

LIFE12 NAT/ES/001091

"Conservació de fauna fluvial d'interès europeu a la xarxa Natura 2000 de les conques dels rius Ter, Fluvià y Muga"



A.4 – PROTOCOLS DE CRIA, REFORÇAMENTS POBLACIONALS I PROTECCIÓ CONTRA L'AFANOMICOSI DEL CRANC DE RIU AUTÒCTON

**Protocol pel disseny d'experiments d'afectació de
l'afanomicosi sobre *Austropotamobius pallipes***

ABRIL 2014





(LIFE12 NAT/ES/001091)

"Conservació de fauna fluvial d'interès europeu a la xarxa Natura 2000 de les conques dels rius Ter, Fluvià y Muga"

Beneficiaris:



Cofinancadors:



Diputació de Girona



Ajuntament de Banyoles



Ajuntament de Porqueres



Consorci Esportiu Estany de Banyoles



AIGÜES DE BANYOLES, S. A.

Adreça de la oficina tècnica:

Plaça dels Estudis, 2
17820 - Banyoles (Girona)

Tel. / Fax: 972.57.64.95
correu-e: consorci@consorcidel'estany.org

web: www.lifepotamofauna.org

A.4 – PROTOCOLS DE CRIA, REFORÇAMENTS POBLACIONALS I PROTECCIÓ CONTRA L'AFANOMICOSI DEL CRANC DE RIU AUTÒCTON

Protocol pel disseny d'experiments d'afectació de l'afanomicosi sobre *Austropotamobius pallipes*

ABRIL 2014

Equip de redacció:

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

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

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

Fina Torres, Tècnica, Forestal Catalana S.A.

Miquel Macies, Tècnic, Forestal Catalana S.A.

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



Promotor:



Generalitat de Catalunya
Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural

Seguiment i direcció:

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

Quim Pou i Rovira, Consorci de l'Estany

Índex

	pàg.
RELACIÓ DE FIGURES	1
1.- RESUMS	2
1.1.- RESUM (CATALÀ)	2
1.2.- RESUMEN (ESPAÑOL)	3
1.3.- ABSTRACT (ENGLISH)	4
2.- INTRODUCCIÓ.....	5
3.- OBJECTIUS	7
3.1.- OBJECTIU GENERAL	7
3.2.- OBJECTIU CONCRET	7
4.- METODOLOGIA.....	7
4.1.- CONSIDERACIONS PRÈVIES.....	7
4.2.- MATERIAL.....	8
4.3.- CRONOGRAMA DELS EXPERIMENTS.....	8
4.4.- PREPARACIÓ DE L'EXPERIMENT.....	9
4.4.1.- CAPTURA DELS EXEMPLARS DE CRANC I TRANSPORT	9
4.4.2.- CURA DELS CRANCS.....	9
4.4.2.1.- ALIMENTACIÓ.....	9
4.4.2.2.- AIGUA I FILTRES.....	10
4.4.3.- SOCA <i>APHANOMYCES ASTACI</i>	10
4.5.- EXPERIMENTACIÓ.....	10
4.5.1.- PRESA DE MOSTRES DE CUTÍCULA.....	12
4.6.- ESQUEMA GENERAL DELS EXPERIMENTS.....	13
5.- TRACTAMENT DE DADES	14
6.- BIBLIOGRAFIA.....	14

ANNEXES

A-I.- Fitxa de camp per la recollida d'exemplars d'*Austropotamobius pallipes* en llibertat

A-II.- Taula d'observació dels efectes de la infecció per afanomicosi

RELACIÓ DE FIGURES

	pàg.
Figura 1.- Cronograma de les diferents fases de l'experiment	8
Figura 2.- Imatge de l'extracció de mostra de la placa abdominal de la cutícula	12
Figura 3.- Esquema general del procediment que es durà a terme durant el protocol	13

1.- RESUMS

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-Urbeondo, 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.- INTRODUCCIÓ

El cranc de riu autòcton (*Austropotamobius pallipes*) és un invertebrat típicament bentònic, poc adaptat a la natació, encara que de vegades pot atènyer grans velocitats de desplaçament, especialment quan es veu atacat. Té el cos subcilíndric, comprimit lateralment, i els tres primers parells de pereïpodis acaben amb una pinça. Són de costums sedentaris i solen viure en grups d'aproximadament 10 individus. Surten dels seus amagatalls per a alimentar-se durant la nit i es consideren pràcticament omnívors. El nombre d'ous que pon cada femella és relativament petit (de 50 a 100) i el desenvolupament és directe.

