

---

**Universidad Nacional de La Plata**  
**Facultad de Ciencias Naturales y Museo**

**"Estudio de hongos Trichomycetes asociados a insectos  
dípteros, con énfasis en dípteros vectores: diversidad, relación  
insecto-hongo, y modos de transmisión"**

**Trabajo de Tesis Doctoral**  
**Lic. Siri Augusto**

**Director: Dra. Claudia C. López Lastra**  
**Co-director: Prof. Em. Robert W. Lichtwardt**

**2008**

---

**AGRADECIMIENTOS**

- A mis directores de Tesis, Dra. Claudia C. López Lastra y Prof. Em. Robert W. Lichtwardt, por brindarme la dirección, colaboración y apoyo profesional permanente para la realización del doctorado.
  - A la Dra. Alda González, directora del CEPAVE por permitirme y facilitarme la realización del doctorado en dicho instituto.
  - Al CONICET por haber financiado mi doctorado a través del otorgamiento de la Beca.
  - A mis compañeros de laboratorio: Ana Clara, Andrea, Cecilia, Celeste, Gerardo, Gustavo, Luis, Nano, Sebastián, Vanesa y Victoria, por colaborar de una u otra manera en la realización de esta tesis en un clima de amistad, permanente colaboración y amplia generosidad.
  - Al Lic. Luis Giambelluca por el constante aporte de material.
  - A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP), en donde obtuve la licenciatura en Biología.
  - A la Dra. Analía Paggi (Instituto de Limnología Dr. "Raúl A. Ringuelet". ILPLA) por la determinación taxonómica de los quironómidos; a Gustavo Rossi (CEPAVE) por la determinación taxonómica de los mosquitos, y al Dr. Sixto Coscarón (Museo de Ciencias Naturales de La Plata) y la Dra. Neusa Hamada (Instituto Nacional de Pesquisas de Amazonia, Departamento de Entomología, INPA/CPEN, Manaus, Brasil) por la determinación taxonómica de los simúlidos.
  - A Juan J. García por brindarme espacio y herramientas para desarrollar mi trabajo de tesis doctoral.
  - A los directivos y al personal del Instituto de Botánica Carlos Spegazzini por permitir depositar alguno de los holotipos de las especies citadas en el presente trabajo de tesis doctoral
  - Al PhD. Merlin White, quien me brindó un gran apoyo y ayuda en mi estadía en la Universidad de Kansas, como así también a lo largo de toda mi tesis.
  - Al personal responsable de la Reserva Natural de Punta Lara por permitirme desarrollar relevamientos en dicha Reserva.
-

- A la Lic. Sy Victoria y a Nano por la colaboración en la interpretación de los análisis estadísticos.
  - Al Director del CRILAR, David Gorla, por permitirme alojar en dicho instituto y por brindarme las herramientas necesarias de laboratorio durante la estadía.
  - A la Lic. Miriam Pérez por haberme donado el agua marina para la realización de algunas de las experiencias.
  - Al Servicio Meteorológico Nacional, Fuerza Aérea Argentina, Centro de Información Meteorológica de Buenos Aires por los datos aportados.
  - A todos mis amigos
  - A toda mi familia por haberme acompañado y ayudado incondicionalmente en toda esta etapa.
  - A los miembros del jurado, quienes con sus sugerencias me han permitido mejorar el presente trabajo de tesis doctoral.
  - Y especialmente a mi esposa Andrea y a mi hijo Joaquín, a quienes le dedico este trabajo de tesis doctoral.
-

**INDICE**

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>1 - INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>2 - ANTECEDENTES</b> .....	7
<b>3 - HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>4 - OBJETIVOS</b> .....	23
<b>5 - MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	24
5 - 1. Área de recolección de Trichomycetes.....	24
5 - 1 - 1. Recolección en ambientes lénticos.....	24
5 - 1 - 2. Recolección en ambientes lóticos.....	24
5 - 2. Mantenimiento de las muestras en el laboratorio.....	31
5 - 3. Disección de los hospedadores.....	31
5 - 4. Procesamiento de los hongos.....	32
5 - 4 - 1. Aislamiento y cultivo del material fúngico.....	32
5 - 4 - 2. Preparaciones microscópicas semipermanentes.....	35
5 - 4 - 3. Identificación taxonómica de los hongos.....	36
5 - 4 - 4. Almacenamiento de los hongos Trichomycetes en solución tamponada (buffer).....	36
5 - 5. Preparación del material utilizado en los bioensayos.....	36
5 - 5 - 1. Mantenimiento y cría de mosquitos.....	36
5 - 5 - 2. Esterilización de huevos de <i>Aedes aegypti</i> .....	38
5 - 5 - 3. Preparación de cultivos de <i>Smittium culisetae</i> .....	38
5 - 6. Evaluación de la resistencia de las tricosporas de <i>Sm. culisetae</i> frente a diferentes variables.....	39
5 - 6 - 1. Resistencia a la temperatura bajo diferentes formas de almacenamiento.....	39
5 - 6 - 2. Resistencia a la desecación.....	41
5 - 6 - 3. Resistencia a diferentes concentraciones salinas.....	42
- Preparación de las soluciones salinas.....	42
- Preparación de las suspensiones de tricosporas.....	42

- Evaluación de la resistencia de las tricosporas a las distintas concentraciones salinas.....	43
- Dilución de las concentraciones salinas para obtener una suspensión final menor a 5 ppm de NaCl y 25% de agua marina.....	44
5 - 6 - 4. Resistencia a diferentes concentraciones de iones hidrógeno (pH).....	45
- Preparación de las soluciones y suspensiones.....	45
- Evaluación de la resistencia de las tricosporas frente a los distintos niveles de pH.....	45
5 - 7. Estudio sobre la transmisión de <i>Sm. culisetae</i> en mosquitos.....	46
5 - 7 - 1. Transmisión vertical.....	46
5 - 7 - 2. Transmisión <i>per os</i> .....	48
5 - 7 - 3. Transmisión mecánica.....	48
5 - 7 - 4. Material obtenido en el campo.....	49
5 - 8. Estudios sobre la prevalencia y estacionalidad de Harpellales en diferentes ambientes.....	51
5 - 8 - 1. Fitotelmata.....	51
5 - 8 - 1 - 1. Área de estudio.....	51
5 - 8 - 1 - 2. Método de recolección de material.....	52
5 - 8 - 1 - 3. Tareas en el laboratorio.....	52
5 - 8 - 1 - 4. Análisis estadísticos.....	53
5 - 8 - 2. Arroyos.....	53
5 - 8 - 2 - 1. Área de estudio.....	53
5 - 8 - 2 - 2. Método de recolección del material.....	53
5 - 8 - 2 - 3. Tareas realizadas en el laboratorio.....	54
5 - 8 - 3. Campo experimental de arroz.....	54
5 - 9. Estimación de la relación entre la presencia de <i>Sm. culisetae</i> y la fecundidad y tamaño de las hembras adultas de <i>Ae. aegypti</i> .....	55
5 - 9 - 1. Larvas de <i>Ae. aegypti</i> utilizadas.....	55
5 - 9 - 2. Condiciones de cría de las larvas.....	55
5 - 9 - 3. Mantenimiento de los adultos emergidos.....	56

5 - 9 - 4. Fecundidad de las hembras.....	56
5 - 9 - 5. Efecto de los Trichomycetes sobre el tamaño de las hembras de <i>Ae. aegypti</i> .....	57
5 - 9 - 6. Análisis estadísticos.....	57
<b>6- RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>
6 - 1. Descripción de las especies de Trichomycetes relevadas.....	58
6 - 1 - 1. Nuevas especies.....	58
6 - 1 - 2. Especies previamente descritas.....	71
6 - 1 - 3. Clave dicotómica de especies de Harpellales descritas Argentina hasta el presente.....	83
6 - 1 - 4. Cultivos obtenidos.....	87
6 - 1 - 5. Material fúngico almacenado en buffer CTAB 2X.....	88
6 - 2. Evaluación de la resistencia de las tricosporas de <i>Sm. culisetae</i> frente a condiciones adversas.....	89
6 - 2 - 1. Resistencia frente a la temperatura.....	89
6 - 2 - 2. Resistencia a la desecación.....	90
6 - 2 - 3. Resistencia a diferentes concentraciones salinas.....	90
6 - 2 - 4. Resistencia frente a diferentes pH.....	91
6 - 3. Transmisión de <i>Sm. culisetae</i> en mosquitos.....	92
6 - 3 - 1. Transmisión vertical.....	92
6 - 3 - 2. Transmisión <i>per os</i> .....	92
6 - 3 - 3. Transmisión mecánica.....	93
6 - 3 - 4. Material recolectado en el campo.....	93
6 - 4. Prevalencia.....	94
6 - 4 - 1. Prevalencia y estacionalidad de Harpellales en fitotelmata.....	94
6 - 4 - 1 - 1. Hospedadores.....	94
6 - 4 - 1 - 2. Harpellales.....	94
6 - 4 - 1 - 3. Prevalencia.....	95
6 - 4 - 1 - 4. Análisis estadísticos.....	98
6 - 4 - 1 - 5. Cultivos.....	98
6 - 4 - 2. Prevalencia de Harpellales en otros ambientes.....	98
6 - 4 - 2 - 1. Arroyos de la provincia de Buenos Aires.....	98
6 - 4 - 2 - 2. Campo experimental de arroz.....	100

---

6 - 5. Relación entre la presencia de <i>Sm. culisetae</i> y la fecundidad y de las hembras adultas de <i>Ae. aegypti</i> .....	101
<b>6- DISCUSIÓN</b> .....	102
<b>7- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	123
<b>8- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	125
<b>9- ANEXOS</b> .....	140
<b>10 - GLOSARIO</b> .....	142

## RESUMEN

Los objetivos principales de este trabajo de tesis doctoral fueron: aportar datos sobre i) la diversidad de hongos Trichomycetes en la República Argentina, ii) la resistencia de estos hongos frente a diferentes condiciones, iii) la transmisión del inóculo entre los individuos, iv) la variación de la presencia de estos hongos a lo largo del año en distintos ambientes, y v) la relación existente entre los hongos y sus hospedadores.

Los estudios realizados sobre la diversidad de Trichomycetes principalmente en larvas de mosquitos, simúlidos y quironómidos, permitieron describir dentro del orden Harpellales, 5 nuevas especies (*Austrosmittium* sp. 1, *Austrosmittium* sp. 2, *Smittium* sp. 1, *Smittium* sp. 2 y *Legeriomyces* sp.) y reportar 12 especies que previamente habían sido descritas. Además, se citaron 4 especies que podrían representar nuevas especies de Trichomycetes, sin embargo el material recolectado fue insuficiente para realizar una diagnosis completa. A su vez, se registró la presencia de *Amoebidium parasiticum* y *Paramoebidium* sp., ambos pertenecientes al Orden Amoebidiales. En el presente estudio se relevaron diversas regiones de Argentina, abarcando las provincias de Buenos Aires, Córdoba, La Rioja, Neuquén y San Luis. De las especies que habían sido descritas previamente, algunas resultaron el primer registro para la República Argentina, e incluso algunas representaron el primer registro para la región Neotropical.

Se evaluó bajo condiciones de laboratorio la resistencia de las tricosporas del harpélido *Smittium culisetae*, frente a diferentes condiciones de temperatura, pH y salinidad. Las tricosporas lograron resistir temperaturas entre -4 y 37°C, sin perder la capacidad de infectar larvas. La viabilidad de las tricosporas que fueron expuestas a valores de pH entre 3.6 y 10 no se vio modificada, por lo que lograron resistir e infectar larvas luego de haber sido mantenidas bajo estas condiciones por más de 30 días. Las suspensiones de tricosporas a las que se le agregaron concentraciones de hasta 35 ppm de NaCl lograron resistir por más de 30 días. A su vez, las tricosporas lograron resistir durante el mismo período cuando fueron almacenadas en diluciones de agua marina de hasta el 50%. Sin embargo, las tricosporas que fueron sometidas a desecación no lograron resistir este efecto.



Los datos obtenidos a partir de estos ensayos, permitieron concluir que las tricosporas mantuvieron su capacidad de infectar larvas aún cuando fueron expuestas por varios meses a un amplio rango de estas condiciones, por lo que podrían resistir en el ambiente incluso en ausencia de los hospedadores. Sin embargo, estas esporas no fueron capaces de sobrevivir luego de que fueron sometidas a condiciones de deshidratación.

Poco se conoce sobre la transmisión de estos hongos por parte de los hospedadores adultos. En los culícidos, se desconoce el mecanismo de transmisión de estos hongos, y no es sabido como pueden colonizar nuevos ambientes acuáticos. A pesar de haber evaluado algunas posibles vías de transmisión en hospedadores culícidos en laboratorio, no se ha podido dilucidar aún como ocurre este mecanismo en estos hospedadores. Solo se observaron unas pocas tricosporas en el tubo digestivo de hembras adultas de *Ae. aegypti*.

Se evaluó la variación en la prevalencia de los hongos Harpellales a lo largo del año en diferentes ambientes. Los resultados obtenidos en este estudio, como así también los resultados obtenidos de los estudios realizados en el laboratorio sobre la resistencia de las tricosporas, permitieron demostrar que las condiciones ambientales tendrían poca influencia sobre la presencia de estos hongos. La deshidratación del ambiente tiene un efecto negativo sobre la viabilidad de estos hongos, por lo que luego de que un ambiente sufre desecación, debe ser colonizado nuevamente.

Se comparó el tamaño y la fecundidad de las hembras adultas del culicido *Ae. aegypti* que fueron criadas a partir de larvas infectadas con el hongo *Sm. culisetae*, con respecto a hembras adultas que habían sido criadas libres de Trichomycetes. A su vez, se evaluó si las hembras criadas a partir de bajos niveles de alimento se veían beneficiadas por la presencia de *Sm. culisetae*. No existieron diferencias significativas en la fecundidad de las hembras adultas criadas en presencia o ausencia fúngica. De esta manera, se podría inferir que el hongo no le aporta ningún beneficio a las hembras de mosquitos criadas con bajos niveles de alimento, ya que estas tuvieron un tamaño menor, y por ende una menor fecundidad que las hembras criadas con altos niveles de alimento.

En el presente estudio no se observó la presencia de especies de Trichomycetes patógenas.

**ABSTRACT**

The main objectives of the present study were to improve knowledge of the diversity of trichomycete fungi associated with immature stages of insects from Argentina; to evaluate the resistance of trichospores of *Smittium culisetae* under laboratory conditions; to contribute to understanding trichomycete transmission in culicid hosts; to better understanding the relationships between Trichomycetes and their hosts; and to know the prevalence of these fungi throughout the year from different aquatic environments.

The taxonomic studies were carried out principally on immature stages of culicids, simuliids and chironomids. As a result of the total samples collected in the present study, five new species were reported (*Austrosmittium* sp. 1, *Austrosmittium* sp. 2, *Smittium* sp. 1, *Smittium* sp. 2, and *Legeriomyces* sp.), and 12 new records of previously known species. Four other species that might be new to science are cited; however, material collected was insufficient to do a complete diagnosis. Also found were *Amoebidium parasiticum* and *Paramoebidium* spp. (Amoebidiales). Samples were collected in Buenos Aires, Córdoba, La Rioja, Neuquén and San Luis provinces. The distribution of some previously known species were expanded.

Trichospore resistance under different conditions of temperature, pH and salinity were evaluated under laboratory conditions. Trichospores remained viable between -4 to 37°C, including for more than 6 months when these trichospores were incubated at 4°C. The viability of trichospores was not adversely affected when incubated under pH values between 3.6 and 10 for more than 1 month. Trichospores were resistant to 35 ppm of NaCl for more than 1 month. The same results were obtained after incubating a suspension of trichospores in a solution of 50% marine water. Trichospores have not shown resistance to dehydration under laboratory condition.

These results lead to the conclusion that trichospores may remain viable in aquatic environments for a few months before being ingested by a host.

The comparison was done between size and fecundity of *Aedes aegypti* adult females grown with and without fungi and with a high and low quantity of food. No significant differences were observed between size and fecundity among adults with and without fungi.

Only a few studies of trichomycete transmission from culicid host to host were conducted. However, the mechanism by which this may occur could not be clarified.

Studies on the prevalence of trichomycete fungi from different aquatic environments were conducted. Results of these and the trichospore resistance studies suggest that certain environmental variables may have little effect on prevalence of these fungi.

No pathogenic species of Trichomycetes were found during the present study.

## 1 - INTRODUCCIÓN

Los Trichomycetes son un grupo de hongos cosmopolitas que viven asociados internamente al tubo digestivo de artrópodos mandibulados. Estos hongos se han encontrado asociados a una gran variedad de ambientes alrededor del mundo, encontrándose casi exclusivamente en ambientes acuáticos, aunque se han citado unos pocos asociados a hospedadores terrestres. Los hospedadores a los cuales están asociados estos hongos, son principalmente detritívoros o herbívoros, y en menor grado depredadores.

Desde el descubrimiento del primer Trichomycetes realizado por Leidy en el año 1849, la mayor parte de los estudios estuvieron concentrados en la búsqueda de nuevas especies alrededor del mundo y en la taxonomía del grupo. Esto se debe en gran parte a que solo se ha logrado cultivar axénicamente unas pocas especies de estos hongos, lo cual representa un impedimento para el estudio de su biología.

Durante muchos años se consideró que la clase Trichomycetes estaba conformada por los órdenes Amoebidiales, Eccrinales, Asellariales y Harpellales. Por medio de estudios realizados en los últimos años en los que se incluyeron datos morfológicos y moleculares, se demostró que esta clasificación no es natural, considerándose que los órdenes Amoebidiales y Eccrinales no son hongos sino que son Protozoos. De esta manera, se considera actualmente que la clase Trichomycetes está conformada por los órdenes Harpellales y Asellariales.

Los estudios realizados sobre la diversidad de Trichomycetes se han concentrado en unos pocos países, siendo necesario un estudio más profundo de la diversidad de Trichomycetes alrededor del mundo, principalmente en áreas poco exploradas como por ejemplo Sudamérica. Para esta región, solo se han realizado unos pocos estudios en Argentina, Chile y Brasil.

El éxito que han tenido los Trichomycetes para colonizar y mantenerse en diversos ambientes acuáticos alrededor de todo el mundo, se debería en gran parte a un eficiente método de dispersión hacia nuevos sitios, como así también a su capacidad de resistir diferentes condiciones ambientales. Sin embargo, estas cuestiones fueron pobremente estudiadas, por lo que existe un gran desconocimiento de cómo estos hongos han logrado colonizar y

mantenerse en los diferentes ambientes. Por ejemplo, sólo se ha podido explicar la transmisión del inóculo fúngico hacia un nuevo ambiente en dos especies de Trichomyces, las cuales tienen la capacidad de invadir los ovarios de las hembras adultas produciéndoles castración parasitaria, y luego, estas hembras transmiten dicho inóculo durante la "oviposición". Se desconoce totalmente si los culícidos adultos tienen la capacidad de dispersar el inóculo, por lo que aún no se ha podido explicar como ocurren infecciones en ambientes totalmente aislados en donde crían los estadios inmaduros de estos hospedadores.

Relativamente pocos estudios se han realizado sobre la prevalencia de hongos Trichomyces a lo largo del año. En la mayor parte de dichos estudios, se ha observado que estos hongos se mantienen a lo largo del año sin existir una variación significativa en el porcentaje de hospedadores infectados.

La relación existente entre los hongos Trichomyces y sus hospedadores fue también pobremente estudiada. Por lo general, se cree que la asociación entre los Trichomyces y sus hospedadores es de tipo comensalista, en donde el hongo se ve beneficiado al encontrar un ambiente óptimo para su desarrollo, mientras que el hospedador no se beneficia ni se perjudica. En algunos estudios realizados en laboratorio se observó que bajo condiciones de insuficiencia de determinados nutrientes, los estadios inmaduros de los hospedadores podrían beneficiarse debido a que estos hongos son capaces de sintetizar y otorgar dichos nutrientes esenciales. De esta manera, existe una relación mutualista debido a que el hongo y el hospedador se ven beneficiados. Bajo determinadas circunstancias, la relación entre estos simbioses es patogénica, ya que se observó que algunas especies de Trichomyces pueden causar la muerte de ciertos hospedadores dípteros.

## 2 - ANTECEDENTES

### Definición, historia y clasificación:

La Clase Trichomycetes pertenece al Phylum Zygomycota e incluye a los hongos que se encuentran asociados simbióticamente al tubo digestivo de un amplio rango de artrópodos mandibulados tales como insectos, crustáceos y miriápodos. Estos hospedadores son principalmente detritívoros, herbívoros y, en menor grado depredadores (Lichtwardt 1986). El término Trichomycetes hace alusión a la apariencia de “pelo” (en griego, *tricho* = pelo) en el intestino del hospedador de alguno de estos organismos y fue propuesto en el año 1948 por Duboscq et al.

Estos hongos se han encontrado asociados a una gran variedad de ambientes en todos los continentes, con excepción de la Antártida (Misra 1998, White 2002) encontrándose casi exclusivamente en ambientes acuáticos, aunque se han citado unos pocos asociados a hospedadores terrestres. La especificidad de la mayoría de los géneros de estos hongos con respecto a sus hospedadores es a nivel de familia (Lichtwardt 1996). Posiblemente en los casos en donde se describen ejemplos de especificidad a ciertos niveles taxonómicos del hospedador, podría ser resultado de insuficientes estudios de hospedadores (Nelder et al 2006).

La primera cita de un Trichomycete (*Enterobryus elegans*) fue realizada por Leidy (1849), quien identificó esta especie a partir del tubo digestivo del miriápodo *Narceus americanus*. Los órdenes Eccrinales y Amoebidiales fueron los primeros órdenes de Trichomycetes en ser descritos (Léger & Dubosq 1929). En el año 1968 Manier y Lichtwardt validaron los órdenes Harpellales y Asellariales, conformándose de esta manera el sistema de 4 órdenes para la clase Trichomycetes (estos órdenes habían sido citados previamente en la literatura, pero nunca habían sido validados). Esta clasificación que considera a los órdenes Amoebidiales, Eccrinales, Asellariales y Harpellales estuvo vigente hasta hace unos años, pero gracias al avance de las técnicas moleculares utilizadas en estudios filogenéticos, se demostró que este sistema de 4 órdenes para la clase Trichomycetes no es natural (O'Donnell et al 1998, Benny 2001, Cafaro 2005, White et al 2006a). Esta idea ya había sido propuesta por Whisler (1963), Lichtwardt (1986) y Moss (1999) quienes, tomando como base

caracteres morfológicos ultraestructurales, dudaron de la relación entre los órdenes Amoebidiales y Eccrinales con el resto de los Trichomycetes.

Benny & O'Donnell (2000) demostraron por medio de técnicas moleculares, que *Amoebidium parasiticum* no sería un hongo, sino un protozoo. De esta manera, pasó a considerarse que la clase Trichomycetes estaba conformada por 3 órdenes. Cafaro (2005) demostró que el orden Eccrinales tampoco pertenece a la clase Trichomycetes. Actualmente, estos órdenes que han sido excluidos de la clase Trichomycetes se incluyeron dentro del orden Ichthyophonida, el cual pertenece a la clase Mesomycetozoa (Benny & O'Donnell 2000, Mendoza et al 2002, Cafaro 2005) y se ubica cerca de la divergencia temprana entre animales y hongos. De esta manera, se considera que la Clase Trichomycetes está compuesta por los órdenes Asellariales y Harpellales (Cafaro 2005), habiéndose incluido en un principio a los Amoebidiales sólo por su similitud en la morfología del talo y por su asociación simbiótica con artrópodos, y a los Eccrinales debido a que comparten el mismo nicho ecológico, o sea, el tubo digestivo de artrópodos.

Sangar et al (1972), Moss (1975) y Moss & Young (1978), utilizando caracteres morfológicos y serológicos, fueron los primeros en proponer que los Asellariales y los Harpellales estaban relacionados filogenéticamente con el orden Kickxellales (Zygomycota: Zygomycetes). Estos resultados fueron sustentados por medio de un estudio realizado por O'Donnell et al (1998) en el cual se utilizaron las secuencias de las subunidades nucleares pequeñas (rDNA), como así también datos morfológicos y fisiológicos. Posteriormente, Gottlieb & Lichtwardt (2001) obtuvieron resultados similares.

Cafaro (2003) destacó que la clase Trichomycetes fue pobremente estudiada por diversas razones, como por ejemplo, porque no presentaría importancia económica, y porque no existen modificaciones anatómicas del hospedador artrópodo pasando desapercibidos si no se realiza la disección. A su vez, debido a que solo se pudieron cultivar unas pocas especies de Trichomycetes, los estudios fisiológicos sobre este grupo de hongos son escasos, siendo la mayoría de los trabajos realizados hasta el momento de carácter taxonómico. Con la obtención de cultivos de varias especies de *Smittium*, este género fue utilizado para la mayoría de los estudios sobre la biología de los Trichomycetes. Son escasos los datos sobre la relación

existente entre los hospedadores y estos hongos, como así también se conoce muy poco sobre su ecología y su transmisión.

### **Orden Harpellales**

Estos organismos comúnmente llamados harpélidos, se asocian exclusivamente con estados inmaduros de insectos dulceacuícolas, con excepción de *Legeriodes tumidus* White que se encuentra en isópodos (Crustacea). La mayor parte de los estudios realizados sobre hongos Trichomycetes han sido sobre el orden Harpellales.

El orden Harpellales está comprendido por las familias Harpellaceae y Legeriomycetaceae, encontrándose la primera asociada al tubo digestivo medio, y la segunda al tubo digestivo posterior de los hospedadores. Hasta el momento, se describieron 5 órdenes de insectos hospedadores (Diptera, Coleoptera, Trichoptera, Ephemeroptera y Plecoptera). No se han observado Harpellales creciendo en el tubo digestivo anterior.

Los caracteres morfológicos que reúnen a los organismos de este orden son (Alexopoulos et al 1996, Lichtwardt et al 2001a, Adl et al 2005):

- Talos adheridos a la cutícula del tubo digestivo posterior, o a la membrana peritrófica que rodea internamente al tubo digestivo medio de estadios inmaduros de insectos acuáticos
- Talos septados que pueden o no estar ramificados, y que presentan pared quitinosa
- reproducción asexual a través de tricosporas
- reproducción sexual por medio de cigosporas cónicas o bicónicas

#### Ciclo biológico

Las esporas asexuales ó tricosporas son las principales estructuras especializadas en la dispersión y colonización de nuevos hospedadores. Estas tricosporas son esporangios deciduos que contienen en su interior una única esporangiospora uninucleada y normalmente contienen adheridos basalmente entre uno y varios apéndices filamentosos no móviles (Moss & Lichtwardt 1976). Si bien la función de los apéndices es incierta, se supone que podrían ayudar a las tricosporas a adherirse a detritos hasta que son ingeridas por el



insecto (Moss 1999). En la base de dichas esporas puede quedar adherida una estructura que se denomina collar, el cual pertenece a la célula generativa de la cual derivan.

Luego de ser ingeridas, las tricosporas “germinan” en el tubo digestivo medio o posterior del hospedador, liberándose la esporangiospora que se encuentra en su interior. El proceso de germinación requiere de un estímulo que incluye cambios en el pH y en las concentraciones iónicas dentro del tubo digestivo (Horn 1989a, 1989b). Las esporangiosporas liberadas durante este proceso desarrollan rápidamente una estructura de fijación (= “holdfast”) por medio de la cual se adhieren firmemente al hospedador. El crecimiento vegetativo del hongo comienza inmediatamente luego de que ocurrió la fijación.

Luego, las tricosporas desarrolladas a partir de las células germinativas de los talos, son eliminadas por medio de las heces del hospedador. Estas esporas tendrían la capacidad de resistir condiciones adversas (siempre y cuando permanezcan húmedas) llegando a soportar hasta varios meses antes de que sean ingeridas por un nuevo hospedador (Williams 1983).

La reproducción sexual está ausente (o no se ha observado) en la mayoría de las especies, y cuando ocurre, generalmente es menos frecuente que la reproducción asexual. Este tipo de reproducción está dado por la conjugación entre talos diferentes, de la cual se desarrollan las esporas sexuales ó cigosporas que presentan una pared gruesa y cuya función no está totalmente conocida. Estas cigosporas podrían ser efímeras y germinar rápidamente luego de su formación (Moss 1970, Lichtwardt 1972) o podrían actuar como "esporas de resistencia". Generalmente, las cigosporas son observadas en el período previo a la muda del hospedador, e incluso, se han observado exuvias de los hospedadores conteniendo un gran número de cigosporas. Debido a esto, Lichtwardt (1986) sugirió que la producción de las esporas sexuales podría estar relacionada con las hormonas que regulan el proceso de ecdisis. Sin embargo, Rizzo & Pang (2005) sugirieron que la producción de las cigosporas no estaría relacionada con dichas hormonas, sino que necesitarían un tiempo prolongado para ser producidas, siendo el período previo a la ecdisis el período más largo entre ecdisis y ecdisis.

Las cigosporas están clasificadas en 4 tipos de acuerdo a su orientación con el cigosporóforo (Lichtwardt 1986):

Tipo I: la unión ocurre en la región media (entre ambos polos) de la cigospora, disponiéndose perpendicularmente al cigosporóforo.

Tipo II: las cigosporas están unidas al cigosporóforo en su región submedial, por lo que se disponen oblicuamente a este.

Tipo III: la unión ocurre en la región media (entre ambos polos) de la cigospora como ocurre en el Tipo I, pero las cigosporas se orientan paralelamente al cigosporóforo.

Tipo IV: la unión es en uno de los polos, por lo que las cigospora y el cigosporóforo son coaxiales.

#### Asociación hongo - hospedador

La asociación entre estos hongos y sus hospedadores es simbiótica. El término simbiosis fue introducido por el botánico alemán Anton de Bary (1879), definiéndola como una asociación permanente entre dos o más organismos específicos diferentes durante al menos una parte de su vida. Este autor incluyó dentro del término simbiosis, a las relaciones comensales, mutualistas y patogénicas. La relación simbiótica entre los Trichomycetes y sus hospedadores puede ser comensalista, mutualista o, en ciertos casos patogénica (Horn & Lichtwardt 1981, Labeyrie et al 1996; McCreddie et al 2005). Según el último autor la asociación simbiótica entre larvas de simúlidos y Trichomycetes es dinámica, habiendo comensalismo cuando las larvas están bien alimentadas, mutualismo cuando están sometidas a largos períodos de ayuno, y patogénica en los adultos.

Se cree que el comensalismo es el tipo de asociación que ocurre más frecuentemente, en donde el hongo se beneficia al encontrar dentro del tubo digestivo del hospedador un lugar donde puede crecer y desarrollarse, mientras que el hospedador no resulta beneficiado ni perjudicado. Los nutrientes utilizados por los Trichomycetes podrían derivar de materiales naturales del hospedador, como por ejemplo secreciones, tejidos y desechos, o podrían derivar de la acción de las enzimas (producidas por los hospedadores u otros organismos que se encuentran en el tubo digestivo) sobre el alimento presente en el tubo digestivo.

Los insectos son incapaces de sintetizar el núcleo esteroideo necesario para la producción de esteroides (Svoboda & Robbins 1975), por lo que en ausencia de un recurso externo de esteroides se detiene el desarrollo de sus estadios inmaduros. En extractos de lípidos obtenidos a partir de cultivos del Trichomycete *Smittium culisetae*, se observó que este hongo es capaz de sintetizar desmosterol y colesterol (Starr et al 1979, Horn & Lichtwardt 1981), los cuales pueden satisfacer las necesidades lipídicas de los insectos hospedadores. Estos lípidos podrían ser absorbidos directamente por el hospedador o podrían ser liberados al exterior para luego ser ingeridos. Además, se observó que el harpélido *Sm. culisetae* produce varias vitaminas B que tampoco son sintetizada por los insectos (Clements 1992). De esta manera el hongo podría beneficiar al hospedador otorgándole los lípidos y vitaminas que éste no puede sintetizar y que son esenciales para el desarrollo normal (Benjamin et al 2004), por lo que existiría de esta manera una relación mutualista.

Si bien la asociación entre los Trichomycetes y sus hospedadores puede ser patogénica, esto solo ocurre en pocos casos. *Smittium morbosum* es una de las especies de Trichomycetes que puede ser patógena para sus hospedadores. Esta especie se encuentra en la cámara pilórica del tubo digestivo posterior del hospedador y tiene la capacidad de crecer hacia el tubo digestivo medio, donde produce la perforación de las células epiteliales pasando luego al hemocele (Sweeney 1981a y 1981b, Sato 1989, López Lastra 1990, Shimada et al 1995). Como respuesta inmunológica del hospedador, los talos que penetran se encuentran melanizados, lo cual puede evidenciarse como una mancha oscura (zona de melanización) en el área de penetración. En estados avanzados de infección, el hongo también puede penetrar y crecer dentro de los túbulos de Malpighi. Si bien se desconoce cual es la causa exacta de la muerte de estas larvas, esta podría estar asociada a la alta cantidad de flora bacteriana que es arrastrada desde la columna de alimento dentro del tubo digestivo medio (Sweeney 1981b), o más posiblemente porque el hongo produce una alteración en el proceso de ecdisis (Shimada et al 1995). En aquellos casos en donde las larvas infectadas logran sobrevivir y continuar su desarrollo, el hongo puede llegar a encontrarse en el hemocele de su estadio adulto.

Los harpélidos *Harpella melusinae* y *Genistellospora homothallica* también pueden ser perjudiciales para sus hospedadores. Ambas especies se encuentran asociadas a simúlidos, y tienen la capacidad de producir clamidosporas dentro de los ovarios de las hembras hospedadoras adultas. Estas clamidosporas reemplazan total o parcialmente a los huevos que se encuentran dentro de una hembra grávida, produciéndole castración parasitaria. Durante la oviposición, las clamidosporas son depositadas por las hembras en el agua (Moss 1998, Benny 2001, McCreadie et al 2005), y a partir de estas se desarrollan tricosporas o cigosporas que van a actuar como inóculo para otras larvas (Labeyrie et al 1996, Rizzo & Pang 2005). En este caso, los hospedadores son perjudicados debido a que se produce la castración parasitaria de las hembras, reduciéndose de esta manera el número de huevos depositados en el ambiente. Por otro lado, los hongos se ven beneficiados debido a que la presencia de clamidosporas en los estadios adultos de los hospedadores permitiría dispersar el inóculo a nuevos ambientes.

En un principio, estas clamidosporas fueron citadas erróneamente como pertenecientes a los hongos "Phycomycetes" (Garms 1975, Undeen & Nolan 1977, Yeboah et al 1984), pero luego, Moss & Descals (1986) identificaron a estas clamidosporas como una fase en el ciclo biológico de Trichomycetes.

### Hospedadores.

Los harpélidos se asocian al tubo digestivo medio o posterior de estados inmaduros de insectos dulceacuícolas. En el presente estudio, se realizó principalmente la prospección de larvas de mosquitos (Culicidae), simúlidos (Simuliidae) y quironómidos (Chironomidae), todos pertenecientes al orden Diptera.

### Estructura generalizada del tubo digestivo de una larva de un insecto díptero.

(Fig. 1 y 7 d-f)

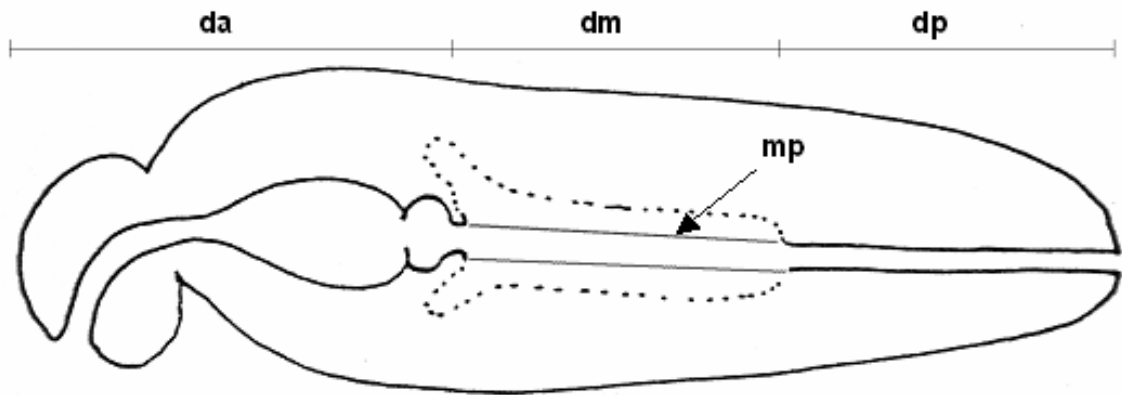
Al igual que en el resto de los artrópodos, el aparato digestivo de los insectos dípteros es básicamente un tubo recto dispuesto longitudinalmente desde el extremo oral al extremo posterior del animal. Este aparato digestivo está dividido en 3 regiones (Richards & Davies 1983) denominadas:

- **Estomodeo (ó tubo digestivo anterior):** se desarrolla como una invaginación ectodérmica anterior, e incluye la región bucal, la faringe y el esófago. Está implicado en la ingestión del alimento.
- **Mesenterón (ó tubo digestivo medio):** conecta la región anterior y posterior del tubo digestivo. A diferencia de las otras regiones del tubo digestivo, el tubo digestivo medio se desarrolla como un saco endodérmico. En esta región se producen las enzimas digestivas, y es donde ocurre principalmente la digestión y absorción.
- **Proctodeo (ó tubo digestivo posterior):** Se desarrolla como una invaginación ectodérmica posterior e interviene en la absorción de agua y formación de las heces.

Debido al origen ectodérmico de la región anterior y posterior del tubo digestivo, el epitelio que rodea ambas regiones está tapizado por cutícula. De esta manera, cuando los insectos sufren el proceso de muda, esta cutícula es eliminada junto a la cutícula que rodea externamente a todo el animal (Clements 1992), por lo que también es eliminado todo el inóculo fúngico adherido a dicha cutícula.

La región media del tubo digestivo no se encuentra tapizada por cutícula, sino que el epitelio de esta región está rodeado por la membrana peritrófica. Esta membrana forma una cubierta alrededor de la masa de alimento que separa y protege a las células epiteliales de la columna de alimento, e impide la entrada de la mayoría de los patógenos. La membrana peritrófica es permeable a las enzimas producidas por el epitelio, y es permeable a los productos de la digestión.

Se han citado Trichomycetes desarrollándose en el tubo digestivo medio y posterior, pero no se observó ninguna especie creciendo en el tubo digestivo anterior.



**Fig. 1.** Tubo digestivo generalizado de una larva de un insecto díptero. da = digestivo anterior, dm = digestivo medio, dp = digestivo posterior, mp = membrana peritrófica. Esquema modificado de Richards & Davies (1983).

#### Tipo de hospedadores. Fig. 2

##### **Culicidae**

La familia Culicidae está compuesta por más de 3500 especies, de las cuales muchas presentan importancia sanitaria. Debido a que la mayoría de las hembras de culícidos necesitan ingerir sangre para el desarrollo de la ovogénesis, son capaces de transmitir a través de sus picaduras, parásitos y patógenos tales como virus, protozoos y nemátodos. Como ejemplo de agentes etiológicos transmitidas por estos insectos vectores, se pueden citar diferentes filarías tales como *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* y *Dirofilaria imitis*; varios tipos de arbovirus, como por ejemplo el causante del dengue, de la fiebre amarilla, y de varias encefalitis; como así también actúan como transmisor del protozoo (*Plasmodium*) causante del paludismo. Los mosquitos han sido y son causantes de importantes epidemias principalmente en regiones tropicales y subtropicales. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2004), se producen anualmente más de 540 millones enfermedades transmitidas por mosquitos, y hay más de 3.000 millones de personas que

viven en áreas de riesgo de contraer dichas enfermedades. Además de presentar importancia sanitaria, estos insectos tienen importancia económica debido a que cuando las poblaciones de mosquitos son altas producen grandes pérdidas en las actividades agrícola-ganadera y turística (OMS 2004).

Las larvas de la mayoría de los mosquitos viven en ambientes dulceacuícolas, mientras que aproximadamente el 5% de las especies viven en ambientes salobres o salinos (Clements 1992).

Solo se han descrito 5 especies de Harpellales que viven en el tubo posterior de mosquitos (Lichtwardt et al 2001a, White et al 2006b), pertenecientes todas al género *Smittium*. Hasta el momento no se encontró ninguna especie de harpélido asociada al tubo digestivo medio, aunque se citaron esporangiosporas de *Sm. culisetae* (Pereira et al 2005) y de *Sm. culicis* (López Lastra et al 2005) adheridas a la membrana peritrófica de larvas de *Ae. aegypti*. Esto último podría deberse a un desarrollo anormal, en donde las tricosporas germinan prematuramente y las esporangiosporas se adhieren al tubo digestivo medio, pero al no encontrar las condiciones adecuadas no logran continuar con su desarrollo.

Como se mencionó anteriormente, *Sm. morbosum* es una de las especies que puede resultar patogénica y producir la muerte a larvas de mosquitos, debido a que tiene la capacidad de crecer desde el tubo digestivo posterior hacia el tubo digestivo medio y penetrar las células epiteliales para luego ubicarse en el hemocele. Los resultados obtenidos en estudios de laboratorio (Sweeney 1981b, López Lastra 1990) permitieron considerar a este hongo como potencial controlador biológico de mosquitos. A pesar de estos resultados promisorios sería posible inferir que *Sm. morbosum* tendría ciertas desventajas como no resistir condiciones de sequía, por lo que su uso como agente potencial para control biológico no sería efectivo.

### **Simuliidae**

Las larvas y pupas de simúlidos son acuáticas, mostrando preferencia por aguas que fluyen (Sther 1991). Las hembras adultas generalmente necesitan ingerir sangre a partir de la picadura sobre animales de sangre caliente para la oviposición. Estas hembras, constituyen una de las plagas más importantes en humanos y en animales (domésticos y salvajes), no solo por la

reacción que causa su picadura, sino porque tienen la capacidad de transmitir virus, bacterias, protozoos y helmintos por medio de la misma (Crosskey 1990). Una de las enfermedades más importantes transmitida por simúlidos, es la filaria *Onchocerca volvulus*, agente causal de la oncocercosis ó "ceguera de los ríos", presente en áreas tropicales de África, América Central y norte de Sudamérica.

Se describieron hasta el momento más de 30 especies de harpélidos distribuidas en 10 géneros (Misra & Lichtwardt 2000, Lichtwardt et al 2001a) asociadas a larvas de simúlidos, de las cuales se observaron dos especies (*Harpella melusinae* y *G. homothallica*) que pueden causar daño al hospedador debido a que le producen castración parasitaria a las hembras. Al no haberse obtenido cultivos axénicos de estas especies patógenas, solo se han realizado unos pocos estudios experimentales sobre su uso como potencial controlador biológico (Rizzo & Pang 2005).

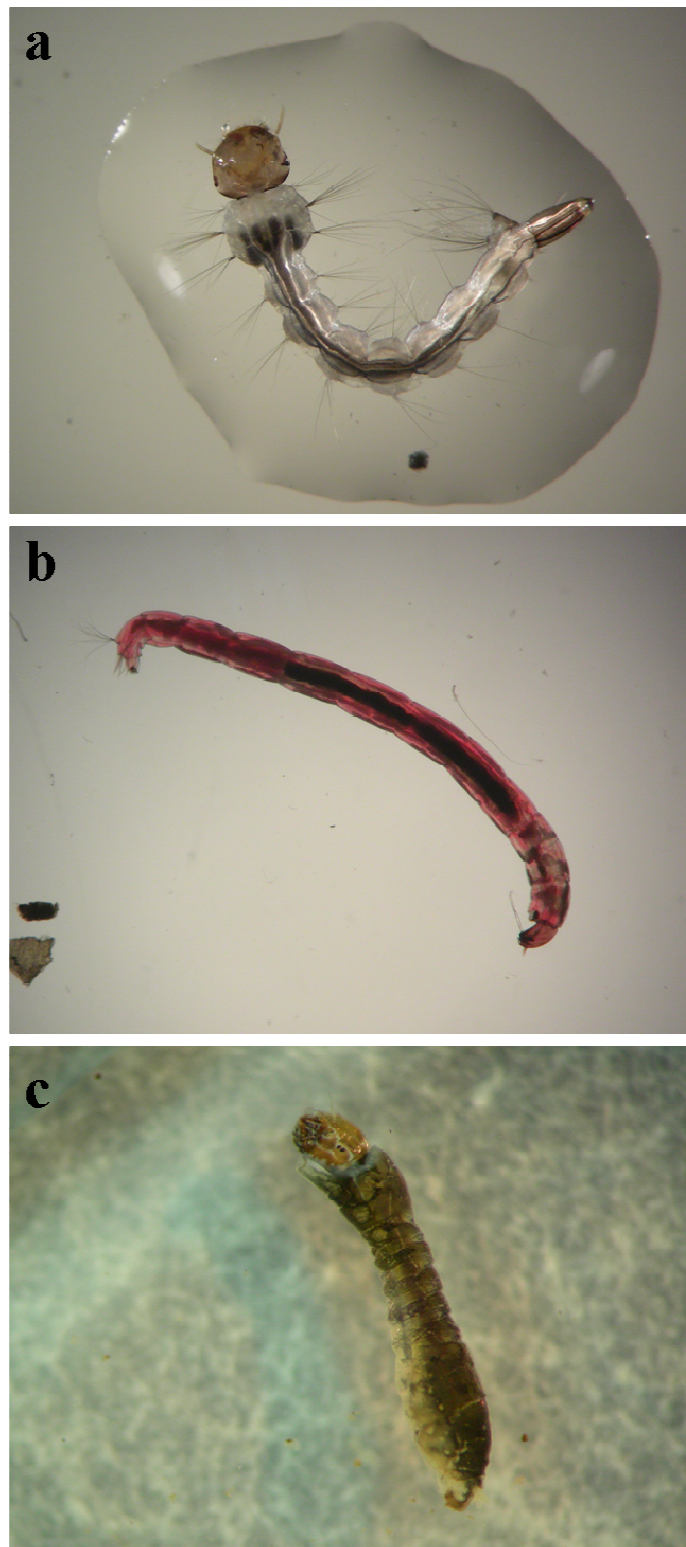
### **Chironomidae**

Esta es una de las familias de dípteros con distribución más amplia, encontrándose en todo tipo de ambiente lótico y léntico, desde el Ártico hasta la Antártida (Bass 1986). Las larvas de quironómidos se desarrollan en una gran diversidad de ambientes dulceacuícolas. A su vez, algunas especies presentan un amplio rango de tolerancia a la salinidad y viven en ambientes salobres, mientras que otras viven en ambientes marinos (Pinder 1995).

En lagos, lagunas, e incluso en arroyos contaminados, ocurren emergencias simultáneas de adultos, por lo que se forman grandes nubes que causan serias molestias al hombre (Cilek & Knapp 1992). Estas nubes de quironómidos adultos son enjambres de cópula y normalmente ocurren al atardecer. Además de las molestias que pueden ocasionar, se han citado diferentes tipos de alergias causadas por quironómidos (Aldunate et al 1999).

Los quironómidos son uno de los hospedadores más comunes de Harpellales, habiéndose registrado la presencia de más de 90 especies (distribuidas en 6 géneros). Moss (1998) citó la existencia de clamidosporas de *Smittium* sp. asociadas al mucílago que recubre los huevos. Al igual que ocurre en los simúlidos, estas clamidosporas reemplazan parcial o totalmente a los huevos dentro del ovario de las hembras adultas.





**Fig. 2.** Estadios larvales de los principales hospedadores relevados en el presente estudio.

a) mosquito. b) quironómido. c) simúlido.

## Ambientes:

### Ambientes lénticos

Como ejemplo de ambientes lénticos en los cuales se han encontrado harpélidos asociados al tubo digestivo de estadios inmaduros de insectos, se pueden citar ambientes naturales (charcos de inundación, lagunas y fitotelmata) y artificiales (zanjas domiciliarias, recipientes y piletas de natación). Se define como fitotelmata a las estructuras presentes en plantas terrestres que tienen la capacidad de almacenar agua, tales como hojas modificadas, axilas, flores, agujeros o depresiones en el tallo, frutos u hojas caídas (Fish 1983). De esta manera se crea un "microambiente" al cual se encuentra asociados una amplia variedad de artrópodos (Campos & Lounibos 1999, Donato & Paggi 2005).

Entre los insectos que son hospedadores de harpélidos en estos tipos de ambientes, se han encontrado por ejemplo larvas de mosquitos, quironómidos y ceratopogónidos.

### Ambientes lóticos.

Dentro de este tipo de ambiente se incluyen cuerpos de agua en los que el agua fluye, como por ejemplo arroyos y ríos. Algunos ambientes lóticos son permanentes y se mantienen durante todo el año, mientras que otros son temporales. Se han citado una gran diversidad de harpélidos asociados a estados inmaduros de artrópodos que viven en este tipo de ambiente, como por ejemplo larvas de simúlidos, quironómidos, plecópteros y efemerópteros.

En estudios realizados en zonas tropicales se observó que la diversidad de Trichomycetes es menor que en zonas templadas y frías (White et al 2000). La mayor diversidad de Trichomycetes estaría asociada con temperaturas relativamente bajas del agua, como así también con aguas bien oxigenadas y que fluyen rápidamente (Lichtwardt et al 2000, Lichtwardt et al 2001b).

Si bien se define que los hongos Trichomycetes se encuentran en ambientes dulceacuícolas, Tuzet et al (1961) encontraron infecciones del harpélido *Sm. culicis* en poblaciones del culícido eurihalino *Ae. detritus* Halliday

en ambientes con concentraciones de NaCl entre 1 y 14 ‰. Estos autores estudiaron poblaciones del mismo culícido de ambientes con concentraciones salinas elevadas, aunque estas larvas no estuvieron infectadas por *Sm. culicis*. Luego, criaron en el laboratorio larvas de *Ae. detritus* en diferentes concentraciones salinas y observaron que luego de que ocurría el proceso de muda, las larvas no se re infectaban por el hongo.

El-Buni (1975) realizó pruebas de resistencia de las tricosporas frente a diferentes concentraciones salinas, y observó que estas toleraron hasta concentraciones elevadas de NaCl. De acuerdo a estos resultados, El-Buni sugirió que las tricosporas son osmotolerantes y, que el crecimiento y desarrollo del hongo en mosquitos hospedadores que viven en ambientes con altas concentraciones salinas podrían estar inhibidos por las condiciones dentro del tubo digestivo del hospedador.

### Orden Asellariales

Este orden incluye solamente los géneros *Asellaria* Poisson, *Baltomyces* Cafaro y *Orcheselaria* Manier & Lichtwardt. Los dos primeros géneros están asociados con isópodos (Crustacea: Malacostraca), mientras que el último se asocia a colémbolos (Entognatha: Collembola). Hasta el presente no se han registrado especies de Asellariales asociadas a insectos.

Los representantes de este orden se caracterizan por presentar esporas asexuales denominadas artrosporas, y por poseer talos ramificados e irregularmente septados. Estos septos que son incompletos y que se forman en la base de las ramificaciones, presentan una cavidad lenticular que contiene un tapón septal (Saikawa et al 1997).

La presencia de reproducción sexual en el orden Asellariales fue observada por Lichtwardt (1973), quien observó conjugaciones escalariformes entre talos de *Asellaria ligiae* Tuzet & Manier dentro del tubo digestivo de isópodos dulceacuícolas recolectados en Hawaii. Las esporas sexuales ó cigosporas de Asellariales, fueron descritas por primera vez en un estudio reciente realizado en el Caribe (Valle & Cafaro 2008).

### Situación actual del conocimiento de Trichomycetes en Argentina:

El primer registro de hongos Trichomycetes para la República Argentina fue realizado por López Lastra (1990), quien citó la presencia del hongo *Sm. morbosum* var *rioplatensis* (O. Harpellales) patógeno de mosquitos, afectando larvas de 5 especies de culícidos. Otros registros posteriores de esta especie fúngica fueron realizados por García et al (1994), Campos et al (1995), Maciá et al (1995, 1996-1997), quienes informaron las variaciones poblacionales de varias especies de culícidos y de sus enemigos naturales en la provincia de Buenos Aires.

Debido a que nuestro país abarca una extensa región norte - sur, se pueden encontrar una gran diversidad de condiciones y ambientes óptimos para la presencia de potenciales artrópodos hospedadores, y por consiguiente para la presencia de hongos Harpellales. Se han realizado 4 trabajos netamente taxonómicos de Trichomycetes en la Argentina (Lopez Lastra 1997, Lichtwardt et al 1999, Lichtwardt et al 2000, López Lastra et al 2005) en los cuales se abarcó parte del noroeste, noreste, sur, y parte de la provincia de Buenos Aires. Como resultado de estos trabajos, se describieron 9 nuevas especies de harpélidos, 16 especies que ya habían sido descritas, y 4 especies no determinadas. A su vez, se describieron 2 nuevas especies de Amoebidiales. Cafaro (2000), describió en la región patagónica Argentina a *Palavascia patagonica*, como una nueva especie del orden Eccrinales asociada a isópodos.

López Lastra et al (2003) informaron sobre la prevalencia de hongos Trichomycetes asociados a insectos que viven en los vasos de flores en el cementerio de La Plata (Buenos Aires) y la variación estacional de estos hongos en condiciones naturales.

### **3 - HIPÓTESIS**

- **La gran diversidad de ambientes en los cuales están citados hospedadores de Trichomycetes en Argentina, permitiría pensar que la diversidad de estos hongos sería muy elevada, incluso en ambientes dulciacuícolas temporales.**
- **Las tricosporas tienen la capacidad de resistir diferentes condiciones ambientales. Sin embargo, éstas no resisten condiciones de desecación, por lo que debe existir recolonización del inóculo en ambientes que no son permanentes. Por lo cual, los Trichomycetes no presentarían estacionalidad a lo largo del año.**
- **Bajo condiciones de estrés, los hospedadores pueden verse beneficiados por la presencia de hongos Trichomycetes.**

**4 - OBJETIVOS**

- **Aislar e identificar hongos Trichomycetes en insectos dípteros vectores.**
- **Evaluar la persistencia y viabilidad de las tricosporas en condiciones de laboratorio.**
- **Dilucidar las vías de transmisión de los Trichomycetes en la naturaleza.**
- **Determinar la variación estacional y prevalencia natural de los Trichomycetes.**
- **Evaluar el efecto de los hongos Trichomycetes sobre el tamaño y fecundidad de las hembras adultas de culícidos.**

## 5 - MATERIALES Y MÉTODOS:

### 5 - 1. Área de recolección de Trichomycetes

Los relevamientos realizados en el presente estudio abarcaron regiones de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, San Luis, Neuquén y La Rioja (Tabla I y Fig. 3), principalmente en áreas que no habían sido exploradas en busca de hongos Trichomycetes. Las muestras fueron recolectadas según el tipo de hospedador y el tipo de ambiente acuático:

#### 5 - 1 - 1. Recolección en ambientes lénticos (Fig. 4)

Las muestras obtenidas a partir de este tipo de ambiente, fueron tomadas con un cucharón (250 cc) y fueron filtradas a través de una red de malla fina (tamaño de poro aproximado = 0,25 mm) y colocadas dentro de un recipiente plástico (3000 cc). En este tipo de ambientes, se recolectaron principalmente larvas de mosquitos y de quironómidos.

En el caso de fitotelmata, el agua almacenada entre las axilas de las hojas de plantas de *Eryngium* L. (Apiacea) fue extraída por medio de pipetas plásticas (3 ml) y colocada en recipientes de plástico limpios (200 cc de capacidad) para su traslado al laboratorio.

#### 5 - 1 - 2. Recolección en ambientes lóticos (Fig. 5)

En este ambiente se recolectaron principalmente larvas de simúlidos (Diptera: Simuliidae) y quironómidos (Diptera: Chironomidae). Para la recolección de simúlidos, el sustrato (por ejemplo plantas acuáticas) que contenía estados inmaduros de dichos insectos, fue colocado dentro de una bolsa plástica y cerrada herméticamente (Fig. 6). A su vez, se removió el sustrato del arroyo y se pasó una red de arrastre para capturar larvas de quironómidos, como así también larvas y ninfas de diferentes tipos de artrópodos acuáticos (efemerópteros, plecópteros, etc).

En todos los casos, luego de la recolección, se colocó cada muestra en un frasco individual rotulado donde figuraba el sitio de muestreo y el número de muestra. Las muestras fueron mantenidas en frío en una conservadora con hielo hasta el arribo al laboratorio. Se obtuvieron los datos de temperatura del

agua, pH (Precision®), temperatura y humedad del ambiente. Algunos ejemplares de los hospedadores fueron fijados en alcohol 70% para su posterior determinación taxonómica.

TABLA I. Sitios de recolección del material

SITIO	AMBIENTE	FECHA	LOCALIDAD	PROVINCIA	LONGITUD / LATITUD
ARR-1	Campo de Arroz	*	Los Hornos	Buenos Aires	34° 59' 20.1" S, 57° 59' 43.1" W
ARR-2	Zanja bordeando campo de arroz	22-XII-2004 01-II-2005 06-VII-2005	Los Hornos	Buenos Aires	35° 59' 20.1" S, 57° 59' 43.1" W
BG-1	Río Salado	03-XI-2004	General Belgrano	Buenos Aires	35° 44' 42.8" S, 58° 31' 31.1" W
BG-2	Charcos en el borde del Río salado	03-XI-2004	General Belgrano	Buenos Aires	35° 44' 42.8" S, 58° 31' 31.1" W
BG-3	Zanja domiciliaria	03-XI-2004	General Belgrano	Buenos Aires	35° 45' 43.9" S, 58° 29' 48.7" W
BG-4	<i>Eryngium</i> sp (Fitotelmata)	03-XI-2004	General Belgrano	Buenos Aires	35° 44' 33.5" S, 58° 28' 59.6" W
BG-5	<i>Eryngium</i> sp (Fitotelmata)	03-XI-2004	Jeppener	Buenos Aires	35° 30' 54.0" S, 58° 21' 27.5" W
CEM	Recipientes para flores en cementerio	10-II-2005 23-III-2005 31-III-2005 27-IV-2005 26-V-2005 29-VI-2005 02-II-2006 21-IV-2006	La Plata	Buenos Aires	34° 57' 30.0" S, 57° 57' 48.0" W
CHA-1	Arroyo Seco	06-XI-2004	Chusadmalal	Buenos Aires	38° 10' 39.0" S, 57° 39' 28.4" W
CHAS-1	Arroyo Vitel	04-IV-2004	Chascomús	Buenos Aires	35° 30' 49.6" S, 58° 08' 35.4" W
CHAS-2	Arroyo que comunica Laguna Vitel con Laguna de Chascomús	04-IV-2004	Chascomús	Buenos Aires	35° 32' 29.2" S, 58° 04' 37.8" W
CHAS-3	Arroyo que comunica laguna Chascomús con Laguna Manantiales	04-IV-2004	Chascomús	Buenos Aires	35° 38' 28.6" S, 58° 00' 18.5" W
CHAS-4	Arroyo San Felipe	04-IV-2004	Chascomús	Buenos Aires	35° 35' 40.2" S, 57° 58' 24.1" W
ChL-1	Charco temporal	20-VII-2005 28-VII-2005 06-VIII-2005 10-XI-2005 23-III-2006 30-X-2006 28-XII-2006 06-III-2007	Arana	Buenos Aires	35° 00' 41.3" S, 57° 54' 49.0" W



SITIO	AMBIENTE	FECHA	LOCALIDAD	PROVINCIA	LONGITUD / LATITUD
ChL-2	<i>Eryngium</i> sp.	20-VII-2005 28-VII-2005 23-III-2006 28-XII-2006	Arana	Buenos Aires	35° 00' 41.3" S, 57° 54' 49.0" W
ChL-3	Zanja	28-XII-2006	Arana	Buenos Aires	35° 00' 41.3" S, 57° 54' 49.0" W
BNS-1	<i>Eryngium</i> sp (Fitotelmata)	16-V-2005	Esenada	Buenos Aires	34° 55' 01.5" S, 57° 44' 33.3" W
LAN-1	Arroyo Rucu Leufú	15-I-2005	Junín de los Andes	Neuquén	39° 43' 13.6" S, 71° 31' 41.7" W
LAN-2	Arroyo pequeño a 100 m de LAN 1	15-I-2005	Junín de los Andes	Neuquén	39° 43' 15.6" S, 71° 31' 38.0" W
LAN-3	Arroyo Raquiné	16-I-2005	Junín de los Andes	Neuquén	39° 45' 39.3" S, 71° 17' 22.2" W
LAN-4	Arroyo (nombre desconocido)	17-I-2005	Junín de los Andes	Neuquén	39° 42' 51.7" S, 71° 31' 55.9" W
LAN-5	Arroyo (nombre desconocido)	17-I-2005	Junín de los Andes	Neuquén	39° 44' 49.3" S, 71° 20' 22.2" W
LAN-6	Arroyo (nombre desconocido)	17-I-2005	Junín de los Andes	Neuquén	39° 45' 06.9" S, 71° 30' 01.2" W
LF-1	Arroyo Río Grande de Funilla	21-IX-2006	La Falda	Córdoba	31° 05' 49.7" S, 64° 30' 04.5" W
LP-1	<i>Eryngium</i> sp (Fitotelmata)	14-XII-2004	La Plata	Buenos Aires	35° 00' 17.2" S, 58° 06' 45.6" W
LP-2	Zanja domiciliarias	14-XII-2004	La Plata	Buenos Aires	34° 59' 33.4" S, 58° 08' 04.6" W
LP-3	Zanja domiciliarias	14-XII-2004	La Plata	Buenos Aires	34° 59' 18.1" S, 58° 08' 22.2" W
LP-4	Zanja domiciliarias	14-XII-2004	La Plata	Buenos Aires	34° 56' 52.6" S, 58° 05' 40.5" W
LP-5	Arroyo del Gato	14-XII-2004	La Plata	Buenos Aires	34° 58' 45.4" S, 58° 03' 00.8" W
LP-6	Zanja domiciliarias	25-I-2005	La Plata	Buenos Aires	34° 57' 10.3" S, 58° 02' 34.3" W
LP-7	Zanja domiciliarias	25-I-2005	La Plata	Buenos Aires	34° 57' 08.5" S, 58° 02' 35.2" W
LP-9	Arroyo Carnaval	12-IV-2005	La Plata	Buenos Aires	34° 50' 49.5" S, 58° 03' 06.9" W
LP-10	Arroyo Martín	12-IV-2005	La Plata	Buenos Aires	34° 31' 36.1" S, 58° 01' 14.6" W
LP-11	Arroyo Rodríguez	12-IV-2005	La Plata	Buenos Aires	34° 51' 37.4" S, 58° 03' 53.0" W
LR-1	Arroyo Sánchez Huayco	20-II-2005	Santa María	Córdoba	31° 18' 46.1" S, 64° 27' 49.3" W
LR-2	Río Cosquín	20-II-2005	Cosquín	Córdoba	31° 17' 14.0" S, 64° 27' 38.4" W
LR-3	Río Huaco	20-II-2005	Samagasta	La Rioja	29° 10' 24.1" S, 67° 02' 46.2" W
LR-4	Río Amillico	22-II-2005	Amillico	La Rioja	28° 47' 45.2" S, 66° 59' 45.5" W
LR-5	Río Santa Vera Cruz	23-II-2005	Santa Vera Cruz	La Rioja	28° 40' 37.6" S, 66° 58' 57.7" W
LR-6	Charco adyacente al Río Santa Vera Cruz	23-II-2005	Santa Vera Cruz	La Rioja	28° 40' 37.6" S, 66° 58' 57.7" W
LR-7	Arroyo nombre desconocido	24-II-2005	Carrizo de las altas cumbres	Córdoba	31° 44' 58.5" S, 64° 55' 41.0" W
LR-8	Río Los Sauces	24-II-2005	Carrizo de las altas cumbres	Córdoba	31° 43' 54.6" S, 64° 54' 04.6" W
LR-9	Naciente de Río Mina Clavero	24-II-2005	Carrizo de las altas cumbres	Córdoba	31° 42' 10.7" S, 64° 53' 44.9" W
LR-10	Arroyo (nombre desconocido)	24-II-2005	Carrizo de las altas cumbres	Córdoba	31° 37' 35.8" S, 64° 54' 43.0" W

SITIO	AMBIENTE	FECHA	LOCALIDAD	PROVINCIA	LONGITUD / LATITUD
MP-1	Arroyo Adelas Negras	13-VII-2003 23-X-2005 24-II-2006 03-V-2006	Ruta 29 Km 297	Buenos Aires	37° 37' 56.5" S, 58° 29' 40.2" W
MP-2	Arroyo Dulce	13-VII-2005	Ruta 29 Km 198	Buenos Aires	37° 52' 00.2" S, 58° 02' 21.6" W
MP-3	Arroyo (nombre desconocido)	23-X-2005	Ayacucho	Buenos Aires	37° 10' 33.5" S, 58° 31' 04.3" W
MP-4	Arroyo Las Brusquitas	13-VII-2005 23-X-2005 03-V-2006	Cotn. Nicanor Otamendi	Buenos Aires	38° 04' 10.7" S, 57° 50' 16.7" W
MP-5	Arroyo (nombre desconocido)	23-X-2005	San Ignacio	Buenos Aires	37° 27' 20.2" S, 58° 28' 44.4" W
MP-6	Arroyo de La Ballenera	13-VII-2005 23-X-2005 24-II-2006 03-V-2006	Miramar	Buenos Aires	38° 09' 40.2" S, 57° 58' 39.0" W
MP-7	Arroyo Tajamar	23-X-2005	Balcerce	Buenos Aires	37° 51' 41.2" S, 57° 57' 01.9" W
MP-8	Arroyo Chocori	23-X-2005	Miramar	Buenos Aires	38° 16' 10.3" S, 58° 09' 23.0" W
MP-9	Arroyo de la Tigra	23-X-2005	Miramar	Buenos Aires	38° 14' 40.4" S, 58° 06' 18.0" W
PI-1	<i>Bryngium</i> sp. (Fitotelrnata)	25-VII-2006	Punta Indio	Buenos Aires	35° 15' 04.5" S, 57° 14' 51.4" W
PI-2	<i>Bryngium</i> sp. (Fitotelrnata)	25-VII-2006	Punta Indio	Buenos Aires	35° 14' 06.1" S, 57° 16' 12.4" W
PI-3	Arroyo (nombre desconocido)	20-VI-2006 25-VII-2006	Magdalena	Buenos Aires	35° 11' 13.1" S, 57° 20' 13.4" W
PI-4	Arroyo (nombre desconocido)	20-VI-2006 25-VII-2006	Magdalena	Buenos Aires	35° 10' 08.5" S, 57° 21' 14.8" W
PI-5	Arroyo El Pescado	13-IX-2003 20-VI-2006 25-VII-2006	La Plata	Buenos Aires	34° 57' 57.2" S, 57° 46' 42.0" W
PI-6	Zanja que drena en arroyo El Pescado	25-VII-2006	La Plata	Buenos Aires	34° 57' 57.2" S, 57° 46' 04.0" W
PI-8	Arroyo Primera Estancia	25-VII-2006	Magdalena	Buenos Aires	35° 08' 46.9" S, 57° 23' 29.3" W
PL-1	<i>Bryngium cabrerus</i> (Fitotckusta)	**	Punta Lara	Buenos Aires	34° 51' 53.0" S, 57° 52' 23.2" W
PL-2	Charco semipermanente	3-X-2005 10-II-2006 27-II-2006 4-I-2007	Punta Lara	Buenos Aires	34° 47' 05.5" S, 58° 00' 55.2" W
PL-3	Charco semipermanente	06-IX-2006	Punta Lara	Buenos Aires	34° 52' 02.4" S, 57° 57' 30.3" W
PL-4	Charco semipermanente	3-X-2005 10-II-2006 28-VI-2006	Punta Lara	Buenos Aires	34° 49' 19.1" S, 57° 58' 07.4" W
PL-5	Charco semipermanente, rodeando sitio PL-1	07-VI-2004	Punta Lara	Buenos Aires	34° 51' 53.0" S, 57° 52' 23.2" W
R9-1	Arroyo Cañada Honda	03-III-2004	San Antonio de Areco	Buenos Aires	33° 57' 11.5" S, 58° 23' 52.3" W

R9-2	Arroyo La Cruz	03-III-2004	San Antonio de Areco	Buenos Aires	34° 10' 12.3" S, 58° 59' 22.2" W	
R9-3	Charco semipermanente, adyacente a R9-2	03-III-2004	San Antonio de Areco	Buenos Aires	34° 10' 12.3" S, 58° 59' 22.2" W	
R9-4	Charco semipermanente	03-III-2004	Las Palmas	Buenos Aires	34° 05' 17.8" S, 59° 11' 10.0" W	
R9-5	Charco semipermanente	03-III-2004	Baradero	Buenos Aires	33° 48' 09.6" S, 59° 37' 04.2" W	
SL-1	Arroyo Larca	19-I-2007	Villa Larca	San Luis	32° 38' 10.3" S, 64° 57' 07.6" W	
SL-2	Arroyo tributario del Arroyo Larca	19-I-2007	Villa Larca	San Luis	32° 38' 16.5" S, 64° 57' 10.9" W	
SL-3	Arroyo Cortaderas	20-I-2007	Cortaderas	San Luis	32° 30' 31.6" S, 64° 57' 59.2" W	
SL-4	Arroyo Papagayos	20-I-2007	Papagayos	San Luis	32° 40' 38.9" S, 64° 58' 37.9" W	
SL-5	Arroyo nombre desconocido	20-I-2007	Cerro de Oro	San Luis	32° 23' 09.6" S, 65° 00' 52.2" W	
SV-1	Arroyo atravesado	20-II-2006 11VI-2007	Sierra de La Ventana	Buenos Aires	37° 53' 58.6" S, 61° 54' 36.4" W	

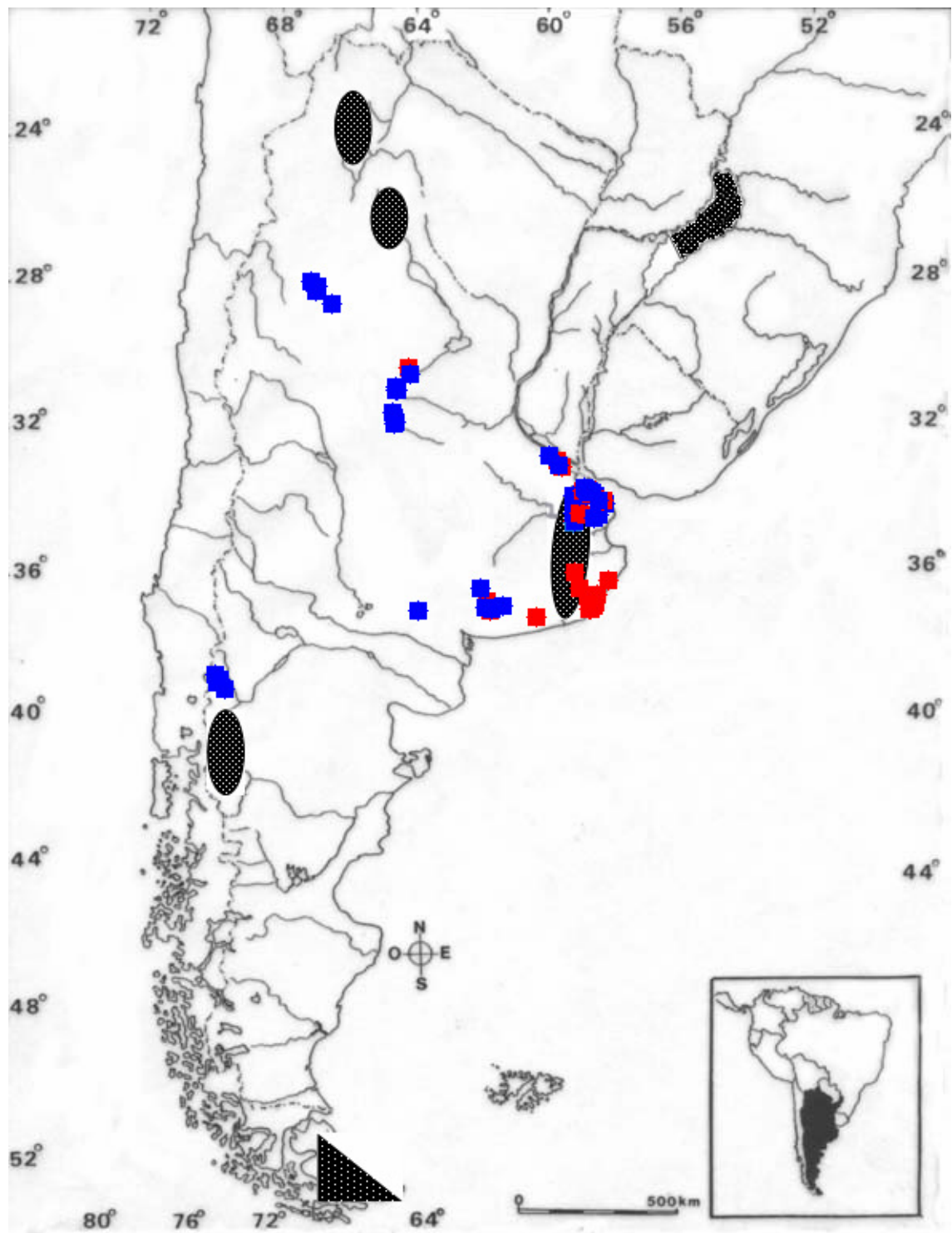
  Ambiente temporal

  Ambiente permanente

\* Muestras obtenidas entre enero de 2004 y julio de 2005

\*\* Muestras obtenidas entre enero de 2003 y diciembre de 2004

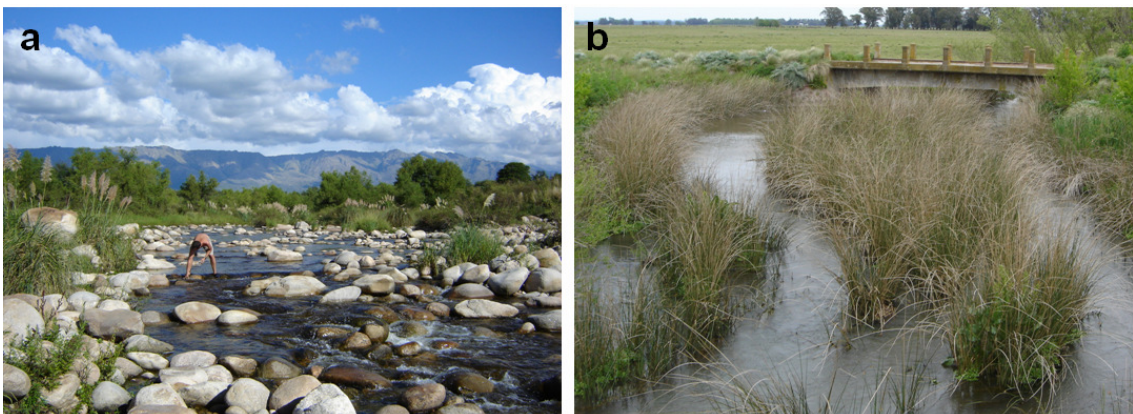
\*\*\* Muestras obtenidas semanalmente entre agosto y diciembre de 2006



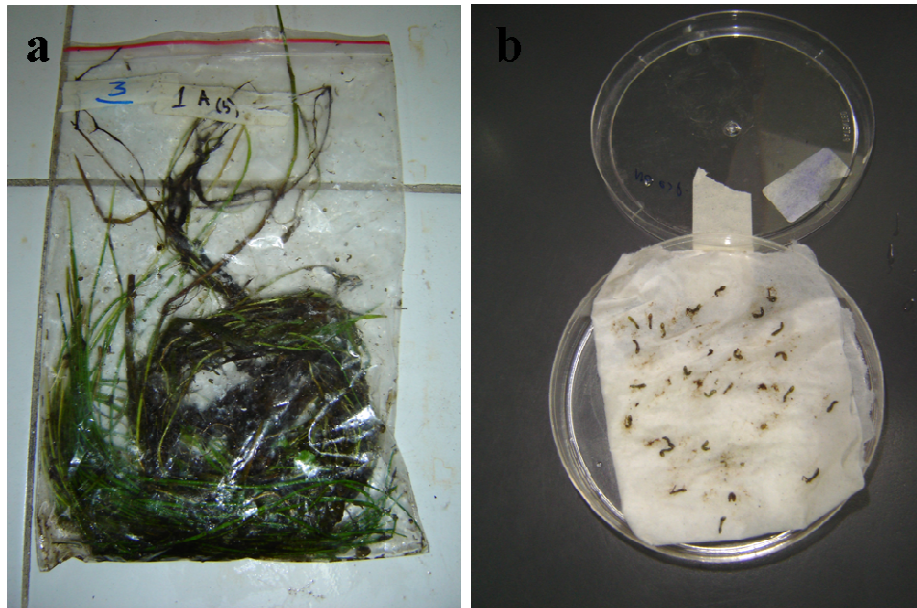
**Fig. 3.** Sitios de relevamiento. ■ = Ambientes temporales; ■ = Ambientes permanentes; áreas sombreadas = áreas relevadas en estudios previos.



**Fig. 4.** Ambientes lénticos. a-b: Charco de inundación. c: Zanja domiciliaria. d: Fitotelmata.



**Fig. 5.** Ambientes lóticos. a: temporario. b: permanente.



**Fig. 6.** Transporte de simúlidos al laboratorio. a: Bolsa con cierre hermético. b: cápsula de petri con papel humedecido.

### 5 - 2. Mantenimiento de las muestras en el laboratorio

Las muestras fueron colocadas en heladera a 4°C hasta su posterior disección en el laboratorio. Las larvas de quironómidos y mosquitos fueron mantenidas a temperatura ambiente (con excepción en los estudios de prevalencia y estacionalidad) para favorecer una mayor infección entre los individuos recolectados.

Los simúlidos fueron identificados taxonómicamente por el Dr. Sixto Coscarón (Museo de Ciencias Naturales de La Plata) y por la Dra. Neusa Hamada (Instituto Nacional de Pesquisas de Amazonia, Departamento de Entomología, INPA/CPEN, Manaus, Brasil); los quironómidos por la Dra. Analía Paggi (Instituto de Limnología Dr. Raúl A Ringuelet. ILPLA); y los mosquitos por el Prof. Gustavo Rossi (CEPAVE), quienes son los especialistas en la taxonomía de los respectivos grupos de insectos.

### 5 - 3. Disección de los hospedadores.

Los insectos fueron disecados con la ayuda de pinzas y agujas entomológicas bajo microscopio binocular estereoscópico, según las técnicas descritas por Lichtwardt (1986). Se describe e ilustra a continuación la metodología de disección de los insectos hospedantes para detección de hongos Trichomycetes (Fig. 7):

- Se colocó la larva de mosquito sobre una gota de agua destilada estéril depositada previamente sobre un portaobjetos (Fig. 7a).
- Con una pinza de disección se sostuvo la región torácica (tx) de la larva, y con otra pinza se traccionó del segmento anal (sa) (Fig. 7b-c), obteniéndose el tubo digestivo medio (dm) y el posterior (dp) unidos entre si (Fig. 7d).
- Se colocó el tracto digestivo de la larva en otra gota de agua destilada estéril y, por medio de una aguja histológica, se separó el tubo digestivo medio del posterior.
- La región posterior del tubo digestivo, fue "abierta" por medio de la pinza histológica (Fig. 7e).
- Se eliminó el epitelio del tubo digestivo medio para obtener la membrana peritrófica (mp) que rodea internamente a este (Fig. 7f), y se la depositó sobre un portaobjetos en una gota de agua destilada.
- Se colocó un cubreobjetos sobre el material, y se lo observó bajo microscopio óptico con contraste de fases.

#### 5 - 4. Procesamiento de los hongos:

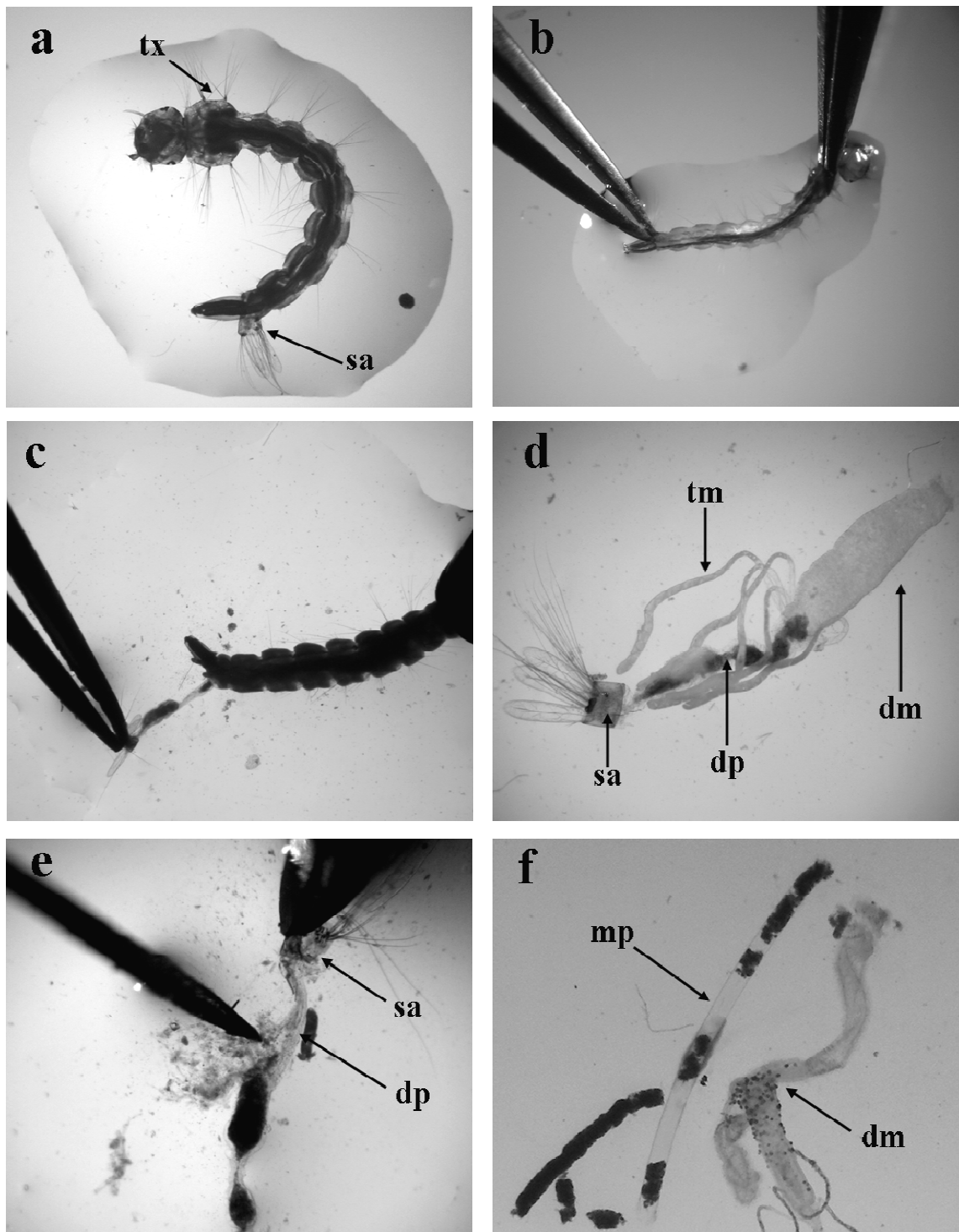
##### 5 - 4 - 1. Aislamiento y cultivo del material fúngico

Hasta el momento solo se ha logrado cultivar axénicamente, relativamente unas pocas especies de Trichomycetes, las cuales se restringen a especies presentes en el tubo digestivo posterior. El aislamiento fúngico fue realizado de la siguiente manera:

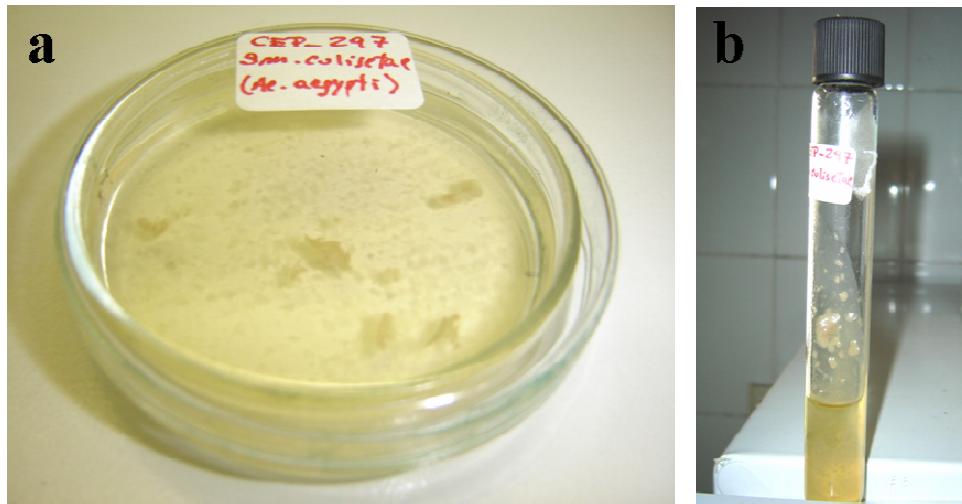
- Se esterilizó previamente el área de trabajo con hipoclorito de sodio (10%) y luego con alcohol 70%, y se utilizó un mechero de Bunsen para mantener el ambiente estéril.
- El material fúngico fue transferido por medio de una aguja histológica a cápsulas de Petri que contenían medio de cultivo solidificado (BHIGTv o BHIA 1/10), al cual se le agregó una delgada capa de agua destilada estéril y 5 gotas de antibiótico (penicilina-estreptomina o gentamicina-cloranfenicol) previamente esterilizado por filtración (ver Anexos).

- Los cultivos fueron incubados en estufa de cultivo a 25°C aproximadamente durante 7 días, y luego fueron transferidos a estrías que contenían medio de cultivo BHIGTv que se había solidificado con una inclinación de 30° y a las cuales se le adicionó 3 ml de agua destilada estéril. Las estrías fueron preparadas en tubos de ensayo con tapa de baquelita a rosca, la cual se mantuvo levemente floja para permitir la entrada de oxígeno.
- Los tubos que contenían el cultivo fúngico, fueron mantenidos durante aproximadamente 7 días en estufa de cultivo a 25°C, y diariamente fueron agitados suavemente para permitir la aireación e hidratación de todo el medio de cultivo.
- Los cultivos conservados fueron depositados en la colección micológica del CEPAVE (Fig. 8).





**Fig. 7.** Disección de larva de *Ae. aegypti*. dm = tubo digestivo medio, dp = tubo digestivo posterior, mp = membrana peritrófica, tm = túbulos de Malpigio, tx = tórax, sa = segmento anal.

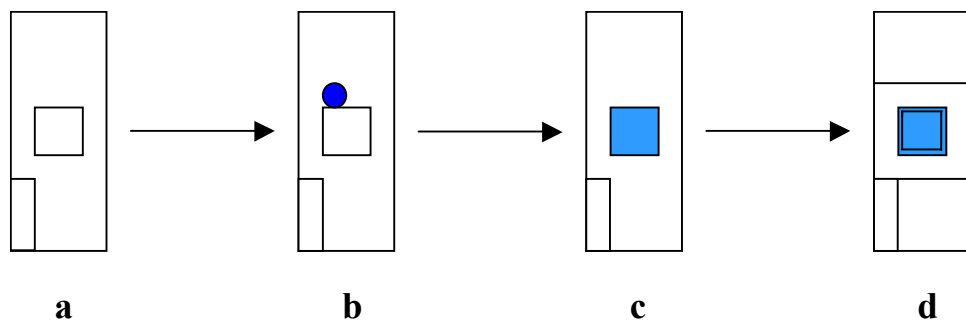


**Fig. 8.** Cultivo de *Smittium culisetae*.

#### 5 - 4 - 2. Preparaciones microscópicas semipermanentes.

Luego de realizar la disección del insecto, para la realización de preparados semipermanentes del material fúngico obtenido se llevaron a cabo los siguientes pasos (Fig. 9):

- Se rotuló el portaobjetos (Fig. 9a)
- Se agregó una gota de azul de algodón-lactofenol de Ammann (0.01% p/v) por fuera de uno de los vértices del cubreobjetos (Fig. 9b-c).
- Luego de 24 hs, el preparado fue sellado por medio de esmalte de uñas incoloro (Fig. 9d).
- Las preparaciones microscópicas (como material de herbario) fueron depositadas en el herbario micológico del Instituto Spegazzini (LPSC) y del CEPAVE.



**Fig. 9.** Realización de las preparaciones microscópicas semipermanentes

#### 5 - 4 - 3. Identificación taxonómica de los hongos

Para realizar la determinación taxonómica de los hongos Trichomycetes, se tuvieron en cuenta caracteres tales como forma, tamaño, collar y apéndices de las tricosporas; tipo de "holdfast" (estructura de fijación), ramificación y medidas de los talos, tipo de hospedador al cual se encontraba asociado, etc. Las medidas antes mencionadas, fueron realizadas en microscopio Zeiss (47 33 57-9901) con contraste de fases.

La determinación taxonómica se llevó a cabo por medio de la comparación con las descripciones realizadas en los trabajos originales de dichas especies, como así también por medio de los trabajos monográficos realizados por Misra & Lichtwardt (2000) y Lichtwardt (1986) y su versión actualizada por el mismo autor, disponible en el sitio web: <http://www.nhm.ku.edu/~fungi/Monograph/Text/Mono.htm> (Lichtwardt et al 2001a). Se tomaron fotografías del material bajo microscopio Olympus (BX-51) con contraste de fases equipado con máquina de fotos digital (Olympus DP-71), y bajo microscopio Olympus (CH-30) con máquina de fotos digital (Sony 4.1 MP DSC-P73).

#### 5 - 4 - 4. Almacenamiento de Trichomycetes en solución tamponada (buffer)

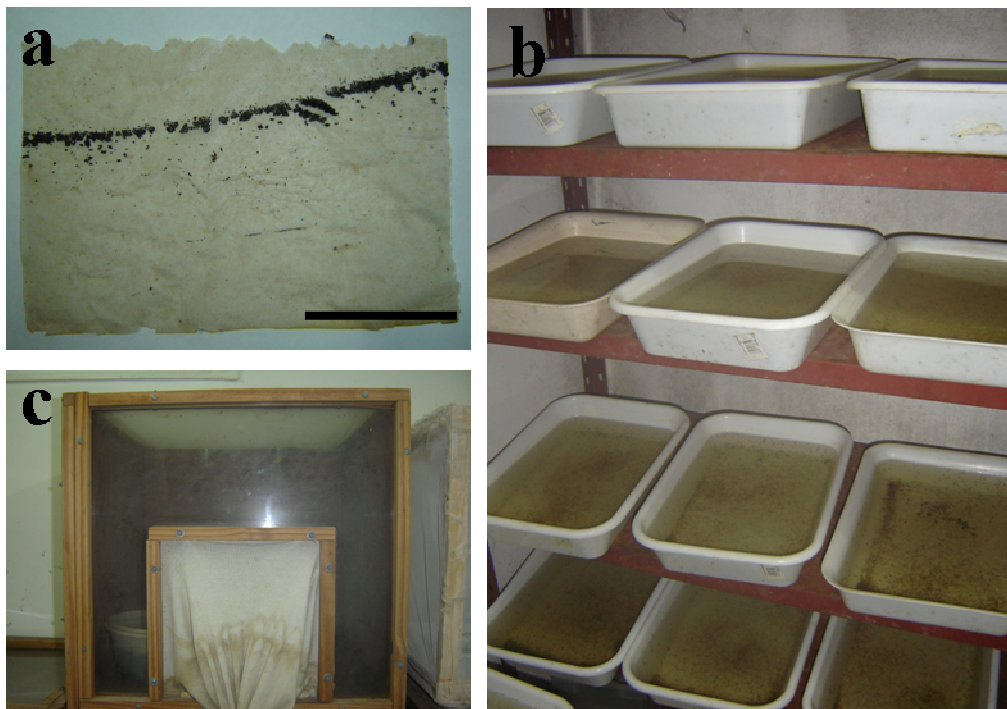
Los talos (o incluso parte del tubo digestivo del hospedador con hongos Trichomycetes) obtenidos de algunos ejemplares, fueron colocados en tubos de centrífuga tipo Eppendorf (1,5 ml) que contenían buffer CTAB 2X (2% (p/v) Bromuro de cetiltrimetilamonio), y fueron almacenados a -21°C, para la futura extracción de ADN y la realización de posteriores estudios de taxonomía molecular.

### 5 - 5. Preparación del material utilizado en los bioensayos

#### 5 - 5 - 1. Mantenimiento y cría de mosquitos (Fig.10)

Los mosquitos utilizados en los ensayos de laboratorio fueron obtenidos de la colonia artificial de *Ae. aegypti* del CEPAVE, los cuales han sido criados según la técnica que describe Gerberg et al (1994). Los huevos de los mosquitos almacenados fueron colocados en bandejas plásticas conteniendo

3000 ml de agua y alimento para cobayos finamente molido. Las pupas se transportaron a jaulas de 50 x 50 x 50 cm para la emersión de los adultos, a los cuales se les proporcionaron pasas de uva como fuente de hidratos de carbono necesarios para su desarrollo. Como fuente de sangre para las hembras adultas, se introdujo una gallina dentro de la jaula una vez por semana. Como recurso hídrico, se colocó un recipiente conteniendo agua, el cual fue cubierto por un voile e invertido en la parte superior de la jaula. Para la oviposición, se colocó dentro de la jaula un recipiente (750 cc) que contenía un papel absorbente cubriendo su borde interno y agua declorinada (400 ml), quedando parte del papel sin sumergir y parte sumergido en el agua. A las 48 hs se retiró el papel que contenía los huevos adheridos y se los almacenó en bolsas de polietileno. La cría de mosquitos se mantuvo a 28°C, fotoperíodo de 12:12 y humedad relativa de 85%.



**Fig. 10.** Cría de mosquitos. a: papel conteniendo huevos de *Ae. aegypti*. b: bandejas con larvas. c: jaula para individuos adultos. Escala para figura a = 10 cm.

### 5 - 5 - 2. Esterilización de los huevos de *Ae. aegypti*.

Para eliminar el inóculo fúngico que haya podido existir en la superficie de los huevos de mosquitos, éstos fueron esterilizados previamente a la realización de los bioensayos. Dicha esterilización se realizó por medio de una modificación de la técnica descrita (Williams & Lichtwardt 1972a) para tal fin. El papel que contenía huevos de *Ae. aegypti*, fue transferido a través de sucesivos baños:

- agua destilada estéril.....1 minuto
- alcohol 80%.....5 minutos
- agua destilada estéril.....1 minuto
- hipoclorito de sodio al 7%.....2 minutos
- agua destilada estéril.....1 minuto
- hipoclorito de sodio al 10%.....2 minutos
- agua destilada estéril.....10 segundos

El papel esterilizado fue transferido a una bandeja plástica que contenía 3000 ml de agua de clorinada estéril y alimento para cobayos finamente molido, y se la mantuvo a 28 +/- 2°C. Diariamente se disecaron larvas (n = 5) de la bandeja para comprobar que estas estaban libres de Trichomycetes.

### 5 - 5 - 3. Preparación de cultivos de *Sm. culisetae*

Para la realización de los ensayos se utilizó el aislamiento de *Sm. culisetae* (CEP-297) obtenido a partir de larvas de *Ae. aegypti*. El inóculo fue preparado 6 días previos al ensayo y fue realizado de acuerdo a una modificación de la técnica descrita por Lichtwardt (1986). Se utilizaron Erlenmeyers (250 ml) que contenían 30 ml de medio de cultivo BHIGTv solidificado + 50 ml de agua destilada estéril. Luego de introducirse el inóculo fúngico, estos Erlenmeyer fueron mantenidos a 24 ± 2°C sin agitación (Fig. 11). Previamente a la realización del ensayo, el cultivo fue filtrado mediante una malla de tipo voile (diámetro = 0.25 mm) mediante la cual se eliminó el micelio, obteniéndose de esta manera una suspensión de tricosporas diluidas en agua.



**Fig. 11.** Cultivo de *Sm. culisetae* utilizado en los bioensayos.

#### 5 - 6. Evaluación de la resistencia de las tricosporas de *Sm. culisetae* frente a diferentes variables

En el presente estudio se evaluó bajo condiciones controladas de laboratorio el efecto de la temperatura, la desecación, el pH y diferentes concentraciones salinas sobre la resistencia de tricosporas de un aislamiento de *Sm. culisetae*.

##### 5 - 6 - 1. Resistencia a la temperatura bajo diferentes formas de almacenamiento

Se evaluó la resistencia de las tricosporas de *Sm. culisetae* almacenadas bajo diferentes condiciones frente a diferentes temperaturas.

Las tricosporas de *Sm. culisetae* almacenadas de diferentes maneras fueron expuestas a distintas temperaturas (-16, -4, 4, Temperatura ambiente (TA), 28 y 35°C). Para cada tratamiento (temperatura) se evaluaron 5 variables (sustratos), realizándose un total de 12 repeticiones para cada variable. Fueron

utilizados recipientes plásticos (30 cc de capacidad) previamente esterilizados, y acondicionados según la manera en que fueron almacenadas las tric esporas.

Las variables (sustratos) utilizados fueron (Fig.12):

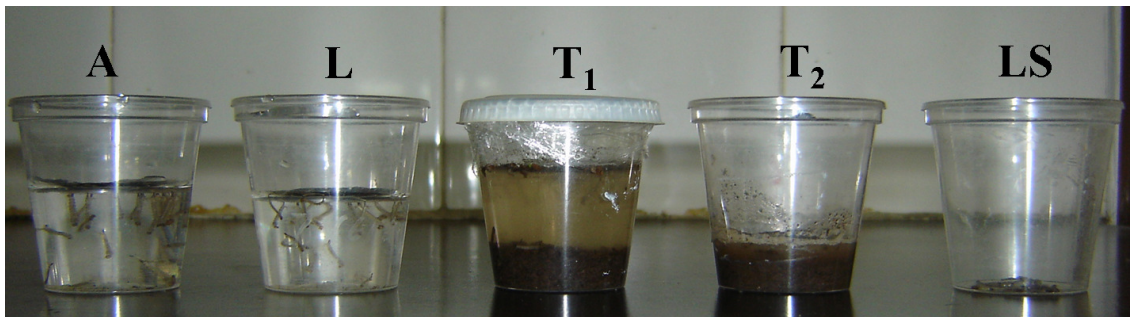
**A:** 15 ml de agua obtenida de la bandeja donde fueron mantenidas las larvas, en la cual se encontraban tric esporas en suspensión de *Sm. culisetae*. Estos recipientes fueron cerrados herméticamente para evitar la desecación.

**L:** 15 ml de agua declorinada + 20 larvas de IV estadio infectadas por *Sm. culisetae*.

**T<sub>1</sub>:** 15 ml de agua declorinada + 5 g de tierra estéril + 20 larvas infectadas. Estos recipientes fueron cerrados herméticamente para evitar la desecación.

**T<sub>2</sub>:** 2 ml de agua declorinada + 5 g de tierra estéril + 20 larvas infectadas. Estos recipientes no fueron cerrados herméticamente.

**LS:** 20 larvas infectadas fueron colocadas sobre un papel absorbente y luego fueron transferidas a su frasco correspondiente.



**Fig. 12.** Variables (recipientes) evaluadas dentro de cada temperatura.

Los tratamientos mantenidos a  $-4^{\circ}\text{C}$  y a  $-21^{\circ}\text{C}$  fueron colocados durante 3 hs a  $4^{\circ}\text{C}$  antes de ser transferidos a las temperaturas correspondientes.

Los tratamientos fueron evaluados a las 24 hs, 7 y 30 días y, a los 6 meses. Para esto, se utilizaron 3 recipientes de cada una de las variables (sustratos) de cada tratamiento, a los cuales se le agregaron 10 larvas de *Ae*.

*aegypti* de II estadio (libres de Trichomycetes) y se los mantuvo a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Luego de 48 hs las larvas fueron disecadas para evaluar la presencia del hongo en el tubo digestivo posterior.

Como control se utilizaron 3 recipientes a los que se le agregaron 10 larvas de II estadio de *Ae. aegypti* libres de Trichomycetes, las cuales fueron disecadas a las 48 hs para verificar que no estuvieran infectadas por el hongo.

El ensayo fue repetido 3 veces en el tiempo bajo las mismas condiciones.

#### 5 - 6 - 2. Resistencia a la desecación

Se evaluó la resistencia de las tricosporas de *Sm. culisetae* frente a condiciones de desecación.

Se filtró el cultivo de *Sm. culisetae*, y se obtuvo una concentración de  $8 \times 10^5$  tricosporas / ml que fueron cuantificadas en hemocitómetro (cámara de Neubauer). Se sumergieron papeles de filtro ( $n = 24$ ) de  $3 \times 3$  cm durante 5 minutos en dicha suspensión, y luego se dejaron secar a  $28^\circ\text{C}$  durante diferentes tiempos (0<sup>(1)</sup>, 15, 30, 60 y 120 minutos, y a las 6, 12 y 24 horas). Se realizaron 3 repeticiones para cada uno de los tiempos de secado evaluados.

Para evaluar la resistencia de las tricosporas, luego de que transcurrió el tiempo de "secado", cada papel fue colocado en un tubo de ensayo que contenía 10 ml de agua declorinada estéril y 10 larvas de II estadio de *Ae. aegypti*. Como controles negativos ( $n = 3$ ) se utilizaron tubos conteniendo 10 larvas de II estadio sin la inclusión de papeles conteniendo tricosporas, mientras que los papeles expuestos a 0' fueron utilizados como controles positivos.

La HR de los papeles fue obtenida colocando dichos papeles durante 5 minutos (a  $28^\circ\text{C}$ ) sobre el sensor del termohigrómetro (TFA®, Alemania. Rango de temperatura:  $0 - 50^\circ\text{C}$ , rango de humedad:  $25 - 95\%$  HR), el cual fue colocado dentro de una bolsa plástica con cierre hermético.

El ensayo fue repetido 3 veces en el tiempo bajo las mismas condiciones.

<sup>(1)</sup> 0', se lo escurrió y se lo transfirió al tubo de ensayo.



### 5 - 6 - 3. Resistencia a diferentes concentraciones salinas

Se evaluó la resistencia de tricosporas de *Sm. culisetae* frente a diferentes concentraciones salinas.

#### Preparación de las suspensiones salinas

Tricosporas de *Sm. culisetae* fueron expuestas a 5 concentraciones de NaCl y a diferentes diluciones de agua marina. Las tricosporas ( $1.10^5$  tricosporas / ml) fueron agregadas luego de que se preparó cada una de las siguientes soluciones salinas en Erlenmeyers de 250 ml de capacidad:

- a) 1 ppm de NaCl
- b) 5 ppm de NaCl
- c) 10 ppm de NaCl
- d) 20 ppm de NaCl
- e) 35 ppm de NaCl
- f) agua de mar (\*)
- g) control (agua destilada)

(\*) ppm = partes por mil

(\*\*) El agua de mar fue preparada de acuerdo al protocolo D 1141-75 (sin la inclusión de metales pesados), aprobado por la ASTM (American Society for Testing Matherials).

Se realizaron 3 repeticiones de cada una de los tratamientos (cada concentración salina). Cada suspensión conteniendo las tricosporas, fue agitada en vórtex durante 20 segundos y luego almacenada a 4°C.

#### Preparación de las suspensiones de tricosporas

Las larvas de *Ae. aegypti* no sobreviven a concentraciones mayores a 7 ppm de NaCl (Pelizza et al 2007), siendo la salinidad de la mayoría de los sitios de cría de los mosquitos menores a 20 ppm (Petersen and Chapman 1970). En estudios preliminares realizados en este trabajo, se observó que las larvas tampoco sobrevivieron a concentraciones mayores de 25% de agua marina, por lo que al momento de evaluar la resistencia de estos hongos, las suspensiones mayores a estos valores fueron diluidas agregando agua

destilada estéril hasta obtener una suspensión final de 5 ppm de NaCl y 25% de agua marina respectivamente.

### Evaluación de la resistencia de las tricosporas a las distintas concentraciones salinas

- **Evaluación directa:** se extrajo una gota de cada concentración salina (previamente agitada en vórtex durante 20 segundos) y luego fue observada bajo microscopio óptico con contraste de fases. Las tricosporas que presentan capacidad de infectar a un nuevo hospedador tienen un aspecto refringente cuando son observadas bajo microscopio óptico con contraste de fases, mientras que las tricosporas que no son viables (perdieron la capacidad de infectar a un hospedador) no son refringentes y presentan un aspecto grisáceo (Fig.13). De esta manera, se consideró como viables aquellas tricosporas que se observaron refringentes, mientras que a las tricosporas no refringentes se las consideró como no viables.

- **Evaluación indirecta:** se colocaron 10 larvas de segundo estadio de *Ae. aegypti* (libres de Trichomycetes) en tubos de ensayo que contenían 10 ml de solución de cada una de las concentraciones y fueron almacenados a 28 +/- 2°C. Las larvas fueron disecadas 48 hs después de la exposición, para comprobar la presencia y el crecimiento del hongo en el tubo digestivo posterior.

La resistencia de las tricosporas fue evaluada a los 60 minutos de la exposición, como así también a las 24 hs y a los 7 y 30 días. Como control se utilizaron 3 tubos conteniendo 10 ml de agua destilada estéril y 10 larvas de segundo estadio libres de Trichomycetes. El ensayo fue repetido 3 veces en el tiempo bajo las mismas condiciones.



**Fig. 13.** Tricosporas de *Sm. culisetae*. a) viable (refringente). b) no viable. Escala = 10  $\mu$ m (en ambas figuras).

Dilución de las concentraciones salinas para obtener una suspensión final menor a 5 ppm de NaCl y 25% de agua marina

Concentración salina (ppm)	(mL)	Agua destilada estéril agregada (mL)
1	10	0
5	10	0
10	5	5
20	2,5	7,5
30	1,7	8,3
Agua marina*	*	*
Control	10	0

(\*) ver en siguiente tabla

Concentración agua marina (%)	(mL)	Agua destilada estéril agregada (mL)
5	100	0
25	100	0
50	50	50
75	33	67
100	25	75

5 - 6 - 4. Resistencia a diferentes concentraciones de iones hidrogeno (pH)

El efecto del pH sobre la resistencia de las tricosporas de *Sm. culisetae* fue evaluada en laboratorio manipulando soluciones de Tris-Ácido Cítrico (0.5M) y Tris-Citrato de Sodio (0.5M) para producir valores de pH variando desde 4 a 10.

#### Preparación de las soluciones y suspensiones

Se evaluó la resistencia de las tricosporas de *Sm. culisetae* frente a soluciones con diferente acidez (3.6, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10). Dichas soluciones fueron realizadas agregando Tris-Ácido Cítrico (0.5M) y Tris-Citrato de Sodio (0.5M) en un recipiente conteniendo 200 ml de agua destilada estéril, hasta obtener los niveles de pH antes mencionado. Se realizaron 3 repeticiones de cada una de las soluciones, y a cada una de las cuales se le adicionó luego una concentración de 3000 tricosporas / ml del hongo y se almacenaron a 4°C. El pH de cada recipiente fue controlado cada 48 hs ajustándose, en el caso que sea necesario, con los buffer Tris-Citrato de Sodio y/o Tris-Ácido Cítrico.

El ensayo fue repetido 3 veces en el tiempo bajo las mismas condiciones.

#### Evaluación de la resistencia de las tricosporas frente a los distintos niveles pH

La resistencia frente a los diferentes pH fue evaluada a las 0 y 24 hs, y a los 7, 14 y 30 días posteriores a la preparación de las suspensiones. Para la evaluación de la resistencia, se utilizaron los métodos directo e indirecto previamente descritos. En la evaluación indirecta, se prepararon 2 tubos de ensayo de cada una de las suspensiones, en los cuales se colocaron 15 ml de dicha suspensión y 10 larvas de *Ae. aegypti* libres de Trichomycetes, y fueron mantenidos durante 48 hs previas a la disección.

Debido a que en los ensayos preliminares las larvas de *Ae. aegypti* no sobrevivieron a los pH de 3,6 y 10, en el momento de realizar la evaluación indirecta, estos niveles de pH fueron llevados por medio de las soluciones buffer a valores de 4,5 y 8 respectivamente.

En los estudios sobre la evaluación de la viabilidad de las tricosporas expuestas frente a las diferentes condiciones de temperatura, pH y salinidad, se consideró como resultado positivo cuando al menos una de las repeticiones ( $n = 3$ ) presentaba larvas infectadas por el hongo.

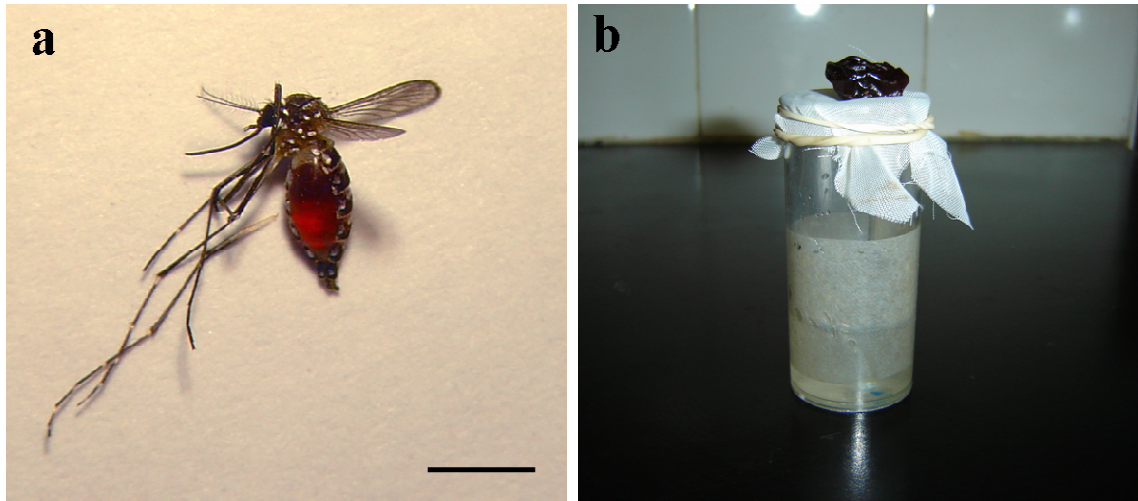
#### 5 - 7. Estudio sobre la transmisión de *Sm. culisetae* en mosquitos

Se realizaron diferentes ensayos para intentar explicar como ocurre la transmisión de estos hongos entre mosquitos.

##### 5 - 7 - 1. Transmisión vertical

Con el fin de dilucidar si existe transmisión *transovum* (sobre la superficie del huevo) o transovárica (en el interior del huevo) de *Sm. culisetae* por medio de las hembras adultas de *Ae. aegypti*, se infectaron 300 larvas de estadio I (eclosionadas de huevos previamente esterilizados) con una concentración de 3000 tricosporas / ml del hongo. Las larvas fueron criadas según se describe en el punto 5 - 5 - 1, y los adultos emergidos de estas larvas fueron colocados dentro de una jaula. Como fuente de recurso de sangre para las hembras adultas se colocó una gallina dentro de la jaula durante 90 minutos.

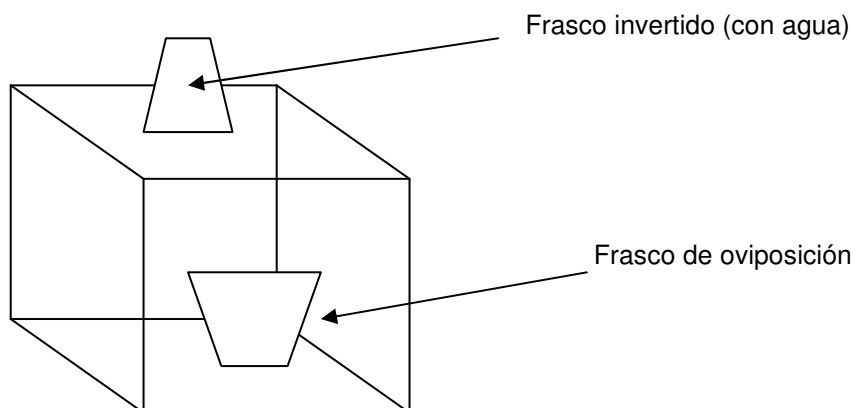
Luego, se extrajeron 30 hembras que presentaban signo de estar alimentadas (abdomen color rojo) y a cada una se la colocó en un recipiente individual (30 cc de capacidad) que contenía un papel absorbente cubriendo el perímetro interno (11 x 3 cm) (Fig. 14). Luego de que se colocó cada hembra anestesiada (con CO<sub>2</sub>) en su frasco correspondiente, éste fue tapado con tela de voile. Después de que las hembras se reanimaron, se agregó 10 ml de agua declorinada (con una jeringa de 30 ml) en cada uno de los frascos, y se colocó una pasa de uva (como fuente de hidratos de carbono) sobre el voile. Los huevos obtenidos se incubaron (a 28 +/- 2 °C y 80% HR) hasta su eclosión y, cuando las larvas llegaron a II o III estadio se seleccionaron 5 larvas de cada recipiente y se realizó la disección para observar la presencia de hongo dentro del tubo digestivo.



**Fig. 14.** a: Hembra adulta de *Ae. aegypti* alimentada. b: Recipiente utilizado para el ensayo. Escala = 2 mm.

Se seleccionaron 10 huevos de cada uno de los papeles conteniendo huevos y se los observó bajo microscopio óptico para observar la presencia de alguna estructura fúngica en su superficie.

A su vez, se seleccionaron 40 hembras y 20 machos de la jaula, los cuales fueron disecados para observar si existía la presencia de alguna estructura fúngica, ya sea asociada exteriormente o asociada a algún órgano interno (tubo digestivo, ovarios o testículos). También, se seleccionaron 20 pupas que provenían de las larvas infectadas con el hongo, y se realizó su disección. El ensayo fue repetido 3 veces en el tiempo bajo las mismas condiciones.

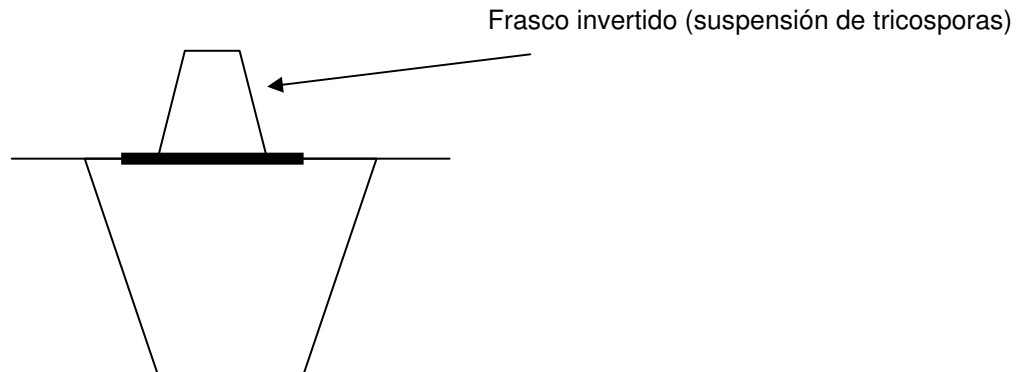


### 5 - 7 - 2. Transmisión *per os*

El objetivo del presente ensayo, fue evaluar la presencia de tricosporas de *Sm. culisetae* dentro del tubo digestivo de hembras adultas de *Ae. aegypti*, suponiendo que estas tricosporas fueran capaces de transmitirse con las heces del hospedador.

Los adultos de *Ae. aegypti* ( $n = 40$ ) obtenidos a partir de larvas libres de infección con el hongo se mantuvieron dentro de un recipiente (750 cc), el cual fue cubierto por medio de tela de voile. Al frasco invertido colocado sobre la parte superior del recipiente y que contenía agua, se le agregó una suspensión de  $8 \cdot 10^5$  tricosporas / ml. Los recipientes fueron mantenidos a  $28^\circ\text{C}$  y 80% HR, y entre las 24 y 48 hs se realizó la disección de los mosquitos.

Se realizaron 3 repeticiones en el tiempo. A su vez, el ensayo fue repetido 1 vez utilizando adultos de *Cx. pipiens* obtenidos de la colonia de mosquitos criada en el CEPAVE.



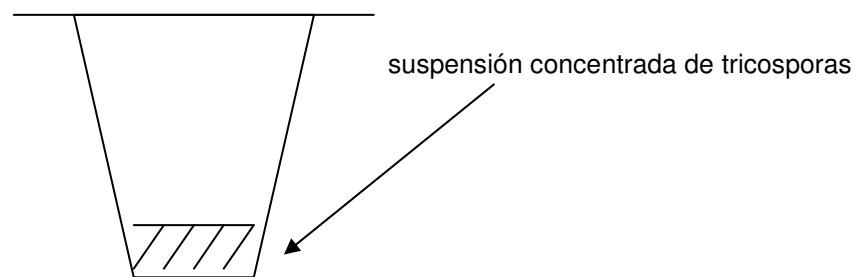
### 5 - 7 - 3. Transmisión mecánica

En este ensayo, se intentó demostrar si las tricosporas de *Sm. culisetae* eran capaces de adherirse a la superficie externa de hembras adultas de *Ae. aegypti*, por lo cual estas tricosporas podrían transmitirse mecánicamente hacia un nuevo ambiente.

Se colocaron adultos de *Ae. aegypti* ( $n = 40$ ) obtenidos a partir de larvas no infectadas, en un recipiente en el cual se colocó una suspensión

concentrada de tricosporas ( $8 \cdot 10^5$  tricosporas / ml). Luego de que los adultos se posaron sobre la suspensión de tricosporas fueron disecados, observándose si se encontraban tricosporas adheridas a su superficie externa (principalmente en las patas).

A su vez, se sumergieron adultos de *Ae. aegypti* ( $n = 20$ ) en la suspensión de tricosporas de *Sm. culisetae* y luego fueron observados bajo microscopio óptico con contraste de fases para observar si se encontraban tricosporas adheridas a la superficie externa de los mosquitos. El ensayo fue repetido 3 veces en el tiempo bajo las mismas condiciones.



#### 5 - 7 - 4. Material obtenido en el campo

En este ensayo, se utilizó material obtenido en el campo, con el fin de encontrar el inóculo fúngico en pupas y/o adultos de diferentes especies de culícidos. Para ello se recolectaron larvas, pupas y adultos de los mosquitos *Cx. apicinus*, *Cx. pipiens* y *Psorophora ferox* obtenidas en el campo, cuyas larvas presentaban el tubo digestivo posterior con un elevado crecimiento de *Sm. culisetae*. Las larvas y las pupas fueron mantenidas en laboratorio para luego, realizar la disección de los correspondientes adultos.

*Culex pipiens*. Larvas y pupas recolectadas en zanjas domiciliarias (Sitio LP-6 y LP-7), y en las cuales se había corroborado la presencia de infecciones por *Sm. culisetae*, fueron mantenidas en el laboratorio hasta alcanzar el estadio de adultez. Se disecaron pupas ( $n = 25$ ) y adultos (52 hembras y 19 machos).



A su vez, se disecaron adultos de *Cx. pipens* (45 hembras y 20 machos) provenientes de la colonia de mosquitos del CEPAVE, cuyas larvas presentaban infecciones causadas por *Sm. culisetae*.

*Cx. apicinus*. Se recolectaron larvas, pupas y adultos en el sitio SW-1 en diferentes meses del año. En todos los casos, las larvas presentaban infecciones de *Sm. culisetae* en el tubo digestivo posterior. Estas larvas y pupas fueron mantenidas a 24°C hasta que llegaron a la adultez. Los adultos recolectados en el mismo sitio fueron también disecados. Fueron disecados 28 pupas, 135 hembras adultas (107 recolectadas en el campo en estado de larva o pupa y 28 recolectadas en estado adulto) y 62 machos adultos (36 recolectados en el campo en estado de larva o pupa y 26 recolectados en estado adulto).

*Psorophora ferox*: Las larvas y pupas recolectadas en el sitio LP-2, fueron mantenidas en laboratorio hasta llegar a adultos, los cuales fueron luego disecados. Los adultos recolectados en el mismo sitio también fueron disecados en el laboratorio. Se disecaron 16 pupas, 58 hembras y 25 machos recolectadas en estado de larva o pupa, y 32 hembras y 12 machos recolectados en estado adulto.

Además de hembras adultas de culícidos, también fueron disecadas hembras adultas de simúlidos para detectar la presencia de estructuras fúngicas asociadas a la superficie externa de éstos. Se disecaron 9 hembras (*S. delponteianum*) del sitio PI-4, 38 (*Simulium delponteianum*) del sitio PI-8, 18 (*S. bonaerense*) del sitio SV-6, 16 (*S. bonaerense*) del sitio SV-3, 34 (*S. auripellitum*) del sitio SV-8.

También fueron observados huevos de quironómidos (recolectados en los sitios ChL-1, ChL-2 y SW-1) bajo microscopio óptico con contraste de fases para detectar la presencia de clamidosporas asociadas a la superficie externa de estos.

5 - 8. Estudio sobre la prevalencia y estacionalidad de Harpellales en diferentes ambientes.

5 - 8 - 1. Fitotelmata

Se llevó a cabo el seguimiento de hongos Harpellales infectando larvas de quironómidos presentes en el agua almacenada en las axilas de plantas de *Eryngium cabreræ* L. (Apiaceae) (Fig. 15).

5 - 8 - 1 - 1. Área de estudio

El sitio de muestreo se encuentra localizado en la “Reserva Natural Integral” de Punta Lara, La Plata, provincia de Buenos Aires (34° 51′ 53″ S, 57° 52′ 23″ W). Esta reserva natural es el relicto más austral del mundo de una selva en galería, en la cual se encuentra vegetación de tipo subtropical.

El muestreo fue realizado en un área abierta de aproximadamente 500 m<sup>2</sup>, adyacente a la zona selvática, y ubicada al costado de un canal. Dicho canal atraviesa la zona selvática y desemboca en el Río de La Plata a 3 Km de distancia. En el área donde se recolectó el material se encuentra un promedio de 10 plantas de *E. cabreræ* por metro cuadrado (rango entre 6 y 12). Estas plantas tienen la capacidad de almacenar agua en las axilas de las hojas, asociándose a una elevada diversidad de artrópodos (Campos & Lounibos 1999, Donato & Paggi 2005).



**Fig. 15.** Plantas de *Eryngium cabreræ*. a: *E. cabreræ* creciendo en altas densidades. b: Axilas de *E. cabreræ* con agua acumulada.

### 5 - 8 - 1 - 2. Método de recolección del material

Las muestras fueron obtenidas quincenalmente, comenzando en Enero de 2003 hasta Diciembre de 2004 (N = 52). En cada fecha de recolección de material, se trazó al azar una transecta de 20 m de longitud sobre la cual se obtuvieron las muestras cada 2 metros. Se escogieron plantas hasta obtener 10 plantas que contengan agua almacenada entre sus axilas. A su vez, se escogieron otras 3 plantas que fueron rotuladas, en las cuales se realizó un seguimiento durante todo el estudio.

En el presente trabajo, se denominan "plantas al azar" a las 10 plantas escogidas al azar, mientras que a las otras 3 plantas se las denominan "plantas fijas" (las plantas fijas fueron muestreadas desde Julio de 2003 hasta Diciembre de 2004). El agua almacenada en las axilas se extrajo con una pipeta plástica (3 ml), colocándose el agua almacenada de cada planta en un recipiente (200 cc) previamente esterilizado para su posterior traslado al laboratorio dentro de una heladera con hielo.

Debido a que en cada fecha de recolección de material se extrajo toda el agua contenida en las plantas (extrayendo por lo tanto el inóculo fúngico y las larvas de quironómidos), las "plantas fijas" fueron utilizadas con el fin de determinar si éstas eran recolonizaciones por el hongo. Luego de 6 meses, las hojas de las plantas fijas fueron dañadas por senescencia natural, como así también a causa del método de muestreo, por lo que perdieron su capacidad de almacenar agua. Debido a esto, se escogieron otras 3 plantas nuevas, considerándolas como las "plantas fijas".

Los datos de las variables ambientales (temperatura, HR y precipitaciones) fueron aportados por el Servicio Meteorológico Nacional, Fuerza Aérea Argentina, Centro de Información Meteorológica de Buenos Aires.

### 5 - 8 - 1 - 3. Tareas en el laboratorio

En el laboratorio se obtuvo el pH y volumen de agua y, el número y tipo de quironómidos presentes por planta. Los frascos con quironómidos fueron mantenidos a 4°C hasta que se llevó a cabo su disección y se obtuvo el número de quironómidos infectados por planta. Luego de realizar la disección

de las larvas, se obtuvo la prevalencia de Harpellales en el tubo digestivo medio y en el posterior.

#### 5 - 8 - 1 - 4. Análisis estadísticos

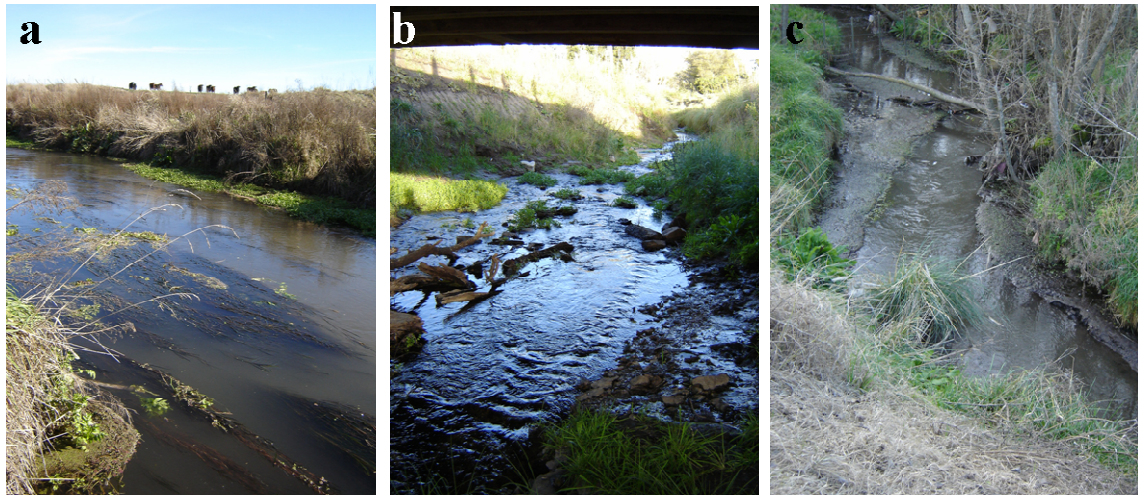
Para determinar si existieron diferencias en la prevalencia de Harpellales entre estaciones de un mismo año, se aplicó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis a los resultados obtenidos a partir de las plantas al azar. A su vez, el mismo análisis fue realizado para determinar si existieron diferencias en el número de quironómidos presentes por cada fecha de recolección de las muestras a lo largo del año.

La relación entre la prevalencia de Harpellales y las diferentes variables ambientales (temperatura, HR y precipitaciones), el pH y volumen de agua y, la densidad larval fue analizada mediante un análisis de correlación.

#### 5 - 8 - 2. Arroyos

##### 5 - 8 - 2 - 1. Área de estudio

Se escogieron 3 arroyos (Sitios MP-1, MP-4 y MP-6, Tabla I, Fig. 16) localizados en la provincia de Buenos Aires para los cuales se conocía la presencia de larvas de simúlidos.



**Fig. 16.** Arroyos relevados. a: sitio MP1. b: sitio MP4. c: sitio MP6.

##### 5 - 8 - 2 - 2. Método de recolección del material

La recolección del material fue realizada una vez por estación (13-VII-2005, 23-X-2005, 24-II-2006 y 03-V-2006). En cada relevamiento se extrajeron

larvas de simúlidos a partir de la vegetación que bordeaba cada arroyo. El sustrato conteniendo larvas fue escurrido para evitar que quede demasiada agua luego de que se los colocara en bolsas plásticas cerradas. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en una conservadora de frío que contenía hielo.

#### 5 - 8 - 2 - 3. Tareas realizadas en el laboratorio

Las larvas de simúlidos se mantuvieron en heladera (4°C) dentro de las bolsas plásticas hasta que se realizó su disección. Se escogieron 30 larvas de último estadio de cada uno de los arroyos, las cuales fueron disecadas. Luego de realizar la disección de las larvas, se registró la presencia / ausencia de Harpellales dentro del tubo digestivo.

#### 5 - 8 - 3. Campo experimental de arroz (Fig. 17)

Este estudio se llevó a cabo en un campo experimental de arroz ubicado en la Estación Experimental Julio Hirschhorn (Sitio ARR-1, Tabla I) perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. Durante el presente estudio, no se llevó a cabo un muestreo sistematizado, sino que se recolectó material de diferentes especies de dípteros mientras este ambiente permaneció con agua, con el fin de evaluar la presencia o ausencia de harpélidos en cada fecha de muestreo.

El campo experimental de arroz fue inundado artificialmente desde comienzos de diciembre de 2004 hasta mediados de marzo de 2005, y permaneció inundado en ciertas regiones hasta principios de julio. Las muestras fueron obtenidas quincenalmente durante el periodo comprendido entre mediados de enero y principios de julio de 2005.

Las muestras fueron obtenidas por medio de un cucharón (250 cc) y fueron filtradas a través de una red de malla fina, para luego ser colocadas en un recipiente plástico (3000 cc) para ser transportados al laboratorio.



**Fig. 17.** Campo experimental de arroz.

5 - 9. Estimación de la relación entre la presencia de *Sm. culisetae* y la fecundidad y tamaño de hembras adultas de *Aedes aegypti*.

5 - 9 - 1. Larvas de *Ae. aegypti* utilizadas

El papel conteniendo huevos (previamente esterilizados) de *Ae. aegypti* se sumergió en agua de cloro esterilizada durante 90 minutos, y luego, las larvas emergidas de esos huevos fueron transferidas a otro recipiente que contenía agua de cloro esterilizada, utilizándose de esta manera larvas con un tiempo similar de eclosión.

5 - 9 - 2. Condiciones de cría de las larvas

Se utilizaron 4 tratamientos, de los cuales 2 fueron infectados con *Sm. culisetae* y 2 se mantuvieron libres de este hongo. A uno de los tratamientos infectados (HC), y a uno de los tratamientos no infectados (SC) se les agregaron altos niveles de alimento para larvas (alimento para cobayos finamente molido) mientras que a los otros 2 tratamientos (HP y SP) se les agregaron bajos niveles de dicho alimento:

(HC) 3000 ml H<sub>2</sub>O dechlorinada estéril + 400 larvas + 1.5 g alimento + 3500 ts/ml

(SC) 3000 ml H<sub>2</sub>O dechlorinada estéril + 400 larvas + 1.5 g alimento

(HP) 3000 ml H<sub>2</sub>O dechlorinada estéril + 400 larvas + 0.2 g alimento + 3500 ts/ml

(SP) 3000 ml H<sub>2</sub>O dechlorinada estéril + 400 larvas + 0.2 g alimento

El ensayo fue mantenido a 28 +/- 2°C. Para verificar la presencia de Trichomyctes dentro del tubo digestivo de cada uno de los tratamientos, se realizó la disección de larvas en los estadios L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub>. Se realizaron 3 repeticiones en el tiempo de cada uno de los tratamientos.

### 5 - 9 - 3. Mantenimiento de los adultos emergidos.

Para cada tratamiento se utilizó una jaula de 40 x 40 x 40 cm, las cuales fueron acondicionadas como se explica en el punto 5 - 5 - 1, con la excepción de que no se colocó un frasco de oviposición. En el interior de cada una de las jaulas se colocó un recipiente de 500 ml que contenía agua dechlorinada, y al cual se le agregaron las pupas obtenidas a partir de la bandeja correspondiente para la emersión de los adultos. Luego de 7 días se extrajeron estos recipientes en cada una de las jaulas, y se colocó una gallina dentro de la jaula durante 90 minutos como recurso de sangre para las hembras adultas. A las 24 hs posteriores a la alimentación, se extrajeron los adultos con un aspirador manual de cada una de las jaulas y fueron anestesiados con CO<sub>2</sub>.

Se escogieron 15 hembras que presentaban signos de alimentación (abdomen rojo) de cada uno de los tratamientos, y cada una se la transfirió a un frasco individual, los cuales fueron acondicionados de la misma manera que se describen en el ensayo 5 - 7 - 1. Los 60 frascos conteniendo las hembras alimentadas se mantuvieron a 28 +/- 2° C y 80% HR.

### 5 - 9 - 4. Fecundidad de las hembras

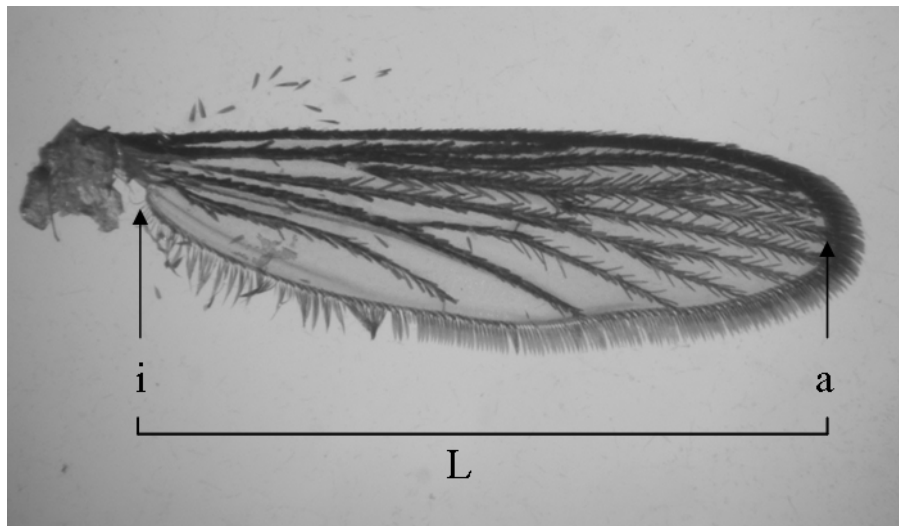
En cada uno de los papeles se llevó a cabo el conteo del número de huevos bajo microscopio binocular estereoscópico. Luego, los papeles conteniendo huevos de *Ae. aegypti* fueron secados a temperatura ambiente y almacenados dentro de una bolsa plástica.

#### 5 - 9 - 5. Efecto de *Sm. culisetae* sobre el tamaño de las hembras de *Ae. aegypti*

Se utilizó la medida del ala derecha como estimador del tamaño de las hembras adultas de *Ae. aegypti* (Becnel et al 1995, Maciá 1996). Para realizar dicha medición, se montó sobre un portaobjetos el ala derecha de cada hembra, y se midió bajo microscopio binocular estereoscópico (Zeiss DV-4) con ocular milimetrado la distancia entre la incisión axilar y el margen apical (Fig. 18). Se utilizaron 15 hembras de cada uno de los tratamientos.

#### 5 - 9 - 6. Análisis estadísticos

Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de los datos. La comparación de la incidencia en el tamaño y fecundidad de las hembras adultas fue realizada con el análisis de varianza (ANOVA) de 3 vías. A su vez, se utilizó el mismo análisis para comparar la incidencia de la cantidad de alimento sobre el tamaño y fecundidad de dichas hembras.



**Fig. 18.** Ala de adulto de *Ae. aegypti*. a = ápice, i = incisura axilar, L = longitud del ala.



## 6 - RESULTADOS

### 6 - 1. Descripción de las especies de Trichomycetes relevadas

Como resultado de estos relevamientos se describen 5 nuevas especies, y se citan 12 especies previamente descritas, y 4 especies aún no descritas completamente. A su vez, se encontraron ejemplares de *Amoebidium parasiticum* y *Paramoebidium* sp., ambos pertenecientes al orden Amoebidiales.

Los Harpellales presentes fueron encontrados principalmente en larvas de dípteros simúlidos (Simuliidae), mosquitos (Culicidae) y quironómidos (Chironomidae).

#### 6 - 1 - 1. Nuevas especies

##### ***Austrosmittium* sp. 1.** sp.nov. Fig: 19

Tricosporas elipsoidales, (24-)28(-31) x 7  $\mu$ m, sin collar, y con un único apéndice largo y delgado. Cigosporas bicónicas, de tipo II, con un engrosamiento muy pronunciado en la región central, (47-)54(-62) x (21-)24(-28)  $\mu$ m, collar oblicuo, cigospororóforo 40 x 12  $\mu$ m, conjugaciones escalariformes entre talos a partir de las cuales se forman las cigosporas. Talos ramificados <300  $\mu$ m, estructura basal conformada por células agrupadas en forma de anillo del cual parten ramificaciones. En tubo digestivo posterior de larvas de Podonominae (Diptera: Chironomidae).

*Ejemplares examinados:* ARGENTINA. NEUQUEN: material recolectado el 17-I-2005 en arroyo permanente (nombre desconocido) localizado en el Parque Nacional Lanín (Sitio LAN-4, Tabla I), 39° 42' 51.7'' S, 71° 31' 55.9'' W.

Preparación microscópica LAN-4-2 (HOLOTIPO, LPSC: 48159), conteniendo un talo bien desarrollado, tricosporas y cigosporas libres como así también algunas adheridas al talo. Material obtenido del tubo digestivo posterior de larvas de *Parochlus* sp. (Podonominae: Chironomidae). Material recolectado en el mismo sitio y fecha: LAN-4-1, LAN-4-5, LAN-4-6, LAN-4-8, LAN-4-10, LAN-4-11, LAN-4-12, LAN-4-13, LAN-4-14.

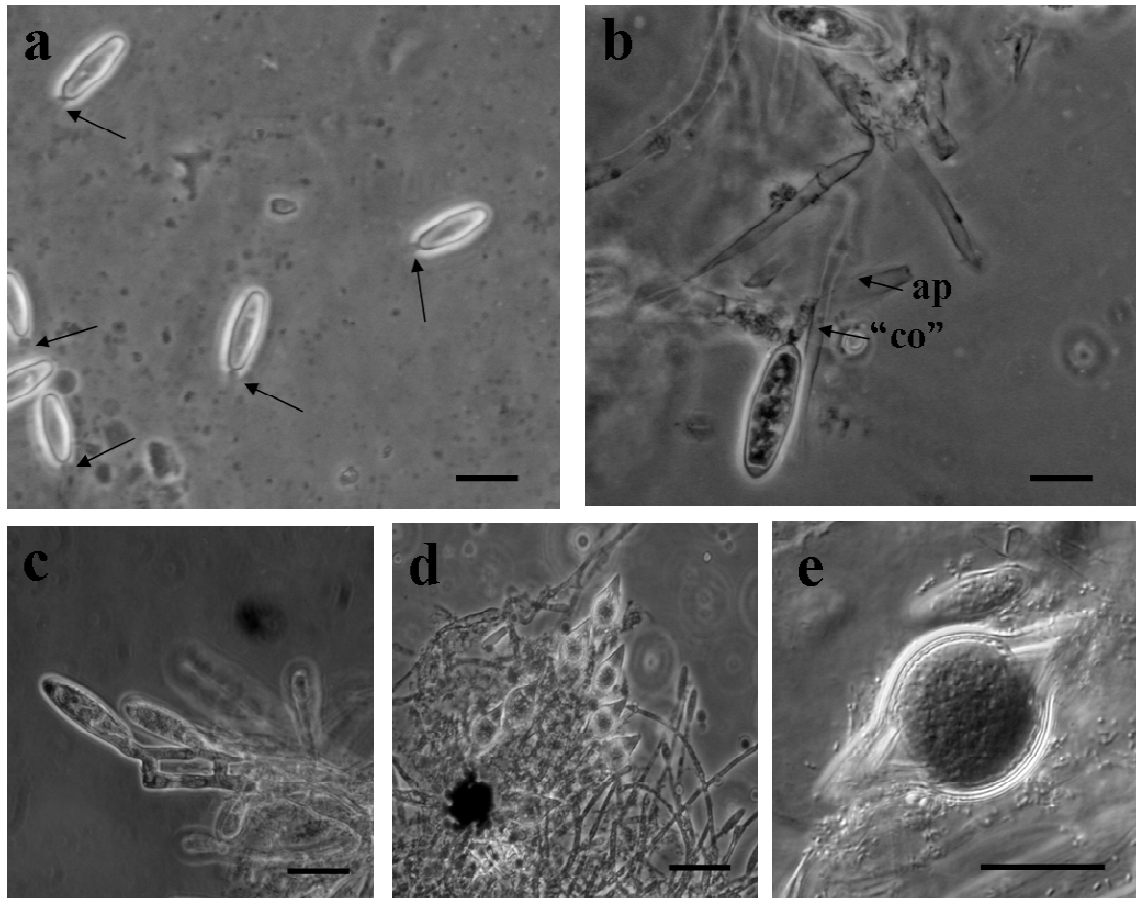
### Similitudes y diferencias con otras especies:

La morfología de las cigosporas y de las tricosporas, como así también el tipo de hospedador fueron los caracteres principales utilizados para ubicar esta nueva especie dentro del género *Austrosmittium*.

El tipo y forma de cigosporas de *Austrosmittium* sp. 1 (Figs. 19d-e) coinciden con el resto de las especies descritas para este género (salvo en el caso de *A. biforme* Williams & Lichtwardt en cuya especie no se han encontrado tales estructuras), sin embargo, las cigosporas de *Austrosmittium* sp. 1 son más grandes que las del resto de las especies, llegando en algunos casos a duplicarlas en largo y en ancho.

Las tricosporas descritas para las especies de *Austrosmittium*, presentan un collar bien evidente el cual está ausente en *Austrosmittium* sp. 1. Algunas tricosporas montadas en agua destilada estéril y observadas bajo microscopio óptico con contraste de fases, presentaban una estructura difusa similar a un collar (Fig. 19a). Sin embargo, luego de la tinción con azul de algodón-lactofenol de Ammann se observó que esa estructura es el apéndice que se encuentra enrollado. Cuando las tricosporas de *Austrosmittium* sp. 1 son liberadas, el apéndice delgado se encuentra enrollado en forma de “tubo” y luego se va alargando (Fig.19b).

El tamaño de las tricosporas es similar al de las tricosporas más grandes que produce la especie dimórfica *A. biforme* Williams & Lichtwardt, pero a diferencia de esta especie, *Austrosmittium* sp. 1 no produce dos tamaños de tricosporas y las tricosporas carecen de collar. Con respecto a *A. kiwiorum* Williams & Lichtwardt, se asemejan en que ambas tienen conjugaciones escalariformes (Fig.19c) a partir de las cuales se forman las cigosporas, pero se diferencian principalmente en el tamaño de las tricosporas [(11-)14(-15) x (6.5-)8(-9)  $\mu\text{m}$ ] y de las cigosporas [(27-)32(-35) x 10-12  $\mu\text{m}$ ].



**Fig. 19.** *Austrosmittium* sp. 1. a: Tricosporas (las flechas indican el "collar difuso"). b: Apéndice enroscado estirándose. c: conjugaciones escalariformes entre talos. d: cigosporas. e: cigospora. ap = apéndice, "co" = apéndice enroscado en la base de la tricospora. Escala: figs. a-c,e = 20  $\mu$ m; fig. d = 40  $\mu$ m.

***Austrosmittium* sp. 2.** sp.nov. Fig. 20

Tricosporas ovals a elipsoidales, (10-)14(-17) x 5  $\mu$ m sin collar ni apéndice. Cigosporas bicónicas, de tipo II, con un engrosamiento pronunciado en la región central, (23-)26(-28) x 10-12  $\mu$ m, collar oblicuo de 10 x 2  $\mu$ m y, cigosporóforo de 34 x 6  $\mu$ m. Talo menor de 120  $\mu$ m de largo, con un eje central de ramificación, 2-4 tricosporas por cada rama fértil y tipo de "holdfast" secretado. En tubo digestivo posterior de larvas de Orthoclaadiinae (Chironomidae).

*Ejemplares examinados:* ARGENTINA, BUENOS AIRES: charco temporal de inundación, ubicado en la localidad de Arana (Sitio ChL-1, 35° 00' 41.3'' S, 57° 54' 49.0'' W), recolectado el 28-VII-2005. Preparación microscópica ChL-1-1 (HOLOTIPO, LPSC: 48160), conteniendo un talo maduro, tricosporas y cigosporas adheridas al talo y libres. Material obtenido de tubo digestivo posterior de larvas de *Corynoneura* sp. (Orthocladiinae: Chironomidae). Material recolectado en el mismo sitio y especie hospedadora: ChL-1-2, ChL-1-4, ChL-1-5, ChL-1-7, ChL-1-8, ChL-1-12, ChL-1-15 en la misma fecha que el holotipo; ChL-1-16, ChL-1-17, ChL-1-18, ChL-1-19, ChL-1-20, ChL-1-21, ChL-1-22 recolectado el 08-VIII-2005 y ChL-1-25, ChL-1-27, ChL-1-29 recolectado el 10-XI-2005.

#### Similitudes y diferencias con otras especies:

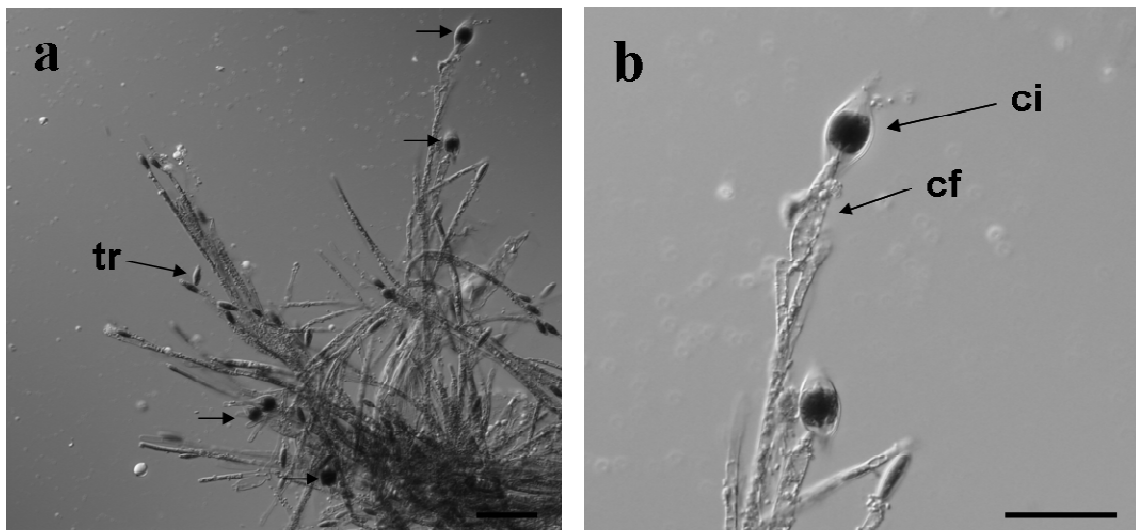
Esta especie ha sido clasificada dentro del género *Austrosmittium* debido a que comparten el mismo tipo de cigosporas (tipo II), las cuales presentan una forma bicónica con un engrosamiento pronunciado en la región central, collar oblicuo localizado en la región media, y están adheridas medialmente al cigosporóforo. Se tuvo en cuenta además, la forma elipsoidal de las tricosporas, como así también el tipo de hospedador al que se encuentran asociados.

Las tricosporas, a diferencia de las otras especies de *Austrosmittium*, carecen de apéndice y de un collar evidente, habiéndose encontrado solamente algunas tricosporas con collar muy pequeño (2 x 1 µm).

Esta nueva especie que se asemeja a *A. aussiorum* Williams & Lichtwardt en cuanto al tamaño de las tricosporas y al largo de las cigosporas, difiere en el ancho de estas últimas, siendo en *Austrosmittium* sp. 2 más anchas, lo que le da un aspecto más globoso. Las tricosporas de *Austrosmittium* sp. 2 tienen un tamaño similar a las tricosporas más chicas producidas por la especie dimórfica *A. biforme* Williams & Lichtwardt, pero una de las diferencias que presenta esta nueva especie es que no producen dos tipos de tricosporas. Si bien las tricosporas de *A. norinsulare* Lichtwardt presentan tamaño similar (10-14 x 5-6.5 µm) que las de *Austrosmittium* sp. 2, las cigosporas de la especie que se está describiendo son más grandes.

*Austrosmittium* sp. 1, la otra especie descrita en el presente trabajo, comparte la característica de poseer tricosporas que no tienen collar, pero difieren en el tamaño de tricosporas y cigosporas, y por la ausencia de apéndice.

*Austrosmittium* sp. 2 es la única especie de este género que se ha encontrado en un ambiente léntico, ya que el resto de las especies descritas hasta el momento han sido citadas en ambientes lóticos.



**Fig. 20:** *Austrosmittium* sp. 2. a: talos con tricosporas adheridas (y una libre). b: cigospora adherida al cigosporóforo. ci: cigospora, cf: cigosporóforo, cj: confugación heterotálica, tr: tricospora libre sin collar. Escala: a = 40  $\mu$ m; b = 20  $\mu$ m.

***Smittium* sp. 1.** sp.nov. Fig. 21.

Talo densamente ramificado <500  $\mu$ m de largo, adherido al tubo digestivo posterior de larvas de Orthoclaadiinae (Diptera: Chironomidae) y de Simuliidae (*Simulium delponteianum* Wygodzinsky) por medio de un “holdfast” simple que, en algunos casos presenta digitaciones que aumentan los puntos de unión; ramas fértiles conteniendo hasta 20 células germinativas. Tricosporas elipsoidales (12-)25(-31) x 5-6  $\mu$ m, collar campanulado 5-7 x 3  $\mu$ m; cigosporas alargadas (47 x 10  $\mu$ m) con extremos redondeados; cigosporóforo de 35 x 7  $\mu$ m.

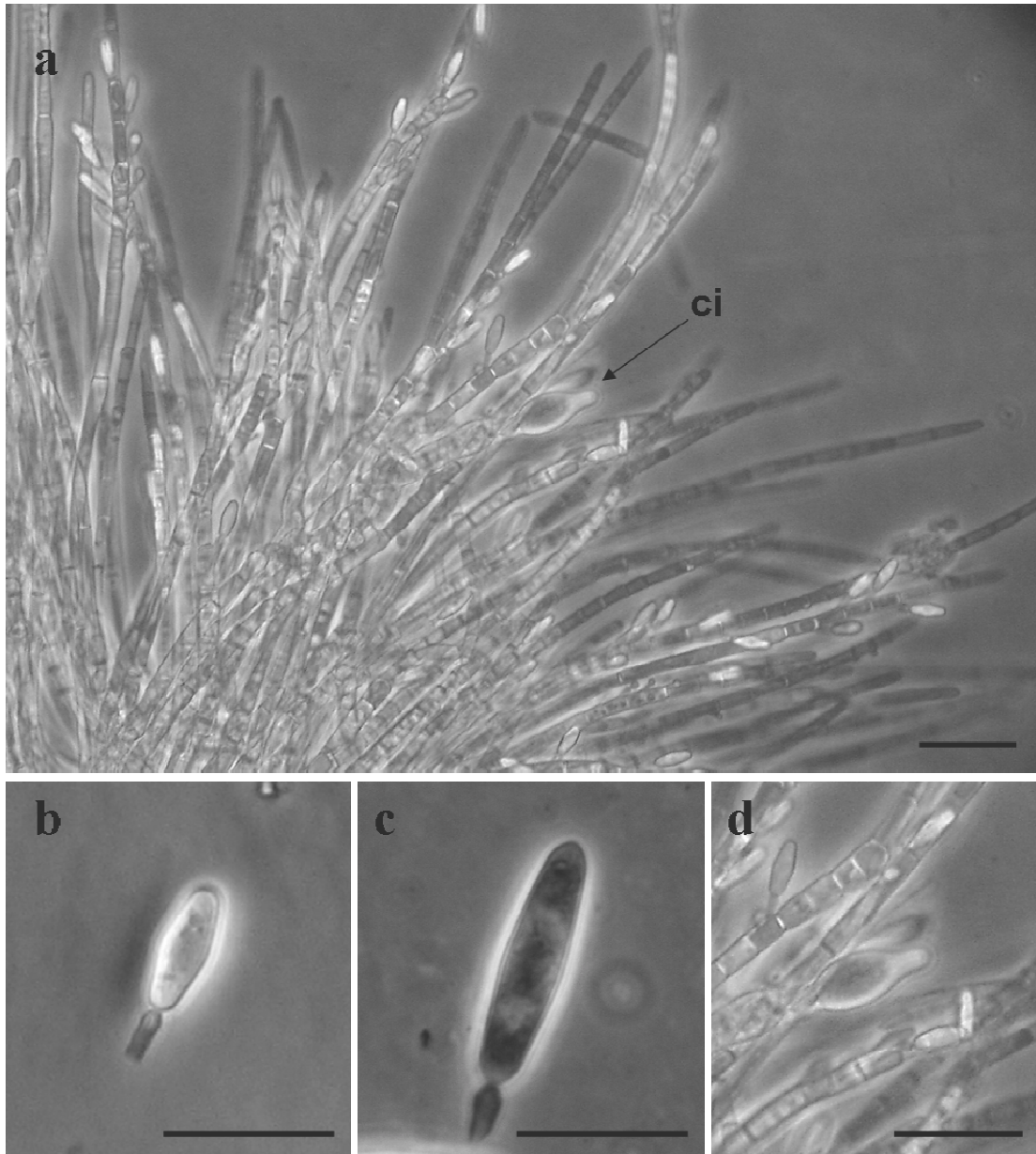
*Ejemplares examinados:* ARGENTINA. BUENOS AIRES: material recolectado en los arroyos ubicados en los sitios PI-8 y PI-3 (Tabla I), los cuales se encuentran en la localidad de Magdalena atravesando la ruta provincial N°11. Holotipo: material obtenido del tubo digestivo posterior de larva de Orthoclaadiinae (Diptera: Chironomidae) (PI-8-9) recolectada en el partido de Magdalena (35° 08' 46.9'' S, 57° 23' 29.3'' W) el 25-VII-2006. Material microscópico que contiene talos de *Smittium* sp. 1, tricosporas y una cigospora.

Otros ejemplares de *Smittium* sp. 1: PI-8-2, PI-8-6, PI-8-8, PI-8-10 (Chironomidae); PI-3-2, PI-3-4, PI-3-11, PI-3-12, PI-8-1, PI-8-3, PI-8-4, PI-8-5, PI-8-7 (Simuliidae).

#### Similitudes y diferencias con otras especies

A pesar de que el rango del tamaño de las tricosporas que se ha citado para esta nueva especie es de (12-)25(-31) x 5-6 µm, se observaron 2 rangos de medidas siendo (12-)14(-16) x 5 µm y (21-)27(-31) x 5-6 µm (Fig. 21a). Sin embargo no se observó en ningún caso, ambas variaciones de tamaños de tricosporas dentro de un mismo hospedador.

El tamaño de las tricosporas, como así también el tipo de collar (campanulado) asemejan a esta especie con *Sm. culicis* Manier, pero el número de tricosporas por cada rama fértil es muy diferente. Además, las cigosporas descritas para *Sm. culicis* (Valle & Santamaría 2004), son muy diferentes a las que presenta *Smittium* sp. 1 (Fig. 21b). El collar campanulado de las tricosporas, la forma de las tricosporas más grandes, los hospedadores (simúlidos y quironómidos) y la presencia de digitaciones que permiten una mayor adhesión al hospedador, hacen recordar a *Sm. culicisoides* Lichtwardt. A pesar de estas similitudes, estas especies difieren en que *Smittium* sp. 1 produce tricosporas generalmente más angostas; el "holdfast" es simple y el número de tricosporas por cada rama fértil es mayor que en *Sm. culicisoides* (Fig. 21c).



**Fig. 21:** *Smittium* sp. 1. a: talo ramificado conteniendo cada rama una gran cantidad de células germinativas. b: tricospora más chica. c: tricospora más grande. d: cigospora. Escala: a,d = 50  $\mu$ m, b,c = 20  $\mu$ m.

***Smittium* sp. 2.** sp.nov. Fig.22

Tricosporas subcilíndricas, (30-)33(-35) x 5-6  $\mu$ m con collar de 1-2  $\mu$ m de largo y un apéndice; talo <350  $\mu$ m, adherido al hospedador por medio de un "holdfast" en forma de disco, ramificado principalmente en la base, formándose pocas ramas de las cuales las tricosporas se forman con un ángulo agudo. Cigosporas desconocidas. En tubo digestivo posterior de larvas de *Polypedilum* sp. (Diptera: Chironomidae).

*Ejemplares examinados:* ARGENTINA. CORDOBA: Río Grande de Punilla, localizado en ciudad de La Falda (Sitio LF, Tabla I), 31° 05' 49.7'' S, 64° 30' 04.5'' W, 21-IX-2006. Preparación microscópica LF-A-3 (HOLOTIPO, LPSC: 48161) que contiene talos maduros en donde se observa claramente el "holdfast", el tipo de ramificación y tricosporas. Material obtenido del tubo digestivo posterior de larva de *Polypedilum* sp. (Diptera: Chironomidae). Otro material perteneciente al mismo sitio, fecha y hospedador que el holotipo: LF-A-4, LF-A-5, LF-B-1, LF-B-2, LF-C-1, LF-C-2.

Similitudes y diferencias con otras especies:

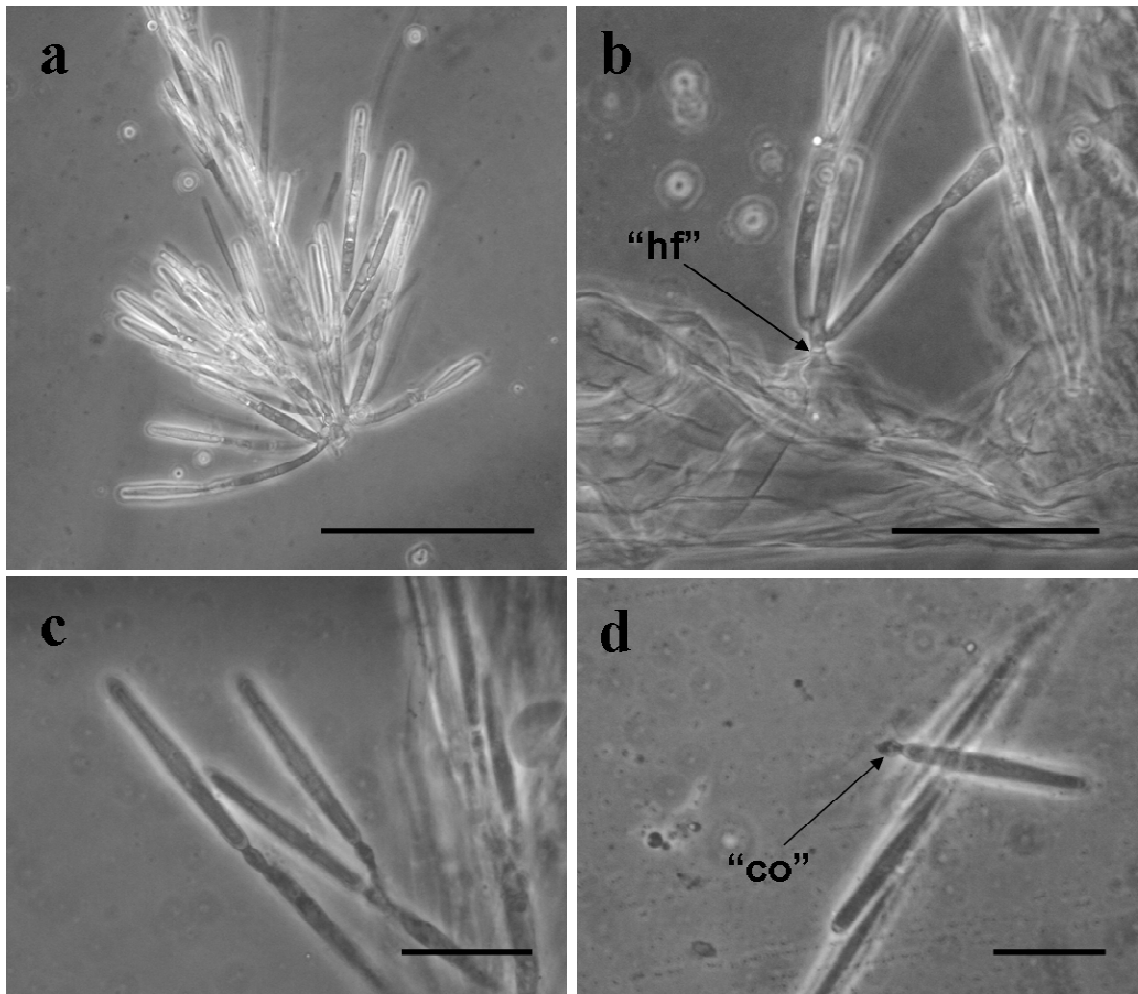
Hasta el presente no se ha descrito ninguna especie de *Smittium* que reúna todas las características que presenta *Smittium* sp. 2. La ramificación que presentan los talos de esta especie, es la misma que presenta *Sm. angustum* Williams & Lichtwardt, en donde se puede observar un crecimiento discoidal debido a que se ramifica desde la base. Esta es la única característica que comparten ambas especies, siendo diferentes el "holdfast" y el tamaño de las tricosporas y del collar.

***Legeriomyces* sp. sp.nov. Fig. 23**

Tricosporas obpiriformes (25-)33(-36) x 6 µm, sin collar y con 2 apéndices largos y delgados; 2-4 tricosporas por cada rama fértil; ramificación del talo sin un eje principal, 450 x 7-9 µm aproximadamente, adheridos al tubo digestivo posterior de ninfas de Ephemeroptera (aún no identificadas) por medio de un "holdfast" simple. Cigosporas desconocidas.

*Ejemplares examinados:* ARGENTINA. BUENOS AIRES: material recolectado en el arroyo localizado en el sitio PI-3 (Tabla I), ubicado en el partido Punta Indio, 35° 11' 13.1'' S, 57° 20' 13.4'' W, 25-VII-2006. Preparación microscópica PI-3-1a (HOLOTIPO, LPSC: 48162) obtenido a partir del tubo digestivo posterior de ninfa de Ephemeroptera (aún no identificada), en donde se encuentran algunos talos maduros y tricosporas libres. Otros ejemplares del mismo sitio, fecha y hospedador que el holotipo: PI-3-2, PI-3-3, PI-3-7, PI-3-8; y a partir del mismo sitio y hospedador recolectados el 15-VII-2006: PI-3-10, PI-3-16, PI-3-17, PI-3-19, PI-3-21.

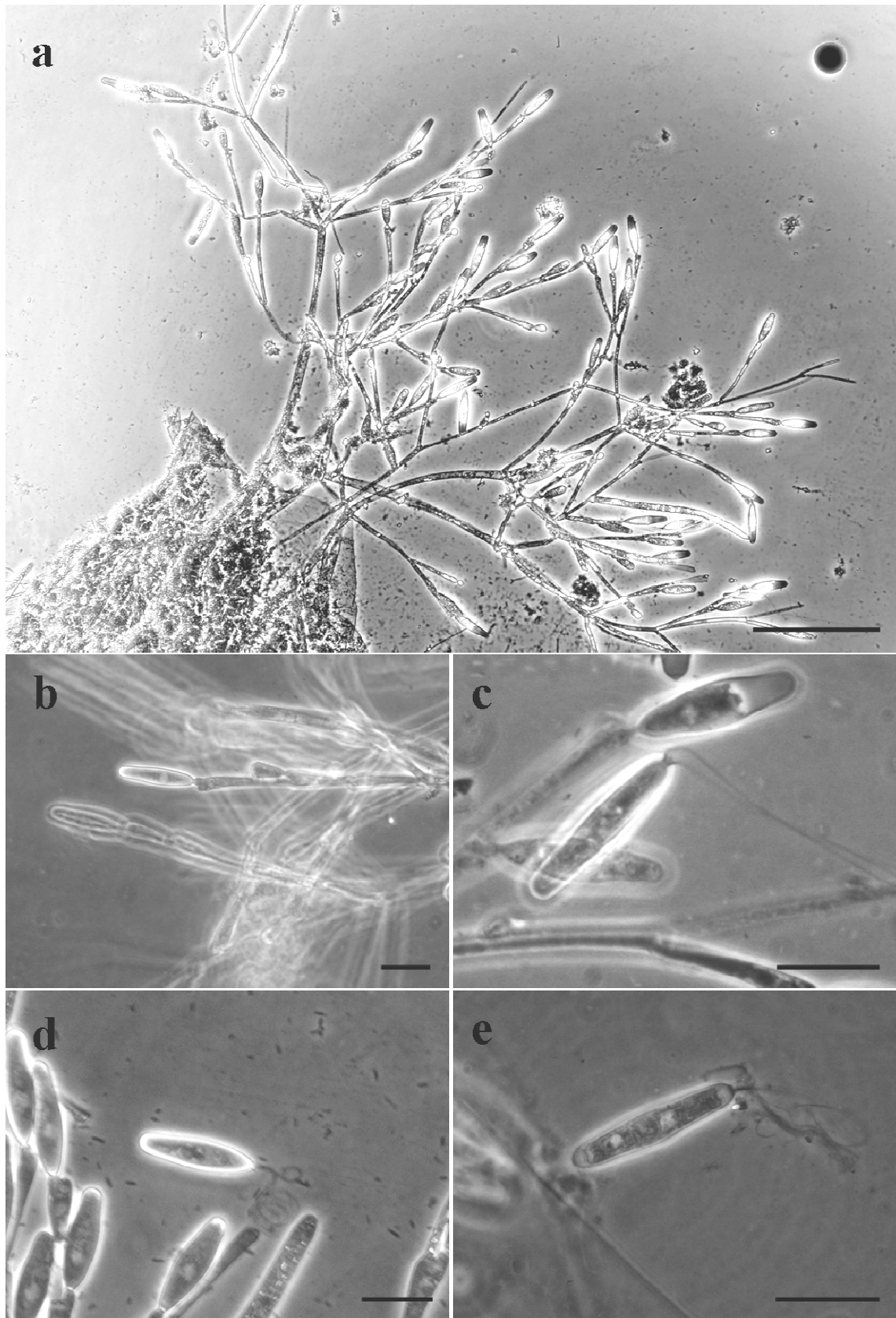




**Fig. 22.** *Smittium* sp. 2. a: talo. b: "holdfast" en forma de disco. c: tricosporas aún no liberadas. d: tricospora libre. hf: "holdfast", co: collar. Escala: a = 100  $\mu$ m, b = 50  $\mu$ m, c-d = 20  $\mu$ m.

#### Similitudes y diferencias con otras especies:

Esta especie se diferencia del resto de las especies del género *Legeriomyces* principalmente por el tamaño de las tricosporas. *Legeriomyces* sp. presenta características similares a *L. rarus* Lichtwardt & Williams, aunque las tricosporas de esta última son más chicas [(25-)27(-31) x (5.5-8)  $\mu$ m] y el "holdfast" adquiere mayor complejidad en los talos maduros, lo cual no ocurre en la nueva especie. Por otra parte, *L. aenigmaticus* Lichtwardt & Williams produce 3 tipos de tricosporas diferentes, de las cuales, las de tamaño medio tienen una medida similar a las tricosporas de *Legeriomyces* sp. La presencia del grueso apéndice en las tricosporas de *L. aenigmaticus* es otra de las características que diferencian a estas dos especies.



**Fig. 23:** *Legeriomyces* sp. a: Talo adherido al tubo digestivo posterior. b - e: secuencia de liberación de tricospora. b: tricospora adherida a célula germinativa, c: tricospora liberándose los apéndices (2) se encuentran estirados). d: los apéndices comienzan a enrollarse, e: apéndices enrollados. ap = apéndices. Escala: a = 100  $\mu$ m, b - e = 20  $\mu$ m.

***Harpella* sp.** Fig. 24.

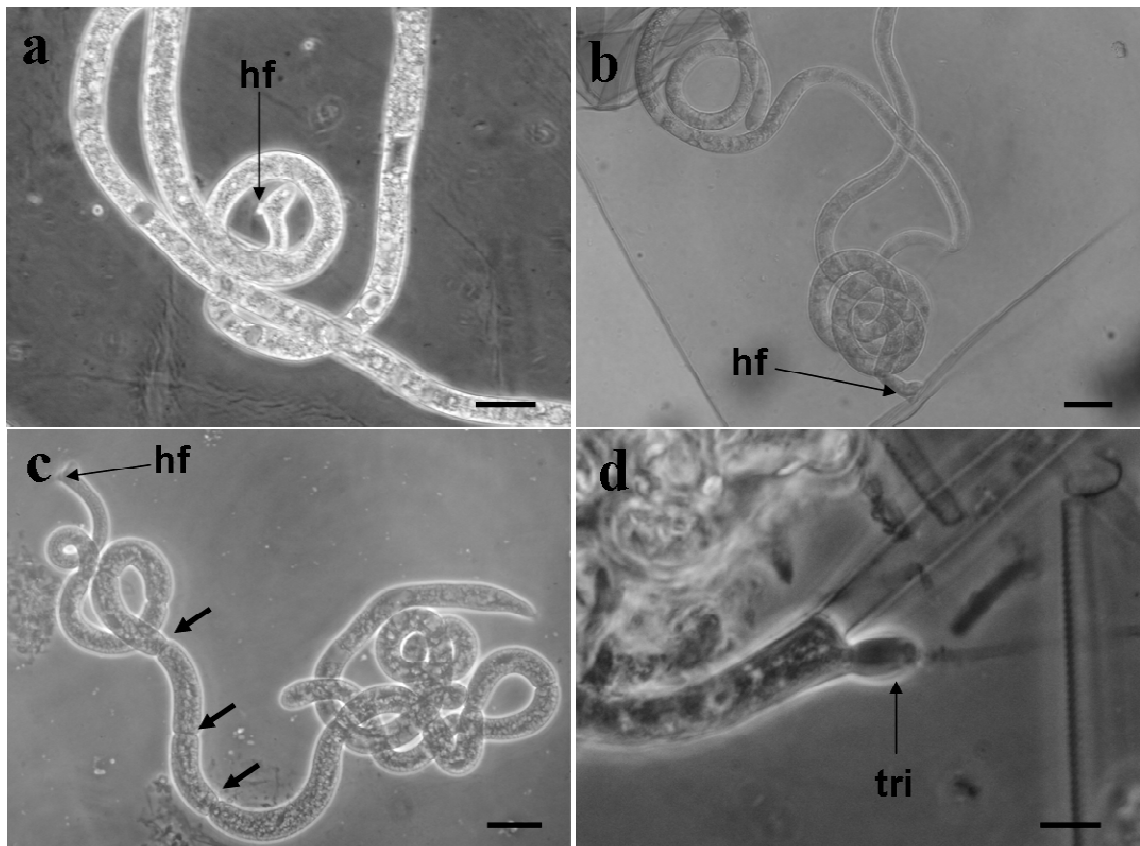
Talos desde 400  $\mu\text{m}$  hasta más de 700  $\mu\text{m}$  de largo x 7-10  $\mu\text{m}$  de ancho, enroscados total o parcialmente, adheridos por medio de un "holdfast" de posición subterminal. No se han observado tricosporas maduras, como así tampoco cigosporas. En tubo digestivo medio de larvas de *Simulium wolffhuegeli* Enderlein (Diptera: Simuliidae) recolectadas en el sitio SL-3 (Tabla I).

*Harpella* sp. presenta al menos tres características que la diferencia del resto de las especies del género. Una de las particularidades es que el "holdfast" no tiene una posición terminal, sino que está ubicado subterminalmente, lo que le da un aspecto de "pie" a la región basal del talo (Figs. 24a-c). Otra característica distintiva es la presencia de talos total o parcialmente enroscados. A su vez, se encuentran "constricciones" transversales a lo largo de algunos talos, lo cual no se ha observado en ninguna de las especies de este género.

Si bien estas características sugieren que esta podría ser una nueva especie de *Harpella*, desafortunadamente no se han observado tricosporas maduras, por lo que no se puede hacer una diagnosis completa de la especie. En algunas de las membranas peritróficas en donde se encontró esta *Harpella*, también se observaron talos maduros de *H. meridionalis* Lichtwardt & Arenas.

***Simuliomyces aff. microsporus*.** Fig. 25.

Tricosporas elipsoidales, alargadas, (17-)19(-20) x 5  $\mu\text{m}$ , sin collar, y con 3 apéndices delgados que superan en largo a las tricosporas. Cigosporas bicónicas (28 x 5  $\mu\text{m}$ ), de tipo I, adheridas medial y perpendicularmente al cigosporóforo (15 x 6  $\mu\text{m}$ ). Talo sin presentar un eje principal de ramificación, adherido al tubo digestivo posterior del hospedador por medio de un "holdfast" "globoso". En tubo digestivo de larvas de *Simulium* (Ectemnaspis) *romanai* (Diptera: Simuliidae) recolectado el 20-II-2005, en un arroyo localizado en el Camino de las altas cumbres (Sitio LR-9, Tabla I), 31° 42' 10.7" S, 64° 53' 44.9" W) de la provincia de Córdoba a 1710 msnm.

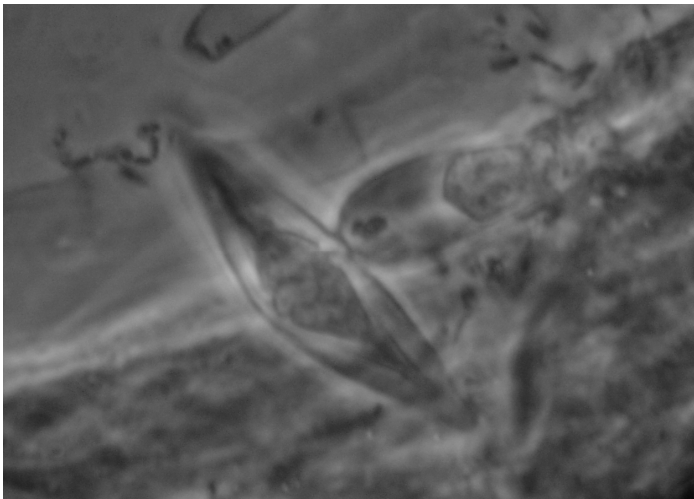


**Fig. 24.** *Harpella* sp. a - b: Talos parcial a totalmente enrollados adheridos por medio de un "holdfast" de posición subterminal. c: Talo enrollado que presenta constricciones transversales (algunas de estas están marcadas por medio de las flechas más gruesas). d: tricospora comenzando a desarrollarse. hf: "holdfast". Escala: a - c = 20  $\mu$ m, d = 10  $\mu$ m.

Al igual de lo que ocurre en *Si. microsporus* Lichtwardt, *Simuliomyces* aff. *microsporus* presenta tricosporas elipsoidales (alargadas), carentes de collar y, con entre 2 y 4 apéndices finos. A su vez, cuando las tricosporas son teñidas con azul de algodón-lactofenol de Ammann, se observa un engrosamiento de la pared en la región apical. Otra característica que comparte, es el tipo de cigosporas, las cuales se encuentran adheridas en la parte media, y perpendicularmente al cigosporóforo. A diferencia de lo que ocurre en *Si. microsporus*, el cual presenta un "holdfast" simple (o levemente globoso), *Simuliomyces* aff. *microsporus* se encuentra adherida al hospedador por medio de un "holdfast" globoso muy evidente. A su vez, estas especies se diferencian en que las tricosporas y cigosporas de *Simuliomyces* aff.

*microsporus* son más pequeñas, las cigospora no presentan aplanado el lado que está adherido al cigosporóforo y, en que no se han observado talos de esta especie adheridos a talos de *Paramoebidium* sp., lo cual ocurre comúnmente para *Si. microsporus*.

Las diferencias entre *Simuliomyces* sp. y *Si. microsporus* son evidentes, por lo que *Simuliomyces* aff. *microsporus* podría representar una nueva especie, sin embargo, el material recolectado no es suficiente como para poder describirla correctamente.



**Fig. 25.** Cigospora de *Simuliomyces* aff. *microsporus*

### ***Stachylina* aff. *lotica***

Esta especie fue observada adherida a la membrana peritrónica de larvas de *Chironomus* sp. (Diptera: Chironomidae), recolectadas en un campo de arroz (Sitio Arr-1, Tabla I). La medida de los talos ( $>100 \times 5-6 \mu\text{m}$ ), como así también la medida de las tricosporas ( $24-32 \times 8-10 \mu\text{m}$ ) y el número de tricosporas por talo (más de 8), asemejan a esta especie a *St. lotica* Williams & Lichtwardt.

### ***Stachylina* aff. *pedifer***

Material recolectado en el Río Grande de Punilla, localizado en la ciudad de La Falda, Córdoba (Sitio LF-1, Tabla I)  $31^{\circ} 05' 49.7''$  S,  $64^{\circ} 30' 04.5''$  W, aislado de la membrana peritrónica que rodea internamente al tubo digestivo medio de *Parametriocnemus* sp. (Diptera: Chironomidae). Cada talo ( $> 100 \times 8-$

11  $\mu\text{m}$ ) contiene 2-8 tricosporas (30-35 x 8-10  $\mu\text{m}$ ), las cuales una vez liberadas presentan un apéndice largo y delgado y carecen de collar. La tricospora adherida a la célula germinal terminal se encuentra en posición subapical. La célula basal presenta una extensión a modo de "pie", la cual penetra la membrana peritrófica. La extensión a modo de pie de la célula basal y la posición subterminal de la tricospora más apical, son dos características que comparte *Stachylina aff. pedifer* con *St. pedifer* Williams & Lichtwardt. A pesar de estas similitudes, existen diferencias importantes tales como la relación entre el largo y diámetro de las tricosporas que permiten considerar a esta especie como una especie diferente de *St. pedifer*. Sin embargo, el material recolectado fue insuficiente para realizar la diagnosis completa de la especie.

#### 6 - 1 - 2. Especies previamente descritas

##### ***Genistellospora homothallica*** Lichtwardt, 1972. Fig. 26

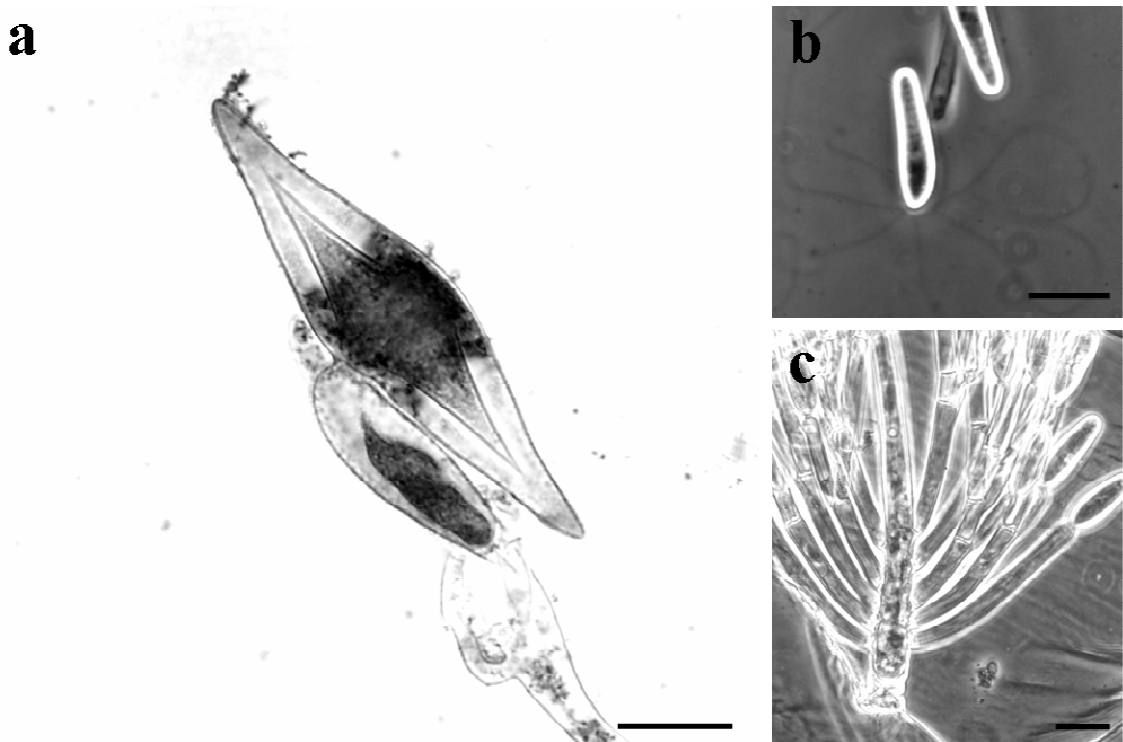
Las tricosporas de esta especie pueden ser confundidas con las tricosporas de *Pennella* sp., sin embargo, *G. homothallica* es fácilmente reconocible por el tipo de "holdfast" secretado y el tipo de cigosporas (tipo III).

Esta especie ha sido encontrada dentro del tubo digestivo posterior de larvas de simúlidos en varios países tales como EEUU, Puerto Rico, Inglaterra, España, Costa Rica, Chile y Argentina. En este último país, la presencia de *G. homothallica* en el tubo digestivo posterior de simúlidos ha sido previamente citada por Lichtwardt et al (1999, 2000) y López Lastra et al (2005).

En general, las medidas de los ejemplares de *G. homothallica* identificadas correspondieron a los datos publicados para esta especie, aunque algunas de las tricosporas encontradas en el sitio SV-6 fueron más largas (43  $\mu\text{m}$  de largo) que las medidas de las tricosporas que fueron previamente publicadas.

En el presente estudio, esta especie fue encontrada infectando larvas de simúlidos de los siguientes sitios: *Simulium* (*Psaroniocompsa*) *bonaerense* Coscarón & Wygodzinsky en MP-1 (13-VII-2005, 23-X-2005, 24-II-2006), MP-2

(13-VII-2005), MP-3 (23-X-2005), MP-4 (13-VII-2005, 23-X-2005, 24-II-2006, 03-V-2006), MP-6 (13-VII-2005, 23-X-2005, 24-II-2006, 03-V-2006), MP-7 (23-X-2005), MP-8 (23-X-2005), MP-9 (23-x-2005); SV-3 (20-II-2006), SV-4 (21-II-2006), SV-6 (23-II-2006), y *S. auripellitum* Enderlein en SV-8 (8-III-2007, 11-VI-2007) (Tabla I).



**Fig. 26.** *Genistellospora homothallica*. a: cigospora; b: tricospora libre en donde se observan varios apéndices muy delgados; c: talo. Escala: 20  $\mu$ m.

***Harpella meridionalis***, Lichtwardt & Arenas, 1996. Fig. 27a-b

Esta especie fue descrita por Lichtwardt y Arenas (1996) en la región sur de Chile, y posteriormente se amplió su distribución para la Argentina en las provincias de Buenos Aires (Lichtwardt et al 1999), Neuquén, Chubut (Lichtwardt et al 2000) y Tierra del Fuego (López Lastra et al 2005).

Las tricosporas de *H. meridionalis* son curvas o enroscadas, característica que permite diferenciar fácilmente a esta especie de *H. tica* Lichtwardt, la cual es la otra especie de *Harpella* presente también en Argentina, pero que posee tricosporas sigmoideas o levemente curvadas.

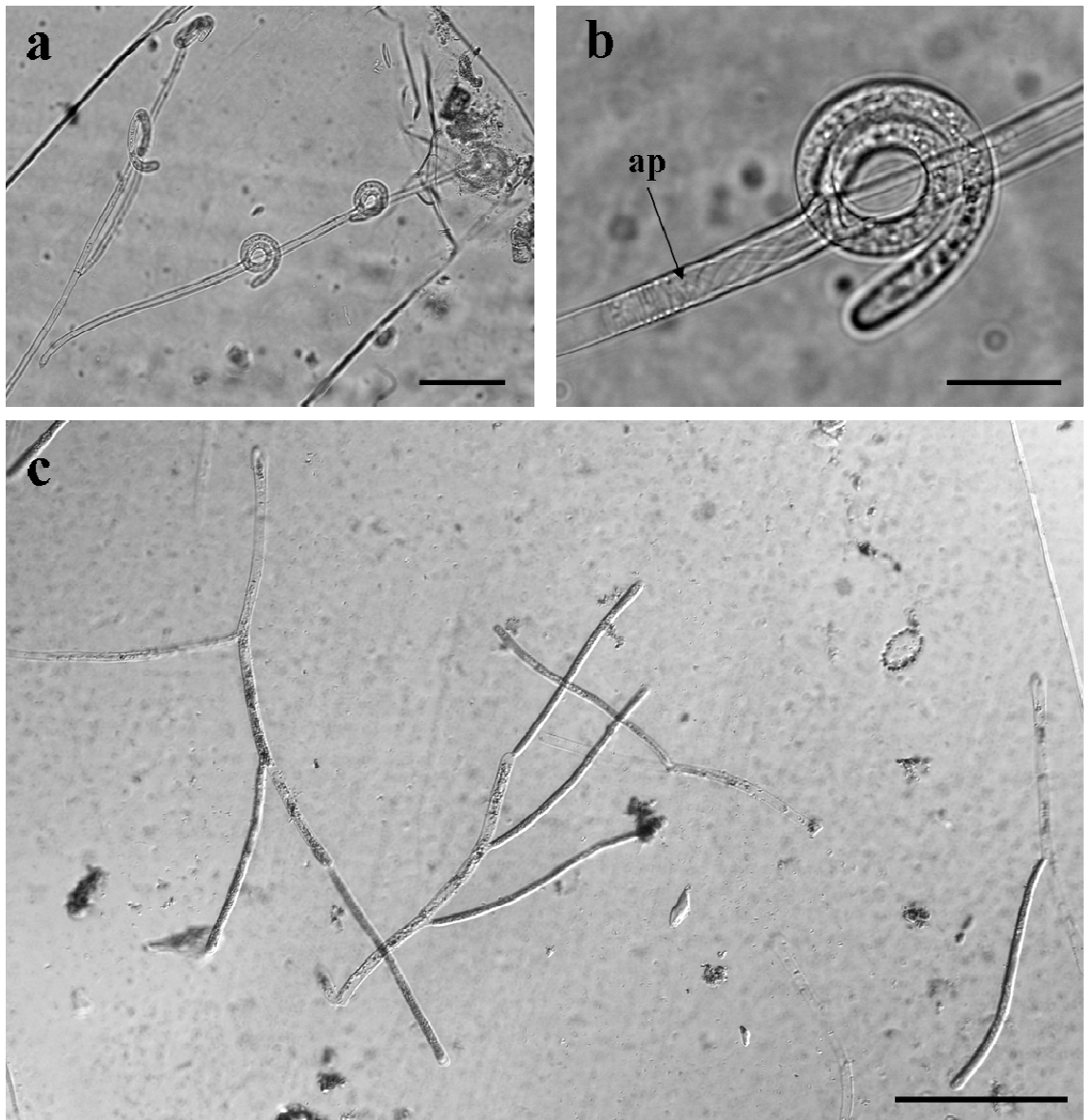
*Harpella meridionalis* es similar a *H. leptosa* Lichtwardt & Moss, pero las tricoporas son más cortas y angostas, y el "holdfast" es más ancho. Hasta el presente nunca se han observado cigosporas de *H. meridionalis*. Algunos talos presentes en las muestras recolectadas en el sitio CHA-1, como así también en los ejemplares disecados pertenecientes al sitio MP-6 (23-X-2005) presentaban conjugaciones entre los talos, sin embargo no se observaron cigosporas.

En el presente estudio esta especie fue encontrada en el tubo digestivo posterior de larvas de simúlidos en los sitios (Tabla I): *Simulium* (Psaroniocampsa) *bonaerense* en CHA-1 (08-XI-2004); *S.* (Trichodagmia) *lahillei* Paterson & Shannon en LR-4 (22-IV-2005), *S.* (Trichodagmia) *huairayacus* Wygodzinsky en LR-5 (23-II-2005), *Simulium* sp. en LR-10 (24-II-2005); *Simulium* (Psaroniocampsa) *bonaerense* Coscarón and Wygodzinsky en MP-1 (13-VII-2005, 23-X-2005, 24-II-2006, 03-V-2006), MP-2 (13-VII-2005), MP-3 (23-X-2005), MP-4 (13-VII-2005, 23-X-2005, 24-II-2006, 03-V-2006), MP-6 (13-VII-2005, 23-X-2005, 24-II-2006, 03-V-2006), MP-7 (23-X-2005), MP-8 (23-X-2005), MP-9 (23-X-2005), SV-3 (20-II-2006), SV-4 (21-II-2006), SV-6 (23-II-2006), *S. auripellitum* en SV-8 (8-III-2007, 11-VI-2007) y *Simulium wolffhuegeli* Enderlein en SL-3 (08-I-2007).

### ***Harpella tica***, Lichtwardt, 1997. Fig. 27c

*Harpella tica* fue descrita por primera vez en Costa Rica (Lichtwardt 1997), y luego se registró su presencia en la República Argentina (Lichtwardt et al 2000, López Lastra et al 2005) y en Puerto Rico (White et al 2000). En estudios previos realizados en Argentina, esta especie fue descubierta en el noroeste argentino (provincias de Jujuy, Salta y Tucumán), como así también en el noreste (Misiones). Durante el presente trabajo, se halló *H. tica* asociada a la membrana peritrófica que rodea el tubo digestivo medio de larvas de *Gigantodax* sp. (Diptera: Simuliidae) recolectadas en el sitio LAN-2 (Tabla I). Esta especie es fácilmente distinguible del resto de las especies de *Harpella*, debido a que presenta tricoporas sigmoideas o raramente curvas a enroscadas (98-)130(-140) x 3-4 µm, mientras que en el resto de las especies de *Harpella* las tricoporas son curvas o enroscadas pero nunca sigmoideas.





**Fig. 27.** *Harpella meridionalis* (a-b) y *H. tica* (c). a: Talos de *H. meridionalis*. b: tricospora de *H. meridionalis* adherida al talo (en el interior de este se observan los apéndices de la tricospora). c: talos de *H. tica* conteniendo tricosporas sigmoideas. tr: tricosporas. Escala: a = 50  $\mu\text{m}$ , b = 20  $\mu\text{m}$ , c = 100  $\mu\text{m}$ .

***Pennella montana*** Lichtwardt, 1997. Fig. 28a-b

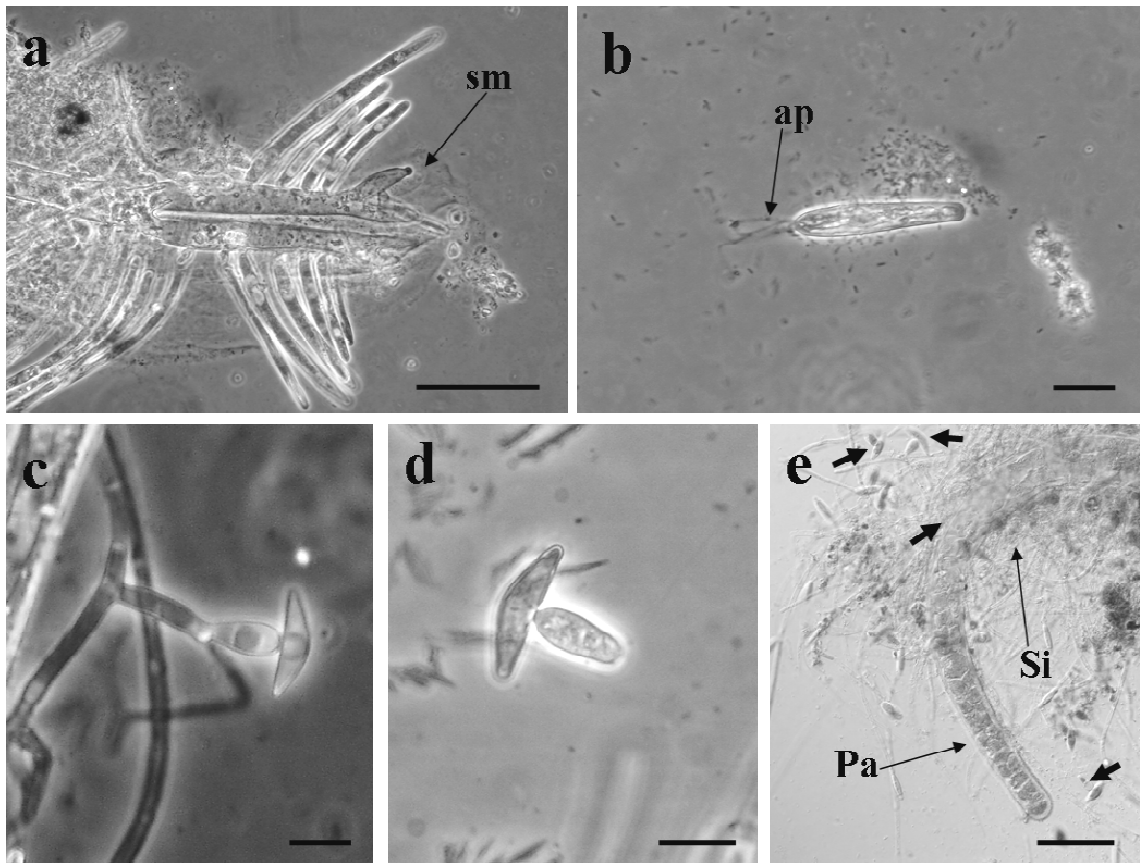
Al igual que la descripción original de la especie, los ejemplares que se han encontrado en el presente trabajo presentan la base del talo ramificada dicotómicamente (más de una vez) y tricosporas ovoideas-alargadas [(39-)60(-72) x (8-10  $\mu\text{m}$ )] con varios apéndices muy delgados. *Pennella montana* fue encontrada en el tubo digestivo posterior de larvas de *Simulium* (Trichodagmia) *huairayacus* del sitio LR-5; en larvas de *Simulium* sp. del sitio LR-10, y en larvas de *S. wolffhuegeli* del sitio SL-3 (Tabla I).

Esta especie fue previamente citada en Argentina (Lichtwardt et al 2000) en la región noroeste (provincias de Tucumán, Salta y Jujuy).

***Simuliomyces microsporus*** Lichtwardt, 1972. Fig. 28c-e

Esta especie comúnmente es confundida con especies de *Smittium*, principalmente cuando no se encuentran presentes las cigosporas (tipo I). Sin embargo, *Si. microsporus* se distingue fácilmente de las especies de *Smittium* debido a que sus tricosporas contienen entre 2 y 4 apéndices, y cuando son coloreadas con azul de algodón en la región apical aparenta tener un engrosamiento. A su vez, esta especie se puede distinguir debido a que es común que se encuentren adheridos a talos de *Paramoebidium* sp. u otros Trichomycetes que se encuentran dentro del tubo digestivo de las larvas.

La especie *Si. microsporus* ha sido descrita en el tubo digestivo de simúlidos para varios países alrededor del mundo, incluida la República Argentina (Lichtwardt et al 1999, 2000). La medida de las tricosporas [(20-30) x (4-6  $\mu\text{m}$ )] y de las cigosporas [(34-45) x (7-9  $\mu\text{m}$ )] de los ejemplares encontrados en el presente trabajo (en larvas de *Simulium* sp., *Simulium* sp., y *S. auripellitum* recolectados en los sitios LR-2, LR-10 y SV-8 respectivamente) coinciden con las medidas publicadas para esta especie.



**Fig. 28.** *Pennella montana* (a-b) y *Si. microsporus* (c-e). a: ramificación dicotómica de la base del talo, asociada a una sustancia mucilaginosa; b: tricospora de *Pe. montana*; c: cigospora (aún no liberada) de *Si. microsporus*; d: cigospora libre; e: varios talos de *Si. microsporus* adheridos a un talo de *Paramoebidium* sp. (las flechas cortas señalan cigosporas de *Si. microsporus*). ap = apéndices, ci = cigospora, Pa = talo de *Paramoebidium* sp, sm = sustancia mucilaginosa, si = talos de *Si. microsporus*. Escala: a = 50  $\mu$ m, b-d = 20  $\mu$ m, e = 100  $\mu$ m.

***Smittium culicis*** Manier, 1969 (1970). Fig. 29a.

= *Orphella culicis* Tuzet & Manier 1947 *nom. nud.*

= *Rubetella culicis* Tuzet, Rioux & Manier 1961 *nom. nud.*

Esta especie presenta una distribución cosmopolita, y se encuentra principalmente en larvas de culícidos y, más raramente en quironómidos, simúlidos y taumaleidos (Insecta: Diptera). La forma y el tamaño de las tricosporas son los principales caracteres para distinguir esta especie del resto de las especies de *Smittium*. Durante el presente trabajo, se ha encontrado *Sm. culicis* en el tubo digestivo de *A. aegypti* L. en el sitio CEM (17-III-2005, 23-III-2005); *Cx. castroii* Casal & García en los sitios ChL-2 (15-XI-2005), LP-1 (14-XII-2004), PL-I (24-XI-2003, 23-XII-2003, 09-XI-2004) y PI-2 (25-VII-2006); *Cx.*

*pipiens* Wiedemann en los sitios LP-6 (25-I-2005), CEM (17-III-2005, 31-III-2005, 27-IV-2005); ChL-1 (28-XII-2006); *Ochlerotatus albifasciatus* (Macquart) en los sitios ARR-1 (26-I-2006); ARR-2 (06-VII-2005); PL-4 (28-VI-2006) y PL-5 (07-VI-2004). Además, se encontró este harpélido en larvas del quironómido *Chironomus* sp. en los sitios BG-3 (27-X-2004), ENS-1 (16-V-2005) y LF-1 (21-IX-2006).

***Smittium culisetae*** Lichtwardt, 1964. Fig. 29b.

= *Smittium inopinatum* Manier 1969 (1970)

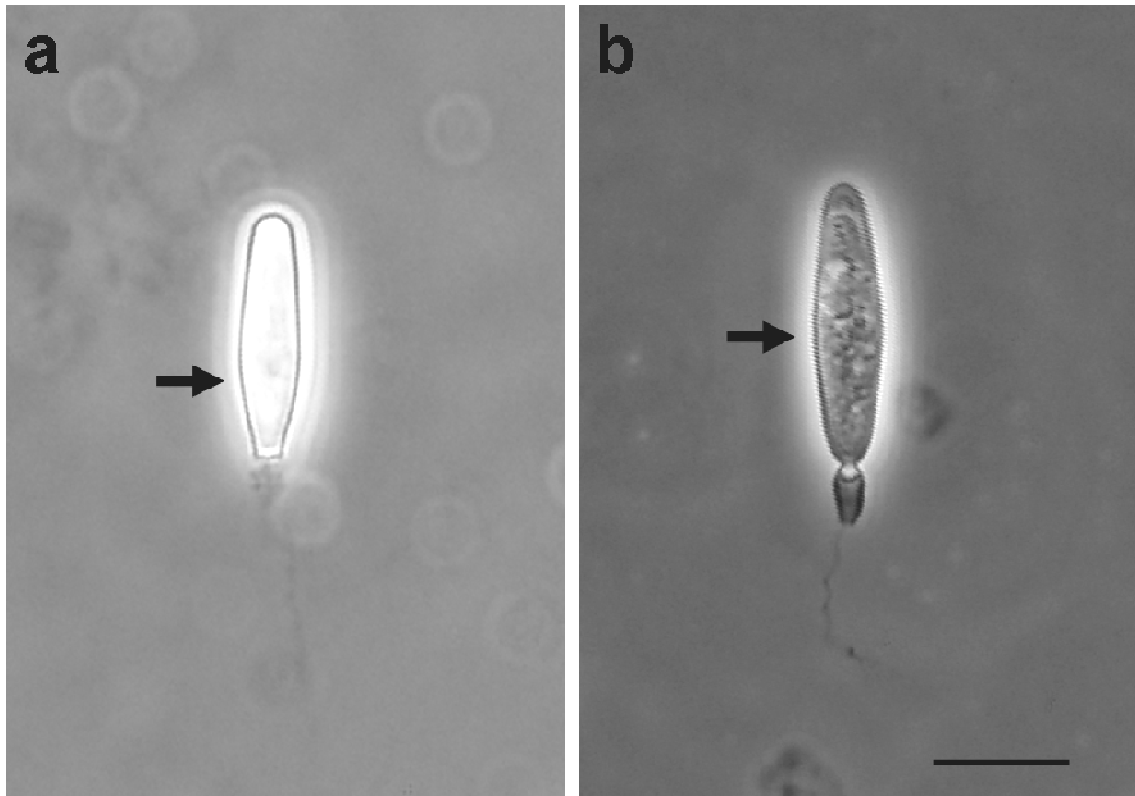
= *Rubetella inopinata* Manier, Rioux & Whishler 1961 *nom.nud.*

Esta es la otra especie de Harpellales que infecta principalmente larvas de mosquitos y presenta una distribución cosmopolita, pudiendo también infectar en menor grado a larvas de Chironomidae, Simuliidae, Ceratopogonidae y Tipulidae. Debido a que el aislamiento y cultivo de *Sm. culisetae* es relativamente fácil, la mayor parte de los estudios relacionados con la biología, fisiología y ultraestructura de los Trichomycetes han sido realizados sobre esta especie. El hecho de que las tricosporas de *Sm. culisetae* presentan el ancho máximo por debajo de la región media, permite diferenciar esta especie de *Sm. culicis*, en la cual el ancho máximo de las tricosporas se encuentra en la región media.

El material obtenido en el sitio PL-2 a partir del tubo digestivo de larvas del mosquito *O. crinifer*, presentó diferencias con respecto a los datos publicados para esta especie de tricomycete. En este caso, los talos presentaban un elevado número de tricosporas por cada rama fértil (más de 20), mientras que los datos publicados en esta especie varían entre 4 y 10 tricosporas por cada rama fértil.

*Smittium culisetae* fue identificada a partir de larvas de *Ae. aegypti* L. en los sitios CEM (17-III-2005); *Cx. castroii* Casal & García en los sitios BG-4 (03-XI-2004), BG-5 (03-XI-2004), PL-1 (06-XII-2004); *Cx. apicinus* (Philippi) en los sitios SW-1 (08-V-2006, 15-VIII-2006, 22-VIII-2006, 23-X-2006, 05-XII-2006), SW-2 (29-XI-2004, 20-VII-2005); *Cx. pipiens* Wiedemann en los sitios ChL-1 (28-XII-2006), CEM (27-IV-2005), LP-7 (04-II-2005); *Ochlerotatus albifasciatus* (Macquart) en los sitios ChL-1 (23-III-2006), ChL-3 (28-XII-2006); *O. crinifer*

(Theobald) en el sitio PL-2 (04-I-2007), *Psorophora ferox* (Humboldt) en los sitios ChL-1 (23-III-2006, 06-III-2007), PL-2 (03-X-2005, 10-II-2006, 04-I-2007), LP-8 (14-XII-2004); *P. cyanescens* (Coquillett) en el sitios PL-2 (04-I-2007).



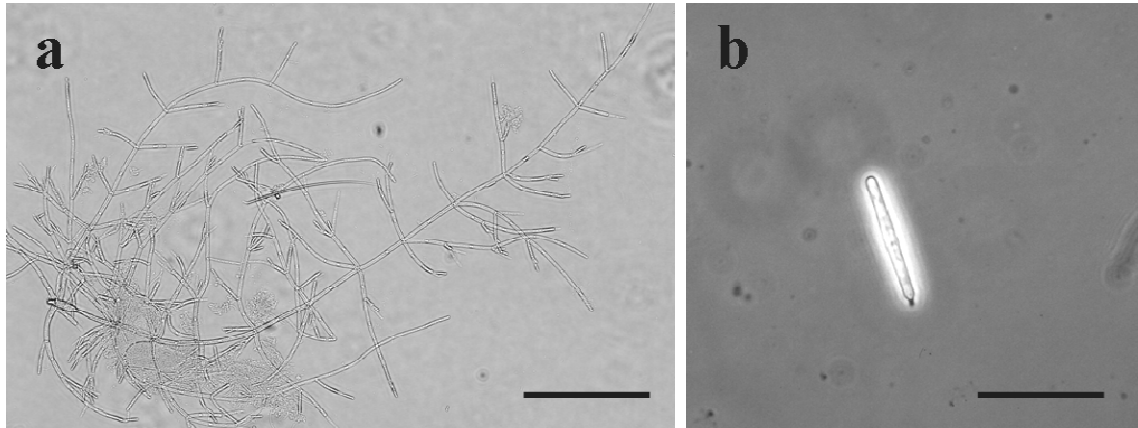
**Fig. 29.** Tricosporas de *Sm. culisetae* y *Sm. culicis*. a: *Sm. culisetae*. b: *Sm. culicis*. Las flechas indican el ancho máximo de las esporas. Escala = 10  $\mu$ m.

***Smittium phytotelmatum*** Lichtwardt, 1994. Fig. 30.

Esta especie de *Smittium* fue descrita previamente por Lichtwardt (1994) en el tubo digestivo de diferentes especies de quironómidos de ambiente fitotelmata y de ambientes semipermanentes.

En el estudio bianual desarrollado en el sitio PL-1 (Tabla I), en el cual se realizó un seguimiento de los Harpellales presentes en el tubo digestivo de larvas de quironómidos que viven en el agua almacenada entre las brácteas de las plantas de *Eryngium cabreræ* L. (Umbellifera), *Sm. phytotelmatum* estuvo presente a lo largo de todo el año sin una marcada estacionalidad. Esta

especie fue encontrada también en larvas de *Polypedilum* sp. de los sitios BG-5 (3-XI-2004) PL-2 (10-II-2006), y ChL-2 (20-VII-2005, 28-XII-2006).



**Fig. 30.** *Smittium phytotelmatum*. a: talo; b: tricospora. Escala: a = 100  $\mu$ m, b = 20  $\mu$ m.

#### ***Smittium simulii*** Lichtwardt, 1964

*Smittium simulii* tiene una distribución muy amplia, habiéndose citado para EEUU, Japón, Australia, Nueva Zelanda, Chile, Argentina, y varios países de Europa (White & Lichtwardt 2004). Esta especie se asocia principalmente a larvas de simúlidos y quironómidos, y más raramente a mosquitos y tipúlidos. Los talos de esta especie se adhieren al hospedador mediante una estructura de fijación fácilmente distinguible porque presenta forma de “herradura”. En el presente trabajo se han encontrado en larvas de *Simulium* sp. (Diptera: Simuliidae) recolectadas en el sitio LR-5; *S. (Ectemnaspis) romanai* en el sitio LR-9, *Simulium* sp. en el sitio LR-10, *S. delponteanum* en el sitio PI-8 y *S. auripellitum* en el sitio SV-8. Las medidas publicadas previamente para las tricosporas de *Sm. simulii* son de (16-)23(-30) x (3-)5(-7)  $\mu$ m, las cuales coinciden con los ejemplares recolectados en la Argentina.

#### ***Stachylina grandispora*** Lichtwardt, 1972. Fig. 31a-b.

Esta especie representa una de las especies de harpélidos más comunes infectando larvas de quironómidos, habiéndose citado para una gran cantidad de países (White et al 2006b). Si bien los talos y las tricosporas de *St. grandispora* son variables, con tricosporas midiendo (40-72) x (6-10)  $\mu$ m, el

largo de las tricosporas es un caracter muy utilizado para distinguir a esta especie.

En la Argentina, fueron recolectados ejemplares infectados con esta especie de Trichomycetes en los sitios R9-5 (*Chironomus* sp.), BG-2 (*Chironomus* sp.), ARR-1 (*Chironomus* sp.) y PI-6 (Orthoclaadiinae).

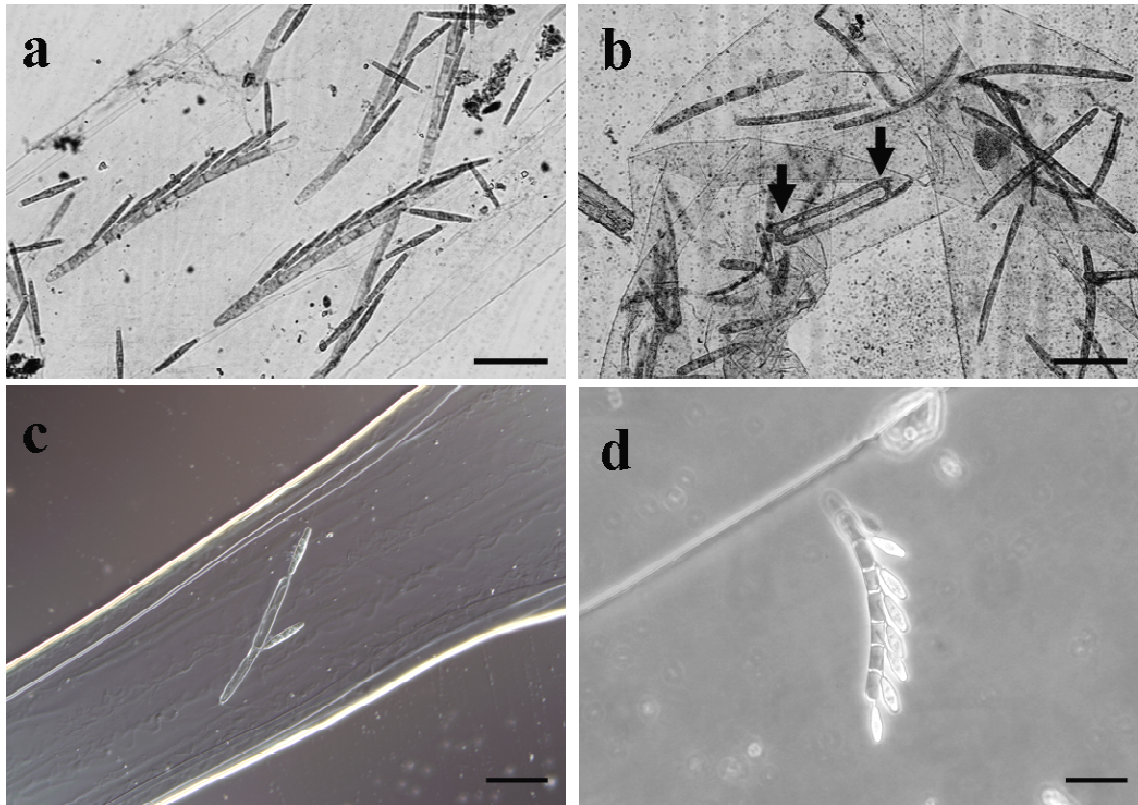
***Stachylina lentica*** White & Lichtwardt, 2004. Fig. 31c.

Previamente a este estudio, esta especie fue citada solamente en la matriz peritrófica de larvas de quironómidos recolectadas en huecos de rocas sobre la costa de un lago de Noruega (White & Lichtwardt 2004). Esta especie se caracteriza por presentar talos que miden entre 50 y 150  $\mu\text{m}$  de largo x 4-9  $\mu\text{m}$  de ancho. Estos talos se encuentran adheridos al hospedador por medio de un "holdfast" romo, produciendo 1-2(4) tricosporas elipsoidales con una medida de (22-)35(-50) x (4-)5-6(-7)  $\mu\text{m}$ . El collar de estas tricosporas es muy corto (1  $\mu\text{m}$ ) mientras que el apéndice es delgado y muy largo.

En el estudio bianual realizado en fitotelmata (Sitio PL-1) realizado quincenalmente durante 2 años, se encontró *St. lentica* asociada a los quironómidos *Polypedilum* sp. y *Metriocnemus eryngiotelmatus* van der Wulp, no habiéndose observado una marcada estacionalidad. No se observaron diferencias entre las medidas de los talos y tricosporas del material recolectado en el presente estudio con respecto a los datos publicados para esta especie.

***Stachylina platensis*** López Lastra, Lichtwardt & Ferrington, 1999. Fig. 31d.

Esta especie fue encontrada en el tubo digestivo medio de larvas de quironómidos (aún no identificadas) recolectadas en el sitio SW-1, el cual se encuentra ubicado en la misma ciudad en la que fue hallado el material tipo. Los talos de *St. platensis* tienen un diámetro de 6-10  $\mu\text{m}$ , y contienen entre 4 y 32 células germinativas de las cuales se forman las tricosporas elipsoidales que miden 25-36 x 5-8  $\mu\text{m}$ , conteniendo un collar muy pequeño y un apéndice que en algunas ocasiones aparenta estar dividido en 2.



**Fig. 31.** *Stachylina grandispora*, *St. lentica* y *St. platensis*. a: Talos de *St. grandispora*. b: conjugaciones entre talos de *St. grandispora* (indicado con flechas). c: *St. lentica*. d: *St. platensis*. Escala a-b = 100  $\mu$ m, c-d = 50  $\mu$ m.

### Orden Amoebidiales. Fig. 32

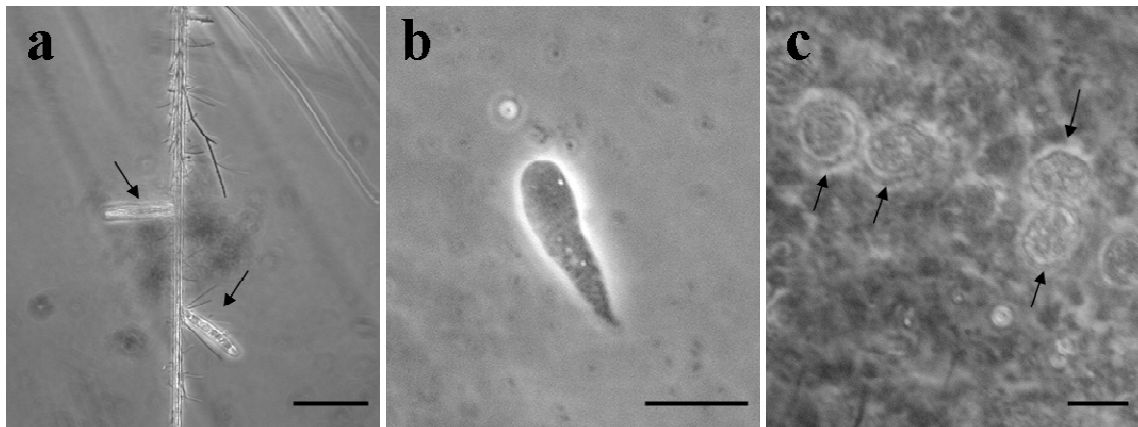
Como se expresó anteriormente, este orden fue considerado durante muchos años (Lichtwardt 1986, Cafaro 2005, White et al 2006a) dentro de la Clase Trichomycetes, por lo que en el presente trabajo se citan las especies que fueron recolectadas pertenecientes a este orden.

*Amoebidium* y *Paramoebidium* son los únicos dos géneros que conforman el orden Amoebidiales. Debido a que las especies del género *Amoebidium* crecen sobre la superficie externa del hospedador, estas fueron consideradas como los únicos Trichomycetes ectocomensales. *Amoebidium parasiticum* fue encontrado sobre la cutícula externa de larvas del mosquito *O. crinifer* recolectadas en el sitio PL-2. Unos minutos después de haber colocado un cubreobjetos sobre las larvas que contenían talos de *A. parasiticum*, se



observó una gran cantidad de amebas que derivaron de los talos, y que se mantuvieron móviles durante unos minutos antes de enquistarse.

Con respecto a *Paramoebidium*, se hallaron talos creciendo en el tubo digestivo de larvas de simúlidos recolectadas en los sitios LR-2 (*Simulium* sp.), LR-9 (*Simulium* (Ectemnaspis) *romanai*), SV-5 y SV-6 (*Simulium* (Psaroniocampsa) *bonaerense*) y SV-8 (*S. auripellitum*). En ninguno de los casos, se realizó la clasificación a nivel específico.



**Fig. 32.** *Amoebidium parasiticum*. a: talos adheridos a seta de *O. crinifer*. b: célula amoebial. c: células amoebiales enquistadas (señaladas con flechas). Escala a = 100  $\mu$ m, b-c = 20  $\mu$ m.

6 - 1 - 3. Clave dicotómica de Harpellales descritas en la Argentina hasta el presente

1	En larvas de Coleoptera acuáticos.....	<i>Coleopteromyces amnius</i>
1'	En estadios inmaduros de otros órdenes de insectos.....	<b>2</b>
2	En Ephemeroptera, tricosporas obpiriformes, sin collar y con 2 apéndices.....	<i>Legeriomyces sp. 1</i>
2'	En estadios inmaduros de Diptera (Nematocera).....	<b>3</b>
3	Talos ramificados, adheridos al tubo digestivo posterior.....	<b>4</b>
3'	Talos no ramificados, adheridos a la membrana peritrófica que rodea internamente al tubo digestivo medio.....	<b>25</b>
4	En larvas de Culicidae.....	<b>5</b>
4'	En otras Familias de Diptera (Nematocera).....	<b>7</b>
5	Patogénico para el hospedador, tricosporas elipsoidales.....	<i>Smittium morbosum</i>
5'	No patogénicos, tricosporas ovales u ovoideas.....	<b>6</b>
6	Tricosporas ovales con collar campanulado (> 3 µm de largo).....	<i>Sm. culicis</i>
6'	Tricosporas elipsoidales (ancho máximo cerca de la base), con collar corto (< 3 µm long).....	<i>Sm. culisetae</i>
7	En larvas de simúlidos.....	<b>8</b>
7'	En larvas de quironómidos.....	<b>14</b>
8	Tricosporas con un apéndice.....	<b>9</b>
8'	Tricosporas con más de un apéndice.....	<b>11</b>
9	Tricosporas elipsoidales, en larvas de simúlidos y quironómidos.....	<i>Smittium sp. 1</i>
9'	Tricosporas cilíndricas.....	<b>10</b>
10	"Holdfast" en forma de herradura, en simúlidos y larvas de quironómidos, más raramente en larvas de culícidos y tipúlidos.....	<i>Sm. simulii</i>
10'	"Holdfast" con forma diferente al del punto 10.....	<i>Smittium imitatum</i>

11	Talos generalmente muy ramificados, comunmente adheridos a talos de <i>Paramoebidium</i> sp. u otros Trichomycetes presentes en el tubo digestivo posterior, tricosporas elipsoidales con entre 2 y 4 apéndices, cigosporas adheridas perpendicular y medialmente al cigosporóforo.....	<i>Simuliomyces microsporus</i>
11'	Talos nunca adheridos a talos de <i>Paramoebidium</i> sp. u otros Trichomycetes, "holdfast" muy evidente; tricosporas con varios apéndices delgados, cigosporas adheridas paralelamente al cigosporóforo.....	12
12	Talos adheridos por medio de un "holdfast" secretado y bien desarrollado, cigosporas producidas sin conjugación entre talos, tricosporas ovoideas (24-)30(-41) x (8-)10(-13) $\mu\text{m}$ , con (5-)6(-7) apéndices muy finos.....	<i>Genistellopora homothallica</i>
12'	"Holdfast" mucilaginoso producido a partir de una célula basal simple o bifurcado, cigosporas producidas a partir de la conjugación entre talos, tricosporas ovoideas-alargadas.....	13
13	Célula basal simple o ahusada (ocasionalmente digitada), cigosporas (84-)90(-96) x (19-)22(-24) $\mu\text{m}$ ; tricosporas (30-)33(-41) x (6.5-)8 (-10.5) $\mu\text{m}$ .....	<i>Pennella simulii</i>
13'	Base de talos inmaduros bifurcados dicotómicamente una o más veces, cigosporas 91-100 x 18-20 $\mu\text{m}$ ; tricosporas (39-)60(-72) x 8-10 $\mu\text{m}$ .....	<i>Pennella montana</i>
14	Tricosporas ovales a elipsoidales, cigosporas bicónicas con un engrosamiento en la región central.....	15
14'	Tricosporas elipsoidales (o sub-elipsoidales) a casi cilíndricas, collar corto o largo y un único apéndice; cigosporas bicónicas a fusiformes sin engrosamiento en la región central.....	16
15	Tricosporas elipsoidales (24-)28(-31) x 7 $\mu\text{m}$ con un apéndice largo y delgado; cigosporas (47-)54(-62) x (21-)24(-28) $\mu\text{m}$ .....	<i>Austrosmittium</i> sp. 1
15'	Tricosporas ovales a elipsoidales (10-)14(-17) x 5 $\mu\text{m}$ sin collar ni apéndices; cigosporas (23-)26(-28) x 10-12 $\mu\text{m}$ .....	<i>Austrosmittium</i> sp. 2
16	Tricosporas dimórficas (dos tipos diferentes de tricosporas que se diferencian en su forma y/o tamaño).....	<i>Smittium esteparum</i>
16'	Tricosporas no dimórficas.....	17

17	Tricosporas elipsoidales y alargadas.....	18
17'	Tricosporas casi cilíndricas o subcilíndricas.....	21
18	Todas las células pueden producir tricosporas.....	<i>Smittium cellaspora</i>
18'	Determinadas células producen las tricosporas.....	19
19	Tricosporas con collar < 5 µm de largo.....	<i>Smittium sp. 1</i>
19'	Tricosporas con collar > 5 µm de largo.....	20
20	Tricosporas con collar entre 1-3 µm de largo, talos ramificados densamente ramificación en ángulo agudo.....	<i>Smittium tronadorium</i>
20'	Tricosporas con collar entre 3-5 µm de largo, talos compactos, ramificación generalmente verticilada.....	<i>Smittium urbanum</i>
21	Tricosporas subcilíndricas.....	22
21'	Tricosporas cilíndricas.....	23
22	Tricosporas (14-)17-25(-30) x 2-3 µm, collar entre 2 y 3 µm de largo. Talos ramificados (no densamente), ramificaciones principales conteniendo una serie de ramificaciones verticiladas cortas en las cuales hay varias células germinativas, generalmente presentes en fitotelmata.....	<i>Smittium phytotelmatum</i>
22'	Tricosporas (30-)33(-35) x 5-6 µm, collar 1-2 µm, talos ramificados principalmente en la base, adheridos por medio de un "holdfast" en forma de disco.....	<i>Smittium sp. 2</i>
23	"Holdfast" con forma de herradura, en larvas de simúlidos y quironómidos, raramente en larvas de culícidos o tipúlidos.....	<i>Smittium simulii</i>
23'	"Holdfast" con otra forma.....	24
24	Tricosporas entre 26-33 µm de largo.....	<i>Smittium cylindrosporum</i>
24'	Tricosporas generalmente entre 40-47 µm de largo, apéndice prominente.....	<i>Smittium megazigosporum</i>
25	Adheridos al tubo digestivo de larvas de ceratopogónidos.....	<i>Carouxella coemeteriensis</i>
25'	Adheridos a la membrana peritrófica de larvas de simúlidos o quironómidos.....	26
26	En larvas de simúlidos.....	27
26'	En larvas de quironómidos, tricosporas elipsoidales u ovaes.....	28

27	Tricosporas sigmoideas, raramente curvas o casi enrolladas.....	<i>Harpella tica</i>
27'	Tricosporas curvas a enroscadas, nunca sigmoideas.....	<i>Harpella meridionalis</i>
28	Parte basal del talo permanece estéril.....	<i>Stachylinoides arctata</i>
28'	Todo el talo se convierte en reproductivo.....	<b>29</b>
29	Los talos penetran la membrana peritrófica, entre 1 y 4 tricosporas ovales y carentes de collar por cada talo.....	<i>Stachylina minima</i>
29'	Los talos no perforando la membrana peritrófica.....	<b>30</b>
30	2 a 16 (o más) tricosporas por talo, elipsoidales y alargadas, 40-72 x 6- 10 (o más) $\mu\text{m}$ , luego de que son liberadas contienen un collar 1-3 $\mu\text{m}$ de largo, y un único, largo y prominente apéndice.....	<i>Stachylina grandispora</i>
30'	Otras características.....	<b>31</b>
31	Produciendo 1- 2 (4) tricosporas por talo.....	<i>Stachylina lentica</i>
31'	Produciendo normalmente 4 o más tricosporas por talo.....	<b>32</b>
32	Tricosporas elipsoidales con un engrosamiento en el centro, 25-36 x 5- 7.8 $\mu\text{m}$ , collar muy corto y un único apéndice que en ocasiones parece estar dividido en 2.....	<i>Stachylina platensis</i>
32'	Tricosporas elipsoidales (30-37 x 8-9 $\mu\text{m}$ ).....	<i>Stachylina jujuyensis</i>

## 6 - 1 - 4. Cultivos obtenidos

A partir del material fúngico aislado en medio BHIGTv, se obtuvieron los siguientes cultivos axénicos:

# Acceso	Especie fúngica	Hospedador	Medio de cultivo	Fecha	Sitio de recolección
CEP-290	<i>Sm. culicis</i>	<i>Cx. pipens</i> (Diptera: Culicidae)	BHIGTv	25-I-2005	LP-6
CEP-291	<i>Sm. culicis</i>	<i>O. albifasciatus</i> (Diptera: Culicidae)	BHIA 1/10	06-VII-2005	ARR-2
CEP-292	<i>Sm. culicis</i>	<i>Cx. pipiens</i> (Diptera: Culicidae)	BHIGTv	23-III-2005	CEM
CEP-293	<i>Sm. culicis</i>	Chironomidae (Diptera: Chironomidae)	BHIGTv	03-XI-2004	BG-4-1
CEP-294	<i>Sm. culisetae</i>	<i>O. crinifer</i> (Diptera: Culicidae)	BHIA 1/10	04-I-2007	PL-2
CEP-295	<i>Sm. culisetae</i>	<i>Cx. apicinus</i> (Diptera: Culicidae)	BHIGTv	08-V-2006	SW-1
CEP-296	<i>Sm. culisetae</i>	<i>O. albifasciatus</i> (Diptera: Culicidae)	BHIGTv	06-IX-2006	PL-3
CEP-297 (*)	<i>Sm. culisetae</i>	<i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae)	BHIGTv	17-III-2005	Cría de mosquitos (CEPAVE)
CEP-298	<i>Sm. phytotelmatum</i>	<i>Polypedilum</i> sp. (Diptera: Chironomidae)	BHIGTv	03-XI-2004	BG-5-1
CEP-299	<i>Sm. phytotelmatum</i>	<i>Polypedilum</i> sp. (Diptera: Chironomidae)	BHIGTv	28-XII-2006	ChL-2
CEP-300	<i>Sm. phytotelmatum</i>	<i>Polypedilum</i> sp. (Diptera: Chironomidae)	BHIGTv	08-XI-2004	PL-1

(\*) El aislamiento CEP-297 fue utilizado en los ensayos de laboratorio realizados en el presente estudio.

## 6 - 1 - 5. Material fúngico almacenado en buffer CTAB 2X.

Harpellales	Hospedador	Fecha	Sitio
<i>Sm. phytotelmatum</i>	<i>Polypedilum</i> sp. (Diptera: Chironomidae)	08-III-2004	PL-1
<i>Austrosmittium</i> sp. 1	<i>Parochlus</i> sp. (Diptera: Chironomidae)	17-I-2005	LAN-4
<i>Paramoebidium</i> sp.	<i>Simulium</i> (Trichodagmia) <i>lahillei</i> (Diptera: Simuliidae)	20-II-2005	LR-2
<i>H. meridionalis</i>	<i>Simulium</i> (Trichodagmia) <i>lahillei</i> (Diptera: Simuliidae)	20-II-2005	LR-4
<i>H. meridionalis</i>	<i>Simulium</i> (Trichodagmia) <i>lahillei</i> (Diptera: Simuliidae)	20-II-2005	LR-4
<i>Sm. simulii</i>	<i>Simulium</i> (Trichodagmia) <i>huairayacus</i> (Diptera: Simuliidae)	23-II-2005	LR-5
<i>Sm. simulii</i>	<i>Simulium</i> (Trichodagmia) <i>huairayacus</i> (Diptera: Simuliidae)	23-II-2005	LR-5
<i>Sm. simulii</i>	<i>Simulium</i> sp. (Diptera: Simuliidae)	24-II-2005	LR-10
<i>Sm. simulii</i>	<i>Simulium</i> sp. (Diptera: Simuliidae)	24-II-2005	LR-10
<i>Sm. simulii</i>	<i>Simulium</i> sp. (Diptera: Simuliidae)	24-II-2005	LR-10
<i>St. grandispora</i>	<i>Chironomus</i> sp. (Diptera: Chironomidae)	15-V-2005	ARR-1
<i>Austrosmittium</i> sp. 2	<i>Corynoneura</i> sp. (Diptera: Chironomidae)	28-VII-2005	ChL-1
<i>Austrosmittium</i> sp. 2	<i>Corynoneura</i> sp. (Diptera: Chironomidae)	28-VII-2005	ChL-1
<i>Austrosmittium</i> sp. 2	<i>Corynoneura</i> sp. (Diptera: Chironomidae)	28-VII-2005	ChL-1
<i>St. lentica</i>	<i>Polypedilum</i> sp. (Diptera: Chironomidae)	25-VIII-2003	PL-1
<i>Legeriomyces</i> sp.	Ephemeroptera (Insecta: Ephemeroptera)	25-VII-2006	PI-8
<i>Legeriomyces</i> sp.	Ephemeroptera (Insecta: Ephemeroptera)	25-VII-2006	PI-8

<i>Smittium</i> sp. 1	<i>Simulium delponteianum</i> (Insecta: Diptera)	25-VII-2006	PI-8
<i>Smittium</i> sp. 1	<i>Simulium delponteianum</i> (Insecta: Diptera)	25-VII-2006	PI-8
<i>Smittium</i> sp. 2	<i>Polypedilum</i> sp. (Diptera: Chironomidae)	21-IX-2006	LF-1
<i>Smittium</i> sp. 2	<i>Polypedilum</i> sp. (Diptera: Chironomidae)	21-IX-2006	LF-1
<i>Sm. culisetae</i>	<i>Ochlerotatus crinifer</i> (Diptera: Culicidae)	04-I-2007	PL-2
<i>Pe. montana</i>	<i>Simulium wolffhuegeli</i> (Diptera: Simuliidae)	20-I-2007	SL-3
<i>Harpella</i> sp.	<i>Simulium wolffhuegeli</i> (Diptera: Simuliidae)	20-I-2007	SL-3
<i>Stachylina aff. lotica</i>	<i>Chironomus</i> sp. (Diptera: Chironomidae)	08-III-2007	ARR-1

## 6 - 2. Evaluación de la resistencia de las tric esporas de *Sm. culisetae* frente a condiciones adversas

### 6 - 2 - 1. Resistencia frente a la temperatura

Las tric esporas resistieron a un amplio rango de temperaturas entre -4 y 37°C (Tabla II). La temperatura a la cual las tric esporas expuestas han persistido por más tiempo manteniendo la capacidad de infectar larvas de *Ae. aegypti* fue a 4°C, temperatura a la cual resistieron por más de 6 meses. En el resto de las temperaturas (-4, TA, 28 y 37°C) las tric esporas resistieron más de 30 días, pero en la evaluación a los 6 meses resultaron inviables. Por otro lado, las tric esporas no resistieron en aquellas experiencias en donde los recipientes sufrieron desecación.

No se han observado prácticamente diferencias en cuanto a la resistencia de las tric esporas almacenadas a -4, TA, 28 y 37°C. La única diferencia entre estas temperaturas ocurrió en la variable  $T_2$ , debido a que a -4°C perduraron viables por más de 30 días (aunque menos de 6 meses),



mientras que a TA, 28 y 37°C resistieron menos de 30 días debido a que los recipientes en estos casos sufrieron la desecación.


Para una misma temperatura de exposición, no se observaron diferencias en cuanto a la resistencia de las tricosporas almacenadas en las condiciones AG, L y T<sub>1</sub>.

En todas las evaluaciones realizadas, las larvas utilizadas como control no presentaron infecciones fúngicas.

**TABLA II:** Resistencia de tricosporas de *Sm. culisetae* frente a distintas temperaturas y condiciones de almacenamiento.

	-21°C				-4°C				4°C				TA				28°C				37°C			
	24H	7D	1M	6M	24H	7D	1M	6M	24H	7D	1M	6M	24H	7D	1M	6M	24H	7D	1M	6M	24H	7D	1M	6M
AG					+	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	
L					+	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	
T1					+	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	
T2					+	+	+		+	+	+		+	+			+	+			+	+		
LS																								

+ Resultados positivos (tricosporas resultaron viables)

 Resultados negativos (tricosporas no resistieron)

### 6 - 2 - 2. Resistencia frente a la desecación

Las tricosporas expuestas a la desecación bajo las condiciones previamente descritas resultaron viables por más de 2 horas, mientras que las que fueron expuestas durante 6 o más horas fueron inviables. Los papeles conteniendo tricosporas expuestos al aire durante 2 horas contenían un promedio de 61% de HR, mientras que los papeles que fueron expuestos 6 horas contenían en promedio 30% HR.

### 6 - 2 - 3. Resistencia frente a diferentes concentraciones salinas

Las tricosporas resistieron a un amplio rango de concentraciones de NaCl a las que fueron expuestas, desde concentraciones de 1 hasta 35 ppm. Todas las suspensiones de tricosporas evaluadas, dieron resultados positivos por más de 30 días (Tabla III).

Con respecto a la evaluación de la resistencia de las tricosporas frente a diferentes concentraciones de agua de mar, éstas resultaron viables por más

de 30 días en los casos en que fueron almacenadas a concentraciones de hasta 50% de agua marina. Las tricosporas expuestas a concentraciones de agua de mar de 75 y 100% sobrevivieron por más de 7 días, pero menos de 30 días (Tabla IV).

**TABLA III.** Resistencia de las tricosporas frente a diferentes concentraciones de NaCl.

<b>Concentración de NaCl (ppm)</b>	<b>0 hs</b>	<b>24 hs</b>	<b>7 días</b>	<b>14 días</b>	<b>30 días</b>
<b>1</b>	+	+	+	+	+
<b>10</b>	+	+	+	+	+
<b>20</b>	+	+	+	+	+
<b>35</b>	+	+	+	+	+
<b>Control</b>					

**TABLA IV.** Resistencia de las tricosporas expuestas frente a diferentes diluciones de agua marina

<b>Concentración de Agua de mar (%)</b>	<b>0 hs</b>	<b>24 hs</b>	<b>7 días</b>	<b>14 días</b>	<b>30 días</b>
<b>100</b>	+	+	+	+	
<b>75</b>	+	+	+	+	
<b>50</b>	+	+	+	+	+
<b>25</b>	+	+	+	+	+
<b>5</b>	+	+	+	+	+
<b>Control</b>	-	-	-	-	-

#### 6 - 2 - 4. Resistencia frente a diferentes pH

La acidez de las distintas suspensiones no tuvo efecto negativo sobre la viabilidad de las tricosporas, habiendo permanecido viables durante al menos 30 días (Tabla V)

**Tabla V.** Resistencia de las tricosporas expuestas a diferentes niveles de pH.

pH	0 hs	24 hs	7 días	14 días	30 días
3,6	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
<b>Control</b>					

### 6 - 3. Transmisión de *Sm. culisetae* en mosquitos

#### 6 - 3 - 1. Transmisión vertical

Como resultado de las 3 repeticiones, se colocaron 60 hembras alimentadas en frascos individuales, de las cuales 49 ovipusieron, 6 murieron antes de la oviposición, y 5 no pusieron huevos. Se disecaron en total 245 larvas eclosionadas de estos huevos, de las cuales ninguna estaba infectada, por lo que el inóculo no fue transmitido por medio de una vía vertical por las hembras adultas.

En las pupas (n = 90) y en los machos adultos (n = 60) que fueron seleccionados para realizar su disección, no se observaron estructuras fúngicas asociadas. De las hembras adultas disecadas (n = 120), solo se observaron unas pocas tricosporas dentro del tubo digestivo de 2 de los ejemplares. Los huevos observados bajo microscopio óptico no presentaron evidencia de estructuras fúngicas en su superficie.

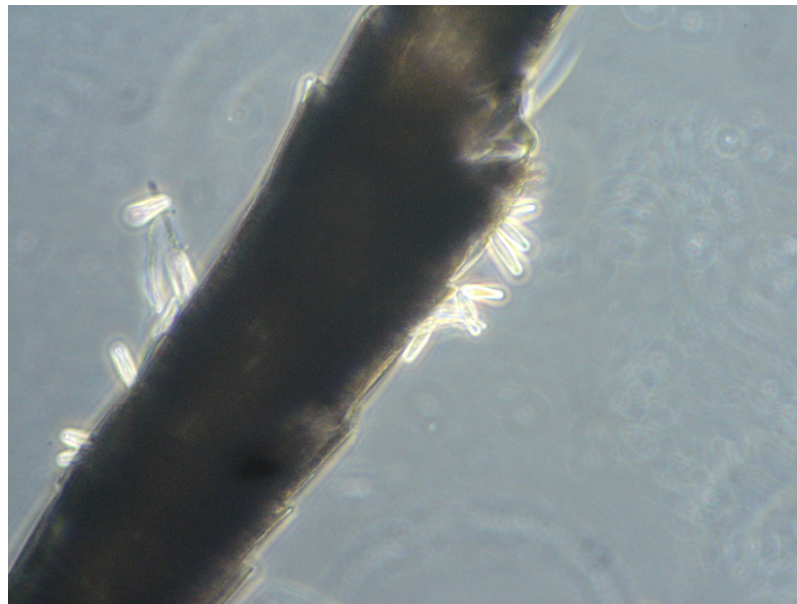
#### 6 - 3 - 2. Transmisión *per os*

Se realizó la disección de un total de 73 adultos (34 hembras y 39 machos) de *A. aegypti*, y 19 (12 hembras y 7 machos) de *Cx. pipiens*, no observándose en ningún caso tricosporas dentro del tubo digestivo.

### 6 - 3 - 3. Transmisión mecánica

Se estudiaron 120 adultos de *Ae. aegypti*, no observándose en ningún caso la presencia de tricosporas adheridas en las extremidades como así tampoco en su superficie externa.

En los adultos que fueron sumergidos en la suspensión de tricosporas, se observaron adheridas tricosporas a la superficie externa de estos (Fig. 33).



**Fig. 33.** Pata de adulto de *Ae. aegypti* con tricosporas adheridas.

### 6 - 3 - 4. Material recolectado en el campo

*Culex pipiens*: no se observaron estructuras fúngicas en las pupas, como así tampoco en las hembras ni en los machos adultos. Tampoco se evidenciaron estructuras fúngicas en los adultos obtenidos de la colonia mantenida en el CEPAVE.

*Cx. apicinus*: no se observó ninguna estructura fúngica asociada a las pupas y adultos disecados.

*Ps. ferox*: no se observaron estructuras de hongos Trichomycetes asociadas ni en las pupas ni a adultos disecados. En un ejemplar adulto emergido de larvas recolectadas en el campo, se observó que en la región terminal de los tarsos se encontraban adheridas esporas de *Alternaria* sp. (Ascomycota: Pleosporales).

No se detectaron clamidosporas en las hembras adultas de simúlidos disecadas, como así tampoco se observaron estructuras fúngicas asociadas a los huevos de quironómidos observados bajo microscopio óptico.

#### 6 - 4. Prevalencia

##### 6 - 4 - 1. Prevalencia y estacionalidad de Harpellales en fitotelmata

###### 6 - 4 - 1 - 1. Hospedadores:

Se observaron estados inmaduros de 2 especies de quironómidos en el agua almacenada en las axilas de *E. cabreræ*. La especie más abundante fue *Polypedilum* sp. ( $n = 2632$ ), la cual estuvo presente en todas las fechas de recolección de material ( $N = 52$ ), mientras que *Metriocnemus eryngiotelmatus* van der Wulp, estuvo presente en 25 de los relevamientos (48%) y fue menos abundante ( $n = 162$ ).

A partir de los resultados obtenidos del análisis estadístico Kruskal-Wallis se observó que el número de larvas por planta no fue significativamente diferente entre las estaciones ( $p < 0.1$ ), por lo que no se observó una estacionalidad en ninguna de las especies de quironómidos presentes.

###### 6 - 4 - 1 - 2. Harpellales

Se encontraron 2 especies de Harpellales asociadas al tracto digestivo de las larvas de quironómidos recolectadas. *Stachylina lentica* (Harpellales: Harpellaceae) se encontró adherida a la membrana peritrófica que rodea internamente al tubo digestivo medio de ambas especies de quironómidos, mientras que *Smittium phytotelmatum* (Legeriomycetaceae: Harpellaceae) fue encontrada creciendo en el tubo digestivo posterior solamente de larvas de *Polypedilum* sp.

Este trabajo representa el primer registro en Argentina de ambas especies de Harpellales, como así también representa el primer registro de *St. lentica* para un ambiente fitotelmata.

## 6 - 4 - 1 - 3. Prevalencia

Plantas al azar: (Fig. 34)

*Stachylina lentica* y *Sm. phytotelmatum* estuvieron presentes en un amplio rango de valores de las variables independientes que se han tenido en cuenta (Tabla VI)

**TABLA VI:** Rango de valores de las variables independientes dentro de los cuales estuvieron presentes los Harpellales.

	Temperatura (°C) <sup>1</sup>	HR media (%) <sup>1</sup>	Precipitaciones (mL) <sup>1</sup>	Volumen (mL) <sup>2</sup>	Densidad larval (n) <sup>2</sup>	pH <sup>2</sup>
<i>Sm. phytotelmatum</i>	3.9 - 30.1	52.4 - 95.7	0 - 65	5 - 60	1 - 28	7.07 - 8.84
<i>St. lentica</i>	5.1 - 29.7	52.4 - 95.7	0 - 64	5 - 70	1 - 26	7.07 - 8.40

<sup>1</sup> Datos acumulados desde las 2 semanas previas a la recolección del material

<sup>2</sup> Datos por planta

Durante los 2 años del estudio, el 3.82% (n = 82) de las larvas de *Polypedilum* sp. recolectadas en las plantas al azar estuvieron infectadas por *St. lentica*, mientras que el 2.05% (n = 54) estuvieron infectadas por *Sm. phytotelmatum*. En estas larvas, *St. lentica* estuvo presente en 18 relevamientos (34.6%) en un total de 31 plantas (5.96%). La prevalencia más alta observados para esta especie, ocurrió en el verano del primer año (2003) y en la primavera del segundo (2004), siendo el valor máximo de infección de 30.2%.

*Smittium phytotelmatum* fue más abundante que *St. lentica*, encontrándose distribuidas en 23 relevamientos (44.23%) en un total de 33 plantas (6.35%) ocurriendo los valores más altos de infección en el otoño del primer año y en el verano del segundo año de muestreo (el valor máximo de infección observado fue de 25%).

Se observó la presencia de *St. lentica* infectando larvas de *M. eryngiotelmatus* solo en tres oportunidades, no habiéndose encontraron larvas

infectadas por *Sm. phytotelmatum*. Si bien el máximo porcentaje de infección fue elevado (50%), esto se debe a que el número total de larvas era muy bajo ( $n = 2$ ). Debido a que la presencia de Harpellales infectando larvas de *M. eryngiotelmatus* fue muy baja, estos datos no fueron tenidos en cuenta al momento de realizarse los análisis estadísticos.

Plantas fijas: (Fig. 35)

En estas plantas, el porcentaje máximo de infección de *St. lentica* en larvas de *Polypedium* sp. fue del 85.7%, mientras que el porcentaje máximo de infección detectado para *Sm. phytotelmatum* fue del 50%.

En la planta n°1, *Sm. phytotelmatum* estuvo presente en 4 de las fechas del muestreo y el porcentaje de infección varió entre 0 y 50% ( $n = 3$ ). *Stachylina lentica* estuvo presente en 7 relevamientos, y la infección varió entre 0 y 85.7% ( $n = 6$ ). En la planta n°2, *Sm. phytotelmatum* estuvo presente en 7 muestras, y la infección varió entre 0 y 50% ( $n = 1$ ), mientras que *St. lentica* estuvo presente en 2 relevamientos, con un rango de infección entre 0 y 33% ( $n = 2$ ). En la planta n°3, *Sm. phytotelmatum* estuvo presente en 4 relevamientos con un valor máximo de infección de 50% ( $n = 8$ ), mientras que *St. lentica* estuvo presente en 3 muestras, en donde el valor máximo de infección fue de 7.1% ( $n = 1$ ).

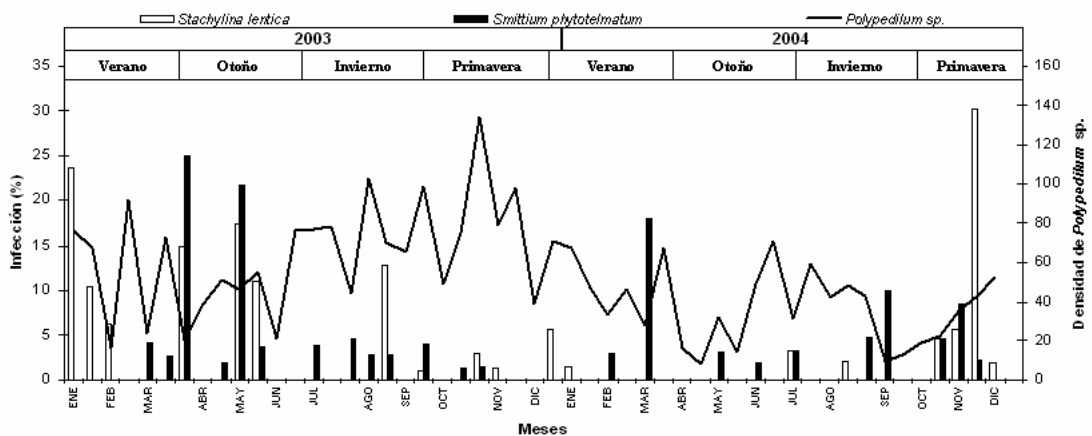


Fig. 34. Prevalencia en las "plantas al azar".

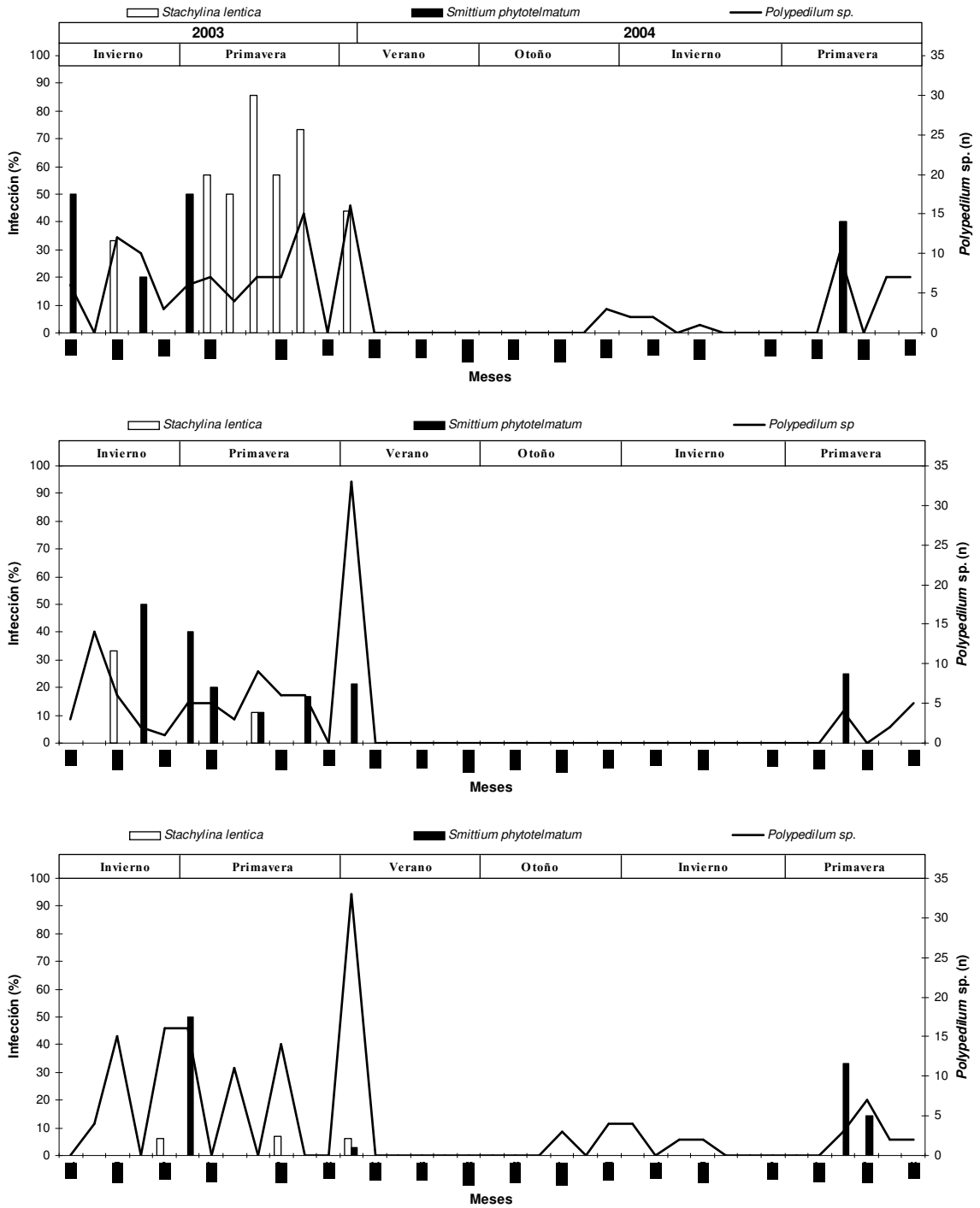


Fig. 35. Prevalencia en las "plantas fijas".



#### 6 - 4 - 1 - 4. Análisis estadísticos

A partir de los resultados del análisis de Kruskal-Wallis utilizado, se observó que no existieron diferencias significativas en las infecciones de larvas de quironómidos entre las distintas estaciones del año (todos los  $p > 0.1$ ,  $n = 7$ ). A su vez, no existió correlación (todos los  $p > 0.1$ ,  $n = 519$ ) entre la prevalencia y la temperatura ( $r = 0.02$ ), el volumen de agua acumulada ( $r = 0.06$ ), el pH ( $r = 0.04$ ), las precipitaciones ( $r = 0.01$ ), densidad larval ( $r = 0.03$ ). El volumen tuvo un efecto significativo muy bajo ( $r = 0.31$ ) sobre la densidad larval, mientras que una pequeña correlación negativa fue observada entre la temperatura y la densidad de larvas por plantas ( $r = -0.12$ ). La correlación fue realizada teniendo en cuenta los valores de cada una de las plantas al azar.

#### 6 - 4 - 1 - 5. Cultivos

Los talos fúngicos de *Sm. phytotelmatum* fueron aislados a partir del tubo digestivo de larvas de *Polypedilum* sp. Se obtuvo un cultivo axénico de este hongo, el cual fue depositado en la colección micológica del CEPAVE (número de acceso: CEP-300).

#### 6 - 4 - 2. Prevalencia de Harpellales en otros ambientes

##### 6 - 4 - 2 - 1. Arroyos de la provincia de Buenos Aires

Como resultado de la prospección de larvas de simúlidos recolectadas en 3 arroyos ubicados en la provincia de Buenos Aires, se identificaron las especies *G. homothallica* y *H. meridionalis* en el tubo digestivo de estas larvas.

Se observó la presencia de ambos harpélidos en todos los relevamientos realizados en los 3 arroyos, con excepción de *G. homothallica* que no estuvo presente en las larvas disecadas correspondientes a la última muestra del sitio MP-1 (Fig. 36).

Los porcentajes de infección de *H. meridionalis* se mantuvieron altos durante las 4 estaciones. Se observó un decrecimiento de los valores de infección en el verano, aunque estos valores se mantuvieron por encima del 72% ( $N = 25$ ). El valor mínimo de infección natural de este harpélido, se registró en el otoño en el sitio MP1, en el cual el valor de infección fue de 63.3% ( $N = 30$ ).

Al igual que el harpélido antes mencionado, *G. homothallica* estuvo presente durante las 4 estaciones aunque con valores menores que *H. meridionalis*, variando el porcentaje de infección entre 32 (N = 25) y 93.3% (N = 30). Los valores más altos de infección observados ocurrieron en las estaciones más frías. En la muestra correspondiente al otoño en el sitio MP-1, no se observó la presencia de *G. homothallica* en el tubo digestivo posterior de las larvas.

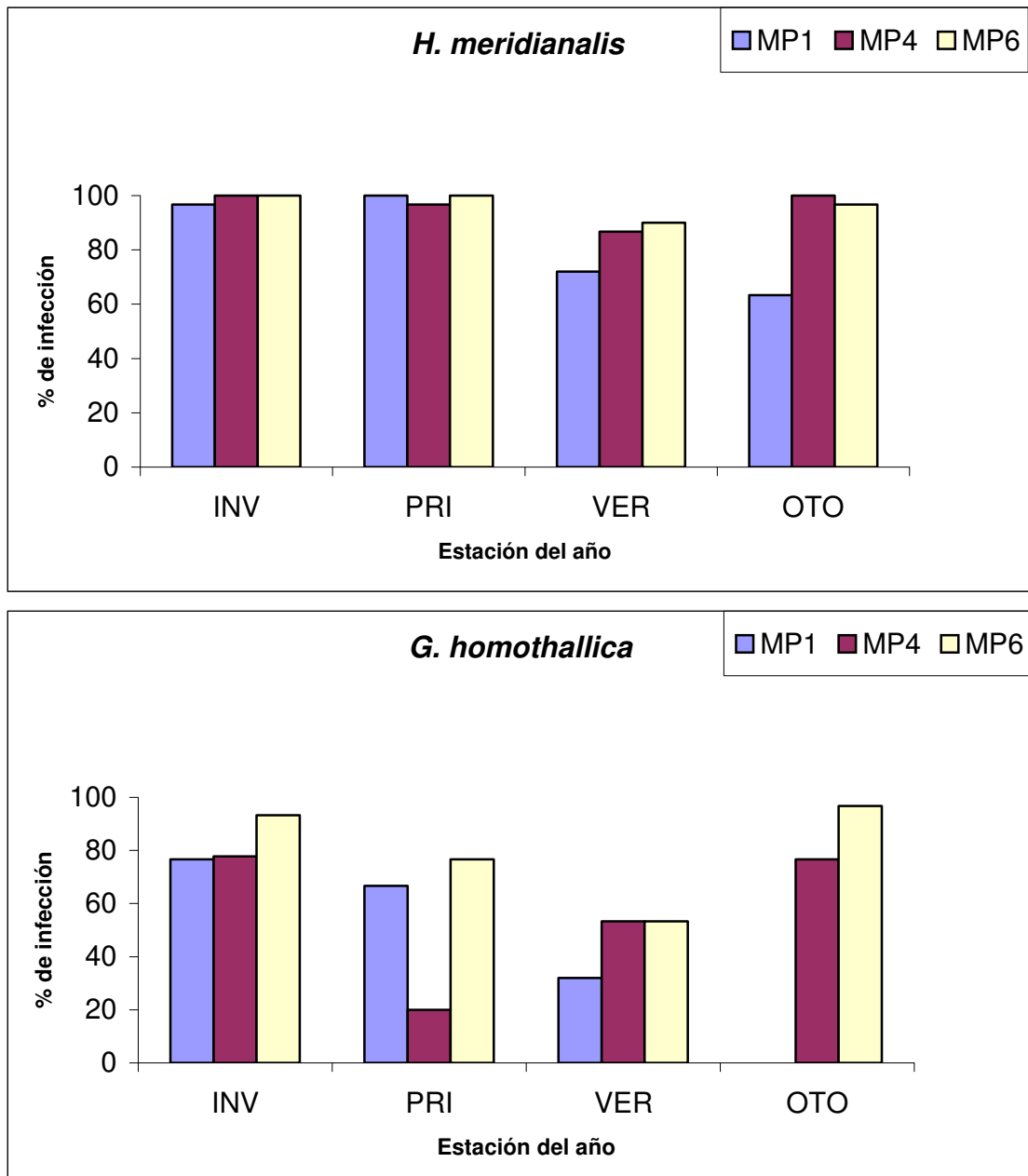


Fig. 36. Prevalencia de *H. meridionalis* y *G. homothallica* en larvas de simúlidos en arroyos.

## 6 - 4 - 2 - 2. Campo experimental de arroz.

Se realizó un total de 11 relevamientos, en los cuales se recolectaron principalmente larvas de quironómidos (*Polypedilum* sp. y *Chironomus* sp.) y mosquitos (*Anopheles albitarsis* Lynch Arribalzaga, *O. albifasciatus* y *Cx. pipiens*).

Como resultado de este estudio se registró la presencia de las siguientes especies de Trichomycetes:

- *Stachylina* aff. *lotica*, en el tubo digestivo medio de larvas de *Polypedilum* sp.
- *Sm. phytotelmatum*, en el tubo digestivo medio de larvas de *Polypedilum* sp.
- *St. grandispora*, en el tubo digestivo medio de larvas de *Chironomus* sp.
- *Sm. culicis*, en el tubo digestivo de *O. albifasciatus*.

*Stachylina* aff. *lotica* estuvo presente en el 100% de los relevamientos, habiéndose realizado la disección de 113 larvas de *Polypedilum* sp., de las cuales el 76.1% (n = 86) presentaban infecciones con este harpélido. A su vez, en uno de los relevamientos, 3 de estas larvas presentaban infecciones en el tubo digestivo posterior con *Sm. phytotelmatum*.

*Chironomus* sp. solo estuvo presente entre enero y abril, habiéndose recolectado 36 larvas de las cuales 26 (72,2%) presentaron infecciones por *St. grandispora*.

Las larvas (n = 35) de *O. albifasciatus* fueron recolectadas en uno de los relevamientos, de las cuales el 57,1% (n = 20) estuvieron infectadas por el harpélido *Sm. culicis*. *Culex pipiens* (n = 251) estuvo presente en todas las muestras, mientras que *A. albitarsis* (n = 177) estuvo presente en 8 de las muestras, no habiéndose registrado para ambos casos la presencia de harpélicos en el tubo digestivo posterior.

A su vez, se realizó la prospección de ninfas de odonatos (n = 32), efemerópteros (n = 25) y tabánidos (n = 6). En una de las ninfas de odonatos disecadas, se observó la presencia de larvas de quironómidos en el interior del tubo digestivo. Estas larvas de quironómidos fueron disecadas, y se observó la presencia de *St. grandispora* en el tubo digestivo medio.

6 - 5. Relación entre la presencia de *Sm. culisetae* y la fecundidad y tamaño de las hembras adultas de *Ae. aegypti*

El tamaño medio de las alas fue de  $3,13 \pm 0,15$  mm y  $2,69 \pm 0,26$  mm para las hembras emergidas de larvas criadas en presencia del hongo y con alto y bajo nivel de alimento respectivamente, mientras que para las hembras emergidas de larvas criadas libres del hongo fue de  $3,07 \pm 0,19$  mm y  $2,83 \pm 0,14$  mm para las larvas criadas con alto y bajo nivel de alimento respectivamente.

El número medio de huevos ovipuestos por las hembras emergidas de larvas criadas en presencia del hongo, y, con alto y bajo nivel de alimento respectivamente fue de  $99,8 \pm 20,54$  y  $73,08 \pm 18,24$ , mientras que para las hembras emergidas de larvas criadas libres del hongo fue de  $93,87 \pm 23,6$  y  $73,5 \pm 19,06$  para las larvas criadas con alto y bajo nivel de alimento respectivamente.

Debido a que los datos no presentaron una distribución normal, se realizó la transformación Logarítmica en el caso de la medida de las alas, y una transformación mediante Raíz cuadrada en el caso del número de huevos. La presencia del hongo *Sm. culisetae* no tuvo incidencia en el tamaño de las hembras adultas de *Ae. aegypti* (ANOVA,  $F = 1.28$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0.259$ ), como así tampoco en su fecundidad (ANOVA,  $F = 2.32$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0.292$ ). La cantidad de alimento tuvo incidencia en el tamaño (ANOVA,  $F = 99.34$ ,  $gl = 1$ ,  $p < 0.05$ ) y fecundidad (ANOVA,  $F = 142.11$ ,  $gl = 1$ ,  $p < 0.05$ ) de las hembras de *Ae. aegypti*.

## 7 - DISCUSIÓN

### *Prospección de Harpellales*

Como resultado de los relevamientos realizados en diferentes ambientes alrededor del mundo, se han descrito hasta el momento cerca de 200 especies de Harpellales distribuidas en 38 géneros.

La República Argentina presenta una gran diversidad de ambientes acuáticos, favoreciendo de esta manera una amplia diversidad de Trichomycetes. Previamente a este estudio, en Argentina fueron descritas 9 nuevas especies, 16 especies que ya habían sido descritas en otras regiones, 4 especies no determinadas, 2 nuevas especies de Amoebidiales y 1 especie nueva de Eccrinales (López Lastra 1990, García et al 1994, Campos et al 1995, García et al 1995, Maciá et al 1995, Maciá 1996, Maciá et al 1996-1997, López Lastra 1997, Lichtwardt et al 1999, Cafaro 2000, Lichtwardt et al 2000, López Lastra et al 2002, López Lastra et al 2003, López Lastra et al 2005). Estos estudios abarcaron las provincias de Buenos Aires, Neuquén, Río Negro, Chubut, Tierra del Fuego, Tucumán, Salta, Jujuy y Misiones.

En el presente estudio se aportan datos al conocimiento de la diversidad de hongos Trichomycetes en Argentina, ampliándose la extensión geográfica de los relevamientos a las provincias de Buenos Aires, Córdoba, San Luis, La Rioja, y Neuquén. Como resultado de este estudio, se describieron 5 especies nuevas de Harpellales como así también 12 especies ya conocidas, de las cuales en algunos casos significan un nuevo registro para el país. Además, se describieron 4 especies que podrían tratarse de nuevas especies, pero no se ha podido realizar aún una diagnosis completa debido al escaso material recolectado.

A pesar de que el orden Amoebidiales fue excluido de la clase Trichomycetes, en el presente trabajo se citan las especies pertenecientes a este orden debido a que fueron considerados como integrantes de la clase Trichomycetes durante muchos años (Cafaro 2005, White et al 2006a).

Debido a que la mayor parte de las áreas de Argentina no se han explorado en búsqueda de Trichomycetes, sólo se conoce una pequeña fracción de la totalidad de especies de estos hongos en nuestro país. A su vez, para conocer aun mejor la diversidad de especies de Trichomycetes en nuestro

país, sería muy importante realizar la prospección de los mismos sitios en diferentes momentos del año.

***Austrosmittium***. Previamente a este estudio, el género *Austrosmittium* fue citado solamente en Australia y Nueva Zelanda (Lichtwardt & Williams 1990, Williams & Lichtwardt 1990, Lichtwardt & Williams 1992). Sin embargo, en el presente estudio se registraron especies de este género para Argentina, y a su vez, White y Strongman (com. pers.) encontraron otras especies en Canadá y EEUU, por lo que este género presenta una distribución muy amplia.

Las especies de *Austrosmittium* presentes en Argentina, fueron recolectadas en lugares muy disímiles y distantes entre sí. *Austrosmittium* sp. 1 fue recolectada en un arroyo de altura localizado dentro del Parque Nacional Lanín en la provincia de Neuquén, mientras que *Austrosmittium* sp. 2 fue encontrado en un charco no permanente de aproximadamente 10 metros de diámetro x 30 cm de profundidad localizado en La Plata (Buenos Aires). En este último caso, el hongo estuvo presente entre los meses de julio y septiembre de 2005, en cuyas muestras varios ejemplares contenían cigosporas. Luego, en los meses más cálidos el charco sufrió desecación, y debido a que durante el año 2006 las precipitaciones en la región fueron escasas, dicho charco estuvo inundado solo en ocasiones. Sin embargo, a pesar de que se intentó detectar la presencia del hongo en varias oportunidades, no ha sido posible encontrarlo nuevamente hasta el momento. El registro de *Austrosmittium* sp. 2 representa el primer registro de una especie de este género para un ambiente léntico.

Ambas especies de *Austrosmittium* citadas en nuestro país comparten la característica de que las tricosporas no presentar collar, mientras que en el resto de las especies esta estructura es muy evidente. En algunas tricosporas de *Austrosmittium* sp. 1 montadas en agua destilada estéril y observadas bajo microscopio óptico con contraste de fases, se visualizó una estructura difusa semejante a un collar. Sin embargo, luego de realizar la tinción del preparado con azul de algodón-lactofenol de Ammann, se detectó que no se trataba del collar sino que era el apéndice que se encontraba enrollado en la base de éstas.

*Austrosmittium* sp. 2 también difiere del resto de las especies de *Austrosmittium* debido a que las tricosporas carecen (o al menos no se han

observado) de apéndices. A pesar de las diferencias descritas entre esta especie y el resto de las especies de *Austrosmittium*, las características de las cigosporas permitieron incluirla dentro de este género.

***Legeriomyces***. Este género, a diferencia del resto de los géneros hallados en el presente estudio, está asociado al tubo digestivo de ninfas de efemerópteros. Debido a que las especies previamente descritas de *Legeriomyces* fueron citadas para EEUU, Australia, y varios países de Europa tales como España, Francia, Inglaterra, Noruega y Suecia (Lichtwardt & Williams 1983b, Williams & Lichtwardt 1993, White & Lichtwardt 2004) el presente registro representa la descripción de una nueva especie, como así también la primera cita de una especie de este género para la región del Neotrópico.

***Smittium***. Este corresponde a uno de los géneros que presenta mayor cantidad de especies dentro de los Trichomycetes, habiéndose descrito hasta el momento al menos 72 especies para el mismo (datos obtenidos a partir de la clave interactiva publicada y actualizada por Robert W. Lichtwardt, disponible en el sitio de Internet <http://www.nhm.ku.edu/~fungi/Monograph/Text/Mono.htm>), las cuales fueron encontradas creciendo en el tubo digestivo posterior de diversos hospedadores.

Estudios basados en la comparación de las secuencias de rDNA entre diferentes especies del género *Smittium*, permitieron deducir que este es un género polifilético y que al menos incluye 5 linajes diferentes (Lichtwardt et al 2001a, Misra & Horn 2001, Gottlieb & Lichtwardt 2001, White 2002, White et al 2006a). Las similitudes entre las diferentes especies incluidas dentro de este género podrían haber aparecido independientemente bajo condiciones ambientales similares.

Previamente a este trabajo, se describieron en Argentina 10 especies de este género, por lo que sumado a las 2 nuevas especies descritas y a *Sm. phytotelmatum* (que no había sido citada aun para este país), existen actualmente 13 especies descritas de *Smittium* para nuestro país. *Smittium* sp. 1 fue encontrada en el tubo digestivo posterior de larvas de simúlidos y quironómidos habitando los mismos arroyos. Si bien esta nueva especie presenta similitudes con *Sm. culicisoides* y *Sm. culicis*, ciertas características

tales como la forma de las cigosporas permitieron diferenciarla de estas últimas. Se realizó el aislamiento de ambas especies en BHIGTv, lográndose que el hongo crezca en dicho medio. Sin embargo, los cultivos se contaminaron en todos los casos, y a pesar de los intentos realizados transfiriendo los cultivos a nuevos medios con diferentes antibióticos, no se pudo obtener ningún cultivo axénico. Lo mismo ocurrió con *Legeriomyces* sp. aislada de ninfas de efemerópteros recolectadas en el mismo sitio, en donde se obtuvo el crecimiento *in vitro* del hongo, pero no se pudo obtener el cultivo axénico debido a que en todos los casos se contaminó (hasta el presente ninguna especie del género *Legeriomyces* ha sido cultivada axénicamente).

*Smittium* sp. 2 fue identificada a partir del tubo digestivo posterior de quironómidos recolectados en Río Grande de Punilla, aproximadamente 500 m luego del dique La Falda, localizado en la ciudad de La Falda, provincia de Córdoba.

*Smittium culicis* y *Sm. culisetae* han sido citadas prácticamente en todos los países en donde se han realizado estudios sobre los Trichomycetes, y representan a las especies de harpélidos más fácilmente cultivables *in vitro*. En el presente estudio, se obtuvieron diferentes aislamientos de ambas especies (además de *Sm. phytotelmatum*), de los cuales el aislamiento obtenido a partir de larvas de *Ae. aegypti* fue utilizado en las distintas experiencias realizadas en el laboratorio.

*Smittium simulii* es otra de las especies que ha sido descrita para una gran cantidad de sitios a lo largo de todo el mundo. Esta especie que está asociada principalmente a larvas de simúlidos y quironómidos, y en menor grado a larvas de mosquitos y tipúlidos, presenta una estructura basal en forma de herradura muy característica, por lo que se distingue fácilmente de otras especies. En Argentina, *Sm. simulii* fue citada por Lichtwardt et al (2000) en la provincia de Salta, mientras que en el presente estudio se registró su presencia en la provincia de La Rioja y en distintos arroyos de las provincias de Córdoba y Buenos Aires.

Otra de las especies de *Smittium* que se identificó en este estudio fue *Sm. phytotelmatum*, la cual se encontró asociada a larvas de quironómidos recolectadas a partir del agua almacenada en las axilas de las hojas de plantas de *Eryngium* sp. (Apiaceae) como así también en charcos de inundación. Este



es el primer registro de esta especie para Argentina, habiéndose encontrado en sitios localizados en la provincia de Buenos Aires, de cuyas muestras se pudo aislar y cultivar axénicamente el hongo.

**Pennella.** El primer registro de *Pe. montana* fue realizado por Lichtwardt (1997) quien encontró este hongo creciendo dentro del tubo digestivo posterior de larvas de simúlidos recolectadas en arroyos de altura en Costa Rica, y posteriormente, fue citada en el noroeste argentino para las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy (Lichtwardt et al 2000). En el presente trabajo se encontraron larvas de simúlidos infectadas por este harpélido en las provincias de Córdoba y San Luis, abarcando por lo tanto arroyos de las regiones del noroeste y centro-oeste de nuestro país. Al igual que en Costa Rica, todos los ejemplares citados para Argentina fueron encontrados en arroyos de altura.

**Harpella.** *Harpella meridionalis* fue citada exclusivamente en América del Sur, habiéndose relevado ejemplares infectados por este hongo en la región sur de Chile (Lichtwardt & Arenas 1996) y en una vasta región de Argentina, comprendida desde el norte hasta el sur de este país (Lichtwardt et al 1999, 2000; López Lastra et al 2005). En el presente trabajo, se extiende la distribución de esta especie a las provincias de La Rioja y Córdoba. Posiblemente, esta especie también se encuentre presente en otras regiones de Sudamérica, pero los trabajos en dicha región son escasos por lo que aún no ha sido encontrada en otros países más que Chile y Argentina.

La otra especie de *Harpella* presente en nuestro país es *H. tica*, la cual fue citada previamente solo para Costa Rica (Lichtwardt 1997) y Puerto Rico (White et al 2000). Esta especie se distingue fácilmente de *H. meridionalis* de acuerdo a la morfología y tamaño de las tricosporas, siendo en el primer caso las únicas tricosporas dentro de este género que presentan forma sigmoidea. En el presente trabajo se reporta la cita más austral hasta el momento de la especie *H. tica*.

Lichtwardt et al (2000) han informado sobre la presencia de *H. tica* en varios sitios del noroeste argentino infectando larvas de simúlidos en forma combinada con *H. meridionalis* dentro del mismo hospedador. En las prospecciones realizadas en el presente trabajo, estas especies no han sido encontradas compartiendo las mismas membranas peritróficas, pero esto si ocurrió con los harpélidos *Harpella* sp. y *H. meridionalis*.

Lamentablemente, no se encontraron tricosporas maduras de la especie *Harpella* sp. presentes en los simúlidos recolectados en el sitio SL-3, por lo que no se ha podido hacer una correcta descripción de esta extraña especie. El hecho de que el “holdfast” tiene una posición subterminal, hace que la región basal adopte una forma de “pie”. Otra de las características particulares de esta especie, es la presencia de talos totalmente enroscados, los cuales pueden presentar constricciones transversales. Estas características que diferencian a *Harpella* sp. del resto de las especies de *Harpella*, podrían representar a una nueva especie, aunque también podrían ser talos de *H. meridionalis* que bajo determinadas condiciones ambientales sufren modificaciones. Esta última hipótesis podría estar sustentada por el hecho de que se observó que los hospedadores contenían al mismo tiempo talos de *Harpella* sp. y *H. meridionalis*.

*Harpella amazonica* es la cuarta especie de este género que fue descubierta en larvas de simúlidos en Sudamérica, aunque no ha sido reportada para nuestro país. Esta especie solo estuvo presente en larvas de simúlidos recolectadas en diversos arroyos de Brasil (Alencar et al 2003). Las tricosporas de *H. amazonica* son similares en la morfología a las tricosporas de *H. meridionalis*, aunque existe una clara diferencia en el tamaño de estas, siendo más chicas las tricosporas de la especie descubierta en Brasil.

*Harpella melusinae* es una especie con una distribución muy amplia, habiéndose encontrado en gran parte de América del Norte, varios países de Europa, Nueva Zelanda, Australia, Japón y China (Rizzo & Pang 2005, White et al 2006b). Aún no se ha podido explicar por qué no se ha encontrado esta especie en Sudamérica, como así tampoco, por qué *H. meridionalis*, *H. tica* y *H. amazonica* solo se encuentran en Sudamérica y Centroamérica, no superponiéndose con *H. melusinae*.

Dentro del género *Harpella*, se citaron cigosporas solamente para la especie *H. melusinae*. En uno de los sitios en donde se encontró *H. meridionalis*, se observó una gran cantidad de conjugaciones entre los talos, sin embargo no se observaron cigosporas. Tampoco se observaron cigosporas luego de haber mantenido las preparaciones microscópicas conteniendo los talos con conjugaciones durante algunas horas en cámara húmeda para

favorecer la formación de las estructuras sexuales (Lichtwardt 1986, Lichtwardt & Williams 1988).

***Stachylina***. Hasta el presente se han descrito cerca de 30 especies de *Stachylina*. Este género cosmopolita, está asociado principalmente a la membrana peritrófica de larvas de quironómidos, aunque también se han citado algunos casos en ceratopogónidos, taumaleidos, psicódidos y simúlidos. A pesar de que en la naturaleza es bastante frecuente encontrar especies de *Stachylina* infectando larvas de quironómidos, hasta el momento no se logró obtener ningún cultivo axénico. Según estudios moleculares realizados sobre el género *Stachylina*, este incluiría un grupo de especies con diferentes linajes, correspondiendo por lo tanto a un grupo polifilético (White et al 2006a). Dentro de las 5 especies de *Stachylina* que se describieron en el presente estudio se cita *St. grandispora* para varias regiones de Argentina. Esta especie presenta una distribución muy amplia, incluyendo entre otros a EEUU, Australia y varios países de Europa.

*Stachylina aff. lotica* fue recolectada en un campo experimental de arroz localizado en la ciudad de La Plata. Esta especie ha sido citada por Williams & Lichtwardt (1984) para el tubo digestivo medio de larvas de psicódidos (Diptera: Psychodidae) recolectados en arroyos de EEUU, y luego, fue citada por Frost (1996) en la membrana peritrófica de larvas de quironómidos recolectados en un lago de Nueva Escocia (Canadá).

La diferencia en el tamaño de las tricosporas es la principal característica que diferencia a *Stachylina aff. pedifer* con respecto a *St. pedifer*. Si bien podría tratarse de una nueva especie, el escaso material recolectado no permitió hacer una diagnosis completa de la especie.

Hasta el presente, *St. lentica* solo había sido descrita en quironómidos recolectados en Noruega (White & Lichtwardt 2004), por lo que el presente estudio representa el primer registro de esta especie en otro país del mundo.

***Genistellospora* y *Simuliomyces***. Otras especies citadas en el presente estudio fueron *G. homothallica* y *Si. microsporus*. Ambas especies presentan distribución cosmopolita, siendo muy frecuentes habitando el tubo digestivo posterior de larvas de simúlidos.

**Amoebidiales**. Dentro del orden Amoebidiales, se encontró la especie *A. parasiticum* adherida a la superficie externa de culícidos, y también se

hallaron talos de *Paramoebidium* sp. dentro del tubo digestivo de larvas de simúlidos relevadas en diferentes zonas de nuestro país.

Se han observado más de una especie de Harpellales ocupando el tubo digestivo en la misma larva. Por ejemplo, Lichtwardt & Grigg (1998) encontraron hasta tres especies de harpélidos (*Sm. commune*, *Sm. kansense* y *Sm. longisporum*) cohabitando el tubo digestivo de larvas de quironómidos. En el presente estudio, se observaron larvas de simúlidos del sitio SV-8 que contenían tres especies de Harpellales (*G. homothallica*, *H. meridionalis* y *Si. microsporus*) y una gran cantidad de talos de *Paramoebidium* sp.

### **Resistencia de las tricosporas**

Se conoce poco sobre la resistencia de las tricosporas frente a condiciones adversas. Cuando estas esporas se encuentran dentro del tubo digestivo del hospedador, como así también cuando se encuentran libres en el ambiente, la gruesa pared quitinosa que presenta *Sm. culisetae* le otorgaría protección a la esporangiospora que se encuentra en su interior. La extrusión de las esporangiosporas requiere de un estímulo que ocurre dentro del tubo digestivo de los hospedadores, incluyendo un cambio en el pH y un cambio en la concentración de determinados iones (Horn 1989a, 1989b). Debido a que las esporangiosporas quedan protegidas dentro del esporangióforo y, debido a que solo germinan luego de ser ingeridas por un hospedador adecuado, evitan de esta manera quedar expuestas en el ambiente. Por lo tanto, las tricosporas podrían sobrevivir en el ambiente durante ciertos períodos donde no se encuentra el hospedador, o cuando el hospedador está presente pero las condiciones no son óptimas por lo que el hospedador no se alimenta. El apéndice de las tricosporas cumpliría también una función importante en la permanencia de estas en el ambiente, al permitir que queden adheridas a algún sustrato hasta que son ingeridas (Moss 1999).

Williams (1983) mantuvo una suspensión de tricosporas de *Sm. culisetae* a 4°C por más de 6 meses. Este autor obtuvo como resultado que las tricosporas se mantuvieran viables durante ese período solo cuando fueron almacenadas en los recipientes que contenían agua y tierra, por lo que atribuyó que el sustrato tiene una gran incidencia sobre la viabilidad de las tricosporas.

En los ensayos de laboratorio realizados en el presente estudio para evaluar la resistencia de las tricosporas frente a diferentes temperaturas y sustratos, estas tricosporas resistieron temperaturas entre  $-4$  y  $37^{\circ}\text{C}$ , habiendo perdurado viables por más tiempo cuando fueron almacenadas a  $4^{\circ}\text{C}$ . A diferencia de los resultados obtenidos por Williams, en el presente estudio (Tabla II) se observó que las tricosporas resultaron viables por más de 6 meses cuando fueron almacenadas como una suspensión en agua (A), como así también cuando fueron almacenadas en recipientes con tierra y agua ( $T_1$ ) y, cuando se almacenaron las larvas infectadas en agua (L).

Los ensayos realizados en el presente trabajo, permitieron demostrar que en condiciones de laboratorio las tricosporas no resisten condiciones de desecación. Las tricosporas solo resistieron unos pocos minutos cuando se las sometió a condiciones de sequía. Las tricosporas que fueron expuestas a las soluciones salinas preservaron su capacidad de infectar larvas de mosquitos por más de 30 días, al igual que las tricosporas que fueron expuestas a concentraciones de hasta el 50% de agua marina.

Misra (2000) obtuvo crecimiento de cultivos de *Furculomyces boomerangum* mantenidos con valores de pH variando entre 4 y 10. En el presente estudio, los resultados obtenidos a partir de la exposición de las tricosporas frente a diferentes soluciones con pH diferentes, demuestran que la acidez del medio tampoco tiene inferencia sobre su viabilidad, habiendo resistido por más de 30 días cuando fueron almacenadas a pH entre 3.6 y 10.

A partir de estos resultados se observa la capacidad que presentan las tricosporas de resistir diferentes condiciones extremas, lo cual puede explicar su capacidad de permanecer en el ambiente por largos períodos de tiempo, siempre y cuando el ambiente no sufra desecación. Los rangos de estas variables que han resistido las tricosporas de *Sm. culisetae* son generalmente más amplios que los que soportan las larvas de mosquitos que actúan como hospedadoras. En ninguno de los ensayos realizados para evaluar la resistencia se observó la formación de otra estructura fúngica (diferente a tricosporas) que actúen como formas de resistencia del hongo, por lo que se observa que las tricosporas cumplen un rol fundamental en la supervivencia de estos hongos en el ambiente.

En otros organismos dulceacuícolas que se encuentran asociados a insectos, la respuesta frente a la temperatura y a la salinidad varió en cada especie. Por ejemplo, se observó que el protista patógeno de mosquitos, *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Straminopiles) toleró un amplio rango de temperatura y salinidad (Pelizza et al 2007). Al igual que *Sm. culisetae*, *L. chapmanii* ha sido encontrado exclusivamente en ambientes dulceacuícola, por lo que no se pudo explicar por que resisten a altas concentraciones de NaCl. Como se expresó anteriormente, en el caso de *Sm. culisetae* la pared de las tricosporas le otorgaría la resistencia frente a estos iones, mientras que *L. chapmanii* no presenta una pared gruesa que la protege, por lo que no se pudo concluir como es capaz de resistir dichas condiciones de salinidad. Otros organismos dulceacuícolas patógenos de culícidos tales como *Saprolegnia parasitica* Coker y *Lagenidium giganteum* Couch, se vieron afectados negativamente por concentraciones mayores de 1 ppm de NaCl (Merrian & Axtell 1982, Lord & Roberts 1985).

Por lo tanto, gran parte del éxito que han tenido los Trichomycetes para colonizar y mantenerse en diversos de ambientes acuáticos alrededor del mundo, se debe a la presencia de las tricosporas, las cuales se forman en abundancia, se transmiten fácilmente entre los estadios inmaduros que se encuentran en un mismo cuerpo de agua, y además, son capaces de mantener su viabilidad en el ambiente aún en ausencia de hospedadores para luego germinar rápidamente al ser ingeridas. A su vez, otro factor importante que presentan estos hongos, es que tienen una velocidad alta de crecimiento y esporulación, lo cual puede demorar menos de 22 horas. Por ejemplo, esto es muy importante en los culícidos, debido a que en condiciones óptimas algunas especies de mosquitos sufren el proceso de muda en menos de 24 hs, por lo que el hongo debe cumplir un ciclo completo durante ese lapso de tiempo antes de ser eliminado junto con la exuvia del hospedador. De esta manera, en menos de 24 horas el hospedador debe ingerir tricosporas, éstas se deben fijar en el tubo digestivo para que comience rápidamente el crecimiento vegetativo del hongo, y por último, debe ocurrir la esporulación y liberación de las tricosporas al ambiente (Williams & Lichtwardt 1972a).

### **Transmisión**

La capacidad que presentan las tricosporas de perdurar viables en el ambiente permite pensar que estos hongos pueden soportar diferentes condiciones ambientales sin perder su capacidad de infectar nuevos hospedadores. Sin embargo, esto no puede explicar como se colonizan nuevos ambientes, o incluso, como se recoloniza un ambiente luego de haber sufrido desecación y de que se haya perdido el inóculo.

De los ambientes seleccionados para los estudios de prevalencia y estacionalidad de hongos Harpellales, dos de los ambientes (fitotelmata y campo de arroz) fueron inestables sufriendo períodos de desecación. Fitotelmata es generalmente un ambiente muy inestable, debido a que están expuestos a la desecación en cortos períodos de tiempo, perdiéndose de esta manera el inóculo fúngico. Por lo tanto, la planta debe acumular agua nuevamente para que los insectos puedan recolonizarlas, y luego, el hongo debe ser capaz de transmitirse de alguna manera para poder infectar a estas larvas. En el caso del campo de arroz, éste es mantenido inundado artificialmente durante aproximadamente 3 meses, por lo que se seca durante gran parte del año. En este caso, luego de que comienza la inundación del campo, el inóculo fúngico debe ser capaz de ser transmitido nuevamente para que ocurran las nuevas infecciones de los hospedadores que recolonizan este ambiente.

El hecho de haber seleccionado y recolectado las muestras de las “plantas fijas” en el estudio de fitotelmata, permitió demostrar que existieron infecciones luego de que se eliminaba el agua almacenada en las axilas de dichas plantas. De esta manera, y debido a que el inóculo no resiste períodos de desecación tal como se demuestra en el presente trabajo, se pudo observar que debe existir una forma en que dicho inóculo se transmita nuevamente. Goettel (1987) y Grigg & Williams (1989) también observaron que *Smittium* sp. estuvo presente en sitios que sufrieron desecación por períodos extensos. A su vez, en diversos trabajos (Williams & Nagel 1980, López Lastra et al 2003, Reeves 2004a, Pereira et al 2005) observaron la presencia de Harpellales (principalmente *Sm. culicis* y *Sm. culisetae*) infectando larvas de mosquitos que criaban en ambientes totalmente aislados, como por ejemplo huecos en las rocas y floreros de cementerio. Asimismo, gran parte de las muestras obtenidas

en el presente trabajo en las que se encontraron Trichomycetes fueron recolectadas en ambientes temporales. Por ejemplo, fueron relevados arroyos temporarios y charcos de inundación, por lo que la presencia de Trichomycetes en estos ambientes indica que el inóculo fúngico debe recolonizar estos ambientes.

Se conoce muy poco sobre como se transmiten los Trichomycetes para colonizar nuevos ambientes, habiéndose citado unos pocos casos en donde los hospedadores adultos son capaces de transmitir dicho inóculo (McCreadie et al 2005). Por ejemplo, se conoce que *H. melusinae* y *G. homothallica* tienen la capacidad de ubicarse en los ovarios de hembras adultas de simúlidos para formar clamidosporas (también denominadas "quistes ováricos"), reemplazando total o parcialmente a los huevos. Luego, las hembras transmiten el inóculo al "oviponer" las clamidosporas, de las cuales se desarrollan tricosporas o cigosporas que van a servir como nuevo inóculo para las larvas (Labeyrie et al 1996, Lichtwardt 1996, Rizzo & Pang 2005). También se encontraron clamidosporas de *Smittium* sp. adheridas a la cubierta mucilaginosa que cubren los huevos de quironómidos (Moss 1998).

En los ensayos de laboratorio, no se observaron transmisiones verticales (*transovum* o *transovárica*) del inóculo, por lo que los huevos puestos por hembras adultas de *Ae. aegypti* (criadas a partir de larvas con altos grados de infección de *Sm. culisetae*) no contenían el inóculo en su superficie, como así tampoco en su interior. A su vez, en las disecciones realizadas en el presente estudio sobre un gran número de estas hembras, tampoco se observaron estructuras fúngicas en ovarios, por lo que se supone que al menos en laboratorio no ocurre transmisión vertical de *Sm. culisetae* en el culícido *Ae. aegypti*.

En el tubo digestivo de dos de las hembras criadas a partir de larvas con altos grados de infección de *Sm. culisetae*, se observaron unas pocas tricosporas. López Lastra et al (2002) observaron en hembras adultas de *Ae. aegypti* recolectadas en el campo (La Plata) que presentaban en el interior del tubo digestivo un gran número de tricosporas. En este caso, no se pudo explicar como estas tricosporas llegaron al tubo digestivo.

Los restos del tubo digestivo medio ("mecoño") de las larvas de mosquitos son envueltos por una membrana que es secretada por el epitelio



del tubo digestivo medio durante la fase de pupa temprana y luego, la pupa segrega una segunda membrana sobre esta. Luego, el mecoño es eliminado generalmente dentro de las 24 hs de emergido el adulto (Peters 1992). En el mecoño de los mosquitos se han observado restos esqueléticos como por ejemplo tecas de diatomeas. A su vez, también podrían encontrarse Trichomycetes que viven asociados al tubo digestivo medio de las larvas, o tricosporas que por algún motivo queden retenidas en dicha región del tubo digestivo. Si esto último es una vía de transmisión de los Harpellales por parte de los individuos adultos, debido a que todas las especies de Harpellales citadas para los hospedadores culícidos están limitadas a la región posterior del tubo digestivo, posiblemente esta sea una explicación de por que no se observa transmisión de estos hongos por medio de los individuos adultos de estos hospedadores. Sin embargo, y tal como se lo expresó anteriormente, se observó un desarrollo anómalo de *Sm. culisetae* y *Sm. culicis* en el tubo digestivo medio e larvas de culícidos, por lo que posiblemente en estos casos excepcionales pueda ocurrir este tipo de transmisión en estos hospedadores.

En los adultos de *Ae. aegypti* que fueron sumergidos en una suspensión de tricosporas, quedaron adheridas tricosporas a su superficie externa. Si bien se observó que las tricosporas tienen la capacidad de adherirse a la cutícula de los mosquitos, en las experiencias realizadas en el laboratorio, no se observó transmisión mecánica del hongo por parte de los adultos de *Ae. aegypti*, como así tampoco se observó la presencia de tricosporas adheridas a la superficie de las patas de estos mosquitos aún cuando se hizo posar a estos individuos sobre una suspensión muy concentrada de tricosporas. En uno de los ejemplares de *Ps. ferox* adulto emergido de una muestra recolectada en el campo, se observó que en el extremo distal de los tarsos se encontraban adheridas esporas de *Alternaria* sp. Si bien en el presente estudio no se observaron tricosporas adheridas a las patas de mosquitos, al encontrar esporas de *Alternaria* sp., permitiría suponer que las tricosporas de Harpellales también podrían adherirse de la misma manera y así ser transportadas a un nuevo ambiente.

Posiblemente los adultos de culícidos solo puedan transmitir el inóculo mecánicamente, o incluso, posiblemente esto tampoco ocurra en la naturaleza y estos insectos dependan de otro agente que transmita dicho inóculo. Por

ejemplo, el género *Smittium* puede habitar el tubo digestivo posterior de varias familias de hospedadores pertenecientes al mismo orden (Grigg datos no publicados, Cafaro 2002). Como se expresó anteriormente, se ha observado que una de las especies de *Smittium* es capaz de desarrollar clamidosporas en las hembras de quironómidos (Moss 1998), por lo que de esta manera estas hembras son capaces de transmitir dicho inóculo hacia nuevos ambientes en donde podrían infectar también a las larvas de mosquitos.

No existen evidencias de que los Trichomycetes puedan transmitirse por medio de propágulos aéreos (Lichtwardt & Williams 1992). Un posible método de transmisión del inóculo podría ocurrir por foresia, lo cual fue propuesto hace unos años por Lichtwardt & Williams (1983a). Estos autores, propusieron que ciertos animales, como por ejemplo los pájaros, pueden transportar larvas de insectos infectadas con Trichomycetes desde un sitio hacia otro. Por ejemplo, Green & Sánchez (2006) encontraron larvas de quironómidos intactas en las heces de aves migradoras, por lo que el hongo podría mantenerse viable dentro de las larvas, y luego, al producirse la egestión de las aves, el inóculo fúngico estaría disponible para nuevas infecciones. En el presente estudio, en una de las muestras obtenidas en el campo de arroz, se disecaron ninfas de odonatos que contenían en su interior larvas de quironómidos. Estos quironómidos fueron disecados y se observó que contenían varios talos maduros y viables de *St. grandispora* asociados a la membrana peritrófica, por lo que el hongo pudo resistir (al menos durante un tiempo) dentro del tubo digestivo de las larvas de quironómidos que fueron ingeridas por otros insectos depredadores.

Debido a que no es común que los Trichomycetes formen estructuras de resistencia en el laboratorio, se recolectó material del campo para evidenciar la existencia de estructuras fúngicas en dichos ejemplares. Sin embargo, a pesar de haber disecado adultos (hembras y machos) de culícidos de varias especies recolectadas en diferentes sitios y momentos del año, no se observó en ningún caso alguna estructura fúngica de harpélidos.

Es posible que los Harpellales sean transportados hacia nuevos ambientes por más de una vía de transmisión, pudiendo variar de acuerdo al tipo de ambiente y momento del año.

### **Prevalencia**

Según la mayor parte de los estudios realizados previamente (Taylor et al 1996, Beard et al 2003, López Lastra et al 2003, Reeves 2004a), los hongos Trichomycetes no presentarían diferencias significativas en la prevalencia a lo largo del año. Sin embargo, Beard & Adler (2002) observaron que existieron diferencias significativas en la prevalencia de *H. melusinae* entre las estaciones en uno de los tres arroyos que relevaron en EEUU. A su vez, Labeyrie et al (1996) observaron diferencias significativas en la prevalencia de Trichomycetes de larvas de simúlidos colectados en diferentes momentos del año.

El presente trabajo aporta datos al conocimiento de la prevalencia de hongos Harpellales a lo largo del año para diferentes ambientes. Los resultados obtenidos a partir de estos estudios coinciden con la mayor parte de los estudios realizados previamente, debido a que no existieron diferencias significativas en el porcentaje de infección entre las distintas estaciones del año. En el seguimiento realizado durante 2 años de los Harpellales creciendo en el tubo digestivo de quironómidos presentes en el agua almacenada entre las hojas de plantas de *E. cabrerae* (fitotelmata), se observó un mayor número de quironómidos infectados por los harpélidos *Sm. phytotelmatum* y *St. lentica* en primavera, verano y otoño (con excepción de la primavera y otoño del 2003 cuando los valores de infección fueron bajos, y el invierno del mismo año, cuando se observó un pico máximo alto (12,86%)). Estos resultados son similares a los obtenidos por Maciá et al (1995, 1996-1997) en estudios de parásitos y patógenos de mosquitos en Argentina, como así también en el estudio realizado por López Lastra et al (2003), quienes estudiaron los cambios temporales en la ocurrencia de Trichomycetes en hospedadores dípteros de floreros en el cementerio de La Plata (Buenos Aires, Argentina). En los estudios realizados por Taylor et al (1996) y Beard & Adler (2002) se reportó una alta prevalencia de *Harpella melusinae* en el tubo digestivo medio de larvas de simúlidos durante el verano y el otoño.

En el seguimiento de las plantas de *E. cabrerae*, en cada fecha de muestreo pocas plantas contenían larvas de quironómidos infectadas, por lo que la mayor parte de las plantas contenían larvas que no estaban infectadas. Debido a que para calcular la prevalencia en cada fecha de muestreo se tuvo en cuenta el número de larvas infectadas de las 10 plantas sobre el total de

larvas presentes en dichas plantas, y, como la mayoría de las plantas presentaban larvas no infectadas, los valores de prevalencia de Harpellales fueron bajos. En las plantas que presentaban larvas infectadas, el porcentaje de infección llegó a valores de hasta 100% en algunos casos.

En el estudio realizado sobre los Harpellales presentes en un campo de arroz inundado artificialmente (Sitio ARR-1, Tabla I), el campo permaneció inundado durante los meses que se han obtenido las muestras. Debido a que el campo de arroz fue inundado hasta el mes de marzo, a principios del mes de julio el agua se restringía solamente a charcos aislados. De esta manera, el período de recolección de las muestras se llevó a cabo entre los meses de enero y julio, abarcando todo el verano y otoño. Se observó que *Stachylina aff. lotica* y *St. grandispora* (en el tubo digestivo de larvas de Chironomidae y *Chironomus* sp. respectivamente) estuvieron presentes en todas las fechas en que se recolectaron las muestras. El presente trabajo representa la primera cita de Trichomycetes asociados a insectos acuáticos en un campo de arroz.

Además de estas especies de Harpellales presentes en larvas de quironómidos, en el campo de arroz aparecieron esporádicamente larvas de *O. albifasciatus* infectadas por *Sm. culicis*. Las larvas del mosquito *Anopheles albitarsis* que fueron recolectadas y disecadas no estuvieron infectadas en ningún caso por un Trichomycete (las larvas de *Anopheles* sp. que fueron recolectadas en el sitio LR-5, como así también las que fueron recolectadas en el sitio ChL-1, tampoco presentaron infecciones por Trichomycetes).

