



Trabajo Fin de Grado
Grado en Biología

Dinámica y prevalencia de la colonización de los huevos de *Rana dalmatina* por microalgas clorofíceas en el medio natural

Autor:

Iñaki Fernández de Larrea González

Director:

Aitor Laza Martínez

Índice

Abstract	2
Resumen	2
Introducción	3
Materiales y métodos.....	6
Resultados	9
Discusión.....	12
Conclusiones.....	14
Bibliografía.....	14

Abstract

The relation between the North American salamander *Ambystoma maculatum* and the green alga *Oophila amblystomatis* is the only case of symbiosis in which transport of photosynthetic products has been demonstrated. Other North American amphibians also get their eggs green because of the colonization of *O. amblystomatis*, although there is no compound exchange. In Europe, this phenomenon has been observed in the agile frog, *Rana dalmatina*, but it has been poorly studied. So, we studied the prevalence, dynamics and growth of the algae colonization in the natural medium, from both fertilized and non-fertilized eggs, and from two separated periods of the reproductive time. To do so, an image-analysis of the eggs was performed from 14 clutches located in Montes de Vitoria (Álava). Then, we calculated the green index (Gcc) during the development of the embryos. Green index (Gcc) was used as a measure of amount of green algae settled in the eggs. It was observed a prevalence of colonization of the 100%. Although its higher grade of colonization, eggs from period 1 hatched later than eggs from period 2, probably because of the higher temperature during their development. The embryonic development it is not necessary for the algal growth in the egg.

Resumen

El único caso demostrado de simbiosis de un alga y un vertebrado en el que hay transporte de los productos fotosintéticos es la que se da entre en Norteamérica entre la salamandra *Ambystoma maculatum* y el alga verde *Oophila amblystomatis*. *O. amblystomatis* también coloniza los huevos de otros anfibios norteamericanos, produciendo un enverdecimiento de las puestas, sin que se conozca intercambio de compuestos. En Europa, este fenómeno ha sido observado en las puestas de la rana ágil, *Rana dalmatina*, pero apenas ha sido estudiado. Por ello se quiso estudiar la prevalencia, la dinámica y el crecimiento de la colonización en el medio natural, tanto en los huevos fecundados como en los no fecundados, durante dos periodos distintos de la época reproductiva. Para ello, se llevó a cabo un seguimiento mediante análisis de imagen a 14 puestas localizadas en los Montes de Vitoria (Álava), y así, obtener el índice de verdor (Gcc) durante el desarrollo de los embriones. El índice de verdor (Gcc) se utilizó como medida de la cantidad de algas en los huevos. Se observó un prevalencia de la colonización del 100%. A pesar de un mayor grado de colonización, las puestas del primer periodo reproductivo tardaron más en eclosionar que las del segundo, debido probablemente a una mayor temperatura durante el desarrollo. También se ha observado que no es necesario que el embrión se desarrolle para el crecimiento de las microalgas.

Introducción

La simbiosis se define como la interacción biológica estrecha y permanente de dos organismos, simbiontes, gracias a la cual al menos uno de ellos ve aumentado su éxito adaptativo. Esta relación puede tener distintos grados de integración entre los simbiontes, según el tiempo que lleva dándose esa interacción, y puede suponer múltiples efectos para los organismos que toman parte en ella (Smith & Smith, 2007).

Un caso bastante común y descriptivo de simbiosis son las interacciones entre organismos de una especie heterótrofa con otra autótrofa. En este caso la especie autótrofa aporta principalmente los productos de la fotosíntesis y, a cambio, la especie heterótrofa le puede proporcionar protección, en la simbiosis cnidario-zooxantela, nutrientes inorgánicos, en micorrizas, o un ambiente adecuado para su desarrollo, en líquenes. A pesar de ser un fenómeno relativamente común en el reino animal, observado en cnidarios (*Aulactinia stelloides*, *Plesiastrea versipra*, *Zoanthus robustus*, *Chlorohydra viridissima*), moluscos (*Pteraeolidia ianthina*, *Tridacna maxima*) y esponjas (*Ephydatia fluviatilis*) (Graham et al, 2014), este tipo de simbiosis es excepcional en vertebrados.

El caso mejor estudiado de simbiosis entre algas y vertebrados es el que se da entre *Oophila amblystomatis*, una especie de alga unicelular de la división Chlorophyta, que crece en el interior de los huevos de especies de anfibios de Norteamérica, provocando un enverdecimiento de los mismos (Orr, 1888). La especie de salamandra *Ambystoma maculatum* (Shaw 1802) ha sido la única en la que se ha demostrado una incorporación de productos fotosintéticos de *O. amblystomatis* (Graham et al., 2014).

La relación entre *O. amblystomatis* y *A. maculatum* comienza tras la puesta de los huevos por parte de *A. maculatum*. Es entonces cuando las células de *O. amblystomatis*, que se mantienen en forma de quiste en las charcas de reproducción, penetran, con la forma flagelada, en los huevos y se instalan como forma no móvil en la membrana interna del huevo (Gilbert, 1942). También, como se ha descrito más

recientemente, *O. amblystomatis* crece como endosimbionte dentro de los tejidos del propio embrión (Kerney et al., 2011).

