



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpa

Opposite and synergistic physiological responses to water acidity and predator cues in spadefoot toad tadpoles

Margarita Florencio^{a,b}, Pablo Burraco^{a,c}, Miguel Ángel Rendón^d, Carmen Díaz-Paniagua^a,
Ivan Gomez-Mestre^{a,*}

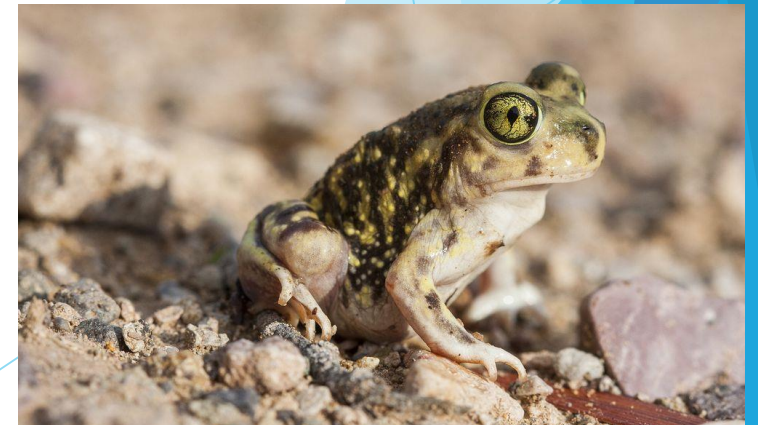
^a Ecology, Evolution and Development Group, Estación Biológica de Doñana, CSIC, Seville, Spain

^b Dept. of Ecology, Centro de Investigación en Biodiversidad y Cambio Global (CIBC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

^c Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom

^d Dept. of Wetland Ecology, Estación Biológica de Doñana, CSIC, Seville, Spain

Pelobates cultripes



Pelobates cultripes

- ▶ Anfibio anuro della famiglia dei Pelobatidi.
- ▶ Areale: penisola iberica, ambienti palustri, cicli umido-secco.
- ▶ La femmina depone fino a 7000 uova per evento riproduttivo.
- ▶ La deposizione avviene molto presto, quando le pozze d'acqua hanno pH molto basso a causa dell'ossidazione della pirite:
 - ▶ Lungo periodo di sviluppo, quindi forti competitori;
 - ▶ Stress abiotico sulle prime fasi dello sviluppo.



Il predatore - *Anax imperator*

- ▶ Le ninfe (larve) di *Anax imperator* sono grandi predatrici.
- ▶ Rilasciano segnali chimici nell'acqua che vengono percepiti dai girini di *Pelobates cultripes*.



Scopo e metodo

- ▶ Studiare l'eventuale effetto sinergico tra due stress:
 - ▶ La presenza del predatore (larve di *Anax imperator*);
 - ▶ Ambiente acido (pH 4).
- ▶ Quattro condizioni sperimentali:
 - ▶ No predatore + pH 7 (controllo)
 - ▶ No predatore + pH 4
 - ▶ Predatore + pH 7
 - ▶ Predatore + pH 4

Metodo e materiali

- ▶ In campo vengono raccolte centinaia di uova di *Pelobates cultripes* da 4 punti diversi e portate in laboratorio.
- ▶ In lab vengono fatte schiudere in acqua filtrata a pH 6.8 raccolta in campo.
- ▶ Una volta schiuse, selezionati 200 girini.
- ▶ Divisi in 4 gruppi, uno per ogni condizione sperimentale; 50 individui per ogni condizione.
- ▶ Per ogni condizione, 10 repliche, ognuna contenente 5 individui.

