UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

"Estudio y evaluación de *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Oomycetes, Saprolegniales) como agente de control biológico de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)"

Trabajo de Tesis Doctoral

Lic. Sebastián A. Pelizza

Director: Dra. Claudia C. López Lastra

Co-director: Dr. Juan J. García

2007

A mis padres por enseñarme con su ejemplo, que en la vida todo se puede lograr con sacrificio, honestidad y perseverancia.

AGRADECIMIENTOS

- A mis directores de tesis, Dra. Claudia Cristina López Lastra y Dr. Juan José García, por brindarme la dirección, colaboración y apoyo profesional para la realización de esta tesis.
- A la directora del CEPAVE, Dra. Alda González y a la k.o.-directora Dra. Graciela Navone por haberme permitido realizar esta tesis en dicho Centro.
- A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT) a través del PICT Nº 11118/02 y al CONICET por haberme financiado el doctorado a través de las becas doctoral que me permitió llevar a cabo este estudio.
- A mis compañeros y amigos del laboratorio: Augusto, Ana Clara, Cecilia, Andrea, Fernanda, Gustavo, Luís, Nano, Gerardo, Vanesa y Victoria, por los momentos compartidos y por colaborar de una u otra manera en la realización de esta tesis en un clima de amistad, permanente colaboración y amplia generosidad.
- A mis compañeros del CEPAVE, por su cordialidad, apoyo y desinteresada ayuda.
- Al Licenciado Emilio Topa, por la realización de los cortes histológicos que figuraron en la presente tesis. A la Sra. María Cristina Estivaritz por las ilustraciones del ciclo de vida.
- Al Dr. Richard Humber por colaborar con sus inigualables conocimientos y por preservar cultivos de este hongo como colección alternativa.

- A la Licenciada en estadística Vilma Bisaro por el asesoramiento y la ayuda brindada en los análisis estadísticos expuestos en la presente tesis.
- A la profesora y traductora de ingles Celina Gotti por la traducción del resumen del presente trabajo.
- A las empresas Laboratorio Biagro y Basf Argentina por cedernos gratuitamente los productos larvicidas *Bti* liquid y Abate (Temephos), respectivamente utilizados en este estudio.
- A mis amigos de Ferre, mi pueblo querido, les agradezco por su amistad sincera y desinteresada.
- A la Familia Juan por la cual siento un cariño muy grande.
- A toda mi Familia y a cada uno de ellos por demostrarme el ejemplo del esfuerzo y la perseverancia en todos sus actos.
- Y especialmente a mi mujer Daniela por haberme acompañado y brindado su apoyo en toda esta etapa.

RESUMEN

ABSTRACT

1 INTRODUCCIÓN **1**

2 ANTECEDENTES **3**

2.1 Distribución de *Aedes aegypti* en América. **4**

2.2 Importancia sanitaria de *Aedes aegypti.* **5**

2.3 Control del vector. **9**

2.4 Control químico. **10**

2.5 Control biológico. **11**

2.6 Enemigos naturales de culícidos. **12**

2.7 Estado actual del conocimiento de los enemigos naturales de culícidos en la Argentina. **17**

2.8 Posición taxonómica de *Leptolegnia chapmanii.* **18**

2.9 Ciclo Biológico. **19**

2.10 Mecanismos de infección de *Leptolegnia chapmanii.* **21**

3 HIPÔTESIS Y OBJETIVOS **24**

4 MATERIALES Y METODOS **26**

4.1 Instalación y mantenimiento de la colonia de *Aedes aegypti* en el laboratorio. **26**

4.2 Mantenimiento *in vitro* e *in vivo* de *Leptolegnia chapmanii.* **26**

4.3 Producción de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* a distintos intervalos de tiempo y temperatura en larvas de *Aedes aegypti*. **27**

4.4 Producción *in vitro* de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii*. **28**

4.5 Tiempo que permanecen infectivas las zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* producidas *in vivo e in vitro* a diferentes temperaturas. **29**

4.6 Enquistamiento y exquistamiento de las zoosporas de *Leptolegnia chapmanii.* **29**

4.7 Tiempo mínimo de contacto entre larvas de *Aedes aegypti* y zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* para el desarrollo de la infección. **30**

4.8 Infección de larvas de *Aedes aegypti* por ingestión de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii.* **31**
4.9 Factores bióticos y abióticos que afectan la infectividad de *Leptolegnia chapmanii* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **32**
4.10 Efecto de la temperatura, pH y salinidad sobre la patogenicidad de *Leptolegnia chapmanii* en larvas de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens.* **33**
4.11 Tiempo requerido por *Leptolegnia chapmanii* para producir la muerte de las larvas de *Aedes aegypti*. **35**
4.12 Producción de oogonios y oosporas de *Leptolegnia chapmanii* a diferentes temperaturas. **35**
4.13 Mortalidad causada por *Leptolegnia chapmanii* sobre larvas de *Aedes aegypti* procedentes del campo y de la colonia de laboratorio. **36**
4.14 Efectos de concentraciones subletales de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* sobre la fecundidad de los adultos de *Aedes aegypti.* **36**
4.15 Efecto de la calidad del agua de los criaderos de culícidos sobre la patogenicidad e infectividad de las zoosporas de *Leptolegnia chapmanii.* **38**
4.16 Efecto individual y combinado de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, Temephos y *Leptolegnia chapmanii* sobre la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* en condiciones seminaturales y en laboratorio. **39**
4.17 Evaluación de diferentes medios de cultivo en el desarrollo y crecimiento de *Leptolegnia chapmanii.* **41**
4.18 Efecto de la luz solar sobre la infectividad de las zoosporas de *Leptolegnia chapmanii.* **42**
4.19 Utilización de suspensiones de zoosporas versus larvas infectadas como inóculo. **43**
4.20 Efecto de la introducción de *Leptolegnia chapmanii* en una población natural de *Aedes aegypti.* **44**
5 RESULTADOS **46**

5.1 Producción de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* a distintos intervalos de tiempo y temperatura en larvas de *Aedes aegypti* . **46**

5.2 Producción *in vitro* de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii*. **49**

5.3 Tiempo que permanecen infectivas las zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* producidas *in vivo e in vitro* a diferentes temperaturas. **50**

5.4 Enquistamiento y exquistamiento de las zoosporas de *Leptolegnia chapmanii.* **51**

5.5 Tiempo mínimo de contacto entre larvas de *Aedes aegypti* y zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* para el desarrollo de la infección. **52**

5.6 Infección de larvas de *Aedes aegypti* por ingestión de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii.* **53**

5.7 Factores bióticos y abióticos que afectan la infectividad de *Leptolegnia chapmanii* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **61**

5.8 Efecto de la temperatura, pH y salinidad sobre la patogenicidad de *Leptolegnia chapmanii* en larvas de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens.* **64**

5.9 Tiempo requerido por *Leptolegnia chapmanii* para producir la muerte de las larvas de *Aedes aegypti*. **68**

5.10 Producción de oogonios y oosporas de *Leptolegnia chapmanii* a diferentes temperaturas. **69**

5.11 Mortalidad causada por *Leptolegnia chapmanii* sobre larvas de *Aedes aegypti* procedentes del campo y de la colonia de laboratorio. **71**

5.12 Efectos de concentraciones subletales de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* sobre la fecundidad de los adultos de *Aedes aegypti.* **71**

5.13 Efecto de la calidad del agua de los criaderos de culícidos sobre la patogenicidad e infectividad de las zoosporas de *Leptolegnia chapmanii.* **72**

5.14 Efecto individual y combinado de *Bacillus thuringiensis* var.

israelensis, Temephos y *Leptolegnia chapmanii* sobre la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* en condiciones seminaturales y en laboratorio. **78**

5.15 Evaluación de diferentes medios de cultivo en el desarrollo y crecimiento de *Leptolegnia chapmanii.* **88**

5.16 Efecto de la luz solar sobre la infectividad de las zoosporas de *Leptolegnia chapmanii.* **89**

5.17 Utilización de suspensiones de zoosporas versus larvas infectadas como inóculo. **90**

5.18 Efecto de la introducción de *Leptolegnia chapmanii* en una población natural de *Aedes aegypti.* **92**

6 DISCUSIÓN **95**

7 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS **114**

8 BIBLIOGRAFÍA **116**

RESUMEN

El aislamiento nativo de *Leptolegnia chapmanii* Seymour estudiado en esta investigación constituye el cuarto aislado en el mundo y el primero para la región Neotropical. El objetivo de este trabajo fue ampliar el conocimiento de la biología de este aislamiento, determinar el efecto de algunos factores bióticos y abióticos sobre la patogenicidad, virulencia y longevidad de los estados infectivos de *L. chapmanii* con la finalidad de determinar el potencial de *L. chapmanii* como agente de control biológico del mosquito vector del dengue, *Aedes aegypti* (L.).

Las zoosporas móviles requirieron un período breve, aproximadamente 2 minutos, para infectar las larvas de culícidos. La infección se realizó por dos vías, la penetración de las zoosporas a través de la cutícula y mediante la ingestión de zoosporas y posterior germinación en el tubo digestivo hasta lograr la invasión del hemocel. La temperatura afectó la longevidad y la producción de zoosporas *in vivo* e *in vitro*. La mayor producción en larvas de *A. aegypti*, casi 1 x 10^5 zoosporas/larva, se obtuvo a las 48 h post-infección a 25 ºC. Las zoosporas de *L. chapmanii* producidas *in vivo* (larvas infectadas) fueron infectivas durante 51 días a 25 ºC, mientras que las colocadas a 10 y 35 ºC lo fueron durante 5 y 12 días, respectivamente. Las zoosporas obtenidas a partir de medios de cultivo fueron infectivas por 5 semanas a 25 ºC, mientras que a 10 y 35 ºC no fueron infectivas.

La densidad de larvas y de zoosporas, así como la superficie donde se produjo el contacto, afectaron sensiblemente los porcentajes de mortalidad de las larvas, no así el volumen de agua en los recipientes que no afectó los niveles de mortalidad. *Leptolegnia chapmanii* produjo una mortalidad de las larvas elevada entre 10 y 35 ºC de temperatura, pH de 4 a 10 y salinidad entre 1 y 7 g/l. Además, las zoosporas toleraron elevados niveles de materia orgánica y de contaminantes en el agua, produciendo porcentajes de mortalidad entre 70 y 99 %, en agua de zanja con elevada cantidad de materia orgánica y en agua de lluvia, respectivamente.

Los efectos subletales se detectaron en los adultos emergidos a partir de larvas sobrevivientes a la exposición a zoosporas de *L. chapmanii*. La infección con *L. chapmanii* afectó la fecundidad de las hembras adultas de *A. aegypti* y se observaron diferencias significativas en el número de huevos colocados por hembras de *A. aegypti* previamente expuestas, respecto a las hembras que no estuvieron en contacto con *L. chapmanii* en estado de larva. La producción de oogonios y oosporas resultó afectada por la temperatura, siendo menor el tiempo requerido para la formación de oogonios y oosporas cuando la temperatura se incrementó.

Las zoosporas de *L. chapmanii* no solo pueden utilizarse conjuntamente con larvicidas de uso generalizado en el control de culícidos, como *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) y el organofosforado Temephos, sino que además *L. chapmanii* potenció la acción larvicida de estos dos productos cuando fueron utilizados conjuntamente. La luz solar afectó negativamente la virulencia e infectividad de las zoosporas de *L. chapmanii*. La introducción de zoosporas de *L. chapmanii* en criaderos naturales de *A. aegypti* produjo una mortalidad de las larvas elevada, provocando la eliminación de las larvas entre los 15 y 22 días posteriores a la introducción de las zoosporas en los recipientes ubicados en la sombra y requiriendo de 28 a 39 días post-introducción en aquellos recipientes expuestos a la luz solar directa. Luego de un año de la introducción de *L. chapmanii* se redujo el número de recipientes positivos con larvas de *A. aegypti* en 33 % en los recipientes colocados al sol y en 66 % en los ubicados a la sombra.

Las características biológicas de este aislamiento nativo de *L. chapmanii*, principalmente la elevada tolerancia de los estados infectivos a la temperatura, pH, salinidad, materia orgánica y contaminantes, lo ubican en un grupo selecto de potenciales candidatos para ser considerados como agentes de control biológico de culícidos de importancia sanitaria, particularmente *A. aegypti*. La facilidad de *L. chapmanii* para ser producido en medios artificiales económicos, con formación de zoosporas que mantienen una elevada virulencia es otra característica relevante que distingue a este aislamiento. Finalmente la posibilidad de combinar *L. chapmanii* con los dos larvicidas de uso más extenso en el mundo, lo ubican como un candidato a integrar a mediano plazo el arsenal de productos para el control racional del vector del dengue en

América y así reducir las áreas de riesgo epidemiológico en el continente americano y en otras áreas en riesgo en el mundo.

ABSTRACT

The native isolation of *Leptolegnia champmanii* Seymour studied in this investigation is the fourth isolated in the world and the first in the Neotropical region. The objective of this research was to expand the knowledge of the biology of this isolation, to determine the effect of some biotics and abiotics factors over pathogen, virulence and longevity of the infective states of *L. chapmanii* with the aim of determining the L. champmanii potential as a biological control agent of the dengue mosquito vector, *Aedes aegyti* (L).

The moving zoopores required a short period, approximately two minutes, to infect the culicidae larva. The infection was done in two ways, the penetration of the zoopores through the cuticle, and by the ingestion of the zoospores and later germination in the alimentary canal until they managed to invade the hemocell. The temperature affected the longevity and the production of the zoospores in vivo and in vitro. The bigger *A. aegypti* larva production, almost 1 x 10^5 zoospores / larva, was obtained in the 48 h post-infection at 25 ºC. The *L. chapmanii* zoospores produced in vivo (infected larvae) were infective during 51 days at 25 ºC, while those placed at 10 and 35 ºC were infective during 5 and 12 days, respectively. The zoospores obtained by cultivation methods were infective for 5 weeks at 25 ºC, while at 10 and 35 ºC were not infective.

Larvae and zoospores density, as well as the surface were contact was made, considerably affected larvae mortality pertcentages. Water volume in the containers didn't affect the levels of mortality. *Leptolegnia chapmanii* produced a high larvae mortality between 10 and 35 ºC temperature, 4 to 10 pH, and salinity between 1 and 7 g/l. Besides, the zoospores tolerated high levels of organic matter and water contaminants, producing percentages of mortality between 70 and 99 %, in ditch water with high level of organic matter and in rain water, respectively.

The sub-lethal effects were detected in adults emerged from larvae which survived the exposure of L. chapmanii zoospores. The infection affected the *A. aegyti* female adult fertility and significant differences in the number of eggs laid by *A. aegyti* females exposed previously was observed, in contrast with the females which were not in contact with *L. chapmanii* in larva state. The

production of oogonies and oospores was affected by temperature; less time was needed for the formation of oogonies and oospores when temperature increased.

Not only can the *L. chapmanii* zoospores be used together with generalized-used larvacide in the culicidae control, such as *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti) and the organophosphorate Temephos, but the *L. chapmanii* also promoted the larvacide action of these two products when used together. Solar light negatively affected the *L. chapmanii* zoospores virulence and infectivity. The introduction of *L. chapmanii* zoospores in *A. aegyti* natural breeders produced a high larva mortality, causing larva elimination between 15 and 22 days after the introduction of the zoospores in the containers placed in the shadows, and requiring from 28 to 39 days after the introduction in those containers exposed to direct solar light. After a year of the *L. chapmanii* introduction the number of containers with positive *A. aegyti* larvae was reduced 33% in the containers placed under the sun and 66% in those placed in the shadows.

The biological characteristics of this *L. chapmanii* native isolation, mainly, infective states high tolerance to temperature, pH, salinity, organic matter and contaminants, place it in a select group of potential candidates to be considered as biological control agents of culicidae sanitary importance, particularly *A. aegyti*. The easy *L. chapmanii* production in cheap artificial means with zoospores formation that keeps a high virulence is another relevant characteristic that distinguishes this isolation. Finally, the possibility of combining *L. chapmanii* with the other two worldwide used larvacides makes it as a candidate to become, in an average time, part of the arsenal of products for a rational control of the dengue vector in America and therefore to reduce the areas of epidemiologic risk in the American continent and in other risk areas in the world.

INTRODUCCIÓN

Los culícidos constituyen uno de los grupos de insectos con mayor número de especies. Son vectores de importantes enfermedades para el hombre y los animales domésticos, como paludismo, filariasis, dengue, fiebre amarilla, virus del Nilo del Oeste y otras arbovirosis. En la Argentina existen varias especies de culícidos de importancia sanitaria, aunque este número se incrementará considerablemente, cuando se identifiquen los culícidos vectores de arbovirosis en el país.

Existen diferentes estrategias de control de larvas y adultos de culícidos, incluyendo métodos culturales, químicos y biológicos. La utilización de insecticidas químicos ha sido una de las medidas de prevención y control más efectivas aunque su aplicación prolongada ocasiona severos inconvenientes en el ambiente, por la toxicidad de estos productos y el desarrollo de resistencia en las poblaciones tratadas. Por tales motivos el control biológico de culícidos, a través de la utilización de patógenos, parásitos y depredadores ha recibido particular atención en los últimos años.

Los hongos constituyen un grupo importante de patógenos de insectos, en general caracterizados por presentar especificidad elevada y ser letales para los hospedadores. Los hongos patógenos de culícidos más estudiados hasta el presente han sido *Lagenidium giganteum* (Couch) (Jaronski & Axtell, 1982; Kerwin & Washino, 1986, 1988; Guzman & Axtell, 1987; Lord et al., 1988) y *Culicinomyces clavisporus* Couch, Romney & Rao (Sweeney et al. 1983; Sweeney, 1986; García & Sweeney, 1986). *Lagenidium giganteum* está comercializado actualmente como larvicida en el mercado internacional y ha sido utilizado con éxito en el control de larvas de culícidos en arrozales (Mc Cray et al. 1973, Christensen et al. 1977, Kerwin, 2007). Entre los hongos acuáticos zoospóricos, se puede mencionar a *Leptolegnia chapmanii* (Seymour), especie descrita originalmente como patógena de larvas de culícidos (Seymour, 1984) y que hasta el presente ha recibido escasa atención.

En el Neotrópico y particularmente en la Argentina, la información sobre hongos patógenos de culícidos es escasa y fragmentaria (García & López Lastra, 1989, López Lastra & García 1997). López Lastra et al. (1999) registraron la presencia de *L. chapmanii* parasitando larvas de *Ochlerotatus*

albifasciatus (Macquart) en los alrededores de la ciudad de La Plata, Provincia de Buenos Aires, constituyendo este hallazgo el cuarto aislamiento mundial del patógeno y el primero en el Neotrópico. Dick et al. (1999) basándose en secuencias de nucleótidos del 18 S rDNA determinaron que los aislamientos de *L. chapmanii* de Florida (EE.UU.) y de la Argentina constituyen un grupo monofilético.

Este aislamiento nativo de *L. chapmanii* presentó un amplio espectro de hospedadores culícidos susceptibles, resultando no patogénico para la mayoría de los invertebrados "no blanco" y los vertebrados acuáticos evaluados en el laboratorio (López Lastra et al. 2004). La elevada patogenicidad y virulencia de este aislamiento neotropical, sumado a su especificidad para los miembros de la familia Culicidae y la capacidad de ser producido en medios artificiales, nos llevaron a plantear este proyecto que intentó profundizar la caracterización biológica y ecológica de los estados infectivos de *L. chapmanii* con la finalidad de determinar su potencialidad como agente de control biológico del culícido vector del dengue, *Aedes aegypti*.

En este estudio se ofrece información amplia y novedosa sobre la biología y modos de infección de este aislamiento nativo de *L. chapmanii*. Se determinó el efecto de algunos factores abióticos y bióticos sobre la longevidad, patogenicidad y virulencia de este patógeno. Se determinó el medio de cultivo más eficiente para la producción de micelio y zoosporas, así como la temperatura óptima de producción. También se aportan interesantes datos sobre la relación entre la temperatura y la formación y producción de los estados sexuales, oosporas, en larvas infectadas. Finalmente, se evaluó el impacto de la introducción de zoosporas del aislamiento nativo de *L. chapmanii*, en poblaciones naturales de *A. aegypti*. Este trabajo constituye un paso importante para la obtención de un producto biológico con base en *L. chapmanii* a ser incorporado en los programas de control de culícidos de importancia sanitaria en el marco de un manejo integrado del vector del dengue.

ANTECEDENTES

La Familia Culicidae (Insecta: Díptera) incluye más de 3.500 especies en el mundo, la mayoría de ellas poseen importancia sanitaria. Enfermedades como paludismo, fiebre amarilla, dengue y filariosis, han sido y son verdaderos azotes de la humanidad, produciendo anualmente más de 540 millones de enfermos en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la mitad de la población mundial, más de 3.000 millones de personas, viven en áreas de riesgo de contraer enfermedades transmitidas por culícidos (OMS, 2004). Además se agregan los inconvenientes producidos por las picaduras de culícidos al hombre y a los animales domésticos, que convierten en inhabitables amplias áreas productivas del planeta (OMS, 2004). *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, culícido originario de la región etiópica, es actualmente un insecto cosmopolita. Su presencia ha sido detectada en la mayor parte de las áreas tropicales o subtropicales, comprendidas entre los 45° de latitud norte y los 35° de latitud sur, en zonas donde la temperatura media anual es de 20 °C.

La hembra de *A. aegypti* deposita sus huevos en la interfase agua-aire de recipientes que contengan agua limpia, con bajo tenor orgánico. Los criaderos más comunes de *A. aegypti* son recipientes de todo tipo localizados en el domicilio o peridomicilio, tales como botellas, floreros, tarros, piletas, baterías viejas y neumáticos en desuso entre otros. Los huevos depositados por las hembras miden menos de un milímetro de largo, son inicialmente de color blanco y se tornan posteriormente negros por el desarrollo del embrión, que evoluciona en condiciones óptimas de temperatura y humedad en un lapso de dos a tres días (Cristophers, 1960). La mayor parte de los huevos de cada postura es de eclosión rápida, mientras que un menor porcentaje constituyen los huevos resistentes los cuales pueden soportar condiciones de temperaturas extremas y desecación por períodos que van de los siete meses al año (Salvatella, 1996)

Las larvas que emergen de dichos huevos inician un ciclo de cuatro estadios larvales, creciendo con tres mudas, desde un largo de 1 mm a los 6 a 7 mm finales. Estas larvas presentan como caracteres morfológicos típicos, fuertes espículas toráxicas laterales quitinizadas, peine de escamas unilineal en el octavo segmento y sifón con forma de oliva corta, que se destaca por su

color negro (Cristophers, 1960). Se alimentan de zooplancton y fitoplancton de los recipientes que habitan. Su desarrollo se completa en condiciones favorables de nutrición y con temperaturas de 25 a 29 °C, en cinco a siete días. Las larvas presentan movimientos verticales característicos entre el fondo y la superficie del recipiente, disponiéndose en forma de "ese" (S) durante los mismos. Son incapaces de resistir temperaturas inferiores a 10 °C y superiores a 46 °C, impidiéndose a menos de 13 °C el pasaje al estado de pupa (Salvatella, 1996).

Las pupas no requieren alimentación y entre 28 y 32 °C completa su desarrollo hasta la emergencia del adulto en uno a tres días. Las variaciones de temperatura pueden dilatar este período. Por lo tanto el ciclo total de *A. aegypti*, de huevo a adulto se completa en óptimas condiciones de temperatura y alimentación en 10 días (Cristophers, 1960).

Los adultos emergentes son de color negro, con diseños blanco-plateados formados por escamas claras que se disponen simulando la forma de una "lira", en el dorso del tórax, y mostrando un anillado característico a nivel de tarsos, tibias y fémures de las patas. Las hembras son hematófagas poseen hábitos de alimentación diurnos, en cercanía a los domicilios, con gran afinidad a la alimentación sobre el hombre (Cristophers, 1960).

2.1 Distribución de *Aedes aegypti* en América.

Aedes aegypti fue introducido en el continente Americano durante los tiempos de la colonización europea. Con la excepción de Canadá y de aquellas áreas donde la altitud, temperatura u otras condiciones climáticas han impedido su colonización, *A. aegypti* se encuentra en casi todos los países del continente.

En la Argentina este culícido fue erradicado durante la década del 60 gracias a la implementación en todo el continente de campañas eficientes de control, coordinadas por la Organización Panamericana de la Salud (Bejaramo, 1979). En 1986 producto de la discontinuidad de los programas de vigilancia y control, *A. aegypti* reapareció nuevamente en nuestro país. Se detectó inicialmente en las provincias de Formosa y Misiones (Anónimo, 1990) y en 1992 en la provincia de Buenos Aires (Campos, 1993). En 2000 este culícido

se encontraba presente en 17 provincias y 589 municipios de la Argentina (Liborio et al. 2004), siendo su limite sur las provincias de Buenos Aires y La Pampa (Curto et al. 2002).

2.2 Importancia sanitaria de *Aedes aegypti*

Aedes aegypti puede transmitir (natural o experimentalmente) 5 especies de protozoos, 20 especies de filarias y 103 tipos de arbovirus (Degallier, 1988). Entre los protozoos que transmite se encuentre el agente que produce la malaria en aves silvestre o de corral, *Plasmodium gallinaceum* (Kelly & Edman 1992), entre las filarias se encuentra *Dirofilaria immitis*, de importancia veterinaria por las patologías que producen en perros (Sulaiman, 1983), pero fundamentalmente es vector del virus causante de la “fiebre amarilla urbana” y el “dengue” (Acha & Szyfres, 1986).

La fiebre amarilla es una arbovirosis provocada por los flavivirus. Posee dos ciclos diferentes, la fiebre amarilla urbana y la selvática. En la fiebre amarilla urbana el culícido *A. aegypti* es el responsable de la transmisión del virus de persona a persona. Si bien en zonas endémicas la tasa de mortalidad por fiebre amarilla es menor al 5 %, en situaciones epidémicas los niveles de mortalidad puede superar 50 % (Benenson, 1995).

El norte de América del Sur es en la actualidad, la zona más afectada por la fiebre amarilla (Goddard, 2000) aunque recientemente la OMS ha recomendado a los países del cono sur de América, incluida la Argentina, la vacunación masiva de la población en riesgo. La fiebre amarilla selvática es normalmente una enfermedad de los monos y otros animales silvestres, pudiendo infectar al hombre ocasionalmente, cuando este se introduce en la selva. Aproximadamente 2.500 millones de personas, dos quintas partes de la población mundial se encuentra en riesgo de contraer fiebre amarilla. Cerca de 50 millones se infectan anualmente con el virus dengue y casi 80.000.000 de personas anualmente contraen la enfermedad en el planeta (Alonso et al. 1999).

Alrededor de 500.000 personas anualmente contraen los casos más serios de dengue. Alrededor de 21.000 personas mueren a causa de la enfermedad (W H O, 2007).

Aedes aegypti es el vector principal del virus dengue en América. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha considerado a esta enfermedad como el mayor problema de salud pública de América luego del Sida, con casi dos tercios de la población mundial viviendo en zonas de riesgo de dengue. El dengue es una de las arbovirosis más importantes que afectan al hombre y constituye un serio problema de salud pública en el mundo, especialmente en los países tropicales, donde las condiciones del medio ambiente favorecen el desarrollo y la proliferación del vector *A. aegypti*. Es una enfermedad fundamentalmente urbana y la transmisión del virus es indirecta, se produce cuando un mosquito hembra infectado pica a una persona sana siendo esta la única forma de contraer la enfermedad ya que no hay transmisión por contacto directo con una persona enferma, o con sus secreciones, ni tampoco por contacto con fuentes de agua o alimento.

El tiempo "intrínseco" de transmisibilidad de la persona infectada comienza un día antes del inicio de la fiebre y se extiende hasta el sexto u octavo día de la enfermedad (Vignoli et al. 2002). En el culícido hembra infectado, el virus se multiplica en el epitelio intestinal, ganglios nerviosos, cuerpo graso y glándulas salivales. Luego de siete a catorce días (tiempo de incubación extrínseco) el vector está capacitado para trasmitir el virus a otra persona permaneciendo infectado y asintomático hasta la muerte. La fuente de infección y el reservorio vertebrado del virus es el hombre. El virus del dengue persiste en la naturaleza gracias al ciclo de transmisión hombre-*A. aegypti*-hombre (Vignoli et al. 2002).

Secundariamente, también contribuyen a la persistencia y transmisión del virus otros fenómenos como:

- La replicación del virus en el tracto genital del vector hace que aquel pueda incorporarse a los huevos y a la progenie.
- Se puede producir la transmisión sexual del virus de mosquitos machos infectados a hembras.
- Existen ciclos selváticos de infección que pueden involucrar a monos y contribuir en escala menor al mantenimiento y la transmisión del virus, junto con el ciclo horizontal principal hombre-mosquito-hombre.

La infección con el virus del dengue causa una enfermedad cuyo espectro incluye desde formas clínicamente inaparentes (Dengue clásico) hasta cuadros

graves de hemorragia y de “shock” que pueden finalizar con la muerte de la persona (Dengue hemorrágico).

El dengue clásico se caracteriza por fiebre elevada (39-40°C), cefaleas, mialgias intensas, náuseas, vómitos y dolor abdominal. Los síntomas respiratorios están representados por tos, rinitis y faringitis. En adultos, al final del periodo febril se pueden presentar manifestaciones hemorrágicas, como epistaxis, petequias y en casos severos hematuria.

Si bien el dengue clásico es usualmente benigno y autolimitado, se asocia con gran debilidad física y algunas veces con una convalecencia prolongada. En el caso del dengue hemorrágico los síntomas son indistinguibles de los del dengue clásico, pero en este caso evolucionan rápidamente las manifestaciones hemorrágicas a nivel de la piel, el tubo digestivo y los sistemas excretor y nervioso.

En los casos benignos o moderados, luego del descenso de la fiebre, el resto de los síntomas y signos desaparecen. En los casos graves de dengue hemorrágico, luego del descenso de la fiebre entre el tercero y séptimo día, el estado de la persona enferma empeora presentando cianosis, taquipnea, hipotensión, hepatomegalia, hemorragias múltiples y falla circulatoria, pudiendo llevar a la muerte de la persona en 12 a 14 horas (Vignoli et al. 2002).

El agente causal de la enfermedad del dengue es un virus perteneciente a la familia Flaviviridae: arbovirus muy similar al que produce la enfermedad de la Fiebre amarilla. Son virus envueltos, sensibles a la destrucción por agentes físicos y químicos, de 40-50 nm de diámetro, con cápside icosahédrica y genoma de ARN monocatenario, no segmentado, de polaridad positiva, actuando directamente como ARNm policistrónico (Vignoli et al. 2002).

El virus se adhiere a las células, ingresa a ellas por viropexia, se replica en el citoplasma y se ensambla en el retículo endoplasmático. Su genoma codifica una proteína que es luego procesada en 10 polipéptidos, 3 estructurales (una proteína de nucleocápside C, una de membrana y una glicoproteína de envoltura E hemaglutinante de adherencia) y 7 no estructurales, de los cuales se destaca NS1, que puede inducir al igual que E, respuesta inmune protectora. Por variación de la proteína E se pueden diferenciar 4 tipos antigénicos del virus que son (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4). Existe heterogeneidad de cepas dentro de cada tipo, que se correlaciona

con variedad de secuencias de ARN. Las posibilidades de variación y supervivencia de este virus son menores que para otros virus ARN a causa de su estricta adaptación a dos hospedadores diferentes (Vignoli et al. 2002).

Las pruebas diagnósticas de laboratorio con que se cuenta actualmente para la detección del virus tanto en personas que se sospecha están infectadas como así también en el culícido consisten en el aislamiento del virus o identificación de sus antígenos o ácidos nucleicos a partir del suero de la persona enferma o de cultivos celulares que pueden ser tanto del culícido como de la persona. El virus del dengue se puede identificar luego de su aislamiento en cultivos celulares, a través de la observación de su efecto citopático inducido (infección citocidal), por la detección de las proteínas virales o por detección de los ácidos nucleicos. Varias líneas celulares han mostrado susceptibilidad al virus del dengue siendo las células de los culícidos y las de riñón de monos las más susceptibles y por ende las más utilizadas para realizar dichos cultivos celulares (Alonso et al. 1999). Las técnicas de biología molecular están siendo muy empleadas para el reconocimiento del virus del dengue, siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una de las técnicas más empleadas para el diagnóstico de las infecciones por el virus del dengue. Los métodos serológicos que se emplean para la confirmación diagnóstica de casos sospechosos de dengue son ELISA, Inmunoelectrofluorescencia (I) y la fijación del complemento (FC). La detección de anticuerpos específicos de clase IgM por enzima-inmunoensayo (Mac ELISA) y UMELISA son marcadores de infección recientes. Estos anticuerpos pueden detectarse desde el comienzo de la fiebre y persisten a niveles dosables durante las 3 a 8 semanas posteriores.

Los primeros relatos históricos sobre el dengue mencionan a la isla de Java en 1779 como el primer lugar donde se reconoció brotes de la enfermedad (Vignoli et al. 2002). En América, los relatos sobre estas dolencias datan de más de 200 años en Filadelfia (EE.UU.) en 1780. En el siglo pasado ocurrieron grandes epidemias, coincidiendo con la intensificación del transporte comercial entre los puertos de la región del Caribe y el Sur de Estados Unidos con el resto del mundo. En América del Sur el dengue se transforma todos los años en una amenaza para la salud pública continental.

En 1965, 49 naciones entre ellas la Argentina, confirmaron la erradicación del mosquito *A. aegypti* transmisor de la enfermedad. Estos resultados fueron obtenidos luego de 18 años de campaña realizada por los países respectivos con la colaboración de la OPS, aunque problemas financieros, políticos, técnicos y administrativos ocasionaron que la mayoría de los países se reinfectaran nuevamente a partir de la década del 80. Los casos aumentaron de 66.000 en 1980 a 717.000 en 1998. En el año 2002 las cifras de la OPS llegaron a 968.723 casos notificados en América con 234 muertos. Los países reinfectados han sufrido por lo menos, una epidemia de dengue. En el año 2004 en Brasil más de 750.000 personas se infectaron, de las cuales 150 murieron (Ricci & Padín, 2007).

En la Argentina la última epidemia de dengue anterior a los brotes registrados en Tartagal (Salta) durante los meses de febrero y marzo de 1998 y Posadas (Misiones) en mayo del mismo año, se supone que tuvo lugar en 1916 en Concordia y Paraná (Entre Ríos) (Gaudino, 1916). En la Argentina, la última actualización del Ministerio de Salud de la Nación (19/03/07) registró 192 casos de dengue confirmados, de los cuales 8 fueron reconocidos como autóctonos (ANSA, 2007). Los casos de dengue registrados en la provincia de Buenos Aires al 19/03/07 fueron 57 según el Ministerio de Salud Bonaerense (Ricci & Padín, 2007).

2.3 Control del vector

Las estrategias para el control de *A. aegypti* incluyen tratamientos para disminuir o eliminar tanto los estadios larvales como los adultos. Entre las medidas de preservación contra los adultos podemos mencionar, la protección personal (repelentes en piel y ropa, tules alrededor de camas, etc.) el uso de las telas mosquiteras y la aplicación terrestre o aérea de insecticidas químicos (Mc Clelland, 1984).

Respecto al control de las larvas de *A. aegypti* se han utilizado métodos culturales como la reducción o eliminación de los sitios de cría, métodos químicos (aceites, organofosforados, organoclorados, piretroides, factores análogos a la hormona juvenil, etc.), y el control biológico (depredadores, parásitos y patógenos) (Laird & Miles, 1983).

Cabe mencionar que los programas de control tienen como acción principal al saneamiento ambiental mediante la eliminación de los recipientes que retengan agua y sirvan como fuente de cría de *A. aegypti***.** Este método preventivo es eficaz y económico, pero de ejecución compleja requiriendo un gran esfuerzo de organización y educación comunitaria.

2.4 Control químico

Desde comienzos del siglo XX se han estado utilizando productos químicos para el control de *A. aegypti*. En la primera campaña contra la fiebre amarilla realizada en Cuba y Panamá, además de los programas de limpieza, los criaderos fueron rociados con petróleo y las casas tratados con piretrina en polvo (OPS, 1998). Cuando se descubrieron las propiedades insecticidas del DDT en 1940, este compuesto se convirtió rápidamente en el método principal empleado en los programas de erradicación de alcance continental de *A. aegypti*. Cuando los culícidos comenzaron a hacerse resistentes al DDT a partir de 1960, ya se habían desarrollado insecticidas organofosforados y algunos de ellos, como fentión, malatión, fenitrotión y temephos empezaron a usarse en el control de *A. aegypti* (OPS, 1998).

Si bien el uso de insecticidas químicos ha sido la elección más efectiva y universalmente elegida para el control de los culícidos en general, la aplicación prolongada de estos productos ha provocado niveles elevados de contaminación del ambiente, peligrosos para los animales y el hombre. Por otra parte las poblaciones de estos insectos vectores tratados, no fueron totalmente erradicadas, retornando y desarrollando resistencia a varios insecticidas sintéticos (Georghiou & Saito, 1983). El creciente interés en la calidad del ambiente ha intensificado en los últimos años la búsqueda de nuevas herramientas para controlar insectos de importancia sanitaria que sean más seguros para la fauna y compatibles con el ambiente (Weiser, 1991; Tanada & Kaya, 1993; Lacey, 1997).

2.5 Control biológico

El control biológico es el estudio y utilización de los enemigos naturales (depredadores, parasitoides, parásitos y patógenos) para lograr reducir el número de organismos de una especie perjudicial por debajo del umbral de daño económico y/o transmisión de una enfermedad, en nuestro caso el culícido vector del virus del dengue *A. aegypti*. La bibliografía mundial sobre los enemigos naturales de culícidos es abundante, habiéndose citado numerosos virus, bacterias, hongos, protozoos, nemátodos y depredadores de estadios inmaduros y adultos de culícidos (Jenkins, 1964; Robert & Strand, 1977; Roberts & Castillo, 1980; Roberts et al. 1983; Weiser, 1991; Becnel & White, 2007; Federici et al. 2007; Kerwin, 2007; Tseng, 2007; Platzer, 2007; Mogi, 2007).

Algunas de las ventajas que se pueden atribuir al uso de agentes de control biológico son:

- No contaminan el ambiente.
- Son altamente específicos atacando solo al insecto blanco, no afectando a otros animales o al hombre.
- Persisten en el ambiente por largos periodos de tiempo.
- Algunos de los organismos utilizados como organismos de control biológico presentan un fenómeno de autodispersión, permitiéndoles llegar a sitios inaccesibles que no podrían ser tratados por otros medios.
- En general no generan resistencia en la especie blanco.

Las desventajas que se pueden enumerar para la aplicación de agentes de control biológico son:

- El costo elevado de la cría o producción de los organismos que serán utilizados para controlar al insecto plaga.
- La dificultad para su aplicación en el campo.
- La limitación de su utilidad en medios acuáticos donde la temperatura, el pH y la contaminación orgánica constituyen un ambiente hostil para su adaptación.

2.6 Enemigos naturales de culícidos

Entre los depredadores de culícidos se han citado otros culícidos, copépodos, hemípteros, coleópteros, odonatos, turbelarios y peces, siendo estos últimos los más estudiados y evaluados. El pez larvívoro *Gambussia affinis* (Bairdand Girard) es la especie más utilizada en el mundo para regular estadios inmaduros de culícidos (Hoy & Reed, 1971; Daved & Meisch, 1977; Bay, 1985; Meish, 1985; Walton, 2007).

Otros depredadores importantes de las larvas de culícidos son larvas de culícidos del género *Toxorhynchites*, las cuales gozan de dos ventajas como depredadores de *A. aegypti*, una es que se desarrollan en los mismos tipos de recipientes que las larvas de *A. aegypti* y la otra ventaja es que los adultos no se alimentan de sangre sino de jugos vegetales.

Ciertos copépodos ciclopoideos ubicuos devoran las larvas recién eclosionadas. No obstante si las larvas de culícidos logran desarrollarse hasta el estadio tercero, son demasiado grandes para que puedan ser atacados con éxito por copépodos diminutos (OPS, 1998; Marten & Reid, 2007).

Un espectro amplio de patógenos y parásitos (virus, bacterias, hongos, protozoos y nemátodos) han sido estudiados y evaluados como potenciales agentes de control biológico de culícidos (Chapman, 1985; Weiser, 1991; Becnel & White, 2007; Federici et al. 2007; Kerwin, 2007; Tseng, 2007; Platzer, 2007; Mogi, 2007).

Entre los virus patógenos de culícidos se han registrado: Baculovirus (Nucleopoliedrovirus), Reovirus (Cypovirus), Entomopoxvirus, Chloriridovirus (RMIV y TMIV) Densovirus y pequeños virus RNA semejantes a Picornavirus (Anderson, 1970; Hall & Fish, 1974, Fukuda & Clark, 1975; Adams, 1991; Schuler et al. 1995; Lacey, 1997; Humter-Fujita et al. 1998; Becnel & White, 2007).

Las bacterias entomopatógenas no son frecuentes en poblaciones naturales de culícidos, aunque algunas bacterias de suelo son patogénicas para larvas de mosquitos. Tal es el caso de *Bacillus sphaericus* (Neide) (Bs) y *B. thuringiensis* serovar *israelensis* (Berliner) (Bti), a partir de las cuales se han desarrollado productos biológicos comerciales para el control de larvas de culícidos que no afectan al ambiente y son inofensivos para el hombre. El

denominado Bti es el producto obtenido de la fermentación de la bacteria *Bacillus thuringiensis* H 14, siendo el producto biológico más aceptable para el control de culícidos con que se cuenta en la actualidad.

El cuerpo parasporal que forma esta bacteria contiene una toxina con alto poder larvicida que se desgrana exclusivamente en un ambiente alcalino donde se encuentran los dípteros del suborden Nematocera. (Lacey & Lacey, 1981; Lacey & Singer, 1982; Mc Laughlin & Billodeaux, 1983; Thiery & Frachon, 1997; Skoumand et al. 1998; Follet & Duan, 2000; Federici et al. 2007). Los productos insecticidas elaborados en base a toxinas de *Bti* y *Bs* han llegado al mercado en diferentes formulaciones siendo uno de los pocos productos biológicos comerciales empleados en el control de culícidos (Lacey & Kaya, 2000; Federici et al. 2007).

Los nemátodos constituyen otro grupo importante de parásitos de culícidos; y los que han sido identificados naturalmente a partir de culícidos pertenecen a la familia Mermithidae, algunas de cuyas especies han sido extensamente estudiadas, tal es el caso de *Romanomermis culicivorax* Ross & Smith, (Petersen, 1985; Platzer, 2007). El uso de nemátodos para el control biológico de culícidos está sustentado por su capacidad de adaptación a nuevos ambientes y a condiciones adversas, por su resistencia a los productos químicos, por su especificidad hacia el insecto blanco, siendo inocuo para otros animales incluso el hombre y por su capacidad de actuar en forma sinérgica con otros entomopatógenos que aumentan su eficacia (Stock & Camino, 1996).

