

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE Estudio

PERIODO 2014

1. **APELLIDO:** Di Battista

NOMBRES: Cristian Matias

Dirección Particular: Calle:

Localidad: La Plata **CP:** 1900 **Tel:**

Dirección electrónica (donde desea recibir información): dibattista@ilpla.edu.ar

2. **TEMA DE INVESTIGACIÓN** (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

Susceptibilidad al parasitismo por *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) y alteración del comportamiento en larvas de *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) provenientes de huevos de diferentes edades

3. **OTROS DATOS** (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: Fecha de iniciación: 01/04/2014

2º AÑO: Fecha de iniciación:

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: Fecha de iniciación:

2º AÑO: Fecha de iniciación:

4. **INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS**

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de La Plata

Facultad: Facultad de Cs Naturales y Museo

Departamento:

Cátedra:

Otros: Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet", CONICET-UNLP

Dirección: Calle: Boulevard 120 y 62 **Nº:**

Localidad: La Plata **CP:** 1900 **Tel:** 0221 4222775

5. **DIRECTOR DE BECA**

Apellido y Nombres: Campos Raúl Ernesto

Dirección Particular: Calle:

Localidad: Gonnet **CP:** 1897 **Tel:**

Dirección electrónica: rcampos@ilpla.edu.ar

6. EXPOSICIÓN SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

INFORME CIENTIFICO DEL 1° AÑO DE BECA DE ESTUDIO

En el plan de trabajo individual fueron planteadas las siguientes actividades:

- a) Lectura de bibliografía y adquisición de conocimientos metodológicos.
- b) Captura de *Aedes aegypti* e inicio y mantenimiento de la colonia.
- c) Captura del nematodo *Strelkovimermis spiculatus* e inicio y mantenimiento de la colonia.
- d) Captura de hembras de *Ochlerotatus albifasciatus* y obtención de huevos.
- e) Ensayos previos y puesta a punto de los experimentos.

A continuación se describen los avances logrados, las modificaciones producidas y las actividades a desarrollar en relación a cada una de ellas.

- a) Lectura de bibliografía y adquisición de conocimientos metodológicos

Antes de iniciar los muestreos y ensayos, se realizó una lectura de las investigaciones referidas al tema realizadas hasta la fecha, y se adquirieron conocimientos en relación a las metodologías a utilizar tales como métodos de captura, métodos de cría y almacenamiento de material.

- b) Captura de *Aedes aegypti* e inicio y mantenimiento de la colonia.

Se colocaron ovitrampas en los alrededores de la ciudad de La Plata durante los meses de abril y mayo, con el fin de recolectar huevos y larvas de *A. aegypti* para fundar una colonia. Los recipientes utilizados fueron vasos de 200 ml color negro con 100 ml de agua y papel absorbente en las paredes internas, el cual sirve de sustrato para los huevos. Una vez hallados los huevos, estos se retiraron junto con el papel y se dejaron secar. Luego se almacenaron en bolsas herméticas a temperatura ambiente en oscuridad.

Los huevos obtenidos fueron puestos a eclosionar en bandejas de plástico con agua y las larvas fueron alimentadas con alimento balanceado para conejos hasta alcanzar el estado de pupa. Estas se colocaron en bandejas con agua dentro de jaulas de madera y acrílico para contener a los adultos emergidos. Se proveyó como alimento agua azucarada al 10 %, la cual se renovó cada cuatro días.

Para estimular el desarrollo ovárico, cada quince días se alimentó a las hembras con sangre de cobayo. Cinco días después de la alimentación con sangre, se colocó en las jaulas un vaso con agua y papel húmedo que servía como sustrato para los huevos. Luego de tres días el recipiente se retiró, el papel se dejó secar, y los huevos se almacenaron en bolsas plásticas.

- c) Captura del nematodo *Strelkovimermis spiculatus* e inicio y mantenimiento de la colonia.

Se realizaron muestreos preliminares en charcos de los alrededores de la ciudad de La Plata, buscando larvas infectadas. En uno de ellos, en la localidad de Ensenada, se halló gran abundancia de larvas y alto nivel de parasitismo. Se trata de un charco somero con agua de origen pluvial, formado en una depresión del suelo cubierta por pasto, y expuesto a insolación directa.

Las muestras se tomaron el 3 de junio de 2014 a las 10:00 a.m. utilizando un cucharón de 350 ml para recoger el agua del charco, y un tamiz de malla fina para filtrar el agua y retener las larvas de *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae), hospedador natural de *S. spiculatus*. La muestra se trasladó al laboratorio en un balde de 10 litros.