Metodo e materiali

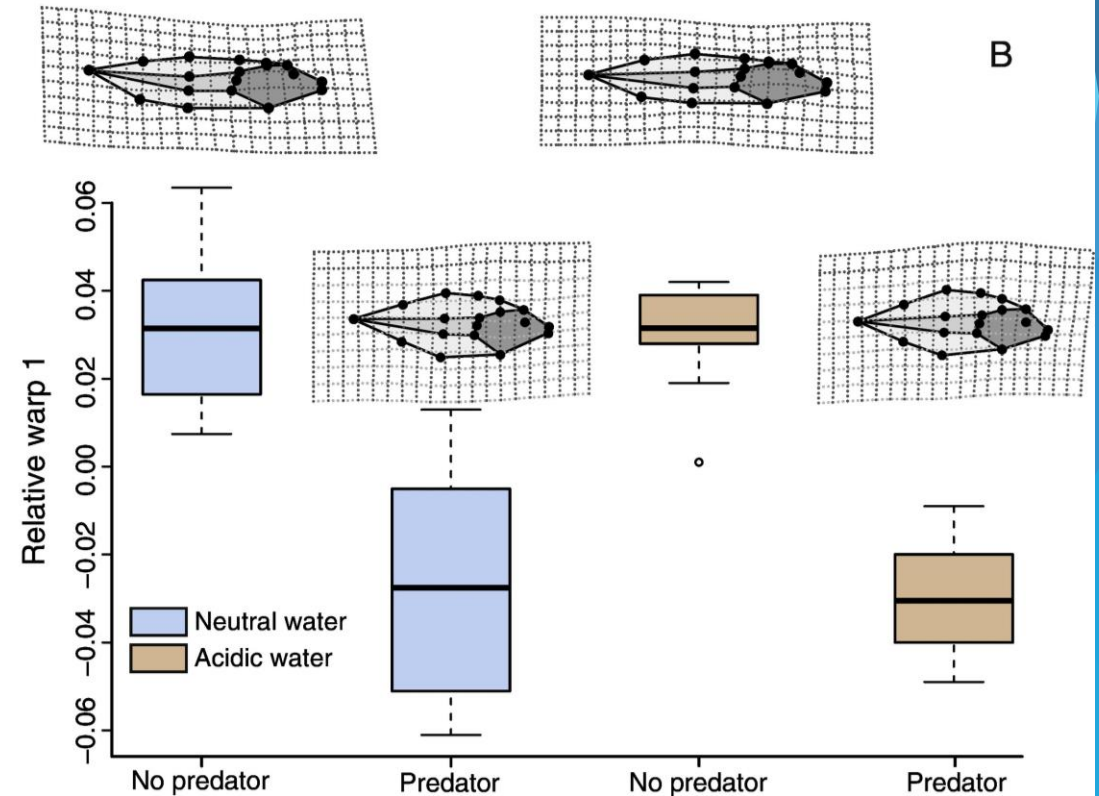
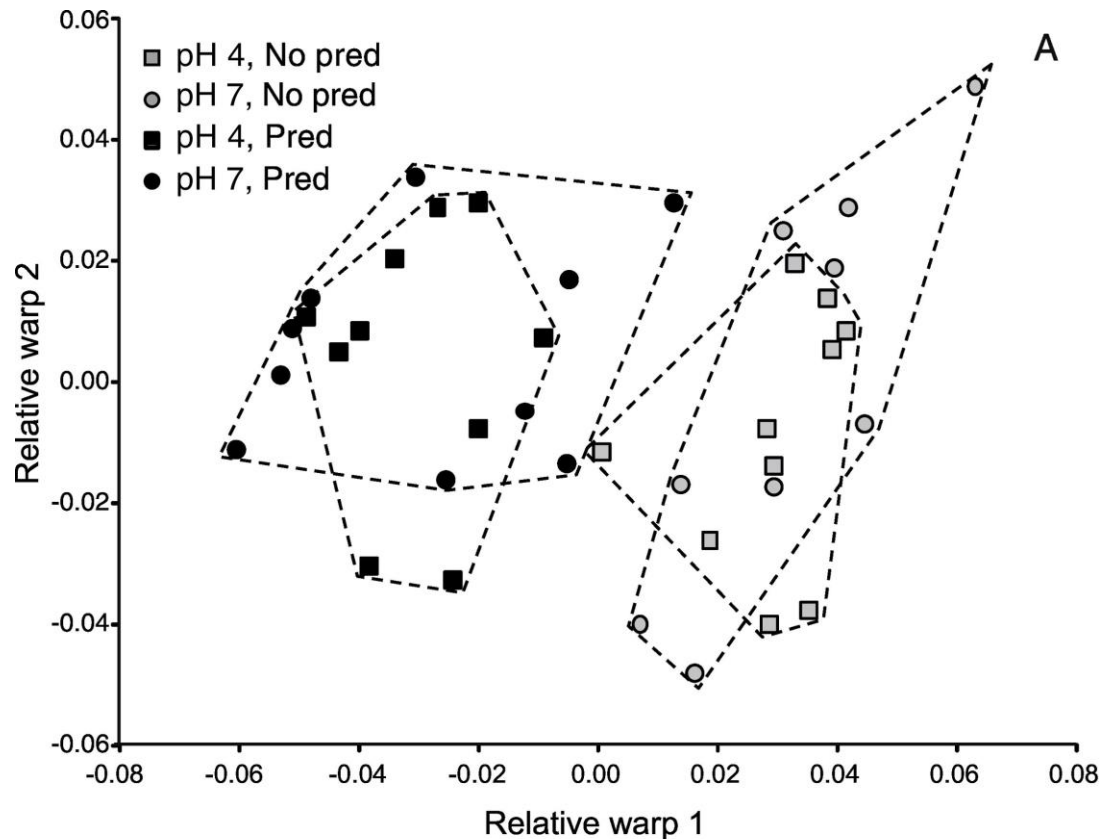
	Predatore	No predatore
pH 7	50 individui: 10 repliche, ciascuna con 5 individui	50 individui: 10 repliche, ciascuna con 5 individui
pH 4	50 individui: 10 repliche, ciascuna con 5 individui	50 individui: 10 repliche, ciascuna con 5 individui