Entre los protozoos parásitos de culícidos se han citado ciliados, flagelados, gregarinas y microsporidios. Ciliados pertenecientes a los géneros *Lambornella* y *Tetrahymena* han sido hallados parasitando larvas de culícidos (Grassmick & Rowley, 1973; Clark & Brandl, 1976; Corliss & Coats, 1976; Dzerhinskii & Dubitskii, 1977). La presencia de flagelados en culícidos no ha sido registrada con frecuencia, siendo las especies más representativas *Crithidia fasciculata* (Leger) y *Blastocrithidia culicis* (Novy, Mc Neal & Torry) (Weiser, 1991). Las infecciones causadas por gregarinas son comunes en especies de culícidos que habitan en ambientes reducidos naturales o artificiales como es el caso de *A. aegypti.* Entre las especies de gregarinas más comunes se pueden citar *Ascogregarina barretti* (Vavra), *A. culicis* (Ross) y *A. taiwanensis* (Lien y Levine) (Munstermann & Werson, 1990; Siegel et al. 1992;

García et al. 1994; Reyes-Villanueva et al. 2001). Sin duda, el grupo de protozoos patógeno de culícidos más importante y mejor representado lo constituyen los microsporidios. Varias decenas de especies pertenecientes a 15 géneros han sido descriptos en culícidos, la mayoría incluidas en los géneros heterospóricos *Amblyospora* y *Parathelohania* (Sprague, 1977; Becnel & Andreadis, 1999; Andreadis, 2007).

Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos ampliamente estudiados en todo el mundo, existiendo más de 700 especies reunidas en 100 géneros. Los hongos tienen la particularidad de parasitar diversos tipos de artrópodos en hábitat acuático y terrestre (Humber, 1997). Los hongos constituyen un importante grupo de patógenos de culícidos. Entre los más importantes se pueden citar *Culicinomyces clavisporus* Couch, *Coelomomyces* sp. (Roberts 1974; Lacey & Undeen 1986; Federici 1995; Lacey 1997; Humber, 1997; Kerwin 2007), y dentro de los *Phythiaceae* a *Lagenidium giganteum* Couch.

Los organismos acuáticos del Reino Straminipila (antes hongos acuáticos) son en su mayoría parásitos facultativos y muchos de ellos afectan a larvas de mosquitos. Varios géneros como *Aphanomyces* aparecen de tanto en tanto infectando larvas de mosquitos causando epizootias (Seymour & Briggs, 1985). Otros como *Leptolegnia chapmanii* Seymour, *L. caudata* Bary, *Pythium flevoense* Van Der Plaats-Niterink, *P. carolinianum* Matthews, *Crypticola clavulifera* Humber, Frances & Sweeney, *Aphamomyces astaci* Schikora, *Saprolegnia feroz* y *S. parasitica* Coker, se los ha encontrado infectando larvas de mosquitos, pero ellos han recibido limitada atención por ser patógenos oportunistas débiles en condiciones de “stress” y sólo actuando como patógenos ocasionalmente. *Lagenidium giganteum* es otra especie patógena de mosquitos, que ha sido extensamente estudiada en el mundo y a partir del cual se ha podido obtener un producto disponible en el mercado cuyo nombre comercial es Laginex^{MR}. *Lagenidium giganteum* fue descrito por primera vez por Couch (1935) al examinar larvas de culícidos de los géneros *Culex y Anopheles* en Carolina del Norte (EE.UU.). Su distribución geográfica es amplia y se lo ha aislado en América del Norte, América del Sur, Europa, África, Asia e incluso en la Antártida (Federici, 1981; Orduz et al. 1992). Esta especie ha sido aislada a partir de larvas de *Culex* (Merrian & Axtell, 1982., Jaronski & Axtell,

1983.), *Mansonia* (Cuda et al. 1997) y de distintas especies de *Anopheles* (Kerwin & Washino, 1987).

Dentro del género *Leptolegnia* sólo *L. caudata* (Bisht et al. 1996) y *L. chapmanii* (Mc Innis & Zattau, 1982) fueron aislados de larvas de mosquitos. *Leptolegnia caudata* fue aislada del culícido vector de la malaria *An. culicifacies* Giles (Bisht et al. 1996) mientras que *L. chapmanii* fue aislado de larvas de *Ochlerotatus triseriatus* (Say) en Luisiana (EE.UU.) en 1971 (Seymour, 1984). *Leptolegnia chapmanii* fue aislado por primera vez en el Hemisferio Sur a partir de larvas de *Oc. albifasciatus* (Macquart) (López Lastra et al. 1999).

Muchas especies de *Pythium* pueden afectar o ser patógenas de plantas vasculares, hongos y algas (Van Der Plaats-Niterink 1981), sin embargo algunas especies fueron encontradas infectando larvas de *Oc. sierrensis* (Ludlow) en California.

Crypticola clavulifera Humber, Frances & Sweeney, fue aislada del tubo digestivo de *Forcipomyia marksae* (Tokunaga) (Ceratopogonidae) en Queensland, Australia en 1984 (Frances et al. 1989). En ensayos en laboratorio se pudo observar que *C. clavulifera* infectaba larvas de *A. notoscriptus* (Skuse), *An. farauti* (Laveran), *C. annulirostris* (Skuse), *C. quinquefasciatus* (Say) (Frances, 1991) y *A. aegypti* (Frances et al. 1989; Frances 1991).

El género *Coelomomyces* consiste de más de 70 especies de hongos acuáticos parásitos obligados. Miembros del género *Coelomomyces* han sido encontrados en todos los continentes excepto en la Antártica, (Roberts, 1974). A diferencia de otros hongos entomopatógenos que tienen un amplio rango de hospedadores incluyendo varios órdenes de insectos, *Coelomomyces* está enteramente restringida a larvas de dípteros acuáticos, *Culicidae*, *Psychodidae*, *Chironomidae*, *Simuliidae* y *Tabanidae* (Lead & Pedroso, 1964; Chapman, 1974; Roberts, 1970). Chapman y Woodard (1966) citaron los culícidos hospedadores de *Coelomomyces* en EE.UU., incluyendo especies de *Culex* (Linnaeus), *Culiseta* (Felt), *Aedes* (Meigen), *Anopheles* (Meigen), *Psorophora* (Robineau-Desvoidy) y *Uranotaenia* (Lynch Arribalzaga). Roberts y Strand (1977) aislaron 22 especies de *Coelomomyces* en 31 especies de mosquitos mientras que Weiser (1988) citó 28 especies de *Coelomomyces* en 60 especies de mosquitos.

Los Trichomycetes (Zygomycota) pertenecen a un grupo de hongos que colonizan el tubo digestivo de muchas especies de artrópodos (Lichtwardt et al. 1999). Entre los Trichomycetes solo *Smittium morbosum* Sweeney fue citado como patógeno para larvas de mosquitos (Lichtwardt, 1986).

Lowe et al. (1968) citaron a *Conidiobulus coronatus* Constantin infectando larvas de *C. quinquefasciatus*, así como también *Entomophthora culicis* Braun fue aislada y descrita en adultos de *C. pipiens* en Alemania en 1985 (Braun, 1855). Kramer (1982) aisló este mismo hongo en especies de *Aedes, Culex*, *Oc. detritus* (Haliday), *An. maculipennis* (Meigen) y *Myzomyia hispaniola* (Theobald).

Erynia aquatica (Anderson & Anagnostakis), es una de las pocas especies dentro de los Entomophthorales que infecta a invertebrados acuáticos. Anderson y Ringo (1969) encontraron este hongo en larvas de *Oc. canadienses* (Theobald), *Culiseta morsitans* (Theobald) y *Oc. cantator* (Coquillet) (Andreadis & Magnarelli, 1983) y en pupas de *Oc. stimulans* (Walker) (Molloy & Wraight 1982).

Culicinomyces es un hongo parásito facultativo que se lo ha encontrado infectando 5 especies de culícidos *Oc. rupestres* Dobrotworsky (Russell et al. 1978), *Oc. rubrithorax* (Macquart) (Frances, 1986), *An. quadrimaculatus* (Say) (Couch et al. 1974), *Culiseta inornata* (Dyar) (Goettel et al. 1984) y *Culiseta inconspicua* Lee (Frances, 1986).

Beauveria es uno de los más frecuentes hongos entomopatógenos y es de distribución cosmopolita. Si bien el género presenta un amplio espectro de hospedadores (Roberts 1974), solo dos especies se han citado en culícidos. *Beauveria bassiana* Balsamo fue hallada infectando adultos de *C. tarsalis* (Coquillet), *C. pipiens* (Linnaeus), *An. albimanus* (Evans) (Clark et al. 1968), *Oc. sierrensis* (Ludlow) (Pinnock et al. 1973) mientras que *B. brongniartii* Saccardo fue citada en adultos de *Oc. sierrensis* (Pinnock et al. 1973).

Metarhizium al igual que *Beauveria* es uno de los hongos entomopatógenos más comunes y presentan distribución cosmopolita y una gran diversidad de insectos hospedadores (Rehner, 2005; Bidochka & Small, 2005). *Metarhizium anisopliae* Sorokin mostró ser un virulento agente contra larvas de mosquitos (Veen, 1968; Roberts, 1967; 1970; 1974; Ramoska, 1982; Agudelo-Silva & Wassink, 1984; Daoust & Roberts, 1983 a,b; Ravallec et al.

1989; Sandhu et al. 1993; Alves et al. 2002). *Tolypocladium cylindrosporum* Gams fue aislado en *Oc. sierrensis* en California en 1971 (Soares, 1982) y *Oc. australis* en Nueva Zelanda (Weiser & Pillai, 1981). También adultos de *Oc. sierrensis* fueron susceptibles a la infección (Soares, 1982). Otros hongos anamórficos como los pertenecientes a los géneros *Aspergillus, Fusarium, Paecilomyces, Penicilium* y *Verticillium* han sido aislados de culícidos (Hasan & Vago, 1972; Roberts & Strand, 1977; Ballard & Knapp, 1984; Sur et al. 1999; Agarwala et al. 1999; Scholte et al. 2003).

2.7 Estado actual del conocimiento de los enemigos naturales de culícidos en la Argentina.

Los parásitos y patógenos de culícidos comenzaron a estudiarse en la Argentina a principios de la década del 80. A partir de este período se han identificado virus (Nucleopoliedrovirus), bacterias esporulantes y no esporulantes, hongos (*Aphanocladium album* (Preuss) Gams*, Coelomomyces* sp.*; Leptolegnia chapmanii* Seymour*, Smittium* sp., (García & López Lastra, 1989; López Lastra, 1990a,b; López Lastra & García, 1997; López Lastra et al. 1991; 1999), gregarinas (*Ascogregarina culicis)* (Dellapé et al. 2005), microsporidios (*Amblyospora* sp. *Hazardia milleri* (Hazard & Fukuda)*, Parathelohania* sp. (García, 1989; García & López Lastra, 1989; García & Camino, 1990; García & Becnel, 1994; Micieli et al. 2000 a,b) y mermítidos (*Hydromermis* sp. *y Strelkovimermis spiculatus)* (Poinar & Camino, 1986; García & Camino, 1990).

La mayoría de estos patógenos han sido identificados a nivel específico. Los ciclos biológicos y las vías de transmisión han sido dilucidados en varios de los patógenos (Camino & Reboredo, 1994; Micieli et al. 1998; 2000 a,b; 2001; 2003). También se determinó la virulencia, patogenicidad y el espectro de hospedadores susceptibles para alguno de los patógenos y parásitos hallados (Camino & Reboredo, 2000; Achinelly & García, 2003; Achinelly et al. 2004 a,b). Estudios epizootiológicos han sido conducidos en algunos de estos sistemas hospedador-parásito, principalmente con microsporidios del género *Amblyospora* (Micieli et al. 2000 a, b; 2001, 2003) y el mermítido *S. spiculatus* (Micieli & García, 1999). Los estudios referidos al impacto sobre la densidad de

culícidos producido por la introducción o el incremento de estos parásitos o patógenos en los criaderos de culícidos son prácticamente nulos en la Argentina.

Dentro de la variedad de entomopátogenos de culícidos identificados en la Argentina, esta investigación se centró en un aislamiento nativo de la especie *L. chapmanii* hallado infectando larvas de *Oc. albifasciatus* (Marquart) en la localidad de Melchor Romero, Provincia de Buenos Aires.

2.8 Posición taxonómica de *Leptolegnia chapmanii*

El Reino Straminipila incluye a organismos morfológicamente diversos, pero que sin embargo tienen en común la presencia de zoosporas biflageladas, con dos flagelos distintos (heterocontas) o derivados de organismos que alguna vez tuvieron dicha característica. El flagelo anterior es tipo pincel, con dos hileras de mastigonemas tubulares y tripartitos (flagelo straminopila), y el posterior tipo látigo, sin mastigonemas (Dick, 2001 a).

El Reino Straminipila esta integrado por los Phylum Oomycota, Hyphochytridioymicota y Labyrinthulomycota, así como por varios grupos de algas cromofitas (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Fucophyceae, Tribophyceae) y algunos pequeños grupos de organismos “Protistas” fotosintéticos y saprótrofos (Dick, 2001 a).

Los Oomycota se diferencian de los hongos verdaderos por presentar zoosporas biflageladas heterocontas, desarrollar un talo cenocítico diploide donde la meiosis tiene lugar en el interior de los gametangios. Tienen reproducción sexual característica, mediante contacto gametangial, produciéndose como resultado una cigota de paredes gruesas (oosporas). Sus paredes celulares están compuestas por β 1-3 y β 1-6 glucanos, hidroxiprolina y celulosa en menor proporción (4-20 % del peso seco de la pared), mientras que los hongos verdaderos tienen quitina. También existen diferencias a nivel de algunas organelas celulares (cristales mitocondriales tubulares), varias características bioquímicas (entre otras diferentes composición de aldioles y polioles, diferencias en la síntesis de lisina y de triptofano sintetasa), presentan también diferentes sustancias de reserva (Dick 2001 a, b).

El Phylum Oomycota presenta una sola clase, Peronosporomycetes (Oomycetes), a su vez dentro de la clase se diferencian dos subclases Saprolegniomycetidae y Peronosporomycetidae, el clivaje del citoplasma de los zoosporangios es centrífugo en la primera subclase y diverso en la segunda, en el interior del oogonio la oosfera se diferencia por agregación centrífuga a partir del periplasma periférico en la primera y centrípeta en la segunda. Los organismos que pertenecen a la subclase Peronosporomycetidae, son generalmente monospóricos, con el ooplasto traslúcido, mientras que los integrantes de la subclase Saprolegniomycetidae son poliospóricos con el ooplasto granular y fluido (Dick, 2001 a,b).

La mayoría de los organismos incluidos .en la subclase Saprolegniomycetidae son de hábitos acuáticos, mientras que los comprendidos en la subclase Peronosporomycetidae son generalmente terrestres (Alexopoulus et al. 1996).

Recientemente, Adl et al. (2005), basándose en estudios moleculares ubican a *L. chapmanii* dentro del Reino Chromalveolata y Phylum Stramenopiles. En esta tesis la ubicación sistemática seguida es la siguiente:

Reino Chromalveolata
- Phylum Straminipila
  - Clase Peronosporomycetes
    - Sub-clase Saprolegniomycetidae
      - Orden Saprolegniales
        - Familia Leptolegniaceae (Dick et al. 1999).

2.9 Ciclo biológico

Muchos de los integrantes pertenecientes a la clase Peronosporomycetes son saprótrofos y se los puede encontrar sobre plantas y animales muertos, con lo cual juegan un papel muy importante en la degradación y reciclado de nutrientes en ecosistemas acuáticos (Dick, 1990).

La parte somática del talo está formada por dos tipos de hifas; en primer lugar, hifas rizoidales, que penetran en el sustrato y sirven para fijar el organismo y absorber el alimento; en segundo lugar, la masa de hifas

profusamente ramificadas situada en la parte externa del substrato, sobre la cual se forman los órganos reproductores (Alexopoulus et al. 1996).

En las condiciones ambientales apropiadas, las hifas producen esporangios. Típicamente, los esporangios son estructuras alargadas, atenuadas, situadas en la parte apical de las hifas somáticas, y separadas de ellas por un septo. Los esporangios están llenos de un protoplasma denso, a diferencia de las hifas somáticas, que sólo están interiormente revestidas por una delgada capa protoplasmática. A medida que el esporangio se desarrolla y antes de que se forme el septo basal, un gran número de núcleos se desplazan hasta el esporangio desde las hifas somáticas situadas más abajo. El protoplasto del esporangio se divide a continuación en tantas porciones como núcleos y cada porción se transforma en una espora. Todo el protoplasto se consume en la formación de esporas (Alexopoulus et al. 1996).

El tipo de expulsión de las zoosporas varía según los distintos géneros. En *Leptolegnia* se desarrolla una abertura en el ápice del esporangio, y las zoosporas primarias pasan al agua circundante, nadan durante cierto tiempo, entran en reposo y se enquistan. Después de un período de reposo corto, se desarrolla una papila delgada sobre el quiste, su ápice se disuelve y surge una zoospora reniforme con dos flagelos laterales que es la que localizará y se unirá al hospedador.

Cuando aparecen condiciones favorables para la reproducción sexual, las hifas somáticas dan lugar a los anteridios y oogonios. A continuación tiene lugar la meiosis, dentro de los gametangios, produciendo oosferas haploides en los oogonios y gametas haploides en los anteridios. Los oogonios poseen pared relativamente gruesa, en comparación con la pared de las hifas somáticas, y cada oogonio, una vez maduro, contiene de una a muchas oosferas libres. En cada oosfera madura hay un solo núcleo. Los anteridios son mucho menores que los oogonios. Son cuerpos plurinucleados, alargados, situados en posición terminal sobre ramas delgadas de las hifas somáticas. A menudo están situados sobre la misma hifa que sostiene el oogonio, y surgen inmediatamente debajo de ella, pero en algunos casos se forman en hifas diferentes. Cuando están plenamente formados, los anteridios se unen a los oogonios, uno o más por cada oogonio. Los tubos de fecundación que se originan en el anteridio penetran en la pared del oogonio y llegan hasta las

oosferas (Alexopoulus et al. 1996). Al entrar al oogonio, un tubo de fecundación puede ramificarse y enviar una rama hasta cada oosfera. Aun cuando más de un anteridio entre en contacto con el oogonio, a cada oosfera sólo le corresponde un tubo de fecundación. Los núcleos anteridiales migran ahora desde el anteridio hasta la oosfera, a través de los tubos de fecundación; un núcleo entra en cada oosfera, se aproxima a su núcleo, se fusiona con él y forma un núcleo diploide cigótico. Después de la fecundación, se desarrolla una pared gruesa alrededor de cada oosfera, convirtiéndola en una oospora. Después de un período de reposo prolongado, las oosporas son liberadas por disgregación de la pared del oogonio y germinan, produciendo cada oospora un tubo de germinación. Poco después, suele formarse un esporangio en el ápice de la hifa, completando así el ciclo vital de todos los organismos pertenecientes a la Familia Saprolegniaceae (Alexopoulus et al. 1996).

2.10 Mecanismos de infección de *Leptolegnia chapmanii*

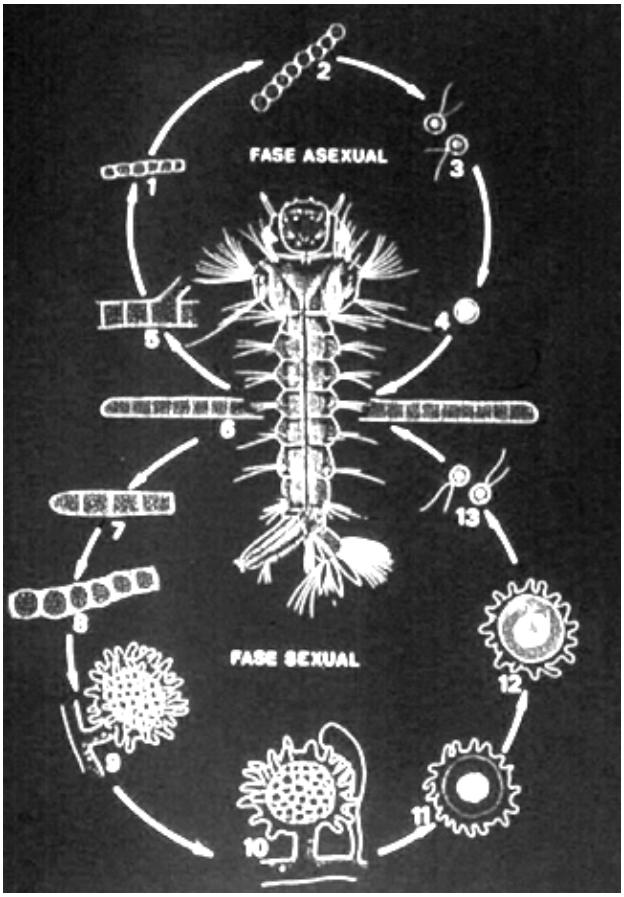
El ciclo de vida de *L. chapmanii* (ver esquema), es el típico que se describió anteriormente para los hongos pertenecientes a la Familia Saprolegniaceae, por lo tanto en este apartado prestaremos mayor atención a los modos de infección por las cuales las zoosporas de *L. chapmanii* pueden infectar a larvas de *A. aegypti.*

En este sentido Zattau & Mc Innis (1987) mencionan dos mecanismos por los cuales las zoosporas de *L. chapmanii* pueden infectar a las larvas de *A. aegypti*. El primero de ellos es la forma de entrada más comúnmente utilizada por las zoosporas y es a través del tegumento de la larva. Las zoosporas secundarias nadan activamente y se enquistan sobre la cutícula larval preferentemente sobre la cabeza, papila anal y a nivel de los pliegues intersegmentales. Posteriormente, de cada zoospora enquistada surge un tubo germinativo que penetra la cutícula de la larva gracias a la acción combinada de mecanismos enzimáticos (quitinasas, proteasas y lipasas) y mecánicos.

La respuesta de la larva en las primeras etapas de la infección consiste en producir melanización alrededor del punto de entrada. Posteriormente esta melanización se extenderá a lo largo de toda la trayectoria que realiza la hifa de *L. chapmanii* dentro del hemocel de la larva, la hifa se ramifica bien dentro de

dicha cavidad y posteriormente penetra el canal alimenticio del culícido. La infección por parte de *L. chapmanii* continúa hasta invadir totalmente los sistemas circulatorios y respiratorios. Simultáneamente con la infección, ocurre una invasión del cuerpo de la larva por bacterias, las que se reproducen en el hemocel y producen la descomposición orgánica del cuerpo una vez muerta la larva. En la larva moribunda o muerta las reservas de nutrientes disminuyen y por lo tanto las hifas de *L. chapmanii* desvían su crecimiento del interior del cuerpo de la larva al exterior de la misma a través de la cutícula. La hifa que emerge hacia el exterior forma zoosporangios terminales que producen y liberan zoosporas primarias que nadan por unos pocos minutos y luego pierden sus flagelos para enquistarse. Luego de unas horas las zoosporas secundarias emergen, nadan activamente y se enquistan sobre la cutícula de la larva y el proceso de infección comienza nuevamente.

El segundo modo de infección descrito por Zattau & Mc Innis (1987), ocurre cuando las zoosporas enquistadas son ingeridas por la larva atravesando estas, boca, esófago e intestino. En la porción del intestino ubicada entre el cuarto y quinto segmento abdominal el quiste germina produciendo un tubo germinativo que se elonga rápidamente dando lugar a la hifa que penetra la membrana peritrófica, ingresando al hemocel y se ramifica formando grandes masas hifales que invaden todo el cuerpo de la larva produciendo su muerte. Este modo de infección fue poco documentado por Zattau & Mc Innis (1987), lo que llevo a muchos investigadores a cuestionar esta vía de infección por parte de las zoosporas de *L. chapmanii.* Las larvas mueren unas pocas horas después de haber sido infectadas por las zoosporas de *L. chapmanii* independientemente del modo de entrada de las mismas al cuerpo de la larva.



Esquema del ciclo de vida de *Leptolegnia chapmanii*: 1. Hifa somática. 2. Esporangio con zoosporas. 3. Zoosporas móviles. 4. Zoosporas enquistadas. 5. Hifas somáticas. 6. Hifas somáticas. 7. Hifas vegetativas desarrollándose. 8. Formación de gametangios. 9. Gametangio femenino (oogonio). 10. Fecundación. 11. Cigota. 12. Oospora (forma de resistencia). 13. Zoosporas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Leptolegnia chapmanii puede ser un eficiente regulador de poblaciones de *Aedes aegypti.*

Objetivo general

- Determinar el potencial de *Leptolegnia chapmanii* como agente de control biológico de *Aedes aegypti*.

Objetivos específicos

- Determinar las condiciones óptimas para el cultivo *in vitro* de *L. chapmanii*.
- Determinar la patogenicidad de *L. chapmanii* para los estados inmaduros (larvas y pupas) de *A. aegypti.*
- Determinar el tiempo necesario para la producción de zoosporas y oosporas en larvas y la cantidad de esporas producidas a diferentes tiempos de infección.
- Determinar la tolerancia de las oosporas (cigotas de resistencia) de *L. chapmanii* a la desecación prolongada, luz solar y temperaturas extremas y la tolerancia de las zoosporas (esporas asexuales móviles) a los niveles de materia orgánica, oxígeno disuelto, pH y temperatura variable.
- Determinar el efecto de algunos factores, tales como tiempo de exposición, superficie, volumen, densidad de larvas, densidad del inóculo y temperatura, sobre la infectividad de *L. chapmanii* en *A. aegypti.*
- Evaluar a campo en pequeña escala la patogenicidad, dispersión y reciclado de *L. chapmanii* en poblaciones de *A. aegypti.*

- Determinar el impacto de la introducción de *L. chapmanii* en la densidad de los estados inmaduros de una población natural de *A. aegypti.*

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Instalación y mantenimiento de la colonia de *Aedes aegypti.*

Las larvas de *Aedes aegypti* utilizadas en el estudio, fueron obtenidas de la colonia instalada en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores - CEPAVE (UNLP - CONICET). Los estadios larvales para la instalación de la colonia se recolectaron a partir de recipientes artificiales en la ciudad de La Plata. El agua de los recipientes se filtró a través de una red de malla fina, los estados inmaduros se colocaron en baldes plásticos con agua del ambiente y se transportaron al laboratorio. Una vez en el laboratorio las larvas se colocaron en bandejas plásticas de 38 x 28 cm y se les suministró alimento para conejos finamente molido hasta el estado de pupa. Las pupas se colocaron en jaulas de 50 x 50 x 50 cm para la emersión de los adultos. En el interior de la jaula con los adultos se colocaron pasas de uvas como fuente de hidratos de carbono. Para la oviposición, se colocó en las jaulas un recipiente plástico negro con una tira de papel rodeando el perímetro interno del recipiente y agua hasta la mitad del papel. Una vez por semana se colocó en la jaula un pollo inmovilizado, durante una hora como fuente de sangre para el desarrollo de los huevos. Entre las 48 y 72 h se retiró el papel con los huevos y los papeles con huevos se colocaron en bolsas de polietileno a temperatura ambiente. Para la obtención de las larvas los papeles con huevos se sumergieron en bandejas plásticas con agua declorinada. Los adultos se mantuvieron a temperatura de 27°C ± 1, fotoperíodo de 12:12 (L/O) y 85% de humedad relativa.

4.2 Mantenimiento *in vitro* e *in vivo* de *Leptolegnia chapmanii.*

En el estudio se utilizó un aislamiento nativo de *Leptolegnia chapmanii* (ARSEF J 499-CEP 010).

Los cultivos de *L. chapmanii* se mantuvieron en medio agar-harina de maíz y en medio agar harina de maíz con 1 % de dextrosa y 0,5 % de peptona (HMDP agar). Los cultivos fueron incubados en estufa de cultivo a 25 °C durante 7 días.

Para la obtención de un cultivo *in vivo* de *L. chapmanii* se emplearon larvas en segundo estadio de *A. aegypti* y como inóculo se usaron bloques cúbicos de 1 cm de lado de HMDP-agar (agar-harina de maíz + 1% de dextrosa y 0,5% de peptona) con micelio, los cuales se colocaron en Erlenmeyers de 250 ml conteniendo 50 ml de agua destilada estéril (los que se dejaron en reposo a 25°C para inducción de la zoosporulación) durante 48 h. Las larvas infectadas y muertas fueron extraídas cada 24 h y observadas individualmente al microscopio con contraste de fases para comprobar la infección de *L. chapmanii.* Las larvas muertas, transcurridas 48 h desde la infección, fueron utilizadas para mantener cultivos *in vivo* de *L. chapmanii* permanentes. Estas larvas muertas por *L. chapmanii* se colocaron en recipientes plásticos con 1000 ml de agua declorinada, diariamente se agregaron larvas de *A. aegypti* (tercero o cuarto estadio) sanas a los recipientes como método de mantenimiento *in vivo* de *L. chapmanii*.

El cultivo *in vivo* de *L. chapmanii* fue mantenido en recipientes plásticos de 145,2 cm^2 y 1000 ml, a temperatura constante de 25 °C y un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, en una incubadora (Semedic modelo I 290 L).

4.3 Producción de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* a distintos intervalos de tiempo y temperatura en larvas de *Aedes aegypti*.

El objetivo de este ensayo fue determinar la producción de zoosporas de *L. chapmanii* en larvas de primero y cuarto estadio de *A. aegypti* infectadas en relación con el tiempo y la temperatura.

Se colocaron por separado 500 larvas sanas de *A. aegypti* de primero y cuarto estadio en recipientes plásticos de 346 cm^2 de superficie con 1000 ml de agua declorinada. Se colocaron en cada recipiente 25 larvas de cuarto estadio de *A. aegypti* muertas por acción de *L. chapmanii* y se incubaron a 10, 25 y 35 ºC y fotoperíodo 12:12 (L-O).

Se tomaron alícuotas de 10 larvas de *A. aegypti* de primero y cuarto estadio expuestas a las zoosporas a las 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 horas post-infección y a partir de las 24 horas se tomaron 25 larvas diarias de ambos estadios hasta la finalización de la experiencia. Las larvas expuestas se

disecaron con pinzas de punta fina (Dumont Nº 5) sobre un vidrio de reloj con agua destilada.

La larva se coloco en un tubo Eppendorf con 0,5 ml de agua destilada y con un palillo de plástico se maceró, luego se fijó mediante el agregado de 0,5 ml de glutaraldehido 2,5 % y se agitó en vortex durante dos minutos.

Se cuantificó el número de zoosporas enquistadas y móviles presentes en la suspensión utilizando una cámara de Neubauer, bajo microscopio de contraste de fases a 40x en un microscopio Olympus BX41.

4.4 Producción *in vitro* de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii.*

El objetivo de este ensayo fue determinar la cantidad de zoosporas producidas por *L. chapmanii* en medio de cultivo Emerson YPSS (extracto de levadura 4 g, HK_2PO_4 1g, $MgSO_4$ 0,5 g, almidón soluble 15 g, agar 20 g, agua destilada 1000 ml) a distintas temperaturas.

Se utilizaron reaislamientos del hongo (primer repique) a partir de larvas infectadas en el medio de cultivo sólido Emerson YPSS. Luego de ser incubados durante 7 días a 25 ºC en oscuridad, se seccionó el medio de cultivo sólido con micelio en cubos de 1 cm^3, los cuales fueron transferidos a erlenmeyers de 250 ml (estériles) con 100 ml de agua destilada estéril y se mantuvieron a 10, 25 y 35 ºC durante 72 horas, para inducir la liberación de zoosporas al agua. Luego se tomaron alícuotas del agua y se verificó la presencia de zoosporas (libres y/o enquistadas). El agua con el micelio se mezcló en un agitador magnético durante 10 minutos, se filtró con tela de malla fina (voile doble) y se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el “pellet” en agua destilada estéril. Se agitó en vortex durante 10 minutos y se agregó 0,5 ml de glutaraldehido 2,5 % para fijar las zoosporas. El número de zoosporas/ml producidas *in vitro* en las temperaturas evaluadas se cuantificó en un hemocitómetro (cámara de Neubauer). Se realizaron 3 réplicas y 3 repeticiones en distinto momento para cada temperatura.

4.5 Tiempo que permanecen infectivas las zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* producidas *in vivo* e *in vitro* a diferentes temperaturas.

En este ensayo se determinó el tiempo que permanecen infectivas las zoosporas de *L. chapmanii*. Se utilizaron diez placas para cultivo de células con 24 celdas esterilizadas. En cada celda se colocaron 2 ml de agua destilada estéril y una larva de *A. aegypti* de cuarto estadio infectada y muerta por *L. chapmanii* 48 h post-infección. Paralelamente, se realizó un ensayo similar, pero en el cuál se utilizó como inóculo una suspensión de 94.000 zoosporas producidas *in vitro*. Estas placas de cultivo fueron colocadas en incubadora (Semedic modelo 290 L) a 10, 25 y 35ºC y fotoperíodo de 12:12 (L:O). A intervalos de 24 h se colocó en cada celda una larva en cuarto estadio de *A. aegypti* sana y se determinó la mortalidad diaria en cada celda. Se hicieron tres réplicas y un control tratado de forma similar pero sin la incorporación del inóculo. Se realizaron tres repeticiones de la experiencia en diferentes fechas.

4.6 Enquistamiento y exquistamiento de las zoosporas de *Leptolegnia chapmanii.*

El objetivo de este ensayo fue determinar la dinámica de las zoosporas a partir de su liberación de larvas infectadas. El período de tiempo que la zoospora nada activamente hasta enquistarse y posteriormente el tiempo requerido para exquistarse.

Para determinar el tiempo de enquistamiento de una zoospora se colocó un ml de una suspensión fresca de zoosporas (aproximadamente 1.000) sobre un portaobjeto excavado y se observó en forma continua en un microscopio con contraste de fases, a 40 x, registrándose el tiempo de enquistamiento sobre 50 zoosporas.

El tiempo de exquistamiento de las zoosporas de *L. chapmanii* se cuantificó en una suspensión de 94.000 zoosporas obtenida a partir de una larva infectada de *A. aegypti* 48 horas post-infección. Las zoosporas se colocaron en una cápsula de Petri de 90 mm de diámetro junto con 10 ml de agua destilada estéril y se incubó a 25 ºC hasta que todas las zoosporas se enquistaron. Luego se colocaron en las cápsulas grupos de 6 larvas de cuarto

estadio de *A. aegypti*. Cada grupo de larvas permaneció en contacto con las zoosporas enquistadas por 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos.

Tres alícuotas de la suspensión de quistes se tomaron para cada tiempo determinado y se colocaron en un portaobjeto excavado, observándolas a 40 x en un microscopio con contraste de fases hasta detectar las zoosporas nadando activamente, lo que las llevó a considerar zoosporas exquistadas.

4.7 Tiempo mínimo de contacto entre larvas y zoosporas para el desarrollo de la infección.

Se determinó el tiempo mínimo que necesitaron las zoosporas de *L. chapmanii* para localizar y ponerse en contacto con las larvas de cuarto estadio de *A. aegypti* y así iniciar la infección.

En recipientes de plástico de 46 cm^2 y 200 ml, se colocaron 150 ml de agua declorinada, 50 larvas sanas en cuarto estadio de *A. aegypti* y una suspensión de 2 x 10^5 zoosporas de las cuales 1,4 x 10^5 estaban enquistadas y 0,6 x 10^5 móviles.

Al minuto de contacto entre las zoosporas y las larvas de *A. aegypti*, se extrajeron 3 larvas del recipiente las que fueron sometidas a tres baños sucesivos en recipientes con 150 ml de agua destilada para eliminar las zoosporas de *L. chapmanii* que no estuviesen adheridas a la cutícula de la larva. Estas larvas fueron colocadas individualmente en recipientes de plástico con 150 ml de agua destilada y se las colocó en una incubadora a 25 °C y fotoperíodo de 12:12 h (L-O). Se realizó igual procedimiento a los 2; 3; 4 y 5 minutos. Para cada tratamiento se realizaron tres réplicas y tres repeticiones en diferentes fechas, utilizando en cada experiencia controles con larvas y sin *L. chapmanii*.

Las larvas que estuvieron en contacto con las zoosporas de *L. chapmanii* fueron examinadas a las 24 y 48 h bajo microscopio óptico con contraste de fases a 20 X para determinar la existencia de infecciones con *L. chapmanii*.

4.8 Infección de larvas de *Aedes aegypti* por ingestión de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii.*

El objetivo de este ensayo fue confirmar y documentar en cortes histológicos la infección por *L. chapmanii* mediante la ingestión de zoosporas, vía de infección cuestionada por los investigadores por no existir en la bibliografía evidencias suficientes.

Se colocaron 100 larvas en el estadio tercero de *A. aegypti* en agua destilada estéril sin alimento por un lapso de 72 horas para vaciar el contenido del tubo digestivo y así favorecer la observación de los quistes ingeridos por las larvas. Las larvas fueron colocados en recipientes plásticos de 346 cm^2 y 2.000 ml de capacidad con 500 ml de agua destilada estéril y una suspensión de zoosporas de 2×10^5 ($1,4 \times 10^5$ enquistadas y $0,6 \times 10^5$ móviles).

Las larvas permanecieron en contacto con las zoosporas de *L. chapmanii* durante 2 minutos, luego fueron fijadas en Bouin acuoso a razón de 3 larvas cada hora durante 24 horas. Las larvas fueron embebidas en parafina, y mediante la utilización de un micrótomo manual se obtuvieron secciones de 6 µm de espesor que fueron coloreadas con la tinción de Grocott (metanamina de plata, contrastado con verde luz) (Ferron et al. 1966; Dikgolz et al. 2005) para detectar la presencia y/o germinación de quistes de *L. chapmanii* en el tubo digestivo así como la invasión del epitelio intestinal y del hemocel por *L. chapmanii*. Larvas sanas no expuestas a *L. chapmanii* fueron procesadas en forma similar actuando como control.

A partir de larvas expuestas durante dos minutos a la suspensión de zoosporas, se tomaron 20 larvas de las cuales 10 fueron esterilizadas superficialmente en una solución acuosa de 0,5 % de hipoclorito de sodio (NaClO) con 0,01 % de tween 80 por un lapso de 1 minuto, mientras que las otras 10 larvas no fueron esterilizadas. Tanto las larvas cuya superficie fue esterilizada como las que no, se colocaron en recipientes plásticos de 46 cm^2 con 150 ml de agua destilada y fueron incubadas a 25 ºC y fotoperíodo 12-12 (L-O). La mortalidad de las larvas fue registrada a las 48 horas de iniciado el ensayo. Se realizaron 3 réplicas con 3 repeticiones en diferentes fechas, en cada experimento se utilizaron controles (tratados de forma similar sin la incorporación del inóculo).

4.9 Factores bióticos y abióticos que afectan la infectividad de *Leptolegnia chapmanii* sobre larvas de *Aedes aegypti*.

El término equivalente larval (E. L.) lo hemos creado en este trabajo para denominar al número promedio de zoosporas que produce una larva de *A. aegypti* en cuarto estadio a las 48 h de infectada con *L. chapmanii*. Un E.L. fue calculado y establecido en 9,4 x 10^4 zoosporas/ml. El número medio de larvas en cuarto estadio de *A. aegypti* que puede matar 1 equivalente larval (E.L.) se determinó mediante ensayos en recipientes plásticos de 45 cm^2 con 150 ml de agua declorinada y 1 E.L. Se colocaron en los recipientes entre 5 y 60 larvas sanas en cuarto estadio de *A. aegypti.*

Por otro lado se determinó la concentración de zoosporas de *L. chapmanii* necesaria para producir 100 % de mortalidad, dejando constante el número de larvas de *A. aegypti.*

Las infecciones se realizaron en recipientes de plásticos de 45 cm^2. En cada recipiente se colocaron 150 ml de agua declorinada y 25 larvas sanas de cuarto estadio de *A. aegypti.* El inóculo utilizado consistió en larvas de cuarto estadio de *A. aegypti* infectadas con *L. chapmanii* (1 larva de cuarto estadio de *A. aegypti* infectada con *L. chapmanii* 48 h. post-infección = 9,4 x 10^4 zoosporas = 1 Equivalente larval = 1 E.L.). La concentración de zoosporas utilizada varió de 1 a 7 E. L con 25 larvas sanas.

Con el fin de determinar si el volumen de los recipientes en los que se realizó la infección es una variable que afecta la prevalencia e infectividad de *L. chapmanii*, se realizaron ensayos en recipientes plástico de 397,4 cm^2 en los que varió el volumen de agua colocado. Los volúmenes que se utilizaron fueron 300 ml, 1.000 ml, 2.500 ml y 5.000 ml. En cada recipiente se colocaron 50 larvas de cuarto estadio de *A. aegypti* y 2 E.L.

Se evaluó además el efecto de la variación de la superficie de exposición de las zoosporas y las larvas sobre la infectividad de *L. chapmanii*. También se intentó determinar la relación óptima, área-inóculo, en la cual se obtendría el mayor porcentaje de mortalidad de las larvas de *A. aegypti.*

Se utilizaron recipientes plásticos de forma similar pero con superficies diferentes (10,17 ; 46,54 ; 145 ; 234,94 ; 346,8 ; 495 y 875 cm^2) con 250 ml de

agua declorinada por recipiente. En cada recipiente, se colocó 1 E.L y 50 larvas sanas de *A. aegypti* en cuarto estadio. Los recipientes de cada uno de los ensayos mencionados anteriormente se colocaron en incubadoras a una temperatura de 25 °C y un fotoperíodo de 12:12 (L-O). En cada uno de los experimentos se realizaron tres réplicas con tres repeticiones en distintas fechas, para cada tratamiento, con sus respectivos controles tratados de forma similar pero sin la incorporación del inóculo. La mortalidad larval fue registrada a las 48 h de iniciada la experiencia y bajo microscopio óptico con contraste de fases a 20X, se verificó la infección con *L. chapmanii.*

4.10 Efecto de la temperatura, pH y salinidad sobre la patogenicidad de *Leptolegnia chapmanii* en larvas de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens.*

Para determinar la amplitud térmica en la cual las zoosporas de *L. chapmanii* se mantienen móviles e infectivas, se diseño el siguiente ensayo.

Se utilizaron recipientes de plástico de 46 cm^2 y 200ml. En cada uno se colocaron 150 ml de agua declorinada, tres E.L. y 25 larvas sanas en el primer estadio de *A. aegypti* y *C. pipiens*. Los controles fueron tratados de igual manera sin la incorporación del inóculo de *L. chapmanii*.

Experiencias similares se realizaron con los estadios segundo, tercero y cuarto, y con pupas de ambas especies de culícidos. Los recipientes se colocaron en incubadoras a temperaturas entre 5 y 40 °C a intervalos de 5°C y con fotoperíodo de 12:12 (L-O).