Ambos simbioses se benefician de esta relación, que por tanto, es mutualista. Por un lado, *O. amblystomatis* recibe un lugar apropiado para su crecimiento, además de los desechos del embrión, CO₂ y restos nitrogenados (Goff & Stein, 1978), que utiliza para realizar la fotosíntesis. Por otro lado, el embrión se desarrolla en un microambiente sin restos nitrogenados tóxicos y con una concentración de oxígeno más estable, recibe los productos de la fotosíntesis que realiza el alga, y además, el alga evita el crecimiento de microorganismos patógenos sobre el huevo (Graham et al., 2014). Es por ello, que los embriones colonizados presentan un mayor crecimiento, un desarrollo más rápido y una tasa de mortalidad más baja que los huevos no colonizados por *O. amblystomatis* (Graham et al., 2014). También se consigue una eclosión de los huevos de la puesta más sincronizada (Marco & Blaunstein, 2000).

En los anfibios norteamericanos *Ambystoma gracile*, *Lithobates sylvatica* y *L. aurora*, sus puestas también se enverdecen durante el desarrollo. También son colonizadas por algas del clado *Oophila*, aunque no tienen una relación simbiótica tan estrecha como la de *A. maculatum* y *O. amblystomatis* (Kim et al., 2014).

Recientemente, en el País Vasco, en el contexto de estudios poblacionales de la rana ágil (*Rana dalmatina*), se ha observado que sus puestas eran colonizadas por algas verdes durante su desarrollo (A. Gosá comunicación personal). En una primera caracterización al microscopio de las algas responsables, se vio que éstas coincidían morfológicamente con las descritas por Kim et al. (2014) en Norteamérica (observaciones no publicadas). Esta colonización de las puestas de *R. dalmatina* fue mencionada en Baumgartner et al. (1996), aunque se limitó a una descripción subjetiva del grado de colonización y en un momento concreto del desarrollo, por lo tanto el fenómeno de la colonización de huevos de anfibios por microalgas está prácticamente sin explorar fuera de Norteamérica.

La especie *Rana dalmatina* pertenece a la familia Ranidae, concretamente al grupo denominado como ranas pardas ibéricas, que incluye a *R. dalmatina*, *R. temporaria*, *R. ibérica* y *R. pirenaica*. Esta especie habita en bosques caducifolios de Europa, en la que está ampliamente distribuida. En la Península Ibérica sólo se

encuentran unas pequeñas poblaciones en Navarra, Álava, Vizcaya y Burgos (Sarasola & Gosá, 2014).

Rana dalmatina habita la mayor parte de su vida en el medio terrestre, en el bosque, pero, como el resto de anfibios lleva a cabo la reproducción en el medio dulceacuícola. En consecuencia del declive de ambos hábitats, debido a la deforestación y el uso para cultivo, en el caso de los robledales, y a la desecación y la eutrofización, en el caso de los humedales, la especie también está sufriendo un grave retroceso (Kaya et al., 2009) y, en el caso de la Comunidad Autónoma Vasca, la especie se encuentra en la categoría de *vulnerable* en el catálogo vasco de especies amenazadas.

La época reproductora de esta especie comienza en enero-febrero cuando los individuos se dirigen a las charcas para emparejarse. Las charcas elegidas son preferentemente temporales, por tanto no hay peces, de 10-50cm de profundidad, y con abundante vegetación macrófita (Ficetola et al., 2006). Tras el apareamiento o amplexus, las hembras depositan masas de huevos de entre 600 y 800 huevos de media (Gosá, 1994) que anclan en los tallos de los macrófitos o en ramas sumergidas. Esta disposición de las puestas es característica de *R. dalmatina* y permite la identificación de sus puestas, distinguiéndose así de las de *R. temporaria* con la que coincide en lugar y tiempo de reproducción (Gosá, 2015). El periodo de puesta se divide en dos periodos, un primero más activo en la que se producen la mayor parte de las puestas, y el final, en el que el ritmo ovoposición decrece rápidamente (Gosá, 1994). Entre los dos periodos puede o no haber separación temporal dependiendo del régimen de precipitaciones

Los huevos de *R. dalmatina* están protegidos por una capa gelatinosa y miden 1,5-2,5mm de diámetro (Iosob & Prisecaru, 2014), lo que varía en función de las condiciones alimentarias desde la puesta del año anterior y el tamaño de la puesta realizada, existiendo un equilibrio entre la cantidad de huevos y el tamaño de estos (Weddeling et al., 2005). El embrión se divide en un polo animal de color negro y el polo vegetal blanco (Sarasola & Gosá, 2014). Tras 4-6 semanas después de la puesta, dependiendo de la temperatura del agua, se produce la eclosión de los huevos.

El **objetivo** del presente estudio es la caracterización de la colonización de los huevos de *R. dalmatina* por parte de microalgas clorofíceas en el medio natural en el que se da tal relación. Concretamente, se ha estudiado la prevalencia de la colonización y la dinámica temporal de la colonización y crecimiento de las algas. Se han diferenciado las puestas del periodo inicial y tardío de la época reproductora y se han seguido tanto huevos fecundados como no fecundados. Se han discutido los resultados comparándolos con lo descrito en el caso de la simbiosis entre *A. maculatum* y *O. amblystomatis*.