Analisi

- ▶ Analisi morfologica: eventuali cambiamenti nella morfologia del girino.
- ▶ Analisi fisiologica:
 - ▶ Quantità di corticosterone nel plasma (stress generico);
 - ▶ Stress ossidativo:
 1. Enzimi: catalasi, superossido dismutasi, glutathione perossidasi, glutathione reduttasi;
 2. Quantità di malondialdeide (MDA), sottoprodotto della perossidazione dei lipidi;
 3. Rapporto «glutathione ridotto/glutathione ossidato» (GSH/GSSG).

Analisi morfologica

- Dopo 20 giorni dall'inizio dell'esperimento, tutti i 200 girini sono stati fotografati per studiare la loro morfologia.



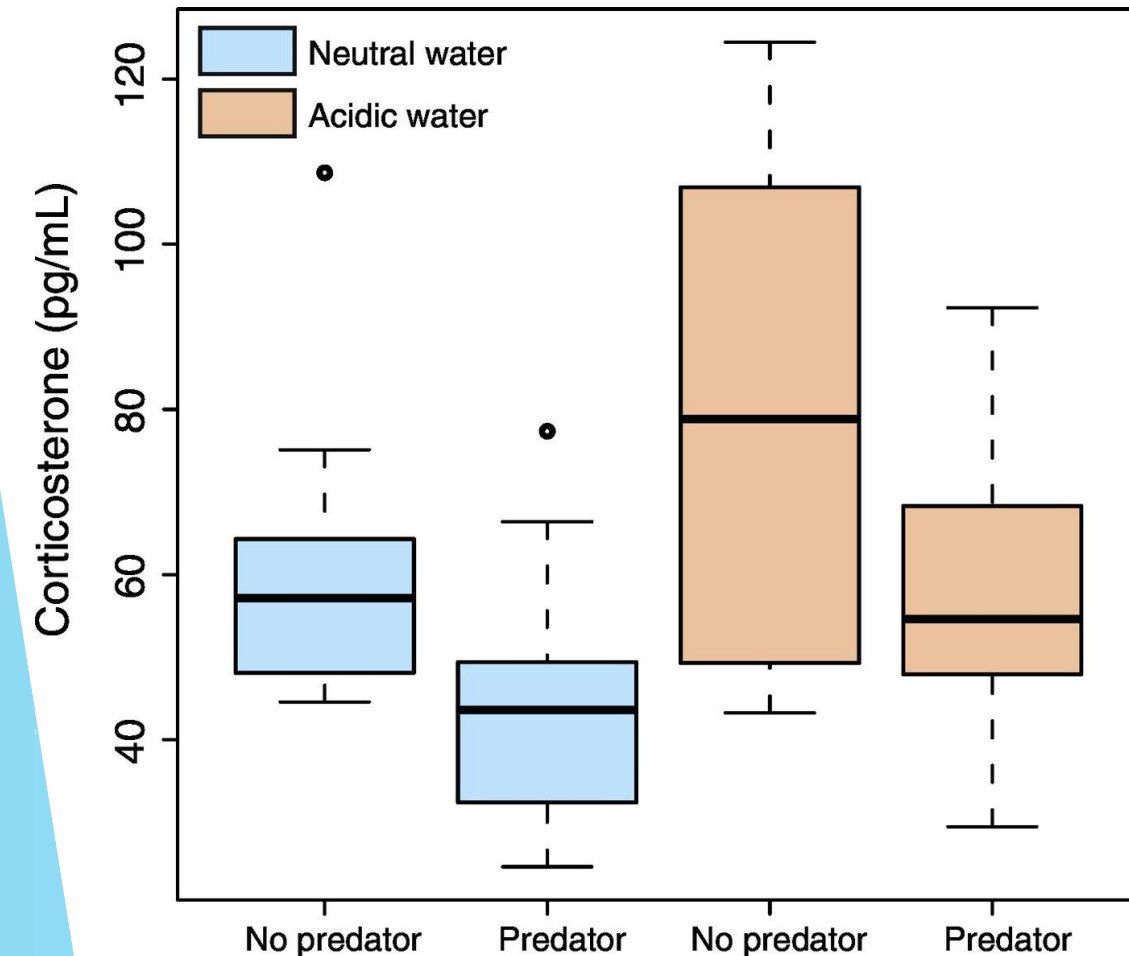
Analisi

- ▶ Analisi morfologica: eventuali cambiamenti nella morfologia del girino.
- ▶ Analisi fisiologica:
 - ▶ Quantità di corticosterone nel plasma (stress generico);
 - ▶ Stress ossidativo:
 1. Enzimi: catalasi, superossido dismutasi, glutathione perossidasi, glutathione reduttasi;
