

REGISTRO MÁS AUSTRAL DEL GÉNERO *PROTOACHLYA* (SAPROLEGNIALES, PERONOSPOROMYCOTA) EN LA REGIÓN NEOTROPICAL

MÓNICA MIRTA STECIOW

Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo/Instituto de Botánica Spegazzini, Calle 53, n. 477, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina, msteciow@museo.fcnym.unlp.edu.ar

FEDERICO LEANDRO OSER

Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química, CIM, CONICET, Boulevard 120, n. 1489, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina

MARÍA JULIA OUSSET

Universidad Nacional del Comahue, Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue, CONICET, Buenos Aires 1400, 8300, Neuquén, Argentina

GUILLERMO SEBASTIÁN NATALE

Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química, CIM, CONICET, Boulevard 120, n. 1489, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina

CAROLINA SALGADO COSTA

Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química, CIM, CONICET, Boulevard 120, n. 1489, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina

Resumen: Durante un estudio de organismos acuáticos zoospóricos (Saprolegniales, Peronosporomycetes), los autores encontraron una especie identificada como *Protoachlya paradoxa*. Esta es la primera caracterización, del género *Protoachlya*, y de la mencionada especie en Argentina. En este artículo, se describe e ilustra a *P. paradoxa* aislada en medio de cultivo, a partir de muestras de agua y materia orgánica vegetal, recolectadas en inmediaciones de un campo agrícola, por el que pasa el Arroyo Carnaval, ubicado en el Partido de La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina, ubicada en la región Neotropical (dominio chaqueño). Se incluyen una descripción detallada y completa de la especie, observaciones ecológicas, e imágenes fotográficas de las estructuras características de la especie y una clave para distinguirla de *P. papillata*, especie que también fue encontrada en el Cono Sur de Sudamérica (Brasil, región Neotropical, Dominio Amazónico).

Palabras clave: Argentina, organismo zoospórico, Peronosporomycetes, *Protoachlya*, Saprolegniales.

SOUTHERNMOST OCCURRENCE OF THE GENUS *PROTOACHLYA* (SAPROLEGNIALES, PERONOSPOROMYCOTA) IN THE NEOTROPICAL REGION

Abstract: During a study of zoosporic aquatic organisms (Saprolegniales, Peronosporomycetes), the authors found a species identified as *Protoachlya paradoxa*. This is the first characterization of the

genus *Protoachlya* and the above-mentioned species in Argentina. In this article, we described and illustrated *P. paradoxa* isolated in culture medium, from water samples and organic plant material collected near an agricultural field through which the Carnaval stream flows, in the city of La Plata (Buenos Aires Province, Argentina), located in the Neotropical region (Chaqueño domain). We provided a detailed and complete description of the species, ecological observations, and photographic images of the characteristic structures of the species, as well as a key to distinguish it from *P. papillata*, a species that also occurs in the Southern Cone of South America (Brazil, Neotropical region, Amazonian Domain).

Keywords: Argentina, zoosporic organism, Peronosporomycetes, *Protoachlya*, Saprolegniales.

INTRODUCCIÓN

Los "mohos acuáticos" zoospóricos pertenecientes al Phylum Oomycota = Peronosporomycota (Straminipila), se encuentran naturalmente como saprófitos, colonizando una variedad de sustratos orgánicos (como restos vegetales en descomposición o exuvias de insectos), así también como parásitos de algas, protozoos, invertebrados, peces, anfibios y macrofitas, tanto en ambientes acuáticos como en terrestres en condiciones de humedad variable (Müller et al., 2004).

A nivel mundial existen numerosos reportes regionales específicos sobre los Peronosporomycetes y Chytridiomycetes; sin embargo en Sudamérica (y en particular en la región Neotropical), son aún escasos, los enfocados al conocimiento de la biodiversidad de estos organismos. Steciow et al. (2012), mencionan en su revisión bibliográfica de los organismos zoospóricos (Fungi, Straminipila y Protozoa), la presencia de un total de 434 especies, entre las que 55, son para Argentina y 68, para Brasil pertenecientes al Orden Saprolegniales (Peronosporomycetes), citados principalmente para la región Neotropical de ambos países. En Argentina, el número de especies registradas fue incrementado por el hallazgo de nuevas especies y nuevas citas, presentes en distintos ambientes de otras regiones biogeográficas del país (Steciow et al., 2013, Steciow et al., 2014).

El orden Saprolegniales, es el único dentro de los Peronosporomycetes que forma zoosporas primarias y secundarias biflageladas, separadas por períodos de enquistamiento (dimorfismo, con mono, di o poliplanetismo, según el género que se trate). Sin embargo, no todos los géneros poseen ambos tipos de zoosporas, como ocurre en el ciclo de vida del género Saprolegnia.

El género *Protoachlya* Coker pertenece a la familia Saprolegniaceae (clase Peronosporomycetes) y comprende ocho especies, con *Protoachlya paradoxa* como especie tipo (Index Fungorum, 2023). Propuesto por Coker (1923),

el género presenta un tipo de descarga de zoosporas similar al género *Achlya*, donde las zoosporas también dispuestas en varias hileras en el interior del zoosporangio, se liberan formando un agrupamiento o "cluster", en el extremo del esporangio, conocido como descarga aclioide. Esta última es característica del género *Achlya*, donde las esporas presentan un comportamiento monomórfico, debido a que se generan esporas primarias sin flagelos, y sus quistes se forman en el extremo del esporangio, germinando luego de unas horas y liberando una zoospora secundaria de tipo reniforme y biflagelada.

Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en *Achlya*, algunos especímenes de *Protoachlya* pueden presentar una liberación o descarga de zoosporas de tipo protoaclioide: una vez que se liberan las zoosporas primarias, algunas se alejan nadando del grupo apical mientras que otras permanecen y se enquistan cerca del poro de descarga (Johnson et al., 2002, Padgett & Johnson, 2004).

Otra característica de *Protoachlya* es la presencia en algunos aislamientos, del tipo de descarga de las zoosporas saprolegnoide, con la renovación de zoosporangios ocurriendo por proliferación interna, una vez que los zoosporangios primarios descargan y liberan sus zoosporas biflageladas primarias hacia el exterior. Esta última característica también se ha observado, hasta ahora, únicamente en el género Saprolegnia (Seymour, 1970, Johnson et al., 2002). Se ha señalado que la descarga protoaclioide es variable de acuerdo con la cepa estudiada, pudiendo estar influenciada por algunas condiciones como la edad del cultivo y su origen, o simplemente su ausencia puede ser una característica inherente del aislamiento estudiado (Gonçalves et al., 2017).

Coker (1923) consideró al género *Protoachlya*, como intermedio entre los géneros *Achlya* y Saprolegnia, debido a los caracteres de su reproducción asexual detallados. Aunque la liberación de zoosporas primarias es aclioide, Johnson et al. (2002) consideraron el patrón de comportamiento de las zoosporas suficiente pa-

ra mantenerlo separado de *Achlya*. En *Protoachlya*, las zoosporas primarias están provistas de flagelos en el momento de la liberación, lo que no ocurre en los representantes del género *Achlya*, en el que los flagelos no están presentes o son evanescentes tempranamente. Steciow et al. (2014) definieron que las especies del género *Protoachlya* tienen zoosporas dimórficas (primarias + secundarias), las mismas que presentan las especies de *Saprolegnia*.