Continuando con la evaluación de factores que pudiesen afectar las infecciones de *L. chapmanii* en larvas de culícidos, se investigó el efecto que pudiese ocasionar la variación de pH del agua sobre la patogenicidad e infectividad de las zoosporas de *L. chapmanii.*

Se utilizaron recipientes plásticos de 46 cm^2 y 200 ml de capacidad; con 150 ml de agua destilada y 25 larvas sanas de cuarto estadio de *A. aegypti* y de *C. pipiens* con 3 E.L.

La infectividad de *L. chapmanii* fue evaluada a pH entre 4 y 10. Los valores de pH se lograron utilizando dos soluciones: 1) tris-ácido cítrico (ácido cítrico monohidratado) 0,5 molar pH= 3; 2) tris-citrato de sodio (citrato de sodio 2-hidrato) 0,5 molar pH= 9,5. El buffer utilizado fue hidroximetil amino metano

(tris buffer), el cual permitió mantener estables los valores de pH durante la experiencia.

Las soluciones 1 y 2 fueron preparadas de la siguiente manera: Se colocaron 24,2 g de tris-buffer en 200 ml de agua destilada; 29,4 g de citrato de sodio en 100 ml de agua destilada y 21 g de ácido cítrico en 100 ml de agua destilada. Posteriormente fueron mezclados 100 ml de buffer tris y 100 ml de citrato de sodio para obtener la solución tris-citrato de sodio (0,5 M); luego se mezclaron 100 ml de buffer tris con 100 ml de ácido cítrico para obtener la solución tris-ácido cítrico (0,5 M).

Se colocó agua destilada (pH 7) en los recipientes y se ajustó el pH con las soluciones 1 y 2 a los valores evaluados pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Todos los recipientes fueron colocados en incubadora a 25°C y con 12:12 (L-O). Los distintos pH del medio fueron registrados a las 24 y 48 h de iniciado el ensayo.

Para determinar la tolerancia de *L. chapmanii* a diferentes concentraciones de ClNa, se utilizaron recipientes plásticos de 46 cm^2 y 200 ml. En cada recipiente se incorporaron 150 ml de diferentes concentraciones de ClNa entre 0 y 7 g/l, 25 larvas sanas en cuarto estadio de *A. aegypti* y *C. pipiens* y 2,8 x 10^5 $\pm$ 3.800 zoosporas/ml.

A las 48 h de iniciada la experiencia, las larvas infectadas y muertas por *L. chapmanii* a las concentraciones salinas evaluadas previamente, se colocaron en concentraciones más elevadas, de 15, 20 y 30 g/l de ClNa. Cada 24 h se tomaron tres larvas y se las colocó en recipientes plásticos de igual superficie y volumen que los mencionados previamente con 150 ml de agua declorinada y 25 larvas sanas de cuarto estadio de *A. aegypti*. Se realizaron tres réplicas y un control para cada una de las concentraciones salinas evaluadas y tres repeticiones del ensayo en distintas fechas. La mortalidad larval fue registrada a las 48 h de iniciada la experiencia y la determinación continuó por seis días.

Se determino además el desarrollo vegetativo de *L. chapmanii* en medios de cultivos artificiales adicionados con ClNa, se determinó en cápsulas de Petri de 60 mm de diámetro previamente esterilizadas, con medio Emerson YPSS-agar y concentraciones de ClNa de 0 a 30 ppm. Un pequeño cubo de agar (0,5 cm^2) con micelio de *L. chapmanii* fue depositado en el centro de cada uno de las cápsulas de Petri con las distintas concentraciones salinas a evaluar. Las

cápsulas de Petri fueron incubadas a 25 ºC en la oscuridad y el crecimiento de *L. chapmanii* fue registrado a las 24, 48, 72 y 96 horas. Se realizaron 3 réplicas con 3 repeticiones en diferentes fechas para cada valor de temperatura, pH y salinidad (tanto *in vivo* como *in vitro*). La mortalidad larval fue registrada a las 48 h de iniciado el ensayo. Las larvas muertas fueron examinadas en un microscopio con contraste de fases a 20 X para verificar la infección de larvas por *L. chapmanii.*

4.11 Tiempo requerido por *Leptolegnia chapmanii* para producir la muerte de las larvas de *Aedes aegypti*.

En este ensayo se determinó el tiempo que tardan en morir las larvas de *A. aegypti* que estuvieron en contacto con zoosporas de *L. chapmanii*. Se utilizaron placas estériles de cultivo de células con 24 celdas de 1,53 cm^2 y 2 ml. Dentro de cada uno de estas celdas se colocaron 2 ml de agua destilada estéril, una larva de cuarto estadio de *A. aegypti* y un E.L.

El ensayo se llevó a cabo durante 15 h y se registró la mortalidad larval para cada hora desde el inicio del ensayo. Se realizaron tres réplicas y un control tratado de forma similar pero sin la incorporación en la celda del E. L. La experiencia fue repetida tres veces en diferentes fechas.

Estas cajas fueron mantenidas en cámaras incubadoras a 25 °C y con fotoperíodo 12:12 h (L-O). Las larvas muertas se retiraron de las celdas y se colocaron individualmente en recipientes plásticos de 10 cm^2 y 30 ml, con 15 ml de agua destilada para confirmar la infección con *L. chapmanii* mediante el examen microscópico a las 48 h.

4.12 Producción de oogonios y oosporas de *Leptolegnia chapmanii* a diferentes temperaturas

El objetivo de este ensayo fue determinar la relación entre la temperatura y el tiempo que necesita *L. chapmanii* para producir oogonios y oosporas en larvas infectadas.

Se utilizaron placas plásticas estériles para cultivo celular con 24 celdas. En cada celda se colocaron 2 ml de agua destilada estéril y una larva de cuarto

estadio de *A. aegypti* 48 h post-infección Las placas se colocaron en incubadoras a temperaturas que oscilaron entre 5 °C y 45 °C (a intervalos de 5 °C) y fotoperíodo de 12:12 h (L-O).

Las larvas infectadas y muertas fueron examinadas cada 24 h en un microscopio con contraste de fases a 20X para observar la formación de oogonios y oosporas Se registró el tiempo (días) transcurrido para la formación de los oogonios y las oosporas en cada temperatura, además se registró la cantidad y tamaño de oogonios y oosporas en cada larva producidas a 5 ºC y 25 ºC.

4.13 Mortalidad causada por *Leptolegnia chapmanii* sobre larvas de *Aedes aegypti* procedentes del campo y de la colonia de laboratorio.

Se intentó determinar la existencia de susceptibilidad diferencial a la infección con *L. chapmanii* en larvas de *A. aegypti* recolectadas en ambientes naturales y las provenientes de la colonia mantenida en el CEPAVE.

Se utilizaron recipientes plásticos de 46 cm^2 y 200 ml, en los que se colocaron 150 ml de agua declorinada, 3 E. L. y 25 larvas en tercero y cuarto estadio de *A. aegypti* recolectadas en floreros del Cementerio Municipal de La Plata o larvas de *A. aegypti* en estadios tercero y cuarto obtenidas de la colonia del CEPAVE. Estos recipientes fueron colocados en incubadoras a 25 °C y fotoperíodo de 12:12 h (L-O).

Se efectuaron tres réplicas y un control tratado de forma similar pero sin la incorporación del inóculo para cada tratamiento, y se realizaron tres repeticiones, las cuales fueron llevadas a cabo en distintas fechas.

La mortalidad larval fue registrada a las 48 h de iniciado el ensayo y las larvas se examinaron entre cubre y portaobjetos bajo el microscopio óptico con contraste de fases a 20X, para confirmar la infección con *L. chapmanii.*

4.14 Efectos de concentraciones subletales de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* sobre la fecundidad de los adultos de *Aedes aegypti.*

Se investigó la existencia de efectos subletales en los ejemplares que sobrevivieron a las infecciones con *Leptolegnia chapmanii.*

Se utilizaron cinco recipientes plásticos de 145 cm^2 y 1000 ml con 800 ml de agua declorinada con 200 larvas sanas de *A. aegypti* en los estadios tercero y cuarto y 2,2 x 10^6 zoosporas/ml.

Paralelamente se colocaron otros cinco recipientes plásticos similares a los anteriores, en los cuales se colocaron 200 larvas de *A. aegypti* en los estadios tercero y cuarto y 800 ml de agua declorinada. Los recipientes tratados y los controles se colocaron en incubadoras a 25 °C y fotoperíodo de 12-12 h (L-O).

A las 24 h se examinaron los recipientes y las pupas presentes se colocaron individualmente en tubos plásticos de 7 cm^2 y 6,5 cm de altura con tapa cubierta con alambre mosquitero, debidamente rotulados. En cada tubo se colocaron 4 ml de agua declorinada y una pupa y en la tapa se colocó una pasa de uva como fuente de hidratos de carbono para los adultos. Las pupas tratadas y los controles se mantuvieron a 27 ± 1 °C; 80 % de H.R. y 12:12 h (L-O). Los adultos emergidos se colocaron en jaulas cubiertas con alambre mosquitero (50 x 50 x 50 cm), una jaula para los adultos tratados y otra para los controles. A las 72 h se colocó durante una hora en ambas jaulas, una gallina inmovilizada como fuente de sangre para las hembras. Durante este período las hembras copularon y se alimentaron. Las hembras alimentadas, se colocaron individualmente en tubos plásticos con un papel húmedo colocado en el perímetro interno y agua hasta el 1/3 inferior, para que las hembras colocaran los huevos en el papel húmedo. Las hembras se colocaron a 27 ± 1 °C, 50 % H.R. y 12:12 h (L-O). Luego de la oviposición, producida entre 72 y 96 h posteriores a la ingesta sanguínea, las hembras tratadas y los controles fueron muertas individualmente con dióxido de carbono. A cada ejemplar se le seccionó el ala derecha, la misma se colocó entre porta y cubreobjetos y se midió al microscopio. Determinándose el largo máximo desde la incisura axial al ápice y el ancho máximo del ala derecha de cada ejemplar. El experimento se repitió tres veces en distintas fechas.

4.15 Efecto de la calidad del agua de los criaderos de culícidos sobre la patogenicidad e infectividad de las zoosporas de *Leptolegnia chapmanii.*

El objetivo de este ensayo fue determinar si las características físico-químicas del agua de los ambientes donde se desarrollan algunos de los culícidos de mayor importancia sanitaria en la Argentina, afectan la patogenicidad e infectividad de las zoosporas de *L. chapmanii*.

Se tomaron muestras de 4 litros de agua de distintos de ambientes de cría de culícidos, en recipientes plásticos. Los ambientes fueron: 1) ambiente temporario inundado por lluvias, 2) agua de zanja de desagüe pluvial y domiciliario en los alrededores de La Plata, 3) agua del Río de La Plata que inunda ambientes temporarios en la reserva Provincial de Punta Lara, Ensenada, Provincia de Buenos Aires y 4) agua de recipientes artificiales (floreros) del cementerio municipal de La Plata. Un litro de cada ambiente fue llevado a analizar en un laboratorio privado acreditado (C & D) para la realización de análisis físicos, químicos y biológicos de agua, mientras que los restantes 3 litros fueron filtrados utilizando papel de filtro Watman Nº 5 y utilizados para realizar los ensayos de patogenicidad y tolerancia. Para estos ensayos se utilizaron recipientes plásticos de 46 cm^2 y 200 ml con 150 ml de cada una de los tipos de agua a analizar, 25 larvas sanas de *A. aegypti* de cuarto estadio y 3 E. L en cada uno de los recipientes. Luego fueron incubados a 25 ºC y fotoperíodo de 12-12 (L-O). La mortalidad larval fue registrada a las 48 horas de iniciado el ensayo. Se realizaron 3 réplicas y un control para cada tipo de agua y 3 repeticiones del ensayo fueron llevadas a cabo en distintas fechas.

Análisis estadístico: Se aplicó un análisis de componentes principales (Manly, 1991), método generalmente usada para ordenar y representar datos multivariados. En este ensayo las variables originales fueron las propiedades químicas del agua y las observaciones, las repeticiones de las distintas procedencias del agua. Se trabajó con datos estandarizados para eliminar el sesgo de interpretaciones causadas por diferentes escalas de medición. Para

relacionar las propiedades químicas del agua y su incidencia en la mortalidad, se realizó un análisis de la variancia y un test de Duncan (P <= 0,05).

4.16 Efecto individual y combinado de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, Temephos y *Leptolegnia chapmanii* sobre la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* en condiciones seminaturales y en laboratorio.

El objetivo de este ensayo fue determinar si pudiesen utilizarse en el futuro en forma conjunta, *L. chapmanii* con los dos larvicidas más ampliamente utilizados en el mundo para el control de *A. aegypti*, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti Liquid, BIAGRO, Laboratorios BIAGRO, Las Heras, Provincia de Buenos Aires) y Temephos 50 % (0,0,0',0',-tetrametil 0'.0' tiodi-p-fenilene) (ABATE, BASF), o si contrariamente los productos comerciales anulan y/o impiden la actividad de *L. chapmanii*.

Para el ensayo llevado a cabo en el laboratorio se utilizaron recipientes plásticos de 46 cm^2 y 200 ml con 150 ml de agua destilada, 25 larvas sanas de estadio tercero avanzado de *A. aegypti* y dos dosis de Bti, 0,012 ppm y 0,027 ppm y dos dosis de Temephos, 0,00035 ppm y 0,001 ppm.

Los productos y las zoosporas de *L. chapmanii* fueron evaluados individualmente y luego combinados. Se colocaron en cinco recipientes cada una de las dosis de Bti, Temephos y 1 E. L. En otros cinco recipientes se colocaron combinados las zoosporas con las dosis de cada larvicida. Las combinaciones utilizadas fueron las siguientes:

A) 1 E. L.
B) 0,00035 ppm Temephos
C) 0,001 ppm Temephos
D) 0,012 ppm Bti
E) 0,027 ppm Bti
F)0,00035 ppm Temephos + 1 E. L.
G)0,001 ppm Temephos + 1 E. L.
H)0,012 ppm Bti + 1 E. L.
I)0,027 ppm Bti + 1 E. L.

J)0,012 ppm Bti + 0,00035 ppm Temephos
K)0,027 ppm Bti + 0,001 ppm Temephos
L)0,012 ppm Bti + 0,00035 ppm Temephos + 1 E. L.
M)0,027 ppm Bti + 0,001 ppm Temephos + 1 E. L.

Se realizaron 5 réplicas con los controles correspondientes (tratados de igual modo sin la incorporación de las zoosporas ni de los dos larvicidas, a este control negativo se le sumaron otros tres controles positivos, uno con Bti, uno con Temephos y otro con zoosporas de *L. chapmanii*) para cada tratamiento y se llevaron a cabo 3 repeticiones que se realizaron en diferentes fechas.

La mortalidad larval fue registrada a las 48 horas de iniciado el ensayo. Las experiencias se realizaron en incubadoras a 25 °C y fotoperíodo de 12:12 h (L-O).

El ensayo realizado en condiciones seminaturales, fue llevado a cabo en dos sectores diferentes, uno en donde el sol incidió directamente y otro ubicado en la sombra. En estas condiciones se llevó a cabo un ensayo similar al del laboratorio, difiriendo en dos aspectos, en el ensayo de campo se utilizaron recipientes plásticos con 500 ml de agua declorinada y las dosis utilizadas fueron 0,09 ppm de Bti, 0,003 ppm Temephos y 3 E. L. respectivamente. Cada 24 horas se registró la mortalidad de larvas del día anterior y se agregaron 20 larvas de *A. aegypti* en cada uno de los recipientes. Además se mantuvo el nivel de agua en los recipientes, agregándole cuando fuera necesario agua declorinada.

Al cabo de 15 días se vació el contenido de los recipientes y se los dejó secos durante una semana al sol y a la sombra, tal como estaban colocados. Transcurrido este período de tiempo se les agregó el mismo volumen de agua que poseían y se trataron de igual manera, pero sin el agregado en los recipientes de Bti, Temephos o zoosporas de *L. chapmanii*. Este procedimiento se llevó a cabo hasta que no se detectó mortalidad de las larvas en los recipientes colocados al sol y a la sombra.

Análisis estadístico: Para analizar este conjunto de datos se aplicó un ANVA para un modelo de medidas repetidas en el tiempo (Littell et al. 1996; Andersen et al. 1981; Jonson & Wichem, 1982) considerando que en cada tarro

se mide el porcentaje de mortalidad a través de los 15 días y las tres inundaciones, la mortalidad se toma como una unidad de medida para determinar el efecto residual de los distintos productos utilizados en el ensayo.

Lo importante en este tipo de análisis es que tiene en cuenta la estructura de covarianza entre los datos a través del tiempo, es decir tiene en cuenta que dos observaciones en tiempos adyacentes están más correlacionadas que dos observaciones en tiempos alejados, lo que se conoce como "falta de independencia" de las observaciones. Se tomaron por separado los recipientes expuestos al sol y a la sombra. Como los datos fueron expresados en % se aplicó la transformación arco-seno raíz del % para normalizarlos.

4.17 Evaluación de diferentes medios de cultivo en el desarrollo y crecimiento de *Leptolegnia chapmanii.*

La siguiente metodología se utilizó para determinar los medios apropiados para el cultivo, desarrollo y la producción de zoosporas de *L. chapmanii.*

Se utilizaron reaislamientos del hongo (primer repique) a partir de larvas infectadas en los distintos medios de cultivos sólidos a ser estudiados. Emerson YPSS agar: Extracto de levadura 4 g, HK_2PO_4 1g, $MgSO_4$ 0,5 g, almidón soluble 15 g, Agar 20 g, agua destilada 1000 ml.

PYG: Peptona de carne 1,2 g, extracto de levadura 1,2 g, glucosa 3 g, agar 15g, agua destilada 1000 ml.

PYG completo: Peptona de carne 1,25 g, Extracto de levadura 1,25 g, glucosa 3 g, Ca Cl_2 $2H_2O$ 0,15 g, colesterol 0,025 g, lecitina de soja 0,05 g, agar 15 g, agua destilada 1000 ml.

PYG completo + SPE + aceite de Sésamo: Peptona de carne 1,25 g, extracto de levadura 1,25 g, glucosa 3 g, Ca Cl_2 $2H_2O$ 0,15 g, colesterol 0,025 g, lecitina de soja 0,05 g, SPE 50 ml, aceite de sésamo 1 ml, agar 15 g, agua destilada 1000 ml.

Luego de ser incubados siete días a 25 °C en oscuridad, se transfirieron los distintos medios de cultivo cortados en cubos de 1 cm^2 a cápsulas de Petri de 100 mm de diámetro y en erlenmeyers de 250 ml de capacidad (esterilizados), conteniendo volúmenes de 30 ml y 100 ml de agua destilada estéril. Se mantuvo a 25 °C durante 72 h (para inducir la liberación de zoosporas al agua).

Luego de las 72 h se tomó una alícuota de agua y se verificó la presencia de zoosporas (móviles o enquistadas). El agua con micelio se agitó en un agitador magnético durante 10 minutos, se filtró a través de tela de malla fina (voile doble), luego se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos, se extrajo el sobrenadante y se resuspendió el pellet en agua destilada estéril. La suspensión se agitó en un vortex 10 minutos y las zoosporas fueron fijadas en 0,5 ml de glutaraldehido 2,5 %. Las zoosporas se cuantificaron determinándose el número de zoosporas/ml en un hemocitómetro (cámara de Neubauer). Se realizaron 5 repeticiones para cada caja y medio de cultivo.

4.18 Efecto de la luz solar sobre la infectividad de las zoosporas de *Leptolegnia chapmanii.*

La finalidad de este ensayo fue determinar en condiciones naturales si la infectividad de las zoosporas de *L. chapmanii* resultaba afectada por la radiación solar.

Como fuente de inóculo sometido a la luz directa del sol y en la sombra, se colocaron dos recipientes de plástico, uno en el área expuesta al sol y otro en el sector con sombra, en cada recipiente se agregaron 1.500 ml de agua declorinada y 100 E.L. Para demostrar la existencia de efectos de la luz solar sobre la infectividad de las zoosporas de *L. chapmanii*, se utilizaron 6 recipientes de plástico de 346 cm^2 de superficie y 2.000 ml de capacidad, dentro de los cuales se colocaron 50 larvas sanas en cuarto estadio de *A. aegypti*, 1500 ml de agua declorinada y 6 E.L. (provenientes de los dos recipientes fuente de inóculo) en cada uno de ellos. El ensayo fue realizado en condiciones seminaturales en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE). Se seleccionaron dos sectores uno expuesto a la luz del sol (3 recipientes) y otro a la sombra (3 recipientes). Se realizaron tres réplicas y un control para los recipientes colocados al sol y a la sombra. Cada día se tomaron las temperaturas máximas y mínimas del aire en el sector donde se realizó el ensayo.

La mortalidad larval fue registrada a las 48 h de iniciado el ensayo y las larvas muertas fueron examinadas al microscopio compuesto con contraste de fases a 20X, para corroborar la infección con *L. chapmanii*. El ensayo se repitió

semanalmente, hasta que las larvas utilizadas como inóculo expuestas al sol y a la sombra no produjeron mortalidad de las larvas en cuarto estadio de *A. aegypti*. Esta experiencia se repitió tres veces en distintas fechas.

4.19 Utilización de suspensiones de zoosporas versus larvas infectadas como inóculo.

Con la finalidad de determinar la existencia de diferencias en la eficiencia como inóculo de *L. chapmanii* cuando se utilizaba una suspensión de zoosporas o larvas infectadas en cuarto estadio de *A. aegypti* infectadas y muertas por *L. chapmanii* 48 horas post-infección, se diseño la siguiente experiencia en el laboratorio.

Se tomaron 50 E. L. con 2 ml de agua destilada, se colocaron en un homogeneizador de tejidos y se maceró durante 3 minutos. El homogeneizado se filtró a través de una tela de malla fina que permitió el paso de las zoosporas y retuvo los restos de los tejidos larvales macerados. El filtrado se colocó en un tubo plástico de 12 ml y se agregó agua destilada estéril hasta 10 ml volumen final. Se tomó 1 ml y se cuantificaron las zoosporas en cámara de Neubauer. Se realizaron diluciones de la suspensión de zoosporas hasta obtener 94.000, 188.000 y 282.000 zoosporas/ml, equivalente a 1, 2 y 3 E. L. La cuantificación de zoosporas de *L. chapmanii* se realizó en un microscopio con contraste de fases a 20X.

Posteriormente 1 ml de cada una de estas suspensiones de zoosporas (94.000, 188.000 y 282.000 zoosporas) se colocó en recipientes de plástico de 46 cm^2 con 150 ml de agua declorinada y 25 larvas sanas en cuarto estadio de *A. aegypti*.

Paralelamente se colocaron recipientes similares con 150 ml de agua declorinada, 25 larvas sanas en cuarto estadio de *A. aegypti* y 1, 2 y 3 E. L. Los recipientes se colocaron en incubadoras a 25 °C y fotoperíodo de 12:12 h (L-O). Se realizaron tres réplicas y un control, con tres repeticiones (llevadas a cabo en fechas diferentes) para cada tratamiento.

La mortalidad larval fue registrada a las 48 h de iniciado el ensayo y las larvas muertas se analizaron al microscopio con contraste de fases para confirmar la infección de las larvas por *L. chapmanii.*

4.20 Efecto de la introducción de *Leptolegnia chapmanii* en una población natural de *Aedes aegypti.*

Este estudio pretendió determinar la capacidad reguladora de este patógeno sobre los estados inmaduros de *A. aegypti* y la persistencia de *L. chapmanii* en el ambiente mediante la introducción de zoosporas de *L. chapmanii*.

El sitio que se eligió para la liberación de *L. chapmanii* fue el predio del cementerio Municipal de la ciudad de La Plata. El monitoreo de larvas de *A. aegypti* en 50 recipientes (jarrones y floreros) en el cementerio se inició en diciembre de 2005, realizando dos muestreos semanales. La metodología empleada consistió en vaciar el agua contenida en cada uno de los 50 floreros en una bandeja plástica de 495 cm^2 y 1.500 ml y registrar la presencia o ausencia de *A. aegypti* luego se devolvía al recipiente correspondiente.

Cuando los recipientes positivos para *A. aegypti* superaron 50 % de los examinados, se decidió la introducción de *L. chapmanii* en los recipientes. Se seleccionaron dos áreas para la liberación, una de ellas expuestas al sol y otra a la sombra. En cada área fueron elegidos 12 recipientes en los cuales se cuantificaron las larvas. En cuatro de los 11 recipientes ubicados al sol y en la sombra se introdujo una dosis de 3 E.L y en otros 4 se introdujeron 6 E.L. Los cuatro recipientes restantes de cada área, fueron utilizados como controles, los cuales fueron tratados de igual forma pero en ellos no se introdujeron larvas infectadas con *L. chapmanii*.

La mortalidad larval en los recipientes en los cuales fue introducido *L. chapmanii* fue registrada a las 48 h posteriores a la liberación, a los fines de determinar el efecto inmediato de *L. chapmanii* en la población de *A. aegypti*. También se realizó un seguimiento semanal hasta que la población de larvas de *A. aegypti* en los recipientes tratados y controles desapareció naturalmente del campo (por cuestiones estacionales), determinando la presencia o ausencia de larvas. El monitoreo de los 24 recipientes continuó durante el segundo año desde noviembre de 2006 a mayo de 2007.

Análisis estadístico: Los valores del porcentaje de mortalidad en todos los ensayos fueron transformados a arcoseno, la homogeneidad de las varianzas se comprobó mediante un test univariado de homogeneidad de varianzas

(Cochran). Las diferencias en los niveles de mortalidad entre los tratamientos fueron analizadas mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y un test a posteriori de Tukey o Duncan (α= 0,05). Cuando no se alcanzaron los supuestos básicos de la ANOVA se aplicó un test de Friedman´s para dos factores (Statistica, 1998).

RESULTADOS

5.1 Producción de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* a distintos intervalos de tiempo y temperatura en larvas de *Aedes aegypti*.

La producción de zoosporas en las larvas infectadas (Figura 1), se inició a las 14 horas posteriores a la infección, con un promedio (± DS) de 150 ± 92 zoosporas/larva (Figura 2), siendo 37 ± 17 zoosporas móviles y el resto enquistadas. Esta producción se elevó rápidamente a las 48 horas posteriores a la infección a 9,6 ± 1,4 x 10^4 zoosporas/larva (61.000 zoosporas enquistadas y 35.000 móviles), estos valores decrecieron a 4.377,7 ± 1.566,9 zoosporas/larva (1.426,6 zoosporas enquistadas y 2.951,1 móviles), al día 6 post-infección (Figura 2).

En las larvas de cuarto estadio infectadas a 10°C la producción de zoosporas se inició a las 22 horas post-infección con 1,7 ± 0,9 x 10^3 zoosporas/larva, con 1.390 zoosporas enquistadas (Figura 2), a las 48 horas post-infección se registró la producción máxima con 1,69 ± 0,23 x 10^4 zoosporas/larva con 11.466 zoosporas enquistadas y el resto fueron móviles. A las 120 horas post-infección la producción decreció a 2,9 ± 0,9 x 10^3 zoosporas/larva, de las cuales 1.692 zoosporas estaban enquistadas (Figura 2), no se observó la producción de zoosporas a 10°C luego de este período. En las larvas de *A. aegypti* de cuarto estadio infectadas a 35°C la producción de zoosporas comenzó a las 22 horas post-infección con un promedio de 3,6 ± 0,84 x 10^3 zoosporas/larva de las cuales 2.250 zoosporas estaban enquistadas (Figura 2). La producción máxima se observó a las 48 horas post-infección con 1,85 ± 0,16 x 10^4 zoosporas por larva de las cuales 13.500 zoosporas estaban enquistadas, número que decreció a 4,9 ± 0,9 x 10^3 zoosporas por larva de las cuales 2.060 estaban enquistadas (Figura 2) a las 120 horas post-infección.

La producción de zoosporas en larvas de primer estadio de *A. aegypti* a 25°C se inició a las 16 h post-infección con 121 ± 40 zoosporas/larva (87 enquistadas y 34 móviles) (Figura 3), con una producción máxima a las 48 horas post-infección de 5,5 ± 0,3 x 10^4 zoosporas/larva de las cuales 35.174 estaban enquistadas, para decrecer hasta 1,8 ± 0,2 x 10^4 zoosporas/larva (9.200 enquistadas) al cabo de 96 horas post-infección (Figura 3). Cuando la

infección de las larvas de primer estadio se realizó a 10°C la producción de zoosporas comenzó a las 22 horas post-infección con 683 ± 216 zoosporas/larva de las cuales 290 eran móviles (Figura 3). A partir de este momento la producción se incrementó hasta un máximo de 5,02 ± 0,8 x 10^3 zoosporas/larva de las cuales 2.546 zoosporas estaban enquistadas a las 48 horas post-infección; luego la producción decreció a 884 ± 249,16 zoosporas/larva (434,6 zoosporas enquistadas) a las 96 horas post-infección, posterior a este período no se pudo observar la producción de zoosporas en las larvas infectadas (Figura 3). Cuando las larvas de primer estadio fueron infectadas a 35°C la producción de zoosporas comenzó a las 22 h con 1.090 ± 352 zoosporas por larva, con 827 zoosporas enquistadas (Figura 3), la máxima producción se observó a las 48 horas con 5,3 ± 1,1 x 10^3 zoosporas por larva, de las cuales 3.486 estaban enquistadas. El número de zoosporas decreció hasta 1.757 ± 723 zoosporas por larva (797 zoosporas enquistadas), a las 96 horas post-infección, luego de este período no se detectó producción de zoosporas.

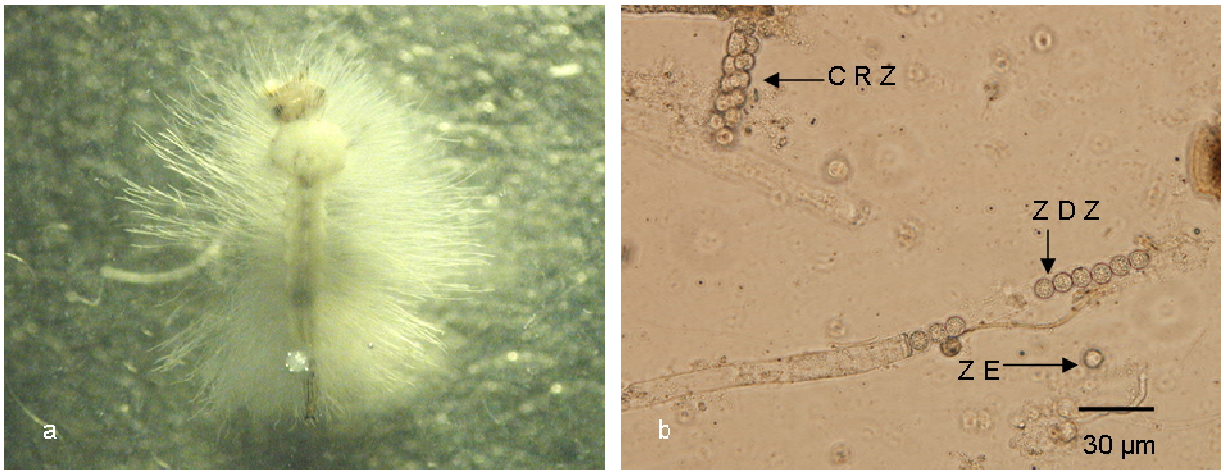


Figura 1: Larva de *Aedes aegypti* de cuarto estadio infectada por *Leptolegnia chapmanii* a las 48 h post-infección (a). Zoosporas en fresco (b). ZE= zoospora enquistada; ZDZ= zoosporas dentro del zoosporangio; CRZ= Zoosporangio con zoosporas.

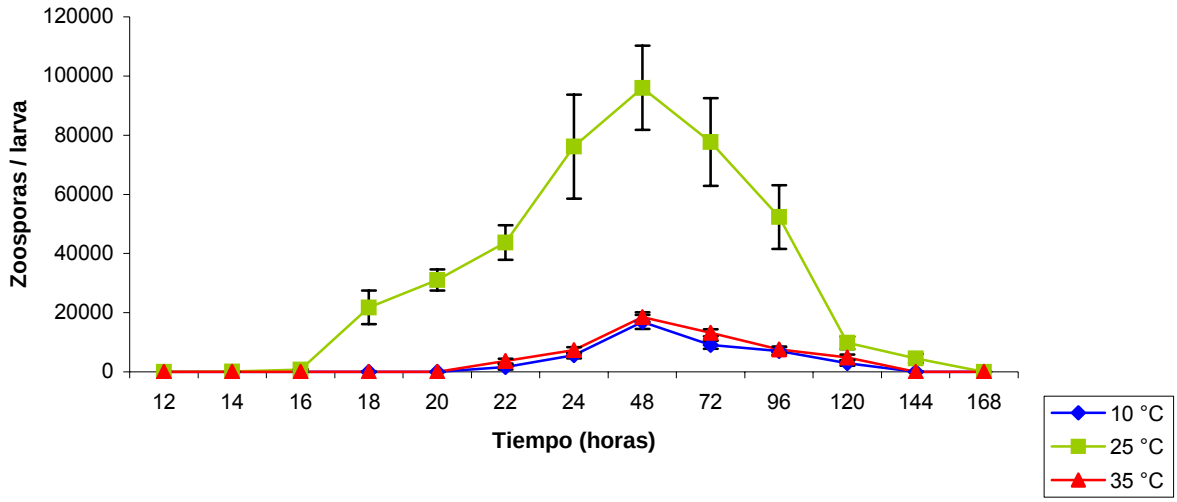


Figura 2: Producción de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* en larvas de cuarto estadio de *Aedes aegypti* a diferentes temperaturas.

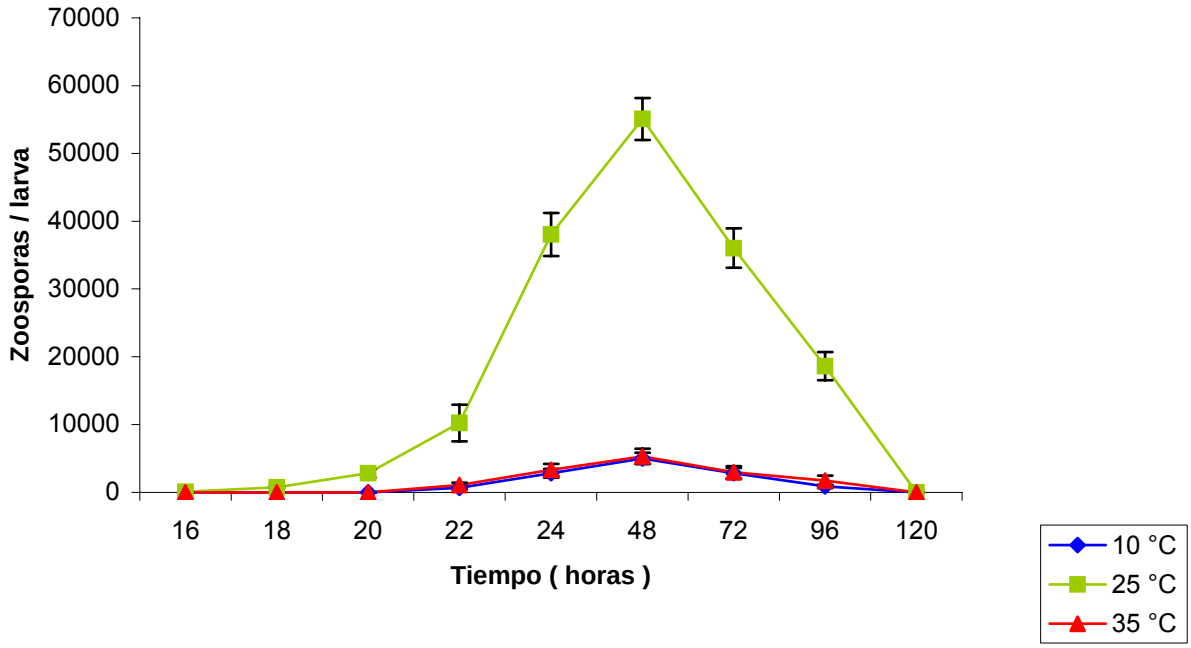


Figura 3: Producción de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* en larvas de primer estadio de *Aedes aegypti* a diferentes temperaturas.

5.2 Producción *in vitro* de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii*.

Cuando se cuantificó la producción de zoosporas *in vitro* a 25°C se determinó que a las 72 horas de colocados los cubos de medio Emerson YPSS – agar de 1 cm^3 con micelio de *L. chapmanii* en agua destilada estéril, la producción de zoosporas fue 7,58 ± 0,36 x 10^4 zoosporas/ml, de las cuales 47.800 zoosporas estaban enquistadas y 28.000 eran móviles. La producción decreció a 1,27 ± 0,15 x 10^4 zoosporas/ ml (9.700 enquistadas y 3.000 móviles) luego de 72 horas en agua a 35 °C y a 0,85 ± 0,13 x 10^4 zoosporas/ml (6.500 enquistadas y 2.000 móviles) cuando el micelio fue incubado a 10°C (Figura 4).

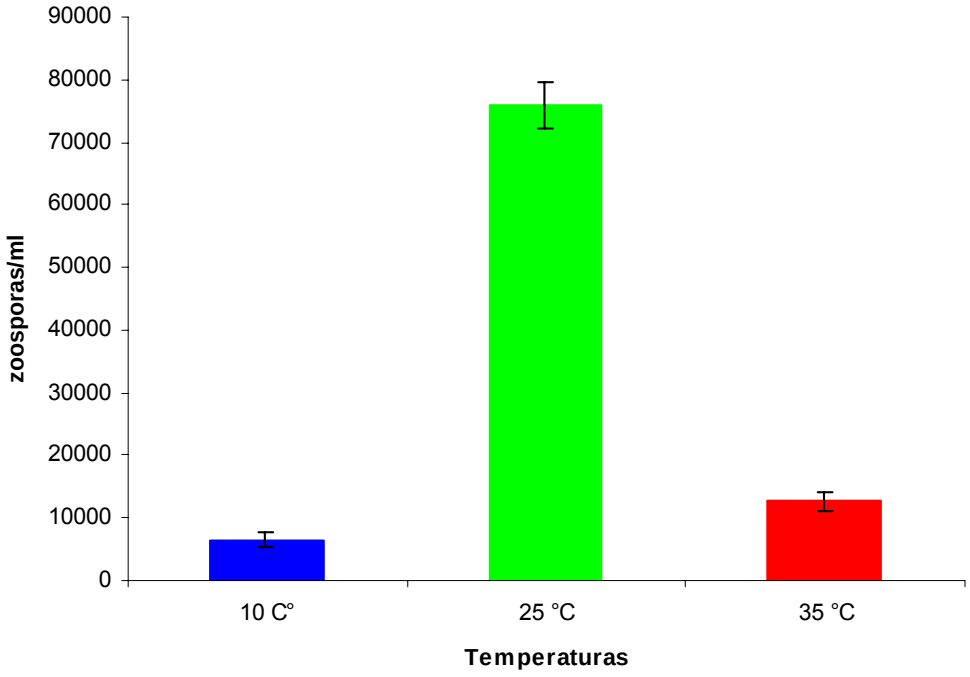


Figura 4: Producción *in vitro* de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* a diferentes temperaturas.

5.3 Tiempo que permanecen infectivas las zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* producidas in vivo e in vitro a diferentes temperaturas.

Las zoosporas producidas in vivo (larvas infectadas) fueron infectivas por 51 días a 25°C produciendo 100 % de mortalidad larval en 24 horas durante los 25 días posteriores a la infección, luego de ese período la mortalidad decreció hasta el día 51, con valores promedios máximos de 10 %, no registrándose mortalidad de las larvas luego de este período. Las zoosporas colocadas a 10°C produjeron 100 % de mortalidad dentro de las primeras 24 horas durante los primeros 5 días, no observándose mortalidad de las larvas posteriormente a este período. Las zoosporas incubadas a 35°C produjeron 100 % de mortalidad de las larvas en 24 horas durante los primeros 12 días, luego de este período no se registró mortalidad (Figura 5).

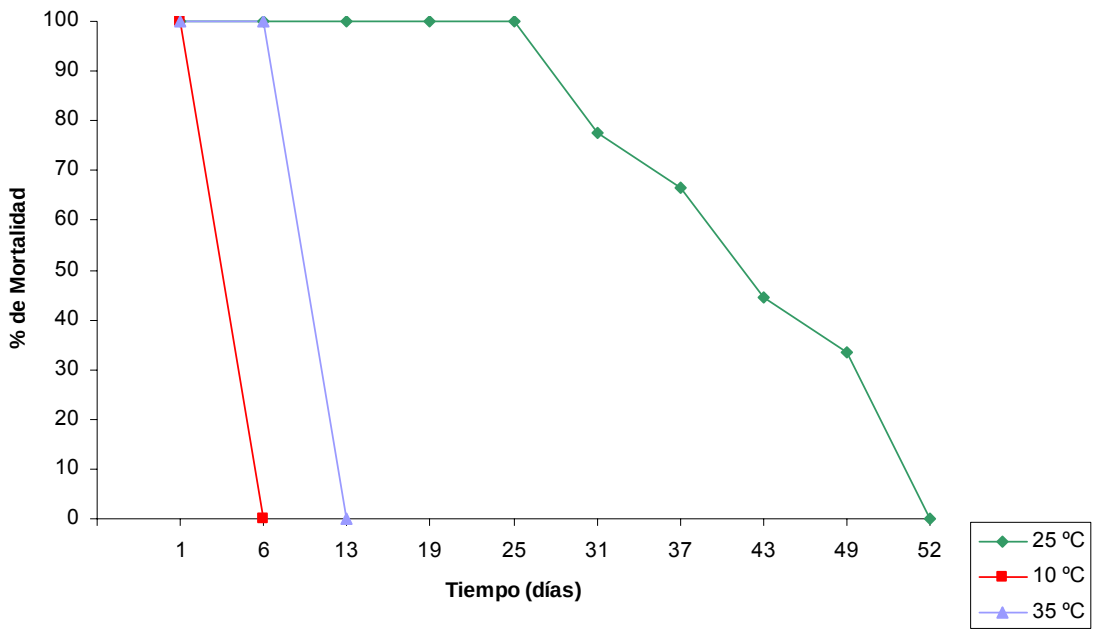


Figura 5: Efecto del tiempo sobre la infectividad de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* producidas *in vivo* en larvas de *Aedes aegypti*.

Cuando se utilizó como inóculo una suspensión de zoosporas obtenida a partir de cultivos en medios artificiales en lugar de larvas infectadas, la mortalidad de las larvas fue 100 % en 24 horas durante las primeras dos semanas a 25°C, dentro de las 48 horas durante la tercera semana, en 72

horas en la cuarta semana y en 96 horas en la quinta semana (Figura 6).Cuando la suspensión de zoosporas utilizada fue incubada a 10 y 35°C no se registró mortalidad de las larvas (Figura 6).

