena murrizten zen bitartean. Hau da, garapenean zehar a klorofilaren fluoreszentiaren emisioa emendioa eta fotosintesiaren efizientzia murrizpena eman zen (10. Irudia).



10. Irudia: Gitaurrietako putzutik hartutako 3 arrautzen a) Fo indizearen batezbestekoen jarraipena denboran zehar b) Fv/Fm indizeen batezbestekoen jarraipena denboran zehar.

Eztabaida

Rana dalmatina-ren erruteetan hazten ziren alga berdeak aztertuz, genero berdineko mikroalgak zirela ondorioztatu zen, bizi zikloaren fase ezberdinak (zoosporangioak, hipnozigotoak eta zoosporak) agertzen zirelarik. Hauen morfologian eta egituran oinarrituz, gorputz esferikoa eta zoosporetan agertzen zen kopa itxurako kloroplasto bakarra kasu, arrautzak kolonizatzen zituen alga berdeak Chlorococcaceae familiako *Clorococcum* generokoa zela ondorioztatu zen. Hala ere, edozein kasutan, hau egiaztatzeko, alga berdeen identifikaziorako bestelako teknikak erabili beharko lirateke. Bestetik, kultibaturiko lagin batean, beste kultiboetan ikusi ez zen zelula esferikoak agertu ziren. Beraz, alga berdeen espezie ezberdinak agertu daitezkeela dirudi.

Denboran zeharreko arrautzetan ematen zen alga berdeen kantitate aldaketa behatuz, garapen enbrionario aurrera joan ahala, alga hauen hazkuntza ere ematen zela ikusi zen. Alga berdeen hazkuntza arrautzaren kapsularen inguruan ere ematen zenez, esan zitekeen, nolabaiteko gaitasuna zutela arrautzaren gelatina zeharkatzeko, hau algaren zenbait zelula flagelatuak zirelako gerta zitekeen. Hau guztia kontuan hartuz, bi espezie hauen artean sinbiosia dagoela ondorioztatu zen.

Honekin bat, berdetasun indizearen emendioa ikusi zen, alga berdeen hazkuntzaren adierazle. Gainera, garapen enbrionario goiztiarra aurkezten zuten laginetan hasierako berdetasun indizearen balioa txikiagoa zen. Fase berantiarreko arrautzetan, ordea, indizearen balioa altuagoa zen. Beraz, putzuetan alga berdeen lehenengo kolonizazio faseak gertatzen zirela ondorioztatu zen, kolonizazioa jasan ostean arrautzaren gelatina barnean hazkuntza ematen zelarik. Horrenbestez, putzuetan denbora gehiago egon ziren arrautzek, hau da, garapen enbrionario altuago zutenek, alga berdeen kolonizazio maila altuagoa zuten eta denbora gutxiagoan egondakoak, garapen enbrionario baxuagoa zutenak, kolonizazio maila baxuagoa.

Gainera, alga berdeekin batera, alga diatomeo arreen hazkuntza ere eman dela ikus zitekeen. Diatomeoen kasuan, alga berdeak ez bezala, arrautzaren gelatinaren kanpoaldean garatzen ziren. Diatomeoak alga ez-flagelatuak izanik, ezingo lirateke gelatinan zehar barneratu kanpo-azalean geratuko liratekeelarik. Honekin alderatuz, behatutako klorofizeoek gelatinan barne hazteko erakutsi duten gaitasuna, igel-arrautza-masekin duten erlazio sinbiotikorako moldapena denaren hipotesia plazaratu genezake.

Fo balioaren emendioa behatu zen. Fo, a klorofilaren fluoreszentziaren neurtzen duen indizea izanik, a klorofila kantitate gehiagoren adierazle da (Rios eta Araya 2002). Hortaz, a klorofilaren kantitatearen igoera egonik, alga berde gehiagoren adierazle izango da. Ondorioz, arrautzaren garapena ematen zen bitartean, alga berdearen kantitatea handitu zen. Bestalde, Fv/Fm indizea aztertuz, denboran zehar honen beherakada ematen zela ikusi zen, hau da, erreakzio fotokimikoen efizientziaren murrizpena eman zen. Hau, algen arteko kompetentziagatik izan zitekeen. Izan ere, denborarekin alga berdeen kantitatea emendatzen zenez, nutrienteak eta karbono dioxidoa (CO₂) bereganatzeko lehiak sortzen dira, hauen eskuraketa zailduz. Hortaz, nutriente gutxiago lortzean, erreakzio fotokimikoen efizientzia murriztu zen.

Ondorioak

Rana dalmatina espeziearen erruteak kolonizatzen dituen alga berdea *Clorococcum* generokoa dela ondorioztatzen da eta bi espezie hauen artean sinbiosia ematen dela esan daiteke. Izan ere, denbora aurrera joan ahala bi hauen garapena eta hazkuntza ematen baita. Hala ere, eginiko azterketekin ezin daiteke sinbiosia mota determinatu.