En el laboratorio se observaron bajo microscopio óptico las larvas de cuarto estadio corroborándose el parasitismo. Luego se acondicionaron en bandejas de plástico de 52

x 36 x 7cm con agua limpia hasta la emersión del nematodo. Previamente se eliminaron los depredadores.

Las formas postparasitas emergidas de las larvas recolectadas en el campo, fueron transferidas a cápsulas de Petri conteniendo arena húmeda la cual actúa de substrato para los huevos. A partir de esos huevos se repicaron las colonias utilizando como hospedador alternativo al mosquito *A. aegypti* en lugar del hospedador natural *O. albifasciatus*, debido a que ésta especie no se reproduce en cautiverio. Para llevar a cabo la infección, primero se obtuvieron larvas Juveniles 2 (J2 =formas infectantes) de la eclosión de los huevos de *S. spiculatus* almacenados en arena. Esto se logró inundando las capsulas de Petri. Las J2 fueron colocadas en un recipiente con larvas de segundo estadio de *A. aegypti* manteniendo la relación parasitoide-hospedador de 5:1. Transcurridas 24 horas se pasaron las larvas a bandejas de mayor tamaño alimentándolas con alimento balanceado para conejos hasta que comenzaron a emerger los nematodos (postparasitos). Las larvas sanas que sobrevivieron y llegaron al estado adulto se descartaron. Los nematodos eran recogidos del fondo de las bandejas con pipetas, y colocados en recipientes con agua de clorinada hasta observar la formación del ovillo (entramado de nematodos adultos donde ocurre la copula). Finalmente este ovillo se colocó en las capsulas de Petri con arena y agua, en donde los nematodos se entierran y depositan sus huevos. Una vez que los nematodos se enterraron, el agua libre se eliminó de las capsulas. La colonia se repico una vez por mes para tener a disposición huevos jóvenes para los ensayos.

d) Captura de hembras adultas de *Ochlerotatus albifasciatus* y obtención de huevos.

Se realizaron tres muestreos los días 3, 9 y 21 de abril de 2014 a las 10:00 a.m. en las zonas de Punta Lara y dos sitios de Parque Pereyra. La captura se efectuó por medio de aspiradores manuales, sirviendo como cebo la persona que realizó el muestreo. Los mosquitos se colocaron en jaulas para el transporte.

Las hembras se alimentaron con sangre de cobayo y cada individuo se aisló en frascos cilíndricos de plástico de 29mm de diámetro por 59mm de alto, provisto de una tapa con tul. En la base del frasco se colocó un paño cubierto por papel absorbente el cual fue mojado con agua para mantener humedad.

Los mosquitos se mantuvieron a temperatura ambiente, proporcionándoles como alimento agua azucarada al 10 % por medio de un algodón, el cual se renovó día por medio.

Los huevos se retiraron del frasco junto con el papel absorbente y se almacenaron a temperatura ambiente en oscuridad. Para ello se utilizaron capsulas de petri conteniendo en sus bases, paño y papel absorbente humedecidos con agua. Dichos huevos fueron utilizados luego en los diferentes ensayos del experimento 1.

e) Ensayos previos y puesta a punto de los experimentos

Experimento 1: Susceptibilidad e historia de vida

El objetivo es conocer si los tiempos largos de dormancia de los huevos de *O. albifasciatus*, inducen a las larvas provenientes de ellos, a ser más susceptibles al parasitismo por *S. spiculatus*.

Este se basa en la hipótesis de que un período de dormancia prolongado podría debilitar a las larvas faradas, como consecuencia de la disminución de los nutrientes de reserva, y hacer que las larvas emergentes sean más débiles y en consecuencia más propensas a ser parasitadas.

Metodología

Durante los meses de abril, mayo y junio se llevaron a cabo los muestreos de mosquitos y nematodos en los alrededores de la ciudad de La Plata, con la metodología descrita anteriormente. Los huevos provenientes de las hembras de *O. albifasciatus* fueron mezclados para minimizar el efecto de los factores que afectan la fertilidad de las

hembras (ej.: edad fisiológica, hembras no fecundadas, etc.), agrupándose en siete tratamientos correspondientes a 60, 120, 180, 240, 300, 360 y 420 días de almacenamiento. En cada tratamiento se utilizaron ciento cincuenta huevos destinados a la infección con *S. spiculatus*, y ciento cincuenta huevos para grupo control (larvas sin contacto con el nematodo).