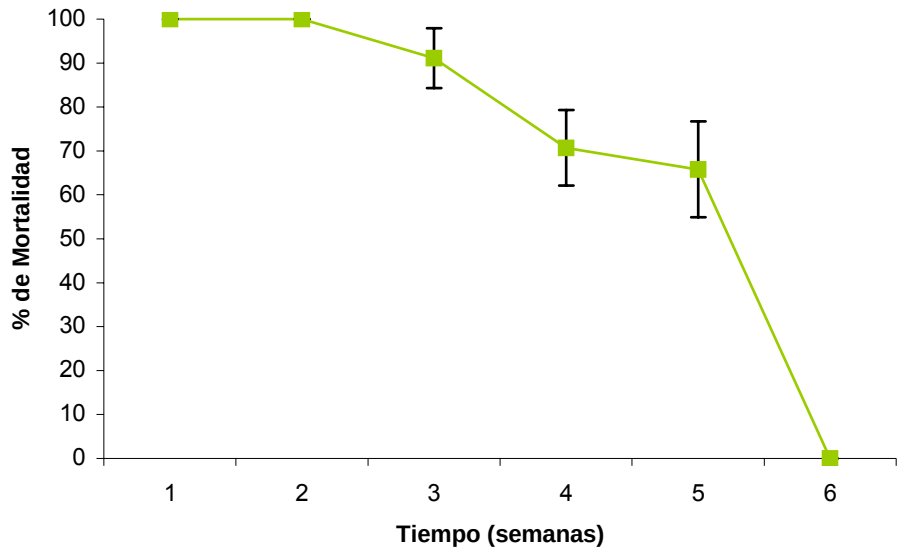


Figura 6: Efecto del tiempo en la infectividad de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* producidas *in vitro* sobre larvas de *Aedes aegypti*.

5.4 Enquistamiento y exquistamiento de las zoosporas de *Leptolegnia Chapmanii.*

Las zoosporas, inicialmente piriformes (zoosporas primarias), se observaron muy activas efectuando movimientos circulares sin dirección definida durante los primeros 10 minutos. Durante los siguientes 7 a 10 minutos continuaron describiendo el movimiento circular de rotación, (sobre su mismo eje) pero con menor intensidad. Finalmente se apoyaron sobre el sustrato y detuvieron el movimiento, modificando su morfología piriforme a esférica, además de internalizar los flagelos.

Cuando las zoosporas enquistadas de *L. chapmanii* se pusieron en contacto con las larvas de *A. aegypti*, las zoosporas comenzaron a realizar movimientos lentos de vaivén, sin translación. Posteriormente se observaron

evaginaciones en toda la pared del quiste, a los cinco minutos aproximadamente, las zoosporas se “exquistaron”, adoptando forma reniforme biflagelada (zoospora secundaria), con los flagelos ubicados en los extremos opuestos de la célula. Las zoosporas “exquistadas” finalmente comenzaron a nadar activamente, se adhirieron a la cutícula de una larva de *A. aegypti* y se enquistaron nuevamente.

5.5 Tiempo mínimo de contacto entre larvas de *Aedes aegypti* y zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* para el desarrollo de la infección.

Las larvas colocadas durante un minuto en una suspensión de 2 x 10^5 zoosporas (1,4 x 10^5 enquistadas y 0,6 x 10^5 móviles) no resultaron infectadas, contrariamente se registró 100 % de infección cuando las larvas de *A. aegypti* permanecieron por dos o más minutos en contacto con la suspensión de zoosporas.

Las larvas que permanecieron dos minutos en contacto con las zoosporas, presentaron zoosporas enquistadas adheridas a la cutícula de la larva, así como también reacciones de melanización típicas (Figura 7), en las áreas cuticulares en las que se produjo la entrada del tubo germinativo de las zoosporas de *L. chapmanii* (Figura 8).

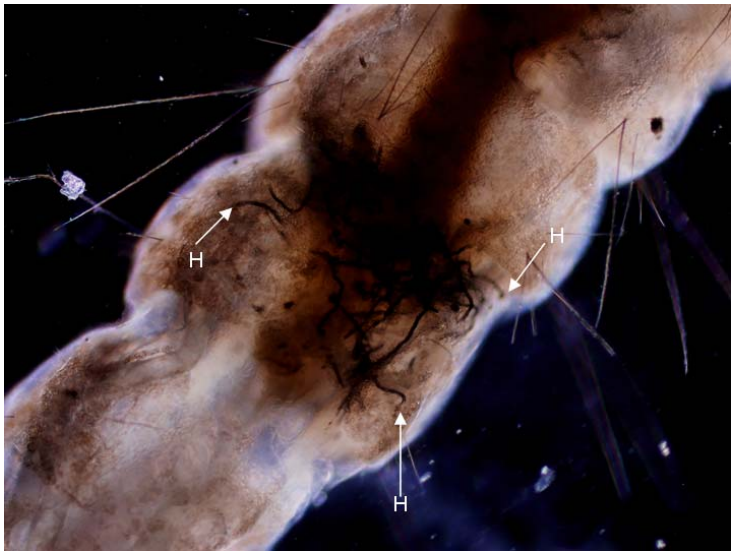


Figura 7: Larva de *Aedes aegypti* infectada con *Leptolegnia chapmanii*. Hifas de *L. chapmanii* penetrando a través de la cutícula de la larva con reacciones de melanización típicas. H= Hifas de *L. chapmanii* melanizadas.

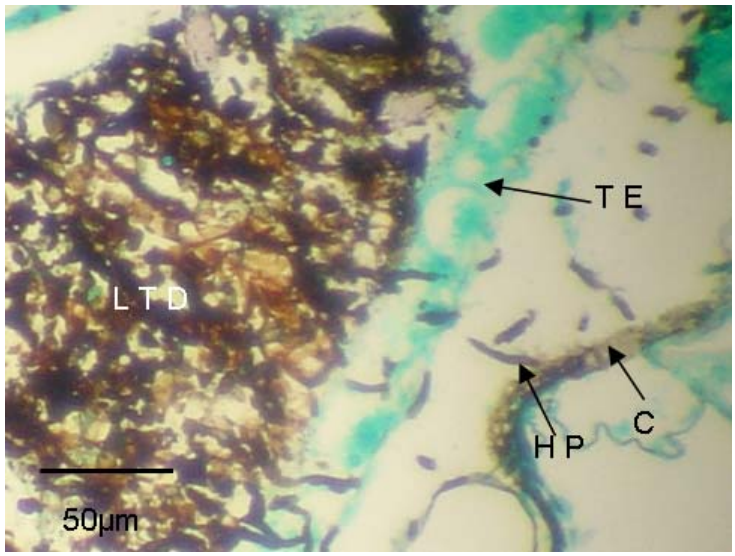


Figura 8: Infección de una larva de *Aedes aegypti* por zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* adheridas a la cutícula. Se observan las hifas de *L. chapmanii* penetrando a través de la cutícula e invadiendo el hemocel. HP= hifa penetrando; C= cutícula; TE: tejido epitelial del intestino; LTD: luz del tubo digestivo. Coloración de Grocott.

5.6 Infección de larvas de *Aedes aegypti* por ingestión de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii.*

Las zoosporas germinadas y enquistadas de *L. chapmanii* fueron observados en el lumen del intestino medio de las larvas que permanecieron en una suspensión de 2 x 10^5 zoosporas (1,4 x 10^5 enquistadas y 0,6 x 10^5 móviles) durante 2 minutos (Figura 9), no registrándose en esta etapa de la infección alteraciones tisulares ni celulares evidentes.

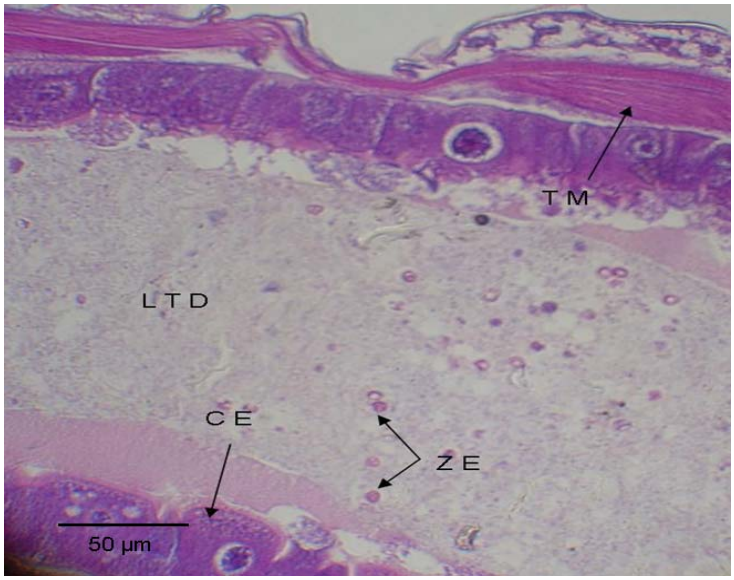


Figura 9: Zoosporas enquistadas sin germinar en el interior del tubo digestivo de larvas de *Aedes aegypti*, (Corte de tubo digestivo 1 hora después de que la larva ingirió las zoosporas de *L. chapmanii*). T M: Tejido muscular; L T D: Luz del tubo digestivo; Z E: Zoosporas enquistadas; C E: Célula epitelial del intestino. Coloración Hematoxilina – Eosina.

El crecimiento vegetativo de *L. chapmanii* fue detectado en el intestino medio larval a las 5 horas post-ingestión. Un abundante y profuso micelio se observó en el espacio entre la membrana peritrófica (MP) y el epitelio simple columnar del intestino medio (Figura 10).

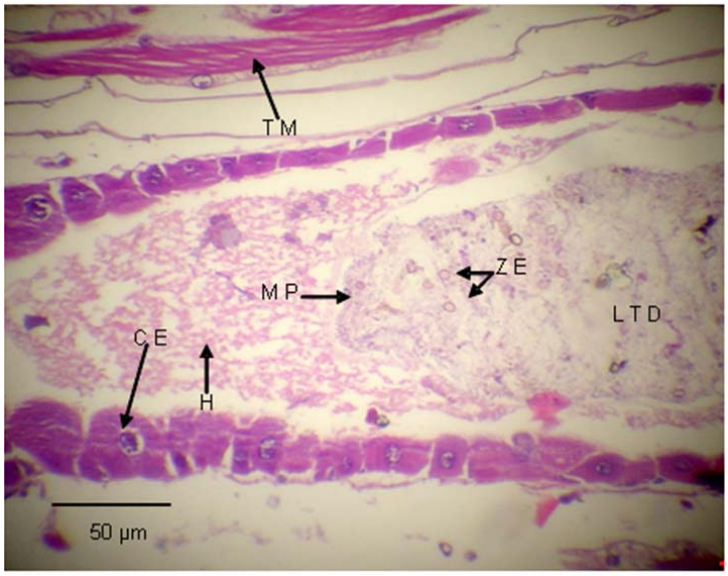


Figura 10: Micelio de *Leptolegnia Chapmanii* ubicado entre la membrana peritrófica y el epitelio del intestino medio (A las 5 horas posteriores a la ingesta

de zoosporas de *L. chapmanii*). TM: tejido muscular; MP: membrana peritrófica; ZE: zoosporas enquistadas; LTD: luz del tubo digestivo; H: Hifa; CE: célula epitelial del intestino. Coloración Hematoxilina – Eosina.

Este espacio se observó muy desarrollado en los ejemplares infectados en relación al que presentaron las larvas control, en las cuales la MP dejó un pequeño espacio o estuvo en contacto con el epitelio intestinal (Figura 11).

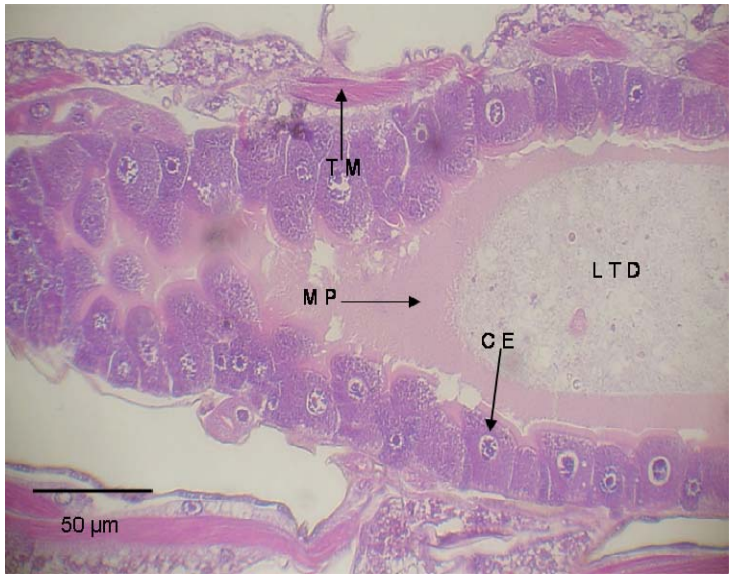


Figura 11: Larva de *Aedes aegypti* sana (no expuesta a zoosporas de *L. chapmanii*). TM: Tejido muscular; MP: Membrana peritrófica; LTD: Luz del tubo digestivo; CE: Célula epitelial intestinal. Coloración Hematoxilina – Eosina.

El micelio continuó invadiendo las larvas, atravesando el epitelio digestivo, destruyendo aparentemente las uniones intercelulares. El epitelio intestinal de larvas infectadas luego de 6 horas presentó alteración de las uniones intercelulares, con algunas células visiblemente afectadas que dejaron espacios por donde pudiera penetrar el micelio al hemocel (Figuras 12, 13 y 14).

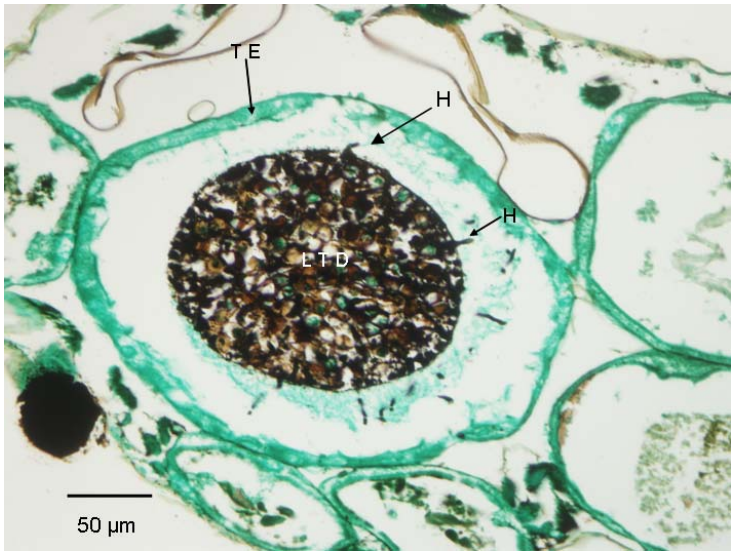


Figura 12: Corte histológico de larvas de *Aedes aegypti* infectadas con *Leptolegnia chapmanii* por la ingestión de zoosporas (Corte de tubo digestivo de 6 horas posterior a la ingestión de las zoosporas de *L. chapmanii*). T E: Tejido epitelial; H: Hifas que atraviesan el epitelio intestinal; L T D: Luz del tubo digestivo. Coloración Grocott.

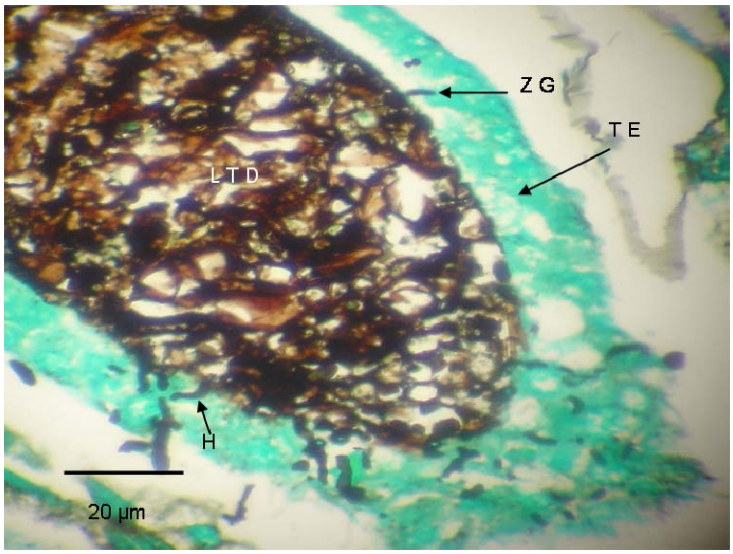


Figura 13: Corte histológico de larvas de *Aedes aegypti* infectadas con *Leptolegnia chapmanii* por la ingestión de zoosporas (Corte de tubo digestivo de 6 horas y medias posterior a la ingestión de las zoosporas de *L. chapmanii*). Z G: Zoosporas germinando; T E: Tejido epitelial; H: Hifas que atraviesan el epitelio intestinal; L T D: Luz del tubo digestivo. Coloración Grocott.

Figura 14: Corte histológico de larvas de *Aedes aegypti* infectadas con *Leptolegnia chapmanii* por la ingestión de zoosporas (Corte de tubo digestivo de 7 horas posterior a la ingestión de las zoosporas de *L. chapmanii*). Z G: Zoosporas germinando; He: Hemocel; T E: Tejido epitelial; H: Hifas que atraviesan el epitelio intestinal; L T D: Luz del tubo digestivo. Coloración Grocott.

Las células epiteliales presentaron aparentes alteraciones intracitoplasmáticas evidenciadas por una profusa vacuolización. Luego de 7-9 horas de haber sido ingeridos los quistes se observó una invasión creciente y paulatina del micelio al interior del hemocel (Figura 15).

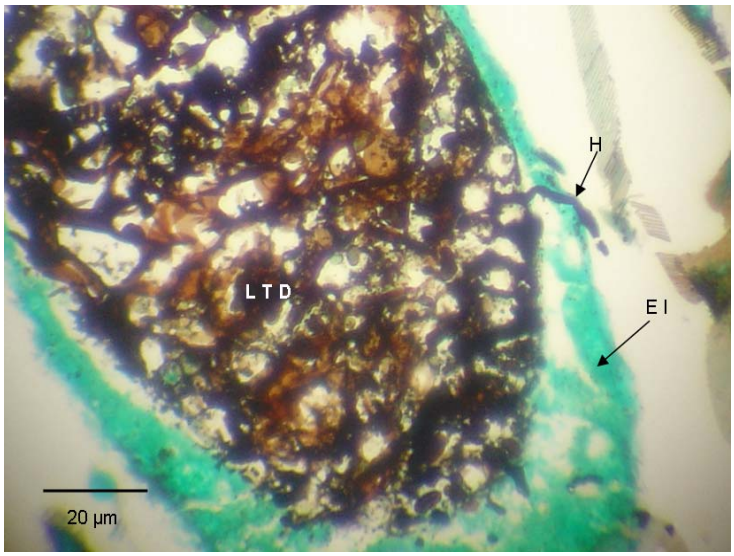


Figura 15: Corte histológico de larvas de *Aedes aegypti* infectadas con *Leptolegnia chapmanii* mediante la ingestión de zoosporas. (Corte de tubo

digestivo entre 8 y 9 horas después de que la larva ingirió las zoosporas de *L. chapmanii*). H: Hifas de *L. chapmanii* atravesando el epitelio intestinal e introduciéndose al hemocel; EI: Epitelio intestinal; L T D: Luz del tubo digestivo. Coloración de Grocott.

Se inició la invasión intrahemocélica con un deterioro marcado de las larvas la que se aceleró a partir de las 10 h post-ingestión donde se observó la destrucción creciente de los tejidos, órganos, sistemas larvales y la exteriorización del micelio a través de la cutícula de las larvas (Figuras 16, 17 y 18).

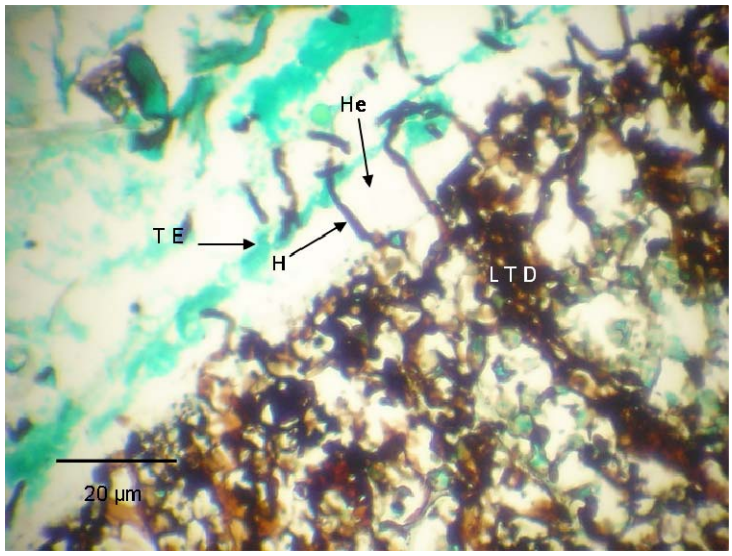


Figura 16: Corte histológico de larvas de *Aedes aegypti* infectadas con *Leptolegnia chapmanii* mediante la ingestión de zoosporas. (Corte de tubo digestivo de 10 horas después de que la larva ingirió las zoosporas de *L. chapmanii*). H: Hifas de *L. chapmanii* que atravesaron el epitelio intestinal y el hemocel, ya dirigiéndose hacia el exterior del cuerpo de la larva; T E: Tejido epitelial; L T D: Luz del tubo digestivo; He: Hemocel. Coloración de Grocott.

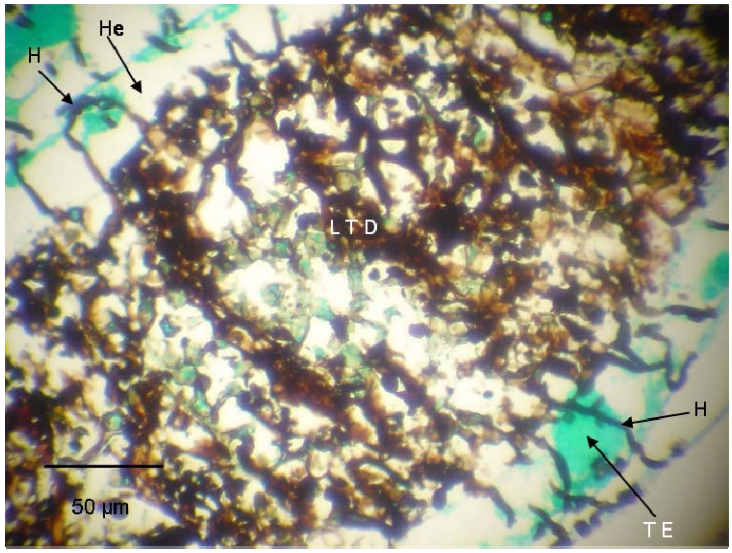


Figura 17: Corte histológico de larvas de *Aedes aegypti* infectadas con *Leptolegnia chapmanii* mediante la ingestión de zoosporas. (Corte de tubo digestivo de 11 horas después de que la larva ingirió las zoosporas de *L. chapmanii*). H: Hifas de *L. chapmanii* que atravesaron el epitelio intestinal y el hemocel, ya dirigiéndose hacia el exterior del cuerpo de la larva; T E: Tejido epitelial; L T D: Luz del tubo digestivo; He: Hemocel. Coloración de Grocott.

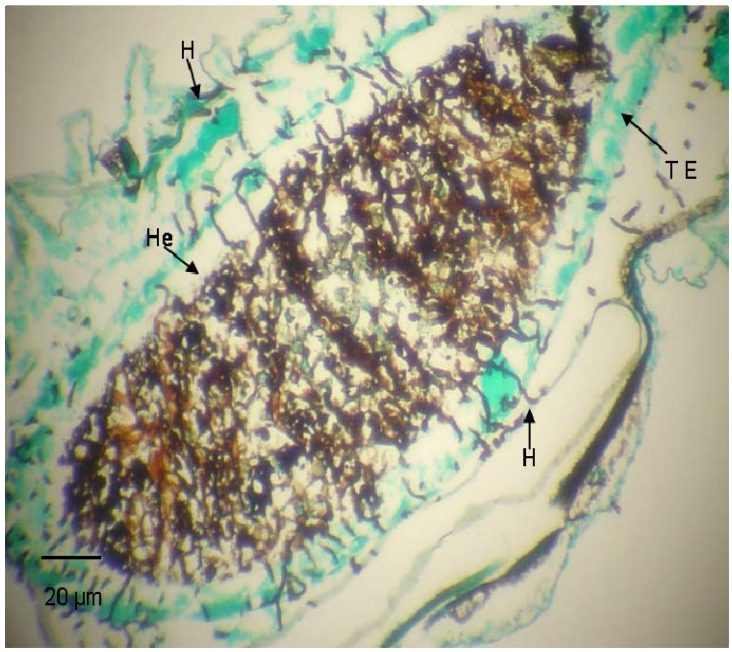


Figura 18: Tubo digestivo de larvas con un importante estado de avance de la infección con zoosporas de *L. chapmanii*, en donde se observa el micelio de *L. chapmanii* atravesando el tubo digestivo y saliendo hacia el exterior. (Corte de

tubo digestivo 12 horas después que la larva ingirió las zoosporas de *L. chapmanii*). H: Hifas de *L. chapmanii* produciendo la destrucción total del tubo digestivo de la larva; T E: Tejido epitelial; He: Hemocel. Coloración de Grocott.

Las larvas que estuvieron expuestas durante 2 minutos a la suspensión de zoosporas y que fueron posteriormente esterilizadas externamente, presentaron porcentajes de mortalidad de 35 % ± 2,3 % a las 48 horas de iniciado el ensayo, mientras que las larvas tratadas de modo similar pero que no fueron esterilizadas, presentaron índices de mortalidad de 75 % ± 1,5 % a las 48 horas posteriores al contacto (Figura 19).

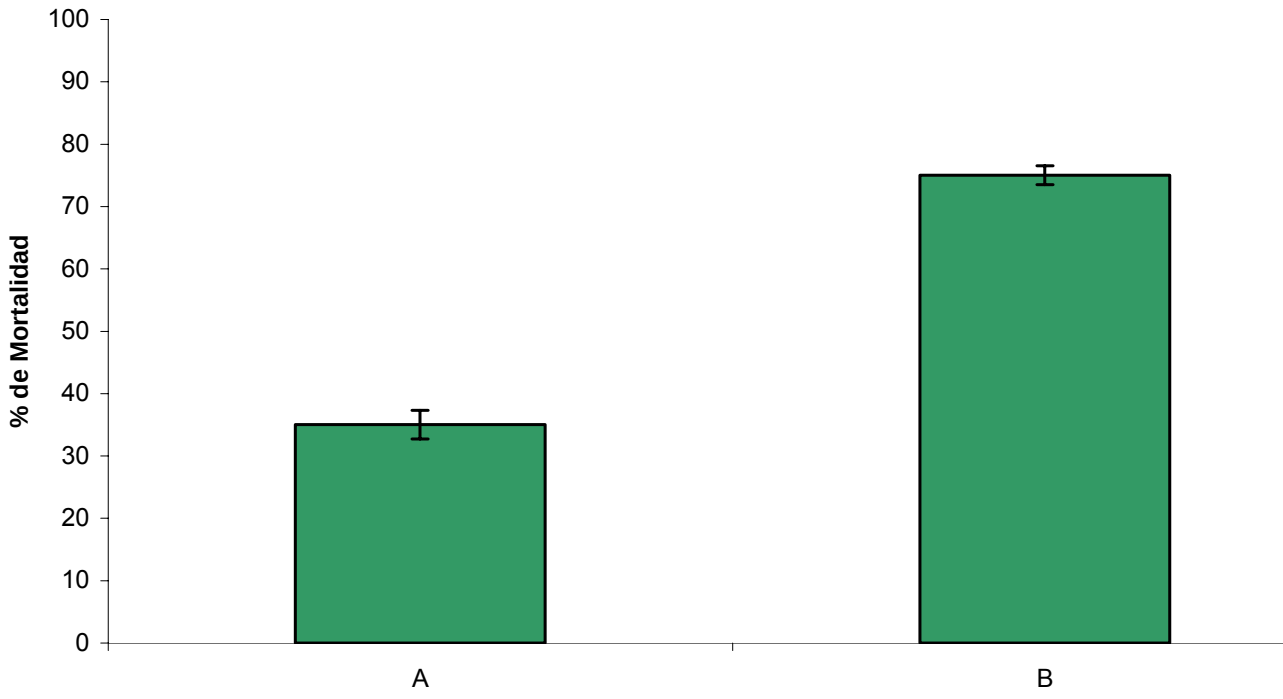


Figura 19: Mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* esterilizadas (A) después de dos minutos de contacto con zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* y en larvas no esterilizadas (B) luego del contacto con zoosporas.

5.7 Factores bióticos y abióticos que afectan la infectividad de *Leptolegnia chapmanii* sobre larvas de *Aedes aegypti.*

Un E. L. produjo niveles de mortalidad mayores a 90 % cuando estuvo en contacto con 20 o menos larvas de cuarto estadio de *A. aegypti* luego de 48 horas de exposición de las larvas a las zoosporas, decreciendo la mortalidad a 37 % ± 9,6 cuando la densidad de las larvas fue de 60 larvas de cuarto estadio de *A. aegypti* (Figura 20). La mortalidad de las larvas a las 48 horas de exposición se vio afectada significativamente por la densidad larval (P < 0,0001 Test de Friedman para dos factores).

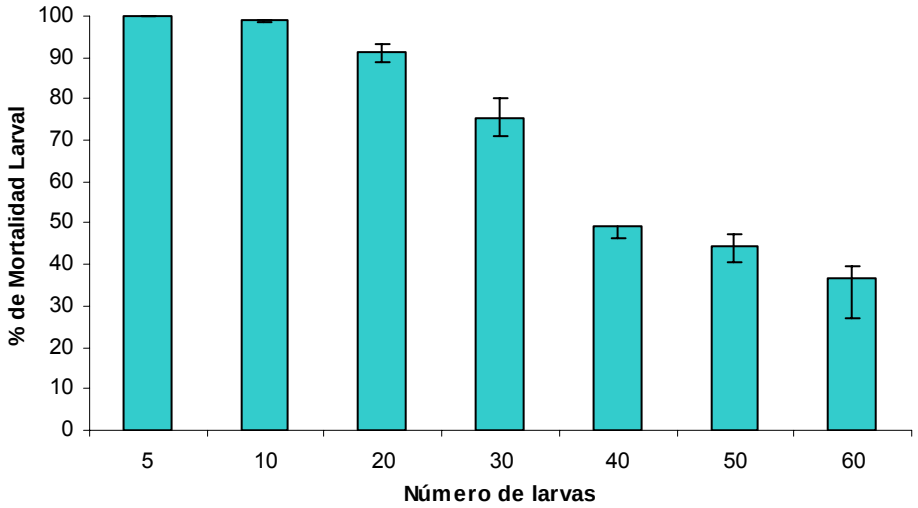


Figura 20: Efecto de la densidad de larvas de *Aedes aegypti* sobre el porcentaje de mortalidad producido por *Leptolegnia chapmanii*.

En lo que respecta al afecto de la variación de la densidad de zoosporas sobre el porcentaje de infección de *L. chapmanii* en larvas de *A. aegypti*, la mortalidad de las mismas varió de 82 a 100 % cuando se colocaron en los recipientes de 1 a 7 E. L. como inóculo con 25 larvas de *A. aegypti*. Cuando se pusieron en contacto 1 y 2 E. L. con 25 larvas sanas de *A. aegypti* la mortalidad de las larvas fue de 82 y 92 %, respectivamente a las 48 horas de exposición. Con 3 o más E. L. en los recipientes, la mortalidad fue 100 % (Figura 21). La

mortalidad se vio significativamente afectada por la concentración de zoosporas (P < 0,0001, test de Friedman).

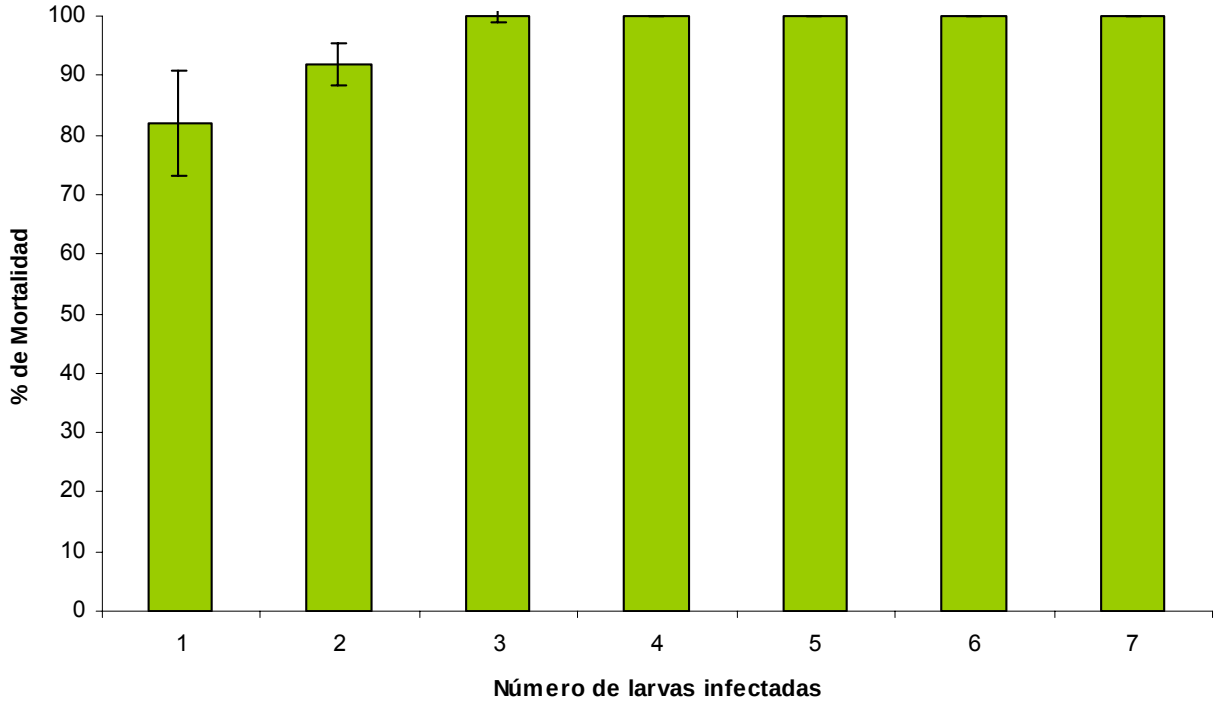


Figura 21: Efecto de la densidad de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* sobre la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti*.

Cuando se evalúo el efecto del volumen de los recipientes sobre el porcentaje de infección de *L. chapmanii* en larvas de *A. aegypti*, los porcentajes de mortalidad en recipientes de igual forma y superficie (397 cm^2) pero con volumen de agua variable entre 300 y 5.000 ml y en los que se colocaron números similares de larvas e inóculo, no presentaron diferencias significativas (P < 0,1 test de Friedman). La mortalidad varió entre 89 % y 92 % para los diferentes volúmenes ensayados (Figura 22).

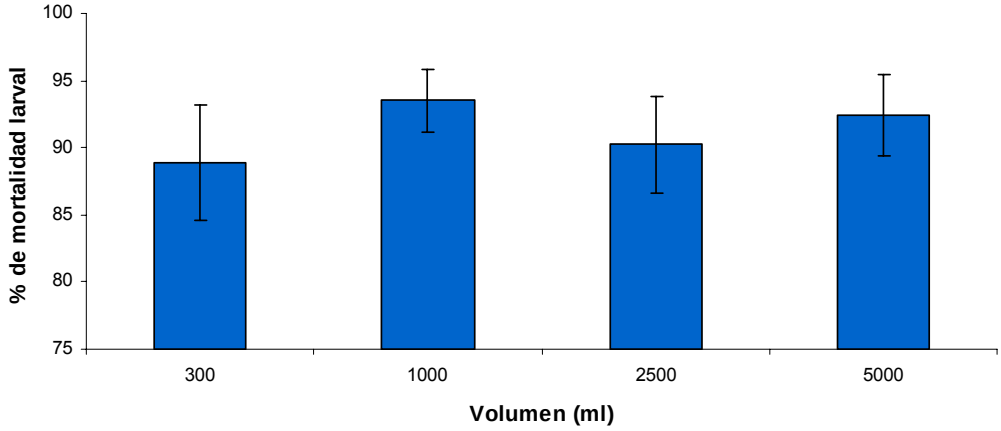


Figura 22: Efecto del volumen de agua donde se realizó la infección sobre la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* expuestas a *Leptolegnia chapmanii*.

Por otro lado al mantener el volumen de agua constante (250 ml) y variar la superficie de los recipientes entre 14,5 y 875 cm^2, la mortalidad larval resultó significativamente afectada ($P < 0,0001$ test de Friedman) variando de 100 % a 25 % de mortalidad, respectivamente (Figura 23).

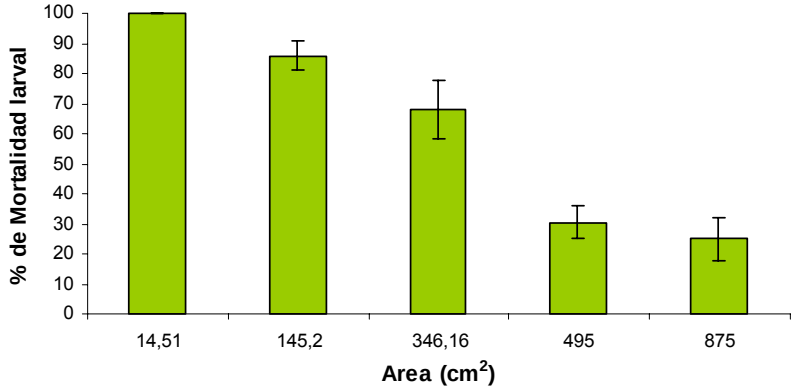


Figura 23: Efecto de la superficie de los recipientes sobre la mortalidad de las larvas de *Aedes aegypti* expuestas a *Leptolegnia chapmanii*.

5.8 Efecto de la temperatura, pH y salinidad sobre la patogenicidad de *Leptolegnia chapmanii* en larvas de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens.*

En este ensayo se evaluaron larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens* debido a que frecuentemente se encontraban en los mismos recipientes. Se observaron diferencias significativas (ANOVA, $P < 0,0001$) en la infectividad de las zoosporas de *L. chapmanii* sobre los estados preimaginales mantenidos a distintas temperaturas. Las larvas de *A. aegypti* fueron significativamente más susceptibles a la infección con *L. chapmanii* que las larvas de *C. pipiens* a las temperaturas evaluadas ($P < 0,05$). La mortalidad de las larvas de los primeros estadios (primero y segundo) expuestas a las zoosporas de *L. chapmanii* fue notablemente mayor que la registrada en los estadios larvales más avanzados (tercero y cuarto). La mortalidad de las pupas de *A. aegypti* (Tabla I) y *C. pipiens* (Tabla II) fue sensiblemente menor a la registrada en las larvas.

La mortalidad de las larvas en *A. aegypti* (Tabla I) y *C. pipiens* (Tabla II) fue significativamente afectada por el estadio larval y la temperatura a la cual fueron expuestas. La mortalidad promedio para los distintos estadios larvales de *A. aegypti* y *C. pipiens* expuestos a diferentes temperaturas, fueron analizadas mediante el test de Tukey determinándose que la mortalidad máxima para cada estadio larval de *A. aegypti* se obtuvo a 25 °C (Tabla I), mientras que para *C. pipiens* la temperatura óptima fue 20 °C (Tabla II). No se registró mortalidad de larvas ni de pupas de estos culícidos cuando fueron expuestos a las zoosporas de *L. chapmanii* a 5 y 40°C respectivamente.

Estadio	**Temperatura (ºC)**					
	10	**15**	**20**	**25**	**30**	**35**
I	100 ± 0**a**	100 ± 0**a**	100 ± 0**a**	100 ± 0**a**	100 ± 0**a**	87,11 ± 1,7**a**
II	80,33 ± 1,2**b**	100 ± 0**a**	100 ± 0**a**	100 ± 0**a**	99,56 ± 0,15**ab**	82,66 ± 1,2**ab**
III	42,66 ± 1,2**c**	100 ± 0**a**	100 ± 0**a**	100 ± 0**a**	77,33 ± 1,02**c**	72,89 ± 1,4**bc**
IV	37,78 ± 1,3**cd**	72,11 ± 1,8**b**	96,44 ± 1,8**b**	99,11 ± 0,3**a**	67,11 ± 2,3**cd**	64,44 ± 1,5**cd**
Pupa	3,99 ± 0,5	7,1 ± 0,8	10,6 ± 0,8	15,55 ± 0,9	6,67 ± 0,45	3,56 ± 0,42

Tabla I: Mortalidad (%) de los estadios larvales y pupas de *Aedes aegypti* expuestos a zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* a diferentes temperaturas.

(Significancia determinada por Tukey, letras diferentes indican diferencias significativas).

Estadio	**Temperatura (ºC)**					
	10	**15**	**20**	**25**	**30**	**35**
I	62,67 ± 3,1**a**	100 ± 0**a**	100 ± 0**a**	100 ± 0**a**	72,84 ± 2,6**a**	66,6 ± 1,5**a**
II	37,76 ± 1,14**b**	100 ± 0**a**	100 ± 0**a**	100 ± 0**a**	64 ± 2,5**ab**	54,6 ± 1,9**b**
III	26,6 ± 1,6**b**	65,33± 1,6**b**	92,89 ± 1,4**a**	70,22 ± 1,4**b**	58,22 ± 3**abc**	40,99 ± 1,03**bc**
IV	13,76 ± 1,6**c**	48 ± 2,03**bc**	84,8 ± 1,3**a**	40,44 ± 1,9**c**	29,78 ± 2,5**bc**	29,78 ± 1,2**bc**
Pupa	2,23 ± 0,47	4,89± 0,42	5,33 ± 0,8	8,99 ± 1,06	3,11 ± 0,72	2,22 ± 0,47

Tabla II: Mortalidad (%) de los estadios larvales y pupas de *Culex pipiens* expuestos a zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* a diferentes temperaturas. (Significancia determinada por Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas).

Cuando se evaluó el efecto de la concentración de H^+ (pH) sobre la patogenicidad de *L. chapmanii* en ambas especies de culícidos se registró 100 % de mortalidad en larvas de *A. aegypti* expuestas a una concentración de 282.000 zoosporas a pH entre 4 y 10 (Figura 24). Las larvas de *C. pipiens* expuestas a similares concentraciones de zoosporas y valores de pH registraron porcentajes de mortalidad entre 62 % y 99 % a pH entre 4 y 7 respectivamente; la mortalidad decreció a 71 % a pH 10 (Figura 24). Las diferencias fueron significativas (ANOVA, P<0,0001) entre los porcentajes de mortalidad registrados en larvas de *C. pipiens* a pH entre 4 y 10. No se registró mortalidad en las larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens* utilizados como controles que fueron colocados en agua con valores similares de pH que los tratados.