El cranc de riu autòcton és una espècie de gran importància ecològica als rius on es distribueix, ja que durant la seva fase juvenil actua com a presa d'un gran nombre de depredadors fluvials i, principalment com adult, ja que intervé de manera activa en el reciclatge de nutrients al riu gràcies al seu règim alimentari, en gran part carronyaire. Aquesta espècie, a més d'ajudar a mantenir els rius en bon estat, és un bon bioindicador de la qualitat de les aigües fluvials, ja que no sobreviu en aigües contaminades.

Durant les darreres tres dècades, s'ha produït una disminució alarmant de les poblacions de cranc de riu autòcton a tot Europa. Aquesta regressió es deu a la contaminació, destrucció de l'hàbitat i principalment a la introducció de l'afanomicosi, malaltia de la qual són portadores diverses espècies de cranc de riu americà (i a la qual són resistents). La malaltia produïda per aquest fong (*Aphanomyces astaci*) és la causant de la desaparició de poblacions senceres de cranc de riu autòcton. Estudis realitzats durant els últims trenta anys mostren la disminució de les poblacions d' *A. pallipes*, paral·lelament a l'expansió del cranc de riu americà, *P. clarkii*, que desplaça al primer en aquells hàbitats que li són favorables.

La regressió d'*A. pallipes* es troba a dos nivells: reducció del número de poblacions observades i fragmentació de les mateixes. La contínua i incontrolada expansió del cranc de riu americà, implica, en molts indrets, la colonització d'aquells hàbitats ocupats anteriorment per *A. pallipes*. A més, degut al fet de ser portadors d'afanomicosi, aquests hàbitats colonitzats per l'afanomicosi queden normalment inservibles per una possible recuperació, ja sigui natural o artificial per part d'*A. pallipes*, el qual es veu forçat a reduir el seu nínxol ecològic a aquells ecosistemes no aptes per *P. clarkii*.

Durant els anys 90 del segle XX, i en vistes a l'alarmant declivi de les poblacions de cranc de riu autòcton, es va començar a gestionar l'espècie a Catalunya, mitjançant el monitoreig de les seves poblacions. A principis del 2000 (a les conques del Fluvià, Ter i Muga) s'iniciaren altres accions de conservació, incloent la cria en captivitat i els reforçaments poblacionals. En l'actualitat i gràcies a la inclusió del cranc de riu al projecte **LIFE Potamo Fauna**, s'ampliaran els esforços per conservar i recuperar aquesta espècie. Aquest projecte, amb el títol "Conservació de fauna fluvial de interès europeu a xarxa Natura 2000 de les conques dels rius Ter, Fluvià i Muga", i una durada total de quatre anys (2014-2017), té com a principal objectiu la conservació i millora de les poblacions de diverses espècies de fauna fluvial amenaçada del nord-est de Catalunya, incloent el cranc de riu (*Austropotamobius pallipes*). Pel que fa al cranc de riu, s'han projectat tota una sèrie d'accions, entre les que s'inclouen el seu seguiment (Acció D5), cria en captivitat (Acció C6), reforçaments poblacionals (Acció C7), seguiments i control de crancs exòtics (Accions D5 i C9), protecció enfront de l'afanomicosi (Acció C8) i experimentació amb afanomicosi (Acció A10).

En el present protocol s'indica la metodologia per a la realització d'experiments amb l'afanomicosi (Acció A10), malaltia causada per l'oomicet *Aphanomyces astaci*. Aquests experiments tenen una gran importància, ja que aquesta infecció és la principal causa del declivi d'*Austropotamobius pallipes*.