Los huevos fueron colocados en una cápsula de Petri y sumergidos en 40 ml de agua declorinada a temperatura ambiente, durante 24 hs. Para estimular la eclosión, se agregó 10 mg de alimento balanceado para peces. Luego del nacimiento, las larvas fueron transferidas a bandejas de mayor volumen y alimentadas con alimento balanceado molido para conejos. Cuando las larvas alcanzaron el estadio II, se pusieron en contacto con las formas infectantes (J2) de *S. spiculatus* durante 24 hs para producir el parasitismo. Con el fin de poder comparar las prevalencias de infección entre los tratamientos, las infecciones se realizaron individualmente con una relación fija de parasitoide-hospedador de 5:1 en recipientes con 10 ml de agua declorinada. Luego, se aisló cada individuo en recipientes de plástico conteniendo 200 ml de agua declorinada y alimento balanceado para conejos (ad libitum). El experimento finalizó cuando todas las larvas parasitadas murieron y/o cuando emergieron los mosquitos adultos. Durante todo el experimento, la temperatura fue de 22°C y el fotoperiodo de 12:12 (horas luz/horas oscuridad)

Para los tratamientos sin el parasitoide, se aislaron larvas de *O. albifasciatus* siguiendo la misma metodología descrita para los tratamientos de larvas parasitadas.

Obtención de juveniles 2 de *S. spiculatus* e infección de las larvas de *O. albifasciatus*:
Las J2 de *S. spiculatus* fueron obtenidas inundando durante 24 hs las cápsulas en donde fueron criados. Luego, se extrajo el agua con las J2, separándose cinco J2 en cada recipiente de 40 ml conteniendo 10 ml de agua corriente. Una vez que las larvas de *O. albifasciatus* alcanzaron el estadio II (n=150) se pusieron en los recipientes en contacto con las formas infectantes respetando una relación J2/Larva II de mosquito de 5:1, durante 24 hs. Posteriormente, las larvas fueron trasladadas a recipientes individuales conteniendo agua limpia.

Registro de datos: Para cada mosquito se registró la supervivencia, el tiempo de desarrollo desde el estadio II hasta el IV, el tiempo de desarrollo del estadio IV hasta pupa, el tiempo de desarrollo de pupa hasta la emergencia del mosquito adulto, el tamaño (longitud del ala) y el peso (húmedo y seco) de los mosquitos adultos. Para cada tratamiento conteniendo larvas parasitadas, además, se registró el tiempo de emergencia de los nematodos, y el número de nematodos por larva de mosquito parasitada.

Resultados preliminares:

Tratamiento con huevos de 60 días de almacenamiento

En el grupo de larvas tratadas con *S. spiculatus* (n: 100) hubo un 92% de mortalidad, sin embargo solo veintitrés individuos presentaron parasitismo. Por otro lado en el grupo control (n: 50) se registro un 86% de mortalidad larvaria.

Tratamiento con huevos de 120 días de almacenamiento

Las larvas tratadas con el parasitoide (n: 150) presentaron una mortalidad del 95%, y el porcentaje de parasitismo fue del 33% con un promedio de 1,47 nematodos (emergidos y retenidos) por hospedador. En el control (n: 150), la mortalidad registrada en el estado larvario fue del 30 %.

Tratamiento con huevos de 180 días de almacenamiento

Este ensayo presento un 84% de mortalidad en larvas expuestas al parasitoide, mientras que hubo un 48% de parasitismo. Por otro lado el grupo testigo presento un 71% de mortalidad en los estadios inmaduros.

A raíz de la alta mortalidad obtenida en las larvas de los tratamientos sin parasitismo al inicio del experimento 1 se decidió desarrollar un experimento para mejorar los métodos de eclosión y cría de larvas de *O. albifasciatus*. A continuación se describe dicho experimento.

Experimento 2: Ensayo para determinar la mejor dieta para larvas de *Ochlerotatus albifasciatus*

Con el fin de determinar con que alimento se obtiene una mejor performance en el desarrollo larvario se ideó un experimento en donde se evaluó, por un lado la levadura y el alimento para peces como estimulantes de eclosión, y por otro, levadura, alimento para peces y alimento para conejos como alimentos para las larvas.

Metodología

Los huevos se colocaron en bandejas con agua de clorinada, durante 24 hs, siguiendo el diseño (tratamientos) que se muestra a continuación:

1) Levadura como estímulo de eclosión

1A: alimento para conejos

1B: alimento para peces

1C: levadura

2) Alimento para peces como estímulo de eclosión

2A: alimento para conejos

2B: alimento para peces

2C: levadura

Se utilizaron dos bandejas de plástico de 30x20x6 cm con un número inicial de 455 y 565 huevos en 80 ml de agua y 20 mg de levadura o alimento para peces para los grupos 1 y 2 respectivamente.