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo con muestras de huevos de *Rana dalmatina* de una población que se reproduce en los Montes de Vitoria (Álava, Figura 1) en una localidad a 700m de altitud, rodeada de bosque de *Quercus faginea*.

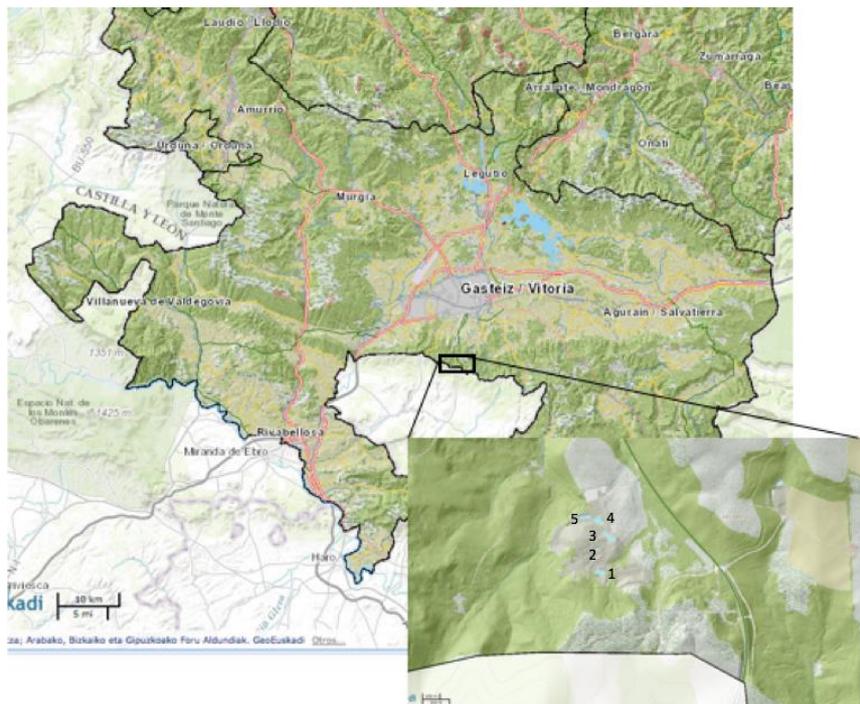


Figura 1: Mapa de la provincia de Álava, situando el área donde se encuentran las charcas seleccionadas (1-5)(Mapa obtenido de Visor GeoEuskadi).

Para los muestreos se contó con el correspondiente permiso de la Diputación Foral de Álava. Se seleccionaron 14 puestas de *Rana dalmatina* de 5 charcas diferentes del área de estudio que estuvieran en los primeros estadios de desarrollo embrionario.

A cada una de las muestras se asignaron dos números para identificarlas, el primero indica la charca en la que fueron recogidas y el segundo hace referencia a la puesta de la que se extrajo la muestra (P. ej.: la muestra 3-1 se recogió de la puesta 1 de la charca 3.). Ambos números se asignaron de forma cronológica. Ocho de las muestras se muestrearon entre el 16 y el 19 de Febrero de 2017 (primer periodo de reproducción) y las 6 restantes entre 1 y 7 de Marzo de 2017 (segundo periodo de reproducción) (Tabla 1).

Tabla 1: Las 14 muestras a las que se realizó el seguimiento fotográfica, la charca de la que fueron recogidas, la fecha en la que se inició el seguimiento y la cantidad de huevos que componían cada muestra y su estado. La época reproductora se dividió en dos periodos: 8 muestras pertenecían al primero y 6 al segundo.

Muestra	Charca	Fecha	Nº de huevos (Fecundados/ No fecundados)
Periodo reproductivo 1			
1-1	1	17/02/2017	5/5
2-1	2	17/02/2017	9/0
2-2	2	17/02/2017	12/0
2-3	2	17/02/2017	10/0
3-1	3	17/02/2017	11/0
3-2	3	17/02/2017	8/1
3-3	3	19/02/2017	13/0
4-1	4	17/02/2017	6/1
Periodo reproductivo 2			
1-2	1	01/03/2017	10/0
1-3	1	07/03/2017	10/0
2-4	2	07/03/2017	10/0
3-4	3	01/03/2017	9/0
4-2	4	07/03/2017	7/2
5-1	5	07/03/2017	8/1

Las puestas se identificaban como de *R. dalmatina* por la forma en la que depositan las puestas, ancladas a tallos de macrófitos o ramas sumergidas de arbustos

adyacentes a las charcas (Fig. 2a), y adicionalmente, en varias de las puestas, se guardaron los renacuajos eclosionados para su reconocimiento a nivel de especie por un experto y descartar definitivamente que pertenecieran a *R. temporaria*.

Se aislaron muestras de 7-13 huevos de cada una de las puestas y se introducían en botes de plástico transparente (7 cm de diámetro y 4 de profundidad, Figura 2b). A los botes se les abrieron 6 aperturas de (0.5 x 0.5 cm) en los laterales para permitir el intercambio de agua con el entorno y permitir la colonización por microalgas. Los botes se ataron a estacas clavadas en la propia charca donde se recogieron los huevos (Fig. 2b).