 2. Quantità di malondialdeide (MDA), sottoprodotto della perossidazione dei lipidi;
 3. Rapporto «glutathione ridotto/glutathione ossidato» (GSH/GSSG).

Analisi fisiologiche - corticosterone

- ▶ Dopo le foto, i girini vengono rimessi nelle proprie condizioni sperimentali per 6 giorni.
- ▶ Successivamente viene estratto il sangue dal cuore di 4 individui su 5 di ogni replica di ogni condizione sperimentale (30 uL da ogni individuo, cioè 120 uL per ogni replica), centrifugato per ottenere il plasma.
- ▶ Il quinto individuo viene eviscerato e congelato per le analisi sullo stress ossidativo.

Analisi fisiologiche - corticosterone



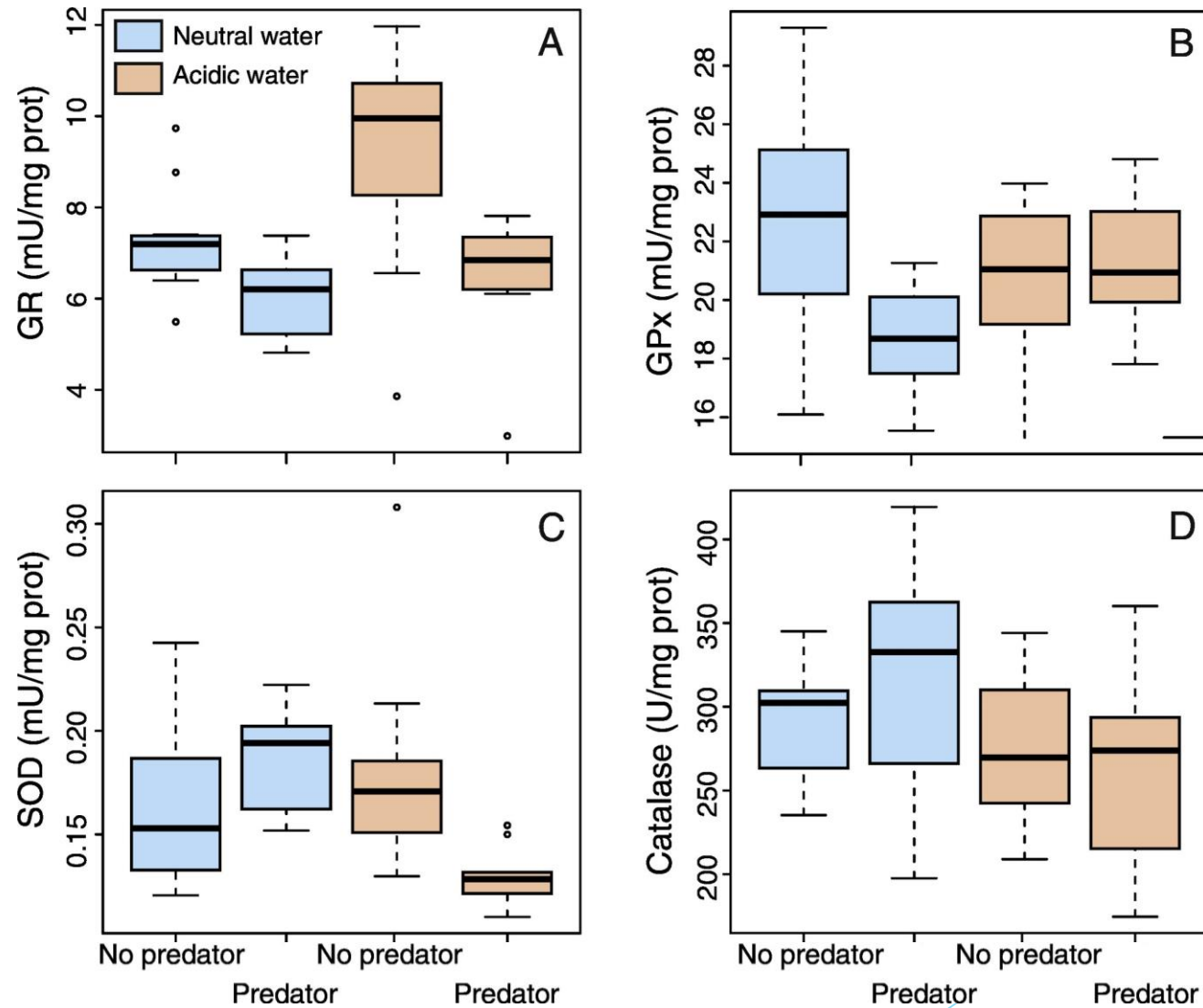
- ▶ Enzyme immunoassay su 50 uL di plasma per ogni replica, e assorbanza a 412 nm.
- ▶ Risultato: l'ambiente acido aumenta del 27% il livello di corticosterone; la presenza del predatore lo riduce del 26%.
- ▶ Quindi non c'è effetto sinergico tra il pH e la presenza del predatore.