Hasta el presente, el primer registro del género *Protoachlya* para Sudamérica, fue hecho en Brasil, donde se describió a la especie *P. paradoxa* obtenida de muestras de agua del Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, en São Paulo (Rogers et al., 1970). Posteriormente fue citada como *Achlya paradoxa*, en un relevamiento de especies encontradas en Brasil, habiéndose encontrado en el SE de Brasil (São Paulo), en el Dominio fitogeográfico correspondiente a Bosque o Mata Atlántica, cuyo tipo de vegetación se corresponde a la Selva Ombrófila o Floresta Pluvial (Milanez et al., 2007). Finalmente, Pires-Zottarelli (2022) la menciona como *P. paradoxa* en un listado actualizado de especies pertenecientes a la microbiota zoospórica de oomicetes del Brasil.

En Argentina, Marano (2009) observó previo a nuestro presente hallazgo, el crecimiento del micelio de una cepa de *Protoachlya* (sobre semillas de sésamo usadas como cebo) en muestras de agua provenientes de la Reserva Natural Selva Marginal de Punta Lara (Pdo de Ensenada). Sin embargo, no se reportaron en su trabajo las estructuras sexuales (oogonios y ramas anteridiales), necesarias para realizar una descripción bibliográfica que establezca una nueva cita.

Más tarde, se incluyó a *P. paradoxa*, en un listado de especies de *Saprolegniales*, encontrada por primera vez en el Arroyo Las Cañas (Marano et al., 2011), ubicado en Reserva Natural de Punta Lara y, posteriormente, en un estudio ecológico realizado a lo largo del Río Luján (Gantes et al., 2011). No obstante, en ninguno de estos trabajos, la descripción fue hecha de manera detallada, a partir del aislamiento y mantenimiento del cultivo de la propia colonia. Posteriormente, Gonçalves et al. (2017) compararon molecularmente una cepa brasilera (*Protoachlya papillata*, DR Gonçalves & CLA Pires-Zottarelli) con una cepa argentina registrada en el GenBank (EU551149) designada como *Protoachlya* sp., por Paul, B. & Steciow, M., correspondiente al primer aislamiento obtenido por Marano (2009), quedando ambas cepas agrupadas en un mismo clado.

El objetivo en este trabajo fue reportar la presencia de *Protoachlya paradoxa* Coker y caracterizar el aislamiento (mantenido en medio agarizado), mediante el reconocimiento de las estructuras reproductivas desarrolladas en culti-

vos de agua, sobre sustratos de diferente composición (técnica de cebado). La caracterización morfológica fue complementada con análisis de secuenciación que permitieron la identificación molecular del aislado y el análisis filogenético de la secuencia obtenida.

En esta contribución, se diferencian mediante una clave dicotómica (teniendo en cuenta sus estructuras morfológicas reproductivas distintivas), a las dos especies de *Protoachlya*, citadas para el Cono Sur (región Neotropical).

MATERIAL Y MÉTODO

ZONA DE ESTUDIO Y SITIO DE MUESTREO

La zona de estudio seleccionada fue la cuenca superior del arroyo Carnaval, al noroeste de la ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina, perteneciente a la región Neotropical, dominio chaqueño (Fig. 1). La cuenca tiene una superficie aproximada de 105 km² y su canal principal tiene una longitud estimada de 16 km con una profundidad media de 0,8 m. La cuenca del arroyo Carnaval se constituye típicamente como un humedal transitorio de la ribera platense según la clasificación de Passarelli et al. (2014).

En la zona de estudio se seleccionó un sitio de muestreo en el arroyo (34° 55' 24,211" S y 58° 6' 39,15" O), en un área donde confluyen la producción de soja y de hortalizas, bajo invernadero y a campo abierto (Fig. 1).

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Siguiendo los lineamientos de Marano & Steciow (2005) y Perotti et al. (2013), para aislamientos microbiológicos, se colectaron muestras de agua y vegetación. Las muestras de agua fueron tomadas superficialmente en botellas de vidrio oscuras de 1 L previamente esterilizadas. La colecta se realizó cuidadosamente procurando no producir burbujeo en el cuello de cada botella, las cuales fueron transportadas al laboratorio, en donde se colocaron 20 mL de agua/ caja de Petri estéril.

Las muestras de vegetación fresca y en descomposición se colectaron en bolsas de polietileno herméticas. Las especies reconocidas fueron *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb., *Azolla filiculoides* Lam., *Cortaderia selloana* (Sult. & Sult.f.) Asch. & Graebn., *Hydrocleys nymphoides* (Willd.) Buchenau, *Lemna gibba* L., *Schoenoplectus californicus* (C.A.Mey.) Soják, *Senecio bonariensis* Hook. & Arn. y *Typha latifolia* L., identificadas según el trabajo de Lahitte et al., (1997).

Estas muestras de materia orgánica húmeda (100-150 g de hojas, raíces, y tallos suspendidos), fueron procesadas en el laboratorio (10g aprox./caja de Petri) y cubiertos con 20 mL de agua destilada estéril.

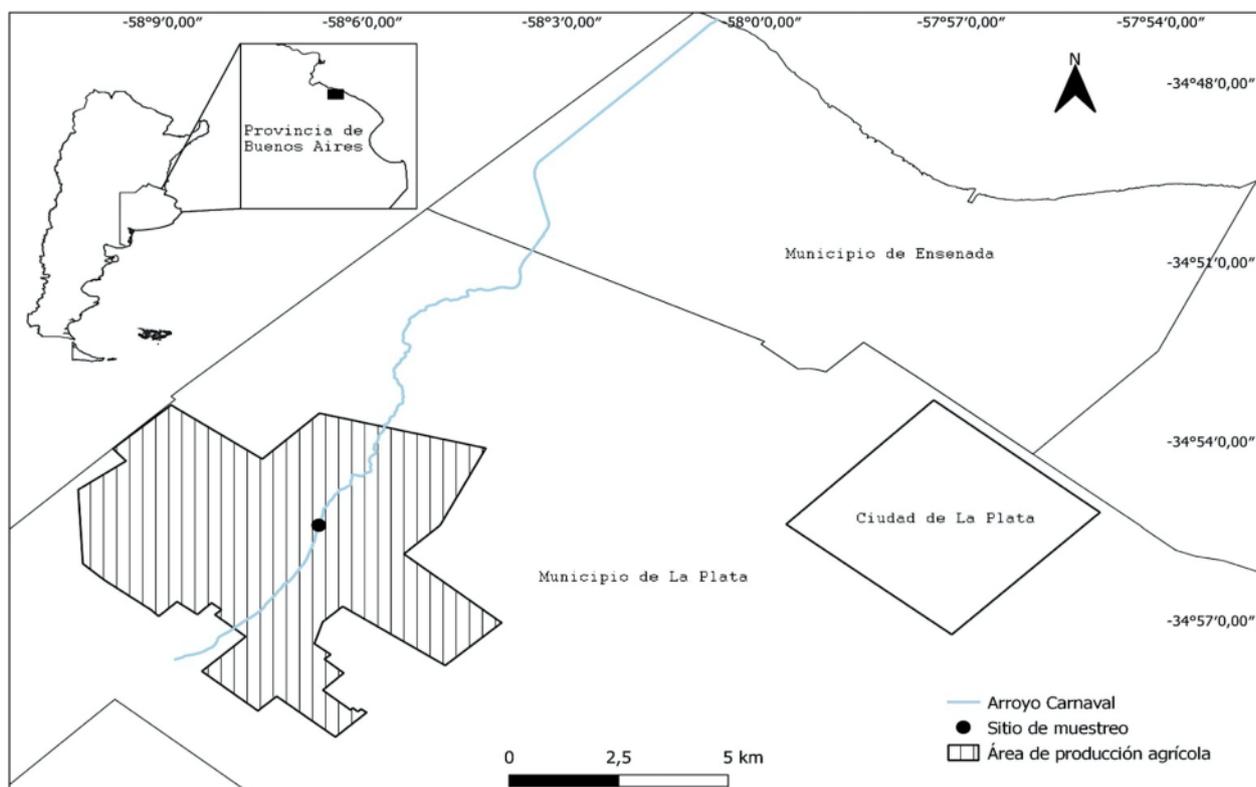


Fig. 1. Ubicación del sitio de muestreo a lo largo del Ayo. Carnaval, que atraviesa el cinturón frutihortícola ubicado en el Partido de La Plata, provincia de Buenos Aires. Argentina.

Fig. 1. Location of sampling site along the Ayo. Carnaval, which crosses the fruit and vegetable belt in the Partido de La Plata, Buenos Aires province. Argentina.

Para la obtención de las colonias de las Saprolegniales, las muestras de agua y materia orgánica flotante fueron tratadas mediante la "técnica de cebado", incubándolas en cajas de Petri estériles con semillas de sésamo (*Sesamum indicum* L.), las que quedaron flotando en la superficie del agua, actuando a modo de sustrato donde se fijan las zoosporas (Johnson, 1956, Sparrow, 1960, Stevens, 1974, Fuller & Jaworski, 1987). Al cabo de 5-7 días el micelio apareció sobre las semillas, las que fueron transferidas a nuevas cajas con agua destilada estéril para el desarrollo y consiguiente formación y maduración de las estructuras reproductivas sexuales y asexuales, las que fueron observadas con microscopio Leitz WETZLAR y fotografiadas con cámara OPTIKA MICROSCOPES C-B5. Las muestras se incubaron en un rango de temperatura de 15-20 °C.

Además de este sustrato celulósico, se utilizaron otros dos sustratos naturales alternativos a modo de cebo, conforme a la metodología empleada por Marano (2009), para ver el desarrollo completo del ciclo de vida de la especie, sobre sustratos adicionales, como son los queratínicos (en discos de 5 mm diám. de mudas de serpiente estériles) y quitínicos (hormigas estériles).

La identificación taxonómica se realizó empleando los trabajos monográficos de Coker (1923), Sparrow (1960), Johnson et al. (2002), Johnson et al. (2005).

Para la caracterización de esta cepa se emplearon cultivos de agua y medios líquidos/sólidos nutritivos, a 5 °C (Steciow & Oser: CIMC 4: y CIMC 5, obtenidos a partir de agua y materia orgánica, respectivamente). Para el mantenimiento del aislamiento obtenido, se procedió al cultivo en diferentes medios naturales (agar harina de maíz, Bacto TM agar) y sintéticos (YpSs Emerson), utilizados habitualmente para su aislamiento y/o conservación (y para la formación de sus estructuras reproductivas sexuales y asexuales), ya que poco se ha descrito con relación a este aspecto (Fuller & Jaworski, 1987). Asimismo, las colonias fueron mantenidas a 5 °C en cultivos de agua, con el agregado de semillas de sésamo y/o cáñamo cada 5 meses, en el laboratorio del CIM, CONICET-UNLP.

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

Con el fin de caracterizar las aguas del sitio de muestreo, se midieron *in situ* los parámetros físicoquímicos: temperatura (T) en °C, pH, oxígeno disuelto (OD) en mg.L⁻¹ y conductividad

(C) en $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ con equipo multiparamétrico Lutron WA-2017SD (provisto por Lutron Electronics®). Por otro lado, en el laboratorio se midieron también por triplicado, en las muestras de agua colectadas los parámetros alcalinidad y dureza en mg CaCO_3/L siguiendo la metodología estandarizada APHA (1992), métodos 2320 y 2340, respectivamente.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El ADN genómico se extrajo a partir de micelio siguiendo la metodología de Liu (Liu et al., 2020). La región ITS se amplificó utilizando los primers ITS1/ITS4 (White et al., 1990). El producto de amplificación previamente purificado se envió a Macrogen Corea para su secuenciación. La identificación molecular preliminar del aislado se realizó analizando y comparando la secuencia obtenida con secuencias publicadas utilizando la herramienta de alineamiento local por pares BLAST, de la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de EE. UU. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Estos resultados se complementaron con análisis de filogenia. Para los alineamientos se utilizó el programa MAFFT v. 7. (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) (Kato et al., 2019). La secuencia obtenida se alineó con secuencias de *Protoachlya* depositadas en el GenBank bajo los números KX555485.1, HQ643404.1, DQ393555.1, DQ393553.1, KP098351.1, HQ643403.1, KP006461.1, EU551149.1, la mayoría *P. paradoxa* y se utilizaron secuencias de *Saprolegnia* (KT964708, DQ393548.1) como grupo externo. Los análisis filogenéticos se realizaron sobre los alineamientos utilizando el software MEGA v. 11 (Tamura et al., 2021). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo Tamura 3 (Tamura, 1992) como el mejor modelo de sustitución de nucleótidos. El soporte de la topología interna de las ramas del árbol fue determinado por análisis de bootstrap con 1000 repeticiones. La secuencia se depositó en el GenBank como *P. paradoxa* isolate Stw-1 y se le asignó el número de acceso OR271918.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Protoachlya Coker., in Saprolegniaceae. p. 90. 1923.

Especie tipo: *Protoachlya paradoxa* Coker

El género se caracteriza por formar colonias monoicas, extensas, con micelio más denso y delicado que en *Achlya*, e hifas más delgadas. Zoosporangios cilíndricos, subcilíndricos a clavados, o alargados y falcados, u obpiriformes, renovados de forma cimosa, basípeta, o

simpodial, y también por proliferación interna, en donde los zoosporangios secundarios pueden ser producidos por fuera del orificio de salida del esporangio primario descargado (descarga saprolegnoide). Zoosporas dimórficas, diplanéticas, algunas o todas nadan fuera del orificio de liberación, o algunas se enquistan y permanecen como una agrupación laxa en la vecindad del orificio de salida del zoosporangio (descarga protoacloide), ocasionalmente con descarga dictioide, raramente aplanoide. Yemas usualmente presentes, esféricas a piriformes o elongadas. Oogonios laterales, intercalares o terminales, esféricos, obpiriformes, cilíndricos o piriformes, cuando intercalar. Pared del oogonio, internamente punteada o no, lisa u ornamentada. Pie del oogonio usualmente corto, simple o ramificado, frecuentemente laterales en relación con la hifa principal. Oosporas poco numerosas, céntricas o subcéntricas, de una a varias en número, ramas anteridiales andróginas, monoclinas o diclinas. Célula anteridial simple, piriforme, adherida lateral o apicalmente al oogonio.

Protoachlya paradoxa (Coker) Coker, in Saprolegniaceae. p. 91, pls. 26-28. 1923. (Fig. 2)
Achlya paradoxa Coker, Mycologia 6: 285. 1914.
Isoachlya paradoxa Kauffman, Amer. J. Bot. 8: 231. 1921.

Especie monoica, micelio difuso, extendido, alcanzando abundante desarrollo, de 1,0-2,5 cm a las 2 semanas de sembrado, moderadamente denso y ramificado. Hifas delgadas y ensortijadas, 10-21 μm de diám. en la base. Zoosporangios terminales, angostos, clavados a cilíndricos, rectos o ligeramente curvos, con extremos marcadamente curvados hacia el ápice, con una prominente papila de descarga, (100-) 175-375 (-700) \times 20-50 μm , renovados frecuentemente en disposición cimosa, basípeta, y en menor proporción simpodialmente, o renovados por proliferación interna. Zoosporas dimórficas. Descarga de zoosporas de tipo acloide, muchas de ellas de tipo protoacloide, frecuentemente del tipo saprolegnoide, raramente tipo aplanoide; quistes de zoosporas primarias, de 8-12 μm de diám. Yemas presentes, muy abundantes, esféricas, subesféricas, u obpiriformes, raramente cilíndricas o irregulares, terminales o intercalares, a menudo catenuladas. Oogonios terminales o laterales, algunos intercalares, raramente sésiles, esféricos u obpiriformes, ovales cuando intercalares, muy raramente constrictos o cilíndricos, 40-77 (-100) μm de diám. Pared del oogonio delgada, lisa, interiormente punteada de manera poco conspicua; pie del oogonio robusto, irregular o curvado, no ramificado, de $\frac{1}{2}$ a 2 $\frac{1}{2}$ veces el diám. del oogonio en longitud. Oosporas céntricas o subcéntricas, esféricas u ovales, (1) 2-5 (15) en número, generalmente llenando el oogonio,

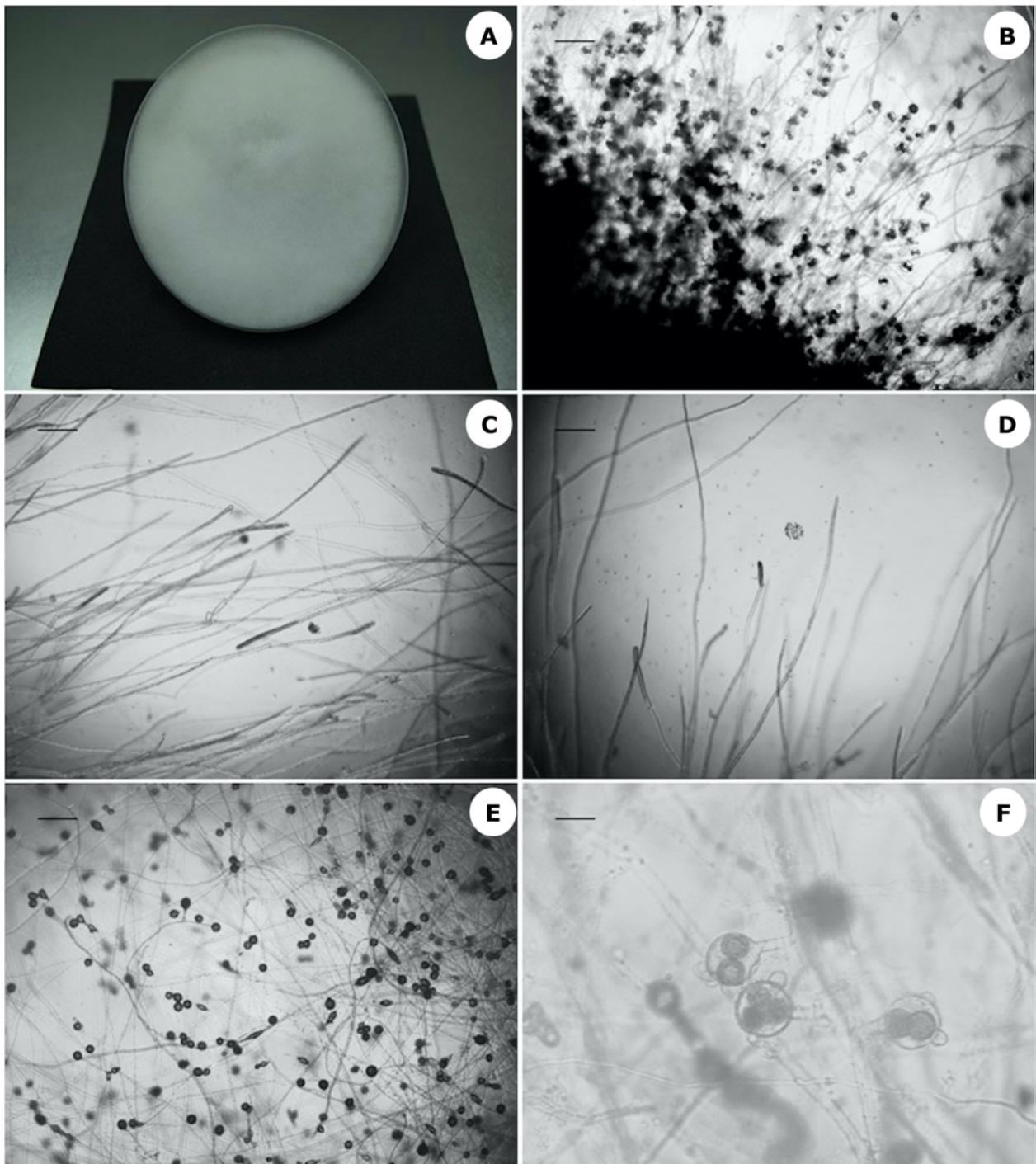


Fig. 2. *Protoachlya paradoxa*. A. Colonia con abundante micelio aéreo algodonoso, en YpSs agar (medio de Emerson). B. detalle del micelio, con abundantes yemas, sobre semillas de sésamo en cultivo en agua destilada estéril. C. Detalle de quistes, dispuestos en la boca del zoosporangio (descarga acliode-protoacliode). D. Hifas con zoosporangios llenos de zoosporas en su interior y otros descargados, con los quistes agrupados en su extremo. E. Micelio con abundante desarrollo de oogonios, con oosporas maduras en su interior, en cultivos de agua sobre sésamo y queratina. F. Detalle de oogonios, de pared externa lisa, con pocas oosporas céntricas-subcéntricas en su interior. Escalas: B-E, 100 μ m, F, 40 μ m.

Fig. 2. *Protoachlya paradoxa*. A. Colony with abundant cottony aerial mycelium on YpSs agar (Emerson's medium). B. Detail of the mycelium, with abundant buds, on sesame seeds grown in sterile distilled water. C. Detail of cysts, arranged at the mouth of the zoosporangium (aclioid-protoaclioid discharge). D. Hyphae with zoosporangia full of zoospores inside and expelling others, with grouped cysts at the end. E. Mycelium with abundant development of oogonia, with mature oospores inside, in water cultures on sesame and keratin. F. Detail of oogonia, with smooth outer wall and few centric-subcentric oospores inside. Bars: B-E, 100 μ m, F, 40 μ m.

(20-) 25-32 (-38) μm de diám., tubos de fertilización presentes. Ramas anteridiales abundantes, ocasionalmente andróginas e infrecuentemente monoclinas, delgadas, cortas, retorcidas o irregulares, dispuestas helicoidalmente alrededor del pie del oogonio, no ramificadas, células anteridiales clavadas o irregulares, adheridas apical o lateralmente, tubos de fertilización presentes, no persistentes.

Hábitat: Especie saprótrófa sobre semillas de sésamo, obtenida a partir de muestras de agua (material estudiado) y de materia orgánica vegetal (material estudiado), parásita de hirudíneos (Czeczuga et al., 2003a), crustáceos (Czeczuga et al., 2004), peces (Vishniac & Nigrelli, 1957, Sati, 1991).

Distribución geográfica: Alemania, Canadá, Dinamarca, Estados Unidos de América, Holanda, India, Latvia, Polonia, República Checa, Rusia, América del Sur (región Neotropical): Brasil, Argentina (material estudiado).

Material examinado: Argentina. Buenos Aires: Pdo. de La Plata: arroyo Carnaval en su recorrido por campo de uso agrícola, a partir de muestras de agua y de materia orgánica vegetal flotante (34° 55' 24,211" S y 58° 6' 39,15" O), 13-V-22, leg. Oser. (Steciow & Oser, CIMC 4 y CIMC 5).

Observaciones: Aunque las estructuras reproductivas sexuales del material de estudio (aislamiento) en la presente investigación coinciden en forma y tamaño con la descripción realizada por Johnson et al. (2002), se observó que, en cultivos de agua, los zoosporangios son de mayor longitud, que los descritos en el correspondiente trabajo monográfico (lo que también coincide con lo observado por Marano (2009), en la cepa encontrada en el Arroyo Las Cañas, Partido de Ensenada).

En nuestro aislamiento se constató la presencia de la liberación de las zoosporas del tipo saprolegnoide y renovación de los zoosporangios por proliferación interna.

En concordancia con Padgett & Johnson (2004), quienes reportan que, aunque este tipo de descarga se produce en el género, el tipo protoacloide predomina ligeramente en comparación con los demás tipos de liberación de zoosporas.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El resultado del BLAST realizado sobre las secuencias parciales correspondiente a la región ITS del aislado Stw-1 (número de acceso GenBank para el ITS OR271918) reveló un grado de homología entre 99,5-100% con las secuencias correspondientes de *P. paradoxa* depositadas en GenBank, entre ellas las cepas de referencia para esta especie (ATCC 44892, CBS 158.45). El análisis filogenético fue consistente con estos resultados. El aislado Stw-1 agrupó junto con las *P. paradoxa* utilizadas para este estudio en un clado con alto soporte (100% soporte de clado, 68% de soporte de subclado). Dentro del clado, pero en otro subclado (98% soporte de clado), y compartiendo el clado con una *Protoachlya papillata*, se encuentra el aislado previamente caracterizado en nuestro laboratorio como *Protoachlya* sp. Argentina (número de acceso GenBank para el ITS EU551149) (Fig. 3).

CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO Y DEL ÁREA ESTUDIADA

Cabe destacar que hasta el presente, en el Cono Sur de América (Región Neotropical), se encontraron solo 2 especies del género *Protoachlya*: *P. paradoxa* fue encontrada en Brasil y Argentina, mientras que *P. papillata* (actualmente nombre válido en lugar de *P. hypogyna* [(Coker & Pemberton) Johnson & Seymour] únicamente se ha citado para Brasil, obtenida por la técnica de cebado a partir de muestras de solución nutritiva hidropónica en cultivos ubicados en Itapericera da Serra, Estado de São Paulo (Gonçalves et al., 2017).

Estas especies son frecuentemente diferenciadas por sus estructuras, por lo tanto, se

CLAVE DE LAS ESPECIES DE *PROTOACHLYA* EN EL CONO SUR

1. Micelio con oogonios únicamente de pared lisa, ramas anteridiales abundantes, diclinas, ocasionalmente andróginas e infrecuentemente monoclinas, célula anteridial, apical o lateral..... ***Protoachlya paradoxa***
- 1'. Micelio con oogonios de pared ornamentada, (raramente lisa), ramas anteridiales escasas, andróginas o monoclinas, raramente diclina, célula anteridial, hipógina o hemihipógina ***Protoachlya apillata***

incluye una clave regional para diferenciarlas:

También se ha señalado, en diferentes hallazgos de *P. paradoxa*, que difícilmente de-

sarrolle estructuras reproductivas sexuales (oogonios, ramas anteridiales y oosporas) necesarias para su correcta identificación y



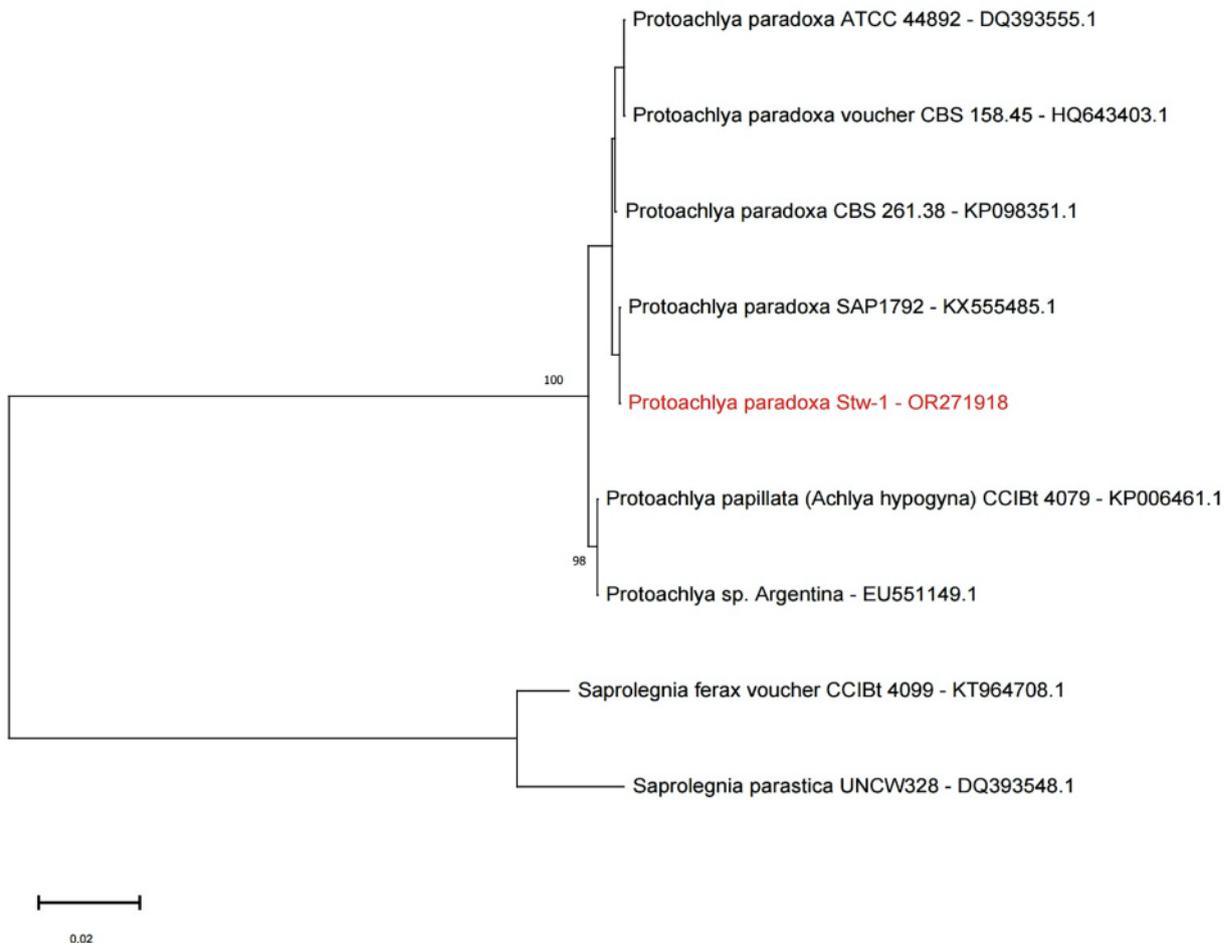


Fig. 3. Árbol filogenético por método de Máxima Verosimilitud para la secuencia de la región ITS. La secuencia del aislado identificado en este estudio se muestra en rojo. Los números junto a las ramas indican porcentaje de soporte de bootstrap (1000 réplicas), solo se muestran ramas con > 75% de soporte. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de ramas medidas en número de sustituciones por sitio.

Fig. 3. Phylogenetic tree by maximum likelihood method of the sequence of the region ITS. The sequence corresponding to the isolate identified in this study is shown in red. The numbers next to the branches indicate the percentage of bootstrap support (1000 replicates). Only branches with > 75% support are shown. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site.

caracterización específica (Coker, 1923, Marano, 2009). Estos autores además señalan el crecimiento y desarrollo completo de algunos aislamientos, en su ciclo de vida, sobre yema de huevo utilizada como sustrato, donde la formación de las estructuras sexuales parece estar inducida favorablemente.

En nuestro reciente aislamiento de *P. paradoxa* (Fig. 2), el micelio alcanza un notable crecimiento en medios agarizados (agar harina de maíz e YpSs), donde formó una colonia algodonosa aérea muy notable, de la misma manera que en cultivos de agua, tanto en la muestra original como en diferentes condiciones ensayadas a distintas temperaturas (15 °C y 25 °C).

Además, desarrolla estructuras reproductivas asexuales y sexuales (oogonios abundantes que alcanzan a madurar después de un cierto tiempo), y es capaz de colonizar sustratos celulósicos, quitínicos y queratínicos, donde desarrolla abundante micelio; así mismo, se observan numerosos oogonios en micelio creciendo en cultivos de agua, sobre semillas de sésamo utilizadas como sustrato, así como sobre mudas de serpiente estéril (queratina).

Dick (2001) distinguió cuatro especies incluidas en el género: *P. hypogyna* Shanor & Conover, *P. oryzae* Khulbe, *P. paradoxa* Coker, y *P. polysporus* (Lindsted) Apinis, en su trabajo monográfico de revisión sistemática del *R. Straminipila*.

Posteriormente, cinco especies fueron descritas por Johnson et al. (2002), de las cuales los autores reconocen que *P. paradoxa* es la única caracterizada por poseer oogonios de pared externa lisa, ya que las especies restantes: *P. benekei* (Furtado) Johnson & Seymour, *P. polyspora* (Lindsted) Apinis, *P. mucronata* (Ziegler) Johnson & Seymour y *P. hypogyna*, (Coker & Pemberton) Johnson & Seymour se caracterizan por poseer oogonios de pared externa ornamentada (papilada, crenulada, etc., según cada caso). Más tarde, Johnson & Seymour (2005), realizaron nuevas combinaciones, al cambiar algunas de las especies, que antes eran consideradas dentro del género *Achlya*, e incorporadas ahora, como especie del género *Protoachlya*. Recientemente, Gonçalves et al. (2017), consideraron inválido la denominación de *P. hypogyna* (Coker & Pemberton) Johnson & Seymour, y la denominaron *P. papillata* DR Gonçalves & CLA Pires-Zottarelli.

Por lo tanto, en el Index Fungorum (2023), se reconocen nueve registros, con ocho especies actualmente válidas, donde además de las ya mencionadas, se incorpora *Protoachlya nainitalensis* M. Upadhyay & Khulbe, descrita y caracterizada como una nueva especie en el 2003.

Los resultados de los análisis físico-químicos del agua se listan en la Tab.1.

En Sudamérica (región Neotropical), *P. paradoxa* fue encontrada a partir de distintos tipos de muestras o sustratos. Por un lado, se encontró en muestras de agua en el arroyo Las Cañas, del partido de Ensenada en Argentina (Marano, 2009) y en Mata Atlántica, SE de Brasil (Rogers et al., 1970) y por otro lado, a partir de restos orgánicos vegetales, en el área de estudio presentada en este trabajo. Estudios previos ya sostenían haber encontrado *P. paradoxa* no solo en el agua, sino también a partir de restos orgánicos vegetales flotantes y en ambientes con pH alcalinos (Lund, 1934; Czczuga et al., 2006), de la misma manera que sucedió para el aislado Stw-1., pero en el caso del estanque estudiado en Polonia, estuvieron asociados con las bajas temperaturas (3,5 °C), pH = 7,84 y un valor de 9,6 mg.L⁻¹ de OD.

En el arroyo Carnaval, las temperaturas promediaron los 12 °C, mientras que Marano (2009), la cita para el arroyo Las Cañas, en aguas con temperaturas que promedian los

20,33 ± 1,51 °C en los meses de otoño, con un pH en un rango estimado de 6,74-7,45, encontrando que fue más abundante en primavera, estando solo ausente en los muestreos de verano (Marano et al., 2011). Del mismo modo, Khulbe & Bhargava (1976) observaron que el género *Protoachlya* y *Achlya* se hallan mejor representados en los meses de otoño (15-23 °C), en un estudio llevado a cabo en la India. En el caso particular del estudio llevado a cabo en varios ambientes de Polonia (Czczuga et al., 2003b), solo en uno de ellos, se encontró a *P. paradoxa*, donde los datos de dureza del agua estuvieron comprendidos entre 72 mg.L⁻¹ en otoño y 60,48 mg.L⁻¹ en primavera, valores que resultaron muy inferiores al obtenido en el sitio estudiado en el Arroyo Carnaval.

Czczuga et al. (2005), concluyeron que el mayor número de especies fúngicas que aparecen en plantas sumergidas es en cuerpos de agua lóticos, siendo menor en cuerpos lénticos con aguas estancadas, de modo tal que el número de hongos y de oomicetes en los cuerpos de agua, depende no solo de factores abióticos (químicos del agua), sino también de propiedades bióticas, especialmente de interacciones positivas o negativas entre los hidrobiontes que lo habitan.

También es distintivo de este hallazgo bonaerense, que las muestras cebadas en cultivos de agua desarrollaron, en algunas cajas de Petri, las estructuras reproductivas sexuales, por lo que pudo ser identificada, a pesar de que en los hallazgos a nivel mundial (Coker, 1923, Marano, 2009), señalan que es una especie que difícilmente cumple su ciclo completo, predominando el desarrollo de estructuras asexuales (zoosporangios, zoosporas y yemas). Por lo tanto, se trataría de una especie de fácil dispersión en el ambiente donde se la encuentre, debido al quimiotaxismo de sus zoosporas y su implicancia en la colonización del sustrato, al que es capaz de degradar (Sparrow, 1960, Fuller & Jaworski, 1987, Johnson et al., 2002).

En este sentido, Marano (2009) obtuvo el crecimiento de *P. paradoxa*, sobre semillas de sésamo a partir de muestras de agua, pero esta no creció sobre mudas de serpiente o escamas de peces, utilizadas como sustrato, a diferencia de nuestros recientes aislamientos. Es importante resaltar la diferente habilidad de los distintos aislamientos, y su papel en la cadena

Tab. 1. Datos físico-químicos del sitio de muestreo, La Plata, Argentina.

Tab. 1. Physicochemical data from sampling site, La Plata, Argentina.

T	pH	OD	CE	Alcalinidad	Dureza
12,6 ± 0,9	8,0 ± 0,4	3 ± 1	1,1 ± 0,2	887 ± 26	159 ± 5

ecológica, ya que existen algunas menciones de *P. paradoxa*, como especie parásita de hirudíneos (Czczuga et al., 2003a), crustáceos (Czczuga et al., 2004) y peces (Vishniac & Nigrelli, 1957; Sati, 1991).

CONCLUSIONES

Protoachlya paradoxa es descrita y caracterizada (morfológica y molecularmente) e ilustrada por primera vez para la Argentina (dominio chaqueño, región Neotropical). Representa el hallazgo más austral para el hemisferio occidental y de la mencionada región biogeográfica, y constituye la primera cita descriptiva del género, mantenido a partir de cultivos de agua y en medios de cultivo agarizados. Esta especie puede colonizar sustratos orgánicos de diferente composición, lo que vislumbra la potencialidad de su capacidad enzimática, y por las características del área muestreada, su resistencia a la presencia de herbicidas o pesticidas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Universidad Nacional de la Plata (Proyectos de incentivos 11/N921, Dr. Steciow), al CONICET (Proyecto PIP 11220200102947CO 2021/2023, Dr G.Natale y PUE 2020, Dr. A. Porta) y a la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (PICT 2019-1177, Dra. Salgado Costa), por el apoyo económico brindado para el estudio de los hongos acuáticos zoospóricos, saprótrofos y parásitos de anfibios. Asimismo, agradecemos al Sr. Marinelli, por facilitarnos el acceso al sitio de muestreo.

REFERENCIAS

Alexopoulos, C. J., C. W. Mims & M. Blackwell. 1996. Introductory mycology. 4 ed. New York, John Wiley & Sons, Inc.

APHA, American Public Health Association, WPCF. 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 17 ed. Madrid, Díaz de Santos SA.

Coker, W. C. 1923. The Saprolegniaceae with notes on other water molds. Chapell Hill, Univ. North Carolina Press. DOI: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.6494>

Czczuga B, B. Kisiewicz & A. Godlewska. 2003a. Zoosporic fungi growing on leeches (Hirudinea). Pol. J. Environ. Stud. 12: 361-364.

Czczuga B., B. Kisiewicz & B. Mazalska. 2003b. Further Studies on Aquatic Fungi in the River Biebrza within Biebrza National Park. Pol. J. Environ. Stud. 12: 531-543

Czczuga, B, B. Kisiewicz & P. Gruszka. 2004. Pallasea quadrispinosa G.O Sars specimens as vectors of aquatic zoosporic fungi parasiting on fish. Pol. J. Environ. Stud. 13: 21-31.

Czczuga B., B. Mazalsk, A. Godlewska & E. Muszyńska. 2005. Aquatic fungi growing on dead fragments of submerged plants. Limnologica. 35: 283-297. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.limno.2005.07.002>

Czczuga, B., M. Kozłowska, A. Godlewska, E. Muszyńska & B. Mazalska. 2006. Aquatic fungi and chromistan organisms (fungus-like organisms) growing on dead individuals of free-floating plants in water bodies of north-eastern Poland. Mycologia Balcanica. 3: 143-153.

Dick, M. W. 2001. Straminipilous fungi. Systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the marine Straminipilous protists, the Plasmodiophorids and similar organisms. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Fuller, M. S. & A. Jaworski. 1987. Zoosporic fungi in teaching and research. Athens (Georgia). Southeastern Pub. Corp. DOI: <https://doi.org/10.2307/3807702>

Gantes, P., A. V. Marano & L. Rigacci. 2011. Changes in the decomposition process associated with the invasión of *Gleditsia triacanthos* (honey locust) in pampean streams (Buenos Aires, Argentina). Journal of Freshwater Ecology 26: 481-494. DOI: <https://doi.org/10.1080/02705060.2011.578397>

Gonçalves D. R., S. C. O. Rocha & C. L. A. Pires-Zottarelli. 2017. *Protoachlya papillata* (Saprolegniales, Oomycota): a new name for *Protoachlya hypogyna* (Coker & Pemberton) TW Johnson & RL Seym. Phytotaxa. 314: 273-278. DOI: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.314.2.9>

Index Fungorum. [permanentemente actualizado, consulta 2023] CABI Bioscience & CBS database of fungal names. Disponible en: <http://indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp>. Acceso en 10 de may. 2023.

- Johnson Jr, T. W.** 1956. The genus *Achlya*: morphology and taxonomy. Ann Arbor, University of Michigan Press.
- Johnson Jr, T. W., R. L. Seymour & D. E. Padgett.** 2002. Biology and systematics of the Saprolegniaceae. Disponible en: <<http://dl.uncw.edu/digilib/Biology/Fungi/Taxonomy%20and%20Systematics/Padgett%20Book>>. Acceso en 09 de jul. 2022.
- Johnson Jr, T. W., R. L. Seymour & D. E. Padgett.** 2005. Systematics of the Saprolegniaceae: new combination. Mycotaxon. 92: 11-32.
- Katoh, K., J. Rozewicki & K. D. Yamada.** 2019 (Briefings in Bioinformatics 20:1160-1166) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. Briefings in Bioinformatics. 20: 1160-1166. DOI: <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Khulbe, R. D. & K. S. Bhargava.** 1976. Distribution and seasonal periodicity of water molds in some lakes in Nainital Hills, India. Hydrobiologia. 54: 67-72. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00018772>
- Liu D., S. Coloe, R. Baird & J. Pederson.** 2000. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. J. Clin. Microbiol. 38(1): 471. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.38.1.471-471.2000>
- Lahitte, H. B., J. A. Hurrell, M. J. Belgrano, L. S. Jankowski, K. Mehlreter, M. P. Haloua & G. Canda.** 1997. Plantas de la costa: las plantas nativas y naturalizadas más comunes de las costas del Delta del Paraná, Isla Martín García y Ribera Platense. v. 1. Buenos Aires, Lola.
- Lund, A.** 1934. Studies on Danish freshwater phycomycetes and notes on their occurrence particularly relative to the hydrogen ion concentration of the water. Mem. Acad. Sci. Denmark. 6: 1-97.
- Marano, A. V. & M. M. Steciow.** 2005. Colonización de sustratos naturales y artificiales por hongos acuáticos zoospóricos. Biología Acuática. 22: 203-209.
- Marano, A. V.** 2009. Diversidad de organismos zoospóricos (Fungi y Straminipila) en un ambiente lótico de la provincia de Buenos Aires (Argentina). 264 p. Doctorado en Ciencias Naturales, orientación ecología. Trabajo de Tesis Doctoral (FCNyM, Universidad Nacional de La Plata). La Plata.
- Marano, A. V., M. D. Barrera, M. M. Steciow, F. H. Gleason & J. L. Donadelli.** 2011. Diversity of zoosporic true fungi and heterotrophic stramenipiles in Las Cañas stream (Buenos Aires, Argentina): assemblages colonizing baits. Fundam. Appl. Limnol. / Archiv für Hydrobiologie. 178: 203-218. DOI: <https://doi.org/10.1127/1863-9135/2011/0178-0203>
- Milanez, A. I, C. L. A. Pires-Zottarelli & L. A. Gomes Lenk.** 2007. Brazilian zoosporic fungi. 1 ed. São Paulo, WinnerGraph.
- Müller, G. M., G. F. Bills & M. S. Foster.** 2004: Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Burlington, Elsevier Academic Press. DOI: [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0282:SFTI-DA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0282:SFTI-DA]2.0.CO;2)
- Padgett, D. E. & T. W. Johnson.** 2004. Zoosporangial discharge in *Protoachlya hypogyna* (Saprolegniaceae) isolated from Southeastern North Carolina. Mycologia. 96: 205-207. DOI: <https://doi.org/10.1080/15572536.2005.11832968>
- Passarelli, L. M., C. H. Rolleri, M. M. Cicciarelli, A. C., Dedomenici & G. González.** 2014. Flora vascular de humedales permanentes y transitorios bonaerenses (Buenos Aires, Argentina). Bot. Complut. 38: 139-154. DOI: https://doi.org/10.5209/rev_BOCM.2014.v38.45782
- Perotti, M. G., M. D., Basanta, M. M. Steciow, J. V., Sandoval-Sierra & J. Diéguez-Uribeondo.** 2013. Early breeding protects anuran eggs from Saprolegnia infection. Austral Ecology. 38: 672-679. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/aec.12014>
- Pires-Zottarelli, C. L. A.** 2022. Saprolegniales in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponible en: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB102078>>. Acceso en 09 oct. 2022.
- Rogers, A. L., A. I. Milanez & E. S. Beneke.** 1970. Additional aquatic fungi from the São Paulo State. Rickia. 5: 93-110.
- Sati, S. C.** 1991. Aquatic fungi parasitic on temperate fishes of Kumaun Himalaya, India. Mycoses. 34: 437-441.
- Seymour, R. L.** 1970. The genus *Saprolegnia*. Nova Hedwigia. 19: 1-124.
- Sparrow Jr, F. K.** 1960. Aquatic Phycomycetes. 2 ed. Ann. Arbour, Univ. Michigan Press.

- Steciow, M. M., A. I. Milanez, C L A. Pires-Zottarelli, A. V. Marano, C. G. Vélez & P. M. Letcher.** 2012. Zoosporic true fungi, Heterotrophic straminipiles and Plasmodiophorids: status of knowledge in South America. *Darwiniana*. 50: 25-32. DOI: <http://doi.org/10.2307/41825695>
- Steciow, M. M., E. Lara., A. Pillonel, S. Pelizza & L. Belbahri.** 2013. Incipient loss of flagella in genus *Geolegnia*: the emergence of a new clade within *Leptolegnia*? *IMA Fungus*. 4: 169-175. DOI: <http://doi.org/10.5598/imafungus.2013.04.02.02>
- Steciow, M. M., E. Lara., C. Paul, A. Pillonel & L. Belbahri.** 2014. Multiple barcode assessment within the *Saprolegnia-Achlya* clade (Saprolegniales, Oomycota, Straminipila) brings order in a neglected group of pathogens. *IMA Fungus*. 5: 439-448. DOI: <http://doi.org/10.5598/imafungus.2014.05.02.08>
- Stevens, R. B.** 1974. *Mycological guidebook*. Seattle, University of Washington Press.
- Tamura, K.** 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*. 9: 678-687. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>
- Tamura, K., G. Stecher & S. Kumar.** 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 38: 3022-3027. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Vishniac, H.S. & R. F. Nigrelli.** 1957. The ability of the Saprolegniaceae to parasitize platyfish. *Zoologica*. 42: 131-134.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (Eds.). *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. New York, Academic Press.

Editor Convidado / Editor Invitado / Guest Editor: Jadson Diogo Pereira Bezerra, UFG, Brasil
Recebido / Recibido / Received: 25.07.2023
Revisado / Revised: 24.10.2023
Aceito / Aceptado / Accepted: 24.10.2023
Publicado / Published: 06.11.2023
DOI: <https://doi.org/10.5216/rbn.v20iesp.76854>
Dados disponíveis / Datos disponibles / Available data: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OR271918.1/>