Teniendo en cuenta que la colonización y crecimiento de las microalgas clorofíceas produce un enverdecimiento de las puestas, una medida del nivel de verdor nos permite obtener una estima de la cantidad de microalgas mediante un análisis de imagen. Así, para el seguimiento de la colonización, se realizaron fotos de los huevos con una cámara Olympus 790 SW, con un periodo de entre 2-4 días hasta su eclosión. En el caso de los huevos no fecundados de la puesta 1-1, el seguimiento se prolongó por 16 días más.

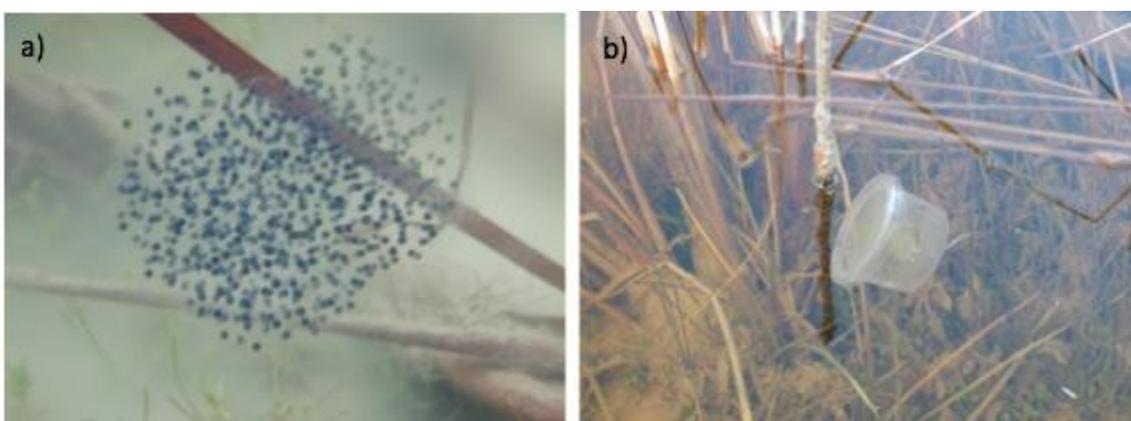


Figura 2: a) Foto de la puesta 2-4. La puesta anclada rodeando el tallo de una planta es característica de *Rana dalmatina*. b) Montaje realizado para aislar los huevos a los que se les realizó el seguimiento fotográfico.

A partir del análisis del color de las fotos, se calculó índice de verdor propuesto en Junker & Esminger (2016). En el contexto de un estudio de la senescencia en los bosques caducifolios mediante seguimiento fotográfico estos autores utilizaron el índice de verdor (Gcc) para corregir las variaciones en la cantidad de verde, rojo y azul

que hay en una imagen debido a los cambios de luz. Para calcular el Gcc se utilizan los valores RGB para saber cuál es la cantidad relativa de verde que hay en la imagen:

$$\text{Índice de verdor (Gcc)} = G / (R + G + B)$$

Para calcular el índice Gcc, se utilizó el programa de análisis de imagen ImageJ (Abramoff et al., 2004) con el que se obtenía la información Red-Green-Blue (RGB) en el área de cada huevo (cantidad de rojo, verde y azul). Esta medida se realizaba individualmente para cada huevo seleccionando su área correspondiente en la foto.

Resultados

En todas las muestras de huevos a las que se les realizó el seguimiento fotográfico mostraron un aumento, en mayor o menor medida, del Gcc (Fig. 3 y Fig. 4). Esto indica que todas sufren crecimiento de algas verdes en su interior, y que por tanto la prevalencia de la colonización por parte de algas en esta población es del 100%.

