



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**FACULTAT DE CIÈNCIES**

**DEPARTAMENT DE BIOLOGIA ANIMAL, DE BIOLOGIA VEGETAL I D'ECOLOGIA**

**UNITAT DE BOTÀNICA**

# TRICOMICETS IBÈRICS

---



Memòria presentada per:

**LAIA GUÀRDIA i VALLE**

per optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques

Vist-i-plau del Director de la tesi:

**SERGI SANTAMARIA DEL CAMPO**

**Professor Titular de Botànica**

Fac. Ciències, Dept. Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Unitat de Botànica  
Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, Desembre 2004

# **3 MATERIAL I**

## **MÈTODES**



# 3 MATERIAL I MÈTODES

---

L'estudi de fongs entomopatògens i simbionts d'artròpodes en general requereix d'una metodologia de treball molt especialitzada, força allunyada de la que s'aplica en la investigació d'altres tipus de fongs, i més propera a la que poden usar els entomòlegs, si més no en les fases d'estudi que suposen l'obtenció i identificació del substrat dels fongs. En el cas dels tricomicets, la metodologia de treball és delicada, i sovint esclava en la dimensió espai-temps, ja que cal treballar sempre amb material fresc, fet que condiciona tot el disseny de les sortides de camp. Per extreure i aïllar el fong és necessari, si no imprescindible, que l'hoste estigui encara viu, o mort recentment (unes poques hores), del contrari, tot el contingut intestinal es degrada i els delicats tal·lus dels tricomicets esdevenen difícilment detectables i en tot cas, el seu estat sol ésser massa precari per a l'estudi (la proliferació bacteriana i la seva acció degradadora es fan notar ràpidament). Amb els hostes vius l'estat del tricomicet és òptim per procedir a l'aïllament del fong i muntatge de les preparacions, per al seu cultiu, o per a reservar el material en solució tampò per a estudis moleculars posteriors.

## 3.1 TREBALL DE CAMP: RECOL·LECCIÓ D'HOSTES

---

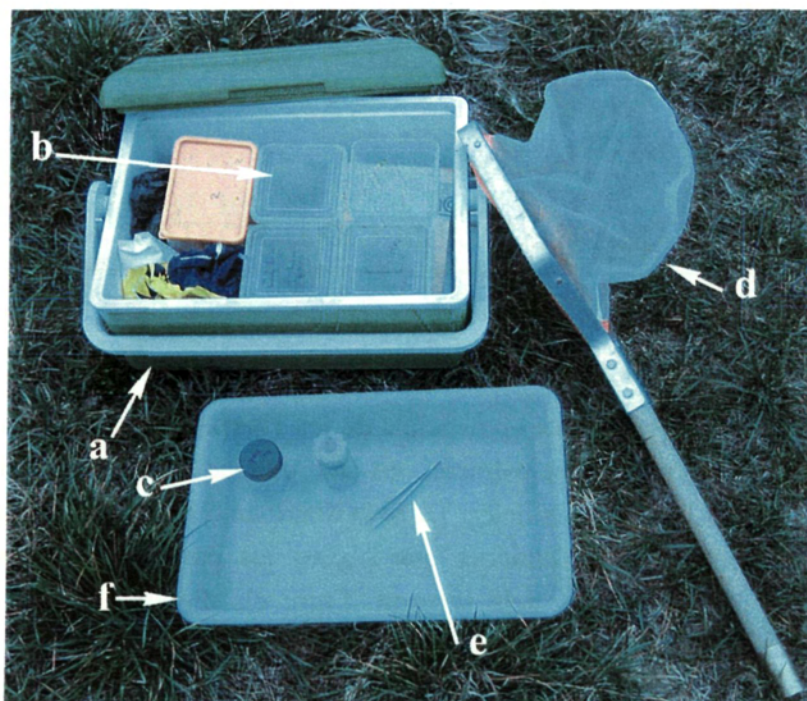
Les larves d'insectes, principals hostes potencials de les **Harpel·lals**, viuen tant en ambients marins com salabrosos però, principalment, en els dulciaqüícoles lòtics i lèntics, des d'oligotròfics a eutròfics, calcaris o silícics. La seva distribució és pràcticament cosmopolita. Són organismes majoritàriament filtradors que capten les partícules en suspensió, o bé detritívors i herbívors, rastrejadors dels substrat. Entre els dípters i els plecòpters hi ha algunes espècies depredadores, però la presència de tricomicets en espècies carnívores és purament circumstancial deguda, en el cas de dípters (quironòmids), a l'existència intestinal de restes no digerides de preses detritívores que encara conserven els fongs en el seu tub digestiu. Altres hostes menys habituals, com tricòpters o coleòpters (LICHTWARDT et al., 2001a), no s'han trobat infectats en l'àmbit geogràfic estudiat.

Els hostes de les **Asel·larials**, crustacis isòpodes terrestres, dulciaquícules o marins (gènere *Asellaria*) i insectes col·lèmbols (gènere *Orchesellaria*), són també detritívors i herbívors. En el cas dels isòpodes aquàtics, només una espècie viu en territoris catalans, *Proasellus coxalis*, amb diverses subespècies. També hem trobat una sola espècie d'isòpode marí associada a Asel·larials, *Ligia italica*, a la península.

Les **Eccrinals** són l'ordre de tricomícets que mostren un ventall més ampli d'hostes, des de crustacis dulciaquícules, marins i terrestres, fins a insectes i miriàpodes terrestres. Tenen doncs una variada ecologia, i possiblement puguí ampliar-se amb la investigació de nous grups d'artròpodes. Tots aquests hostes són de fàcil recol·lecció i es troben àmpliament distribuïts pel territori ibèric.

## MATERIAL

- Una petita xarxa (tipus aquari) amb diàmetre de porus de 0,5 mm, que permet recol·lectar des de les larves més petites fins a les més grans, ja que el porus és suficientment petit, però sense frenar excessivament el pas de l'aigua, ja que de ser així, hi hauria el perill de perdre les larves dels insectes més grans. Apropiadada per cursos d'aigua petits, estrets i poc profunds, tipus reguerots i entollaments, on és fàcil maniobrar amb una xarxa de petites dimensions. En la resta de casos, és preferible l'altra model de la llista (FIG. 20d).



**FIG. 20.** Material per a la recol·lecció d'hostes: Nevera portàtil (a) amb recipients estancs (b), pots de diverses mides (c), xarxa entomològica o mànega per insectes aquàtics (d), pinces (e) i safata (f).

- Una mànega per insectes aquàtics, amb malla d'un diàmetre de porus de 0,5 mm, reforçada a les vores i agafada a un suport metàl·lic (FIG. 20d).
- Unes pinces entomològiques toves que permetin recollir les larves sense malmetre-les (FIG. 20e).
- Una safata de plàstic (FIG. 20f) per abocar-hi el material recollit amb la xarxa, i poder destriar amb comoditat els artròpodes que ens interessin (FIGS. 22, 23).
- Continents estancs tipus carmanyola, de plàstic o d'altre material, que ens permetin transportar les larves vives amb aigua (FIG. 20b-c). El volum d'aquests recipients pot variar en funció de les necessitats, tot i que és recomanable abstenir-se en l'ús de pots petits (menys de 5-10 cm de diàmetre) ja que l'oxigenació de l'aigua es dificulta en reduir excessivament la superfície d'intercanvi de gasos, i la mort de les larves és més ràpida.
- Una nevera portàtil (FIG. 20a) amb els corresponents tancs d'aigua refrigerants degudament aïllats, per transportar el material recol·lectat fins al laboratori. Pot prescindir-se d'ella si el temps és fred i el desplaçament fins al laboratori curt. Cal tenir en compte que els canvis bruscs de temperatura provoquen fàcilment la mort de les larves, sobretot per un excés de calor.
- Un retolador resistent a l'aigua per etiquetar els recipients, amb la localitat i data.
- Una llibreta de camp i llapis per fer qualsevol tipus d'anotació que pugui ser rellevant (estat de la conca, tipus de substrat, vegetació, etc.).
- Altres: botes d'aigua altes, guants (de goma) per si l'aigua és molt freda o contaminada (opcional).
- Un aspirador entomològic, amb els corresponents recipients, per a la captura de col·lèmbols o altres artròpodes terrestres.