Mitjançant aquesta acció es pretén avaluar els diferents graus de resistència de diverses poblacions de cranc autòcton presents dins el **LIFE Potamo Fauna**, incloent la població del riu Arnera, que amb anterioritat ha demostrat presentar un cert grau de resistència, o si més no, un temps més elevat en començar a presentar símptomes d'infecció i de supervivència. La troballa d'una població que presentés resistència a l'afanomicosi podria significar un avanç molt important per la conservació de l'espècie, que d'altra manera, i malgrat als esforços que s'han dut i es duren a terme, presenta un futur incert.

Les accions detallades en aquest protocol s'han de realitzar amb la col·laboració de l'equip i personal del CSIC de Madrid, dirigits pel Dr. Diéguez-Urbeondo, els quals tenen una gran experiència en el camp de l'afanomicosi i són una referència a nivell estatal i mundial.

3.- OBJECTIUS

3.1.- OBJECTIU GENERAL

Aquest protocol dissenya com s'han de realitzar els experiments per avaluar els diferents graus de resistència de diverses poblacions d'*Austropotamobius pallipes* a l'afanomicosi (*Aphanomyces astaci*).

3.2.- OBJECTIUS CONCRETS

Confirmar i avaluar la resistència aparentment superior a l'afanomicosi de la població d'*Austropotamobius pallipes* de l'Arnera, en comparació a les altres poblacions de cranc de riu autòcton de la zona d'estudi.

4.- METODOLOGIA

4.1.- CONSIDERACIONS PRÈVIES

Un dels objectius dels experiments és avaluar la resistència aparentment superior a l'afanomicosi de la població d'*Austropotamobius pallipes* de l'Arnera (situada al SCI Alta Garrotxa-Massís de les Salines (ES5120001)), en comparació a les altres poblacions de cranc de riu autòcton de la zona d'estudi. Aquesta suposició prèvia és conseqüència a dos fets observats durant els darrers anys:

- 1) L'agost de l'any 2007 l'afanomicosi va entrar al Centre de Reproducció d'Olot, els exemplars provinents de la població de l'Arnera van ser els últims en presentar símptomes d'infecció i els últims en morir.
- 2) A la tardor de 2011 es va detectar un brot d'afanomicosi a la part inferior d'aquesta població de l'Arnera i un any després només havia afectat uns 800 metres de la mateixa, restant encara avui uns 7 km de riu aigües amunt en perfectes condicions. Aquest fet es contraposa amb la progressió habitual dels brots d'afanomicosi en altres poblacions que desapareixen senceres amb pocs dies o setmanes.

4.2.- MATERIAL

- **9 aquaris (80L), filtres i oxigenadors** per establir-hi els crancs durant els experiments.
- **Aigua autoclavada** per assegurar que l'únic agent infecció que afectarà els crancs serà la soca d'afanomicosi que serà introduïda als aquaris durant els experiments.
- **Grava i refugis per cranc (totxanes) autoclavats** per reproduir les condicions de l'hàbitat dels crancs.
- **Microscopi òptic** per a la realització de les observacions de melanització de la cutícula dels crancs infectats.
- **Soca coneguda d'*Aphanomyces astaci*.**
- **Pinces, bisturí i agulles emmanegades** per a l'extracció i manipulació de mostres.

4.3.- CRONOGRAMA DELS EXPERIMENTS

Tot seguit es proposa el cronograma a seguir per aplicar aquest protocol. Les setmanes que durarà l'experiment no es pot saber a priori, però difícilment superarà les setmanes aquí descrites.

L'experiment s'hauria de realitzar fora dels períodes de reproducció o de baixa activitat d'hivern.

Tasca \ Setmana	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Captura dels exemplars i trasllat al CSIC-Madrid														
aclimatació dels crancs als aquaris														
Infecció dels crancs														
Observacions diàries (Annex 2)														
Incorporació a la base de dades														

Figura 1. Cronograma de les diferents fases de l'experiment.