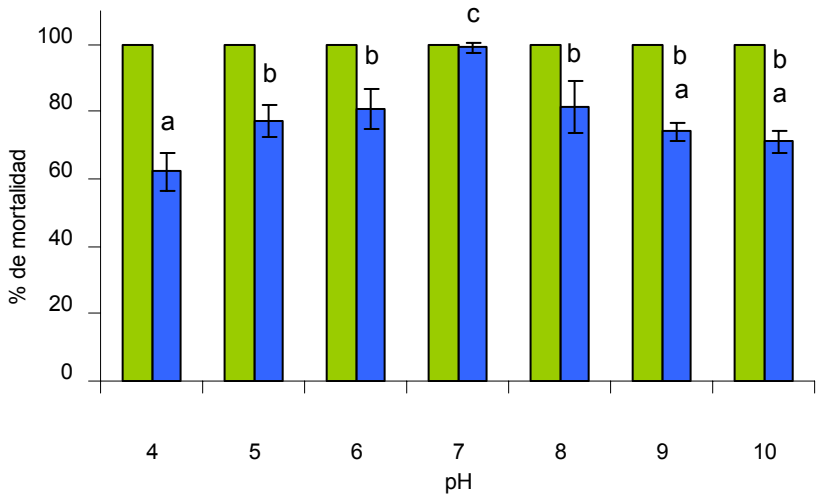


Figura 24: Efecto de la concentración de H^+ (pH) sobre la infección de *Leptolegnia chapmanii* en larvas de *Aedes aegypti* (barra verde) y *Culex pipiens* (barra azul). (Diferencias significativas determinadas por Tukey, letras diferentes indican significancia).

Por otro lado se registró una mortalidad de 100 % en larvas de *A. aegypti* expuestas a zoosporas de *L. chapmanii* en concentraciones de ClNa de 0 a 7ppm. La mortalidad de larvas de *C. pipiens* expuestas a igual concentración de zoosporas 3 E. L. decreció de 96 % en agua destilada (control) a 31,5 % en agua con 6ppm de ClNa (Figura 25). Aún cuando esta experiencia incluía la determinación del efecto de concentraciones superiores a 7ppm de ClNa sobre las infecciones, las larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens* utilizadas como controles no toleraron concentraciones tan elevadas, muriendo en concentraciones superiores a 7ppm y 6ppm, respectivamente. Las diferencias en la mortalidad de *C. pipiens* a diferentes concentraciones de ClNa fueron significativas (split-plot ANOVA; $P < 0,0001$).

La tolerancia de *L. chapmanii* a concentraciones superiores a 7ppm de ClNa fueron investigadas utilizando larvas de *A. aegypti* infectadas con *L. chapmanii* (48 horas post-infección) mantenidas en concentraciones de ClNa de 15, 20 y 30 ppm por un período de tiempo que varió entre 24 y 144 horas. Esas larvas muertas mantenidas en las 3 concentraciones citadas previamente se colocaron en recipientes con larvas sanas y agua destilada, produciendo 100% de mortalidad en 24 horas. Las larvas muertas e infectadas mantenidas a

15, 20 y 30 ppm durante 144 horas produjeron mortalidad de 54,2 % ± 6,4; 27,4 % ± 3,9 y 0%, respectivamente (Tabla III).

Conc.ClNa	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
15 ppm	100 % ± 0	100 % ± 0	100 % ± 0	100 % ± 0	100 % ± 0	54,2 % ± 6,4
20 ppm	100 % ± 0	100 % ± 0	100 % ± 0	38,2 % ± 2,8	56,5 % ± 4,5	27,4 % ± 3,9
30 ppm	100 % ± 0	100 % ± 0	100 % ± 0	7,4 % ± 2,1	13,1 % ± 2,3	0% ± 0

Tabla III: Mortalidad (%) de larvas de *Aedes aegypti* expuestas a larvas infectadas con *Leptolegnia chapmanii* previamente mantenidas en concentraciones de ClNa de 15, 20 y 30 ppm entre 24h y 144 h.

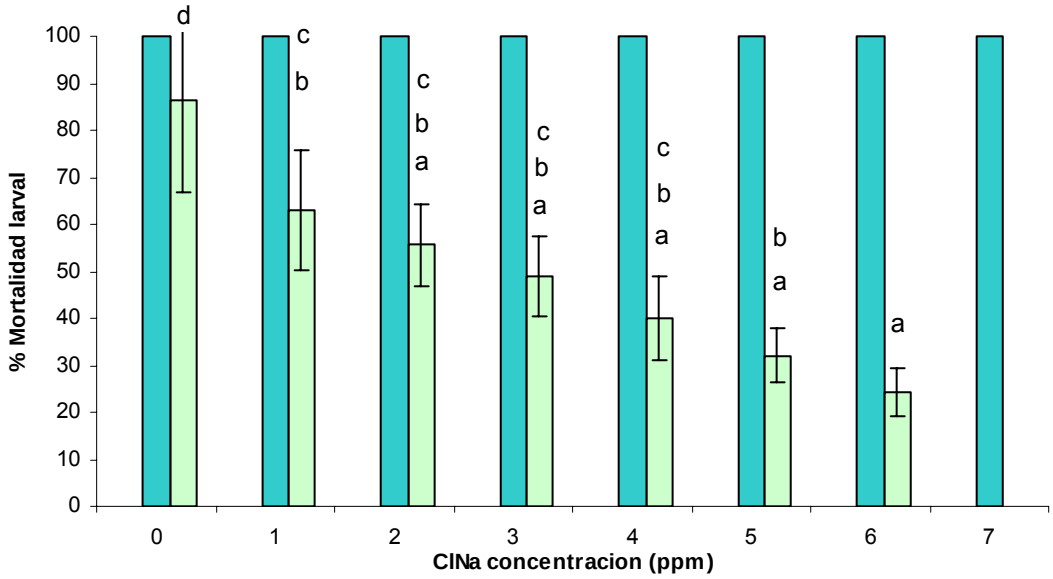


Figura 25: Efecto de la concentración de ClNa, sobre la infección de *Leptolegnia chapmanii* en larvas de *Aedes aegypti* (barra turquesa) y *Culex pipiens* (barra verde). (Diferencias significativas determinadas por Tukey, letras diferentes indican significancia).

Con respecto al desarrollo *in vitro* de *L. chapmanii* se determinó que el mismo decreció a medida que aumentaba la concentración de NaCl en el medio (Figura 26). A 15 y 20 ppm de ClNa se determinó escaso desarrollo vegetativo al cabo de 3-4 días, no observándose desarrollo del micelio en concentraciones de 30 ppm.

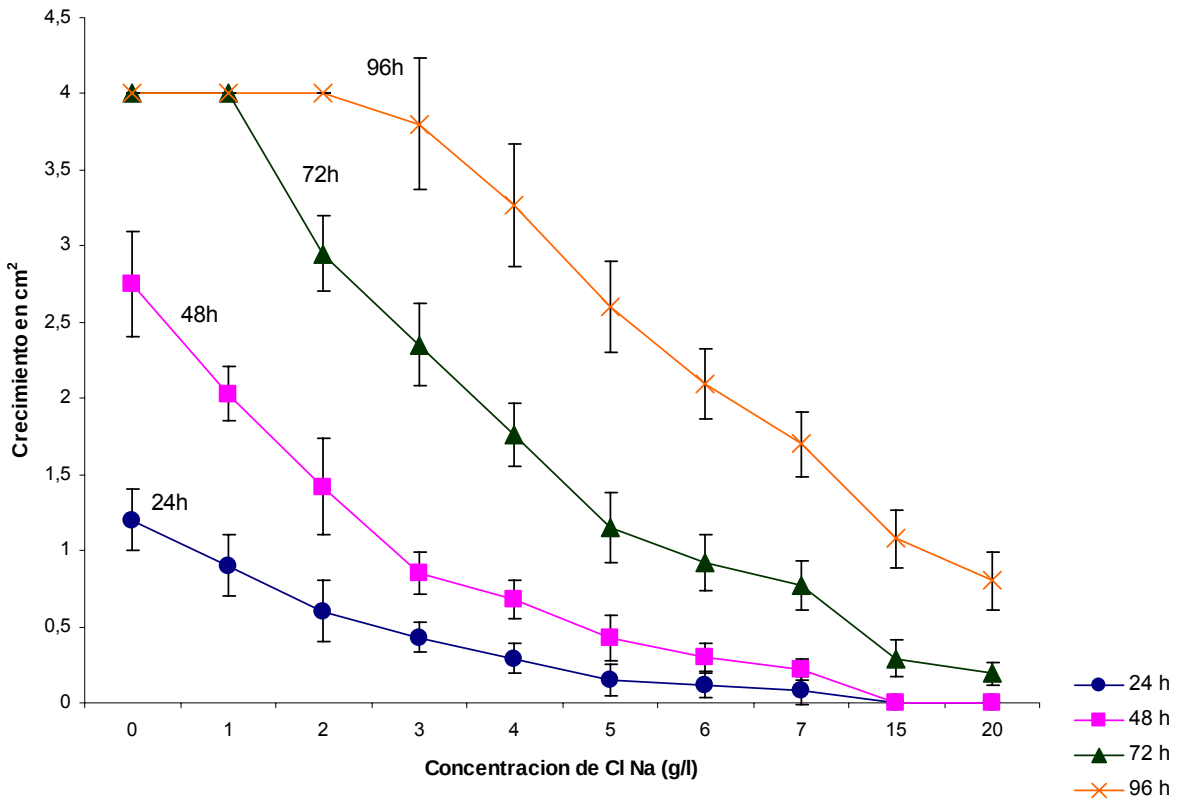


Figura 26: Efecto de la concentración de ClNa sobre el desarrollo *in vitro* de *L. chapmanii*.

5.9 Tiempo requerido por *Leptolegnia chapmanii* para producir la muerte de las larvas de *Aedes aegypti*.

En este ensayo se observó una mortalidad de las larvas de 77,5 % ± 1,4, el 50% ± 2,3 se produjo en la primera hora de exposición. Posteriormente se observó 5,5 % de mortalidad durante las horas 2, 3, 4, 5 y 11 de iniciado el ensayo. En los controles no se registró mortalidad larval.

Las larvas de *A. aegypti* sanas colocadas en recipientes con larvas muertas infectadas con *L. chapmanii* se acercaron rapidamente a las larvas infectadas, observándose contacto directo entre ambos grupos. Luego se observó una disminución notoria del movimiento de las larvas y finalmente quedaron suspendidas de la superficie del agua por el sifón, desplazándose sólo ante un estímulo táctil.

5.10 Producción de oogonios y oosporas de *Leptolegnia chapmanii* a diferentes temperaturas.

En las larvas infectadas colocadas a 5 ºC se observó la formación de los primeros oogonios y oosporas (Figura 27) a los 36 y 68 días respectivamente (Tabla IV). El tiempo de inicio de la formación de oogonios y oosporas se redujo con el incremento de la temperatura, a 40 °C se requirieron 5 y 9 días, respectivamente, para la formación de los estados sexuales (Tabla IV). En cuanto a la producción de oogonios a diferentes temperaturas se observó que a medida que se elevó la temperatura se incrementó el número de oogonios producido por las larvas infectadas. Este comportamiento no se observó en las oosporas, cuyo número mayor fue producido a 25 °C (Tabla V). Respecto del número de oosporas producido por las larvas infectadas, se observó que las larvas colocadas a 5 y 25°C produjeron 82,5 ± 4,6 y 87 ± 6,4 oosporas por larva, respectivamente. Las oosporas producidas a 5 y 25 °C tuvieron tamaños similares midiendo 13,75 µm ± 2,04 y 14,72 µm ± 3,2, respectivamente

Temperatura (ºC)	Oogonios	Oosporas	Tiempo total del ciclo
5	36 días	32 días	68 días
10	30 días	24 días	54 días
15	19 días	22 días	41 días
20	9 días	18 días	27 días
25	5 días	17 días	22 días
30	5 días	10 días	15 días
35	5 días	6 días	11 días
40	5 días	4 días	9 días

Tabla IV: Tiempo (días) necesario para iniciar la producción de oogonios y oosporas en larvas de *Aedes aegypti* infectadas con *Leptolegnia chapmanii*

Temperatura (ºC)	Oogonios	Oosporas
5	12	1
10	57	5
15	120	9
20	131	7
25	263	10
30	527	4
35	843	8
40	1030	7

Tabla V: Producción de oogonios y oosporas de *Leptolegnia chapmanii* en larvas de *Aedes aegypti* a diferentes temperaturas.

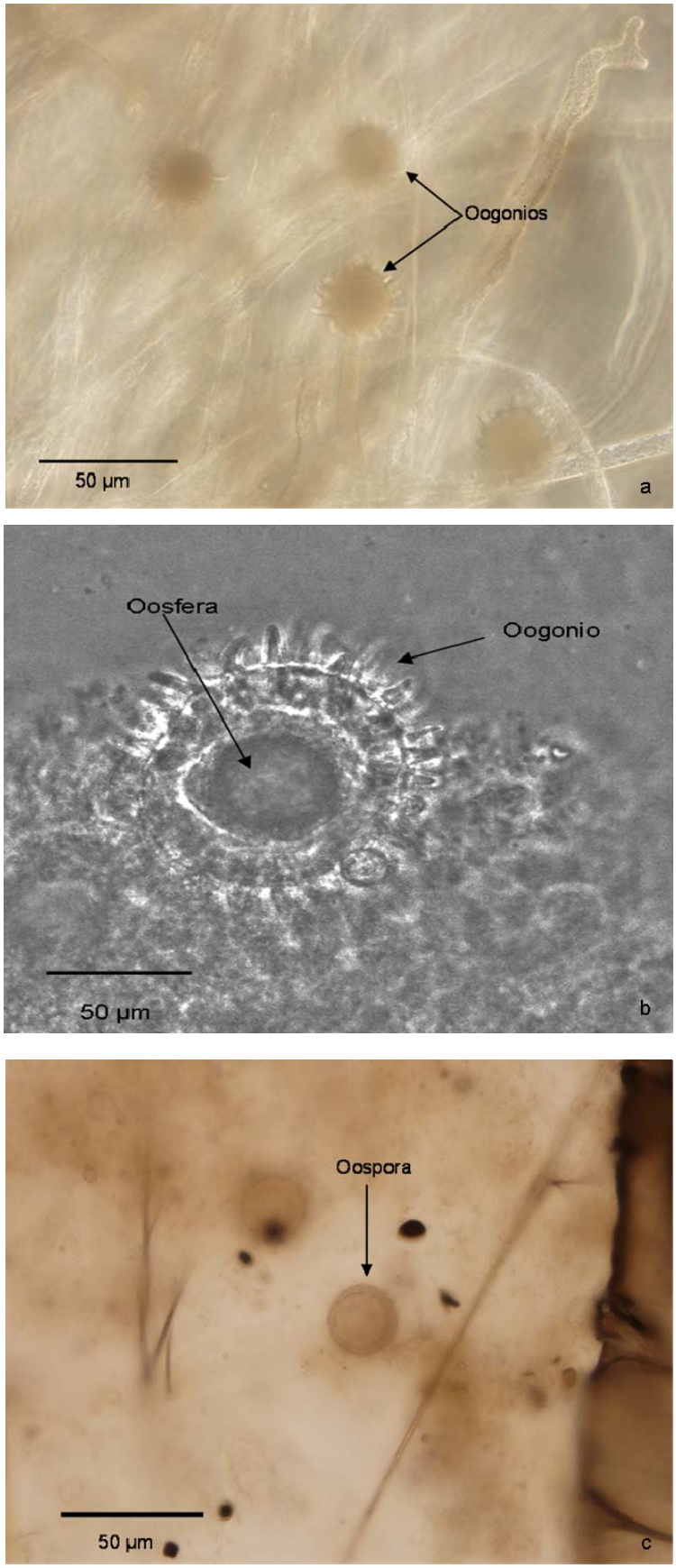


Figura 27: Oogonios, oosferas y oosporas formados en larvas infectadas con *Leptolegnia chapmanii*. (a) Oogonios en etapa temprana de desarrollo aun no

fecundados por el anteridio. (b) Oogonio fecundado por el anteridio que ha desarrollado una oosfera en su interior. (c) Oospora de *L. chapmanii*, producto final de la reproducción sexual. Preparación en fresco (contraste de fases).

5.11 Mortalidad causada por *Leptolegnia chapmanii* sobre las larvas de *Aedes aegypti* de campo y de la colonia de laboratorio

Las larvas de *A. aegypti* obtenidas de la colonia mantenida en el CEPAVE y las recolectadas en el campo de poblaciones naturales, resultaron igualmente susceptibles a las infecciones con zoosporas de *L. chapmanii,* mostrando porcentajes de mortalidad de 100% a las 48 horas post-infección cuando estuvieron en contacto con 3 E. L.

5.12 Efectos de concentraciones subletales de *Leptolegnia chapmanii* sobre la fecundidad de los adultos de *Aedes aegypti.*

Se registraron diferencias significativas (ANOVA, P<0,0001) en la cantidad de huevos (61,3 ± 22) colocados por hembras de *A. aegypti* obtenidas a partir de larvas sobrevivientes que fueron expuestas a *L. chapmanii*, respecto de los huevos (84,2 ± 26,4) colocados por hembras que nunca estuvieron expuestas a *L. chapmanii*. Asimismo se observaron diferencias en la longitud máxima (1,96 mm ± 0,59) y ancho máximo (0,4 mm ± 0,14) de las alas de las hembras de *A. aegypti* que estuvieron en contacto con zoosporas de *L. chapmanii* en estado de larvas, respecto a las que no lo estuvieron (controles) que presentaron un largo máximo de 2,32 mm ± 0,18 y ancho máximo de 0,54 mm ± 0,12 (Figura 28).

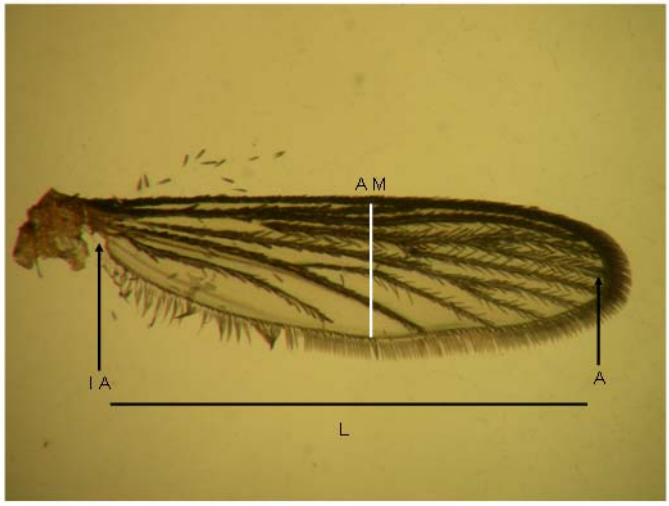


Figura 28: Ala derecha de hembra adulta de *Aedes aegypti.* IA (Incisura axial); L (Longitud); A (Ápice); AM (Ancho máximo).

5.13 Efecto de la calidad del agua de los criaderos de culícidos sobre la patogenicidad e infectividad de las zoosporas de *Leptolegnia chapmanii*.

Las características físico-químicas del agua utilizada en los ensayos, obtenida de los ambientes donde se desarrollan algunos de los culícidos de mayor importancia sanitaria en la Argentina se mencionan en las Tablas VI a IX. Los ambientes donde se obtuvieron las muestras de agua son representativos de los criaderos de las principales especies de culícidos de la Provincia de Buenos Aires, se presentan en las Figuras 29, 30, 31 y 32.

PARÁMETROS	RESULTADO	UNIDAD	LIMITE DETECCIÓN	MÉTODO
pH	7,8	U de pH	0,1	SM M 4500 H - B - Potenciometrico
Conductividad	552	µmhos/cm	1	SM M 2510 B
Turbiedad	7,8	NTU	3	SM M 2130 B - Nefelometrico
Color	10,7	U de Color Co -Pt	3	SM M 2120 B modificado
Olor	Inodoro	-	-	SM 2150 - B - Organoléptico
Aspecto	*	-	-	SM 2110
Dureza	116	mg de CaCO3/L	1	SM M 2340 C - Titulación
Alcalinidad Total	253	mg de CaCO3/L	1	SM M 2320 B - Titulación
Calcio	32	mg/L	1	SM M 3500 Ca -D - Titulometrico
Magnesio	9	mg/L	1	SM M 3500 Mg -E - Titulometrico
Sodio	33	mg/L	1	SM M 3500 Na -D - Fotometrico de llama
Potasio	85	mg/L	1	SM M 3500 K -D - Fotometrico de llama
Carbonatos	No Contiene	mg/L	1	Valoración ácido Base
Bicarbonatos	309	mg/L	1	Valoración ácido Base
Cloruros	28	mg/L	1	SM M 4500 Cl - B - Titulometrico
Sulfatos	7	mg/L	1	SM M 4500 SO4 -E - Turbidimetrico
Nitratos	< 0,5	mg/L	0,5	SM Acido Fenoldisulfonico - Espectrofotometrico
Nitritos	0,014	mg/L	0,005	M de Zambelli. Rodier - Espectrofotometrico
Fluoruros	0,47	mg/L	0,03	SM M 4500 F -D - Espectrofotometrico
Arsénico	< 0,003	mg/L	0,003	EPA 7062 EAA - GH
Amonio	3,3	mg/L	0,1	SM M 4500 NH3 -C - Espectrofotometrico

Tabla VI: Características físico-químicas del agua de recipientes artificiales (floreros) del cementerio Municipal de La Plata.

PARÁMETROS	RESULTADO	UNIDAD	LIMITE DETECCIÓN	MÉTODO
pH	7,9	U de pH	0,1	SM M 4500 H - B - Potenciometrico
Conductividad	1021	µmhos/cm	1	SM M 2510 B
Turbiedad	<3	NTU	3	SM M 2130 B - Nefelometrico
Color	6,4	U de Color Co -Pt	3	SM M 2120 B modificado
Olor	Inodoro	-	-	SM 2150 - B - Organoléptico
Aspecto	*	-	-	SM 2110
Dureza	128	mg de CaCO3/L	1	SM M 2340 C - Titulación
Alcalinidad Total	485	mg de CaCO3/L	1	SM M 2320 B - Titulación
Calcio	32	mg/L	1	SM M 3500 Ca -D - Titulometrico
Magnesio	12	mg/L	1	SM M 3500 Mg -E - Titulometrico
Sodio	199	mg/L	1	SM M 3500 Na -D - Fotometrico de llama
Potasio	14	mg/L	1	SM M 3500 K -D - Fotometrico de llama
Carbonatos	No Contiene	mg/L	1	Valoración ácido Base
Bicarbonatos	591	mg/L	1	Valoración ácido Base
Cloruros	57	mg/L	1	SM M 4500 Cl - B - Titulometrico
Sulfatos	16	mg/L	1	SM M 4500 SO4 -E - Turbidimetrico
Nitratos	< 0,5	mg/L	0,5	SM Acido Fenoldisulfonico - Espectrofotometrico
Nitritos	0,188	mg/L	0,005	M de Zambelli. Rodier - Espectrofotometrico
Fluoruros	0,70	mg/L	0,03	SM M 4500 F -D - Espectrofotometrico
Arsénico	0,007	mg/L	0,003	EPA 7062 EAA - GH
Amonio	6,1	mg/L	0,1	SM M 4500 NH3 -C - Espectrofotometrico

Tabla VII: Características físico-químicas del agua de zanjas de desagüe pluvial y domiciliario de los alrededores de La Plata.

PARÁMETROS	RESULTADO	UNIDAD	LIMITE DETECCIÓN	MÉTODO
pH	7,2	U de pH	0,1	SM M 4500 H - B - Potenciometrico
Conductividad	236	µmhos/cm	1	SM M 2510 B
Turbiedad	<3	NTU	3	SM M 2130 B - Nefelometrico
Color	6,8	U de Color Co -Pt	3	SM M 2120 B modificado
Olor	Inodoro	-	-	SM 2150 - B - Organoléptico
Aspecto	*	-	-	SM 2110
Dureza	86	mg de CaCO3/L	1	SM M 2340 C - Titulación
Alcalinidad Total	104	mg de CaCO3/L	1	SM M 2320 B - Titulación
Calcio	26	mg/L	1	SM M 3500 Ca -D - Titulometrico
Magnesio	5	mg/L	1	SM M 3500 Mg -E - Titulometrico
Sodio	13	mg/L	1	SM M 3500 Na -D - Fotometrico de llama
Potasio	10	mg/L	1	SM M 3500 K -D - Fotometrico de llama
Carbonatos	No Contiene	mg/L	1	Valoración ácido Base
Bicarbonatos	127	mg/L	1	Valoración ácido Base
Cloruros	14	mg/L	1	SM M 4500 Cl - B - Titulometrico
Sulfatos	4	mg/L	1	SM M 4500 SO4 -E - Turbidimetrico
Nitratos	< 0,5	mg/L	0,5	SM Acido Fenoldisulfonico - Espectrofotometrico
Nitritos	0,124	mg/L	0,005	M de Zambelli. Rodier - Espectrofotometrico
Fluoruros	0,31	mg/L	0,03	SM M 4500 F -D - Espectrofotometrico
Arsénico	< 0,003	mg/L	0,003	EPA 7062 EAA - GH
Amonio	0,8	mg/L	0,1	SM M 4500 NH3 -C - Espectrofotometrico

Tabla VIII: Características físico-químicas del agua del Río de la Plata que inunda ambientes temporarios en la Reserva Provincial de Punta Lara, Ensenada, Provincia de Buenos Aires.

PARÁMETROS	RESULTADO	UNIDAD	LIMITE DETECCIÓN	MÉTODO
pH	7,8	U de pH	0,1	SM M 4500 H - B - Potenciometrico
Conductividad	247	µmhos/cm	1	SM M 2510 B
Turbiedad	4,8	NTU	3	SM M 2130 B - Nefelometrico
Color	11,2	U de Color Co -Pt	3	SM M 2120 B modificado
Olor	Inodoro	-	-	SM 2150 - B - Organoléptico
Aspecto	*	-	-	SM 2110
Dureza	53	mg de CaCO3/L	1	SM M 2340 C - Titulación
Alcalinidad Total	90	mg de CaCO3/L	1	SM M 2320 B - Titulación
Calcio	12	mg/L	1	SM M 3500 Ca -D - Titulometrico
Magnesio	5	mg/L	1	SM M 3500 Mg -E - Titulometrico
Sodio	28	mg/L	1	SM M 3500 Na -D - Fotometrico de llama
Potasio	12	mg/L	1	SM M 3500 K -D - Fotometrico de llama
Carbonatos	No Contiene	mg/L	1	Valoración ácido Base
Bicarbonatos	109	mg/L	1	Valoración ácido Base
Cloruros	25	mg/L	1	SM M 4500 Cl - B - Titulometrico
Sulfatos	6	mg/L	1	SM M 4500 SO4 -E - Turbidimetrico
Nitratos	< 0,5	mg/L	0,5	SM Acido Fenoldisulfonico - Espectrofotometrico
Nitritos	0,007	mg/L	0,005	M de Zambelli. Rodier - Espectrofotometrico
Fluoruros	0,59	mg/L	0,03	SM M 4500 F -D - Espectrofotometrico
Arsénico	< 0,003	mg/L	0,003	EPA 7062 EAA - GH
Amonio	1,1	mg/L	0,1	SM M 4500 NH3 -C - Espectrofotometrico

Tabla IX: Análisis físico-químico del agua de ambientes temporarios inundados por agua de lluvia.

Figura 29: Recipientes artificiales (floreros) ubicados en el cementerio Municipal de La Plata que constituyen importantes criaderos de los culícidos *Aedes aegypti* y *Culex pipiens.*

Figura 30: Zanja de desagüe pluvial y domiciliario ubicada en los alrededores de La Plata. Criadero típico del culícido *Culex pipiens*.

Figura 31: Ambiente temporario inundado por las fluctuaciones de nivel del Río de la Plata en la Reserva Provincial de Punta Lara, Ensenada, Provincia de Buenos Aires. Criadero típico de los culícidos *Ochlerotatus crinifer* y *Psorophora ferox.*

Figura 32: Ambiente temporario inundado con agua de lluvia ubicado en la localidad de Melchor Romero, Partido de La Plata, criadero típico del culícido de las inundaciones *Ochlerotatus albifasciatus*. **Localidad tipo** del aislamiento nativo de *Leptolegnia chapmanii.*

Los porcentajes más elevados de mortalidad en las larvas fueron 99,53% ± 0,13 a las 48 h post-infección en agua de ambientes temporarios inundados por lluvias, mientras que el porcentaje menor fue 70,2 % ± 1,25, cuando se utilizó agua de floreros de cemento del cementerio de La Plata (Figura 33).

Utilizando el análisis de componentes principales (Manly, 1991) respecto de la composición químicas del agua de los cuatro ambientes, se determinó que el agua de ambientes temporarios inundados por lluvias y el agua del Río de La Plata son similares, registrando valores diferentes en el contenido de calcio, difiriendo del agua de floreros del cementerio y del agua de las zanjas de desagüe, estas dos con valores opuestos en la mayoría de los casos del resto.

Para relacionar las características del agua y la mortalidad obtenida, se realizó un análisis de varianza comparando la mortalidad a las 48 horas en cada tipo de agua. Se determinaron diferencias altamente significativas entre la mortalidad en agua de floreros del cementerio y agua de ambientes inundados por lluvias o por agua del Río de La Plata que inundan ambientes temporarios (Figura 33). Las diferencias en la mortalidad de larvas expuestas a *L. chapmanii* en agua de zanja y de lluvia o agua del Río de La Plata no fueron significativas.

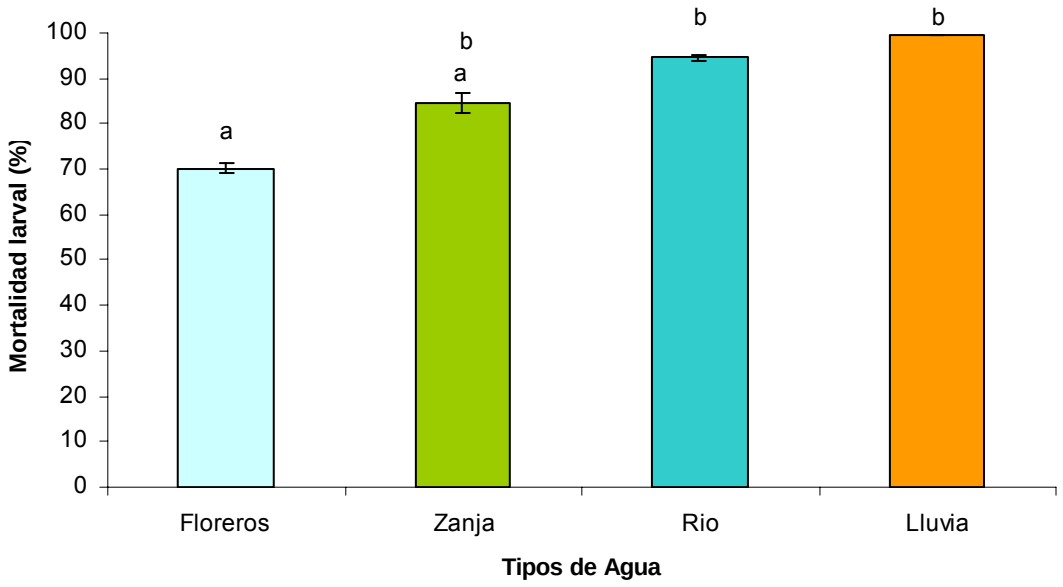


Figura 33: Mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* por *Leptolegnia chapmanii* en agua procedente de cuatro ambientes diferentes de desarrollo de culícidos.

Diferencias significativas determinadas por el test de Duncan, letras distintas indican significancia (P < 0,05).

5.14 Efecto individual y combinado de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, Temephos y *Leptolegnia chapmanii* sobre la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* en condiciones semi-naturales y de laboratorio.

La mortalidad registrada a las 48 horas en larvas de *A. aegypti* expuestas a dos dosis de *Bti*, dos dosis de Temephos y 94.000 zoosporas de *L. chapmanii* individualmente, combinadas de a dos y los tres larvicidas conjuntamente, se observan en la Tabla X.

Tipo de Combinación	(%) Mortalidad (Promedio ± DS)
A)1 E. L.	44,6 ± 2,5
B)0,00035 ppm Temephos	59,3 ± 5,8
C)0,001 ppm Temephos	97,3 ± 0,3
D)0,012 ppm Bti	33,3 ± 1,8
E)0,027 ppm Bti	61,3 ± 2
F)0,00035 ppm Temephos + 1 E. L.	89,3 ± 0,5
G)0,001 ppm Temephos + 1 E. L.	100 ± 0
H)0,012 ppm Bti + 1 E. L.	80 ± 2,6
I)0,027 ppm Bti + 1 E. L.	90,6 ± 1,3
J)0,012 ppm Bti + 0,00035 ppm Temephos	100 ± 0
K)0,027 ppm Bti + 0,001 ppm Temephos	100 ± 0
L)0,012 ppm Bti + 0,00035 ppm Temephos + 1 E. L.	100 ± 0
M)0,027 ppm Bti + 0,001 ppm Temephos + 1 E. L.	100 ± 0

Tabla X: Mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* expuestas a *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*, Temephos y *Leptolegnia chapmanii* individualmente o combinados.

La dosis mayor (0,001ppm) de Temephos produjo la mortalidad más elevada mientras que la dosis menor (0,00035ppm) de *Bti* causó el porcentaje menor de mortalidad cuando los tres larvicidas fueron ensayados individualmente (Figura 34).

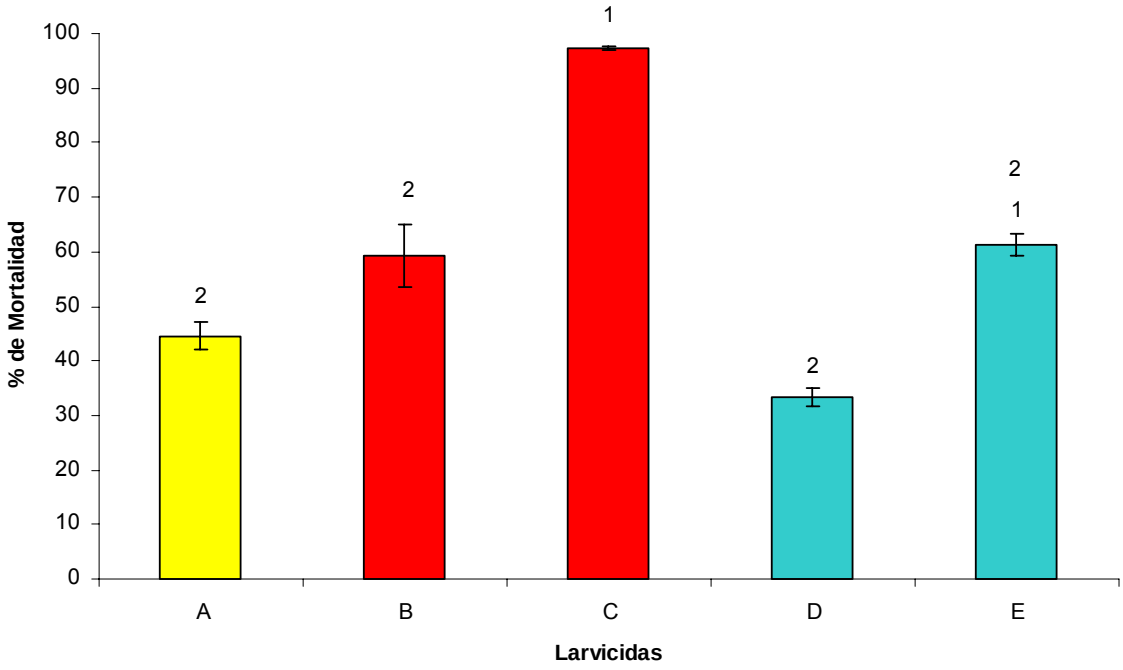


Figura 34: Mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* producida por Temephos (B-0,00035 y C-0,001ppm), Bti (D-0,012 y E-0,027ppm) y zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* (A-1 E. L.). (Significancia determinada por Dunkan, números distintos indican diferencias significativas).

* En los controles no se registro mortalidad de las larvas por ello no se incluyen en la figura.

Cuando los larvicidas se utilizaron combinados de a dos productos, la mortalidad se incrementó en general en todas las combinaciones, variando entre 80 y 100% (Figura 35).

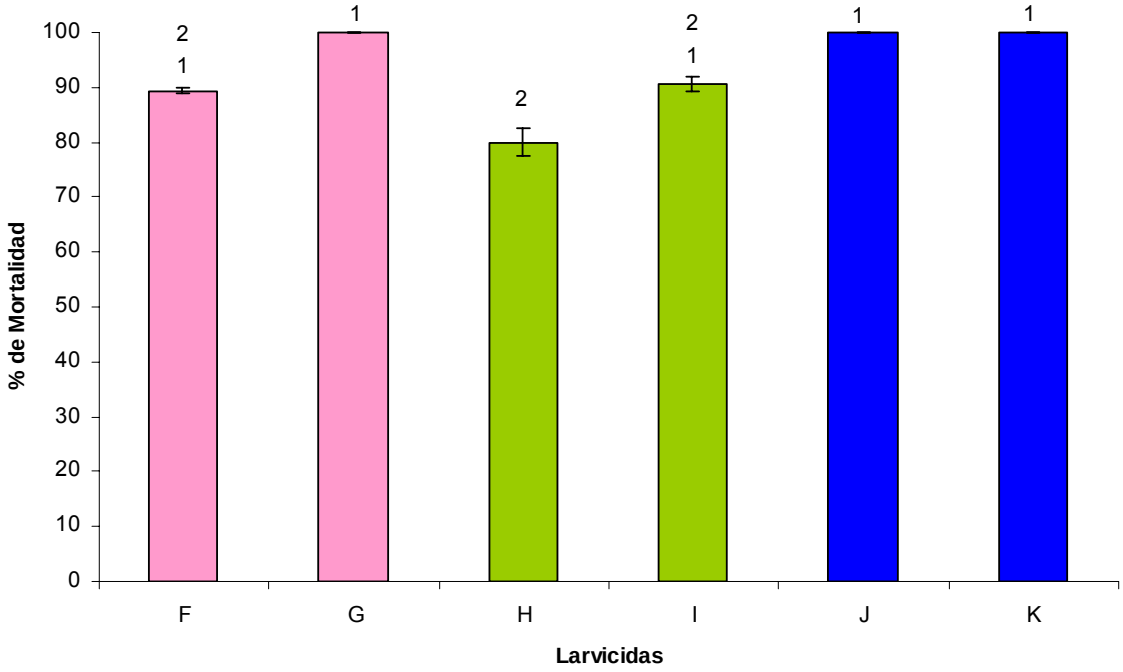


Figura 35: Mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* producida por Temephos (F-0,00035 y G-0,001ppm) + zoosporas (94.000zoosp), Bti (H-0,012 y I-0,027ppm) + 1 E. L. y Temephos (J-0,00035 y K-0,001ppm) + Bti (J-0,012 y K-0,027ppm). (Significancia determinada por Dunkan, números distintos indican diferencias significativas).

* En los controles no se registro mortalidad de las larvas por ello no se incluyen en la figura.

Finalmente cuando se evaluaron los tres larvicidas combinados la mortalidad fue 100% (Figura 36).

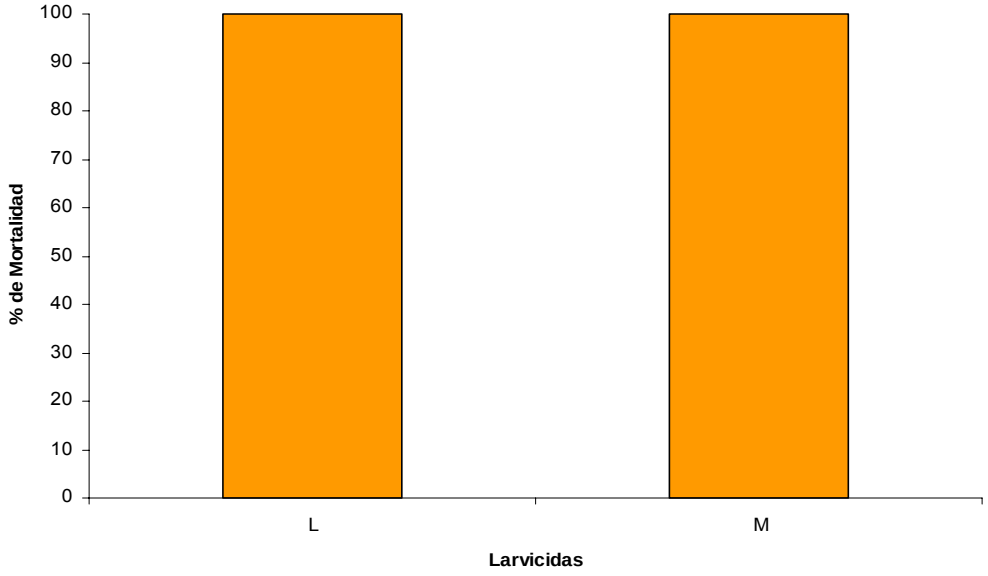


Figura 36: Mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* producida por Temephos (L-0,00035 y M-0,001ppm) + Bti (L-0,012 y M-0,027ppm) + zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* (L-M 1 E. L.) combinados.
* En los controles no se registro mortalidad de las larvas por ello no se incluyen en la figura.

En el ANVA de los tarros expuestos al sol como los de la sombra, primeramente se tomaron como factores inundaciones, tratamientos y días (como medidas repetidas). Todos los efectos principales como las interacciones resultaron significativas (P<0,0001), lo que indica distinta respuestas de los tratamientos ante las distintas inundaciones y días.

Como la interacción triple inundaciones*tratamientos*días (para sol y sombra) resulto altamente significativa, se estudio el comportamiento de la variable respuesta (%) para cada inundación por separado, esto nos permitió ver el comportamiento de los tratamientos a través de los días y estudiar sus perfiles. En este análisis se detectaron diferencias altamente significativas para los efectos principales días y tratamientos y para la interacción días * tratamiento (P<0,0001), en las tres inundaciones y para tarros expuestos tanto al sol como a la sombra.

Los 3 E. L. introducidos en los recipientes con *A. aegypti* en condiciones semi-naturales produjeron 95% ± 0,8 de mortalidad en los recipientes ubicados al sol y 100% en los colocados en la sombra al día 4 de la introducción (figuras

37 y 38 respectivamente). En los recipientes donde se introdujeron 1 ml de Temephos se determinó 100% de mortalidad al sol (figura 37) y a la sombra (figura 38) durante los primeros 3 y 4 días, respectivamente; mientras que en los recipientes en los que se introdujeron 1,5 ml de *Bti* la mortalidad fue 71,6% ± 3,2 al sol y 75% ± 2,4 a la sombra el día 1 (figura 37 y 38 respectivamente). En los recipientes en los que se agregaron zoosporas de *L. chapmanii* y temephos la mortalidad fue 100% hasta el día 9 inclusive, en los expuestos al sol y 100% hasta el día 10 inclusive en los ubicados en la sombra. Cuando se incorporaron zoosporas de *L. chapmanii* y *Bti* la mortalidad máxima obtenida fue 83,3% ± 0,4 en los recipientes colocados al sol (figura 37) y 88,3% ± 0,4 en los ubicados a la sombra (figura 38), a las 24 h de iniciado el ensayo. Cuando se combinaron temephos y *Bti* la mortalidad fue 100% hasta el día 9 y 10 inclusive, en los recipientes ubicados al sol y a la sombra, respectivamente (figuras 37 y 38). Las experiencias en las cuales se combinaron las dosis subletales de zoosporas de *L. chapmanii* con temephos y *Bti* la mortalidad registrada fue 100% hasta el día 12 y 13 inclusive, en los recipientes al sol y a la sombra, respectivamente (figura 37 y 38).