## **METODOLOGIA**

La xarxa s'usa per filtrar l'aigua i retenir les larves que hi viuen. Cal remoure el substrat amb l'ajuda d'un tronquet o similar, sense brusquedats, per incorporar al corrent d'aigua la fauna intersticial. També sacsejant lleugerament algues, hidròfits i molses fem sortir les larves que s'hi adhereixen. En tots els casos col·loquem la xarxa per davall de l'àrea remoguda. La quantitat de larves que podem obtenir d'aquesta manera és molt satisfactòria. Cal rastrejar també la superfície i les vores de la zona inundada, mirar sota les pedres i agafar les larves que viuen a la seva cara inferior amb l'ajut de les pinces. El material recollit amb la xarxa es trasllada a la safata, prèviament omplerta amb una mica d'aigua, per veure-hi clarament el material recollit i agafar-lo amb les pinces fins als recipients. També podem agafar el material amb les pinces directament de la xarxa, si la quantitat de brossa acumulada ho permet. Col·locarem els recipients dins de la nevera portàtil.



**FIG. 21.** Recol·lecció d'hostes amb l'ajuda de la mànega i un bastonet per remoure el substrat pedregós.

La millor manera per assegurar que recol·lectem la major varietat possible d'artròpodes, és recórrer la conca mostrejada amunt i avall per explorar-ne els diferents ambients.

Collir gran quantitat de material pot ésser contraproductiu. Cal tenir present que el material ha de ser viu en estudiar-lo, i cal disposar de cert temps per dur a terme la dissecció de totes les larves. Acumular molt material vol dir arriscar-se a perdre'n gran quantitat per mort. És preferible diversitat a quantitat. Si després trobem tricomicets interessants, sempre som a temps de tornar al punt exacte on hem mostrejat per agafar més individus de l'hoste infestat.

Per a la recol·lecció de col·lèmbols, cal cercar zones humides, riques en humus, sota fusta, vora torrents i damunt l'aigua. Podem recollir terra i fullaraca en una bossa per posteriorment procedir a destriar



**FIGS. 22 i 23.** Recol·lecció d'hostes. A l'esquerre, traspasant el material filtrat amb la xarxa a la safata de plàstic, amb aigua. A la dreta, un cop abocat el material a la safata, procedim a seleccionar els artròpodes que ens interessen, amb l'ajut d'unes pinces.

els col·lèmbols amb l'ajuda d'un aspirador entomològic, o bé podem usar aquest aparell per recollir els hostes un a un directament en el seu hàbitat.

Per la recollecció d'altres artròpodes terrestres (miriàpodes, isòpodes), en tenim prou amb unes pinces toves i uns recipients on col·locar-los per al transport. Els trobem sota pedres, troncs, fullaraca i en llocs resguardats de la calor i del sol, com coves i en l'humus del sotabosc. Els podem transportar dins la nevera o fora d'ella, segons la temperatura ambient. Són molt més resistents que els artròpodes aquàtics, i poden ser mantinguts més dies abans de disseccionar-los si el viatge al centre d'investigació és llarg o si convé postergar el treball de laboratori.

### 3.2 DISSECCIÓ DELS HOSTES AL LABORATORI

#### ANATOMIA DE L'INTESTÍ

##### Larves aquàtiques d'insectes

Totes les larves d'insectes aquàtics tenen una anatomia interna similar. Són organismes senzills, amb un aparell digestiu molt simple. Aquest consta de tres trams principals: estomoideu (intestí anterior), mesodeu (intestí mig) i proctodeu (intestí posterior). Els trams

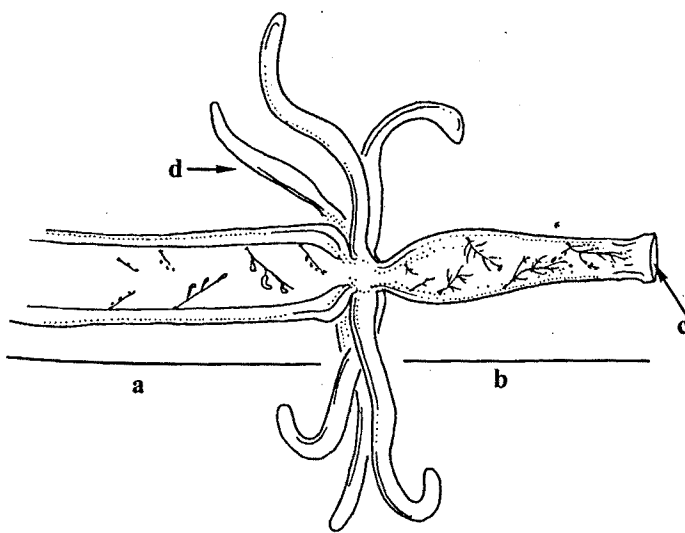


FIG. 24.- Intestí mig (a) i posterior (b) d'un quironòmide en una visió simplificada, on observem l'anús (c) i els tubs de Malpighi (d), que marquen el final del budell mig o mesodeu, i l'inici del budell posterior o proctodeu.

anterior i posterior són ectodèrmics, i per tant, són renovats periòdicament juntament amb la resta de la cutícula externa durant la muda. La part mitja és d'origen endodèrmic, està recoberta per l'anomenada matriu peritròfica, i no és sotmesa a mudes. Entre el mesodeu i el proctodeu hi trobem els tubs de Malpighi, òrgans excretors que desemboquen a la cambra pilòrica, una porció lleugerament més engruixida, al límit del mesodeu (FIG. 24).

Els diferents gèneres de Harpel·lals viuen en diferents



porcions del budell. Com ja hem remarcat a l'apartat de generalitats, al proctodeu hi trobarem les Harpel·lals Legeriomycetaceae, mentre que les Harpel·lals Harpellaceae, no ramificades, es situen a la matriu peritròfica del mesodeu. Dins de cada porció de l'intestí existeixen també zones preferides per a les diferents espècies, de manera que una Legeriomycetaceae pot fixar-se a la zona propera a la cambra pilòrica, o bé a les proximitats de l'anús, mentre d'altres prefereixen el tram mig.

### **Isòpodes i crustacis terrestres**

Tot i que externament són molt diferents, per a la dissecció no presenten molta diferència respecte als hostes insectes. En tot cas s'ha de tenir en compte que la cutícula externa està quitinitzada i per tant, abans de treure i netejar el budell, és necessari retirar-la, amb l'ajuda d'unes pinces. Per a crustacis marins més grans, es procedeix de la mateixa manera que quan "pelem" els crustacis per al consum de la carn abdominal, tot retirant els pleonits.

### **Isòpodes i crustacis marins**

Aquests han estat els menys estudiats dels hostes potencials de tricomícets que aquí tractem. Tant és així que no hem trobat cap espècie que pugui ser incorporada en aquest catàleg, si no tenim en compte els hàbits marins de l'isòpode *Ligia italica*, que a efectes pràctics ve a funcionar com un isòpode terrestre en quant a la seva manipulació. No obstant mencionarem que hem disseccionat diversos decàpodes marins sense èxit. La seva dissecció és un xic més feixuga que la d'altres crustacis, ja que aquests incorporen substàncies minerals ( $\text{CaCO}_3$ ) que impregnen les malles de quitina i escleroproteïnes, fent que les eines de dissecció ja no siguin les fines agulles entomològiques, sinó agulles emmanegades i pinces més robustes. Per la resta, no hi ha diferències metodològiques destacables.

