

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO



**Oomicosis en salmónidos (Salmonidae) y pejerrey
patagónico (*Odontesthes hatcheri*) de cultivo en la
provincia del Neuquén.**

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias Naturales

Lic. Pablo Moreno

Directora: Dra. Mónica M. Steciow

Codirector: Dr. Carlos M. Luquet

2022

A Julia, Gaspar y Paula.

Agradecimientos

Al Centro de Ecología Aplicada del Neuquén, autoridades y compañeros de trabajo, por posibilitarme desarrollar este trabajo de tesis.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la UNLP por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo.

A Mónica Steciow, mi directora, por su apoyo y constante motivación, por su entusiasmo y aportes en la identificación de los Oomycetes.

A Carlos Luquet, mi codirector, por su dedicación y por compartir generosamente sus conocimientos y experiencia.

A mis compañeros del CEAN por el apoyo, afecto y motivación para llevar adelante esta tesis, especialmente a Leonardo Molinari por compartir su experiencia y lugar de trabajo en el laboratorio de Ictiopatología, a Walter Torres, Jorge Barriga, Carlos Barriga, Juan Figueroa, compañeros del área de producción del CEAN, por proveerme de los peces y ovas para realizar los experimentos y por compartir sus conocimientos en piscicultura, a Pablo Hualde por brindarme sus conocimientos y por los datos de calidad de agua, a Luciana Piudo por su ayuda con los análisis estadísticos, a Pablo Morzenti por su aporte en los ensayos con pejerreyes, a Jorge Kuroda, Leandro Castiñeira, Mariela Demicheli, Martín Monteverde, Alejandro González, Laura Portuze, Mariana Aubone, Taty Sagario, Vir Rago, Lali Guichon y Fernando Milesi, por lo compartido, las sugerencias y las palabras de aliento.

A los integrantes del Laboratorio de Ecotoxicología Acuática – CONICET. A Virginia Bianchi, Julio Paineofilú, Juan Castro y Mariano Pascual por la colaboración en los ensayos, análisis de laboratorio y discusión de resultados. A Julieta De Anna y Lucila Herbert, por compartir sus conocimientos en estudios moleculares y modelos de dosis-respuesta. A Iara y Mercedes por sus sugerencias y palabras de aliento.

A Elisabet Vilacoba, María Laura Barone y Darío Lijtmaer del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” – Proyecto Barcode of life (iBOL) por su colaboración con el procesamiento de las muestras de esta tesis, incorporadas al proyecto. A Pablo

Lavinia, también de iBOL, por lo enseñado, su dedicación y ayuda con los análisis moleculares.

A Sandra Gómez Saravia, Silvia E. Rastelli y Marisa R. Viera por recibirme en el CIDEPINT - CONICET, por instruirme y colaborar en los ensayos con antioomicóticos.

A Togo Miyazaki, de la Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA), por sus enseñanzas en patología de peces y técnicas de PCR.

A Luca Di Cesare y Silvia Plaul, de la Facultad de Cs. Veterinarias de la UNLP, por contribuir con la tinción de Grocott y compartir sus conocimientos en histología.

Al Hatchery Viclunco, de la localidad de Aluminé, por proveer un lote de peces.

A mis hermanas Flor y Mari, por la ayuda con las imágenes y el aliento a la distancia.

A mi amigo Gonzalo y su familia por la hospitalidad al recibirme, al comienzo de todo, en La Plata.

A mi tía Norma y amigos Diego y Emiliano, por la hospitalidad cuando realicé cursos y pasantías en las ciudades de Buenos Aires, La Plata y Bariloche.

A mi colega y amiga Natalia por estar presente, por sus consejos y aliento permanente.

A Paula, mi compañera, por apoyarme y acompañarme, aún en los momentos difíciles, a Julia y Gaspar, mis hijos, por su paciencia y alegrar mis días.

A mis padres, Elena y Aurelio por alentarme, como siempre lo han hecho, en esta etapa de crecimiento.

A mi familia, amigos, amigas y quienes de alguna manera contribuyeron para que este trabajo sea posible.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 11 |
| ABSTRACT | 15 |
| INTRODUCCIÓN GENERAL..... | 19 |
| 1. PANORAMA DE LA ACUICULTURA..... | 19 |
| 2. LA ACUICULTURA EN ARGENTINA Y PROVINCIA DEL NEUQUÉN | 20 |
| 3. LAS OOMICOSIS | 23 |
| 4. ANTECEDENTES DE ESTUDIO DE LAS OOMICOSIS EN PECES DE ARGENTINA..... | 24 |
| METODOLOGÍA GENERAL | 27 |
| 1. PISCICULTURA DEL CEAN..... | 27 |
| 2. CALIDAD DEL AGUA | 27 |
| 3. CRÍA DE SALMÓNIDOS Y PEJERREY PATAGÓNICO..... | 28 |
| 4. OVAS Y PECES UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS..... | 31 |
| 4.1. Ovas | 31 |
| 4.2. Peces..... | 31 |
| 5. SISTEMAS DE EXPERIMENTACIÓN | 32 |
| 5.1. Sistemas de experimentación con ovas | 32 |
| 5.2. Sistemas de experimentación con peces - acuarios..... | 33 |
| 6. AISLAMIENTO DE OOMYCETES..... | 34 |
| 7. CULTIVO DE OOMYCETES Y OBTENCIÓN DE ZOOSPORAS..... | 36 |
| 8. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO..... | 37 |
| CAPÍTULO 1: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE OOMYCETES | 39 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 39 |
| 1.1. Ubicación taxonómica del phylum Oomycota | 39 |
| 1.2. Características del phylum Oomycota..... | 40 |
| 1.3. Sistemática del phylum Oomycota..... | 42 |
| 1.4. El orden Saprolegniales | 43 |
| 1.5. Identificación molecular | 46 |
| 1.6. Proyecto iBol | 49 |
| 2. HIPÓTESIS | 50 |
| 3. OBJETIVOS | 50 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1. Identificación morfológica..... | 51 |
| 4.2. Identificación molecular..... | 51 |
| 4.3. Abundancia relativa de los aislamientos por sustrato | 54 |
| 5. RESULTADOS..... | 54 |
| 5.1. Identificación morfológica..... | 54 |
| 5.1.1. Orden Saprolegniales | 54 |
| 5.1.2. Orden Leptomitales..... | 61 |
| 5.2. Identificación molecular..... | 63 |
| 5.3. Filogenia y distancias genéticas..... | 65 |
| 5.4. Abundancia relativa de los aislamientos por sustrato | 75 |
| 6. DISCUSIÓN..... | 77 |
| 6.1. Identificación morfológica..... | 77 |
| 6.2. Estudios moleculares..... | 82 |
| 6.3. Identificación molecular y filogenia | 83 |
| 6.4. El complejo <i>S. diclina</i> – <i>S. parasitica</i> | 87 |
| 6.5. Aislamientos por sustratos | 89 |
| CAPÍTULO 2: PATOGENICIDAD DE LOS OOMYCETES SOBRE OVAS Y PECES DE CULTIVO..... | 92 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 92 |
| 1.1. Oomicosis en acuicultura | 92 |
| 1.2. Patogenicidad de los Oomycetes | 93 |
| 1.3. Alteraciones patológicas | 95 |
| 1.4. Sistemas de defensa | 96 |
| 1.5. Agregados de macrófagos | 98 |
| 1.6. Problemática en la incubación de ovas | 99 |
| 2. HIPÓTESIS | 101 |
| 3. OBJETIVOS | 101 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 101 |
| 4.1. Diseño experimental: infecciones sobre ovas..... | 102 |
| 4.1.1. Ensayos de patogenicidad sobre ovas de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) y pejerrey patagónico (<i>Odontesthes hatcheri</i>). Exposición a cepas de los géneros <i>Saprolegnia</i> , <i>Achlya</i> y <i>Leptomit</i> | 102 |
| 4.1.2. Ensayos de coincubación..... | 104 |
| 4.1.2.1. Ensayo de coincubación I | 105 |
| 4.1.2.2. Ensayo de coincubación II | 106 |
| 4.1.3. Análisis estadístico | 107 |

| | |
|---|-----|
| 4.2. Diseño experimental: infecciones sobre peces juveniles..... | 107 |
| 4.2.1. Ensayos de patogenicidad sobre juveniles de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mikiss</i>).. | 107 |
| 4.2.2. Procesamiento y análisis histológico..... | 109 |
| 4.2.3. Ensayo de patogenicidad sobre larvas de pejerrey patagónico (<i>Odontesthes hatcheri</i>) | 110 |
| 4.2.4. Análisis estadístico | 111 |
| 5. RESULTADOS..... | 112 |
| 5.1. Ensayos de patogenicidad sobre ovas..... | 112 |
| 5.1.1. Ovas de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mikiss</i>)..... | 112 |
| 5.1.1.1. Colonización sobre los grupos de ovas muertas | 112 |
| 5.1.1.2. Infección sobre los grupos de ovas vivas | 113 |
| 5.1.1.3. Análisis histológico | 118 |
| 5.1.1.4. Ensayo de coincubación I | 120 |
| 5.1.1.5. Ensayo de coincubación II | 122 |
| 5.1.1.6. Análisis histológico, ensayos de coincubación | 122 |
| 5.1.2. Ovas de pejerrey patagónico (<i>Odontesthes hatcheri</i>)..... | 123 |
| 5.2. Ensayos de patogenicidad sobre peces juveniles..... | 125 |
| 5.2.1. Ensayos sobre juveniles de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mikiss</i>) | 125 |
| 5.2.1.1. Ensayo 1. Exposición a zoosporas de <i>S. parasitica</i> C08 y <i>S. ferax</i> C11 | 125 |
| 5.2.1.2. Ensayo 2. Exposición a zoosporas de <i>Saprolegnia diclina</i> C13..... | 126 |
| 5.2.1.3. Ensayo 3. Exposición a zoosporas de <i>Saprolegnia ferax</i> C20, <i>S. ferax</i> C21 y <i>Leptomitus lacteus</i> C23 | 128 |
| 5.2.1.4. Ensayo 4. <i>Saprolegnia parasitica</i> C22 y <i>Saprolegnia diclina</i> C24 | 129 |
| 5.2.1.5. Análisis histológico | 130 |
| 5.2.1.6. Agregados de macrófagos (AG)..... | 135 |
| 5.2.2. Ensayo patogenicidad sobre larvas de pejerrey patagónico (<i>Odontesthes hatcheri</i>).. | 137 |
| 5.2.2.1 Alteraciones histopatológicas | 139 |
| 6. DISCUSIÓN..... | 141 |
| 6.1. Exposición de ovas de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mikiss</i>) a zoosporas de Oomycetes . | 142 |
| 6.2. Ensayos de coincubación..... | 144 |
| 6.3. Exposición de ovas de pejerrey patagónico (<i>Odontesthes hatcheri</i>) a zoosporas de Oomycetes..... | 145 |
| 6.4. Exposición de juveniles de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mikiss</i>) a zoosporas de Oomycetes | 146 |
| 6.5. Observaciones histopatológicas..... | 149 |

| | |
|--|------------|
| 6.6. Análisis de agregados de macrófagos | 150 |
| 6.7. Exposición de larvas de pejerrey patagónico (<i>Odontesthes hatcheri</i>) a zoosporas de <i>S. diclina</i> C13..... | 151 |
| CAPÍTULO 3: COINFECCIÓN <i>Flavobacterium psychrophilum</i> – <i>Saprolegnia parasitica</i>..... | 154 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 154 |
| 1.1. Coinfecciones | 154 |
| 1.2. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> | 156 |
| 1.3. Balance oxidativo | 157 |
| 1.4. Mucus-inmunoglobulinas..... | 160 |
| 1.5. Leucocitos..... | 161 |
| 2. HIPÓTESIS | 163 |
| 3. OBJETIVOS | 164 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 164 |
| 4.1. <i>Saprolegnia parasitica</i> | 164 |
| 4.2. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> | 164 |
| 4.2.1. Aislamiento..... | 164 |
| 4.2.2. Identificación | 165 |
| 4.2.3. Caracterización fenotípica..... | 166 |
| 4.2.4. Hidrólisis de gelatina | 167 |
| 4.2.5. Curva de crecimiento | 167 |
| 4.2.6. Recuento celular..... | 168 |
| 4.3. Diseño experimental | 169 |
| 4.4. Procedimiento de muestreo y análisis | 171 |
| 4.4.1. Determinación de inmunoglobulinas en mucus..... | 171 |
| 4.4.2. Recuento diferencial de leucocitos | 172 |
| 4.4.3. Análisis bioquímicos | 172 |
| 4.4.3.1. Glutación reducido (GSH) | 172 |
| 4.4.3.2. Glutación total | 173 |
| 4.4.3.3. Determinación del contenido de GSSG y relación GSH/GSSG | 174 |
| 4.4.3.4. Glutación Reductasa (GR)..... | 174 |
| 4.4.3.5 Daño oxidativo a lípidos | 175 |
| 4.4.3.6 Contenido de Proteínas..... | 175 |
| 4.5. Análisis histológico | 176 |
| 4.6. Análisis estadístico | 176 |

| | |
|---|------------|
| 5. RESULTADOS..... | 177 |
| 5.1. Aislamiento, caracterización fenotípica e identificación..... | 177 |
| 5.1.1. Hidrólisis de la gelatina..... | 178 |
| 5.1.2. Identificación por PCR y selección de la cepa para el ensayo | 178 |
| 5.2. Ensayo de exposición consecutiva | 179 |
| 5.2.1. Mortalidad e infección | 179 |
| 5.2.2. Alteraciones macroscópicas | 180 |
| 5.2.3. Contenido de inmunoglobulinas (Igs) en mucus | 181 |
| 5.2.4. Conteo diferencial de leucocitos | 182 |
| 5.2.5. Balance oxidativo | 184 |
| 5.2.6. Análisis histológico | 186 |
| 5.2.7. Agregados de macrófagos (AG) en hígado y riñón | 187 |
| 6. DISCUSIÓN..... | 188 |
| 6.1. Aislamiento, caracterización fenotípica e identificación..... | 188 |
| 6.2. Ensayo de exposición consecutiva: Mortalidad, infección y aspectos patológicos | 189 |
| 6.3. Respuesta inmune | 192 |
| 6.3.1. Contenido de inmunoglobulinas en mucus..... | 192 |
| 6.3.2. Conteo diferencial de leucocitos | 194 |
| 6.3.3. Agregados de melanomacrófagos | 197 |
| 6.4. Balance oxidativo | 198 |
| CAPÍTULO 4: ANTIOOMICÓTICOS NATURALES | 202 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 202 |
| 1.1. El verde de malaquita, su prohibición y antioomicóticos alternativos | 202 |
| 1.2. Antioomicóticos naturales..... | 204 |
| 2. HIPÓTESIS | 207 |
| 3. OBJETIVOS | 207 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 207 |
| 4.1. Evaluación de la actividad antioomicótica sobre micelio, técnica de microatmósfera | 208 |
| 4.2. Evaluación de la actividad antioomicótica sobre micelio, técnica de dilución en placas ... | 210 |
| 4.3. Evaluación del efecto oomicocida u oomicostático | 211 |
| 4.4. Evaluación de la actividad antioomicótica sobre zoosporas | 211 |
| 5. RESULTADOS..... | 212 |
| 5.1. Actividad antioomicótica sobre micelio, técnica de microatmósfera | 212 |

| | |
|--|------------|
| 5.2. Actividad antioomicótica sobre micelio, técnica de dilución en placas y efecto oomicocida u oomicostático | 216 |
| 5.3. Actividad antioomicótica sobre zoosporas | 217 |
| 6. DISCUSIÓN | 219 |
| 6.1. Actividad antioomicótica sobre micelio de Oomycetes mediante la técnica de microatmósfera | 219 |
| 6.2. Actividad antioomicótica sobre micelio y zoosporas de Oomycetes mediante la técnica de dilución en placas | 220 |
| CONCLUSIONES | 228 |
| BIBLIOGRAFÍA | 231 |

RESUMEN

La acuicultura es una actividad económica con gran crecimiento en los últimos años. Tanto a nivel regional como mundial, los productos de acuicultura se diversificaron y aumentaron considerablemente sus volúmenes de producción. En este contexto, las técnicas de cultivo intensivo promueven el surgimiento de enfermedades que implican un problema importante para la piscicultura de aguas continentales. En particular, las oomicosis (también llamadas “saprolegniasis”) son causa de mortalidad y pérdidas económicas, principalmente en los países donde el cultivo de salmónidos se encuentra más desarrollado. Estas infecciones son causadas por Oomycetes acuáticos del orden Saprolegniales que afectan a los peces de cría en todos los estadios de su ciclo de vida y resultan muchas veces letales sin tratamientos adecuados. Además de causar serios problemas en los sistemas de producción, las oomicosis fueron observadas en peces silvestres e inclusive están implicadas en la declinación de poblaciones naturales de salmónidos y en brotes asociados a situaciones de estrés ambiental.

En la piscicultura del CEAN, Junín de los Andes, se realiza la cría y reproducción de salmónidos (trucha arcoíris, *Oncorhynchus mikiss*; trucha marrón, *Salmo trutta* y salmón del Atlántico, *Salmo salar*) y, de manera experimental, del pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*). Tanto en la incubación de ovas como en otras etapas del ciclo de cría de estos peces, comúnmente se observan infecciones oomicóticas, que causan pérdidas en la producción y deben ser combatidas mediante el uso de tratamientos preventivos y/o terapéuticos. Este trabajo de tesis tiene como objetivo ampliar el conocimiento sobre Oomycetes que afectan a los peces de cría en estaciones de piscicultura, estudiar aspectos patogénicos y, además, los efectos de la interacción con *Flavobacterium psychrophilum*, una bacteria patógena de salmónidos. Por otro lado, y con fines de implementación en tratamientos de control, se evalúa la capacidad antioomicótica de ciertas sustancias de origen vegetal frente a algunas cepas aisladas durante este estudio.

El capítulo 1, se dedicó al aislamiento e identificación de Oomycetes asociados a ovas, peces y materia orgánica de la piscicultura del CEAN. Se colectaron ovas de salmónidos y pejerrey patagónico infectadas naturalmente en los sistemas de incubación.

Mientras que, en los estanques de cría, se recolectaron peces moribundos (trucha arcoíris y pejerrey patagónico) que presentaban micelio en la superficie corporal. La identificación se realizó mediante características morfológicas y moleculares. En este estudio, se aislaron e identificaron morfológicamente once taxones pertenecientes a los órdenes Saprolegniales y Leptomitales del phylum Oomycota, de los cuales, *Saprolegnia diclina*, *S. ferax*, *S. parasitica*, *S. glomerata*, *Newbya dichotoma*, *Scoliolegnia asterophora* y *Leptomitus lacteus* fueron registradas en Argentina con anterioridad, mientras que *Saprolegnia aenigmatica*, *Achlya ambisexualis*, *Pythiopsis cymosa* y *P. humphreyana* representan nuevas citas para nuestro país. Por otra parte, mediante los estudios moleculares, se logró la amplificación de la región Cox2 del ADN mitocondrial y se obtuvieron 62 secuencias que fueron incorporadas al proyecto "OOMAC Oomycota de Argentina y Chile" de la base de datos de BOLD SYSTEMS. En base al análisis de similitud con secuencias depositadas en GenBank y a los análisis filogenéticos, se logró agrupar a 56 de las secuencias y asignarlas a los taxones *Saprolegnia parasitica*, *S. ferax*, *S. diclina*, *S. aenigmatica* y *Saprolegnia sp.* Finalmente, y de acuerdo a los agrupamientos realizados en el análisis molecular, se estimó la abundancia relativa de cada taxón por sustrato de aislamiento.

En el capítulo 2, se evaluaron la capacidad infectiva y los efectos patológicos de algunas de las cepas aisladas en los muestreos del capítulo anterior. Se realizaron infecciones experimentales sobre ovas y juveniles de trucha arcoíris y pejerrey patagónico donde se consideraron las tasas de infección, mortalidad y efectos histológicos. Los principales resultados indican que las zoosporas de cepas identificadas como *S. parasitica*, *S. ferax*, *S. diclina*, *S. glomerata*, *Saprolegnia spp.*, *Leptomitus lacteus* y *Achlya sp.* tienen la capacidad de colonizar ovas muertas de trucha arcoíris, sin embargo, no generan un aumento significativo de la mortalidad de las ovas vivas. Mientras que, el contacto con inóculos infectivos de *Saprolegnia spp.*, *S. glomerata*, *S. parasitica*, *S. diclina* y *S. ferax* generó infección y mortalidad en las ovas vivas, aunque esto fue dependiente de la cantidad de los inóculos. Por otra parte, las ovas muertas de pejerrey patagónico también fueron colonizadas por zoosporas de *S. parasitica*, *S. diclina* y *S. ferax*, sin embargo, las ovas vivas fueron un sustrato donde las esporas germinaron y desarrollaron pequeñas hifas, sin causar incrementos significativos en la mortalidad. Estos resultados

sugieren que el corion de las ovas representa una barrera de defensa efectiva frente a la infección por las zoosporas de Oomycetes a la vez que los estadios vegetativos (hifas) son los causantes de los incrementos en la mortalidad y la propagación de los Oomycetes en los sistemas de incubación de ovas.

En este estudio, solamente los peces sometidos a un tratamiento previo de abrasión fueron infectados por las zoosporas de *S. parasitica*, *S. diclina* y *S. ferax*. Las infecciones causaron, además, un aumento significativo de la mortalidad. Estos resultados sugieren que el tegumento representa una línea de defensa eficaz contra la infección por las zoosporas de Oomycetes. En estos ensayos, se observaron diferencias inter e intraespecíficas en las tasas de infección y mortalidad. A nivel histológico, se observó que *S. diclina* y *S. ferax* causan alteraciones a nivel del tegumento y capa muscular, y una débil respuesta inflamatoria. Por otra parte, en el ensayo con larvas de pejerrey patagónico, se observó que los componentes de la dieta pueden incidir en la infección y mortalidad generada por zoosporas de *S. diclina*. Las observaciones histológicas sugieren, en este caso, que las infecciones se originaron a nivel del tracto digestivo, desde donde las hifas se expandieron hacia el resto del cuerpo.

En el capítulo 3, se evaluó el efecto de la infección por *Flavobacterium psychrophilum* como un probable factor inductor de la infección y la mortalidad por *Saprolegnia parasitica* en juveniles de trucha arcoíris. Se estudiaron, además, aspectos patológicos y parámetros inmunológicos y de estrés oxidativo. Se evaluaron la predisposición a la infección por zoosporas de *S. parasitica* en peces previamente infectados con *F. psychrophilum* y posibles efectos sinérgicos o antagónicos.

Para ello, a partir de peces naturalmente infectados, se aislaron e identificaron distintas cepas de *F. psychrophilum*, se seleccionó una de éstas y se la utilizó, junto con una cepa de *S. parasitica* en un ensayo *in vivo* de exposición consecutiva. Se midieron las tasas de infección y mortalidad, y se realizaron observaciones clínicas y análisis histológicos. Se midió el contenido de inmunoglobulinas en el mucus, el recuento diferencial de leucocitos y, a nivel hepático, el contenido de indicadores del balance oxidativo y de daño a lípidos. *F. psychrophilum* generó alteraciones patológicas principalmente a nivel del tegumento y la musculatura, sin embargo, la infección bacteriana no promovió la infección por *S. parasitica* y no se observó un efecto sinérgico en la mortalidad ni a nivel histopatológico.

Flavobacterium psychrophilum generó el incremento en los porcentajes relativos de monocitos y trombocitos con forma de huso, lo cual puede indicar una activación de la respuesta inmune inespecífica. La exposición a zoosporas de *S. parasitica* incrementó el porcentaje relativo de linfocitos, sin embargo, esta respuesta no fue evidente en los peces infectados previamente con *F. psychrophilum*. Los descensos en los niveles de inmunoglobulinas en mucus de peces infectados por *F. psychrophilum* también sugieren una inhibición de la respuesta inmune adaptativa. La infección por *F. psychrophilum* disminuyó el pool de glutatión total en los hepatocitos y afectó el balance hacia el estado antioxidante. Mientras que la exposición a *S. parasitica* produjo un aumento en los niveles de daño oxidativo a lípidos sin modificar los otros parámetros del balance oxidativo estudiados en el hígado. No se observaron efectos sinérgicos entre *F. psychrophilum* y *S. parasitica* sobre los indicadores de daño oxidativo.

Finalmente, en el capítulo 4 se evaluó *in vitro* la acción antioomicótica del eugenol, el isoeugenol, el timol y el guaiacol frente a estadios vegetativos y zoosporas de una cepa de *S. diclina*, una de *S. ferax* y dos cepas de *S. parasitica*. En estos ensayos, se emplearon las técnicas de microatmósfera y dilución en placas para la determinación de la concentración inhibitoria total (CI_T) y la concentración letal (CL) de estas sustancias frente a los Oomycetes. Además, según el caso, se estimaron la concentración inhibitoria 90 (CI₉₀) y la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) mediante modelos de regresión no lineal. Los resultados mostraron que los estadios vegetativos y las zoosporas de *S. parasitica*, *S. ferax* y *S. diclina* fueron sensibles, en mayor o menor medida, al eugenol, isoeugenol, timol y guaiacol. El timol y el isoeugenol fueron las sustancias más efectivas en reducir o inhibir el crecimiento oomicótico y podrían ser consideradas en futuros estudios de búsqueda de productos antioomicóticos alternativos para su aplicación en acuicultura.

ABSTRACT

Aquaculture is an economic activity with high growth in recent years. Globally and regionally, aquaculture products diversified, and their production volumes increased significantly. In this context, intensive farming techniques promote the emergence of diseases that pose a major problem for inland water fish farming. Particularly, oomycosis (also called “saprolegniasis”) produce mortality and economic losses, mainly in countries where salmonid farming is more developed. These infections are caused by aquatic Oomycetes of the order Saprolegniales that affect farmed fish at all life cycle stages and are often lethal without appropriate treatments. In addition to posing serious problems in production systems, oomycosis was observed in wild fish and is even involved in the decline of natural salmonid populations and outbreaks associated with environmental stress.

The CEAN fish farming station in Junín de los Andes carries out the breeding and reproduction of salmonids (rainbow trout [*Oncorhynchus mikiss*], brown trout [*Salmo trutta*], and Atlantic salmon [*Salmo salar*]) and, experimentally, of the Patagonian silverside (*Odontesthes hatcheri*). In egg incubation and other stages of these fish’s breeding cycle, oomycotic infections are common. These infections cause production losses and require preventive or therapeutic strategies. This thesis paper aims to broaden the knowledge about Oomycetes affecting farmed fish, their pathogenic aspects, and the effects of the interaction between Oomycetes and *Flavobacterium psychrophilum*, a salmonids pathogenic bacterium. In addition, this work aims to evaluate the antioomycotic capacity of certain plant-derived substances against several strains isolated during this study for their implementation in control treatments.

Chapter 1 refers to the isolation and identification of Oomycetes associated with eggs, fish, and organic matter from the CEAN fish farming station. Naturally infected salmonid and Patagonian silverside eggs and dying fish of both species with mycelium on the body surface were visible in the incubation systems. Oomycetes were identified using morphological and molecular characteristics. Eleven taxa belonging to the Saprolegniales and Leptomitales orders of the phylum Oomycota were isolated and morphologically identified. *Saprolegnia diclina*, *S. ferax*, *S. parasitica*, *S. glomerata*, *Newbya dichotoma*,

Scoliolegnia asterophora, and *Leptomitus lacteus* have already been registered in Argentina. In contrast, *Saprolegnia aenigmatica*, *Achlya ambisexualis*, *Pythiopsis cymosa*, and *P. humphreyana* represent new citations for our country.

The amplification of the mitochondrial DNA region Cox2 allowed the identification of 62 sequences that were incorporated into the project “OOMAC - Oomycota of Argentina and Chile” from the BOLD SYSTEMS database. Based on the analysis of similarity with sequences deposited in GenBank and the phylogenetic analyses, it was possible to group 56 of the sequences and assign them to the taxa *Saprolegnia parasitica*, *S. ferax*, *S. diclina*, *S. aenigmatica*, and *Saprolegnia sp.* Finally, according to the molecular analysis groupings, the relative abundance of each taxon by isolation substrate was estimated.

Chapter 2 includes the evaluation of the infectivity and pathological effects of some strains isolated in the previous chapter's samplings. Experimental infections, considering mortality rates and histological effects, were performed on eggs and juveniles of rainbow trout and Patagonian silverside. The main results show that the zoospores of strains identified as *S. parasitica*, *S. ferax*, *S. diclina*, *S. glomerata*, *Saprolegnia spp.*, *Leptomitus lacteus* and *Achlya sp.* can colonize dead rainbow trout eggs but do not generate a significant increase in live eggs mortality. Contact with infective inocula of *Saprolegnia spp.*, *S. glomerata*, *S. parasitica*, *S. diclina*, and *S. ferax* caused infection and mortality in live eggs, although this effect depended on the number of inocula. On the other hand, dead Patagonian silverside eggs were also colonized by zoospores of *S. parasitica*, *S. diclina*, and *S. ferax*. However, live eggs were a substrate in which the spores germinated and developed small hyphae without causing significant mortality increases. These results suggest that the egg chorion represents an effective barrier against infection by the zoospores of Oomycetes, while the vegetative stages (hyphae) increase mortality and favor the spread of Oomycetes in the eggs' incubation systems.

In this study, the zoospores of *S. parasitica*, *S. diclina*, and *S. ferax* only infected fish undergoing prior abrasion treatment. Infections also caused a significant increase in mortality. These results suggest that the skin is an effective line of defense against infection by oomycete zoospores. Inter- and intraspecific differences in infection and mortality rates were observed in these tests. Histologically, *S. diclina* and *S. ferax* cause skin and muscle layer alterations and weak inflammatory response. On the other hand, in

the trial with Patagonian silverside larvae, it was observed that a combined diet of *Artemia salina* and formulated feed strongly increased the infection and mortality caused by *S. diclina* zoospores. In this case, histological observations suggest that the infection originates in the digestive tract, from where the hyphae expand to the rest of the body.

In Chapter 3, the effect of infection by *Flavobacterium psychrophilum* was evaluated as a probable inducer of *Saprolegnia parasitica* infection and mortality in juvenile rainbow trout. In addition, pathological aspects and immunological and oxidative stress parameters were studied. This chapter also analyzes the predisposition to *S. parasitica* zoospore infection in fish previously infected with *F. psychrophilum* and possible synergistic or antagonistic interaction between *S. parasitica* and *F. psychrophilum*.

For this, from naturally infected fish, different strains of *F. psychrophilum* were isolated, identified, and one of them was selected and used, together with a strain of *S. parasitica*, in an *in vivo* continuous exposure test. Infection and mortality rates were measured, and histological analyses and clinical observations were made. The content of immunoglobulins in the mucus, the differential leukocyte count, and the content of lipid damage and oxidative balance indicators in the liver were measured. *Flavobacterium psychrophilum* caused pathological alterations mainly in the skin and muscle. However, the bacterial infection did not promote infection by *S. parasitica*, and no synergistic effect was observed on mortality or at the histopathological level. *F. psychrophilum* generated an increase in relative percentages of fusiform thrombocytes and monocytes, indicating an activation of the non-specific immune response. Exposure to *S. parasitica* zoospores increased the relative percentage of lymphocytes, whereas this response was not evident in fish previously infected with *F. psychrophilum*. Decreases in immunoglobulin levels in the mucus of fish infected with *F. psychrophilum* also suggest inhibition of the adaptive immune response. *Flavobacterium psychrophilum* infection reduced the total glutathione pool in hepatocytes and affected the balance toward antioxidant status. On the other hand, exposure to *S. parasitica* increased oxidative damage to lipids without modifying the other oxidative balance parameters studied in the liver. There were no synergistic effects between *F. psychrophilum* and *S. parasitica* on oxidative damage indicators.

Finally, in Chapter 4, the antioomycotic action of eugenol, isoeugenol, thymol, and guaiacol against vegetative stages and zoospores of one strain of *S. diclina*, one strain of *S.*

ferax, and two strains of *S. parasitica* was evaluated *in vitro*. Micro-atmosphere and plate dilution techniques were used in these trials to determine these substances' total inhibitory concentration (TIC) and lethal concentration (LC) against Oomycetes. In addition, depending on the case, inhibitory concentrations 90 (IC₉₀) and 50 (IC₅₀) were estimated using nonlinear regression models. The results showed that the vegetative stages and zoospores of *S. parasitica*, *S. ferax*, and *S. diclina* were sensitive, to a greater or lesser extent, to eugenol, isoeugenol, thymol, and guaiacol. Thymol and isoeugenol were the most effective substances in reducing or inhibiting oomycotic growth and could be considered in future studies searching for alternative antioomycotic products for application in aquaculture.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. PANORAMA DE LA ACUICULTURA

La acuicultura es una actividad en creciente desarrollo a nivel mundial. El cultivo de peces, moluscos, crustáceos u otros organismos acuáticos se ha incrementado en las últimas décadas y la acuicultura se mantiene como uno de los sectores de mayor crecimiento dentro de la industria de producción de alimento. La producción mundial proveniente del cultivo de especies acuáticas ha alcanzado los 114,5 millones de toneladas en el año 2018: 82,1 millones de toneladas de pescado comestible (incluidos peces, moluscos, crustáceos y otros animales acuáticos) y 32,4 millones de toneladas de plantas acuáticas, a los que puede sumarse unas 26.000 toneladas de productos ornamentales. La producción acuícola de pescado representó para el año 2018, el 46,0% de la producción total del pescado consumido en el mundo, cuando se incluye a la pesca de captura y esto supone un aumento del 25,7% con respecto al año 2000 (figura 1) (FAO, 2020). Según la FAO, las estadísticas oficiales indican que la acuicultura emplea a unos 20,5 millones de personas en el mundo, participando de distintas maneras, este empleo ha aumentado proporcionalmente respecto del empleo del sector pesquero. La producción pesquera mantiene un marcado estancamiento desde finales de la década del 80 principalmente debido a la sobreexplotación y agotamiento de stocks y consecuencias del calentamiento de los océanos debido al cambio climático (Free *et al.*, 2019). El estado de los recursos marinos ha empeorado, la explotación biológicamente sostenible de las poblaciones de peces tiene una tendencia descendente mientras que se incrementan los niveles de explotación insostenible (FAO, 2020). En términos *per cápita*, el consumo de pescado comestible aumentó de 9,0 kg en 1961 a 20,3 kg anuales en 2017, a una tasa media de aproximadamente un 1,5% al año. En 2017, el pescado representó alrededor del 17% de la proteína animal consumida por la población mundial, siendo este consumo superior al consumo de carne del conjunto de los animales terrestres, con excepción de las aves de corral. El pescado y los productos pesqueros desempeñan un papel fundamental en la nutrición y la seguridad alimentaria mundial, en la medida en que

representan una fuente valiosa de nutrientes y micronutrientes sumamente importantes para obtener dietas diversificadas y saludables (FAO, 2018). En este contexto, la acuicultura se proyecta hacia el futuro como una importante actividad para proveer proteína para consumo humano, enfrentar el déficit alimenticio y desarrollar las economías regionales.

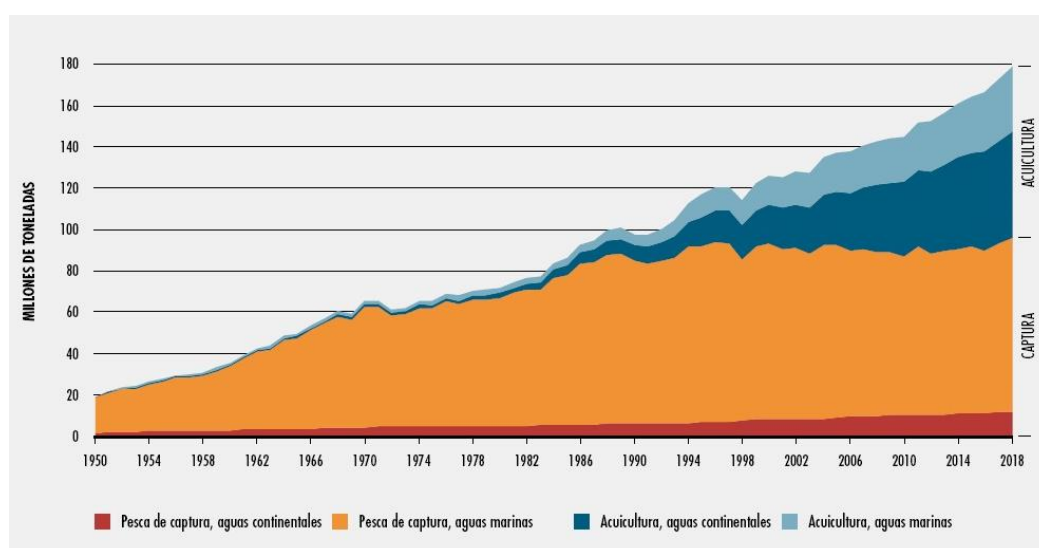


Figura 1. Producción mundial de la pesca y la acuicultura. Fuente: FAO (2020)

2. LA ACUICULTURA EN ARGENTINA Y PROVINCIA DEL NEUQUÉN

En nuestro país la acuicultura comercial comenzó a desarrollarse a mediados de 1960 y tuvo un marcado impulso a partir de la década de 1990 fundamentado en la intensificación de la producción de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)) en Patagonia Norte y en el inicio del cultivo de peces y crustáceos en la región templado cálida y subtropical. A pesar del enorme potencial para el desarrollo de la actividad, debido principalmente a la diversidad de climas, variedad de especies cultivables y amplios recursos acuáticos, tanto continentales como marítimos, en Argentina, la acuicultura está aún poco difundida y no ha superado una fase de desarrollo incipiente (Hualde *et al.*, 2011; Carciofi y Rossi, 2021). Para el año 2019 la producción acuícola rondó las 2.600 toneladas de las cuales la gran mayoría se destinó al consumo interno y sólo una fracción de la producción de truchas tuvo como destino la exportación. Del total producido, el 46,36% provino del cultivo de trucha arcoíris, el 41,01% provino del cultivo

de pacú (*Piaractus mesopotamicus* (Holmberg)), y el 12,63% del resto de los peces y organismos acuáticos en cultivo (carpa, surubí, tilapia, ostras, ranas y mejillones, entre otros) (Panné Huidobro, 2020). En Argentina se calcula que el consumo de pescado es de 5 – 8 kg anuales *per cápita*, menos de la mitad del promedio mundial (20,3 kg anuales según la FAO) (Carciofi y Rossi, 2021) y esta baja demanda puede bien representar un obstáculo para el crecimiento de la acuicultura.

En la provincia del Neuquén, la piscicultura comenzó a desarrollarse en la década de 1970 en establecimientos ubicados sobre los ríos Chimehuín y Traful que utilizaban estanques en tierra para la cría de truchas. En los años siguientes surgieron pequeños productores en distintos sitios de la provincia, pero su funcionamiento fue irregular y de forma interrumpida. Recién en los años 90's la producción acuícola intensiva logró afianzarse cuando se instalaron, en el embalse Alicurá, emprendimientos privados utilizando jaulas flotantes de cría que permitieron ampliar los volúmenes de producción (Prieto y Del Valle, 1996). Paralelamente, el estado provincial promovió la actividad mediante la creación del Centro de Ecología Aplicada del Neuquén (CEAN), organismo dedicado al desarrollo y monitoreo de la actividad acuícola, y de la sanción de la Ley 1996 de acuicultura que reguló la actividad hasta 2019, cuando fue reemplazada por la ley 3073. En la actualidad, en la provincia del Neuquén se concentra el 41,42% del total de la producción acuícola del país. La producción está comprendida únicamente por trucha arcoíris y fue de aproximadamente 1.070 tn para el año 2019 (Panné Huidobro, 2020). Los principales establecimientos de producción de truchas están ubicados en los embalses de Alicurá y Piedra del Águila (ambos localizados sobre el río Limay) y emplean el sistema de balsas jaulas para la etapa de engorde de los peces mientras que la provisión de semilla o alevinos es realizada principalmente por establecimientos (denominados *hatchery*) localizados en Aluminé, Junín de los Andes, Villa Llanquín o Bariloche (las últimas dos, de la provincia de Río Negro) destinados a ese propósito. Además, una pequeña producción de truchas se realiza en pisciculturas de tipo rural o familiar que utilizan el sistema de estanques en tierra y están ubicadas en localidades del centro y norte de la provincia del Neuquén (figura 2). En los últimos años, la provincia del Neuquén ha otorgado nuevas concesiones acuícolas sobre los embalses de Alicurá y Piedra del

Águila, donde se ha estimado que la capacidad de carga es de 27.600 tn (compartidas en partes iguales con la provincia de Río Negro).

Por otra parte, en la provincia del Neuquén se realiza la cría experimental del pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri* (Eigenman)), un aterínido autóctono de amplia distribución en la Patagonia Argentina y sur de Chile. Desde el CEAN se realizó la primera experiencia de cría en jaulas flotantes de esta especie en el embalse Ezequiel Ramos Mexía (Hualde *et al.*, 2011), así como también se realizaron ensayos para la evaluación de dietas (Hualde *et al.*, 2009), se describieron aspectos de su biología y desarrollo embrionario (Cavallín *et al.*, 2011) y alteraciones patológicas asociados a las condiciones de cría (Hualde *et al.*, 2008; Steciow *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2012). En la actualidad se continúa con esta línea de investigación mediante el desarrollo de experiencias en reproducción, alimentación de estadios larvarios y evaluación de dietas para juveniles.

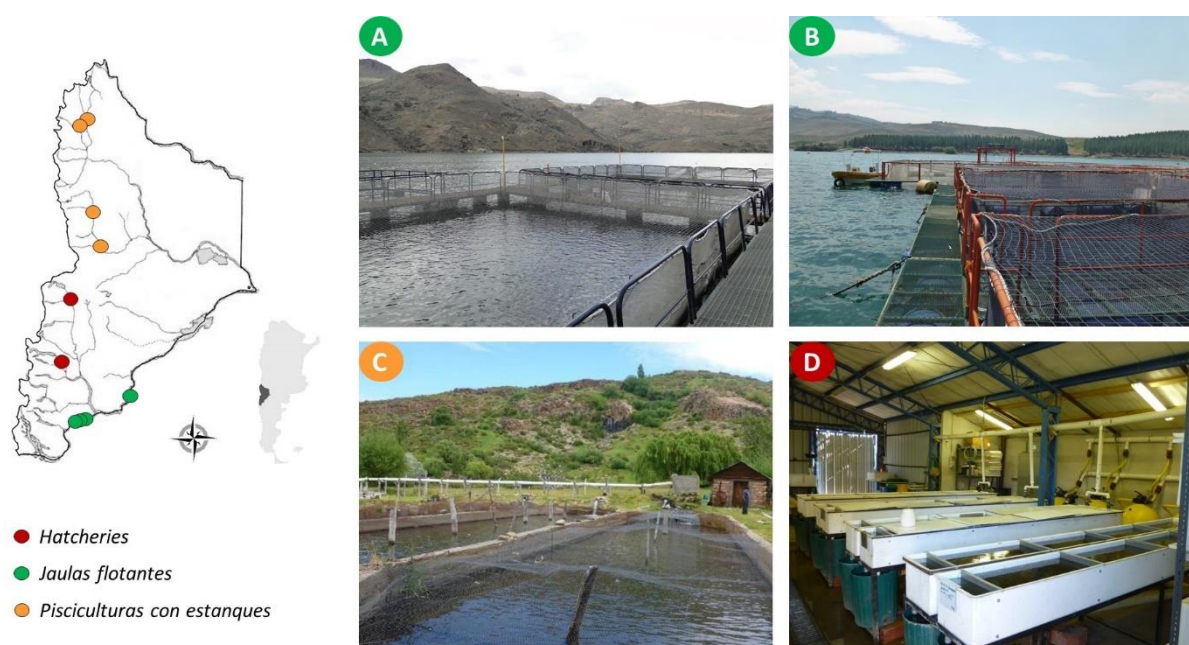


Figura 2. Se muestra en el mapa de la provincia del Neuquén, la localización de diferentes establecimientos productivos. En las imágenes se pueden observar distintos sistemas de cría de trucha arcoíris. A) y B) jaulas flotantes localizadas en el embalse Alicurá; C) piscicultura en estanques, paraje Bella Vista; D) Hatchery para la producción de ovas y alevinos en Aluminé.

3. LAS OOMICOSIS

La mayor dificultad para el desarrollo económico de la acuicultura ha sido el surgimiento de enfermedades derivadas de las técnicas de cultivo intensivo. Condiciones de cría desfavorables, tales como: hacinamiento, calidad de agua deficiente, dietas inadecuadas, manejo excesivo, fluctuaciones de la temperatura u otros estresores ambientales, producen situaciones propicias para el desarrollo de enfermedades infecciosas que afectan a todos los organismos de cultivo. Estas enfermedades provocan pérdidas importantes por mortalidad, bajos rendimientos productivos y costos asociados al tratamiento y medidas de prevención (Roberts, 1981; Meyer, 1991). Dentro de las enfermedades infecciosas, las infecciones causadas por Oomycetes representan un factor de pérdidas millonarias en las pisciculturas de todo el mundo (van West, 2006; Phillips *et al.*, 2008; Barde *et al.*, 2020). Conocidas frecuentemente como “saprolegniasis”, estas infecciones son causadas por Oomycetes del orden Saprolegniales, como *Saprolegnia spp.* Ness, *Aphanomyces spp.* de Bari o *Achlya spp.* Ness que afectan a los peces de cría en todos los estadios de su ciclo de vida y resultan letales sin tratamientos adecuados (van West, 2006; Robertson *et al.*, 2009). Las infecciones oomicóticas sobre ovas se caracterizan por la presencia de un micelio blanquecino que crece sobre las ovas muertas y avanza hacia las ovas vecinas extendiendo el proceso de infección (Meyer, 1991). Mientras que, en peces, la oomicosis aparece como una infección crónica y superficial, de aspecto algodonoso, que se origina en el tegumento de la cabeza, cola y aletas, desde donde se expande hacia el resto del cuerpo. Las infecciones pueden cubrir hasta el 80% del cuerpo y producir la muerte (Bruno *et al.*, 2011). La oomicosis es muchas veces considerada como una infección secundaria, producida por organismos saprótrofos que colonizan la materia orgánica muerta o a peces afectados por lesiones previas o inmunodeprimidos (Bruno *et al.*, 2011; Barde *et al.*, 2020), sin embargo, numerosos estudios demostraron la capacidad de algunas especies de producir infecciones primarias y dar como resultados graves epizootias en establecimientos de piscicultura (Bly *et al.*, 1992; Hatai y Hoshiai, 1992; van West, 2006).

Además de producir serios problemas en los sistemas de producción, varias especies de Oomycetes causan infecciones sobre peces y ovas en los ecosistemas acuáticos naturales (Phillips *et al.*, 2008; Van der Berg *et al.*, 2013; Aller-Gancedo *et al.*, 2016; Lone

y Manohar, 2018). Las infecciones oomicóticas han sido observadas produciendo brotes asociados a situaciones de estrés ambiental (González de Canales *et al.*, 2001; Liotta *et al.*, 2007; Mancini *et al.*, 2008, 2010) e inclusive algunos autores consideran que son responsables de la declinación de poblaciones naturales de peces (Neitzel *et al.*, 2004; van West, 2006).

4. ANTECEDENTES DE ESTUDIO DE LAS OOMICOSIS EN PECES DE ARGENTINA

En Argentina los estudios en relación a esta temática son escasos y sólo algunos han abordado la problemática en los sistemas de producción. Los primeros registros de enfermedades oomicóticas en peces de Argentina son los realizados por Ringuelet (1943) en su manual de piscicultura de pejerrey (*Odontesthes bonariensis* (Valenciennes)). En el texto hace referencia al papel patogénico de *Saprolegnia* en la incubación de ovas y la cría de pejerreyes en estanques y sugiere medidas de prevención, desinfección y tratamiento terapéutico para disminuir sus impactos. Grosman (1995) y García Romero (2001) retomaron el tema en trabajos sobre ecología, cultivo y aprovechamiento del pejerrey bonaerense e indicaron que *Saprolegnia* representa uno de los principales problemas en el manejo de los sistemas intensivos de cría de pejerrey y es la principal causa de mortalidad de huevos embrionados. Los primeros estudios que comenzaron a abordar la identificación y sistemática de los Oomycetes causantes de oomicosis en peces fueron los de Steciow *et al.* (2004a, b) y Pacheco Marino *et al.* (2006). En estos trabajos se estudiaron infecciones sobre juveniles de pejerrey bonaerense criados en jaulas en la laguna Lacombe, provincia de Buenos Aires y en ovas de pejerrey bonaerense de la Estación Hidrobiológica de Chascomús, donde se pudo identificar la presencia de los géneros *Achlya*, *Aphanomyces*, *Saprolegnia*, *Pythium* Pringsh. y *Leptomitus* (Roth) Agardh. Posteriormente, Pacheco Marino *et al.* (2009) realizaron determinaciones específicas y describieron la ocurrencia de *Achlya racemosa* Hidebr. sobre ovas y *Saprolegnia ferax* (Gruith) Kütz. en juveniles de pejerrey bonaerense de la Estación Hidrobiológica de Chascomús, los mismos, representaron los primeros reportes de estas especies como causales de oomicosis en Argentina. Además, los autores incluyeron estudios histopatológicos sobre las ovas infectadas. En los años subsiguientes, Pacheco Marino (2010) y Pacheco Marino *et al.* (2011) profundizaron los estudios sobre *A. racemosa* y *S.*

ferax; realizaron la identificación molecular a través de la comparación de secuencias de ADN de la región ITS, evaluaron la influencia del medio de cultivo y la temperatura sobre el crecimiento de las especies y también estudiaron la acción de distintas sustancias antioomicóticas para el control de las oomicosis en la incubación de ovas de pejerrey.

Hasta este punto se han mencionado únicamente estudios relacionados con el cultivo de pejerrey bonaerense. Esto se debe a que estos estudios son mayoritarios y los de mayor complejidad. Las oomicosis son también una problemática muy vinculada a la cría de salmónidos. Pero si bien el cultivo de truchas en Argentina tiene ya muchos años de desarrollo, existe poca información respecto del impacto de las oomicosis sobre esta actividad. Los primeros registros de la enfermedad en truchas fueron publicados en un informe técnico del CEAN (Coria, 1991). En este informe se hace referencia a la presencia de “enfermedades fúngicas” que afectaron a truchas arcoíris de distintas pisciculturas de la provincia del Neuquén y se destacó la observación de mortalidades de hasta un 25% en etapas de incubación y alevinaje. No se brindan más detalles acerca de la prevalencia o el grado de afección y mortalidad en peces reproductores, o de tratamientos utilizados en ese momento por los productores. Por otra parte, en cultivos experimentales de trucha arcoíris realizados en Luján, Zeis Caro (2000), menciona que *Saprolegnia parasitica* Coker constituye un problema para los cultivos y especialmente en el período de incubación de ovas. Los antecedentes más recientes son los de Steciow *et al.* (2012, 2013 y 2014a, b) que realizaron estudios preliminares sobre oomicosis en pisciculturas de salmónidos y donde se mencionan a géneros del orden Saprolegniales, tales con *Saprolegnia* y *Achlya*, como causantes de esta problemática.

En ambientes silvestres, Ringuelet *et al.* (1967) fueron los primeros en reportar la incidencia de las infecciones oomicóticas sobre peces. En su obra dedicada a la ictiofauna de agua dulce de Argentina, los autores mencionan que, a bajas temperaturas, las mojarra del género *Astyanax* Baird y Girard pueden verse afectadas por micosis que se agravan en presencia de lastimaduras o pérdida de escamas. Posteriormente, en los años 2000, Mancini *et al.* (2000, 2006, 2008, 2010) retomaron este tema en distintos estudios sobre eventos de mortandad de peces en ambientes naturales de la provincia de Córdoba, asociados a *Saprolegnia*. En el lago Villa Dalcar, Mancini *et al.* (2000) detectaron la presencia de infecciones por *Saprolegnia sp.* junto con parásitos protozoos y monogéneos

(*Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, *Trichodina* sp. Ehrenberg, *Dactylogyrus* sp. Diesing) sobre mojarra (*Cheirodon interruptus* (Jenyns)), coridoras (*Corydoras paleatus* (Jenyns)), bagres (*Rhamdia sapo* (Valenciennes)) y madrecitas del agua (*Cnesterodon decenmaculatus* (Jenyns)) en un evento de mortalidad que relacionaron con problemas de contaminación ambiental. Además, Mancini *et al.* (2006, 2008, 2010) estudiaron eventos de mortalidad donde el descenso brusco de la temperatura pudo ser un factor desencadenante de infecciones por *Saprolegnia*. Estas situaciones se reportaron para mortandades de pejerrey bonaerense y para las mojarra *Astyanax eigenmanniorum* (Cope) y *A. fasciatus* (Cuvier) en distintas lagunas y embalses de Córdoba. En algunos casos también se observó coinfección con *Aeromonas* sp. Stanier o *Pseudomonas* sp. Migula. Por último, otros autores también reportaron mortalidades importantes de peces en el río Paraná producidas en condiciones de bajas temperaturas y en presencia de *Saprolegnia* sp. que afectó, entre otras especies, a mojarra (*Astyanax abramis* (Jenyns)), viejas (*Liposarcus anisitsi* (Eigenmann y Kennedy)), dientudos (*Cynopotamus kincaidi* (Schultz)) y armados (*Megalodoras laevigatulus* (Berg)) (Liotta *et al.*, 2007). Debido al impacto de la saprolegniasis sobre poblaciones de peces silvestres y al rol de la temperatura en los brotes de esta enfermedad, Bonansea *et al.* (2019) estudiaron un modelo predictivo que estima la probabilidad de muerte de peces por oomicosis en el embalse Río Tercero. Este modelo tuvo en cuenta la temperatura superficial del agua, estimada mediante imágenes satelitales (Landsat 7 y 8) y se desarrolló utilizando una regresión logística para relacionar la temperatura con diferentes episodios de mortandad de peces en los últimos años.

METODOLOGÍA GENERAL

1. PISCICULTURA DEL CEAN

El Centro de Ecología Aplicada de Neuquén (CEAN), localizado en las proximidades de la ciudad de Junín de los Andes, es un organismo del estado provincial encargado de realizar estudios e investigaciones aplicadas para el aprovechamiento sostenido, la conservación, el control y manejo de la fauna silvestre y sus hábitats. Entre sus líneas de acción se encuentra la promoción y el desarrollo de la acuicultura dentro del ámbito provincial. El área de acuicultura del CEAN está conformada por los laboratorios de Producción y Genética, Ictiopatología, Calidad de Aguas y Nutrición y Alimentos, desde donde se brinda asesoramiento y servicios para el sector productivo acuícola y se realizan estudios e investigaciones aplicadas al desarrollo de la acuicultura (<https://www.cean.gob.ar/>).

El CEAN cuenta con una piscicultura destinada a la cría y reproducción de especies de salmónidos y del pejerrey patagónico. La piscicultura posee estanques y piletas para la cría de juveniles y peces reproductores y una sala equipada con bateas para la incubación de ovas y alevinaje. También posee un sector de acuarios para el desarrollo de experimentos en nutrición y enfermedades de peces. Este sector está provisto de peceras de vidrio y acuarios de PVC con suministro constante de agua y de un sistema de control de temperatura y aireación.

2. CALIDAD DEL AGUA

La piscicultura del CEAN es alimentada con agua del río Chimehuín, río originado como desagüe natural de la cuenca del lago Huechulafquen, por medio de un canal de alimentación de 8 km de longitud, del cual se abastece también la planta potabilizadora de Junín de los Andes. El caudal de agua utilizado por la piscicultura es de 1 m³/s (Prieto y Del Valle, 1996). Las características limnológicas del río Chimehuín, medidas en las proximidades del CEAN se muestran en la tabla 1 y figura 1.

Tabla 1: Calidad del agua en la piscicultura del CEAN (datos del Laboratorio de Calidad de Aguas del CEAN).

| Variable | |
|---|----------|
| T° agua, promedio anual (°C) | 10,0 |
| T° agua, mínima - máxima (°C) | 2,0-25,0 |
| pH | 7,0 |
| Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$) | 56,0 |
| OD (% saturación) | 95 |
| Turbidez (NTU) | 0,52 |
| PT $\mu\text{g}/\text{l}$ | 11,1 |
| PO ₄ $\mu\text{g}/\text{l}$ | 4,0 |
| NT $\mu\text{g}/\text{l}$ | 38,7 |

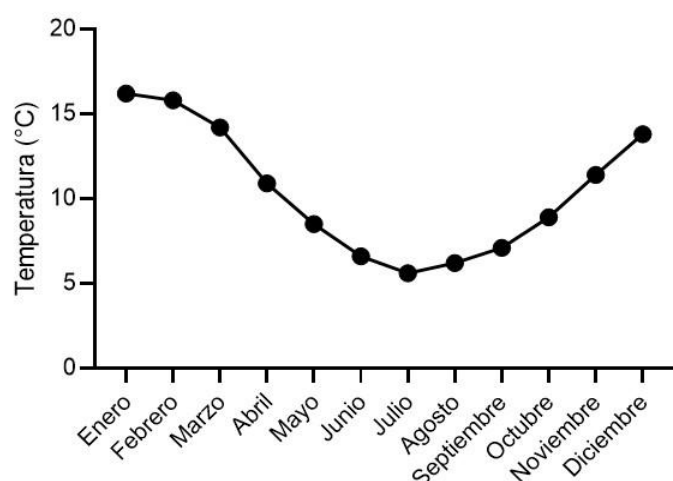


Figura 1. Curva de temperatura del agua del río Chimehuín, CEAN. Los valores representan el promedio de los últimos 10 años (datos del Laboratorio de Calidad de Aguas del CEAN).

3. CRÍA DE SALMÓNIDOS Y PEJERREY PATAGÓNICO

En la piscicultura del CEAN (figura 2) se realiza la cría y reproducción de planteles de trucha marrón (*Salmo trutta* Linnaeus), trucha arcoíris (*O. mykiss*), salmón encerrado (*Salmo salar* Linnaeus) y pejerrey patagónico (*O. hatcheri*), con el fin de proveer de “semilla” (ovas y alevinos) a otros centros de cría y engorde, realizar siembras de remediación en ambientes naturales y mantener lotes para el desarrollo de investigaciones en el centro.

Los reproductores de salmónidos son criados en estanques rectangulares de concreto de 20 m³ de capacidad, separados por especie, edad y sexo. El periodo reproductivo abarca los meses de junio a septiembre, en ese lapso, los salmones son los primeros en alcanzar la madurez, luego maduran las truchas arcoíris y finalmente lo hacen las truchas marrones. Las ovas se fecundan de manera artificial y se incuban con el método libre en bateas de incubación de tipo Atkins de PVC de 300 L de capacidad con flujo constante de agua (figura 3 A). La duración de esta etapa es de aproximadamente 160 UTAs (unidades térmicas acumuladas). A continuación, las ovas se disponen en bastidores apilados de incubación (método de bandejas) hasta el momento de la eclosión de los alevinos, aproximadamente a las 140 UTAs (figura 3 B). Durante la primera etapa de incubación se realizan tratamientos antioomicóticos de manera frecuente, se aplica formol comercial (40%) en una concentración final de 1-2 mL L⁻¹, entre 3 y 4 veces por semana, el tratamiento es suspendido cuando comienza la eclosión. Los alevinos se mantienen en las bateas de incubación hasta alcanzar el peso de 1 g (figura 3 C), luego se trasladan a estanques rectangulares en donde se mantienen en densidades de hasta 10 kg m⁻³. El resto del ciclo de cría, hasta alcanzar la madurez sexual, incluye maniobras de manejo tales como muestreos de crecimiento y clasificaciones periódicas. La alimentación de los salmónidos mantenidos en el centro está comprendida por una dieta a base de alimento balanceado comercial, de composición y calibre acorde al tamaño de los peces.

En el CEAN se realiza también la cría y reproducción del pejerrey patagónico. El cultivo de esta especie se encuentra aún en una etapa de experimentación y desarrollo. Existen en la provincia del Neuquén experiencias de cría en sistemas de balsas jaulas en embalses artificiales (Hualde *et al.*, 2011) pero en la actualidad no hay pisciculturas que hayan adoptado a esta especie para el cultivo con fines productivos. Los reproductores de pejerrey patagónico se mantienen en estanques de 1.000 L, en densidades de hasta 4-5 kg m⁻³. En los meses de octubre y noviembre los peces maduran sexualmente. El desove y la fecundación se realizan de manera artificial o natural. A continuación, las ovas se incuban en botellas tipo Zoug, que están provistas con un sistema de entrada de agua desde el fondo de la botella que garantiza la oxigenación y el movimiento continuo de las ovas (figura 3 D). En esta etapa se aplican tratamientos antioomicóticos con formol comercial

(40%), en dosis y frecuencias similares a las descritas para ovas de salmónidos. Luego de la eclosión, las larvas son alimentadas en primera instancia con zooplancton (producido en estanques fertilizados), luego con *Artemia salina* Linnaeus, y finalmente se les suministra alimento balanceado o dietas experimentales. La tasa de supervivencia es baja y se considera que esta etapa es la más crítica en el cultivo de esta especie (Torres, Laboratorio de Producción y Genética del CEAN, comunicación personal).

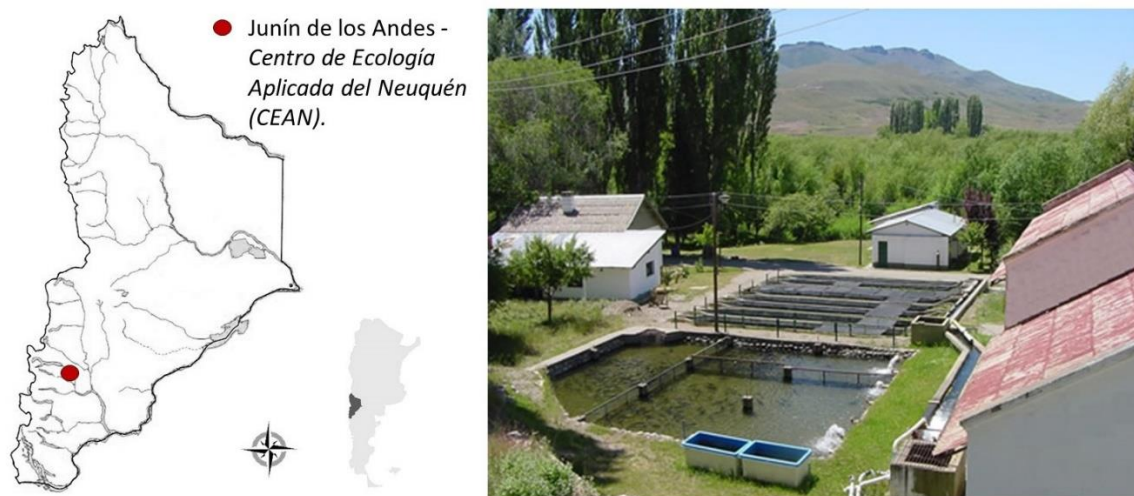


Figura 2. Localización del Centro de Ecología Aplicada del Neuquén (CEAN), próximo a la ciudad de Junín de los Andes, provincia del Neuquén. En la fotografía se pueden observar los contenedores para la cría de salmónidos.

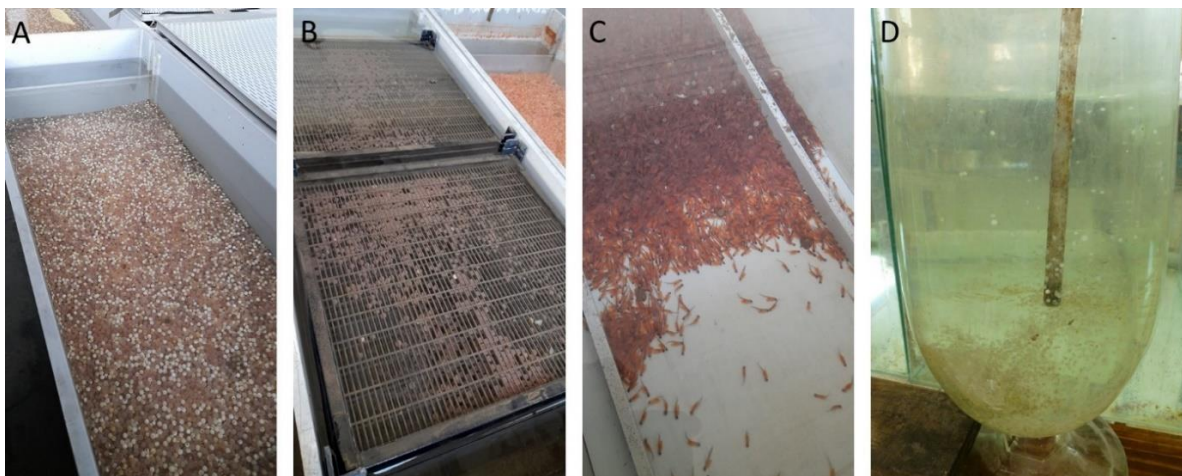


Figura 3. Sistemas de incubación para ovas de salmónidos y pejerreyes. A) Batea de incubación donde se disponen las ovas de salmónidos con el método "libre". Se observan numerosas ovas muertas, de color blanquecino, que son susceptibles a la colonización por Oomycetes. B) Bastidores apilados para la última etapa de incubación. C) Alevinos con saco después de la eclosión y el retiro de los bastidores. D) Botella Zoug para la incubación de ovas de pejerrey patagónico.

4. OVAS Y PECES UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS

4.1. Ovas

Para los ensayos se utilizaron ovas embrionadas, en estadio de ojo, de trucha arcoíris y pejerrey patagónico provenientes de los planteles de reproductores de la piscicultura del CEAN. Las ovas se extrajeron de las bandejas de incubación, en el caso de las ovas de trucha y de las botellas Zoug en el caso de las ovas de pejerrey, luego se desinfectaron con un baño de formol comercial (40%) al 1% durante 15 min y se enjuagaron 2 veces en agua destilada estéril, antes de su uso en los ensayos. En ensayos previos, no presentados en este trabajo de tesis, se verificó la efectividad de este tratamiento como antiséptico contra eventuales microorganismos que pudieran ser transportados junto con las ovas e interferir en los experimentos.

4.2. Peces

Para los ensayos se utilizaron ejemplares juveniles de 3-6 g de trucha arcoíris provenientes de la piscicultura del CEAN y un lote proveniente de un hatchery privado de la localidad de Aluminé, Neuquén. Los peces del CEAN se utilizaron para todos los ensayos excepto para el ensayo de coinfección entre *Flavobacterium psychrophilum* (Bernardet y Grimont) Bernardet y *S. parasitica* (capítulo 3) donde se utilizaron los peces del hatchery de Aluminé. Hasta el momento del ensayo, los peces se mantuvieron en piletas de fibra de vidrio (8 kg m^{-3}) con provisión constante de agua. Los peces se alimentaron con un alimento balanceado comercial marca Ganave dos veces por día a una tasa de alimentación de entre el 2 y 3%. Diariamente, los peces se observaron para la detección de anormalidades o signos de enfermedad. La alimentación fue suprimida 2 días antes de la realización de cada ensayo.

Para el ensayo con pejerrey patagónico se utilizaron larvas provenientes de la piscicultura del CEAN. Las larvas se mantuvieron en acuarios de vidrio de 100 L hasta el momento del ensayo. La dieta hasta su utilización consistió en zooplancton y *A. salina*.

5. SISTEMAS DE EXPERIMENTACIÓN

5.1. Sistemas de experimentación con ovas

Para la realización de los experimentos se construyeron dos sistemas diferentes de incubación de ovas en pequeña escala.

Sistema N° 1. Se utilizaron placas de Petri de poliestireno de 88 mm diám. y 23 mm de alto (figura 4 A y B). En la tapa de cada placa se realizaron dos perforaciones donde se colocaron: una aguja hipodérmica que sirvió de inyector de aire y un tip amarillo con filtro de gasa para el escape de aire. El sistema de aireación se completó con aireadores eléctricos para acuarios y mangueras plásticas. Las placas se completaron con 80-90 mL de agua de río estéril.

Sistema N° 2. Se utilizaron frascos plásticos de boca ancha de 100 mL de capacidad (figura 4 C). En la tapa de cada frasco se incorporó un inyector de aire y un tip amarillo con filtro para el escape de aire. Los frascos se completaron con 50-60 mL de agua de río estéril.



Figura 4. Sistemas de incubación en pequeña escala utilizados en los ensayos experimentales. A) y B) sistema N°1, placas de Petri con 80-90 mL de agua de río estéril; C) sistema N°2, frascos de boca ancha con 50-60 mL de agua de río. Ambos sistemas fueron provistos con aireación constante.

5.2. Sistemas de experimentación con peces - acuarios

Los experimentos de exposición a zoosporas de Oomycetes y tratamiento abrasivo (desarrollados en el capítulo 2) se realizaron en acuarios de vidrio de 20 L de capacidad, completados con 10 L de agua (figura 5 A y B). Se utilizó agua de perforación con el fin de minimizar el riesgo de contaminación con bacterias, parásitos u esporas de Oomycetes, además, los acuarios se taparon con agropol para evitar el ingreso de partículas del medio. Los acuarios se mantuvieron con provisión de aire constante, para lo cual se utilizó una bomba de aire de tipo industrial que alimentó a cada acuario mediante mangueras y piedras difusoras. Por otra parte, para el ensayo de exposición consecutiva (coinfección con cepas de *F. psychrophilum* y *S. parasitica*) (capítulo 3) se usaron acuarios de PVC de 80 L de capacidad, completados con 55 L de agua. Además de estar provisto de aireación constante, este sistema de acuarios permitió la renovación de agua (figura 5 C). En este periodo, el agua desagotada fue clorinada constantemente. Finalmente, para el ensayo con larvas de pejerrey patagónico (capítulo 2) se utilizaron frascos de vidrio de 1,5 L de capacidad, completados con 0,5 L de agua de perforación. Se colocó una tapa con dos perforaciones, una para la entrada de la manguera de aire y otra para permitir el escape de aire del frasco (figura 5 D).



Figura 5. Sistemas de acuarios para experimentación con peces. A) y B) acuarios de vidrio completados con 10 L de agua de perforación y aireación constante. C) acuarios de PVC con provisión constante de agua. D) frascos de vidrio con tapa completados con 0,5 L de agua de perforación y aireación constante.

6. AISLAMIENTO DE OOMYCETES

Los aislamientos de Oomycetes se realizaron a partir de peces, ovas y muestras de materia orgánica vegetal obtenidas de la piscicultura del CEAN. Durante los años 2012 al 2019 se colectaron ovas de trucha arcoíris, trucha marrón, salmón del atlántico y pejerrey patagónico naturalmente infectados desde las bateas o botellas de incubación. Al momento de ser retiradas, las ovas se encontraban muertas y presentaban un micelio evidente, de color blanquecino que irradiaba desde la superficie (figura 6 A y B), las ovas se retiraron cuidadosamente con una pinza. Por otro lado, desde las piletas o estanques de cría, se recolectaron peces moribundos (trucha arcoíris y pejerrey patagónico) que presentaban lesiones en la superficie corporal y la presencia de un micelio evidente, de color blanquecino (figura 6 C y D); se realizó la necropsia de los peces y se extrajeron las muestras de micelio con pinzas y tijeras estériles.



Figura 6. Ovas y peces con oomicosis. A) Ovas de trucha arcoíris infectadas, color blanquecinas, con micelio evidente, en bandeja de incubación. B) Ova de pejerrey patagónico infectada con micelio evidente. C) Salmones del Atlántico moribundos con micelio en las aletas pectorales. D) Trucha arcoíris con micelio en gran parte de la superficie del cuerpo.

Las muestras de material infectado se llevaron al laboratorio y se observaron bajo microscopio binocular estereoscópico. Las muestras se colocaron en placas de Petri, con agua destilada y semillas de sésamo estériles y se incubaron a temperatura ambiente de laboratorio (15-20 °C). Una vez que las semillas fueron colonizadas, una hifa o esporangio se transfirió asépticamente a una placa con medio de cultivo agarizado Emerson con extracto de levadura (YpSs, por sus siglas en inglés: Yeast protein Soluble starch; almidón soluble 20 g, extracto de levadura 1 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g, agar 20 g, agua destilada 1000 mL). Los aislamientos se purificaron mediante sucesivos subcultivos de los micelios en placas de YpSs con 1 mL de solución de antibióticos (estreptomicina 0,5 g y cloranfenicol 0,25 g en 100 mL de agua destilada). Para este procedimiento, se extrajo un bloque de agar del borde de la colonia y se lo colocó asépticamente en una nueva placa

de YpSs. Los procedimientos se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Fuller y Jaworski (1987), Johnson *et al.* (2002) y Pacheco Marino y Steciow (2009).

7. CULTIVO DE OOMYCETES Y OBTENCIÓN DE ZOOSPORAS

Las cepas aisladas se mantuvieron en placas de Petri con medio de cultivo glucosa-levadura (GL: glucosa 10 g, extracto de levadura 5 g, cloranfenicol 0,1 g, estreptomicina, 0,06 g, penicilina 0,6 g, agar 14 g, agua destilada 1000 mL, pH 7,2) a 4 °C y se repicaron periódicamente.

Para la obtención de los estadios zoospóricos (figuras 7 y 8), se utilizó la metodología descrita por Hussein y Hatai (2002). Por cada cepa se colocaron bloques de 1 cm² de GL con crecimiento activo de micelio en Erlenmeyers que contenían 100 mL de GL líquido (glucosa 10 g, extracto de levadura 5 g, cloramphenicol 0,1 g, estreptomicina, 0,06 g, penicilina 0,6 g, agua destilada 1000 mL, pH 7,2), estos cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente (10-18 °C). Después de 7 días se extrajo el micelio, se lavó repetidas veces en un vaso de precipitado con agua corriente estéril y se lo fraccionó con tijera en trozos de aproximadamente 1 x 3 cm que se colocaron en Placas de Petri de 15 cm de diámetro con 100 mL de agua corriente estéril. Se realizaron sucesivos recambios de agua a las 48, 72 y 96 h. En el momento de este último recambio, las zoosporas se visualizaron con microscopio estereoscópico. A las 120 h se recolectó el agua con las zoosporas en suspensión y se filtró mediante el uso de una gasa para eliminar impurezas, zoosporas germinadas y micelios desarrollados. La cantidad de zoosporas en suspensión fue estimada mediante el conteo en cámara de Neubauer (Hussein y Hatai, 2002), se realizaron entre 8 y 12 mediciones que fueron promediadas para estimar el número de zoosporas por mL en las placas de Petri. Para las exposiciones de las ovas o peces a los estadios zoospóricos, la concentración final de zoosporas fue estimada según el volumen final de agua en los acuarios o recipiente de incubación, el volumen de suspensión de zoosporas utilizado y la concentración de zoosporas obtenida de los cultivos.

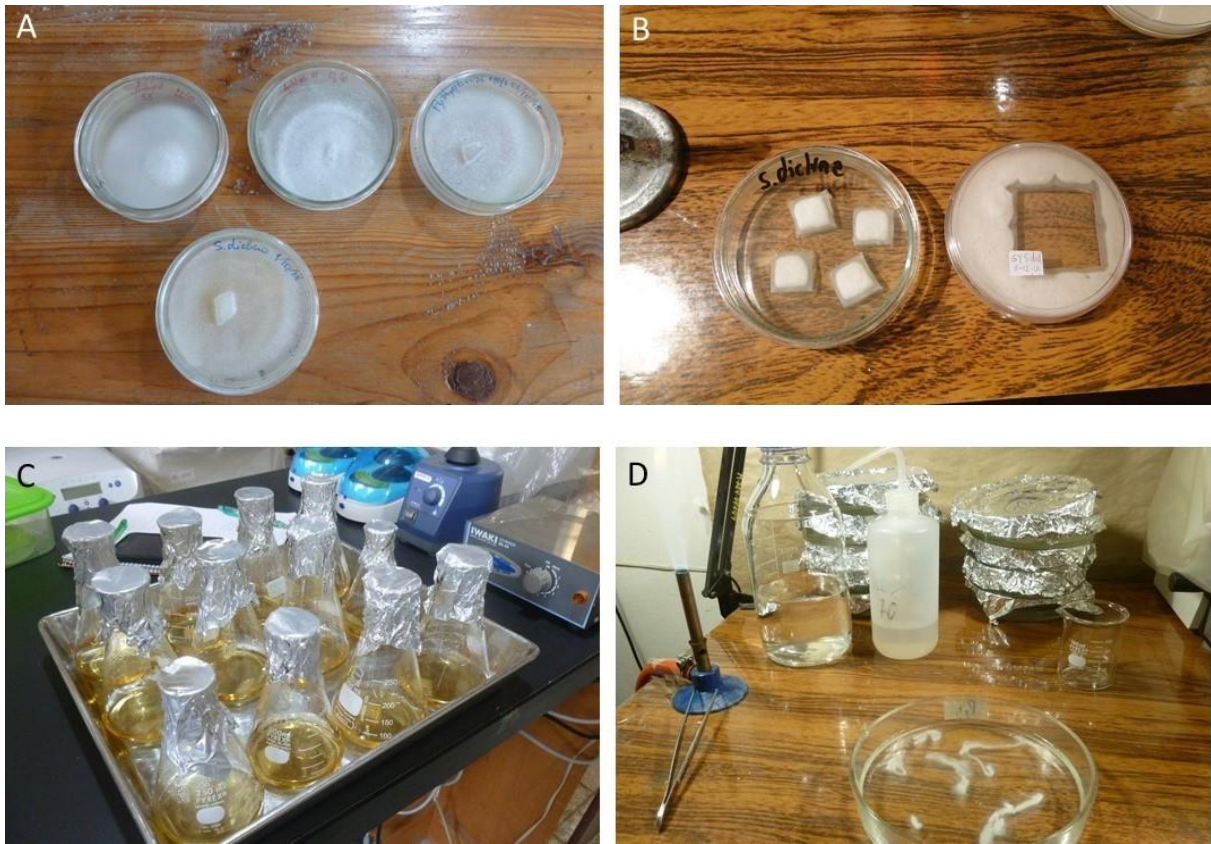


Figura 7. Obtención de zoosporas de Oomycetes. A) Cultivos en placas con medio agarizado GL. B) Bloques de 1 x 1 cm con crecimiento de micelio. C) Crecimiento de micelio en medio líquido GL. D) Trozos de micelio en agua destilada estéril donde se estimuló la formación de zoosporangios y liberación de zoosporas.

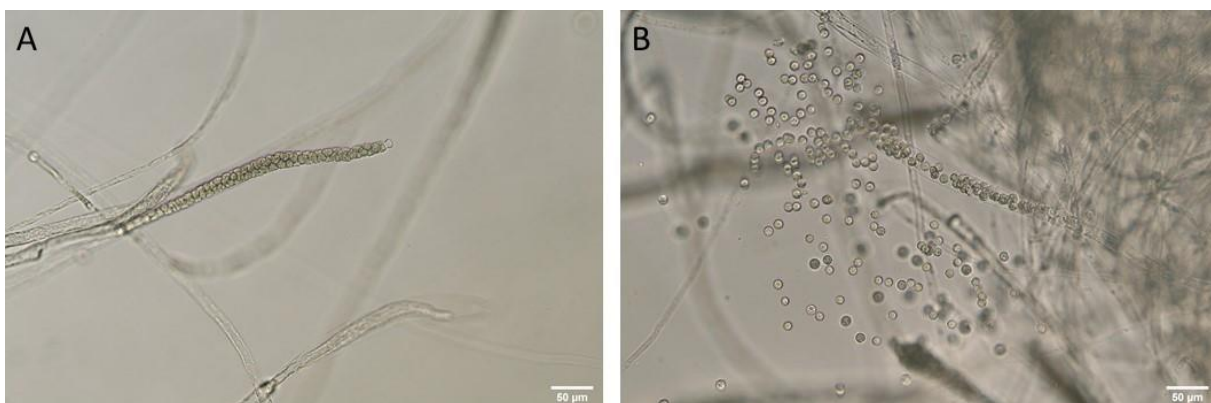


Figura 8. Obtención de zoosporas de Oomycetes. A) Zoosporangio terminal de *Saprolegnia* sp. B) Liberación de zoosporas. Barra de escala = 50 µm.

8. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO.

Las muestras de ovas y tejidos se fijaron en formol bufferado al 10%, se conservaron en alcohol al 70% y se procesaron finalmente mediante técnicas histológicas

convencionales. El procedimiento utilizado comprendió en todos los casos, el siguiente esquema: deshidratación en soluciones de alcohol 70°, alcohol 80° (2 pasos), alcohol 96° (2 pasos) y alcohol 100° (2 pasos). Clarificado en solución de alcohol – xilol (50/50) y xilol (2 pasos). Infiltración en baños de xilol – parafina y parafina (2 pasos) a 60 °C. Los tacos de parafina se prepararon con un inclusor Leica. Se realizaron cortes histológicos de entre 3 y 5 µm de espesor con un micrótopo de rotación Leica RM2135. Las cortes se estiraron en un baño de agua a 50 °C, se montaron en portaobjetos y se secaron en una placa térmica a 45 °C por 2 h y en estufa a 37 °C por 2 días. Luego, fueron coloreados con hematoxilina-eosina, coloración tricrómica de Masson, técnica de metenamina de plata de Grocott y ácido peryódico de Schiff (PAS), según el caso. Los preparados se observaron en un microscopio Nikon Eclipse e600. Se tomaron fotografías digitales mediante una cámara digital MShot acoplada al microscopio y el software MShot Image Analysis System 1.5.2.

CAPÍTULO 1: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE OOMYCETES

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ubicación taxonómica del phylum Oomycota

Los Oomycetes han sido organizados y reorganizados en sucesivas oportunidades a lo largo del tiempo, con respecto a su ubicación taxonómica. Debido a su forma de nutrición y al hecho de presentar un típico crecimiento miceliar, estos organismos filamentosos fueron originalmente agrupados dentro del reino Fungi. Sin embargo, los Oomycetes poseen numerosos caracteres distintivos (tabla 1), como la producción de oosporas como producto de la reproducción sexual, la ocurrencia de núcleos diploides en los micelios vegetativos y la producción de zoosporas asexuales biflageladas, entre otros, que los distinguen del reino Fungi (Alexopoulos *et al.*, 1996). En la figura 1 se muestra, en un árbol filogenético simplificado de los eucariotas, la relación entre los Oomycetes y hongos verdaderos (Fungi). Margulis *et al.* (1990) ubicaron a los Oomycetes dentro del reino Protocista, un grupo no monofilético, junto con todos los protozoos y las algas. Otras clasificaciones agrupan a los Oomycetes como la subdivisión Pseudofungi, phylum Heterokonta del reino Chromista (Cavalier-Smith, 1986) o la subdivisión Heterokontimycotina del reino Heterokonta. Alexopoulos *et al.* (1996) y Dick (2001), colocan al phylum Oomycota dentro del reino Stramenopila, una división de los eucariotas que incluye a los mohos acuáticos y las algas pardas, organismos que comparten como rasgo ancestral común la presencia de zoosporas biflageladas, con dos flagelos diferentes (heterokontas), uno liso y otro barbulado con mastigonemas (Patterson y Sogin, 1992; Dick, 2001). Finalmente, Cavalier-Smith y Chao (2006) ubican a los Oomycetes junto con organismos autótrofos como las diatomeas, crisofitas, xantofitas y algas pardas (feofitas) y una serie de organismos heterótrofos dentro del “infrarreino” Heterokonta (Stramenopila), perteneciente al reino Chromista.

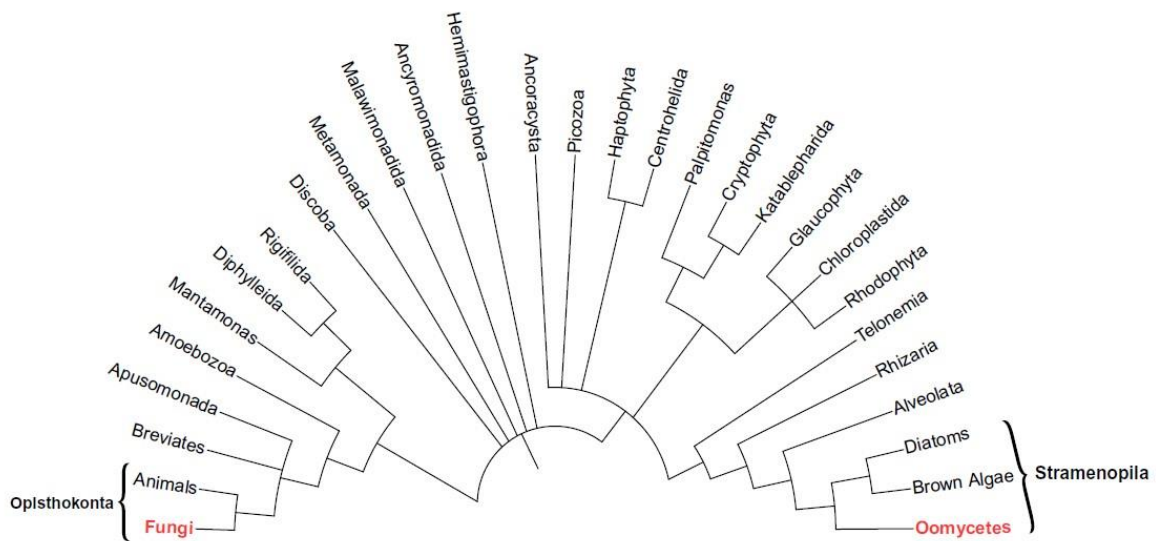


Figura 1. Árbol filogenético simplificado de los Eucariotas que muestra la relación distante entre Oomycetes y hongos (Fungi). Extraído de McGowan y Fitzpatricka, (2020).

1.2. Características del phylum Oomycota

El phylum Oomycota incluye tanto a especies unicelulares, holocárpicas y eucárpicas como a especies filamentosas de hifas cenocíticas muy ramificadas. Los septos se encuentran ausentes excepto en la base de los órganos reproductivos (zoosporangios, yemas, oogonios y anteridios). La pared celular, una característica importante que se utiliza para separarlos de Fungi, está compuesta predominantemente de β -1,3- y β -1,6- D-glucanos y celulosa y, ocasionalmente, se encuentra quitina en algunos géneros. La reproducción sexual es casi siempre heterogamética, en la mayoría de las especies los gametangios se diferencian en estructuras masculinas, de aspecto de hifas pequeñas, correspondientes a las ramas anteridiales que rematan en los anteridios y estructuras femeninas de tipo globosos llamadas oogonios. Los gametangios producen por meiosis oosferas inmóviles (gametos femeninos), mientras que en el anteridio se desarrollan núcleos germinales que son introducidos en las oosferas mediante un tubo de germinación. Por otra parte, la reproducción asexual en la mayoría de los Oomycetes se produce mediante zoosporas heterokontas desarrolladas en los esporangios o, en algunos casos, en vesículas donde migran los núcleos y se diferencian en su interior las zoosporas.

En la mayoría de las especies de Oomycetes existen dos tipos morfológicos de zoosporas biflageladas. El primer tipo, denominado zoospora primaria, es piriforme y posee ambos flagelos, uno barbulado, pleuronematado y otro liso, de tipo látigo, en la región anterior de la espora. El segundo tipo, la zoospora secundaria, presenta un aspecto reniforme con los flagelos insertados lateralmente. Ambos flagelos se dirigen en direcciones opuestas, un flagelo alargado y con mastigonemas se dirige anteriormente mientras que un flagelo más corto y en forma de látigo se dispone hacia atrás. Algunas especies de Oomycetes han perdido en su evolución uno o ambos tipos de zoospora, por lo que la espora se enquista en su interior (Alexopoulos *et al*, 1996).