Analisi

- ▶ Analisi morfologica: eventuali cambiamenti nella morfologia del girino.
- ▶ Analisi fisiologica:
 - ▶ Quantità di corticosterone nel plasma (stress generico);
 - ▶ Stress ossidativo (analisi fatte sul quinto girino):
 1. Enzimi: catalasi, superossido dismutasi, glutathione perossidasi, glutathione reduttasi;
 2. Quantità di malondialdeide (MDA), sottoprodotto della perossidazione dei lipidi;
 3. Rapporto «glutathione ridotto/glutathione ossidato» (GSH/GSSG).

Analisi fisiologiche - stress ossidativo

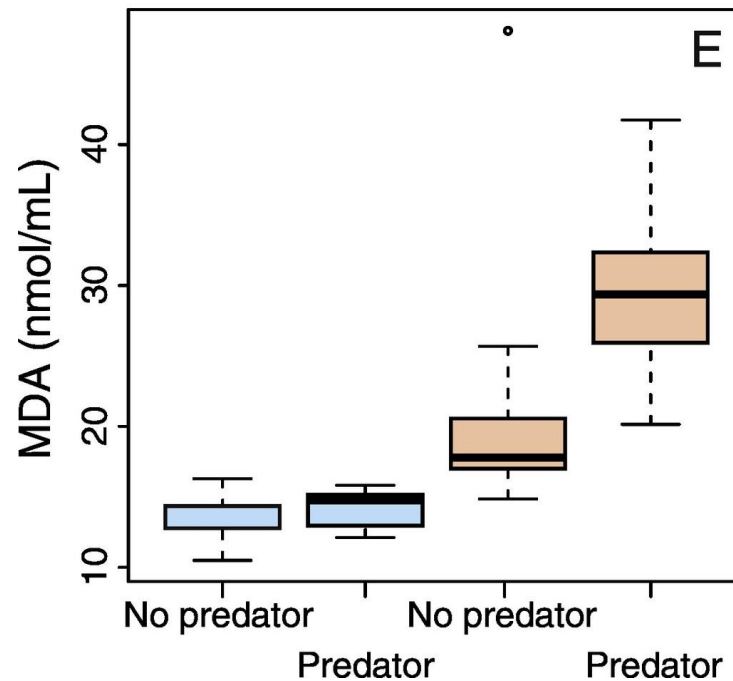
1. Enzimi



Analisi fisiologiche - stress ossidativo

2. Malondialdeide

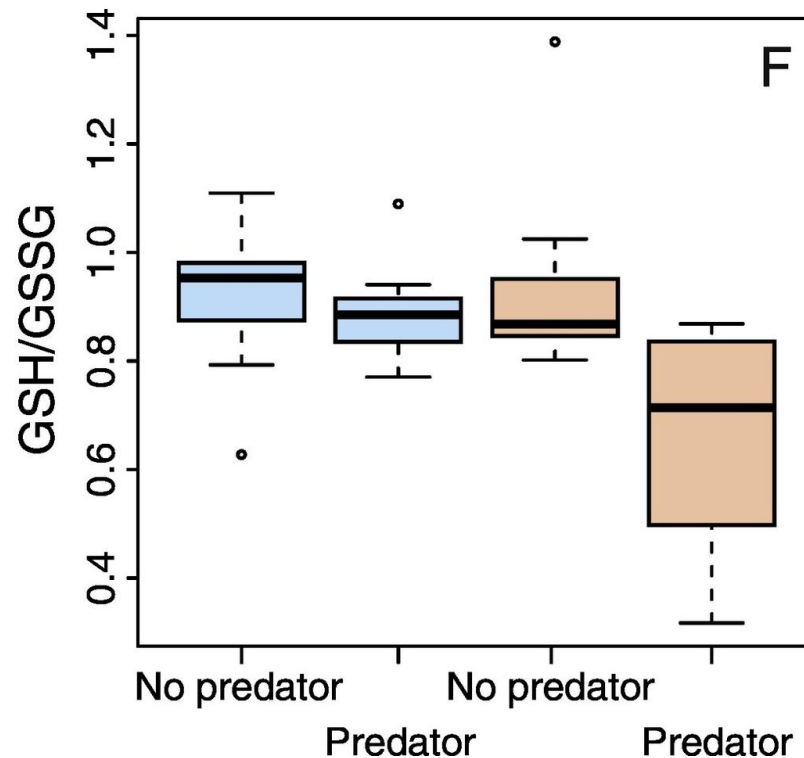
- ▶ La malondialdeide è sottoprodotto della perossidazione lipidica.
- ▶ C'è effetto sinergico tra acidità e presenza del predatore: +42% quando coesistono entrambi gli stress rispetto all'assenza di predatore a pH 4.



Analisi fisiologiche - stress ossidativo

3. *GSH/GSSG*

- C'è effetto sinergico tra acidità e presenza del predatore: -27% quando coesistono entrambi gli stress rispetto al controllo.



Conclusioni - morfologia

- ▶ Il pH non inficia la capacità dei girini di *Pelobates cultripes* di riconoscere la presenza del predatore e di attuare modificazioni morfologiche.