## **MATERIAL**

- Aigua destil·lada.
- Càpsules de Petri.
- Llum freda Olympus™ Highlight-2000 (FIG. 25).
- Microscopi Estereoscopi (lupa binocular) Zeiss™, amb zoom de 10x fins 40x augments (FIG. 25).
- Un parell d'agulles entomològiques (del número 2).
- Un parell de pinces fines (de rellotger, preferentment inoxidable).
- Vidres portaobjectes

## **METODOLOGIA**

Les larves d'insectes que cal conservar uns dies fins al moment d'ésser obertes es col·loquen dins d'una nevera, entre 5 i 11°C, en els mateixos recipients on foren transportades, o en d'altres més grans (també en càpsules de Petri, que permeten un bon intercanvi de gasos per l'elevada superfície i poca profunditat). En aquests recipients poden estar-hi uns dies, tot i que les larves d'insectes nadiues de cursos d'aigua molt oxigenada per la ràpida circulació, tenen més problemes per sobreviure-hi. El millor, és obrir les larves en el menor lapse de temps possible, abans que morin. Les espècies d'indrets lèntics s'adapten més bé, no requereixen tanta oxigenació i poden viure fins a una setmana, fora del seu hàbitat natural. La conservació *ex-situ* d'artròpodes terrestres no presenta cap dificultat. Els isòpodes terrestres i els miriàpodes aguanten molts dies si se'ls proporciona prou humitat. L'únic inconvenient que pot causar el fet de posposar la seva dissecció, és que amb una dieta inadequada, les Eccrinals poden ésser expulsades a través de l'anús amb les excretes de l'hoste, degut a la duresa o indigestibilitat de la matèria que travessa el budell.



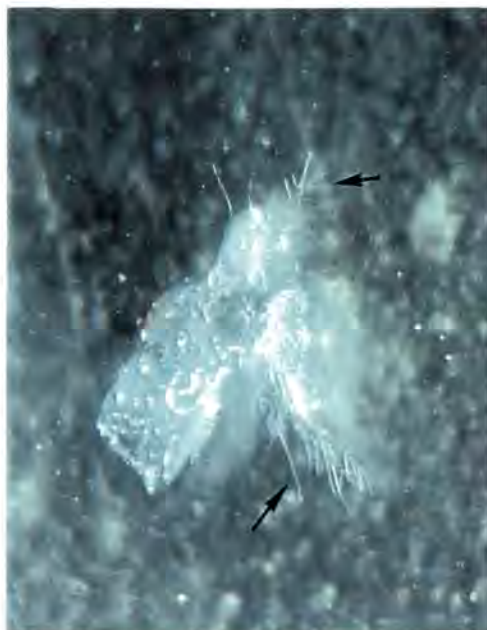
FIG. 25. Microscopi estereoscopi (lupa binocular) Zeiss™, i llum freda Olympus™, per procedir a la dissecció dels hostes.

i els tubs de Malpighi, FIG. 24) és feble i un trencament en aquest punt és molt habitual. La membrana externa del budell i la capa muscular es retiren amb l'ajuda de les agulles, i es conserva la membrana interna. En cas que l'intestí mig estigui ple de contingut semidigerit, és necessari netejar-lo, amb ajuda de les agulles entomològiques, traient i submergint l'intestí diverses vegades. El budell posterior reté més l'aliment i per netejar-lo cal empènyer-ne delicadament el contingut cap a un dels extrems que ha quedat obert.

Sota la lupa binocular ja es pot veure si hi ha tricomicets, que s'observen a pocs augments en forma de finíssims filaments hialins i ramificats (Legeriomycetaceae, en proctodeu), o simples (Harpellaceae, en el mesodeu) agafats a la paret interna del budell (FIG. 26). Com que els tricomicets són quasi hialins, hem d'usar un fons fosc en la base de la lupa, ja que hi destaquen millor. En un altre vidre portaobjectes situat al costat, també amb una gota d'aigua destil·lada, s'hi trasllada el budell net amb els tricomicets, en cas que n'hi hagi.

Els hostes aquàtics que han de ser immediatament disseccionats són col·locats en càpsules de Petri amb aigua fresca. Sota la lupa i damunt d'un vidre portaobjectes es situa, fent ús de les pinces, una de les larves dins d'una gota d'aigua destil·lada. Cal esquinçar l'artròpode per extreure'n l'intestí, pinçant amb compte la part més extrema de l'abdomen (prop dels cercs o lòbuls anals, si hi són presents) amb unes pinces, tot tibant mentre es subjecta l'artròpode per la part mitja del cos amb unes segones pinces. Cal no fer estrebades i estirar amb suavitat fins que surti l'aparell digestiu. El punt d'unió entre mesodeu i proctodeu (just davant de la cambra pilòrica

El tram de l'intestí que ens interessa, ja net, s'obre longitudinalment i es fragmenta, sempre amb l'ajut de les agulles entomològiques, per obtenir el tricomicet acompanyat de la menor quantitat possible de budell, i vigilant que no es trenqui el tal·lus per la base. D'aquesta manera es veu com es fixa a la membrana mitjançant el "holdfast". No sempre és factible



**FIG. 26.** Visió sota la lupa binocular (40x) del tram posterior del budell d'un plecòpter amb els filaments fúngics de *Lancisporomyces* sp. (fletxes).

observar els tricomicets als pocs augments de la lupa. De vegades es troben en fases juvenils o només hi ha tricòspores, així que encara que no s'hi observi res, es traspasa el tram net de budell a l'altre portaobjectes que teníem a punt, per fer una observació al microscopi, havent-hi col·locat el preceptiu vidre cobreobjectes. Les tricòspores i zigòspores es poden detectar, si estan encara unides al tal·lus, amb la lupa.

Ocasionalment, podem trobar zigòspores o tricòspores joves, que seria interessant de veure més desenvolupades. En aquest cas, en comptes de fixar la mostra, aquesta és col·locada en una cambra humida (sempre ha de quedar aigua en la mostra). Aquest sistema no sempre ha donat resultat, però hem arribat a veure que en 18h-24h s'ha produït creixement i certa maduració de les estructures sexuals.

### 3.3 OBSERVACIÓ I FIXACIÓ DE LES MOSTRES FÚNGIQUES

---

#### MATERIAL

- Carrets de fotografia B/N Ilford™ PAN-F 50 ASA o AGFA™ PAN 25 ASA.
- Laca d'ungles incolora.
- Lactofenol-blau cotó.
- Microscopi Zeiss™ Universal equipat amb càmera fotogràfica i càmera clara.
- Microscopi Carl Zeiss™ Jenaival Contrast equipat amb òptica DIC, CF, càmera clara i càmera fotogràfica (FIG. 27).
- Vidres porta- i cobreobjectes.
- Cotó i alcohol 70%.

## METODOLOGIA

Per estudiar les mostres de tricomicets, un cop aïllades de l'intestí, hem usat el microscopi. En principi tindrem les preparacions acabades de fer, muntades amb l'aigua destil·lada. És molt recomanable fer sempre una primera observació en aigua, ja que tot es veu més nítid, i certes estructures delicades com els apèndixs poden degradar-se un cop fixada la mostra. També, sempre que sigui possible, és recomanable fer fotografies en aigua, ja que el resultat és molt millor que l'obtingut amb mostres ja fixades, si més no per l'observació de determinats detalls. Els negatius han estat revelats i posteriorment escanejats a 600 ppp (píxels per polzada).

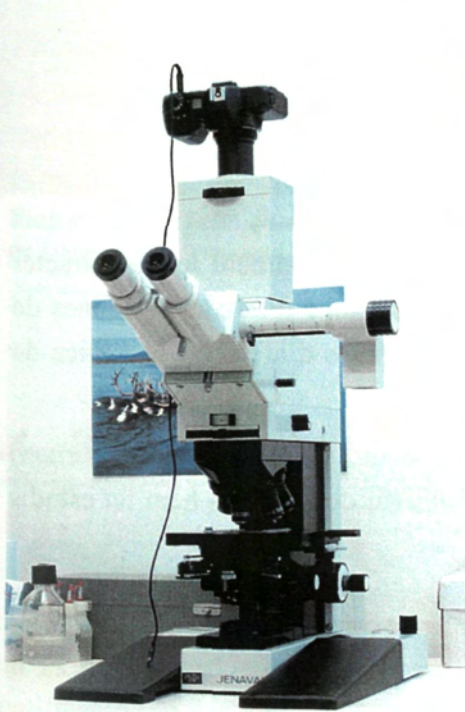


FIG. 27. Microscopi Carl Zeiss™ Jenaival Contrast equipat amb òptica DIC, CF, càmera clara i càmera fotogràfica.