Tabla 1. Características de los Oomycetes que los diferencian de los hongos verdaderos pertenecientes al reino Fungi. Adaptado y modificado de McGowan y Fitzpatricka, (2020).

| Característica | Oomycetes | Hongos verdaderos |
|---|---|---|
| Reproducción sexual | Las oosporas se forman cuando las oosferas son fertilizadas por núcleos de anteridios | La reproducción sexual da como resultado cigosporas, ascosporas o basidiosporas |
| Estado nuclear vegetativo | Diploide | Haploide o dicariótico |
| Componentes principales de la pared celular | (1 → 3), (1 → 6) β-D-glucanos, celulosa (cantidades mínimas de quitina en algunos especies) | Quitina, (1 → 3), (1 → 6) β-Dglucanos, α-D-mananos y celulosa en cantidades menores |
| Estructura de las hifas | Aseptadas y multinucleadas | Células individuales, hifas tabicadas o sin tabiques en algunas clases, con uno o más núcleos por compartimento |
| Tipo de flagelo en zoospora | Biflagelado, heterokontes: uno posterior corto, tipo látigo y uno fibroso dirigido anteriormente con mastigonemas | Cuando poseen flagelo: usualmente posterior, tipo látigo |
| Mitocondrias | Crestas tubulares | Crestas aplanadas |
| Síntesis de esterol | Fucosterol | Ergosterol |
| Síntesis de Lisina | Ruta del ácido diaminopimélico | Ruta del Alfa-aminoadipato |
| Pigmentación | Usualmente sin pigmento | Hifas y esporas comúnmente pigmentadas |

1.3. Sistemática del phylum Oomycota

La taxonomía actual de los Oomycetes es en gran parte el resultado de líneas de investigación desarrolladas por Sparrow (1960, 1976), Dick (2001) y Johnson *et al.*, (2002). El phylum Oomycota contiene una única clase: Oomycetes. Según Sparrow (1960), los Oomycetes pueden agruparse en dos grandes subgrupos taxonómicos, denominados “galaxias”, uno que abarca los “órdenes de mohos acuáticos saprolegnianos”, en gran parte saprótrofos (Eurychasmales, Leptomitales y Saprolegniales) y otro que incluye a los “órdenes peronosporales”, a menudo patógenos de las plantas (Rhipidiales, Pythiales y Peronosporales); estos grupos fueron separados en base al tipo de zoospora producido como así también por características de las oosferas y oosporas (Alexopoulos *et al.*, 1996). Dick *et al.* (1984) denomina a las “galaxias” creadas por Sparrow (1960) como las subclases Saprolegniomicetidae y Peronosporomicetidae. Dentro de estas subclases, algunos autores consideran cinco órdenes: Saprolegniales, Rhipidiales, Leptomitales, Lagenidiales y Peronosporales (Alexopoulos *et al.*, 1996). Mientras que por ejemplo Dick, (1990) reconoce seis órdenes: Saprolegniales, Rhipidiales, Leptomitales, Peronosporales, Sclerosporales y Pythiales. En la figura 2 se muestran las posibles relaciones filogenéticas entre los principales órdenes y familias de Oomycetes (Beakes y Thines, 2017).

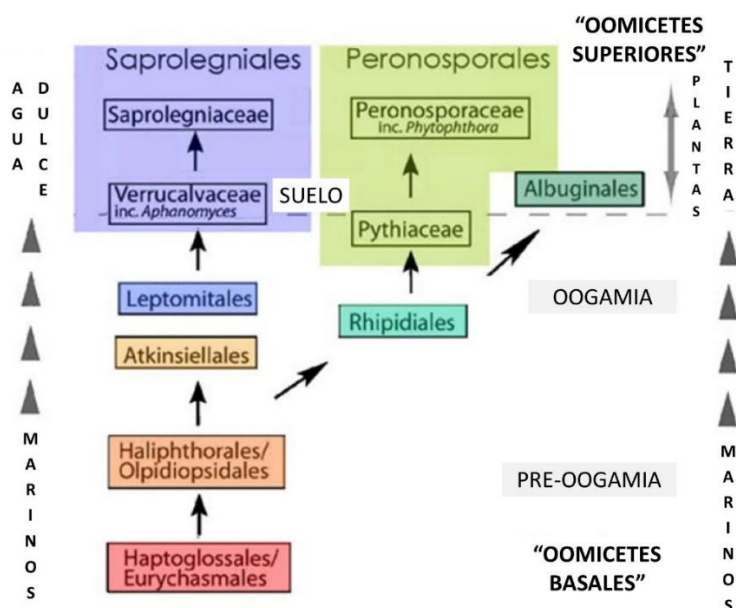


Figura 2. Resumen esquemático de las posibles relaciones filogenéticas entre los principales órdenes y familias de Oomycetes. Extraído y modificado de Beakes y Thines (2017).

1.4. El orden Saprolegniales

El orden Saprolegniales agrupa a organismos de distribución mundial tanto de agua dulce o salobre como también de ambientes terrestres y húmedos. La mayoría de las formas acuáticas, crecen en ríos, arroyos, lagunas y lagos con suficiente aireación donde son más comunes en zonas poco profundas, cercanas a la costa. Gran parte de estas especies son saprótrofas sobre los restos de plantas y animales y, como grupo, juegan un papel importante en la degradación y reciclado de nutrientes en los ecosistemas acuáticos. Sin embargo, hay algunas especies parásitas que atacan algas, nematodos, rotíferos, larvas de mosquitos, cangrejos y peces. Por otra parte, la mayoría de los Oomycetes terrestres son parásitos facultativos o altamente especializados de plantas vasculares y causan serias enfermedades en algunos cultivos de importancia económica (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Dentro del orden Saprolegniales se encuentran los tres principales géneros que son reconocidos como capaces de infectar a anfibios, peces y mariscos (moluscos, crustáceos y equinodermos): *Saprolegnia*, *Achlya* y *Aphanomyces* (van West, 2006; Barde *et al.*, 2020). El género *Saprolegnia* (que incluye a especies como *S. parasitica*, *Saprolegnia diclina* Humphrey y *Saprolegnia australis* Elliott) es aislado frecuentemente durante las infecciones oomicóticas en peces, y es así que la “saprolegniasis” resulta ser una de las enfermedades más perjudiciales para la acuicultura, estimándose que puede causar hasta el 10% de las pérdidas en pisciculturas de salmónidos (Bruno y Wood, 1999; van West, 2006; Phillips *et al.*, 2008; Sandoval-Sierra *et al.*, 2014a; Barde *et al.*, 2020). *Saprolegnia diclina* y *S. ferax* son especies patógenas de anfibios, en particular *S. ferax* ha sido causante en parte de la declinación de anfibios en ambientes naturales (Phillips *et al.*, 2008). Especies del género *Achlya* fueron también encontradas causando infecciones en peces (Bruno y Ellis, 1996; Phillips *et al.*, 2008; Duc *et al.*, 2016; Ming y Hatai, 2017). Por otra parte, *Aphanomyces* incluye patógenos causantes de enfermedades de crustáceos, *Aphanomyces astaci* Schikora produce la peste del cangrejo o afanomicosis y es considerada una de las especies invasoras más perjudiciales del mundo. Originaria de ambientes dulceacuícolas de Norteamérica, esta enfermedad fue introducida en Europa,

y causó mortalidades que han llevado a la declinación poblacional de especies nativas de langostas o cangrejos de río (Diéguez-Uribeondo, 2006; Rezinciuc *et al.*, 2015).

Los miembros del orden Saprolegniales se caracterizan por poseer un micelio cenocítico profusamente ramificado. Los septos se forman justo por debajo de las estructuras reproductivas, separándolas de las hifas somáticas, que permanecen aseptadas. Las hifas varían en diámetro y producen, en muchas especies, zoosporangios terminales donde se desarrollan y liberan las zoosporas. En algunos casos, como en el género *Saprolegnia*, existen zoosporangios de repetición o proliferación interna (Alexopoulos *et al.*, 1996) (figura 3). Las saprolegniales producen zoosporas primarias y secundarias. Algunas especies, como *Pythiopsis spp* de Bary, producen sólo zoosporas primarias, otras como las pertenecientes al género *Saprolegnia* producen ambos tipos de zoosporas y una gran mayoría, como en el caso de *Dictyuchus sp.* Leitg. y *Traustotheca sp.* Humphrey, producen sólo zoosporas secundarias. Tanto los tipos de zoosporas producidos, como el comportamiento de éstas son caracteres taxonómicos importantes para este grupo. Las especies que producen ambos tipos de zoosporas son denominadas dimórficas mientras que las que producen sólo un tipo, son monomórficas. De acuerdo a que las zoosporas reciban uno, dos o más períodos de motilidad, las especies pueden ser descritas como monoplanéticas, diplanéticas o polioplanéticas. La zoospora primaria, de natación lenta, se dispersa más allá del zoosporangio y de la colonia parental, luego se asienta y redondea para producir un quiste de pared delgada, que libera finalmente la zoospora secundaria (Hughes, 1994). Esta última, es capaz de una natación más vigorosa y puede mantener la movilidad por varias horas y aún días, y en muchos casos se considera que es la unidad infectiva (Hughes, 1994). Estas zoosporas producen quistes secundarios con distintos tipos de ornamentación. Si el quiste de la zoospora secundaria no encuentra un sustrato u hospedante favorable, puede germinar liberando otra zoospora secundaria y dar origen a otro quiste secundario, estos ciclos repetidos de enquistamiento y emergencia se denominan “poliplanetismo”. Este comportamiento es un aspecto adaptativo que posibilita que los propágulos de *Saprolegnia spp.* tengan varios intentos de localizar y colonizar un sustrato favorable (Hughes, 1994). Finalmente,

cuando el quiste secundario encuentra un sustrato u hospedador adecuado, se produce la germinación a través de un tubo germinativo.

En el caso de la reproducción sexual, la meiosis ocurre justo antes de la formación de las gametas y el proceso reproductivo incluye el pasaje de los núcleos masculinos dentro de los oogonios a través de un tubo de fertilización. Los oogonios son en general globosos y contienen una o más oosferas, globosas y uninucleares. Las ramas anteridiales son ramificadas, llevan a los anteridios y pueden originarse o no de la misma hifa que los oogonios. Las especies se pueden denominar andróginas, monoclinas o diclinas, de acuerdo a la posición de la célula anteridial con respecto al pie del oogonio. El proceso de reproducción sexual se denomina contacto gametangial y da origen a las oosporas. Algunas características de las oosporas tienen también valor taxonómico, se pueden caracterizar como céntricas, subcéntricas, excéntricas o subexcéntricas dependiendo de la ubicación de las gotas lipídicas que tienen en su interior. La mayoría de las saprolegniales son hermafroditas o monoicas (homotálicas) y unas pocas son heterotálicas (Alexopoulos *et al.*, 1996).

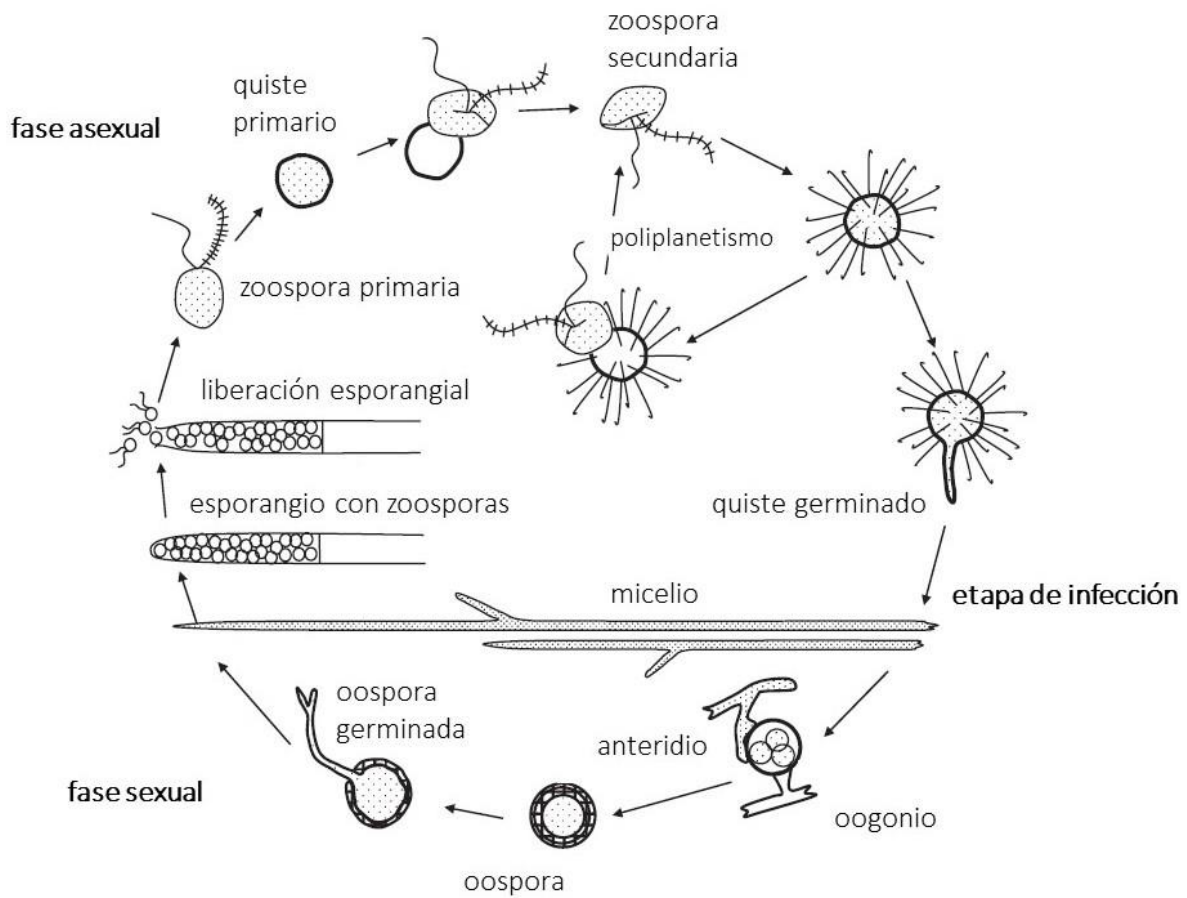


Figura 3. Diagrama esquemático del ciclo de vida de *Saprolegnia* sp. Extraído y modificado de van West (2006).

1.5. Identificación molecular

Las descripciones morfológicas fueron complementadas en los últimos años con análisis moleculares. La amplificación y secuenciación de distintas regiones del genoma de los Oomycetes han resultado ser herramientas útiles para la identificación y caracterización de especies, así como también para el estudio de las relaciones naturales entre ellas (Steciow *et al.*, 2007). De esta manera, regiones del ADN nuclear como el gen de la β -tubulina, el 18S rRNA, 5.8S rRNA y 28S rRNA o las regiones no codificantes ITS (Espaciador Transcrito Interno) y, por otra parte, las regiones del genoma mitocondrial Cox1 y Cox2, se han utilizado exitosamente para definir relaciones taxonómicas entre géneros de Oomycetes (de la Bastide *et al.*, 2015; Sarowar *et al.*, 2019; Barde *et al.*, 2020).

La amplificación de ADN nuclear ribosómico se utiliza para la identificación molecular de muchos organismos ya que comprenden tanto secuencias altamente conservadas durante la evolución como secuencias altamente variables entre especies e incluso dentro de especies. El ADN ribosómico, que codifica ARN ribosómico, regulando la transcripción e iniciación de la amplificación, consta de regiones codificantes y no codificantes. Las regiones codificantes comprenden los genes altamente conservados, 18S rRNA, 28S rRNA y 5.8S rRNA, que son utilizadas para la identificación y estudios filogenéticos sobre Oomycetes (White *et al.* 1990; Villa *et al.*, 2006; de la Bastide *et al.*, 2015; Sarowar *et al.*, 2019). Las regiones no codificantes, denominadas “Espaciadores Internos Transcritos” ITS1 e ITS2, no son conservadas y se amplifican con el método de PCR utilizando los *primers* universales ITS1 e ITS4 (Paul y Steciow, 2004; Villa *et al.*, 2006; Hulvey *et al.*, 2007) o ITS5 e ITS4 (Sandoval-Sierra *et al.*, 2014b; Rahman y Sarowar, 2016; Sarowar *et al.*, 2019) (figura 4); estas regiones son de las más utilizadas debido a su relativamente alta variabilidad y a la disponibilidad de *primers* que proporcionan datos de secuencias para una amplia gama de taxas (White *et al.*, 1990; Villa *et al.*, 2006). Sin embargo, debido a la aparente falta de funcionalidad en esta región no codificante de rDNA, la alineación de las secuencias de ITS se ve en algunas ocasiones obstaculizada por grandes cantidades de inserciones y deleciones, que pueden ser un problema para la precisión de los alineamientos. Es por esto que, autores como Robideau *et al.* (2011) sugieren que otras regiones también deberían usarse para obtener más claridad en los trabajos taxonómicos y de identificación de especies de Oomycetes.

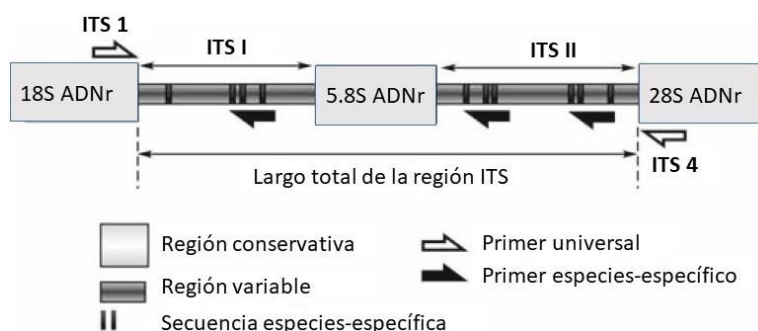


Figura 4. Regiones no codificantes ITS1 e ITS2 y genes asociados del ADN ribosómico utilizadas para la identificación y estudios filogenéticos sobre Oomycetes. Extraído y modificado de Horisawa y Sakuma (2009).

Por otra parte, el genoma mitocondrial ha sido empleado ampliamente en estudios de evolución por ser heredado de manera uniparental, por contener una copia única de genes ortólogos y por tener una alta tasa de mutación, para definir la distancia genética entre organismos cercanamente relacionados y así establecer sus relaciones filogenéticas (Rodríguez-Salinas y González-Halphen, 2009). El ADN mitocondrial contiene genes que codifican para las proteínas de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. Las secuencias de los loci mitocondriales (Cox1 y Cox2) que codifican para las subunidades 1 y 2 (COI-COII) de la citocromoxidasa-c, son utilizadas también para el estudio de relaciones filogenéticas en Oomycetes (figura 5) (Hudspeth *et al.*, 2000; Sarowar *et al.*, 2019). La amplificación del locus mitocondrial Cox1 ha tenido resultados de éxito variable mientras que el Cox2 se ha utilizado para la identificación molecular a niveles taxonómicos más finos, como a nivel de especie o cepa, como así también para estudios filogenéticos y de genética poblacional (Hudspeth *et al.*, 2000; Villa *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2015). Precisamente, a través de los análisis filogenéticos mediante el uso del marcador Cox2, Hudspeth *et al.* (2000) encontraron evidencia para reconocer a las subclases Saprolegniomycetidae y Peronosporomycetidae como grupos naturales y a las taxas Saprolegniales, Leptomitales y Pythiales como grupos monofiléticos. El uso de Cox1 ha sido validado como una opción práctica, aunque complementaria del ITS por Robideau *et al.* (2011): en la comparación de estos marcadores estos investigadores encontraron que el ITS provee mayor variación interespecífica que el Cox1, pero este último se destaca por la amplificación de fragmentos cortos y uniformes, de fácil secuenciación y alineamiento. Por otra parte, Choi *et al.* (2019) proponen el uso del Cox2 como marcador molecular para los estudios de identificación, taxonomía y filogenia de los Oomycetes. En estudios de comparación entre Cox1 y Cox2 sobre géneros representativos, estos autores observaron que el Cox2 resultó tener mayor eficiencia para la amplificación por PCR y mayor éxito en la identificación de especies, con una divergencia interespecífica alta e intraespecífica baja. Si bien tanto Cox1 como Cox2 muestran buenas cualidades para la identificación específica y la realización de estudios filogenéticos, en la actualidad hay menos secuencias disponibles en GenBank (NCBI) con respecto a la región ITS (Sarowar *et al.*, 2019) y por

lo tanto en algunos casos puede resultar más dificultosa la identificación de secuencias problema.

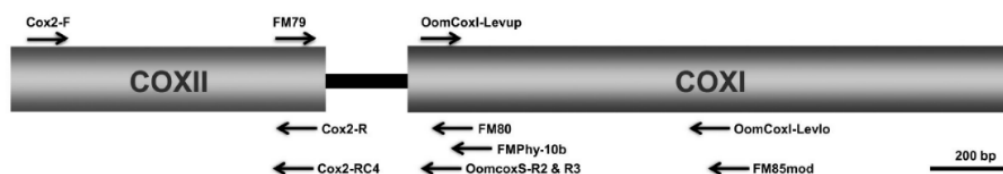


Figura 5. Organización genética del grupo de genes Cox2-1 mitocondrial y ubicación de los *primers* de PCR. Las flechas encima o debajo del fragmento indican algunos de los *primers* que se utilizan para la amplificación. Extraído de Choi *et al.* (2019).

1.6. Proyecto iBol

El código de barras de ADN es un sistema novedoso diseñado para proporcionar identificaciones rápidas, precisas y automatizables de especies mediante el uso de regiones genéticas cortas y estandarizadas (Hebert y Gregory, 2005). A través de la extracción y secuenciación de ADN de una muestra de interés, se pueden realizar alineamientos que permitan comparar las secuencias obtenidas con las ya disponibles en la base de datos de repositorios de acceso libre como el Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) o del proyecto Barcode (<https://v4.boldsystems.org/index.php>). Los alineamientos, que pueden efectuarse en plataformas virtuales de acceso libre como BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), permiten la identificación de las secuencias de interés por similitud con secuencias de identificación confiable (tipo, holotipo u otras). Otra metodología también utilizada para la identificación de secuencias es la construcción de árboles filogenéticos. Los análisis filogenéticos basados en secuencias de ADN permiten la agrupación de especies y la asignación de individuos de identificación desconocida a una especie conocida basada en sus cercanías evolutivas (Elías *et al.*, 2007).

El proyecto de “código de barras de la vida” (Barcode of life) es una iniciativa generada con el fin de obtener grandes cantidades de códigos de barras y construir así una base de datos de referencia cada vez más amplia (Paz *et al.*, 2011). Este proyecto fue propuesto por el investigador Paul Hebert de la Universidad de Guelph, Canadá en 2003

y representa la mayor iniciativa mundial genómica realizada con el fin de inventariar la biodiversidad del planeta (Hebert y Gregory, 2005). *Bold System* es una base de datos de acceso libre que recopila varios elementos esenciales de los códigos de barras de ADN: la información taxonómica, los datos y fotografías del voucher o espécimen, la información de colecta incluyendo datos geográficos, el identificador del espécimen, la secuencia de COI o ITS, los *primers* y los cromatogramas de la secuenciación. Además, la plataforma incluye herramientas útiles para el manejo y análisis de los datos (Ratnasingham y Hebert, 2007). Para apoyar este proyecto fue creado en 2004 el Consorcio del Barcode of Life (CBOL) que incluye más de 120 organizaciones de 45 países. El CBOL promueve el desarrollo de alianzas internacionales entre grupos de investigadores con el objeto de construir, para los próximos 20 años, una biblioteca de código de barras que incluya a todos los organismos eucariotas del planeta (Ratnasingham y Hebert, 2007). Nuestro país participa en el proyecto iBOL a través del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" (MACN) - CONICET y cumple un importante rol desde sus inicios. Actualmente, la Argentina actúa como nodo regional en América del Sur.

La Dra. Mónica Steciow ha incorporado el proyecto "OOMAC - Oomycota de Argentina y Chile" para el estudio de biodiversidad de Oomycetes en estos países al proyecto iBOL, y esto ha permitido el procesamiento y secuenciación de muestras de ADN para la identificación de los Oomycetes aislados en este estudio.

2. HIPÓTESIS

- Diversas especies de Oomycetes colonizan de manera diferencial distintos sustratos (peces, ovas y materia orgánica) asociados a la estación de piscicultura del CEAN.

3. OBJETIVOS

- Aislar e identificar morfológicamente a las especies de Oomycetes asociadas a la cría de salmónidos (Salmonidae) y pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*) en la piscicultura del CEAN.

- Identificar molecularmente e inferir relaciones filogenéticas entre los Oomycetes aislados en la piscicultura.
- Estimar las abundancias relativas por sustratos (ovas, peces y materia orgánica) de las especies aisladas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Identificación morfológica

Los estudios morfológicos fueron realizados sobre cultivos mantenidos en agua sobre semillas de cáñamo/sésamo. Para la observación y medición de distintas características morfológicas de las colonias (diámetro de la colonia, espesor de las hifas, diámetro de los oogonios, número de oosporas por oogonio, diámetro de las oosporas) se utilizó un microscopio Olympus BX 40 equipado con óptica de contraste de fase. Debido a que no todos los cultivos produjeron estructuras sexuales *in vitro*, las identificaciones morfológicas se hicieron sólo cuando fue posible. La determinación de los géneros/especies de Oomycetes se realizó a través de la observación y medición de las estructuras sexuales y asexuales siguiendo las metodologías descritas por Sparrow (1960), Scott (1961), Seymour (1970) y Dick (2001). Las actividades de laboratorio hasta aquí mencionadas fueron desarrolladas en los laboratorios de Ictiopatología del CEAN y en el Instituto de Botánica Spegazzini de la UNLP.

4.2. Identificación molecular

Con el fin de lograr la identificación, mediante el uso de herramientas de biología molecular y bioinformática, de las cepas aisladas y establecer relaciones filogenéticas, se procesaron en el Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” (MACN-CONICET) 143 muestras de cultivos que, posteriormente, fueron enviadas al Centre for Biodiversity Genomics (CBG) de la Universidad de Guelph, Canadá para su secuenciación.

Esto se realizó en el marco del proyecto internacional iBOL –International Barcode of Life– para la identificación genética de especies.

La extracción y amplificación de ADN, se realizó en el Laboratorio de Códigos de Barras Genéticos del MACN. El proceso de extracción fue realizado a partir de cultivos puros mantenidos en medio de cultivo o, en el caso de algunos aislamientos a partir de micelio conservado en etanol absoluto. Se siguió el protocolo para la extracción de ADN en placa de fibra de vidrio del CCDB (*Canadian Centre for DNA Barcoding*) (https://ccdb.ca/site/wpcontent/uploads/2016/09/CCDB_DNA_Extraction-Plants.pdf). La región COII del ADN mitocondrial de los aislamientos se amplificó usando los *primers* COX2F (GGCAAATGGGTTTTCAAGATCC) y COX2R (CCATGATTAATACCACAAATTTTCAC-TAC) (Hudspeth *et al.*, 2000). Se trabajó con 10,5 µL de una solución obtenida de acuerdo al siguiente protocolo: 2 µL de ddH₂O, 10X buffer 1,25 µL, 50 mM MgCl₂ 0,625 µL, 10 µM *primer* COX2 F 0,125 µL, 10 µM *primer* COX2 R 0,125 µL, 10 mM dNTPs, Polimerasa (5U/µL) 0,06 µL. A esta solución se le agregó 2 µL de ADN (muestra). La amplificación se hizo con el siguiente programa de ciclado: 96 °C por 4 min; 24 ciclos de: 96 °C por 30 s, 50 °C por 30 s, 72 °C por 1 min; 72 °C por 4 min, utilizando el protocolo “*PCR amplification for plants and fungi*” del CCDB (https://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB_Amplification-Plants.pdf). Los productos de amplificación se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Invitrogen E-gel® 96 system) y posterior visualización en transiluminador UV equipado con cámara digital. El análisis de las imágenes se realizó mediante el software E-editor™2.0. El producto de la amplificación se envió a secuenciar al CBG. Se realizó una secuenciación bi-direccional (Forward y Reverse) en secuenciador ABI 3730xl DNA Analyzer mediante el protocolo de secuenciación del CCDB (https://ccdb.ca/site/wpcontent/uploads/2016/09/CCDB_Sequencing.pdf). Las secuencias consenso (*contig*) se incorporaron a la plataforma de trabajo del BOLD-Systems (<https://v4.boldsystems.org/index.php>), desde donde fueron descargadas.

Las secuencias obtenidas (*query sequences*) fueron comparadas con todas secuencias de nucleótidos de la base de datos (*target*) del servidor GenBank-BLAST del NCBI (*National Centre of Biotechnology Information*) (<https://blast.nc->

bi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Se obtuvo el listado de las secuencias de Cox2 que presentaron mayor similitud. Se descargaron del GenBank-BLAST las secuencias que presentaron mayor similitud (*closest match*), con una divergencia máxima del 5%, y todas las secuencias con una divergencia de hasta el 1% con respecto al *closest match*. Se descargaron también las secuencias AF086692.1 *Aphanomyces euteiches* Drechsler; AF086689.1 *Pythiopsis cymosa* de Bary; AF086696.1 *Leptomitus lacteus* (Roth) Agardh; LC595988.1 *Phytophthora constricta* Rea et al. y C596057.1 *Phytophthora virginiana* Yang y Hong, que se utilizaron como grupos externos (*outgroups*) en los análisis filogenéticos posteriores.

Se utilizaron los métodos de Neighbor joining e Inferencia Bayesiana para realizar análisis filogenéticos de las secuencias Cox2 obtenidas y las secuencias tomadas del GenBank (NCBI) (secuencias de mayor similitud y secuencias seleccionadas como grupos externos). Mediante el software MEGA se alinearon todas las secuencias usando el algoritmo ClustalW y luego se construyó un árbol de Neighbor joining con el modelo p-distance y un análisis de bootstrap de 1000 repeticiones. Se considera que un soporte de bootstrap $\geq 70\%$ brinda información confiable sobre la posición de la secuencia en el cladograma. Por otra parte, se utilizó el software MrBayes 3.2.2 para inferir árboles filogenéticos según la metodología Bayesiana. Se realizaron dos corridas independientes con cuatro cadenas (3 cadenas calientes y 1 fría) durante 10×10^6 generaciones bajo las probabilidades a priori predeterminadas para todos los parámetros, los árboles se muestrearon cada 100 generaciones. Los valores de probabilidad posterior (PP) se definieron como: “débil” valores entre 53 – 61%, “bueno” valores entre 62 - 95% y “fuerte” los valores $> 96\%$, que se considera que brindan la información más acertada y confiable. Finalmente, se utilizó el modelo de distancias Kimura de 2 parámetros (K2P) y distancias sin corregir (*p-distance*) en MEGA para estimar distancias genéticas entre todas las secuencias, entre y dentro de agrupamientos de secuencias y, para cada caso, se construyó una matriz de datos.

4.3. Abundancia relativa de los aislamientos por sustrato

De acuerdo a las identificaciones realizadas en el análisis molecular, se estimó la abundancia relativa de cada Grupo por sustrato de aislamiento. Las abundancias relativas sobre ovas, peces y materia orgánica fueron estimadas de acuerdo con Arellano *et al.* (2008) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Abundancia relativa por sustrato} = \frac{\text{(nro. de aislamientos de un Grupo)}}{\text{nro. de aislamientos totales}}$$

5. RESULTADOS

5.1. Identificación morfológica

Descripción de las especies halladas (determinadas por sus caracteres morfológicos):

5.1.1. Orden Saprolegniales

Saprolegnia diclina Humphrey

Las características morfológicas observadas en el material de estudio concuerdan con las descritas por Steciow (1988): “Hifas delgadas, ramificadas; 20-60 µm diám. Yemas, cuando presentes, variables en forma, piriformes; terminales o intercalares; simples o catenuladas; ocasionalmente desarticuladas; funcionando como zoosporangio. Zoosporangios abundantes; claviformes o filiformes; rectos; 270-550 x 24-40 µm; renovados por proliferación interna, cimosamente o, en pocas ocasiones, en sucesión basípeta. Zoosporas de comportamiento saprolegnoide durante la liberación; zoosporas primarias enquistadas 10-12 µm diám. Oogonios abundantes; terminales o laterales; intercalares o catenulados; esféricos o piriformes, por lo general doliformes cuando intercalares; 48-75 µm diám. Pared del oogonio variable en la disposición del punteado

interior; lisa. Pie del oogonio corto a bastante largo; recto o poco inclinado; no ramificado. Las oosferas llegan a madurar. Oosporas céntricas o raramente subcéntricas; esféricas; llenando el oogonio; en número de (1-2) 4-12; (14) 24-27 (30) μm diám. Ramas anteridiales casi siempre presentes; diclinas, raramente monoclinas o andróginas; delgadas, a veces ramificadas; no persistentes. Célula anteridial tubular o clavada; fijadas al oogonio por contacto lateral o apical; persistentes”.

Material estudiado: Argentina, Provincia del Neuquén: Junín de los Andes, CEAN. Aislada de materia orgánica vegetal y ovas de trucha arcoíris y pejerrey patagónico. En las figuras 6 (C) y 7 (C) se muestran imágenes representativas.

***Saprolegnia parasitica* Coker**

Las características morfológicas observadas en el material de estudio concuerdan con las descritas por Steciow (1988): “Hifas gruesas, ramificadas, 20-100 μm diám. Yemas abundantes; claviformes, piriformes o irregulares; terminales, simples o frecuentemente catenuladas, a veces intercalares y simples; funcionando como oogonio o zoosporangio. Zoosporangios abundantes; cilíndricos, claviformes o irregulares; rectos, pocas veces curvos; (60) 150-500 (1050) μm long. x (20) 30-45 (80) μm diám.; renovados por proliferación interna o lateralmente en sucesión basípeta. Zoosporas de comportamiento saprolegnoide durante la liberación; zoosporas primarias enquistadas 9-11 μm diám. Oogonios esparcidos; terminales, pocas veces laterales o intercalares; clavados, piriformes o irregulares; 60-150 (170) x 18-75 μm diám. Pared del oogonio no punteada interiormente; delgada; lisa. Las oosferas llegan a madurar. Oosporas en número de (1) 10-24; subcéntricas; esféricas, llenando el oogonio; (18) 20-24 (28) μm diám. Ramas anteridiales diclinas, muy raramente andróginas; simples, delicadas, con frecuencia envolventes alrededor del oogonio; persistentes. Célula anteridial tubular o clavada; simple, ocasionalmente ramificada; fijadas al oogonio por contacto lateral”.

Material estudiado: Argentina, Provincia del Neuquén: Junín de los Andes, CEAN. Aislada de materia orgánica vegetal, adulto de trucha arcoíris con lesiones tegumentarias y ovas de esta especie. En la figura 6 (A y B) se muestran imágenes representativas.

Saprolegnia ferax (Gruith) Kütz.

Las características morfológicas observadas en el material de estudio concuerdan con las descritas por Pacheco Marino (2010): “Micelio robusto, hifas moderada a escasamente ramificadas, a las dos semanas sobre semillas de sésamo las colonias alcanzan un diámetro de 1-3,5 cm. Zoosporangios cilíndricos, clavados, fusiformes, o ligeramente irregulares, algunas veces casi esféricos; rectos, curvados o sinuosos; renovación interna por formación de esporangios secundarios dentro de los primarios ya descargados; raramente en sucesión basípeta o cimosa; (30-) 400-600 (-900) x 16-48 μm . Zoosporas dimórficas; descarga y comportamiento saprolegnioide; quiste de esporas primarias 9-12 μm diám. Yemas, cuando presentes, cilíndricas, irregulares, esféricas; terminales o intercalares, solitarias o catenuladas. Oogonios laterales, terminales o intercalares simples o catenulados, formados raramente sobre esporangios vacíos o sésiles; piriformes, esféricos o subesféricos, a menudo dolioformes cuando intercalares; (28-) 60-80 (-120) μm diám. Paredes del oogonio generalmente conspicuas y abundantes interiormente punteadas, ocasionalmente sin punteado interior; lisas o raramente con una o dos evaginaciones papiliformes cortas, o apiculadas. Pies del oogonio 20-300 μm long.; robustos, rectos o curvados; muy raramente ramificados. Oosporas céntricas o subcéntricas, esféricas o elipsoidales; (1-) 10-35 por oogonio y ocupando casi todo el oogonio, 20-25 (-31) μm diám., originando un tubo de germinación o un esporangio clavado apical. Ramas anteridiales predominantemente monoclinas o andróginas, raramente diclinas; algunas veces ausentes; delgadas, irregulares, no ramificadas o muy poco ramificadas; persistentes. Célula anteridial simple; tubular o clavada, ocasionalmente irregular, infrecuentemente ramificada; persistente; adherida lateralmente, muy raramente apical; tubo de fertilización presente, no persistente”.

Material estudiado: Argentina, Provincia del Neuquén: Junín de los Andes, CEAN. Aislada en materia orgánica (restos vegetales), trucha arcoíris con lesiones tegumentarias y ovas de esta misma especie. En la figura 7 (A, B y D) se muestran imágenes representativas.

Saprolegnia glomerata (Tiesen.) Lund

Las características morfológicas observadas en el material de estudio concuerdan con las descritas por Steciow (1996): “Micelio en semilla de cáñamo, extendido, abundante, alcanzando 4-6 cm diám. a las 2 semanas de sembrado; hifas delgadas, usualmente delicadas, 10 μm diám. en la base; ramificaciones laterales irregulares, abundantes, cortas, irregulares o retorcidas. Yemas poco abundantes; claviformes o piriformes, terminales, simples; funcionando como oogonio o esporangio. Zoosporangios abundantes, 121-390 x 24-29 μm , cilíndricos o claviformes, a veces con una base bulbosa, raramente piriformes; renovados por proliferación interna. Zoosporas de comportamiento saprolegnoide durante la liberación, raramente aplanoide; zoosporas primarias enquistadas 10-14 μm diám. Oogonios abundantes; terminales, laterales o intercalares; 72-155 x (40) 77-115 μm ; esféricos, piriformes o doliformes cuando intercalares. Pared del oogonio exteriormente lisa, interiormente punteada o no. Pie del oogonio delgado, comúnmente inclinado, retorcido o ramificado, 20-100 μm long. Las oosferas alcanzan la madurez. Ramas anteridiales andróginas o monoclinas, raramente diclinas, abundantes, delgadas, a menudo irregulares y ramificadas. Células anteridiales tubulares o claviformes, simples o algunas veces ramificadas, fijadas al oogonio por contacto lateral o apical; tubos fertilizantes observados. Oosporas céntricas, esféricas, en número de (1) 4-16 (25); 28,4-33,5 (36) μm diám.; germinación de la oospora no observada”.

Material estudiado: Argentina, Provincia del Neuquén: Junín de los Andes, CEAN. Aislada de materia orgánica vegetal.

Saprolegnia aenigmatica Sand.-Sierra y Diég.-Uribeondo

Micelio en semilla de cáñamo, extendido, abundante, alcanzando 3-4 cm diám. a las 2 semanas de sembrado; hifas delgadas, usualmente delicadas, 7-10 μm diám. en la base; moderadamente ramificada, ramificaciones laterales irregulares, abundantes, cortas, o retorcidas. Yemas, cuando presentes; ramificadas, catenuladas, esféricas, piriformes, irregulares; frecuentemente terminales, simples; funcionando como oogonio o

esporangio. Zoosporangios clavados o raramente filiformes, 158-320 μm long. x 22-29 μm diám., cilíndricos o claviformes, con papila de descarga; terminales, renovados por proliferación interna. Zoosporas de comportamiento saprolegnoide durante la liberación, raramente aplanoide; zoosporas primarias enquistadas 10-12 μm diám. Oogonios y ramas anteridiales, no desarrollados.

Material estudiado: Argentina, Provincia del Neuquén: Junín de los Andes, CEAN. Aislada de materia orgánica vegetal.

Newbya dichotoma Steciow, Lara y Belbahri, sp. nov.

Las características morfológicas observadas en el material de estudio concuerdan con las descritas por Steciow *et al.* (2014b): “Monoica. Micelio en semilla de cáñamo extendido, denso, alcanzando 1,5-5 cm de diám. a las 2 semanas de sembrado. Hifas delgadas o robustas, moderadamente ramificadas, finalizando en extremos bifurcados dicotómicamente en 2 ejes o ramas, de 30-90 μm diám. en la base. Yemas escasas o abundantes, de acuerdo con la edad del cultivo en agua; laterales, intercalares o terminales, cilíndricas, fusiformes, irregulares, simples, catenuladas o ramificadas, ubicadas en el extremo de las hifas, funcionando como zoosporangio. Zoosporangios dispersos, delgados, filiformes o fusiformes, aguzados hacia el ápice; rectos, a veces curvos, inclinados o sinuosos, renovados en sucesión simpodial, cimosa o basípeta, (80–) 150-800 (-1300) μm long. x 20-30 μm diám. Zoosporas monomórficas, de comportamiento aclioide durante la liberación, de 10-12,5 μm diám. cuando se encuentran enquistadas. Oogonios variables en abundancia, o frecuentes con la edad del cultivo, laterales, o terminales, ocasionalmente intercalares, simples o catenulados; apiculados, frecuentemente esféricos, subglobosos, piriformes, o raras veces ovoides o irregular doliformes, muy raramente filiformes; oogonios muy variables en tamaño y número, con la edad del cultivo; a menudo (20-40) μm diám. cuando pequeños y en desarrollo y predominantemente 45-90 (-110) μm diám. cuando alcanzan mayor desarrollo. Oogonios con oosporas que pueden o no alcanzar la madurez en su interior y desarrollar un bajo número de oosporas, frecuentemente única, a menudo de gran

tamaño; muy frecuente los oogonios inmaduros o maduros proliferando. Pared del oogonio lisa, delgada (muy raramente con una papila lateral como proyección), no punteada interiormente, o sólo bajo el punto de adherencia de la célula anteridial, con superficie interna ocasionalmente irregular. Pie del oogonio variable en longitud, 0,5-4 (-9) de veces el diám. del oogonio, delgado y corto usualmente o robusto y más largo; a menudo curvo, inclinado o enrollado una a varias veces, raramente recto; frecuentemente ramificado. Oosferas casi siempre llegan a la madurez en el interior de oogonios normales, o no maduran en el interior de los oogonios más grandes o anormales. Oosporas subcéntricas, tipo I; esféricas o elipsoidales, o irregulares cuando inmaduras; en número de (1-) 2-5 (-7), llenando o no los oogonios más grandes o anormales con frecuentemente una oospora mayor madura o una oospora inmadura anormal en su interior; (20-) 25-35 μm diám. dentro de oogonios más pequeños, (35-) 50-70 (-80) μm diám. dentro de los oogonios de mayor tamaño. Ramas anteridiales usualmente abundantes, principalmente monoclinas, a menudo diclinas, raramente andróginas; delgadas, irregulares, muy ramificadas, persistentes. Célula anteridial simple, corta, tubular a irregular, persistente; fijada al oogonio por contacto lateral; tubos de fertilización no observados”.

Material estudiado: Argentina, Provincia del Neuquén: Junín de los Andes, CEAN. Aislada de materia orgánica vegetal.

Scoliolegnia asterophora (de Bary) Dick

Las características morfológicas observadas en el material de estudio concuerdan con las descritas por Arellano *et al.* (2008): “Micelio extenso con hifas delgadas, escasamente ramificadas. Estructuras asexuales (zoosporangios y yemas) no observadas. Oogonios moderadamente abundantes; laterales, ocasionalmente terminales, raramente intercalares; esféricos u ovals; (25-) 30-47 (-51) μm diám., incluyendo las ornamentaciones de la pared. Pared del oogonio no punteada internamente; densamente ornamentada, con ornamentaciones cortas, papiladas (2-10 μm long.), de extremos romos o redondeados, ocasionalmente apiculadas (hasta 20 μm long.). Pie del oogonio usualmente largo, delgado, recto, en ocasiones ramificado. Oosporas 1-2 en número,

subcéntricas, esféricas u ovoides, que llenan completamente la cavidad del oogonio; (15) 20-31 μm diám. Germinación de las oosporas no observada. Ramas anteridiales usualmente numerosas; andróginas y diclinas, cortas, a veces ramificadas y retorcidas. Célula anteridial simple, clavada, corta, en ocasiones tuberosa, que contacta el oogonio de forma apical o lateral. Tubo de fertilización no observado”.

Material estudiado: Argentina, Provincia del Neuquén: Junín de los Andes, CEAN. Aislada de ovas de trucha arcoíris.

Achlya ambisexualis Raper

Especie dioica. Micelio, conteniendo las ramas anteridiales, en semilla de cáñamo, difuso o denso, extendido, abundante, alcanzando 4-6 cm diám. a las 2 semanas de sembrado; hifas robustas, ramificadas; 10- μm diám. en la base; ramificaciones laterales irregulares, abundantes, cortas, irregulares o retorcidas. Zoosporangios esparcidos, fusiformes o claviformes, terminales; 190-580 μm . long x 15-48 μm diám.; renovados simpodialmente. Yemas abundantes, cilíndricas, fusiformes, ocasionalmente irregulares; terminales o intercalares, simples o catenuladas, terminales, renovados simpodialmente. Zoosporas monomórficas, de comportamiento acliode durante la liberación, raramente aplanoide; zoosporas primarias enquistadas 9-14 μm diám. Persistentes en el orificio de salida o desintegrándose en parte. Oogonios escasos y raramente formados en el punto de encuentro de las colonias; esféricos u obpiriformes, que no alcanzan a madurar.

Material estudiado: Argentina, Provincia del Neuquén: Junín de los Andes, CEAN. Aislada de ovas de trucha arcoíris.

Pythiopsis cymosa de Bary

Micelio moderadamente ramificado; hifas gruesas en la base y delgadas en sus extremos; 5-12 μm diám. en la base. Zoosporangios globosos, claviformes, cilíndricos, a veces lobados o ramificados; con papila de descarga prominente; renovados cimosamente, simpodial o en basípeta sucesión; 50-84 μm long. x 30-48 μm diám.

Zoospora piriforme a la emergencia; con descarga y comportamiento saprolegnoide de la zoospora primaria. Quistes de zoosporas primarias 8-10 μm diám. Yemas abundantes, globosas, subglobosas, piriformes, cilíndricas; terminal o intercalar; simple o catenuladas. Oogonios y ramas anteridiales no desarrollados.

Material estudiado: Argentina, Provincia del Neuquén: Junín de los Andes, CEAN. Aislada de ovas de salmónidos.

Pythiopsis humphreyana Coker

Hifas delgadas, escasamente ramificadas, de 11-25 μm diám., que son más robustas en la vecindad de los cuerpos reproductores asexuales. Esporangios variables en forma desde esféricos, ovalados o piriformes hasta formas alargadas e irregulares; descarga por una papila corta o bastante larga y prolifera; 62-305 x 18-73 μm generalmente terminal, o lateral en posición basal; renovados en disposición cimosa o simpodial, raramente por proliferación interna. Zoosporas primarias enquistadas 10-12 μm diám. Yemas usualmente abundantes; similar en forma a los esporangios, frecuentemente catenuladas, adelgazadas en sus extremos; esféricas, ovals, piriformes, cortas o irregulares en forma. Oogonios y ramas anteridiales no observados.

Material estudiado: Argentina, Provincia del Neuquén: Junín de los Andes, CEAN. Aislada de materia orgánica vegetal, trucha arcoíris con lesiones tegumentarias y ovas de salmónidos.

5.1.2. Orden Leptomitales

Leptomitus lacteus (Roth) Agardh

Las características morfológicas observadas en el material de estudio concuerdan con las descritas por Steciow y Elíades (2002): "Micelio en semilla de cáñamo, extendido, abundante, alcanzando 4-6 cm diám. a las 2 semanas de sembrado. Talo filamentoso con ramificación monopodial, y dicotómica en su base; porción basal robusta, hasta 40 μm diám., con ramas de 8-16 μm diám. Hifas con constricciones a intervalos variables

determinando segmentos hasta 380 μm , cada uno de los cuales contiene uno o más discos de celulina. Zoosporangios cilíndricos terminales o en sucesión basípeta, 92-197 μm long. x 10,5-20,5 μm diám. Zoosporas primarias piriformes, biflageladas, de 10-11 μm diám., disponiéndose en una hilera en el esporangio, ocasionalmente en forma irregular, zoosporas secundarias biflageladas. No se observaron órganos de reproducción sexual”.

Material estudiado: Argentina, Provincia del Neuquén: Junín de los Andes, CEAN. Aislada de trucha arcoíris adulta con lesiones tegumentarias y ovas de esta especie.

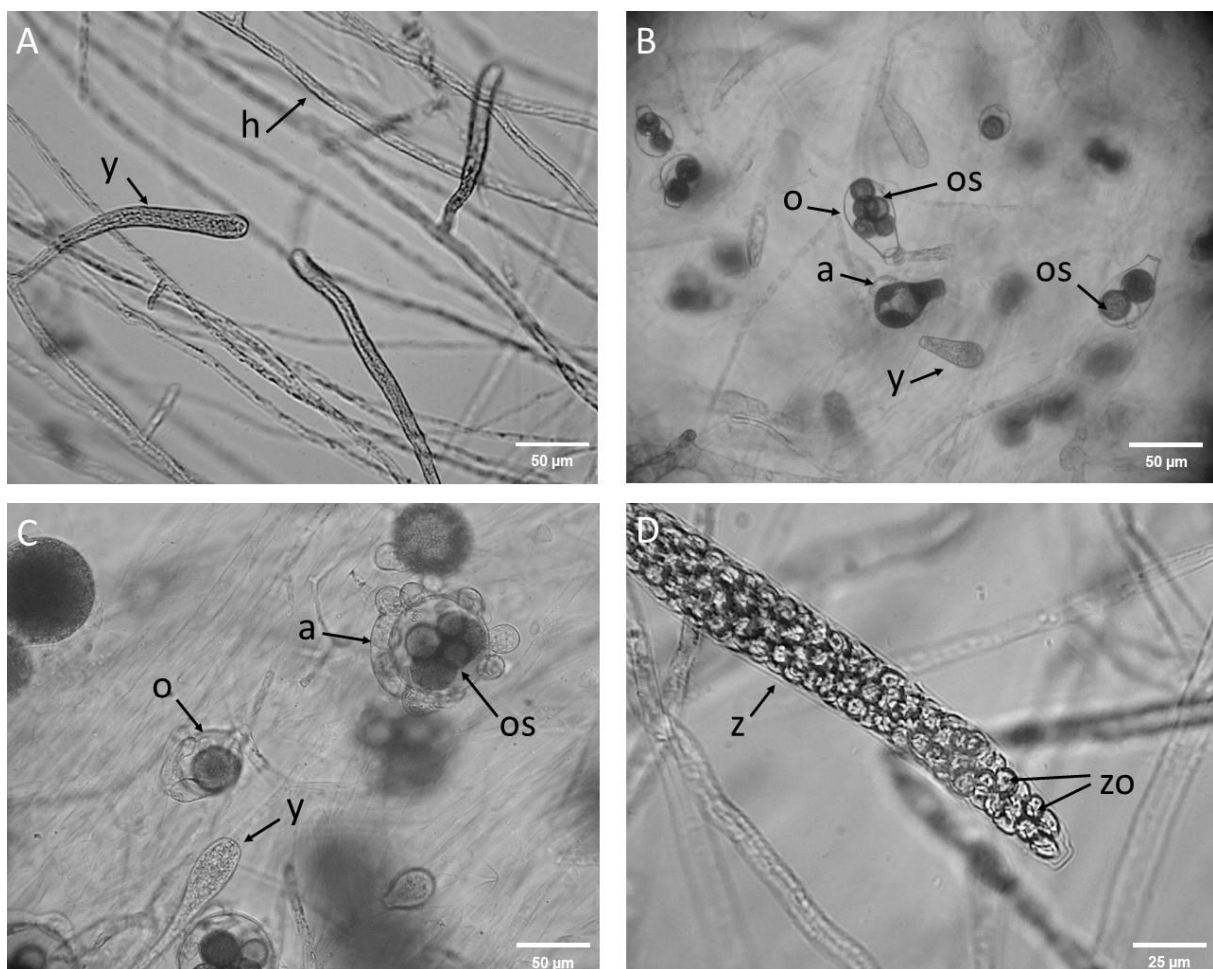


Figura 6. Imágenes representativas de los Oomycetes aislados. A) Hifas y yemas de *S. parasitica*. B) Yemas, oogonios, ramas anteridiales y oosporas de *S. parasitica*. C) Yemas, oogonios, ramas anteridiales y oosporas de *S. diclina*. D) zoosporangio con zoosporas próximas a liberarse en *Saprolegnia* sp. Referencias: Hifas (h); yemas (y); oogonio (o); oosporas (os); anteridio (a); zoosporangio (z); zoosporas (zo).

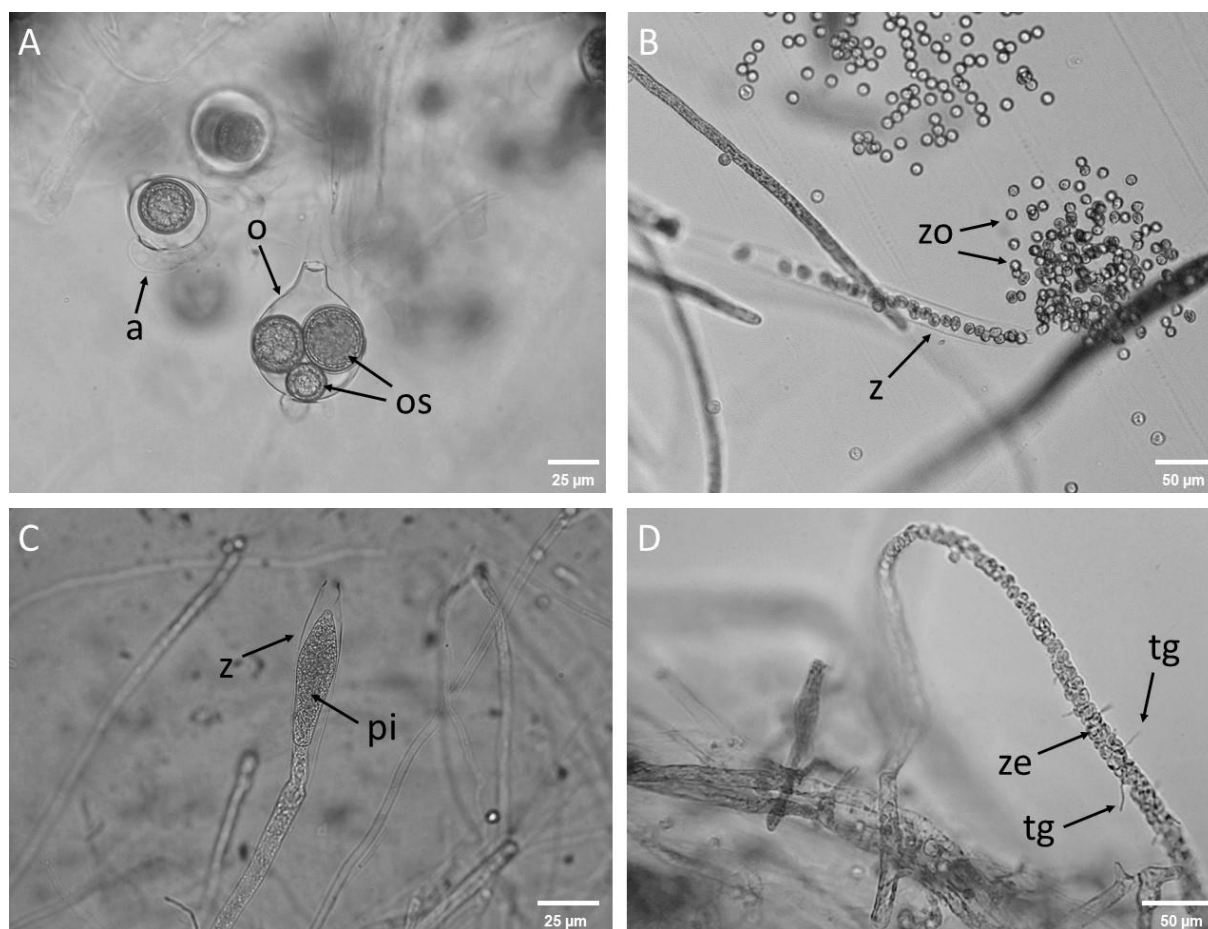


Figura 7. Imágenes representativas de los Oomycetes aislados. A) Oogonios, ramas anteridiales y oosporas de *S. ferax*. B) Zoosporangio y descarga de zoosporas de *S. ferax*. C) Zoosporangio renovado por proliferación interna en *S. diclina*. D) Zoosporas enquistadas y produciendo tubos germinales dentro del zoosporangio en *S. ferax*. Referencias: Oogonio (o); oosporas (os); anteridio (a); zoosporangio (z); zoosporas (zo); proliferación interna (pi); zoosporas enquistadas (ze); tubos germinales (tg).

5.2. Identificación molecular

Se logró la amplificación de la región Cox2 del ADN mitocondrial de 64 de las 143 muestras procesadas en el MACN. El producto de amplificación se envió al CBG para la secuenciación y se obtuvieron 62 secuencias que fueron incorporadas al proyecto “OOMAC Oomycota de Argentina y Chile” de la base de datos de *BOLD SYSTEMS*.

Las longitudes de las secuencias obtenidas fueron de $413,38 \pm 37,55$ pb (media \pm error estándar), con un mínimo de 183 pb y máximo de 518 pb. El 82,25% de las secuencias fue ≥ 400 pb. En la tabla 2 se muestra la lista de las secuencias obtenidas y las

secuencias que presentaron mayor similitud (% de identidad) cuando se compararon con la base de datos del servidor GenBank-BLAST del NCBI. Las secuencias obtenidas en este trabajo presentaron similitudes altas con secuencias asignadas a *S. parasitica*, *S. ferax*, *S. diclina*, *S. aenigmatica* y *Saprolegnia* sp. El 75,8% de las secuencias tuvo porcentajes de similitud de 99 - 100%, el 14,51% de 98 - 99% y el 9,67% tuvo similitudes de \leq 98% (tabla 2).

Tabla 2. Identificación molecular mediante el análisis de las secuencias Cox2 de los Oomycetes aislados durante este trabajo. Las secuencias se compararon con la base de datos del servidor GenBank-BLAST del NCBI.

| Identificación de la cepa en BOLD - SYSTEMS | Sustrato de aislamiento | Longitud de la secuencia (pb) | Especie más cercanamente relacionada en GenBank | Nro. de acceso en GenBank | % de similitud |
|---|-------------------------|-------------------------------|---|---------------------------|----------------|
| OOMAC208-16 | Materia orgánica | 319 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 100,00 |
| OOMAC210-16 | Materia orgánica | 423 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 100,00 |
| OOMAC211-16 | Materia orgánica | 436 | <i>S. parasitica</i> | MK941864.1 | 98,85 |
| OOMAC213-16 | Materia orgánica | 423 | <i>S. parasitica</i> | MK941864.1 | 98,82 |
| OOMAC217-16 | Materia orgánica | 426 | <i>S. ferax</i> | MK941867.1 | 99,77 |
| OOMAC218-16 | Materia orgánica | 426 | <i>S. parasitica</i> | MK941864.1 | 99,30 |
| OOMAC219-16 | Materia orgánica | 432 | <i>S. ferax</i> | MK941867.1 | 100,00 |
| OOMAC221-16 | Materia orgánica | 402 | <i>S. ferax</i> | MK941868.1 | 99,50 |
| OOMAC222-16 | Materia orgánica | 485 | <i>S. parasitica</i> | DQ071421.1 | 99,59 |
| OOMAC223-16 | Materia orgánica | 251 | <i>S. parasitica</i> | MK941865.1 | 100,00 |
| OOMAC224-16 | Agua | 425 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 91,78 |
| OOMAC225-16 | Materia orgánica | 426 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 100,00 |
| OOMAC226-16 | Materia orgánica | 434 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 100,00 |
| OOMAC227-16 | Materia orgánica | 399 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 100,00 |
| OOMAC231-16 | Materia orgánica | 421 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 100,00 |
| OOMAC233-16 | Materia orgánica | 421 | <i>S. ferax</i> | MK941868.1 | 98,81 |
| OOMAC234-16 | Materia orgánica | 427 | <i>S. parasítica</i> | MK941866.1 | 99,30 |
| | | | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 99,30 |
| OOMAC235-16 | Materia orgánica | 434 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 100,00 |
| OOMAC236-16 | Materia orgánica | 437 | <i>S. ferax</i> | MK941868.1 | 99,08 |
| OOMAC238-16 | Materia orgánica | 431 | <i>S. aenigmatica</i> | MK941870.1 | 99,77 |
| OOMAC245-16 | Materia orgánica | 518 | <i>S. ferax</i> | AY534144.1 | 93,45 |
| OOMAC246-16 | Materia orgánica | 432 | <i>S. ferax</i> | MK941867.1 | 100,00 |
| OOMAC247-16 | Materia orgánica | 341 | <i>S. ferax</i> | MK941867.1 | 99,41 |
| OOMAC251-16 | Materia orgánica | 427 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 100,00 |
| OOMAC252-16 | Materia orgánica | 437 | <i>S. aenigmatica</i> | MK941870.1 | 99,77 |
| OOMAC287-18 | Pez | 426 | <i>S. parasitica</i> | MK941864.1 | 100,00 |
| OOMAC289-18 | Pez | 425 | <i>S. parasitica</i> | MK941864.1 | 100,00 |

| | | | | | |
|-------------|------|-----|------------------------|------------|--------|
| OOMAC290-18 | Pez | 427 | <i>S. parasitica</i> | MK941864.1 | 100,00 |
| OOMAC292-18 | Pez | 190 | <i>S. parasitica</i> | MK941864.1 | 98,42 |
| OOMAC293-18 | Ovas | 425 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 91,31 |
| | | | <i>P. cymosa</i> | AF086689.1 | 91,31 |
| OOMAC294-18 | Ovas | 425 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 100,00 |
| OOMAC295-18 | Ovas | 447 | <i>Saprolegnia sp.</i> | MK941872.1 | 98,88 |
| OOMAC296-18 | Ovas | 438 | <i>S. parasitica</i> | MK941864.1 | 98,86 |
| OOMAC297-18 | Ovas | 435 | <i>S. ferax</i> | MK941867.1 | 99,77 |
| OOMAC298-18 | Pez | 328 | <i>S. parasitica</i> | MK941865.1 | 99,09 |
| OOMAC300-18 | Pez | 414 | <i>S. parasitica</i> | MK941864.1 | 99,52 |
| OOMAC302-18 | Ovas | 323 | <i>S. ferax</i> | MK941867.1 | 99,69 |
| OOMAC303-18 | Pez | 293 | <i>S. parasitica</i> | MK941864.1 | 100,00 |
| OOMAC304-18 | Pez | 496 | <i>S. parasitica</i> | DQ071421.1 | 100,00 |
| OOMAC305-18 | Ovas | 465 | <i>S. parasitica</i> | DQ071421.1 | 91,54 |
| OOMAC307-18 | Ovas | 441 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 98,41 |
| OOMAC308-18 | Ovas | 501 | <i>S. ferax</i> | KP965749.1 | 99,80 |
| OOMAC311-18 | Ovas | 425 | <i>S. ferax</i> | MK941867.1 | 99,53 |
| OOMAC312-18 | Ovas | 295 | <i>S. parasitica</i> | MK941865.1 | 99,32 |
| OOMAC313-18 | Ovas | 478 | <i>S. parasitica</i> | DQ071421.1 | 91,40 |
| OOMAC316-18 | Ovas | 345 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 97,97 |
| | | | <i>S. parasitica</i> | MK941866.1 | 97,97 |
| OOMAC317-18 | Ovas | 422 | <i>S. ferax</i> | MK941867.1 | 99,76 |
| OOMAC319-18 | Ovas | 421 | <i>S. ferax</i> | MK941867.1 | 99,76 |
| OOMAC321-18 | Ovas | 421 | <i>S. ferax</i> | MK941867.1 | 100,00 |
| OOMAC324-18 | Ovas | 183 | <i>S. parasitica</i> | MK941864.1 | 100,00 |
| OOMAC327-18 | Ovas | 500 | <i>S. parasitica</i> | DQ071421.1 | 100,00 |
| OOMAC329-18 | Ovas | 429 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 100,00 |
| OOMAC339-18 | Ovas | 426 | <i>S. ferax</i> | MK941867.1 | 99,77 |
| OOMAC340-18 | Ovas | 421 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 100,00 |
| OOMAC341-18 | Pez | 428 | <i>S. ferax</i> | MK941867.1 | 99,77 |
| OOMAC342-18 | Ovas | 426 | <i>S. parasitica</i> | MK941864.1 | 99,30 |
| OOMAC344-18 | Ovas | 437 | <i>S. diclina</i> | MK941869.1 | 100,00 |
| OOMAC362-18 | Ovas | 421 | <i>S. ferax</i> | MK941867.1 | 99,76 |
| OOMAC370-18 | Ovas | 441 | <i>S. parasitica</i> | MK941864.1 | 98,64 |
| OOMAC371-18 | Ovas | 506 | <i>S. ferax</i> | KP965749.1 | 99,80 |
| OOMAC375-18 | Ovas | 441 | <i>S. parasitica</i> | MK941864.1 | 98,64 |
| OOMAC376-18 | Ovas | 432 | <i>S. ferax</i> | MK941867.1 | 99,77 |

5.3. Filogenia y distancias genéticas

Para realizar los árboles filogenéticos de Neighbor joining e Inferencia Bayesiana se utilizaron las 62 secuencias obtenidas a partir de los Oomycetes aislados en este trabajo,

las secuencias Cox2 de referencia de GenBank que estuvieron más cercanamente relacionadas (tabla 3) y cinco secuencias de Cox2 seleccionadas y tomadas GenBank como grupos externos (tabla 4).

Tabla 3. Secuencias Cox2 de GenBank (NCBI) relacionadas cercanamente con las secuencias de este estudio, tomadas de referencia y utilizadas para realizar los alineamientos y árboles filogenéticos en MEGA y MrBayes.

| Código GenBank | Especie | Sustrato de aislamiento | Autor |
|----------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| MK941870.1 | <i>Saprolegnia aenigmatica</i> | Salmónidos-peces | Sarowar <i>et al.</i> (2019) |
| MK941869.1 | <i>Saprolegnia diclina</i> | Salmónidos-ovas | Sarowar <i>et al.</i> (2019) |
| KP965749.1 | <i>Saprolegnia ferax</i> | ND | Choi <i>et al.</i> (2015) |
| AF086690.1 | <i>Saprolegnia ferax</i> | ND | Hudspeth <i>et al.</i> (2000) |
| MK941867.1 | <i>Saprolegnia ferax</i> | Salmónidos-peces | Sarowar <i>et al.</i> (2019) |
| MK941868.1 | <i>Saprolegnia ferax</i> | Salmónidos | Sarowar <i>et al.</i> (2019) |
| AY534144.1 | <i>Saprolegnia ferax</i> | ND | Grayburn <i>et al.</i> (2004) |
| EU826103.1 | <i>Saprolegnia ferax</i> | ND | Goeker (2008)* |
| MK941872.1 | <i>Saprolegnia sp.</i> | Salmónidos | Sarowar <i>et al.</i> (2019) |
| MK941865.1 | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Salmónidos-peces | Sarowar <i>et al.</i> (2019) |
| MK941866.1 | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Agua | Sarowar <i>et al.</i> (2019) |
| MK941864.1 | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Salmónidos-peces | Sarowar <i>et al.</i> (2019) |
| MK941863.1 | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Salmónidos | Sarowar <i>et al.</i> (2019) |
| HQ660429.1 | <i>Saprolegnia parasitica</i> | ND | Liu y Chen (2010)* |
| DQ071421.1 | <i>Saprolegnia parasitica</i> | Salmónidos-peces | Villa <i>et al.</i> (2006) |

* Sin publicar. ND: información no disponible

Tabla 4. Secuencias Cox2 tomadas de GenBank (NCBI) y utilizadas como grupos externos para realizar los alineamientos múltiples y árboles filogenéticos en MEGA y MrBayes.

| Código GenBank | Especie | Autor |
|----------------|--------------------------------|-------------------------------|
| AF086692.1 | <i>Aphanomyces euteiches</i> | Hudspeth <i>et al.</i> (2000) |
| AF086696.1 | <i>Leptomitius lacteus</i> | Hudspeth <i>et al.</i> (2000) |
| LC595988.1 | <i>Phytophthora constricta</i> | Hieno <i>et al.</i> (2020) * |
| LC596057.1 | <i>Phytophthora virginiana</i> | Hieno <i>et al.</i> (2020) * |
| AF086689.1 | <i>Pythiopsis cymosa</i> | Hudspeth <i>et al.</i> (2000) |

* Sin publicar.

La secuencia de *Saprolegnia sp.* MK941872.1 (Sarowar *et al.*, 2019), que tuvo un porcentaje de similitud de 98,88% con la secuencia OOMAC295-18, representó un caso

particular. En primer lugar, la secuencia *Saprolegnia sp.* MK941872.1 no tiene una identificación a nivel de especie y, por lo tanto, para los objetivos de este análisis, la información que aporta es limitada. Por otra parte, esta secuencia tuvo una distancia genética promedio de 9,23% con respecto a las secuencias del género *Saprolegnia* tomadas de GenBank (utilizadas para el análisis filogenético) y esta distancia puede considerarse alta para secuencias conespecíficas e incluso cogenéricas. Para revisar las relaciones con el resto de las secuencias, se confeccionó un árbol de Neighbor joining únicamente con *Saprolegnia sp.* MK941872.1 y las secuencias de referencia (figura 8) que mostró que *Saprolegnia sp.* MK941872.1 se agrupa con *P. cymosa* AF086689.1 con soporte de nodo alto (83 bootstrap) separado del grupo de secuencias del género *Saprolegnia*, que también tuvo un soporte alto (99 de bootstrap). Por estos motivos, y a los fines de este trabajo de tesis, se consideró que esta secuencia muy probablemente no aportaría claridad en los análisis filogenéticos y por ende no fue utilizada.

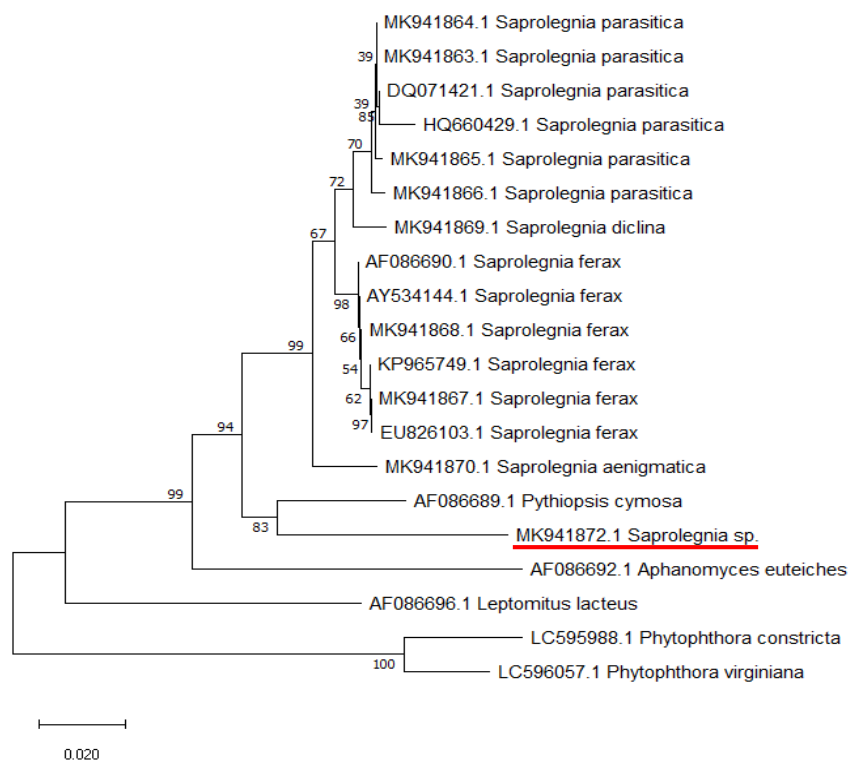


Figura 8. Árbol de Neighbor joining que muestra las relaciones entre las secuencias de referencia tomadas de GenBank (NCBI) y la secuencia *Saprolegnia sp.* MK941872.1. Los números ubicados sobre o debajo de las ramas representan los valores de bootstrap.

El análisis de los árboles filogenéticos de Neighbor joining e Inferencia Bayesiana mostró que las secuencias Cox2 obtenidas en este trabajo se separan principalmente en dos grandes clados (figuras 9 y 10). La mayoría (n = 56) de las secuencias analizadas se agrupan junto con todas las secuencias de referencia asignadas al género *Saprolegnia*, en un clado “Saprolegnia”, con alto soporte (soporte de bootstrap de NJ de 81% y probabilidad posterior (PP) de 0,94). Mientras que las seis secuencias restantes se agruparon con la secuencia *P. cymosa* AF086689.1 (Hudspeth *et al.*, 2000) con débil soporte (soporte de bootstrap 44% y PP de 0,68) en un clado denominado “divergente”.

A los fines de esta tesis, se distinguieron siete grupos dentro del clado “Saprolegnia”: Grupo parasítica; Grupo diclina; Grupo aenigmatica; Grupo ferax; Grupo I; Grupo II; Grupo III. Y, por otra parte, el clado “divergente” fue tratado como un solo agrupamiento: el Grupo divergente.

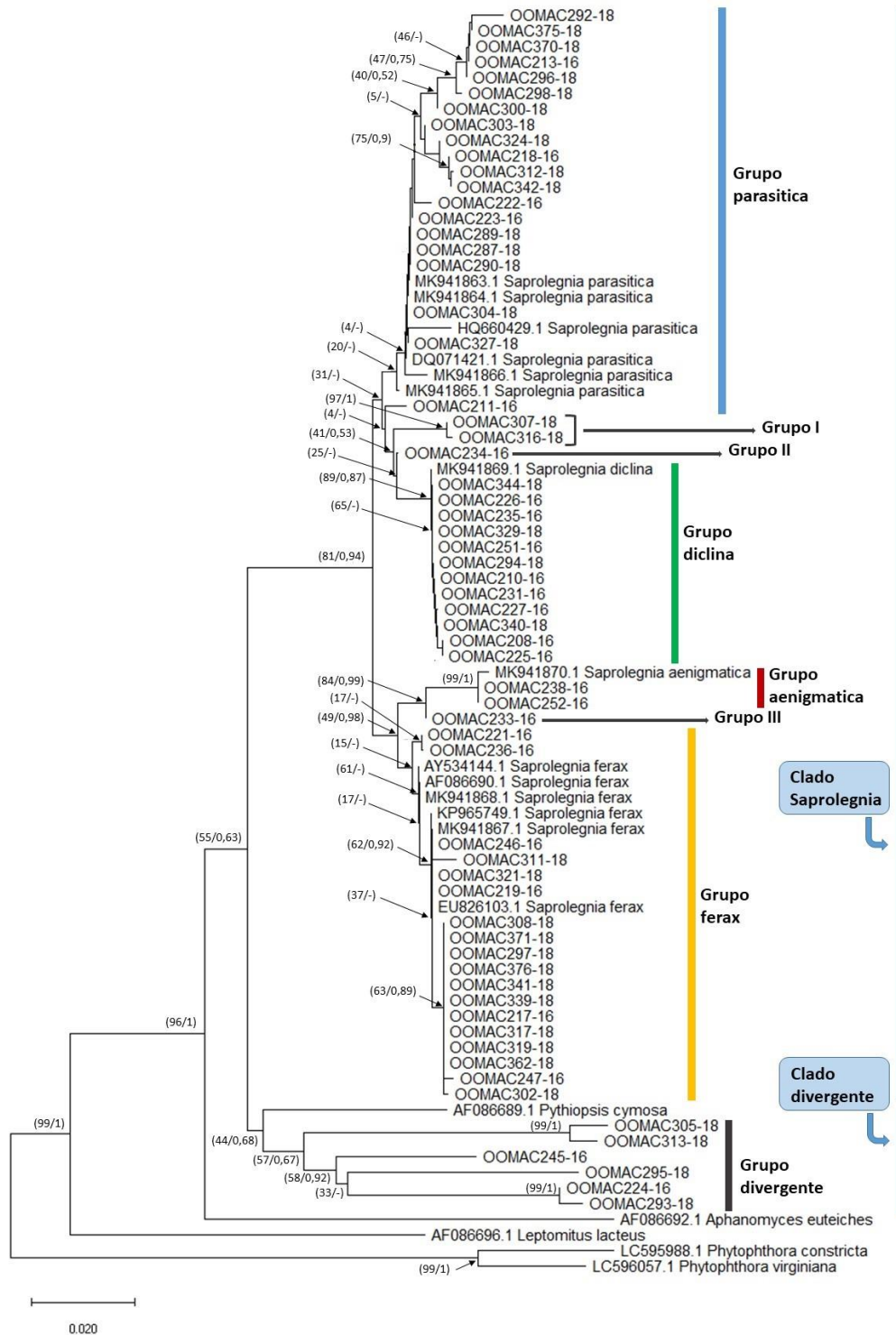


Figura 9. Árbol de Neighbor joining y análisis Bayesiano basado en la región Cox2 del ADN mitocondrial. Los análisis se realizaron con las secuencias obtenidas en este trabajo y las secuencias tomadas de GenBank (NCBI). Se muestra la conformación de los clados y grupos principales. Los números entre paréntesis representan los valores de bootstrap y de probabilidad posterior del análisis Bayesiano. Los valores de soporte de la mayoría de los nodos internos se omitieron para una mayor claridad. El árbol fue enraizado en las secuencias de *Phytophthora*.

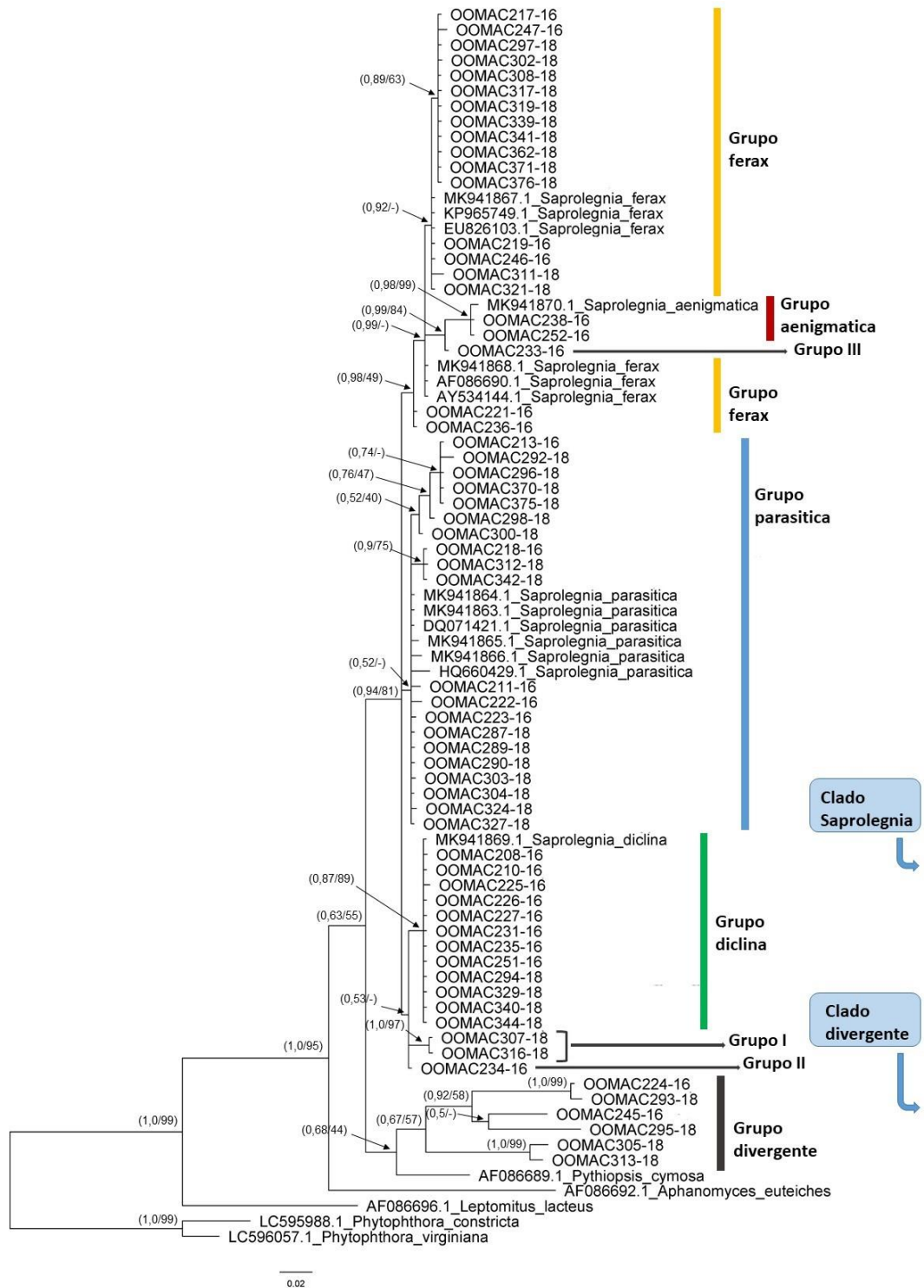


Figura 10. Árbol de Inferencia Bayesiana y análisis de Neighbor joining basado en la región Cox2 del ADN mitocondrial. Los análisis se realizaron con las secuencias obtenidas en este trabajo y las secuencias tomadas de GenBank (NCBI). Se muestra la conformación de los clados y grupos principales. Los números entre paréntesis representan los valores de probabilidad posterior del análisis Bayesiano y de bootstrap para NJ. Los valores de soporte de la mayoría de los nodos internos se omitieron para una mayor claridad. El árbol fue enraizado en las secuencias de *Phytophthora*.

El Grupo parasitica se conformó de forma monofilética en la topografía Bayesiana con soporte de nodos bajo (0,52) y de manera polifilética en Neighbor joining (NJ). En ambas topologías, este agrupamiento incluyó a las secuencias de referencia tomadas de GenBank: MK941865.1, MK941866.1, MK941864.1, MK941863.1, HQ660429.1 y DQ071421.1, asignadas a *S. parasitica* (Sarowar *et al.*, 2019; Liu y Chen, 2010; Villa *et al.*, 2006). Estas secuencias presentaron similitudes de 98,42-100% con 20 secuencias de este trabajo. Los agrupamientos internos de este grupo fueron distintos en las topologías NJ y Bayesiana y los soportes fueron en general bajos y poco confiables. En el extremo superior del árbol de NJ se observaron cinco secuencias distantes que podrían distinguirse o separarse de este grupo (OOMAC292-18, OOMAC375-18, OOMAC370-18, OOMAC213-16 y OOMAC296-18), este agrupamiento, no tiene un buen soporte de bootstrap ni tampoco se visualizó en el árbol Bayesiano. Estas cinco secuencias presentaron una similitud de 98,42-98,88% con *S. parasitica* MK941864.1 (Sarowar *et al.*, 2019) y una distancia genética promedio de 1,25% con el resto del grupo. Debido a esto y para simplificar el análisis, se decidió incluir a estas cinco secuencias dentro del Grupo parasitica. Finalmente, la secuencia OOMAC211-16 también se incluyó en este grupo debido a que presentó un 98,85% de similitud con *S. parasitica* MK941864.1 (Sarowar *et al.*, 2019) y se agrupó junto con las secuencias de referencia de GenBank en la topología del árbol bayesiano.

Los Grupos *diclina* y *aenigmatica* fueron consistentes entre ambas metodologías y formaron grupos monofiléticos con altos valores de soporte. En los árboles de NJ y Bayesiano, el Grupo *diclina* estuvo formado por la secuencia de GenBank *S. diclina* MK941869.1 (Sarowar *et al.*, 2019) y 12 de las secuencias obtenidas en este trabajo con un soporte de nodo de 89% en NJ y 0,87 (PP) en el árbol Bayesiano. Las 12 secuencias tuvieron una similitud de 100% con *S. diclina* MK941869.1. Por otra parte, el Grupo *aenigmatica*, se conformó por las secuencias OOMAC238-16, OOMAC252-16 y *S. aenigmatica* MK941870.1 (Sarowar *et al.*, 2019) y, de la misma manera que el grupo anterior, también tuvo altos valores de soporte en los árboles de NJ (99%) y Bayesiano (PP 1,0).

Para el grupo Grupo ferax, los árboles NJ y Bayesiano mostraron topologías diferentes. Dentro de este agrupamiento se observó un grupo de secuencias que se repitieron en ambas topologías con alto valor de soporte bayesiano (0,92), mediano en NJ (62%) conformando un clado consistente: el grupo incluyó a las secuencias de referencia de GenBank: KP965749.1, MK941867.1 y EU826103.1, identificadas como *S. ferax* (Goeker, 2008; Choi *et al.*, 2015; Sarowar *et al.*, 2019) y 16 de las secuencias obtenidas en este trabajo. Los agrupamientos internos no son consistentes entre las dos metodologías y los soportes, principalmente en NJ, son bajos, lo que indica que las relaciones observadas no son del todo concluyentes. En ambas topologías, las secuencias OOMAC221-16 y OOMAC236-16 aparecen separadas del grupo principal. Sin embargo, estas dos secuencias tienen similitudes $\geq 99,08\%$ con *S. ferax* MK94868.1 (Sarowar *et al.*, 2019) y presentan una divergencia de 0,75% (considerada adecuada para distancias intraespecíficas) con respecto al grupo principal, por estos dos motivos, para este trabajo se las incluyó dentro del Grupo ferax.

Las secuencias OOMAC233-16, OOMAC234-16, OOMAC316-18 y OOMAC307-18 no se incluyeron en ninguno de los grupos mencionados anteriormente y se las agrupó en los denominados Grupo I, Grupo II y Grupo III. Estas secuencias tuvieron similitudes ambiguas con las secuencias referencia de GenBank (tabla 2) o presentaron incongruencias que no justificaron su inclusión en los grupos principales.

Clado divergente. En ambas topologías se recuperó un grupo divergente conformado por 6 secuencias que se asociaron mejor con *P. cymosa* AF086689.1 (Hudspeth *et al.*, 2000) utilizado como grupo externo, que con las secuencias de referencia del género *Saprolegnia*. Este agrupamiento tuvo soportes de nodo débiles (57% en NJ y 0,67 de PP en el árbol Bayesiano) y una topología interna diferente según la metodología utilizada. Ninguna de las secuencias de este agrupamiento tuvo similitudes confiables cuando se las comparó con las secuencias de la base de datos de GenBank. Las secuencias OOMAC224-16, OOMAC245-16, OOMAC293-18, OOMAC305-18 y OOMAC313-18 tuvieron similitudes de $< 93,5\%$ (similitudes consideradas bajas) con secuencias asignadas a *S. ferax*, *S. diclina* o *S. parasitica*. Mientras que la secuencia OOMAC295-18 tuvo una similitud de 98,88% con *Saprolegnia* sp. MK941872.1 (Sarowar *et al.*, 2019), sin

embargo, esta secuencia no fue utilizada en este estudio por los motivos mencionados antes.

Con el fin de profundizar en las relaciones de este grupo, se obtuvo un árbol de NJ sólo para las secuencias del Grupo divergente y los grupos externos tomados de GenBank, a los que se les sumaron las secuencias *S. diclina* MK941869.1 (Sarowar *et al.*, 2019) y *A. ambisexualis* AF086687.1 (Hudspeth *et al.*, 2000) (figura 11). El árbol de NJ obtenido mostró que las secuencias OOMAC305-18 y OOMAC313-18 se agrupan con *A. ambisexualis* AF086687.1 en un grupo con bajo soporte (52%) mientras que OOMAC224-16, OOMAC245-16, OOMAC293-18 y OOMAC295-18 se agrupan con *P. cymosa* AF086689.1 en un agrupamiento que también posee bajo soporte (20%). La distancia genética promedio sin corregir entre el Grupo divergente y los grupos del género *Saprolegnia* fue de 9-10%, esta divergencia sugiere, así como se observó en los árboles de NJ y Bayesiano, que estas secuencias no corresponden al género *Saprolegnia*. Asimismo, el promedio de las distancias genéticas dentro del Grupo divergente fue de 8,24%, un valor alto para distancias entre secuencias cogenéricas (teniendo en cuenta que las distancias entre los grupos del género *Saprolegnia* son de 1,9% - 4,1%), lo que también sugiere que existen diferentes géneros dentro del grupo. Las secuencias OOMAC293-18 y OOMAC224-16 fueron agrupadas con buen soporte (100%) y poseen una distancia de 0,47% lo que parece indicar que son conespecíficas, algo similar ocurrió con las secuencias OOMAC305-18 y OOMAC313-18 (más cercanamente relacionadas con *A. ambisexualis* AF086687.1), aunque la divergencia fue mayor (1,3%) y podrían ser conespecíficas o cogenéricas. En síntesis, se puede decir que las secuencias del Grupo divergente corresponden a especies que no tienen secuencias Cox2 almacenadas en GenBank y son de géneros distintos a *Saprolegnia*, aunque pertenecientes al orden Saprolegniales. Estas seis secuencias podrían pertenecer a cuatro géneros y cuatro (o cinco) especies diferentes.