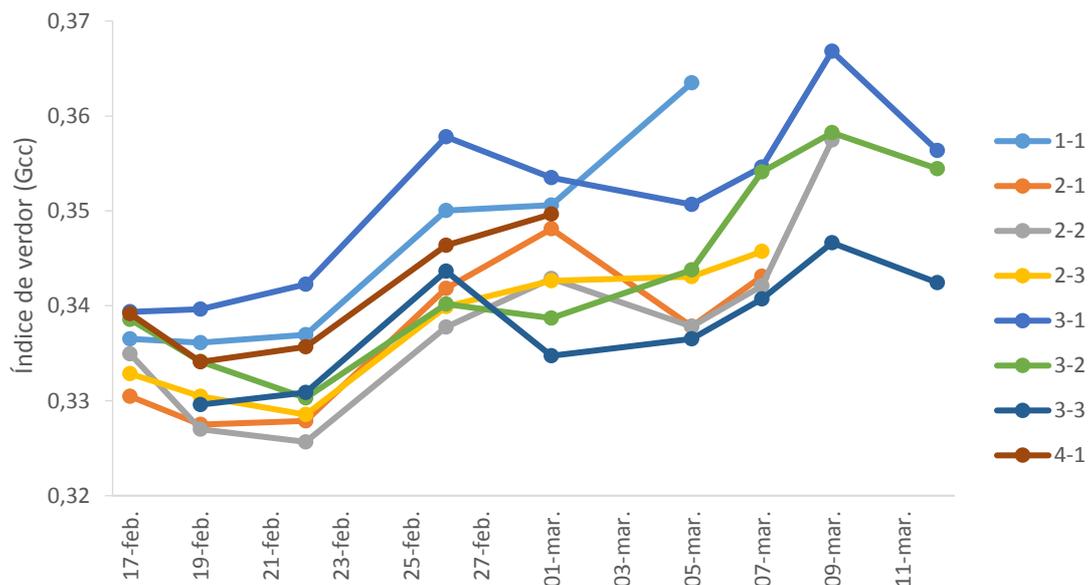


Figura 3: Evolución del índice Gcc en las muestras de las puestas del primer periodo reproductivo desde el inicio del seguimiento hasta la eclosión de los huevos fecundados. Se muestran la media de los diferentes huevos de cada puesta. Se siguieron 8 puestas de este periodo reproductivo de 4 charcas diferentes: 1-1 (Charca 1); 2-1, 2-2, 2-3 (Charca 2); 3-1, 3-2, 3-3 (Charca 3); 4-1 (Charca 4).

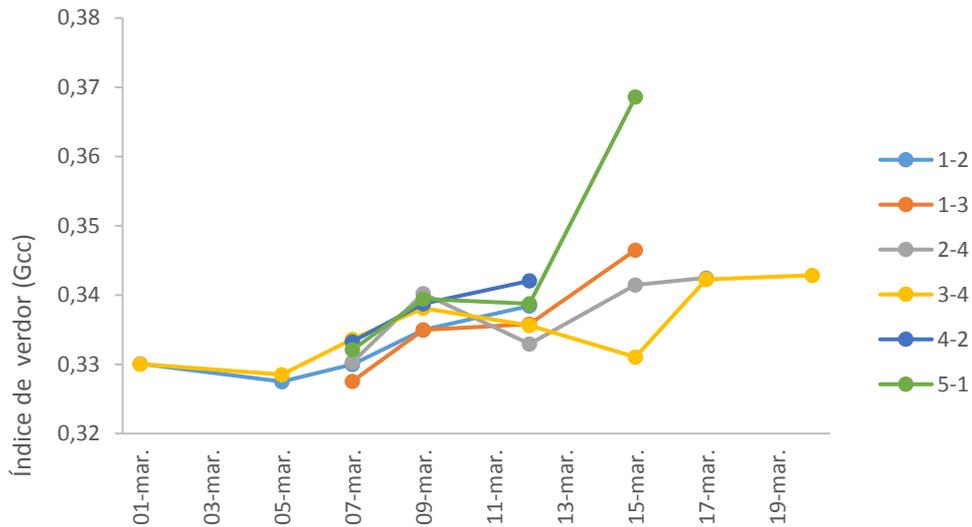


Figura 4: Evolución del índice Gcc en las muestras de las puestas del segundo periodo reproductivo desde el inicio del seguimiento hasta la eclosión de los huevos fecundados. Se muestran la media de los diferentes huevos de cada puesta. Se siguieron 6 puestas de este periodo reproductivo de 5 charcas diferentes: 1-2, 1-3 (Charca 1); 2-4 (Charca 2); 3-4 (Charca 3); 4-2 (Charca 4); 5-1 (Charca 5).

Existen diferencias entre las puestas del primer periodo de la época reproductiva y los del segundo. Por un lado, al final del proceso embrionario, las puestas del periodo 1 han sido más colonizadas que los del periodo 2 porque el Gcc inicial era mayor, ya que, sin embargo la tendencia en el aumento del índice Gcc es similar en ambos periodos (Fig. 5). Por otro lado, la duración de este proceso es mayor en el periodo 1 (19,125 días de media) que en el segundo (11 días de media) (Fig. 6).