- ▶ Altre specie invece risentono molto del pH per il riconoscimento del predatore e anche di individui della propria specie.
- ▶ Probabilmente i girini di *Pelobates cultripes* sono adattati all'ambiente acido degli stagni in cui vivono e quindi la capacità di riconoscere un predatore non è influenzata dal pH.

Conclusioni - fisiologia

- ▶ Corticosterone: lo stress biotico dato dal predatore abbassa il livello di corticosterone, che comporta rallentamento metabolico simile alla risposta allo stress dato da carenza di cibo.
- ▶ Stress ossidativo:
 - ▶ pH acido: glutathione reduttasi ↑, e MDA ↑.
 - ▶ Predatore: corticosterone ↓, glutathione perossidasi ↓, glutathione reduttasi ↓, anche se l'effetto sulla glutathione perossidasi è mascherato in condizioni acide.
 - ▶ Effetto sinergico: superossido dismutasi ↓, MDA ↑, e GSH/GSSG ↓.

Aspetti critici

- ▶ Altri anfibi hanno diverse risposte alla presenza del predatore:
 - ▶ *Rana sylvatica* aumenta il livello di corticosterone;
 - ▶ *Rana temporaria* può aumentare o abbassare il livello di corticosterone in base all'area geografica in cui si trova.
- ▶ Il sangue di 4 individui diversi viene mescolato per avere un'aliquota maggiore, quindi viene persa l'eventuale diversità genotipica degli individui.
- ▶ Tutte le analisi sono svolte in laboratorio, in condizioni non naturali.