De cada grupo se utilizó una cantidad final de 150 larvas, el resto se descarto.

Se separaron de forma individual, 50 larvas de segundo estadio individualizadas en potes con 200ml de agua de clorinada para cada tratamiento y se las alimentó día por medio.

Para cada tratamiento se registró el tiempo de desarrollo expresado en días y el porcentaje de supervivencia.

Resultados preliminares: El ensayo sobre las posibles dietas para larvas mostró que la mejor supervivencia (74%) se da para aquellas eclosionadas de huevos inducidos con alimento para peces y alimentadas con alimento balanceado para conejos molido.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)
Se encuentra en desarrollo el manuscrito del siguiente artículo:

PREVALENCIA DE PARASITISMO Y TIEMPO DE SUPERVIVENCIA DE ADULTOS DE *OCHLEROTATUS ALBIFASCIATUS*, (DIPTERA: CULICIDAE) PARASITADOS POR *STRELKOVIMERMIS SPICULATUS* (NEMATODA: MERMITHIDAE)

Di Battista, Cristian M.; Fischer, Sylvia; Campos, Raúl E.

En el presente estudio se describe un caso de parasitismo de *Strelkovimermis spiculatus* en adultos de *O. albifasciatus* provenientes de larvas infectadas en condiciones naturales. Se estimó la prevalencia en larvas y adultos, y se midió el tiempo de supervivencia de adultos parasitados y sanos. Se muestreó un charco en Ensenada, Buenos Aires en junio de 2014. La prospección de parasitismo en larvas del estadio IV, mostró que el 93% de los individuos estuvieron parasitadas por *S. spiculatus*. El parasitismo en mosquitos adultos se presentó en ambos sexos, con mayor prevalencia en las hembras (15,1%) que en machos (11,2%). El rango del tiempo de supervivencia de adultos no parasitados fue de 1 a 41 días (media: 15,4), en tanto que el rango de supervivencia de los individuos parasitados fue de 4 a 38 días (media: 16,1). El presente estudio muestra que los mosquitos adultos presentando parasitismo sobreviven un promedio de 16 días, lo cual permitiría la colonización de nuevos charcos por parte de *S. spiculatus*.

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

8.3. OTROS

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

Se realizó la inscripción y el envío del resumen al IX Congreso Argentino de Entomología, a realizarse en la ciudad de Posadas desde el 19 al 22 de mayo de 2015.

Prevalencia de parasitismo y tiempo de supervivencia de adultos de *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae), parasitados por *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae)

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

Como parte del plan de actividades complementarias para el doctorado se curso la materia Patología de Insectos dictada en la Facultad de Ciencias Naturales y Museo entre los meses de agosto y noviembre de 2014, con una carga horaria total de cien horas.

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

Durante este período se desempeñaron tareas de docencia bajo el cargo de Ayudante Alumno ad honorem en la Cátedra de Anatomía Comparada de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo.

13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TÍTULOS ANTERIORES (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

14. TÍTULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Susceptibilidad al parasitismo por *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) y alteración del comportamiento en larvas de *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) provenientes de huevos de diferentes edades

Actividades a desarrollar

Mantenimiento y replicación de las colonias de mosquitos y nematodos.

Captura de *Ochlerotatus albifasciatus* y obtención de huevos.

Continuación del experimento Susceptibilidad e historia de vida. Este ensayo tiene como objetivo conocer si los tiempos largos de dormancia de los huevos de *O. albifasciatus*, inducen a las larvas provenientes de ellos, a ser más susceptibles al parasitismo por *S. spiculatus*. Este experimento se basa sobre la hipótesis de que un período de dormancia prolongado, podría debilitar a las larvas faradas, como consecuencia de la disminución de los nutrientes de reserva, y hacer que las larvas emergentes sean más débiles y en consecuencia más propensas a ser parasitadas.

Una vez terminado el experimento se analizarán los datos obtenidos.

Inicio y desarrollo del experimento Alteración del comportamiento. Este tiene el objetivo de evaluar el comportamiento de las larvas parasitadas respecto de las sanas, en cohortes provenientes de huevos con diferentes tiempos de dormancia.

Este experimento se basa sobre la hipótesis de que el parasitismo causado por *S. spiculatus*, modifica el comportamiento disminuyendo el tiempo que dedican las larvas de *O. albifasciatus* a la alimentación, siendo más marcado en las larvas provenientes de huevos más viejos.

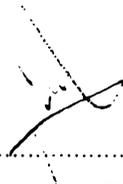
Análisis de los datos obtenidos con el experimento.

Condiciones de Presentación

A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
- b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
- c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.



Firma del Director



Firma del Becario