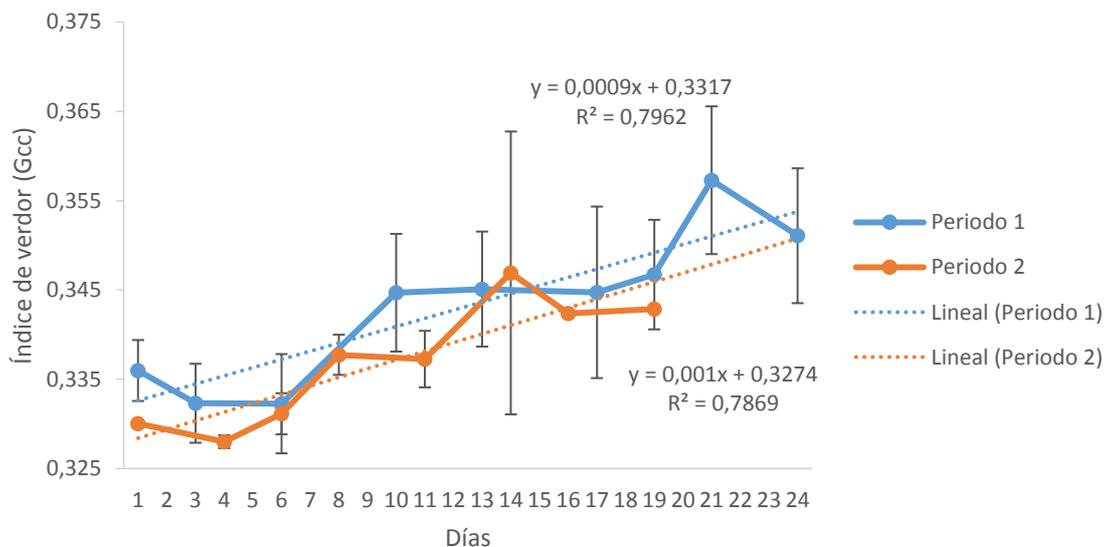


Figura 5: Evolución del índice Gcc medio, con su desviación estándar, de las muestras de los periodos reproductivos 1 y 2, y la tendencia lineal de cada una de las fases. Para la media no se tienen en cuenta las puestas eclosionadas, por tanto, el último valor es de las muestras que más tardaron en eclosionar en cada periodo reproductivo.

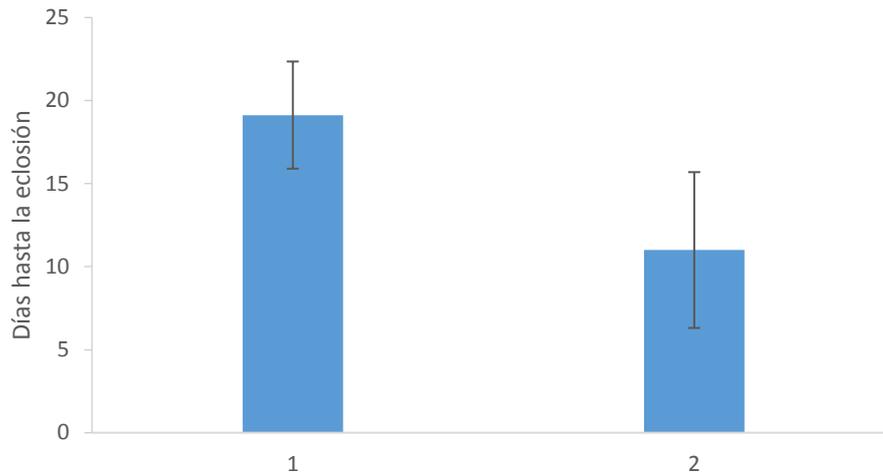


Figura 6: Tiempo de duración del periodo embrionario medio en las fases 1 y 2 y la desviación estándar..

En la muestra 1-1, 5 de los 10 huevos no se desarrollaron, probablemente por no estar fecundados, pero se continuó con el seguimiento. El crecimiento algal es mayor en los huevos fecundados. En los huevos no fecundados también se da aumento del índice de verdor después de eclosión de los huevos fecundados (Fig. 7 y fig. 8).

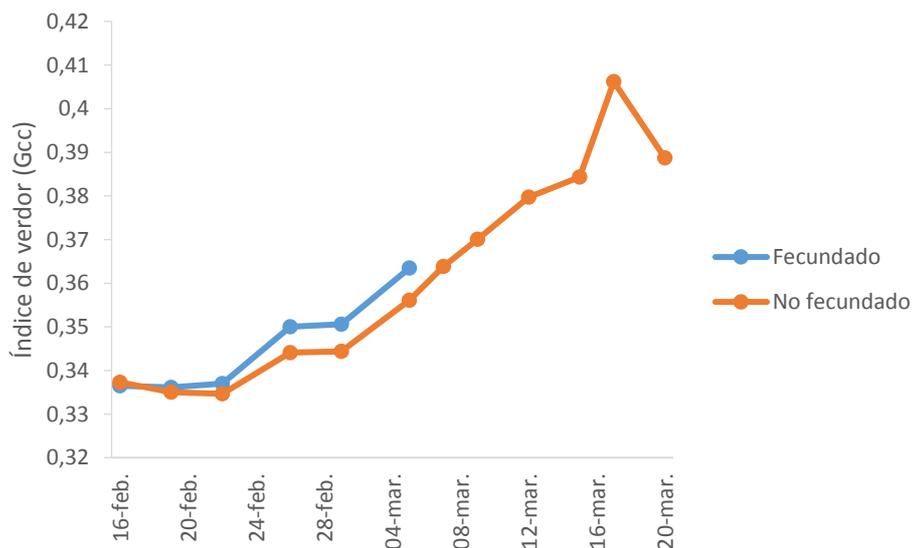


Figura 7: Evolución del índice Gcc en los huevos fecundados (5 huevos) y no fecundados (5 huevos) en la muestra 1-1.