Las zoosporas de *L. chapmanii* produjeron mortalidad larval, aunque muy baja, hasta el día 11 inclusive de la tercera inundación de los recipientes ubicados al sol (1,3 % ± 0,8) y a la sombra (2,9 % ± 0,4) (figuras 41 y 42). El organofosforado temephos produjo mortalidad larval hasta el día 15 inclusive de la segunda inundación en los recipientes ubicados al sol (1 % ± 0) y a la sombra (1,8 % ± 0,4) (figuras 39 y 40). Las toxinas de *Bti* produjeron mortalidad hasta el día 7 inclusive de la segunda inundación tanto en los recipientes ubicados al sol (5,7 % ± 0,8) como a la sombra (5,7 ± 0) (figuras 39 y 40). Cuando se combinaron zoosporas de *L. chapmanii*, Temephos y *Bti* se registró mortalidad larval hasta el día 10 y 11 inclusive, al sol (2,9 % ± 0,9) y a la sombra (2,5 % ± 0,4) de la tercera inundación (figuras 41 y 42). En los recipientes donde se combinaron Temephos y *Bti* se registró mortalidad larval hasta el día 15 inclusive de la segunda inundación tanto al sol (1,2 % ± 0,4) como a la sombra (2,1 % ± 0,4) (figuras 39 y 40).

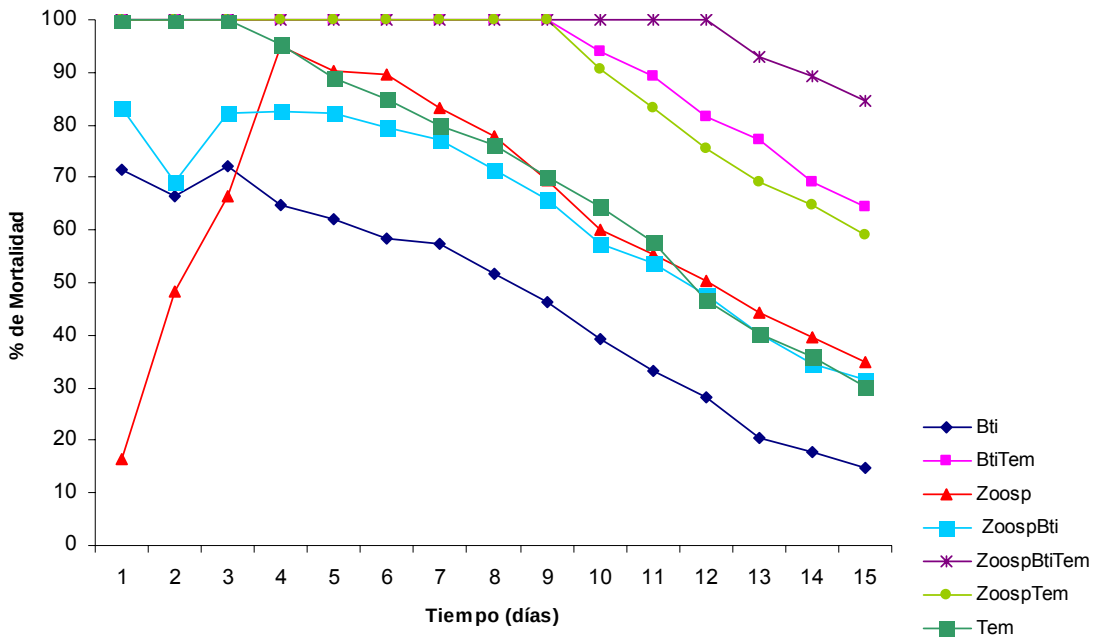


Figura 37: Mortalidad de las larvas en recipientes ubicados al sol durante la primera inundación (perfiles para cada uno de los tratamientos, cada punto es el promedio de las tres repeticiones).

Aquí se puede apreciar que en todos los tratamientos , salvo para las zoosporas de *L. Chapmanii*, el porcentaje de mortalidad va decayendo a medida que avanzamos en los días y por otro lado vemos que cuando los larvicidas estan combinados el porcentaje de mortalidad es mayor a cuando se encuentran por separado.

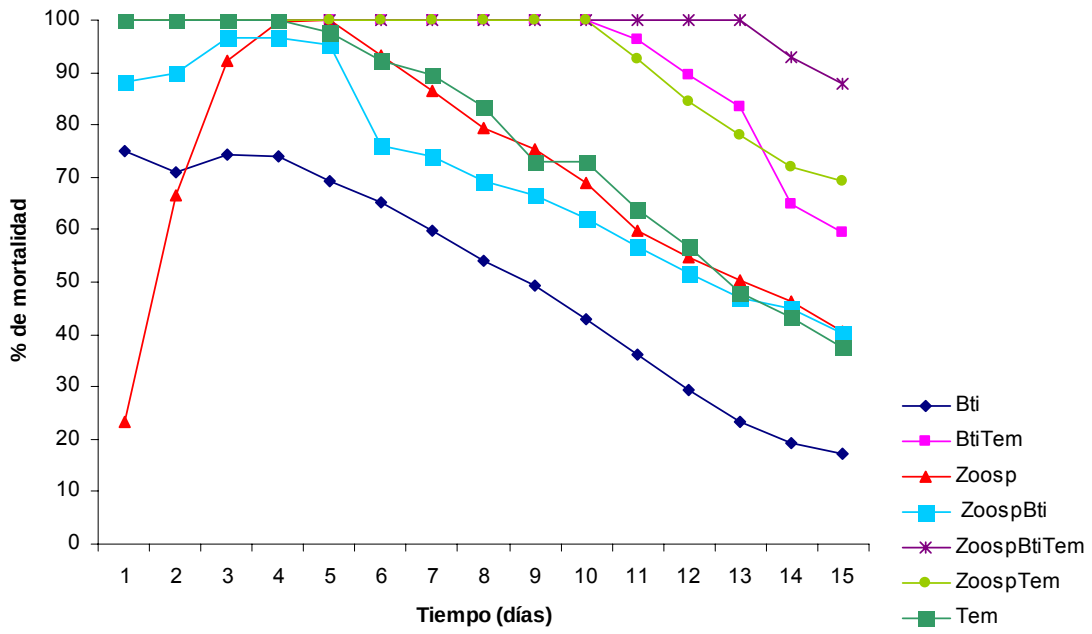


Figura 38: Mortalidad de las larvas en recipientes ubicados a la sombra durante la primera inundación (perfiles para cada uno de los tratamientos, cada punto es el promedio de las tres repeticiones).

Existen dos tratamientos (Bti y Temephos) en esta primera inundación a la sombra que comienzan a reducir su mortalidad a partir de los primeros días de exposición. En los restantes cuatro tratamientos se observa que el porcentaje de mortalidad se mantiene constante o se incrementa en igual lapso de tiempo.

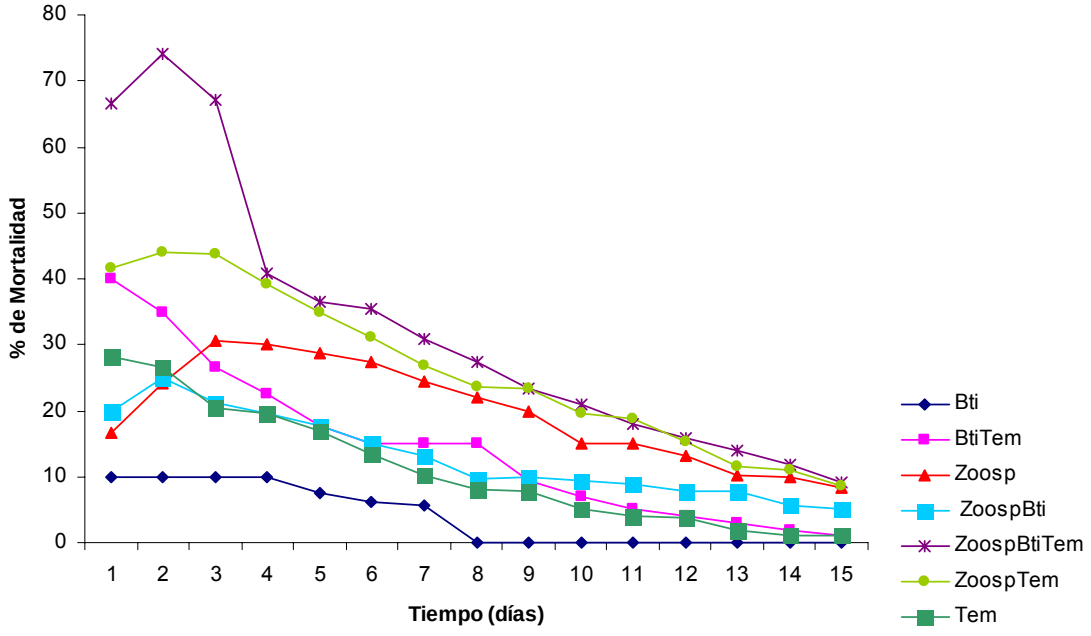


Figura 39: Mortalidad de las larvas en recipientes ubicados al sol durante la segunda inundación (perfiles para cada uno de los tratamientos, cada punto es el promedio de las tres repeticiones).

En esta segunda inundación al sol se observa que el porcentaje de mortalidad para cada uno de los tratamientos comienza a descender desde el primer día de exposición salvo en aquellos en donde intervienen zoosporas de *L. Chapmanii* ya sea solas o combinadas con los larvicidas Bti o Temephos.

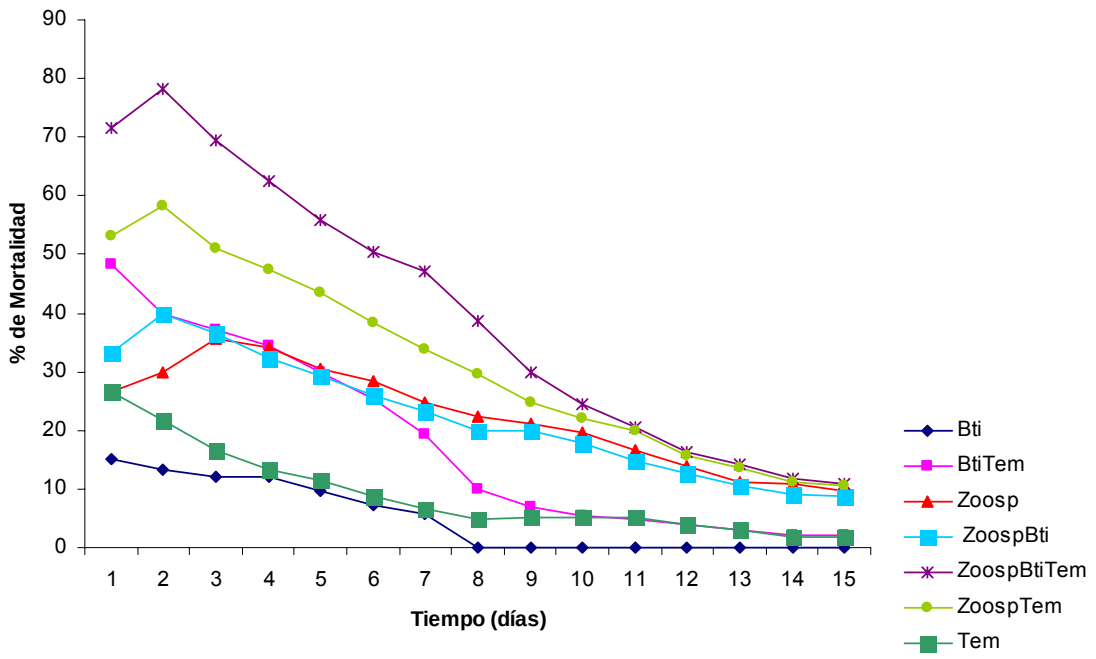


Figura 40: Mortalidad de las larvas en recipientes ubicados a la sombra durante la segunda inundación (perfiles para cada uno de los tratamientos, cada punto es el promedio de las tres repeticiones).

En esta segunda inundación a la sombra la mortalidad comienza a decrecer a partir de determinados días en los tratamientos Zoosp. , Zoosp-Bti, Zoosp-Tem y Zoosp-Bti-Tem, en el resto de los tratamientos la mortalidad comienza a decrecer a partir del primer día.

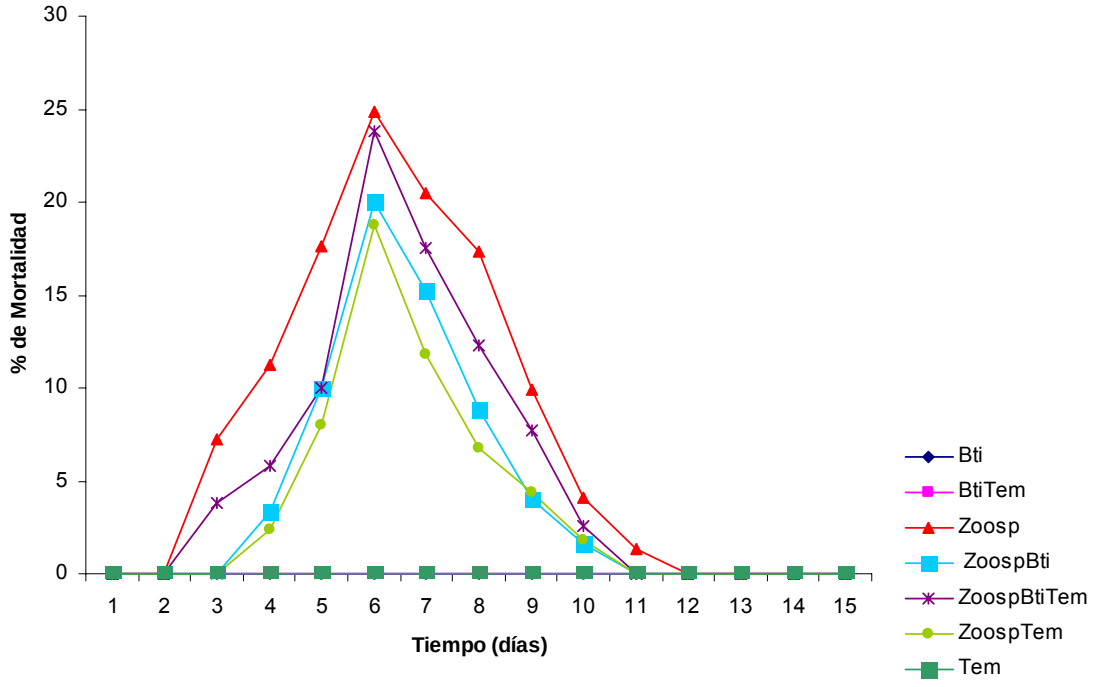


Figura 41: Mortalidad de las larvas en recipientes ubicados al sol durante la tercera inundación (perfiles para cada uno de los tratamientos, cada punto es el promedio de las tres repeticiones).

Existen tres tratamientos en esta tercera inundación al sol que no producen mortalidad, ellos son Bti, Tem y la combinación Bti-Tem. En los restantes cuatro tratamientos se observa que la mortalidad va en aumento hasta el día 6, para posteriormente en los días sucesivos decaer bruscamente hasta no observarse mortalidad alguna.

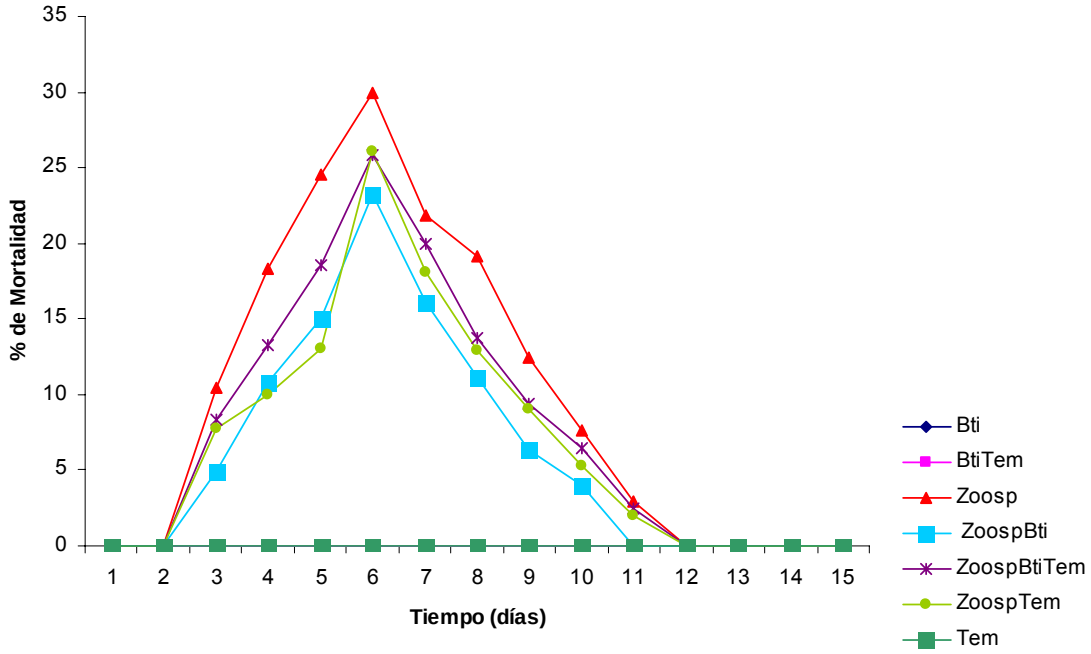


Figura 42: Mortalidad de las larvas en recipientes ubicados a la sombra durante la tercera inundación (perfiles para cada uno de los tratamientos, cada punto es el promedio de las tres repeticiones).

En esta tercera inundación a la sombra los tratamientos Bti, Bti-Tem y Tem, no producen mortalidad de las larvas, en el resto de los tratamientos se observa mortalidad la cual decrece con el transcurso de los días.

5.15 Evaluación de diferentes medios de cultivos en el desarrollo y crecimiento de *Leptolegnia chapmanii.*

El medio de cultivo Emerson (YPSS) fue el medio sólido más eficaz donde se produjeron mayor número de zoosporas de *L. chapmanii*, 77.152 ± 1.500 zoosporas/ml (24.852 móviles y 52.300 enquistadas) (Figura 43). El medio sólido que produjo el menor número de zoosporas fue PYG, peptona y glucosa con extracto de levadura 1%, con 62.400 ± 972,5 zoosporas/ml (52.400 enquistadas y 10.000 móviles) (Figura 43).

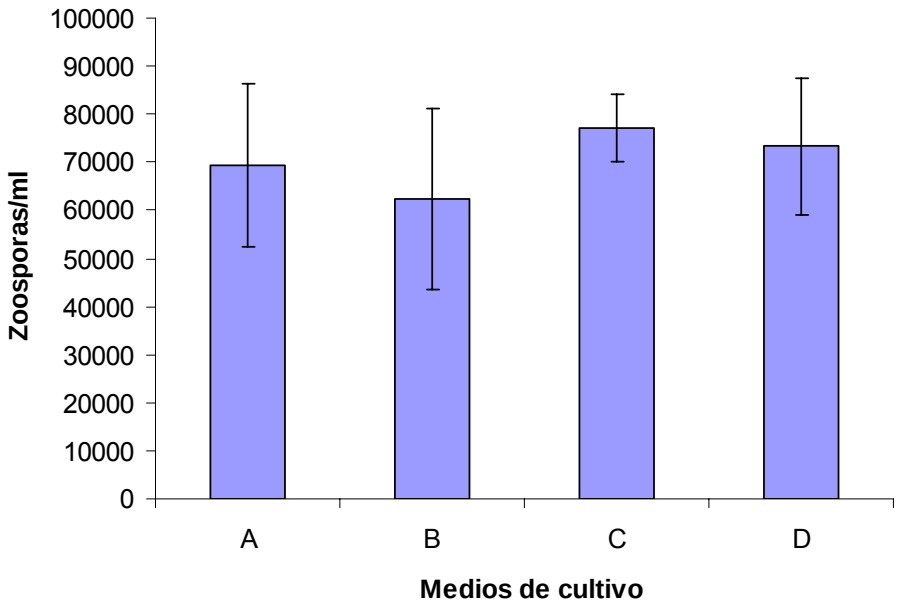


Figura 43: Producción *in vitro* de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* en cuatro medios de cultivo sólidos. (A= PYG completo; B= PYG; C= YPSS; D= PYG completo + SPE + aceite de sésamo).

5.16 Efecto de la luz solar sobre la infectividad de *Leptolegnia chapmanii.*

La mortalidad provocada por larvas de cuarto estadio de *A. aegypti* infectadas y muertas por *L. chapmanii* 48 horas post-infección y expuestas a la luz solar directa, fue 95,3 % ± 2,05 durante la primera semana de exposición (Figura 44), no registrándose mortalidad larval a partir de la segunda semana de exposición. La temperatura máxima y mínima promedio fueron 30,5 y 11,7 °C, respectivamente. Las larvas de *A. aegypti* utilizadas como inóculo que fueron colocadas a la sombra produjeron una mortalidad de 99,3 % ± 0,47 durante la primera semana de exposición con temperaturas máximas y mínimas de 26,8 y 10 °C, respectivamente, 36% ± 2,8 fue la mortalidad en la segunda semana con temperatura máxima de 25,9 °C y mínima 16,1 °C y en la tercera semana las zoosporas produjeron 23 % ± 2,4 de mortalidad (Figura 44) con temperatura máxima y mínima de 27 y 11 °C, respectivamente. No se registró mortalidad larval luego de la tercera semana de exposición en los recipientes ubicados en la sombra.

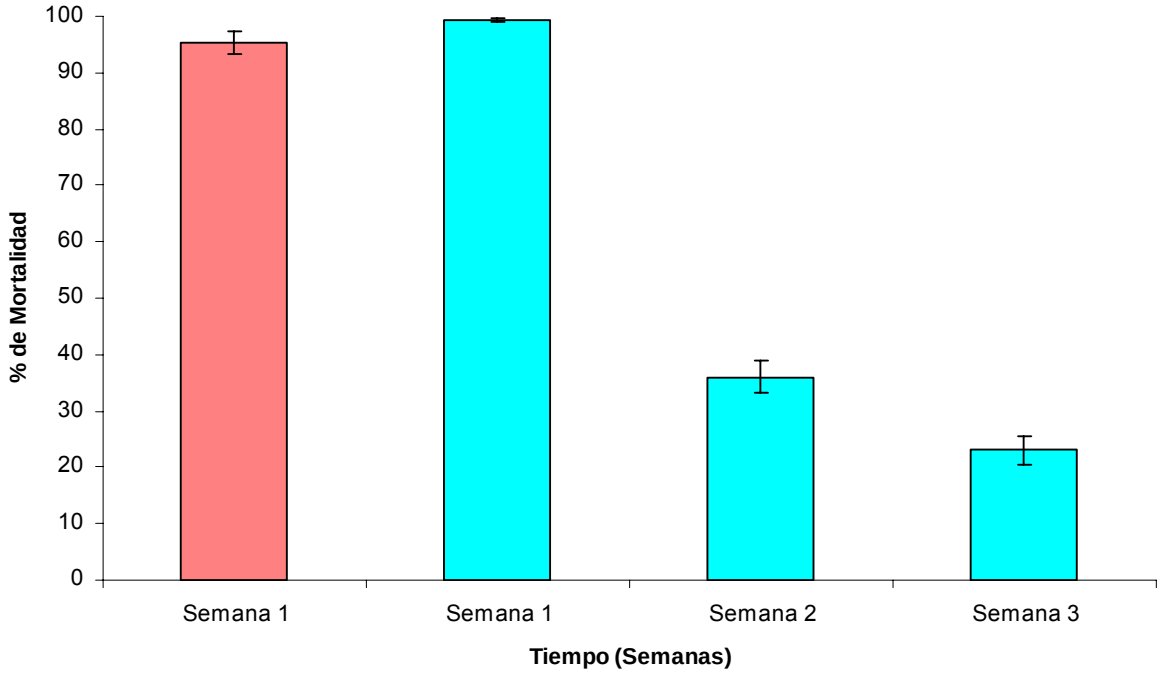


Figura 44: Mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* por zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* expuestas al sol (Barra salmón) y a la sombra (Barra turquesa).

5.17 Utilización de suspensiones de zoosporas versus larvas infectadas como inóculo.

Se diseñó una experiencia en el laboratorio para comparar la eficiencia como inóculo de *L. chapmanii* de larvas infectadas de cuarto estadio de *A. aegypti* a las 48h post-infección y una suspensión de zoosporas producidas *in vivo* o *in vitro*. Los resultados a las 48 horas registraron que no existieron diferencias significativas (Anova P< 0,01) entre el uso de la suspensión de zoosporas de *L. chapmanii* o larvas de *A. aegypti* infectadas y muertas con *L. chapmanii* 48 horas post-infección. La mortalidad registrada fue 82,2 % ± 2,3, 92,4 % ± 1,4 y 100 % ± 0, cuando se utilizaron 1, 2 y 3 E. L. (Figura 45), mientras que la mortalidad fue 81,7 % ± 1,2, 91,1 % ± 0,8 y 100 % ± 0 cuando se utilizaron suspensiones de 94.000, 188.000 y 282.000 zoosporas, respectivamente (número de zoosporas equivalente a las que produce 1, 2 y 3 E. L.) (Figura 46).

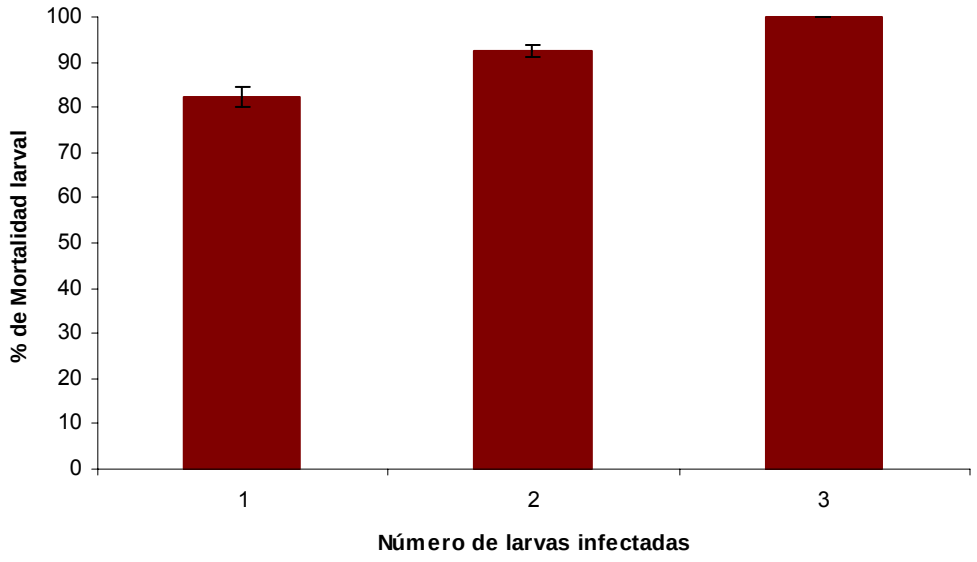


Figura 45: Mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* expuestas a 1, 2 y 3 E. L.

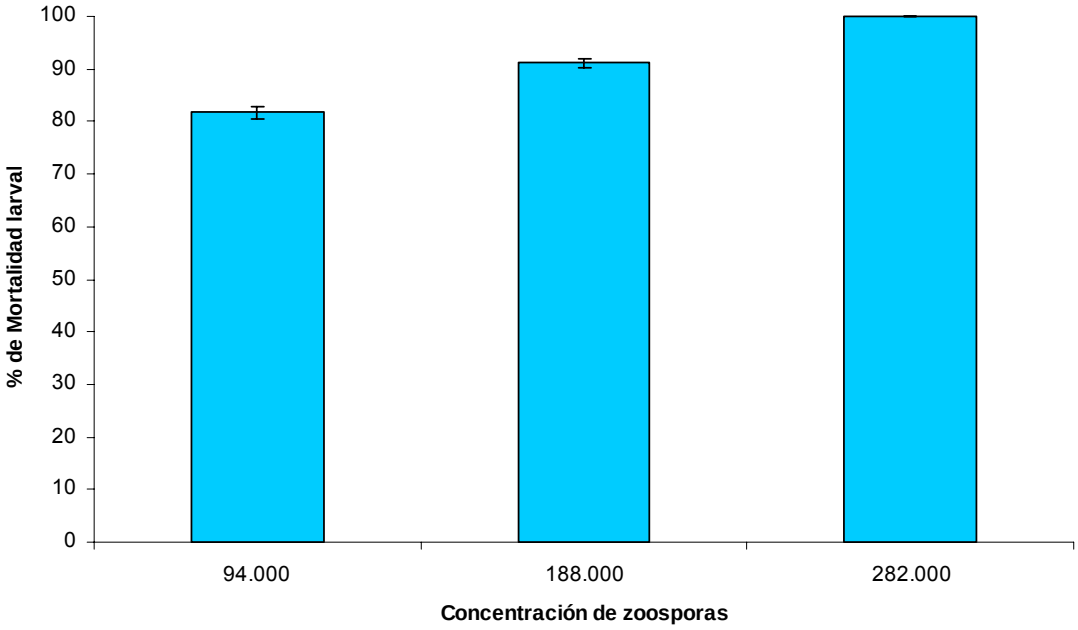


Figura 46: Mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* expuestas a tres concentraciones de zoosporas de *Leptolegnia chapmanii*.

5.18 Efecto de la introducción de *Leptolegnia chapmanii* en una población natural de *Aedes aegypti.*

La densidad de las larvas promedio en los 12 recipientes utilizados antes de la introducción de *L. chapmanii* fue 10,8 ± 4,5 larvas por recipiente ubicado en la sombra y de 10,1 ± 4,9 larvas por recipiente ubicado al sol. Una vez introducidas las zoosporas de *L. chapmanii* en los recipientes ubicados al sol y en la sombra en el cementerio de la ciudad de La Plata (Figura 47), se registró a las 48 horas de comenzado el ensayo una mortalidad larval de 54,5 % ± 9,7 en recipientes ubicados al sol en los que se introdujeron 3 equivalentes larvales-E.L. (Figura 48). En los recipientes ubicados en la sombra en los cuales se liberó similar concentración de zoosporas, la mortalidad larval promedio fue 59 % ± 5,07 (Figura 48). En los recipientes en los cuales la cantidad de inóculo introducido fue el doble, 6 E.L. la mortalidad larval promedio en recipientes al sol y en la sombra fue a las 48 horas 70,7 % ± 8,6 y 80,3 % ± 11,2, respectivamente (Figura 49). No registrándose mortalidad larval en los controles ubicados al sol y a la sombra.

Figura 47: Recipientes artificiales donde se desarrolla la población de estados inmaduros de *Aedes aegypti* en los que fueron introducidas zoosporas de *L. chapmanii* (Cementerio Municipal de La Plata).

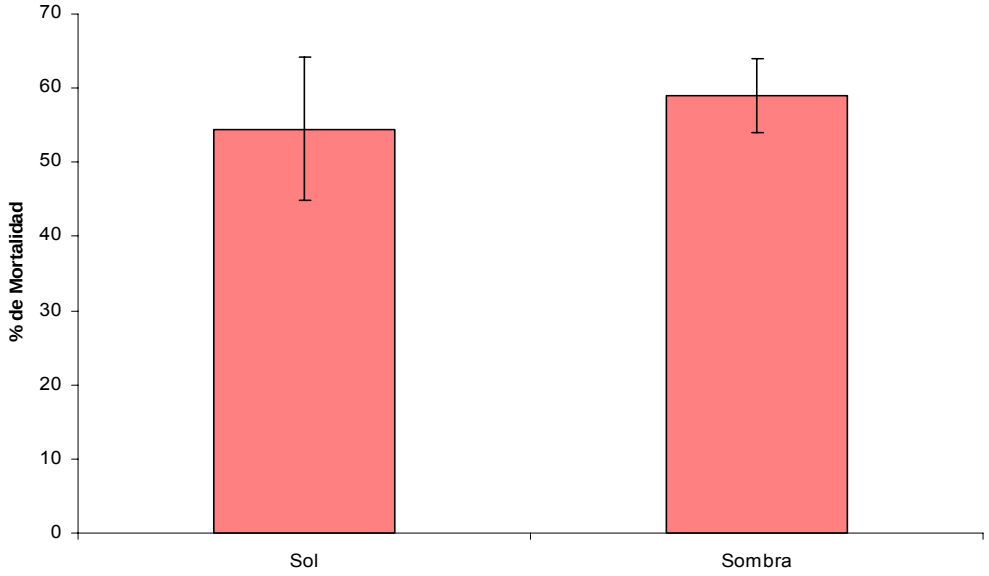


Figura 48: Mortalidad (%) larval en una población natural de *Aedes aegypti* en recipiente ubicados al sol y a la sombra, producida por la introducción de tres (=3E.L.) larvas de cuarto estadio de *Aedes aegypti* muertas por *Leptolegnia chapmanii*.

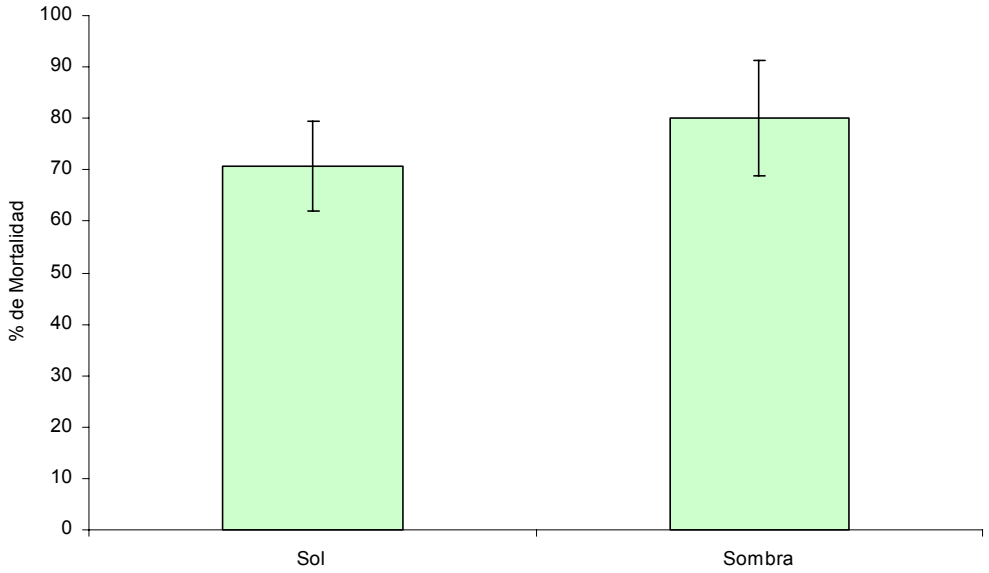


Figura 49: Mortalidad (%) larval en una población natural de *Aedes aegypti* en recipientes artificiales ubicados al sol y a la sombra, producida por la introducción de seis (=6E.L.) larvas de cuarto estadio de *Aedes aegypti* muertas por *Leptolegnia chapmanii* por recipiente.

En los recipientes ubicados en la sombra se observó la erradicación de las larvas de *A. aegypti* a los 15 y 22 días de introducidas los 3 y 6 E.L. de zoosporas, respectivamente, mientras que en los recipientes ubicados a la radiación directa del sol se observó la eliminación total de las larvas a los 28 y 39 días posteriores a la introducción de los 3 y 6 E.L. de zoosporas. No se registraron larvas en los recipientes tratados, aunque estaban presentes en los controles, en una densidad promedio de 15 $\pm$ 2,3 larvas por recipiente.

Las larvas de *A. aegypti* desaparecieron también de los controles ubicados al sol y en la sombra durante junio de 2006, reapareciendo las larvas a partir de diciembre de 2006 en los recipientes controles pero no en los recipientes tratados. A partir de febrero de 2007 se volvió a registrar la presencia de larvas de *A. aegypti* en 67% de los recipientes ubicados al sol y en 34% de los recipientes en la sombra donde se introdujo *L. chapmanii*. Cuando se colocaron trampas centinelas con larvas de *A. aegypti* de la colonia del CEPAVE en los recipientes tratados, no se observaron larvas infectadas por *L. chapmanii*.

DISCUSIÓN

El aislamiento de *L. chapmanii* (ARSEF 5499 – CEP 010) objeto de estudio de este trabajo de tesis fue aislado en cuerpos de agua temporaria parasitando larvas del mosquito de las inundaciones *Ochlerotatus albifasciatus* en la localidad de Melchor Romero, Partido de La Plata, Provincia de Buenos Aires. La distribución mundial conocida de esta especie se reduce a localidades en 3 estados en EE.UU. (Carolina del Sur, Florida y Ohio) (Seymour, 1984., Mc Innis & Zattau, 1982., Lord & Fukuda, 1988., Fukuda et al. 1997), siendo el aislamiento estudiado el único hallado en la región Neotropical. Los estudios de virulencia y patogenicidad en entomopátogenos no quedan limitados a nivel específico, sino que adquieren enorme relevancia las diferencias que presentan diferentes aislamientos de un patógeno, ya sea a partir de hospedadores y/o de localidades-ambientes distintos. Hasta el presente, la información relativa a este nuevo aislamiento de *L. chapmanii* se reduce a su hallazgo (López Lastra et al. 1999), sus relaciones filogenéticos y evolutivas con otros miembros del mismo género o grupo superior (Dick et al. 1999) y un estudio respecto al espectro de hospedadores susceptibles y su efecto sobre la fauna asociada en los criaderos de culícidos (López Lastra et al. 2004).

El ciclo de vida del entomopatógeno *L. chapmanii* es típicamente el de un oomycete saprolegniaceo (Zattau & Mc Innis, 1987). Los propágulos producto de la reproducción asexual (zoosporas) son los agentes o unidades infectivas y las oosporas los estados resistentes.

La infección de las larvas de culícidos tiene lugar por dos vías, por enquistamiento de las zoosporas móviles sobre la cutícula larval y por la germinación de las zoosporas ingeridas y enquistadas en el interior del tubo digestivo de las larvas. Por otro lado, como resultado de la reproducción sexual se desarrollan oosporas (esporas de resistencia) las cuales le permiten a *L. chapmanii* permanecer en el ambiente durante largos periodos de tiempo, particularmente cuando las condiciones de temperatura y humedad le son desfavorables. La capacidad de formar estados resistentes, sumado a que *L. chapmanii* puede infectar larvas de mosquitos utilizando dos vías diferentes, lo convierte a este patógeno en un valioso candidato como agente de control biológico de culícidos vectores en el mediano y largo plazo.

Las zoosporas de *L. chapmanii* requirieron un período de tiempo breve para infectar larvas de *A. aegypti*. En el presente estudio quedó demostrado que un período tan breve como dos minutos, fueron necesarios para las zoosporas de *L. chapmanii* para encontrar y adherirse a la cutícula de las larvas y/o ser ingeridas por las larvas de *A. aegypti*. Este período breve que requiere *L. chapmanii* para ponerse en contacto con las larvas hospedadoras, permite hipotetizar la existencia de factores de atracción y/o estímulos y/o conductas de la larva y/o de las zoosporas de *L. chapmanii* que favorezcan el encuentro hospedador-parásito. Con referencia a la existencia de factores de atracción, Clark et al. (1966), demostraron que las zoosporas de *Pythium* sp. incrementaban sensiblemente su actividad en presencia de larvas de *A. sierrensis* (Ludlow), adjudicando este comportamiento al quimiotactismo positivo de las zoosporas. La presencia de factores de atracción y/o cambios en la conducta de *L. chapmanii* y/o larvas de *A. aegypti* cuando ambas están en el mismo ambiente, no ha sido investigada en este estudio ni por otros autores anteriores, tampoco se ha investigado en *Lagenidium giganteum* (Couch) ni en otras especies acuáticas parásitas de culícidos.

Los registros de invasión de organismos acuáticos por vía de ingestión de formas infectivas presentan escasos registros en la literatura. La mayoría de los estudios han priorizado la vía de adhesión de los propágalos a la cutícula de los insectos y en raras ocasiones han mencionado la ingestión de zoosporas como vía alternativa y/o complementaria para las infecciones de estos patógenos. En este estudio se demostró mediante técnicas histológicas la germinación y el crecimiento vegetativo de las zoosporas de *L. chapmanii* en el interior del tubo digestivo de las larvas de *A. aegypti*, confirmando y profundizando la información parcial y fragmentaria existente (Zattau & Mc Innis, 1987). La germinación de propágulos infectivos en el tubo digestivo de larvas de culícidos, también fue registrada previamente en conidios del hongo patógeno de culícidos, *Culicinomyces clavisporus* (Sweeney, 1975).

Las células del epitelio intestinal de las larvas expuestas a *L. chapmanii* presentaron una notable vacualización y alteración de la disposición normal de las células sobre la membrana basal, sugiriendo la existencia de cambios en las estructuras de unión celular, que pudiesen haber generado la separación de los componentes celulares y la consecuente alteración de la continuidad tisular.

También se observaron alteraciones en el tejido conectivo y muscular de la pared del tubo digestivo. Cambios similares fueron registrados por Weiser y Mat'ha (1988a,b) y Mat'ha et al. (1992) en larvas de mosquitos infectadas con el hongo *Tolypocladium* sp. quienes describieron alteraciones celulares y tisulares como las descritas en *L. chapmanii*, adjudicándolas a la presencia de micotoxinas producidas por ese hongo. Moléculas con algún tipo de actividad biológica producidas por *L. chapmanii* no han sido investigadas hasta el presente, pero sospechamos que las alteraciones celulares registradas en este estudio pudiesen ser producto de la actividad biológica de moléculas secretables o no, pero finalmente responsables de los cambios celulares y titulares observados en las larvas de *A. aegypti* infectadas con *L. chapmanii*. En el mismo sentido y constituyendo otra potencial evidencia de la existencia de micotoxinas, hemos registrado la mortalidad temprana (dos-tres horas post-infección) de larvas en la mayoría de los bioensayos que se realizaron en este estudio, y luego de haber descartado que la muerte fue producto del crecimiento vegetativo de *L. chapmanii* se sugirió la existencia de moléculas con actividad biológica tóxica para larvas de dípteros. Además de las evidencias histopatológicas halladas en esta investigación sobre ambos modos de infección de las zoosporas de *L. chapmanii*, también estas vías de infección han quedado demostradas a través de los porcentajes de mortalidad observados en las larvas infectadas por ingestión exclusivamente o a través de ambas rutas, 35 y 75 %, respectivamente. Estos porcentajes no sugieren la preponderancia de un modo sobre el otro o cual de las vías constituiría el mecanismo principal de infección para las zoosporas de *L. chapmanii*. La presencia de formas infectivas móviles como las zoosporas biflageladas en *L. chapmanii* sugiere que el contacto, enquistamiento y posterior penetración a través de la cutícula pudiese ser el mecanismo primario de infección mientras que la ingestión y germinación de los quistes en el tubo digestivo sería un mecanismo alternativo y complementario, en principio menos eficiente en el proceso de infección de las larvas de culícidos. La existencia de dos modos de ingreso al hospedador en *L. chapmanii* bien pudiese haber evolucionado como una estrategia ecológica relacionada con la persistencia del patógeno en el medio motivada por la amplia diversidad de hábitat y hospedadores culícidos que posee y son susceptibles a *L. chapmanii* (López Lastra et al. 2004).