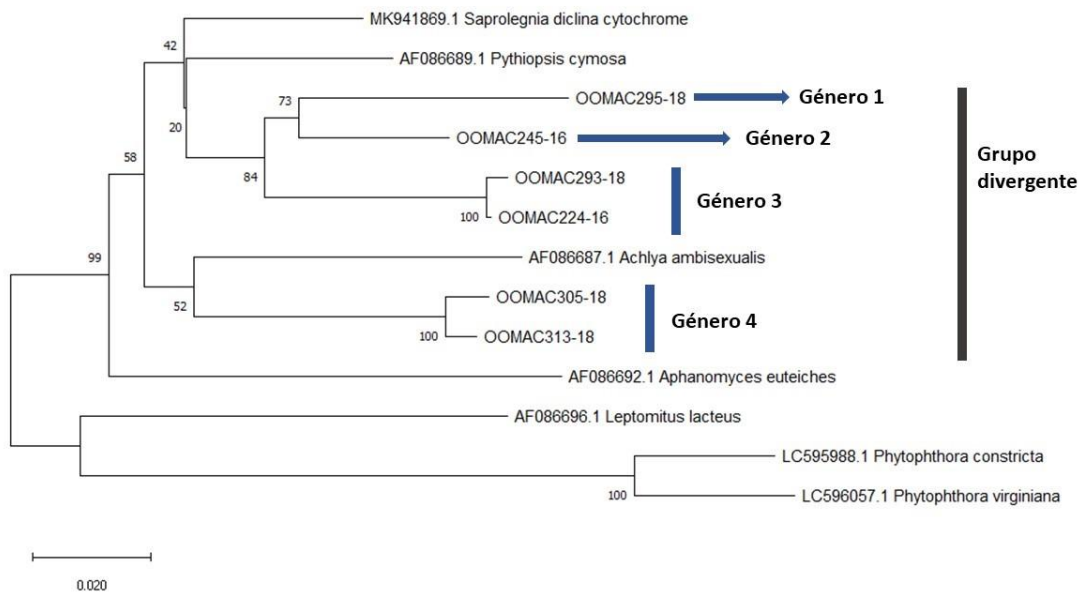


Figura 11. Árbol de Neighbor joining que muestra las relaciones entre las secuencias del Grupo divergente y las secuencias de los grupos externos, *S. diclina* MK941869.1 y *A. ambisexualis* AF086687.1. Se propuso en este trabajo que el Grupo divergente puede incluir secuencias de cuatro géneros diferentes. Los números ubicados sobre o debajo de las ramas representan los valores de bootstrap.

Las distancias genéticas promedio sin corregir calculadas entre grupos y dentro de los grupos se muestran en las tablas 5 y 6. Algunos datos fueron mencionados previamente y sirvieron para definir la conformación de los agrupamientos realizados. Entre los grupos principales del clado “*Saprolegnia*”, las distancias genéticas fueron de 1,96-4,06% mientras que entre los grupos de este clado y el Grupo divergente varió entre 9,88% y 10,89%. Las distancias dentro de los grupos fueron de 0,00-0,76% en los grupos de “*Saprolegnia*” y de 8,24% dentro del Grupo divergente. Estas divergencias sustentan la separación del Grupo divergente de los grupos de “*Saprolegnia*” y sugieren la presencia de géneros distintos dentro del agrupamiento. En la tabla 7 se muestran las distancias sin corregir entre las secuencias de este grupo. Las distancias genéticas también fueron calculadas con la metodología Kimura dos parámetros (K2P) para permitir la comparación de estos resultados con los obtenidos en trabajos previos por otros autores.

Tabla 5. Comparaciones de a pares entre los grupos principales. Distancias genéticas sin corregir (p-distance) (encima de la diagonal) y distancias obtenidas mediante K2P (debajo de la diagonal). Las distancias genéticas se expresan en valores porcentuales (%).

| | Grupo parasitica | Grupo diclina | Grupo aenigmatica | Grupo ferax | Grupo divergente |
|----------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|-------------------------|
| G. parasitica | | 1,96 | 4,06 | 2,60 | 9,85 |
| G. diclina | 1,98 | | 3,39 | 2,55 | 9,24 |
| G. aenigmatica | 4,18 | 3,47 | | 2,62 | 9,30 |
| G. ferax | 2,65 | 2,60 | 2,67 | | 10,12 |
| G. divergente | 10,57 | 9,88 | 9,94 | 10,89 | |

Tabla 6. Distancias genéticas sin corregir (*p-distance*) y distancias obtenidas mediante K2P dentro de los grupos. Las distancias genéticas se expresan en valores porcentuales (%).

| | K2P | p-distance |
|----------------|------------|-------------------|
| G. parasitica | 0,769 | 0,763 |
| G. diclina | 0,022 | 0,022 |
| G. aenigmatica | 0,000 | 0,000 |
| G. ferax | 0,314 | 0,313 |
| G. divergente | 8,825 | 8,247 |

Tabla 7. Distancias genéticas sin corregir (*p-distance*) entre las secuencias del Grupo divergente. Las distancias genéticas se expresan en valores porcentuales (%).

| | OOMAC 295-18 | OOMAC 245-18 | OOMAC 293-18 | OOMAC 224-16 | OOMAC 305-18 | OOMAC 313-18 |
|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| OOMAC295-18 | | | | | | |
| OOMAC245-18 | 7,5 | | | | | |
| OOMAC293-18 | 8,6 | 7,76 | | | | |
| OOMAC224-16 | 8,93 | 7,29 | 0,47 | | | |
| OOMAC305-18 | 11,58 | 9,58 | 10,25 | 9,74 | | |
| OOMAC313-18 | 11,23 | 9,32 | 10,42 | 9,92 | 1,3 | |

5.4. Abundancia relativa de los aislamientos por sustrato

En base a los agrupamientos realizados en el análisis molecular, se estimó la abundancia relativa de cada Grupo por sustrato de aislamiento (exceptuando al sustrato

agua, de donde se logró sólo un aislamiento). En peces, se aislaron en mayor proporción Oomycetes del Grupo parasitica mientras que a partir de ovas el mayor porcentaje estuvo representado por aislados del Grupo ferax. Sobre materia orgánica, por otra parte, la mayor proporción estuvo comprendida por aislamientos del Grupo diclina. Los aislamientos del Grupo parasitica y del Grupo ferax fueron obtenidos a partir de los tres sustratos (peces, ovas y materia orgánica), los del Grupo diclina a partir de ovas y materia orgánica y los del Grupo aenigmatica, sólo fueron obtenidos a partir de materia orgánica (figura 12).

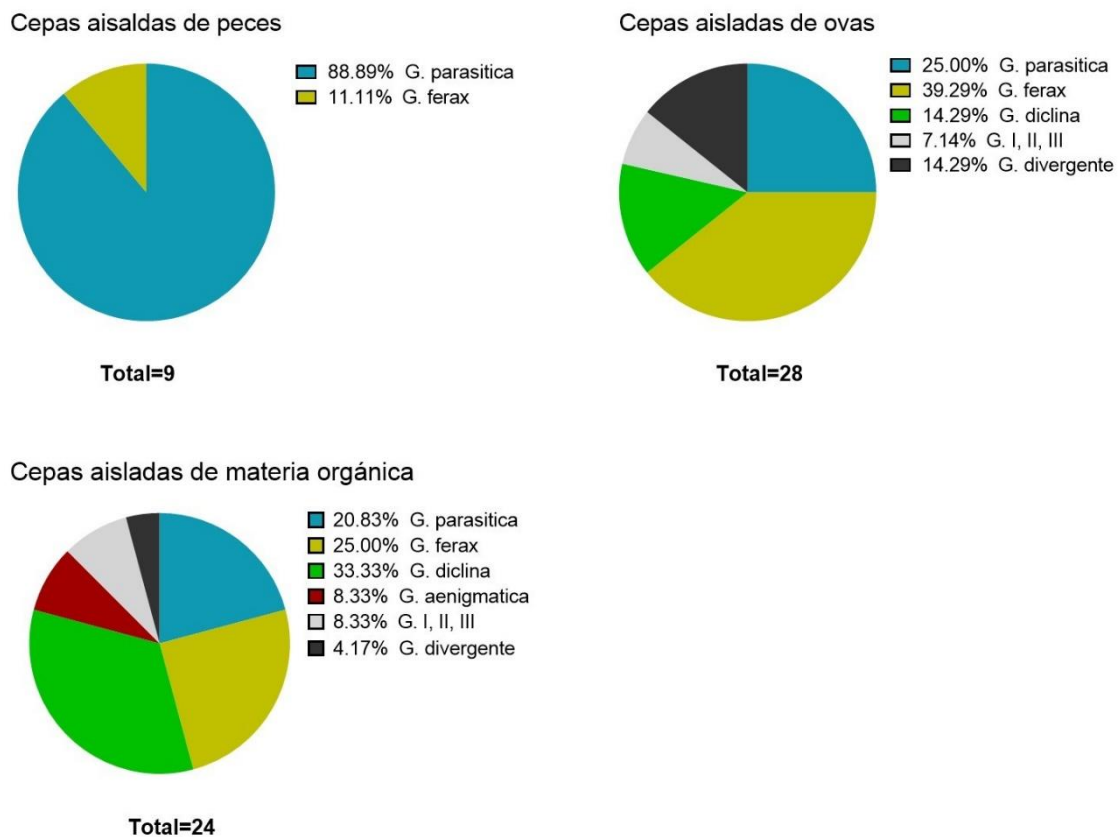


Figura 12. Aislamientos de Oomycetes obtenidos a partir de peces, ovas y materia orgánica. En los gráficos se muestra la abundancia relativa de cada Grupo para cada sustrato (peces, ovas y materia orgánica).

6. DISCUSIÓN

6.1. Identificación morfológica

En el presente estudio, se registraron once taxa a nivel específico, pertenecientes a los órdenes Saprolegniales y Leptomitales del phylum Oomycota (Peronosporomycetes). De los taxa identificados a nivel específico, siete especies fueron registradas con anterioridad para la Argentina y cuatro representan nuevas citas para nuestro país. Entre las especies registradas anteriormente, encontramos a: *S. diclina*, *S. ferax*, *S. parasitica*, *S. glomerata*, *N. dichotoma*, *S. asterophora* y *L. lacteus*. Mientras que entre las nuevas citas se incluyen a *S. aenigmatica*, *A. ambisexualis*, *P. cymosa* y *P. humphreyana*.

Estudios previos en Argentina han hecho mención de géneros y especies de saprolegniales y leptomitales causantes de oomicosis en peces. Por un lado, los géneros *Achlya*, *Aphanomyces*, *Saprolegnia*, *Pythium* y *Leptomitus* fueron identificados en pejerrey bonaerense (*O. bonariensis*) de pisciculturas de la provincia de Buenos Aires (Ringuelet, 1943; Grosman, 1995; García Romero, 2001; Steciow *et al.*, 2004a, b; Pacheco Marino *et al.*, 2006). Y, a nivel de especie, Pacheco Marino *et al.* (2009) lograron la identificación de *A. racemosa* y *S. ferax*, sobre ovas y juveniles, respectivamente, de pejerrey bonaerense de la Estación Hidrobiológica de Chascomús. Por otra parte, los estudios previos en salmónidos son escasos; Zeis Caro (2000) indica que *S. parasitica* es un problema presente en ovas de trucha arcoíris en cultivos realizados en Luján, mientras que Steciow *et al.* (2012, 2013 y 2014a), en estudios preliminares sobre saprolegniasis en pisciculturas de salmónidos, señalan a los géneros *Saprolegnia* y *Achlya* como causantes de estas infecciones. Finalmente, y como fue mencionado antes, en nuestro país también se reportó a *S. parasitica* y *Saprolegnia sp.* como causantes de infecciones sobre distintas especies de peces y anfibios en ambientes acuáticos naturales (Ringuelet *et al.*, 1967; Mancini *et al.*, 2000, 2006, 2008, 2010; Liotta *et al.*, 2007; Perotti *et al.*, 2012).

Las especies halladas en este estudio son, en su mayoría, novedosas para ambientes y organismos acuáticos asociados a sistemas de producción de peces en Argentina y se mencionan a continuación:

Saprolegnia aenigmatica (orden Saprolegniales) se aisló a partir de materia orgánica de la piscicultura del CEAN y es citada por primera vez en nuestro país. Recientemente, Sandoval-Sierra y Diéguez-Uribeondo (2015) describieron a *S. aenigmatica* como una especie nueva a partir de aislamientos obtenidos de ambientes naturales y pisciculturas de diversas regiones geográficas. En el trabajo mencionado, se registra una secuencia de la región ITS proveniente de una muestra de nuestro país. La secuencia está incorporada en el GenBank y se informa que fue aislada de muestras de agua sin precisar una ubicación geográfica o mayores detalles. En el estudio de Carraschi *et al.* (2018) en Brasil, esta especie se aisló de ovas de pejerrey bonaerense, tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus* (Linnaeus)) y agua de piscicultura y fue utilizada para ensayos de infección experimental en pacú (*P. mesopotamicus*). También Sarowar *et al.* (2019) encontraron a *S. aenigmatica* en truchas arcoíris de pisciculturas de Nueva Escocia, Canadá. Puede considerarse que el hallazgo descrito en este trabajo de tesis es el primero para esta especie asociado a un ambiente de piscicultura en nuestro país.

Saprolegnia diclina (orden Saprolegniales) se aisló a partir de materia orgánica y ovas de trucha arcoíris y pejerrey patagónico. En Argentina, fue reportada por primera vez por Steciow (1988) para ambientes acuáticos de la provincia de Buenos Aires y registrada luego por Perotti *et al.* (2012) en puestas de huevos de anfibios en humedales de ambientes patagónicos. En otras partes del mundo y en relación con la acuicultura, esta especie se registró como causante de infecciones en ovas y peces de distintas especies, principalmente salmónidos (Rand y Munden, 1992; Kitancharoen y Hatai, 1996; Hussein y Hatai, 2002; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007; Vega-Ramírez *et al.*, 2013; Sandoval-Sierra *et al.*, 2014a; Thoen *et al.*, 2015; Songe *et al.*, 2015; Mostafa *et al.*, 2020) y también en bagre africano (*Clarias gariepinus* (Burchell)) (Hanjavanit *et al.*, 2008), tilapia del Nilo (Hussein *et al.*, 2013) y pejerrey bonaerense (Kitancharoen *et al.*, 1995) en Japón, Egipto, España, Tailandia, México, Chile, Noruega, Estados Unidos y Arabia Saudita, entre otros.

Saprolegnia ferax (orden Saprolegniales) fue aislada de materia orgánica, ovas y adultos de trucha arcoíris de la piscicultura del CEAN. En nuestro país, se la aisló previamente de juveniles de pejerrey bonaerense de la Estación Hidrobiológica de Chascomús (Pacheco Marino *et al.*, 2009) y en puestas de huevos de anfibios en humedales

de ambientes patagónicos (Perotti *et al.*, 2012). En otras partes del mundo, y en relación con la acuicultura, *S. ferax* fue hallada en salmónidos (Wood y Willoughby, 1986; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007; Vega-Ramírez *et al.* 2013; Rezinciuc *et al.*, 2014; Sandoval-Sierra *et al.*, 2014a; Thoen *et al.*, 2015; Tedesco *et al.*, 2021), *Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson) (Cao *et al.*, 2012), tilapia del Nilo (Zahran y Risha, 2013), carpas (*Cyprinus carpio* Linnaeus) (Butty *et al.*, 1989, Czeczuga *et al.*, 2015a) y percas (Percidae) (Czeczuga y Muszynska, 1999), en Escocia, España, Italia, Chile, Estados Unidos, Noruega, México, China, Egipto, Irak y Polonia.

Saprolegnia parasitica (orden Saprolegniales) se aisló a partir de ovas, peces y materia orgánica de la piscicultura del CEAN. *S. parasitica* fue registrada por primera vez en nuestro país por Steciow (1988) en ambientes acuáticos de la provincia de Buenos Aires y mencionada por Zeis Caro (2000) en ovas de trucha arcoíris criadas en Luján y por Mancini *et al.* (2010) sobre pejerrey bonaerense en lagos de Córdoba. En relación con la acuicultura, esta especie es la más comúnmente observada a nivel mundial y uno de los patógenos de peces más importantes (van West, 2006). *S. parasitica* se ha encontrado principalmente en salmónidos (Pickering, 1981; Hatai y Hoshiai, 1992; Langvad, 1994; Smith, 1994; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 1996; Kitancharoen y Hatai, 1996; Hussein y Hatai, 2002; Zaror *et al.*, 2004; Fregeneda-Grandes *et al.*, 2007; de Bruijn *et al.*, 2012; Vega-Ramírez *et al.*, 2013; Minor *et al.*, 2014; Sandoval-Sierra *et al.*, 2014a; Czeczuga *et al.*, 2015b; Thoen *et al.*, 2015; Adel *et al.*, 2020; Tedesco *et al.*, 2021), en bagre del canal (*Ictalurus punctatus* (Rafinesque)) (Bangyeekhun *et al.*, 2001), así como también en peces de acuario (Eissa *et al.*, 2013; Saha *et al.*, 2016) y acipenséridos (Czeczuga *et al.*, 1995), en Japón, Noruega, Reino Unido, Polonia, Irlanda, Italia, Países Bajos, Chile, España, México, Irán, Estados Unidos, India y Egipto.

Saprolegnia glomerata (orden Saprolegniales) se aisló a partir de materia orgánica vegetal extraída de agua proveniente de la piscicultura del CEAN. En nuestro país, fue previamente registrada por Steciow (1996) en ambientes acuáticos próximos a la ciudad de Chascomús, provincia de Buenos Aires. En ambientes de pisciculturas, se registra un aislamiento sobre huevos y adultos de trucha arcoíris (Vega-Ramírez *et al.*, 2013) en

México. Por otra parte, *S. glomerata* se aisló de ovas de trucha marrón (*S. trutta*) incubadas en agua de ríos de Polonia con diferentes grados de eutrofización (Czeczuga *et al.*, 2005).

En este trabajo de tesis, el género *Achlya* (orden Saprolegniales) se aisló e identificó por primera vez en Argentina a partir de ovas de salmónidos. El cultivo de estos organismos en medios sintéticos, como el YpSs, fue dificultoso, ya que muchas veces esta especie resultó desplazada por el crecimiento de *Saprolegnia spp.* Los aislados se caracterizan por la presencia de hifas adelgazadas en sus extremos, que se continúan en ramas terminales muy ramificadas. Panchai *et al.* (2005, 2007) lograron aislar *A. ambisexualis* a partir de ovas y alevinos de tilapia del Nilo mientras que Hanjavanit *et al.* (2008, 2012, 2013) aislaron a esta especie a partir de ovas de bagre africano y tilapia. Hanjavanit *et al.* (2008) realizaron infecciones experimentales sobre ovas de bagre africano mediante la exposición a zoosporas de *A. ambisexualis* y los resultados sugirieron la patogenicidad de esta especie. Sin embargo, otros estudios demostraron que la mayoría de las cepas de *A. ambisexualis* actúan como saprótrofos (Dubey *et al.*, 2018). *Achlya ambisexualis* crece comúnmente en desechos orgánicos en el suelo y en cuerpos de agua y, probablemente, también desempeña un papel activo en la descomposición de sustratos celulósicos y queratinosos dentro del ecosistema (Dubey *et al.*, 2018).

Newbya dichotoma nov. sp. (orden Saprolegniales) se aisló a partir de materia orgánica situada en agua proveniente de la piscicultura del CEAN. Esta especie fue descrita recientemente para nuestro país, morfológica y molecularmente, por Steciow *et al.* (2014b) sobre aislamientos también realizados a partir de muestras de materia orgánica provenientes del río Chimehuín, en las proximidades de la piscicultura del CEAN. No se reportó previamente en ovas o peces de pisciculturas.

Pythiopsis cymosa y *P. humphreyana* (orden Saprolegniales) no tienen reportes previos en nuestro país. En cambio, en otros países, se han registrado aislamientos del género *Pythiopsis* en percas (*Perca fluviatilis* Linnaeus), lampreas (*Lampetra fluviatilis* (Linnaeus)) y en el lucio (*Esox lucius* Linnaeus) (Pickering y Willoughby, 1977; Willoughby, 1978; Johnson *et al.*, 2002). Durante este trabajo de tesis, *P. cymosa* se aisló a partir de ovas de trucha arcoíris y *P. humphreyana* se aisló a partir de ovas y adultos de trucha arcoíris y a partir de materia orgánica asociada al desagüe de la piscicultura.

Pythiopsis cymosa fue citada para alevinos de trucha (Howard *et al.*, 1970) y también fue aislada de lesiones tegumentarias en peces ornamentales (*Gasteropelecus sternicla* (Linnaeus)) de criaderos de Brasil (Rocha y Soares, 2018) y en truchas arcoíris de pisciculturas de Canadá (Sarowar *et al.*, 2019). Estos últimos autores sugieren que *P. cymosa* no es una especie patogénica, sino que afecta peces suprimidos inmunológicamente. Por otra parte, no hay información en la bibliografía consultada sobre registros previos de *P. humphreyana* asociados al cultivo de peces.

Scoliolegnia asterophora (orden Saprolegniales) se observó directamente a partir de ovas de trucha arcoíris de la piscicultura del CEAN. En el material de estudio, se trató de una especie difícil de aislar y mantener en cultivo, ya que posee un crecimiento lento y rápidamente es desplazada por especies del género *Saprolegnia*, de más rápido desarrollo. Fue hallada previamente en muestras de agua del partido de Ensenada y materia orgánica de charcas semipermanentes en el partido de La Plata, provincia de Buenos Aires (Arellano *et al.*, 2008) y también como especie parásita en ovas de anfibios (*Pleurodema thaul* (Lesson)) en humedales de Bariloche (Río Negro) (Basanta *et al.*, 2011). La mayoría de los aislamientos de las especies del género *Scoliolegnia* se obtuvieron a partir de suelos húmedos, con alto contenido de materia orgánica y bajos valores de pH. *Scoliolegnia asterophora* tiene una amplia distribución y también ha sido encontrada sobre peces muertos (Arellano *et al.*, 2008).

Leptomitius lacteus (orden Leptomitales) se encontró en ovas, juveniles y adultos de trucha arcoíris de la piscicultura del CEAN. *Leptomitius lacteus* fue observada directamente sobre los distintos sustratos, sin embargo, los cultivos resultaron difíciles de mantener debido a su lento crecimiento y/o rápido consumo de los nutrientes. Esta especie fue reportada anteriormente en Argentina en ambientes contaminados con hidrocarburos vinculados al polo petroquímico del partido de Ensenada (Buenos Aires) por Steciow y Elíades (2002). Existen pocos registros de esta especie en relación con la acuicultura. El crecimiento de *L. lacteus* se observó en ovas de corégono blanco (*Coregonus albula* (Linnaeus)) y lavareto (*Coregonus lavaretus* (Linnaeus)) en pisciculturas del noreste de Polonia (Czeczuga *et al.*, 2004), y también se aisló de ovas de pércidos y trucha marrón incubadas en agua de ambientes lóticos (Czeczuga y Muszynska,

1999; Czczuga *et al.*, 2005). Las especies del orden Leptomitales son organismos típicos de ambientes contaminados y son capaces de crecer en condiciones de anaerobiosis (Steciow y Elfades, 2002). Sin embargo, Riethmüller *et al.* (2006) observaron que *L. lacteus* podría preferir los ríos antes que las aguas estancadas. *Leptomitus lacteus* no utiliza azúcares tales como la glucosa como fuentes de carbono, mientras que sí puede utilizar alanina y leucina, además, es capaz de utilizar acetato, piruvato y ácidos grasos, los que están fácilmente disponibles en los desechos cloacales (Hudson, 1986). *Leptomitus lacteus* fue encontrada produciendo extensas floraciones en ríos pequeños de Canadá, donde ocuparon gran parte del lecho aguas debajo del vertido de efluentes (Taylor *et al.*, 2009). Willoughby y Roberts (1991) sugieren que esta especie tiene un activo rol en los procesos de descomposición en la zona litoral de lagos del Reino Unido y utiliza plantas y peces muertos como sustrato.

6.2. Estudios moleculares

La taxonomía de Oomycetes está en gran parte basada en la morfología de las estructuras reproductivas y ciertos caracteres bioquímicos, lo que representa muchas veces una situación problemática (Lone y Manohar, 2018). La identificación a nivel de género se basa tradicionalmente en los caracteres asexuales, tipo de zoospora liberada fuera del zoosporangio y especialmente en el modo de descarga de las zoosporas (Seymour, 1970; Daugherty *et al.*, 1998), mientras que la diferenciación dentro de cada género está basada principalmente en las características de los órganos reproductores sexuales, tales como oogonios, anteridios y oosporas. Sin embargo, muchos de estos caracteres pueden ser variables en una especie o similares entre diferentes especies y, por otra parte, muchas cepas pierden la capacidad de reproducirse sexualmente o no pueden ser inducidas a formar estructuras sexuales en condiciones de laboratorio. Resulta entonces difícil hacer una identificación definitiva utilizando únicamente los criterios morfológicos tradicionales y por lo tanto, la taxonomía clásica de los Oomycetes basada enteramente en los caracteres morfológicos de las estructuras sexuales y asexuales es actualmente considerada como insuficiente para una identificación inequívoca y que probablemente conduzca a la creación de especies

artificiales o complejos de especies (Hulvey *et al.*, 2007; Tohen *et al.*, 2015; Lone y Manohar, 2018; Sarowar *et al.*, 2019).

En este contexto, en los últimos años, los análisis moleculares han cobrado relevancia en la identificación y caracterización de especies, así como también en el estudio de las relaciones naturales entre ellas (Steciow *et al.*, 2007). Numerosos estudios han empleado las regiones del ADN nuclear como el gen de la β -tubulina, el 18S ARNr, 5.8S ARNr, 28S ARNr o las regiones no codificantes del espaciador interno de transcritos (ITS por sus siglas en inglés) y las regiones del genoma mitocondrial Cox1 y Cox2 del ADN nuclear en la identificación, la filogenia y el abordaje de problemas taxonómicos de los Oomycetes (Hudspeth *et al.*, 2000; Paul y Steciow, 2004; Villa *et al.*, 2006; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007; Hulvey *et al.*, 2007; Robideau *et al.*, 2011; Eissa *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2015; de la Bastide *et al.*, 2015; Sarowar *et al.*, 2019; Barde *et al.*, 2020).

6.3. Identificación molecular y filogenia

En este estudio se obtuvieron 62 secuencias de la región amplificada Cox2 de Oomycetes procesadas en el MACN en el marco del proyecto “OOMAC – Oomycota de Argentina y Chile para el estudio de biodiversidad de Oomycetes” incorporado a iBOL. La mayor parte de las secuencias obtenidas presentó similitudes altas con secuencias depositadas en GenBank asignadas a *S. parasitica*, *S. ferax*, *S. diclina*, *S. aenigmatica* y *Saprolegnia sp.* El 75,8% de las secuencias (n=47) tuvo porcentajes de similitud de 99-100%, el 14,51% (n=9) de 98-99% y el 9,67% (n=6) tuvo similitudes de \leq 98%, lo cual indica que gran parte de las secuencias pueden ser identificadas mediante el uso del marcador Cox2 y la base de datos de GenBank. A los fines de este trabajo, se consideró confiable una identificación con similitud de 99-100% mientras que índices de 98-99% se consideraron no concluyentes y su identificación o relación con otras cepas fueron tratadas en los análisis filogenéticos. Finalmente, las secuencias con índices de similitud de \leq 98% no pudieron ser identificadas con estas metodologías.

Los análisis filogenéticos mostraron que las secuencias Cox2 obtenidas en este estudio se separaron en dos clados principales. La mayoría (n=56) de las secuencias analizadas se agruparon junto con las secuencias de referencia asignadas al género

Saprolegnia, en un clado denominado “Saprolegnia”, mientras que las seis secuencias restantes se agruparon, junto con una secuencia de referencia identificada como *Pythiopsis cymosa* en un clado denominado “divergente”. Dentro del clado “Saprolegnia” se reconocieron siete grupos: Grupo parasitica; Grupo diclina; Grupo aenigmatica; Grupo ferax; Grupo I; Grupo II; Grupo III. Mientras que, el clado “divergente” quedó conformado por un solo grupo: Grupo divergente. La conformación de los grupos fue descrita previamente en la sección de resultados.

Dentro del Grupo ferax se incluyeron 16 de las secuencias obtenidas en este trabajo, estas secuencias presentaron similitudes $\geq 99,08\%$ con las secuencias de referencia tomadas de GenBank: KP965749.1, MK941867.1 y EU826103.1, identificadas como *S. ferax* (Goeker, 2008; Choi *et al.*, 2015; Sarowar *et al.*, 2019). Dentro del Grupo parasitica se incluyeron 20 secuencias que presentaron similitudes de 98,42-100% con las secuencias de referencia tomadas de GenBank: MK941865.1, MK941866.1, MK941864.1, MK941863.1, HQ660429.1 y DQ071421.1, asignadas a *S. parasitica* (Sarowar *et al.*, 2019; Liu y Chen, 2010; Villa *et al.*, 2006). Doce secuencias de este estudio tuvieron una similitud de 100% con *S. diclina* MK941869.1 (Sarowar *et al.*, 2019) y fueron incluidas en el Grupo diclina, mientras que las secuencias OOMAC238-16, OOMAC252-16 tuvieron similitudes altas con *S. aenigmatica* MK941870.1 (Sarowar *et al.*, 2019) y se agruparon en el Grupo aenigmatica. Las secuencias OOMAC233-16, OOMAC234-16, OOMAC316-18 y OOMAC307-18 no se incluyeron en ninguno de los grupos anteriores y fueron agrupadas en: Grupo I, Grupo II y Grupo III. Estas secuencias tuvieron similitudes ambiguas con las secuencias referencia de GenBank o presentaron incongruencias que no justificaron su inclusión en los grupos principales. Finalmente, se observó un grupo divergente conformado por 6 secuencias que se asociaron mejor con *P. cymosa* AF086689.1 (Hudspeth *et al.*, 2000), que con las secuencias de referencia del género *Saprolegnia*. Ninguna de las secuencias de este agrupamiento tuvo similitudes confiables cuando se las comparó con las secuencias de la base de datos de GenBank, de todos modos, el análisis filogenético permitió concluir que las secuencias de este grupo podrían pertenecer a cuatro géneros, distintos de *Saprolegnia*, y cuatro (o cinco) especies diferentes, pertenecientes al orden Saprolegniales.

El uso del marcador molecular Cox2 permitió la identificación de la mayoría de las secuencias obtenidas, sin embargo, varias secuencias de este estudio no pudieron ser identificadas y otras, como en el caso de los grupos *ferax* y *parasitica*, se incluyeron de manera no concluyente en los grupos respectivos. El marcador Cox2 fue previamente utilizado en estudios moleculares por otros autores (Hudspeth *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2015; Sarowar *et al.*, 2019) y particularmente fue propuesto por Choi *et al.* (2019) para los estudios de identificación, taxonomía y filogenia de los Oomycetes. De acuerdo a estos autores, el Cox2 posee buena eficiencia para la amplificación por PCR y mayor éxito en la identificación de especies, a partir de su alta divergencia interespecífica y baja divergencia intraespecífica. Sin embargo, y en particular para las especies del orden Saprolegniales, la información disponible en las bases de datos de BOLD y GenBank es limitada. En este sentido, existen más secuencias en BOLD y GenBank para los marcadores Cox1 e ITS que para Cox2. Por ejemplo, para el marcador Cox2, en la base de datos de GenBank hay secuencias identificadas a nivel específico para cinco especies del género *Saprolegnia*: *S. aenigmatica*, *S. ferax*, *S. diclina*, *S. parasitica* y *Saprolegnia torulosa* de Bary. Las secuencias de estas especies son las que se compararon en los alineamientos múltiples mediante BLAST y las utilizadas luego para realizar los árboles filogenéticos. En cambio, para los marcadores ITS y Cox1, hay secuencias disponibles de un número mayor de especies. En el estudio de identificación de *Saprolegnia spp.* basado en unidades taxonómicas operativas (MOTUs, por su sigla en inglés), mediante la utilización del marcador ITS, Sandoval-Sierra *et al.* (2014b) reconocieron 18 especies del género *Saprolegnia* (*S. diclina*, *S. parasitica*, *S. ferax*, *S. australis*, *Saprolegnia delica* Coker, *Saprolegnia litoralis* Coker, *Saprolegnia subterranea* (Dissman) Seymour, *S. torulosa*, *Saprolegnia monilifera* de Bary, *S. terrestres* (Seymour) Cookson, *Saprolegnia eccentrica* (Coker) Seymour, *Saprolegnia furcata* Maurizio, *Saprolegnia asterophora* de Bary, *Saprolegnia megasperma* Coker, *Saprolegnia turfosa* (Minden) Gauman, *Saprolegnia anisospora* de Bary, *Saprolegnia monoica* Pringsh. y *Saprolegnia brachydanionis* Ke *et al.*) todas ellas con secuencias incorporadas a la base de datos de GenBank. Por otra parte, Sarowar *et al.* (2019) realizaron análisis filogenéticos con secuencias Cox1 de 16 especies de *Saprolegnia* (*S. diclina*, *S. parasitica*, *S. ferax*, *S. delica*, *S. litoralis*, *S. torulosa*, *S. eccentrica*, *S. asterophora*, *S. megasperma*, *S. turfosa*, *S. anisospora*, *S. monoica*, *S. aenigmatica*,

Saprolegnia hypogina (Pringsh.) de Bary, *Saprolegnia unispora* (Coker y Couch) Seymour y *S. torulosa*), también incorporadas en el GenBank. Estos ejemplos muestran que hay insuficientes secuencias Cox2 disponibles en la base de datos como para realizar la identificación de algunas especies y análisis filogenéticos más concluyentes. Choi *et al.* (2019) propusieron el uso del Cox2 como marcador universal para Oomycetes en el sistema de código de barras, ya que posee mayor eficiencia para la amplificación por PCR y mayor éxito en la identificación de especies, sin embargo, puede considerarse que su uso como “código de barras” para el orden Saprolegniales es en la actualidad limitado debido a las escasas secuencias que se encuentran disponibles en las bases de datos.

También es necesario resaltar que si bien, desde el punto de vista molecular, el GenBank ha dado lugar a un rápido aumento de la información de secuencias de ADN, aún falta información confiable y verificada sobre su nivel taxonómico y, precisamente, una de las principales dificultades del procedimiento de identificación basado en el ADN es la calidad de los datos comparativos de los que dependen las identificaciones (Johnson *et al.*, 2008). Por ejemplo, en organismos pertenecientes al reino Fungi, trabajos recientes sobre la falta de fiabilidad de las secuencias de ADN publicadas mostraron que alrededor del 20% de las secuencias parecen estar mal identificadas o son dudosas (Bridge *et al.* 2003; Nilsson *et al.* 2006). Y en esta misma línea, Sandoval-Sierra *et al.* (2014b) encontraron que el GenBank representa la principal fuente de identificación errónea de especies de Saprolegniales. En un estudio realizado con 961 secuencias (incluidas secuencias obtenidas con el marcador ITS a partir de cepas de colección y secuencias del GenBank) detectaron que el 45% de las secuencias en el GenBank del género *Saprolegnia* tienen nombres incorrectos o mal asignados, de acuerdo con el MOTUs. Esto puede deberse a causas tales como que la base de datos de GenBank carece de un sistema de prevención de anotaciones incorrectas (lo cual produce un efecto en cadena de malas asignaciones), errores de secuenciación o incluso, errores de identificación o contaminación de los cultivos de referencia (Sandoval-Sierra *et al.*, 2014b).

Probablemente, futuras contribuciones a las bases de datos de BOLD y GenBank permitan avanzar con la identificación de las secuencias obtenidas en esta tesis: confirmar o brindar mayor soporte a las asignaciones realizadas para los Grupos parasítica, ferax,

aenigmatica y diclina, lograr identificar las secuencias ubicadas en los Grupos I, II, III y divergente, así como también aumentar la información disponible para mejorar la exactitud de las distancias intra e interespecíficas y determinar umbrales entre las mismas. En este sentido, cabe destacar también que, en una próxima etapa, se continuará con el procesamiento y la amplificación de la región Cox2 del ADN mitocondrial de muestras que se encuentran depositadas en el MACN y estos productos se enviarán al CGB (Canadá), junto otros 41 productos de amplificación, ya obtenidos y almacenados en el MACN, para la secuenciación y el análisis posterior.

6.4. El complejo *S. diclina* – *S. parasitica*

Como fue mencionado arriba, la delimitación e identificación de especies resulta una tarea complicada dentro de los Oomycetes, ya que muchas especies tienen caracteres morfológicos similares o que se solapan debido a su plasticidad fenotípica. Un ejemplo está dado por el complejo *S. diclina*-*S. parasitica*, que incluye a saprolegniales aislados de peces y ovas, y que fue establecido por Neish y Green (1976) para agrupar especies que tienen ramas anteridiales predominantemente diclinas y oogonios de paredes delgadas, discretamente o no punteadas (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007). Este complejo incluyó originalmente a *S. diclina*, *S. parasitica*, *Saprolegnia kauffmanian* Pieters, *Saprolegnia shikotsuensis* Hatai *et al.* y *S. australis*, y fue adoptado por Willoughby (1978) en su trabajo sobre “saprolegniasis” en Inglaterra. Adicionalmente, este autor diferenció tres subgrupos para *S. diclina*: *S. diclina* tipo 1 (parásitos de salmónidos), *S. diclina* tipo 2 (parásitos de peces) y *S. diclina* tipo 3 (saprófitos), basado en la morfología de los oogonios y la temperatura requerida para la formación de los mismos (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007). Los conceptos propuestos fueron aceptados inicialmente por algunos autores (Pickering *et al.*, 1979; Beakes y Ford, 1983; Wood y Willoughby 1986; Wood *et al.*, 1988), sin embargo, con el paso del tiempo, otros autores abandonaron la idea del complejo *S. diclina*-*S. parasitica* (Hatai y Willoughby, 1988; Dick, 2001). Diferentes autores adoptaron enfoques distintos (morfología del oogonio, ornamentación del quiste secundario, tipo y tamaño de las zoosporas, patrones de germinación, análisis de isoenzimas o sustrato de aislamiento) para la determinación taxonómica de las

Saprolegnia spp. aisladas de peces. Esto ha llevado a una literatura que es muchas veces confusa y problemática (Beakes y Ford, 1983; Beakes, 1994; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2007; Bruno *et al.*, 2011).

La problemática planteada con el complejo *S. diclina-S. parasitica* se abordó en distintos estudios con herramientas moleculares. Molina *et al.* (1995) utilizaron el análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) y demostraron que *S. diclina* y *S. parasitica* no son conespecíficas; además, correlacionaron esta distinción molecular con caracteres tales como la morfología y ultraestructura de los oogonios. Posteriormente, Diéguez-Uribeondo *et al.* (2007) realizaron los primeros estudios moleculares orientados a esclarecer las relaciones filogenéticas y taxonómicas entre las especies del complejo *S. diclina-S. parasitica*. Estos autores estudiaron 128 aislados de diferentes partes del mundo pertenecientes al complejo *S. diclina-S. parasitica*, secuenciaron la región ITS del ADNr y estudiaron características morfológicas tales como la ornamentación del quiste, la germinación retraída y la emergencia repetida de zoosporas (poliplanetismo). De esta manera, concluyeron que los aislados de especies que forman este complejo podrían separarse en al menos 5 clados filogenéticamente diferentes. El clado I incluyó aislados caracterizados como *S. parasitica*, *S. diclina* tipo 1 y *S. salmonis* Hussein y Hatai, el clado II incluyó a *S. diclina* tipo 2, mientras que los aislados de *S. diclina sensu stricto* se distribuyeron dentro de los clados III y V, y *S. australis* fue ubicada en el clado IV. Dentro del clado I, se incluyeron todos los aislados del género *Saprolegnia* obtenidos a partir de lesiones de salmónidos y se les asignó el nombre *S. parasitica*. Los resultados de Diéguez-Uribeondo *et al.* (2007) muestran que los aislados a partir de lesiones de peces conforman un grupo separado de *S. diclina s. str.*, considerada saprófita. Por último, los estudios moleculares de Sandoval-Sierra *et al.* (2014b) también soportan la separación de las especies que conforman el complejo *S. diclina-S. parasitica*. Los análisis de MOTUs mostraron que las distancias genéticas obtenidas separan claramente como taxa diferentes a los MOTUs *S. diclina* y *S. parasitica*. Además, este estudio mostró que no existen diferencias genéticas entre las especies *S. hypogyna* y *S. salmonis* y los aislados de *S. parasitica* y por lo tanto pueden considerarse como pertenecientes al mismo taxón.

Los estudios filogenéticos realizados con las secuencias de esta tesis concuerdan en gran medida con los resultados mencionados arriba. Los Grupos *diclina* y *parasitica* pudieron diferenciarse como taxa diferentes con las metodologías de neighbor joining y el análisis bayesiano, al igual que en los estudios de Molina *et al.* (1995), Diéguez-Uribeondo *et al.* (2007) y Sandoval-Sierra *et al.* (2014b). El Grupo *diclina* fue el más consistente entre ambas metodologías e incluyó 12 secuencias junto con *S. diclina* MK941869.112, con una distancia intraespecífica (*p-distance*) de 0,022. Mientras que el Grupo *parasitica* se conformó por 20 secuencias y las secuencias de referencia asignadas a *S. parasitica* tomadas de GenBank (MK941865.1, MK941866.1, MK941864.1, MK941863.1, HQ660429.1 y DQ071421.1), con una distancia intraespecífica de 0,763. La distancia interespecífica entre los grupos fue de 1,98; esta distancia fue la menor entre los grupos conformados (Grupos *parasitica*, *diclina*, *ferax* y *aenigmatica*) lo cual podría indicar que *S. parasitica* y *S. diclina* están más cercanamente relacionadas entre sí que con *S. ferax* y *S. aenigmatica*. Estos resultados apoyan la separación entre *S. parasitica* y *S. diclina*, muestran la estrecha relación entre ellos y también demuestran que el uso del marcador *Cox2*, si bien cuenta con las limitaciones discutidas anteriormente, también puede ser una herramienta adecuada para inferir relaciones filogenéticas entre las saprolegniales.

6.5. Aislamientos por sustratos

Saprolegnia parasitica, *S. ferax*, *S. diclina* y *S. aenigmatica* fueron las especies que se identificaron molecularmente a partir de los aislamientos realizados en el ámbito de la piscicultura del CEAN. Por un lado, *S. parasitica* fue hallada en muestras de peces, ovas y materia orgánica, y fue la especie con más proporción de aislamientos a partir de peces. *S. ferax* también fue aislada de los tres sustratos y fue la especie con mayor proporción de aislamientos sobre ovas. En cuanto a *S. diclina*, esta especie fue hallada en materia orgánica y ovas, pero no sobre peces. Finalmente, *S. aenigmatica*, sólo fue hallada en materia orgánica. Estos resultados sugieren cierta selectividad de sustrato o diferente capacidad de colonización de las especies de Oomycetes halladas en la piscicultura del CEAN.

Distintas características brindan capacidades a los Oomycetes para colonizar y establecerse en sustratos diferentes. A nivel de las zoosporas secundarias, el quimiotaxismo es una característica relevante a la hora de localizar y establecerse sobre el cuerpo de los peces o el corion de las ovas para su colonización. Rand y Munden (1993) demostraron que las zoosporas de *S. diclina* presentan quimiotaxis positiva hacia metabolitos y extractos de tejidos de trucha arcoíris y a extractos de la membrana coriónica de ovas de trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis* (Mitchill)). Por su parte, la actividad quimiotáctica de las zoosporas de *S. parasitica* hacia aminoácidos fue demostrada por El-Feki *et al.* (2003). La capacidad de colonización también está relacionada con la ornamentación de los quistes secundarios. Dentro del género *Saprolegnia*, los quistes secundarios de *S. parasitica*, considerada patogénica en la bibliografía, poseen haces de filamentos largos con ganchos; *S. diclina*, *S. australis*, *S. ferax* y *S. delica*, la mayoría de las veces consideradas saprótrofas, poseen filamentos simples y cortos con ganchos; y finalmente *S. anisospora* tiene quistes secundarios sin ornamentación (Pickering y Willoughby, 1982; Hatai y Hoshiai, 1993; Stueland *et al.*, 2005a; Rezinciuc *et al.*, 2018). Stueland *et al.* (2005a) demostraron que cepas de *S. parasitica* que formaban quistes secundarios con haces de filamentos largos y con ganchos producían mayor mortalidad en salmón del Atlántico que las cepas de *S. diclina* y *S. ferax* (con quistes con filamentos simples y cortos). Sin embargo, algunas cepas de *S. parasitica* con quistes secundarios con haces de filamentos largos no causaron mortalidades significativas. Esto indica que la ornamentación es una característica necesaria en la patogenicidad de las saprolegniales pero no es determinante y, además, existe una variación considerable en la patogenicidad, incluso entre distintas cepas de una misma especie. La actividad enzimática extracelular incrementa la capacidad de digestión y es necesaria para el proceso de penetración de los tejidos en las especies parásitas de peces. Peduzzi y Bizzozero (1977) detectaron actividad proteolítica de tipo quimotripsina en cultivos *in vitro* de *S. parasitica*, *S. diclina*, *S. ferax* y *S. delica*. Mientras que Alberts *et al.* (1989) evidenciaron la actividad de enzimas extracelulares en especies de los géneros *Achlya*, *Aphanomyces* y *Saprolegnia* y demostraron actividad hemolítica, hidrólisis de caseína y presencia de desoxirribonucleasa en condiciones de laboratorio. Además, *Achlya spp.*, *S. diclina* y *S. parasitica* demostraron tener producción de enzimas

degradadoras de lignina, pectina, celulosa y hemicelulosa, que son sustratos orgánicos presentes en las células vegetales de los restos orgánicos presentes en el ambiente acuático (Steciow, 1993). Finalmente, Rand y Munden (1992) encontraron que *S. diclina* produce enzimas hidrolíticas extracelulares y proponen que éstas enzimas pueden alterar la integridad de la membrana coriónica, solubilizando polímeros estructurales y favoreciendo la penetración de las hifas en el corion.

Otros estudios moleculares llevados a cabo en pisciculturas de salmónidos revelaron resultados similares a los hallados en este trabajo de tesis. *S. parasitica*, *S. ferax*, *S. diclina* y *S. aenigmatica*, entre otras, también fueron aisladas por Sarowar *et al.* (2019) a partir de peces infectados y muestras de agua de pisciculturas de salmónidos de Nueva Escocia, Canadá; las mismas fueron identificadas mediante el análisis de la secuencia del ITS del ADNr. Estos autores indican que *S. parasitica* es la más importante causante de oomicosis en las pisciculturas de Nueva Escocia, mientras que *S. ferax*, *S. diclina* y *S. aenigmatica* causan infección en peces severamente estresados e inmunodeprimidos. En otro estudio, realizado en pisciculturas de salmónidos en Chile, Sandoval-Sierra *et al.* (2014a) encontraron a *S. australis*, *S. delica*, *S. diclina*, *S. ferax*, *S. parasitica* y dos especies nuevas del género *Saprolegnia* asociadas a los casos de oomicosis. Las especies fueron determinadas utilizando el sistema de MOTUs y se encontraron asociaciones específicas con el estadio de desarrollo de los peces. De esta manera, establecieron que *S. parasitica* está fuertemente relacionada con infecciones de peces adultos mientras que *S. diclina* se asocia con ovas o alevinos y *S. ferax* infecta esporádicamente tanto a adultos como a estadios embrionarios. Finalmente, *S. parasitica* también fue la especie más representada en los aislamientos realizados a partir de salmónidos de pisciculturas de Italia y Escocia por Tedesco *et al.* (2021). Los aislamientos fueron identificados a nivel de especie a través de la amplificación y secuenciación de la región ITS del ADNr; estos autores también observaron a *S. diclina* y *S. ferax* sobre peces, pero en menor proporción.

CAPÍTULO 2: PATOGENICIDAD DE LOS OOMYCETES SOBRE OVAS Y PECES DE CULTIVO

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Oomicosis en acuicultura

Los Oomycetes del orden Saprolegniales son responsables de producir infecciones y grandes mortalidades en pisciculturas de todo el mundo. Estas infecciones son un problema económico importante en la acuicultura de aguas continentales debido a que son causa de pérdidas millonarias, principalmente en los países donde el cultivo de salmónidos se encuentra más desarrollado (van West, 2006; Fregeneda-Grandes *et al.*, 2007). Estas pérdidas representan al menos el 10% del total de las pérdidas de producción, y pueden llegar en algunos casos hasta el 50% de las pérdidas anuales de la industria salmonera (Sandoval-Sierra *et al.*, 2014a). Las infecciones oomicóticas impactan particularmente en países como Escocia, Chile, Japón, Estados Unidos, Canadá y los países escandinavos (van West, 2006). En Japón, *Saprolegnia sp.* es una de las mayores causas de infecciones y, en particular, *S. parasitica* puede llegar a causar la muerte de uno de diez salmones cultivados en la industria salmonera (Robertson *et al.*, 2009). *Saprolegnia parasitica* también se ha convertido en una gran amenaza para la industria salmonera chilena, una de las más importantes del mundo (Robertson *et al.*, 2009). Fuera de la industria salmonera, las oomicosis también causan importantes pérdidas económicas. En Egipto, se han registrado severos eventos de mortalidad producidos por *Saprolegnia spp.* y *Achlya spp.* en cultivos de la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) (Husseini *et al.*, 2013). Mientras que, *Saprolegnia sp.* es responsable de la “mortandad de invierno” en el cultivo de bagre de canal (*I. punctatus*) en EEUU (Quiniou *et al.* 1998; Bruno y Wood, 1999; Robertson *et al.*, 2009) y de brotes epizoóticos que afectan a ovas y alevinos de pércidos cultivados en Polonia (Czeczuga y Muszynska, 1999). Finalmente, en Argentina se señala a *Saprolegnia sp.* como la principal causa de mortalidad de ovas de pejerrey bonaerense (*O. bonariensis*) en pisciculturas de la provincia de Buenos Aires (Grosman 1995; García Romero, 2001) y,

de manera similar, *Saprolegnia sp.* también representa una problemática importante en el cultivo de trucha arcoíris en la región patagónica (Coria, 1991; Zeis Caro, 2000).

1.2. Patogenicidad de los Oomycetes

Los Oomycetes fueron inicialmente considerados como organismos saprótrofos, productores de infecciones secundarias que surgen ante infecciones bacterianas o parasíticas y como consecuencia de las maniobras de manejo, altas densidades de cría e interacción social en los peces de piscicultura (Bruno y Wood, 1999; Van den Berg *et al.*, 2013). Sin embargo, esta concepción inicial de organismos exclusivamente saprótrofos ha cambiado; existen reportes de Oomycetes que actúan como agentes infecciosos primarios de peces y ovas y pueden producir epizootias en salmónidos y otros teleósteos (van West, 2006; Bruno *et al.*, 2011). Algunas cepas de *S. parasitica* pueden ser altamente virulentas y causar infecciones primarias en salmón del Atlántico (*S. salar*) y trucha marrón (*S. trutta*) (van West, 2006; Robertson *et al.*, 2009;). Stueland *et al.* (2005a) detectaron, en infecciones experimentales, cepas de *Saprolegnia sp.* que producían mortalidades significativas en salmón del Atlántico sometidos previamente a un tratamiento estresante y abrasivo (tratamiento denominado “ami-momi”) mientras que Hussein y Hatai (2002), reportan a *S. salmonis* y *S. parasitica* como dos especies altamente virulentas en ensayos de exposición de trucha marrón, salmón rojo (*Oncorhynchus nerka* (Walbaum)), trucha arcoíris (*O. mykiss*), char japonés (*Salvelinus leucomaenis* (Pallas)) y salmón japonés (*Oncorhynchus masou* (Brevoort)). Stueland *et al.* (2005a) consideraron que, en un evento de mortalidad producido por Oomycetes, resulta un gran desafío poder determinar cuándo una infección es considerada primaria o cuando es secundaria a otras enfermedades o factores de stress. Y de ahí la relevancia de determinar el grado de patogenicidad de cada cepa. Si bien las enfermedades ocasionadas por estos organismos son reconocidas en peces desde hace largo tiempo, una de las mayores problemáticas reside en la identificación del agente y la determinación de la condición de verdaderos patógenos o saprótrofos que colonizan una lesión preexistente (Alderman, 1994).

Los Oomycetes producen zoosporas móviles que poseen la capacidad de reconocer un sustrato o potencial hospedador, movilizarse y adherirse a éste. La atracción y

desplazamiento, mecanismo denominado quimiotaxis, de las zoosporas hacia las ovas o el tegumento de los peces, es un paso esencial en el proceso de infección. Distintos autores han estudiado estos mecanismos, Rand y Munden (1993) y El-Feki *et al.* (2003) demostraron que las esporas de *S. parasitica* y *S. diclina* presentan quimiotaxis positiva hacia metabolitos y extractos de tejidos de trucha arcoíris y a extractos de la membrana coriónica de la trucha de arroyo (*S. fontinalis*). La quimiotaxis no es específica, sin embargo, facilita el encuentro de las zoosporas con el hospedador. La adhesión es el siguiente paso en el proceso infeccioso. Los Oomycetes secretan glicoproteínas que sirven como material adhesivo (Deacon y Donaldson, 1993) para asegurar la germinación sobre el sustrato, sin embargo, la ornamentación del quiste secundario puede ser relevante en la fijación y patogenicidad. Pickering y Willoughby (1982) hallaron que las cepas consideradas patogénicas (*S. parasitica*, *S. diclina* tipo1) desarrollan quistes secundarios con haces de filamentos largos y ganchos mientras que en las cepas no patogénicas (*S. diclina* tipo 2, *S. australis* y *S. ferax*) los filamentos son simples y cortos. Estas estructuras disminuyen la tasa de sedimentación y mantienen a las esporas en circulación en el medio, incrementando de esta manera, las oportunidades de encontrar un sustrato u hospedador (Beakes, 1994). Por otro lado, los haces de filamentos largos con ganchos aumentan la eficiencia en la fijación al hospedador, ya sea por aumento de la superficie de contacto como por la presencia de una matriz extracelular adhesiva (Beakes, 1994; Rezinciuc *et al.*, 2018). El rápido crecimiento de los tubos germinativos, es otra característica ventajosa en el éxito de las especies más patogénicas al momento de lograr la colonización de un sustrato (Beakes, 1994). Stueland *et al.* (2005a) demostraron experimentalmente que la tasa de germinación y crecimiento de los quistes de las cepas de especies patógenas es mayor que la de las cepas no patogénicas. Sin embargo, la correlación entre las características fenotípicas observadas de las zoosporas y la patogenicidad no es siempre consistente y es probable que la patogenicidad no se pueda atribuir a un solo factor, sino que sería el resultado de una combinación de varios factores (Thoen *et al.*, 2011). Las zoosporas y quistes de los Oomycetes poseen características que les confieren mayor o menor capacidad infectiva. La quimiotaxis, el desarrollo de haces de pelos con ganchos y el rápido crecimiento de los tubos germinativos son elementos necesarios, aunque no determinantes en las cepas patogénicas.

1.3. Alteraciones patológicas

Las oomicosis se caracterizan por la presencia de manchas blancas o grisáceas de aspecto algodonoso en la cabeza, opérculo, pedúnculo caudal y aletas de los peces desde donde el micelio se desarrolla y esparce al resto del cuerpo (Hatai *et al.*, 1992; Robertson *et al.*, 2009). En el tegumento de los peces, las hifas generalmente se establecen de forma focal, se extienden sobre la epidermis, erosionándola a medida que avanza la infección e invaden la capa dérmica, deteriorándola a medida que avanza la infección, estas lesiones pueden afectar hasta el 80% de la superficie corporal y, como consecuencia, causar la muerte del hospedador (Roberts, 1981; Van den Berg *et al.*, 2013). En general la penetración oomicótica está restringida al tegumento y las lesiones musculares son más bien raras y están asociadas a infecciones bacterianas, sin embargo, en ocasiones las hifas pueden causar necrosis de la musculatura y penetrar hasta órganos, como la faringe y el resto del sistema digestivo e incluso, llegar al sistema nervioso central y vasos sanguíneos importantes (Pickering y Willoughby, 1982; Bruno y Wood, 1999; González de Canales *et al.*, 2001; Hussein y Hatai, 2002; Gieseke *et al.*, 2006; Ashour *et al.*, 2017). Hussein *et al.* (2013) observaron en infecciones de *Achlya proliferoides* Coker y *S. diclina* sobre juveniles de tilapia del Nilo que las hifas irradiaban desde el foco de infección en la epidermis, penetraban en la membrana basal subyacente y se extendían hacia la dermis e hipodermis hasta alcanzar la musculatura. Estos autores, también observaron proliferaciones hiperplásicas epidérmicas alrededor del foco de infección, edema en la hipodermis y musculatura y cambios degenerativos miofibrilares. Ashour *et al.* (2017) detectaron pérdida de la epidermis, necrosis de la dermis e hipodermis y pérdida de la apariencia normal de las células musculares en individuos de carpa común (*C. carpio*) infectados con *Saprolegnia sp.* En bagres (*Clarias batrachus* (Linnaeus)) infectados con *S. diclina* se observó la pérdida de la epidermis, un extenso edema en la hipodermis y células musculares degeneradas (Chauhan *et al.*, 2014). En salmónidos, por otra parte, Hussein y Hatai (2002) encontraron en los sitios de infección por *Saprolegnia spp.*, pérdida de la epidermis, edema en la hipodermis y distintos grados de cambios degenerativos en la musculatura subyacente. Mientras que Gieseke *et al.* (2006) observaron espongirosis del epitelio, ocasionales focos hemorrágicos e inflamación mononuclear, pérdida de tejido conectivo y escamas en la dermis en truchas arcoíris infectadas con *S. parasitica*. Además,

estos autores, detectaron hemorragias e inflamación en la hipodermis y músculo subyacente. En síntesis, los Oomycetes producen notables alteraciones en el tegumento y musculatura de los peces infectados, hemorragias y destrucción del tegumento con la consecuente pérdida de impermeabilización, que causan una hemodilución severa que puede llevar a la muerte de los peces por fallas osmorregulatorias (Pickering, 1994; van West, 2006).

1.4. Sistemas de defensa

El tegumento de los peces constituye la primera barrera de defensa contra la acción de microorganismos patógenos. La integridad del tegumento es, por lo tanto, de vital importancia en la resistencia a la infección por Oomycetes. En acuicultura, las continuas acciones de manejo sobre los peces (muestreo, clasificación, traslado o desove) y, por otra parte, la interacción y el comportamiento territorial de algunas especies en épocas reproductivas producen constantes pérdidas de escamas y mucus, y lesiones abrasivas en el tegumento, que son vías de entrada para las infecciones oomicóticas (Pickering, 1994). El daño en la epidermis aumenta la susceptibilidad a las oomicosis. En distintos estudios, se demostró que los peces tratados con medios abrasivos son más sensibles a contraer infecciones después de la exposición a zoosporas de *Saprolegnia spp.* (Howe *et al.*, 1998; Hussein y Hatai, 2002; Bruno *et al.*, 2011; Panchai *et al.*, 2015a). Tal es así, que el método “ami-momi”, que consiste en sacudir a un grupo de peces en una red por 1 o 2 minutos, produciendo lesiones, descamación y demucificación del tegumento, es ampliamente utilizado para lograr con éxito infecciones en ensayos experimentales (Hatai y Hoshiai, 1993; Yuasa y Hatai, 1996; Fregeneda-Grandes *et al.*, 2001; Hussein y Hatai 2002; Stueland *et al.*, 2005a; Hanjavanit *et al.*, 2010; Hussein *et al.*, 2013; Panchai *et al.*, 2015a).

En el tegumento, la secreción mucosa actúa como una barrera física, química y celular frente a los agentes infecciosos. La producción y recambio continuo del mucus remueve potenciales patógenos de la superficie de los peces (Pickering, 1994). Por otra parte, se encuentran en el mucus moléculas con propiedades antimicrobianas y numerosos componentes proteicos relacionados con el sistema inmune, cuya función es eliminar los patógenos y activar la respuesta cuando ocurre una infección (Pickering,

1994; Olabuenaga, 2000; Reverter *et al.*, 2018). También, en el mucus de los peces se ha observado una respuesta celular contra Oomycetes. Wood *et al.* (1986) y Willoughby (1989) detectaron elementos celulares adheridos a hifas de *Saprolegnia sp.* que sugieren un mecanismo de defensa mediado por células.

La inflamación es una respuesta de orden local del sistema de defensa innato, que comienza rápidamente después del contacto con el antígeno e involucra a los granulocitos, monocitos/macrófagos y linfocitos. El área afectada recibe mayor irrigación sanguínea, aumenta la permeabilidad de los capilares y posteriormente se produce la migración de los leucocitos desde los capilares hacia el tejido (Rubio-Godoy, 2010). Los glucanos de la pared celular de los Oomycetes son reconocidos por los leucocitos y dan inicio a la reacción inflamatoria (Belmonte *et al.*, 2014). Los Oomycetes pueden generar una fuerte respuesta inflamatoria en salmónidos. Una vez iniciado el proceso inflamatorio, es inducida la producción de citoquinas y quimioquinas (IL-1 β 1, IL-8, TNF- α) junto con otros componentes de la respuesta celular innata (lectinas, péptidos antimicrobianos y ciclooxigenasa 2 COX-2) (de Bruijn *et al.*, 2012; Belmonte *et al.*, 2014). A nivel histológico, el proceso inflamatorio ha sido descrito por Wada *et al.* (1996) en la infección experimental de ayu (*Plecoglossus altivelis* (Temminck y Schelegel)) y carpa con esporas de *Aphanomyces sp.* Estos autores observan una primera infiltración inflamatoria y luego la presencia de focos inflamatorios constituidos por macrófagos que rodean a las hifas. Estos focos confluyen y se convierten en células gigantes multinucleadas. Finalmente, se forman granulomas cuando las células epiteloideas encapsulan a estos complejos (macrófagos multinucleados-hifas) que terminan sufriendo necrosis. De este modo, los macrófagos juegan un rol determinante en la eliminación del patógeno. A pesar de esto, el proceso inflamatorio no siempre es observado en el caso de las oomicosis. Álvarez *et al.* (1995) no detectaron respuesta inflamatoria en truchas marrones silvestres infectadas con *Saprolegnia sp.*, mientras que Bly *et al.* (1994) observaron que el proceso inflamatorio es dependiente de la temperatura en bagres del canal naturalmente infectados con *Saprolegnia sp.* La aparición de células multinucleadas, infiltración de granulocitos y linfocitos fue observada, en el último caso, a temperaturas mayores que 10 °C. En otros estudios experimentales se ha demostrado también, que existen reacciones

complejas entre el brusco descenso de la temperatura, inmunosupresión, ausencia de inflamación y las infecciones oomicóticas (Bruno y Wood, 1999).

1.5. Agregados de macrófagos

Los agregados de macrófagos (AM) son acumulaciones de macrófagos pigmentados presentes en tejidos linfohematopoyéticos de los osteictios (Wolke, 1992). En la mayoría de los teleósteos, los agregados de macrófagos se encuentran en focos definidos, que también pueden contener otros leucocitos, y están delimitados por una fina cápsula. Sin embargo, en salmónidos los AM no están bien definidos y los macrófagos se encuentran distribuidos más aleatoriamente en el tejido linfohematopoyético (Agius y Roberts, 2003). Los AM son también denominados centros melanomacrofágicos (CMM), no obstante, algunos autores prefieren el uso del término AM para hacer referencia a las acumulaciones mencionadas ya que en salmónidos, estas acumulaciones de macrófagos no se encuentran formando verdaderos “centros” definidos (Agius, 1981) y, por otra parte, el término CMM hace explícita mención a la presencia de melanina y este pigmento, junto con lipofuscina y hemosiderina, puede o no estar presente en los agregados (Wolke, 1992). En este estudio, y en concordancia con el estudio de Schwindt *et al.* (2006) realizado con truchas de arroyo y truchas arcoíris, se utilizará el término “agregado de macrófagos” para hacer referencia a las acumulaciones de macrófagos pigmentados presentes en tejidos linfohematopoyéticos. Los AM se forman por la acumulación de macrófagos, que contienen pigmentos, material exógeno, incluidos agentes infecciosos, productos de desecho celular o de tejidos dañados en procesos patológicos, y otras células linfoides y reticulares que cumplen un importante rol en el sistema de defensa de los peces (Fernández *et al.*, 2002). La actividad inmunológica de los macrófagos incluye la destrucción y detoxificación de materiales endógenos y exógenos, la fagocitosis de agentes infecciosos y la presentación de antígenos (Stosik *et al.*, 2019). En los AM, se produce la retención de antígenos como complejos inmunes y la interacción y activación de linfocitos (Olabuenaga, 2000; Tort *et al.* 2003). Las características funcionales y estructurales sugieren que los AM serían análogos primitivos o precursores de los centros germinales de otros vertebrados (Agius y Roberts, 2003). En esta línea, Vigliano *et al.*

(2006), mediante el estudio de inmunoreactividad con anticuerpos utilizados para marcar células dendríticas foliculares, hallaron evidencia sobre las relaciones evolutivas entre los AM y los centros germinales de aves y mamíferos. Los AM varían en cantidad y tamaño en procesos infecciosos, eventos estresantes y exposición a sustancias tóxicas (Ferguson, 2006; Schwindt *et al.*, 2006). También, la edad, ayunos prolongados, deficiencias en la dieta y anemias producen el aumento de los AM (Fernández *et al.*, 2002; Agius y Roberts, 2003; Schwindt *et al.*, 2006). Si bien los AM cumplen un rol importante en el curso de las enfermedades infecciosas, no hay información de su comportamiento en caso de infecciones oomicóticas.

1.6. Problemática en la incubación de ovas

Las oomicosis en ovas de peces están fuertemente asociadas con la acuicultura. Las mortalidades debidas a estas infecciones representan uno de los principales problemas durante el período de incubación, donde ovas de distinta calidad y viabilidad son incubadas por períodos prolongados y a altas densidades con un permanente riesgo de infección (Piper, 1982; Pickering, 1994; Kitancharoen y Hatai, 1996). Esta problemática, frecuente en los *hatcheries* de la provincia del Neuquén y Patagonia Norte, conlleva a la necesidad de realizar tratamientos preventivos y manejos adecuados para evitar pérdidas económicas en los establecimientos productivos. Las oomicosis en *hatcheries* de salmónidos pueden generar mortalidades de más del 10% de las ovas incubadas anualmente, aunque en algunas pisciculturas se han dado pérdidas de hasta el 80 o 90% (Bruno *et al.*, 2011; Vega-Ramírez *et al.*, 2015). *Saprolegnia diclina*, *S. ferax*, *S. parasitica*, *S. australis*, *S. delica*, *S. monoica*, *S. litoralis*, *A. ambisexualis* y *Aphanomyces spp.* son algunas de las especies que fueron aisladas y estudiadas a partir de infecciones oomicóticas en ovas de salmónidos y otras especies (Czeczuga y Muszynska, 1999; Hussein *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2012; Songe *et al.*, 2015).

Las ovas muertas son un sustrato fértil para el crecimiento oomicótico y la diseminación de zoosporas infectivas. Una sola zoospora puede iniciar el crecimiento del micelio sobre una ova muerta, luego, las hifas se desarrollan, sofocan e invaden a las ovas vivas adyacentes y producen la consecuente muerte de las mismas (Post, 1987; Meyer,

1991). En paralelo, se generan aglutinamientos de ovas muertas, micelios y sedimentos que obstruyen el flujo de agua y aumentan el déficit de oxígeno e incrementan masivamente la mortalidad (Pickering, 1994). Algunos estudios sugieren que las ovas vivas son refractarias a la infección por las zoosporas en suspensión y que la infección masiva surge a partir de focos de huevos muertos y sedimentos (Kitancharoen y Hatai, 1996; Thoen *et al.*, 2011). Thoen *et al.* (2011) en estudios de infección experimental, concluyen que las cepas estudiadas del género *Saprolegnia* utilizan a las ovas muertas como sustrato desde donde la infección se extiende hacia las ovas adyacentes. Por estos motivos, resulta claro que, retirar las ovas muertas, actividad conocida como “picado de ovas” junto con la aplicación de tratamientos antioomicóticos es imprescindible para prevenir infecciones masivas y elevadas mortalidades en *hatcheries* de producción de “semilla” (Kitancharoen y Hatai, 1996; Hanjavanit *et al.*, 2008).

Las ovas de los peces teleósteos presentan una envoltura primaria externa, denominada corion, que provee protección mecánica y a la vez permite el intercambio gaseoso y de productos metabólicos de desecho, además brinda aislamiento térmico a la ova y juega un rol fundamental en la protección contra infecciones (Brivio *et al.* 1991; Iconomidou *et al.*, 2000). El corion está conformado por componentes proteicos que son sintetizados en el hígado y/o en el ovario y ensamblados en el ovario durante la vitelogénesis; esto le otorga una identidad bioquímica y morfológica a la ova que es distintiva para cada especie (Jaramillo *et al.*, 2009; Songe *et al.*, 2016). Al no poseer aún un sistema inmune desarrollado, el embrión tiene una capacidad limitada de sintetizar moléculas inmunológicamente relevantes. La resistencia a la infección oomicótica podría estar influida por aspectos físicos de la cubierta de la ova y por la transferencia inmunológica pasiva (transferencia de inmunoglobulinas, lectinas, proteasas, componentes del complemento, lisozimas) por parte de las hembras progenitoras (Songe *et al.*, 2016). En este sentido, Songe *et al.* (2016) sugieren que un corion más grueso en salmón del Atlántico provee mayor resistencia contra las infecciones por *Saprolegnia spp.* Finalmente, Kudo y Teshima (1991), observaron que la cubierta de huevos fecundados de *P. altivelis* y *Tribolodon hakonensis* (Günther), posee una importante actividad enzimática (celulasa, quitinasa, β -glucanasa, liqueninasa, xilanasa, dextranasa, manasa, lisozimas y proteasas) y, por ende, una acción antioomicótica.

2. HIPÓTESIS

- Los Oomycetes aislados en la piscicultura del CEAN son organismos con fuerte capacidad infectiva sobre ovas y peces de cultivo, producen alteraciones patológicas importantes y causan incrementos significativos en la mortalidad.

3. OBJETIVOS

- Evaluar la capacidad de infección de diversas cepas de Oomycetes sobre juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mikiss*), larvas de pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*) y ovas de ambas especies, en condiciones experimentales.
- Describir las alteraciones patológicas asociadas con las infecciones oomicóticas en ovas y peces.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron experimentos con el fin de evaluar la patogenicidad de diferentes cepas de Oomycetes. Las cepas utilizadas fueron obtenidas previamente a partir de distintos sustratos en la piscicultura del CEAN; estas cepas fueron aisladas, identificadas y conservadas tal como se explica en la metodología general y el capítulo 1. Las cepas *Saprolegnia* sp. C01, *S. glomerata* C02, *S. parasitica* C03, *Saprolegnia* sp. C05, *Saprolegnia* sp. C06, *Saprolegnia* sp. C07, *L. lacteus* C23, *Saprolegnia* sp. C25, *Saprolegnia* sp. C26, *L. lacteus* C27, *Achlya* sp. C28 y *Saprolegnia* sp. C29 fueron determinadas según sus características morfológicas, mientras que las cepas *S. ferax* C04 (OOMAC362-18), *S. parasitica* C08 (OOMAC370-18), *S. ferax* C11 (OOMAC371-18), *S. diclina* C13 (OOMAC340-18), *S. parasitica* C18 (OOMAC375-18), *S. ferax* C20 (OOMAC376-18), *S. ferax* C21 (OOMAC341-18), *S. parasitica* C22 (OOMAC342-18) y *S. diclina* C24 (OOMAC344-18) fueron determinadas mediante los análisis moleculares mostrados en el capítulo 1.

Todos los ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de Ictiopatología y el área de acuarios para experimentación de la piscicultura del CEAN.

4.1. Diseño experimental: infecciones sobre ovas

4.1.1. Ensayos de patogenicidad sobre ovas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*). Exposición a cepas de los géneros *Saprolegnia*, *Achlya* y *Leptomitosis*

Se realizaron ensayos de infección experimental sobre ovas embrionadas de truchas arcoíris (siete ensayos) y pejerrey patagónico (un ensayo). Las ovas, en estadio de ojo, fueron seleccionadas a partir de lotes mantenidos en la piscicultura del CEAN y se desinfectaron con el procedimiento descrito en la metodología general. Los ensayos se llevaron a cabo en los sistemas N°1 y N°2 de incubación en pequeña escala. Se realizó la exposición de grupos de ovas muertas y vivas a concentraciones conocidas de zoosporas de 19 cepas de Oomycetes, que fueron mantenidas en condiciones de cultivo. Se realizaron ocho ensayos, donde se utilizaron entre 2 y 4 cepas en simultáneo (tabla 1). El cultivo de los Oomycetes y la producción de los estadios zoospóricos se describen en la metodología general. Las ovas muertas se prepararon mediante la aplicación de un baño de agua estéril a 60 °C durante 1 min, siguiendo la metodología propuesta por Tohen *et al.* (2011) y luego se agruparon de a 20 por unidad de incubación. Se expusieron tres réplicas de ovas muertas a zoosporas de cada una de las cepas testeadas, estos grupos actuaron como control para confirmar la viabilidad y capacidad de germinación y colonización de las zoosporas. Además, se utilizaron, por ensayo, tres grupos control de ovas muertas sin exposición a zoosporas, que sirvieron para comprobar la esterilidad del sistema. Las ovas vivas fueron también agrupadas de a 20 por unidad de incubación. Por cada ensayo se expusieron tres grupos de ovas vivas a zoosporas de cada cepa de Oomycetes y tres grupos se mantuvieron sin exposición a zoosporas y actuaron como control (figura 1). La exposición de las ovas a las zoosporas se mantuvo durante 3 días y después de este periodo se realizó un recambio de agua cada tres días. Las ovas fueron mantenidas en el sistema durante 10 días o hasta la eclosión de los alevinos o muerte de las ovas. Durante este lapso, se registró diariamente la mortalidad y la aparición de ovas infectadas. La infección de las ovas se verificó mediante la observación de micelio a simple vista, microscopio estereoscópico o microscopio invertido. Las ovas muertas fueron retiradas del sistema.

Los experimentos se llevaron cabo durante los meses de agosto, septiembre y octubre, a temperatura ambiente y sin alteración o control del fotoperiodo.

Tabla 1. Cepas de Oomycetes utilizadas en los ensayos de infección experimental sobre ovas de trucha arcoíris y pejerrey patagónico. Se indica el código de la cepa, identificación, sustrato de aislamiento, la concentración de zoosporas y la temperatura de trabajo para cada ensayo.

| | Cepa | Identificación | Sustrato de aislamiento | Zoosporas mL⁻¹ | T° |
|---|-------------|------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------|
| Ensayo 1 Ovas trucha arcoíris | C25 | <i>Saprolegnia sp.</i> | Ova TAI | 1,24 x 10 ³ | 6 ± 2 °C |
| | C03 | <i>S. parasitica</i> | Pez TAI | 1,24 x 10 ³ | |
| Ensayo 2 Ovas trucha arcoíris | C27 | <i>L. lacteus</i> | Pez TAI | 1,89 x 10 ³ | 6 ± 2 °C |
| | C28 | <i>Achlya sp.</i> | Ova TAI | 1,89 x 10 ³ | |
| Ensayo 3 Ovas trucha arcoíris | C26 | <i>Saprolegnia sp.</i> | Ova SS | 4,69 x 10 ³ | 8,5 ± 2,5 °C |
| | C29 | <i>Saprolegnia sp.</i> | Ova SS | 4,69 x 10 ³ | |
| Ensayo 4 Ovas trucha arcoíris | C04 | <i>S. ferax</i> | Ova TAI | 1,07 x 10 ³ | 6 ± 2,5 °C |
| | C06 | <i>Saprolegnia sp.</i> | Ova SS | 1,07 x 10 ³ | |
| | C07 | <i>Saprolegnia sp.</i> | Ova SS | 1,07 x 10 ³ | |
| Ensayo 5 Ovas trucha arcoíris | C01 | <i>Saprolegnia sp.</i> | Ova TAI | 2,50 x 10 ³ | 8 ± 2,5 °C |
| | C02 | <i>S. glomerata</i> | Materia orgánica | 2,50 x 10 ³ | |
| | C05 | <i>Saprolegnia sp.</i> | Ova TAI | 2,50 x 10 ³ | |
| Ensayo 6 Ovas trucha arcoíris | C08 | <i>S. parasitica</i> | Ova SS | 2,00 x 10 ³ | 6,5 ± 2,5 °C |
| | C11 | <i>S. ferax</i> | Ova SS | 2,00 x 10 ³ | |
| | C13 | <i>S. diclina</i> | Ova PJP | 2,00 x 10 ³ | |
| Ensayo 7 Ovas trucha arcoíris | C20 | <i>S. ferax</i> | Pez Ova TAI | 1,19 x 10 ⁴ | 10 ± 3 °C |
| | C21 | <i>S. ferax</i> | Pez TAI | 1,19 x 10 ⁴ | |
| | C22 | <i>S. parasitica</i> | Ova TAI | 1,19 x 10 ⁴ | |
| Ensayo 8 Ovas Pejerrey | C08 | <i>S. parasitica</i> | Ova SS | 3,37 x 10 ³ | 15 ± 3,5 °C |
| | C11 | <i>S. ferax</i> | Ova SS | 3,37 x 10 ³ | |
| | C13 | <i>S. diclina</i> | Ova TAI | 3,37 x 10 ³ | |

TAI: trucha arcoíris; SS: salmón del Atlántico; PJP: pejerrey patagónico.

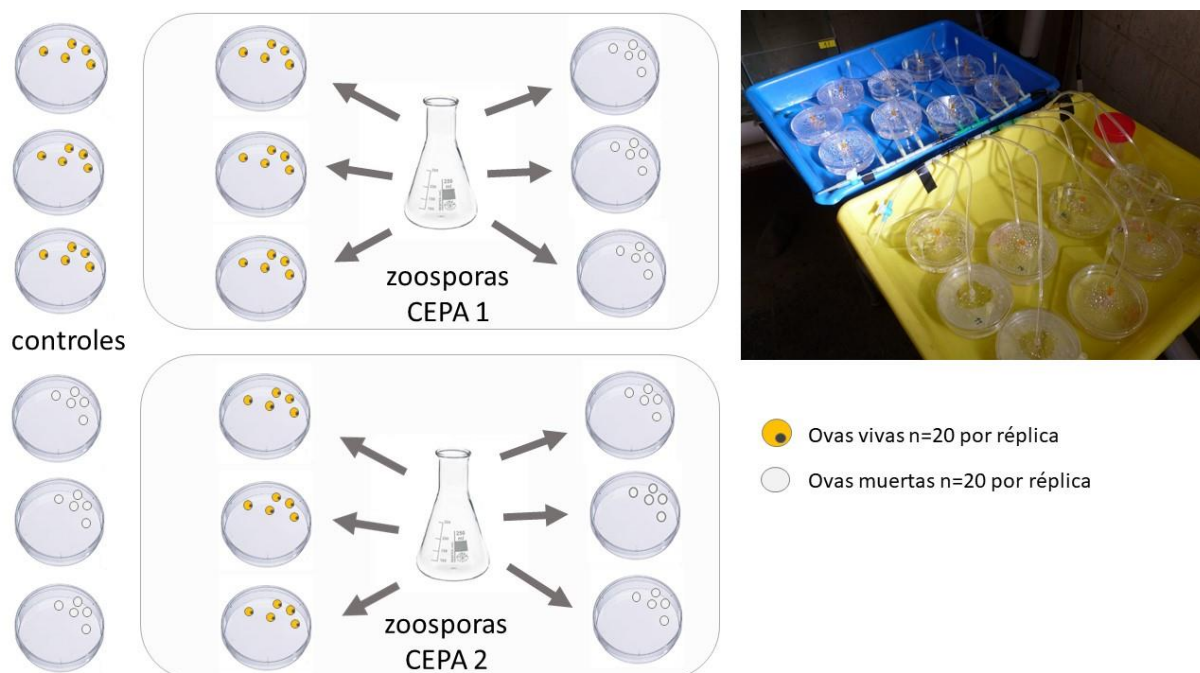


Figura 1. Esquema del sistema experimental utilizado para la evaluación de la patogenicidad de cepas de Oomycetes sobre ovas de truchas arcoíris y pejerrey patagónico. La exposición a las zoosporas se realizó sobre ovas vivas y ovas muertas. Se realizaron controles de ovas vivas y muertas, sin exposición a zoosporas. Las placas de incubación se mantuvieron con aireación constante.

Por cada ensayo se conservaron ovas muertas infectadas para la realización de preparaciones histológicas. En particular, para el ensayo N°6 se utilizó una cuarta réplica de ovas vivas expuestas a zoosporas con el fin de obtener muestras para el análisis histológico. Esta réplica fue mantenida en las mismas condiciones que el resto, pero se retiraron del sistema antes de la eclosión de los alevinos. Las ovas fueron fijadas en formol 10% y conservadas en alcohol 70° hasta el momento del procesamiento histológico. Las preparaciones histológicas se realizaron según los procedimientos mencionados en la metodología general.

4.1.2. Ensayos de coincubación

Con el fin de evaluar la incidencia de las ovas infectadas como inductoras de infecciones sobre ovas embrionadas con ojo se realizaron dos ensayos de coincubación con las cepas *S. glomerata* C02, *Saprolegnia* sp. C05, *S. parasitica* C08, *S. ferax* C11, *S. diclina* C13 y *Saprolegnia* sp. C25. Los ensayos se realizaron con ovas de trucha arcoíris, en los

sistemas de incubación de pequeña escala, durante el mes de agosto y la temperatura de trabajo fue de $7 \pm 2,5$ °C.

4.1.2.1. Ensayo de coincubación I

Para este ensayo se utilizaron las cepas *Saprolegnia sp.* C01, *S. glomerata* C02 y *Saprolegnia sp.* C05. Por cada cepa se realizó la infección de ovas muertas que sirvieron como inóculos. Los inóculos se prepararon mediante la exposición de ovas muertas y esterilizadas a zoosporas de cada una de las cepas, durante 48 h. Después de este tiempo, se observó el crecimiento de hifas sobre las ovas. Por cada cepa se realizaron 3 tratamientos ($T_{1,2,3}$). Se colocaron siete ovas en el interior de aros plásticos de 2,0 cm de diám. con la siguiente configuración: T_1 : 6 ovas vivas y una muerta en el centro, T_2 , 4 ovas vivas y 3 muertas, T_3 , 1 ova viva en el centro y 6 muertas en torno a la primera (figura 2). Los aros plásticos con las ovas se colocaron dentro de las placas de Petri adaptadas como incubadoras a pequeña escala. Seis ovas vivas con ojo fueron colocadas en cada placa, por fuera del aro plástico, sin contacto con las ovas infectadas, y fueron utilizadas como control. Cada tratamiento fue realizado por triplicado. El ensayo concluyó a los 7-10 días en el momento en que eclosionaron la totalidad de los alevinos viables. Al finalizar el ensayo se registró la mortalidad y se estimó la tasa de eclosión. Se conservaron muestras para la realización de cortes histológicos. Las preparaciones histológicas se realizaron según los procedimientos mencionados en la metodología general.



Figura 2. Esquema de tratamientos utilizado para las cepas *Saprolegnia sp.* C01, *S. glomerata* C02 y *Saprolegnia sp.* C05 en el ensayo de coincubación I. A) T_1 , 6 ovas embrionadas con ojo y 1 inóculo en el centro. B) T_2 , 4 ovas embrionadas con ojo y 3 inóculos. C) T_3 , 1 ova embrionada con ojo en el centro y 6 inóculos.

4.1.2.2. Ensayo de coincubación II

En este ensayo se utilizaron las cepas *S. parasitica* C08, *S. ferax* C11 y *S. diclina* C13 (tabla 2). Se dispusieron 70 ovas vivas de trucha arcoíris en estadio de ojo en recipientes de 100 mL de capacidad y 5 cm de diám. de base por triplicado por cada cepa a ensayar. Las ovas se colocaron en el fondo del recipiente y en el centro se ubicó una ova muerta, colonizada previamente por las diferentes cepas (de acuerdo a procedimientos mencionados en la metodología general), que actuó como inóculo. Se realizó un control negativo donde se colocó una ova muerta, estéril, sin infección previa en el centro. Los recipientes se mantuvieron con aireación constante durante todo el ensayo. Al cabo de 7 días se extrajo el inóculo con una pinza y con este, todas las ovas adheridas. El cúmulo de ovas se agitó luego de forma suave para lograr el desprendimiento de las ovas adheridas débilmente. Se contabilizaron las ovas muertas, las ovas fuertemente adheridas al inóculo (las que no se desprendieron luego de la suave agitación) y finalmente las ovas desprendidas durante la agitación (adheridas débilmente). Las ovas fueron fijadas en formol 10% y conservadas en alcohol 70°. Cuatro ovas por tratamiento se procesaron mediante técnicas histológicas convencionales (detallado en la metodología general), se realizaron dos cortes por ova que fueron coloreados con hematoxilina y eosina. Mediante el análisis histológico se evaluó la presencia o ausencia de hifas sobre la cubierta de las ovas.

Tabla 2. Cepas de Oomycetes utilizadas en los ensayos de coincubación con ovas de trucha arcoíris. Se indica el código de la cepa, identificación y sustrato de aislamiento.

| | Cepa | Identificación | Sustrato de aislamiento |
|----------------------|------|------------------------|-------------------------|
| Ensayo 10 | C01 | <i>Saprolegnia sp.</i> | Ova TAI |
| Coincubación I | C02 | <i>S. glomerata</i> | Materia orgánica |
| Ovas trucha arcoíris | C05 | <i>Saprolegnia sp.</i> | Ova TAI |
| Ensayo 11 | C08 | <i>S. parasitica</i> | Ova SS |
| Coincubación II | C11 | <i>S. ferax</i> | Ova SS |
| Ovas trucha arcoíris | C13 | <i>S. diclina</i> | Ova TAI |

TAI: trucha arcoíris; SS: salmón del Atlántico.

4.1.3. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media \pm error estándar. La distribución normal de los datos se evaluó con los tests de Kolmogorov-Smirnov y/o D'Agostino-Pearson mientras que la homogeneidad de la varianza se evaluó con el test de Brown-Forsythe. Se utilizó ANOVA de un factor seguido del test de Tukey, para identificar diferencias entre grupos. Para el análisis estadístico de los casos en que se comparan porcentajes, se utilizó la transformación de arcoseno de la raíz de la proporción. Las diferencias se consideraron significativas a $p \leq 0,05$.

4.2. Diseño experimental: infecciones sobre peces juveniles

4.2.1. Ensayos de patogenicidad sobre juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mikiss*)

Con el fin de evaluar la patogenicidad de las especies de Oomycetes, se realizaron infecciones experimentales sobre juveniles de trucha arcoíris. Se realizaron cuatro ensayos de infección experimental, donde se expuso a los peces a una concentración conocida de zoosporas de ocho cepas diferentes de Oomycetes aislados previamente en la piscicultura del CEAN (tabla 3).

Se utilizaron peces de 3 - 6 g, sin antecedentes ni signos de enfermedad, obtenidos de la piscicultura del CEAN. Se conformaron grupos de 15 individuos, que fueron dispuestos en acuarios de 10 L, con agua de perforación y aireación constante a temperatura ambiente. Los acuarios fueron lavados y desinfectados antes y después de los ensayos. Como inductor de la infección oomicótica se realizó un tratamiento abrasivo previo (TAP) que consistió en realizar un suave raspado con una hoja de bisturí sobre el lado izquierdo del pedúnculo caudal para lograr la extracción de mucus y células epidérmicas. Por cada ensayo, se realizaron tres réplicas de los siguientes tratamientos: T₁, con exposición a zoosporas en suspensión; T₂, con exposición a zoosporas en suspensión y TAP; T₃, grupo control sin exposición a zoosporas y T₄, sin exposición a zoosporas con TAP (figura 3). Los ensayos se realizaron durante los meses de julio, noviembre y diciembre, a temperatura ambiente y sin control del fotoperiodo. Al cuarto y

séptimo día se realizó un recambio parcial de agua de los acuarios. Los peces fueron observados diariamente y se registró la mortalidad y el número de peces infectados. Los individuos muertos o moribundos fueron retirados de los acuarios y considerados dentro de la mortalidad diaria. Se realizó la necropsia de los peces moribundos y se tomaron muestras de tejidos para el procesamiento histológico. Al cabo de 10 días después de la exposición a las zoosporas se midieron las tasas de infección y mortalidad. Para estos experimentos se consideraron las metodologías propuestas por Hatai y Hoshiai (1993), Pottinger y Day (1999), Hussein y Hatai (2002) y Gieseke *et al.* (2006).

Tabla 3. Cepas de Oomycetes utilizadas en los ensayos de infección experimental sobre juveniles de trucha arcoíris. Se indica el número de la cepa, identificación, sustrato de aislamiento, la concentración de zoosporas utilizada y la temperatura de trabajo para cada ensayo.

| | Cepa | Identificación | Sustrato de aislamiento | Zoosp mL⁻¹ | T° |
|----------|-------------|-----------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------|
| Ensayo 1 | C08 | <i>S. parasitica</i> | Ova SS | 2,11 x 10 ² | 6 ± 2°C |
| | C11 | <i>S. ferax</i> | Ova SS | 2,11 x 10 ² | |
| Ensayo 2 | C13 | <i>S. diclina</i> | Ova PEJ | 2,90 x 10 ² | 6,5 ± 2°C |
| Ensayo 3 | C20 | <i>S. ferax</i> | Pez Ova TAI | 2,08 x 10 ² | 16,5 ± 3,5°C |
| | C21 | <i>S. ferax</i> | Pez TAI | 2,08 x 10 ² | |
| | C23 | <i>L. lacteus</i> | Pez TAI | 2,08 x 10 ² | |
| Ensayo 4 | C22 | <i>S. parasitica</i> | Ova TAI | 2,73 x 10 ² | 15 ± 3°C |
| | C24 | <i>S. diclina</i> | Ova TAI | 2,73 x 10 ² | |

SS: Salmón del Atlántico; PEJ: pejerrey patagónico; TAI: trucha arcoíris

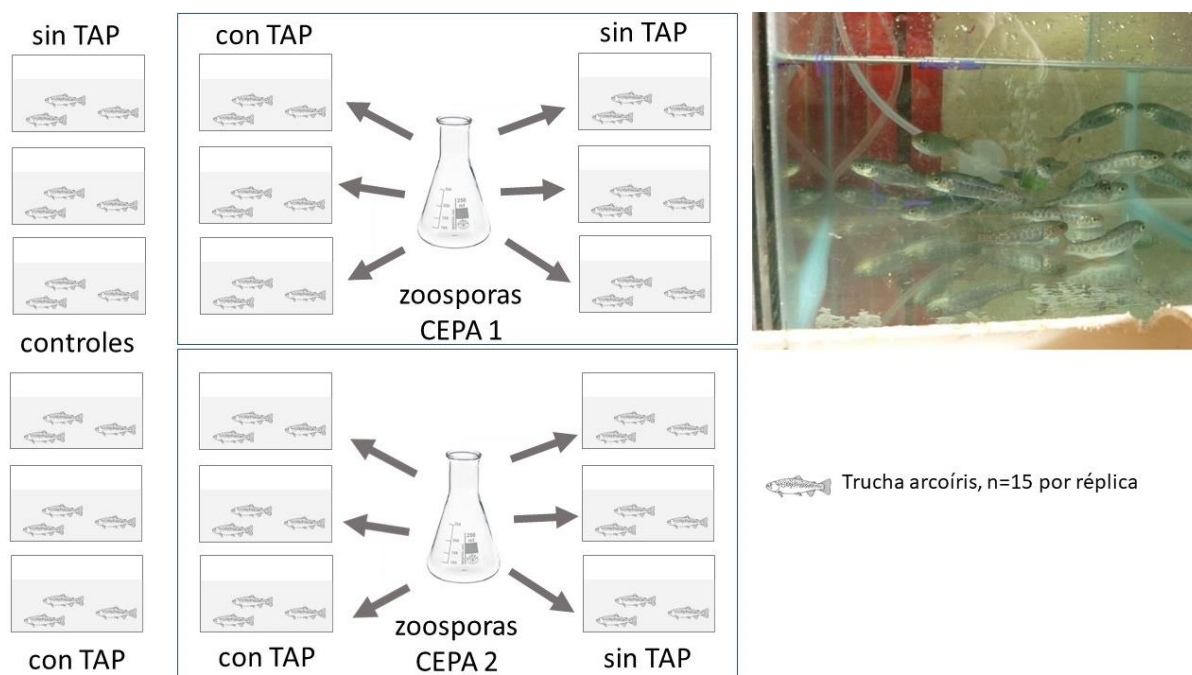


Figura 3. Esquema del sistema experimental para la evaluación de la patogenicidad de cepas de Oomycetes sobre juveniles de trucha arcoíris. La exposición a las zoosporas se realizó con y sin tratamiento abrasivo previo (TAP).

4.2.2. Procesamiento y análisis histológico

Los peces moribundos de cada ensayo fueron sacrificados mediante un golpe en la cabeza y sometidos a necropsia para la obtención de muestras de tegumento y musculatura de la zona de aplicación del tratamiento abrasivo. Al final del ensayo N° 1 se tomaron muestras de tres peces por tratamiento elegidos de manera aleatoria. De estos peces, se extrajeron muestras de bazo, hígado y riñón, además de las muestras de tegumento y musculatura. Las muestras de tejidos se fijaron y procesaron según lo descrito en la metodología general. Los preparados histológicos se observaron al microscopio a 10X, 20X, 40X y 100X y se registraron las alteraciones patológicas observadas. Para el ensayo N°1 se estimó, además, el porcentaje ocupado por los agregados de macrófagos (AM) y macrófagos pigmentados dispersos (MPD) en preparados histológicos de bazo, hígado y riñón. Se analizó un preparado de cada órgano por individuo. Por cada corte histológico, se tomaron tres fotografías digitales a 20X de magnificación sobre áreas no solapadas. Las fotografías se analizaron con el software Image J. Se determinó el porcentaje de ocupación por AM y MPD con respecto al área total

analizada. Los AM y MDP fueron considerados en conjunto con el objeto de restar complejidad al análisis. El área ocupada por los MPD es relativamente pequeña y su efecto puede considerarse insignificante sobre el área total pigmentada (Schwindt, 2006).

4.2.3. Ensayo de patogenicidad sobre larvas de pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*)

En lotes de larvas de pejerrey patagónico, de 13-15 días post-eclosión, criadas en el CEAN y alimentadas con un alimento formulado se observó una mortalidad elevada y la presencia de hifas sobre la superficie corporal de los individuos muertos y moribundos. En relación a esta problemática, se decidió realizar un ensayo para evaluar la patogenicidad de una cepa de *S. diclina* sobre larvas de pejerrey patagónico y considerar también a la dieta como un probable factor inductor de la infección oomicótica y la mortalidad. Debido a que no existen alimentos comerciales para esta especie, en la piscicultura del CEAN se utilizan alimentos de formulación propia en la cría del pejerrey patagónico. Para este ensayo, se utilizó la cepa *S. diclina* C13 (OOMAC340-18), identificada mediante análisis moleculares descriptos en el capítulo 1.

Se conformaron grupos de 15 individuos de $8,6 \pm 0,2$ mm (media \pm error estándar) (8 días post-eclosión) que fueron colocados en recipientes de vidrio con 0,5 L de agua de perforación con aireación constante. Los recipientes fueron lavados y desinfectados antes y después de los ensayos. Se realizaron 6 tratamientos con diferentes dietas (nauplios de *A. salina* y alimento artificial formulado) y exposición a $2,60 \times 10^2$ zoosporas mL⁻¹ de *S. diclina* C13. El alimento formulado estaba elaborado en base a la siguiente composición: harina de pescado 41,4%, músculo de pejerrey hidrolizado 10%, músculo de merluza hidrolizado 10%, levadura 5%, lecitina 10%, celulosa 2%, aceite de pescado + 0,5 vitamina E 10%, mix de vitaminas 1%, mix de minerales 4%, fosfato de sodio monobásico 1%, ácido ascórbico 0,1%, cloruro de sodio 0,5%, yogurth entero 5%. Los tratamientos fueron realizados por triplicado, con el siguiente esquema: T₁, artemia; T₂, artemia + alimento formulado; T₃, artemia y exposición a zoosporas; T₄, artemia + alimento formulado y exposición a zoosporas; T₅, alimento formulado; T₆, alimento formulado y

exposición a zoosporas. Se registró la mortalidad diaria y el número de peces infectados por día. Los peces muertos fueron retirados del acuario. Los peces moribundos también fueron retirados y considerados dentro de la mortalidad diaria. Los peces moribundos fueron fijados en formol buffer al 10% y conservados en etanol 70° para el posterior procesamiento histológico, según se detalla en la metodología general. Al cabo de 10 días después de la exposición a las zoosporas se midieron las tasas de infección y mortalidad. El ensayo se realizó en el mes de diciembre y la temperatura del agua durante el experimento fue de $15 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

4.2.4. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media \pm error estándar. La distribución normal de los datos se evaluó con los tests de Kolmogorov-Smirnov y/o D'Agostino-Pearson mientras que la homogeneidad de la varianza se evaluó con el test de Brown-Forsythe. Se utilizó ANOVA de un factor seguido del test de Tukey, para identificar diferencias entre grupos. Para el análisis estadístico de los casos en que se comparan porcentajes, se utilizó la transformación de arcoseno de la raíz de la proporción. Cuando los supuestos estadísticos no se cumplieron se optó por utilizar el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para la comparación entre grupos. En particular, para el ensayo de infección experimental sobre larvas de pejerrey patagónico se utilizó ANOVA de dos factores seguido del test de Tukey, con el objeto de determinar la interacción entre los factores "dieta" y "exposición a zoosporas". En todos los casos las diferencias se consideraron significativas a $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Ensayos de patogenicidad sobre ovas

5.1.1. Ovas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mikiss*)

5.1.1.1. Colonización sobre los grupos de ovas muertas

Todas las cepas ensayadas produjeron el 100% de colonización sobre los grupos de ovas muertas utilizados como control positivo. Las zoosporas lograron germinar y desarrollar hifas sobre el corion de las ovas (figura 4). Los grupos de ovas muertas utilizados como control negativo, sin exposición a la suspensión de zoosporas, no presentaron crecimiento oomicótico a lo largo de todo el ensayo (figura 5).

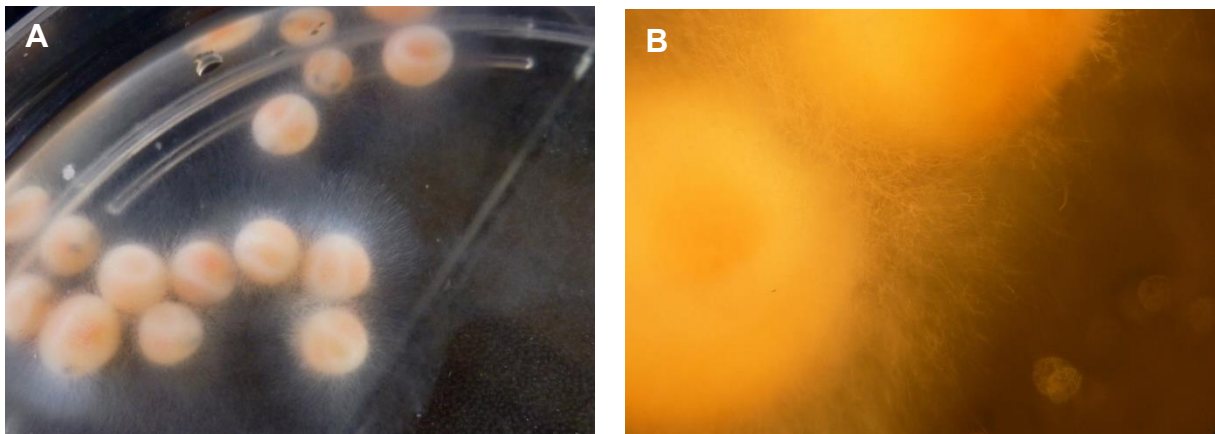


Figura 4. Imágenes representativas. Ovas muertas colonizadas por zoosporas de Oomycetes. Las ovas muertas se distinguen por su color blanquecino; se destacan la región cefálica que presenta los ojos de color oscuro, la zona de la columna y el vitelo color naranja pálido. En (A) se pueden observar las hifas que irradian a partir de todas las ovas. En (B) se observan dos ovas con un alto grado de infección y descomposición.

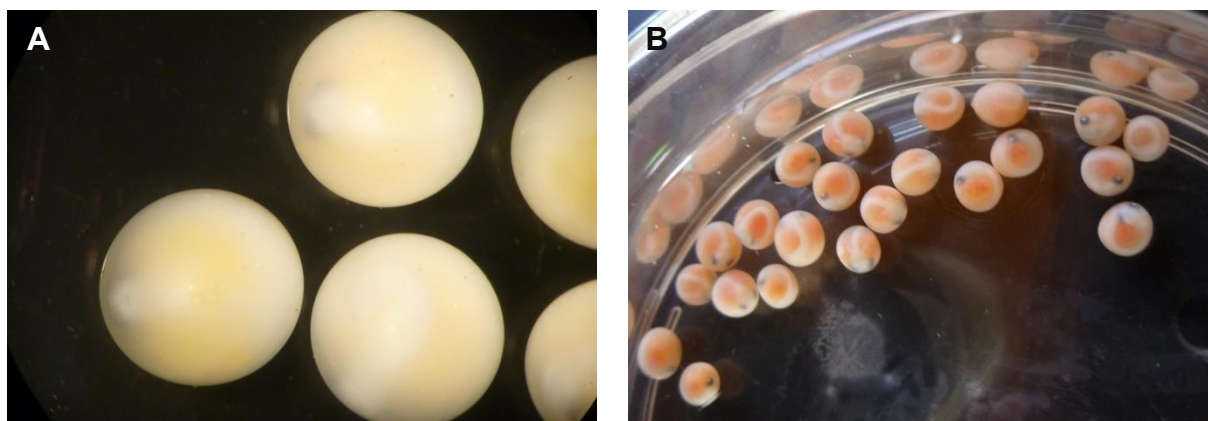


Figura 5. Grupos de ovas muertas utilizadas como control negativo. Estos grupos no fueron expuestos a zoosporas en suspensión y no se observó la germinación o crecimiento de Oomycetes a lo largo del ensayo.

5.1.1.2. Infección sobre los grupos de ovas vivas

Ninguna de las cepas estudiadas produjo una mortalidad significativa sobre los grupos de ovas vivas cuando estas fueron expuestas a las suspensiones de zoosporas (figuras 6 a 12). Las mortalidades variaron entre el 0 y el 21% en los grupos más afectados, sin embargo, en ningún caso fueron significativamente mayores que en los grupos utilizados como control. Todas las ovas muertas se observaron de color blanquecino y presentaron hifas que irradiaban hacia el exterior. Sobre el corion de las ovas vivas se observaron distintos grados de infección. Estas infecciones sólo se evidenciaron mediante la observación al microscopio invertido. En algunos casos se observó la germinación de esporas sobre el corion y el crecimiento de hifas simples y delgadas, mientras que, en otros, se observó un crecimiento más vigoroso (figura 13). Los ensayos fueron finalizados al momento de la eclosión de los alevinos. Los alevinos fueron observados con microscopio estereoscópico, y en ningún caso se observaron hifas o evidencia de oomicosis sobre la superficie corporal (figura 14).

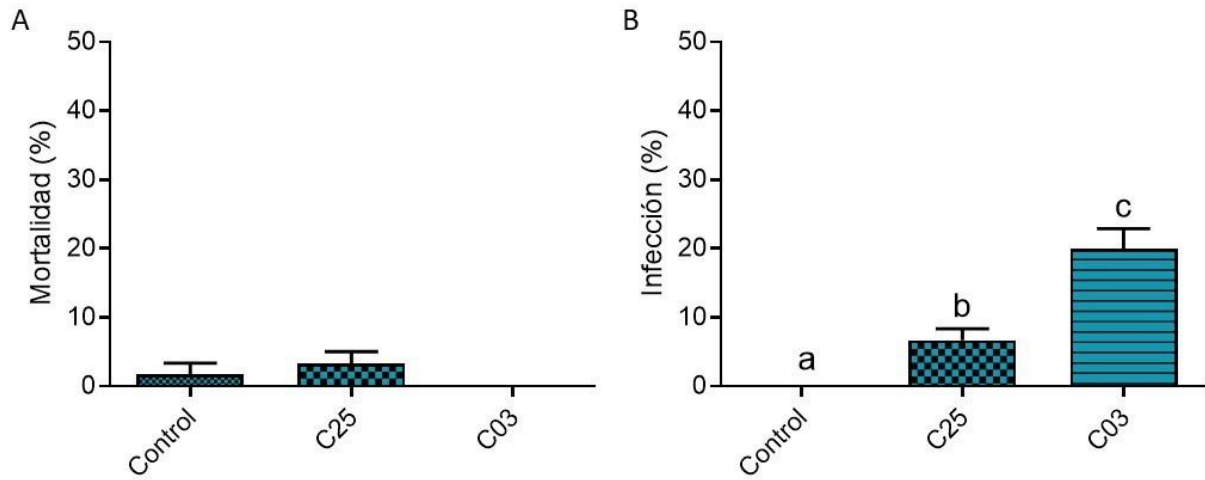


Figura 6. Ensayo 1. Tasas de mortalidad (A) e infección (B) en grupos de ovas de truchas arcoíris expuestas a $1,24 \times 10^3$ zoosporas mL^{-1} de *Saprolegnia sp.* C25 y *Saprolegnia parasitica* C03. Los valores están expresados como media \pm error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

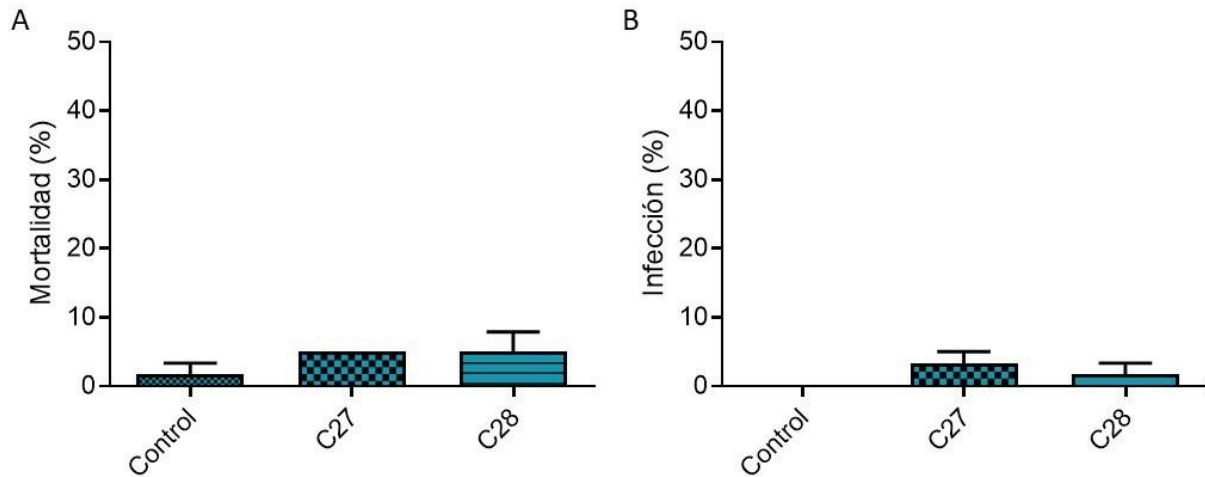


Figura 7. Ensayo 2. Tasas de mortalidad (A) e infección (B) en grupos de ovas de truchas arcoíris expuestas $1,89 \times 10^3$ zoosporas mL^{-1} de *L. lacteus* C27 y *Achlya sp.* C28. Los valores están expresados como media \pm error estándar.

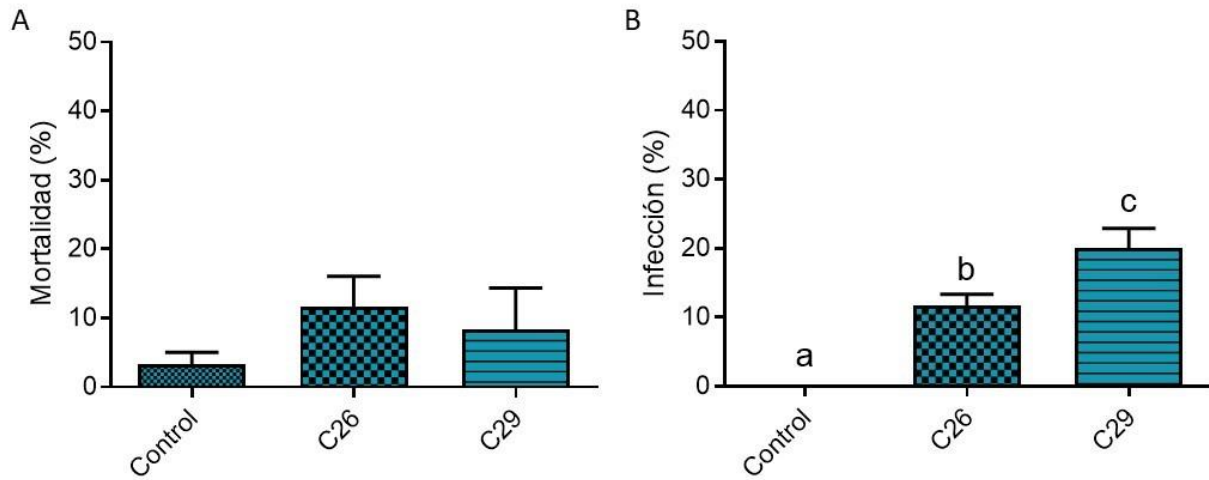


Figura 8. Ensayo 3. Tasas de mortalidad (A) e infección (B) en grupos de ovas de truchas arcoíris expuestas a $4,69 \times 10^3$ zoosporas mL^{-1} de *Saprolegnia sp.* C26 y *Saprolegnia sp.* C29. Los valores están expresados como media \pm error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

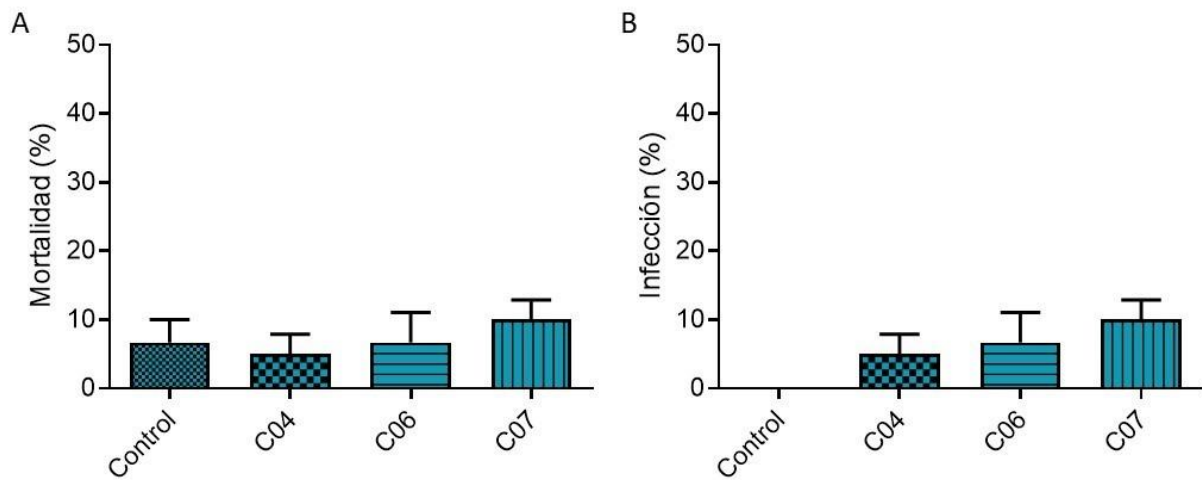


Figura 9. Ensayo 4. Tasas de mortalidad (A) e infección (B) en grupos de ovas de truchas arcoíris expuestas a $1,07 \times 10^3$ zoosporas mL^{-1} de *S. ferax* C04, *Saprolegnia sp.* C06 y *Saprolegnia sp.* C07. Los valores están expresados como media \pm error estándar.

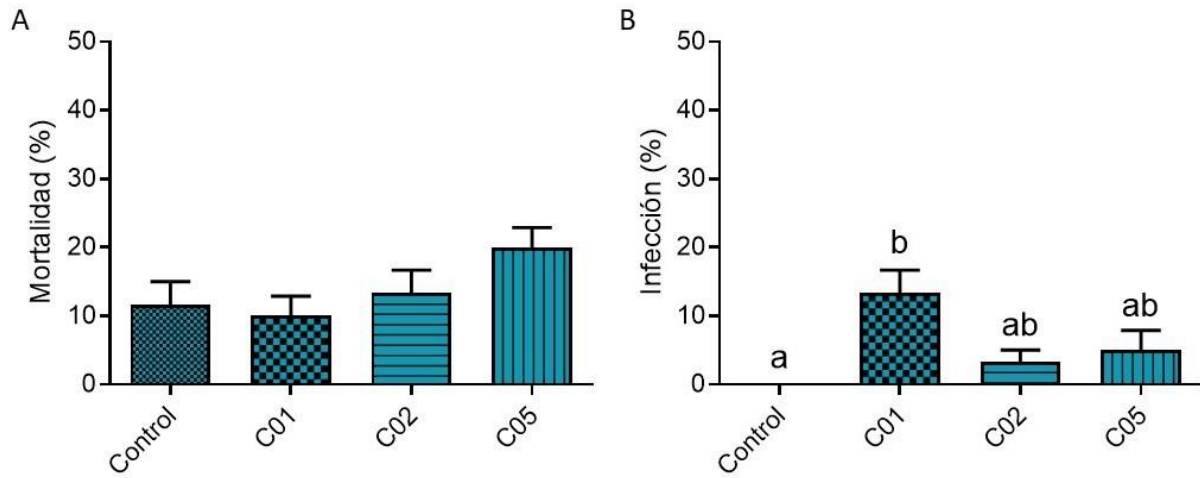


Figura 10. Ensayo 5. Tasas de mortalidad (A) e infección (B) en grupos de ovas de truchas arcoíris expuestas a $2,50 \times 10^3$ zoosporas mL^{-1} de *Saprolegnia* sp. C01, *S. glomerata* C02 y *Saprolegnia* sp. C05. Los valores están expresados como media \pm error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

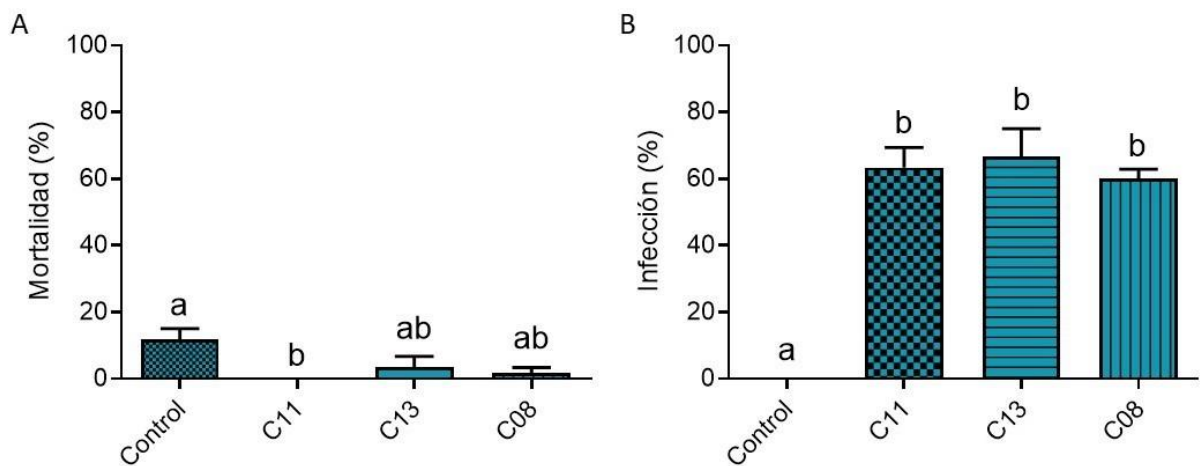


Figura 11. Ensayo 6. Tasas de mortalidad (A) e infección (B) en grupos de ovas de truchas arcoíris expuestas a $2,00 \times 10^3$ zoosporas mL^{-1} de *S. ferax* C11, *S. diclina* C13 y *S. parasitica* C08. Los valores están expresados como media \pm error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

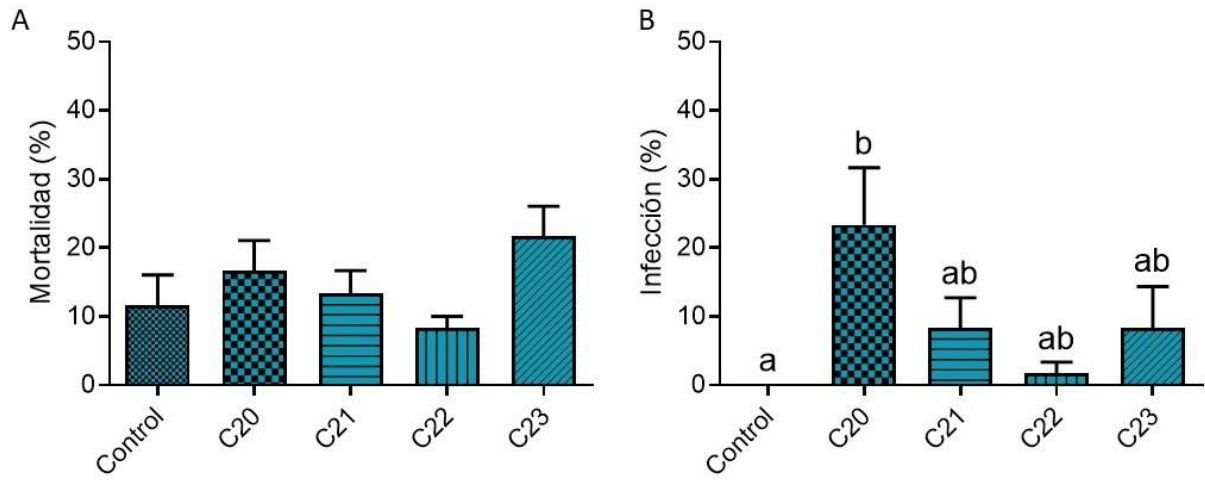
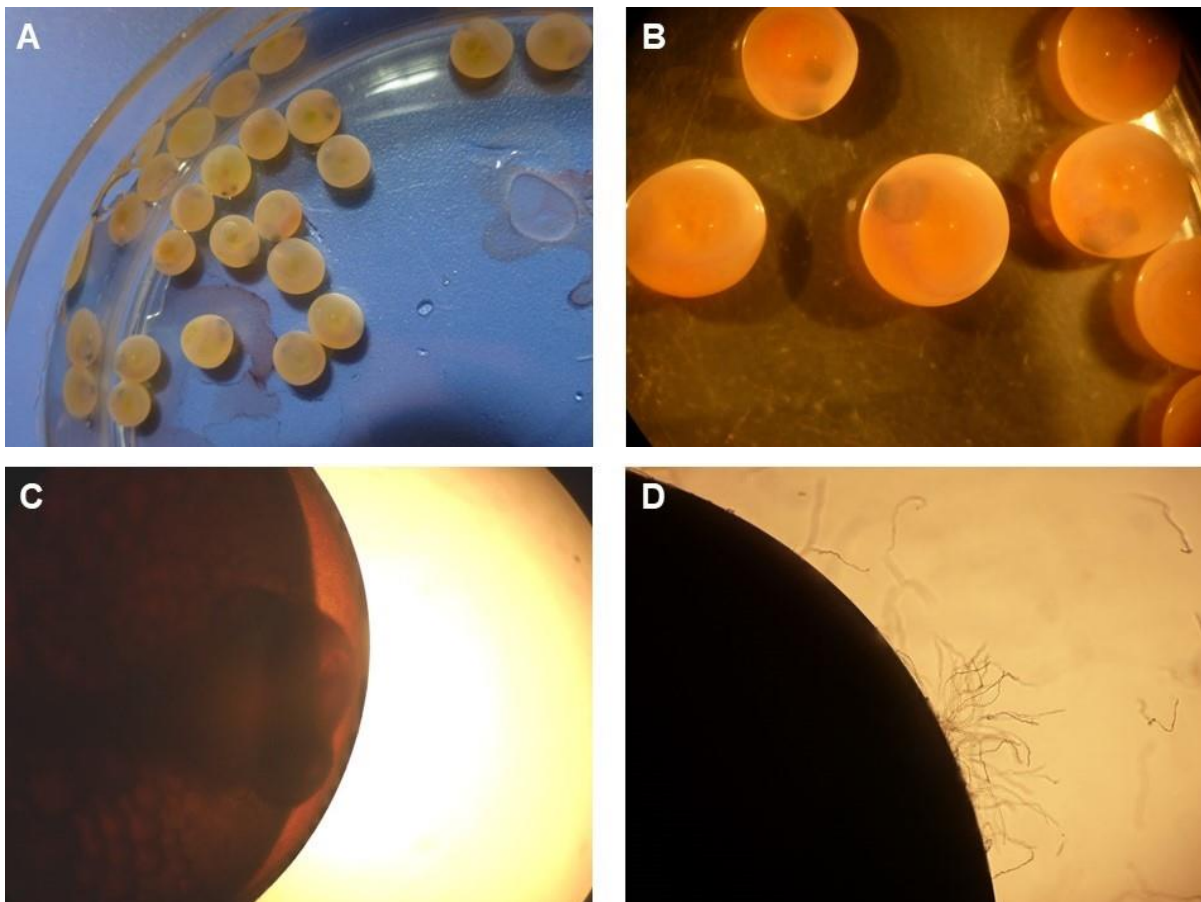


Figura 12. Ensayo 7. Tasas de mortalidad (A) e infección (B) en grupos de ovas de truchas arcoíris expuestas a $1,19 \times 10^4$ zoosporas mL^{-1} de *S. ferax* C20, *S. ferax* C21, *S. parasitica* C22 y *L. lacteus* C23. Los valores están expresados como media \pm error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).



Continúa en la pág. siguiente.

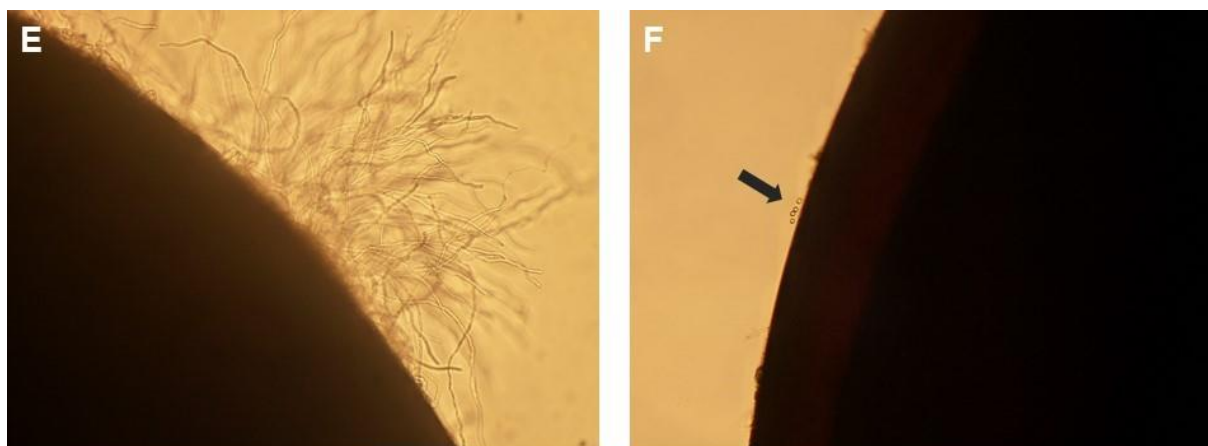


Figura 13. Ovas de trucha arcoíris expuestas a zoosporas de Oomycetes. En (A) y (B) se muestran grupos de ovas vivas expuestas a zoosporas en suspensión, sin crecimiento fúngico observable a nivel macroscópico. C) Ova viva sin evidencia de crecimiento fúngico. Se observa la región cefálica, el vitelo, espacio perivitelino y el corion. D) Ova viva, con hifas sobre el corion y esporas germinadas en las proximidades. E) Hifas sobre el corion de una ova viva. F) Esporas enquistadas, sin germinar, sobre una ova (flecha). A y B) imágenes tomadas en microscopio estereoscópico. C - F) Imágenes tomadas en microscopio invertido a 4X (C y D) y 10X (E y F).

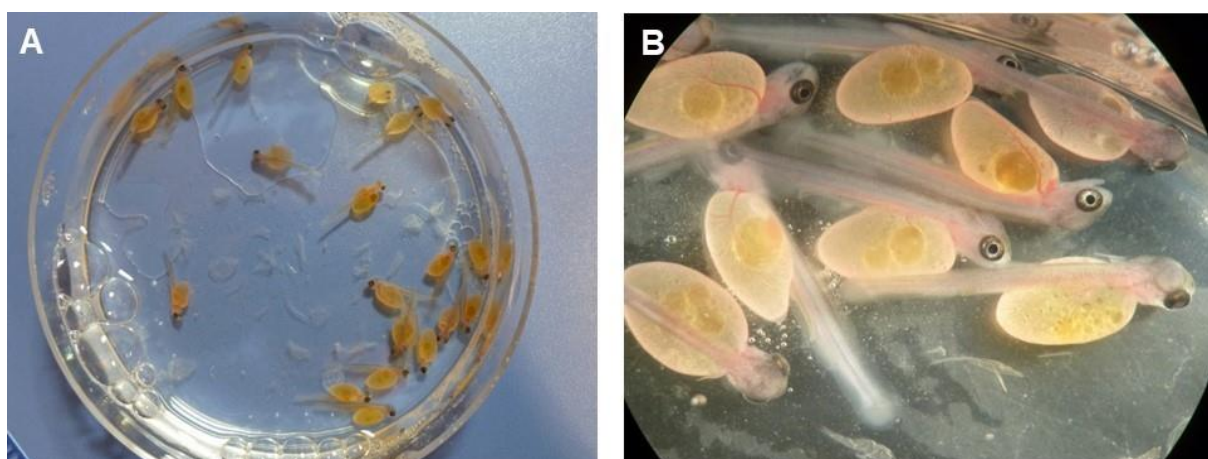


Figura 14. A) Eclosión de alevinos de trucha arcoíris al término de un ensayo de exposición a zoosporas de Oomycetes. B) Individuos a mayor aumento (microscopio estereoscópico) donde no se observan lesiones ni crecimiento oomicótico.

5.1.1.3. Análisis histológico

En el examen de los preparados histológicos se pudo observar la estructura de las ovas y las alteraciones producidas por las cepas de Oomycetes utilizadas en los ensayos. La estructura normal de las ovas se observó en cortes realizados a partir de ovas no expuestas a zoosporas (figura 15). Se observó una cubierta embrionaria (corion) constituida por una capa externa delgada de 0,2-0,3 μm y una capa interna más gruesa de

30,0-62,0 μm de espesor. La capa interna presentó porocanales dispuestos en forma radial que la atraviesan y da el aspecto estriado a aumentos mayores. Hacia el interior de la ova se distingue el espacio perivitelínico y, según el corte histológico puede observarse una capa rica en células, el blastodermo y el tejido embrionario. El vitelo se distingue en forma de gránulos o como una masa más o menos homogénea, eosinófila intensa con distinto grado de vacuolización. En ovas de los grupos expuestos a zoosporas y que murieron durante los ensayos, se observaron hifas, de paredes basófilas y diferentes grosores (5,0-35,0 μm), tanto en el exterior como en el interior (figura 16 A y B). Se observaron rupturas en el corion asociadas a la presencia de hifas y la colonización del espacio perivitelínico, el embrión y vitelo por parte de estas, las observaciones fueron similares independientemente de la cepa. Finalmente, en cortes histológicos de ovas infectadas con *S. parasitica* C08 que fueron fijadas mientras aún estaban vivas (ensayo 6), se observaron hifas delgadas (2,5-6,5 μm) en el exterior del corion, dispuestas sobre la capa externa. Sin embargo, no se observó la penetración o irrupción en el corion por parte de las hifas ni alteraciones en el tejido embrionario o espacio perivitelínico (figura 16 C y D).

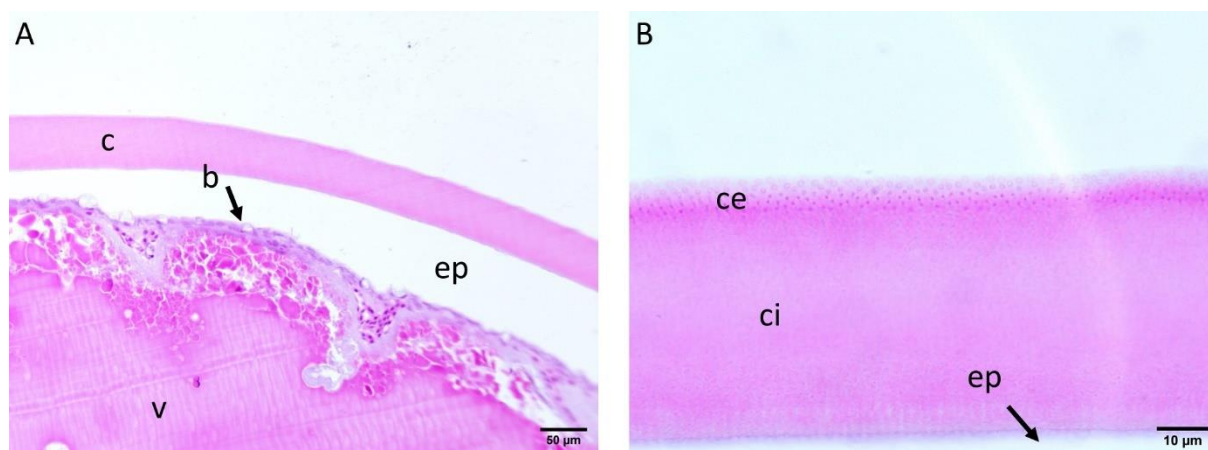


Figura 15. A) y B) Cortes histológicos de ovas de trucha arcoíris sin alteraciones. Se observan el corion (c) conformado por una capa externa (ce) y otra interna (ci), el espacio perivitelino (ep), el blastodermo celular (b) y el vitelo (v)

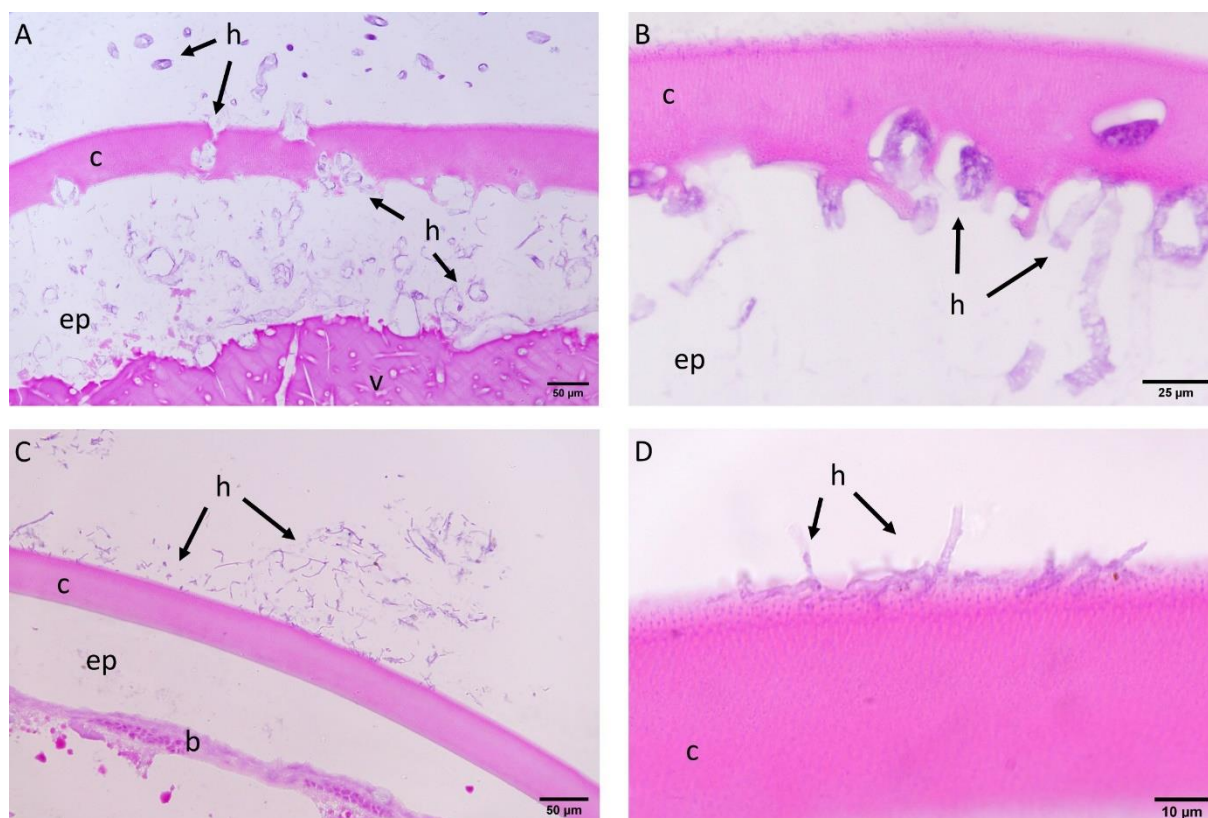


Figura 16. Cortes histológicos de ovas de trucha arcoíris, con crecimiento de micelio. A) y B) Ovas de los grupos expuestos a zoosporas y que murieron durante los ensayos. Se observan rupturas en el corion (c) asociadas a la presencia de hifas (h) y la colonización del espacio perivitelínico (ep) y vitelo (v). C) y D) Ovas infectadas con *S. parasitica* C08 fijadas vivas y con micelio externo. Se observan hifas (h) en el exterior del corion (c). Las hifas parecen apoyarse sobre el corion sin penetrar ni producir marcas en el mismo, a la vez que el espacio perivitelínico (ep) y el blastodermo (b) se mantienen sin alteraciones.

5.1.1.4. Ensayo de coincubación I

Las tres cepas estudiadas produjeron mortalidad en las ovas coincubadas con inóculos infectivos. A partir de los inóculos infectivos se observó el crecimiento de micelios que cubrieron total o parcialmente a las ovas vivas adyacentes. La decoloración de las ovas, pasando de anaranjado a un color blanquecino, fue un indicador del inicio de la mortalidad. El proceso concluyó con la coagulación del vitelo y eventual ruptura del corion. Cuando fueron coincubadas 6 ovas vivas con un inóculo la mortalidad varió entre 1,00 ($\pm 0,58$) ova para *Saprolegnia sp.* C01 a 2,33 ($\pm 0,33$) ovas para *Saprolegnia sp.* C05, las ovas sobrevivientes lograron eclosionar y no se observaron signos de infección en los alevinos. Para el tratamiento donde se coincubaron 4 ovas vivas con 3 inóculos, la mortalidad observada fue de 3,67 ovas para las cepas *S. glomerata* C02 y *Saprolegnia sp.* C05 y de 3,33 ovas para la *Saprolegnia sp.* C01. En este caso, la ova ubicada en el centro

(en estrecho contacto con tres inóculos) siempre resultó muerta. Le eclosión fue como máximo de 1 alevino por réplica. Finalmente, cuando se expuso una ova viva a 6 inóculos, las ovas de todos los tratamientos murieron y no lograron eclosionar (tabla 4). Las ovas que fueron incubadas en las placas, por fuera del aro plástico y que sirvieron como control, eclosionaron en su totalidad al final del ensayo (figura 17).

Tabla 4. Número de ovas muertas en los grupos de expuestos a inóculos infectivos de *Saprolegnia sp.* C01, *S. glomerata* C02 y *Saprolegnia sp.* C05. Los valores están expresados como media \pm error estándar.

| Cepa | Mortalidad | | |
|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 6 v + 1 m | 4 v + 3 m | 1 v + 6 m |
| <i>Saprolegnia sp.</i> C01 | 1,00 (\pm 0,58) | 3,33 (\pm 0,33) | 1,00 (\pm 0,00) |
| <i>S. glomerata</i> C02 | 2,33 (\pm 0,33) | 3,67 (\pm 0,33) | 1,00 (\pm 0,00) |
| <i>Saprolegnia sp.</i> C05 | 1,33 (\pm 0,67) | 3,67 (\pm 0,33) | 1,00 (\pm 0,00) |

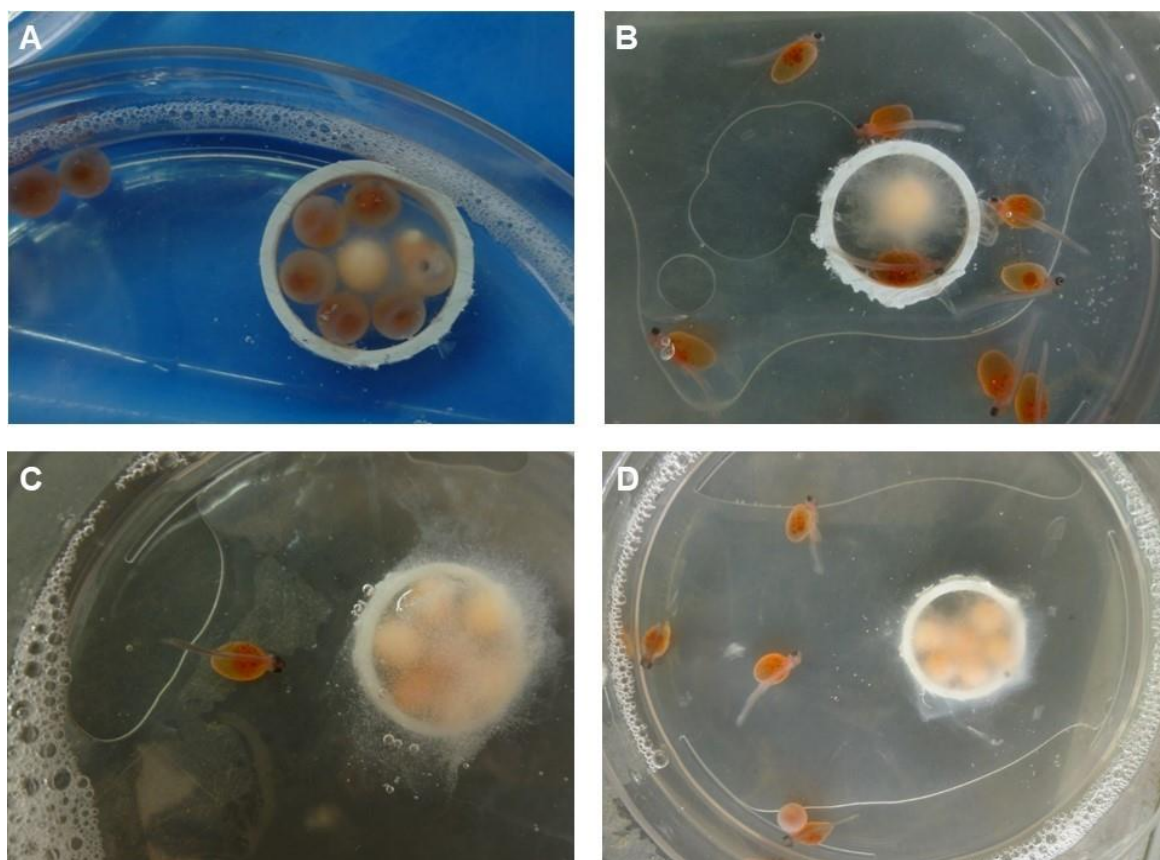


Figura 17. Imágenes representativas del ensayo de coincubación I. A) y B) Tratamiento 6v + 1m. Se observa en (A) una ova muerta mientras que en (B) se observa la eclosión de alevinos al final del ensayo. C) Tratamiento 1v + 6m. Las ovas vivas ubicadas en el centro siempre murieron y fueron colonizadas por hifas, el alevino que se observa fuera del aro plástico eclosionó a partir del grupo de ovas control. D) Tratamiento 4v + 3m. Se observa la eclosión de un alevino a partir de una ova en contacto con los inóculos infectivos y otros alevinos del grupo de ovas control.

5.1.1.5. Ensayo de coincubación II

Las hifas de *S. parasitica* C08, *S. ferax* C11 y *S. diclina* C13 crecieron a partir de los inóculos ubicados en el centro del frasco de incubación y se adhirieron a las ovas localizadas alrededor. Cuando se extrajeron los inóculos de los frascos se encontraban adheridas entre 8,33 y 9,67 ovas por tratamiento, la mayoría se desprendieron luego de una suave agitación. La adhesión observada luego de la agitación fue mayor para las cepas *S. parasitica* C08 y *S. diclina* C13 ($p < 0,01$) mientras que la mortalidad entre los tratamientos no fue significativa (tabla 5).

Tabla 5. Número de ovas muertas y adheridas en los grupos de ovas expuestas a un inóculo infectivo de *S. parasitica* C08, *S. ferax* C11 y *S. diclina* C13. Los valores están expresados como media \pm error estándar. Diferentes letras dentro de una misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).

| Cepa | Muertas | Adhesión | |
|--------------------------|--------------------|--------------------|----------------------------------|
| | | Leve | Fuerte |
| <i>S. parasitica</i> C08 | 0,67 (\pm 0,67) | 9,67 (\pm 1,45) | 2,67 (\pm 0,33) ^b |
| <i>S. ferax</i> C11 | 0,00 (\pm 0,00) | 8,33 (\pm 3,48) | 1,67 (\pm 0,67) ^{ab} |
| <i>S. diclina</i> C13 | 1,00 (\pm 0,58) | 9,00 (\pm 4,58) | 2,67 (\pm 0,33) ^b |
| Control | 0,00 (\pm 0,00) | 0,00 (\pm 0,00) | 0,00 (\pm 0,00) ^a |

5.1.1.6. Análisis histológico, ensayos de coincubación

El exámen de los preparados histológicos reveló la presencia de hifas externas al corion en al menos una de las muestras analizadas por cada tratamiento. Las hifas de *S. parasitica* C08 y *S. ferax* C11 se observaron en la capa externa del corion donde generaron depresiones, pero sin progresar profundamente en la capa interna (figura 18). En ningún caso se observaron hifas atravesando el corion ni invadiendo el espacio perivitelínico o las estructuras internas de las ovas (tabla 6).

Tabla 6. Observación de hifas de *S. parasitica* C08, *S. ferax* C11 y *S. diclina* C13 sobre las ovas analizadas del ensayo de coincubación II. Se expresa el número de ovas con hifas sobre el total de ovas analizadas.

| Cepa | Hifas externas | Hifas internas | Hifas en corion |
|--------------------------|----------------|----------------|-----------------|
| <i>S. parasitica</i> C08 | 2/5 | 0/5 | 2/5 |
| <i>S. ferax</i> C11 | 1/4 | 0/4 | 1/4 |
| <i>S. diclina</i> C13 | 1/4 | 0/4 | 0/4 |

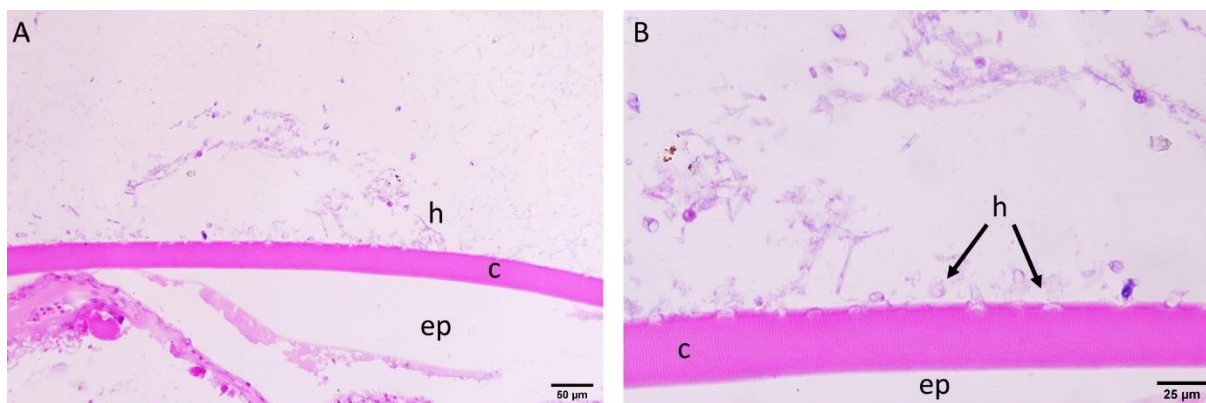


Figura 18. Ensayo de coincubación II. En (A) y (B) (a mayor aumento), se observan hifas (h) de *S. parasitica* C08 sobre la capa externa del corion (c), sin que lo atraviesen, ni invadiendo el espacio perivitelínico (ep). Las hifas generan pequeñas depresiones sobre la capa externa del corion.

5.1.2. Ovas de pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*)

Las mortalidades registradas en los grupos de ovas de pejerrey patagónico expuestos a *S. parasitica* C08, *S. ferax* C11 y *S. diclina* C13 no resultaron significativas con respecto al grupo control. Tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre los porcentajes de infección producidos por las cepas utilizadas en este ensayo (figura 19). Sobre los grupos de ovas muertas, utilizados como control positivo, se observó la germinación de las zoosporas y el 100% de infección sobre las ovas. Finalmente, los grupos de ovas muertas utilizados como control negativo, sin exposición a la suspensión de zoosporas, no presentaron crecimiento fúngico a lo largo de todo el ensayo.

A nivel histológico, se observó la presencia de hifas en el interior, en el corion y en la superficie externa de las ovas muertas infectadas. Internamente, las hifas se observaron invadiendo el tejido embrionario, el vitelo y el espacio perivitelínico, produciendo distintos grados de degradación de los tejidos (figura 20).

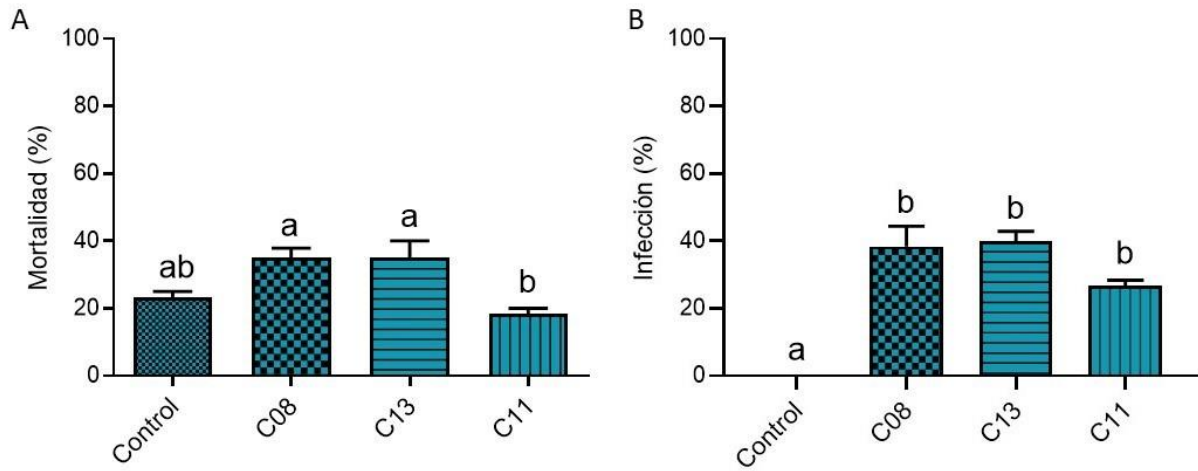


Figura 19. Tasas de mortalidad (A) e infección (B) en grupos de ovas pejerrey patagónico expuestas a $3,37 \times 10^3$ zoosporas mL^{-1} de *S. parasitica* C08, *S. ferax* C11 y *S. diclina* C13. Los valores están expresados como media \pm error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$ para mortalidad y $p < 0,001$ para infección).

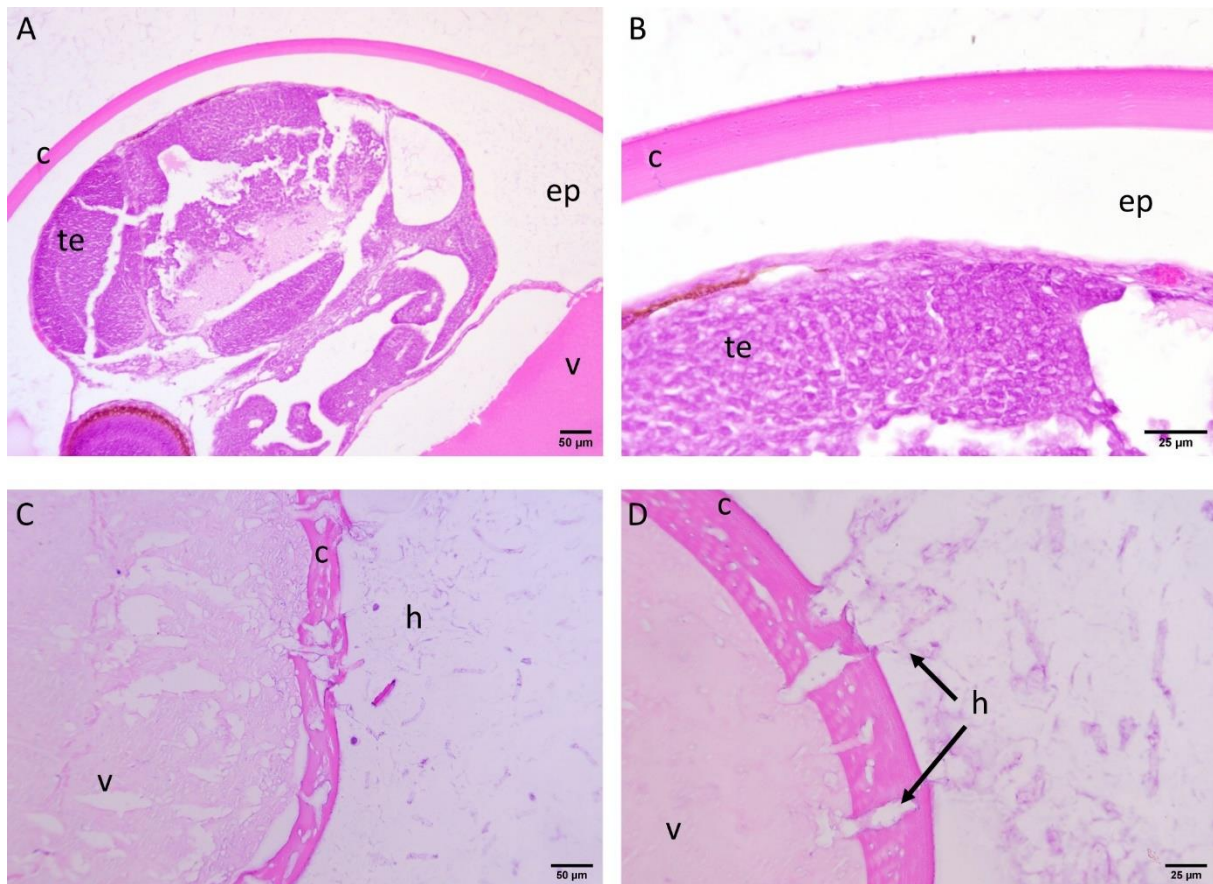


Figura 20. Cortes histológicos de ovas de pejerrey patagónico. A) y B) ovas no infectadas donde se pueden observar el corion (c), el espacio perivitelínico (ep), el tejido embrionario (te) y el vitelo (v). En (C) y (D) se observan hifas (h) en el interior y exterior de las ovas, que atraviesan y generan rupturas en el corion (c).

5.2. Ensayos de patogenicidad sobre peces juveniles

5.2.1. Ensayos sobre juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mikiss*)

5.2.1.1. Ensayo 1. Exposición a zoosporas de *S. parasitica* C08 y *S. ferax* C11

El grupo de peces expuesto a zoosporas de *S. parasitica* C08 con aplicación del tratamiento abrasivo previo (TAP) registró las tasas de mortalidad e infección más elevadas (tabla 7). Mientras que la mortalidad no fue estadísticamente significativa, la tasa de infección fue significativamente mayor con respecto a lo observado en el grupo expuesto a zoosporas de *S. ferax* C11 y el grupo control ($p < 0,05$) (figura 21).

La mortalidad en el grupo de peces expuesto a zoosporas de *S. parasitica* C08 con aplicación del TAP comenzó el día 1 post infección y continuó hasta el día 5. Se retiraron de los acuarios 4 peces moribundos que fueron observados letárgicos o con pérdida del equilibrio y natación errática. Dichos peces fueron sacrificados y en la necropsia se observó que presentaban un crecimiento de micelio en la zona del pedúnculo caudal, en la zona de aplicación del tratamiento de abrasión, y una marcada erosión de la aleta caudal (figura 22). A partir del día 5 no hubo incrementos en la mortalidad de este grupo.

Los peces de los grupos sin TAP y expuestos a zoosporas, mantuvieron un comportamiento normal durante el ensayo y no presentaron signos de infección oomicótica, ni mortalidad.

Tabla 7. Porcentajes de mortalidad e infección en grupos de peces expuestos a $2,11 \times 10^2$ zoosporas mL^{-1} de *S. parasitica* C08 y *S. ferax* C11. Las exposiciones se realizaron con y sin tratamiento abrasivo previo (TAP). Los valores están expresados como media \pm error estándar. Diferentes letras dentro de una columna indican diferencias significativas entre tratamientos (Test de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$).

| Tratamiento | Con TAP | | Sin TAP | |
|--------------------------|---------------------|----------------------------------|--------------------|-------------|
| | % mortalidad | % infección | % mortalidad | % infección |
| <i>S. parasitica</i> C08 | 8,89 ($\pm 5,88$) | 8,89 ($\pm 2,22$) ^b | 0,0 | 0,0 |
| <i>S. ferax</i> C11 | 0,0 | 0,0 ^a | 0,0 | 0,0 |
| Control | 2,22($\pm 2,22$) | 0,0 ^a | 2,22($\pm 2,22$) | 0,0 |

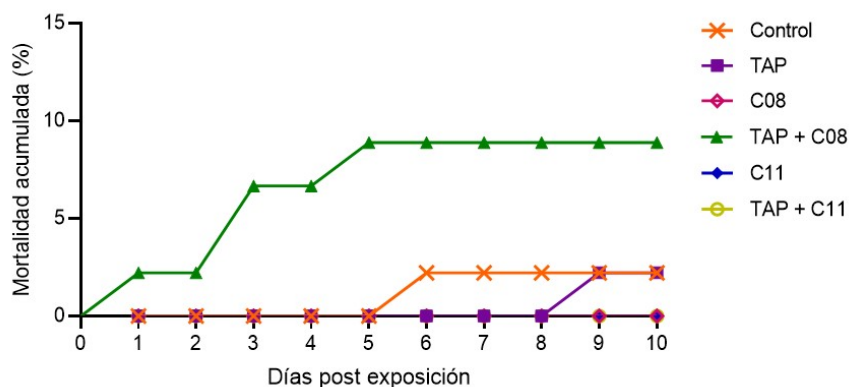


Figura 21. Ensayo 1. Mortalidad acumulada en grupos de truchas arcoíris expuestas a $2,11 \times 10^2$ zoosporas mL^{-1} de *S. parasitica* C08 y *S. ferax* C11. Las exposiciones se realizaron con y sin tratamiento abrasivo previo (TAP). Los valores son el promedio de las tres réplicas.

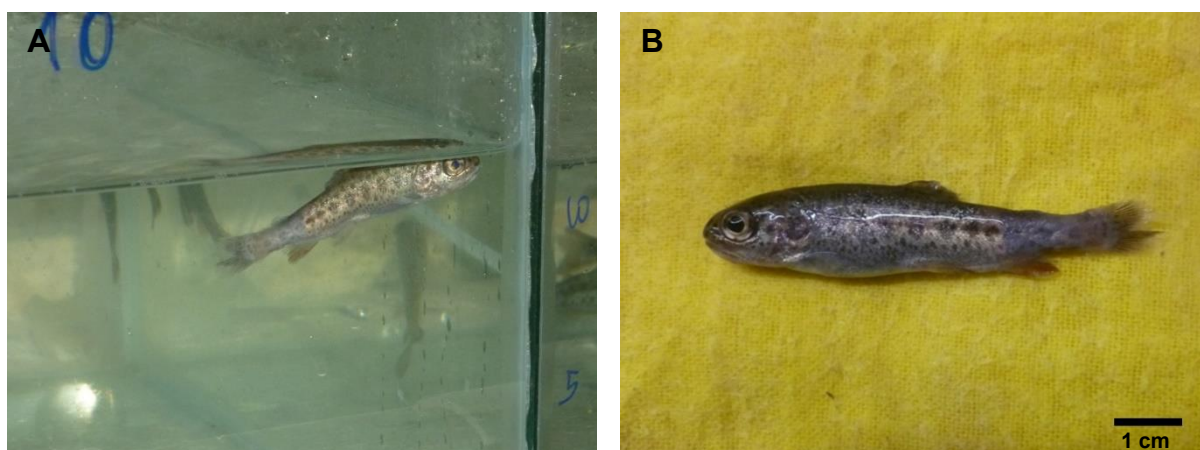


Figura 22. Ensayo 1. Trucha arcoíris moribunda expuesta a $2,11 \times 10^2$ zoosporas mL^{-1} de *S. parasitica* C08 con tratamiento abrasivo previo (TAP). Se observa en (A) un individuo moribundo con infección en el pedúnculo caudal. En (B) se puede observar erosión de la aleta caudal y micelio color grisáceo en la zona del pedúnculo caudal.

5.2.1.2. Ensayo 2. Exposición a zoosporas de *Saprolegnia diclina* C13

En este ensayo fue evaluada la patogenicidad de la cepa *S. diclina* C13. Las tasas de mortalidad e infección del grupo de peces con TAP y expuestos a *S. diclina* C13 fueron significativamente mayores que las del grupo control ($p < 0,05$) (figura 23). La mortalidad se inició el día 6 y sumó en total unos 4 individuos. Los 4 individuos presentaron signos de infección oomicótica, 2 peces fueron retirados y sacrificados cuando se los observó moribundos mientras que otros 2 fueron retirados muertos del acuario (figura 24). Los

peces sin TAP y expuestos a zoosporas no presentaron mortalidad ni infección oomicótica y mantuvieron un comportamiento normal durante el ensayo (tabla 8).

Tabla 8. Porcentajes de mortalidad e infección en grupos de peces expuestas a $2,08 \times 10^2$ zoosporas mL^{-1} de *S. diclina* C13. Las exposiciones se realizaron con y sin tratamiento abrasivo previo (TAP). Los valores están expresados como media \pm error estándar. Diferentes letras dentro de una columna indican diferencias significativas entre tratamientos (Test de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$).

| Tratamiento | Con TAP | | Sin TAP | |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------|-------------|
| | % mortalidad | % infección | % mortalidad | % infección |
| <i>S. diclina</i> C13 | 11,11 ($\pm 4,44$) ^b | 11,11 ($\pm 4,44$) ^b | 0,0 | 0,0 |
| Control | 0,0 ^a | 0,0 ^a | 0,0 | 0,0 |

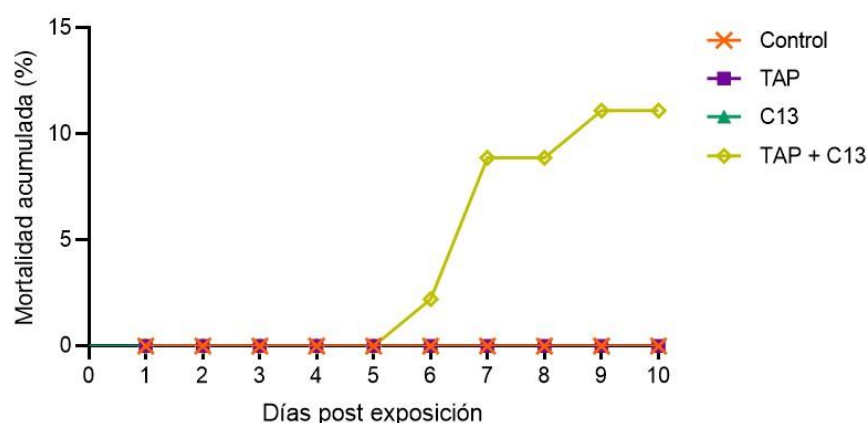


Figura 23. Ensayo 2. Mortalidad acumulada en grupos de truchas arcoíris expuestas a $2,08 \times 10^2$ zoosporas mL^{-1} de *Saprolegnia diclina* C13. Las exposiciones se realizaron con y sin tratamiento abrasivo previo (TAP). Los valores son los promedios de las tres réplicas.



Figura 24. Ensayo 2. Trucha arcoíris expuesta a zoosporas de *S. diclina* C13 con tratamiento abrasivo previo (TAP). Se observa erosión de la aleta caudal y la presencia de micelio en la zona del pedúnculo caudal.

5.2.1.3. Ensayo 3. Exposición a zoosporas de *Saprolegnia ferax* C20, *S. ferax* C21 y *Leptomitius lacteus* C23

En este ensayo fue evaluada la patogenicidad de las cepas *S. ferax* C20, *S. ferax* C21 y *L. lacteus* C23. El grupo de peces expuesto a *S. ferax* C20 con TAP tuvo las tasas de mortalidad e infección más elevadas (tabla 9; figura 25) ($p < 0,05$). Todos los peces moribundos o muertos mostraron signos de oomicosis (figura 26). Los grupos de peces con TAP y expuestos a *S. ferax* C21 y *L. lacteus* C23 no tuvieron mortalidad o una tasa de infección diferente al grupo control. Finalmente, los peces de los grupos sin TAP y expuestos a zoosporas de diferentes cepas de Oomycetes, mantuvieron un comportamiento normal durante el ensayo y no presentaron signos de infección oomicótica ni mortalidad.

Tabla 9. Porcentajes de mortalidad e infección en grupos de peces expuestas mediante inmersión a $2,9 \times 10^2$ zoosporas mL^{-1} de *S. ferax* C20, *S. ferax* C21 y *L. lacteus* C23. Las exposiciones se realizaron con y sin tratamiento abrasivo previo (TAP). Los valores están expresados como media \pm error estándar. Diferentes letras dentro de una columna indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de un factor; $p < 0,05$).

| Tratamiento | Con TAP | | Sin TAP | |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------|-------------|
| | % mortalidad | % infección | % mortalidad | % infección |
| <i>S. ferax</i> C20 | 22,22($\pm 5,88$) ^b | 17,78 ($\pm 2,22$) ^b | 0,0 | 0,0 |
| <i>S. ferax</i> C21 | 4,33($\pm 4,33$) ^a | 4,33 ($\pm 4,33$) ^a | 0,0 | 0,0 |
| <i>L. lacteus</i> C23 | 6,67($\pm 3,85$) ^{ab} | 6,67 ($\pm 3,85$) ^{ab} | 0,0 | 0,0 |
| Control | 0,0 ^a | 0,0 ^a | 0,0 | 0,0 |

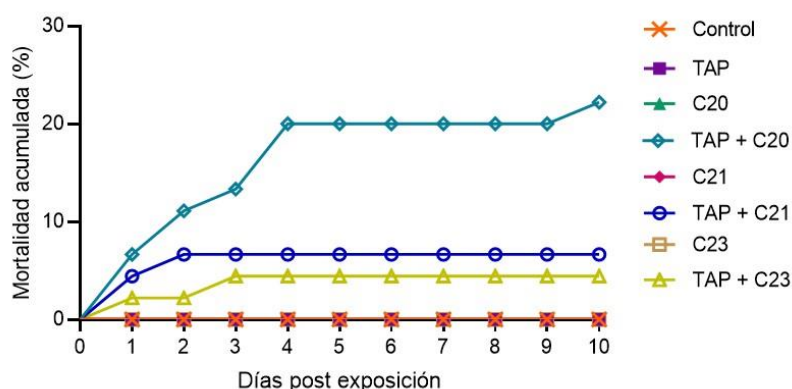


Figura 25. Ensayo 3. Mortalidad acumulada en grupos de truchas arcoíris expuestas mediante inmersión a $2,9 \times 10^2$ zoosporas mL^{-1} de *S. ferax* C20, *S. ferax* C21 y *L. lacteus* C23. Las exposiciones se realizaron con y sin tratamiento abrasivo previo (TAP). Los valores son los promedios de las tres réplicas.



Figura 26. Ensayo 3. Trucha arcoíris expuesta a zoosporas de *S. ferax* C20 con TAP. Se observa la presencia de micelio en la zona del pedúnculo caudal. Barra de escala: 1 cm.

5.2.1.4. Ensayo 4. *Saprolegnia parasitica* C22 y *Saprolegnia diclina* C24

En este ensayo, la exposición a zoosporas de *S. parasitica* C22 y *S. diclina* C24 con TAP produjeron una mortalidad significativa (tabla 10; figura 27) con respecto al grupo no expuesto a zoosporas (grupo control) ($p < 0,05$) y en ambos grupos se observó infección oomicótica sobre los peces (figura 28). La mortalidad comenzó el día 4 post infección en ambos tratamientos y a partir del día 8 se mantuvo sin incrementos. El porcentaje de infección no fue significativamente diferente entre los 2 grupos con TAP y expuestos a zoosporas. En este ensayo no fueron sacrificados peces moribundos, todos los peces fueron retirados muertos de los acuarios. Por lo tanto, no se tomaron muestras para el análisis histológico. Finalmente, los peces de los grupos sin TAP y expuestos a zoosporas de ambas cepas mantuvieron un comportamiento normal durante el ensayo y no presentaron signos de oomicosis.

Tabla 10. Porcentajes de mortalidad e infección en grupos de peces expuestos mediante inmersión a $2,73 \times 10^2$ zoosporas mL^{-1} de *S. parasitica* C22 y *S. diclina* C24. Las exposiciones se realizaron con y sin tratamiento abrasivo previo (TAP). Los valores están expresados como media \pm error estándar. Diferentes letras dentro de una columna indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía, $p < 0,05$).

| Tratamiento | Con TAP | | Sin TAP | |
|--------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------|-------------|
| | % mortalidad | % infección | % mortalidad | % infección |
| <i>S. parasitica</i> C22 | 13,33($\pm 6,67$) ^b | 4,44 ($\pm 4,44$) ^{ab} | 0,0 | 0,0 |
| <i>S. diclina</i> C24 | 8,89($\pm 2,22$) ^b | 13,33 ($\pm 6,67$) ^b | 0,0 | 0,0 |
| Control | 0,0 ^a | 0,0 ^a | 0,0 | 0,0 |

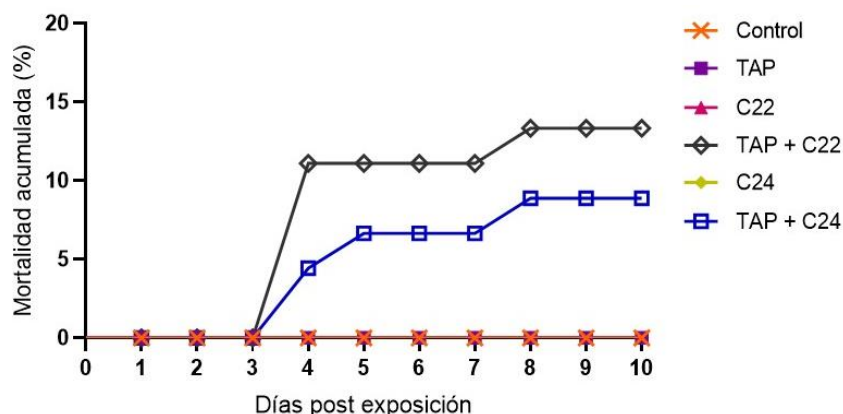


Figura 27. Ensayo 4. Mortalidad acumulada en grupos de truchas arcoíris expuestas a $2,73 \times 10^2$ zoosporas mL^{-1} de *S. parasitica* C22 y *S. diclina* C24. Las exposiciones se realizaron con y sin tratamiento abrasivo previo (TAP). Los valores son los promedios de las tres réplicas.



Figura 28. Ensayo 4. Juveniles de trucha arcoíris expuestas a zoosporas de *S. parasitica* C22 con tratamiento abrasivo previo. Se observa la presencia de micelio en la zona del pedúnculo caudal. Barra de escala: 1cm.

5.2.1.5. Análisis histológico

5.2.1.5.1. Ensayo 1

a) Individuos del muestreo realizado al finalizar el ensayo

Los preparados histológicos de tegumento y musculatura de los peces del grupo control, sin tratamiento abrasivo previo (TAP) ni exposición a zoosporas, presentaron una apariencia normal, y no se observaron alteraciones histopatológicas. Estas muestras se tomaron como referencia en la comparación con observaciones realizadas en el resto de los grupos. Se observó un tegumento íntegro y se distinguieron las capas que lo constituyen: epidermis, dermis e hipodermis (figura 29). La epidermis se observó como un epitelio estratificado, conformado principalmente por células epiteliales denominadas queratinocitos que se van haciendo aplanadas hacia la superficie externa y, en menor número, células mucosas (sin colorear con HyE y coloreadas con un tono rosado con la

tinción de PAS). Por debajo de la epidermis se encuentra la dermis, ésta capa se halla compuesta por dos estratos, el estrato esponjoso y el estrato compacto. El estrato esponjoso se halla compuesto por tejido conectivo laxo en donde se observan fibras de colágeno delgadas (coloreadas de un tono azulado con Tricrómico de Masson, TM), melanóforos y bolsillos dérmicos que contienen a las escamas. El estrato compacto de la dermis, se halla compuesto por un tejido conectivo denso, con fibras de colágeno más gruesas dispuestas de forma paralela (evidenciadas con TM). Por debajo de esta capa se observó la hipodermis, vascularizada y de naturaleza adiposa y la capa muscular subyacente donde se encontraron paquetes de músculo blanco, rojo, epiaxial o hipoaxial según el corte.

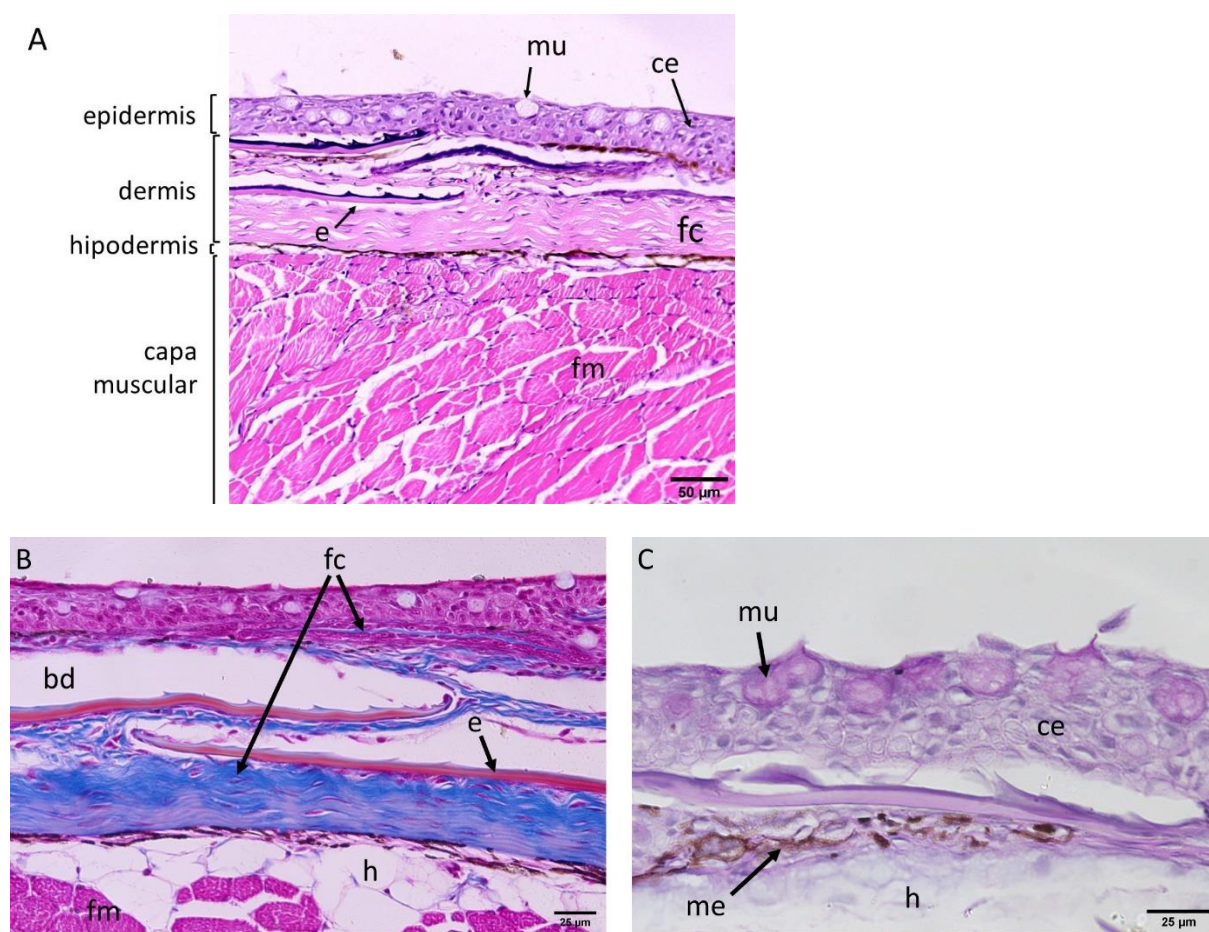


Figura 29. Ensayo 1. Grupo Control. Apariencia normal del tegumento y músculo en juveniles de trucha arcoíris. (mu) células mucosas, (ce) células epiteliales, (fm) fibras musculares, (e) escama, (bd) bolsillos dérmicos, (fc) fibras de colágeno, (h) hipodermis, (me) melanóforos. A) tinción HyE, B) tinción TM, C) tinción PAS.

Al final del experimento, los individuos de los grupos expuestos a zoosporas de C08 y C11, sin TAP, presentaron el tegumento y la musculatura subcutánea sin alteraciones evidentes. No se observaron hifas establecidas en el tegumento ni en la musculatura ni evidencia de infección o respuesta inflamatoria. Los peces de los grupos con TAP y expuestos a zoosporas de *S. parasitica* C08 y *S. ferax* C11 también presentaron el tegumento y la musculatura subcutánea sin alteraciones evidentes, con excepción de la ausencia de escamas en algunos sectores (probablemente por causa del tratamiento abrasivo). No se observó la presencia de hifas ni signos de infección.

b) Peces moribundos con signos de infección (Grupo *S. parasitica* C08 con TAP)

Los individuos moribundos del grupo de peces expuestos a zoosporas de *S. parasitica* C08 con TAP mostraron varias alteraciones histopatológicas (figura 30). Se distinguieron diferentes grados de destrucción y pérdida de la capa epidérmica y del estrato esponjoso de la dermis, en todos los casos, asociado a la invasión de las hifas. En la capa dérmica se observó, además, el desprendimiento o ausencia de escamas y la desorganización y degeneración de las fibras de colágeno del estrato compacto. A nivel de la capa hipodérmica se distinguieron zonas con edema y presencia de hifas. En general, las hifas se observaron invadiendo los restos de la dermis, atravesando el estrato compacto e hipodermis y establecidas también en la musculatura subcutánea y en fibras más profundas. En la musculatura se observó un cuadro de miositis, caracterizado por infiltración de células inflamatorias asociadas a lesiones degenerativas y necróticas de las fibras musculares. En algunos cortes, además, se observó infiltrado inflamatorio en áreas de hipodermis y musculatura (figura 31). Las hifas se tiñeron de un color oscuro intenso con la tinción de Grocott contrastada con verde luz mientras que tomaron una coloración azul violáceo en cortes coloreados con hematoxilina y eosina.

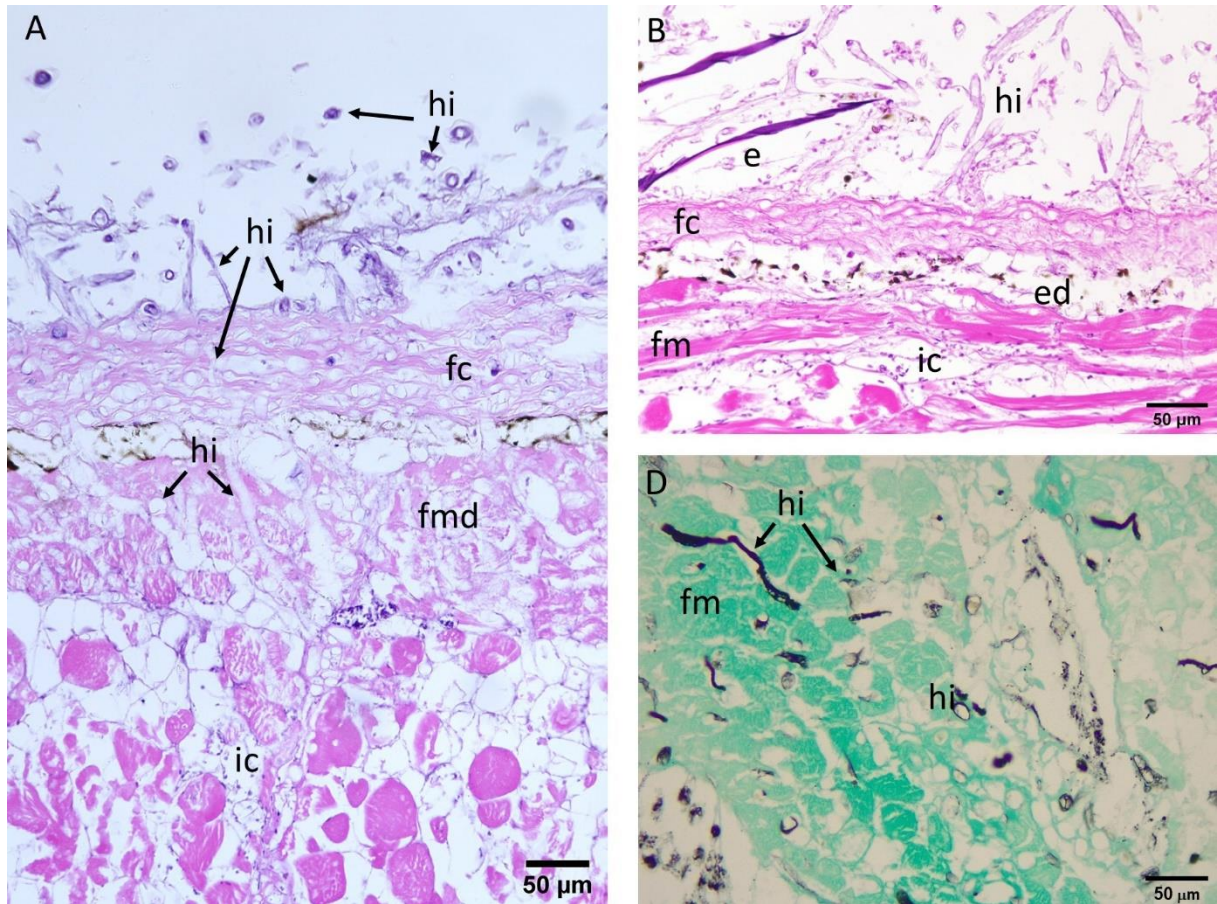


Figura 30. Ensayo 1. Cortes histológicos de peces expuestos a *S. parasitica* C08 con TAP. Puede notarse la presencia de hifas y profundas alteraciones en el tegumento y la capa muscular. Entre ellas, la ausencia de capa epidérmica, ruptura de la capa esponjosa de la dermis, la degeneración de fibras musculares e infiltración celular. (hi) hifas, (fc) fibras de colágeno, (fmd) fibras musculares degeneradas, (ic) infiltración celular, (e) escama, (ed) edema, (fm) fibra muscular. A y B) tinción HyE, C) tinción Grocott.

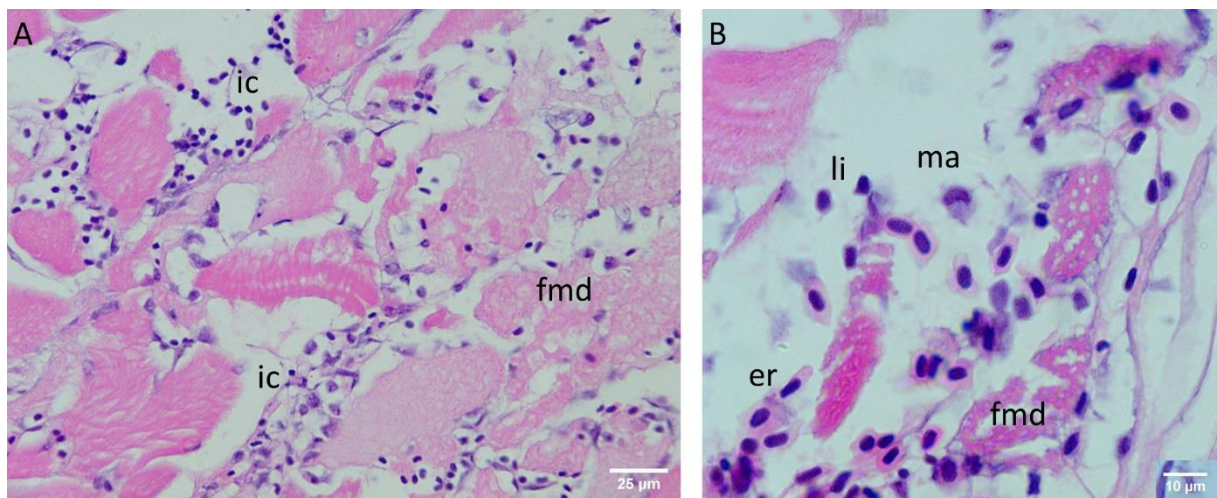


Figura 31. Ensayo 1. Cortes histológicos de peces expuestos a *S. parasitica* C08 con TAP. Degeneración muscular e infiltración celular asociadas a oomicosis. (fmd) fibras musculares degeneradas, (ic) infiltración celular, (li) linfocitos, (ma) macrófago, (er) eritrocitos. A y B) tinción HyE.

5.2.1.5.2. Ensayos 2 y 3

Para los ensayos 2 y 3 sólo se realizaron cortes histológicos a partir de muestras de peces moribundos. Se analizaron preparados de tegumento y musculatura de 3 individuos expuestos a *S. diclina* C13 con TAP y 2 individuos expuestos a *S. ferax* C20 con TAP (figuras 32 y 33). En todos los casos se observaron alteraciones histopatológicas similares a las observadas y descritas arriba para las muestras de individuos del ensayo 1. Se observó la presencia de hifas en todas las capas tegumentarias y en la musculatura. Se encontraron alteraciones tales como el desprendimiento de la epidermis, ausencia de escamas y degeneración de las fibras de colágeno de la capa dérmica. En la capa muscular se observó necrosis de las fibras musculares, edema y escasas células inflamatorias (figura 34).

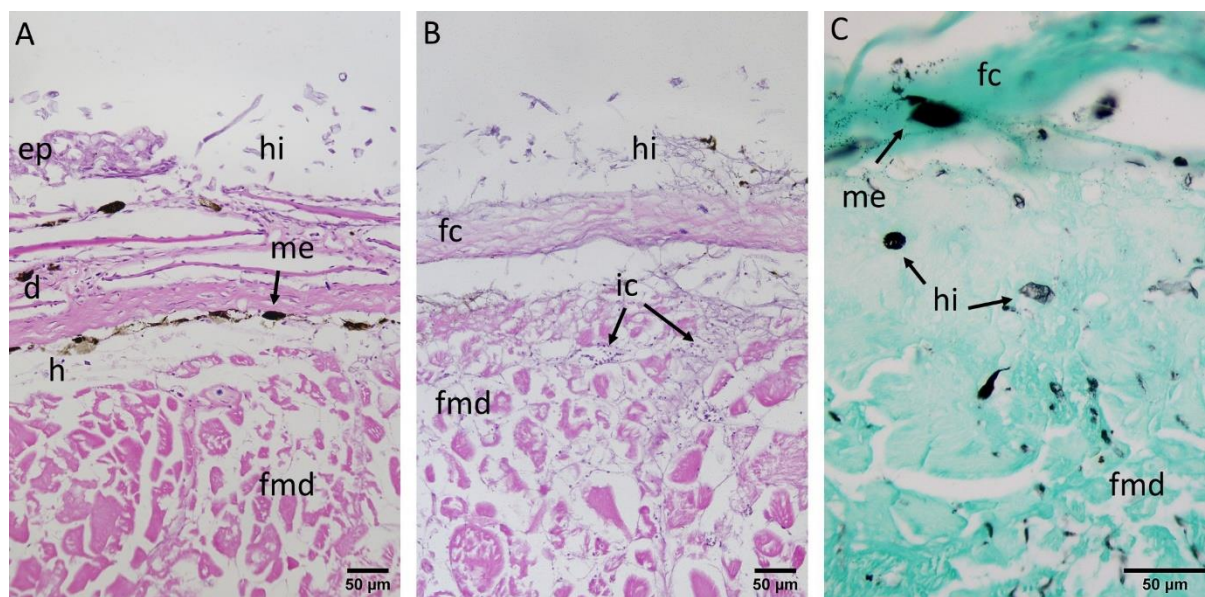


Figura 32. Ensayo 2. Cortes histológicos de peces expuestos a zoosporas de *S. diclina* C13 con TAP. Puede notarse la presencia de hifas y alteraciones en el tegumento y la capa muscular. Entre ellas, el desprendimiento de la epidermis, ruptura de la capa esponjosa de la dermis, la degeneración de fibras musculares e infiltración celular. (ep) epidermis, (d) dermis, (h) hipodermis, (me) melanóforos, (hi) hifas, (fc) fibras de colágeno, (fmd) fibras musculares degeneradas, (ic) infiltración celular. A) y B) tinción HyE, C) tinción Grocott.

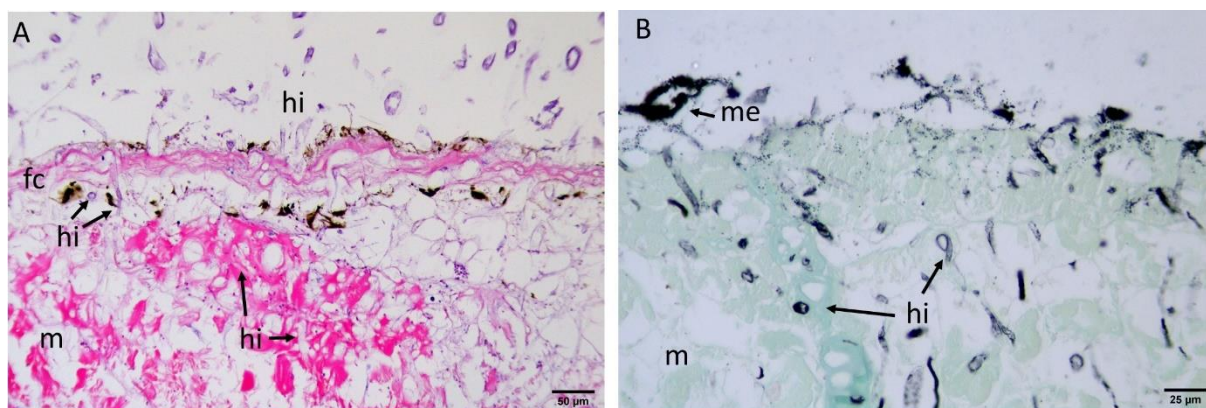


Figura 33. Ensayo 3. Cortes histológicos de peces expuestos a *S. ferax* C20 con TAP. Puede notarse la presencia de hifas y alteraciones en el tegumento y la capa muscular. Se observa el desprendimiento de la epidermis, ruptura de la capa esponjosa de la dermis y la degeneración de fibras musculares. (m) músculo, (me) melanóforos, (hi) hifas, (fc) fibras de colágeno. A) tinción HyE, B) tinción Grocott.

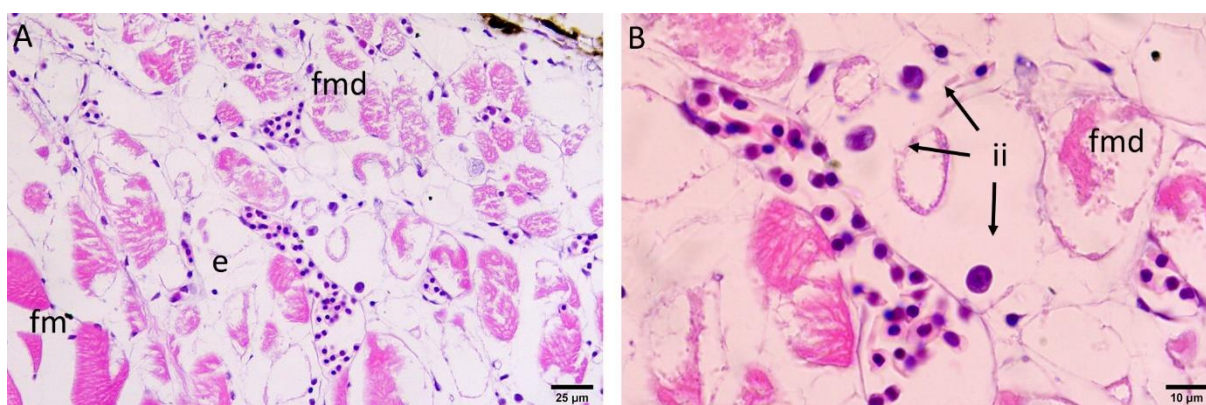


Figura 34. Ensayo 2. Cortes histológicos de peces expuestos a *S. diclina* C13 con TAP. Degeneración muscular e infiltración celular asociadas a *S. diclina* C13. (fmd) fibras musculares degeneradas, (fm) fibras musculares normales, (e) edema, (ii) infiltrado inflamatorio. A y B) tinción HyE.

5.2.1.6. Agregados de macrófagos (AM)

El análisis de las fotografías de los preparados histológicos de bazo, hígado y riñón mostró una marcada diferencia en los porcentajes de áreas pigmentadas, correspondientes a los AM y MPD entre los distintos órganos (ANOVA 1 factor, $p < 0,05$) (figura 35 y 36). El riñón presentó la mayor proporción de áreas pigmentadas, en porcentajes que variaron entre el 6,91 y 16,31% de la superficie total analizada mientras que en el bazo los porcentajes variaron entre 0,89 y 1,89% y en hígado entre 0,039 y el 0,079% (tabla 10). En el riñón, la interacción del factor TAP y exposición a zoosporas fue significativa para el porcentaje de área pigmentada (ANOVA de 2 factores, $p < 0,001$). Los individuos expuestos a zoosporas de *S. ferax* C11, con TAP, presentaron menor superficie

de área pigmentada que los peces con TAP y sin exposición a zoosporas (ANOVA de 2 vías, $p < 0,05$), que los peces expuestos a *S. parasitica* C08 con TAP (ANOVA de 2 vías, $p < 0,01$), y que los peces expuestos a zoosporas de *S. ferax* C11, sin TAP (ANOVA de 2 vías, $p < 0,01$). En hígado y bazo, por otra parte, no fueron detectadas diferencias significativas entre los tratamientos realizados. Finalmente, cuando se incluyó en el análisis a los individuos moribundos expuestos a zoosporas de *S. parasitica* C08 y TAP, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de áreas pigmentadas con respecto al resto de los tratamientos ($p > 0,05$).

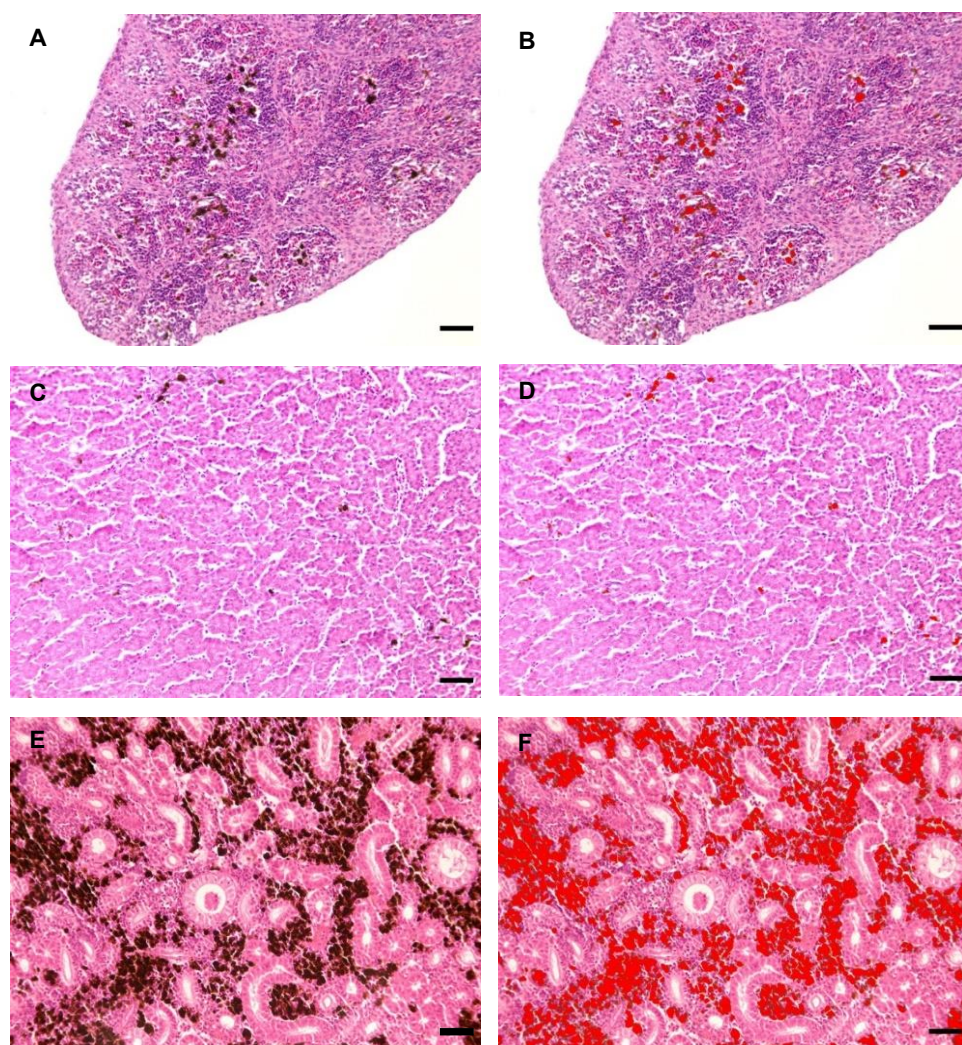


Figura 35. Ensayo 1. Imágenes representativas de cortes histológicos de bazo (arriba), hígado (al medio) y riñón (abajo) coloreados con HyE. En las imágenes A, C y E puede observarse la apariencia y densidad de AM+MPD en los diferentes órganos mientras que en B, D y F se observa la transformación de las imágenes mediante la función de ajuste Color Threshold del software Image J, que permite el Análisis de Partículas y la estimación del área ocupada por AM+MPD. Barra de escala: 50 μ m.

Tabla 10. Porcentaje de ocupación de los agregados de macrófagos y macrófagos pigmentados dispersos en cortes histológicos de bazo, hígado y riñón de peces expuestos a zoosporas de *S. parasitica* C08 y *S. ferax* C11, con y sin tratamiento abrasivo previo (TAP). Los valores están expresados como media \pm error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

| Tratamiento | Bazo | Hígado | Riñón |
|------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| Control | 1,522 ($\pm 0,054$) | 0,039 ($\pm 0,005$) | 9,682 ($\pm 1,498$) ^{ab} |
| TAP | 1,680 ($\pm 0,144$) | 0,049 ($\pm 0,015$) | 15,032 ($\pm 1,391$) ^a |
| C08 | 0,899 ($\pm 0,112$) | 0,039 ($\pm 0,014$) | 9,696 ($\pm 0,623$) ^{ab} |
| C08 + TAP | 1,236 ($\pm 0,134$) | 0,045 ($\pm 0,023$) | 16,137 ($\pm 3,043$) ^a |
| C08 + TAP Morib. | 1,897 ($\pm 0,616$) | 0,056 ($\pm 0,025$) | 11,543 ($\pm 0,735$) ^a |
| C11 | 1,628 ($\pm 0,440$) | 0,046 ($\pm 0,008$) | 16,317 ($\pm 1,496$) ^a |
| C11 + TAP | 1,141 ($\pm 0,084$) | 0,079 ($\pm 0,002$) | 6,918 ($\pm 0,621$) ^b |

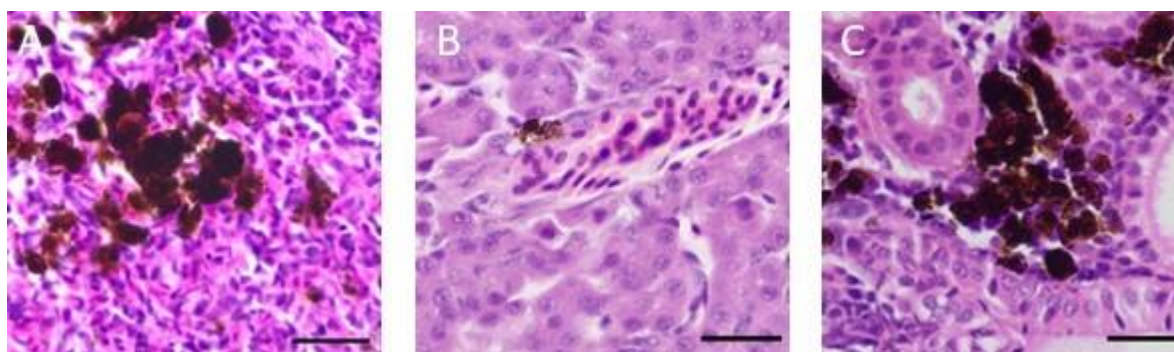


Figura 36. Ensayo 1. Detalle de los agregados de macrófagos y macrófagos pigmentados dispersos observados en bazo (A), hígado (B) y riñón (C). Tinción HyE. Barra de escala: 25 μ m.

5.2.2. Ensayo patogenicidad sobre larvas de pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*)

En este ensayo fue evaluada la patogenicidad de la cepa *S. diclina* C13 sobre larvas de pejerrey patagónico alimentadas con tres dietas diferentes (artemia, alimento formulado y una combinación de artemia + alimento formulado). El resultado de ANOVA de 2 vías mostró una interacción significativa entre la dieta y la exposición a zoosporas de *S. diclina* C13 en el efecto sobre las tasas de mortalidad e infección ($p < 0,001$) (tabla 11). Los peces alimentados con alimento formulado (sólo o en combinación con artemia) tuvieron una mortalidad e infección significativamente mayor que el resto de los grupos ($p < 0,01$) (figura 37). Las larvas muertas o moribundas fueron examinadas con microscopio estereoscópico y microscopio óptico. Se observó la presencia de hifas principalmente en la región abdominal (figura 38). Las hifas parecen extenderse desde

los órganos y cavidad celómica hacia la zona dorsal y caudal del cuerpo afectando al tegumento y musculatura (figura 38). Por otra parte, en el fondo de los acuarios de los grupos de peces alimentados con el alimento formulado se observó la germinación de esporas y el desarrollo de hifas.

Tabla 11. Porcentajes de mortalidad e infección en larvas de pejerrey patagónico expuestas a $2,60 \times 10^2$ zoosporas mL^{-1} de *S. diclina* C13. Las exposiciones se realizaron sobre grupos de peces alimentados con artemia, artemia + alimento formulado o alimento formulado. Los valores están expresados como media \pm error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de dos factores, $p < 0,01$).

| Cepa | % mortalidad | | | % infección | | |
|---------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | Artemia | Artemia + alim. formulado | Alimento formulado | Artemia | Artemia + alim. formulado | Alimento formulado |
| C13 | 4,44 ($\pm 2,22$) ^{ab} | 86,67 ($\pm 3,84$) ^c | 55,56 ($\pm 11,11$) ^d | 2,22 ($\pm 2,22$) ^a | 86,67 ($\pm 3,84$) ^b | 42,22 ($\pm 8,01$) ^c |
| Sin C13 | 2,22 ($\pm 2,22$) ^{ab} | 0,00 ^a | 15,55 ($\pm 2,22$) ^b | 0,00 ^a | 0,00 ^a | 0,00 ^a |

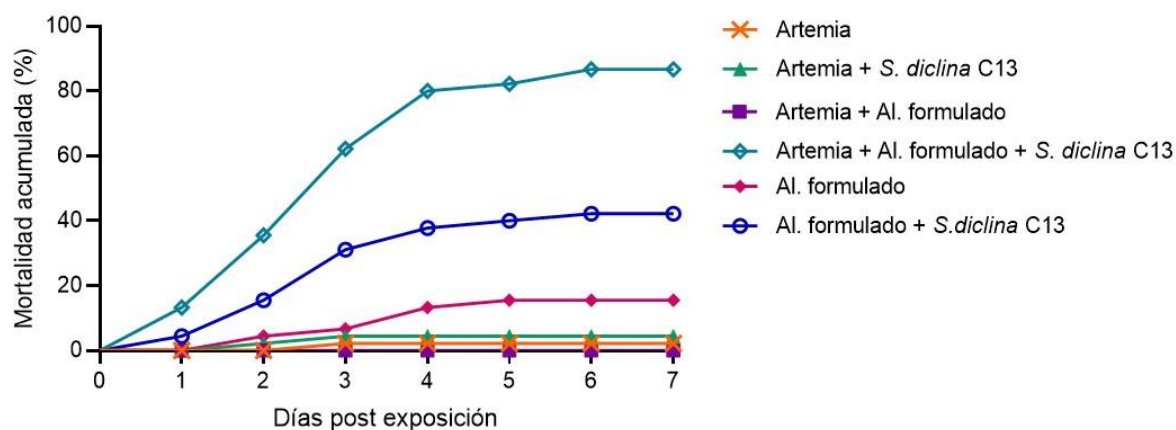


Figura 37. Curvas de mortalidad acumulada en larvas de pejerrey patagónico expuestas a $2,60 \times 10^2$ zoosporas mL^{-1} de *S. diclina* C13, alimentadas con artemia, artemia + alimento formulado o alimento formulado.

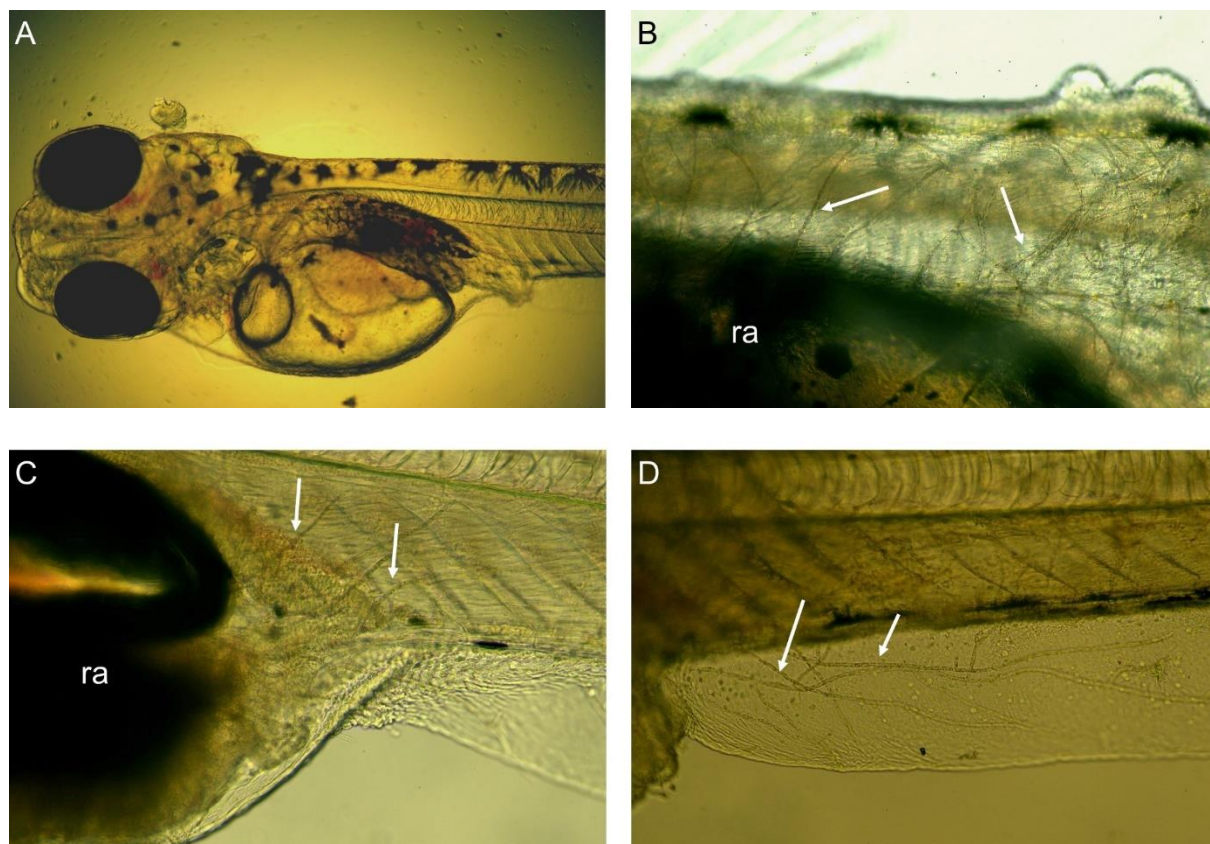


Figura 38. Imágenes de larvas de pejerrey patagónico tomadas en fresco a 10X de magnificación. A) larva del grupo control con aspecto normal. B, C y D) infección por *S. diclina* C13. Se observan hifas (flechas) que irradian a partir de la región abdominal (ra) hacia la región dorsal del cuerpo y aleta embrionaria.

5.2.2.1 Alteraciones histopatológicas

En las larvas de los grupos no expuestos a zoosporas de *S. diclina* C13 no se evidenciaron alteraciones histopatológicas (figura 39). Las larvas moribundas de los grupos expuestos a *S. diclina* C13 evidenciaron distintas alteraciones histopatológicas asociadas a la presencia de hifas. Las hifas, que se colorean débilmente con un tono azul violáceo con las tinciones de HyE y Tricrómico de Masson o con un tono grisáceo oscuro con la tinción de Grocott, se observaron en el tracto digestivo, riñón, cavidad celómica, musculatura y tegumento. En el intestino, se observó degeneración de las vellosidades y, en algunos casos la pérdida general de la integridad de la pared del órgano. En estos casos se observaron hifas en la luz y a través de las paredes del tracto. Las hifas también se observaron invadiendo la cavidad abdominal y afectando a los acinos pancreáticos y al riñón (figuras 40 y 41), en éste último órgano se detectó la degeneración de túbulos

renales. La musculatura también se vio afectada por *S. diclina* C13. Se observaron hifas presentes en la musculatura y, en algunos casos, se observaron cambios degenerativos y desorganización de las fibras musculares. En las larvas de pejerrey el tegumento se presenta como una estructura muy delgada, la epidermis y la capa dérmica aparecen como láminas de aspecto aplanado y de pocas células de espesor. Se observaron zonas de pérdida de la integridad y necrosis del tegumento como así también crecimientos hiperplásicos asociados a la presencia de hifas. En la cavidad celómica se observaron células de la respuesta inmune (infiltrado inflamatorio) alrededor de algunas hifas (figura 42).

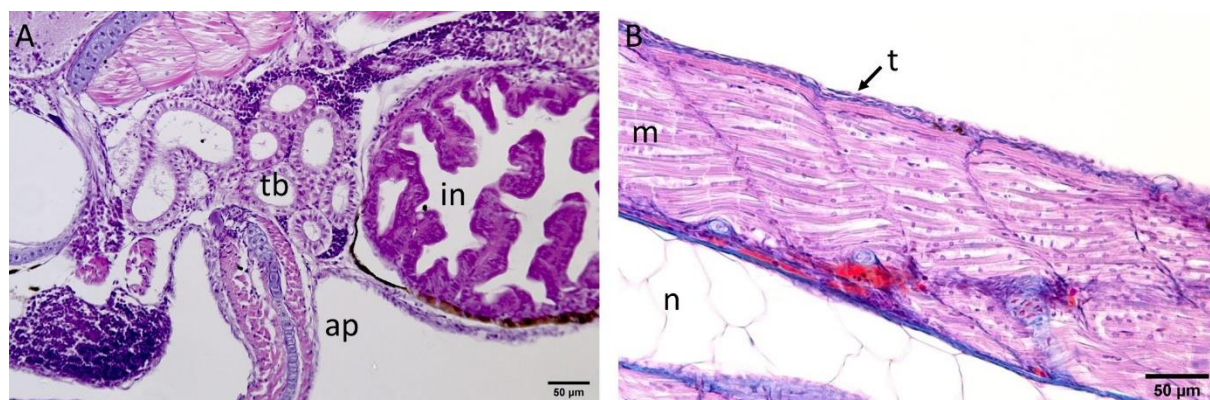


Figura 39. Cortes histológicas de larvas de pejerrey patagónico del grupo Control. Apariencia normal de órganos en la región craneal y zona caudal del cuerpo. (in) intestino, (tb) túbulos renales, (ap) aleta pectoral, (t) tegumento, (m) musculatura, (n) notocorda. A) y B) tinción HyE.

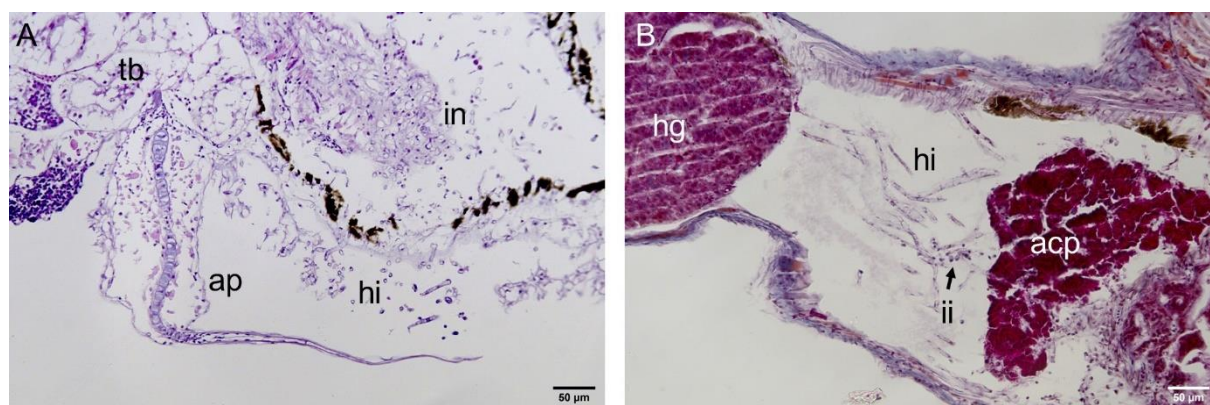


Figura 40. Cortes histológicas de larvas de pejerrey patagónico infectadas con *S. diclina* C13. Se observa en (A) una profunda necrosis de los tejidos, en particular del tegumento, la pared intestinal, los túbulos renales y la musculatura de la aleta pectoral. Se observan hifas en el interior y exterior del cuerpo. En (B) se observan hifas (hi) en la cavidad abdominal y células de la respuesta inflamatoria asociadas. (in) intestino, (tb) túbulos renales, (ap) aleta pectoral, (hg) hígado, (acp) acinos pancreáticos, (ii) infiltrado inflamatorio. A) y B) tinción HyE.

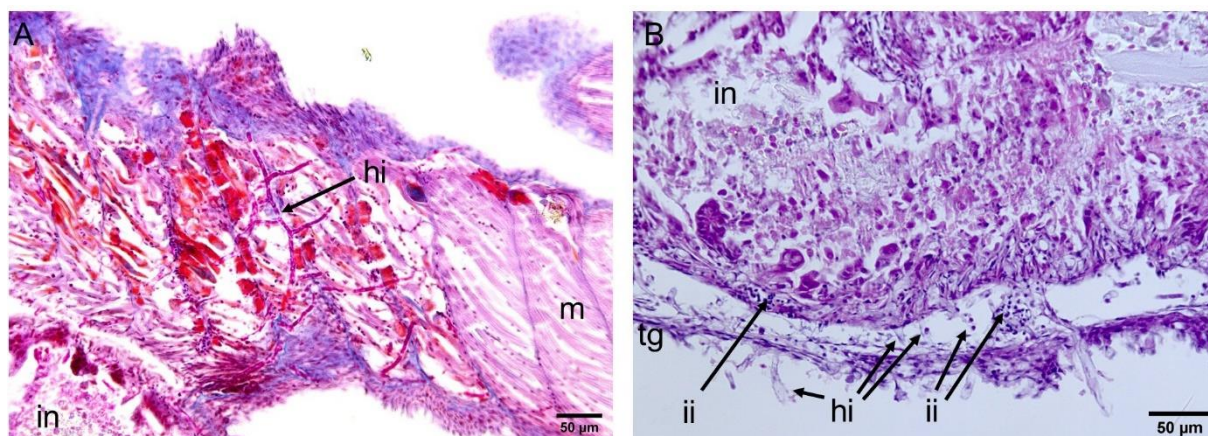


Figura 41. Cortes histológicos de larvas de pejerrey patagónico infectadas con *S. diclina* C13. Se observan en (A) hifas y desorganización y necrosis de las fibras musculares. Mientras que en (B), se observan hifas (hi) en la pared intestinal, atravesando la cavidad abdominal y el tegumento. Tanto en la pared intestinal como en la cavidad, se observa un infiltrado inflamatorio (ii) asociado a las hifas (hi). (in) intestino, (tg) tegumento, (m) musculatura. A y B) tinción HyE.

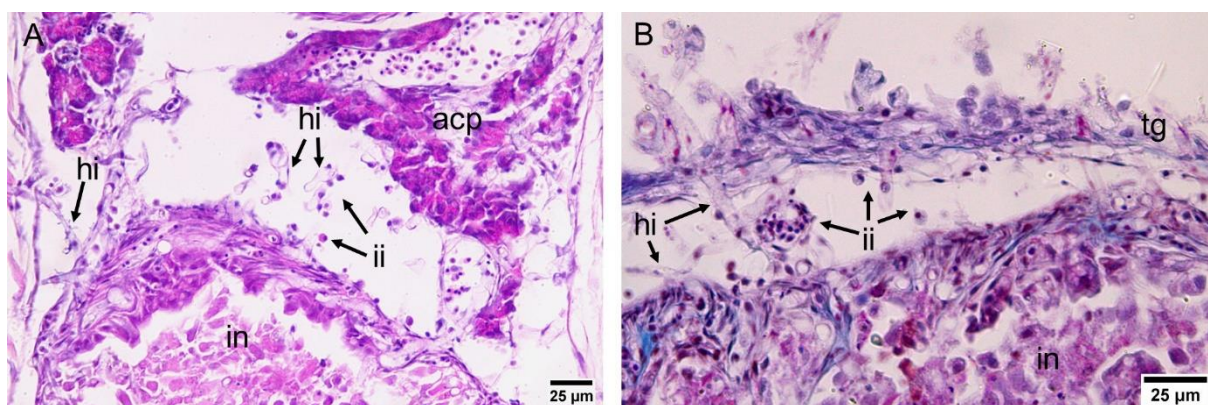


Figura 42. Cortes histológicos de larvas de pejerrey patagónico expuestas a zoosporas de *S. diclina* C13 donde puede apreciarse células de la respuesta inflamatoria. (hi) hifas, (ap) acinos pancreáticos, (ii) infiltrado inflamatorio, (in) intestino, (tg) tegumento. A) tinción HyE, B) tinción TM.

6. DISCUSIÓN

En este capítulo se estudió la capacidad patogénica de algunas cepas de *S. parasitica*, *S. ferax*, *S. diclina*, *S. glomerata*, *Saprolegnia sp.*, *L. lacteus* y *Achlya sp.* sobre ovas y juveniles de trucha arcoíris (*O. mikiss*) y pejerrey patagónico (*O. hatcheri*) de la piscicultura del CEAN en Junín de los Andes, Neuquén. Los ensayos se realizaron después de haber aislado y mantenido cultivos puros de las distintas cepas en condiciones de laboratorio.

6.1. Exposición de ovas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mikiss*) a zoosporas de Oomycetes

Los resultados de los ensayos muestran que las zoosporas de *Saprolegnia sp.* C01, *S. glomerata* C02, *S. parasitica* C03, *S. ferax* C04, *Saprolegnia sp.* C05, *Saprolegnia sp.* C06, *Saprolegnia sp.* C07, *S. parasitica* C08, *S. ferax* C11, *S. diclina* C13, *S. ferax* C20, *S. ferax* C21, *S. parasitica* C22, *L. lacteus* C23, *Saprolegnia sp.* C25, *Saprolegnia sp.* C26, *L. lacteus* C27, *Achlya sp.* C28 y *Saprolegnia sp.* C29 tienen la capacidad de adherirse a ovas muertas de trucha arcoíris, germinar y crecer sobre las mismas. En este estudio, las hifas colonizan e invaden el corion, vitelo y tejido del embrión y el micelio finalmente se proyecta desde la ova hacia el medio externo. Las cepas ensayadas pertenecen a géneros y especies que fueron previamente aislados en nuestro país a partir de ovas de pejerrey bonaerense (Pacheco Marino *et al.*, 2006; 2009) y, en otros países, sobre ovas de pércidos (Czeczuga y Muszynska, 1999), salmónidos (Rand y Munden, 1992; Kitancharoen y Hatai, 1996; Stueland *et al.*, 2005a; Songe *et al.*, 2015), bagres (Cao *et al.*, 2012; Duc *et al.*, 2016) y pez ángel (*Pterophyllum scalare* (Schultze)) (Eissa *et al.*, 2013), entre otros. En los sistemas de incubación, las ovas colonizadas se convierten en un núcleo infectivo desde donde el micelio se expande, sofoca y genera la mortalidad de las ovas vecinas (Post, 1987; Meyer, 1991; Tohen *et al.*, 2011). El riesgo de infección aumenta cuando se incuban lotes de ovas de mala calidad o con bajos porcentajes de fecundidad. En estos casos, resulta imprescindible la extracción de las ovas infectadas (actividad conocida como “picado de ovas”) y la aplicación de tratamientos contra las oomicosis.

Las zoosporas de las cepas estudiadas también lograron asentarse en la superficie externa de las ovas vivas, donde germinaron y desarrollaron hifas, generalmente de menor tamaño que las hifas encontradas sobre ovas muertas (donde el micelio se encuentra más desarrollado). Las prevalencias de estas infecciones en los ensayos fueron variables, incluso para distintas cepas de una misma especie. De modo similar, Tohen *et al.* (2011) observaron hifas de *Saprolegnia spp.*, solitarias o formando pequeños grupos, adheridas externamente al corion de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*), pero sin penetrar en él, ni inducir la mortalidad de las ovas. En la mayoría de los cortes histológicos realizados sobre las ovas vivas, que presentaron hifas microscópicas cuando se fijaron en

formol, no se observaron hifas asociadas al corion. Esto puede deberse a que las hifas microscópicas observadas sobre las ovas vivas no se disponen en toda la superficie de la ova, sino que se encuentran en bajo número y dispersas sobre la superficie (como fue observado al microscopio invertido). Por este motivo, la oportunidad de observarlas en los preparados histológicos (se analizaron dos cortes por ova) fue baja. Además, podría ser que estas hifas superficiales no se encuentren fuertemente adheridas y se desprendan durante el procedimiento histológico.

En preparados de ovas expuestas a zoosporas de *S. parasitica* C08, sí se observó la presencia de hifas delgadas sobre el corion; en este caso, las hifas parecieron apoyarse sobre la superficie externa y no se observaron evidencias de penetración sobre la cubierta de la ova. Si bien las zoosporas de las cepas estudiadas logran germinar y desarrollar hifas sobre las ovas vivas, no tienen la capacidad de producir un incremento en la mortalidad.

En síntesis, las esporas germinan sobre el corion, desarrollan hifas pequeñas que no están fuertemente adheridas ni penetran hacia el interior de la ova y no producen un daño que genere la muerte de la ova. Los resultados obtenidos concuerdan con otros ensayos de infección realizados sobre ovas de salmónidos, aunque no se han registrado estas mismas observaciones en otros grupos de peces. Tohen *et al.* (2011) no observaron mortalidades significativas cuando expusieron ovas de salmón del Atlántico a zoosporas de ocho cepas de Oomycetes del orden Saprolegniales, incluidas *S. parasitica*, *S. diclina* y *Saprolegnia sp.*; mientras que Kitancharoen y Hatai (1996) tampoco observaron infección ni mortalidad en ovas vivas de trucha arcoíris expuestas a zoosporas de *S. diclina*, *S. ferax* y *S. parasitica*. Contrariamente, las ovas del bagre africano (*C. gariepinus*) podrían ser más susceptibles que las ovas de salmónidos. Hanjavanit *et al.* (2008) obtuvieron altas tasas de infección y mortalidad (que variaron en función de la concentración de zoosporas) en ovas de esta especie de cláridos a zoosporas de *S. diclina*, *Achlya sp.* *A. ambisexualis* y *Aphanomyces sp.*

Los resultados obtenidos sugieren que el corion puede representar una barrera eficiente contra la infección por zoosporas de Oomycetes y es probable que las ovas de trucha arcoíris posean un mecanismo de defensa capaz de inhibir o limitar el crecimiento del micelio. Esta resistencia podría ser tanto física, brindada por la cubierta, como química

y estar influida por la transferencia de inmunoglobulinas, lectinas, proteasas, componentes del complemento o lisozimas por parte de las hembras progenitoras (Songe *et al.*, 2016). La actividad enzimática de acción fungicida ha sido observada por Kudo y Teshima (1991) en la cubierta de huevos fecundados de *P. altivelis* y *Tribolodon hakonensis* (Günther).

6.2. Ensayos de coincubación

En los ensayos de coincubación se observó que los inóculos infectivos desarrollan hifas que se extienden sobre las ovas vecinas, tienen la capacidad de adherirse a éstas y terminan provocando a veces la muerte de las mismas, dependiendo de la densidad de los inóculos. El primer ensayo mostró que, a mayor cantidad de inóculos infectivos en contacto con una ova viva, mayor es la probabilidad de que ésta sea afectada y muera. Cuando los inóculos de *Saprolegnia sp.* C01, *S. glomerata* C02 y *Saprolegnia sp.* C05 rodearon por completo a una ova viva, esta última terminó muriendo y fue colonizada por el micelio; mientras que cuando el contacto fue menor, la mortalidad también fue menor. En el segundo ensayo, los inóculos de *S. parasitica* C08 y *S. diclina* C13 produjeron adherencia sobre las ovas vecinas, mientras que no se observó lo mismo para *S. ferax* C11. Además, en este ensayo, ninguna de las cepas causó una mortalidad significativa. En cortes histológicos, se observó que las hifas que se originan en los inóculos infectivos y que se adhieren a las ovas vecinas, generan depresiones o marcas en el corion, aunque no penetran más allá de la capa externa. Estas depresiones muestran el estrecho contacto y pueden ser la causa, junto con la acción de glicoproteínas adhesivas (Deacon y Donaldson, 1993), de la fuerte adhesión de las ovas vivas con los inóculos infectivos. En ensayos de coincubación con cepas de *S. parasitica*, *S. diclina* y *Saprolegnia sp.*, Tohen *et al.* (2011) también observaron adhesión e infección en las ovas próximas a los inóculos infectivos. En dicho estudio, una cepa de *S. diclina* y una cepa identificada como *Saprolegnia sp.* produjeron la adhesión de 4,5 y 5,5 ovas por inóculo, mientras que el resto de las cepas (*S. parasitica*, *S. diclina* y *Saprolegnia sp.*) causaron 0-2 ovas adheridas. En este estudio, la adhesión de *S. parasitica* C08 y *S. diclina* C13 fue de 2,6 ovas. Las diferencias entre los resultados de ambos trabajos pueden deberse a diferencias en la patogenicidad de las

cepas o también a la duración del ensayo, ya que el ensayo de Tohen *et al.* (2011) duró 3 días más y es probable que este tiempo sea suficiente para que el micelio crezca, se adhiera fuertemente a mayor cantidad de ovas e incluso tenga más incidencia en la mortalidad. En general, la bibliografía consultada menciona que la mortalidad de las ovas en los sistemas de incubación se produce por el sofocamiento o asfixia (Post, 1987; Meyer, 1991). Las ovas muertas, los micelios y sedimentos generan aglutinamientos, que obstruyen el flujo de agua, aumentan el déficit de oxígeno e incrementan masivamente la mortalidad (Pickering, 1994). Sin embargo, Rand y Munden (1992) proponen que la invasión de las ovas se da por una combinación de presión mecánica y digestión enzimática extracelular y en concordancia con esto, Peduzzi y Bizzozero (1977) detectaron enzimas proteolíticas producidas por Oomycetes que podrían favorecer la penetración de las hifas en los tejidos del hospedador. Tohen *et al.* (2011) plantean que, además de la sofocación, las hifas que crecen sobre las ovas muertas contribuyen activamente en la muerte de las ovas vecinas, aunque desconocen el mecanismo de acción.

6.3. Exposición de ovas de pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*) a zoosporas de Oomycetes

Las zoosporas de *S. parasitica* C08, *S. ferax* C11 y *S. diclina* C13 logran germinar y desarrollar pequeñas hifas sobre las ovas de pejerrey patagónico sin causar incrementos significativos en la mortalidad. En cortes histológicos de ovas muertas colonizadas, se observó que el micelio atraviesa el corion e invade el tejido del embrión, el vitelo y el espacio perivitelínico. Al contrario, sobre ovas vivas no se detectaron las hifas que fueron observadas previamente en el material fresco (sin fijar). Los resultados de infección y mortalidad son similares a los hallados en los ensayos con ovas de trucha arcoíris: las ovas vivas de pejerrey patagónico parecen ser refractarias a la infección por las zoosporas de los Oomycetes estudiados. A nivel histológico, Pacheco Marino *et al.* (2009), encontraron alteraciones similares en ovas muertas de pejerrey bonaerense: hifas penetrando el corion, expandiéndose internamente en la ova y una marcada desorganización del tejido del embrión.

6.4. Exposición de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mikiss*) a zoosporas de Oomycetes

Los ensayos muestran que las zoosporas de algunas cepas de *S. parasitica*, *S. diclina* y *S. ferax* aisladas en el CEAN pueden infectar a juveniles de truchas arcoíris y producir un incremento de la mortalidad. Sin embargo, esta situación sólo ocurre cuando los peces son sometidos previamente a un tratamiento abrasivo. Las zoosporas de *Saprolegnia spp.* nadan activamente y tienen un quimiotaxismo positivo hacia los tejidos de los peces que facilita el encuentro con el hospedador (El-Feki *et al.*, 2003; Rand y Munden, 1993). Posteriormente, las zoosporas dan lugar a quistes secundarios y estos poseen filamentos con ganchos para aumentar el éxito en la adherencia al sustrato. La ornamentación del quiste secundario es relevante en la fijación y patogenicidad de los Oomycetes. Varios autores, consideraron a *S. parasitica* (que incluye a *S. diclina* tipo 1), que posee quistes secundarios con haces de filamentos largos y ganchos, como una especie patogénica mientras que a *S. diclina* (denominada por algunos autores como *S. diclina* tipo 2) y a *S. ferax*, que poseen quistes con haces de filamentos cortos, las consideran especies no patogénicas o principalmente saprótrofas (Pickering y Willoughby, 1982; Hatai y Hoshiai, 1993; Bruno y Wood, 1999; Hussein y Hatai, 2002). En esta línea, Hatai y Hoshiai (1993) lograron infecciones y mortalidades significativas en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch* (Walbaum)) de 20-30 g expuestos a 2×10^5 zoosporas L^{-1} de *S. parasitica*, mientras que las mismas variables no mostraron cambios significativos luego de la exposición a zoosporas de *S. diclina*. A su vez, Yuasa y Hatai (1996) también observaron una baja tasa de infección en truchas arcoíris expuestas a 2×10^5 zoosporas L^{-1} de *S. diclina*, pero en el mismo estudio, la infección y la mortalidad causada por *S. parasitica* fue variable y dependió de la cepa ensayada. La correlación entre la patogenicidad y las cepas que producen morfotipos diferentes de zoosporas no fue confirmada en esta tesis: *S. parasitica* no demostró ser más patogénica que *S. diclina* o *S. ferax* como podría esperarse según las características de los quistes secundarios descritos antes. Además, las tasas de infección y mortalidad variaron entre cepas distintas de la misma especie, coincidiendo con los resultados de Yuasa y Hatai (1996). Así, *S. diclina* C13, *S. diclina* C24 y *S. ferax* C20 produjeron infecciones y mortalidades significativas, mientras que *S. parasitica* C22 causó mortalidad, pero no infección y *S. parasitica* C08 causó infección, pero no mortalidad

significativa. Por otra parte, las cepas *S. ferax* C11, *S. ferax* C21 y *L. lacteus* C23, no causaron infección ni mortalidad.

Los estudios previos de infección experimental de salmónidos con zoosporas de Oomycetes arrojaron resultados variables. Por ejemplo, Stueland *et al.* (2005a) observaron que las características de los quistes secundarios descritas arriba son aparentemente necesarias, pero no determinan la habilidad de causar mortalidad en el salmón del Atlántico. En coincidencia con los resultados de esta tesis, los trabajos en salmónidos de Fregeneda-Grandes (2001), Hussein y Hatai (2002) y Stueland *et al.* (2005a), concluyen que hay una variación considerable en la patogenicidad, incluso entre cepas del género *Saprolegnia* del mismo grupo taxonómico.

Cabe mencionar, también, que otros autores han logrado infecciones experimentales en peces de varias especies no salmónidas sometidos a tratamientos de estrés o erosivos. Hussein *et al.* (2013) reportan un 100% de mortalidad producida por *S. diclina* y 60% por *A. proliferoides* sobre tilapia del Nilo (*O. niloticus*). En el mismo sentido, Panchai *et al.* (2015a) observaron que *Achlya klebsiana* Pieters y *Achlya diffusa* (Harvey) Johnson produjeron 88 y 77% de mortalidad sobre la misma especie. En ambos trabajos, la mortalidad fue dependiente de la concentración de zoosporas. Carraschi *et al.* (2018) lograron la infección del pacú con *S. aenigmatica*, mediante tratamientos que incluyeron la inmunosupresión con dexametasona, la descamación del tegumento y la inoculación subcutánea de zoosporas o exposición en baños junto a semillas con desarrollo de micelio. Finalmente, Singhal *et al.* (1987) produjeron infecciones y altas mortalidades por *A. recemosa* y *S. parasitica* en la carpa (*C. carpio*), el rohu (*Labeo rohita* (Hamilton)) y el mrigal (*Cirrhina mrigala* (Hamilton)), después de la extracción de escamas y la inyección de zoosporas o cohabitación con peces previamente infectados.

Como se mencionó antes en este estudio, las zoosporas de *S. parasitica*, *S. diclina*, *S. ferax* sólo generaron infección y mortalidad en peces sometidos al tratamiento abrasivo. Este tratamiento intenta representar una situación de estrés y lesión tegumentaria comparables con las producidas durante las acciones de manejo, la interacción entre los peces o por efectos de las densidades de cría muy elevadas en los centros de producción acuícola. En numerosos trabajos experimentales, se utilizó el método llamado “ami-

“ami-momi” para sensibilizar a los peces a las infecciones por Oomycetes; el método consiste en sacudir durante uno o dos minutos a un grupo de peces en una red para producir la descamación, la eliminación del mucus y generar pequeñas lesiones tegumentarias (Hatai y Hoshiai, 1993; Yuasa y Hatai, 1996; Fregeneda-Grandes *et al.*, 2001; Hussein y Hatai, 2002; Stueland *et al.*, 2005a; Hussein *et al.*, 2013; Panchai *et al.*, 2016). Este método fue probado para su uso en este estudio, sin embargo, no se optó por el mismo, debido a que generó una elevada mortalidad post tratamiento. Algunos autores también atribuyen al método “ami-momi” un aumento en la mortalidad al inicio de los ensayos de exposición a zoosporas (Yuasa y Hatai, 1996; Fregeneda-Grandes *et al.*, 2001). Otros autores utilizaron otros métodos de sensibilización, tales como la erosión del tegumento con remoción de escamas (Singhal *et al.*, 1987; Carballo y Muñoz, 1991; Carballo *et al.*, 1995; Giesecker *et al.*, 2006; Carraschi *et al.*, 2018), aplicación de inmunosupresores (Pickering y Duston, 1983; Carraschi *et al.*, 2018), o un shock de temperatura combinado con abrasión tegumentaria (Howe *et al.*, 1998).

Los tratamientos abrasivos son necesarios para lograr con éxito infecciones experimentales que permiten estudiar la patogenicidad de distintas cepas o realizar pruebas de sensibilidad a antioomicóticos. Las observaciones realizadas refuerzan la idea de que un sistema tegumentario íntegro representa una barrera eficaz contra la infección causada por los Oomycetes presentes en los sistemas de cultivo. La secreción mucosa generada por las células epiteliales está en continuo recambio y actúa como una efectiva barrera física para remover patógenos del epitelio; Wood y Willoughby (1986) y Pickering (1994) demostraron la desaparición en el tiempo o la pérdida de viabilidad de las esporas en la capa de mucus. Por otra parte, el mucus, también contiene diferentes moléculas (lisozimas, fosfatasas, esterases, enzimas proteolíticas, histonas, factores del complemento, lectinas e inmunoglobulinas, entre otras) que forman una barrera activa de defensa química del tegumento y pueden inhibir la germinación de esporas y el crecimiento oomicótico (Wood *et al.*, 1988; Pickering, 1994; Dash *et al.*, 2018; Reverter *et al.*, 2018).

6.5. Observaciones histopatológicas

Las cepas *S. parasitica* C08, *S. diclina* C13, *S. ferax* C 20 y *S. diclina* C24 causan importantes alteraciones histopatológicas. Las hifas invaden el tegumento y generan alteraciones tales como el desprendimiento de la epidermis y, en la capa dérmica, la pérdida de escamas y la degeneración de las fibras de colágeno. A nivel de la musculatura, las hifas generan cambios degenerativos y necrosis de las fibras musculares acompañados por la presencia de líquido edematoso entre las fibras. Estas observaciones concuerdan con lo publicado por Fregeneda-Grandes *et al.* (2001) y Hussein y Hatai (2002), en los estudios de infecciones experimentales de *Saprolegnia spp.* sobre salmónidos. Además, Fregeneda-Grandes *et al.* (2001) y Gieseke *et al.* (2006) observaron la presencia de hifas en riñón, vasos sanguíneos e intestino en truchas arcoíris infectadas con *Saprolegnia spp.* En el presente trabajo, no se observaron hifas en las muestras de riñón, hígado y bazo. Por otro lado, no se procesaron muestras del tubo digestivo para histología. Otros ensayos de infección experimental, sobre la tilapia del Nilo, la carpa común y el bagre *C. batrachus* con *A. proliferoides*, *S. diclina* y *Saprolegnia sp.*, también dieron como resultado la pérdida de la epidermis, la necrosis de la dermis e hipodermis y la degeneración de la musculatura (Hussein *et al.*, 2013; Chauhan *et al.*, 2014; Ashour *et al.*, 2017).

La inflamación es una respuesta de orden local del sistema de defensa innato, que comienza después del contacto con el antígeno e involucra a granulocitos, monocitos/macrófagos y linfocitos. El área afectada recibe mayor irrigación sanguínea, aumenta la permeabilidad de los capilares y posteriormente se produce la migración de los leucocitos desde los capilares hacia los tejidos (Rubio-Godoy, 2010). Wada *et al.* (1996) observaron en el ayu (*P. altivelis*) y la carpa, infectados con *Aphanomyces sp.*, la presencia de focos inflamatorios constituidos por macrófagos que rodean a las hifas y se convierten en células gigantes multinucleadas. Posteriormente, estos complejos son necrosados y encapsulados por granulomas formados por células epitelioides. Las células gigantes multinucleadas y la formación de granulomas también fueron observadas por Hawke *et al.* (2003) en bagre del canal (*I. punctatus*) y la agalla azul (*Lepomis macrochirus* Rafinesque) y por Oidtmann *et al.* (2008) en el gurami (*Trichogaster trichopterus* (Pallas)) y en trucha arcoíris infectados con *A. invadans*. Contrariamente a lo descrito antes, en

esta tesis, la respuesta inflamatoria observada en las truchas infectadas con Oomycetes fue débil y no se registró la formación de granulomas; aunque en algunos cortes histológicos se observó infiltración de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas en áreas de la hipodermis y la musculatura. Algunos estudios en salmónidos muestran ausencia de una respuesta inflamatoria (Álvarez *et al.*, 1995; Fregeneda-Grandes *et al.*, 2001; Hussein y Hatai, 2002) o presencia de una respuesta limitada (Giesecker *et al.*, 2006; Songe *et al.*, 2014) ante infecciones por *Saprolegnia spp.* Estos resultados pueden estar relacionados con distintos mecanismos de inmunosupresión (Kales *et al.*, 2007; Fregeneda-Grandes *et al.*, 2007, 2009).

6.6. Análisis de agregados de macrófagos

Los agregados de macrófagos (AM) varían en cantidad y tamaño en procesos infecciosos, inmunizaciones, exposición a sustancias tóxicas y eventos estresantes (Fernández *et al.*, 2002; Ferguson, 2006). En este trabajo, y acorde con lo publicado por Schwindt *et al.* (2006), los AM se encontraron en mayor proporción en riñón y en menor proporción en bazo e hígado. No se observaron diferencias en la proporción de AM entre los tratamientos, excepto en los peces expuestos a zoosporas de *S. ferax* C11 con tratamiento abrasivo, donde se observó una disminución de AM. Sin embargo, este resultado es difícil de interpretar, ya que en condiciones de infección se esperaría un aumento en la proporción de AM. Es necesario tener en cuenta que las muestras de órganos para realizar este análisis fueron obtenidas al finalizar el ensayo a partir de los peces sobrevivientes, algunos de ellos expuestos a zoosporas (según el tratamiento), pero sin manifestaciones o signos de infección por las cepas estudiadas. Esto puede explicar que no haya habido diferencias entre los grupos de peces expuestos a las zoosporas y los grupos de control. Por otra parte, tampoco hubo un aumento de los AM en los peces infectados con *S. ferax* C11 (retirados moribundos de los acuarios y muestreados para el análisis) y esto podría deberse a que este tipo de respuesta sea más frecuente o característica de infecciones crónicas, como lo sugieren Schwindt *et al.* (2006). Otro motivo podría ser también la evasión de la respuesta inmune, en este sentido, Kales *et al.* (2007) sugieren que la fagocitosis por parte de los macrófagos contra las Oomycetes es

inhibida debido al tamaño de las hifas y zoosporas y a la reducción de la expresión del receptor de macrófagos MH II.

6.7. Exposición de larvas de pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*) a zoosporas de *S. diclina* C13

Las zoosporas de *S. diclina* causaron infección y aumento de la mortalidad en las larvas de pejerrey patagónico que consumieron el alimento formulado (formulado), sólo o en combinación con nauplios de *A. salina* (artemia), este efecto resultó mayor para la dieta combinada. En los grupos no expuestos a zoosporas de *S. diclina* C13, las larvas alimentadas con formulado tuvieron mayor mortalidad que los grupos que incluyeron artemias en la dieta (solas o en combinación con formulado). Esto sugiere que el formulado no satisface los requerimientos nutritivos de las larvas de pejerrey para esta etapa del desarrollo. Esta parte del ciclo de cría del pejerrey patagónico se encuentra en etapa de investigación en el CEAN. De la misma manera, en distintos estudios de reproducción y cría de larvas y juveniles de pejerrey bonaerense, los autores mantuvieron el suministro de alimento vivo (zooplancton y nauplios de artemia) por 60 días (Miranda *et al.*, 2006) o más tiempo (Velasco *et al.*, 2008; Colautti *et al.*, 2009) para optimizar la supervivencia y la tasa de crecimiento, lo que destaca la importancia del consumo de alimento vivo para esta etapa del ciclo de cría de los pejerreyes en general.

Las zoosporas de *S. diclina* C13 fueron infectivas y elevaron la mortalidad en los peces que consumieron el formulado, y este efecto fue mayor en los peces que consumieron dicho alimento combinado con nauplios de artemia (dieta combinada). Los porcentajes de infección fueron más altos en los peces que recibieron combinada (86,67%) y formulado (42,22%) que en los peces alimentado con artemia (2,2%). Estos resultados se corresponden con los de mortalidad, que muestran mayores porcentajes en los tratamientos que incluyen formulado (86,7 y 55,56% para dieta combinada y formulado, respectivamente) en comparación con los que recibieron sólo artemia (4,44%). Debe destacarse que el 25% de los peces muertos en el tratamiento formulado no presentaban infección.

La observación de quistes germinados y pequeñas hifas formando una delgada película blanquecina sobre el fondo de los acuarios con peces alimentados con alimento formulado (sólo o en combinación con artemia) sugiere que dicho alimento favoreció la germinación de los quistes de *S. diclina* C13 en el medio y podría también propiciar la germinación dentro del tracto digestivo de los peces (esta idea se retomará más adelante). Además, como se observó, la germinación puede producirse externamente (en el ambiente) y, en este caso, las hifas podrían ser luego ingeridas por las larvas. En individuos en fresco y preparados histológicos se observó la presencia de hifas en la región abdominal, principalmente en el tracto digestivo y otros órganos de la cavidad. Las hifas parecieron extenderse desde los órganos internos y cavidad hacia la zona dorsal y caudal del cuerpo afectando al tegumento y a la musculatura. Estas observaciones soportan la idea de que la infección no se inició a nivel del tegumento de las larvas sino internamente, en el tracto digestivo. Por ende, los quistes secundarios podrían encontrar en el alimento formulado un medio nutritivo que favorece su germinación y/o desarrollo, tanto en el medio como en el tracto digestivo de las larvas de pejerrey.

Retomando los resultados de mortalidad e infección, podría esperarse que las larvas con deficiencias nutricionales sean más susceptibles a la infección por *S. diclina* C13. Por lo tanto, *S. diclina* C13 produciría mayor mortalidad en los grupos alimentados únicamente con el alimento formulado. Sin embargo, y como se señaló arriba, en el grupo alimentado con la dieta combinada se observaron las tasas de mortalidad e infección más altas. En primer lugar, estos resultados podrían deberse a que larvas alimentadas con artemia tuvieron un estímulo mayor hacia la alimentación y la captura de las artemias pudo hacer que ingirieran mayor cantidad de zoosporas, que, propiciados por compuestos liberados por el alimento formulado, germinaron y se desarrollaron en el tracto digestivo causando la infección.

Por otra parte, también las zoosporas o quistes, que miden entre 10-20 μm (Ke *et al.*, 2009; Earle e Hintz, 2014) podrían ser ingeridos por los nauplios de artemia ya que estos pueden filtrar y consumir partículas de 1-50 μm (Lavens y Sorgeloos, 1996) y así ser transportados a las larvas de pejerrey durante la alimentación de las mismas. Los nauplios podrían transportar los quistes sin germinar o podrían ser infectados por *S.*

diclina C13; si bien esto no se registra en la bibliografía, se han observado infecciones por Oomycetes en otros crustáceos zooplanctónicos como los cladóceros *Chydorus sphaericus* (Müller) y *Daphnia sp.* Müller (Wolinska *et al.*, 2008; Wolska y Mazurkiewicz-Zapałowicz, 2013) y el copépodo *Parabroteas sarsi* (Daday) (García *et al.*, 2018). En los nauplios que sirvieron de alimento a los grupos de peces expuestos a zoosporas y alimentados solo con artemia, pudo suceder algo similar, sin embargo, las tasas de infección y mortalidad no fueron significativas. Esto sugiere que las zoosporas que fueron ingeridas por los pejerreyes alimentados con artemia no lograron germinar en el tubo digestivo y/o fueron digeridas eficientemente.

Finalmente, la presencia de Oomycetes del orden Saprolegniales en el tracto digestivo de peces no es novedosa y fue reportada en trabajos previos. *S. diclina* fue aislada del tracto gastrointestinal de trucha arcoíris y ayu, y también en infecciones viscerales de varias especies de salmónidos (Kitancharoen *et al.*, 1996; Yuasa y Hatai, 1996). Un factor limitante para el desarrollo de hifas en el tracto digestivo puede ser el pH interno, sin embargo, esto no parece ser una limitante para la germinación de los quistes de *S. diclina* C13 dentro del tracto digestivo de las larvas de pejerrey patagónico. El intervalo de pH óptimo para el crecimiento de *Saprolegnia spp.* es 5,0-10,0 según lo informado por distintos autores (Noland, 1975; Koeypudsa *et al.*, 2005). Asimismo, Kitancharoen *et al.* (1996) demostraron que *S. diclina* y *S. parasitica* pueden germinar y desarrollarse también a pH muy bajos (3,5-3,8) y sugieren que las zoosporas o quistes secundarios son capaces de germinar en el tracto digestivo de los peces y las hifas pueden penetrar los tejidos e invadir los órganos contiguos. Cabe mencionar que los pejerreyes no poseen estómago ácido verdadero (Agelet *et al.*, 2003; Bieczynski *et al.*, 2016; Pérez-Sirkin *et al.*, 2020) y esta condición también puede ser propicia para el desarrollo de los Oomycetes dentro del tracto digestivo. Horn *et al.* (2006) determinaron que el pH a lo largo de todo el tracto de los aterínidos *Atherinopsis californiensis* Girard y *Leuresthes tenuis* (Ayres) es alcalino ($7,2 \pm 0,2$ y $8,1 \pm 0,1$ respectivamente) y estos valores de pH están dentro del intervalo óptimo mencionado por Koeypudsa *et al.* (2005) para el crecimiento de micelio de distintas cepas del género *Saprolegnia* (pH 7,0-10,0).

CAPÍTULO 3: COINFECCIÓN *Flavobacterium psychrophilum* – *Saprolegnia parasitica*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Coinfecciones

Las coinfecciones o infecciones concurrentes, pueden ser definidas como aquellas en donde dos o más patógenos de especies diferentes afectan en simultáneo a un mismo hospedador. En estas situaciones se generan interacciones entre los patógenos y el hospedador que pueden tener efectos sinérgicos, cuando se incrementa la patogenicidad de uno o de ambos agentes infecciosos, o antagónicos, cuando los efectos de al menos uno de los patógenos son atenuados (Cox, 2001; Abdel-Latif *et al.*, 2020). En las interacciones sinérgicas, un patógeno puede alterar la respuesta inmune e inducir a una inmunosupresión que torna más susceptible al hospedador a infecciones posteriores, incrementando su severidad y la mortalidad. Por otra parte, los efectos antagónicos pueden ser el resultado de la competencia por nutrientes o sitios de infección y también por efectos de la modulación del sistema inmune producido por el primer patógeno que limita la acción de un segundo agente infeccioso (Kotob *et al.*, 2016).

Los peces están expuestos frecuentemente a infecciones heterogéneas producidas por macro y microorganismos. Tanto en sistemas de cultivo como ambientes naturales, suceden numerosas situaciones de coinfección con la participación de distintos agentes patógenos: las interacciones entre bacterias, virus, parásitos (protozoos y metazoos), hongos y Oomycetes tienen impacto en el desarrollo y la severidad de las infecciones y son importantes de tener en cuenta a la hora de planificar estrategias de prevención y control (Kotob *et al.*, 2016).

En peces de cultivo se reportan diversos casos de coinfección entre Oomycetes y agentes bacterianos. Yardimici y Turgay (2021) detectaron una infección concurrente de *Saprolegnia sp.* y *Aeromonas sobria* Popoff y Veron que causaba septicemia en juveniles

de truchas arcoíris (*O. mykiss*). Los peces estudiados presentaban importantes alteraciones histopatológicas y *Saprolegnia sp.* fue considerada en este caso, como un patógeno secundario. También se aislaron *Saprolegnia sp.* y *Flavobacterium columnare* (Bernardet y Grimont) Bernardet *et al.* a partir de branquias de truchas arcoíris de 5-10 g que presentaban una mortalidad elevada y lesiones en tegumento y branquias (Kubilay *et al.*, 2008). Como en el ejemplo anterior, *Saprolegnia sp.* se consideró como un patógeno oportunista. La coexistencia de *Saprolegnia sp.* y *Aeromonas hydrophila* (Chester) Stanier fue reportada en róbalo (*Dicentrarchus labrax* (Linnaeus)) criados en sistemas de recirculación y siluriformes (*C. gariepinus*) mantenidos en sistemas de jaulas flotantes (Kusdarwati *et al.*, 2017; Dinçtürk *et al.*, 2018). En eventos de mortalidad observados en el cultivo del ayu (*P. altivelis*), Chang *et al.* (2002) aislaron a *S. australis* y *A. hydrophila* a partir de muestras de tegumento y órganos internos, respectivamente. En los peces, se observaron alteraciones histopatológicas tales como necrosis tegumentaria, infiltración de leucocitos y formación de granulomas. En dicho estudio se realizó, además, un ensayo de infección experimental mediante la inyección intramuscular de zoosporas a peces de 22 g de peso y 12 cm de long. Los resultados no mostraron incremento significativo de la mortalidad o infección y los autores concluyeron que *A. hydrophila* fue el agente precursor de las lesiones cutáneas propiciando la infección posterior por *S. australis*. Otros ensayos experimentales también evaluaron la acción sinérgica entre cepas bacterianas y Oomycetes. Sharma y Sihag (2013) demostraron que *Aphanomyces invadans* Willoughby, Roberts y Chinabut reduce la respuesta inmune de la carpa mrigal (*Cirrhinus cirrhosus* (Bloch)) y también el periodo de incubación en la infección con distintas cepas bacterianas patógenas de peces en India, mientras que Solopova *et al.* (2020) observaron procesos de peroxidación lipídica y actividad de enzimas antioxidantes en carpas (*C. carpio*) infectadas en simultáneo con *Saprolegnia sp.* y *A. hydrophila*. Los Oomycetes y distintas bacterias coinfectan con frecuencia a peces de cultivo, interactúan y causan sobre los hospedadores distintos efectos que, en muchas ocasiones, tienden a potenciar la severidad de la infección.

1.2. *Flavobacterium psychrophilum*

Entre las bacterias que afectan a peces de cultivo, *F. psychrophilum* se destaca por ser una de las especies que mayores morbi-mortalidades produce. *Flavobacterium psychrophilum* es una bacteria psicrófila, gram negativa, conocida por ser el agente causal de la enfermedad bacteriana de agua fría (denominada BCWD por su sigla en inglés “*bacterial cold water disease*”) o flavobacteriosis y que es responsable de pérdidas económicas importantes en la industria acuícola (Barnes y Brown, 2011). La morbilidad por *F. psychrophilum* puede oscilar entre el 1% y el 50%, especialmente cuando la temperatura del agua es inferior a 10° C y en muchos de estos casos, la mortalidad puede acercarse al 90% (Woo *et al.*, 2006; Barnes y Brown, 2011). Si bien la distribución originaria de *F. psychrophilum* se limitó a Norte América, actualmente se la aisla a partir de peces enfermos de pisciculturas de todo el mundo (Nematollahi *et al.*, 2003). En Sudamérica, la presencia de *F. psychrophilum* fue reportada en Chile (Bustos *et al.*, 1995), Perú (León *et al.*, 2009), Argentina (Moreno *et al.*, 2016) y México (Castillo *et al.*, 2017).

Las lesiones típicas producidas por *F. psychrophilum* incluyen la erosión y necrosis de tejidos del pedúnculo y aleta caudal (Barnes y Brown, 2011). Uno de los primeros signos de una infección es el desarrollo de material blanquecino a lo largo del margen de la aleta adiposa o dorsal, seguido de la necrosis progresiva del pedúnculo y la aleta; esta necrosis incluye al tegumento y la musculatura y expone eventualmente a la columna vertebral y radios de las aletas al medio externo (Cipriano y Holt, 2005; Barnes y Brown, 2011). Otros signos clínicos incluyen letargia, pigmentación, natación errática, anemia, ascitis, exoftalmia y hemorragia en las branquias. Los peces pueden presentar también lesiones en la mandíbula, opérculo y alrededor del ano (Nematollahi *et al.*, 2003; Bruno *et al.*, 2013). Los cambios histopatológicos más frecuentes incluyen, entre otros, congestión, edema y necrosis en el bazo y hemorragias, degeneración vacuolar, presencia de núcleos picnóticos e incremento de la hemosiderina en el hígado. En el riñón se pueden observar núcleos picnóticos, hemorragias y necrosis en el epitelio tubular y tejido hematopoyético. Por otra parte, *F. psychrophilum* puede producir hemorragias y necrosis en músculo e hipodermis, infiltración de linfocitos y granulocitos, hiperplasia y espongirosis en la epidermis (Bruno, 1992; Ekman y Norrgren, 2003; Roberts, 2012).

En nuestro país, precisamente en las provincias de Río Negro y Neuquén, la flavobacteriosis se observa de forma recurrente en los centros de cría y alevinaje de trucha arcoíris (observación personal). Produce mortalidades elevadas y requiere de medidas de manejo y tratamientos terapéuticos para su control. Nuestro grupo de trabajo (CEAN-CONICET) realizó los primeros estudios en Argentina destinados a identificar y caracterizar distintas cepas de *F. psychrophilum* aisladas de truchas arcoíris enfermas en pisciculturas de la provincia del Neuquén. Hemos realizado la identificación molecular mediante el uso de los *primers* específicos FP1 - FP3 (del Cerro *et al.*, 2002) y fpPPIC1F - fpPPIC1R (Yoshiura *et al.*, 2006) en ensayos de PCR, pruebas bioquímicas de caracterización y mediante ensayos de laboratorio, evaluamos también la virulencia de algunas de las cepas estudiadas (Moreno *et al.*, 2016).

1.3. Balance oxidativo

Durante los procesos infecciosos, la destrucción de microorganismos por fagocitosis, la síntesis de mediadores inflamatorios y la detoxificación constituyen procesos homeostáticos esenciales. En estos procesos, y en otros tan fundamentales como el metabolismo aerobio, las especies reactivas de oxígeno (EROs) cumplen un importante rol como intermediarios de reacciones de óxido-reducción (redox).

Las EROs son moléculas que contienen uno o más electrones desapareados que les confieren propiedades altamente inestables y reactivas. Debido a esto, y en exceso, las EROs pueden interactuar y producir importantes daños en la estructura celular, la peroxidación de las membranas lipídicas y el deterioro de proteínas en tejidos, membranas, enzimas, carbohidratos y ADN constituyen alteraciones que pueden llevar a la consecuente muerte celular (Biller y Takahashi, 2018).

Las EROs se producen de forma endógena durante el metabolismo aeróbico, en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, donde el oxígeno molecular (O₂) es reducido hasta producir agua y los productos intermediarios son el radical superóxido (O₂•-), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (HO•). Además, se producen EROs en los peroxisomas donde la acción de diferentes oxidases genera H₂O₂ como producto intermedio y en el retículo endoplasmático mediante la acción de la enzima de

la superfamilia citocromo P450 (CYPs) que constituyen una defensa contra xenobióticos y metabolizan sustancias endógenas. Por otra parte, también se producen $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 cuando los fagocitos (monocitos, neutrófilos y macrófagos) destruyen células infectadas con bacterias o virus. Durante estos procesos infecciosos, la producción de EROs resulta esencial en la defensa del organismo (Chihuailaf *et al.*, 2002; Biller y Takahashi, 2018). Existen también, fuentes exógenas que incrementan la producción de EROs, tal es el caso de algunos metales, radiación UV, solventes orgánicos y pesticidas, micotoxinas, hiperoxia y otros agentes estresantes (Chihuailaf *et al.*, 2002).

Las EROs se generan y eliminan constantemente por distintas vías manteniendo un estado estacionario, sin embargo, la concentración celular de EROs es un parámetro dinámico que varía bajo ciertas circunstancias (Lushchak, 2011). Cuando existe un desequilibrio entre la producción de EROs y la capacidad antioxidante del organismo se produce una alteración denominada estrés oxidativo, esta situación, donde los EROs aumentan de forma crónica o transitoria, puede perturbar el metabolismo celular y su regulación, dañando los componentes celulares y activando, incluso, procesos de muerte celular como la apoptosis (Chihuailaf *et al.*, 2002; Lushchak, 2011; Chowdhury y Saikia, 2020).

Frente al desbalance en la producción de EROs, los organismos tienen estrategias para prevenir su formación o para promover reacciones químicas que reduzcan la alta reactividad de estos compuestos a través de componentes antioxidantes. La producción de antioxidantes responde a las necesidades del organismo y se encuentra activamente regulada (Lushchak, 2011; Biller y Takahashi, 2018). El sistema antioxidante posee componentes enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glucosa -6- fosfato deshidrogenasa (G6PD) y componentes no enzimáticos tales como el glutatión reducido (GSH), péptidos de histidina, proteínas unidas al hierro (transferrina y ferritina), ácido dihidrolipoico y ubiquinona (CoQH₂) (figura 1). También se compone de antioxidantes incorporados en la dieta como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina C), micronutrientes (selenio) y compuestos fenólicos, como flavonoides y poliflavonoides (Biller y Takahashi, 2018).

El estado oxidativo puede ser evaluado mediante el uso de biomarcadores que brindan una idea sobre el balance redox y sus alteraciones en el organismo (Lunschack, 2011). Los marcadores de estrés oxidativo se han utilizado para mostrar las respuestas de los organismos acuáticos a varios estresores ambientales tales como fluctuaciones de la temperatura y salinidad, metales pesados, hidrocarburos, pesticidas organoclorados y organofosforados, entre otros. Sin embargo, hay poca información acerca de las respuestas de estos marcadores a infecciones fúngicas, oomicóticas, bacterianas, o parasíticas (Álvarez *et al.*, 2005; Alí *et al.*, 2011; Adeyemi, 2014). El incremento en la concentración de malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la cadena de peroxidación lipídica, es usado como potencial indicador de daño lipídico sobre membranas celulares y como un marcador indirecto de la generación de EROs en peces (Ali *et al.*, 2011). Estos incrementos fueron detectados en trucha arcoíris (Droshnev, 2020), bagre africano, tilapia del Nilo y carpas infectadas naturalmente o en forma experimental con Oomycetes y/o agentes bacterianos (Ali *et al.*, 2011; Adeyemi, 2014; Azimzadeh y Amniattalab, 2017; Baldissera *et al.*, 2020; Solopova *et al.*, 2020). También se observaron alteraciones en los niveles de antioxidantes como el GSH y las enzimas CAT, SOD y GR, catalizadora de la reacción de reducción del GSSG, en tejidos y suero de peces afectados por oomicosis o enfermedades bacterianas. Entre los primeros se encuentran, por ejemplo, los trabajos de Alí *et al.* (2011), Zarhan y Risha (2013) y Azimzadeh y Amniattalab (2017), donde se expusieron o inocularon peces con zoosporas de *Aphanomyces laevis* de Bari, *S. ferax* y *Saprolegnia sp.* en distintos ensayos de laboratorio. Mientras que Zahran *et al.* (2014) y Droshnev (2020) detectaron algunas de estas alteraciones en tilapia del Nilo y trucha arcoíris afectadas por las bacterias *F. columnare* y *Yersinia ruckeri* Ewing, respectivamente.

En este trabajo se evalúan las concentraciones de GSH, GSSG, GR y daño oxidativo a lípidos (TBARS) como indicadores de estrés oxidativo en grupos truchas arcoíris infectadas con *F. psychrophilum* y expuestas a zoosporas de *S. parasitica*.

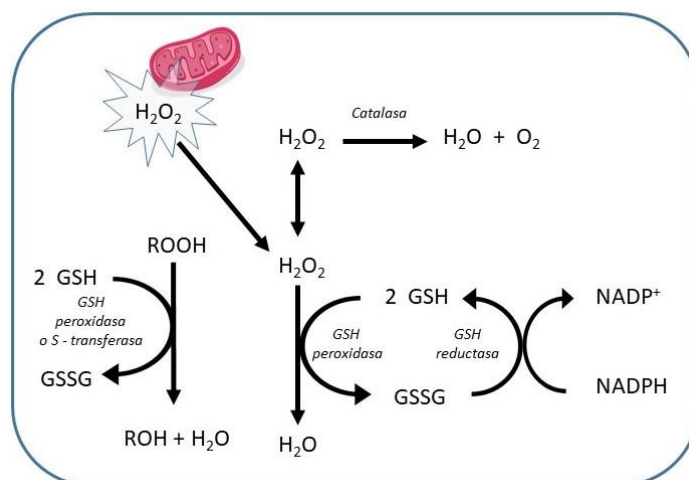


Figura 1. Esquema representativo de las reacciones antioxidantes del GSH. Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2); Glutati6n reducido (GSH); Glutati6n oxidado (GSSG); Hidroper6xidos org6nicos (ROOH); Nicotinamida adenina dinucle6tido fosfato reducido ($NADPH$) y oxidado ($NADP^+$); Adaptado de Denzoin Vulcano *et al.* (2013).

1.4. Mucus-inmunoglobulinas

La epidermis y su secreci6n mucosa representan la primera barrera de los peces contra las infecciones producidas por microorganismos. Las c6lulas mucosas y otras c6lulas epiteliales son responsables de la continua secreci6n de un material viscoso que est6 compuesto principalmente por mucinas (glicoprote6nas), carbohidratos, agua y mol6culas que juegan un importante rol en el sistema de defensa (Dash *et al.*, 2018). El mucus sirve como un componente importante del sistema inmune innato que actúa mediante dos mecanismos b6sicos. Por un lado, la producci6n continua y el constante recambio de mucus en el tegumento previene la adherencia y colonizaci6n de pat6genos, mientras que, por otra parte, el mucus contiene diferentes mol6culas que forman una barrera activa de defensa qu6mica contra agentes bacterianos y pueden inhibir tambi6n la germinaci6n de esporas y el crecimiento oomic6tico (Pickering, 1994; Dash *et al.*, 2018; Reverter *et al.*, 2018). En el mucus se han encontrado distintas mol6culas con propiedades antimicrobianas como glicoprote6nas, enzimas y p6ptidos antimicrobianos y numerosos componentes proteicos relacionados con el sistema inmune como lisozimas, fosfatasa, esterasas, enzimas proteol6ticas, histonas, factores del complemento, lectinas, inmunoglobulinas y prote6nas C-reactivas cuya funci6n es eliminar los pat6genos y

activar la respuesta inmune cuando ocurre una infección (Pickering, 1994; Olabuenaga, 2000; Reverter *et al.*, 2018).

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas altamente especializadas que reconocen una gran variedad de antígenos a partir de diferentes agentes patógenos y reclutan otras células o moléculas para eliminarlos (Yu *et al.*, 2020). En teleósteos se reconocen los isotipos IgM, IgT e IgD, los dos primeros son los de mayor relevancia en la respuesta inmune (Tongsri *et al.*, 2020). En las superficies mucosas de los teleósteos las IgT, IgM evitan que los patógenos se adsorban en el epitelio, median en la neutralización de los patógenos en las células infectadas y promueven la muerte de estos activando la vía del sistema del complemento alternativo (Yu *et al.*, 2020). Estudios previos demuestran el incremento en la concentración de IgT en el mucus de truchas infectadas con parásitos tegumentarios (Xu *et al.*, 2013). Mientras que también en otras superficies mucosas las Igs responden ante la presencia de microorganismos. Tongsri *et al.* (2020) y Dong *et al.* (2020) detectaron aumentos en los niveles de IgT en branquias y mucosa nasal de truchas arcoíris después de la exposición por inmersión a *F. columnare*.

1.5. Leucocitos

Los leucocitos son las células del sistema inmune (tanto innato como adquirido) que se encuentran en la sangre circulante o en los tejidos de los teleósteos. Comprenden distintos tipos celulares (linfocitos, granulocitos y monocitos) que varían en su función y cantidad dependiendo de las especies o condiciones fisiológicas (Fernández *et al.*, 2002). A continuación, se describen los tipos de leucocitos presentes en sangre periférica de salmónidos:

Neutrófilos: son elementos celulares que poseen un núcleo excéntrico, de variado polimorfismo, multilobulado, con gran citoplasma de coloración pálida y presencia de gránulos (Fernández *et al.*, 2002, Roberts, 2012). Participan en la respuesta inflamatoria aguda y poseen actividad fagocítica, producen EROs durante el proceso de estallido respiratorio y enzimas antimicrobianas que participan en la lisis extracelular (Olabuenaga, 2000; Ellis, 2001; Fernández *et al.*, 2002).

Eosinófilos: son células redondeadas con núcleo bilobulado y excéntrico. Citoplasma azulado con gránulos eosinófilos. Rara vez aparecen en sangre de teleósteos, pero se los encuentra frecuentemente en el peritoneo, tracto gastrointestinal y branquias (Olabuenaga, 2000; Fernández *et al.*, 2002;). Intervienen en procesos de inflamación y defensa celular mediante degranulación y liberación de piscidinas e histamina. (Fernández *et al.*, 2002; Rubio-Godoy, 2010).

Monocitos: son células parcialmente diferenciadas que en los tejidos se diferencian en macrófagos y ejercen sus funciones inmunológicas como células fagocíticas maduras (Roberts, 2012). Son leucocitos grandes con citoplasma azul-gris, ocasionalmente vacuolado en el que pueden observarse pseudópodos. Poseen un núcleo de forma variable (redondeado, ovoide o arriñonado) que ocupa de un tercio a la mitad de la célula y posee cromatina dispersa (Fernández *et al.*, 2002). Poseen capacidad fagocítica sobre materiales extraños, inertes, antigénicos o restos celulares, tienen capacidad microbicida intra y extracelular mediante la producción de óxido nítrico y EROs (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo) durante el proceso de estallido respiratorio dependiente del oxígeno (Ellis, 2001; Fernández *et al.*, 2002; Van Muiswinkel, 2006;). En la respuesta específica, reconocen y procesan antígenos, secretan factores solubles que regulan la actividad linfocitaria y transportan los productos fagocitados a los AM, donde se producen interacciones con células responsables de la respuesta específica (Ellis, 2001).

Linfocitos: Son las células altamente diferenciadas y esenciales de la respuesta inmune adquirida. Poseen un núcleo grande y cromatina muy condensada, el citoplasma no contiene gránulos específicos y se presenta como un borde fino, basófilo, alrededor del núcleo. Las células pueden separarse arbitrariamente en “grandes” y “pequeñas” dependiendo de su estado funcional (Olabuenaga, 2000; Fernández *et al.*, 2002; Van Muiswinkel, 2006; Roberts, 2012). Se diferencian en subpoblaciones de linfocitos B y T, y son en su conjunto, los responsables de la respuesta inmune específica humoral y celular. Los linfocitos B se activan con los antígenos y se diferencian en las células plasmáticas que son las productoras de anticuerpos (inmunoglobulinas, Ig). Por otra parte, los linfocitos T, responsables de la inmunidad mediada por células, después de una estimulación

antigénica se diferencian en distintos tipos celulares: células citotóxicas, células con memoria inmunológica y células colaboradoras que liberan factores de la regulación inmunológica como las linfoquinas (Olabuenaga, 2000; Fernández *et al.*, 2002).

El conteo diferencial de leucocitos puede proveer información acerca de la salud y estado inmunológico de los peces. Esto se debe a que la presencia de los tipos celulares y sus valores cuantitativos son influidos por distintos factores intrínsecos y extrínsecos (Rahimi *et al.*, 2015). El conteo diferencial depende de la especie, edad, sexo, estación del año, métodos de cultivo y nutrición, y se lo ha utilizado, entre otros, en la evaluación de los efectos de anestésicos y drogas en acuicultura (Modrá *et al.*, 1998), efectos de la administración de vitaminas (Rahimi *et al.*, 2015) y del fotoperiodo (Valenzuela *et al.*, 2005), infecciones bacterianas (Zorriehzahra *et al.*, 2010), fúngicas (Álvarez *et al.*, 1988), o parasitarias (da Silva Corrêa *et al.*, 2016) así como también para la evaluación del estado fisiológico de peces expuestos a estresores ambientales (da Silva Corrêa *et al.*, 2016).

En este capítulo se estudia el efecto sobre juveniles de trucha arcoíris de la coinfección con los organismos potencialmente patógenos: *F. psychrophilum*, agente causal de la enfermedad bacteriana de agua fría, y *S. parasitica*. Ambos organismos aislados en la piscicultura del CEAN. Se evalúa la susceptibilidad a *S. parasitica* en peces infectados previamente con *F. psychrophilum*, y posibles efectos sinérgicos o antagónicos mediante un experimento de exposición consecutiva bajo condiciones de laboratorio. Se evalúa la incidencia e interacción de ambos patógenos en la mortalidad, variación de los indicadores de estrés oxidativo en el hígado, respuesta inmune en sangre y mucus y alteraciones histopatológicas.

2. HIPÓTESIS

- Las infecciones bacterianas, frecuentes en los sistemas de producción de peces, favorecen la infección por Oomycetes presentes en el ambiente. Estas coinfecciones

tienen efectos sinérgicos sobre parámetros inmunológicos y componentes del sistema del balance oxidativo.

3. OBJETIVOS

- Evaluar la mortalidad y la infección por Oomycetes ocasionada por la infección por *Flavobacterium psychrophilum* y la exposición consecutiva a zoosporas de *Saprolegnia parasitica* en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mikiss*).
- Describir las alteraciones patológicas y evaluar los cambios en las respuestas inmunológicas y bioquímicas medidas en sangre, mucus e hígado de trucha arcoíris infectadas con *F. psychrophilum* y luego expuestas a zoosporas de *S. parasitica*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Las actividades realizadas durante este capítulo se desarrollaron en los laboratorios del Laboratorio de Ecotoxicología Acuática INIBIOMA (CONICET-UNCo-CEAN) y el CEAN.

4.1. *Saprolegnia parasitica*

Para este ensayo se utilizó un cultivo de la cepa *S. parasitica* C22, aislada en la piscicultura del CEAN. Esta cepa fue identificada mediante análisis moleculares (código: OOMAC342-18). En la metodología general y en el capítulo 1 se describen el aislamiento, identificación y método de obtención de zoosporas infectivas.

4.2. *Flavobacterium psychrophilum*

4.2.1. Aislamiento

El aislamiento y cultivo primario de *F. psychrophilum* se realizó a partir de truchas arcoíris provenientes de la piscicultura del CEAN, de una piscicultura localizada en el embalse Alicurá y de un individuo silvestre, proveniente del río Limay. Los peces muestreados, presentaban lesiones dérmicas evidentes, de tipo necrótico, en aletas,

pedúnculo caudal o zona dorsal del cuerpo y alteraciones en el comportamiento como letargia, natación errática o pérdida del equilibrio. La eutanasia de los peces fue realizada mediante un golpe en la cabeza y posterior desmedulación cervical. A continuación, se desinfectó con alcohol 70% la superficie del cuerpo, se realizó la necropsia y se tomaron muestras de riñón. Las muestras de riñón se sembraron en placas de Petri con medio TYES (triptona, extracto de levadura y sales), compuesto por MgSO_4 ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), CaCl_2 ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), triptona (4 g L^{-1}), extracto de levadura ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) y agar (10 g L^{-1}), pH 7,2 (Valdevenito y Avedaño-Herrera, 2009) o medio FLP compuesto por triptona (4 g L^{-1}), extracto de levadura ($0,4 \text{ g L}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), glucosa ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) y agar (10 g L^{-1}), pH 7,4 (Cepeda *et al.*, 2004). Las placas se incubaron por 10 - 14 días a 15 - 20 °C. Las colonias con características morfológicas compatibles con *F. psychrophilum* (redondeadas de color naranja-amarillentas y aspecto brillante y translúcido) se aislaron mediante el repique en nuevas placas con medios de cultivo TYES y FLP. A partir de estas placas se obtuvieron las bacterias para caracterizar fenotípicamente los aislados, realizar la identificación por PCR y conservar a -30 °C en medio crioprotector. Las cepas aisladas se denominaron FP01, FP02, FP03, FP04 y FP05.

4.2.2. Identificación

Los ensayos por PCR para la identificación de los cultivos se llevaron a cabo de acuerdo a la siguiente metodología: la extracción de ADN se realizó con Chelex® 100 resin (Bio-Rad) 5%, según el método descrito por Izumi *et al.* (2003). Para la amplificación de las secuencias génicas específicas se utilizaron, en reacciones separadas, 2 pares de *primers*: FP1 - FP3 (del Cerro *et al.*, 2002) y fpPPIC1F - fpPPIC1R (Yoshiura *et al.*, 2006) (tabla 1). La amplificación se realizó con un total de 25 μL de mezcla de reacción, que contenía 2,0 μL de ADN purificado, 1,0 μL de cada primer, 12,5 μL de GoTaq® Hot Start Green Master Mix (Promega) y 8,5 μL de Ultra Pure™ TAE Buffer (Invitrogen™). La cepa *F. psychrophilum* NCIMB1947T fue utilizada como referencia y control positivo, mientras que como control negativo se utilizó 2 μL de Chelex® 100 (Bio-Rad).

Tabla 1. Secuencias de los *primers* que se utilizaron en la identificación de los aislados bacterianos.

| Nombre | Gen | Secuencia (5´ a 3´) | Producto esperado | Referencia |
|----------|----------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|
| FP1F | 16S rDNA | CTTAGTTGGCATCAACAC | 971 pb | del Cerro <i>et al.</i> , 2002 |
| FP3R | | ACACTGGCAGTCTTGCTA | | |
| fpPPIC1F | ppiC | GTACCATGATACAGTCAGGTTTTTATACCA | 346 pb | Yoshiura <i>et al.</i> , 2006 |
| fpPPIC1R | | GCGTTTTTAAATCCAACCTCTTGCTTCG | | |

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando un termociclador Mastercycler® nexus (Eppendorf), donde se aplicaron los siguientes programas de ciclado:

- *Primers* FPR1F y FP3R (del Cerro *et al.*, 2002): precalentamiento a 94 °C, una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de amplificación (desnaturalización 95 °C por 15 s, hibridación 60 °C por 30 s, y extensión a 72 °C por 1 min); y un periodo de elongación final a 72 °C por 5 min,
- *Primers* fpPPIC1F - fpPPIC1R (Yoshiura *et al.*, 2006): precalentamiento a 94 °C, una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de amplificación (desnaturalización 95 °C por 15 s, hibridación 60 °C por 30 s, y extensión a 72 °C por 30 s); y un periodo de elongación final a 72 °C por 5 min.

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 2%, teñidos con solución de bromuro de etidio y se observaron y fotografiaron con un Transiluminador UVP y el Sistema de Imágenes Photo Doc-It™ (UVP). Las cepas identificadas como *F. psychrophilum* se conservaron a -30 °C en solución de glicerol al 30% como agente crioprotector.

4.2.3. Caracterización fenotípica

Se examinaron las características morfológicas y bioquímicas de las colonias en crecimiento, tales como forma, pigmentación, tinción de Gram, reacción con KOH al 3%, morfología celular, movilidad y actividad de catalasa en 3% (v/v) de H₂O₂ y actividad oxidasa (Bactident® Oxidasa - MERCK MILLIQPORE) de acuerdo a lo propuesto por Bernardet *et al.* (2002) y Valdebenito y Avendaño-Herrera (2009).

4.2.4. Hidrólisis de gelatina

Para comparar el potencial infectivo de las cepas aisladas se realizaron ensayos *in vitro* de hidrólisis de gelatina, que indican su capacidad de producir enzimas proteolíticas que licúan el colágeno. Se realizó el método cuantitativo modificado de Ostland *et al.* (2000) y Soule *et al.* (2005). Se partió de un cultivo líquido en fase log, ajustado a una densidad óptica de 0,5 abs (a 512 nm). Se sembraron una gotas de 5 µL de diluciones seriadas de cultivo (10^0 - 10^4) sobre agar FLP suplementado con 4% de gelatina y se incubó por 48 horas a 18 °C. Para visualizar la zona de hidrólisis, se agregó una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 30% y se registró la presencia/ausencia de licuefacción del medio de cultivo en el lugar de la siembra para cada cepa/dilución. Se utilizó medio estéril como control negativo y colagenasa (30 U), como control positivo.

4.2.5. Curva de crecimiento

A partir de una alícuota de la cepa FP05 conservada en solución con glicerol a -30 °C se elaboró una curva de crecimiento para la estimación de la concentración bacteriana por espectrofotometría (turbidez a 512 nm), que abarcó la fase de adaptación o latencia, la fase exponencial y la fase estacionaria.

Se prepararon 4 repiques de la cepa FP05, previamente descongelada, en Erlenmeyer con 100 mL de medio líquido (FLP). Los cultivos se incubaron a 15-20 °C con agitación constante (en agitador plano orbital Biomit BM021). En forma periódica, se tomaron alícuotas de 1 mL (por duplicado), y se midió la ABS a 512 nm en espectrofotómetro (Shimadzu UV-1201). A partir de estos datos, se elaboró una curva de crecimiento para esta cepa, aplicando un modelo de ajuste no lineal (modelo logístico, $r^2=0.99$, suma de cuadrados=0.034) (figura 2).

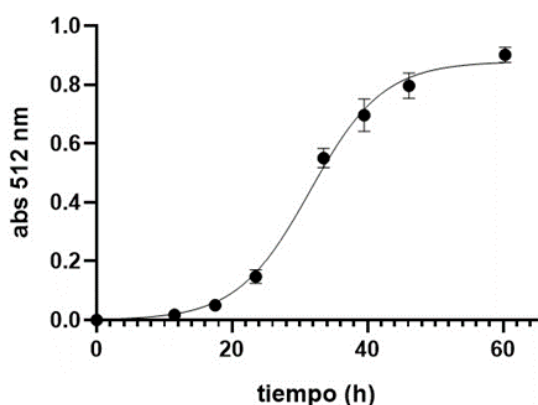


Figura 2. Curva de crecimiento de la cepa FP05 en medio FLP. Absorbancia medida a 512 nm. Los valores están expresados como media \pm error estándar, $n=3$.

4.2.6. Recuento celular

Se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) por dilución seriada en placas, que consiste en realizar diluciones seriadas 1:10 y sembrar en superficie 100 μ L de cada dilución en una placa con medio agarizado FLP, e incubar por un máximo de 10 días, hasta que las colonias sean apreciables para su recuento. Este procedimiento se realizó sobre 4 réplicas de cultivo líquido de FP05, que se midieron en fase de crecimiento exponencial (0,199, 0,395, 0,68 y 0,99 de ABS inicial a 512 nm, respectivamente). La cantidad de bacterias cultivables en placa luego de este proceso, permitió establecer una correlación lineal entre las UFC mL^{-1} y la ABS medida en ese intervalo (regresión lineal, $r^2 = 0,98$, pendiente = $4,8 \times 10^8$) (figura 3).

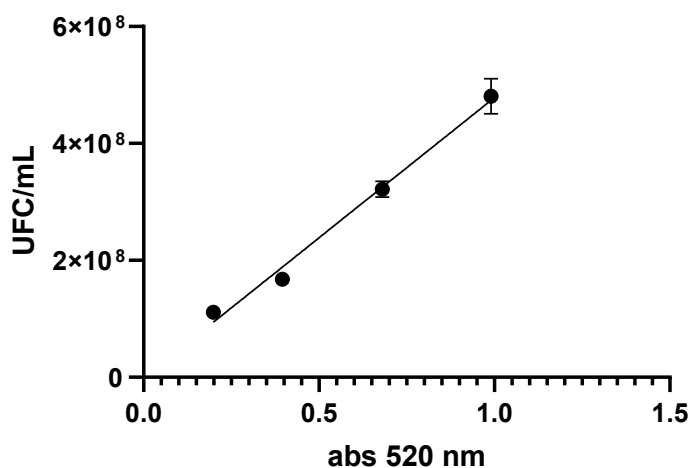


Figura 3. Curva de calibración de absorbancia vs UFC mL^{-1} para FP05. Regresión lineal, $r^2 = 0,98$; pendiente = $4,8 \times 10^8$

4.3. Diseño experimental

Se colocaron grupos de 22 peces de $5,4 \pm 0,1$ g de peso (media \pm error estándar) en 12 acuarios de 55,0 L con provisión constante de agua a 14-20 °C. Se establecieron 4 tratamientos con 3 réplicas cada uno, donde cada uno de los 12 acuarios correspondió a una réplica. Se realizó la inyección intramuscular de un inóculo de *F. psychrophilum* FP05 y posteriormente, la exposición de los peces a zoosporas de *S. parasitica* C22. Los tratamientos empleados fueron los siguientes:

- T₀: Inyección intramuscular de 10 μ L de medio líquido FLP.
- T₁: Inyección intramuscular de medio líquido FLP + exposición a $5,0 \times 10^5$ zoosporas L⁻¹ de *S. parasitica* C22.
- T₂: Inyección intramuscular de 10 μ L de inóculo de *F. psychrophilum* FP05 con $1,81 \times 10^8$ UFC en medio líquido FLP.
- T₃: Inyección intramuscular de 10 μ L de inóculo de *F. psychrophilum* FP05 con $1,81 \times 10^8$ UFC en medio líquido FLP + exposición a $5,0 \times 10^5$ zoosporas L⁻¹ de *S. parasitica* C22.

La inoculación de las suspensiones se realizó con jeringa de precisión y aguja hipodérmica descartable, en la zona dorsal del cuerpo, a 2-3 mm sobre la línea lateral y por delante de la aleta dorsal. Los peces se retiraron del agua y se mantuvieron en frío sobre un paño húmedo y hielo, se inyectaron e inmediatamente se devolvieron a los acuarios para su recuperación. La cantidad de células de *F. psychrophilum* FP05 inoculadas ($1,81 \times 10^8$ UFC) se estimó mediante la medición de la absorbancia (0,38 ABS) del cultivo en medio líquido FLP al momento de la extracción de las alícuotas para inocular y el posterior cálculo según la ecuación de la recta obtenida en la sección anterior:

$$UFC = 4,8 \times 10^8 * ABS - 1,19 \times 10^6$$

La exposición a las zoosporas de C22 en suspensión, se realizó 24 h después de la inyección de FLP con y sin bacterias en suspensión (figura 4). La cantidad de zoosporas por acuario ($5,0 \times 10^5$ zoosporas L⁻¹) se estimó mediante recuento en cámara de Neubauer

según lo mencionado en la sección de metodología general. Durante las 24 h siguientes se suprimió el ingreso de agua al sistema de acuarios para evitar el lavado de las zoosporas. Durante este lapso se realizó la oxigenación de los acuarios mediante un sistema de bombeo conformado por una bomba de aire de tipo industrial conectada a mangueras plásticas de distribución con válvulas reguladoras y piedras difusoras. Luego se restableció la circulación de agua y se mantuvo de esta manera hasta el final del ensayo. A partir del día 2, los peces se mantuvieron en los acuarios con provisión constante de agua. Se registró la mortalidad e infección oomicótica observada macroscópicamente. Para evaluar los efectos subletales causados por exposición a los patógenos, los peces sobrevivientes se muestrearon luego del quinto día de comenzado el ensayo. El muestreo se realizó en forma desfasada, se procesó una réplica (acuario) por día por cada tratamiento, de esta forma, el total del muestreo se completó en tres días sucesivos. Los resultados reflejan el estado fisiológico de los peces supervivientes en el periodo ensayado.

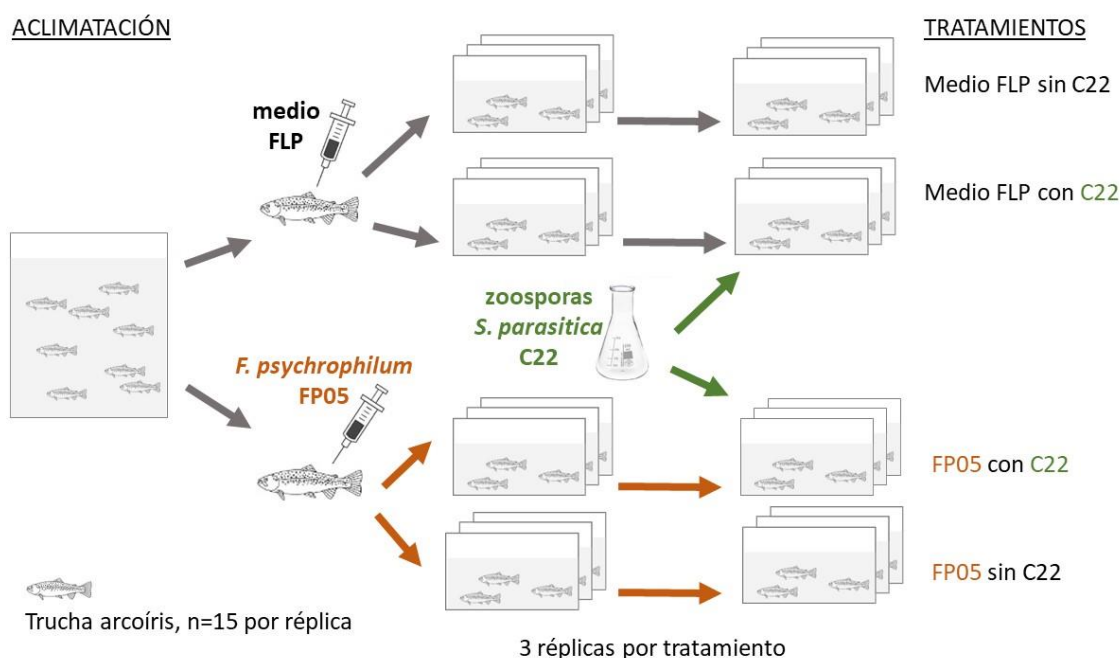


Figura 4. Esquema del sistema experimental utilizado para el ensayo de coinfección con *F. psychrophilum* FP05 y zoosporas de *S. parasitica* C22. La exposición a las zoosporas se realizó sobre peces inyectados y no inyectados con *F. psychrophilum* FP05.

4.4. Procedimiento de muestreo y análisis

4.4.1. Determinación de inmunoglobulinas en mucus

Se utilizaron 9 peces por réplica (= acuario) por tratamiento con el fin de determinar los contenidos de inmunoglobulinas (Ig) en el mucus de los peces. Las muestras de cada réplica se agruparon en grupos de 3 peces cada uno. Se colocaron de a 3 peces en una bolsa de polipropileno transparente con 1 mL de buffer salino tris estéril (TBS, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5), por cada 3 g de pez. Los peces fueron masajeados suavemente durante 30 segundos para estimular la liberación de mucus. La muestra se trasvasó a un tubo de Kant de vidrio, se la homogenizó con pipeta Pasteur y se la centrifugó a 500 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se conservó a -30 °C.

Para estimar la cantidad de inmunoglobulinas presentes en las muestras se utilizó el ensayo de precipitación de complejos inmunes con polietilenglicol (PEG). El PEG precipita complejos antígeno-anticuerpo grandes, incluyendo Igs agregadas y monoméricas. Se realizaron mediciones de proteínas totales sobre una fracción de la muestra original y sobre otra fracción de la muestra mezclada con solución de PEG para precipitación de Igs. El contenido de Igs (mg mg prot^{-1}) en la muestra se estimó como el cociente entre estas dos mediciones.

Las muestras se descongelaron y se separaron en 2 volúmenes por muestra. Un volumen se mezcló con la solución de PEG 12% (1:1) (Solución de PEG 12% (PEG 6000, p/v) en Buffer TRIS-HCl 100 mM, pH 8 (1,211 g de TRIS en 100 mL de H₂O destilada), en tubos eppendorf de 1,5 mL y luego se incubaron a temperatura ambiente, con agitación constante (agitador al máximo), durante 2 horas. A continuación, se centrifugaron a 5000 x g durante 10 min. La cantidad de proteínas totales se midió luego mediante una adaptación del método de Bradford (1976) con modificaciones de Ernst y Zor (2010) a partir del sobrenadante de esta muestra y del volumen reservado al comienzo. Se utilizó la misma curva patrón para las muestras con y sin precipitación con PEG. Se realizó una curva de calibración con seroalbúmina bovina (BSA) 1 mg mL⁻¹ tomando lecturas en espectrofotómetro a 595 nm y 465 nm.

4.4.2. Recuento diferencial de leucocitos

Se colectaron muestras de sangre periférica mediante punción caudal con jeringa de 1 mL y aguja de 0,6 mm diám., la cual fue enjuagada previamente con heparina. Se extrajeron aproximadamente 30 μL de sangre por individuo, los que se agruparon en grupos de a 3 en microtubos de 1,5 mL. A continuación, las muestras se diluyeron en una proporción de 1:3 con PBS 0,01 M, pH = 7,2 (PBS) y 0,3 mL se cargaron sobre 1,68 mL de una solución de Percoll de densidad 1,075 g mL^{-1} (Pettersen, 1995). Cada tubo se centrifugó a 800 x g 40 min a 4 °C, las células de la interfase se colectaron con pipeta Pasteur y se lavaron en PBS mediante la centrifugación a 400 x g durante 10 min, a 4 °C. Finalmente, las células se resuspendieron en PBS, a partir de donde se realizaron frotis en portaobjetos, los cuales se colorearon con Wright-Giemsa. Se contabilizaron un total de entre 150 - 190 leucocitos por frotis, incluyendo linfocitos, monocitos, eosinófilos y neutrófilos y se estimó el porcentaje de cada tipo celular por tratamiento.

4.4.3. Análisis bioquímicos

Para los análisis bioquímicos se utilizaron 3 individuos por réplica (=acuاریo) por tratamiento. Al final del experimento, los peces se retiraron de los acuarios y se sacrificaron mediante un golpe en la cabeza e inmediata desmedulación en frío. Luego se realizó la necropsia en una bandeja refrigerada. Se seccionaron entre 0,03 y 0,1 g de hígado por pez y se conservaron a -30 °C hasta su uso. Las muestras se homogenizaron en buffer PiK (K_2HPO_4 143 mmol L^{-1} + EDTA 6,3 mmol L^{-1} , pH 7,5), durante 1 min con un homogenizador Cole-Parmer LabGen 7 a 35000 rpm y centrifugaron a 12000 rpm (9700 x g) durante 15 min, a 4 °C. El sobrenadante se fraccionó en alícuotas en tubos, de acuerdo a cada determinación, y se guardó a -30 °C, durante un periodo no superior a una semana.

4.4.3.1. Glutati3n reducido (GSH)

Para determinar la concentraci3n de GSH se utiliz3 la t3cnica de Ellman (1959), con modificaciones de Venturino *et al.* (2001), que cuantifica la formaci3n de 2-nitro-5-thiobenzoato (TNB^{2-}) a partir de la reacci3n del grupo tiol (SH) del GSH con el reactivo

DTNB. Los sobrenadantes se desproteinizaron con la adición de partes iguales de ácido 5-sulfosalicílico (SSA) 10% y se centrifugaron a 10000 x g durante 10 min, a 4 °C. Para la medición se incubaron 100 µL de sobrenadante y 300 µL de solución de DTNB 2,6 mmol L⁻¹, durante 5 min. En paralelo, se confeccionó una curva de calibración de GSH que abarcó concentraciones de 1 nmol L⁻¹ a 16 nmol L⁻¹. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro UV-visible a 412 nm en cubeta de vidrio de 400 µL. Las mediciones se realizaron por duplicado y se refirieron a la concentración de proteína total de la muestra. El contenido de GSH se calculó acorde a la Fórmula 1 y se expresó como nmol GSH mg proteína⁻¹.

Fórmula 1:

$$\text{Contenido GSH} = \frac{(\text{ABS muestra-ABS blanco}) \times \text{Factor} \times \text{Dilución}}{\text{Vol. muestra} \times \text{mg proteína mL}^{-1}}$$

Factor = 1/ pendiente de la curva de calibración de GSH.

4.4.3.2. Glutación total

Para determinar el contenido de glutación total se utilizó una técnica de reducción de GSSG a GSH, en una reacción catalizada por la enzima GR, para luego utilizar la técnica de Ellman (1959), con modificaciones de Venturino *et al.* (2001), como se explicó en la sección anterior. Se incubaron 50 µL de sobrenadante con 10 µL de solución NADPH (2,1 mmol L⁻¹), 10 µL de solución GR (5 U mL⁻¹) y 30 µL de buffer PiK (143 mmol L⁻¹ + EDTA 6,3 mmol L⁻¹ a pH 7,5) en tubos de 1,5 mL, por duplicado, durante 30 min. Con el objeto de detener la reacción, se agregaron 100 µL de SSA 10% y a continuación los tubos se centrifugaron a 10000 x g durante 10 min, a 4 °C. La concentración de GSH se estimó con la técnica y la fórmula que se describieron en la sección anterior. Para control de la reacción se confeccionó una curva de GSSG.

4.4.3.3. Determinación del contenido de GSSG y relación GSH/GSSG

Una vez estimadas las concentraciones de GSH y glutatión total se determinaron los contenidos de GSSG y la relación GSH/GSSG. El contenido de GSSG se calculó despejando la fórmula: Glutatión total = GSH + 2 GSSG.

4.4.3.4. Glutatión Reductasa (GR)

La actividad de la enzima GR se determinó de acuerdo a Schaedle y Bassham (1977), con modificaciones de Venturino (2001). Mediante esta técnica se cuantifica el consumo en el tiempo del NADPH, que se oxida a NADP⁺, cuando participa como cofactor en la reacción de reducción de GSSG a GSH, catalizada por la enzima GR. En primer lugar, se realizó un blanco por cada muestra para determinar el consumo inespecífico de NADPH. Para ello, por cada medición, se mezclaron 340 μL de buffer de reacción (NADPH 0,13 mmol L⁻¹ en buffer PiK) y 50 μL de sobrenadante, y se registró la absorbancia a 340 nm, cada 15 s durante 5 min. Luego, se agregaron 10 μL de solución de GSSG (10 mmol L⁻¹) para iniciar la reacción específica de la enzima GR y se registró la absorbancia durante 5 min, cada 15 s. Este procedimiento se realizó por duplicado. Los cálculos se realizaron en base a la pendiente que se obtiene de la regresión lineal de absorbancia en función del tiempo, tanto para el blanco de reacción como para la medición de la actividad específica de GR en la muestra. La actividad enzimática se calculó de acuerdo a la Fórmula 2 y se expresó como nmol s⁻¹ mg proteína⁻¹.

Fórmula 2:

$$\text{Actividad GR} = \frac{(\text{Pendiente muestra} - \text{Pendiente blanco muestra}) \times \text{Vol. cubeta}}{\text{Vol. muestra} \times \epsilon \times \text{Camino óptico} \times \text{mg proteína mL}^{-1}}$$

ϵ = coeficiente de extinción molar del NADPH = 6220 mmol⁻¹ L⁻¹ cm⁻¹

Camino óptico = 1 cm

4.4.3.5 Daño oxidativo a lípidos

Como indicador de daño oxidativo a lípidos se utilizó el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). El malondialdehído (MDA), producto final de la oxidación de ácidos grasos poli-insaturados, sirve como un índice conveniente para determinar el alcance de la reacción de peroxidación lipídica (Beuge y Aust, 1978). El MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico en medio ácido, en caliente, para dar un compuesto color rosa con un pico de absorción a 532 nm. Esta reacción se puede cuantificar según el protocolo de Beuge y Aust (1978). Para la reacción, se mezclaron 150 μL de sobrenadante con 150 μL de buffer PiK y 500 μL de buffer de reacción (TCA 15%, TBA 26 mmol L^{-1} , HCl 2% y BHT 100 mmol L^{-1}). Cada muestra se incubó por triplicado durante 15 min a 95 $^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se centrifugaron a 11000 x g durante 15 min. A partir del sobrenadante se midió la absorbancia en una cubeta de vidrio de 400 μL a 532 nm. El contenido de TBARS en las muestras se calculó de acuerdo a la Fórmula 3 y se expresó como $\mu\text{mol mg proteína}^{-1}$.

Fórmula 3:

$$\text{Contenido de TBARS} = \frac{(\text{ABS muestra-ABS blanco}) \times \text{Vol. cubeta}}{\text{Vol. muestra} \times \epsilon \times \text{Camino óptico} \times \text{mg proteína mL}^{-1}}$$

ϵ = coeficiente de extinción molar del MDA= $1,56 \times 10^5 \text{ mmol}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Camino óptico= 1 cm.

4.4.3.6 Contenido de Proteínas

Se utilizó el contenido de proteínas solubles para estandarizar y referir los resultados de las mediciones de GSH, glutatión total y TBARS. Se utilizó el método de Lowry (1951), que se basa en la reacción del Cu^+ (producto de la oxidación de los enlaces peptídicos) con el Reactivo de Folin-Ciocalteu. El producto de la reacción se puede cuantificar en espectrofotómetro UV-visible.

Se mezclaron alícuotas de 5, 10 y 15 μL de cada muestra con 95, 90 y 85 μL de agua destilada (respectivamente), 100 μL de solución NaOH 0,2 eq L^{-1} y 1000 μL de solución de Lowry (Na_2CO_3 2%; CuSO_4 0,5%; Tartrato de potasio 1%, en NaOH 0,1 eq L^{-1}). y se incubaron por 10 min a 25 °C. A continuación, se agregaron 100 μL de solución de Folin-Ciocalteu y se incubaron nuevamente por 30 min, a 25 °C. La absorbancia se midió inmediatamente en una cubeta de vidrio de 1 mL, a 750 nm. La concentración de proteínas solubles de cada muestra se calculó de acuerdo a la Fórmula 4 y se expresó como mg proteína mL^{-1} .

Fórmula 4:

$$\text{Concentración de proteínas} = \frac{(\text{ABS muestra} - \text{ABS blanco}) \times \text{Factor}}{\text{Vol. muestra.}} \times \text{Dilución}$$

4.5. Análisis histológico

Al final del ensayo se tomaron muestras de tres peces por tratamiento elegidos de manera aleatoria. De estos peces, se extrajeron muestras de tegumento, musculatura, bazo, hígado y riñón. Las muestras de tejidos se fijaron y procesaron mediante técnicas histológicas convencionales y se colorearon con Hematoxilina-Eosina, acorde a lo descrito en la metodología general. Los preparados histológicos se observaron al microscopio a 10X, 20X, 40X y 100X. En cada caso, se registraron las alteraciones patológicas observadas y se estimó, además, el porcentaje ocupado por los agregados de macrófagos (AM) y macrófagos pigmentados, según fue descrito en el capítulo 2.

4.6. Análisis estadístico

La normalidad de la varianza se analizó con el test de Kolmogorov-Smirnov mientras que se realizó el test de Spearman para evaluar heterocedasticidad y/o el test de Levene para homogeneidad según el caso. Las diferencias entre tratamientos se probaron mediante ANOVA de dos factores. Para las comparaciones entre tratamientos se usó el test *a posteriori* de Tukey. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con $p \leq 0,05$. Para el análisis estadístico de los casos en que se comparan porcentajes, se

utilizó la transformación del arcoseno de la raíz de la proporción. Los resultados se expresan como media \pm error estándar.

5. RESULTADOS

5.1. Aislamiento, caracterización fenotípica e identificación

En las placas con medio FLP sembradas con muestras de riñón, se observó el crecimiento de colonias bacterianas de morfología y pigmentación compatible con *F. psychrophilum*. Se observaron colonias redondeadas de entre 2 y 4 mm diám., de aspecto brillante, translúcido y con pigmentación naranja amarillenta. A partir de estas, se seleccionaron y repicaron 5 colonias en nuevas placas con FLP, para caracterizarlas fenotípicamente e identificarlas por PCR (figura 5, tabla 2).

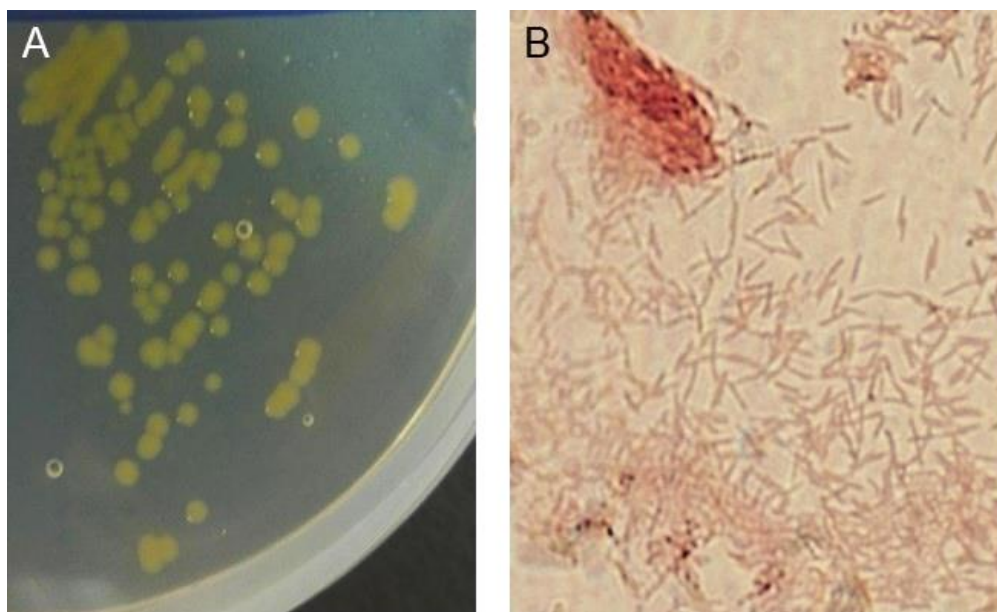


Figura 5. a) Colonias de *Flavobacterium psychrophilum* en placa con medio de cultivo FLP. Las colonias se observan de forma redondeada, de 2 a 4 mm diám., de color amarillento y aspecto brillante. b) Bacilos de *F. psychrophilum* coloreados con tinción de Gram. Los bacilos se colorean débilmente con la solución de contraste (safranina) y se consideran Gram negativos.

Tabla 2. Características fenotípicas de los aislados bacterianos obtenidos a partir de muestras de riñón de truchas arcoíris enfermas.

| Características fenotípicas | | | | | | | |
|-----------------------------|---------|------|------|------------|-----------|----------|---------|
| Cepa | Origen | Gram | Morf | Reacc. KOH | Movilidad | Catalasa | Oxidasa |
| FP01 | Alicura | - | b | + | | | |
| FP02 | CEAN | - | b | + | - | - | - |
| FP03 | CEAN | - | b | + | - | + | - |
| FP04 | CEAN | - | b | + | - | + | - |
| FP05 | Limay | - | b | + | - | - | - |

+ Reacción positiva

- Reacción negativa

b Bacilos

5.1.1. Hidrólisis de la gelatina

Las cepas FP02, FP03, FP04 y FP05 demostraron capacidad de hidrólisis sobre la gelatina. Entre éstas, la cepa FP05, aislada de una trucha arcoíris silvestre, fue la única que presentó actividad colagenasa en la dilución 10^4 (tabla 3).

Tabla 3. Actividad colagenasa de los aislados bacterianos.

| Cepa | Dilución | | | | |
|-------------|----------|--------|--------|--------|--------|
| | 10^0 | 10^1 | 10^2 | 10^3 | 10^4 |
| FP01 | - | - | - | - | - |
| FP02 | + | + | + | + | - |
| FP03 | + | + | + | + | - |
| FP04 | + | + | + | + | - |
| FP05 | + | + | + | + | + |
| FLP estéril | - | - | - | - | - |
| Colagenasa | + | + | + | + | + |

+ Reacción positiva

- Reacción negativa

5.1.2. Identificación por PCR y selección de la cepa para el ensayo

Las cepas denominadas FP01, FP02 y FP05 resultaron positivas en el ensayo de PCR realizado con los *primers* fpPPIC1F y fpPPIC1R (Yoshiura et al., 2006) y FP1 y FP2 (del Cerro et al., 2002) y por lo tanto fueron confirmadas como *F. psychrophilum* (figura 6). Para la elección de la cepa a utilizar en el ensayo de exposición consecutiva, se tuvo en cuenta, además, la capacidad proteolítica de los diferentes aislados. Por este motivo se

descartó a la cepa FP01 (no produjo la hidrólisis de la gelatina aún en el inóculo sin diluir) y se seleccionó la cepa FP05 por ser la única que presentó actividad colagenasa a la máxima dilución.

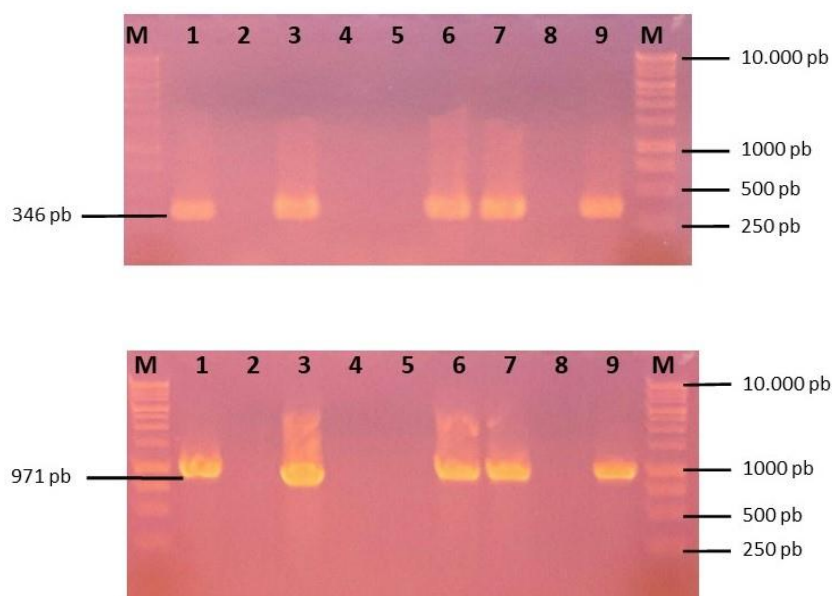


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados por PCR. Arriba, productos amplificados con los *primers* fpPPIC1F y fpPPIC1R (Yoshiura et al., 2006). Abajo, productos amplificados con los *primers* FP1 y FP2 (del Cerro et al., 2002). Líneas M, Marcador molecular de 1kb; Líneas 1 y 9, control positivo; Líneas 2 y 8, control negativo; Línea 3, FP01; Línea 4, FP02; Línea 5, FP03; Línea 6, FP04; Línea 7, FP05. Las cepas FP01, FP02 y FP05 fueron consideradas positivas para *Flavobacterium psychrophilum*.

5.2. Ensayo de exposición consecutiva

5.2.1. Mortalidad e infección

Se observó un efecto significativo del factor “FP05” en la mortalidad de los peces (ANOVA de dos vías, $p < 0,001$). Los grupos de peces inyectados con *F. psychrophilum* FP05, con y sin exposición a zoosporas de *S. parasitica* C22 tuvieron una mortalidad significativamente mayor que los grupos de peces no inyectados. El tercer día post inyección se observaron los primeros peces muertos y/o moribundos en estos lotes y la mortalidad aumentó rápidamente hacia el quinto día (figura 7). Por otra parte, sólo se observó infección oomicótica, presencia de micelio observado como una masa algodonosa de color blanquecino, en un pez del grupo de peces inyectados con *F. psychrophilum* FP05 y expuestos a zoosporas de *S. parasitica* C22. Debido al rápido incremento de la

mortalidad se decidió comenzar el muestreo de los peces el sexto día después del día de la inyección con *F. psychrophilum* FP05.

Tabla 4. Porcentajes de mortalidad e infección por *S. parasitica* C22 en grupos de peces al 5to día después de la inyección intramuscular de 10 µL de $1,81 \times 10^8$ UFC de FP05 *F. psychrophilum* en medio líquido FLP y exposición a $5,0 \times 10^5$ zoosporas L⁻¹ de *S. parasitica* C22. Los valores están expresados como media ± error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de 2 factores; $p < 0,001$).

| Tratamiento | % mortalidad | | % infección | |
|-------------|----------------------------|-------------------|--------------|----------|
| | FP05 | Sin FP05 | FP05 | Sin FP05 |
| C22 | 30,00 (±2,88) ^a | 0,00 ^b | 1,67 (±1,67) | 0,00 |
| Sin C22 | 31,67 (±4,41) ^a | 0,00 ^b | 0,00 | 0,00 |

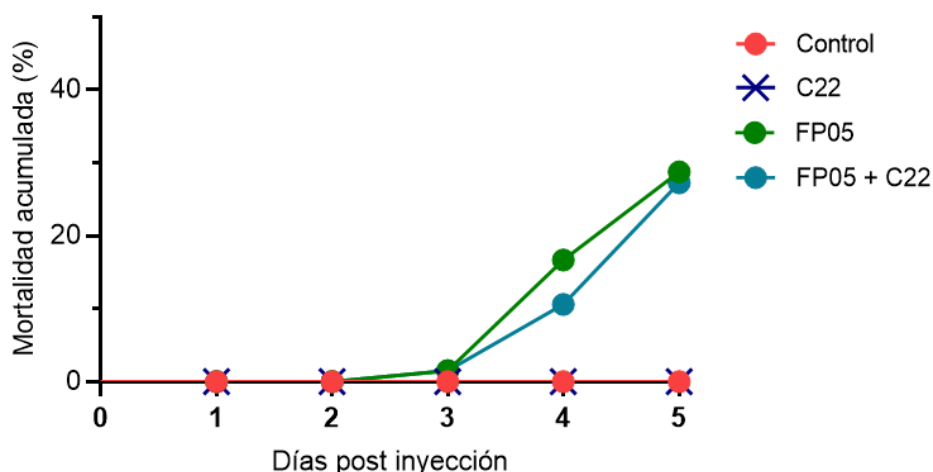


Figura 7. Mortalidad acumulada en truchas arcoíris después de la inyección intramuscular de 10 µL de $1,81 \times 10^8$ UFC de *F. psychrophilum* FP05 en medio líquido FLP y exposición a $5,0 \times 10^5$ zoosporas L⁻¹ de *S. parasitica* C22.

5.2.2. Alteraciones macroscópicas

En los peces inyectados con *F. psychrophilum* FP05, con y sin exposición a zoosporas de *S. parasitica* C22, se observaron alteraciones patológicas relevantes. Los peces presentaron un oscurecimiento general del tegumento mientras que la zona próxima al sitio de inyección se observó hinchada, edematosa, con el tegumento delgado, pálido y una evidente pérdida de escamas. La lesión mostró un aspecto fluctuante al tacto y al seccionarla se observó necrosis muscular y presencia de líquido sanguinolento. En

algunos casos el sitio de inyección presentó lesiones de tipo ulcerativo, con pérdida del tegumento y exposición de la musculatura al medio externo. Por otra parte, los peces inyectados con medio FLP, sin *F. psychrophilum* FP05, no presentaron alteraciones macroscópicas en el sitio de inyección ni en el resto del cuerpo (figura 8).

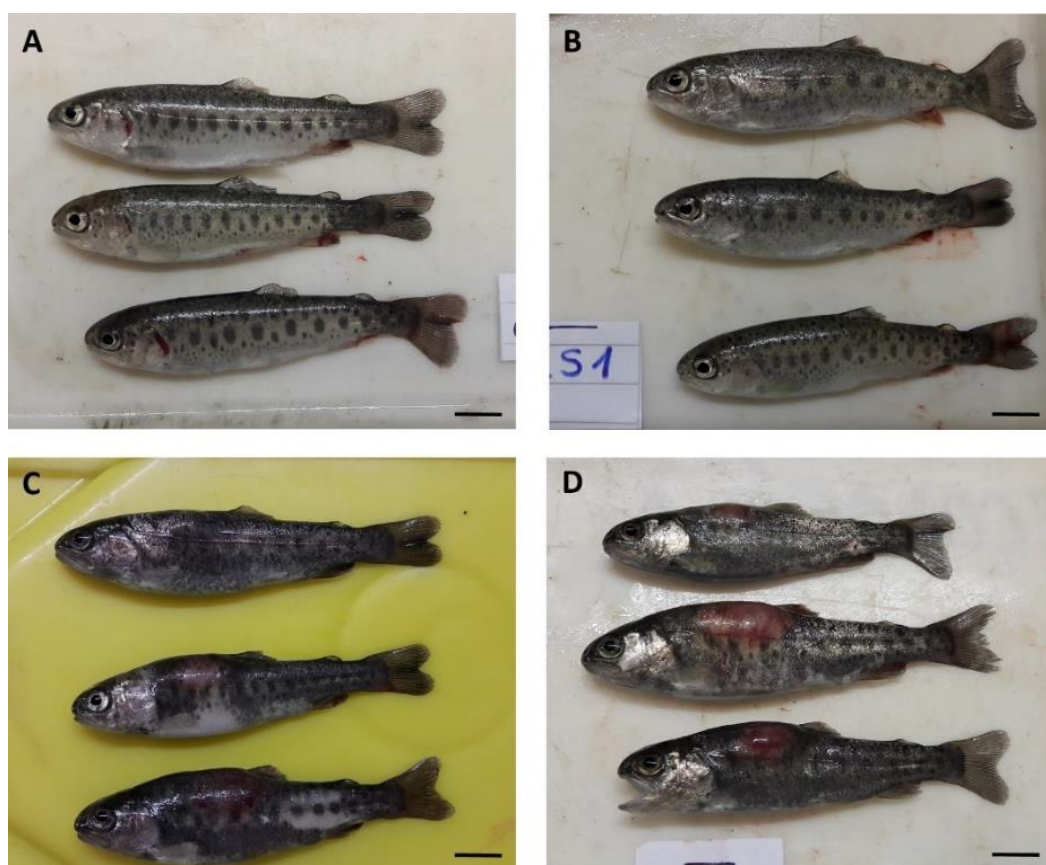


Figura 8. Truchas arcoíris muestreadas al final del ensayo. Los peces inyectados con medio FLP (A) y del grupo inyectados con medio FLP y expuestos a *S. parasitica* C22 (B) no presentaron lesiones externas. Por el contrario, los peces inyectados con *F. psychrophilum* FP05 con o sin exposición a *S. parasitica* C22 (C y D respectivamente) mostraron edema, decoloración y pérdida de escamas en el sitio de inyección. Barra de escala = 1 cm.

5.2.3. Contenido de inmunoglobulinas (Igs) en mucus

El contenido de Igs en mucus fue menor en los grupos de peces inyectados con *F. psychrophilum* FP05, independientemente de la exposición a *S. parasitica* C22 (ANOVA de dos factores, $p < 0,01$ para el factor “FP05”) (figura 9).

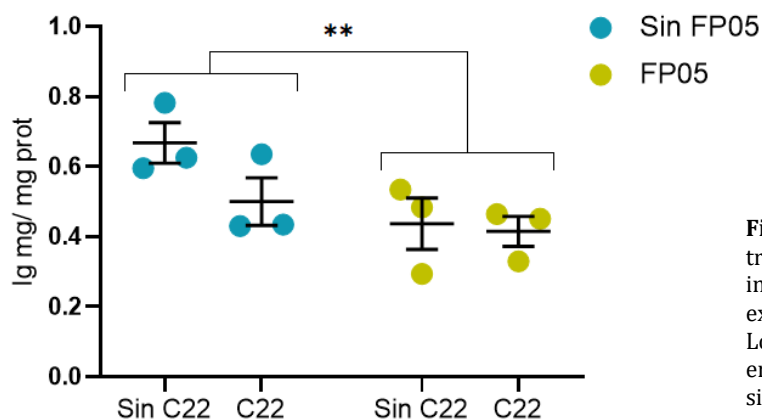


Figura 9. Contenido de Igs en mucos de truchas arcoíris tratadas mediante inyección con *F. psychrophilum* FP05 y expuestas a zoosporas de *S. parasitica* C22. Los valores están expresados como media \pm error estándar. ** indica diferencias significativas ($p < 0,01$).

5.2.4. Conteo diferencial de leucocitos

El porcentaje de monocitos en las muestras de sangre fue afectado por la inyección de *F. psychrophilum* FP05 (ANOVA de dos factores, $p < 0,001$ para el factor “FP05”). Estos peces tuvieron, en la fórmula leucocitaria un porcentaje de monocitos mayor que los peces no inyectados con *F. psychrophilum* FP05, independientemente de la exposición a zoosporas de *S. parasitica* C22 (figura 10 A).

La exposición de los peces a zoosporas de *S. parasitica* C22 tuvo un efecto significativo en el porcentaje de neutrófilos calculado en el conteo diferencial de leucocitos (ANOVA de dos factores, $p < 0,01$ para el factor “C22”). El porcentaje de neutrófilos disminuyó con respecto a los peces no expuestos a las zoosporas (figura 10 B).

La interacción entre *F. psychrophilum* FP05 y *S. parasitica* C22 tuvo un marcado efecto en la cantidad de linfocitos en sangre. El resultado de ANOVA de dos factores muestra una interacción significativa ($p < 0,001$) entre los factores “FP05” y “C22”. Los peces expuestos a zoosporas de *S. parasitica* C22, sin previa inyección de *F. psychrophilum* FP05, aumentaron el porcentaje de linfocitos con respecto a los peces no expuestos, con o sin inyección previa de *F. psychrophilum* FP05 (Test de Tukey, $p < 0,001$ y $p < 0,01$, respectivamente). El porcentaje de linfocitos en los peces expuestos a *S. parasitica* C22 e inyectados con *F. psychrophilum* FP05 disminuyó con respecto al grupo de peces expuesto a las zoosporas y sin *F. psychrophilum* FP05 (Test de Tukey, $p < 0,01$) (figura 10 C).

El porcentaje de eosinófilos fue afectado por el factor “C22” (ANOVA de dos factores, $p < 0,05$). Los grupos de peces expuestos a zoosporas con o sin *F. psychrophilum* FP05

presentaron menor porcentaje eosinófilos en sangre que los peces no expuestos (figura 10 D).

Cuando se incluyó a los trombocitos en forma de huso en el recuento diferencial y en la estimación de los porcentajes de tipos celulares, el porcentaje de este tipo celular fue significativamente mayor en los peces inyectados con *F. psychrophilum* FP05 que en los peces no inyectados (ANOVA de dos factores, $p < 0,001$), independientemente de la exposición o no a las zoosporas de *S. parasitica* C22. Se observó un marcado efecto del factor “FP05” en el porcentaje de trombocitos con forma de huso (figura 11).

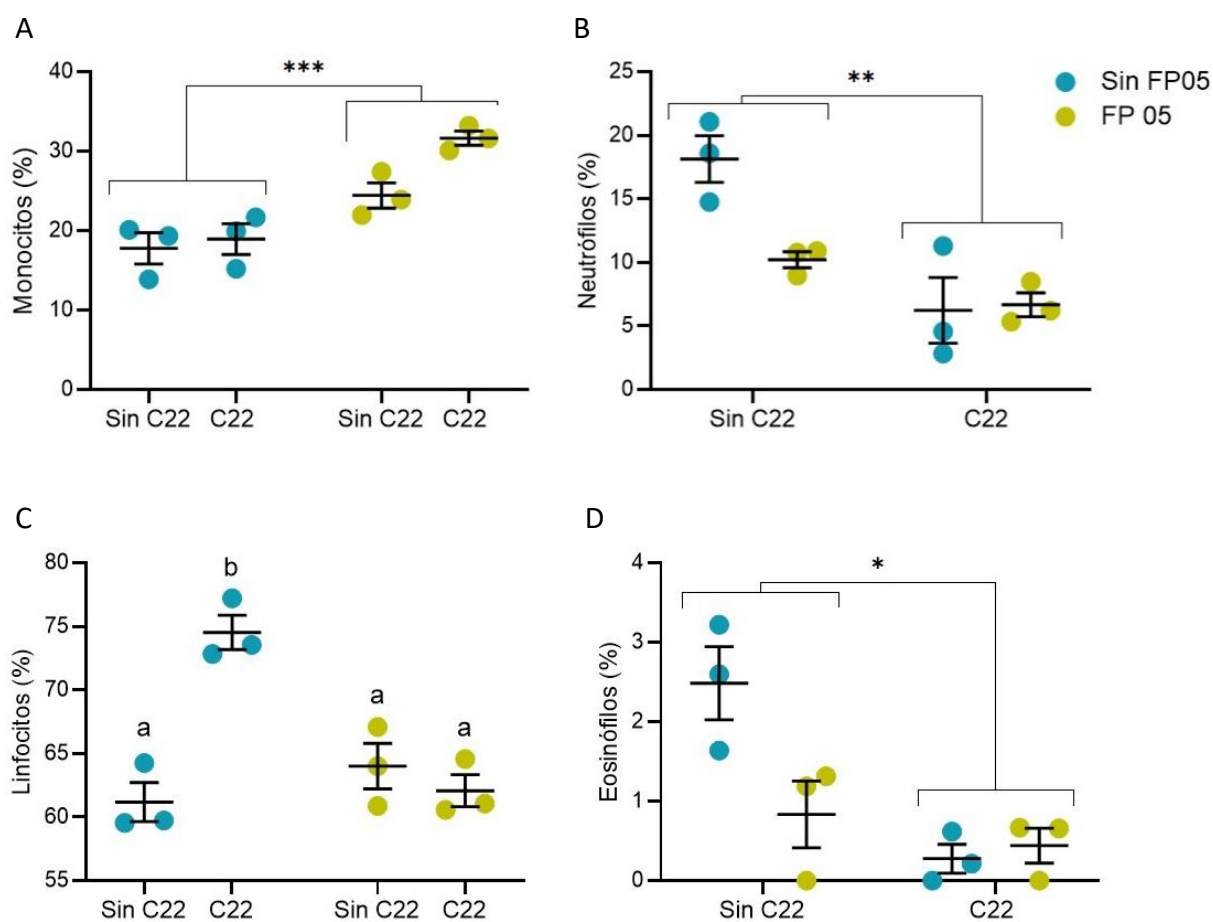


Figura 10. Recuento diferencial de leucocitos en truchas arcoíris tratadas con inyección intramuscular de $1,81 \times 10^8$ UFC de *F. psychrophilum* FP05 en medio líquido FLP y expuestas a $5,0 \times 10^5$ zoosporas L^{-1} de *S. parasitica* C22. A) Porcentaje de monocitos, B) Porcentaje de neutrófilos, C) Porcentaje de linfocitos, D) Porcentaje de eosinófilos. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

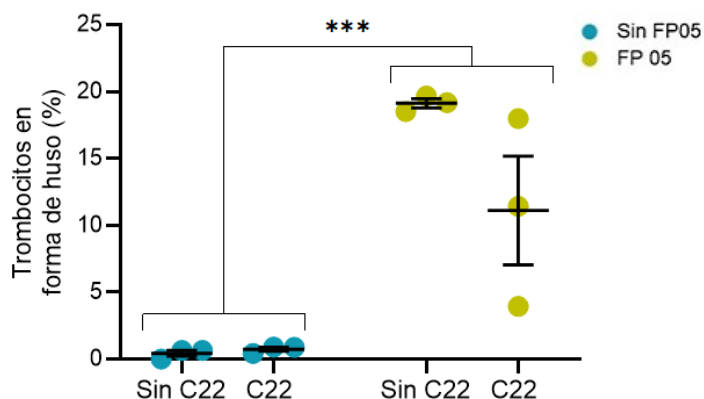


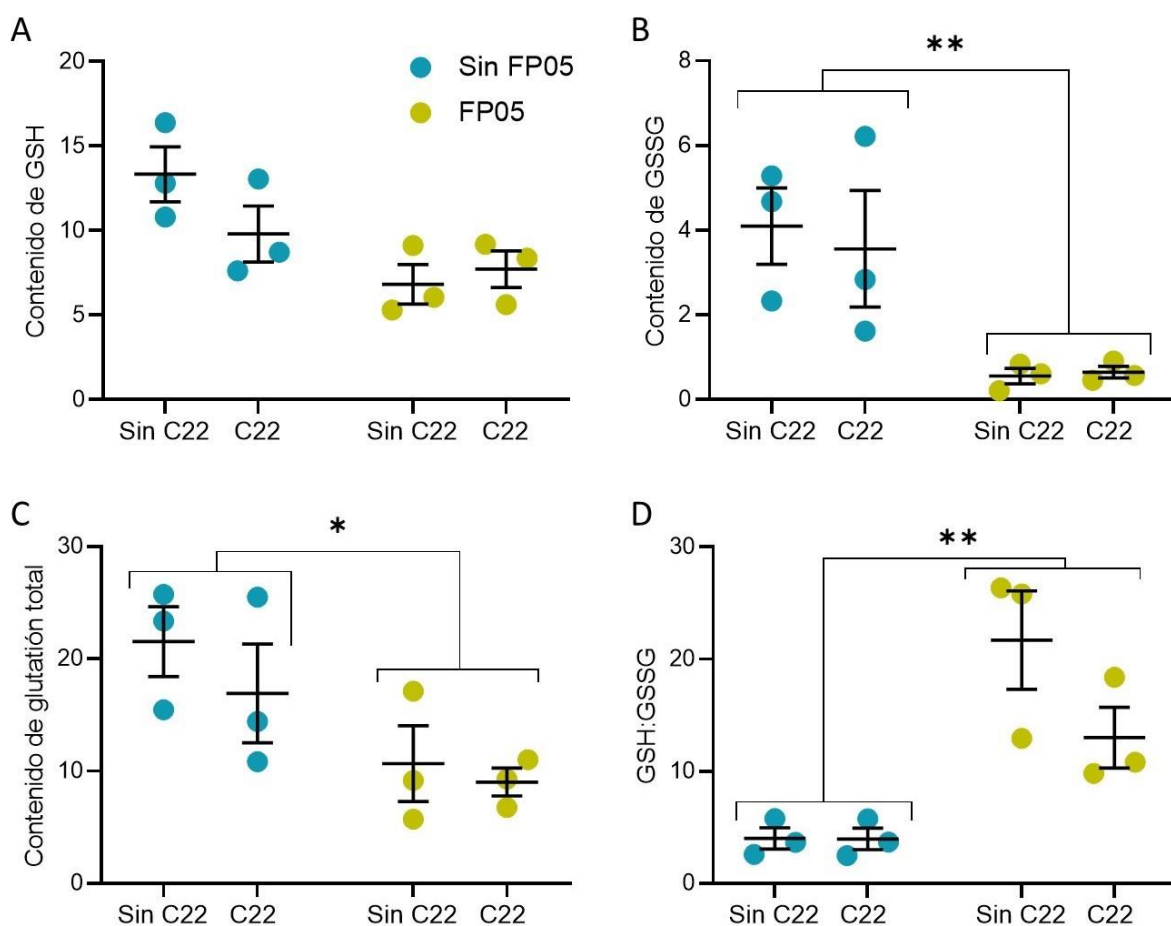
Figura 11. Porcentaje de trombocitos en forma de huso incluidos en la formula leucocitaria. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas (***) = $p < 0,001$.

5.2.5. Balance oxidativo

El contenido de glutatión reducido (GSH) en el hígado no fue afectado por la infección por *F. psychrophilum* FP05 ni la exposición a zoosporas de *S. parasitica* C22 (figura 12 A). Mientras que, la inyección de *F. psychrophilum* FP05 produjo un efecto significativo sobre el contenido de glutatión oxidado medido en hígado (ANOVA de dos factores, $p < 0,01$ para el factor “FP05”). Los valores de GSSG en hígado fueron significativamente menores en los peces inyectados con *F. psychrophilum* FP05 con respecto a los grupos de peces no inyectados (figura 12 B), independientemente de la exposición a las zoosporas de *S. parasitica* C22.

La inyección de *F. psychrophilum* FP05 produjo un efecto significativo sobre el contenido de glutatión total medido en hígado (ANOVA de dos factores, $p < 0,05$ para el factor “FP05”). Tanto los peces expuestos a zoosporas de *S. parasitica* C22 como los que no lo fueron y que se inocularon previamente con la cepa bacteriana, tuvieron niveles de glutatión total menores que los medidos en los peces control (figura 12 C). Por otra parte, el cociente GSH/GSSG se incrementó en los peces inyectados con *F. psychrophilum* FP05 y en los peces inyectados y expuestos a zoosporas de *S. parasitica* C22, con respecto a los niveles que se midieron en los peces no inyectados (ANOVA de dos factores, $p < 0,01$ para el factor “FP05”) (figura 12 D). Finalmente, no se registraron diferencias en cuanto a la actividad de glutatión reductasa (GR) medida en hígado de los peces después de la inyección de *F. psychrophilum* FP05 y/o la exposición a zoosporas de *S. parasitica* C22 (figura 12 E).

El contenido de TBARS en el hígado fue afectado por la exposición a *S. parasitica* C22 (ANOVA de dos factores, $p < 0,01$ para el factor “C22”). Los peces expuestos a zoosporas de *S. parasitica* C22 con y sin inyección previa de *F. psychrophilum* FP05 tuvieron niveles de TBARS mayores que los observados en los peces no expuestos a zoosporas, con y sin inyección previa de *F. psychrophilum* FP05 respectivamente. La interacción entre los factores no fue significativa ($p > 0,05$) (figura 12 F).



Continúa en la pág. siguiente.

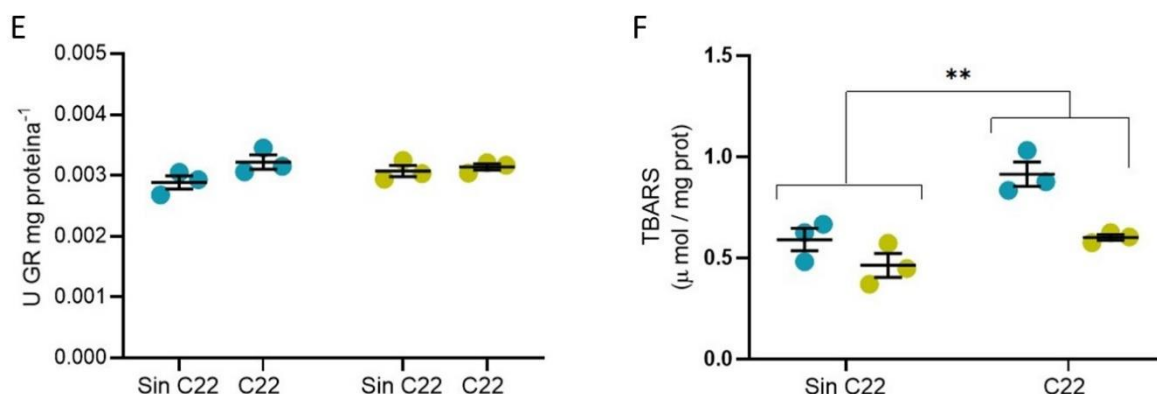


Figura 12. Bioindicadores de estrés oxidativo en el hígado de truchas arcoíris tratadas con inyección intramuscular de $1,81 \times 10^8$ UFC de *F. psychrophilum* FP05 en medio líquido FLP y expuestas a $5,0 \times 10^5$ zoosporas L⁻¹ de *S. parasitica* C22. A) Contenido de glutatión reducido (GSH) (nmol GSH mg proteína⁻¹), B) Contenido de glutatión oxidado (GSSG) (nmol GSSG mg proteína⁻¹), C) Contenido de glutatión total (nmol GSH mg proteína⁻¹), D) GSH/GSSG, E) Glutatión reductasa (mg prot⁻¹), F) TBARS (μmol mg prot⁻¹). Los resultados se expresan como media ± error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas (* = p < 0,05, ** = p < 0,01).

5.2.6. Análisis histológico

Los preparados histológicos de los peces correspondientes a los grupos no inyectados con *F. psychrophilum* FP05 (grupos con y sin exposición a zoosporas de *S. parasitica* C22) presentaron el tegumento y la musculatura de aspecto normal, sin lesiones evidentes. En particular, en el grupo expuesto a zoosporas no se observó la presencia de hifas en el tegumento o la musculatura ni evidencias de una respuesta inflamatoria (figura 13 A). En los peces inyectados con *F. psychrophilum* FP05, por el contrario, se observaron profundas alteraciones histopatológicas, principalmente a nivel de la musculatura. En el tegumento se observó erosión de la capa epidérmica, pérdida de escamas en la dermis e infiltración celular en la hipodermis. En la capa muscular, se observaron hemorragias e infiltración de células mononucleares y del tipo fibroblásticas, además se observó la degeneración y necrosis de las fibras musculares. En los peces inyectados con *F. psychrophilum* FP05 y expuestos a zoosporas de *S. parasitica* C22, no se observó la presencia de hifas en el tegumento o musculatura.

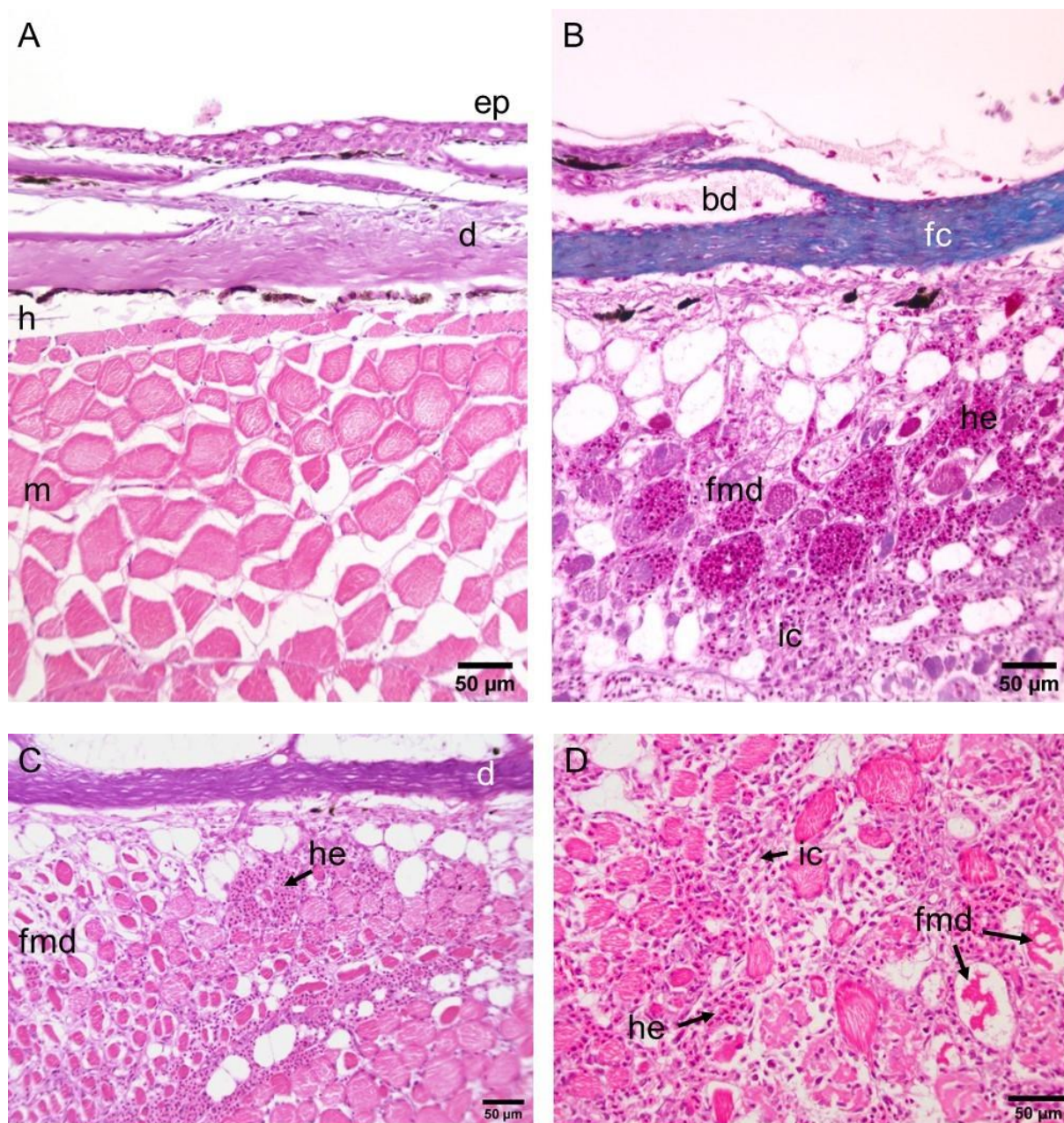


Figura 13. Ensayo de exposición consecutiva. A) Corte histológico de juvenil de trucha arcoiris donde pueden apreciarse sin alteraciones la epidermis (ep), dermis (d), hipodermis (h) y músculo (m). B, C y D) peces infectados con *F. psychrophilum* FP05. Se observa la pérdida de la capa epidérmica, la ausencia de escamas y hemorragias, degeneración de fibras musculares e infiltración celular en la musculatura. bolsas dérmicas (bd), fibras de colágeno (fc), fibras musculares degeneradas (fmd), infiltrado celular (ic), hemorragia (he).

5.2.7. Agregados de macrófagos (AM) en hígado y riñón

Los resultados del ANOVA de dos factores de los porcentajes de áreas pigmentadas en los cortes histológicos de riñón mostraron un efecto significativo del factor “FP05” ($p < 0,001$). Los peces inyectados con la cepa FP05 mostraron menor superficie ocupada por

AM y MPD que los peces sin inyectar (figura 14). Por otra parte, la exposición a *S. parasitica* C22 no tuvo efecto sobre esta variable. En las imágenes de los cortes histológicos de hígado no se detectaron diferencias en las superficies ocupadas por AM y MPD entre los tratamientos/factores.

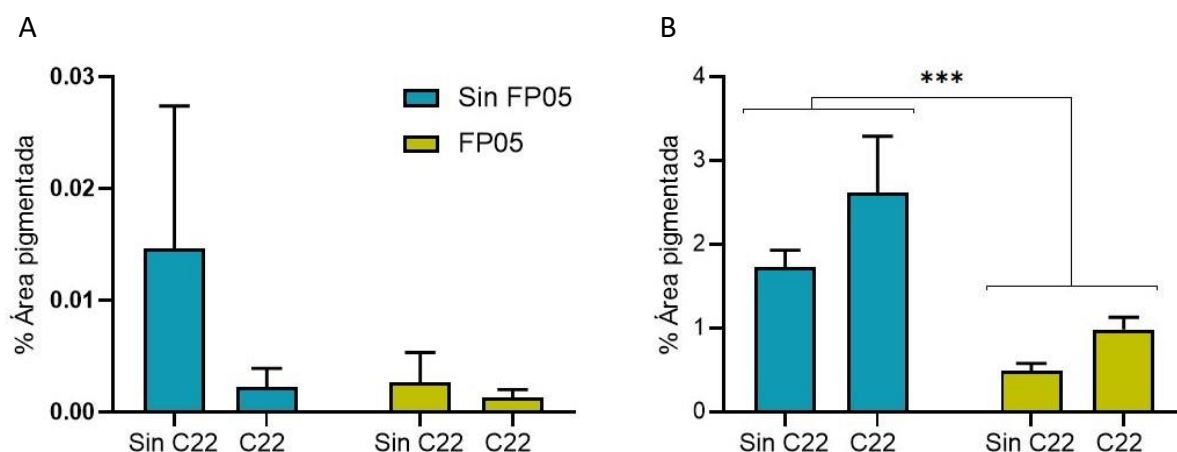


Figura 14. Porcentaje de área pigmentada, correspondiente a agregados de macrófagos y macrófagos pigmentados dispersos, en secciones histológicas de hígado (A) y riñón (B) de truchas arcoíris tratadas con inyección intramuscular de *F. psychrophilum* FP05 y expuestas a zoosporas *S. parasitica* C22. Los asteriscos indican diferencias significativas (***) = $p < 0,001$.

6. DISCUSIÓN

En este capítulo se evaluó el efecto de la infección por *F. psychrophilum* como un probable factor inductor de la infección y la mortalidad por *S. parasitica* en juveniles de trucha arcoíris. Se estudiaron, además, aspectos patológicos y parámetros inmunológicos y de estrés oxidativo.

6.1. Aislamiento, caracterización fenotípica e identificación

Se obtuvieron cinco cepas bacterianas con características fenotípicas compatibles con *F. psychrophilum* (FP01, FP02, FP03, FP04 y FP05) a partir de truchas arcoíris con signos clínicos de flavobacteriosis, como erosión de aletas o lesiones tegumentarias. La cepa FP05 fue identificada como *F. psychrophilum* mediante el ensayo de PCR realizado

con los *primers* fpPPIC1F y fpPPIC1R (Yoshiura *et al.*, 2006) y FP1 y FP3 (del Cerro *et al.*, 2002). La cepa FP05 también presentó mayor capacidad de hidrólisis de gelatina; esta característica es considerada un factor de virulencia para las cepas de *F. psychrophilum* (Soule *et al.*, 2005; Ilardi Lazcano *et al.*, 2013) ya que la degradación del colágeno daña la estructura tisular de manera que permite la dispersión de las bacterias a través de los tejidos. Los resultados obtenidos motivaron el uso de esta cepa en el ensayo de exposición consecutiva.

6.2. Ensayo de exposición consecutiva: Mortalidad, infección y aspectos patológicos

En este ensayo, los peces fueron inyectados intramuscularmente con $1,81 \times 10^8$ UFC de *F. psychrophilum* FP05 o con medio líquido FLP y expuestos posteriormente a $5,0 \times 10^5$ zoosporas L^{-1} de *S. parasitica* C22 o a la condición control. Los peces se muestrearon al quinto día post infección debido al rápido aumento de la mortalidad.

La inyección de la cepa FP05 causó un incremento en la mortalidad en los peces. Esta cepa demostró ser patogénica y altamente virulenta. La mortalidad en los peces inyectados con *F. psychrophilum* FP05 se inició el tercer día post inyección y, hacia el quinto día, alcanzó el 30% de los peces expuestos a zoosporas de *S. parasitica* C22 y el 32% de los no expuestos. Si bien las metodologías en cuanto a tamaño de los peces, dosis o tipo de inoculación fueron diferentes, las mortalidades observadas en este estudio concuerdan con los resultados de Madsen y Dalsgaard (1999), Misaka y Suzuki (2007) y Moreno *et al.* (2016). En los trabajos mencionados se reportan mortalidades del 10 al 60% en los primeros seis días posteriores a la inoculación de las células de *F. psychrophilum*. En el presente ensayo, la mortalidad no fue afectada por la exposición conjunta a las zoosporas de *S. parasitica* C22, mientras que la tasa de infección oomicótica tampoco mostró diferencias significativas entre el grupo previamente tratado con *F. psychrophilum* y el inyectado con medio líquido FLP (condición control).

Las lesiones en los peces infectados por *F. psychrophilum* se localizaron en la región latero-dorsal del cuerpo entre la cabeza y la aleta dorsal, en la zona de la inyección del inóculo bacteriano. En este sitio, las lesiones se caracterizaron por una hinchazón edematosa del tegumento acompañada de un cambio en la coloración y pérdida de

escamas. El tegumento se observó delgado y fluctuante al tacto. En algunos de los peces, se desarrollaron lesiones ulcerativas con pérdida del tegumento y exposición de la musculatura al medio externo, que son características de la infección por *F. psychrophilum* (Cipriano y Holt, 2005; Barnes y Brown, 2011). Las alteraciones histopatológicas incluyeron: erosión de la capa epidérmica, pérdida de escamas en la dermis e infiltración celular en la hipodermis. En los preparados histológicos, la capa muscular se observó profundamente comprometida; se observaron hemorragias e infiltración de células mononucleares y del tipo fibroblásticas y degeneración y necrosis de las fibras musculares (patología muscular denominada miositis). Este tipo de alteraciones histopatológicas fueron descritas anteriormente en truchas arcoíris infectadas con *F. psychrophilum* (Bruno, 1992; Ekman y Norrgren, 2003; Ferguson, 2006; Nilsen *et al.*; 2011; Roberts, 2012; Godoy, 2015). Las alteraciones patológicas observadas en los peces y el rápido incremento en la mortalidad demuestran una alta virulencia y patogenicidad de la cepa FP05 de *F. psychrophilum*.

Las zoosporas de *S. parasitica* C22 no incidieron en la mortalidad ni produjeron infecciones macroscópicas significativas. Sólo una de truchas infectadas con *F. psychrophilum* FP05 desarrolló micelio sobre la zona de la inoculación bacteriana al segundo día de la exposición a las zoosporas, mientras que el resto de los peces de este grupo (que presentaban lesiones bacterianas) no evidenció un desarrollo de micelio. Asimismo, en los cortes histológicos analizados, donde se observaron importantes alteraciones histopatológicas atribuidas a *F. psychrophilum* FP05, no se observaron hifas o evidencias de penetración o crecimiento fúngico.

La ausencia de infección por *S. parasitica* C22 podría explicarse por la baja virulencia de esta cepa. Esta explicación concuerda con los resultados del ensayo de patogenicidad presentado en el capítulo 2: los peces tratados con el método abrasivo y expuestos a zoosporas de *S. parasitica* C22 tuvieron una mortalidad del 13% y, además, no todos los peces muertos presentaron evidencias externas de oomicosis. Esto sugiere la baja virulencia de esta cepa y que la infección por la cepa FP05 favoreció a la infección por *S. parasitica* C22 en menor medida que el método abrasivo utilizado en el capítulo 2.

Otra explicación probable estaría dada por el corto tiempo transcurrido entre la inoculación de *F. psychrophilum* FP05 y la exposición a las zoosporas. Las lesiones edematosas comenzaron a observarse 72 h después de la inyección con la cepa FP05, mientras que la exposición a las zoosporas de *S. parasitica* C22 se realizó durante las 24 y 48 h post inyección. Podría ser entonces que, para el momento en que el tegumento de los peces comenzó a presentar daños, la concentración de zoosporas de *S. parasitica* C22 en el acuario fuese demasiado baja como para lograr establecerse y desarrollarse. Si bien las zoosporas secundarias podrían mantenerse viables en el medio durante algunos días (Robertson *et al.*, 2009) e incluso repetir sucesivos ciclos de enquistamiento y emergencia (fenómeno llamado poliplanetismo) cuando no encuentran el hospedador o sustrato adecuado (Beakes, 1994), una proporción significativa de las zoosporas podría irse “perdiendo” desde el momento en que se reestableció la provisión de agua mientras que otras pudieron germinar en los acuarios favorecidas por la acumulación de materia orgánica, disminuyendo de esta manera la probabilidad de infección sobre los peces.

Finalmente, cabe considerar que algunas bacterias tienen capacidad antagónica contra *Saprolegnia sp.* Varios autores demostraron que distintas cepas de bacterias de géneros como *Alteromonas* Bauman, *Pseudomonas* y *Aeromonas* inhiben *in vitro* el crecimiento de especies de Oomycetes (Bly *et al.*, 1997; Hussein y Hatai, 2001; Osman *et al.*, 2008; Carbajal-González *et al.*, 2011; Moghaddam *et al.*, 2012). Además, en experimentos *in vivo*, Lategan *et al.* (2004) observaron efectos inhibitorios de *Aeromonas media* Allen sobre la infección de *S. parasitica* en la anguila de aleta corta (*Anguilla australis* Richardson), mientras que González-Palacios *et al.* (2019) demostraron que *Pseudomonas spp.* pueden inhibir la infección por *S. parasitica* en trucha arcoíris. Los mecanismos de acción inhibitoria pueden incluir la producción de sustancias extracelulares antibióticas (Lategan *et al.*, 2004), la competencia por nutrientes (Bly *et al.*, 1997) o la prevención de la adhesión de los quistes secundarios por exclusión competitiva (González-Palacios *et al.*, 2019). La infección por *F. psychrophilum* FP05 podría también tener una acción antagónica contra la colonización y crecimiento de *S. parasitica* C22 en el tegumento de la trucha arcoíris. Sin embargo, el diseño de los experimentos de esta tesis no permite analizar esta interacción y tampoco hay información sobre la misma en la bibliografía consultada.

Estudios *in vitro* e *in vivo* podrían aportar más información acerca de la capacidad de *F. psychrophilum* de inhibir el crecimiento de distintas especies de Oomycetes presentes en los cultivos de salmónidos. Además, otros ensayos que utilicen cepas más virulentas de *Saprolegnia spp.* y un diseño experimental que contemple el uso de diluciones bacterianas con efecto subletal podrían optimizar y complementar los resultados obtenidos en esta tesis para evaluar la susceptibilidad a Oomycetes en peces infectados previamente con *F. psychrophilum*.

6.3. Respuesta inmune

6.3.1. Contenido de inmunoglobulinas en mucus

Las inmunoglobulinas (Igs) son producidas principalmente por las células plasmáticas y juegan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis de las mucosas incluyendo la respuesta ante la presencia de microorganismos (Esteban, 2012). Dentro de las Igs, las IgMs son principalmente abundantes en el suero, mientras que las IgTs son inducidas en mayor medida en las mucosas del tracto digestivo y el tegumento de los peces (Xu *et al.* 2013). En este estudio, el contenido de Igs en mucus disminuyó en los peces inoculados con *F. psychrophilum* FP05 (con y sin exposición a zoosporas de *S. parasitica* C22) con respecto a los niveles medidos en los peces no inoculados. En cambio, la exposición a zoosporas de *S. parasitica* C22 no influyó en los niveles de Igs en el mucus de los peces.

El sistema inmune en general y la concentración de Igs en particular dependen en gran medida de la permanente interacción con la comunidad microbiana simbiótica de las mucosas, para mantener el estado basal y su normal funcionamiento (Kelly y Salinas, 2017). La infección por *F. psychrophilum* FP05 pudo alterar este estado de homeostasis. La infección por la cepa FP05 provocó profundas lesiones tegumentarias y musculares, una respuesta inflamatoria tisular y, además, podría haber generado un estado de inmunosupresión a nivel del sistema inmune adaptativo que hizo decaer los niveles de Igs en el mucus.

El efecto de supresión del sistema inmune fue observado por Siwicki *et al.* (2004) en truchas arcoíris naturalmente infectadas con *F. psychrophilum*. Estos autores midieron niveles de Igs y actividad de lisozimas más bajos en el suero de truchas infectadas que en truchas no infectadas después de 3 a 10 días de detectados los síntomas de flavobacteriosis. También Henriksen *et al.* (2013) observaron, en riñón de trucha arcoíris expuestas por inmersión a *F. psychrophilum*, una regulación negativa en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmunológica adquirida. La expresión de los genes de IgT y de MHC II (Complejo principal de histocompatibilidad) fueron afectadas negativamente al quinto día post exposición a *F. psychrophilum*. Hacia el octavo día, la expresión de estos genes se recompuso a los valores previos, mientras que la producción de anticuerpos fue detectada mediante la técnica ELISA al día 50.

Los resultados obtenidos en mucus en esta tesis concuerdan con lo observado por Siwicki *et al.* (2004) y Henriksen *et al.* (2013) en sangre y riñón, y soportan la idea de una supresión de la respuesta inmune adaptativa en los primeros días posteriores a la infección por *F. psychrophilum*. La alta virulencia de la cepa FP05 y la consecuente mortalidad llevaron a que el experimento finalizara al quinto día post infección. A este tiempo, se observó una disminución en el nivel de Igs en el mucus de las truchas infectadas sobrevivientes; sin embargo, podría esperarse que con el correr de los días, dosis sub letales de *F. psychrophilum* FP05 activen la respuesta inmunológica adaptativa con un aumento de Igs. En este mismo sentido, LaFrentz *et al.* (2002), en ensayos de inmunización en trucha arcoíris mediante la inoculación intraperitoneal de diferentes preparaciones de *F. psychrophilum*, registraron niveles débiles o nulos de Igs en mucus y suero durante los primeros días post inoculación. El aumento de Igs y, por ende, la respuesta inmunológica adaptativa, fueron significativos después de los 40 días. Otros estudios también demuestran que los incrementos en los niveles de Igs en mucus pueden ser evidentes a los 14 o 28 días después de la infección o exposición a distintos agentes bacterianos (Makesh *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2020; Tongsri *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

6.3.2. Conteo diferencial de leucocitos

Las cantidades relativas de leucocitos en frotis de sangre periférica (conteo diferencial) son muy variables en trucha arcoíris. Según la bibliografía consultada: los monocitos pueden representar entre < 1 – 11% de los leucocitos totales, mientras que los neutrófilos el 0,6 – 24%, los linfocitos el 65 – 98% y los eosinófilos representan generalmente < 0,5% (Clifton-Hadley *et al.*, 1987; Rodríguez Forero, 1995; Modrá *et al.*, 1998; Zorriehzahra *et al.*, 2010; Buenaño, 2010; Jaafar *et al.*, 2016). Las variaciones en el conteo diferencial de leucocitos entre individuos de la misma especie pueden deberse al sexo o a factores genéticos y ambientales, tales como ubicación geográfica, clima, alimentación y manejo. También pueden existir variaciones a nivel intraindividual, condicionadas por la edad, la estacionalidad, los ciclos reproductivos y las condiciones fisiológicas o patológicas (Noro y Wittwer, 2012; Vigliano *et al.*, 2013; Rozas-Serri *et al.*, 2015). Particularmente entre los salmónidos, se reportaron cambios en el conteo diferencial de leucocitos según la edad o etapa de producción (Buenaño, 2010; Jaafar *et al.*, 2016) y durante el curso de infecciones (Clifton-Hadley *et al.*, 1987; Álvarez *et al.*, 1988; Zorriehzahra *et al.*, 2010).

La cantidad relativa de monocitos en los peces inoculados con *F. psychrophilum* FP05 (con y sin exposición a *S. parasitica* C22) aumentó con respecto a los peces no inoculados; si bien no se realizó la estimación del número total de monocitos, este resultado podría indicar un estado de monocitosis. Esta variación sugiere la presencia de una respuesta inflamatoria asociada a la presencia de un agente infeccioso (Noro y Wittwer, 2012; Rozas-Serri *et al.*, 2015). Los monocitos/macrófagos participan activamente en la respuesta inflamatoria y la monocitosis observada podría relacionarse con la respuesta a la infección por *F. psychrophilum* FP05. En los preparados histológicos se observaron alteraciones patológicas tales como hemorragias, infiltración de células mononucleares, fibroblastos y degeneración de fibras musculares y una respuesta de tipo inflamatorio, que principalmente afecta al tegumento y la capa muscular. En concordancia con lo observado en el presente estudio, Suzuki e Iida (1992) observaron, en carpas (*C. carpio*) con lesiones inflamatorias, el incremento gradual de la cantidad de monocitos en

la sangre periférica y en el sitio donde se desarrolla la respuesta inflamatoria, alcanzando el máximo después de cinco días de iniciado este proceso.

Los peces expuestos a zoosporas de *S. parasítica* C22 tuvieron un incremento en la cantidad relativa de linfocitos en sangre. Esto podría explicarse por la migración de estas células desde los tejidos linfohematopoyéticos a la sangre periférica en respuesta a la presencia de zoosporas sobre la mucosa tegumentaria. La linfocitosis sugiere una estimulación inmunogénica, ya que los linfocitos participan de la respuesta inmune celular y humoral (Noro y Wittwer, 2012). Este tipo de respuesta fue observado también en casos de infecciones bacterianas en tilapia (Mattsson *et al.*, 2001; Sebastião *et al.*, 2011). De manera contraria, Álvarez *et al.* (1988) observaron linfopenia en truchas marrones (*Salmo trutta*) silvestres de entre tres y siete años que presentaban infecciones evidentes de *Saprolegnia sp.* Los autores asociaron estos niveles a un estado de inmunosupresión inducido por elevados niveles de cortisol en el plasma sanguíneo y que afectaban al número de linfocitos circulantes. Por otra parte, el aumento en el porcentaje relativo de linfocitos no se observó en los peces expuestos a zoosporas y previamente infectados con *F. psychrophilum* FP05, de modo que, en este caso, la infección bacteriana podría causar una supresión de la respuesta inmunológica frente a las zoosporas de *S. parasítica* C22. Esta idea concuerda con lo discutido en la sección anterior donde se sugiere una supresión inmunológica en razón de la disminución de los niveles de Igs observados en los peces infectados por *F. psychrophilum* FP05.

La migración de granulocitos es una de las principales características de la fase aguda de los procesos inflamatorios. En esta etapa, que puede producirse rápidamente en las primeras 12 - 24 horas, los neutrófilos migran desde los órganos y tejidos linfohematopoyéticos y elevan su número tanto en el torrente sanguíneo como los tejidos del órgano afectado (Suzuki e Iida, 1992). Una neutrofilia (aumento en el número de neutrófilos en sangre) es indicadora de alteraciones inflamatorias de origen infeccioso (Noro y Wittwer, 2012; Rozas-Serri *et al.*, 2015). De manera contraria, en este experimento se observó una disminución en el porcentaje relativo de neutrófilos en los grupos expuestos a *S. parasítica* C22 (con y sin inoculación previa de *F. psychrophilum* FP05). En este caso, la declinación en la cantidad relativa de neutrófilos pudo deberse al

incremento en la cantidad relativa de monocitos, en los grupos inoculados con *F. psychrophilum* FP05 (con y sin exposición a *S. parasitica* C22) y al incremento en la cantidad relativa de linfocitos, en el grupo expuesto a *S. parasitica* C22.

Los eosinófilos suelen encontrarse en muy bajo número en la sangre periférica de los peces y participan de la respuesta inflamatoria, junto con neutrófilos y macrófagos. La eosinofilia sugiere una respuesta inflamatoria asociada a infecciones parasitarias o estimulación antigénica (Rozas-Serri *et al.*, 2015). Sin embargo, en este experimento, se observó el descenso en el porcentaje relativo de eosinófilos en los grupos expuestos a *S. parasitica* C22 (con y sin inoculación previa de *F. psychrophilum* FP05). Este resultado podría interpretarse de la misma forma que en el caso de los neutrófilos, es decir, el aumento de la proporción de monocitos y linfocitos pudo generar la disminución de la cantidad relativa de eosinófilos.

Finalmente, cuando se incluyeron a los trombocitos con forma de huso en la fórmula leucocitaria, se observó un aumento en la proporción de este tipo celular en los peces inoculados con *F. psychrophilum* FP05 (con y sin exposición a *S. parasitica* C22). Como fue mencionado en las secciones anteriores, en estos peces también se observó una respuesta inflamatoria a nivel histológico y el aumento de monocitos en el conteo diferencial relativo. El aumento en la proporción de trombocitos con forma de huso podría deberse al estado de activación y participación en la respuesta inmune de este tipo celular (Rozas-Serri *et al.*, 2015). Los trombocitos de los teleósteos tienen funciones en el mantenimiento de la homeostasis sanguínea, tales como la agregación y la coagulación en caso de daños en los vasos sanguíneos y la participación en el desarrollo de la respuesta inmune (Stosik *et al.*, 2019). Las funciones inmunológicas de los trombocitos incluyen la producción de citoquinas necesarias para el control de la respuesta inmune, fagocitosis y posiblemente también tengan un rol en los procesos inflamatorios y como transportadores y presentadores de antígenos (Nagasawa *et al.*, 2014; Stosik *et al.*, 2019).

Debido a que en esta tesis no se realizaron otros análisis del hemograma tales como la medición del hematocrito, el recuento de eritrocitos o el recuento total de leucocitos, la interpretación de los resultados tiene un alcance limitado. En particular, la falta del recuento total de leucocitos, que permite estimar cantidades absolutas, puede generar

interpretaciones erróneas. Por ejemplo, un incremento en la cantidad relativa de un tipo celular podría deberse a la migración desde los órganos y tejidos linfohematopoyéticos hacia la sangre periférica de estas células o también a la declinación en la cantidad de otro tipo celular, lo cual hace variar su abundancia relativa. Un hemograma más completo también permitiría identificar estados de anemia, eritrocitosis, leucopenia, leucocitosis o trombopenia, que pueden ser indicadores del estado sanitario de los peces (Noro y Wittwer, 2012).

6.3.3. Agregados de macrófagos

Los agregados de macrófagos y los centros melanomacrófágicos (para especies no salmónidas) se forman por la acumulación de macrófagos, pigmentos, material exógeno y productos de desecho celular, y su cantidad y tamaño puede variar en los procesos infecciosos (Fernández *et al.*, 2002; Ferguson, 2006; Schwindt *et al.*, 2006; Steinel y Bolnick, 2017). En este ensayo, los peces inoculados con *F. psychrophilum* FP05 (con y sin exposición a *S. parasitica* C22) mostraron una disminución en la cantidad de AM en el riñón. Como se describió anteriormente, en estos peces se observó una fuerte respuesta inflamatoria que incluyó la infiltración de células mononucleares en músculo y tegumento y también un aumento en el porcentaje relativo de monocitos en sangre. Estas observaciones sugieren la activación del sistema inmune innato, que involucra a monocitos/macrófagos y procesos de fagocitosis, y por lo tanto podría esperarse la acumulación de macrófagos en el riñón y en el hígado. Sin embargo, el porcentaje ocupado por los AM en los preparados histológicos analizados fue menor que en los peces no inyectados con *F. psychrophilum* FP05. Este resultado es difícil de explicar. Aun así, se puede mencionar que la disminución de AM o CMM (según el caso) en órganos de peces fue observada previamente por algunos autores. Por ejemplo, Spazier *et al.* (1992) detectaron una disminución de melanomacrófagos y la ausencia de CMM junto con alteraciones estructurales y necrosis celular en el bazo de anguilas (*Anguilla anguilla* Linnaeus) expuestas a químicos tóxicos derramados en el río Rin. La disminución de CMM también se observó en hígados de bagre africano (*C. gariepinus*) expuestos a endosulfan (Matthiessen y Roberts, 1982) y de la solla roja (*Pleuronectes americanus* Walbaum)

expuesta a sedimentos contaminados con hidrocarburos (Payne y Fansey, 1989). Estos autores concluyeron que, a niveles bajos de contaminación, el sistema de defensa celular es capaz de eliminar los desechos mediante una mayor actividad fagocítica, mientras que, a niveles más altos, la fagocitosis puede verse afectada, lo que lleva a una disminución de CMM.

6.4. Balance oxidativo

El metabolismo normal y las funciones que mantienen el estado estacionario requieren niveles bajos de oxidantes, este nivel de estrés es denominado eustrés oxidativo (Sies, 2020). Los procesos infecciosos causan un aumento en las EROs y su acumulación genera estrés oxidativo y efectos deletéreos en las células, tales como peroxidación de lípidos, carbonilación de proteínas y daños al ADN (Kurhalyuk y Tkachenko, 2011). Los sistemas de defensa antioxidantes previenen la formación descontrolada de EROs o impiden efectos deletéreos en macromoléculas, sin embargo, en procesos infecciosos, estos mecanismos pueden ser excedidos conduciendo a un estado de estrés oxidativo que contribuye directamente al progreso y la patogénesis de la enfermedad (Chihuailaf *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2019).

Los peces inyectados con *F. psychrophilum* FP05 mostraron alteraciones en los niveles de GSSG, glutatión total y el balance GSH/GSSG mientras que los valores de GSH y la actividad de la enzima GR se mantuvieron sin variaciones entre los tratamientos. Por otra parte, la exposición a *S. parasitica* C22 no modificó ninguno de estos parámetros ni alteró el efecto causado por *F. psychrophilum* FP05 en componentes del sistema antioxidante en el hígado.

El glutatión cumple un rol central en el sistema antioxidante. En su forma reducida (GSH) es un tripéptido de bajo peso molecular que actúa frente a numerosos compuestos oxidantes tales como el peróxido de hidrógeno, el superóxido y el hidroxilo (Chihuailaf *et al.*, 2002). Bajo condiciones de estrés oxidativo, el GSH reduce a los EROs en una reacción catalizada por la enzima glutatión peroxidasa (GPx) y que resulta también en oxidación del GSH a su forma oxidada (GSSG). El GSH también puede consumirse rápidamente y de forma no enzimática en una reacción con el radical hidroxilo, el NO, el N₂O₃ y los

peroxinitritos (Song *et al.*, 2006). Un descenso en los niveles de GSH podría deberse a su utilización en contrarrestar la sobreproducción de EROs generados por una infección bacteriana, como lo sugieren Ali *et al.* (2011) en su estudio con tilapias infectadas experimentalmente con *A. laevis* y *Phoma herbarum* Westend. En el ensayo realizado para esta tesis, ninguno de los tratamientos modificó el nivel de GSH en el hígado; esto sugiere que ni *S. parasitica* C22 ni *F. psychrophilum* FP05 causaron condiciones prooxidantes en este órgano.

Los niveles de GR tampoco mostraron diferencias debidas a los tratamientos. Un aumento en la actividad de la enzima GR se considera indicador de condiciones prooxidantes (Deponete, 2013). La enzima GR cataliza la reducción del GSSG a dos moléculas de GSH y contribuye de esta manera al balance entre las formas reducidas y oxidadas del glutatión dentro de las células (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006). Este resultado también indica que tanto *S. parasitica* C22 como *F. psychrophilum* FP05 no causaron condiciones prooxidantes en el hígado.

En cambio, los niveles de GSSG disminuyeron en los peces inyectados con *F. psychrophilum* FP05 y que mostraron signos de flavobacteriosis. Esto llevó a un aumento en la relación GSH/GSSG, que indica que no hay una condición prooxidante y podría explicar la ausencia de una respuesta de GR. La disminución del contenido de GSSG sin aumento de la actividad de GR ni aumento de GSH determina un menor contenido de glutatión total, que podría explicarse por transporte de GSSG hacia afuera de las células, por ejemplo, hacia la bilis a través de una proteína ABCC (Homolya *et al.*, 2003; Bieczynski *et al.*, 2021). En este sentido, Song *et al.* (2006) proponen que, en condiciones de estrés oxidativo, el exceso de GSSG puede ser exportado fuera de la célula para mantener el balance redox por una proteína transportadora dependiente de ATP (figura 15). En síntesis, la infección bacteriana disminuyó el pool de glutatión total en los hepatocitos y afectó el balance hacia el estado antioxidante.

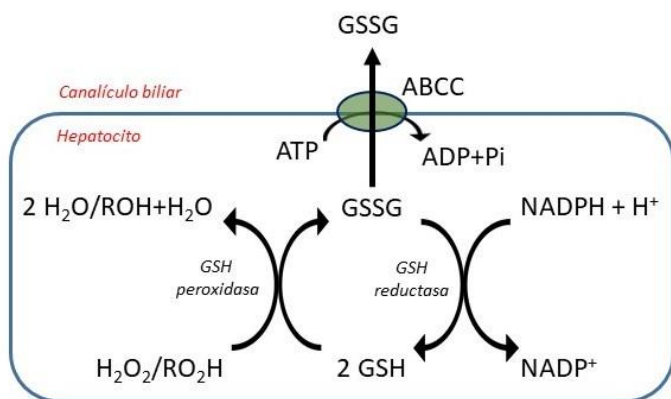


Figura 15. El GSSG es exportado activamente de las células por una proteína ABCB ATP dependiente. Adaptado de Homolya *et al.* (2003).

Finalmente, la exposición a zoosporas de *S. parasitica* C22 causó un incremento significativo en los niveles de TBARS en hígado, que indica un aumento en el daño oxidativo a lípidos, sin presentar cambios en los otros indicadores de estrés oxidativo. Distintos estudios demuestran que las enfermedades infecciosas generan condiciones prooxidantes que pueden producir aumentos en la peroxidación lipídica en órganos y tejidos de los peces. Por ejemplo, Baldissera *et al.* (2020) observaron un aumento de la peroxidación lipídica junto con aumento en los niveles de EROs y una disminución de la capacidad antioxidante en el hígado de la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella* (Valencienes)) infectadas naturalmente con *Saprolegnia sp.* Mientras que también se observaron aumentos en los niveles de peroxidación lipídica en hígado y riñón de tilapias infectadas con *Providencia rettgeri* Rettger (Souza *et al.*, 2019), en el hígado del bagre plateado (*Rhamdia quelen* (Quoy y Gaimard)) infectado con *Aeromonas sp.* (Baldissera *et al.*, 2017, 2018), en el hígado del bagre africano infectado con *Escherichia coli* (Migula) Castellani y Chalmers y *Vibrio fischeri* (Beijernick) Lehmann y Neumann (Adeyemi, 2014) y en el plasma de truchas arcoíris infectadas con *Y. ruckeri* (Droshnev, 2020). En la mayoría de estos casos, además, se observaron altos niveles de EROs y un descenso en la capacidad antioxidante. En el presente estudio, se esperaba que los peces inoculados con *F. psychrophilum* FP05, que presentaban alteraciones patológicas evidentes y una fuerte incidencia en la mortalidad, tuvieran signos de estrés oxidativo y un consecuente daño a lípidos, de modo similar a lo observado por los autores mencionados arriba. Sin embargo,

estos grupos no mostraron signos de estrés oxidativo ni valores de TBARS elevados. En concordancia con los resultados de esta tesis, Kurhalyuk y Tkachenko (2011) no detectaron modificaciones en los niveles de TBARS en hígados de trucha marrón con signos de NDU (necrosis dérmica ulcerativa) producido por la infección con *A. hydrophila* aun cuando otros indicadores de daño oxidativo, como la carbonilación de proteínas y disminución de la actividad de algunas enzimas del mecanismo antioxidante (CAT, GR, GPX) sí, presentaron alteraciones.

CAPÍTULO 4: ANTIOOMICÓTICOS NATURALES

1. INTRODUCCIÓN

La prevención y las buenas prácticas de manejo son las medidas más efectivas y rentables a la hora de evitar los impactos producidos por las enfermedades en la industria acuícola. Estas prácticas incluyen la prevención del ingreso de patógenos, el mantenimiento de la calidad del suministro de agua, evitar estresores ambientales y fisiológicos, proveer dietas adecuadas para la especie y estadio y aislar a los individuos enfermos en caso de epizootias. Sin embargo, las infecciones causadas por Oomycetes resultan muy difíciles de prevenir y, en la mayoría de las ocasiones, es inevitable e imprescindible el uso de quimioterapéuticos para combatirlas.

1.1. El verde de malaquita, su prohibición y antioomicóticos alternativos

En la industria acuícola las infecciones oomicóticas son tratadas continuamente para evitar pérdidas económicas importantes. Tanto en la incubación de ovas, como en los peces de cría, el verde de malaquita (Cloruro de 4-[[4-(dimetilamino)fenil](fenil)metilideno]-N,N-dimetilciclohexa-2,5-dien-1-iminio, $C_{23}H_{25}ClN_2$) fue el más efectivo e histórico antioomicótico utilizado. Sin embargo, su uso en acuicultura ha sido prohibido en numerosos países (Alderman, 1994; van West, 2006). En diferentes estudios se demostró que el verde de malaquita es altamente tóxico para los peces, las dosis utilizadas en los tratamientos terapéuticos muchas veces son cercanas a las concentraciones letales y producen intoxicaciones agudas que causan alteraciones del sistema nervioso y pueden concluir en la muerte de los peces (Sudova *et al.*, 2007). Por otra parte, las exposiciones crónicas a este quimioterapéutico han producido carcinogénesis, mutagénesis, fracturas de cromosomas, teratogenicidad y reducción de la fertilidad en truchas arcoíris (Srivastava *et al.*, 2004). Otros estudios también reportan anomalías en el desarrollo, ruptura de cromosomas, y malformaciones en alevinos recién eclosionados y ovas sometidos a tratamientos con verde de malaquita (Sudova *et al.*, 2007). El verde de malaquita posee afinidad con los tejidos animales, se bioacumula y

sus residuos se pueden encontrar en ovas, juveniles y peces adultos tiempo después de la exposición (Allen, 1990; Alderman, 1994; Meinertz *et al.*, 1995; Mitrowska y Posyniak, 2005). El verde de malaquita también tiene efectos nocivos en mamíferos; en observaciones clínicas y experimentales, se reporta su toxicidad hacia distintos órganos, acción citotóxica y efectos mutagénicos y carcinogénicos (Srivastava *et al.*, 2004). Debido a los riesgos para la salud humana, el verde de malaquita fue prohibido para su uso en la producción de pescado para consumo por la Unión Europea y la FDA (*Food and Drug Administration*) de Estados Unidos (Hernando *et al.*, 2006), entre otros.

En los últimos años, se realizaron numerosos estudios y pruebas con el fin de encontrar alternativas al verde de malaquita para su uso en acuicultura. La utilización de cloruro de sodio (NaCl) se evaluó en varios trabajos (Marking *et al.*, 1994; Bly *et al.*, 1996; Ali, 2005) y está comprobado su efecto inhibitorio contra las infecciones oomicóticas; sin embargo, su uso no es frecuente debido a la gran cantidad de sal que debe ser utilizada para los tratamientos continuos (Robertson *et al.*, 2009). La sal se emplea como antioomicótico en pisciculturas de la provincia del Neuquén aunque su uso está limitado a la realización de baños profilácticos, con alta concentración de NaCl, que se implementan luego de acciones de manejo como clasificaciones, traslados y desoves (observación personal). Además, entre otras sustancias estudiadas, se pueden mencionar el permanganato de potasio (KMnO₄) (Bly *et al.*, 1996), el sulfato de cobre (CuSO₄) (Bly *et al.*, 1996; Panchai *et al.*, 2016), el yodo (I) (Fitzpatrick *et al.*, 1995), el ozono (O₃) (Forneris *et al.*, 2003; Grotmol *et al.*, 2003;) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Marking *et al.*, 1994; Fitzpatrick *et al.*, 1995; Ghazvini *et al.*, 2012). El bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) es otro compuesto que demostró ser un eficaz antioomicótico en la incubación de ovas de salmónidos (Pottinger y Day, 1999; Pérez Saldías, 2002) y su uso está difundido en países de la Comunidad Europea y Chile, donde la industria salmonera se encuentra muy desarrollada (Zaror *et al.*, 2004; Tedesco *et al.*, 2019). En la actualidad, el formaldehído (CH₂O) es uno de los productos más utilizados para combatir las infecciones oomicóticas en pisciculturas de todo el mundo y, en particular, en los establecimientos productores de ovas de salmónidos de la provincia del Neuquén (observación personal). Diversos estudios comprueban su efectividad en la incubación de ovas (Marking *et al.*, 1994; Bly *et al.*, 1996; Barnes *et al.*, 2000, 2001; Giesecker *et al.*, 2006). Sin embargo, las

preocupaciones por la seguridad de los usuarios y el efecto sobre el ambiente son persistentes (Barnes *et al.*, 2000, 2001; Robertson *et al.*, 2009), ya que el formaldehído puede causar irritación en las mucosas de los operarios y, en caso de presentar precipitación de paraformaldehído (producto de la polimerización del formaldehído), puede ser tóxico también para las ovas de los peces (Howe *et al.*, 1995). En 2004, luego de una serie de evaluaciones, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la OMS, con sede en Lyon (Francia), concluyó que no cabían dudas acerca de la cancerogenicidad del formaldehído (<http://www.an-mat.gov.ar/comunicados/formaldehido.pdf>). En particular en nuestro país, existe sólo un estudio sobre sustancias antioomicóticas frente a Oomycetes que afectan a peces y sus ovas. Pacheco Marino (2010) evaluó *in vitro* la capacidad antioomicótica de diversas sustancias sobre *A. racemosa* y *S. ferax* aisladas de ovas de pejerrey bonaerense (*O. bonariensis*). En el estudio mencionado, *A. racemosa* y *S. ferax* fueron sensibles, en distinto grado, al verde de malaquita, al cloruro de sodio, al formaldehído y al ácido acético tamponado, a concentraciones seguras para las ovas de pejerrey.

Varias sustancias poseen comprobada eficacia y son utilizadas en las pisciculturas de todo el mundo con el fin de reducir las pérdidas económicas producidas por las infecciones oomicóticas. Sin embargo, ya sea por practicidad, costos económicos o riesgos para la salud humana y el ambiente, ninguna de estas alternativas representa una solución “ideal” o definitiva para abordar esta problemática. La búsqueda de antioomicóticos alternativos, económicos, seguros y “amigables” con el ambiente sigue siendo una línea de investigación necesaria.

1.2. Antioomicóticos naturales

Un importante número de extractos y aceites esenciales obtenidos de plantas presenta actividad antimicrobiana sobre bacterias, algas y hongos (Gómez de Saravia y Gaylarde, 1998; Cowan, 1999; Gonçalves *et al.*, 2005; Guiamet y Gómez de Saravia, 2005; Gómez de Saravia, *et al.*, 2008; Borrego *et al.*, 2012, Gómez de Saravia *et al.*, 2013). La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en plantas y especias secas son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos,

cetonas, ácidos o isoflavonoides (Heisey y Gorman, 1992). Varios de ellos fueron estudiados con el objeto de identificar compuestos activos asociados con la actividad antioomicótica para su potencial uso como terapéuticos en el cultivo de peces. En años recientes, se investigó la efectividad de extractos naturales de hierbas, aceites esenciales u otras sustancias químicas extraídas de plantas, sobre especies de los géneros *Achlya* (Hussein *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2002; Chukanhom *et al.*, 2005), *Saprolegnia* (Hussein *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2002; Tampieri *et al.*, 2003; Udomkusonsri *et al.*, 2007; Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2009; Khosravi *et al.*, 2012; Hoskonen *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2013; Borisutpeth *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015; Madrid *et al.*, 2015; Hauff y Barnes, 2016; Adel *et al.*, 2020; Nardoni *et al.*, 2019; Mostafa *et al.*, 2020; Tandel *et al.*, 2021) y *Aphanomyces* (Hussein *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2002; Chukanhom *et al.*, 2005; Borisutpeth *et al.*, 2014). En estos trabajos, se evaluó la actividad oomicocida y oomicostática de dichas sustancias contra el micelio o la inhibición en la producción y germinación de esporas de especies de Oomycetes del orden Saprolegniales, en muchos casos, aislados a partir de ovas o peces infectados.

Eugenol

El eugenol (C₁₀H₁₂O₂, figura 1 A) es un compuesto aromático perteneciente al grupo de los fenoles, que se obtiene a partir de aceites esenciales naturales de plantas de las familias Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae y Myristicaceae. Es el componente más importante del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum* Merr y Perry) (Ulanowska y Olas, 2021). El eugenol tiene comprobadas propiedades farmacológicas, como, por ejemplo, anestésico, antioxidante, anti-inflamatorio, anticarcinogénico y tiene acción antiparasitaria, antibacteriana y antifúngica (Charan Raja *et al.*, 2015). Algunos autores evaluaron también la capacidad del eugenol como antioomicótico. Hussein *et al.*, (2000) estudiaron la actividad oomicocida y oomicostática contra estadios vegetativos (micelio) y zoosporas de *S. parasitica*, *S. diclina*, *S. ferax*, *S. salmonis*, *Achlya klebsiana* Pieters y *Aphanomyces piscicida* Hatai. Los autores evaluaron también, la toxicidad del eugenol sobre juveniles de ciprínidos y salmónidos. Hauff y Barnes (2016), en su estudio con *S. diclina* y ovas de salmón chinook, encontraron al aceite de clavo de olor y al eugenol como potenciales antioomicóticos para la etapa de incubación de ovas. Por su parte, Tandel *et al.* (2021) también evaluaron la actividad antioomicótica, inhibición del crecimiento del

micelio, germinación de esporas y colonización del eugenol sobre *S. parasitica* y *S. australis*, aunque este no fue el compuesto más eficaz entre los evaluados en dicho estudio.

Isoeugenol

El isoeugenol ($C_{10}H_{12}O_2$, figura 1 B) es un fenil propeno, isómero del eugenol que puede sintetizarse a partir de este último. Posee propiedades fungicidas (contra hongos verdaderos) e insecticidas (Marchese *et al.*, 2017; Ulanowska y Olas, 2021). En la actualidad, es utilizado en la industria acuícola como anestésico para salmones y truchas (<https://cen-trovvet.virbac.com>), para lo que se han establecido los límites máximos residuales (<https://www.ema.europa.eu/en>).

Guaiacol

El guaiacol es un compuesto orgánico ($C_7H_8O_2$, figura 1 C) extraído habitualmente de árboles del género *Guaiacum* Linnaeus y de la creosota de madera. Se puede preparar de diversas maneras en laboratorio y puede utilizarse también como precursor del eugenol. Si bien en algunos estudios se evaluó su capacidad antifúngica (Kurita *et al.*, 1981; Roncadori *et al.*, 1985), no se estudió hasta el momento su acción contra Oomycetes.

Timol

El timol ($C_{10}H_{14}O$, figura 1 D) es un monoterpeno que se encuentra como compuesto principal de varios aceites esenciales, como el de orégano (*Origanum vulgare* Linnaeus) y el de tomillo (*Thymus vulgaris* Linnaeus). En numerosos estudios se evaluó y determinó la buena capacidad de este compuesto como antimicrobiano y desinfectante en general. En estos estudios se evaluó su capacidad como insecticida (Isman *et al.*, 2000; Grodnitzky y Coats, 2002), antifúngico (Kurita *et al.*, 1981; Braga *et al.*, 2007; Marei *et al.*, 2012; Bogdan *et al.*, 2015), antibacteriano (Dorman y Deans, 2000; Lambert *et al.*, 2001; Burt, 2004; Pei *et al.*, 2009) y antiparasitario (de Moraes *et al.*, 2014). Además de determinarse la acción antimicrobiana del timol, se observó que ciertas combinaciones de timol y eugenol muestran efectos sinérgicos en esta actividad (Braga *et al.*, 2007; Pei *et al.*, 2009). La capacidad antioomicótica del aceite esencial de tomillo y del timol como compuesto puro fue evaluada en distintos trabajos. Mostafa *et al.* (2020) observaron que el extracto de tomillo posee eficacia para suprimir el crecimiento de micelio de *S. diclina*, mientras que Nardoni *et al.* (2019) también detectaron la acción antioomicótica del aceite esencial

de tomillo contra *S. parasitica*. Estos autores consideran a estas sustancias como potenciales alternativas para combatir la saprolegniasis en la producción de peces.

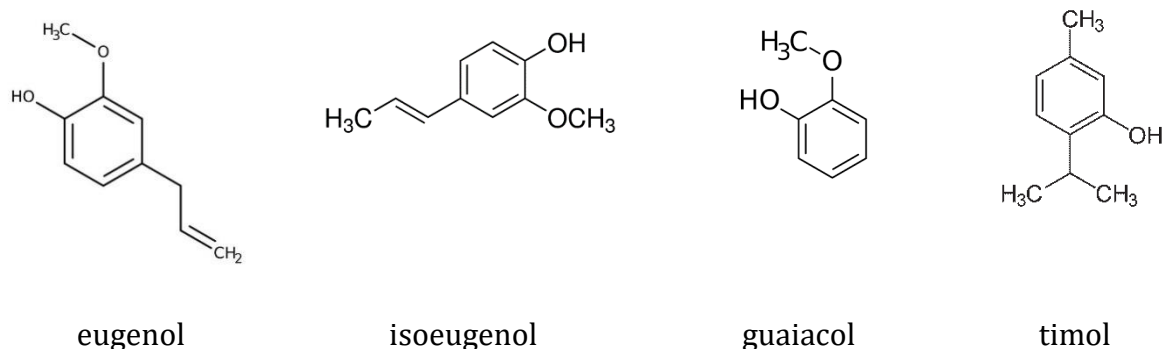


Figura 1. Estructura química del eugenol, isoeugenol, guaiacol y timol.

2. HIPÓTESIS

- Los extractos vegetales (aceites esenciales y productos naturales) representan productos ambientalmente amigables, que pueden ser una alternativa “no tóxica” y efectiva para el tratamiento de las oomicosis en acuicultura.

3. OBJETIVOS

- Evaluar *in vitro* la capacidad antioomicótica de compuestos orgánicos de origen vegetal sobre estadios vegetativos y zoospóricos de Oomycetes aislados en la piscicultura del CEAN.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos realizados para este capítulo fueron desarrollados en laboratorios del Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnologías de Pinturas (CIDEPINT) CICPBA-CONICET-UNLP y el CEAN.

Se evaluó la actividad antioomicótica de los compuestos orgánicos, eugenol, isoeugenol, timol y guaiacol, contra el micelio y estadios zoospóricos de *S. parasitica* C08, *S. diclina* C13, *S. ferax* C20 y *S. parasitica* C22. Se utilizaron compuestos orgánicos de la empresa Sigma-Aldrich, que fueron provistos por el CIDEPINT. Las cepas utilizadas en estos ensayos fueron identificadas mediante los análisis moleculares detallados en el capítulo 1 (códigos OOMAC370-18, OOMAC340-18, OOMAC376-18 y OOMAC342-18, respectivamente). La evaluación fue realizada mediante las técnicas de microatmósfera y dilución en placas, con el fin de determinar la concentración inhibitoria total (CI_T) y, para el segundo de los ensayos, la concentración letal (CL). La CI_T , es indicadora del efecto oomicostático de una sustancia y se define en esta tesis como la concentración probada de producto que es capaz de inhibir totalmente el crecimiento visible de los Oomycetes después de un período de incubación de 48 h. Mientras que, la CL es la concentración probada a la cual el producto destruye o mata a los organismos, es decir que tiene un efecto oomicocida.

4.1. Evaluación de la actividad antioomicótica sobre micelio, técnica de microatmósfera

Este ensayo se realizó siguiendo la metodología propuesta por Delespaul *et al.* (2000). Se sembraron inóculos de 5 x 5 mm de cultivos en agar con crecimiento activo de *S. parasitica* C08, *S. diclina* C13, *S. parasitica* C22 y *S. ferax* C20 en placas de Petri con medio glucosa-levadura (GL). En el centro de la tapa de cada placa se colocó un disco estéril (13,0 mm de diám.) de papel de filtro que luego fue embebido con 50 μ L del compuesto a probar, en diluciones en dimetil sulfóxido (DMSO). Se probaron las siguientes concentraciones: 31,25, 62,5, 125 y 250 mM para el eugenol e isoeugenol; 3,9, 7,81, 15,62, 31,25, 62,5 y 125 mM para el timol y 250, 500, 1000 y 1333 mM para el guaiacol. Los tratamientos se realizaron por triplicado. Se realizó un control negativo (sin producto) y un blanco (con DMSO). El DMSO se utilizó como disolvente debido a que los compuestos a probar son poco solubles en agua (Husseini *et al.*, 2000). Las placas de Petri fueron selladas con Parafilm M® e incubadas de forma invertida durante 48 h a $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de 48 h se observó el halo de crecimiento de los Oomycetes en el medio de cultivo (figura 2). Se

tomaron fotografías que luego fueron analizadas mediante el software ImageJ para determinar la superficie de crecimiento del micelio en la placa de cultivo.

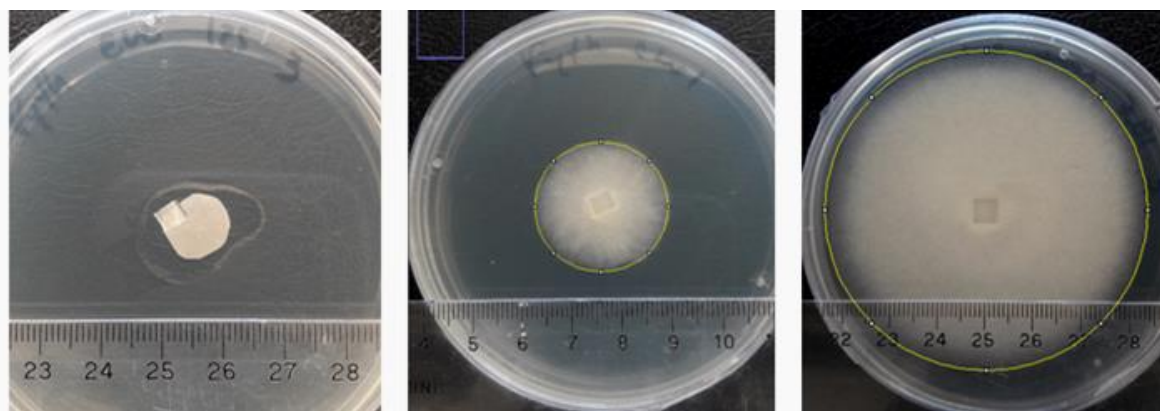


Figura 2. Diferentes halos de crecimiento oomicótico en medio GL. El círculo amarillo corresponde a la herramienta del software Image J para realizar las mediciones.

Además de la CI_T , para este ensayo, se estimaron las concentraciones de inhibición del 50 y 90% del crecimiento (CI_{50} y CI_{90}) por medio de regresiones no lineales, ajustando los datos con un modelo log-logístico de pendiente variable y respuesta normalizada, según la ecuación: $y = 100 / (1 + 10^{((\text{Log}x_0 - x) * p)}$); o un modelo log-logístico de pendiente estándar y respuesta normalizada, según la ecuación: $y = 100 / (1 + 10^{(x - \text{Log}x_0)}$). Donde y corresponde al crecimiento de micelio (medido en valores de superficie ocupada) normalizado con respecto al crecimiento del grupo control, x_0 corresponde a la concentración a la cual la respuesta está en el medio entre el límite inferior y el límite superior de la estimación y p indica la pendiente de la curva concentración-respuesta. Se utilizó el software GraphPad Prism 8.0.2. para la estimación de las regresiones no lineales. La CI_{50} se calculó con la ecuación indicada arriba con los parámetros estimados, considerando $y = 50$, como la concentración de producto que inhibe en un 50% el crecimiento del micelio en la placa con medio GL, con respecto al grupo control. Mientras que CI_{90} se calculó considerando $y = 90$, como la concentración de producto que inhibe en un 90% el crecimiento del micelio.

4.2. Evaluación de la actividad antioomicótica sobre micelio, técnica de dilución en placas

Para la realización de este ensayo, se utilizó una adaptación de la metodología propuesta por Stueland *et al.* (2005b). Se utilizaron placas de 48 hoyos de fondo plano, estériles, donde se sembró un inóculo de 3 x 3 mm de cada cepa por hoyo. En cada hoyo, se colocaron los productos naturales (diluidos en DMSO) en una solución al 10% v/v con medio GL líquido. Las concentraciones finales en cada hoyo se ajustaron en 0,5, 1,0, 2,5 y 5,0 mM para el eugenol e isoeugenol; 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 y 5 mM para el timol y 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 y 7,5 mM para el guaiacol. Las placas fueron selladas con Parafilm M® e incubadas durante 48 h a 27 ± 1 °C. Después de 48 h, se observó el crecimiento de las hifas que se expandieron a partir del inóculo. El grado de crecimiento se dividió en 3 categorías (tabla 1, figura 3). Los tratamientos se realizaron por triplicado. Se realizó un control negativo (sin producto) y un blanco (con DMSO).

Tabla 1. Categorías para la determinación del grado de crecimiento del micelio para el ensayo de la técnica de dilución placas.

| Categoría | Descripción |
|-----------|--|
| 0 | Sin crecimiento. |
| 1 | Crecimiento leve-moderado que no alcanza a las paredes del hoyo. |
| 2 | Crecimiento alto. El micelio abarca toda la superficie del hoyo. |

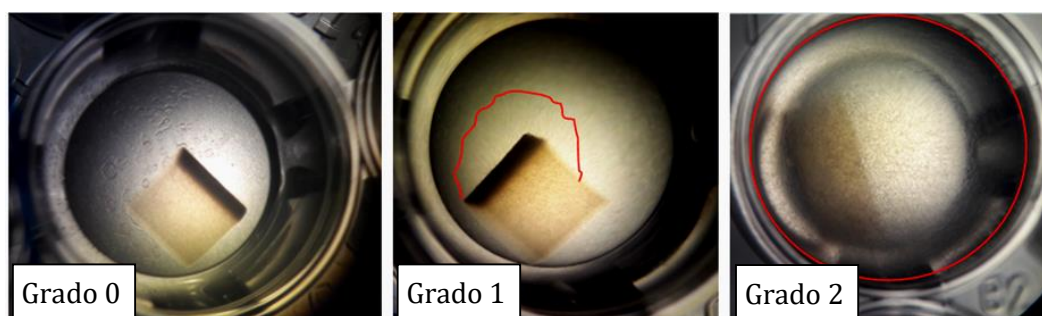


Figura 3. Categorías para la determinación del grado de crecimiento del micelio dentro de los hoyos. La línea roja marca el límite de crecimiento de las hifas a partir del inóculo.

4.3. Evaluación del efecto oomicocida u oomicostático

Con el fin de determinar la inhibición oomicocida u oomicostática, luego del ensayo de la sección anterior, se retiraron 3 inóculos sin crecimiento aparente de micelio, por tratamiento, de la placa de 48 hoyos, se enjuagaron en agua destilada estéril y se incubaron en tubos de ensayo con medio GL líquido al 10% v/v en agua destilada estéril. Después de 48 h se observó la presencia o ausencia de hifas en crecimiento que irradiaron desde el inóculo (figura 4).

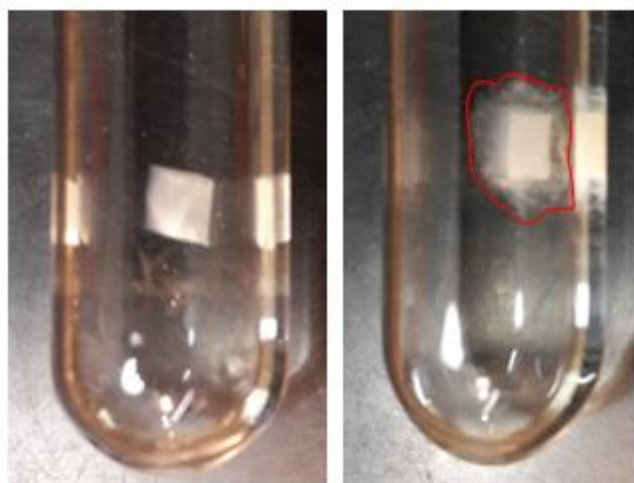


Figura 4. Inóculos incubados en tubos con medio GL líquido. La línea roja marca el límite de crecimiento de las hifas a partir del inóculo.

4.4. Evaluación de la actividad antioomicótica sobre zoosporas

Se evaluó efecto oomicostático de los productos naturales contra zoosporas de *Saprolegnia parasitica* C08, *S. diclina* C13, *S. parasitica* C22 y *S. ferax* C20. El ensayo se realizó en placas de 96 hoyos que contenían diluciones de los productos en medio GL líquido. Las diluciones utilizadas fueron 1,25 - 4,5 mM para el eugenol; 1,0 - 3,0 mM para el isoeugenol; 0,5 - 3,0 mM para el timol y 5,0 - 13,75 mM para el guaiacol. Las zoosporas se obtuvieron según se explica en la metodología general. Los productos naturales se diluyeron en DMSO y luego se preparó una solución X10 de cada extracto natural con agua destilada estéril (Mori *et al.* 2002). Se añadieron 20 μ L de cada solución concentrada X10 a 20 μ L de medio GL líquido y 160 μ L de suspensión de zoosporas. Se realizó un control con agua estéril y un blanco con solución de 0,3% de DMSO en agua destilada estéril. Los tratamientos y controles se hicieron por triplicado. La actividad antioomicótica se evaluó

mediante la observación al microscopio invertido de tubos germinativos a las 48 h ($T^{\circ}=15 \pm 1^{\circ}\text{C}$). El grado de crecimiento se dividió en 3 categorías (tabla 2, figura 5).

Tabla 2. Categorías para la determinación del grado de germinación de las zoosporas en el ensayo de evaluación oomicostática de los productos naturales.

| Categoría | Descripción |
|-----------|---|
| 0 | Sin crecimiento o esporas germinadas con un crecimiento mínimo. |
| 1 | Observación de tubos germinativos - Crecimiento leve. |
| 2 | Hifas desarrolladas. |

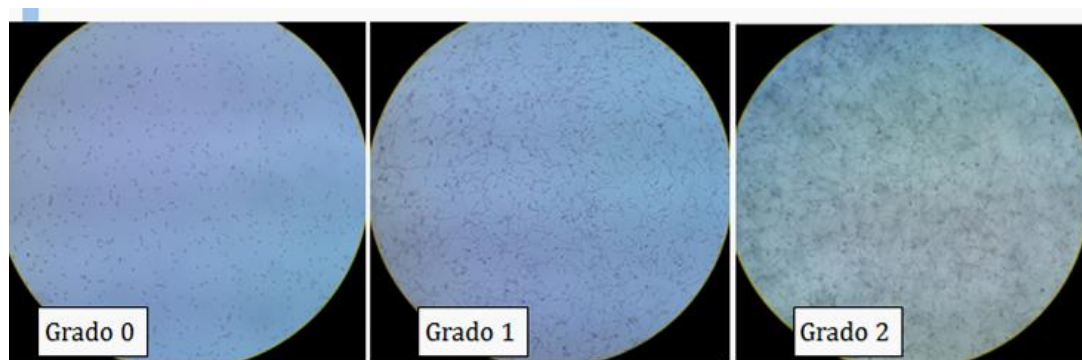


Figura 5. Categorías para la determinación del grado de crecimiento del micelio dentro de los hoyos.

5. RESULTADOS

5.1. Actividad antioomicótica sobre micelio, técnica de microatmósfera

El crecimiento de los micelios expuestos a eugenol, isoeugenol, timol y guaiacol mediante la técnica de microatmósfera se muestra en la tabla 3, mientras que la tabla 4 resume los valores obtenidos de CI_T , CI_{90} y CI_{50} . La mayoría de los tratamientos ajustaron a un modelo log-logístico de pendiente variable y respuesta normalizada, sin embargo, los tratamientos con guaiacol (todos), con eugenol frente a *S. ferax* C20 y con isoeugenol frente a *S. parasitica* C08 no tuvieron concordancia con el mismo, sino que ajustaron a un modelo log-logístico de pendiente estándar (figura 6). Este último modelo, no permitió obtener las CI_{90} para los tratamientos mencionados. El timol presentó en promedio las

CI_T, CI₉₀ y CI₅₀ más bajas frente a los Oomycetes estudiados, seguido por el isoeugenol y, con menor eficacia, el eugenol (tabla 5).

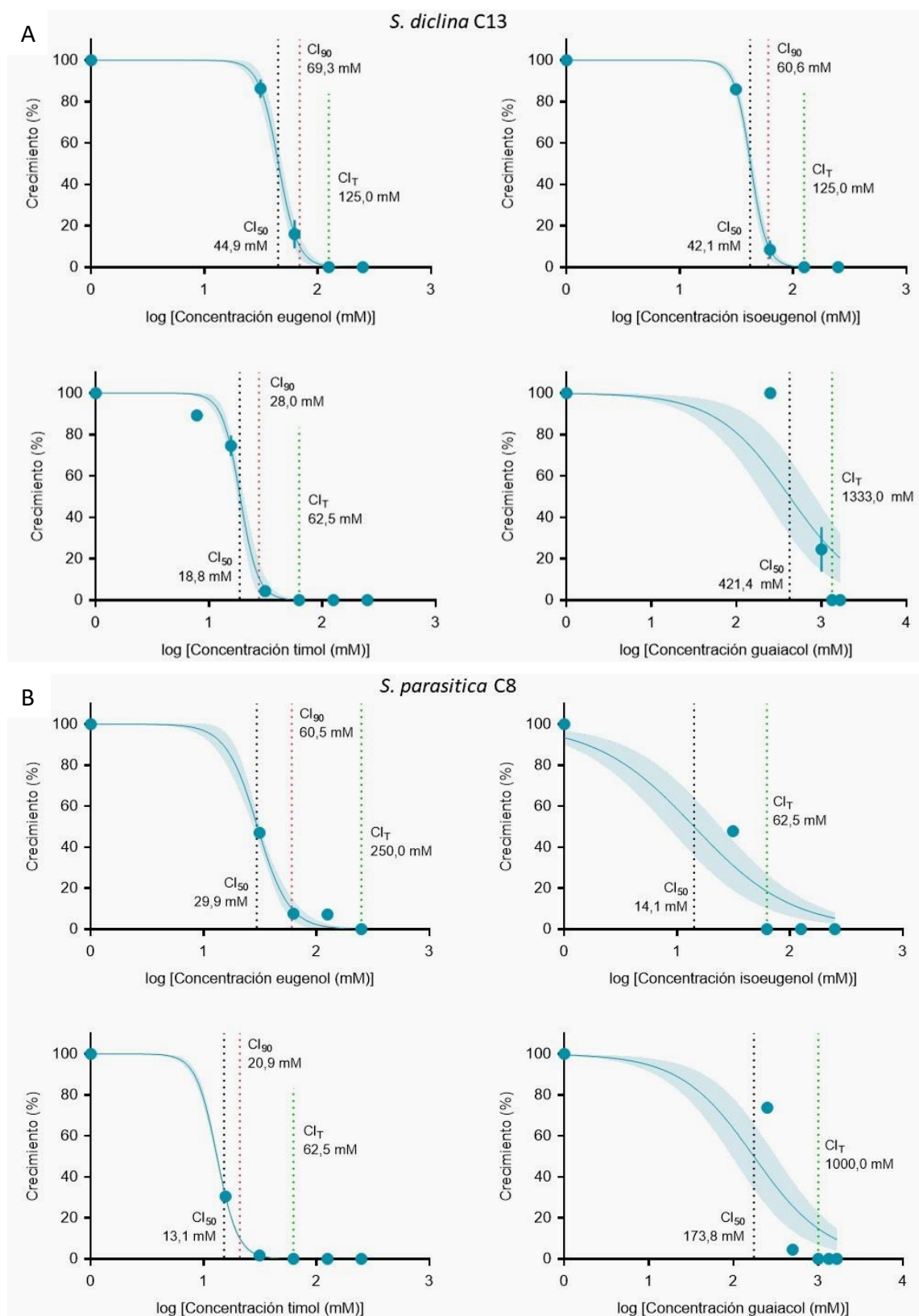
Tabla 3. Técnica de microatmósfera. Efecto antioomicótico del eugenol, isoeugenol, timol y guaiacol sobre el crecimiento de *S. diclina* C13, *S. parasitica* C08, *S. parasitica* C22 y *S. ferax* C20. Porcentaje de crecimiento del micelio (media, n=3, ± error estándar) con respecto al control.

| Concentración | Cepa | | | |
|---------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
| | <i>S. diclina</i> C13 | <i>S. parasitica</i> C08 | <i>S. parasitica</i> C22 | <i>S. ferax</i> C20 |
| Control 0 mM | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| Blanco DMSO | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| Eugenol | | | | |
| 250 mM | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 125 | 0,0 | 7,2 (± 2,74) | 0,0 | 31,9 (± 21,21) |
| 62,5 | 16,0 (± 6,80) | 7,5 (± 2,37) | 23,1 (± 6,18) | 65,4 (± 3,30) |
| 31,25 | 86,3 (± 4,45) | 47,0 (± 2,02) | 77,4 (± 8,05) | 51,0 (± 3,01) |
| Isoeugenol | | | | |
| 250 mM | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 125 | 0,0 | 0,0 | 1,0 (± 0,05) | 0,0 |
| 62,5 | 8,5 (± 4,51) | 0,0 | 3,9 (± 0,70) | 10,2 (± 3,08) |
| 31,25 | 86,0 (± 2,51) | 47,8 (± 2,76) | 40,8 (± 6,76) | 17,9 (± 7,77) |
| Timol | | | | |
| 125 mM | 0,00 | 0,00 | - | 0,00 |
| 62,5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 6,08 (± 3,15) |
| 31,25 | 4,35 (± 0,55) | 1,66 (± 0,53) | 10,90 (± 1,69) | 64,71 (± 5,6) |
| 15,62 | 78,09 (± 4,57) | 38,87 (± 8,36) | 60,25 (± 4,26) | 78,10 (± 2,46) |
| 7,81 | 89,25 (± 1,79) | - | 85,14 (± 7,52) | - |
| 3,9 | 93,35 (± 1,27) | - | - | - |
| Guaiacol | | | | |
| 1333 mM | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 1000 | 24,49 (± 10,83) | 0,00 | 0,00 | 21,39 (± 9,91) |
| 500 | - | 4,53 (± 0,86) | - | 38,01 (± 13,83) |
| 250 | 107,21 (± 4,85) | 73,73 (± 2,97) | 77,43 (± 3,65) | 20,21 (± 10,12) |

Tabla 4. Técnica de microatmósfera. Concentración inhibitoria total (CI_T), concentración inhibitoria noventa (CI₉₀) y concentración inhibitoria cincuenta (CI₅₀) de los productos naturales contra estados vegetativos de *S. diclina* C13, *S. parasitica* C08, *S. parasitica* C22 y *S. ferax* C20. Las CI_T, CI₅₀ y CI₉₀ se expresan en mM.

| Producto | <i>S. diclina</i> C13 | | | <i>S. parasitica</i> C08 | | | <i>S. parasitica</i> C22 | | | <i>S. ferax</i> C20 | | |
|-------------------|-----------------------|------------------|------------------|--------------------------|------------------|------------------|--------------------------|------------------|------------------|---------------------|------------------|------------------|
| | CI _T | CI ₉₀ | CI ₅₀ | CI _T | CI ₉₀ | CI ₅₀ | CI _T | CI ₉₀ | CI ₅₀ | CI _T | CI ₉₀ | CI ₅₀ |
| Eugenol | 125 | 69,33 | 44,9 | 250 | 60,58 | 29,97 | 125 | 81,65 | 44,29 | 250 | - | 50,21 |
| Isoeugenol | 125 | 60,65 | 42,18 | 62,5 | - | 14,15 | 250 | 47,69 | 26,05 | 125 | 57,00 | 18,14 |
| Timol | 62,6 | 28,08 | 18,8 | 62,5 | 20,92 | 13,12 | 62,5 | 35,72 | 17,07 | 125 | 71,28 | 34,04 |
| Guaiacol | 1333 | - | 421,4 | 1000 | - | 173,8 | 1000 | - | 278,2 | 1333 | - | 123,1 |

(-) El modelo de ajuste no permitió su estimación.



Continúa en la pág. siguiente.

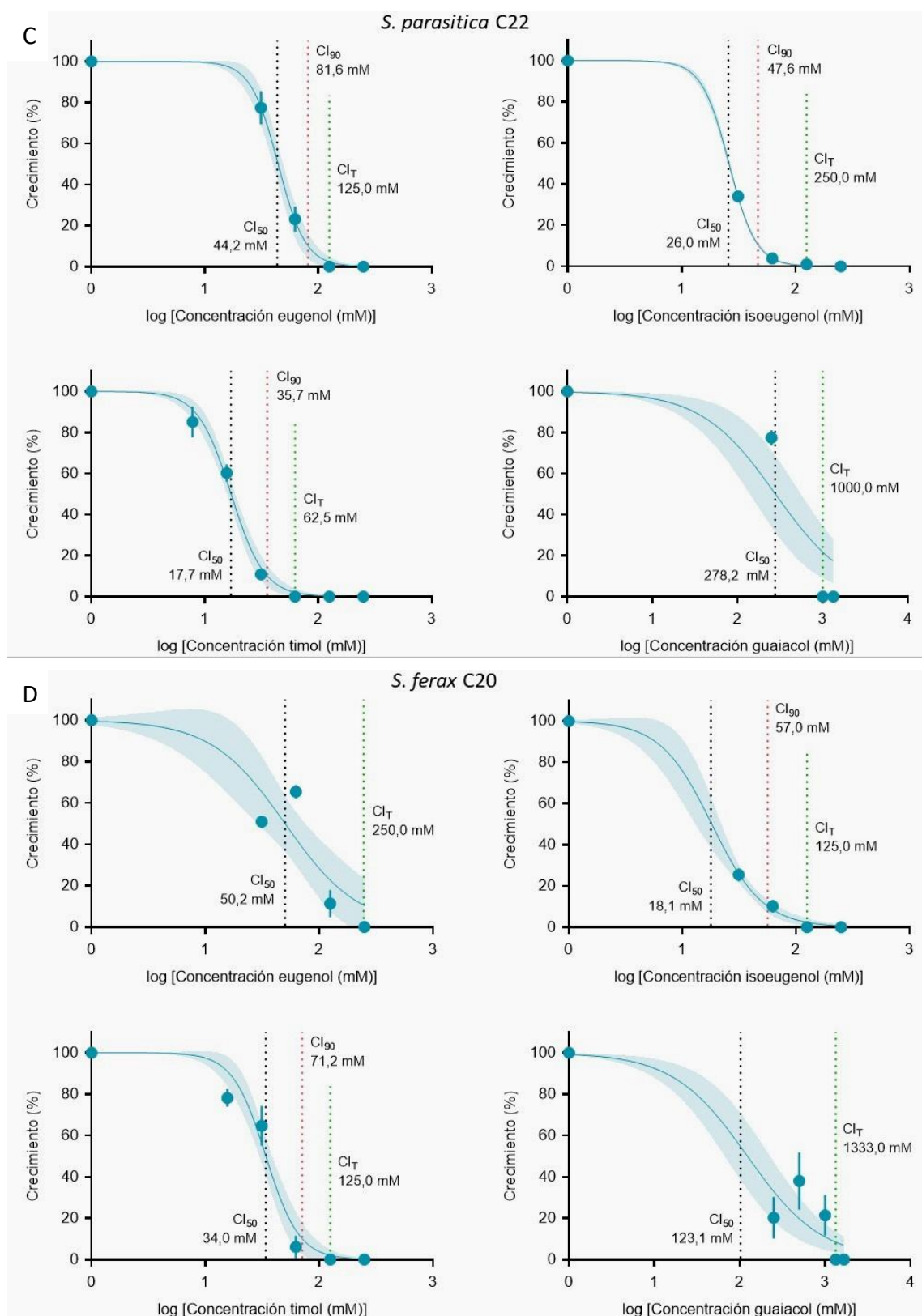


Figura 6. Crecimiento de Oomycetes expuestos a eugenol, isoeugenol, timol y guaiacol. Porcentajes con respecto al control en función del logaritmo de la concentración para la estimación de la CI₅₀ y la CI₉₀ mediante regresión logística. Efecto sobre *S. diclina* C13 (A), *S. parasitica* C08 (B), *S. parasitica* C22 (C) y *S. ferax* C20 (D). Puntos y líneas: media ± error estándar. Bandas alrededor de la curva: intervalo de confianza del ajuste.

Tabla 5. Técnica de microatmósfera. Promedios de las concentraciones inhibitorias totales (CI_T), concentraciones inhibitorias noventa (CI₉₀) y concentraciones inhibitorias cincuenta (CI₅₀) de los productos naturales contra estadios vegetativos de Oomycetes. Las CI_T, CI₉₀ y CI₅₀ se expresan en mM (± error estándar).

| Producto | CI _T | CI ₉₀ | CI ₅₀ |
|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Eugenol | 187,50 (± 41,67) | 70,52 (± 6,11) | 42,34 (± 5,00) |
| Isoeugenol | 140,63 (± 45,41) | 55,11 (± 3,86) | 25,13 (± 7,16) |
| Timol | 78,13 (± 18,04) | 39,00 (± 12,90) | 20,76 (± 5,29) |
| Guaiacol | 1166,5 (± 111,00) | - | 249,13 (± 76,07) |

(-) El modelo de ajuste no permitió su determinación.

5.2. Actividad antioomicótica sobre micelio, técnica de dilución en placas y efecto oomicocida u oomicostático

El ensayo de dilución en placas mostró que todas las cepas fueron sensibles al eugenol, isoeugenol, timol y guaiacol, para alguna de las concentraciones utilizadas. En la tabla 6 se muestran los grados de crecimiento de cada cepa para las diferentes concentraciones de los productos naturales, como así también, los resultados para la determinación de la acción oomicocida u oomicostática de los productos. El timol mostró los valores de CI_T y CL más bajos. Los valores de CI_T y CL para el eugenol, isoeugenol, timol y guaiacol se resumen en la tabla 7.

Tabla 6. Grados de crecimiento del micelio (media, n=3) obtenidos mediante la técnica de dilución en placa (ensayo sección 4.2) e inhibición/no inhibición de crecimiento (ensayo sección 4.3), entre paréntesis. Un signo menos (-), indica inhibición del crecimiento, mientras que un signo más (+) indica el crecimiento del micelio cuando los inóculos se colocaron en GL líquido. En negrita se indica el nivel de tratamiento que determina la CI_T.

| Concentración | Cepa | | | |
|-------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
| | <i>S. diclina</i> C13 | <i>S. parasitica</i> C08 | <i>S. parasitica</i> C22 | <i>S. ferax</i> C20 |
| Control | | | | |
| 0 mM | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| DMSO | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| Eugenol | | | | |
| 5,00 mM | 0,00 (-) | 0,00 (-) | 0,00 (-) | 0,00 (-) |
| 2,50 | 0,00 (-) | 0,00 (-) | 0,00 (-) | 0,00 (-) |
| 1,00 | 1,33 | 2,00 | 2,00 | 1,00 |
| 0,50 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| Isoeugenol | | | | |
| 5,00 mM | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 2,50 | 0,00 | 0,00 | 0,00 (-) | 0,00 (-) |
| 1,00 | 0,00 (-) | 0,00 (-) | 0,00 (-) | 0,00 (-) |
| 0,50 | 0,00 (+) | 0,00 (-) | 0,33 (+) | 0,33 (-) |

| | | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Timol | | | | |
| 5,00 mM | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 2,50 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 1,00 | 0,00 (-) | 0,00 (-) | 0,00 (-) | 0,00 (-) |
| 0,50 | 0,00 (-) | 0,00 (-) | 0,00 (-) | 0,00 (-) |
| 0,25 | 1,00 | 1,00 | 1,33 | 1,66 |
| 0,10 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| Guaiacol | | | | |
| 10,00 mM | 0,00 (+) | 0,00 (+) | 0,00 (-) | 0,00 (+) |
| 7,50 | 0,00 (+) | 0,00 (+) | 0,00 (-) | 0,66 (+) |
| 5,00 | 1,66 | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| 2,50 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| 1,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| 0,50 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 |

Tabla 7. Concentración inhibitoria total (CI_T) y concentración mínima letal (CL) de los productos naturales contra estados vegetativos de *S. diclina* C13, *S. parasitica* C08, *S. parasitica* C22 y *S. ferax* C20. Técnica de dilución en placas. CI_T y CL se expresan en mM.

| Producto | <i>S. diclina</i> C13 | | <i>S. parasitica</i> C08 | | <i>S. parasitica</i> C22 | | <i>S. ferax</i> C20 | |
|-------------------|-----------------------|------|--------------------------|-------|--------------------------|-----|---------------------|-------|
| | CI _T | CL | CI _T | CL | CI _T | CL | CI _T | CL |
| Eugenol | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Isoeugenol | < 0,5 | 1 | < 0,5 | < 0,5 | 1 | 1 | 1 | < 0,5 |
| Timol | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Guaiacol | 7,5 | > 10 | 7,5 | > 10 | 7,5 | 7,5 | 10 | > 10 |

5.3. Actividad antioomicótica sobre zoosporas

Las zoosporas de *Saprolegnia diclina* C13, *S. parasitica* C08, *S. ferax* C21 y *S. ferax* C20 también resultaron sensibles a los productos naturales. En este ensayo, el isoeugenol y el timol fueron los productos más efectivos, las CI_T de estos dos productos resultaron coincidentes y fueron de 1,75 mM para C13, y de 2,25 mM para las cepas C08, C22 y C20. El grado de crecimiento de los micelios se muestra en la tabla 8 mientras que la CI_T de cada producto contra las cepas estudiadas se observa en la tabla 9.

Tabla 8. Efecto de los extractos naturales sobre la germinación de zoosporas de *S. diclina* C13, *S. parasitica* C08, *S. parasitica* C22 y *S. ferax* C20 (media, n=3). En negrita se indica el nivel de tratamiento que determina la Clr.

| Concentración | Cepa | | | |
|-------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
| | <i>S. diclina</i> C13 | <i>S. parasitica</i> C08 | <i>S. parasitica</i> C22 | <i>S. ferax</i> C20 |
| Control | | | | |
| 0 mM | 2 | 2 | 2 | 2 |
| DMSO | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Eugenol | | | | |
| 4,50 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4,25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4,00 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3,75 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3,5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3,25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3,00 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 2,75 | 0 | 1 | 1 | 2 |
| 2,50 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 2,25 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 2,00 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 1,75 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 1,50 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 1,25 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Isoeugenol | | | | |
| 3,00 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2,75 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2,50 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2,25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2,00 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 1,75 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| 1,50 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 1,25 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 1,00 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Timol | | | | |
| 3,00 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2,75 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2,50 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2,25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2,00 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 1,75 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| 1,50 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 1,25 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 1,00 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 0,75 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 0,50 | 2 | 2 | 2 | 2 |

| Guaiacol | | | | |
|----------|---|---|---|---|
| 13,75 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12,50 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11,25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10,00 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 8,75 | 1 | 2 | 0 | 1 |
| 7,50 | 1 | 2 | 0 | 2 |
| 6,25 | 2 | 2 | 0 | 2 |
| 5,00 | 2 | 2 | 1 | 2 |

Tabla 9. Concentración inhibitoria total (CI_T) de eugenol, isoeugenol, timol y guaiacol contra zoosporas de *S. diclina* C13, *S. parasitica* C08, *S. parasitica* C22 y *S. ferax* C20. Técnica de dilución en placas. CI_T se expresa en mM.

| | <i>S. diclina</i> C13 | <i>S. parasitica</i> C08 | <i>S. parasitica</i> C22 | <i>S. ferax</i> C20 |
|------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
| Producto | CI _T | CI _T | CI _T | CI _T |
| Eugenol | 2,75 | 3 | 3 | 3,25 |
| Isoeugenol | 1,75 | 2,25 | 2,25 | 2,25 |
| Timol | 1,75 | 2,25 | 2,25 | 2,25 |
| Guaiacol | 11,25 | 11,25 | 6,25 | 11,25 |

6. DISCUSIÓN

En este capítulo se evaluó la actividad antioomicótica del eugenol, el isoeugenol, el timol y el guaiacol frente a estados vegetativos (micelios) y zoosporas de *S. parasitica* C08, *S. diclina* C13, *S. ferax* C20 y *S. parasitica* C22. La evaluación fue realizada mediante técnicas *in vitro* de microatmósfera y dilución en placas con el fin de determinar, según el caso, la concentración inhibitoria total (CI_T), la concentración inhibitoria 90 (CI₉₀), la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) y la concentración letal (CL) de las sustancias contra las cepas mencionadas.

6.1. Actividad antioomicótica sobre micelio de Oomycetes mediante la técnica de microatmósfera

En este ensayo, se verificó la capacidad antioomicótica de los productos naturales a las concentraciones probadas. Teniendo en cuenta las CI_T, el timol resultó ser la sustancia más efectiva contra *S. diclina* C13 y *S. parasitica* C22 (CI_T = 62,6 mM, para ambas),

mientras que el timol y el isoeugenol fueron las más efectivas contra *S. parasitica* C08 y *S. ferax* C20 ($CI_T = 65,5$ y 125 mM, respectivamente). Por otra parte, *S. ferax* C20 fue la cepa menos sensible a las sustancias probadas. En concordancia con los resultados de la CI_T , las estimaciones de CI_{50} y CI_{90} indican que, en general, el timol fue la sustancia con mayor poder inhibitorio. La estimación de CI_{50} y CI_{90} permitió encontrar diferencias entre tratamientos que obtuvieron la misma CI_T , así, por ejemplo, se pudo observar que a pesar de que el timol y el isoeugenol mostraron una CI_T similar frente a *S. ferax* C20, la CI_{50} fue menor para el isoeugenol y, por lo tanto, podría inferirse que este último tiene un mayor poder inhibitorio frente a esta cepa en particular. Por otra parte, la CI_{90} también permite predecir una concentración efectiva al margen del valor de la CI_T . En este caso, la CI_{90} puede brindar información útil para la realización de futuros ensayos de dosis-respuesta o, al momento de seleccionar dosis adecuadas que contemplen la eficacia y toxicidad de las sustancias, y los costos de aplicación de los tratamientos.

El método de microatmósfera se utiliza en muchos casos con el fin de determinar las propiedades antimicrobianas de aceites esenciales con compuestos volátiles. Esta metodología resulta relevante para el estudio de aceites esenciales con potencial uso como conservantes atmosféricos de materiales de valor patrimonial y documental, tales como papel, fotografías o cintas magnéticas (Delespaul *et al.*, 2000; Lavín *et al.*, 2016). Este fue el primero de los ensayos realizados en esta tesis para la evaluación de las sustancias con potencial antioomicótico y, de este modo, sirvió como *screening* en la verificación de la capacidad antioomicótica del eugenol, el isoeugenol, el timol y el guaiacol. Los resultados obtenidos con esta técnica fueron coherentes con los obtenidos mediante la técnica de dilución en placas, discutidos abajo.

6.2. Actividad antioomicótica sobre micelio y zoosporas de Oomycetes mediante la técnica de dilución en placas

El ensayo de dilución en placas contra estados vegetativos mostró que todas las cepas de Oomycetes estudiadas fueron sensibles al eugenol, isoeugenol, timol y guaiacol. A similares concentraciones, el timol y el isoeugenol fueron las sustancias más efectivas, mientras que el guaiacol fue el que menos afectó al crecimiento de los micelios. El timol

tuvo las concentraciones inhibitorias totales (CI_T) más bajas contra *S. parasitica* C22 (0,5 mM) y *S. ferax* C20 (0,5 mM), mientras que el isoeugenol presentó mayor efectividad contra *S. diclina* C13 (< 0,5 mM) y *S. parasitica* C08 (< 0,5 mM). Estas dos sustancias también mostraron mayor poder oomicocida; el timol presentó las concentraciones mínimas letales (CL) más bajas contra *S. diclina* C13 (0,5 mM) y *S. parasitica* C22 (0,5 mM) mientras que el isoeugenol fue más efectivo contra *S. parasitica* C08 (< 0,5 mM) y *S. ferax* (< 0,5 mM). De igual modo que los estados vegetativos, las zoosporas de *S. parasitica* C08, *S. diclina* C13, *S. ferax* C20 y *S. parasitica* C22 también resultaron sensibles a las sustancias probadas. En este caso, también el isoeugenol y el timol fueron los productos más efectivos: las CI_T de estos dos productos resultaron coincidentes y fueron de 1,75 mM para *S. diclina* C13 y de 2,25 mM para *S. parasitica* C08, *S. ferax* C20 y *S. parasitica* C22.

La acción antimicrobiana de los aceites esenciales y sus componentes activos puede deberse a distintos mecanismos, aunque gran parte de los mismos incluye algún grado de alteración de las membranas celulares (Burt, 2004). Los aceites esenciales son lipófilos que atraviesan la pared celular y la membrana citoplasmática, alteran la estructura de diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos, y las permeabilizan (Pinto *et al.*, 2009). En la bibliografía consultada no se describen en particular estos mecanismos contra los Oomycetes, la mayoría de los estudios en este tema fueron realizados sobre hongos (Fungi) y bacterias. Por ejemplo, Lucini *et al.* (2006) observaron la alteración de la composición de lípidos de membrana de *Sclerotium cepivorum* Berkeley (Ascomycota) en presencia de distintos monoterpenos. La mayoría de estos, y en particular el timol, incrementaron el contenido de ergosterol en las membranas y generaron una disminución en la relación fosfolípidos/esteroles, lo cual es indicador de una menor fluidez de la membrana. Estos autores también sugieren que la peroxidación lipídica es parte del mecanismo de acción letal del timol sobre *S. cepivorum*. También, la acción antifúngica de los compuestos fenólicos parece tener algún efecto sobre la membrana celular. Pinto *et al.* (2009) reportan lesión de la membrana celular y una reducción considerable en la biosíntesis de ergosterol causada por el clavo de olor y el eugenol en *Candida spp.* Berkhout. Finalmente, los mecanismos de acción de los componentes de los aceites esenciales sobre las células bacterianas también fueron estudiados, e incluyen: degradación de la pared celular, daño en la membrana celular y aumento de la

permeabilidad, el daño a las proteínas de membrana, la pérdida del contenido celular, la coagulación del citoplasma, la inhibición enzimática y la disminución de la fuerza protón-motriz (Burt, 2004; Hyldgaard *et al.*, 2015, Marchese *et al.*, 2017).

Cabe destacar que la sensibilidad a los compuestos antimicrobianos puede ser variable entre géneros, especies y cepas (Martin, 1968; Srivastava y Srivastava, 1978). También la naturaleza de las sustancias utilizadas y las características metodológicas de los ensayos, como la temperatura, el medio de cultivo, el pH, el tamaño del inóculo y/o el tiempo de incubación, son variables que pueden afectar la actividad antimicrobiana y los resultados de los ensayos de susceptibilidad (Marchese *et al.*, 2017). Debido a esto, los resultados obtenidos en este estudio son, en la mayoría de los casos, difíciles de comparar con aquellos obtenidos por otros autores y por lo tanto las comparaciones realizadas más adelante deben considerarse de forma referencial.

El timol fue, junto con el isoeugenol, la sustancia que mejor respuesta tuvo contra los Oomycetes estudiados. Esta sustancia tiene una comprobada acción microbicida y antifúngica contra hongos fitopatogénicos y mohos que afectan construcciones humanas (Kurita *et al.*, 1981; Braga *et al.*, 2007; Pei *et al.*, 2009; Marei *et al.*, 2012; Bogdan *et al.*, 2015;). La acción antifúngica del timol fue evaluada, por ejemplo, por Lucini *et al.* (2006) contra *S. cepivorum* y por Kurita *et al.* (1981) contra *Blastomyces dermatitidis* Gilchrist y Stokes, *Histoplasma capsulatum* Darling, *Trichophyton rubrum* (Castellani) Sabouraud, *Fonsecaea pedrosi* (Brumpt) Negróni, *Aspergillus nidulans* Winter y *Penicillium spp.* Link. En concordancia con los resultados obtenidos en esta tesis, las concentraciones inhibitorias obtenidas por Kurita *et al.* (1981) fueron de 0,5 a 2 mM y sugieren que el timol y el isoeugenol poseen mayor capacidad antifúngica que otras sustancias tales como el fenol, el guaiacol y el eugenol. Por su parte, la acción del timol sobre los Oomycetes fue poco estudiada. Como antecedente, se puede mencionar el estudio de Tampieri *et al.* (2003) quienes observaron una CI_T y una CL de 3,3 mM contra una cepa de *S. parasitica* aislada de *P. fluviatilis*, utilizando la técnica de cultivo en medio GL líquido con agitación constante a 18 °C. Los valores observados por estos autores para las CI_T y CL son más altos que los hallados en esta tesis.

El timol es el principal componente activo del aceite esencial de tomillo (*T. vulgaris*) (Nardoni *et al.*, 2019), cuya capacidad antioomicótica también se evaluó en trabajos previos. Nardoni *et al.* (2019), evaluaron la acción oomicocida del aceite esencial de tomillo y otros aceites esenciales sobre *S. parasitica* y determinaron que esta fue la sustancia más efectiva entre las evaluadas. Por otra parte, en el estudio realizado por Tampieri *et al.* (2003), el aceite esencial de tomillo mostró una CI_T de 100 mg L⁻¹ y una CL de 200 mg L⁻¹ contra *S. parasitica*; mientras que extractos etanólicos del mismo aceite fueron efectivos contra *S. diclina* a 400 y 500 mg L⁻¹ (CI_T y CL respectivamente) (Mostafa *et al.*, 2020). Además, en un estudio *in vitro* realizado en Chile, Toledo *et al.* (2004), determinaron que el aceite de tomillo en concentraciones de 150 mg L⁻¹ inhibió el crecimiento de *Saprolegnia sp.*, mientras que, por medio de ensayos *in vivo*, estos investigadores determinaron que los tratamientos a 400 y 200 mg L⁻¹ son efectivos y seguros para la prevención de infecciones en la etapa de incubación de ovas de trucha arcoíris (para los estadios de ovas verdes y con ojo respectivamente).

Si bien se ha demostrado la capacidad antioomicótica del timol y el aceite esencial de tomillo, la utilización de estas sustancias *in vivo* es discutida debido a los efectos biológicos adversos y, por lo tanto, resulta necesario conducir investigaciones con el fin de determinar la seguridad del uso de estas sustancias en acuicultura (Ran *et al.*, 2016; Polednik *et al.*, 2018; Nardoni *et al.*, 2019).

El isoeugenol mostró, junto con el timol, los mejores resultados como antioomicótico contra los Oomycetes estudiados. El isoeugenol tiene comprobada acción antifúngica contra *Candida spp.*, *B. dermatitidis*, *A. nidulans* y *Penicillium spp.*, entre otros y bactericida sobre una gran variedad de bacterias gram-negativas y gram-positivas (Kurita *et al.*, 1981; Laekeman *et al.*, 1990; Hyldgaard *et al.*, 2015; Marchese *et al.*, 2017). Diferentes autores indican que la acción microbicida del isoeugenol es comparable o incluso mayor que la del eugenol (Kurita *et al.*, 1981; Hyldgaard *et al.*, 2015). Los resultados de esta tesis demuestran por primera vez la acción antioomicótica del isoeugenol contra Oomycetes del orden Saprolegniales y podrían sugerir a esta sustancia como una alternativa para el control de las oomicosis en acuicultura. Sin embargo, la citotoxicidad del isoeugenol puede limitar su uso (Laekeman *et al.*, 1990) y, al igual que

para el timol, futuros estudios deberían realizarse para evaluar la seguridad de esta sustancia en acuicultura. Cabe mencionar que en la actualidad el isoeugenol es utilizado como sedante y/o anestésico en la cría de salmones y trucha arcoíris para operaciones de rutina tales como clasificación, vacunación o transporte, a concentraciones de 0,002 - 0,013 mg L⁻¹. Además, se encuentran establecidos los límites máximos residuales para su uso en la Unión Europea (<https://centrovet.virbac.com>; <https://www.ema.europa.eu/en>).

Las cepas de Oomycetes estudiadas en este capítulo, también fueron inhibidas por el eugenol. Los resultados obtenidos, se aproximan a los hallados por Hussein *et al.* (2000), quienes determinaron la CI_T y la CL, en valores de 3,04 y 6,09 mM respectivamente contra estados vegetativos de distintas especies del género *Saprolegnia*, incluidas *S. parasitica*, *S. diclina* y *S. ferax*. Estos autores también observaron que el eugenol inhibía la germinación de zoosporas a una concentración de 1,52 mM. En cambio, en este trabajo de tesis las CI_T del eugenol contra zoosporas fueron apenas mayores que las obtenidas para los estados vegetativos de las mismas cepas (2,75 a 3,25 mM) dependiendo de la cepa. Por otra parte, Hussein *et al.* (2000) demostraron la alta toxicidad del eugenol contra juveniles de la trucha arcoíris y el salmón japonés (*Oncorhynchus masou* (Brevoort)). En dicho estudio, una exposición por 10 min a 0,38 mM generó una mortalidad del 10% para la trucha arcoíris y del 100% para el salmón japonés. En cambio, a la misma concentración, la exposición durante 20 min causó el 100% de mortalidad para ambas especies. Las concentraciones mencionadas son menores que las CI_T y CL halladas, tanto en el trabajo de Hussein *et al.* (2000) como en esta tesis, lo cual podría desalentar su uso para el tratamiento antioomicótico en la producción acuícola, al menos, para las especies de salmónidos.

El eugenol es el principal ingrediente activo del clavo de olor (*S. aromaticum*). Hauff y Barnes (2016) comprobaron el efecto del clavo de olor molido en solución sobre el crecimiento de micelio en semillas sésamo, mientras que Hoskonen *et al.* (2015) observaron que la exposición estática continua a 100 mg L⁻¹ de aceite de clavo de olor inhibe el crecimiento de *Saprolegnia sp.* En el mismo estudio, la concentración capaz de inhibir el crecimiento oomicótico en tratamientos *in vitro* mediante baños periódicos de

15 minutos fue de 10000 mg L⁻¹. Estos autores demostraron también que los baños de entre 1 y 3 veces por semana de 1000 mg L⁻¹ resultan tóxicos para ovas de salmón Chinook y causan mortalidades del 95 - 100%. Por lo tanto, estos autores sugieren que el clavo de olor no sería un producto adecuado para controlar las infecciones oomicóticas en acuicultura. Por otra parte, el clavo de olor se usa en bajas dosis como anestésico, sin embargo, la duración de la exposición puede afectar la toxicidad y las exposiciones largas pueden causar la muerte de los peces, en vez de la sedación (Marin Municipal District Vegetation Management Plan, 2010).

Finalmente, el guaiacol presentó menor efecto oomicostático y oomicocida que el timol, el eugenol y el isoeugenol. En general, las CI_T y las CL observadas frente a los estadios vegetativos fueron más altas que para los otros productos. Además, contra los estadios zoospóricos su acción antioomicótica también fue menor. En este caso, *S. parasitica* C22 parece ser más sensible al guaiacol que el resto de las cepas estudiadas, como lo muestran los resultados de la CL contra estados vegetativos y CI_T contra zoosporas. Algunos estudios previos evaluaron la capacidad antifúngica del guaiacol (Kurita *et al.*, 1981; Roncadori *et al.*, 1985), sin embargo, no se estudió hasta el momento su acción contra Oomycetes. En concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, Kurita *et al.* (1981) determinaron que la acción antifúngica del guaiacol es menor que la del timol, el eugenol y el isoeugenol. La acción antifúngica contra hongos (Fungi) tales como *B. dermatitidis*, *A. nidulans* y *Penicillium spp.*, entre otros, fue establecida en 6 a >10 mM, concentraciones que son similares a las CI_T y CL obtenidas en esta tesis, lo que confirma la baja capacidad antifúngica del guaiacol.

En este estudio, las CI_T de los productos naturales para los estadios zoospóricos fueron en general mayores que para los estadios vegetativos de la misma cepa. Estos resultados son contrarios a lo descrito previamente en la bibliografía. Las zoosporas resultan, en general, más sensibles a los productos químicos (antioomicóticos) que los estadios vegetativos (Mori *et al.*, 2002). En el trabajo mencionado previamente de Hussein y Hatai (2002), las CI_T observadas para los estadios zoospóricos de *S. parasitica*, *S. diclina*, *S. ferax*, *S. salmonis*, *A. klebsiana* y *A. piscicida* fueron menores que para los estadios vegetativos de las mismas especies (250 y 500 mg L⁻¹ respectivamente). También, Panchai

et al. (2015b) observaron que las zoosporas de *Achlya spp.* tuvieron mayor sensibilidad que las hifas hacia varios extractos de plantas tailandesas probados como antioomicóticos. Mientras que Mori *et al.* (2002) observaron que las zoosporas de algunas especies de los géneros *Saprolegnia*, *Aphanomyces* y *Achlya* son en general más sensibles que los estadios vegetativos a compuestos naturales como hinokitiol, citral o isotiocianato.

Los resultados contrarios obtenidos en este trabajo de tesis podrían deberse a la temperatura a los que fueron realizados los ensayos. Mientras que el ensayo con zoosporas se realizó a 15 °C, el ensayo con micelio se ejecutó a 27 °C; los ensayos fueron realizados a temperatura ambiente (sin control de temperatura), en distintos sitios geográficos y diferentes épocas del año. La temperatura es un factor que afecta la actividad antimicrobiana de varios componentes de los aceites esenciales y otros antibióticos. Algunos estudios demostraron que, a mayor temperatura, el timol aumenta el poder antibiótico contra bacterias gram-negativas (Phumkhachorn *et al.*, 2019) y que la temperatura también incide positivamente en el efecto combinado de la nisina con el carvacol contra *Bacillus cereus* Frankland y Frankland (Periago y Moezelaa, 2001). Además, el aumento progresivo de la temperatura mejora los efectos antimicrobianos de distintos antibióticos contra *Candida spp.* (Fungi) (Odds *et al.*, 1993) así como también contra *Staphylococcus spp.* Rosenbach (Hajdu *et al.*, 2010) y otras bacterias gram-negativas y gram-positivas (Mackowiak *et al.*, 1982).

Ante la necesidad de encontrar sustancias alternativas y ambientalmente amigables para el control de las oomicosis en los sistemas de producción acuícola, los resultados obtenidos en esta tesis pueden aportar información útil y servir de base para futuras líneas de investigación. Por un lado, deberían obtenerse con mayor precisión las concentraciones mínimas inhibitorias y letales sobre los Oomycetes asociadas a pisciculturas: sobre distintos géneros, especies y entre cepas de una misma especie; así como también determinar el efecto de la temperatura sobre estos parámetros. Por otra parte, es necesario estudiar la toxicidad de los productos naturales más promisorios (timol e isoeugenol) sobre las especies de peces de interés en acuicultura, en el caso de la provincia del Neuquén: los salmónidos y el pejerrey patagónico. Y, finalmente, deben

establecerse las dosis, la duración de los tratamientos y el modo de administración de las sustancias para el uso seguro en la prevención y control de las enfermedades oomicóticas en acuicultura.

CONCLUSIONES

- En el ámbito de la piscicultura del CEAN, Junín de los Andes, se aislaron e identificaron once especies pertenecientes a los ordenes Saprolegniales y Leptomitales del phylum Oomycota. Las especies *Saprolegnia aenigmatica*, *Achlya ambisexualis*, *Pythiopsis cymosa* y *P. humphreyana* representan nuevas citas para nuestro país. Mientras que *S. diclina*, *S. ferax*, *S. parasitica*, *S. glomerata*, *Newbya dichotoma*, *Scoliolegnia asterophora* y *Leptomitus lacteus* fueron registradas en Argentina con anterioridad.
- A partir de la amplificación de la región del ADN mitocondrial Cox2, la comparación con secuencias depositadas en GenBank y análisis filogenéticos, se agruparon 56 secuencias y se las asignó a los clados *S. parasitica*, *S. ferax*, *S. diclina*, *S. aenigmatica* y *Saprolegnia sp.*
- *Saprolegnia diclina* y *S. parasitica* son especies estrechamente relacionadas que se separan como taxones diferentes mediante análisis moleculares.
- En la piscicultura del CEAN, las especies de Oomycetes que fueron identificadas molecularmente (*S. parasitica*, *S. ferax*, *S. diclina* y *S. aenigmatica*) colonizan distintos sustratos (peces, ovas y/o materia orgánica) en forma diferencial. En futuros estudios se debería estudiar los factores que determinan este tipo de colonización.
- Las ovas vivas son resistentes a las zoosporas de los Oomycetes, mientras que las ovas muertas son susceptibles a la colonización por los mismos. En los sistemas de incubación, los grupos de ovas muertas son potenciales focos infectivos, pasibles de ser colonizados por zoosporas de *S. parasitica*, *S. ferax*, *S. diclina*, *S. glomerata*, *Saprolegnia spp.*, *L. lacteus*. y *Achlya sp.*, y en particular, a partir focos infectivos de *Saprolegnia spp.*, los micelios se propagan hacia las ovas vecinas y generan un aumento en la mortalidad.
- Las zoosporas de los Oomycetes tienen diferente capacidad de infectar y generar mortalidad en juveniles de trucha arcoíris. Estas diferencias se dan entre especies y entre cepas de una misma especie. Las oomicosis causadas por *S. diclina*, *S. ferax* y *S.*

parasitica ocurren cuando los peces presentan lesiones tegumentarias, mientras que un tegumento íntegro evita la infección por las zoosporas. Establecer buenas prácticas de manejo y condiciones adecuadas de cría permite minimizar el impacto de las infecciones oomicóticas en estaciones de piscicultura.