4.4.- PREPARACIÓ DE L'EXPERIMENT

4.4.1.- CAPTURA DELS EXEMPLARS DE CRANC I TRANSPORT

- Es capturaran 12 exemplars mascles de mida gran de cada una de les conques d'estudi del **LIFE Potamo Fauna** (conques del Riu Ter, Fluvià i Muga, d'aquesta última pertanyents a la població de l'Arnera). S'especificarà la procedència dels crancs, així com els col·laboradors que hagin efectuat la seva captura, omplint la taula adjunta a l'Annex 1.
- Les poblacions seleccionades seran poblacions amb informació precisa de la seva genètica.
- Els crancs seran transportats de manera separada per cada població al CSIC de Madrid (Real Jardín Botánico, CSIC. Plaza de Murillo, 2. Madrid E-28014).
- Els transport es durà a terme en dipòsits de 30 litres, plens d'aigua autoclavada i amb oxigenadors, ja que el transport serà força llarg.
- Un cop arribats a destí, els animals seran introduïts en aquaris per a la seva aclimatació.
- S'ha de desinfectar tot el material abans i després del transport.

4.4.2.- CURA DELS CRANCS

4.4.2.1-ALIMENTACIÓ

Durant el període en que els crancs visquin als aquaris se'ls alimentarà amb una dieta similar al que se'ls hi proporciona als crancs presents al Centre de Reproducció d'Olot. Aquesta consistirà en l'aport de sardines i fetge de xai trossejats per simular la part de la dieta carnívora i en patata bullida i trossejada per la part herbívora. Caldrà adequar les quantitats d'aliment i la seva renovació durant tot el procediment, ja que a mesura que la infecció vagi avançant els crancs s'alimentaran en menor quantitat.

4.4.2.2.- AIGUA I FILTRES

Gràcies a la instal·lació de filtres d'aquari automàtics, només caldrà supervisar el seu correcte funcionament. En cas que els crancs sobrevisquessin durant un període llarg de temps, s'haurien de netejar els filtres i es valoraria la possibilitat de renovar l'aigua dels aquaris.

4.3.3.- SOCA APHANOMYCES ASTACI

S'utilitzaran els cultius purs de diferents soques d'*Aphanomyces astaci* procedents de la col·lecció del Dr. Diéguez-Urbeondo del CSIC Madrid. Aquesta col·lecció disposa de cultius purs d'*Aphanomyces astaci* de les soques associades a les diferents espècies vectorres de cranc exòtiques: *Procambarus clarkii*, *Pacifastacus leniusculus* i *Orconectes limosus*.

Inicialment els experiments es realitzaran amb la soca provinent de *Procambarus clarkii*, ja que és la soca que està causant més mortalitats a la zona d'actuació del LIFE Potamo Fauna. Tot i així, en funció dels resultats, es podria repetir el mateix experiment amb les altres soques provinents de *Pacifastacus leniusculus* i *Orconectes limosus*. D'aquesta manera, es podria comparar les diferents virulències de les soques i la resistència que realitzen els crancs.

4.5.- EXPERIMENTACIÓ

- S'utilitzaran 9 aquaris (3 per cada població). Cada aquari tindrà 3 crancs provinents de la mateixa població. D'aquesta manera s'obtingran 3 rèpliques (cada aquari) de l'experiment per població.
- Cada cranc s'haurà de poder distingir de manera individualitzada per poder seguir en detall la seva evolució (Annex 2). En el cas que els individus siguin molt semblants entre ells es realitzarà una petita marca amb pintaungles per poder-los identificar.
- Tot i que es capturen 12 crancs de cada població només se n'utilitzen 9. Els altres 3 són per seguretat, per si algun individu mort durant el transport i/o aclimatació.

- S'infectaran al mateix temps tots els exemplars de les 3 poblacions amb la mateixa soca. El procediment d'infecció consistirà en realitzar un raspat sobre la cutícula dels exemplars d'*Austropotamobius pallipes* amb la soca d'*Aphanomyces astaci* seleccionada (apartat 4.3.3 d'aquest protocol).

- Revisions diàries d'efectes subletals (Mathews & Reynolds, 1990) d'*Aphanomyces astaci* a tots els individus, recollits a la taula adjunta a l'**Annex 2**:

Saludable: Quan és pertorbat s'amaga ràpidament. Actiu a la nit i roman amagat durant el dia. Moviment de les antenes sovint, alimentació amb normalitat. Si se'l col·loca panxa enlaire tornarà a la posició natural amb cops de cua en menys de 5 segons.