La determinación de las características biológicas de este primer aislamiento neotropical de *L. chapmanii* y del efecto de diversos factores bióticos y abióticos sobre la biología, patogenia, dispersión y persistencia de este aislamiento han constituido la cuestión central de este trabajo de tesis, respondiendo a la necesidad de profundizar el conocimiento de este patógeno para determinar fehacientemente las potencialidades que posee como agente de control biológico de *A. aegypti*.

La profundización del conocimiento de las zoosporas, estados infectivos asexuales de *L. chapmanii*, han ocupado gran parte del esfuerzo dedicado a esta investigación. Esto es debido a que hasta el presente, las zoosporas son el estado por excelencia a ser considerado como inóculo en las introducciones a campo o en futuros productos larvicidas que pudiesen surgir en el mercado con base en *L. chapmanii*. En este sentido se determinó que la capacidad de las zoosporas de *L. chapmanii* para encontrar e infectar larvas de *A. aegypti* no dependió exclusivamente de la concentración de zoosporas utilizada, sino también, de la superficie del recipiente en el cual se realizó la infección y de la densidad larval presente en el recipiente. Contrariamente, el volumen de agua en los recipientes de cría no afectó los niveles de parasitismo en las larvas de culícidos expuestas a *L. chapmanii*. La falta de efecto del volumen sobre los niveles de infección pudiese estar relacionada con el comportamiento de las zoosporas en el proceso de búsqueda de las larvas, por ejemplo el desplazamiento de los estados infectivos exclusivamente por la superficie del agua, y/o deberse a que las larvas de culícidos permanecen suspendidas de la superficie del agua por el sifón durante largos períodos de tiempo para respirar facilitando el contacto con las zoosporas. La superficie de los criaderos y la densidad de larvas presente en los sitios de cría son factores limitantes para la propagación y persistencia de *L. chapmanii* en condiciones naturales, debiendo ser determinados previamente a que el aislamiento nativo de *L. chapmanii* sea introducido en los ambientes de cría de *A. aegypti* u otra especie de culícido de importancia sanitaria cuyo control se intente.

La temperatura es un factor clave en el desarrollo de *L. chapmanii*, afectando la producción de zoosporas en larvas de *A. aegypti* infectadas (*in vivo*) y en medios artificiales de cultivo (*in vitro*). La producción de zoosporas de *L. chapmanii* fue notoriamente afectada por las temperaturas extremas

obteniéndose el número máximo de zoosporas a 25ºC. En otras especies como *Saprolegnia parasitica* Coker *y S. diclina* Humphrey la mayor producción y movilidad de las zoosporas se observó a 10 ºC , mientras que a 20 ºC la movilidad y producción de zoosporas se redujo notoriamente hasta detenerse a 30 ºC (Dieguez-Uribeondo, 1995).

La longevidad e infectividad de las zoosporas producidas *in vivo* (51 días) duplicó los valores registrados en zoosporas producidas *in vitro* (35 días), siendo en ambos casos períodos llamativamente prolongados y que constituyen otra característica relevante de la biología de este patógeno y que refuerza sus cualidades como candidato a agente de control biológico de culícidos vectores. La disminución de la patogenicidad y virulencia en entomopatógenos cuando fueron producidos en medios artificiales por períodos prolongados no es un hecho inusual y ha sido citado en varias especies, constituyendo una característica negativa para aquellas especies con potencialidades para ser utilizadas como agentes de control biológico de insectos perjudiciales (Hall, 1980; Fargues & Robert, 1983; Mc Coy et al. 1988; Boucias & Pendland, 1998). La reducción de la patogenicidad de los hongos entomopatógenos cuando se producen en medios artificiales afecta sensiblemente una de las principales ventajas que presentan los hongos como bioinsecticidas, la facilidad de producirlos en medios sólidos y líquidos. El número menor de zoosporas de *L. chapmanii* obtenidas *in vitro* respecto de las producidas en larvas infectadas pudiera obedecer entre otras causas, a la menor riqueza en nutrientes y factores de crecimiento presentes en los medios de cultivo utilizados para la producción de *L. chapmanii* comparados con los presentes en la hemolinfa de las larvas hospedadoras.

Leptolegnia chapmanii puede producir zoosporas *in vitro* e *in vivo* dentro de un amplio rango de temperaturas, siendo el valor óptimo 25 ºC. Estudios similares fueron llevados a cabo en otras dos especies de patógenos de culícidos, *L. giganteum* y *Crypticola clavulifera* Humber, Frances & Sweeney (Oomycete, Lagenidiales) habiéndose registrado resultados muy cercanos a los obtenidos en este estudio para *L. chapmanii*. La producción *in vitro* de zoosporas en *L. giganteum* se registró dentro de un rango de temperaturas entre 15 y 35 ºC con temperaturas óptimas entre 21 y 27 ºC (Jarowski et al. 1983), mientras que para *C. clavulifera* la temperatura óptima de producción de

zoosporas varió entre 20 y 25 ºC, no registrándose producción a 30 ºC (Frances, 1991). Las temperaturas para la producción de zoosporas fueron similares para *L. giganteum, C. clavulifera* y *L. chapmanii*, si bien esta última puede producir zoosporas a 10 y 35 ºC lo cual le permitiría desarrollarse en ambientes de cría de culícidos con temperaturas extremas. Respecto a la cantidad de zoosporas de *L. giganteum* producidas *in vitro* e *in vivo* los valores promedios fueron 1,7-3,8 x 10^7 zoosporas (Jaronski et al. 1983) y 1,8 x 10^5 zoosporas (Umphlett & Huang; 1972), respectivamente. Estos valores son superiores a los obtenidos en *L. chapmanii* los cuales fueron 9,6 x 10^4 zoosporas en larvas de mosquitos y de 7,58 x 10^4 zoosporas obtenidas *in vitro*, ambos a 25 ºC. Este aislamiento de *L. chapmanii* puede infectar y matar larvas de *A. aegypti* dentro de un rango amplio de temperatura. *L. chapmanii* no resultó infectivo a temperaturas extremas de 5 y 40 ºC. Los estadios tempranos de *A. aegypti* fueron más susceptibles que los estadios tardíos y las pupas, siendo este último el estado más refractario a la infección por zoosporas de *L. chapmanii*. El mayor porcentaje de mortalidad se registró entre 20 y 25 ºC para todos los estadios larvales de *A. aegypti*.

Lagenidium giganteum es un promisorio agente de control biológico que se comercializa actualmente como larvicida para el control de culícidos. Los aislamientos de *L. giganteum* provenientes de Carolina del Norte y Luisiana (EE.UU.) produjeron las mayores tasas de infección a una temperatura entre 21-29 ºC, reduciéndose los porcentajes de mortalidad notablemente a valores sobre 29 ºC y por debajo de 21 ºC, deteniéndose completamente la infección en larvas por debajo de 15 ºC y por encima de 35 ºC (Jaronski et al. 1983).

La tolerancia térmica diferencial que presentan los aislamientos de *L. chapmanii* y *L. giganteum* constituye un factor que limita la amplitud de ambientes donde pueden ser introducidos estos aislamientos, aunque la mayoría de los ambientes donde se desarrollan los culícidos se ubican dentro de las temperaturas que toleran estos patógenos.

Crypticola clavulifera es otra especie de oomycota que ha sido considerado como un potencial agente de control biológico para dípteros de importancia médica, especialmente mosquitos, ha sido encontrado en larvas de *Forcipomyia marksae* Tokunaga (Díptera: Ceratopogonidae) en Australia en 1985 y fue infectivo también para larvas de mosquitos (Frances et al. 1989). La

biología de *C. clavulifera* es típica de Lagenidiales y similar a la de *L. giganteum* y *L. chapmanii*. Frances (1991) estudió el rango de hospedadores susceptibles a *C. clavulifera* y el rango térmico dentro del cual esta especie produjo mortalidad larval, observando que la infección fue inhibida a 30 ºC, a esta temperatura *C. clavulifera* no produce zoosporas, diferenciándose de *L. chapmanii* que produce mortalidad larval inclusive a 35 ºC. El mismo autor determinó que el porcentaje de mortalidad más elevado se observó a 20 y 25 ºC, coincidiendo con lo registrado para el aislamiento nativo de *L. chapmanii*. En estudios llevados a cabo en *Culicinomyces* sp. (Sweeney, 1978) se registraron resultados similares a los de *C. clavulifera*, produciendo infección en las larvas expuestas desde los 15 ºC hasta los 27 ºC aunque resultando la infección inhibida a 30 ºC.

Mc Innis & Zattau (1982) determinaron que el aislamiento de *L. chapmanii* de Carolina del Sur (EE.UU.) produjo 100 % de mortalidad en larvas de *A. aegypti* de primero y segundo estadio a 25 ºC, coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio, aunque la mortalidad producida en larvas de *A. aegypti* de tercero y cuarto estadio se redujo a 31 y 12 %, respectivamente, siendo los porcentajes de mortalidad para estos mismos estadios larvales de 100 y 99 %, respectivamente, con el aislamiento nativo. En el mismo trabajo Mc Innis & Zattau (1982) determinaron que ese aislamiento de *L. chapmanii* no produjo mortalidad larval por sobre 30 ºC, contrariamente este aislamiento nativo infectó y mató las larvas expuestas hasta 35 ºC. Lo que se pudo observar en nuestros resultados y en otros llevados a cabo alrededor del mundo es que la mortalidad larval es siempre mayor en larvas de estadios tempranos (primero y segundo) que en los más tardíos (tercero y cuarto) y en pupas, condición observada en la mayoría de los entomopatógenos. Esta infección diferencial relacionada con la edad de los ejemplares pudiese deberse al engrosamiento progresivo que se produce en el tegumento larval, aún más pronunciado en pupas, además los porcentajes de infección están reducidos en las larvas tardías de cuarto estadio y pupas ya que no se alimentan, impidiendo en estas etapas del desarrollo los niveles complementarios de infección provocados por la ingestión de zoosporas enquistadas.

Leptolegnia chapmanii toleró un amplio rango de valores de pH en condiciones de laboratorio produciendo grandes tasas de infección en las larvas de *A. aegypti* expuestas. Mortalidad de 60 % fue registrada en agua con pH de 4 a 10, rango que presentan la mayoría de los hábitat de mosquitos del planeta (Mac Gregor, 1929; Laird, 1988). Lord & Roberts (1985) determinaron diferencias significativas en la producción de zoosporas por parte de varios aislamientos de *L. giganteum* en medios artificiales con pH entre 4,5 y 8,4.

El desarrollo *in vitro* de este aislamiento nativo de *L. chapmanii* fue afectado negativamente por la presencia de ClNa en el medio de cultivo. Lord et al. (1988) determinaron que concentraciones superiores a 5 ppm de ClNa estimularon el crecimiento del micelio en *L. chapmanii* aislado de una larva de *Culex* sp. colectada de los bordes de un ambiente de aguas salobres en Florida, EE.UU. A mayores concentraciones de ClNa se observó una progresiva inhibición del desarrollo del micelio de este aislamiento de Florida, deteniéndose el mismo a concentraciones de 20 ppm. Estos resultados fueron similares a los observados en cultivos *in vitro* de *L. giganteum* con distintas concentraciones de ClNa (Merriam & Axtell; 1982).

Diferencias significativas en la mortalidad de larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens* se hallaron en este estudio, cuando se expusieron zoosporas de *L. chapmanii* en agua destilada con diferentes concentraciones de ClNa. Las distintas concentraciones salinas no afectaron la tasa de mortalidad de las larvas de *A. aegypti* por las zoosporas de *L. chapmanii*, contrariamente afectaron significativamente la mortalidad de larvas de *C. pipiens.* La susceptibilidad diferencial observada entre las dos especies hospedadoras cuando fueron expuestas al mismo inóculo en distintas concentraciones salinas no podemos interpretarla y debería dar lugar a futuras investigaciones tendientes a dilucidar este fenómeno. La viabilidad e infectividad de las zoosporas de *L. chapmanii* no resultaron afectadas por elevadas concentraciones salinas, sin embargo el desarrollo vegetativo de *L. chapmanii* resultó sensiblemente afectado. Una interpretación preliminar y sencilla de estos resultados pudiera ser que el medio de cultivo utilizado en este trabajo y con el cual fue realizado el ensayo (Emerson YPSS) contenía sales, condición que lo diferenció del medio de cultivo (SDA) utilizado para el aislamiento de *L. chapmanii* de Florida, pudiendo interpretarse *a priori* que las diferencias entre

ambos aislamientos de *L. chapmanii* se deberían a requerimientos culturales respecto del contenido y tipos de sales presentes en el medio de cultivo utilizado.

En contraste con el aislamiento argentino de *L. chapmanii*, *L. giganteum* no puede infectar larvas de culícidos en aguas que contengan concentraciones de ClNa por encima de 1 ppm (Merriam & Axtell, 1982; Lord & Roberts, 1985). Esta característica ha constituido una importante limitación para la diversidad de hábitat donde pudiera ser introducido exitosamente *L. giganteum*, ya que la salinidad de la mayoría de los sitios de cría de culícidos en el planeta varía desde 1 hasta raramente, 20 ppm (Petersen & Chapman, 1970; Laird, 1988). También debería tenerse en cuenta al momento de interpretar la tolerancia de este aislamiento de *L. chapmanii* a elevadas concentraciones de ClNa, que este aislamiento fue obtenido a partir de larvas de *Oc. albifasciatus*, culícido neotropical de amplia distribución en la Argentina y que ha sido citado frecuentemente criando en cuerpos de agua salobres (Bachmann & Casal, 1962), aun cuando los hallazgos de este aislamiento fueron realizados en cuerpos de agua dulce ubicados en la localidad de Melchor Romero, partido de la Plata, Provincia de Buenos Aires (López Lastra et al. 1999).

Los resultados de este trabajo nos permiten inferir que el aislamiento nativo de *L. chapmanii* presenta una amplia tolerancia a la temperatura, pH y salinidad de los ambientes, por lo que no deberían ser considerados factores limitantes para la introducción de este aislamiento en la mayoría de criaderos de culícidos en el mundo y particularmente en aquellos donde se desarrolla *A. aegypti*. Las condiciones abióticas y bióticas de los ambientes donde se desarrollan los culícidos son muy variables tal como lo describe Laird (1988) en su completa obra sobre los hábitats de larvas de mosquitos alrededor del mundo. Aun cuando este aislamiento tolera amplios márgenes de temperatura, pH y salinidad, una de las variables más relevantes es la complejidad físico-química del agua de los criaderos. El efecto de la calidad y características físico-químicas del agua de los criaderos de mosquitos sobre la infectividad de *L. chapmanii* fue otro de los factores abióticos que se investigaron en este estudio. Los cuatro tipos de agua que se evaluaron correspondieron al agua de los criaderos donde se desarrollan los culícidos más abundantes e importantes desde el punto de vista sanitario en la provincia de Buenos Aires y en amplias

áreas de la Argentina y la región Neotropical. Estas especies son *A. aegypti*, el mosquito vector de dengue en América que se desarrolla preferentemente en recipientes artificiales tales como agua de lluvia acumulada en cubiertas de automóvil, floreros en cementerios y todo tipo de recipiente que acumule agua; *C. pipiens*, el mosquito de los domicilios, que habita preferentemente en ambientes relacionados con el hombre, tales como recipientes artificiales como los mencionados para *A. aegypti* y zanjas de desagüe con elevados niveles de materia orgánica y en ocasiones productos de uso domiciliario o industrial como lavandina, detergente, jabón, etc. La tercera especie es *Oc. albifasciatus*, vector de algunas arbovirosis, conocido como el mosquito de las inundaciones, es la especie que produce mayores inconvenientes a los habitantes y animales domésticos en la Argentina por los numerosos adultos que emergen a los 10 días, aproximadamente, de la inundación de los ambientes deprimidos donde las hembras colocaron los huevos. El agua necesaria para la inundación de los ambientes de *Oc. albifasciatus* proviene generalmente de lluvias intensas y/o prolongadas y/o de los desniveles de arroyos y ríos como sucede en el área Platense cuando el Río de La Plata incrementa sensiblemente su nivel, generalmente por acción del viento intenso de dirección sudeste. El aislamiento nativo de *L. chapmanii* tuvo un comportamiento exitoso en los cuatro tipos de agua evaluados, produciendo elevados niveles de mortalidad larval independientemente del tipo y características del agua. La elevada mortalidad que produjo *L. chapmanii* en las diferentes calidades de agua marcó una diferencia notable con los resultados hallados por otros autores en estudios similares con *L. giganteum*. Las diferencias observadas en la mortalidad larval por *L. chapmanii* entre los cuatro tipos de agua evaluados no son tan marcadas como las que se registraron en *L. giganteum* que infectó casi exclusivamente larvas expuestas en aguas claras y libres de materia orgánica. *Lagenidium giganteum* infectó entre 27 y 100 % de las larvas de *C. quinquefasciatus* expuestas en agua con bajos niveles de contaminación y materia orgánica, mientras que no registraron infecciones en agua con niveles moderados a altos de contaminación y materia orgánica (Jaronski & Axtell, 1982). Algunas características de aguas contaminadas como los niveles bajos de oxígeno disuelto, pH extremo y gran número de otros microorganismos presentes en el agua hacen que la infectividad y efectividad de las zoosporas de *L. giganteum*

sea escasa o nula (Lord & Roberts,1985). También la temperatura elevada del agua y los altos niveles de contaminación orgánica pueden limitar la infección de mosquitos por *L. giganteum* (Fetter-Lasko & Washino, 1978; Hallmon et al. 2000). Sin embargo *L. giganteum* fue un muy buen agente de control de larvas de *An. nigromaculis* (Ludlow) en pasturas y de *C. tarsalis* (Loquillett) en campos de arroz (Washino et al. 1976; Christensen et al. 1977).

En lo que respecta al tiempo requerido por *L. chapmanii* para producir la muerte de las larvas de *A. aegypti*, se determinó una mortalidad elevada en la primera hora de exposición, fenómeno que sólo pudiese ser explicado por la presencia de micotoxinas con potente acción biológica en el medio. La producción de metabolitos secretados o no al medio por *L. chapmanii* no pudo ser determinado en este estudio, aunque debería ser motivo de investigaciones en un futuro cercano. La detección de metabolitos con acción larvicida u otra acción biocida en hongos entomopatógenos acuáticos carece de antecedentes. Contrariamente, la presencia de micotoxinas con potente acción larvicida y/o antimicrobiana ha sido citada en varios hongos entomopatógenos, preferentemente hongos patógenos de insectos terrestres como *Beauveria bassiana* (Vuil), *B. brongniartii* (Petch); *Tolypocladium*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Metarhizium* (Ferro, 1978; Roberts, 1981; Mc Coy et al. 1988; Cerenius et al. 1990; Gupta et al. 1992; Matha et al. 1993; Dumas et al. 1996).

También se ha demostrado que la concentración de zoosporas tiene una relación directa con la mortalidad de las larvas expuestas. Se determinó que la concentración de zoosporas necesaria para producir la muerte de 25 larvas de *A. aegypti* en cuarto estadio a las 48 horas a 25 ºC, fueron aproximadamente 282.000 zoosporas o su equivalente larval = tres larvas de cuarto estadio infectadas luego de 48 h en una superficie aproximada de 100 cm^2. López Lastra et al. (2004) condujeron ensayos de patogenicidad y espectro hospedador con el mismo aislamiento y similar concentración de zoosporas, determinando que diez de las doce especies de culícidos evaluados fueron susceptibles a este aislamiento de *L. chapmanii,* ocho de las cuales resultaron muy susceptibles con niveles de mortalidad entre 59 y 100 % en tres días.

La información publicada sobre la relación entre la concentración de zoosporas y la mortalidad larval no es abundante y en ocasiones resulta dificultosa la comparación entre especies o aislamientos de *L. chapmanii*

debido a que la metodología empleada en los diferentes estudios no es comparable. Orduz & Axtell (1991) reportaron una elevada mortalidad e infectividad de *L. giganteum* sobre larvas de *Aedes* sp. y *Culex* sp. que tenían 1 o 2 días de emergidas, una mortalidad intermedia sobre aquellas larvas que presentaban 3 días de emergidas y baja mortalidad en aquellas larvas que tenían 4 o 5 días de emergidas. Kerwin & Washino (1987) apoyaron estos resultados y sugirieron que las zoosporas de *L. giganteum* no reconocen las larvas de estadios tardíos. El aislamiento de *L. chapmanii* obtenido en Luisiana, EE.UU. produjo 100 % de mortalidad en larvas de *A. aegypti* de primero y segundo estadio en 24 horas, mientras que estos valores se redujeron a menos de 40 % con larvas de tercero y cuarto estadio del mismo culícido a las 72 horas (Mc Innis & Zattau, 1982). Estos autores, también observaron niveles de susceptibilidad similares en larvas de *C. quinquefasciatus* (Say), *An. quadrimaculatus* (Say) y *An. albimanus* (Wiedemann). Nnakumusana (1986) registró 100 % de mortalidad en larvas de *An. gambiae* (Giles) expuestas a zoosporas de *Leptolegnia chapmanii* (Aislamiento de Carolina del Sur) a las 72 horas. Respecto a la información sobre otras especies cercanas a *L. chapmanii*, Bisht et al. (1996), determinó que una suspensión de zoosporas (7 x 10^3 zoosporas) de *L. caudata* (Bary) produjo 100 % de mortalidad en larvas de *An. culicifacies* (Giles) a los 7 días. En ensayos de laboratorios realizados con otras dos especies fúngicas patógenas de culícidos se determinó que, *Culicinomyces clavisporus* Couch, Romney & Rao produjo entre 87 y 95% de mortalidad en larvas de *C. quinquefasciatus* a los 5 días de exposición (Cooper & Sweeney, 1986), mientras que *Tolypocladium cylindrosporum* Gams produjo 98 % de mortalidad en larvas de *A. sierrensis* a los 7 días post-exposición (Gardner et al. 1986). Esta información, aunque parcial, nos permite concluir que el aislamiento nativo de *L. chapmanii* es más virulento y patogénico que otras especies de organismos acuáticos entomopatógenos que han requerido entre cinco y siete días para producir niveles similares de mortalidad en larvas. Respecto de otros aislamientos de *L. chapmanii*, el aislamiento argentino presenta niveles de virulencia y patogenicidad similares.

Los métodos empleados en la cría de *A. aegypti* y el mantenimiento *in vivo* e *in vitro* de *L. chapmanii*, condujo al desarrollo de experiencias tendientes

a dilucidar la existencia o no de niveles de mortalidad diferencial entre larvas de la colonia y las provenientes de poblaciones de campo. La colonia de *A. aegypti* mantenida en el CEPAVE está sometida a una constante presión que artificialmente selecciona los insectos mediante los métodos regulares de crianza. Inclusive, la no introducción de material genético en la colonia por períodos de tiempo prolongados, favorecería la homogeneidad genética, inclusive la susceptibilidad o resistencia mayor a las infecciones por *L. chapmanii* respecto de la que presentan las larvas de poblaciones naturales de *A. aegypti*. Los resultados de los ensayos tendientes a determinar la existencia o no de mortalidad diferencial en larvas de colonia o de campo expuestas a zoosporas de *L. chapmanii* desestimaron la existencia de tales diferencias. La mortalidad de las larvas de ambas procedencias, expuestas a similares concentraciones de zoosporas, fue 100 %. Esta información adquiere relevancia si consideramos que las larvas de poblaciones naturales de *A. aegypti* serían eventualmente objeto de control por *L. chapmanii*. La existencia de virulencia diferencial de *L. chapmanii* frente a mosquitos de campo y de laboratorio tendría implicancia en la concentración del inóculo introducido en un ambiente a los efectos de lograr resultados exitosos. Así como seleccionamos continuamente los culícidos sometidos a cría artificial, también *L. chapmanii* es seleccionada en el proceso de mantenimiento *in vivo* e *in vitro* en el laboratorio. Estos resultados elevan las expectativas sobre la potencialidad de este aislamiento nativo de *L. chapmanii*, altamente virulento e infectivo, para controlar las poblaciones naturales de culícidos en sus respectivos hábitat, particularmente *A. aegypti*.

La presencia de sobrevivientes entre las larvas expuestas en los bioensayos conducidos con *L. chapmanii* y *A. aegypti*, indujo a determinar la existencia de efectos subletales en los adultos provenientes de larvas expuestas. Se determinó el número de huevos colocados por las hembras emergidas de larvas expuestas a *L. chapmanii* en relación con el de hembras que no estuvieron en contacto con el patógeno. Se observó que las hembras expuestas a *L. chapmanii* colocaron 23 % menos huevos que aquellas que no lo estuvieron, aun cuando no se detectó la presencia de *L. chapmanii* en estas hembras. Esta diferencia en número de huevos colocados fue acompañada por la menor dimensión que presentaron estas hembras expuestas, determinado

por el tamaño del ala de las hembras. Estudios anteriores efectuados con otros patógenos confirmaron que hembras de culícidos de tamaños menores colocan menos huevos que aquellas de tamaños mayores (Nasci et al. 1992; Becnel et al. 1995). La relevancia de la determinación fehaciente de la existencia de efectos subletales en hembras adultas expuestas en estado de larvas a *L. chapmanii* requerirá mayor precisión y la profundización de las investigaciones, ampliándolas a los efectos sobre la eclosión de los huevos y la longevidad de las hembras expuestas, resultados que tendrían un impacto directo sobre la densidad poblacional de los adultos de *A. aegypti* y consecuentemente sobre la capacidad de las hembras adultas de *A. aegypti* para transmitir arbovirosis.

Los estados sexuales de *L. chapmanii*, oosporas, han sido pobremente investigados hasta el presente, aun cuando son los estados responsables de la variabilidad genética intraespecífica e intrapoblacional, en el ciclo de un organismo que habita una amplia y variable diversidad de ambientes como son donde se desarrollan los culícidos. Además, las oosporas le permiten a *L. chapmanii* persistir por largos períodos y dispersarse efectivamente en esos ambientes tan cambiantes y expuestos a condiciones diversas, las cuales en ocasiones suelen ser extremas.

La producción de oogonios y oosporas a distintas temperaturas en el aislamiento nativo de *L. chapmanii* fue inversamente proporcional a las variaciones de la temperatura. La temperatura más elevada disminuyó el tiempo de formación de los oogonios y oosporas. Este resultado, en líneas generales responde a leyes biológicas que consignan que la temperatura elevada, dentro de ciertos límites, favorece el incremento del metabolismo en la mayoría de los organismos. Esto explica el incremento de oogonios y oosporas en *L. chapmanii*, pero no lo logra con el otro fenómeno registrado y que estableció que el incremento de oogonios al aumentar la temperatura no fue acompañado por el incremento en el número de oosporas.

La interacción temperatura-oosporas es valiosa para los intentos de producción y utilización de oosporas de *L. chapmanii* en programas de regulación de poblaciones de este insecto vector. Como es conocido, *A. aegypti* es un culícido que habita en regiones tropicales o subtropicales donde se registran elevadas temperaturas medias, que le permitirían a *L. chapmanii* poder desarrollar rápidamente oosporas cuando no hubiese larvas de

mosquitos disponibles y de esta manera incrementar las posibilidades de persistencia en el ambiente. Patel et al. (1991) determinaron que el número medio de oosporas producidas por *L. giganteum* no era influido por la temperatura, inclusive los autores no registraron la producción de oosporas de *L. giganteum* en larvas de cuarto estadio a 15 ºC, resultados que difieren de los hallados con nuestro aislamiento de *L. chapmanii* en el presente estudio, que continúa produciendo oosporas a temperaturas tan bajas como 5 ºC.

Las características relevantes de este aislamiento neotropical de *L. chapmanii* lo posicionan como un serio candidato para ser evaluado a campo como agente de control biológico de culícidos de importancia sanitaria, particularmente en poblaciones naturales de *A. aegypti*. El control de *A. aegypti* en el mundo se ha realizado históricamente mediante el empleo de métodos culturales (eliminación de fuentes de cría) y por el uso de insecticidas químicos, como el organofosforado Temephos. A partir de la década del 80 se incorporó al arsenal para el control de este y otros culícidos de importancia sanitaria, varios productos comerciales cuya sustancia activa son las endotoxinas del *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serovar H-14) (Bti), con elevada especificidad para larvas de dípteros acuáticos y seguro para vertebrados y la mayoría de los invertebrados acuáticos (Federici et al. 2007).

Ante la posibilidad a mediano o largo plazo de incorporar productos basados en zoosporas y/o oosporas y/o micelio de *L. chapmanii* dentro del arsenal efectivo y permitido para el control de *A. aegypti* surgió la necesidad de investigar la compatibilidad entre nuestro aislamiento de *L. chapmanii* con los dos productos larvicidas de uso corriente en el mundo en los programas de control de larvas de culícidos vectores.

El efecto combinado de dosis subletales de Bti y Temephos con zoosporas demostró que *L. chapmanii* no es inhibido por esos dos larvicidas, inclusive se comprobó la potenciación de la actividad de *L. chapmanii* cuando las zoosporas se utilizaron conjuntamente con Bti y Temephos. Este incremento de la actividad larvicida observado cuando se utilizaron zoosporas de *L. chapmanii* conjuntamente con temephos y/o Bti se determinó no solo en ensayos de laboratorio sino también, en condiciones seminaturales donde se determinó que las zoosporas de *L. chapmanii* fueron infectivas durante 71 días.

Estudios similares con *L. giganteum* mostraron que este patógeno es compatible y puede ser utilizado tanto con Bti (Vectobac-12 AS) como *Bacillus sphaericus*. En concentraciones bajas de Bti y *Bacillus sphaericus* (0,057 itu/ml y 0,6 x 10^4 esporas/ml respectivamente) la mortalidad de las larvas fue inferior a 50 % pero al combinar estas mismas dosis con zoosporas de *L. giganteum* la mortalidad alcanzó valores de 97,5 y 100 %, respectivamente (Orduz & Axtell 1991). La posibilidad que el aislamiento nativo de *L. chapmanii* pueda ser utilizado de manera conjunta con esos dos larvicidas, es un dato relevante dentro del conjunto de características favorables que reúne este aislamiento nativo. La inexistencia de acción inhibitoria entre estos productos y las zoosporas sumado a la potenciación de su accionar sobre las larvas de *A. aegypti*, abre expectativas para la utilización conjunta de estos 3 larvicidas y para el desarrollo de productos comerciales novedosos que contemplen dos o los tres larvicidas en una formulación. Formulaciones con estas combinaciones de productos activos tendrían varias ventajas respecto a las existentes que poseen un solo larvicida como producto activo. Las ventajas de estas formulaciones multivalentes serían en primer lugar, la reducción de la dosis de insecticida de síntesis liberada a campo, en este caso Temephos, con los beneficios que esto traería aparejado para el ambiente. También se reduciría la cantidad de Bti aplicado, redundando en un notable abaratamiento de los costos de tratamiento. El uso racional en menores dosis de Bti también demoraría la eventual aparición de resistencia en las poblaciones naturales del vector, inconveniente que ya ha surgido en poblaciones de *C. pipiens* expuestas a *B. sphericus* y en lepidópteros tratados con *B.t.kurstaki* (Tabashnik et al. 1990; Tabashnik, 1994). Finalmente, la ventaja mayor que tendrían estas formulaciones multivalentes estaría relacionada con el control a corto, mediano y largo plazo de *A. aegypti* en las zonas de riesgo sanitario de dengue. Esta ventaja derivaría de combinar el efecto a corto plazo provocado por el control inmediato de la población de *A. aegypti* por la acción de Temephos y/o Bti con un control a mediano y largo plazo producido por *L. chapmanii*, que además de provocar elevada mortalidad larval puede permanecer en el ambiente por lagos períodos de tiempo en formas de zoosporas enquistadas y/o oosporas de resistencia, hasta que las condiciones ambientales sean apropiadas para la presencia de una nueva generación de larvas de culícidos.

La producción en medios axénicos es otra ventaja relevante que caracteriza a *L. chapmanii* respecto de otros entomopatógenos. Este aislamiento pudo ser cultivado fácilmente en medios artificiales simples y económicos y no requirió la adición extra de esteroles para inducir la esporulación, como requiere *L. giganteum* (Mc Innis & Schimmel, 1985; Nnakumusana, 1987; López Lastra et al. 2004).

Emerson YPSS fue el medio de cultivo en el que se obtuvo la producción mayor de zoosporas del aislamiento nativo de *L. chapmanii*, por el contrario el medio de cultivo peptona, glucosa con extracto de levadura 1 % (PYG) fue el que produjo menor número de zoosporas, estos resultados fueron coincidentes con los obtenidos en estudios anteriores realizados por otros autores (Lord & Roberts, 1986).

Esta investigación profundizó el conocimiento de las características biológicas del único aislamiento neotropical de *L. chapmanii*, así como del efecto que tienen varios factores bióticos y abióticos sobre la patogenicidad, virulencia y longevidad de los estados infectivos asexuales de *L. chapmanii*. Finalmente se realizaron evaluaciones de *L. chapmanii* en poblaciones naturales de *A. aegypti* en condiciones naturales y seminaturales.

La introducción de este aislamiento nativo de *L. chapmanii* en una población natural de *A. aegypti* produjo elevados niveles de mortalidad larval durante las primeras 48 horas, siendo mayor la mortalidad en los recipientes ubicados en la sombra que en aquellos expuestos directamente a los rayos solares. Esta observación pudo deberse a dos factores, la mayor temperatura en los recipientes expuestos al sol respecto de los ubicados en la sombra y la mayor intensidad de radiación ultravioleta (UV) en los primeros recipientes. La radiación ultravioleta probablemente afecte negativamente la virulencia, infectividad y longevidad de las zoosporas de *L. chapmanii*. Los efectos negativos de la UV son comunes y han sido demostrados para la mayoría de los entomopatógenos, incluidos los hongos acuáticos. Conidios del hongo *Metarhizium anisopliae* Sorokin se inactivaron completamente luego de estar expuestos solo unas pocas horas a la radiación UVA y UVB solar (Braga et al. 2001a). Resultados similares fueron obtenidos con los hongos entomopatógenos *Verticillium lecanii* Viegas y *Aphanocladium album* Gams (Braga et al. 2002) y en *M. album*, *M. flavoviride* y *M. taii* (Braga et al. 2001b).

La utilización de protectores UV en futuras formulaciones de *L. chapmanii* pudiera ayudar a la viabilidad de las zoosporas.

El tiempo que demandó a las zoosporas de *L. chapmanii* la eliminación de la población natural de larvas de *A. aegypti* fue relativamente breve (15 a 22 días en promedio en aquellos recipientes ubicados a la sombra y entre 28 y 39 días en los ubicados a la sombra) y luego de un año de la introducción de *L. chapmanii*, el porcentaje de recipientes positivos (con larvas de *A. aegypti*) se redujo 33 % en los recipientes expuestos al sol y 66 % en los ubicados en la sombra. Estos resultados son auspiciosos y muy positivos, considerando que fue la primera liberación a campo del aislamiento nativo de *L. chapmanii*. En las futuras experiencias a campo debería ajustarse la concentración de zoosporas introducidas en los recipientes, tratando de estandarizarlas de acuerdo a la superficie y densidad larval presente en los recipientes de acuerdo a lo determinado en este estudio.

Como se mencionara previamente, *L. giganteum* ha sido hasta el presente el único hongo acuático evaluado a campo en profundidad. Ha sido registrado como larvicida biológico ante la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EE.UU. y se comercializa en el mercado mundial como larvicida de culícidos (Kerwin, 2007). Glenn y Chapman (1978) publicaron los resultados de tres años continuos de epizootias de *L. chapmanii* en Luisiana (EE.UU.) luego de la introducción de dicho hongo en ambientes naturales con varias especies de culícidos. Washino (1981) observó que *L. giganteum* pudo persistir por ocho años en un hábitat natural de culícidos luego de haber sido introducido por Mc Cray et al (1973). Fetter-Lasko (citado en Washino 1981) demostraron la supervivencia de *L. giganteum* en un campo de arroz experimental que fuera drenado durante el invierno, el cultivo cosechado y los restos de las plantas de arroz secas fueron quemados. Al año siguiente ese campo fue nuevamente sembrado con arroz e inundado, determinando porcentajes de mortalidad larval por *L. giganteum* entre 19,4 y 48,5 %. Jaronski & Axtell (1983) determinaron que *L. giganteum* controló la población natural de mosquito *Culex* sp. durante un año.

Las características determinadas en este estudio sobre el aislamiento neotropical de *L. chapmanii* nos permiten concluir que es un excelente regulador natural de estadios inmaduros de culícidos, particularmente *A.*

aegypti, y que reúne condiciones para convertirse en un larvicida biológico eficiente para larvas de culícidos. Presenta atributos relevantes como la tolerancia a condiciones extremas de temperatura, pH, salinidad, incluida la tolerancia a niveles elevados de contaminación del agua de los criaderos. Presenta un amplio espectro de culícidos susceptibles y es seguro para la mayoría de los insectos, peces y larvas de anfibios que crían en los ambientes de culícidos. Crece fácilmente sobre medios axénicos económicos manteniendo las zoosporas la patogenicidad. Posee estados sexuales resistentes a condiciones extremas, incluida la desecación. Los resultados de las liberaciones en poblaciones naturales de *A. aegypti* son muy alentadores, aunque preliminares, debiéndose profundizar las evaluaciones a campo exponiendo a los estados infectivos a una amplia gama de ambientes que permitan demostrar la tolerancia determinada en el laboratorio, en condiciones naturales y sobre poblaciones silvestres de *A. aegypti*.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados de este estudio nos permiten concluir que el aislamiento neotropical de *L. chapmanii*:

- Es patogénico y virulento dentro de un amplio rango de temperatura, pH, salinidad, contenido de materia orgánica y contaminantes del agua. Consecuentemente, *L. chapmanii* puede ser aplicado en casi todos los ambientes naturales y artificiales donde se crían los culícidos.
- Produce una mortalidad de las larvas rápida y elevada (24 o 48 h), poco común en otros entomopatógenos que suelen requerir períodos más prolongados para matar a los hospedadores.
- Puede ser utilizado conjuntamente con larvicidas como el órganofosforado Temephos y *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), provocando además, la potenciación del efecto de esos larvicidas.
- Crece en medios de cultivos simples y económicos y no requiere la adición de esteroles para favorecer la esporulación.
- Las estructuras de resistencia (oosporas) son producidas en un amplio espectro de temperatura.
- La superficie y la densidad de larvas de culícidos en el criadero a tratar deben conocerse como paso previo y necesario para determinar la concentración de zoosporas a aplicar.
- Presentó un excelente comportamiento en liberaciones preliminares a campo. La introducción de zoosporas de *L. chapmanii* en criaderos naturales de *A. aegypti* provocó la reducción del número de recipientes positivos (con larvas) entre 33% (sol) y 66% (sombra) luego de un año de la introducción de zoosporas.

Las características determinadas en este estudio sumadas a otras como, la especificidad elevada a nivel de la Familia Culicidae y la ausencia de patogenicidad sobre la fauna “no blanco”, nos permiten concluir que este aislamiento nativo de *L. chapmanii* es un excelente candidato para utilizarlo como agente de control biológico en programas de manejo integrado de *A. aegypti*.

Este estudio abre nuevas perspectivas para futuros estudios a realizarse por el nuestro u otros grupo de investigación similares que se interesen en los aspectos básicos de un organismo tan enigmático como *L. chapmanii* y/o que pretendan profundizar aun más el conocimiento de este aislamiento como agente de control biológico de culícidos.

Algunas áreas que deberán abordarse en investigaciones futuras son:

- el proceso de germinación de las oosporas de *L. chapmanii*.
- Los genes que regulan la quiescencia de las oosporas.
- Determinar los factores ambientales que contribuyen a terminar con la quiescencia de las oosporas.
- Determinar el impacto a mediano y largo plazo que produciría la introducción de zoosporas y/u oosporas de *L. chapmanii* en poblaciones naturales de *A. aegypti* y otros culícidos vectores.

BIBLIOGRAFÍA

Acha, P. & B, Szyfres. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. O. P. S-Public. cient. Nº 354.

Achinelly, M. F. & J. J. García. 2003. Efecto de la temperatura sobre la longevidad e infección de los juveniles de *Strelkovimermis spiculatus* (Nematodo: Mermithidae) parásito de culícidos. Rev. Biol. Trop. 51: 753-758.

Achinelly, M. F., M. V. Micieli & J. J. García. 2004 a. Pre-parasitic juveniles of *Strelkovimermis Spiculatus* Poinar & Camino. 1986 (Nematoda: Mermithidae) predated upon by freshwater copepods (Crustacea: Copepoda). Nematology 5: 885-888.

Achinelly, M. F., M. V. Micieli, G. A. Marti & J. J. García. 2004 b. Suceptibility of neotropical mosquito larvae (Diptera: Culicidae) and non-target aquatic organisms to the entomoparasitic nematode *Strelkovimermis spiculatus* Poinar & Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae). Nematology 6: 299-302.

Adams, J. R. 1991. Introduction and classification of viruses of invertebrates. En: Atlas of invertebrate viruses. J. R. Adams, & J. R. Bonani (eds.). CRC Press, Boca raton, Fla. USA. pp. 1-8.

ADL. M., G. B. Alastair, G. B. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Andersen, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Frederico, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C. E. Lane, L. A. Lewis, J. Lodge, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M. Mccourt, L. Mendoza, O. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A. Shearer, A. V. Smirnov, F. W. Spiegel & M. F. J. R. Taylor. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protist. J. Eukaryot. Microbiol. 52: 399-451.

Agarwala, S.P., S. K. Sagar & S.S. Sehgal. 1999. Use of mycelial suspensión and metabolites of *Paecilomyces lilacinus* (Fungi: Hyphomycetes) in control of *Aedes aegypti* larvae. J. Commun. Dis. 31: 193-196.

Agudelo-Silva, F. & H. Wassink. 1984. Infectivity of a Venezuelan strain of *Metarhizium anisopliae* to *Aedes aegypti* larvae. J. Invertebr. Pathol. 43: 435-436.