Per fixar la mostra hem utilitzat lactofenol-blau cotó (LPCB, de *lactophenol cotton-blue*), simplement afegint-ne una gota en el marge del cobreobjectes. El fixador es difon cap a l'aigua i, al cap de 24 hores, aproximadament, quan la preparació ja ha madurat, es neteja el lactofenol sobrant, amb compte de no bellugar el cobreobjectes, amb un trocet de cotó mullat en alcohol. Un cop neta, la preparació es segella amb laca d'ungles incolora. Hem etiquetat les preparacions convenientment, indicant l'espècie de fong, l'hoste, la localitat i la data de recol·lecció, i després les hem guardat amb el corresponent número d'herbari en la BCB-Mycotheca (UAB, Dept. BABVE, Unitat de Botànica).

L'observació de les preparacions amb LPCB, tot i que, com hem dit, a la llarga pot degradar algunes estructures, és també interessant, ja que la tinció del contingut citoplasmàtic posa de manifest caràcters inapreciables en aigua, com l'obtingut de la tinció de les zigòspores i tricòspores, amb els seus corresponents zigosporòfors i cèl·lules generatives. El material citoplasmàtic tenyit es cohesiona de manera constant i característica per a cada espècie. Nosaltres som partidaris de fer sempre una doble observació, no menystenint la informació que aporta la tinció amb LPCB (VALLE & SANTAMARIA, 2002a).

Quan l'observació de nuclis ha estat transcendent, hem usat lactofenol amb acetocarmina (LPAC), seguint el mateix procediment que amb LPCB. Aquesta tinció ha estat usada només puntualment, i principalment en Ecrinals, per distingir els nuclis que permeten diferenciar espores primàries i secundàries, tot i que el seu resultat no ha estat sempre satisfactori.

## IDENTIFICACIÓ DE LES ESPÈCIES DE TRICOMICETS

La identificació preliminar de les espècies de tricomicets s'ha realitzat amb les monografies de LICHTWARDT (1986) i LICHTWARDT et al. (2001a). En LICHTWARDT (1986) s'hi inclou la primera clau dicotòmica per a totes les espècies de tricomicets descrites fins al moment. Aquesta clau ha quedat lògicament obsoleta, si més no per al tractament de determinats gèneres com *Smittium* o *Stachylina*, degut a la gran quantitat de noves espècies que d'aquests gèneres han estat trobades amb posterioritat. També són diversos els gèneres que han estat descrits després de la publicació d'aquesta obra. Per tant, aquesta monografia, a nivell d'identificació ens ha servit en les primeres fases d'aprenentatge, essent necessari recórrer sempre als articles més recents per un reconeixement precís.

Per complementar l'estudi taxonòmic hem cregut convenient demanar en préstec algunes de les preparacions tipus existents, la majoria fruit de les investigacions de Lichtwardt i col·laboradors, i de Manier i col·laboradors. Les preparacions de l'equip de treball de Lichtwardt han estat cedides des del Farlow Herbarium (FH, Harvard University, Cambridge, USA), i les pertanyents a la col·lecció J.-F. Manier, des de l'herbari del Museum d'Histoire Naturelle (PC, Laboratoire de Cryptogamie, París, França). S'han pres les mesures dels elements més significatius de totes les mostres tipus enviades, especialment les de caràcter espòric. S'han fotografiat tots els tipus, alguns d'ells han estat també dibuixats. Algunes de les mostres enviades en préstec han estat segellades de nou, després d'afegir-hi una mica de lactofenol, per millorar-ne l'estat de conservació.

També ens hem proveït de cultius axènics de certes espècies (en el cas de *Smittium*) dipositades a la "University of Kansas" (Lawrence, USA), a partir de les quals hem fet estudis comparatius.

## **MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA**

S'ha fet ús del SEM (*Scanning Electron Microscope*) per a l'observació de determinades microestructures. La microscòpia d'escandallatge només permet veure detalls de la superfície de la mostra (FIG. 28). Així el seu ús és limitat, però els resultats obtinguts en l'estudi de les tricòspores han incentivat el nostre interès en l'ús d'aquestes tècniques. Les estructures de més interès que hem estudiat amb aquesta metodologia són: apèndixs, superfície de les tricòspores i collarets.

## **PREPARACIÓ DE LES MOSTRES PEL SEM**

La majoria d'observacions realitzades amb SEM ho han estat per aquelles espècies que hem aconseguit cultivar axènicament, ja que és més fàcil treballar quan es disposa de gran quantitat de material per fer-ne les fixacions. De totes maneres també hem utilitzat SEM amb material extret directament del budell. Les mostres usades per a microscòpia electrònica d'escandallatge han estat fixades en glutaraldehid 2-2,5% en tampó cacodilat 2M (pH 7), rentades amb el mateix tampó i posteriorment deshidratades en una sèrie gradual d'etanol (15

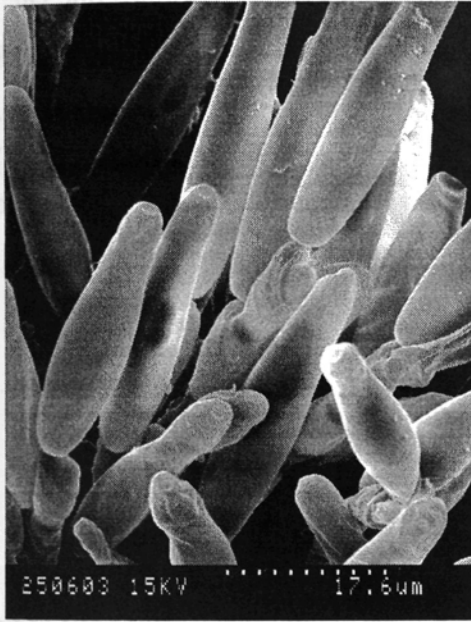


FIG. 28. Imatge SEM d'unes tricòspores de *Legeriomyces ramosus*.

min. en cadascun dels passos al 10-25-40-60-80 %) fins a etanol 100%. Després de la deshidratació completa i la substitució de l'alcohol per l'acetona, hem procedit a fer el punt crític i el metal·litzat amb or. L'observació s'ha fet amb un microscopi d'escandallatge HITACHI™ S-570 (al Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona). En el cas de les mostres que no procedeixen de cultiu, hem fet tot el procés amb una porció de budell juntament amb els fongs enganxats, per permetre una manipulació més fàcil, i per evitar una pèrdua excessiva de material durant el procés de deshidratació. En el moment de muntar la mostra, després del punt crític, s'han obert els budells damunt del suport per a fer-ne el metal·litzat i les posteriors observacions, deixant exposats a l'exterior els filaments dels tricomicets.

### 3.4 IDENTIFICACIÓ I CONSERVACIÓ DELS HOSTES

Quan un hoste està infectat amb tricomicets, cal determinar-ne la identitat. La larva a la qual li hem extret l'intestí conserva encara la major part dels caràcters necessaris per a la seva identificació (en cas que no hagi quedat molt malmesa per la manipulació), i hem procedit a guardar-la en un "Eppendorf™" amb etanol al 70%, degudament etiquetat amb el mateix número d'herbari BCB que la preparació microscòpica i les fitxes associades.

#### Per a artròpodes aquàtics

- Les larves de dípters quironòmids (FIG. 29) són especialment difícils d'identificar, degut a

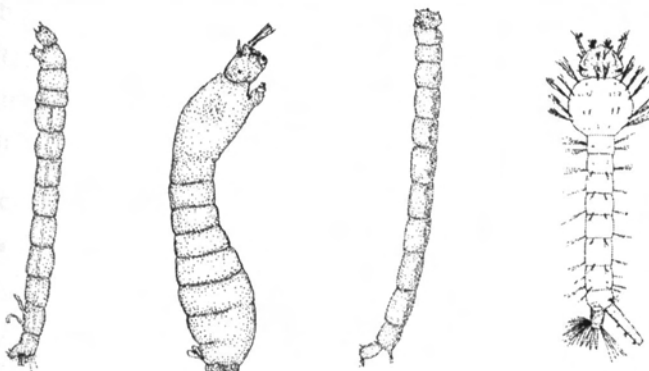


FIG. 29. Dibuixos de les larves de dípters més comunes on trobem Harpel·lals (d'esquerre a dreta): Chironomidae, Simuliidae, Thaumaleidae i Culicidae.

l'elevat nombre d'espècies existents i a les petites dimensions de les característiques que cal observar. Sovint ha estat necessari fer preparacions de les càpsules cefàliques, prèviament escalfades amb una solució de KOH al 10%, durant 10 minuts, per digerir-ne les parts toves (musculatura). Un altre mètode que hem usat no requereix digestió, i consisteix en separar l'esclerita cefàlica dorsal de la ventral. Amb l'ajut d'unes pinces fines, agulles entomològiques i un bisturí hem fet dues incisions des de la zona occipital fins a l'obertura bucal. Hem preparat les dues seccions sobre un portaobjectes amb una gota de lactofenol o glicerina (FERRARESE & ROSSARO, 1981). D'aquesta manera es poden observar les característiques de l'aparell bucal, antenes i esclerita dorsal que ens permetran determinar a quina tribu o gènere pertany l'espècimen examinat. No sempre hem arribat a nivell d'espècie, ja que a part de la dificultat, el grau d'especificitat de les espècies de Harpel·lals respecte l'hoste és més genèric o tribal que específic.