Letàrgic: S'amaga lentament quan se'l pertorba, però per altra banda és reticent a moure's. Si se'l col·loca panxa enlaire pot tornar a la seva posició natural però lentament (més de 5 segons).

Feble: Molt lent, moviments laboriosos. Moviments molt febles de cua. No es mou, roman sense amagar-se. Poc moviment de les antenes.

Erràtic: Inici de la fase final de la malura. Els animals cauen i s'aixequen repetidament. Pèrdua de coordinació i l'equilibri. Freguen les pinces o altres apèndixs uns contra els altres i han d'utilitzar la resta d'apèndixs o el tèlson per desplaçar-se.

Postrat: L'animal reposa sobre la part posterior o lateral del cos i no pot redreçar-se. Moviments molt esporàdics i febles. De tant en tant les extremitats d'un costat del cos es paralitzen.

Proper a la mort: Extremadament feble. Els pereopodis pengen sense forces si es treu l'animal de l'aigua. Si es punxa l'animal la resposta reflexe de les extremitats és difícilment perceptible.

Mort: Generalment panxa enlaire i en espai obert

- Revisió diària de la mortalitat causada per *Aphanomyces astaci* i omplir la taula adjunta a l'**Annex 2**.

- Revisió amb microscopi del nivell de melanització de la cutícula dels cadàvers, seguint les instruccions de l'apartat 4.4.1 "Presa de mostres de cutícula"

4.5.1.- PRESA DE MOSTRES DE CUTÍCULA

- Un cop el procés d'infecció hagi finalitzat i es trobin crancs morts es procedirà a l'extracció de mostres de cutícula per a la seva observació posterior al microscopi per avaluar el nivell de melanització.
- Mitjançant l'ajuda de pinces i tisores, s'extraurà un tros de cutícula, concretament de la placa abdominal. (**Figura 1**)
- Quan s'hagi extret el fragment de placa abdominal es procedirà a la neteja de la seva part interior. Es retiraran les restes de múscul i altres parts de carn que hi puguin quedar enganxades, gratant amb el bisturí. Aquestes parts de carn i múscul s'hauran de llençar.
- En cas que l'anàlisi al microscopi no es realitzi immediatament després de l'extracció de mostres de cutícula, es recomana conservar aquestes en aigua freda, indicant clarament l'aquari de procedència i la data i hora de la mort d'extracció.



Figura 2. Extracció de mostra de la placa abdominal de la cutícula.