- Los resultados de esta tesis no sustentan la correlación entre la patogenicidad y la producción de morfotipos diferentes de zoosporas, propuesta en la bibliografía. *Saprolegnia parasitica* no resultó ser más patogénica que *S. diclina* o *S. ferax* como podría esperarse según las características de sus quistes secundarios.
- El efecto de las zoosporas de *S. diclina* en larvas de pejerrey patagónico puede depender de los componentes del alimento. La combinación de alimento vivo y alimento formulado favorece fuertemente una infección originada en el tubo digestivo y el consecuente aumento de la mortalidad.
- Bajo las condiciones de este estudio, la infección por *Flavobacterium psychrophilum* no sensibiliza a las truchas arcoíris hacia la infección por *S. parasitica*. Las zoosporas de *S. parasitica* no colonizan preferencialmente a los peces previamente infectados con *F. psychrophilum* y tampoco se observan efectos sinérgicos en la mortalidad o a nivel histopatológico.
- En las truchas arcoíris, la infección con *F. psychrophilum* genera la activación de la respuesta inmune inespecífica (dada por el incremento del porcentaje relativo de monocitos y trombocitos con forma de huso en la sangre) y, a la vez, puede causar la supresión del sistema inmune adaptativo (dado por la disminución en el contenido de inmunoglobulinas en mucus y, además, debido a que *F. psychrophilum* evita el aumento en el porcentaje de linfocitos causado en respuesta a *S. parasitica*).
- En hígado de trucha arcoíris, la infección por *F. psychrophilum* afecta el balance oxidativo mientras que la infección por *S. parasitica* aumenta el daño oxidativo a lípidos.
- Los estadios vegetativos y zoospóricos de *S. parasitica*, *S. ferax* y *S. diclina* son sensibles al eugenol, isoeugenol, timol y guaiacol. Si bien existe cierta variación según la especie, el timol y el isoeugenol tienen mayor poder de inhibición y podrían ser tenidas en cuenta en futuros estudios de toxicidad, dosificación y/o administración

de los tratamientos para considerar su uso en la prevención y control de las oomicosis en acuicultura.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Latif, H. M., Dawood, M. A., Menanteau-Ledouble, S. y El-Matbouli, M. (2020). The nature and consequences of co-infections in tilapia: A review. *Journal of Fish Diseases*, 43(6), 651-664.
- Adel, M., Dadar, M., Zorriehzahra, M. J., Elahi, R. y Stadtlander, T. (2020). Antifungal activity and chemical composition of Iranian medicinal herbs against fish pathogenic fungus, *Saprolegnia parasitica*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(6), 3239-3254.
- Adeyemi, J. A. (2014). Oxidative stress and antioxidant enzymes activities in the African catfish, *Clarias gariepinus*, experimentally challenged with *Escherichia coli* and *Vibrio fischeri*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(2), 347-354.
- Agelet, L., Manes, J., Vigliano, F. A. y Cerutti, P. A. (2003). Estudio histológico e histoquímico del tubo digestivo de juveniles de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). Sitio Argentino de Producción Animal. https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_peces/piscicultura/118-Jornadas_2003_1.pdf.
- Agius, C. (1981). The effects of splenectomy and subsequent starvation on the storage of haemosiderin by the melano-macrophages of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 18(1), 41-44.
- Agius, C. y Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26(9), 499-509.
- Alberts, V. A., Khan, S. S., Lim, D. V. y Strake, D. (1989). Extracellular enzyme activity of some Saprolegniales from a Florida estuary. *Mycologia*, 81(3), 460-463.
- Alderman, D. J. (1994). Control of Oomycete pathogens in aquaculture. En: Mueller G. J. (ed), Salmon Saprolegniasis. U.S. Department of Energy, Bonneville Power Administration, Portland, Oregon, pp. 87-98.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. y Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. John Wiley and Sons. Inc., New York, 868.
- Ali, E. H. (2005). Morphological and biochemical alterations of oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* as affected by salinity, ascorbic acid and their synergistic action. *Mycopathologia*, 159(2), 231-243.
- Ali, E. H., Hashem, M. y Al-Salahy, M. B. (2011). Pathogenicity and oxidative stress in Nile tilapia caused by *Aphanomyces laevis* and *Phoma herbarum* isolated from farmed fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94(1), 17-28.
- Allen, J. L. (1990). Residues of Malachite green in muscle, eggs, and fry of treated Atlantic Salmon and Chinook Salmon. *US Fish and Wildlife Service*, 101, 0-4.
- Aller-Gancedo, J. M., Fregeneda-Grandes, J. M., González-Palacios, C., García-Iglesias, M. J. y Pérez-Ordoyo, L. I. (2016). First record of an outbreak of saprolegniosis by *Saprolegnia parasitica* in *Pseudochondrostoma duriense* (Coelho, 1985) (Cyprinidae). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 36(2), 91.
- Álvarez, F., Villena, A., Zapata, A. y Razquin, B. (1995). Histopathology of the thymus in *Saprolegnia*-infected wild brown trout, *Salmo trutta* L. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 47(1-2), 163-172.
- Álvarez, F., Razquin, B., Villena, A., Fierro, P. L. y Zapata, A. (1988). Alterations in the peripheral lymphoid organs and differential leukocyte counts in *Saprolegnia*-infected brown trout, *Salmo trutta* fario. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 18(2), 181-193.

- Arellano, M. L., Marano, A. V. y Steciow, M. M. (2008). Nuevas citas de Saprolegniales (Peronosporomycota, Straminipila) para ambientes acuáticos de la provincia de Buenos Aires (Argentina). *Darwiniana*, 46(1), 36-45.
- Ashour, A. A., Mustafa, S. A. y Yassein, S. N. (2017). Histopathological studies on common carp (*Cyprinus carpio* L.) infected with *Saprolegnia* sp. and treated with Virkon®. *Mirror of Research in Veterinary Sciences and Animals*, 6(1), 19-30.
- Azimzadeh, K. y Amniattalab, A. (2017). Total sialic acid, oxidative stress and histopathological changes in rainbow trout saprolegniasis (*Oncorhynchus mykiss*). *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 23, 55-62.
- Baldissera, M. D., Souza, C. F., Júnior, G. B., de Vargas, A. C., Boligon, A. A., de Campos, M. M., Stefani, L. y Baldisserotto, B. (2017). *Melaleuca alternifolia* essential oil enhances the non-specific immune system and prevents oxidative damage in *Rhamdia quelen* experimentally infected by *Aeromonas hydrophila*: effects on cholinergic and purinergic systems in liver tissue. *Fish and Shellfish Immunology*, 61, 1-8.
- Baldissera, M. D., Souza, C. F., Parmeggiani, B., Leipnitz, G., Verdi, C. M., Santos, R. V., Stefani, L. y Baldisserotto, B. (2018). The disturbance of antioxidant/oxidant balance in fish experimentally infected by *Aeromonas caviae*: relationship with disease pathophysiology. *Microbial Pathogenesis*, 122, 53-57.
- Baldissera, M. D., Souza, C. F., Abbad, L. B., Izabel, M., Rocha, U. M., Veiga, M. L., Silva, A. S. y Baldisserotto, B. (2020). Oxidative stress in liver of grass carp *Ctenopharyngodon idella* naturally infected with *Saprolegnia parasitica* and its influence on disease pathogenesis. *Comparative Clinical Pathology*, 29 (2), 581-586.
- Bangyeekhun, E., Quiniou, S. M., Bly, J. E. y Cerenius, L. (2001). Characterisation of *Saprolegnia* sp. isolates from channel catfish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45 (1), 53-59.
- Barde, R. D., Deshpande, M., Nagthane, N., Darak, O., y Baig, M. M. V. (2020). A review of *Saprolegnia* infection in freshwater fishes and control of the Saprolegniosis. *Sustainable Humanosphere*, 16(1), 702-711.
- Barnes, M. E., Wintersteen, K., Sayler, W. A. y Cordes, R. J. (2000). Use of formalin during incubation of rainbow trout eyed eggs. *North American Journal of Aquaculture*, 62(1), 54-59.
- Barnes, M. E., Sayler, W. A. y Cordes, R. J. (2001). Use of formalin treatments during incubation of eyed eggs of brown trout. *North American Journal of Aquaculture*, 63(4), 333-337.
- Barnes, M. E. y Brown, M. L. (2011). A Review of *Flavobacterium psychrophilum* Biology, Clinical Signs, and Bacterial Cold Water Disease Prevention and Treatment. *The Open Fish Science Journal*, 4, 40-48.
- Basanta, M. D., Perotti M. G. y Steciow, M. M. (2011). Determinación, grado de infección y rol ecológico de hongos acuáticos (Oomycetes) en dos poblaciones de *Pleuroderma thaul* (Anura, Leiuperidae). XII Congreso Argentino de Herpetología. San Carlos de Bariloche.
- Beakes, G. y Ford, H. (1983). Esterase isoenzyme variation in the genus *Saprolegnia*, with particular reference to the fish-pathogenic *S. diclina-parasitica* complex. *Microbiology*, 129(8), 2605-2619.
- Beakes, G. W. (1994). Features which characterize *Saprolegnia* isolates from salmonid fish lesions- a review. En: *Salmon Saprolegniasis*, 33-66.
- Beakes, G. W. y Thines, M. (2017). Hyphochytriomycota and Oomycota. En: *Handbook of the Protists*, 435-505.

- Belmonte, R., Wang, T., Duncan, G. J., Skaar, I., Mérida, H., Bulone, V., van West, P. y Secombes, C. J. (2014). Role of pathogen-derived cell wall carbohydrates and prostaglandin E2 in immune response and suppression of fish immunity by the oomycete *Saprolegnia parasitica*. *Infection and Immunity*, 82(11), 4518-4529.
- Bernardet, J. F., Nakagawa, Y. y Holmes, B. (2002). Proposed minimal standards for describing new taxa of the family Flavobacteriaceae and emended description of the family. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 1049-1070.
- Bieczynski, F., Torres, W. D., Paineofilu, J. C., Castro, J. M., Bianchi, V. A., Frontera, J. L., Paz, D., González, C., Martín, A., Villanueva, S. y Luquet, C. M. (2016). Alterations in the intestine of Patagonian silverside (*Odontesthes hatcheri*) exposed to microcystin-LR: Changes in the glycosylation pattern of the intestinal wall and inhibition of multidrug resistance proteins efflux activity. *Aquatic Toxicology*, 178, 106-117.
- Bieczynski, F., Paineofilú, J. C., Venturino, A. y Luquet, C. M. (2021). Expression and Function of ABC Proteins in Fish Intestine. *Frontiers in Physiology*, 12, 791834.
- Biller, J. D. y Takahashi, L. S. (2018). Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90 (4), 3403-3414.
- Bly, J. E., Lawson, L. A., Dale, D. J., Szalai, A. J., Durburow, R. M. y Clem, L. W. (1992). Winter saprolegniosis in channel catfish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 13(3), 155-164.
- Bly, J. E., Lawson, L. A., Abdel-Aziz, E. S. y Clem, L. W. (1994). Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, immunity to *Saprolegnia* sp. *Journal of Applied Aquaculture*, 3(1-2), 35-50.
- Bly, J. E., Quiniou, S. M. A., Lawson, L. A. y Clem, L. W. (1996). Therapeutic and prophylactic measures for winter saprolegniosis in channel catfish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 24(1), 25-33.
- Bly, J. E., Quiniou, S. A., Lawson, L. A. y Clem, L. W. (1997). Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Fish Diseases*, 20(1), 35-40.
- Bogdan, S., Deyá C. y Romagnoli, R. (2015). Evaluación de timol para el control antifúngico sobre películas de pintura. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 20, 699-704.
- Bonanse, M., Mancini, M., Ledesma, M., Ferrero, S., Rodriguez, C. y Pinotti, L. (2019). Remote sensing application to estimate fish kills by Saprolegniasis in a reservoir. *Science of The Total Environment*, 669, 930-937.
- Borisutpeth, M., Kanbutra, P., Weerakhun, S., Wada, S. y Hatai, K. (2014). In vitro antifungal activity of *Cassia fistula* L. against selected pathogenic water molds. *International Journal of Phytomedicine*, 6(2), 237.
- Borrego, S., Valdés, O., Vivar, I., Lavin, P., Guiamet, P., Battistoni, P., Gómez de Saravia S. y Borges, P. (2012). Essential oils of plants as biocides against microorganisms isolated from Cuban and Argentine documentary heritage. *International Scholarly Research Network Microbiology*, 2012.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Braga, F. G., Bouzada, M. L. M., Fabri, R. L., Matos, M. D. O., Moreira, F. O., Scio, E. y Coimbra, E. S. (2007). Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2), 396-402.
- Bridge, P. D., Roberts, P. J., Spooner, B. M. y Panchal, G. (2003). On the unreliability of published DNA sequences. *New Phytologist*, 160(1), 43-48.

- Brivio, M. F., Bassi, R. y Cotelli, F. (1991). Identification and characterization of the major components of the *Oncorhynchus mykiss* egg chorion. *Molecular Reproduction and Development*, 28(1), 85-93.
- Bruno, D. W. (1992). *Cytophaga psychrophila* (= *Flexibacter psychrophilus*) (Borg), histopathology associated with mortalities among farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in the UK. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 12, 215.
- Bruno, D. E. y Ellis, A. E. (1996). Salmonid disease management. En: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 29, 759-832.
- Bruno D. W. y Wood B. P. (1999). Saprolegnia and other Oomycetes. En: Woo PTK, Bruno D.W.(ed), *Fish Diseases and Disorders. Viral, Bacterial and Fungal Infections*, Vol. 3. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, United Kingdom, 599-659.
- Bruno, D. W., van West, P. y Beakes, G. W. (2011). Saprolegnia and other oomycetes. *Fish Diseases and Disorders: Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, 2nd Edition. Wallingford, UK: CABI International, 669-720.
- Bruno, D. W., Noguera, P. A. y Poppe, T. T. (2013). *A colour atlas of salmonid diseases* (Vol. 91). Springer Science and Business Media.
- Buenaño, M. V. (2010). Hemograma de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en tres etapas de producción en la cuenca alta de la provincia del Napo, Ecuador. *Boletín Técnico, Serie Zoológica*, 9(6).
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods— a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Bustos, P. A., Calbuyahue, J., Montana, J., Opazo, B., Entrala, P. y Solervicens, R. (1995). First isolation of *Flexibacter psychrophilus*, as causative agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS), producing rainbow trout mortality in Chile. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 15(5), 162-164.
- Butty, A. K. N., Mhaisen, F. T. y Ali, N. M. (1989). Isolation of three water moulds from fresh water fishes and insect exuviae. *Journal of Environmental Science and Health*, 24, 17-22.
- Cao, H., Zheng, W., Xu, J., Ou, R., He, S. y Yang, X. (2012). Identification of an isolate of *Saprolegnia ferax* as the causal agent of saprolegniosis of Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) eggs. *Veterinary Research Communications*, 36 (4), 239-244.
- Carbajal-González, M. T., Fregeneda-Grandes, J. M., Suárez-Ramos, S., Cadenas, F. R., y Allergancedo, J. M. (2011). Bacterial skin flora variation and in vitro inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* in brown and rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, 96(2), 125-135.
- Carballo, M. y Muñoz, M. J. (1991). Effect of sublethal concentrations of four chemicals on susceptibility of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to saprolegniosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1813-1816.
- Carballo, M., Munoz, M. J., Cuellar, M. y Tarazona, J. V. (1995). Effects of waterborne copper, cyanide, ammonia, and nitrite on stress parameters and changes in susceptibility to saprolegniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6), 2108-2112.
- Carciofi, I. y Rossi, L. (2021). Acuicultura en Argentina: red de actores, procesos de producción y espacios para el agregado de valor. En búsqueda del impulso exportador para los productos acuícolas. Ministerio de Desarrollo Productivo de la Nación, ISSN 2718-8124.

- Cárdenas-Rodríguez, N. y Pedraza-Chaverri, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes. Aspectos básicos. *Educación Química*, 17(2), 164-173.
- Carraschi, S., Garlich, N., Isabel, D., Pereira, B., da Cruz, C. y Tavares Ranzani-Paiva, M. (2018). Isolation of *Saprolegnia aenigmatica* oomycetes and protocol for experimental infection of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, 40, 1-9.
- Castillo, M. A., Ortega, C., Fajardo, R., Martínez-Castaneda, S., Valladares, B., Irgang, R. Poblete-Morales, M. y Avendano-Herrera, R. (2017). First isolation and characterisation of *Flavobacterium psychrophilum* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farmed in Mexico. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 37, 23-30.
- Cavalier-Smith, T. (1986). The kingdom Chromista: origin and systematics. *Progress in Phycological Research*, 4, 309-347.
- Cavalier-Smith, T. y Chao, E. E. (2006). Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (kingdom Chromista). *Journal of Molecular Evolution*, 62(4), 388-420.
- Cavallín L., Hualde P., Molinari L., Moreno P., Torres W. y Sanzano P. (2011). Aspectos de la biología y desarrollo embrionario de *Odontesthes hatcheri* (Atheriniformes: Atherinopsidae). II Jornadas Patagónicas de Biología, I Jornadas Patagónicas de Ciencias y IV Jornadas Estudiantiles de Ciencias Biológicas. *BioScriba*, 4(1), 60.
- Cepeda, C., García-Márquez, S. y Santos, Y. (2004). Improved growth of *Flavobacterium psychrophilum* using a new culture medium. *Aquaculture*, 238(1-4), 75-82.
- Chang, P. H., Wu, T. P., Chung, H. Y. y Chien, C. Y. (2002). *Aeromonas hydrophila* and *Saprolegnia australis* isolated from Ayu, *Plecoglossus altivelis* with ulcerative skin disease in Taiwan. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22(6), 393.
- Charan Raja, M. R., Srinivasan, V., Selvaraj, S., Mahapatra, S. K., (2015). Eugenol: a versatile phytomedicine. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7, 35-40.
- Chauhan, R., Beigh, A. H., y Bhatt, M. (2014). Histopathological manifestations in commercially important fish, *Clarias batrachus* (L.) found infected with *Saprolegnia diclina*. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 2(168), 1168-1172.
- Chihuailaf, R. H., Contreras, P. A. y Wittwer, F. G. (2002). Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health. *Veterinaria México*, 33, 265-283.
- Choi, Y. J., Beakes, G., Glockling, S., Kruse, J., Nam, B., Nigrelli, L., Ploch, S., Hyeon-Dong Shin, Shivas, R., Telle, S., Voglmayr, H. y Thines, M. (2015). Towards a universal barcode of oomycetes—a comparison of the cox1 and cox2 loci. *Molecular Ecology Resources*, 15(6), 1275-1288.
- Choi, Y. J., Lee, S. H., Nguyen, T. T., Nam, B. y Lee, H. B. (2019). Characterization of *Achlya americana* and *A. bisexualis* (Saprolegniales, Oomycota) isolated from freshwater environments in Korea. *Mycobiology*, 47(2), 135-142.
- Chowdhury, S. y Saikia, S.K. (2020). Oxidative Stress in Fish: A review oxidative stress in fish: A Review. *Journal of Scientific Research*, 12, 145-160.
- Chukanhom, K., Borisuthpeth, P. y Hatai, K. (2005). Antifungal activities of aroma components from *Alpinia galanga* against water molds. *Biocontrol Science*, 10(3), 105-109.
- Cipriano, R. C. y Holt, R. A. (2005). *Flavobacterium psychrophilum*, cause of bacterial cold-water disease and rainbow trout fry syndrome. United States Department of Interior, U.S. Geological Service, National Fish Health Research Laboratory. Fish Disease Leaflet No. 86.

- Clifton-Hadley, R. S., Richards, R. H. y Bucke, D. (1987). Further consideration of the haematology of proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 10(6), 435-444.
- Colautti, D. C., García de Souza, J. R. y Miranda, L. (2009). Sistema de cultivo mixto en jaulas y estanques para el pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Biología Acuática*, 26, 47-54.
- Coria, C. O. (1991). Informe preliminar sobre el estado sanitario de los salmónidos en la provincia del Neuquén. CEAN-JICA Informe Técnico N° 2. Junín de los Andes. 13 pp.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Cox, F. E. (2001). Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology*, 122(1), 23-38.
- Czczuga, B., Muszynska, E., Wossughi, G., Kamaly, A. y Kiziewicz, B. (1995). Aquatic fungi growing on the eggs of several species of acipenserid fishes. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 2(25), 71-79.
- Czczuga, B. y Muszynska, E. (1999). Aquatic fungi growing on percid fish eggs (Percidae) in Poland. *Polish Journal of Environmental Studies*, 8, 31-34.
- Czczuga, B., Kiziewicz, B. y Godlewska, A. (2004). Zoosporic Fungi Growing on Eggs of *Coregonus lavaretus holsatus* Thienemann, 1916 from Lake Wdzydze in Kaszuby. *Polish Journal of Environmental Studies*, 13, 355-359.
- Czczuga, B., Bartel, R., Kiziewicz, B., Godlewska, A. y Muszyńska, E. (2005). Zoosporic fungi growing on the eggs of sea trout (*Salmo trutta* m. *trutta* L.) in river water of varied trophicity. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14, 295-303.
- Czczuga, B., Semeniuk-Grell, A. y Czczuga-Semeniuk, E. (2015a). Growth of mycotal species on the eggs of *Cyprinus carpio* in limnologically and trophically different water bodies. *African Journal of Biotechnology*, 14, 482-488.
- Czczuga, B., Czczuga-Semeniuk, E. y Semeniuk-Grell, A. (2015b). Observations of mycotal species growth on the rainbow trout eggs (*Oncorhynchus mykiss*). *African Journal of Microbiology Research*, 9, 515-520.
- da Silva Corrêa, S., Abessa, D., Santos, L., da Silva, E. B. y Seriani, R. (2016). Differential blood counting in fish as a non-destructive biomarker of water contamination exposure. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 99(3), 482-491.
- Dash, S., Das, S. K., Samal, J. y Thatoi, H. N. (2018). Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 19(2), 72.
- Daugherty, J., Evans, T. M., Skillom, T., Watson, L. E. y Money, N. P. (1998). Evolution of spore release mechanisms in the Saprolegniaceae (Oomycetes): evidence from a phylogenetic analysis of internal transcribed spacer sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 24(3), 354-363.
- de Bruijn, I., Belmonte, R., Anderson, V. L., Saraiva, M., Wang, T., van West, P. y Secombes, C. J. (2012). Immune gene expression in trout cell lines infected with the fish pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica*. *Developmental and Comparative Immunology*, 38(1), 44-54.
- de la Bastide, P. Y., Leung, W. L. y Hintz, W. E. (2015). Species composition of the genus *Saprolegnia* in fin fish aquaculture environments, as determined by nucleotide sequence analysis of the nuclear rDNA ITS regions. *Fungal Biology*, 119(1), 27-43.
- de Morais, S. M., Vila-Nova, N. S., Bevilaqua, C., Rondon, F. C., Lobo, C. H., de Alencar A. N., Moura, A., Sales, A. D., Rodrigues, A., de Figueiredo, J. R., Campello, C. C., Wilson, M. E. y de Andrade, H.

- (2014). Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 22(21), 6250-6255.
- Deacon, J. W. y Donaldson, S. P. (1993). Molecular recognition in the homing responses of zoospore fungi, with special reference to *Pythium* and *Phytophthora*. *Mycological Research*, 97(10), 1153-1171.
- del Cerro, A., Marquez, I. y Guijarro, J. A. (2002). Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5177-5180.
- Delespaul, Q., de Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Michel, G., Marquier-Viñuales, C. y Bessièrè, J. M. (2000). The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *Journal of Essential Oil Research*, 12(2), 256-266.
- Denzoin Vulcano, L. A., Soraci, A. L. y Tapia, M. O. (2013). Homeostasis del glutati3n. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(3), 0-0.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3217-3266.
- Dick, M. W, Wong, P. y Clark, G. (1984). The identity of the oomycete causing kikuyu yellows with a reclassification of the downy mildews. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 89, 17.
- Dick, M. W. (1990). *Keys to Pythium*. Department of Botany, School of Plant Science, University of Reading, Reading, UK, 64 pp.
- Dick, M. W. (2001). *Straminipilous Fungi. Systematic of the Peronosporomycetes including accounts of the marine Straminipilous Protists the Plasmodiophoris and similar Organisms*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 660 pp.
- Diéguez-Uribeondo, J. (2006). The dispersion of the *Aphanomyces astaci*-carrier *Pacifastacus leniusculus* by humans represents the main cause of disappearance of the indigenous crayfish *Austropotamobius pallipes* in Navarra. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 380-381, 1303-1312.
- Diéguez-Uribeondo, J., Cerenius, L. y Soderhall, K. (1996). Physiological characterization of *Saprolegnia parasitica* isolates from brown trout. *Aquaculture*, 140(3), 247-257.
- Diéguez-Uribeondo, J., Fregeneda-Grandes, J. M., Cerenius, L., Pérez-Iniesta, E., Aller-Gancedo, J. M., Tellería, M. T., Soderhall, K. y Martín, M. P. (2007). Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina*-*Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. *Fungal Genetics and Biology*, 44(7), 585-601.
- Dinçtürk, E., Tanrikul, T.T. y Türk Çulha, S. (2018). Fungal and bacterial co-infection of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) in a Recirculating Aquaculture System: *Saprolegnia parasitica* and *Aeromonas hydrophila*. *Aquatic Sciences and Engineering*, 33, 67-71.
- Dong, F., Yin, G. M., Meng, K. F., Xu, H. Y., Liu, X., Wang, Q. C. y Xu, Z. (2020). IgT plays a predominant role in the antibacterial immunity of rainbow trout olfactory organs. *Frontiers in Immunology*, 11, 2942.
- Dorman, H. J. y Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.
- Droshnev, A. E., (2020). Evaluation of the effect of fish yersiniosis on the course of antioxidant protection processes in trout. En: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 548, 42013.

- Dubey, M. K., Zehra, A., Meena, M. y Upadhyay, R. (2018). Taxonomic note on a rare fish infecting freshwater mould *Achlya ambisexualis* Raper 1939 (Achlyaceae) isolated from Chandraprabha dam, Uttar Pradesh, India. *Indian Journal of Fisheries*, 65, 71–78.
- Duc, P. M., Thy, D. T. M., Trinh, N. T. M., Tuan, T. N. y Hatai, K. (2016). Water molds isolated from eggs and fry of Striped Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in the Mekong Delta of Viet Nam. *Journal of Fisheries Sciences*, 10, 31-36.
- Earle, G. e Hintz, W. (2014). New approaches for controlling *Saprolegnia parasitica*, the causal agent of a devastating fish disease. *Tropical Life Sciences Research*, 25(2), 101.
- Eissa, A. E., Abdelsalam, M., Tharwat, N. y Zaki, M. (2013). Detection of *Saprolegnia parasitica* in eggs of angelfish *Pterophyllum scalare* (Cuvier–Valenciennes) with a history of decreased hatchability. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1(1), 7-14.
- Ekman, E. y Norrgren, L. (2003). Pathology and immunohistochemistry in three species of salmonids after experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 26(9), 529–538.
- El-Feki, M., Hatai, K. y Hussein, M. (2003). Chemotactic and chemokinetic activities of *Saprolegnia parasitica* toward different metabolites and fish tissue extracts. *Mycoscience*, 44, 159–162.
- Elias, M., Hill, R. I., Willmott, K. R., Dasmahapatra, K. K., Brower, A. V., Mallet, J. y Jiggins, C. D. (2007). Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1627), 2881-2889.
- Ellis, A.E., (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 25(8-9), 827-839.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77.
- Ernst, O. y Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford protein assay. *Journal of Visualized Experiments*, (38), 1918.
- Esteban, M. A. (2012). An overview of the immunological defenses in fish skin. *International Scholarly Research Notices*, 29 pp.
- FAO. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. <https://docs.gestionaweb.cat/0673/informe-sofia.pdf>
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. [gricoltura. http://www.fao.org/3/ca9231es/CA9231ES.pdf](http://www.fao.org/3/ca9231es/CA9231ES.pdf)
- Ferguson, H. W. (2006). Systemic pathology of fish. Scotian Press, 2da edición, 368 pp.
- Fernández, A. B., De Blas, I. y Ruiz, I. (2002). El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. *Revista AquaTIC*, 16.
- Fitzpatrick, M. S., Schreck, C. B., Chitwood, R. L. y Marking, L. L. (1995). Technical notes: Evaluation of three candidate fungicides for treatment of adult spring chinook salmon. *The Progressive Fish-Culturist*, 57(2), 153-155.
- Forneris, G., Bellardi, S., Palmegiano, G. B., Saroglia, M., Sicuro, B., Gasco, L. y Zoccarato, I. (2003). The use of ozone in trout hatchery to reduce saprolegniasis incidence. *Aquaculture*, 221(1-4), 157-166.
- Free, C. M., Thorson, J. T., Pinsky, M. L., Oken, K. L., Wiedenmann, J. y Jensen, O. P. (2019). Impacts of historical warming on marine fisheries production. *Science*, 363(6430), 979-983.
- Fregeneda-Grandes, J. M., Fernandez Diez, M. y Aller-Gancedo, J. M. (2001). Experimental pathogenicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), of two distinct morphotypes

- of long-spined *Saprolegnia* isolates obtained from wild brown trout, *Salmo trutta* L., and river water. *Journal of Fish Diseases*, 24(6), 351-359.
- Fregeneda-Grandes, J.M., Rodríguez-Cadenas, F., Carbajal-González, M. y Aller-Gancedo, M. (2007). Antibody response of brown trout *Salmo trutta* injected with pathogenic *Saprolegnia parasitica* antigenic extracts. *Diseases of Aquatic Organisms*, 74, 107-111.
- Fregeneda-Grandes, J. M., Carbajal-González, M. T. y Aller-Gancedo, J. M. (2009). Prevalence of serum antibodies against *Saprolegnia parasitica* in wild and farmed brown trout *Salmo trutta*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83(1), 17-22.
- Fuller, M.S. y Jaworski, A. (1987). *Zoosporic Fungi in Teaching and Research*. Southeastern Publishing, Athens, Georgia, 303 pp.
- García Romero, N. (2001). Alteraciones patológicas del pejerrey (*Odontesthes bonariensis* C.) en ambientes naturales y bajo condiciones de cultivo. En: *Fundamentos Biológicos, Económicos y Sociales para una Correcta Gestión del Recurso Pejerrey*. Grossman, F., Eds., Editorial Astyanax. Azul, Argentina, 80-90.
- García, R. D., Jara, F. G., Steciow, M. M. y Reissig, M. (2018). Oomycete parasites in freshwater copepods of Patagonia: effects on survival and recruitment. *Diseases of Aquatic Organisms*, 129(2), 123-134.
- Ghasemi Pirbalouti, A., Taheri, M., Raiesi, M., Bahrami, H. y Abdizadeh, R. (2009). In vitro antifungal activity of plant extracts on *Saprolegnia parasitica* from cutaneous lesions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7(2), 94-6.
- Ghazvini, A., Rudsari, H. V., Takami, G. A., Masuleh, A. R. S. y Ashourpour, A. (2012). Disinfection efficiency of three anti-fungal agents (nanosil, chloramine-T and hydrogen peroxide) on Persian sturgeon (*Acipenser persicus*, Borodin 1897) larvae. *International Journal of Biology*, 4(1), 138.
- Giesecker, C. M., Serfling, S. G. y Reimschuessel, R. (2006). Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 253(1-4), 120-129.
- Godoy, M. (2015). Patología en acuicultura. Miositis crónica asociada a infección por *Flavobacterium psychrophilum* en Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*): Histopatología. <http://goo.gl/PNKON5>.
- Gómez de Saravia, S. y Gaylarde, C. C. (1998). The antimicrobial activity of an aqueous extract of *Brassica nigra*. *International Biodeterioration y Biodegradation*, 41(2), 145-148.
- Gómez de Saravia, S., de la Paz Naramjo, J., Guiamet, P., Arenas, P. y Borrego, S. F. (2008). Biocide activity of natural extracts against microorganisms affecting archives. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(1), 25-29.
- Gómez de Saravia, S., Borrego, S., Lavin, P., Valdés, O., Vivar, I., Battistoni, P. y Guiamet, P. (2013). Environmentally friendly products from plants in the control of biodeteriogen agents. *Natural Products. An Indian Journal (NPIJ)*, 9(5).
- Gonçalves, A. L., Alves Filho, A. y Menezes, H. (2005). Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72, 353-358.
- González de Canales, M. L., Ortiz, J. B., González del Valle, M. y Sarasquete, C. (2001). Saprolegniasis en poblaciones naturales de peces. *Ciencias Marinas*, 27(1), 125-137.

- González-Palacios, C., Fregeneda-Grandes, J. M. y Aller-Gancedo, J. M. (2019). Biocontrol of saprolegniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) using two bacterial isolates (LE89 and LE141) of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Fish Diseases*, 42(2), 269-275.
- Grayburn, W. S., Hudspeth, D. S., Gane, M. K., y Hudspeth, M. E. (2004). The mitochondrial genome of *Saprolegnia ferax*: organization, gene content and nucleotide sequence. *Mycologia*, 96(5), 981-989.
- Grodnitzky, J. A. y Coats, J. R. (2002). Toxicokinetics of the monoterpene thymol. En: Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 224, 104-105.
- Grosman, F. (1995). El pejerrey. Ecología, cultivo, pesca y explotación. Astyanax. Azul, Argentina, 132pp.
- Grotmol, S., Dahl-Paulsen, E. y Totland, G. K. (2003). Hatchability of eggs from Atlantic cod, turbot and Atlantic halibut after disinfection with ozonated seawater. *Aquaculture*, 221(1-4), 245-254.
- Guiamet, P. S. y Gómez de Saravia, S. G. (2005). Laboratory studies of biocorrosion control using traditional and environmentally friendly biocides: an overview. *Latin American Applied Research*, 35(4), 295-300.
- Hajdu, S., Holinka, J., Reichmann, S., Hirschl, A. M., Graninger, W. y Presterl, E. (2010). Increased temperature enhances the antimicrobial effects of daptomycin, vancomycin, tigecycline, fosfomicin, and cefamandole on staphylococcal biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4078-4084.
- Hanjavanit, C., Kitanchaen, N. y Rakmanee, C., (2008). Experimental infection of aquatic fungi on eggs of african catfish (*Clarias gariepinus* Burch). *KKU Science Journal*, 36, 36-43.
- Hanjavanit, C., Panchai, K., Wada, S., Kurata, O. y Hatai, K. (2010). Artificial infection by water molds following net-shake treatment in the platyfish (*Xiphophorus maculatus*). *Aquaculture Science*, 58(4), 533-537.
- Hanjavanit, C., Rakmanee, C., Kitanchaen, N., y Hatai, K. (2012). Freshwater oomycete isolated from African Catfish *Clarias gariepinus* eggs in Thailand. *Aquaculture Science*, 60(2), 269-276.
- Hanjavanit, C., Panchai, K., Kitanchaen, N. and Hatai, K. (2013). The anti-oomycetic effects of sodium chloride and potassium permanganate and the toxicity of these compounds to tilapia (*Oreochromis niloticus*) eggs. *African Journal of Microbiology Research*, 7(18), 1852-1857.
- Hatai, K. y Willoughby, L. G. (1988). *Saprolegnia parasitica* from the rainbow trout inhibited by the bacterium, *Pseudomonas ferax*. *Transactions of the British Mycological Society*, 83, 257-263.
- Hatai, K. y Hoshiai, G. (1992). Mass mortality in cultures coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* Coker. *Journal of Wildlife Diseases*, 28(4), 532-536.
- Hatai, K. y Hoshiai, G. I. (1993). Characteristics of two *Saprolegnia* species isolated from coho salmon with saprolegniosis. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5(2), 115-118.
- Hauff, S. y Barnes, M. E. (2016). Initial Investigations of Cloves and Clove Oil Component as Water Mold Inhibitors. *Jacobs Journal of Aquaculture and Research*, 2(1), 16.
- Hawke, J. P., Grooters, A. M. y Camus, A. C. (2003). Ulcerative mycosis caused by *Aphanomyces invadans* in channel catfish, black bullhead, and bluegill from southeastern Louisiana. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15(2), 120-127.
- Hebert, P. D. y Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 852-859.

- Heisey, R. M. y Gorham, B. K. (1992). Antimicrobial effects of plant extracts on *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* and other micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, 14(4), 136-139.
- Henriksen, M. M., Kania, P. W., Buchmann, K., y Dalsgaard, I. (2013). Evaluation of the immune response in rainbow trout fry, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after waterborne exposure to *Flavobacterium psychrophilum* and/or hydrogen peroxide. *Journal of Fish Diseases*, 38(1), 55-66.
- Hernando, M. D., Mezcua, M., Suárez-Barcena, J. M. y Fernández-Alba, A. R. (2006). Liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry for simultaneous determination of chemotherapeutant residues in salmon. *Analytica Chimica Acta*, 562(2), 176-184.
- Homolya, L., Váradi, A. y Sarkadi, B. (2003). Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors*, 17(1-4), 103-14.
- Horisawa, S., y Sakuma, Y. (2009). Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi. *Journal of Wood Science*, 55(2), 133-138.
- Horn, M. H., Gawlicka, A. K., German, D. P., Logothetis, E. A., Cavanagh, J. W. y Boyle, K. S. (2006). Structure and function of the stomachless digestive system in three related species of New World silverside fishes (Atherinopsidae) representing herbivory, omnivory, and carnivory. *Marine Biology*, 149(5), 1237-1245.
- Hoskonen, P., Heikkinen, J., Eskelinen, P. y Pirhonen, J. (2015). Efficacy of clove oil and ethanol against *Saprolegnia* sp. and usability as antifungal agents during incubation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) eggs. *Aquaculture Research*, 46(3), 581-589.
- Howard, K. L., Seymour, R. y Johnson Jr, T. W. (1970). Aquatic fungi of Iceland: Saprolegniaceae. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society*, 63-79.
- Howe, G. E., Marking, L. L., Bills, T. D. y Schreier, T. M. (1995). Efficacy and toxicity of formalin solutions containing paraformaldehyde for fish and egg treatments. *The Progressive Fish-Culturist*, 57(2), 147-152.
- Howe, G. E., Rach, J. J. y Olson, J. J. (1998). Method for inducing saprolegniasis in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10(1), 62-68.
- Hualde, P., Moreno P., Torres W., Chabert A., Molinari L. y Demicheli M. (2008). Skeletal abnormality related to phosphorous deficiency in Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*). XIII International Symposium on Fish Nutrition and feeding. Florianópolis, Brasil, pp. 139.
- Hualde, P., Torres W., Demicheli M., Molinari L., Moreno P., Ferrada M., Posse M., Garrido E., Gader R. y Luquet C. (2009). Cría experimental de pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*) en jaulas. Segunda Conferencia Latinoamericana sobre Cultivo de Peces Nativos. Chascomús, Argentina, pp. 43.
- Hualde, P., Ceferino Torres, W. D., Moreno, P., Ferrada, M., Demicheli, M. A., Molinari, L. y Luquet, C. M. (2011). Growth and feeding of Patagonian pejerrey *Odontesthes hatcheri* reared in net cages. *Aquaculture Research*, 42(6), 754-763.
- Huang, X. L., Liu, R. J., Whyte, S., Du, Z. J., Chen, D. F., Deng, Y. Q., Wang, K. Y. y Geng, Y. (2015). The in vitro antifungal activity of 30 Chinese herb extracts to *Saprolegnia* sp. *Journal of Applied Ichthyology*, 31(4), 681-686.
- Hudson, H. J. (1986). *Fungal Biology* (Edward Arnold, London). Hudson Fungal Biology. E. Arnold Publishing Ltd. Great Britain.

- Hudspeth, D. S., Nadler, S. A. y Hudspeth, M. E. (2000). A COX2 molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. *Mycologia*, 92(4), 674-684.
- Hughes, G. C. (1994). Saprolegniasis, then and now: a retrospective. En: Mueller GJ (ed), Salmon Saprolegniasis. U.S. Department of Energy, Bonneville Power Administration, Portland, Oregon, pp. 3-32.
- Hulvey, J. P., Padgett, D. E. y Bailey, J. C. (2007). Species boundaries within *Saprolegnia* (Saprolegniales, Oomycota) based on morphological and DNA sequence data. *Mycologia*, 99(3), 421-429.
- Hussein, M. M., Wada, S., Hatai, K. y Yamamoto, A. (2000). Antimycotic activity of eugenol against selected water molds. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12(3), 224-229.
- Hussein, M. M., Hatai, K., Nomura, T., (2001). Saprolegniosis in salmonids and their eggs in Japan. *Journal of Wildlife Diseases*, 37, 204-207.
- Hussein, M. M. y Hatai, K. (2001). *In vitro* inhibition of *Saprolegnia* by bacteria isolated from lesions of Salmonids with saprolegniasis. *Fish Pathology*, 36(2), 73-78.
- Hussein, M. M., y Hatai, K., (2002). Pathogenicity of *Saprolegnia* species associated with outbreaks of salmonid saprolegniosis in Japan. *Fisheries Science*, 68, 1067-1072.
- Hussein, M. M., Hassan, W. H. y Mahmoud, M. A. (2013). Pathogenicity of *Achlya proliferoides* and *Saprolegnia diclina* (Saprolegniaceae) associated with Saprolegniosis outbreaks in cultured Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 5, 188-193.
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., Piotrowska, R., Foss, M. y Meyer, R. L. (2015). Isoeugenol has a non-disruptive detergent-like mechanism of action. *Frontiers in Microbiology*, 6, 754.
- Iconomidou, V. A., Chryssikos, D. G., Gionis, V., Pavlidis, M. A., Paipetis, A. y Hamodrakas, S. J. (2000). Secondary structure of chorion proteins of the teleostean fish *Dentex dentex* by ATR FT-IR and FT-Raman spectroscopy. *Journal of Structural Biology*, 132(2), 112-122.
- Ilardi Lazcano, P., Vargas del Campo, M., Battaglia, J., Sandoval, C. y Oliva, H. (2013). Genotipificación y factores de virulencia de aislados de *Flavobacterium psychrophilum* obtenidos a partir de salmónidos en Chile. *Salmon Xpert*, 7, 45-48.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19(8-10), 603-608.
- Izumi, S., Aranishi, F. y Wakabayashi, H. (2003). Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56(3), 207-214.
- Jaafar, R. M., Ohtani, M., Kania, P. W. y Buchmann, K. (2016). Correlation between leukocyte numbers and body size of rainbow trout. *Open Journal of Immunology*, 6(03), 101.
- Jaramillo, R., Goicoechea, O., Garrido, O. y Molinari, E. (2009). *Salmo salar*: Morfología ultraestructural de la pared del corion en ovas normales y con problemas de eclosión. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 41(1), 67-71.
- Johnson, T. W., Seymour, R. L. y Padgett, D. E. (2002). Biology and systematics of the Saprolegniaceae. Online publication: <http://www.ilumina-dlib.org>, 1028 pp.
- Johnson, J. E., Belmont, S. F. y Wagner, R. S. (2008). DNA barcoding as a means to identify organisms associated with amphibian eggs. *Herpetological Conservation and Biology*, 3(1), 116-127.
- Kales, S. C., DeWitte-Orr, S. J., Bols, N. C. y Dixon, B. (2007). Response of the rainbow trout monocyte/macrophage cell line, RTS11 to the water molds *Achlya* and *Saprolegnia*. *Molecular Immunology*, 44(9), 2303-2314.

- Ke, X., Wang, J., Gu, Z., Li, M. y Gong, X. (2009). *Saprolegnia brachydanicis*, a new oomycete isolated from zebra fish. *Mycopathologia*, 167(2), 107-113.
- Kelly, C. y Salinas, I. (2017). Under pressure: interactions between commensal microbiota and the teleost immune system. *Frontiers in Immunology*, 8, 559.
- Khosravi, A. R., Shokri, H., Sharifrohani, M., Mousavi, H. E. y Moosavi, Z. (2012). Evaluation of the antifungal activity of *Zataria multiflora*, *Geranium herbarium*, and *Eucalyptus camaldolensis* essential oils on *Saprolegnia parasitica*-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(7), 674-679.
- Kitancharoen, N., Yuasa, K. y Hatai, K. (1995). Morphological aspects of *Saprolegnia diclina* Type 1 isolated from pejerrey, *Odonthetes bonariensis*. *Mycoscience*, 36, 365-368.
- Kitancharoen, N. y Hatai, K. (1996). Experimental infection of *Saprolegnia* in Rainbow Trout eggs. *Fish Pathology*, 31, 49-50.
- Kitancharoen, N., Yuasa, K. y Hatai, K. (1996). Effects of pH and temperature on growth of *Saprolegnia diclina* and *S. parasitica* isolated from various sources. *Mycoscience*, 37(4), 385-390.
- Koeypudsa, W., Phadee, P., Tangtrongpiros, J. y Hatai, K. (2005). Influence of pH, temperature and sodium chloride concentration on growth rate of *Saprolegnia sp.* *Journal of Scientific Research at Chulalongkorn University*, 30, 123-130.
- Kotob, M. H., Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Abdelzaher, M., y El-Matbouli, M. (2016). The impact of co-infections on fish: a review. *Veterinary Research*, 47(1), 1-12.
- Kubilay, A., Altun, S., Diler, Ö. y Ekici, S. (2008). Isolation of *Flavobacterium columnare* from cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 169, 165-169.
- Kudo, S. y Teshima, C. (1991). Enzyme activities and antifungal action of fertilization envelope extract from fish eggs. *Journal of Experimental Zoology*, 259(3), 392-398.
- Kurhalyuk, N. y Tkachenko, H. (2011). Induction of oxidative stress and antioxidant defenses in the livers of sea trout, *Salmo trutta* L., with ulcerative dermal necrosis. *Fisheries and Aquatic Life*, 19(4), 229-240.
- Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R. y Takahara, Y. (1981). Antifungal activity of components of essential oils. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(4), 945-952.
- Kusdarwati, R., Kurniawan, H. y Prayogi, Y. T. (2017). Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* and *Saprolegnia sp.* on catfish (*Clarias gariepinus*) in floating cages in Bozem Moro Krembangan Surabaya. En: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Vol. 55, No. 1, p. 012038.
- Laekeman, G. M., Van Hoof, L., Haemers, A., Berghe, D. V., Herman, A. G. y Vlietinck, A. J. (1990). Eugenol a valuable compound for *in vitro* experimental research and worthwhile for further *in vivo* investigation. *Phytotherapy Research*, 4(3), 90-96.
- LaFrentz, B. R., LaPatra, S. E., Jones, G. R., Congleton, J. L., Sun, B. y Cain, K. D. (2002). Characterization of serum and mucosal antibody responses and relative per cent survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following immunization and challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 25(12), 703-713.
- Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. y Nychas, G. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.

- Langvad, F. (1994). Saprolegnia in Norwegian Fish Farming. En: Mueller, G. (Ed.), "Salmon Saprolegniasis." pp. 189-202.
- Lategan, M. J., Torpy, F. R. y Gibson, L. F. (2004). Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199. *Aquaculture*, 240(1-4), 19-27.
- Lavens, P. y Sorgeloos, P. (1996). Manual on the production and use of live food for aquaculture. Food and Agriculture Organization (FAO), No. 361.
- Lavín, P., Gómez de Saravia, S. y Guimet, P. (2016). *Scopulariopsis sp.* and *Fusarium sp.* in the documentary heritage: evaluation of their biodeterioration ability and antifungal effect of two essential oils. *Microbial Ecology*, 71(3), 628-633.
- León, J., Ávalos, R. y Ponce, M. (2009). *Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Onchorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. *Revista Peruana de Biología*, 15(2), 117-124.
- Liotta J., Giacosa B. y Wagner M. (2007). Muerte masiva de peces en una amplia región del país en el invierno. Informe Fundación Oga.
- Lone, S. A. y Manohar, S. (2018). *Saprolegnia parasitica*, a lethal oomycete pathogen: demands to be controlled. *Journal of Infection and Molecular Biology*, 6(2), 36-44.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Lucini, E. I., Zunino, M. P., López, M. L. y Zygadlo, J. A. (2006). Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Journal of Phytopathology*, 154(7-8), 441-446.
- Lushchak, V.I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101, 13-30.
- Mackowiak, P. A., Marling-Cason, M. y Cohen, R. L. (1982). Effects of temperature on antimicrobial susceptibility of bacteria. *Journal of Infectious Diseases*, 145(4), 550-553.
- Madrid, A., Godoy, P., González, S., Zaror, L., Moller, A., Werner, E., Cuellar, M., Villena, J. y Montenegro, I. (2015). Chemical characterization and anti-oomycete activity of *Laureliopsis philippianna* essential oils against *Saprolegnia parasitica* and *S. australis*. *Molecules*, 20(5), 8033-8047.
- Madsen, L. y Dalsgaard, I. (1999). Reproducible methods for experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36(3), 169-176.
- Makesh, M., Sudheesh, P. S. y Cain, K. D. (2015). Systemic and mucosal immune response of rainbow trout to immunization with an attenuated *Flavobacterium psychrophilum* vaccine strain by different routes. *Fish y Shellfish Immunology*, 44(1), 156-163.
- Mancini, M., Rodriguez, C., Finola, M., Basualdo, C. y Prospero, C. (2000). Mortandad de peces en un lago recreacional del Sur de Córdoba, Argentina. *Revista AquaTIC*, (11).1-18.
- Mancini, M., Rodriguez, C., Prospero, C., Salinas, V. y Bucco, C., (2006). Main diseases of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) in central Argentina. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 26, 205-210.
- Mancini, M., Rodriguez, C., Bonansea, M., Astoreca, A., Bagnis, G., Rocha, C. y Dalcero, A. (2008). Saprolegniasis en poblaciones silvestres de *Astyanax eigenmanniorum* y *A. fasciatus* (Pisces, Characidae) de Argentina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria*, 30(2), 115-122.

- Mancini, M., Rodriguez, C., Barberis, C., Astoreca, A. y Brol, G. (2010). Registro de saprolegniasis en ejemplares silvestres de pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Pisces: Atherinopsidae) de Argentina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria*, 32, 46-50.
- Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I. E., Daglia, M., Nabavi, S. F. y Ajami, M. (2017). Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(6), 668-689.
- Marei, G. I. K., Rasoul, M. A. A., y Abdelgaleil, S. A. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(1), 56-61.
- Margulis, L., Corliss, J. O, Melkonian, M. y Chapman, D. J, eds. (1990). *Handbook of Protoctista*. Boston: Jones y Bartlett.
- Marin Municipal District Vegetation Management Plan. (2010). *Herbicide Risk Assessment. Chapter 6 – Colve Oil. Draft-1/1/2010*, 82 pp.
- Marking, L., Rach, J. y Schreier, T. (1994). Evaluation of antifungal agents for fish culture. *The Progressive Fish-Culturist*, 56, 225-231.
- Martin, R. (1968). The effect of malachite green as a fungicide. *The Ohio Journal of Science*, 68, 118-120.
- Matthiessen, P. y Roberts, R. J. (1982). Histopathological changes in the liver and brain of fish exposed to endosulfan insecticide during tsetse fly control operations in Botswana. *Journal of Fish Diseases*, 5(2), 153-159.
- Mattsson, K., Lehtinen, K. J., Tana, J., Härdig, J., Kukkonen, J., Nakari, T. y Engström, C. (2001). Effects of pulp mill effluents and restricted diet on growth and physiology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(2), 144-154.
- McGowan, J. y Fitzpatrick, D. A. (2020). Recent advances in oomycete genomics. *Advances in Genetics*, 105, 175-228.
- Meinertz, J. R., Stehly, G. R., Gingerich, W. H. y Allen, J. L. (1995). Residues of [¹⁴C]-malachite green in eggs and fry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after treatment of eggs. *Journal of Fish Diseases*, 18(3), 239-248.
- Meyer, F. P. (1991). Aquaculture disease and health management. *Journal of Animal Science*, 69(10), 4201-4208.
- Ming, L. y Hatai, K. (2017). Treatment of *Achlya* Infection in Freshwater Seabass, *Lates calcarifer* (Bloch 1790). *Asian Fisheries Science*, 30(130), 130-138.
- Minor, K. L., Anderson, V. L., Davis, K. S., Van Den Berg, A. H., Christie, J. S., Obach, L. L., Reza, A., Wawra, S., Secombes, C.J. y van West, P. (2014). A putative serine protease, SpSsp1, from *Saprolegnia parasitica* is recognised by sera of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fungal Biology*, 8, 630-639.
- Miranda, L. A., Berasain, G. E., Velasco, C. A. M., Shirojo, Y. y Somoza, G. M. (2006). Natural spawning and intensive culture of pejerrey *Odontesthes bonariensis* juveniles. *Biocell*, 30(1), 157-162.
- Misaka, N. y Suzuki, K. (2007). Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in chum salmon *Oncorhynchus keta* and virulence of isolated strains to salmonid fishes. *Fish Pathology*, 42(4), 201-209.
- Mitrowska, K. y Posyniak, A. (2005). Malachite green: pharmacological and toxicological aspects and residue control. *Medycyna Weterynaryjna*, 61, 742-745.

- Modra, H., Svobodova, Z., y Kolářová, J. (1998). Comparison of differential leukocyte counts in fish of economic and indicator importance. *Acta Veterinaria Brno*, 67, 215-226.
- Moghaddam, A. A., Hajimoradloo, A., Ghiasi, M. y Ghorbani, R. (2012). In vitro inhibition of growth in *Saprolegnia* sp. isolated from the eggs of Persian Sturgeon *Acipenser persicus* (Pisces: Acipenseriformes) by *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC: 1430). *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 11(2), 245-252.
- Molina, F. I., Jong, S. C. y Ma, G. (1995). Molecular characterization and identification of *Saprolegnia* by restriction analysis of genes coding for ribosomal RNA. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68(1), 65-74.
- Moreno, P., Molinari, L., Demicheli, M., Ferrada, M. (2012). Parásitos del pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*) en condiciones de cría. IX Reunión sobre parasitismo en ecosistemas de agua dulce. Bariloche. INIBIOMA (CONICET-UNCo).
- Moreno, P., Molinari, L., Hualde, P., y Miyazaki, T. (2016). First report of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Argentina. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 36(2), 59-66.
- Mori, T., Hirose, H., Hanjavanit, C. y Hatai, K. (2002). Antifungal activities of plant extracts against some aquatic fungi. *Biocontrol Science*, 7(3), 187-191.
- Mostafa, A. A. F., Al-Askar, A. A. y Yassin, M. T. (2020). Anti-saprolegnia potency of some plant extracts against *Saprolegnia diclina*, the causative agent of saprolegniasis. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(6), 1482-1487.
- Nagasawa, T., Nakayasu, C., Rieger, A. M., Barreda, D. R., Somamoto, T. y Nakao, M. (2014). Phagocytosis by thrombocytes is a conserved innate immune mechanism in lower vertebrates. *Frontiers in Immunology*, 5, 445.
- Nardoni, S., Najar, B., Fronte, B., Pistelli, L. y Mancianti, F. (2019). In vitro activity of essential oils against *Saprolegnia parasitica*. *Molecules*, 24(7), 1270.
- Neish, G. A. y Green, B. R. (1976). Nuclear and satellite DNA base composition and the taxonomy of *Saprolegnia* (Oomycetes). *Microbiology*, 96(1), 215-219.
- Neitzel, D. A., Elston, R. A. y Abernethy, C. S. (2004). Prevention of prespawning mortality: cause of salmon headburns and cranial lesions (No. PNNL-14748). Pacific Northwest National Lab. (PNNL), Richland, WA (United States).
- Nematollahi, A., Decostere, A., Pasmans, F. y Haesebrouck, F. (2003). Review *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 26, 563-574.
- Nilsen, H., Johansen, R., Colquhoun, D. J., Kaada, I., Bottolfsen, K., Vågnes, Ø. y Olsen, A. B. (2011). *Flavobacterium psychrophilum* associated with septicaemia and necrotic myositis in Atlantic salmon *Salmo salar*: a case report. *Diseases of Aquatic Organisms*, 97(1), 37-46.
- Nilsson, R. H., Ryberg, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Larsson, K. H. y Kõljalg, U. (2006). Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS one*, 1(1), 59.
- Nolan, R. A. (1975). Physiological studies with the fungus *Saprolegnia megasperma* isolated from the freshwater nematode *Neomesomermis fluminalis*. *Canadian Journal of Botany*, 53(24), 3032-3040.
- Noro, M. y Wittwer, F. (2012). *Hematología de Salmonídeos*. 1ª ed. Imprenta America, Chile, 45 pp.

- Odds, F. (1993). Effects of temperature on anti *Candida* activities of antifungal antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(4), 685-691.
- Oidtmann, B., Steinbauer, P., Geiger, S. y Hoffmann, R. W. (2008). Experimental infection and detection of *Aphanomyces invadans* in European catfish, rainbow trout and European eel. *Diseases of Aquatic Organisms*, 82(3), 195-207.
- Olabuenaga, S. E. (2000). Sistema inmune en peces. *Gayana (Concepción)*, 64(2), 205-215.
- Osman, H. M., Solman, W. E., Noor, E. L., Deen, A. E. y Laila, A. M. (2008). Induction of Saprolegniosis in *Oreochromis niloticus* with special reference to its biological control. *Global Veterinaria*, 2(1), 32-37.
- Ostland, V. E., Byrne, P. J., Hoover, G. y Ferguson, H. W. (2000). Necrotic myositis of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): proteolytic characteristics of a crude extracellular preparation from *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 23(5), 329-336.
- Pacheco Marino, S., Steciow, M. M., García Romero, N. y Salibián A. (2006). Aproximación a la caracterización de la microbiota parásita de ovas fecundadas de pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Resúmenes del 2º Congreso Nacional de Conservación de la Biodiversidad. Buenos Aires.
- Pacheco Marino, S., Steciow, M. M. y Barbeito, C. (2009). First report of Saprolegniosis on eggs and a juvenile of "Argentinian silverside" (*Odontesthes bonariensis*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 29(1), 10.
- Pacheco Marino, S. (2010). Determinación del efecto fungicida de diferentes tratamientos en ovas de pejerrey *Odontesthes bonariensis* infectados por Saprolegniales (Saprolegniales-Oomycetes). Tesis doctoral. FCNyM. Universidad Nacional de La Plata, 324 pp.
- Pacheco Marino, S., Cabello, M. N. y Salibian, A. (2011). Effect of three fungicides on in vitro growth of *Fusarium solani* and *Fusarium semitectum*, parasitic on *Odontesthes bonariensis* eggs. *International Journal of Environment and Health*, 5(4), 293-303.
- Panchai, K., Hanjavanit, C. y Kitancharoen, N. (2005). Some morphological and biological characteristics of *Achlya ambisexualis* isolated from tilapia fry, *Oreochromis niloticus* Linn. *Proceedings of the 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology*, pp. 18-20.
- Panchai, K., Hanjavanit, C. y Kitacharoen, N. (2007). Characteristics of *Achlya bisexualis* isolated from eggs of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *KKU Research Journal*, 1, 195-202.
- Panchai, K., Hanjavanit, C., Rujinanont, N., Wada, S., Kurata, O. y Hatai, K. (2015a). Experimental pathogenicity of *Achlya* species from cultured Nile tilapia to Nile tilapia fry in Thailand. *Aquaculture, Aquarium, Conservation y Legislation*, 8(1), 70-81.
- Panchai, K., Hanjavanit, C., Rujinanont, N., y Hatai, K. (2015b). Effects of four Thai herbs *in vitro* on *Achlya spp.* isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand and the toxicity to Nile tilapia fry. *Aquaculture, Aquarium, Conservation y Legislation*, 8(5), 761-771.
- Panchai, K., Hanjavanit, C., Sangpradub, N. y Hatai, K. (2016). Anti-oomycetic effect of copper sulfate in vitro on *Achlya spp.* isolated from infected Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture, Aquarium, Conservation y Legislation*, 9(2), 414-421.
- Panné Huidobro, S. (2020). Producción de acuicultura destinada al consumo humano en Argentina durante el año 2019. Coordinación de Acuicultura y Promoción del Consumo Interno Subsecretaría de Pesca y Acuicultura Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 13 pp.
- Patterson, D. J. y Sogin, M. L. (1992). The origin and evolution of prokaryotic and eukaryotic cells. En: *Eukaryote origins and protistan diversity*. New Jersey: World Scientific, pp. 13-46.

- Paul, B. y Steciow, M. M. (2004). *Saprolegnia multispora*, a new oomycete isolated from water samples taken in a river in the Burgundian region of France. *FEMS Microbiology Letters*, 237(2), 393-398.
- Payne, J. F. y Fancey, L. F. (1989). Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on immune responses in fish: change in melanomacrophage centers in flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) exposed to hydrocarbon-contaminated sediments. *Marine Environmental Research*, 28(1-4), 431-435.
- Paz, A., Gonzalez, M. y Crawford, A. J. (2011). Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 161-176.
- Peduzzi, R. y Bizzozero, S. (1977). Immunochemical investigation of four *Saprolegnia* species with parasitic activity in fish: serological and kinetic characterization of a chymotrypsin-like activity. *Microbial Ecology*, 3(2), 107-118.
- Pei, R. S., Zhou, F., Ji, B. P. y Xu, J. (2009). Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of Food Science*, 74(7), 379-383.
- Pérez Saldías, R. (2002). Evaluación de la eficacia y seguridad de bronopol durante un periodo de incubación de 90 a 170 UTA en ova verde de *Salmo salar*. Doctoral dissertation, Tesis. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, 44 pp.
- Pérez-Sirkin, D. I., Solovyev, M., Delgadin, T. H., Herdman, J. E., Miranda, L. A., Somoza, G. M., Vissio, P. y Gisbert, E. (2020). Digestive enzyme activities during pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) ontogeny. *Aquaculture*, 524, 735151.
- Periago, P. M. y Moezelaar, R. (2001). Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 68(1-2), 141-148.
- Perotti, M. G., Basanta, M. D., Steciow, M. M., Sandoval-Sierra, J. V. y Diéguez-Uribeondo, J. (2012). Early breeding protects anuran eggs from *Saprolegnia* infection. *Austral Ecology*, 38(6), 672-679.
- Phillips, A. J., Anderson, V. L., Robertson, E. J., Secombes, C. J. y van West, P. (2008). New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology*, 16(1), 13-19.
- Phumkhachorn, P., Kamsa, S. y Rattanachaikunsopon, P. (2019). Effect of temperature on antimicrobial activity and mode of action of thymol against *Staphylococcus aureus*. *Indian Journal of Science and Technology*, 12, 15.
- Pickering, A. D. y Willoughby, L. G. (1977). Epidermal lesions and fungal infection on the perch, *Perca fluviatilis* L., in Windermere. *Journal of Fish Biology*, 11(4), 349-354.
- Pickering, A. D., Willoughby, L. G. y McGrory, C. B. (1979). Fine structure of secondary zoospore cyst cases of *Saprolegnia* isolates from infected fish. *Transactions of the British Mycological Society*, 72, 427-436.
- Pickering, A. D. (ed.). (1981). *Stress and Fish*. London and New York. Academic Press, 367 pp.
- Pickering A. D. y Willoughby L. G. (1982). *Microbial Diseases of Fish*. En: Roberts RJ (ed). Academic Press, London, England, pp. 271-297.
- Pickering, A. D. y Duston, J. (1983). Administration of cortisol to brown trout, *Salmo trutta* L., and its effects on the susceptibility to *Saprolegnia* infection and furunculosis. *Journal of Fish Biology*, 23(2), 163-175.

- Pickering A. D. (1994). Factors which predispose salmonid fish to Saprolegniasis. En: Mueller GJ (ed), Salmon Saprolegniasis. U.S. Department of Energy, Bonneville Power Administration, Portland, Oregon, pp. 67-84.
- Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C. y Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. Journal of Medical Microbiology, 58(11), 1454-1462.
- Piper, R. G. (1982). Fish hatchery management (No. 2175). US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service.
- Polednik, K. M., Koch, A. C. y Felzien, L. K. (2018). Effects of essential oil from *Thymus vulgaris* on viability and inflammation in zebrafish embryos. Zebrafish, 15(4), 361-371.
- Post. G. (1987). Textbook of Fish Health. T.F.H. Publications. Neptune City. N.J., 288 pp.
- Pottinger T.G. y Day J.G. (1999). A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. Diseases of Aquatic Organisms, 36, 129-141.
- Prieto A. B. y del Valle A. E. (1996). La salmonicultura en Neuquén y Río Negro. Situación en octubre de 1996. CEAN-JICA. Editorial Hemisferio Sur S. A., Buenos Aires, 109 pp.
- Quiniou, S. A., Bigler, S., Clem, L. W. y Bly, J. E. (1998). Effects of water temperature on mucous cell distribution in channel catfish epidermis: a factor in winter saprolegniasis. Fish y Shellfish Immunology, 8(1), 1-11.
- Rahimi, M., Ahmadvand, S., Eagderi, S. y Shamohammadi, S. (2015). Effects of vitamin C and E administration on leukocyte counts in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Nutrition and Health, 1(2), 5.
- Rahman, K. M. y Sarowar, M. N. (2016). Molecular characterisation of oomycetes from fish farm located in Mymensingh sadar during summer. Asian Journal of Medical and Biological Research, 2(2), 236-246.
- Ran, C., Hu, J., Liu, W., Liu, Z., He, S., Dan, B., Diem, N., Ooi, E. y Zhou, Z. (2016). Thymol and carvacrol affect hybrid tilapia through the combination of direct stimulation and an intestinal microbiota-mediated effect: insights from a germ-free zebrafish model. The Journal of Nutrition, 146(5), 1132-1140.
- Rand, T. G., y Munden, D. (1992). Enzyme involvement in the invasion of brook char, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), eggs by *Saprolegnia diclina* (Oomycotina: Saprolegniaceae). Journal of Fish Diseases, 15(1), 91-94.
- Rand, T. G., y Munden, D. (1993). Chemotaxis of zoospores of two fish-egg-pathogenic strains of *Saprolegnia diclina* (Oomycotina: Saprolegniaceae) toward salmonid egg chorion extracts and selected amino acids and sugars. Journal of Aquatic Animal Health, 5(4), 240-245.
- Ratnasingham, S. y Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). Molecular Ecology Notes, 7(3), 355-364.
- Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B. y Sasal, P. (2018). Biological and ecological roles of external fish mucus: a review. Fishes, 3(4), 41. 1-19.
- Rezinciuc, S., Sandoval-Sierra, J. V. y Diéguez-Uribeondo, J. (2014). Molecular identification of a bronopol tolerant strain of *Saprolegnia australis* causing egg and fry mortality in farmed brown trout, *Salmo trutta*. Fungal Biology, 118(7), 591-600.

- Rezinciuc, S., Sandoval-Sierra, J. V., Oidtmann, B. y Diéguez-Uribeondo, J. (2015). The biology of crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*. Current Answers to Most Frequent Questions in Freshwater Crayfish: A Global Overview, 182-204.
- Rezinciuc, S., Sandoval-Sierra, J.V., Ruiz-leo, Y. y Die, J. (2018). Specialized attachment structure of the fish pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica*. PLoS One, 13, 1-17.
- Riethmüller, A., Gründel, A. y Langer, E. (2006). The seasonal occurrence of the sewage fungus *Leptomitus lacteus* (Roth) C. Agardh in stagnant and running waters of different water chemistry of Hesse and Thuringia, Germany. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica, 34(1-2), 58-66.
- Ringuelet, R. A. (1943). Piscicultura del pejerrey o aterinicultura. Vol. 6. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata, 134 pp.
- Ringuelet, R. A., Arámburu, R. H. y de Arámburu, A. A. (1967). Los peces argentinos de agua dulce. Comisión de Investigación Científica (CIC), La Plata, 602 pp.
- Roberts R. J. (1981). Patología de los peces. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, 366 pp.
- Roberts, R. J. (2012). Fish pathology. John Wiley y Sons.
- Robertson, E. J., Anderson, V. L., Phillips, A. J., Secombes, C. J. y van West, P. (2009). Saprolegnia-fish. Oomycete Genetics and Genomics, 407 pp.
- Robideau, G. P., De Cock, A. W., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K. y André Lévesque, C. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. Molecular Ecology Resources, 11(6), 1002-1011.
- Rocha, J.R.S. y Soares, B.M. (2018). First record of *Pythiopsis cymosa* de Bary (Saprolegniales : Oomycota) from freshwater fish in Brazil. Brazilian Journal of Biology, 78, 386-388.
- Rodríguez Forero, A. (1995). Determinación de algunos aspectos hematológicos de *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae), en Cundinamarca, Colombia. Revista de Biología Tropical, 283-8.
- Rodríguez-Salinas, E. y González-Halphen, D. (2009). Los genomas mitocondriales: ¿Qué nos dicen sobre la evolución de las algas verdes? Revista Latinoamericana de Microbiología, 51(1-2), 44-57.
- Rubio-Godoy, M. (2010). Inmunología de los peces óseos: Revisión. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 1(1), 47-57.
- Roncadori, R. W., Duffey, S. S. y Blum, M. S. (1985). Antifungal activity of defensive secretions of certain millipedes. Mycologia, 77(2), 185-191.
- Rozas-Serri, M., Walker, R., Muller, A., Arnés, V., Jaramillo, V. y Idefonso, R. (2015). Manual of clinical pathology in salmonids. 2nd Ed. Programa para la gestión sanitaria en acuicultura. Pathovet. Universidad Austral de Chile, 64 pp.
- Saha, H., Pal, A. K., Sahu, N. P. y Saha, R. K. (2016). Feeding pyridoxine prevents *Saprolegnia parasitica* infection in fish *Labeo rohita*. Fish and Shellfish Immunology, 59, 382-388.
- Sandoval-Sierra, J.V., Latif-eugenin, F., Martín, M.P., Zaror, L. y Diéguez-uribeondo, J. (2014a). *Saprolegnia* species affecting the salmonid aquaculture in Chile and their associations with fish developmental stage. Aquaculture, 434, 462-469.
- Sandoval-Sierra, J. V., Martín, M. P. y Diéguez-Uribeondo, J. (2014b). Species identification in the genus *Saprolegnia* (Oomycetes): defining DNA-based molecular operational taxonomic units. Fungal Biology, 118(7), 559-578.

- Sandoval-Sierra, J. V. y Diéguez-Uribeondo, J. (2015). A comprehensive protocol for improving the description of Saprolegniales (Oomycota): Two practical examples *Saprolegnia aenigmatica* sp. nov. and *Saprolegnia racemosa* sp. nov. PLoS One, 10, 1-21.
- Sarowar, M. N., Cusack, R. y Duston, J. (2019). Saprolegnia molecular phylogeny among farmed teleosts in Nova Scotia, Canada. Journal of Fish Diseases, 00, 1-16.
- Schwindt, A. R., Truelove, N., Schreck, C. B., Fournie, J. W., Landers, D. H. y Kent, M. L. (2006). Quantitative evaluation of macrophage aggregates in brook trout *Salvelinus fontinalis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Diseases of Aquatic Organisms, 68(2), 101-113.
- Scott W. W. (1961). A monograph of the genus *Aphanomyces*. Virginia Agricultural Experiment Station. Tech Bulletin, 151, 1-95.
- Sebastião, F. A., Nomura, D., Sakabe, R. y Pilarski, F. (2011). Hematology and productive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) naturally infected with *Flavobacterium columnare*. Brazilian Journal of Microbiology, 42(1), 282-289.
- Seymour, R. L. (1970). The genus *Saprolegnia*. Nova Hedwigia, 19(1 y 2), 1-124.
- Sharma, P. y Sihag, R. C. (2013). Pathogenicity test of bacterial and fungal fish pathogens in *Cirrihinus mrigala* infected with EUS disease. Pakistan Journal of Biological Sciences, 16, 1204-7.
- Sies, H. (2020). Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks. En Oxidative Stress. Academic Press, pp. 3-12.
- Singh, R., Kumar, A., Pandey, N. N. y Gupta, M. (2013). In vitro screening of antifungal activity of aqueous extracts of some medicinal plants against pathogenic fungi *Saprolegnia parasitica*. International Journal of Advanced Research, 1(6), 116-123.
- Singhal, R. N., Jeet, S. y Davies, R. W. (1987). Experimental transmission of *Saprolegnia* and *Achlya* to fish. Aquaculture, 64(1), 1-7.
- Siwicki, A. K., Pozet, F., Morand, M., Kazuń, K., Głabski, E. y Trapkowska, S. (2004). Atypical bacterial gill disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): influence on non specific humoral defence mechanisms. Fisheries and Aquatic Life, 12(1), 5-12.
- Smith, P. R. (1994). Saprolegnia in Ireland. En: Mueller, G. (Ed.), "Salmon Saprolegniasis." US Department of Energy, Portland. DOE/BP-02836-1, 203.
- Solopova, Kh. Ya., Vishchur, O. I., Korylyak, M. Z. y Solovodzinska, I. (2020). State of antioxidant protection system in carp hepatopancreas affected by associative Aeromonas Hydrophila infection with *Saprolegnia* sp. Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management, 6, 85-89.
- Song, S. B., Xu, Y. y Zhou, B. S. (2006). Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). Chemosphere, 65(4), 699-706.
- Songe, M. M., Thoen, E., Evensen, Ø. y Skaar, I. (2014). In vitro passages impact on virulence of *Saprolegnia parasitica* to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. parr. Journal of Fish Diseases, 37(9), 825-834.
- Songe, M. M., Willems, A., Wiik-Nielsen, J., Thoen, E., Evensen, Ø., van West, P. y Skaar, I. (2015). *Saprolegnia diclina* IIIA and *S. parasitica* employ different infection strategies when colonizing eggs of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Diseases, 39(3), 343-352.
- Songe, M. M., Willems, A., Sarowar, M. N., Rajan, K., Evensen, Ø., Drynan, K., Skaar, I. y van West, P. (2016). A thicker chorion gives ova of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) the upper hand against *Saprolegnia* infections. Journal of Fish Diseases, 39(7), 879-888.

- Soule, M., LaFrentz, S., Cain, K., LaPatra, S., y Call, D. R. (2005). Polymorphisms in 16S rRNA genes of *Flavobacterium psychrophilum* correlate with elastin hydrolysis and tetracycline resistance. *Diseases of Aquatic Organisms*, 65(3), 209-216.
- Souza, C. D. F., Baldissera, M. D., Verdi, C. M., Santos, R. C., Da Rocha, M. I. U., da Veiga, M. L. y Baldisserotto, B. (2019). Oxidative stress and antioxidant responses in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* experimentally infected by *Providencia rettgeri*. *Microbial Pathogenesis*, 131, 164-169.
- Sparrow, F. K. (1960). *Aquatic Phycomycetes*. 2nd ed. University of Michigan Press, Ann Arbor.
- Sparrow, F. K. (1976). The present status of classification in biflagellate fungi. *Recent Advances in Aquatic Mycology*, 213-222.
- Spazier, E., Storch, V. y Braunbeck, T. (1992). Cytopathology of spleen in eel *Anguilla anguilla* exposed to a chemical spill in the Rhine River. *Diseases of Aquatic Organisms*, 14(1), 1-22.
- Srivastava, G. A. y Srivastava, R. C. (1978). A note on the potential applicability of malachite green oxalate in combating fish-mycoses. *Mycopathologia*, 64(3), 169-171.
- Srivastava, S., Sinha, R. y Roy, D. (2004). Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicology*, 66(3), 319-329.
- Steciow, M. M. (1988). Algunos Oomycetes de ambientes acuáticos de la provincia de Buenos Aires (Mastigomycotina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 25, 334-346.
- Steciow, M. M. (1993). Actividad enzimática de algunas saprolegniales (Oomycetes). *Boletín Micológico*, 8, 85-89.
- Steciow, M. M. (1996). Hongos acuáticos zoosporicos (Oomycetes, Mastigomycotina) en laguna vitel y tributarios (Buenos Aires, Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 32, 67-73.
- Steciow, M. M. y Elfades, L. A. (2002). Mohos acuáticos con metabolismo fermentativo en aguas contaminadas del Partido de Ensenada (Buenos Aires, Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 37, 5-11.
- Steciow, M. M., García Romero, N., Pacheco Marino, S., Lunaschi, L. y Drago, F. (2004a). Saprolegniasis en juveniles de pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*), de la laguna Lacombe (Pcia. Buenos Aires, Argentina). *Jornadas de Biología del Pejerrey. Aspectos básicos y acuicultura. IIB-INTECH, Chascomús, 2-3 de diciembre del 2004.*
- Steciow, M. M., Pacheco Marino, S., García Romero, N. (2004b). Una nueva especie de Saprolegnia aislada de ovas de pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*). *Jornadas de Biología del Pejerrey. Aspectos básicos y acuicultura. IIB-INTECH, Chascomús, 2-3 de diciembre del 2004.*
- Steciow, M. M., Paul, A. y Bala, K. (2007). *Saprolegnia bulbosa* sp. nov. isolated from an Argentine stream: taxonomy and comparison with related species. *FEMS Microbiology Letters*, 268(2), 225-230.
- Steciow, M. M., Moreno, P., Demicheli, M., Molinari, L. y Diéguez-Uribeondo, J. (2011). Saprolegniasis (Saprolegniales, Straminipila) en pejerrey patagónico de la provincia del Neuquén. XXXIII Jornadas Argentinas de Botánica. Posadas, Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 46 (Supl.) Pag. 227.
- Steciow, M. M., Moreno, P. y Fasano, C. (2012). Algunos casos de saprolegniasis (Saprolegniales, Straminipila), en pisciculturas de patagonia (Argentina). V Jornadas de Microbiología Clínica, Industrial y Ambiental de la provincia de Buenos Aires. La Plata, Bs As.

- Steciow, M. M., Moreno, P., P. Dell'Orto y Ruiz, K. (2013). Casos de saprolegniasis (Saprolegniales, Straminipila), en pisciculturas (Argentina-Chile). XXXIV Jornadas Argentinas de Botánica. La Plata, Bs As. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 47 (Supl.) Pag. 227.
- Steciow, M. M., Moreno, P., Dell'Orto, P. y Díaz Troquian, V. (2014a). Casos de "saprolegniasis" en salmónidos de Argentina y Chile. Conferencias VI Congreso Argentino de Limnología. La Plata. Argentina. Biología Acuática, N° 29 ISSN 1668-4869.
- Steciow, M. M., Lara, E., Paul, C., Pillonel, A. y Belbahri, L. (2014b). Multiple barcode assessment within the *Saprolegnia-Achlya* clade (Saprolegniales, Oomycota, Straminipila) brings order in a neglected group of pathogens. IMA Fungus, 5(2), 439-448.
- Steinel, N. C. y Bolnick, D. I. (2017). Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in Immunology*, 8, 827.
- Stosik, M. P., Tokarz-Deptuła, B. y Deptuła, W. (2019). Melanomacrophages and melanomacrophage centres in Osteichthyes. *Central-European Journal of Immunology*, 44(2), 201.
- Stueland, S., Hatai, K. y Skaar, I. (2005a). Morphological and physiological characteristics of *Saprolegnia spp.* strains pathogenic to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 28, 445-453.
- Stueland, S., Tafjord Heier, B. y Skaar, I. (2005b). A simple *in vitro* screening method to determine the effects of drugs against growth of *Saprolegnia parasitica*. *Mycological Progress*, 4(4), 273-279.
- Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z. y Vesely, T. (2007). Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 52(12), 527.
- Suzuki, Y. e Iida, T. (1992). Fish granulocytes in the process of inflammation. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 149-160.
- Tampieri, M. P., Galuppi, R., Carelle, M. S., Macchioni, F A., Cioni, P. L. y Morelli, I. V. (2003). Effect of selected essential oils and pure compounds on *Saprolegnia parasitica*. *Pharmaceutical Biology*, 41(8), 584-591.
- Tandel, R. S., Dash, P., Bhat, R. A. H., Thakuria, D., Sawant, P. B., Pandey, N., Chadra, S. y Chadha, N. K. (2021). Anti-oomycetes and immunostimulatory activity of natural plant extract compounds against *Saprolegnia spp.*: Molecular docking and in-vitro studies. *Fish and Shellfish Immunology*, 114, 65-81.
- Taylor, B. R., Garbary, D. J., Miller, A. y Barlocher, F. (2009). Metabolism and ecology of the water mould, *Leptomitus lacteus* (Oomycota), blooming in winter in a Nova Scotia stream. *Fundamental and Applied Limnology*, 175(2), 171.
- Tedesco, P., Fioravanti, M. L. y Galuppi, R. (2019). *In vitro* activity of chemicals and commercial products against *Saprolegnia parasitica* and *Saprolegnia delica* strains. *Journal of Fish Diseases*, 42(2), 237-248.
- Tedesco, P., Saraiva, M., Sandoval-Sierra, J.V., Fioravanti, M.L., Morandi, B., Dieguez-Uribeondo, J., va West, P. y Galuppi, R. (2021). Evaluation of potential transfer of the pathogen *Saprolegnia parasitica* between farmed salmonids and wild fish. *Pathogens*, 10(8), 2-16.
- Thoen, E., Evensen, Ø. y Skaar, I. (2011). Pathogenicity of *Saprolegnia spp.* to Atlantic salmon, *Salmo salar* L., eggs. *Journal of Fish Diseases*, 34(8), 601-608.

- Tohen, E., Vrålstad, T., Rolén, E., Kristensen, R., Evensen, Ø. y Skaar, I. (2015). *Saprolegnia* species in Norwegian salmon hatcheries: field survey identifies *S. diclina* sub-clade IIIB as the dominating taxon. *Diseases of Aquatic Organisms*, 114(3), 189–198.
- Toledo, M. I., Lagos, A. M., Cantillano, G. O., Azocar, A. S. y Carvajal, L. G. (2004). Aplicación del Tomillo (*Thymus vulgaris*) en el manejo de enfermedades de la salmonicultura. Escuela de Ciencias del Mar. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Chile, 55pp.
- Tongsri, P., Meng, K., Liu, X., Wu, Z., Yin, G., Wang, Q., Liu, M. y Xu, Z. (2020). The predominant role of mucosal immunoglobulin IgT in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after infection with *Flavobacterium columnare*. *Fish and Shellfish Immunology*, 99, 654–662.
- Tort, L., Balasch, J. C. y Mackenzie, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*, 22(3), 277-286.
- Udomkusonsri, P., Trongvanichnam, K., Limpoka, M., Klangkaew, N. y Kusucharit, N. (2007). *In vitro* efficacy of the antifungal activity of some Thai medicinal-plants on the pathogenic fungus, *Saprolegnia parasitica* H2, from fish. *Agriculture and Natural Resources*, 41(5), 56-61.
- Ulanowska, M., y Olas, B. (2021). Biological properties and prospects for the application of eugenol-a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3671.
- Valdebenito, S. y Avendaño-Herrera, R. (2009). Phenotypic, serological and genetic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated from salmonids in Chile. *Journal of Fish Diseases*, 32(4), 321-333.
- Valenzuela, A. E., Silva, V. M. y Klempau, A. E. (2005). Qualitative and quantitative effects of constant light photoperiod on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood erythrocytes. *Aquaculture*, 251(2-4), 596-602.
- Van den Berg, A. H., McLaggan, D., Diéguez-Uribeondo J. y van West, P. (2013). The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fungal Biology Reviews*, 27, 33-42.
- Van Muiswinkel, W. B. y Vervoorn-Van Der Wal, B. (2006). The immune system of fish. En: *Fish diseases and disorders*. CAB International, pp. 678-701.
- van West, P. (2006). *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist*, 20(3), 99-104.
- Vega-Ramírez, M.T., Moreno-Lafont, M.C y López-Santiago, R. (2006). Hongos acuáticos: presencia del género *Saprolegnia* en México. En: *Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito hospedero II*. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, pp. 207-225.
- Vega-Ramírez, M.T., Moreno-Lafont, M.C., Valenzuela, R., Cervantes-Olivares, R., Aller-Gancedo, J.M., Fregeneda-Grandes, J.M., Damas-Aguilar, J.L., García-Flores, V. y López-Santiago, R. (2013). New records of Saprolegniaceae isolated from rainbow trout, from their eggs, and water in a fish farm from the State of México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, 637–649.
- Velasco, C. A., Berasain, G. E. y Ohashi, M. (2008). Producción intensiva de juveniles de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Biología Acuática*, (24), 55-58.
- Venturino, A., Anguiano, O. L., Gauna, L., Cocca, C., Bergoc, R. M. y de D'Angelo, A. M. P. (2001). Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 130(2), 191-198.

- Vigliano, F. A., Bermúdez, R., Quiroga, M. I. y Nieto, J. M. (2006). Evidence for melano-macrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: an immunohistochemical study. *Fish and Shellfish Immunology*, 21(4), 467-471.
- Vigliano, F. A., Pose, R. B. y Berdeal, M. Q. (2013). IgM-producing cells distribution in spleen and head kidney of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 6(34), 1744-1745.
- Villa, N. O., Kageyama, K., Asano, T. y Suga, H. (2006). Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *Mycologia*, 98(3), 410-422.
- Wada, S., Rha, S. A., Kondoh, T., Suda, H., Hatai, K. y Ishii, H. (1996). Histopathological comparison between ayu and carp artificially infected with *Aphanomyces piscicida*. *Fish Pathology*, 31(2), 71-80.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Willoughby, L.G. (1978). Saprolegnias of salmonid fish in Windermere: a critical analysis. *Journal of Fish Diseases*, 1, 51-67.
- Willoughby, L. G. (1989). Continued defence of salmonid fish against *Saprolegnia* fungus, after its establishment. *Journal of Fish Diseases*, 12(1), 63-67.
- Willoughby, L. G. y Roberts, R. J. (1991). Occurrence of the sewage fungus *Leptomitus lacteus*, a necrotroph on perch (*Perca fluviatilis*), in Windermere. *Mycological Research*, 95(6), 755-758.
- Wolinska, J., King, K. C., Vigneux, F. y Lively, C. M. (2008). Virulence, cultivating conditions, and phylogenetic analyses of oomycete parasites in *Daphnia*. *Parasitology*, 135(14), 1667-1678.
- Wolke, R. E. (1992). Piscine macrophage aggregates: a review. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 91-108.
- Wolska, M. y Mazurkiewicz-Zapalowicz, K. (2013). Parasites of zooplankton and periphyton assemblages in the littoral zone of lakes in Drawa National Park, Poland. *Acta Mycologica*, 48(1).
- Wood, S. E. y Willoughby, L. G. (1986). Ecological observations on the fungal colonization of fish by Saprolegniaceae in Windemere. *Journal of Applied Ecology*, 737-749.
- Wood, S. E., Willoughby, L. G. y Beakes, G. W. (1986). Preliminary evidence for inhibition of Saprolegnia fungus in the mucus of brown trout, *Salmo trutta* L., following experimental challenge. *Journal of Fish Diseases*, 9, 557-560.
- Wood, S. E., Willoughby, L. G. y Beakes, G. W. (1988). Experimental studies on uptake and interaction of spores of the *Saprolegnia diclina-parasitica* complex with external mucus of brown trout (*Salmo trutta*). *Transactions of the British Mycological Society*, 90(1), 63-73.
- Xu, Z., Parra, D., Gómez, D., Salinas, I., Zhang, Y. y Von Gersdorff, L., (2013). Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(32), 13097-13102.
- Yardimci, R. E. y Turgay, E. (2021). Diagnosis of *Aeromonas sobria* and *Saprolegnia* sp. co-infection in rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Research*, 4(1), 65-72.
- Yoshiura, Y., Kamaishi, T., Nakayasu, C. y Ootake, M. (2006). Detection and genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR targeted to peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C gene. *Fish Pathology*, 41, 67-71.

- Yu, Y., Wang, Q., Huang, Z., Ding, L. y Xu, Z. (2020). Immunoglobulins, mucosal immunity and vaccination in teleost fish. *Frontiers in Immunology*, 11, 1-14.
- Yuasa, K. y Hatai, K. (1996). Some biochemical characteristics of the genera *Saprolegnia*, *Achlya* and *Aphanomyces* isolated from fishes with fungal infection. *Mycoscience*, 37, 477-479.
- Zahran, E. y Risha, E. (2013). Protective role of adjuvant and potassium permanganate on oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Saprolegnia ferax*. *SpingerPlus*, 2, 1-10.
- Zahran, E., Abdelhamid, F. M., Awadin, W. y El-Gohary, F. A. (2014). The effect of *Flavobacterium coulmnare* challenge and potassium permanganate treatment on survival, innate immune, oxidative stress response and pathological alterations in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Global Journal of Fisheries and Aquaculture Researches*, 1(2), 83-105.
- Zaror, L., Collado, L., Bohle, H., Landskron, E., Montaña, J. y Avedaño, F. (2004). *Saprolegnia parasitica* in salmon and trout from Southern Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 36(1), 71-78.
- Zeis Caro, E. (2000). El cultivo de trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) en regiones de llanura y clima templado-cálido. El caso de Lujan, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista AquaTIC*, (9).
- Zhang, X. T., Yu, Y. Y., Xu, H. Y., Huang, Z. Y., Liu, X., Cao, J. F., Meng, K. F., Wu, Z. B., Han, G. K. Zhan, M. T., Ding, L. G., Kong, W. G., Li, N., Takizawa, F., Oriol, S. J. y Xu, Z. (2021). Prevailing role of mucosal immunoglobulins and B cells in teleost skin immune responses to bacterial infection. *The Journal of Immunology*, 206(5), 1088-1101.
- Zorriehzahra, M.J., Hassan, M.D., Gholizadeh, M. y Saidi, A.A. (2010). Study of some hematological and biochemical parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry in western part of Mazandaran province, Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 9, 185-198.