Etorkizunerako proposamenak

Lan honetan burutu den karakterizazioaren ostean hainbat galdera eta zalantza geratu dira argitzeko *Rana dalmatina* espeziearen eta honen erruteak kolonizatzen dituen alga berdearen inguruan. Beraz, hauek argitzeko helburuarekin hainbat esperimentu proposatuko dira; bi espezie hauen artean ematen den sinbiosi mota (parasitismoa, mutualismoa...) ezagutzeko, garapen enbrionarioan algek duten eragina behatzeko, mikroalgaren identifikazio zehatzagoa eta *Oophila amblystomatis* (Chlorophyceae) alga kolonizazioan parte hartzen duen alga den determinatzeko eta erruteen kolonizazioa putzuetan hazitako alga berdeen bitartez ematen dela frogatzeko.

Rana dalmatina-ren erruteen eta alga berdearen arteko sinbiosi mota

Lanean ikusi den bezala, *Rana dalmatina*-ren arrautzen eta mikroalga berdeen artean sinbiosia ematen da. Sinbiosi mota ezagutzeko enbrioia algek sintetizatutako konposatu organikoak erabiltzen dituen ikusiko da. Horretarako, C¹⁴-aren asimilazioan oinarrituriko teknika proposatzen da, zeinetan algek fixaturiko karbonoa enbrietara emandako transferentzia aztertzea baimenduko duen. Arrautzak hainbat tratamenduen (arrautzak argipean eta iluntasunean; arrautzetatik aterako enbrioia argitasun eta iluntasunean) eraginpean jarri ondoren, erradiazioa neurtuko da. Modu honetan, tratamendu ezberdinetara doitutako laginak konparatuz, erradiazio altuena erakusten duenak karbonoa bereganatu duen seinale izango da (Graham *et al.*, 2014).

Alga berdeen eragina garapen enbrionarioan

Lanean aipatu bezala, alga berdeen hazkuntzaren aldaketa denboran zehar determinatzeko, putzuetatik hartutako arrautza-laginen argazki digitalen bidezko jarraipena eta Fo eta Fv/Fm indizeak neurtu dira. Modu honetan, garapen enbrionarioarekin batera algen populazioen hazkuntza eman dela behatu da, baina alga berdeen dentsitateak eragina du enbrioiaren hazkuntza eta garapenean? Galdera honi erantzuteko argipean dauden arrautzak iluntasunean eta fotosintesi inhibitzailea duten arrautza-masekin konparatzen duen esperimentua proposatzen da. Horretarako arrautza-masa hiru zatitan banatuko da eta bakoitza, aipatu bezala, tratamendu baten eraginpean jarriko da. Hiru tratamendu burutuko dira; kontrol gisa jardungo duena (argitasunean), iluntasunean egingo dena eta fotosintesiaren inhibitzailea den DCMU errektiboa duena. Arrautzak, naturako baldintzak mantentzearen, 8°C-tan eta 12 orduko argitasunean gordeko dira 30 egunez. Algen populazioaren dentsitatea behatzeko, arrautzak fosfato tanpoidun disoluzioan barneratuko da, arrautzen apurtuz enbrioia askatuz. Aldi berean, arrautzaren fluidoak eta mintzak askatuko dira. Hauei zenbait errektibo gehitu ondoren zentrifugatu eta alga isolatzea lortuko da hauen zenbaketa baimenduz. Beraz, garapen enbrionarioan zehar, prozesu hau errepikatuz, tratamendu ezberdinetan alga berdeen dentsitatea determinatzea lortuko da hauen eragina behatuz (Graham *et al.*, 2014).

Era berean, algen garapena dagoen egiaztatzeko beste teknika bat fluorimetria izan daiteke. Handy fluorimetroa erabili ordez, bigarrenko fotosistemako a klorofilaren kontzentrazioa eta etekin kuantikoaren neurketa egin daiteke pulstuen anplitudeekin modulatuak (PAM) fluorimetria bidez (Bishop and Miller, 2014).

Alga berdearen identifikazioa

Arrautzen masak kolonizatzen dituzten algen identifikaziorako mikroskopioa erabili da. Honen bidez, alga berdea genero mailara arte soilik identifikatzea lortu da. Espezie mailako identifikazioa lortzeko, teknika zehatzagoak eta konplexuagoak daude, sekuentziario molekularrak eta analisi filogenetikoak. Kasu honetan, arrautzaren kapsulatik lorturiko alga berdeetan oinarrituriko analisisia proposatzen da. Erabiliko diren erruteen laginak, arrautza barnean jadanik alga berdearen hazkuntza ikusten denean hartuko dira. Laginetik alga berdeak lortzeko, arrautza zulatu, kapsulako fluidoak kendu eta diluzioak egingo dira. Hauek saiodietan mantenduko dira 15-20°C-etan eta 12 orduko argipean. Ondoren, alga berdeen DNA-ren erauzketa eta PCR-a egingo da. Lorturiko zati anplifikatuak purifikatu eta Sanger sekuentziarioa burutuko da (Kim *et al.*, 2014). Algaren identifikaziorako, alga berdeen espezieen sekuentziekin konparatu dira, GenBank datu basetik lortuak, analisi filogenetikoaren bidez (Kim *et al.*, 2014). Beraz, teknika honen bidez, *Rana dalmatina* erruteen algen kolonizazioa *Oophila* generoari dagokion determinatzea lortuko da.