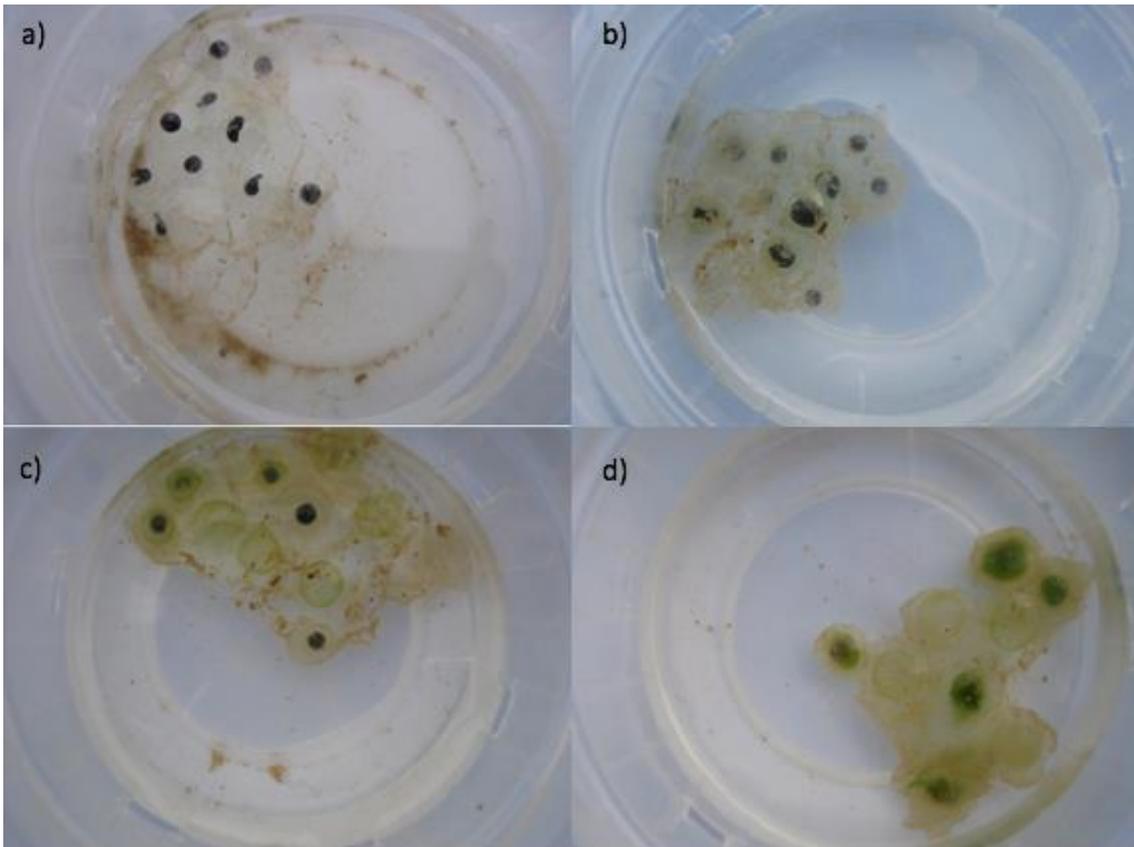


Figura 8: Evolución fotográfica de la colonización de algas verdes en los huevos de la puesta 1-1. a) Estadio inicial en el que no se observa colonización pero ya se distinguen los huevos fecundados de los que no. b) Estadio previo a la eclosión de los huevos fecundados. c) Etapa posterior a la eclosión de los huevos fecundados. d) Etapa final del seguimiento fotográfico.

Discusión

En el conjunto de charcas estudiadas la prevalencia de huevos colonizados por algas verdes fue del 100%, y coincide con la prevalencia observada por Gilbert (1944) para *Ambystoma maculatum*. Este resultado no descarta la existencia de transferencia intergeneracional del huésped en *Rana dalmatina*, que existe en la simbiosis entre *A. maculatum* y *Oophila amblystomatis*, lo que implicaría una colonización de los tejidos embrionales, además de la cápsula del huevo, lo que significaría que es una relación endosimbiótica (Kerney et al., 2011). Sin embargo, tampoco descarta la hipótesis de la presencia de formas de resistencia en las charcas que colonizan externamente los huevos, ya que al ser charcas muy próximas entre sí es fácil que se haya podido

dispersar por todas ellas. Por ello, el 100% de prevalencia podría estar limitado a la población estudiada.

La colonización fue más intensa en las puestas del primer periodo que en el segundo periodo de la época reproductora (Fig. 8). Según Gilbert (1942), la colonización de los huevos de *A. maculatum* la realizan zoosporas de *O. amblystomatis* que se encuentran libres en la charca. Esta colonización es necesaria para que *O. amblystomatis* complete su ciclo vital, ya que en el huevo se forman cigotos que, al eclosionar los huevos, se divide por meiosis y libera más zoosporas, acoplando así su ciclo vital al de su hospedador (Bishop & Miller, 2014). Por tanto, la mayor intensidad inicial de la colonización en el periodo 1 podría deberse a una mayor concentración de zoosporas libres en el medio acuático que colonizarían rápidamente el huevo, y al bajar esa concentración de células libres se estabilizaría la tasa de colonización.

Contraviniendo los efectos descritos de la colonización de *Oophila amblystomatis* sobre el desarrollo de los embriones de *Ambystoma maculatum*, por los que esperaríamos un desarrollo más rápido cuando hay mayor grado de colonización algal (Graham et al., 2014), la duración del proceso embrionario fue más corta en el periodo 2 (Fig. 6) aunque haya menor crecimiento de las algas que en el periodo 1 (Fig. 7). El efecto de la temperatura en la velocidad del desarrollo embrionario de los anfibios es muy importante. En cada una de las fases hubo diferencias notables de las temperaturas máximas y mínimas medias: en el primer periodo 15,63°C- 1,21°C y en el segundo periodo 18,1°C-2,94°C (temperatura del aire: <http://www.accuweather.com/es/es/san-vicentejo/1452019/february-weather/1452019>), respectivamente. El aumento de temperatura en el periodo 2 podría explicar el aumento en la velocidad de desarrollo, y sería un factor más importante en la velocidad a la que se desarrollan los embriones que la cantidad de algas verdes en el huevo.