- Les larves d'efemeròpters i plecòpters (FIG. 30) no mostren tanta dificultat en la seva determinació i manipulació. S'ha intentat arribar sempre a nivell de gènere, i en molts casos d'espècie. Per a la identificació s'han usat les memòries de tesi doctoral de PUIG (1983) i d'ORTEGA (1986), i les guies d'efemeròpters (BELFIORE, 1983) i de plecòpters (CONSIGLIO, 1980) d'Itàlia.

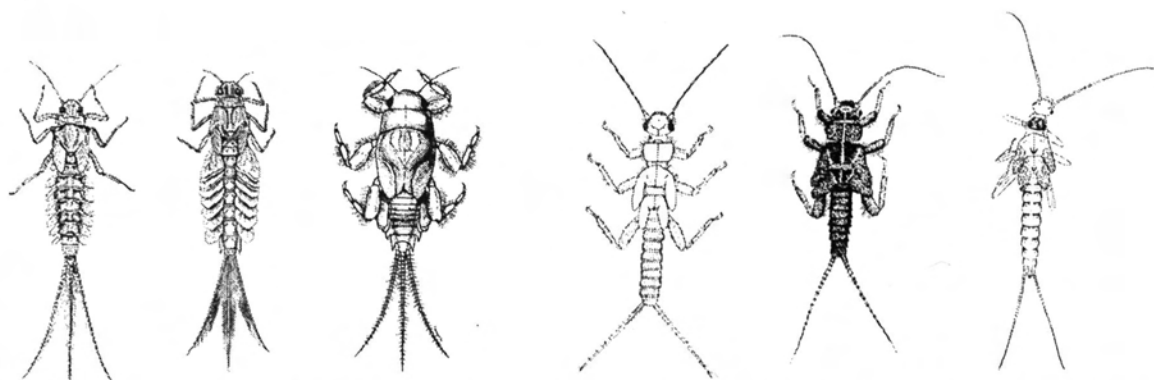


FIG. 30. Diverses larves d'efemeròpters (les tres primeres de l'esquerra) i de plecòpters (les tres darreres de la dreta), hostes comuns de Harpel·lals. D'esquerra a dreta: Baetidae, Siphonuridae, Caenidae, Leuctridae, Nemouridae, Capnidae.

- A Catalunya el gènere d'isòpode aquàtic més freqüent es *Proasellus* (segons PUIG, 1999) (FIG. 31), i a la península el nombre d'espècies és molt reduït, fet que en facilita la identificació.

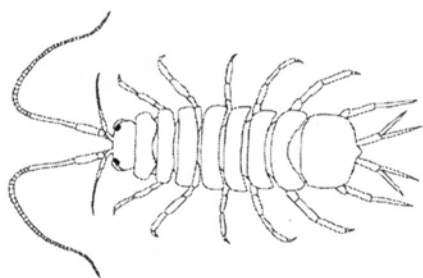
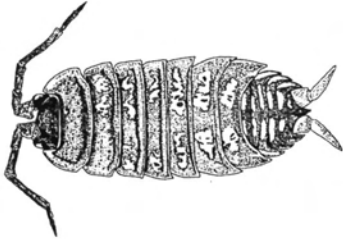


FIG. 31. L'isòpode aquàtic *Proasellus coxalis*. Tot i ser l'únic isòpode auctòcton, hi ha un altre gènere, amb l'espècie *Asellus aquaticus*, pròpia d'Àsia, que competeix amb aquest. Per a la identificació cal mirar els plecòpodes del mascle.

### Per a artròpodes terrestres

- La identificació d'isòpodes terrestres (FIG. 32) ha estat possible gràcies al treball de SUÁREZ (1990), havent-nos proposat només la determinació fins a gènere. Sovint és necessari fer preparacions microscòpiques de l'aparell copulador dels mascles.



**FIG. 32.** Isòpode terrestre (Oniscidae). *Porcelio* sp. Són les anomenades popularment cuques o porquets de Sant Antoni, o someretes, abundants per tot el país. El percentatge d'infecció per tricomicets és molt baix.

- Els diplòpodes miriàpodes (polidèsמידs, iúlids i glomèrids, FIG. 33) han estat determinats fins a nivell genèric, amb l'ajut de la memòria de tesis doctoral de VICENTE (1978).



**FIG. 33.** Exemples de diplòpodes. D'esquerra a dreta: Glomèrid, Polidèsמיד i Iúlid. Hostes habituals d'Eccrinals.

## 3.5 TRACTAMENT DE LES MOSTRES PER A PROCEDIR A ANÀLISIS MOLECULARS

---

Els tractaments de les mostres de Harpel·lals, per a accedir a fer estudis moleculars, s'han realitzat enterament a la Universitat de Kansas, a Lawrence (USA), on el Dr. M. M. White ha desenvolupat una metodologia adient per a l'amplificació d'ínfimes quantitats de 18S rDNA (WHITE, com. pers.)

La recol·lecció, aïllament i emmagatzematge de les mostres s'ha dut a terme en el laboratori de la UAB. Aquesta cooperació entre les dues Universitats és fruit d'un projecte, iniciat per l'equip del Dr. R. Lichtwardt a Kansas, i que té com a finalitat l'estudi filogenètic de les espècies de tricomicets associades a plecòpters, en el seu context biogeogràfic. En aquest



marc, l'interès mutu per al coneixement dels fongs intestinals, ha facilitat l'intercanvi d'informació i esforços amb la voluntat de comprendre'n millor els processos de diversificació i especiació a escala global. Des de la nostra posició, hem aportat espècimens que representen una mostra de la diversitat de tricomícets a Europa occidental.

## **MATERIAL**

- Recipients "CTAB buffer" amb el contingut següent: 500 µl de 2x CTAB buffer (2% CTAB, 1.4 M Tris-HCl pH 8.0, 0.25 mM EDTA) (seguint les instruccions de GOTTLIEB & LICHTWARDT, 2001a).
- Congelador (entre -5/-10°C i -20°C).
- El propi per a procedir a la dissecció normal dels hostes.

## **METODOLOGIA**

Quan ens interessa reservar material fúngic per fer posteriors estudis moleculars, procedim com de costum amb la dissecció de l'hoste per aïllar el tricomícet. Ens convé no disgregar molt la mostra per poder transferir-la sencera als recipients de CTAB. S'identifica l'espècimen amb el l'ajut del microscopi i s'etiqueta el recipient amb les dades oportunes (espècie, hoste, localitat, data i número de referència). Transferim el material al recipient de CTAB amb l'ajuda d'unes agulles entomològiques o d'unes pinces. És habitual que fragments del budell hi siguin també dipositats. En el cas que més d'una espècie de fong cohabitï en un mateix fragment de budell, refusem la mostra, evitant que la barreja de material dificulti l'anàlisi. Així, per cada recipient hi haurà el material d'una sola espècie de tricomícets extret d'un hoste.

El material disposat en "CTAB buffers" és guardat al congelador fins que el nombre de mostres és prou elevat com per enviar una remesa al laboratori de la Universitat de Kansas, on el Dr. White procedeix al seu estudi.