Alexopoulus, C. J., C. W. Mins, & M. Blackwell. 1996. Introductory Mycology. Wiley. New York, 868 pp.

Alonso, J. M; J. O. Gorodner, A. R. Fabre, M. Galván, D. E. Merino & S. E. Balbachán. 1999. Circulación de virus dengue en población de la ciudad de Posadas. Bol. Inst. Med. Reg. 22: 28-31.

Alves, S. B., L. F. A. Alves, R. B. Lopes, R. M. Pereira & S. A. Vieira. 2002. Potencial of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt., Culicidae). J. Appl. Entomol. 126: 504-509.

Andersen, A. H., E. Jensen & S. Geat. 1981. Two-way analysis of variance with correlated errors. International Statistical Review 49: 153-169.

Anderson, J. F. 1970. An iridiscent virus infecting the mosquito *Aedes stimulans*. J. Invertebr Pathol. 15:219-224.

Anderson, J. F. & S. L. Ringo. 1969. *Entomopthora aquatica* sp, n. Infecting floodwater mosquitoes. J. Invertebr. Pathol. 13: 386-393.

Andreadis, G. T. 2007. Microsporidian parasites of mosquitoes. En: Biorational control of mosquitoes. T. G. Floore (Ed.), 7: 3-28. American Mosquito Control Association, Inc.

Andreadis, G. T. & L. A. Magnarelli. 1983. *Erynia* (Entomophthora) aquatica in a salt-marsh mosquito, *Aedes cantator*. J. Invertebr. Pathol. 42: 277-279.

Anónimo. 1990. Las condiciones de la salud en las Américas. O.P.S; Publicación Científica N° 524, Vol. I, 503 p.

ANSA 2007.www.anlis.gov.ar/consulta/consultadengue.htm

Bachmann, A. O. & O. H. Casal. 1962. Mosquitos Argentinos que crían en aguas salobres y saladas. Rev. Soc. Entomol. Argent. 25: 21-27.

Ballard, E. M. & F. W. Knapp. 1984. Ocurrence of the fungus *Verticillium lecanii* on a new host species: *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). J. Medical. Entomol. 21: 6.

Bay, E. C. 1985. Other larvivorous fishes. En: Biological control of mosquitoes. H. Chapman (ed.), Am. Mosq. Control Assoc. 6: 18-24.

Becnel, J. J., & G. T. Andreadis. 1999. Microsporidia in insect. En: The microsporidia and microsporidiosis. Wittner & Weiss (eds.), pp. 447-501. Asm Press, Washington.

Becnel, J. J. & S. E. White. 2007. Mosquito pathogenic viruses-the last 20 years. En: Biorational control of mosquitoes. T. G. Floore (Ed.) 7: 36-49. American Mosquito Control Association, Inc.

Becnel, J. J., J. J. García & M. A. Johson. 1995. *Edhazardia aedis* (Microspora: Culicosporidae) Effects on the reproductive capacity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 32: 549-553.

Bejaramo, J. R. F. 1979. Estudio sobre la fiebre amarilla selvática en la República Argentina. Subsecretaría de Medicina Sanitaria, DNPPS: 38 pp.

Benenson, A. S. 1995. Control of communicable diseases manual, 16 th. American Public Health Association.

Bidochka, M. J. & C. L. Small. 2005. Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. En: Insect-fungal associations. Ecology and evolution. F.E. Vega & M. Blackwell (Eds), pp 28-51. Oxford University Press, Inc.

Bisht, G. S., C. Joshi & R. D. Khulbe. 1996. Watermolds: Potencial biological control agents of malaria vector *Anopheles culicifacies.* Curr. Sci. 70: 393-395.

Boucias, D. & J. C. Pendland. 1998. General properties of fungal pathogens. En: Principles of insect pathology. En: D.G.Boucias & J. C. Pendland (Eds.), pp 259-283. Kluwer Academic Plublishers.

Braga, U. L. G., D. S. Flint, D. C. Miller, J. A. Anderson & W. D. Roberts. 2001a. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61º N to 54º S. J. Invertebr. Pathol. 78: 98-108.

Braga, U. L. G., D. S. Flint, D. C. Miller, J. A. Anderson & W. D. Roberts. 2001b. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Photochem. Photobiol. 74: 734-739.

Braga, U. L. G., E. N. D. Rangel, D. S. Flint, D. C. Millar, J. A. Anderson & W. D. Roberts.2002. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. Mycol. Res. 94: 912-920.

Braun, A. 1855. Algarun unicellularium genera nova et minus cognita, praemissis observationibus de algis unicellularibus in genere. Engelmann, Lipsiae: 111 pp.

Camino, N. B. 1989. Primer registro de culícidos (Diptera: Culicidae) parasitados por *Hydromermis* sp. (Nematoda: Mermithidae). Neotrópica 35:67-70.

Camino, N. B. & G. R. Reboredo. 1994. Biología de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar & Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) parásito de mosquitos (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. Neotrópica 40:45-48.

Camino, N. B. & G. R. Reboredo. 2000. Efecto de la temperatura en la infección de tres especies de culicidae (Diptera) por *Strelkovimermis spiculatus* (Nematodo: Mermithidae). Iheringia, série zoología 88:3-6.

Campos, R. E. 1993. Presencia de *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* L. (Diptera: Culicidae) en la localidad de Quilmes (Buenos Aires, Argentina). Rev. Soc. Entomol. Argent. 52: 4-36.

Cerenius, L. P., O. Thornquist, A. Vey, M. W. Johansson & K. Soderhall. 1990. The effect of the fungal toxin destruxin e on isolated crayfish haemocytes. J. Insect. Physiol. 36: 785-789.

Chapman, H. C. 1974. Biological control of mosquito larvae. Ann. Rev. Entomol. 19: 33-59.

Chapman, H. C. 1985. Biological control of mosquitoes. Am. Mosq. Control Assoc. Bulletin Nº 6, California.

Chapman, H. C. & D. B. Woodard. 1966. *Coelomomyces* (Blastocladiales: Coelomomycetaceae) infections in Louisiana mosquitoes. Mosq. New 26: 121-123.

Christensen, J. B., J. L. Fetter-Lasko, R. K. Washino, R. C. Husband & E. E. Kaufman. 1977. A preliminary field study employing *Lagenidium giganteum*, a fungus, as a possible biological control agent against the pasture mosquito *Aedes nigromaculis.* Proc. Calif. Mosq. Vector control Assoc. 45: 105 (Abstract).

Cristophers, S. R. 1960. *Aedes aegypti* (L.). The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. Tomo 1 pp 739. Cambridge at the University Press.

Clark, T. B., W. Kellen, T. Fukuda & J. E. Lindegren. 1968. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. J. Invertebr. Pathol. 11: 1-7.

Clark, T. B., W. R. Kellen, J. E. Lindegren & R. D. Sanders. 1966. *Pythium sp* (Phycomycetes: Pythiales) pathogenic to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 8: 351-354.

Clark, T. B. & D. G. Brandl. 1976. Observations on the infection of *Aedes sierrensis* by a tetrahymenid ciliate. J. Invert. Pathol. 23: 341-349.

Cooper, R. & A. W. Sweeney. 1986. Laboratory studies on the recycling potential of the mosquito pathogenic fungus *Culicinomyces*. J. Invertebr. Pathol. 48: 152-158.

Corliss, J. O. & D. W. Coast. 1976. A new cuticular cyst-producing tetrahymenid ciliate, lambornella clarkin sp, and the current status of ciliatosis in culicine mosquitoes. Trans. Am. Microsc. Soc. 95: 725-739.

Couch, J. N. 1935. A new saprofytic species of *Coelomomyces,* with notes on others forms. Mycologia 27: 376-387.

Couch, J. N. & S. V. Romney, B. R. 1974. A new fungus which attacks mosquitoes and related diptera. Mycologia 66: 374-379.

Cuda, J. P., J. A. Hornby, B. Cotterilli & M. Cattell. 1997. Evaluation of *Coelomomyces* for biocontrol of *Mansonia* mosquitoes in Florida (Diptera: Culicidae). Biol. Control 8: 124-130.

Curto, S. F; R. Boffi, A. E. Carbajo, R. Plastina & N. Schweigmann. 2002. Reinfestación del territorio argentino con *Aedes aegypti*. Distribución geográfica (1994-1999). En : Actualizaciones en artropodología sanitaria. D. Salomón (ed.), pp. 127-137. Serie de enfermedades Transmisibles RAVE.

Daoust, R. A. & D. W. Roberts. 1983 a. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: Effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. J. Invertebr. Pathol. 41: 143-150.

Daoust, R. A. & D. W. Roberts. 1983 b. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: Effect og growth substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes. J. Invertebr. Pathol. 41: 161-170.

Davey, R. B. & M. V. Meisch. 1977. Control of dark rice field mosquito larvae, *Psorophora columbiae*, by mosquito fish *Gambussia affinis* and green sunfish, *Leponis cyanellus*, in Arkansas rice fields. Mosq. News 37:258-262.

Degallier, N. 1988. *Aedes aegypti* (L.): Importance de sa bioecologie dans la transmission de la dengue et des outres arbovirus. Premiere partie. Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales, 81: 97-110.

Dellapé, M. E., G. A. Marti, M. C. Tranchida & J. J. García. 2005. First record of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Infected by the parasite *Ascogregarina culicis* (Ross) (Aplicomplexa: Lecudinidae) in Argentina. Entomol. Vectores 12: 111-115.

Dick, M. W. 1990. Oomycota. En: Handbook of protoctista. L. Margulis, J. D. Corliss, M. Melkonian & D. J. Chapman (Eds). Jones & Bartlett, Boston pp 661-685.

Dick, M. W. 2001 a. The Peronosporomycetes. En: The Mycota VII, part a systematics and evolucion. D. J. Laughlin, E. G. Mc Laughlin, P. A. Lemke (Eds.), pp 39-72. Springer-Verlag, Berlin.

Dick, M. W. 2001 b. Straminipilous Fungi. Systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the marine Straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 670 pp.

Dick, M. W., M. C. Vick, J. G. Gibbings, T. A. Hedderson & C. C. López Lastra. 1999. 18 S rDNA for species of *Leptolegnia* and other Peronosporomycetes: Justification for the subclass taxa *Saprolegniomycetidae* and *Peronosporomycetidae* and division of the *Saprolelegniaceae* sensu lato into the *Leptolegniaceae* and *Saprolegniaceae*. Mycological Research 1023: 1119-1125.

Dieguez-Uribeondo, J. 1995. Adaptation to parasitism of some animal pathogenic saprolegniaceae. Comprehensive summaries of uppsala dissertations from the faculty of sciense and technology 122. Acta universitatis upsaliensis, Uppsala.

Dikgolz, V. E., V. A. Toledo, P. E. Topa & C. C. López Lastra. 2005. Evaluation of histological techniques for the detection of fungal infections caused by *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales) in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. Folia Microbiol. 50: 125-127.

Dumas, C., V. Matha, J. M. Quiot & A. Vey. 1996. Effects of destruxins, cyclic depsipeptide mycotoxins, on calcium balance and phosphorylation on intracellular proteins in lepidopteran cell lines. Comp. Biochem. Physiol. 114: 213-219.

Dzerzhinskii, V. A. & A. M. Dubitskii. 1977. A new host of *Tetrahymena Stegomyiae*. Parazitología 11:189.

Fargues, J. & P. H. Robert. 1983. Influence de l‘ antécédent nutritionnel sur la virulence de deux souches de l’ hyphomycete entomopathogene *Metarhizium anisopliae.* Mycopathologia 81: 145-154.

Federici, B. A. 1981. Mosquito control by the fungi *Culicinomyces*, and *Coelomomyces*. En: Microbial control of pests and plant diseases. H. D. Burges (Ed.), 29: 555-572. London, Academic Press.

Federici, B. A. 1995. The future of microbial insecticides as vector control agents. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 11: 260-268.

Federici, B. A., H. W. Park, D. K. Bideschi, M. C. Wirth, J. J. Johson, Y. Sakano, & M. Tang. 2007. Developing recombinant bacteria for control of mosquito larvae. En: Biorational control of mosquitoes. T. G. Floore (Ed.), 7: 164-175. American Mosquito Control Association, Inc.

Ferron, P. 1978. Biological control of insect pest by entomogenous fungi. Annu. Rev. Entomol. 23: 409-442.

Ferron, P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium.* En: Microbial control of pests and plant diseases. H. D. Burgess (Ed.) 24: 465-482. London Academic Press.

Fetter-Lasko, J. L., & R. K. Washino. 1978. Patterns of experimental infection of mosquito larvae by *Lagenidium giganteum*. J. Mosq. Control Assoc. 46: 90 (Abstract).

Follet, P. A. & J. J. Duan. 2000. Non target effects of biological control. Kluwer Academia Publishers, Boston, Dordrecht, London.

Frances, S. P. 1986. Record of the mosquito pathogenic fungus *Culicinomyces clavisporus* Couch, romney and rao infecting larvae of *Culiseta inconspicua* Lee (Diptera: Culicidae) in victoria. J. Aust. Entomol. Soc. 25:60.

Frances, S. P. 1991. Pathogenicity, host range and temperature tolerance of *Crypticola clavulifera* (Oomycetes: Lagenidiales) in the laboratory. J. Am. Mosq. Control Assoc. 7: 504-506.

Frances, S. P., A. W. Sweeney & R. A. Humber. 1989. *Crypticola clavulifera* gen. et sp. Nov. And *Coelomyces giganteum*: Oomycetes pathogenic for dipterans infesting leaf axils in an Australian rain forest. J. Invertebr. Pathol. 54: 103-111.

Fukuda, T. & T. B. Clark. 1975. Transmisión of the mosquito to iridescent virus (RMIV) by adult mosquitoes of *Aedes taeniorhynchus* to their progeny. J. Invertebr. Pathol. 24:275-276.

Fukuda, T., O. R Willis & D. R. Barnard. 1997. Parasites of the Asian Tiger mosquito and other container-inhabiting mosquitoes (Diptera: Culicidae) in northcentral Florida. J. Med. Entomol. 84: 226-233

García, J. J. 1989. Primer registro de microsporidiosis en culícidos (Diptera: Culicidae) de la República Argentina. Rev. Soc. Entomol. Argent. 47:100-108.

García, J. J. & J. J. Becnel. 1994. Eight new species of microsporidia (Microspora) from argentine mosquitoes (Diptera: Culicidae). J. Invertebr. Pathol. 64:243-252.

García, J. J. & N. B. Camino. 1990. Primera cita para la Argentina de infecciones naturales en larvas de *Culex pipiens* (L.) (Diptera: Culicidae). Neotrópica 36:83-86.

García, J. J. & C. C. López Lastra. 1989. Infecciones por microsporidios y hongos en *Culex dolosus* (Lynch Arribalzaga, 1891) (Diptera: Culicidae) en Argentina y Uruguay. Neotropica 35 (93): 9-14.

García, J. J; T. Fukuda & J. J. Becnel. 1994. Seasonality, prevalence and pathogenicity of the gregarine *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in mosquitoes from Florida. J. Am. Mosq. Control Assoc. 10:413-418.

García, R. & A. W. Sweeney. 1986. The use of microbial pathogens for the control of mosquitoes, agricultura. Ecosystems and Environment 15:201-208.

Gardner, J. M., R. C. Ram, S. Kumar & J. S. Pillai. 1986. Field trials of *Tolypocladium cylindrosporum* against larvae of *Aedes Polynesiensis* breeding in crab holes in fiji. J. Am. Mosq. Control Assoc. 2: 292-295.

Gaudino, N. 1916. El dengue. Algunas consideraciones sobre la epidemia de Entre Ríos de 1916. Rev. Sanid. Mil. At. 15: 617-627.

Georghiou, G. P. & T. Saito. 1983. Pest resistance to pesticides. Plenum press, New York and London.

Glenn, F. E. & H. E. Chapman. 1978. A natural epizootic of the aquatic fungus *Lagenidium giganteum* in the mosquito *Culex territans.* Mosq. News 38: 522-524.

Goddard, J. 2000. Infections diseases and arthropods. Humana press, Totowa, New Jersey.

Goettel, M. S., L. Sigler & J. W. Carmichael. 1984. Studies on the mosquito pathogenic Hyphomycete *Culicinomyces clavisporus.* Mycologia. 76: 614-625.

Grassmick, R. A. & W. A. Rowley. 1973. Larval mortality of *Culex tarsalis* and *Aedes aegypti* when reared with different concentrations of *Tetrahymena pyriformis*. J. Invertebr. Pathol. 22: 86-93.

Grove, J. F.& M. Pople. 1980. The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. Mycopathologia. 70: 103-105.

Gupta, S., S. B. Krasnoff, D. W. Roberts & J. A. A. Renwick. 1992. Structure of efrapeptins from the fungus *Tolypocladium niveum:* Peptide inhibitors of mithochondrial ATPase. J. Organic. Chem. 57: 2213-2306.

Guzman, D. R. & R. C. Axtell. 1987. Populations dynamics of *Culex quinquefasciatus* and the fangal pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) in stagnant water pools. J. Am. Mosq. Control Assoc. 3:442-449.

Hall, D. W. & D. D. Fish. 1974. A Baculovirus from the mosquito *Wyeomyia smithii*. J. Invertebr. Pathol. 23:383-388.

Hall, R. A. 1980. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenicity, morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii*. J. Invertebr. Pathol. 36: 216-222.

Hallmon, C. F., E. T. Schreiber & M. A. Bloomquist. 2000. Field trials of three concentrations of Laginex as biological larvicide compared to Vectobac-12 AS as a biocontrol agent for *Culex quinquefasciatus*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 16: 5-8.

Hasan, S. & C. Vago. 1972. The pathogenicity of *Fusarium oxysporum* to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 20: 268-271.

Hoy, J. B. & D. E. Reed. 1971. The efficacy of mosquito fish for control of *Culex tarsalis* in a California ricefields. Mosq. News 31:567-572.

Humber, R. A. 1997. Fungi: Identification. En: Manual of techiques in insect pathology. L. Lacey (Ed.), pp 153-185. Academic Press, San Diego

Humter-Fujita, F. R; P. F. Entwistle, H. F. Evans & N. E. Crook. 1998. Insect virases and pest management. John Wily & Sons, Chichester.

Jaronski S. T. & R. C. Axtell. 1982. Effects of organic water pollution on the infectivity of the fungus *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) for the larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): Field and laboratory evaluation, J. Med. Entomol. 19:255-262.

Jaronski, S. T., & R. C. Axtell. 1983. Effects of temperature on infection growth and zoosporogenesis of *Lagenidium giganteum*, a fungal pathogen of mosquito larvae. Mosq. News 43: 42-45.

Jaronski, S. T., R. C. Axtell, S. M. Fagan, A. J. Domnas. 1983. In vitro production of zoospores by *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) from solid media. J. Invertebr. Pathol. 41: 305-309.

Jenkins, D. W. 1964. Pathogens, parasites and predators of medically important arthropods. Suppl. Vol. 30, Bulletin World Health Organization 150 pp.

Johnson, R. A. & D. W. Wichern. 1982. Applied multivariate statistical analysis. Prentice-Hall. New Jersey.

Kelly, R. & J. D. Edman. 1992. Multiple transmission of *Plasmodium gallinaceum* (Eucoccida: Plasmodiidae) during serial probing by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) on several host. J. Med. Entomol. 29: 329-331.

Kerwin, J. L. 2007. Oomycetes: *Lagenidium giganteum*. En: Biorational control of mosquitoes. T. G. Floore (Ed.), 7: 50-58. American Mosquito Control Association, Inc.

Kerwin, J. L. & E. Petersen. 1997. Fungi: Oomycetes and Chrytidiomycetes. En : Manual of techniques in insect pathology. L. A. Lacey (ed.), pp. 251-268. Academic Press, San Diego.

Kerwin, J. L. & R. K. Washino. 1986. Ground and aerial application of the sexual and asexual stages *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) for mosquito control. J. Am. Mosq. Control Assoc. 2:182-189.

Kerwin, J. P.& R. K. Washino. 1987. Ground and aerial application of the asexual stage of *Coelomomyces giganteum* for control of mosquitoes associated with rice culture in the central valley of California. J. Am. Mosq. Control Assoc. 3: 59-64.

Kerwin, J. L. & R. K. Washino. 1988. Field evaluation of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Saprolegniales) and description of a natural epizootic involving a new isolate of the fungus, J. Med. Entomol. 25:452-460.

Kerwin, J. L. & R. K. Washino. 1988. Isolation of a new strain of *Lagenidium giganteun* and implications for control of floodwater and other rapidly developing mosquito species. Proc 56th Annu. Conf. Calif. Mosq. Vector Control Assoc. 56:182.

Kitanchaoren, N., K. Yuasa and K. Hatai. 1995. Morphological aspects of *Saprolegnia diclina* type 1 isolated from pejerrey, *Odonthetes bonaerensis*. Mycoscience 36: 365-368.

Kramer, J. P. 1982. *Entomophthora culicis* (Zygomycetes, Entomophthorales) as a pathogen of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Aquat. Insec. 4: 73-79.

Lacey, L. A. 1997. Biological techniques “Manual of techniques in insect pathology” Academic Press, San Diego.

Lacey, L. A. & W. M. Brooks. 1997. Initial handling and diagnosis of diseased insect. En: “Manual of techniques in insect pathology”, pp 1-12. Academia Press, San Diego.

Lacey, L. A. & H. Kaya. 2000. Field manual of techniques in invertebrate pathology. L. A. Lacey & H. Kaya (Eds), pp 911. Kluwer Academia Publishers.

Lacey, L. A. & J. M. Lacey. 1981. The larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (h-14) against mosquitoes of the central amazon basin. Mosq. News 41:266-270.

Lacey, L. A. & S. Singer. 1982. Larvicidal activity of new isolates of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* (H-14) against anopheline and culicine mosquitoes. Mosq. News 44:26-32.

Lacey, L. A. & A. H. Undeen. 1986. Microbial control of black flies and mosquitoes. Ann. Rev. Ent. 31: 265-296.

Laird, M. 1988. Larval mosquito habitats. Academic Press. London, England pp 443.

Laird, M. Y. & J. W. Miles. 1983. Integrated mosquito control methodologies. M. Laird & J. W. Miles (Eds.) Tomo 1 y 2.

Lead, A. E. & M. C. Pedroso. 1964. Nova especie do genero *Coelomomyces* parasito de ovos de phlebotomus. Mycopathol Mycol Appl 26: 305-307.

Liborio, M., A. M. Tomisani, C. B. Moyano; R. Salazar & L. R. Balparda. 2004. Dengue prevention strategies Rosario-Argentina. Rev. Bras. Epidemiol. 7: 311-327.

Lichtward, R. W. 1986. The trichomycetes: Fungal associates of arthropods, 1 st edition. Springer Verlag New York, pp 343.

Lichtwardt, R. W., Jr. L. C. Ferrington & C. C. López Lastra. 1999. Trichomycetes in Argentinean aquatic insect larvae. Mycologia 91: 1060-1082.

Littell, R., G. Milliken, W. Stroup & R. Wolfinger. 1996. SAS system, for mixed models. SAS Institute., Cary, N. C. USA.

Loed, J. C., and D. W. Roberts. 1985. Effects of salinity, pH, organic solutes, anaerobic conditions and the presence of other microbes on production and survival of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) zoospores. J. Invertebr. Pathol. 43: 331-8.

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

López Lastra, C. C. 1990b. Primer registro de *Aphanocladium album* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) como patógeno de insectos en la República Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot. 26: 259-260.

López Lastra, C. C & J. J. García. 1997. Presencia del hongo *Coelomomyces ilensis* var. *indus* como patógeno de larvas de mosquitos (Diptera: Culicidae) en la República Argentina. Rev. Iberoam. Micol. 14: 69-71.

López Lastra, C. C; J. J. García & G. R. Reboredo. 1991. Efecto de la temperatura y la salinidad sobre la viabilidad y producción de conidios en los hongos entomópatogenos: *Tolypocladium cylidrosporum* y *Aphanocladium album* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Bol. Micol. 6: 43-47.

López Lastra, C. C., M. M. Steciow & J. J. García. 1999. Registro más austral del hongo *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales) como patógeno de larvas de mosquitos (Diptera: Culicidae). Rev. Iberoam. Micol. 16: 143-145.

López Lastra, C. C., A. C. Scorsetti, G. A. Marti & J. J. García. 2004. Host range and specifity of an Argentinean isolate of the aquatic fungus *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales), a pathogen of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). Mycopathologia 158: 311-315.

Lord J. & T. Fukuda. 1988. An ultrastructural study of *Culex quinquefasciatus* larvae by *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales). Mycopathologia 104: 67-74.

Lord, J. C. & D. W. Roberts. 1985. Solute effects on *Lagenidium giganteum* zoospore motility and bioassay reproducibility. J. Invertebr. Pathol. 46: 160-165.

Lord, J. C. & D.W. Roberts. 1986. The effects of culture medium quality and host passage on zoosporogenesis, oosporogenesis, and infectivity of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales). J. Invertebr. Pathol. 48: 355-361.

Lord, J. C., T. Fukuda & E. Daniels. 1988. Salinity tolerance of *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales), a fungal pathogen of mosquito larvae. J. Am. Mosq. Control Assoc. 4: 370-371.

Lowe, R. E., R. G. Rumbaugh & R. S. Patterson. 1968. *Entomophtora coronata* as a pathogen of mosquitoes. J. Invertebr. Pathol. 11: 506-507.

Mac Gregor, M. E. 1929. The significance of the pH in development of mosquito larvae. Parasitology. 21: 132-157.

Manly, F. J. B. 1991. Principal component analysis. En: Multivariate statistical methods. B. J. F. Manly (Ed.), pp 59-71. Chapman & Hall

Marten, G. G. & J. W. Reid. 2007. *Cyclopoid* copepods. En: Biorational control of mosquitoes. T. G. Floore (Ed.) 7: 65-92. American Mosquito Control Association, Inc.

Matha, V., A. Jegorov, J. Weiser & J. S. Pillai. 1992. Ultrastructural changes in *Culex pipiens* larvae treated with tolypin the insecticidal metabolite of *Tolypocladium inflatum* Gams (Deuteromycetes). Cytobios 69: 179-186.

Matha, A. J., J. Weiser, P. Harazin, Z. Mlinka & J. Stuchlik. 1993. Production of cyclosporins by *Tolypocladium terricola* in stationary cultivation. Microbios. 75: 83-90.

Mc Clelland, G. A. H. 1984. Medical Entomology. University of California, Davis.

Mc Coy, C. W., R. A. Samson & D. G. Boucias. 1988. Entomogenous fungi. En: "CRC handbook of natural pesticides. Microbial insecticides part A. Entomogenous Protozoa and Fungi" C. M. Ignoffo (Ed.), pp 151-236.

Mc Cray, E. M., D. J. Womeldorf, R. C. Husbands & D. A. Eliason. 1973. Laboratory observations and field test with *Lagenidium giganteum* against California mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc. 41: 123-128.

Mc Innis, T. M. Jr.& L. E. Schimmel. 1985. Host range studies with fungus *Leptolegnia* a parasite of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 22: 226-227.

Mc Innis, T. Jr. & W. C. Zattau. 1982. Experimental infection of mosquito larvae by a species of the aquatic fungus *Leptolegnia*. J. Invertebr. Pathol. 39: 98-104.

Mc Laughlin, R. E. & J. Billodeaux. 1983. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis against *Psorophora columbiae* breeding in rice fields. Mosq. News 43:30-33.

Meisch, M. V. 1985. *Gambussia affinis*. En: Biological control of mosquitoes. H, Chapman (Ed). Bulletin 6, American Mosquito Control Association, California, pp 3-17.

Merrian, T. L. & R. C. Axtell. 1982. Salinity tolerance of two isolates of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales), a fungal pathogen of mosquito larvae. J. Med. Entomol. 19: 388-393.

Micieli, M. V. & J. J. García. 1999. Estudios epizootiológicos de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar & Camino, 1986 (Nematoda: Memithidae) en una población natural de *Aedes albifasciatus* Macquart (Diptera: Culicidae) en la Argentina. Miscelánia Zoologíca 22: 31-37.

Micieli, M. V; J. J. García & T. G. Andreadis. 2001. Epizootiological studies of *Amblyospora albifasciati* (Microsporidia: Amblyosporidae) in natural populations of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Mesocyclops annulatus* (Copepoda: Cyclopidae) in a transient floodwater habitat. J. Invertebr. Pathol. 77: 68-74.

Micieli, M. V., J. J. García & J. J. Becnel. 1998. Horizontal transmision of *Amblyospora dolosi* (Microsporidia: Amblyosporidae) to the copepod *Metacyclops mendocinus* (Wierzejski 1982). J. Invertebr. Pathol. 72: 330-335.

Micieli, M. V., J. J. García & J. J. Becnel. 2000a. Life cycle and description of *Amblyospora camposi* N. sp. (Microsporidia: Ambyosporidae) in the mosquito *Culex renatoi* (Diptera: Culicidae) and the copepod *Paracyclops fimbriatus* (Copepoda: Cyclopidae). J. Euk. Microbiol. 47: 575-580.

Micieli, M. V; J. J. García & J. J. Becnel. 2000b. Horizontal transmision of *Amblyospora albifasciatus* García and Becnel, 1994 (Microsporidia: Amblyosporidae) to a copepod intermediate host and the neotropical mosquito, *Aedes albifasciatus* (Macquart, 1837). J. Invertebr. Pathol. 75:76-83.

Micieli, M. V., J. J. García & J. J. Becnel. 2003. Life cycle and epizootiology of *Ambliospora ferocis*. (Microsporidia: Amblyosporidae) in the mosquito *Psorphora ferox* (Diptera: Culicidae). Folia Parasit. 50: 170-175.

Mogi, M. 2007. Insect and other invertebrate predators. En: Biorational control of mosquitoes. T. G. Floore (Ed.), 7: 93-109. American Mosquito Control Association, Inc.

Molloy, D. & S. P. Wraight. 1982. Rediscovery of *Ernyia aquatica* (Entomophthoraceae) in snowpool mosquitoes. J. Invertebr. Pathol. 40: 142-145.

Muelheisen, D. P. 1977. The effectiveness of *Lagenidium giganteum* as a biological control agent of *Culex pipiens*. M. S. Thesis, Clemsom University, S. C.

Munstermann, L. E. & D. W. Wesson. 1990. First record of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in north American *Aedes albopictus*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 6:235-243.

Nasci, R. S., K. H. Tang, J. J. Becnel & T. Fukuda. 1992. Effect of *per os Edhazardia aedis* (Microsporidia: Amblyosporidae) infection on *Aedes aegypti* mortality and body size. J. Am. Mosq. Control Assoc. 8: 131-136.

Nnakumusana, E. S. 1986. Histopathogical studies on the progress of infection of *Leptolegnia sp*. (SC-1) in *Anopheles gambiae* larvae exposed to zoospores in the laboratory. Curr. Sci. 55: 633-636.

Nnakumusana, E. S. 1987. Susceptibility of mosquito larvae to *Leptolegnia* sp. Indian. J. Med. Res. 84: 586-593.

O.M.S. 2004. www.who.int/infectiousdisease-report/idr99-spanish/pages/ch3text

O.P.S. 1998. Organización Panamericana de la Salud. Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas guías para su prevención y control. Publicación Científica N° 548.

Orduz, S. & R. C. Axtell. 1991. Compatibility of *Bacillus thurigiensis var. israelensis* and *Bacillus sphaericus* with the fungal pathogen *Coelomomyces giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales). J. Am. Mosq. Control Assoc. 7: 188-193.

Orduz, S., J. S. Zulaga, T. Diaz & W. Rojas. 1992. Five new isolates of the mosquito pathogenic fungus *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) from Colombia. Mem. Inst. Osvaldo Cruz 87: 597-599.

Patel, K. J., M. L. Rueda, R. C. Axtell & R. E. Stinner. 1991. Temperature-dependent development of the fungal pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) in larva of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J. Entomol. 28: 95-100.

Pettersen, J. J. 1985. Nematode parasites. En: Biological Control of Mosquitoes. H. C. Chapman, (Ed.), Am. Mosq. Control Assoc. 6: 110-122.

Petersen, J. J. & H. C. Chapman. 1970. Chemical characteristics of habitats producing larvae of *Aedes solicitans*, *Aedes taeniorhynchus* and *Psorophora confinnis* in Luisiana. Mosq. News. 30: 156-161.

Pinnock, D. E., R. Garcia & C. M. Cubbin. 1973. *Beauveria tenella* as a control agents for mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 22: 143-147.

Platzer, G. E. 2007. Mermithid nematodes. En: Biorational control of mosquitoes. T. G. Floore (Ed.), 7: 58-64. American Mosquito Control Association, Inc.

Poinar, G. O. Jr & N. B. Camino. 1986. *Strelkovimermis spiculatus* n. sp. (Mermithidae: Nematoda) Parasiting *Aedes albifasciatus* Mac. (Culicidae: Diptera) in Argentina. J. Nematol. 18:317-319.

Ramoska, W. A. 1982. An examination of the long-term epizootic potencial of various artificially introduced mosquito larvae pathogens. Mosq. News 42: 603-607.

Ravallec, M., G. Riba & A. Vey. 1989. Sensibilite d` *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) A` L` Hyhomycètes entomopathogène *Metarhizium anisopliae.* Entomophaga 34: 209-217.

Rehner, A. S. 2005. Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. En : Insect-fungal associations. Ecology and evolution. F. E. Vega & M. Blackwell (Eds) pp 28-51. Oxford University Press, Inc.

Reyes-Villanueva F; J. J. Becnel & J. F. Butler. 2001. Morphological traits for distinguishing extracellular gamonts of *Ascogregarina culicis* and *Ascogregarina taiwanensis* in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus.* J. Invertebr. Pathol. 77:227-229.

Ricci, M. & S. Padin. 2007. Dengue en la Provincia de Buenos Aires: Medidas de prevención y control para *Aedes aegypti* y otros mosquitos vectores de enfermedades. www.agro.unlp.edu.ar/novedades/noticias/llegoElDenge.pdf

Roberts, D. W. 1967. Some effects of *Metarhizium anisopliae* and its toxins on mosquito larvae. En: Insect pathology and microbial control. Van der Laan (Ed.), pp 243-246. orth-Holland Publishing Company, Ámsterdam.

Roberts, D. W. 1970. *Coelomomyces*, *Entomophtora*, *Beauveria*, and *Metarhizium* as parasites of mosquitoes. Miscellaneous Publications of the Entomological society of America 7: 140-155.

Roberts, D. W. 1974. Fungal infections of mosquitoes. En: Le controle des moustiques. A. Aubin, S. Belloncik, J. P. Bourassa, E. Lacoursiere, M. Pellissier (Eds.), pp 143-193. Presses de l' Université du Québec.

Roberts, D. W. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. En: Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980. H. D. Burges (Ed.), pp 441-464. Academic Press, New York.

Roberts, D. W. & J. M. Castillo. 1980. Bibliography on pathogens of medically important arthropods. Suppl. To Vol. 58, Bulletin World Health Organization p.p. 197.

Roberts, D. W. & M. A. Strand. 1977. Pathogens of medically important arthropods. Suppl. N° 1 To Vol. 55 Bulletin world health organization p.p. 419.

Roberts, D. W; R. A. Daoust & S. P. Wraight. 1983. Bibliography on pathogens of medically important arthropods: 1981 supplement Nº 1 Vol. 83. Bulletin World Health Organization p.p. 137.

Russell, R. C., M. J. Debenham & D. J. Lee. 1978. A natural habitad of the insect pathogenic fungus *Culicinomyces* in the Sidney area. Proceedings of the Linnaen Society of New South Wales 103: 71-73.

Salvatella, A. R. 1996. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay. Rev. Med. Urug. http://www.smu.or.uy/publicaciones/rmv/1996v1/salvat.htm.

Sandhu, S. S., R. C. Rajack, M. & Sharma. 1993. Bioactivity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* as pathogens of *Culex tritaeniorhynchus* and *Aedes aegypti*: effect of instar, dosages and time. Indian J. Microbiol. 33: 191-194.

Scholte, E.J., W. Takken & B.G.J. Knols. 2003. Pathogenicity of five east African entomopathogenic fungi to *Anopheles gambiae s.s.* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. Proc. Exp. Appl. Entomol. 14: 25-29.

Scholte, E. J., B. G. J. Knols, R.A. Samson & W. Takken. 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. J. Insect Sci. 4: 1-24.

Schuler, M. L, H. A. Word; R. R. Granados & D. Hammer. 1995. Baculoviruses expresión systems and biopesticides. Wiley-Liss, New York, pp 13-40.

Seymour, R. L. 1984. *Leptolegnia chapmanii*, an Oomycete pathogen of mosquito larvae. Mycologia 76: 113-120.

Seymour, R. L. & L. D. Briggs. 1985. Occurrence and control of *Aphanomyces* (Saprolegniales: Fungi) infections in laboratory colonies of larval *Anopheles.* J. Am. Mosq. Control Assoc. 1: 100-102.

Siegel, J. P; R. J. Novak & J. V. Maddox. 1992. Effects of *Ascogregarina barretti* (Eugregarinida: Lecudinidae) infections on *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) in Illinois. J. Med. Entomol. 29:968-973.

Skovmand, O., I. Thiery, G. L. Benzon, G. Sinegre, N. Montey & N. Becker. 1998. Potency of product based on *Bacillus thurigiensis* var. israelensis interlaboratory variations. J. Am. Mosq. Control Assoc. 14:298-304.

Soarés, Jr. G. G. 1982. Pathogens of infection by the Hyphomycetous fungus *Tolyplocladium cylindrosporum* in *Aedes sierrensis* and *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). Entomophaga 27: 283-300.

Sprague, V. 1977. Systematics of the microsporidia. Comparative pathobiology, Vol. 2. Plenum Press, New York.

Statistica for Windows, Statsoft Inc. 1998. (Computer program manual). Tulsa, Ok: Statsoft, Inc.

Stock, S.P. & N. B. Camino. 1996. Nematodos entomopatógenos. En: Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. R. E. Lecuona (Ed.), 7: 105-107. Buenos Aires, Argentina: Talleres Graficos Mariano Mas.

Strasser, H., A. Vey & T. M. Butt. 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of

Metarhizium, *Tolypocladium* and *Beauveria* species. Bioc. Sci. Tech. 10: 717-735.

Sulaiman, I. 1983. Suceptibility of *Aedes aegypti* to infections with *Dirofilaria immitis* and *D. repens.* Southeast Asian. J. Of Trop. Medc. And Public Health 14: 543-547.

Sur, B., V. Bihari, A. Sharma & S. K. Basu. 1999. Survey of termite-inhabited soil and mosquito breeding sites in luknow. Indian for potential mycopathogens of anopheles stephensis. Mycopathologia 144: 77-80.

Sweeney, A. W., 1975. The mode of infection of the insect pathogenic fungus *Culicinomyces* in larvae of the mosquito *Culex fatigens*. Aust. J. Zool. 23: 49-57.

Sweeney, A. W. 1978. The effects of temperature on the mosquito pathogenic fungus Culicinimyces. Aust. J. Zool. 26: 47-53.

Sweeney, A.W. 1986. Laboratory and field observations on persistance and recycling potencial of *Culicinomyces clavisporus*. En: Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology, foundation of the fourth intl. R. A. Samson, J. M. Vlak & D. Peters (Eds.). (Proceedings of the foundation of the fourth international colloquium of invertebrate pathology, Veldhoven, the Netherlans) foundation of the fourth international colloquium of invertebrate pathology Wageningen. p.p. 175-177.

Sweeney, A. W; R. Cooper & B. E. Medcraft. 1983. Field tests of the mosquito fungus *Culicinimyces clavisporus* against the australian encephalitis vector *Culex annulirostris*. Mosq. News 43:290-297.

Tabashnik, B. E.. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thurigiensis*. Annu. Rev. Entomol. 39: 47-79.

Tabashink, B. E., N. L. Custhing, N. Finson & M. W. Johnson. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thurigiensis* in the diamondback moth (*Plutella xylostella)*. J. Econ. Entomol. 83: 1671-1676.

Tanada, Y. & H. K. Kaya. 1993. Fungal infections. En: Insect Pathology. Y. Tanada, H. K. Kaya (Eds.), pp 318-366. Academic Press.

Thiery, I. & E. Frachon. 1997. Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria. En: Manual of techniques in insect pathology. L. A. Lacey (ed.), pp. 55-90. Academic Press.

Tseng, M. 2007. Ascogregarine parasites as possible biocontrol agents of mosquitoes. En: Biorational control of mosquitoes. T. G. Floore (Ed.), 7: 36-49. American Mosquito Control Association, Inc.

Umphlett, C. J., & C. S. Huang. 1972. Experimental infection of mosquito larvae by a species of the aquatic fungus *Lagenidium.* J. Invertebr. Pathol. 20: 326-331.

Van Der Plaats-Niterink. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in mycology. 21: 1-240.

Veen, K. H. 1968. Recherches sur la maladie, due a *Metharhizium anisopliae* chez le críquetpelerin. Phd-thesis. Wageningen, the Netherlands: Landbouwhogeschool Wageningen.

Vignoli, R., E. Calvelo, H. Chiparelli & F. Schelotto. 2002. Hantavirus y dengue. www.higiene.edu.uy/cefa/libro2002/cap%207.pdf.

Walton, E. W. 2007. Larvivorous fish including *Gambusia*. En: Biorational control of mosquitoes. T. G. Floore (Ed.), 7: 184-220. American Mosquito Control Association, Inc.

Washino, R. K., 1981. Biocontrol of mosquitoes associated with California rice fields with special reference to the recycling of *Lagenidium giganteum* Couch and other microbial agents. En: Biocontrol of medical and veterinary pests. M. Laird (Ed.), pp 122-139. Praeger Publishers, New York.

Washino, R. K., J. Fetter, C. K. Fukushima & K. Gonot. 1976. The establishment of *Lagenidium giganteum*, an aquatic fungal parasite of mosquitoes, three years after field introduction. Proc. Calif. Mosq. Control Assoc. 44-52.

Weiser, J. 1988. Characterization of main groups of pathogens. En: Biological control of vectors. J. Weiser (Ed), John Wiley & Sons pp 44-80.

Weiser, J. 1991. Biological control of vectors. Wiley & Sons, Chichester.

Weiser, J. & V. Matha. 1988a. The insecticidal activity of cyclosporines on mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 51: 92-93.

Weiser, J. & V. Matha. 1988b. Tolypin, a new insecticidal metabolite of the fungi of the genus *Tolypocladium*. J. Invertebr. Pathol. 51: 94-96.

Weiser, J., & J. S. Pillai. 1981. *Tolypocladium cylindrosporum* (Deuteromycete: Moniliacae) a new pathogen of mosquito larvae. Entomophaga 26: 357-361.

WHO. 2007. Mobilizing research to halt exponential growth of dengue. TDR news 77: 8-11.

Zattau, W. C. & T. Jr. Mc Innis. 1987. Life cycle and mode of infection of *Leptolegnia chapmanii* (Oomycete) parasitizing *Aedes aegypti*. J. Invertebr. Pathol. 50: 134-145.