Se observó que en los huevos no fecundados, en los que no hay desarrollo del embrión, también hay crecimiento algal, aunque el crecimiento es menor que en los huevos fecundados. Sin embargo, este crecimiento continúa incluso después de la eclosión de los fecundados, superando el índice Gcc de los huevos fecundados al final del desarrollo (Fig. 7). En experimentos con *A. maculatum* en los que el embrión fue eliminado del huevo, por el contrario, no se detectó crecimiento de las algas (Gilbert,

1944). Esto podría indicar que la relación simbiótica en *R. dalmatina* no es tan estrecha como la existente entre *A. maculatum* y *O. amblystomatis*, y que el alga verde simplemente aprovecha el medio favorable que es el huevo. Sin embargo, una vez producida la eclosión del huevo el crecimiento algal se detiene (Fig. 8), algo que sí coincide con lo que ocurre en el modelo de *A. maculatum* (Bishop & Miller, 2014). Por ello, se puede concluir que el huevo, esté en desarrollo o no, aporta al alga algún elemento imprescindible para el desarrollo del alga. Small et al. (2014) propone que ese factor que limita el crecimiento algal en los huevos de anfibios es el amonio. En el caso de los huevos no fecundados, el amonio y otros nutrientes para las algas podrían provenir de la descomposición del huevo por la eventual acción microbiana.

Conclusiones

La prevalencia de la colonización en la población estudiada es del 100%, pero podría ser distinta en otras poblaciones de *Rana dalmatina*. La temperatura es más determinante en el tiempo de desarrollo que la cantidad de algas en el interior de los huevos. No es necesario el desarrollo del embrión para la colonización de microalgas. La relación simbiótica entre *R. dalmatina* y el alga clorofícea no es tan estrecha como la existente entre *Ambystoma maculatum* y *Oophila amblystomatis*.

Bibliografía

Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J. & Ram, S.J. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int* 11, 36-42.

Baumgartner, C., Bitschi, N., Ellinger, N., Gollmann, B., Gollmann, G., Köck, M. & Waringer-Löschenkohl, A. (1996). Laichablage und Embryonalentwicklung von Springfrosch (*Rana dalmatina* BONAPARTE, 1940) 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

Ficetola, G. F.; M. Valota; F. De Bernardi (2006). Temporal variability of spawning site selection in the frog *Rana dalmatina*: consequences for habitat management." *Animal Biodiversity and Conservation*, 29, 157-163.

Gilbert, P. W. (1942). Observations on the eggs of *Ambystoma maculatum* with especial reference to the green algae found within the egg envelopes. *Ecology* 23, 215-227.

Gilbert, P. W. (1994). The Alga-Egg relationship in *Ambystoma maculatum*, a case of simbiosis. *Ecology*, 25, 366-369.

Goff, L. J. & Stein, J. R. (1978). Ammonia: basis for algal simbiosis in salamander egg masses. *Life Sciences*, 22, 1463-1468.

Gosá, A. (1994). Biología reproductiva de la rana ágil, *Rana dalmatina* (Ranidae, Anura), en Navarra. *Munibe (Ciencias Naturales- Natur Zientziak)* 46, 97-108.

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* 216, 452-459.

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

Kaya, U., Kuzmin, S., Sparreboom, M., Ugurtas, I. H., Tarkhnishvili, D., Anderson, S., Andreone, F., Corti, C., Nyström, P., Schmidt, B., Anthony, B., Ogrodowczyk, A., Ogielska, M., Bosch, J. & Tejedo, M. (2009). *Rana dalmatina*. The IUCN Red List of Threatened Species.

Kerney, R., Kim, E., Hangarter, R. P., Heiss, A. A., Bishop, C. D. and Hall, B. K. (2011). Intracellular invasion of green algae in a salamander host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 6497-6502.

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(11).

Marco, A. and Blaustein, A. R. (2000). Symbiosis with green algae affects survival and growth of northwestern salamander embryos. *J. Herpetol.* 34, 617-620.

Orr, H. (1888). Note on the development of amphibians, chiefly concerning the central nervous system; with additional observations on the hypophysis, mouth, and the appendages and skeleton of the head. *Q. J. Micr. Sci. N.S.* 29, 295-324.

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.

Smith, T. M. & Smith, R. L. (2007). *Ecología* (6ª ed). Pearson, 327.

Weddeling, K., Bosbach, G., Hatchel, M., Sander, U., Schmidt, P., & Tarkhnishvili, D. (2005). Egg Size Versus Clutch Size: variation and trade-offs in reproductive output of

Rana dalmatina and *R. temporaria* in a pond near Bonn (Germany)(In: Proceedings of the 12th Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica, Eds: N. Ananjeva, O. Tsinenko)–Societas Europaea Herpetol. *St. Petersburg*, 238-240.