## **3.6 IL·LUSTRACIÓ DELS FONGS**

---

### **DIBUIXOS**

Per il·lustrar cadascuna de les espècies trobades, a més de les microfotografies, hem procedit a la realització de dibuixos a tinta, els quals han estat elaborats a partir de les preparacions

fixades amb LPCB, amb l'ajuda d'una càmera clara acoblada al microscopi. S'han tingut en compte les següents premisses en la tria del material per a les il·lustracions:

- Estudi preliminar de les preparacions de l'espècie que volem dibuixar. D'aquesta manera ens assegurem de que la mostra o fragment escollit és representatiu del conjunt, i es troba en les millors condicions possibles. En cas d'existir diferències entre poblacions, es tindran en compte per veure la variació intraespecífica.
- Incloure en el dibuix la major quantitat d'informació possible: estructures reproductives, ramificació del tal·lus, holdfast, etc.
- En el cas de disposar de poc material o que aquest estigui en males condicions, s'ha optat per dibuixar els fragments més representatius del tal·lus, les tricòspores i/o les zigòspores, estructures que, aparentment, són més resistents a la degradació bacteriana. Això succeeix en material trobat en mudes o en hostes ja morts.

Tots els dibuixos inclouen l'escala, de manera que pot comparar-se'n la magnitud.

Els dibuixos originals han estat escanejats per a la seva reproducció, a una resolució mínima de 600 píxels/polzada (ppp).

## **MICROFOTOGRAFIES**

Les microfotografies han estat realitzades a partir de material recent muntat en aigua o fixat en LPCB, tot i que la opció més desitjable, com ja s'ha esmentat, és la primera. S'ha usat, bàsicament, una màquina fotogràfica réflex acoblada al microscopi Carl Zeiss™ Jenaival Contrast. S'han realitzat amb les tècniques de camp clar, contrast de fases (CF) o contrast interferencial Nomarski (DIC), segons la mostra i les necessitats. S'han seguit les mateixes consideracions que les preses per a la realització dels dibuixos.

Els negatius fotogràfics han estat escanejats a una resolució de 600 ppp a 9 x 13 cm, mitjançant un escàner Epson™ per al seu posterior tractament amb Adobe™ Photoshop™.

## 3.7 TRACTAMENT DELS RESULTATS

---

### FITXES

- 1- Pel control dels hostes disseccionats i del seu grau d'infecció.-** Hem dissenyat una fitxa (ANNEX VII) per a fer un seguiment de la quantitat d'individus disseccionats de cada espècie d'hoste per localitat, de manera que obtindrem les dades necessàries per extreure'n uns percentatges relatius d'infecció. Així mateix en aquesta fitxa s'inclouen totes les dades d'interès de la localitat mostrejada, des de les referències geogràfiques i edàfiques fins a notes sobre l'estat general de la conca (contaminació, vegetació dominant, estat de conservació, etc.).
- 2- Pel seguiment de cada espècie fúngica.-** Per a cada preparació microscòpica del fong s'ha confeccionat una fitxa de descripció, amb la corresponent referència numèrica de l'herbari BCB-Mycotheca, amb anotacions sobre la identitat del fong i de l'hoste, la localitat, la data de recol·lecció i observacions (ANNEX XI). Les dades de cada fitxa estan també incloses en una base de dades informatitzada amb Microsoft™ Excel™.
- 3- Per l'estudi morfològic dels fongs.-** Unes altres fitxes han estat dissenyades amb l'objectiu d'anotar les característiques morfològiques de les espècies de tricomicets que anem trobant (ANNEXES VIII-X). Aquestes dades, que inclouen les mesures de diversos paràmetres (diàmetre de les hifes, longitud i diàmetre de les tricòspores, longitud i diàmetre del collaret, aparença de l'apèndix, nombre de cèl·lules generatives per branca, longitud i diàmetre de les cèl·lules generatives, etc.) han servit per elaborar les taules (veure les observacions del gènere *Lancisporomyces* en el capítol de taxonomia). En el cas d'espècies que requerien d'alguna anàlisi morfomètrica aquestes dades han estat introduïdes en un programa d'anàlisi estadística (Microsoft™ Excel™ i SPSS™ 10) per extreure'n els resultats més representatius i les corresponents gràfiques.

### ELS HOSTES EN XIFRES

S'han realitzat un total de 460 mostrejos puntuals, comptant les possibles reiteracions en una mateixa localitat. Això equival a un mateix nombre de fitxes de seguiment per localitat i dia. Considerant un promig de 30 hostes disseccionats per localitat, obtenim un total d'uns 13.800 individus explorats. Cal remarcar que la mitjana d'hostes aquàtics analitzats per mostreig sol ser major que els 30 comptabilitzats, però en el cas d'artròpodes terrestres i de determinats

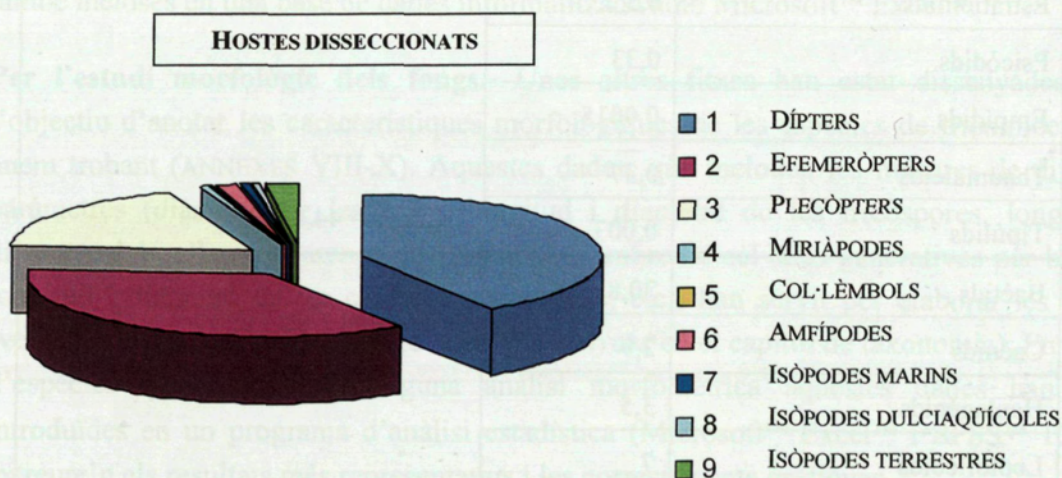
mostrejos molt dirigits a recol·lectar un grup concret d'hostes, la mitja per localitat baixa considerablement.

Exposem a continuació (Taula 1) una llista amb els grups d'hostes estudiats i el percentatge relatiu de la seva importància d'acord amb el nombre d'individus estudiats.

Grups d'hostes	% respecte al total d'hostes disseccionats	Percentatges agrupats
Culícids	2	<b>Dípters = 44,6%</b>
Quironòmids	12,5	
Simúlids	5,8	
Díxids	0,9	
Ceratopogònids	0,1	
Estratiòmids	0,3	
Psicòdids	0,33	
Empídids	0,0015	
Thaumaleids	0,37	
Tipúlids	0,003	
Baètids	20,8	<b>Efemeròpters = 38,7%</b>
Caènids	2,9	
Heptagènids	3,5	
Leptoflèbids	7	
Efemèrids + Efemerèl·lids	4	
<i>Nemoura</i>	9,8	<b>Plecòpters = 20,2%</b>
<i>Protonemura</i>	3,8	
<i>Amphinemura</i>	0,2	
Leuctrids	6	
Càpnids	0,45	
Iúlids	0,13	

Glomèrids	0,24	<b>Miriàpodes = 0,54%</b>
Polidèsמידs	0,17	
Col·lèmbols	0,4	<b>Col·lèmbols = 0,4%</b>
Talítrids ( <i>Orchestia</i> )	0,03	<b>Amfípodes = 1,33%</b>
Gammàrids	1,3	
<i>Ligia</i>	0,54	<b>Isòpodes marins = 0,54%</b>
Asèl·lids	0,65	<b>Isòpodes dulciaqüícoles = 0,65%</b>
Oníscids	2,5%	<b>Isòpodes terrestres = 2,5%</b>

**TAULA 1.** Quadre de percentatges d'hostes estudiats, separats per grups, amb proporcions relatives per al total dels prop de 14.000 hostes disseccionats. Destaquen, en percentatge d'estudiats, els dípters (especialment quironòmids i simúlids), i entre els efemeròpters, la família dels baètids.