Tampoco se encontraron infecciones por Trichomycetes en larvas de *Cx. pipiens* recolectadas en el campo de arroz. Las larvas de este culícido, presentaron en todas las muestras una gran cantidad de bacterias filamentosas en el tubo digestivo posterior. Es posible que estas bacterias inhiban la adhesión de las tricosporas de Trichomycetes en el tubo digestivo, ya sea porque ocupan todo el tubo digestivo posterior o porque producen alguna sustancia química inhibidora. Por ejemplo, se conoce que determinadas bacterias presentes en el tubo digestivo de insectos, tienen la capacidad de producir diferentes sustancias que afectan el desarrollo y crecimiento de otros habitantes del tubo digestivo (Charkrabarty et al 1995, Azambuha et al 2005). Se conoce muy poco sobre la relación entre los Trichomycetes y el resto de los endobiontes del tubo digestivo de los insectos. Por ejemplo, se observó que los

talos de *Si. microsporus* se asocian principalmente a talos de *Paramoebidium*, por lo que este harpélido se ve beneficiado con la presencia de estos protistas (Lichtwardt et al 2001a). Nelder & McCreadie (2003) observaron que rotíferos bdelloideos presentes dentro del tubo digestivo de larvas de simúlidos son capaces de ingerir las tricosporas de los Trichomycetes que se encuentran en dicho tubo digestivo, reduciendo de esta manera la cantidad de talos presentes. A su vez, se observó que la membrana peritrófica de larvas de simúlidos es modificada por la infección de microsporidios, lo cual facilitaría la adhesión del harpélido *H. melusinae* (Kim & Adler 2005). Sin embargo, estos mismos autores no observaron diferencias significativas en la colonización de otras especies de Harpellales en presencia o ausencia de otros endobiontes tales como microsporidios y mermítidos.

Es común observar talos de Trichomycetes rodeados totalmente por bacterias, por lo que estos hongos podrían favorecer de alguna manera el crecimiento de estas bacterias, afectando indirectamente (positiva o negativamente) al hospedador. Esto último se observa generalmente en hospedadores recolectados en aguas cálidas.

En el estudio realizado en los arroyos seleccionados en la provincia de Buenos Aires en donde se evaluó la presencia de hongos Harpellales en estadios inmaduros de simúlidos, se obtuvo como resultado que *H. meridionalis* y *G. homothallica* estuvieron presentes durante todo el año sin encontrarse una diferencia significativa en el porcentaje de infección. Los porcentajes de larvas infectadas fueron elevados a lo largo del año llegando por lo general hasta 100%. Estos resultados coinciden con los datos publicados por El Sheriff (1975) y Beard & Adler (2002) para *H. melusinae*. A su vez, Taylor et al (1996) registraron que el porcentaje de infección de larvas de simúlidos recolectadas en un arroyo de Inglaterra, varió entre el 80 y 100% a lo largo del año.

Según se pudo observar en los estudios realizados en laboratorio sobre la resistencia de tricosporas de *Sm. culisetae* frente a diferentes condiciones, como así también en la mayoría de los estudios de prevalencia y estacionalidad, los factores bióticos y abióticos no afectarían directamente la viabilidad de los hongos Trichomycetes mientras el ambiente se mantenga con agua, por lo que estos hongos pueden soportar diferentes condiciones naturales sin que se vea afectada su viabilidad. Sin embargo, estos factores

pueden afectar a los hospedadores en su biología o en su capacidad de colonizar nuevos ambientes y por lo tanto, afectan indirectamente a los hongos. Esto último, podría explicar que en determinadas situaciones pueda existir una variación significativa de la prevalencia de estos hongos a lo largo del año.

En ciertos momentos del año podría prevalecer la persistencia del hongo en el ambiente, mientras que durante otros períodos podría predominar la incorporación de nuevo inóculo. Por ejemplo, en el seguimiento de los Harpellales de las "plantas fijas" de *E. cabrerae*, se observó que no hubo infecciones entre los meses de marzo y octubre, por lo que se sugiere que la transmisión ocurre más frecuentemente en los meses cálidos, mientras que en los meses más fríos el inóculo persiste en el agua almacenada o dentro de las larvas.

Muchos insectos pasan los períodos más fríos como larvas y pueden entrar en diapausa (Bradshaw & Holzapfel 1977, Copeland & Craig 1989), por lo que el inóculo podría mantenerse en el ambiente hasta que los insectos salgan de ese estado de "quiescencia". Luego, al comenzar el período más cálido, las larvas salen del estado de diapausa y comienzan a alimentarse, por lo que ingerirían las tricosporas que lograron mantenerse en el ambiente. Reeves (2004a) al encontrar que el mayor porcentaje de infección de larvas de mosquitos ocurría en el comienzo del período frío, propuso que esto sucedería debido a que las larvas al salir del estado de diapausa comenzaban a ingerir mayor cantidad de alimento (y por ende de tricosporas). Este autor sugirió también que como durante el período frío las larvas no se alimentan, las esporas se acumulan en el ambiente. De esta manera, durante el período frío predominaría la acumulación de tricosporas, mientras que en los meses más cálidos en donde ocurre una mayor emersión de los adultos, estos podrían ser los encargados de transmitir el inóculo hacia nuevos sitios.

### ***Relación insecto-hongo***

Al igual que para otros insectos, el tamaño de las especies de mosquitos tiene una base genética, pero el tamaño de los imagos puede ser un reflejo de factores ambientales, de la cantidad y calidad de alimento disponible de sus estadios inmaduros, y de la densidad de las larvas (Christopher 1960, Clements 1992, Maciá 1996). Experimentos realizados con varias especies de

culícidos y de otros insectos, demostraron que estos factores que afectan el tamaño de los individuos también afectan su potencial reproductivo (Colbo & Porter 1981, Scriber & Slansky 1981). Por ejemplo, en experiencias en donde fueron adicionadas cantidades crecientes de alimento en recipientes con una baja densidad larval, hubo un incremento en el tamaño de los adultos, asociado con el incremento de alimento hasta una determinada cantidad (Clements 1992). Este incremento en el tamaño de los individuos produce un mayor poder reproductivo, por lo que las hembras más grandes tienen la capacidad de poner un mayor número de huevos (Lounibos et al 1990, Maciá 1996).

De acuerdo a los estudios que sugieren que los Harpellales bajo condiciones de escasez de determinados nutrientes pueden beneficiar a sus hospedadores, el tamaño y la fecundidad de los individuos adultos podrían estar beneficiados por la presencia de harpélidos en los estados inmaduros. En las experiencias realizadas en el presente estudio, se evaluó el efecto que tiene el harpélido *Sm. culisetae* sobre la fecundidad y tamaño de las hembras adultas de *Ae. aegypti* criadas con altos y bajos niveles de alimento. Existieron diferencias significativas entre la fecundidad de las hembras que habían sido criadas con mucho alimento y las que fueron criadas con una escasa cantidad de alimento, pero no existieron diferencias significativas en la fecundidad de las hembras adultas criadas con o sin hongo. De esta manera, el hongo no tuvo un efecto positivo sobre el tamaño de las hembras hospedadoras criadas con poco alimento, las cuales tuvieron un tamaño menor y por ende una menor fecundidad que las hembras criadas con mucho alimento.

### ***Harpellales patógenos***

Las diferencias morfológicas existentes entre el harpélido patógeno de mosquitos *Sm. morbosum* con respecto a *Sm. culisetae* y *Sm. culicis* no son muy marcadas, por lo que es conveniente realizar ensayos de patogenicidad para diferenciarla de estas últimas. Para esto, tal como se explica en la metodología de los ensayos realizados en el presente estudio, se debe filtrar el cultivo por medio de una malla fina para descartar el micelio. A su vez, en la infección de las larvas es conveniente utilizar suspensiones de tricosporas de aproximadamente 3000 ts / ml. En las infecciones causadas por *Sm. morbosum* además de ocasionarse la muerte de las larvas, se observan zonas de

melanización (en la región en donde el hongo penetró el tubo digestivo del hospedador), mientras que en las infecciones causadas por *Sm. culisetae* y *Sm. culicis* las larvas no mueren y no se observan zonas de melanización.

La presencia en la República Argentina del hongo patógeno de mosquitos *Sm. morbosum* fue citada en varios trabajos (López Lastra 1990, García et al 1994, Campos et al 1995, Maciá 1995, Maciá et al 1996-1997, Lichtwardt et al 1999). A pesar de que en el presente trabajo se realizó la prospección de diversos sitios donde crían larvas de culícidos, incluso en lugares donde se había citado previamente la presencia de *Sm. morbosum*, no se ha registrado nuevamente dicha especie en ningún sitio u oportunidad posterior.

Con el objetivo de demostrar que el hongo presente en diversas especies de culícidos en Argentina era *Sm. morbosum*, López Lastra (1990) realizó pruebas de laboratorio infectando larvas de mosquitos con cultivos de esta especie. Como resultado obtuvo mortalidades de hasta el 100% de las larvas, por lo que llegó a la conclusión de que se trataba indudablemente del hongo patógeno de culícidos. A pesar de esto, los casos citados de *Sm. morbosum* para la Argentina podrían haber sido un error, pudiendo en realidad haberse tratado de las especies *Sm. culisetae* o *Sm. culicis*. En los ensayos de laboratorio realizados por López Lastra, la infección de las larvas fue realizada mediante la inoculación directa del cultivo. Cuando las larvas ingieren dicho cultivo, el micelio del hongo les produce una obturación del tubo digestivo provocándoles la muerte. De esta manera, la mortalidad de las larvas en dichos ensayos podría haberse debido a un error en la metodología utilizada y no a la presencia de *Sm. morbosum*. Esto mismo puede haber ocurrido en el resto de los trabajos realizados en la República Argentina, y en los cuales se han citado a *Sm. morbosum* afectando larvas de culícidos.

Las hembras de mosquitos, previamente a la postura de los huevos, "prueban" el agua para detectar indicadores químicos (Bentley & Day 1989), los cuales pueden ser producidos por las larvas, o incluso por los huevos de los mosquitos. En el caso de *Ae. aegypti* las hembras prefieren poner los huevos donde existan huevos o larvas de la misma especie (Allan & Kline 1998). A su vez, los organismos simbioses asociados a las larvas de mosquitos pueden producir (directa o indirectamente) ciertos químicos, haciendo más o menos



atractivo el sitio de oviposición hacia las hembras de mosquitos. Por ejemplo, cuando las larvas son infectadas por el trematode *Plagiorchis elegans* (Rudolphi), se producen ciertos químicos que hacen menos atractivo el sitio de oviposición, por lo que las hembras no oviponen en esos criaderos (Zahiri et al 1997). Reeves (2004b) al comparar las posturas de huevos en sitios que presentaban simbiosis de larvas de mosquitos, encontró que no había diferencias en el número de huevos puestos entre sitios con *Sm. morbosum* y sitios libres de este patógeno. Esto resulta muy interesante debido a que esto favorece al mantenimiento del hongo en determinados sitios, regulando a las poblaciones de mosquitos. Sin embargo, en los ensayos realizados por Reeves, no murió ninguna de las larvas de mosquito a causa del hongo *Sm. morbosum*, por lo que posiblemente este autor haya utilizado cultivos de *Sm. culisetae* o *Sm. culicis*, y no cultivos del hongo patógeno.

## 8 - CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En relación a las hipótesis planteadas, a los objetivos propuestos y a los resultados obtenidos en el presente estudio, se pueden presentar las siguientes conclusiones:

- i) La República Argentina presenta una amplia diversidad de especies de hongos Trichomycetes gracias a su variedad de ambientes acuáticos y climas diferentes a lo largo de toda su extensión.
- ii) En el presente estudio, se aportan importantes datos sobre la diversidad de Trichomycetes en Argentina, habiéndose descrito 5 nuevas especies. Además, se realizaron nuevos registros de Trichomycetes que no habían sido encontrados aún en nuestro país.
- iii) A su vez, se amplió la distribución de especies a nivel geográfico, como así también se amplió el espectro hospedador de varias especies de Harpellales.
- iv) Las tricosporas de *Smittium culisetae* resisten a un amplio rango de temperaturas, salinidad y pH, por lo que estas esporas cumplirían un rol fundamental en la permanencia de estos hongos en el ambiente.
- v) Las tricosporas no resisten condiciones de deshidratación, por lo que es necesario que el ambiente se mantenga con agua para que estas puedan permanecer viables.
- vi) El éxito que han presentado los Trichomycetes al haber colonizado diferentes ambientes acuáticos alrededor del mundo, se debe en gran parte a la presencia de las tricosporas, las cuales se forman en gran número dentro del hospedador y tienen una gran capacidad de mantenerse viables durante largos períodos libres en el ambiente. Sin embargo, la distribución cosmopolita de estos hongos también debe explicarse por un efectivo mecanismo de transmisión del inóculo, aunque hasta el momento se conoce muy poco sobre la transmisión de los Trichomycetes.
- vii) Se desconoce si los culícidos adultos tienen la capacidad de transmitir el inóculo fúngico.

- viii) Las condiciones ambientales pueden afectar directamente a los hospedadores de los hongos Trichomycetes. De esta manera, los hongos Trichomycetes podrían ser afectado indirectamente, por lo que bajo determinadas condiciones podrían existir diferencias en la prevalencia de estos hongos a lo largo del año.
- ix) Las hembras adultas de *Ae. aegypti* emergidas de larvas criadas con poca cantidad de alimento e infectadas por el harpélido *Sm. culisetae*, no se vieron beneficiadas, por lo que no hubo incremento en su tamaño y fecundidad.

Las actividades desarrolladas por el hombre están causando la pérdida de un gran número de ambientes, y consecuentemente de la biodiversidad. Es por esto que es necesario realizar mayores relevamientos en áreas inexploradas de este país, ya que se estima que existe un gran número de especies de Trichomycetes por descubrirse. La situación de escaso conocimientos sobre la diversidad de estos hongos no solo ocurre en Argentina, sino que también ocurre en toda Latinoamérica, en donde solo se han realizado unos pocos trabajos sobre estos hongos.

La relación que presentan los hongos Trichomycetes con sus hospedadores, sigue siendo pobremente conocida, por lo que es necesario realizar diferentes trabajos para conocer mejor dicha relación.

**9 - BIBLIOGRAFIA**

Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer C, Smirnov AV, Spiegel FW & Taylor MF. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protist. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**: 399-451.

Aldunate MT, Echechipía S, Gómez B, García BE, Olaguibel JM, Rodríguez A, Moneo I & Tabar I. 1999. Quironómidos y otras causas de alergia a comida de peces. *Alergol. Inmunol. Clin.* **14**: 140-145.

Alencar YB, Ríos-Velásquez CM, Lichtwardt RW & Hamada N. 2003. Trichomycetes (Zygomycota) in the digestive tract of arthropods in Amazonas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **98**: 799-810.

Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. & Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th ed. John Wiley & Sons, New York. 868 pp.

Allan SA & Kline DL. 1998. Larval rearing water and preexisting eggs influence oviposition by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **35**: 943-947.

Azambuha P, Garcia ES & Ratcliffe NA. 2005. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol.* **21**: 568-572.

Bass D. 1986. Larval Chironomidae (Diptera) of the Big Thicket streams. *Hydrobiologia* **135**: 271-285.

Beard CE & Adler PH. 2002. Seasonality of Trichomycetes in larval black flies from South Carolina, USA. *Mycologia* **94**: 200-209.

Beard CE, McCreadie JW & Adler PH. 2003. Prevalence of the trichomycete fungus *Harpella melusinae* (Harpellales: Harpellaceae) in larval black flies (Diptera: Simuliidae) across a heterogeneous environment. *Mycologia* **95**: 577-583.

Becnel JJ, García JJ & Johnson MA. 1995. *Edhazardia aedis* (Microspora: Culicosporidae) effects on the reproductive capacity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **32**: 549-553.

Benjamín RK, Blackwell M, Chapela IH, Humber RA, Jones KG, Klepzia KD, Lichtwardt RW, Malloch D, Noda H, Roeper RA, Spatafora JW & Weir A. 2004. Insect- and other arthropod- Associated fungi. *En: Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. G. M. Mueller, G. F. Bills & M. S. Foster eds. Elsevier Academic Press, San Diego, CA. 777 pp.

Benny GL & O'Donnell K. 2000. *Amoebidium parasiticum* is a protozoan, not a Trichomycete. *Mycologia* **92**: 1133-1137.

Benny GL. 2001. Zygomycota: Trichomycetes. *En: The Mycota, VII Part A, systematics and evolution*. McLaughlin, McLaughlin & Lemke eds. Springer-Verlag, Berlin, pp. 147-160.

Bentley MD & Day JF. 1989. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. *Annu. Rev. Entomol.* **34**: 401-421.

Bradshaw WE & Holzapfel CM. 1977. Interaction between photoperiod, temperature, and chilling in dormant tree-hole mosquito, *Toxorhynchites rutilus* (Coq.). *Biol. Bull.* **152**:147-158.

Cafaro MJ. 2000. Gut fungi in isopods: the genus *Palavascia*. *Mycologia* **92**: 361-369.

Cafaro MJ. 2002. Species richness patterns in symbiotic gut fungi (Trichomycetes). *Fung. Divers.* **9**: 47-56.

Cafaro MJ. 2003. Systematics of the Trichomycetes as an ecological group with emphasis on the phylogeny of Eccrinales and Asellariales based on rDNA sequences. Ph. D. Dissertation, University of Kansas, Lawrence. 196 pp.

Cafaro MJ. 2005. Eccrinales (Trichomycetes) are not fungi, but a clade of protists at the early divergence of animals and fungi. *Mol. Phylogenet. Evol.* **35**: 21-34.

Campos RE, Macia A & Garcia JJ. 1995. Seasonality of *Psorophora* spp. populations (Diptera: Culicidae) and survey of parasites and pathogens in Buenos Aires Province, Argentina. *Acta Ent. Chilena* **19**: 113-121.

Campos RE & Lounibos P. 1999. *Eryngium* spp. (Umbelliferae) as Phytotelmata and their *Culex* (*Culex*) inhabitants in Temperate Argentina. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **15**: 493-499.

Charkrabarty D, Mondal B, Pal SC & Sen SK. 1995. Characterisation and identification of broad spectrum antibiotic producing *Streptomyces hygroscopicus* D1.5. *Hind. Antibiot. Bull.* **37**: 37-43.

Christophers SR. 1960. *Aedes aegypti* (L.). *The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure*. Cambridge Univ. Press, Londres, 739 pp.

Cilek JE & Knapp FW. 1992. Distribution and control of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) in a polluted creek. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **8**: 181-183.

Clements AN. 1992. *The Biology of the Mosquitoes*. Volume I: Development, nutrition and reproduction. Ed- Chapman & Hall, New York. 509 pp.

Colbo MH & Porter GN. 1981. The interaction of rearing temperature and food supply on the life history of two species of simuliidae (diptera). *Can. J. Zool.* **59**: 158-163.

Copeland RS & Craig GB Jr. 1989. Winter cold influences the spatial and age distributions of the North American treehole mosquito *Anopheles barberi*. *Oecologia* **79**: 287-292.

Crosskey, R. W. 1990. *The natural history of blackflies*. John Wiley & Sons, New York. 711 pp.

de Bary, A., *Die Erscheinung der Symbiose. Vortrag, gehalten auf der Versammlung Deutscher Naturforscher und Aerzte zu Cassel.* 1879, Strassburg: R. J. Trübner.

Donato MH & Paggi AC. 2005. A new Neotropical species of the genus *Metriocnemus* van der Wulp (Chironomidae: Orthocladiinae) from *Eryngium* L. (Apiaceae) phytotelmata. *Zootaxa* **1050**: 1-14.

Duboscq O, Léger L & Tuzet O. 1948. Contribution à la connaissance des Eccrinides: les Trichomycètes. *Archiv. Zool. Exp. Gén.* **86**: 29-144.

El-Buni AM. 1975. *Factors affecting sporulation, growth and spore germination in species of Smittium (Trichomyces)*. Ph. D. Dissertation, University of Kansas, Lawrence. 136 pp.

El-Sherif HK. 1975. *Microsporidian and fungal infections of larval blackfly (Simuliidae) in rivers and streams of North Wales and South East England*. Ph. D. Thesis, University of London, U. K. 369 pp.

Fish D. 1983. Phytotelmata: flora and fauna. *En: Phytotelmata: terrestrial plants as hosts for aquatic insect communities*. J. H. Frank & L. P. Lounibos eds. Plexus, Medford, New Jersey, USA:1-27.

Frost JA. 1996. *Trichomycetes in chironomids and mayflies at Vinegar Lake, Nova Scotia*. Bachelor of Science (Honours Biology) Thesis, Saint Mary's University, Halifax, Nova Scotia, Canada. 42 pp.

García JJ, Campos RE & Maciá A. 1994. Prospección de enemigos naturales de Culicidae (Diptera) de la selva marginal de Punta Lara (Prov. de Buenos Aires, Republica Argentina). *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exactas Fis. Nat.* **19**: 209-215.

García JJ, Campos RE & Maciá A. 1995. Observaciones ecológicas sobre *Mansonia indubitans* y *Ma. titillans* (Diptera: Culicidae) y sus enemigos naturales en Punta Lara, Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* **54**: 43-50.

Garms R. 1975. Observations on filarial infections and parous rates of anthropophilic blackflies in Guatemala, with reference to the transmission of *Onchocerca volvulus*. *Tropenmed. Parasitol.* **26**: 169-182.

Gerberg E, Bernard D & Ward D. 1994. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. *Bulletin N°5. J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 98 pp.

Goettel MS. 1987. Field incidence of mosquito pathogens and parasites in central Alberta. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **3**: 231-238.

Gottlieb AM & Lichtwardt RW. 2001. Molecular variation within and among species of Harpellales. *Mycologia* **93**: 66-81.

Green AJ & Sánchez MI. 2006. Passive internal dispersal of insect larvae by migratory birds. *Biol. Lett.* **2**: 55–57.

Grigg RD & Williams MC. 1989. Distribution of *Amoebidium* and *Smittium* species (Trichomycetes) in mosquito larvae on the Platte River floodplain of Central Nebraska. *Trans. Nebraska Acad. Sci.* **17**: 23-28.



Horn BW & Lichtwardt RW. 1981. Studies on the nutritional relationship of larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Smittium culisetae* (Trichomycetes). *Mycologia* **73**: 724-740.

Horn BW. 1989a. Physiological and ultrastructural studies on host-mediated sporangiospore extrusion from trichospores of *Smittium culisetae* and other *Smittium* Ph. D. Dissertation, University of Kansas, Lawrence. 74 pp.

Horn BW. 1989b. Requirement for potassium and pH shift in host-mediated sporangiospore extrusion from trichospores of *Smittium culisetae* and other *Smittium* species. *Mycol. Res.* **93**: 303-313.

Kim SK & Adler PH. 2005. Multiple simbiotes in larval black flies (Diptera: Simuliidae): Associations of trichomycete fungi with ichthyosporean, mermithid nematodes, and microsporidia. *J. Invertebr. Pathol.* **88**: 247-253.

Labeyrie ES, Molloy DP & Lichtwardt, R. W. 1996. An investigation of Harpellales (Trichomycetes) in New York State blackflies (Diptera: Simuliidae). *J. Invertebr. Pathol.* **68**: 293-298.

Léger L & Duboscq O. 1929. *Harpella melusinae* n.g. sp. Entophyte eccliniforme parasite des larves de Simulie. C- R. Hebd. *Seances Acad. Sci. Paris* **188**: 951-954.

Leidy J. 1849. *Enterobrus*, a new genus of Confervaceae. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia* **4**: 225-233.

Lichtwardt RW. 1972. Undescribed genera and species of Harpellales (Trichomycetes) from the guts of aquatic insects. *Mycologia* **64**: 167-197.

Lichtwardt RW & Williams MC. 1983a. Two unusual Trichomycetes in an aquatic midge larva. *Mycologia* **75**: 728-734.

Lichtwardt RW & Williams MC. 1983b. A new *Legeriomyces* (Harpellales) with variable trichospore size. *Mycologia* **75**: 757-761.

Lichtwardt RW. 1986. *The Trichomycetes: Fungal Associates of Arthropods*. Springer-Verlag, New York. 343 pp.

Lichtwardt RW & Williams MC. 1988. Discovery of sexual reproduction in an unusual new species of *Stachylina* (Trichomycetes). *Mycologia* **80**: 400-405.

Lichtwardt RW & Williams MC. 1990. Trichomycete gut fungi in Australian aquatic larvae. *Can. J. Bot.* **68**: 1057-1074.

Lichtwardt RW & Williams MC. 1992. Western Australian species of *Smittium* and other Trichomycetes in aquatic insect larvae. *Mycologia* **84**: 392-398.

Lichtwardt, R. W. 1994. Trichomycete fungi living in the guts of Costa Rican phytotelm larvae and other lentic dipterans. *Rev. Biol. Trop.* **42**: 31-48.

Lichtwardt RW. 1996. Trichomycetes and the arthropod gut. *En: The Mycota, animal and human relations*. D. Howard & D. Miller eds. Springer-Verlag, New York. pp. 315-330.

Lichtwardt RW & Arenas J. 1996. Trichomycetes in aquatic insects from southern Chile. *Mycologia* **88**: 844-857.

Lichtwardt, RW. 1997. Costa Rican gut fungi (Trichomycetes) infecting lotic insect larvae. *Rev. Biol. Trop.* **45**: 1339-1383.

Lichtwardt RW & Grigg RD. 1998. Four new *Smittium* species inhabiting the hindgut of Chironomidae larvae. *Mycologia* **90**: 427-433.

Lichtwardt RW, Ferrington LCJr & López Lastra C. 1999. Trichomycetes in Argentinean aquatic insect larvae. *Mycologia* **91**: 1060-1082.

Lichtwardt RW, López Lastra CC & Mazzucchelli MG. 2000. Fungi living in the guts of larval aquatic insects in northwestern Argentina. *Mycologia* **92**: 332-340.

Lichtwardt RW, Cafaro MJ & White MM. 2001a. The Trichomycetes, fungal associates of arthropods. Revised Edition. Published on the Internet [www.nhm.ku.edu/~fungi](http://www.nhm.ku.edu/~fungi).

Lichtwardt RW, White MM & Colbo, M. H. 2001b. Harpellales in Newfoundland aquatic insect larvae. *Mycologia* **93**: 764-773.

López Lastra CC. 1990. Primera cita de *Smittium morbosum* var. *rioplatensis* var. nov. (Trichomycetes: Harpellales) patógeno de 5 especies de mosquitos (Diptera: Culicidae) en la República Argentina. *Rev. Argent. Micol.* **13**: 14-18.

López Lastra CC. 1997. Primera cita de *Smittium culisetae* y *S. culicis* (Trichomycetes: Harpellales) en larvas de mosquitos (Diptera: Culicidae) de la República Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* **33**: 43-46.

López Lastra CC, García JJ & Micieli MV. 2002. Symposium Microecology of Entomopathogenic Fungi. Microecology of entomopathogenic fungi from aquatic environments. En: VIII International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control (ICIPMC). XXXV Annual Meeting of the SIP. VI International Conference on *Bacillus thuringiensis* (ICBt). Foz do Iguassu, Brasil.

López Lastra CC, Mazzucchelli MG & Dikgolz V. 2003. Temporal changes in the prevalence of three species of Trichomycetes (Zygomycota: Zygomycotina) in Dipteran aquatic larvae from Argentina. *Fung. Divers.* **14**: 85-93.

López Lastra CC, Scorsetti AC, Marti GA & Coscarón S. 2005. Trichomycetes living in the guts of aquatic insects of Misiones and Tierra del Fuego, Argentina. *Mycologia* **97**: 320-328.

Lord JC & Roberts DW. 1985. Effects of salinity, pH, organic solutes, anaerobic condition and the presence of other microbes on production and survival of

Lagenidium giganteum (Oomycetes: Lagenidiales) zoospores. *J. Invertebr. pathol.* **45**: 331-338.

Lounibos LP, Larson VL & Morris CD. 1990. Parity, fecundity and body size of *Mansonia dyari* in Florida. *Mosq. News.* **6**: 121-126.

Maciá A, García JJ & Campos RE. 1995. Bionomía de *Aedes albifasciatus* y *Ae. crinifer* (Diptera: Culicidae) y sus enemigos naturales en Punta Lara, Buenos Aires. *Neotrópica* **41**: 43-50.

Maciá A. 1996. Variación intraespecífica del tamaño de adultos de Culicidae (Diptera) en el área platense, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Acta Ent. Chilena* **20**: 63-70.

Maciá A, García JJ & Campos RE. 1996-1997. Variación estacional de tres especies de *Culex* (Diptera: Culicidae) y sus parásitos y patógenos en Punta Lara, Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Biol. Trop.* **44(3)/45(1)**: 267-275.

Manier JF & Lichtwardt RW. 1968. Révision de la systématique des Trichomycètes. *Ann. Sci. Nat. Bot.* **12, 9**: 519-532.

McCreadie JW, Beard CE & Adler PH. 2005. Context-dependent between black flies (Diptera: Simuliidae) and trichomycete fungi (Harpellales: Legeriomycetaceae). *Oikos* **108**: 362-370.

Mendoza L, Taylor JW & Ajello L. 2002. The Class Mesomycetozoea: a heterogeneous group of microorganisms at the animal-fungal boundary. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 315-344.

Merriam TL & Axtel RC. 1983. Relative toxicity of certain pesticides to *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales), a fungal pathogen of mosquito larvae. *Environ. Entomol.* **12**: 515-521.

Misra JK. 1998. Trichomycetes - fungi associated with arthropods: review and world literature. *Symbiosis* **42**: 179-220.

Misra JK. 2000. Growth, sporulation and pH tolerance of *Furculomyces boomerangus* and *Austrosmittium bifforme* in axenic culture. *Mycologia* **92**: 1051-1056.

Misra JK & Lichtwardt RW. 2000. Illustrated genera of Trichomycetes: fungal symbionts of insects and other arthropods. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire. 155 pp.

Misra JK & Horn BW. (eds). 2001. Trichomycetes and other fungal groups. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire, USA. 396 pp.

Moss ST. 1970. Trichomycetes inhabiting the digestive tract of *Simulium equinum* larvae. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **54**: 1-13.

Moss ST. 1975. Septal structure in the Trichomycetes with special reference to *Astreptonerna gammari* (Eccrinales). *Trans. Br. Mycol. Soc.* **65**: 115-127.

Moss ST. 1976. Formation of the trichospore appendage in *Stachylina grandispora* (Trichomycetes). *En: Microbial Ultrastructure. The Use of the Electron Microscope*. R. Fuller & D. W. Lovelock eds. Academic Press, New York. pp. 279-294.

Moss ST & Lichtwardt RW. 1976. Development of trichospores and their appendages in *Genistellospora homothallica* and other Harpellales and fine-structural evidence for the sporangial nature of trichospores. *Can. J. Bot.* **54**: 2346-2364.

Moss ST & Young TWK. 1978. Phyletic considerations of the Harpellales and Asellariales (Trichomycetes, Zygomycotina) and the Kickxellales (Zygomycetes, Zygomycotina). *Mycologia* **70**: 944-963.

Moss ST & Descals E. 1986. A previously undescribed stage in the life cycle of Harpellales (Trichomycetes). *Mycologia* **78**: 213-222.

Moss ST. 1998. Harpellales (Trichomycetes); mycobionts of Insecta. *Bot. J. Scot.* **50**: 137-152.

Moss, S.T. 1999. *Astreptonema gammari*: an eccrinid with appendaged spores. *Kew Bull.* **54**: 637-650.

Nelder MP & McCreddie JW. 2003. Bdelloid rotifers (Rotifera: Bdelloidea) inhabiting larval black flies (Diptera: Simuliidae) and their effect on Trichomycete (Zygomycota) fungal abundance. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* **105**: 794-796.

Nelder MP, Beard CE, Adler PH, Kim SK & McCreddie JW. 2006. Harpellales (Zygomycota: Trichomycetes) associated with black flies (Diptera: Simuliidae): world review and synthesis of their and taxonomy ecology. *Fung. Divers.* **22**: 121-169.

O'Donnell K, Cigelnick E & Benny GL. 1998. Phylogenetic relationships among the Harpellales and Kickxellales. *Mycologia* **90**: 624-639.

O.M.S..2004.[www.who.int/infectiousdisease-report/idr99-spanish/pages/ch3text](http://www.who.int/infectiousdisease-report/idr99-spanish/pages/ch3text)

Pelizza SA, López Lastra CC, Becnel JJ, Bisaro V & García JJ. 2007. Effects of temperature, pH and salinity on the infection of *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Peronosporomycetes) in mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **96**: 133-137.

Pereira EW, Ferreira RLM, Hamada N & Lichtwardt RW. 2005. Trichomycete fungi (Zygomycota) associated with mosquito larvae (Diptera: Culicidae) in natural and artificial habitats in Manaus, AM Brazil. *Neotrop. Entomol.* **34**: 325-329.

- Peters W. 1992. *Peritrophic membranes*. Springer-Verlag New York, Inc. 238 pp.
- Petersen JJ & Chapman HC. 1970. Chemical characteristics of habitats producing larvae of *Aedes sollicitans*, *Aedes taeniorhynchus*, and *Psorophora confinnis* in Louisiana. *Mosq. News* **30**:156-161.
- Pinder LCV. 1995. The habitats of chironomid larvae. *En: The Chironomidae. The Biology and Ecology of non-biting midges*. P. Armitage, P. C. Cranston & L. C. V. Pinder eds. Chapman & Hall, London, pp. 107-135.
- Reeves WK 2004a. Temporal distribution of *Smittium culisetae* in a wild population of *Wyeomyia smithii* from pitcher plants. *Mycologia* **96**: 1233-1235.
- Reeves WK. 2004b. Oviposition by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in relation to conspecific larvae infected with internal symbiotes. *J. Vect. Ecol.* **29**: 159-163.
- Richards OW & Davies RG. 1983. *Tratado de Entomología Imms*. Vol. 1: Estructura, Fisiología y Desarrollo. Ed. Omega, Barcelona. 438 pp.
- Rizzo AM & Pang KL. 2005. A zygosporic stage of the Harpellales (Trichomycetes, Zygomycota) associated with simuliid egg masses. *Mycol. Res.* **109**: 266-270.
- Saikawa M, Sugiura K & Sato H. 1997. Electron microscopy of two trichomycetous fungi attached to the hindgut lining of pill bugs. *Can. J. Bot.* **75**: 1479-1484.
- Sangar VK, Lichtwardt RW, Kirsch JAW & Lester RN. 1972. Immunological studies on the fungal genus *Smittium* (Trichomycetes). *Mycologia* **64**: 342-358.
- Sato H & Aoki J. 1989. Electron microscopy of the holdfast of *Smittium culisetae* (Harpellales). *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* **30**: 437-443.

Scriber JM & Slansky FJr. 1981. The nutritional ecology of immature insects. *Ann. Rev. Entomol.* **26**: 183-211.

Shimada N, Kumini Y, Sato R & Iwahana H. 1995. Factors affecting susceptibility of *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) larvae to *Smittium morbosum* Sweeney (Trichomycetes: Harpellales). *Appl. Entomol. Zool.* **30**: 67-73.

Starr AM, Lichtwardt RW, McChesney JD & Baer TA. 1979. Sterols synthesized by cultured Trichomycetes. *Archiv. Microbiol.* **120**: 185-189.

Sther, FW. 1991. Order Diptera. *En: Immature Insects*. Vol 2. Kendall / Hunt Publishing Co., IOWA. 975 pp.

Svoboda JA & Robbins WE. 1975. Insects steroid metabolism. *Ann. Rev. Entomol.* **20**: 205-220.

Sweeney AW. 1981a. An undescribed species of *Smittium* (Trichomycetes) pathogenic to mosquito larvae in Australia. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **77**: 55-60.

Sweeney AW. 1981b. Fungal pathogens of mosquito larvae. *En: Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*. E. W. Davidson ed. Allanheld, Osmun & Co., Totowa, New Jersey. pp. 403-424.

Taylor MR, Moss ST & Ladle M. 1996. Temporal changes in the level of infestation of *Simulium ornatum* Meigen (Complex) (Simuliidae: Diptera) larvae by endosymbiotic fungus *Harpella melusinae* Lichtwardt (Harpellales: Trichomycetes). *Hydrobiologia* **328**: 117-125.

Tuzet O, Rioux JA & Manier JF. 1961. *Rubetella culicis* (Tuzet et Manier 1947), Trichomycète rameux parasite de l'ampoule rectale des larves de Culicides (morphologie et spécificité). *Vie et Milieu* **12**: 167-187.



Undeen AH & Nolan RA. 1977. Ovarian infection and fungal spore oviposition in the blackfly *Prosimulium mixtum*. *J. Invertebr. Pathol.* **30**: 97-98.

Valle LG & Santamaría S. 2004. The genus *Smittium* (Trichomycetes, Harpellales) in the Iberian Peninsula. *Mycologia* **96**: 682-701.

Valle GL & Cafaro MJ. 2008. First report of Zygosporae in Asellariales and new species from the Caribbean. *Mycologia* **101**: 122-131.

Whisler HC. 1963. Observations on some new and unusual enterophilous Phycomycetes. *Can. J. Bot.* **41**: 887-900.

White MM, Cafaro MJ & Lichtwardt RW. 2000. Arthropod gut fungi from Puerto Rico and summary of tropical Trichomycetes worldwide. *Caribbean J. Sci.* **36**: 210-220.

White MM. 2002. Taxonomic and molecular systematic studies of the Harpellales (Trichomycetes) toward understanding the diversity, evolution and dispersal of gut fungi. *Ph.D. Dissertation*, University of Kansas. 172 p.

White MM & Lichtwardt RW. 2004. Fungal symbionts (Harpellales) in Norwegian aquatic insect larvae. *Mycologia* **96**: 891-910.

White MM, James TY, O'Donnell K, Cafaro MJ, Tanabe Y & Sugiyama J. 2006a. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia* **98**: 872-884.

White M, Siri A & Lichtwardt RW. 2006b. Trichomycete insect symbionts in Great Smoky Mountains National Park and vicinity. *Mycologia* **98**: 333-352.

Williams MC & Lichtwardt RW. 1972a. Infection of *Aedes aegypti* larvae by axenic cultures of the fungal genus *Smittium* (Trichomycetes). *Am. J. Bot.* **59**: 189-193.

Williams MC & Lichtwardt RW. 1972b. Physiological studies on the cultured Trichomycete, *Smittium culisetae*. *Mycologia* **64**: 806-815.

Williams MC. 1983. Spore longevity of *Smittium culisetae* (Harpellales, Legeriomycetaceae). *Mycologia* **75**: 171-174.

Williams MC & Nagel HG. 1980. Occurrence of Trichomycete fungi in mosquito larvae near Kearney, Nebraska. *Mosquito News* **40**: 445-447.

Williams MC & Lichtwardt RW. 1984. Two *Stachylina* and two *Smittium* species (Trichomycetes) from Montana. *Mycologia* **76**: 204-210.

Williams MC & Lichtwardt RW. 1990. Trichomycete gut fungi in New Zealand aquatic insect larvae. *Can. J. Bot.* **68**: 1045-1056.

Williams MC & Lichtwardt RW. 1993. A new monotypic fungal genus, *Allantomyces*, and a new species of *Legeriomyces* (Trichomycetes, Harpellales) in the hindgut of a Western Australian mayfly nymph (*Tasmanocoenis* sp.). *Can. J. Bot.* **71**: 1109-1113.

Yeboah DO, Undeen AH & Colbo MH. 1984. Phycomycetes parasitizing the ovaries of blackflies (Simuliidae). *J. Invertebr. Pathol.* **43**: 363-373.

Zahiri N, Rau ME, Lewis DJ & Khanizadeh S. 1997. Intensity and site of *Plagiorchis elegans* (Trematoda: Plagiorchiidae) infections in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae affect the attractiveness of their waters to ovipositing, conspecific females. *Environ. Entomol.* **26**: 920-923.

**10 - ANEXOS****Medios de cultivo****a) BHIA 1/10**

Infusión cerebro - corazón.....	3.7 g
Agua destilada.....	1 litro
Agar.....	15 g

**b) TGv**

Triptona.....	20 g
Glucosa.....	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	28 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.35 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0.26 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	0.10 g
CaCl-2H <sub>2</sub> O.....	0.07 g
Tiamina-HCl.....	200 ug
Biotina.....	50 ug
Agua destilada.....	1 litro
Agar.....	15 g

**c) BHIGTv:**

Este medio está compuesto por una mezcla 1:1 de los medio BHI 1/10 y TGv.

(los medios fueron esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 1 atm)

**Colorantes****Azul de algodón-Lactofenol de Ammann (*Stevens R.B., 1974*)**

Fenol (cristales).....	20 g
Ácido láctico.....	20 g (16 ml)

Agua destilada..... 20 g (20 ml)  
Glicerol..... Azul de algodón

Los ingredientes se mezclan y se calientan, y luego se agrega el azul de algodón

### **Antibióticos**

*Penicilina 40.000 unidades 1.150 mg/ 50 ml*

*Estreptomina (SO<sub>4</sub> estreptomina) 80.000 unidades 528,5 mg/ 50ml*

Agua destilada estéril 50 ml

### **Cloranfenicol-Gentamicina:**

*Cloranfenicol 250 mg/ 50 ml de agua destilada estéril*

*Gentamicina 25mg/ 50 ml de agua destilada estéril*

Los antibióticos fueron esterilizados por medio del filtrado a través de filtros (20 µm de diámetro, Fisherbrand).

### **Buffer**

**CTAB (2% (p/v) Bromuro de Cetiltrimetilamonio**

### **Preparación de Tris-Citrato de Sodio y Tris-Acido Cítrico**

En primer lugar, se realizaron las siguientes soluciones:

- a) 24 g Tris + 200 ml agua destilada
- b) 29.4 g Citrato de Sodio + 100 ml agua destilada
- c) 21 g Acido Cítrico + 100 ml agua destilada

Luego, cada solución se agitó en agitador hasta que las sales se diluyeron. Por último, se mezcló 100 ml de Tris con la solución de Citrato de Sodio, y los otros 100 ml de Tris con la solución de Acido Cítrico, obteniéndose como resultado:

- Tris-Citrato de Sodio [0.5] M
- Tris-Acido Cítrico [0.5] M

## 11 - GLOSARIO

Apéndices: estructuras filamentosas inmóviles adheridas basalmente a las tricosporas de Harpellales.

Célula germinativa: célula reproductiva especializada que produce una tricospora externa y sus respectivos apéndices.

Cigospora: espora sexual formada a partir de la fusión de 2 núcleos (cariogamia), generalmente precedida de la fusión de 2 células (plasmogamia). Estas esporas presentan las paredes engrosadas.

Collar: estructura que permanece adherida a la base de las tricosporas luego de que fueron liberadas a partir de las células generativas.

Fitotelmata: estructuras presentes en plantas terrestres que tienen la capacidad de almacenar agua, tales como hojas modificadas, axilas, flores, agujeros o depresiones en el tallo, frutos u hojas caídas.

"Holdfast": Estructura especializada para la adhesión del talo al hospedador.

Talo: cuerpo vegetativo de una talófito.

Tricospora: esporangio decidido que contiene en su interior una única esporangiospora uninucleada. Se desarrollan a partir de una célula germinativa, y generalmente presentan entre 1 y varios apéndices adheridos a su base.