Erruteen kolonizazioa putzuetan

Putzuetatik hartutako arrautza-laginetan jadanik alga berdeen hazkuntza beha zitekeen, baina alga berdea *Rana dalmatina*-tik erruteetara edo putzuetatik erruteetara pasatzen da? Hau determinatzeko, putzuetako ur laginak bi garai ezberdinetan hartuko dira eta bertako algen DNA-aren PCR-a egitea proposatzen da. Ur laginak igelaren errutealdian eta honen ostean hartuko dira. Lagin hauek filtratu eta mintzean geraturiko zelulen DNA-aren erauzketa burutuko da. DNA erauzia izanik, PCR-an oinarrituko entsegua egingo da, taxoiarentzat espezifikoa diren hasleak erabiliz. Lortutako 18rDNA sekuentziak purifikatu eta arrautza-masatik zuzenean hartutako *Oophila* espezieari dagokion sekuentziak analisi filogenetiko baten bidez konparatuz, ikusi daiteke, alga berde hau errutealdi hasieran, bitartean edo amaieran soilik agertzen den. Modu honetan

putzuetako algak arrautza-masa kolonizatzen duen edo zuzenean arrautzaren parte diren determinatuko da (Lin eta Bishop, 2015).

Bibliografia

Baumgartner, C., Bitschi, N., Ellinger, N., Gollmann, B., Gollmann, G., Köck, M., ... & Waringer-Löschenkohl, A. (1996). Laichablage und Embryonalentwicklung von Springfrosch (*Rana dalmatina* BONAPARTE, 1840) und Grasfrosch (*Rana temporaria* LINNAEUS, 1758) in einem syntopen Vorkommen. *Herpetozoa*, 9 , 133-150.

Bishop, C. D., & Miller, A. G. (2014). Dynamics of the growth, life history transformation and photosynthetic capacity of *Oophila amblystomatis* (Chlorophyceae), a green algal symbiont associated with embryos of the northeastern yellow spotted salamander *Ambystoma maculatum* (Amphibia). *Symbiosis*, 63, 47-57.

Bonk, M., Bury, S., Hofman, S., Szymura, J. M., & Pabijan, M. (2012). A reassessment of the northeastern distribution of *Rana dalmatina* (Bonaparte, 1840). *Herpetology Notes*, 5, 345-354.

Gosá, A. (2015). La rana ágil: el eco sordo de los robledales. Colección Monografías de Anfibios del País Vasco y Navarra, 1. Sociedad de Ciencias Aranzadi, Donostia-San Sebastián.

Graham, E. R., Fay, S. A., Davey, A., & Sanders, R. W. (2014). Intracapsular algae provide fixed carbon to developing embryos of the salamander *Ambystoma maculatum*. *The Journal of experimental biology*, 217, 2983-2983.

Junker, L. V., & Ensminger, I. (2016). Relationship between leaf optical properties, chlorophyll fluorescence and pigment changes in senescing *Acer saccharum* leaves. *Tree physiology*, tpv148.

Kim, E., Lin, Y., Kerney, R., Blumenberg, L., & Bishop, C. (2014). Phylogenetic analysis of algal symbionts associated with four North American amphibian egg masses. *PLoS one*, 9, e108915.

- Laza-Martínez, A., David, H., Riobó, P., Miguel, I., & Orive, E. (2015). Characterization of a Strain of *Fukuyoa paulensis* (Dinophyceae) from the Western Mediterranean Sea. *Journal of Eukaryotic Microbiology*.
- Lin, Y., & Bishop, C. D. (2015). Identification of free-living *Oophila amblystomatis* (Chlorophyceae) from Yellow Spotted Salamander and Wood Frog breeding habitat. *Phycologia*, *54*, 183-191.
- Rios, L. C., & Araya, H. E. (2002). Cambios en los contenidos de clorofila, proteínas y niveles de fluorescencia de clorofila en plantas de café (*Coffea arabica* L.) cultivadas en zonas áridas en diferentes condiciones de luminosidadl. *IDESIA (Chile)*, 111-118.
- Sarasola-Puente, V., Madeira, M. J., Gosá, A., Lizana, M., & Gómez-Moliner, B. (2012). Population structure and genetic diversity of *Rana dalmatina* in the Iberian Peninsula. *Conservation Genetics*, *13*, 197-209.
- Sarasola, V., & Gosá, A. (2014). *Rana ágil–Rana dalmatina* Fitzinger, 1838. Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles.
- Small, D. P., Bennett, R. S., & Bishop, C. D. (2014). The roles of oxygen and ammonia in the symbiotic relationship between the spotted salamander *Ambystoma maculatum* and the green alga *Oophila amblystomatis* during embryonic development. *Symbiosis*, *64*, 1-10.
- Verlag, G. F. (1983). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Chlorophyta I, Zygnematales. H.Ettl. New York.