**FIG. 34.** Diagrama circular on s'hi representa el percentatge d'hostes estudiats repartits en grups. Queda molt ben representada l'abundància dels dípters i també la dels efemeròpters, sobretot baètids que, quan són presents en una localitat formen grans poblacions. Els grups d'isòpodes, miriàpodes i amfípodes serien els més minoritaris.

## 3.8 CULTIUS AXÈNICS

---

### ASPECTES HISTÒRICS

Dins de les Harpel·lals, les primeres espècies en ser cultivades pertanyien al gènere *Smittium*, a partir de mostres obtingudes en larves de mosquit que prèviament havien estat esterilitzades en superfície (CLARK et al., 1963). Es varen usar antibiòtics diluïts en l'aigua de dissecció per rentar el material fúngic abans de col·locar-lo en medi sang-agar (SNB-9), usat habitualment en el cultiu d'hemoflagel·lals (protozous paràsits). Amb aquest mètode es van aconseguir aïllar *Smittium culicis* i *S. culisetae*.

Aquells autors varen fer subcultius en medi cervell-cor-Agar (*Brain-Heart Infusion agar* o BHIa). El creixement que obtingueren fou molt lent i la formació de tricòspores només es produí al cap d'un mes. Estudis posteriors varen revelar que l'ús de BHIa en les concentracions recomanades pel fabricant resultaven inhibidores per la producció d'espores. Fou establert l'òptim en una dilució de BHIa al 10% (EL-BUNI & LICHTWARDT, 1976a).

Poc després s'aconseguien fer cultius de *S. simulii* i *S. culisetae* amb BHIa diluït i també en agar patata-dextrosa-extracte de llevat (PDYEA) per LICHTWARDT (1964). Des de llavors s'han aïllat moltes més espècies de *Smittium*, també en altres medis.

Actualment només 7 gèneres de Harpel·lals han pogut ser cultivats: *Austrosmittium*, *Capniomyces*, *Furculomyces*, *Genistelloides*, *Simuliomyces*, *Smittium* i *Trichozygospora*. Les espècies cultivades representen prop del 12% de totes les conegudes (segons MISRA, 1998). Cap espècie dels altres dos ordres, Asel·larials i Eccrinals, no ha pogut ésser aïllada axènicament. *Amoebidium parasiticum*, una Amoebidial, fou el primer "fong" associat a artròpodes (i inclòs *sensu lato* en els tricomicets) en ésser cultivat (WHISLER, 1960).

Dels gèneres presents a la península, només hem pogut cultivar espècies del gènere *Smittium*, si bé s'han fet intents amb molts d'altres gèneres, que no han mostrat la capacitat de créixer axènicament. Així doncs, tot l'apartat de cultius es centra en aquest gènere de Harpel·lals.

### MATERIAL

Per aïllar els fongs en cultiu axènic hem usat el medi proposat per LICHTWARDT (1986) (BHIa 1/10) amb les proporcions lleugerament modificades:

**Medi original Brain-heart infusion Agar (BHI 1/10-Agar):**

BHI agar.....3,7 g

Tiamina HCl.....200 µg  
 Biotina.....50 µg  
 Agar.....15 g  
 Aigua destil·lada.....1 L

**Medi modificat:**

BHI agar.....5,5 g  
 Tiamina HCl.....200 µg  
 Biotina.....50 µg  
 Agar.....13 g  
 Aigua destil·lada.....1 L

Per la desinfecció de l'inòcul hem utilitzat una solució d'antibiòtics (solució Stock) amb la següent formulació (a partir de LICHTWARDT, 1986):

40.000 unitats de Penicil·lina G  
 80.000 unitats d'Estreptomicina-sulfat  
 100 ml d'aigua destil·lada estèril

**METODOLOGIA**

El medi de cultiu estacionari (BHIa 1/10) es prepara segons les instruccions del fabricant (LIOFILCHEN™) i com s'estableix en la bibliografia (LICHTWARDT, 1964; LICHTWARDT et al., 2001a; WHISLER, 1962; WILLIAMS, 1971; WILLIAMS & LICHTWARDT, 1972). S'hi afegeixen vitamines (tiamina i biotina), que malgrat no ser imprescindibles, milloren significativament el creixement de les espècies de *Smittium* (WILLIAMS & LICHTWARDT, 1972). Abans de procedir a la inoculació del fong en el medi, s'hi incorpora una fina pel·lícula d'aigua destil·lada estèril.

**Preparació de l'inòcul.-** Un cop extret i netejat el budell, com s'explica en l'apartat

corresponent, s'utilitza el tal·lus ja separat del budell, o bé agafat a aquest si està prou net. En qualsevol dels dos casos, hem de fer un rentat exhaustiu amb antibiòtics. Si treballem amb una porció del budell, el procés és més còmode ja que, en ser visible a ull nu, podem prescindir de la lupa. En cas que manipulem una porció petita del tal·lus del fong, és necessari fer tot el procés de rentat sota una lupa binocular. Aquesta segona opció, sempre comporta menys riscos de contaminació per bacteris, molt abundants en les restes de budell.



**FIG. 35.** Plaques de Petri amb BHIa, amb un cultiu de *Smittium hecatei* (esquerra) i *S. simulii* (dreta). Cada espora esdevé un centre de creixement que conté gran densitat de tricòspores i hifes que creixen entrelaçades.

Es treballa amb càpsules de Petri (FIG. 35) estèrils, parcialment plenes d'aigua estèril, en les quals s'hi afegeix fins a 0,6 ml de la solució d'antibiòtics o més, si la mostra està molt contaminada, fins a un màxim de 1,5 ml per placa de Petri. Es passa el budell per 3-4 plaques amb la solució desinfectant abans de col·locar-lo al medi de cultiu. En cada placa, o rentat, la mostra hi ha de romandre entre 30 i 60 segons. Es realitza tota l'operació en una cambra de flux laminar, equipats amb guants i amb l'ajut d'unes pinces fines que han estat convenientment esterilitzades a la flama cada cop que agafem material fúngic.



FIG. 36. Tubs d'agar inclinat per a fer cultius de llarga duració. Aquests en concret, són cultius de *Smittium* spp. cedits per la Universitat de Kansas.

Una segona metodologia que hem emprat per a la conservació de material viu, ha estat la següent: usant el mateix medi descrit anteriorment (BHIa 1/10) es fan medis d'agar inclinat en tubs de 1,3 cm de diàmetre per 12 cm de llargada (FIG. 36). Sempre en condicions d'esterilitat, s'afegeix aigua destil·lada estèril com en el cas de les plaques de Petri. Aquest mètode l'usem per guardar les mostres a llarg termini en el refrigerador, ja que requereixen menys repicades (viuen fins a tres mesos), i ocupen menys espai. L'inòcul procedent de plaques de Petri es recull amb una nansa de Cole flamejada i es passa als tubs amb medi inclinat. Posant la nansa dins de l'aigua sobrenedant sacsegem el material fúngic fins a fraccionar-lo en petits bocins que seran les noves unitats formadores

de colònies. Amb el tub inclinat fem girar l'aigua per damunt de l'agar inclinat, aconseguint que alguns dels fragments de l'inòcul quedin adherits al medi. Deixem els tubs en una gradeta i repetim l'operació de manera que els trossos vagin quedant enganxats en la part emergida de l'agar dins del tub inclinat. Al quart dia deixem en repòs el tub durant una setmana o menys i col·loquem els medis a la nevera.

**Preparació de la solució d'antibiòtics (solució Stock).**- Per preparar una solució de 40.000 unitats de Penicil·lina G i 80.000 unitats d'Estreptomicina-sulfat per mil·lilitre, es barregen 0,0025 g (màxim de 0,005 g) de Penicil·lina-G amb 0,01 g (màxim de 0,02 g) d'Estreptomicina-sulfat en 100 ml d'aigua destil·lada estèril. Després filtrarem i aquesta solució podrà ésser conservada en el refrigerador durant 6 mesos o més. La solució s'aplicarà sobre la mostra amb una micropipeta.

**Conservació i manteniment dels cultius.**- Els cultius es guarden en el refrigerador després de fer-los créixer a temperatura ambient durant 7-15 dies, segons l'espècie i la velocitat de creixement.