4.6.- ESQUEMA GENERAL DELS EXPERIMENTS

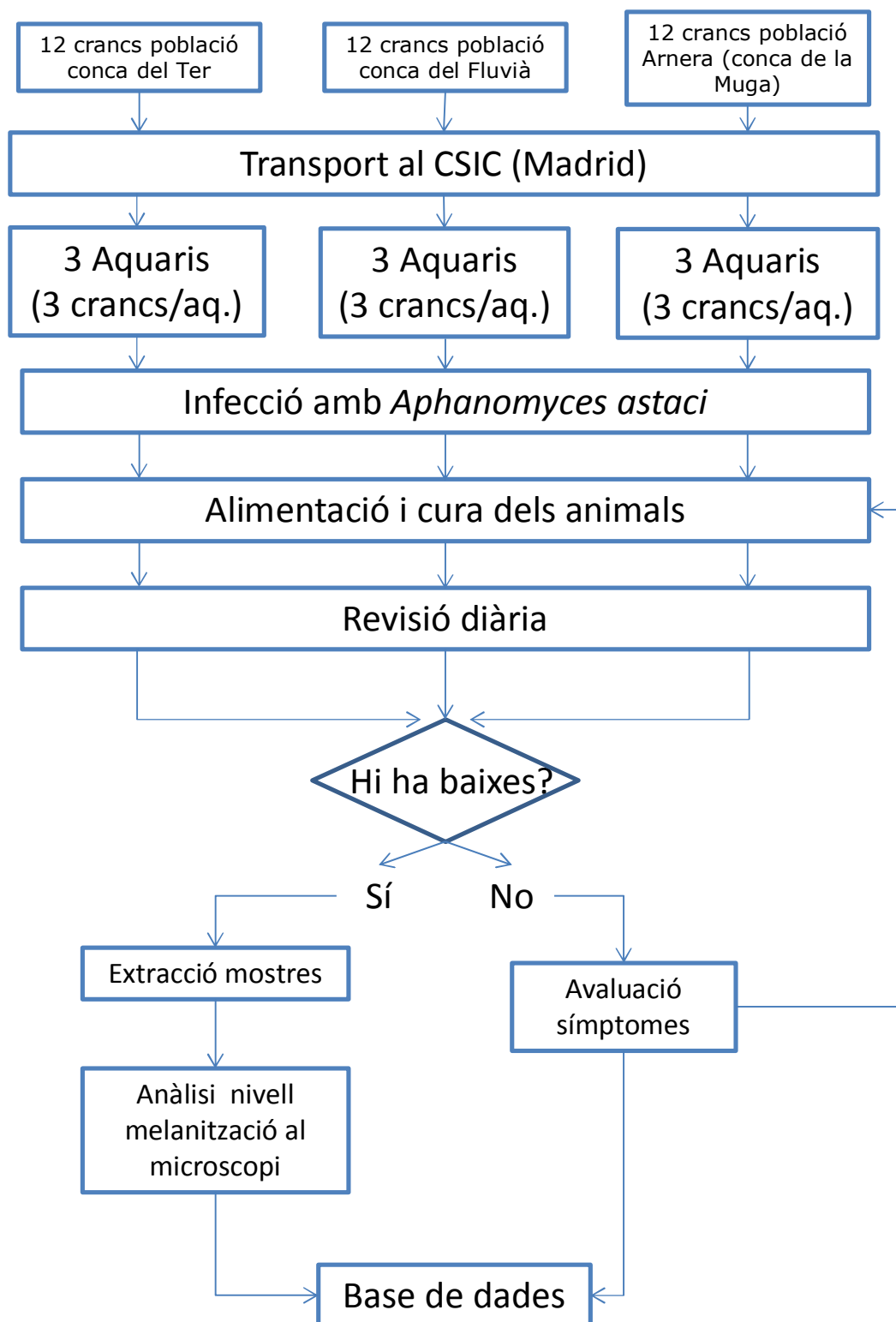


Figura 3. Esquema general del procediment que es durà a terme durant el protocol.

5.- TRACTAMENT DE DADES

- S'inclouran les dades obtingudes a una base de dades per realitzar anàlisis estadístics.
- En funció dels resultats trobats es valorarà repetir l'experiment, però sempre mantenint la població de l'Arnera i en tot cas canviant les poblacions del Ter i Fluvià.
- Així mateix, depenent dels resultats, es podria repetir el mateix experiment amb les altres soques provinents de *Pacifastacus leniusculus* i *Orconectes limosus*. D'aquesta manera, es podria comparar les diferents virulències de les soques i la resistència que realitzen els crancs.

6.-BIBLIOGRAFIA

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.

ANNEXES

ANNEX 1.- FITXA DE CAMP PER LA RECOLLIDA D'EXEMPLARS D'*AUSTROPOTAMOBIOUS PALLIPES* EN LLIBERTAT

RECOLLIDA D'EXEMPLARS D'*AUSTROPOTAMOBIOUS PALLIPES* EN LLIBERTAT

Població		Data	
Coordenades inici tram		Coordenades final tram	
Col·laboradors			
Nº mascles grans recollits			

Observacions:

**ANNEX 2.- TAULA D'OBSERVACIÓ DELS EFECTES DE LA INFECCIÓ PER
AFANOMICOSI**

TAULA D'OBSERVACIÓ DELS EFECTES DE LA INFECCIÓ PER AFANOMICOSI

Nº aquari	Població		Data infecció			Data revisió	
	Saludable	Letàrgic	Feble	Erràtic	Postrat	Proper a la mort	Mort
Cranc 1							
Cranc 2							
Cranc 3							

Observacions: