

SAPROLEGNIOSIS EN TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) EN LA PISCICULTURA DE RIO BLANCO (V REGION-CHILE)

(*Saprolegniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)
in "Rio Blanco" pisciculture, V Región-CHILE*)

Valia M. Vivar Muñoz

Escuela de Ciencias del Mar, Universidad Católica de Valparaíso
Av. Altamirano 1480 Valparaíso, Chile.

Palabras clave: Saprolegniosis, *Saprolegnia parasitica*, trucha arcoiris

Key words: Saprolegniosis, *Saprolegnia parasitica*, rainbow trout

RESUMEN

En la Piscicultura de Rio Blanco (V Región) entre Abril, 1995 y Marzo 1996, se estudiaron los agentes responsables de saprolegniosis en trucha arcoiris y sus huevos, con el objetivo de caracterizar morfo-fisiológica y patológicamente a los hongos del complejo *Saprolegnia* asociados a su cultivo.

Los propágulos de dispersión fúngicos (zoosporas), se obtuvieron a partir de 2 estados econutricionales: "saprotrofo", aislados de muestras de agua de 5 sectores de la piscicultura, y "biotrofo" desde peces y huevos infectados. A las muestras de agua se les adicionó semillas de cáñamo como cebo, mientras que las hifas provenientes del estado biotrofo se cultivaron directamente en agar GY. La determinación taxonómica de los aislamientos se realizaron mediante análisis de las hifas y de los órganos reproductivos, cultivados en semillas de cáñamo, mien-ras que, las características fisiológicas se observaron en agar GY, a 10, 20 y 30°C, y con tres regímenes de luz, midiéndose el tamaño de las colonias cada 24 hr para determinar su crecimiento diario.

Desde las muestras de agua se aislaron 2 tipos de colonias que se diferenciaron por morfología y velocidad de crecimiento. Los aislamientos se desarrollaron en las 3 temperaturas utilizadas aunque con distintas tasas de crecimiento.

Mediante una incisión subcutánea poco profunda en los peces, se demostró el poder patógeno de las zoosporas de las cepas estudiadas, subdividiéndolas en tres grupos experimentales según su origen: **BIOR** (= Biotrófos), **SAPR** (= Saprotrofos con colonias de crecimiento regular) y **SAPI** (= Saprotrofos con colonias de crecimiento irregular). Los resultados de patogenicidad indicaron que las cepas **BIOR** y **SAPR** fueron patógenas, alcanzando un 100% de morbilidad, mientras

SUMMARY

Within April 1995 and March 1996, the agents responsible for causing saprolegniosis on rainbow trouts and their eggs were studied in the pisciculture of Rio Blanco (5° región), in order to get a morpho-physiological and pathogenical characterization of the fungi from the *Saprolegnia* complex, associated to their culture.

The zoospore were collected from 2 econutritional states "saprotrophic", isolated from water samples taken in 5 sectors of the pisciculture and "biotrophic" from infected fish and eggs. Water samples were added with hemp-seed as a bait while hypha resulting from biotrophic state were directly cultivated in GY agar.

The taxonomic determination of isolates was carried out by means of the analysis of hypha and the reproductive organs cultured in hemp-seed, whereas physiological characteristics were studied in GY agar at 10, 20 and 30°C and under three lighting conditions, the size of colonies being measured each 24 hr to ascertain their daily growth.

Two kinds of colonies, wich differed one from the other in morphology and growth, were isolated from the water samples. Isolations were developed under the three prescribed temperatures yet with different rates of growth.

By making a shallow subcutaneous incision in the fish, the pathogenic capacity of zoospore from the strain under study was shown, subdividing them into 3 experimental groups according to their origin: **BIOR**, (= Biotrophics), **SAPR** (= Saprotrophics with regular grown colony) and **SAPI** (= Saprotrophics with irregular grown colony). The results of pathogenicity revealed that **BIOR** and **SAPR** strain were pathogenic reaching a 100% morbidity, whereas **SAPI** strain behaved like saprotrophic (0-1% morbidity).

las cepas SAPI, se comportaron como saprotrofas (morbilidad entre 0-1%).

Como caracter concluyente en la identificación final de los hongos, se utilizó su capacidad de crecer a 30°C. Todas las cepas aisladas se clasificaron como *Saprolegnia parasitica* Coker.

INTRODUCCION

El término saprolegniosis, se emplea para designar una infección fúngica (micosis) producida por una amplia variedad de hongos, pertenecientes a los géneros, *Achlya*, *Aphanomyces*, *Leptomitosis*, *Pythium* y *Saprolegnia*. La mayoría de ellos pertenecen al Orden "Saprolegniales", Clase *Oomycetes* (Scott y O'Bier, 1962; Singhal et al, 1987; Willoughby, 1978 Xu et al, 1990; Rand y Munden, 1993a; Rand y Munden, 1993 b). Muchos de estos *Oomycetes* son capaces de infectar peces de habitat marino, estuarino o dulceacuicola, en todas sus etapas de vida, huevos, larvas, juveniles y adultos (Scott y O'Bier, 1962; Xu y Rogers, 1991; Rand y Munden, 1993 b).

La saprolegniosis de los peces teleosteos se considera como una infección secundaria (oportunist) a una enfermedad viral o bacteriana o como consecuencia de una lesión en la superficie del pez (Richards y Pickering, 1978; Willoughby, 1978; Xu et al., 1990). En los peces salmonídeos, tales como *Salvelinus alpinus*, *Salmo trutta*, *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss*, se ha encontrado que, por lo general, el agente causal de estas micosis corresponde a hongos del género *Saprolegnia* (Richards y Pickering, 1978; Papatheodorou et al., 1981; Willoughby, 1978). Las especies más frecuentemente citadas corresponden a "*Saprolegnia parasitica* Coker" y "*Saprolegnia diclina* Humprey" (Scott y O'Bier, 1962; Singhal et al, 1987; Willoughby, 1978; Bullis y Noga, 1990; Hatai y Hoshiai, 1993; Dieguez-Urbeondo et al., 1994).

Debido a su naturaleza saprótrofa los hongos responsables de las micosis en peces son abundantes en el medio ambiente acuático, siendo éste la principal fuente de infección. En algunas cepas potencialmente patógenas los mismos peces infectados son considerados como vectores. El modo de transmisión de la enfermedad es directa, el hongo pasa del estado saprótrofo al estado biótrofo, vía esporas, cuando encuentra un huésped receptivo (Kinkelin et al, 1985).

Para poder determinar el agente causal, es necesario aislarlo desde el animal enfermo y obtener sus estructuras reproductivas en un medio de cultivo apropiado, los anamorfos del hongo son utilizados para definir los géneros, y los teleomorfos para las especies (Bullis y Noga, 1990). Debido a que las estructuras sexuales de *Saprolegnia parasitica* Coker son morfológicamente similares a las observadas en el estado saprotrofo de la

As a conclusive measure in the final identification of the fungi, their ability to grow at 30°C was used. Every isolated strain was classified as *Saprolegnia parasitica* Coker.

especie "*Saprolegnia diclina* Humprey", se ha optado por utilizar el término "Complejo *Saprolegnia*" para designar al complejo formado por *S. parasitica* - *S. diclina* (Singhal et al, 1987; Willoughby, 1978; Dieguez-Urbeondo et al., 1996). Este complejo se caracteriza por presentar un crecimiento masivo de delgados filamentos de color blanco-gris, semejante a motas de algodón en la superficie de piel, aletas y agallas de los peces (Papatheodorou et al, 1981; Kinkelin et al, 1985; Richard y Pickering, 1978; Willoughby, 1978).

Los hongos responsables de las saprolegniosis son cosmopolitas, sin embargo, la distribución de las especies está controlada principalmente por la temperatura del agua, mostrando una clara fluctuación estacional, con un máximo de especies en primavera y otoño (Papatheodorou, 1981; Hubert, 1982). En Chile las micosis de peces de cultivo y sus huevos se han observado desde la V hasta la XI Regiones, por lo general se denominan como saprolegniosis, aunque no se hayan identificado la o las especies de hongos responsables. El diagnóstico de estas micosis es muy delicado, pues algunas cepas, en el pez o aisladamente, son incapaces de crecer y, en consecuencia, imposibles de diferenciar de las abundantísimas especies saprotrofas presentes en el medio acuático (Kinkelin, et al., 1985).

En esta investigación se realizó una caracterización morfo-fisiológica y patogénica de hongos del "complejo *Saprolegnia*" asociadas al cultivo de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), a partir de su estado biótrofo y saprótrofo en la piscicultura de Río Blanco, V Región, Chile.

MATERIALES Y METODOS

Las muestras fueron tomadas en la Piscicultura de Río Blanco, perteneciente a la Universidad Católica de Valparaíso, este centro de cultivo se encuentra ubicado en la provincia de Los Andes, 45 Km. al Este de la ciudad de Los Andes, a una altura aproximada de 1420 m.s.n.m.

1.- Obtención y cultivo del hongo a partir de muestras de agua (estado saprotrofo).

Las muestras se tomaron mensualmente, entre abril (1995) y marzo (1996) con temperaturas que fluctuaron entre 5 y 15°C, en cinco sectores de la Piscicultura que

corresponden a :

- Estanque de tierra (E.T.)
- Estanque de PVC (E.P.)
- Estanque de cemento (E.C.)
- Sala de incubación (S.I.)
- Toma de agua (T.A.)

En cada uno de estos lugares se tomaron 3 muestras, las que fueron colectadas a una profundidad de 30 cm, con botellas estériles de 30 ml, en una región cercana a la orilla o borde de los estanques. Se llenaron con 25 ml de agua y se taparon, trasladándose al laboratorio en el transcurso de 4-5 horas. Una vez allí se vertió su contenido en recipientes con 10 ml de agua destilada estéril, posteriormente, como cebo, se adicionó 3 mitades de semillas de cáñamo esterilizadas en autoclave.

A los 15 días, las semillas colonizadas, se sembraron en placas con agar GY, consistente en 10 g de glucosa, 2,5 g de extracto de levadura y 15 g de agar en 1000 ml de agua destilada (Hatai y Hoshiai, 1992a). El pH del medio se reguló en 6,5 y para inhibir el crecimiento bacteriano se adicionó al medio 500 µg/ml de penicilina G y sulfato de estreptomycin.

Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente (16-22°C), por un período de 5 a 10 días, bajo un régimen de luminosidad normal. A cada una de las muestras obtenidas se les midió, el tiempo requerido para colonizar las semillas de cáñamo y el diámetro que alcanzaron las colonias en éstas a los 15 días de cultivo. En las placas con agar GY se observó la morfología de la colonia y se registró el tiempo requerido para cubrir completamente la superficie del agar (9 cm diámetro).

2.- Obtención y cultivo de los hongos acuáticos a partir de peces y huevos infectados (estado biotrófo)

Peces: Mensualmente se tomaron muestras de 3 especímenes vivos de trucha arcoiris, (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) con síntomas de saprolegniosis, lo que se manifestó por la presencia de manchas algodonosas en la piel (Xu y Rogers, 1991), provenientes de los estanques de cultivo, tierra y PVC. Se seleccionaron estos estanques porque en ellos se observó la mayor incidencia de peces con micosis.

De cada pez se retiraron fragmentos de micelio desde el centro y bordes de la lesión formándose así un pool de muestras (por pez), estas se lavaron con agua destilada estéril y se secaron, posteriormente se pusieron en 3 placas Petri con agar GY y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el desarrollo de las colonias (4 días).

De los mismos estanques se seleccionaron tres peces aparentemente sanos, sin signos de micosis, a éstos se les realizó un raspado de escamas y mucus superficial

el que se inoculó en Placas de Petri con agar GY.

Huevos: Durante los meses de Junio, Julio y Agosto se tomaron muestras de 9 huevos sanos y nueve huevos infectados (por mes), los que se lavaron, secaron y pusieron directamente sobre placas de Petri con agar GY (Scott y O'Bier, 1962). Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente (16-22°C), hasta el crecimiento de las colonias (4 días).

A los 4 días de incubación en Agar GY a temperatura ambiente y régimen de luz normal, se registró la morfología y crecimiento de las colonias obtenidas del micelio proveniente de los peces y huevos infectados.

3.- Obtención de cepas puras a partir de los estados saprótrofo y biotrófo y mantención de los hongos.

Cuando las colonias cubrieron las placas con agar GY, se removieron algunas hifas, se transfirieron a nuevas placas con agar, y se incubaron a temperatura ambiente. Al cabo de tres días, de la periferia de las colonias se sacó un cuadrado (3x3 mm) de agar con hifas, el que se transfirió a una nueva placa con agar.

Con el fin de obtener cultivos puros, la operación anterior se repitió cinco veces cuidando que las hifas contenidas en el bloque de agar fueran de reciente aparición. Los cultivos así obtenidos se consideraron cultivos puros y fueron traspasados a tubos con agar inclinado. Se mantuvieron a 5°C, transfiriéndose mensualmente.

4 - Caracterización de las cepas aisladas (Saprotrofes y Biotrofes).

Caracterización morfológica: Tanto para las muestras obtenidas desde las diversas fuentes de agua, como de aquellas aisladas de los peces y huevos infectados se observó la morfología de las hifas vegetativas, posteriormente se indujo la formación de estructuras reproductivas, para lo cual, se sembró un inóculo de cada una de las cepas en placas con agar GY.

Al tercer día de cultivo a temperatura ambiente, 3 mitades de semillas de cáñamo estériles se dispusieron sobre las colonias, cuando éstas se infectaron se transfirieron a placas con agua destilada estéril, seguida de una incubación por 5-10 días a temperatura ambiente (16-22°C). Con el fin de observar el desarrollo de las estructuras reproductivas (asexuales y sexuales), se seleccionaron porciones de las hifas que fueron observadas al microscopio con (Lactofenol con azul de algodón) y sin tinción.

Caracterización fisiológica: Se seleccionaron 40 colonias que fueron cultivadas en agar GY y sometidas a dos condiciones de temperatura (10 y 20°C). Para determinar

si el régimen de luz influye en el crecimiento de las colonias, estas fueron incubadas bajo tres condiciones de luz (normal, iluminadas durante 24 horas y en oscuridad).

Con el fin de construir curvas de crecimiento radial de todas las cepas, se retiró un trozo de agar (3x3 mm) con hifas proveniente de todas las placas donde se cultivaron las cepas originales, y se sembraron en triplicado en placas con agar GY. El crecimiento de estas colonias se midió con un pie de metro cada 24 horas, hasta completar la superficie de las placas (9cm) (Hatai y Hoshiai, 1992b).

Para el cálculo final se tomó un promedio con los valores registrados de tres mediciones.

5.- Patogenicidad de las cepas aisladas

Para probar la patogenicidad de los hongos aislados, se seleccionaron:

- 40 truchas arcoiris con un peso promedio de 100 (± 12)g y una longitud de 21 (± 2) cm.

- 40 truchas arcoiris con un peso promedio de 10 (± 2)g y una longitud de 10 (± 1) cm.

Con el fin de mantener controladas las condiciones de cultivo, los peces fueron trasladados desde la piscicultura de Río Blanco, hasta la Escuela de Ciencias del Mar en Valparaíso, donde se distribuyeron en estanques de experimentación con agua desclorada y filtrada. La densidad fue de 5 Kg/m³, la temperatura del agua de 17 \pm 2°C y la aireación constante.

Después de un período de aclimatación de 15 días, los peces se prepararon desinfectándolos con una solución con antifúngico (verde malaquita), se anestesiaron con Benzocaina al 1%, y para verificar que no presentaran daños visibles se examinaron bajo lupa binocular. Con un bisturí fino se realizó una herida subcutánea, poco profunda, de aproximadamente 1 cm de largo en ambos costados de los peces, a la altura de la aleta dorsal.

Para cada tamaño, las 40 truchas en estudio se dividieron en cinco grupos (n=8), como se enumera a continuación:

- 1.- Truchas infectadas con un inóculo proveniente de las cepas aisladas desde su estado biotrofo: BIOR.

- 2 y 3.- Truchas infectados con inóculos provenientes de las cepas recuperadas de las distintas fuentes de agua: SAPR y SAPI

- 4.- Peces que se mantuvieron en contacto con el inóculo, sin que se les practicara la herida: CONTROL 1

- 5.- Truchas a las que se les practicó la incisión pero que no fueron infectadas: CONTROL 2

De los peces que desarrollaron la infección, se tomaron muestras de los hongos y se cultivaron e identificaron según la metodología anterior.

Debido a que las zoosporas son los únicos elementos capaces de producir la infección, para poder infectar a las

truchas, fue necesario inducir su formación al cultivar los hongos en agua destilada. Una vez desarrollados los esporangios, fueron captados bajo microscopio invertido, y se extrajeron con ayuda de agujas de disección y micropipeta.

Para la infección, se tomó un inóculo de 0,5 ml, (aproximadamente 10000 zoosporas por ml) y se distribuyó directamente en las heridas realizadas en la superficie de los peces, ayudando a su penetración con la aguja de disección (Singhal et al., 1987).

6.- Identificación de las cepas

La identificación de las cepas se efectuó en base a los resultados de la caracterización morfo-fisiológica. Se tomaron como caracteres con valor taxonómico: tipo de esporangios y su dehiscencia, tipo de oospora, posición y forma del oogonio, origen del anteridio, modo de adhesión del anteridio, tamaño de oogonios-oosporas y la capacidad para crecer a 30°C, según los criterios de Seymour, (1970); Willoughby (1978); Papatheodorou (1981), Chien (1981), Hatai y Hoshiai (1992 y 1993), Dieguez-Urbeondo et al. (1996).

RESULTADOS

1.- Obtención y cultivos de los hongos a partir de muestras de agua (Estanques de cemento, PVC, tierra, sala de incubación y toma de agua)

Se aisló un total de 314 colonias de *Saprolegniales*, provenientes de las distintas fuentes de agua.

A los 15 días de cultivo en agua destilada, a temperatura ambiente, las semillas de cáñamo se cubrieron completamente de hifas, formando colonias de 1 a 2 cm de diámetro. En las semillas se originaron 2 tipos de hifas, unas poco ramificadas, de 30-80 μ m de diámetro y otras ramificadas y delgadas (10-25 μ m de diámetro). A partir de las primeras se generaron clamidosporas y esporangios del tipo saprolegniode, mientras que en las segundas se produjeron oogonios y anteridios. Al ser traspasadas a placas con agar GY, ambos tipos de hifas generaron colonias radiadas de aspecto algodonoso con hifas de 20 a 70 μ m de diámetro.

Al inocular las hifas desarrolladas en las semillas de cáñamo en agar GY, se observó que no todas las colonias presentaban la misma morfología: el 55% presentó una morfología que se clasificó como "**regular**", con un crecimiento radial y un micelio algodonoso adherido a la superficie del agar, alcanzando una altura de 0,3 a 0,7 cm. Estas colonias se desarrollaron relativamente rápido, cubriendo la superficie de las placas a los 4 días de cultivo (T° ambiente), en tanto el 45% restante presentó una

morfología que se clasificó como "irregular", estas fueron levemente lobuladas, sus hifas mostraron una distribución espaciada, y un crecimiento más lento, requiriendo de 6 a 8 días para cubrir completamente las placas, en estas últimas el micelio aéreo alcanzó incluso las tapas.

De los estanques de PVC y cemento, solo se obtuvieron colonias con morfología regular, mientras que las restantes fuentes de agua generaron ambos tipos de colonias, predominando las irregulares en sala de incubación y toma de agua, en esta última se aisló un 84% de éstas, las que se aislaron de todos los muestreos realizados, mientras que en el estanque de tierra solo se registró un 39% de estas colonias (5 de los 12 muestreos).

Si bien las colonias "regulares" se aislaron durante todo el año, se observó una mayor frecuencia en Julio y Septiembre, meses en los que se registró la menor temperatura (5,3 y 7,5°C). Las "irregulares" se aislaron preferentemente en los meses de Enero y Noviembre, con temperaturas de 10,8° y 15°C respectivamente.

2.- Obtención y cultivo a partir de peces y huevos infectados (Biotrofo).

Todas las muestras obtenidas desde huevos y peces infectados generaron colonias algodonosas, que al ser traspasadas a placas con agar GY mostraron una morfología similar a las clasificadas como "regular". Estas colonias presentaron filamentos poco ramificados de 20-60 µm de diámetro.

Independientemente de su origen, estas colonias alcanzaron al cuarto día de cultivo en agar GY, a temperatura ambiente, diámetros entre 7,5 y 8 cm.

Las muestras obtenidas desde la piel, mucus y escamas de peces que no presentaban signos de saprolegniosis y los huevos sanos, no generaron colonias.

3. Obtención de cultivos puros y mantención de las cepas aisladas.

Dependiendo de la morfología del micelio aéreo en el medio de cultivo (regular e irregular), se seleccionaron 32(1:1) cepas provenientes de las fuentes de agua (saprótrofas), y 8 de origen biotrofo, las que se encuentran en el laboratorio de cultivo de peces de la Escuela de Ciencias del Mar, Universidad Católica de Valparaíso.

4.- Caracterización de las cepas aisladas

Las cepas seleccionadas se dividieron en tres grupos:

1. **SAPR**, corresponde a las cepas recuperadas a partir de las fuentes de agua que en agar GY mostraron una

morfología regular (cemento, PVC, toma de agua, tierra y sala de incubación)

2. **SAPI**, cepas provenientes de las fuentes; toma agua, estanque de tierra y sala de incubación, que al ser traspasadas a agar GY mostraron un patrón de crecimiento irregular.

3. **BIOR**, cepas provenientes de peces y huevos infectados, que presentaron un aspecto regular sobre el medio de cultivo.

Caracterización morfológica:

1. SAPR. (saprotofo con crecimiento regular)

a) Hifas vegetativas. Presentaron ramificaciones espaciadas y alcanzaron un diámetro promedio de 20-45 µm (90 µm en la base). A los 3 días de cultivo en semillas de cáñamo se formaron abundantes clamidosporas, en posición: terminal, intercalar, lateral o en cadena. A partir de ellas se originaron oogonios y esporangios.

b) Esporangios. Terminales, con proliferación interna, filiformes o fusiformes, de 200 a 550 µm de largo por 40-65 µm de ancho. Las esporas se liberaron cerca de 12 horas después de formada la papila de descarga, la salida tuvo una duración de aproximadamente 45 seg, las zoosporas (15 y 25 µm de diámetros) se liberaron de a una y se alejaron rápidamente del esporangio.

c) Oogonios. Se visualizaron entre los 15 y 21 días de ser inducidos, presentaron una posición terminal, lateral e intercalar, por lo general piriformes; pero también, filiforme, doliforme o globosos, alcanzando diámetros de 50 a 110 µm y un largo de 75 a 200 µm.

d) Oosporas. De forma redondeada, 15 a 37 µm, de diámetro, céntrica o subcéntrica, completando totalmente el oogonio, en un número que fluctuó entre 1 y 30.

e) Anteridios. Preferentemente diclinos, observándose de 1 a 4 células anteridiales sobre los oogonios.

2. SAPI (Saprotofo con crecimiento irregular)

Estas cepas se caracterizaron por presentar un crecimiento lento en agar GY, las colonias desarrolladas presentaron un aspecto algodonoso con hifas esparcidas, moderadamente ramificadas, con un diámetro promedio de 40µm (20-100µm). Al ser cultivadas en semillas de cáñamo, generaron dos tipos de hifas: unas muy ramificadas, densas y delgadas (15-25µm) y otras, menos ramificadas y más gruesas (40-80µm).

Los esporangios, midieron de 150-500µm de largo por 18-70µm de ancho y las zoosporas alcanzaron hasta 18µm de diámetro. Las clamidosporas fueron escasas, de forma irregular y no se observó que generaran esporangios ni oogonios.

Los oogonios fueron abundantes, midieron de 35 a

150µm de diámetro, generalmente laterales, aunque también se encontraron algunos terminales e intercalares. Oogonios sésiles o pedunculados (0-400µm), ocasionalmente se observaron oogonios en cadenas. Por lo general, presentaron forma esférica, piriforme o doliformes (los intercalares). Frecuentemente se observaron oogonios inmaduros. Las oosporas fueron esféricas, céntricas o subcéntricas, con un diámetro que varió entre 17 y 35µm. Se observaron escasos anteridios monoclinos y diclinos.

3. BIOR. (Biotrofo con crecimiento regular)

Las hifas vegetativas en cultivo, poco ramificadas, con diámetros de 15 a 60µ; en semillas de cáñamo alcanzaron hasta 100µm en la base.

Clamidosporas abundantes, terminales, intercalares o en cadena, de forma irregular por lo general alargadas, a partir de ellas se generaron esporangios y oogonios.

Esporangios abundantes (a 10 y 20°C), con forma alargada, claviforme y filiformes, de 150 a 450µm por 20 a 70µm de diámetro, en posición terminal e intercalar; en estas ocasiones las esporas se liberaron a través de un orificio de descarga lateral. Zoosporas abundantes, hasta 20µm de diámetro (9-20µm).

Oogonios, abundantes, sobre hifas delgadas (20-40µm) laterales o terminales, de forma esférica y piriforme, con diámetros de 30 a 300 µm, algunas veces fueron intercalares, en cuyo caso midieron hasta 380 x 70 µm, con numerosas oosporas.

Oosporas esféricas con un promedio 20 µm de diámetro, la mayoría de ellas céntricas, aunque también se observaron algunas subcéntricas. Dentro del oogonio se encontraron de 1 a 50 oosporas. Anteridios diclinos, o monoclinos del tipo andrógino e hipógino.

Caracterización fisiológica:

Como todas las cepas seleccionadas mostraron similares incrementos en diámetro al ser cultivadas con luz constante, oscuridad o bajo un régimen de luz normal, las curvas y tasas de crecimiento se determinaron con un régimen de luminosidad normal.

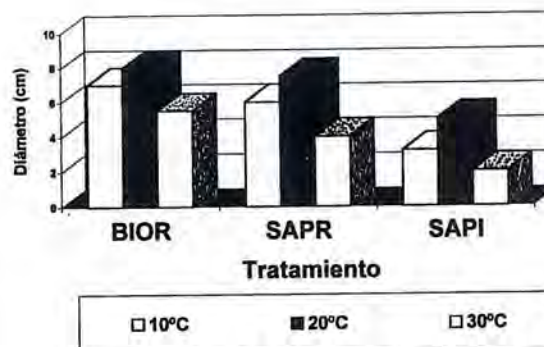
Al ser cultivadas a 10°C las colonias que presentaron menor crecimiento, correspondieron a las provenientes de una morfología irregular. Entre las que alcanzaron mayores diámetros a las 96 horas de cultivo, se ubicaron las provenientes del estado biotrofo.

A los 20°C las colonias de morfología regular fueron las que alcanzaron un mayor incremento en diámetro entre las 24 y 96 horas de cultivo (desde 1,5 hasta 8,2 cm). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió a 10°C, las colonias de morfología irregular presentaron mayores incrementos.

Todas las colonias que se desarrollaron, fueron capaces de crecer, a 30°C, aunque con crecimientos inferiores a los obtenidos con las temperaturas anteriores (Fig. 1).

En lo que respecta a los tiempos requeridos para la formación de estructuras reproductivas se observó que, por lo general, se requiere de menor tiempo a 10 que a 20°C.

Fig1. Diámetro de las colonias a las 96 h de cultivo en agar GY a 10-20-30°C.



Los esporangios se visualizaron entre los 12 y 15 días a 10°C y entre los 21 y 28 días a 20°C. En el caso de las estructuras sexuales, se requirió un mínimo de 26 y 58 días a 10 y 20°C respectivamente. Las cepas **irregulares** requirieron más tiempo que las **regulares** para generar estructuras sexuales a 10°C, en cambio a 20°C las cepas **regulares** requirieron de más tiempo (Tab.1).

Tabla 1: Tiempo promedio requerido para la formación de estructuras reproductivas a 10 y 20°C

ESPORANGIOS OOGONIOS			
ORIGEN	T° C	Tiempo días	Tiempo días
BIOTROFO	10	12±2	27±3
	20	25±3	74±7
SAPROTROFO REGULAR	10	15±2	26±3
	20	21±2	68±6
SAPROTROFO IRREGULAR	10	18±3	30±4
	20	28±3	58±2

5.- Patogenicidad de los hongos aislados

Bioensayo en peces de 100 g.

BIOR (Biotrofo regular). Los primeros signos de

Tabla 2 : Resultados del Bioensayo

Tamaño peces	10g	100 g	10 g	100 g	10 g	100 g	10g	100g
	Tiempo (días) inicio aparición de síntomas		Tiempo (días) en aparecer primeros muertos		% de Peces Infectados		% de Mortalidad a los 30 días de ensayo	
BIOR	2	20	3	25	100	100	100	25
SAPR	5	25	9	-	100	100	87,5	0
SAPI	22	-	-	-	12,5	0	0	0
CONTROL 1-2	-	-	-	-	0	0	0	0

infección, se manifestaron a los 20 días de contacto con el inóculo por la presencia de hifas alrededor de las heridas inferidas a los peces, 2 de los 8 peces infectados murieron al cabo de 25 días.

SAPR (Saprotrofo regular). Los primeros síntomas de saprolegniosis se observaron a los 25 días de inoculación, el segundo caso se registró a los 27 días. A los 30 días de inoculación todos los peces presentaron signos de infección en el sitio de producida la lesión y sus alrededores, no se registraron mortalidades durante los 30 días de experimentación (Tab.2).

SAPI (Saprotrofo irregular). Hasta los 30 días de producida la inoculación no se observó síntomas de saprolegniosis en ninguno de los peces infectados.

Control 1 y 2 (Peces heridos sin infectar y Peces sin herida). No se observó signos de micosis en ninguno de los peces bajo estas condiciones (Tab.2).

Bioensayo en peces de 10 g.

BIOR (Biotrofo regular). Los primeros signos de micosis se observaron a los 2 días de efectuada la infección. A los 10 días se registró una mortalidad del 100%. Los peces estaban completamente cubiertos por las hifas (Tab.2).

SAPR (Saprotrofo regular). Inicialmente la colonización fue más benigna, los peces mostraron leves signos de micosis a los 5 días de contacto con las zoosporas y la primera muerte se observó a los 8 días. El 87,5% de los peces murieron cubiertos por hifas a los 15 días de realizada la infección.

SAPI (Saprotrofo irregular). Durante los 30 días de experimentación, solo se detectaron síntomas leves de micosis en un pez, las hifas algodonosas se observaron en los bordes de la lesión. No se registraron mortalidades.

CONTROL 1 y 2. (Peces heridos sin infectar y peces sin herida). No se observaron signos de micosis ni de mortalidad durante el período de experimentación (Tab.2).

La infección causadas en los peces por las cepas

patógenas son similares, se inició en el sitio en que se produjo la lesión y posteriormente se expandieron hacia las áreas circundantes. El 100% de los peces pequeños (10g) manifestaron la infección entre los 2 y 5 días, las hifas que se observaron a simple vista, se extendieron rápidamente y llegaron a cubrir completamente a los peces al cabo de 3 a 9 días, provocándoles la muerte.

Todos los peces de 100 g inóculados con estas cepas se infectaron, en la mayoría de ellos las hifas se circunscribieron a la periferia de la lesión. Los peces del grupo SAPR, desarrollaron la infección pero no presentaron mortalidades, sin embargo, con la cepa BIOR la lesión se extendió hacia otras regiones del cuerpo. En 2 de los peces infectados las hifas se desarrollaron sobre las branquias provocándoles la muerte entre los 25 y 30 días de experimentación. En cambio solo uno de los peces inóculados con el grupo SAPI mostró signos de infección, a los 22 días se observó la presencia de hifas en los bordes de la herida, sin que las hifas se extendieran hacia otras áreas. Hasta los 30 días la infección no continuó su evolución.

Los hongos recuperados a partir de los peces infectados artificialmente, correspondieron en sus características morfofisiológicas con las cepas inoculadas.

6.- Identificación de las cepas

Todas las cepas aisladas fueron capaces de generar zoosporangios con deshincencia saprolegnioide y proliferación interna, con lo que se comprobó que correspondían al género *Saprolegnia*.

Las cepas de hongos aisladas se caracterizaron por formar oogonios y anteridios a 10 y 20°C. En el primer caso requirieron de algunas semanas y en el segundo, fue necesario mantener las colonias en cultivo en semilla de cáñamo, por un período de 1 a dos meses. Los oogonios presentaron de 1 a 30 oosporas céntricas y subcéntricas con diámetros de 18 a 29 µm.

Al contrastar las características morfológicas, fisiológicas y patogénicas estudiadas, (que se resumen en la

Tabla 3) con la literatura revisada (Seymour, 1970; Willoughby, 1978; Papateodorou, 1981; Chien, 1981; Hatai y Hoshiai, 1992 y 1993; Dieguez-Urbeondo et al., 1996), consideramos que las 42 cepas aisladas pertenecen a la especie *Saprolegnia parasitica* Coker.

DISCUSION

La saprolegniosis, ha constituido una amenaza en los cultivos piscícolas de agua dulce, y a la fecha existen múltiples reportes de esta enfermedad en cuerpos de agua y pisciculturas del Hemisferio Norte (Europa, Norte América, Japón), (Scott y O'Bier, 1962; Neish, 1970; Willoughby, 1978; Papatheodorou, 1981; Wood et al., 1986; Chien, 1987; Hatai y Hoshiai, 1992a, b; Rand y Munden, 1993; Yuasa y Hatai, 1994). En tanto en el Hemisferio Sur, la información sobre su incidencia es más restringida, se ha reportado en Australia sobre *Nematolosa erebi* (Puckridge, 1991), en Brasil en diferentes especies de carpas cultivadas (Figueira y Ceccarelli, 1991), en Venezuela constituye uno de los principales agentes responsables de parasitosis en peces de cultivo (Conroy y Hernández, 1989) y en Chile se presenta en las pisciculturas (agua dulce) donde ataca preferentemente a los salmónidos en etapa de reproducción y a sus huevos.

Los estudios realizados en nuestro país se han enfocado principalmente en la prevención y tratamiento de los huevos infectados (Helena, 1994; Mendoza, 1994; Bernal, 1996). En la piscicultura de Río Blanco las mortalidades de las ovas fluctúan entre un 15 a un 25% (Bernal, 1996), y durante el transcurso de esta investigación (julio-agosto, 1996) se observó que las ovas alcanzaron una mortalidad del 21%. Los huevos infectados, frecuentemente se encontraron formando masas compactas, constituidas por hifas, huevos muertos, restos de huevos muertos y sedimento. En las ocasiones en que estas masas no pudieron ser eliminadas, (período de ova verde) el micelio se desarrolló y se extendió hacia los huevos vivos, llegando a cubrirlos completamente hasta conducirlos a la muerte, cuando las condiciones de cultivos no fueron las apropiadas, (exceso de materia orgánica en el agua y/o problemas de flujo del agua) la infección se extendió a toda una bandeja de incubación, provocando la muerte. Según Gajdusek y Rubcov (1985), la muerte del embrión sobreviene debido a que el micelio cubre la superficie de los huevos impidiéndoles el intercambio de gases. Además, la infección genera una disminución del glucógeno y por ende, una baja disponibilidad de glucosa, impidiendo que el embrión pueda llevar a cabo el metabolismo oxidativo (Timeyko, 1992).

La mayoría de los autores que han estudiado la saprolegniosis en huevos de peces, están de acuerdo con el

hecho que ésta sólo se desarrolla a partir de huevos muertos (Smith y O'Bier, 1962; Wood et al 1986; Gajdusek y Rubcov, 1985; Timeyko, 1992). Las zoosporas son atraídas quimiotácticamente hacia los huevos muertos y, ayudadas por la formación de un material adhesivo, son capaces de asentarse, germinar y desarrollarse (Beakes y Burr, 1983). Aún cuando en el transcurso de esta investigación, se registró la presencia de zoosporas de *Saprolegnia* en las bateas de incubación, no se observó micosis en los huevos vivos, aunque sí, colonización sobre los huevos muertos (blancos), probablemente, debido a que éstos constituyen un buen sustrato para el asentamiento y desarrollo fúngico. Para constatar si las zoosporas de las cepas aisladas eran capaces de infectar huevos vivos, se realizó un ensayo (técnica no considerada en materiales y métodos) en el cual éstos fueron cultivados en un medio al que se le adicionó esporas y esporangios de las cepas aisladas, los huevos se mantuvieron en este medio por un período de 30 días sin que se manifestara la infección. Esta observación difiere con los resultados obtenidos por Lartseva y Dudka (1990), quienes encontraron que *S. parasitica* y *S. ferax* fueron capaces de infectar a huevos vivos de esturión, aún cuando éstos pudieron liberar enzimas que les otorgaron mayor resistencia a la infección. Rand y Munden (1993a), demostraron experimentalmente que las zoosporas de *S. diclina* son atraídas hacia la membrana de huevos vivos de *Salvelinus fontinalis*, en donde se adhieren y germinan. Ellos postularon que la invasión de los huevos se realiza por una combinación entre el efecto de enzimas extracelulares y presión mecánica.

Al contrario de lo que ocurre en pisciculturas Japonesas (Hatai y Hoshiai, 1993), Escocesas (Bruno y Stamps, 1987) y Españolas (Dieguez-Urbeondo et al, 1994), en la de Río Blanco no observamos mortalidades masivas de alevines, probablemente debido a que estos peces no sufren los típicos cambios morfofisiológicos que ocurren en otras especies de salmónidos durante esta etapa de su vida (esmolificación). No obstante, esporádicamente se observó la infección en los alevines de trucha durante el transcurso del año, lo que podría ser atribuido al estrés que sufren durante las operaciones de: separación por tamaño y sexo, transporte, desdoble, alimentación o por factores ambientales tales como baja calidad del agua o cambios bruscos de temperatura (Bernal, 1996).

En todos los muestreos realizados (abril-marzo) se pudo verificar la presencia de zoosporas en las distintas fuentes de agua analizadas, sin embargo, la presencia de

Al comparar tasas de crecimiento, morfología de las colonias y poder patógeno de las cepas, se pudo constatar que las cepas obtenidas desde el estado biotrofo, presentaron una morfología regular, similares rangos de crecimiento a las tres temperaturas estudiadas y alto poder

Tabla 3: Resumen de las características observadas en las cepas estudiadas

	SAPR	SAPI	BIOR
HIFAS:			
Diámetro (µm)	20-45	20-40	15-60
Diámetro base (µm)	90-95	99-103	95-100
ESPORANGIOS:			
Largo (µm)	200-550	150-500	150-450
Ancho (µm)	40 - 65	18 - 70	20 - 70
Diám. Zoosporas (µm)	15 - 25	18 - 21	19 - 21
CLAMIDOSPORAS:			
Generan	Abundantes	Escasas	Abundantes
	Oogonios- E esporangios	No-observado	Oogonios- E esporangios
OOGONIOS:			
Largo (µm)	75-270	40-278	30-300
Ancho (µm)	50-110	40-150	30 - 85
OOSPORAS:			
Tipo	Céntricas- Subcéntricas	Céntricas- Subcéntricas	Céntricas Subcéntricas
Diámetro (µm)	26 - 30	17 - 35	18 - 30
ANTERIDIO:			
	Diclino Androgino	Diclino- Monoclino Andro-Hipogino	Diclino- Monoclino Androgino
PROD. OOGONIOS A:			
10°C	Abundante	Abundante	Abundante
20°C	Regular	Abundante	Escaso
CAPACIDAD INFECTIVA CRECIMIENTO A 30°C	Baja Presente	Nula Presente	Alta Presente

patógeno (100%). Las cepas saprotrofas con morfología **regular** se diferenciaron de las biotrofas en su poder patógeno (100% de patogenicidad, y un 87,5% de mortalidad en los peces de 10g), mientras que en los de 100 g sólo se observó la presencia de hifas (sin mortalidad). Estas diferencias en la patogenicidad de las cepas también ha sido observada por Hatai y Hoshiai (1993), quienes al infectar salmón coho de 20 y 30 g con 2 cepas de *Saprolegnia*, observaron que una de ellas (*Saprolegnia parasitica* H2), era altamente patógena, provocando un 100% de mortalidad a los 10 días de iniciado el ensayo. La otra cepa, que estudiaron, *Saprolegnia diclina* (H3), infectó al 70% de los peces, sin que se observaran mortalidades, la mayoría de los peces infectados se recuperaron al cabo de 12 días, demostrando así el bajo

poder patógeno de esa cepa.

Independientemente de su origen, las cepas aisladas en la piscicultura de Río Blanco, entre abril y marzo 1996, fueron capaces de crecer a 30°C, aunque con diferentes tasas de crecimiento. Estos resultados concuerdan con los trabajos de Hatai y Hoshiai (1992, 1993) quienes al cultivar 4 cepas de *S. parasitica* y una de *S. diclina* encontraron que todas ellas presentaron similares tasas de crecimiento a 10, 20 y 25°C, sin embargo, en los cultivos a 30°C solo crecieron las cepas de *S. parasitica*. Dieguez-Urbeondo et al. (1996), también concluyeron que las cepas de *S. parasitica* biotrofas en salmones, presentaban la capacidad para crecer a 30°C, mientras que cepas saprotrofas de *S. diclina* no lo hacían. En un estudio



Fig.2. Microcaracterísticas de *Saprolegnia parasitica*, oogonios y oosporas céntricas 1000X

para establecer la especificidad con respecto al huésped, Hatai et al (1990) encontraron que de 17 cepas de *Saprolegnia* aisladas desde pisciculturas japonesas, sólo las cepas patógenas de trucha arcoiris podían crecer a 30°C. Lo anterior nos sirvió como carácter concluyente para la identificación de las cepas aisladas en este estudio.

Uno de los problemas que se generan en el estudio de hongos acuáticos causantes de saprolegniosis, es la identificación de las especies, principalmente debido a que no existe una clara delimitación de éstas. En la literatura, manuales de ictiopatología y revistas de divulgación (Kinkelin et al, 1985), se encuentra que la saprolegniosis se atribuye principalmente a *S. parasitica*, lo que no siempre se puede comprobar, debido a que muchas de las cepas aisladas a partir de peces infectados no forman órganos sexuales, a menos que se mantengan durante largo tiempo en medios especiales (Willoughby, 1978).

La mayoría de los autores que han estudiado las formas sexuales de *Saprolegnia* le han asignado nombres específicos, por Ej. Seymour (1970) en un estudio sobre el género transfirió a sinonimia a muchas de las especies antes descritas, reclasificando 28 como pertenecientes a *S. ferax* y otras 13 como *S. diclina*. Neish (1977), sugiere que *S. parasitica* puede ser considerada como sinónimo de *S. diclina*.

Por otro lado debido a que las estructuras sexuales de *S. parasitica* son morfológicamente similares a las de las cepas saprotrofas de *S. diclina*, diversos autores (Neish, 1977; Singhal et al, 1987; Ogbonna y Alabi, 1992; Bullis y Noga, 1990), han optado por utilizar el término Complejo *Saprolegnia* para identificar el agente causal de la saprolegniosis de peces y sus huevos. Los hongos pertenecientes a este complejo se caracterizan principalmente por ser sapro o biotrofos, con capacidad para generar estructuras reproductivas en pocas semanas al ser cultivadas en semillas de cáñamo a 10°C, presentar oosporas céntricas o subcéntricas, muchas de las cuales abortan antes de germinar y por presentar anteridios diclinos o monoclinos. Estos caracteres coinciden con los encontrados en las cepas aisladas lo que nos permitió establecer que el agente causal de las micosis que afectan a las truchas arcoiris y sus huevos en la piscicultura de Río Blanco pertenecen a este complejo.

En 1978, Willoughby reconsideró el uso del concepto "Complejo *Saprolegnia*" indicando que el agente causal de estas micosis en peces corresponde a *S. diclina*, subdividiendo la especie aislada desde el lago Windermere (Inglaterra) en tres tipos: *S. diclina* tipo I, considerada como parásito específico de salmones, *S. diclina* tipo II parásito de percas y *S. diclina* tipo III, únicamente saprotrofo. No obstante, Hatai y Hoshiai, (1993) conside-

ran que en los salmones, especialmente en época de reproducción, la saprolegniosis se debe a un solo tipo de *Saprolegnia* o bien a un grupo estrechamente ligado, que corresponde a *S. parasitica* (Coker).

El análisis de las características morfofisiológicas y patogénicas de las cepas aisladas, nos hizo pensar que estas podrían pertenecer a las especies *S. parasitica* y *S. diclina*, sin embargo cuando se realizó la prueba de crecimiento a 30°C, se pudo concluir que estas

correspondían a cepas con diferentes grados de patogenicidad pertenecientes al taxa *Saprolegnia parasitica* Coker.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los Drs. H. Cerisola, P. García-Tello y E. Piontelli, por la guía durante el desarrollo de esta investigación y la revisión crítica de este manuscrito.

REFERENCIAS

- Beakes, G. & Burr, A.W. (1983). Aquatic fungi: Zoospores and encystment, with particular reference to saprolegnial Oomycetes. J. Appl. Aquacult. 3:35-50
- Bernal, F. (1996). Eficacia de distintos tratamientos para controlar hongos (*Saprolegnia*) en un sistema de incubación en la piscicultura de Río Blanco. Tesis para optar al título de Ingeniero Pesquero. Escuela de Ciencias del Mar. Universidad Católica de Valparaíso.
- Bruno, B. & Stamps, S. (1987). Saprolegniosis of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. fry. Journal Fish Dis. 10:513-517
- Bullis, R. & Noga, J.E. (1990). Immunological relationship of the Fish Pathogenic Oomycete *Saprolegnia parasitica* to other Oomycetes and unrelated fungi, Journal of Aquatic Animal Health 2:223-227
- Chien, C.Y. (1981). Observations on the growth and Morphology of saprolegniaceous Fungi isolated from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Fish Pathology 15: 241-247
- Chien, C.Y. (1987). Some water molds isolated from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) associated with fish saprolegniosis. The memoir of parasitology in fish disease 2 : 99-105
- Conroy, D. A. & Hernandez, (1989). A review on the main infections and parasitic diseases of fish of the genus *Colossoma*. Ed. Bogotá-Colombia/Rede-Regional-Entidades y Centros de Acuicultura de América Latina, pp. 93-112
- Dieguez-Urbeondo, J., Cerenius L. & Söderhll. (1994). *Saprolegnia parasitica* and its virulence on three different species of fresh water crayfish. Aquaculture, 120: 219-228
- Dieguez-Urbeondo, J., Cerenius L. & Söderhll. (1996). Physiological characterization of *Saprolegnia parasitica* isolates from brown trout, Aquaculture, 140:247-257
- Figuerida, L. B. & Ceccarelli, P.S. (1991). Observations about the ectoparasites present in tropical island piscicultures (CEPTA and surroundings). Bol. Tec. CEPTA. 4:58-6
- Gajdušek, J. & Rubcov, V. (1985). Microstructure of moulted carp eggs infested with *Saprolegnia*. Folia-Zool, BRNO, 34: 349-355
- Hatai, K., Willoughby, L. & Beakes G. (1990). Some characteristics of *Saprolegnia* obtained from fish hatcheries in Japan. Mycol-Res. 94: 182-190
- Hatai, K. & Hoshiai, G. (1992) (a). Saprolegniosis in Cultured Coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. Gyobyo Kenkyu, 27:233-234
- Hatai, K. & Hoshiai, G. (1992) (b). Mass mortality in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* Coker. J. of Wildlife Diseases 28 :532-436
- Hatai, K. & Hoshiai, G. (1993). Characteristics of two *Saprolegnia* species isolated from Coho Salmon with saprolegniosis, Journal of Aquatic Animal Health 5:115-118
- Helena, D. (1994). Control de hongos (*Saprolegnia*) en huevos de trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, mediante el uso de soluciones salinas. Tesis para optar al título de Ingeniero Pesquero. Escuela Ciencias del Mar. Universidad Católica de Valparaíso.
- Herrera, T. & Ulloa, M. (1990). El reino de los hongos, micología básica y aplicada. Fondo de Cultura Económica, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Hubert, M.F. (1982). La saprolegniose des salmonides etude in vitro de 43 antifúngiques. These, L'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Kinkelin, P., Michel, P. & Ghittino, P. (1985). Tratado de las enfermedades de los peces. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza.
- Larsteva, L.V. & Dudka, L.A. (1990). Dependence of the development of *Saprolegniaceae* on the reproductive quality of the eggs of the sturgeon and white salmon. Mikologiya y Fitopatologiya 24:112-116
- Mendoza, J. (1994). Efecto de la alta densidad de incubación, con y sin antifúngicos, sobre la mortalidad de ovas verdes de trucha arcoiris variedad Donaldson. Memoria de título presentada a la facultad de medicina veterinaria de la Universidad de Concepción para optar al título de Médico Veterinario, Chillán-Chile.
- Neish, G. (1977). Observations on saprolegniosis of adult sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* Walbaum. J. Fish Biol. 10: 513-522
- Ogbonna, C. I. & Alabi, R.O. (1991). Studies on species of fungi associated with mycotic infections of fish in a Nigerian freshwater fish pond. Hidrobiologia 220:131-135
- Papathodorou, V. (1981). Observations sur *Saprolegnia australis* Elliot, agent pathogene de la saprolegniose des poissons. Bulletin Français de pisciculture. 283: 96-101

- Papatheodorou, V., Labat, R. & Quillier, R. (1981). Ichtyomycoses des salmonidae importance de *Saprolegnia diclina* Humphrey (*Saprolegniaceae*, *Saprolegniales*, *Oomycetes*). Extrait du bulletin de la société d'histoire naturelle de Toulouse 117: 8-10
- Puckeridge, J. (1991). Epidemics in a Murray fish, SAFISH. 116:12-14
- Rand, T.G. & Munden, D. (1992). Enzyme involvement in the invasion of brook char *Salvelinus fontinalis*, eggs by *Saprolegnia diclina* (Oomycotina: *Saprolegniaceae*). J. Fish Disease 19:91-94
- Rand, T.G. & Munden, D. (1993 a). Envolvement of zoospores of *Saprolegnia diclina* (Oomycotina: *Saprolegniaceae*) in the attachment to and invasion of eggs of Brook Trout under experimental conditions. Journal of Aquatic Animal Health 5: 233-239
- Rand, T.G. & Munden, D. 1993 b. Chemotaxis of zoospores of two fish egg-pathogenic strains of *Saprolegnia diclina* (Oomycotina: *Saprolegniaceae*) toward Salmonid egg chorion extracts and selected amino acids and sugars. Journal of Aquatic Animal Health 5: 240-245
- Richards, R.H. & Pickering, A.D. (1978). Frequency and distribution patterns of *Saprolegnia* infection in wild and hatchery reared brow trout *Salmo trutta* and char *Salvelinus alpinus* (L.), Journal of Fish Diseases. 1: 69-82
- Scott, W. & O'Bier, A. (1962). Aquatic fungi associated with diseased fish and fish eggs, the Progressive Fish-Culturist. 24: 3-15
- Seymour, R. L. (1970). The genus *Saprolegnia*. Nova Hervigia. 19:1-124
- Singhal, R.N., Jeet, S. & Davies, R.W. (1987). Experimental transmission of *Saprolegnia* and *Achlya* to fish. Aquaculture. 64: 1-7
- Timejko, V.N. (1992). Depletion of glycogen reserves in saprolegniosis affected developing eggs of salmon, *Salmo salar*. Vopr-Ikhtiol. J. Ichthyol. 32:186-190
- Willoughby, L. G. (1978). Saprolegnias of salmonid fish in Windermere: a critical analysis. Journal of Fish Disease. 1:51-67
- Wood, S.E., Willoughby, L.G. & Beakes, G. (1986). Preliminary evidence for inhibition of *Saprolegnia* fungus in the mucus of brown trout, *Salmo trutta* L, following experimental challenge. J. Fish. Dis. 9:557-560
- Xu, D., Rogers, W.A. & Rushing, A.E. (1990). Ultrastructure of the hyphae of *Saprolegnia parasitica*. Journal of Aquatic Animal Health 2:289-294
- Xu, D. & Rogers, W.A. (1991). Electron microscopy of infection by *Saprolegnia* spp. in Channel Catfish. Journal of Aquatic Animal Health 3:63-69
- Yuasa, K. & Hatai, K. (1994). An attempt of classification by biological characteristics of some pathogenic water moulds from freshwater fishes. Reprinted from Nippon Kingakukai Kaiho 35: 104-110