No és estrany que, passats uns dies, les plaques es contaminin amb bacteris. En aquest cas es neteja l'inòcul repetint l'operació de rentat amb la solució d'antibiòtics. Podem afegir més concentració d'antibiòtics en la placa de cultiu, al posar l'aigua destil·lada. En cas que la contaminació sigui per llevats (es fàcil de notar la diferència entre llevats i bacteris per l'olor que desprèn la placa en obrir-la), la neteja del cultiu es fa especialment difícil. Aleshores, podem optar per anar canviant de placa els tal·lus en creixement, després de rentar-los en una càpsula de Petri amb aigua destil·lada estèril i més antibiòtics (per tornar a evitar el creixement de bacteris associats). Ocasionalment, si la contaminació amb llevats resulta excessiva, s'ha de prescindir de la placa. Els cultius han estat repicats quan el creixement del fong ho ha permès (és a dir, quan hi ha prou massa fúngica).

El creixement dels tal·lus cultivats s'ha seguit amb l'ajut d'un microscopi invertit WILD™.

Com que totes les espècies que hem aconseguit cultivar pertanyen al gènere *Smittium*, en el corresponent apartat de taxonomia referenciem l'article on es publiquen els resultats, i més concretament, el treball de recerca on aquests estan més detallats (VALLE, 2002).

### 3.9 L'ÀREA DE MOSTREIG

---

L'àmbit geogràfic d'estudi s'estén, d'entrada, per tota la Península Ibèrica, com es deriva dels objectius proposats pel projecte "Flora Micológica Ibérica". De totes maneres, com hem exposat al pròleg, la zona més intensament prospectada queda compresa dins de les províncies de Catalunya i circumdants, per la raó òbvia a una millor accessibilitat des del centre on hi tenim el laboratori (FIG. 37). Aquest fet no resta importància a les recol·leccions que haguem pogut realitzar en altres comunitats, que si bé han estat explorades, el nombre de mostres recollides en elles no ha estat molt elevat. Un dels principals factors limitants per a la realització de campanyes extenses lluny del centre d'investigació és la metodologia de treball, que sempre ens obliga a fer via ràpidament amb el material fresc per evitar la mort dels hostes i la conseqüent degradació dels fongs. Per aquesta raó sempre ens és de menester un lloc de treball pròxim a la zona de recol·lecció, requeriment que no a tot arreu és possible de satisfer. En aquest sentit, totes les campanyes de mostreig fora de Catalunya han estat molt planificades, i hem hagut de comptar amb el suport d'altres centres de recerca, universitats i llocs d'acollida on fos possible instal·lar-hi lupa, microscopi i, tot el material necessari per a la dissecció, aïllament, fixació i conservació de les mostres.

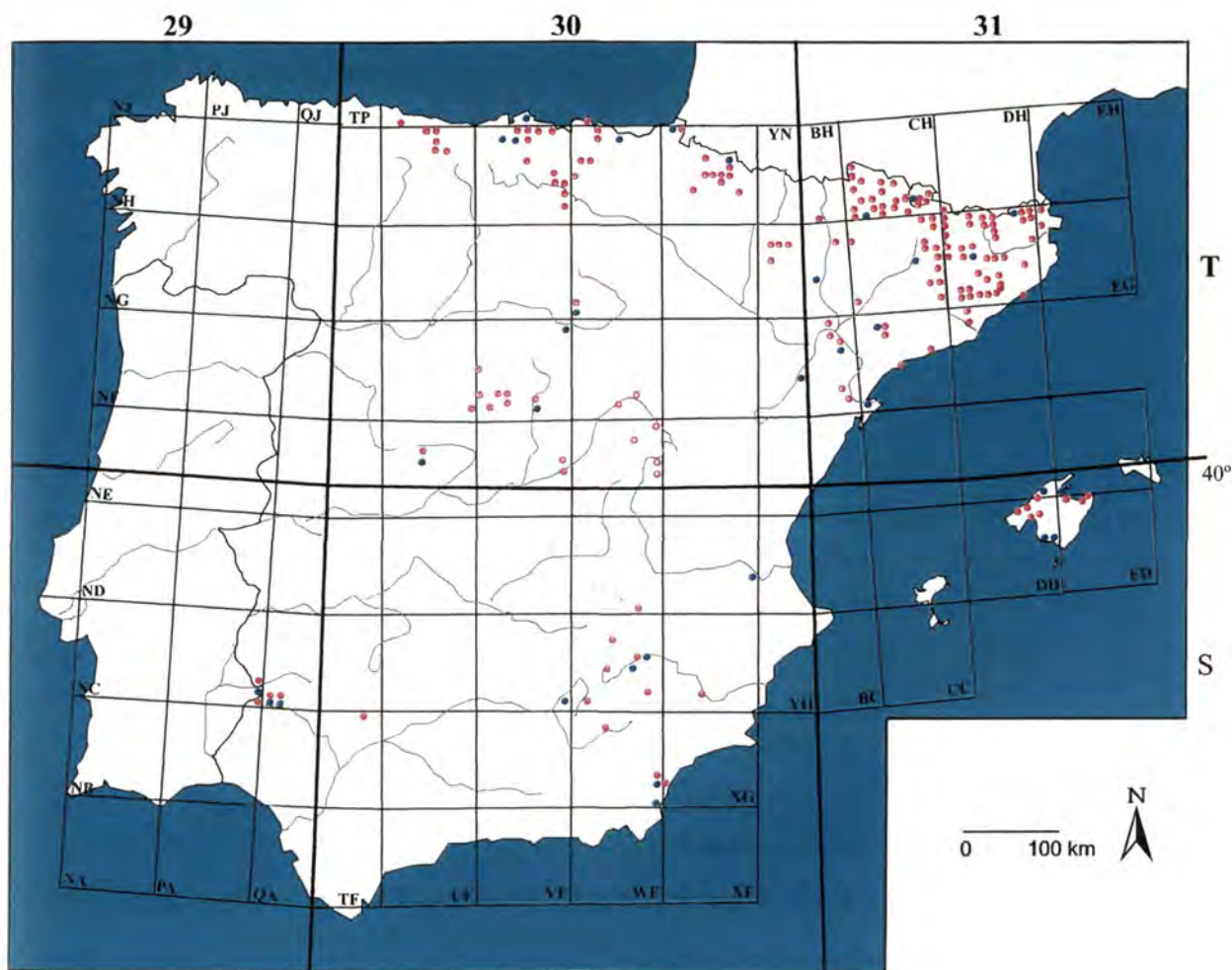


FIG. 37. Mapa de localitats mostrejades. Els punts de to rogenç indiquen localitats (segons quadrant UTM 10 x 10) on hem trobat hostes infectats. Els punts blaus corresponen a localitats mostrejades on no hi hem trobat tricomicets.

### Llista de localitats mostrejades fora de Catalunya i centres d'acollida:

- Andorra** <sup>(5)</sup>:
- Parròquia de Canillo, El Soldeu, riu d'Incles (31T CH91).
  - Parròquia de Canillo, Bordes de Ransol, afluent del riu de la Coma (31T CH81).
  - Parròquia de Sant Julià de Lòria, Canòlic, riu d'Ós (31T CH70).
  - Parròquia de la Massana, Cortals de Sispony, riu de Montaner (31T CH71).
  - Parròquia de la Massana, Arinsal (31T CH71).
  - Parròquia de la Massana, Pal, riu de Pal (31T CH72).
  - Parròquia d'Ordino, El Serrat, riu de Sorteny (31T CH81).
  - Parròquia d'Ordino, El Serrat, riu Tristaina (31T CH82).
  - Parròquia d'Ordino, El Serrat, els Aiguassos (31T CH81).
  - Parròquia d'Ordino, entre Llorts i El Serrat, riu Valira d'Ordino (31T CH81).
  - Parròquia d'Ordino, coll d'Ordino (31T CH81).
- Álaba** <sup>(1)</sup>:
- Caranca, río Húmedo (30T VN94).
  - Delika, naixement del río Nervión (30T WN05).

- Gurendes, río Omecillo (30T VN94).  
Pinedo, río Omecillo (30T VN84).  
Santuario de Angosto, río Húmedo (30T VN94).
- Albacete** <sup>(4)</sup>: Ayna, río Mundo (30S WH45).  
Chospes, río Jardín (30S WJ70).  
La Mesta, río Horcajo (30S WH47).  
Paterna del Madera (Casa Rosa), río Madera (30S WH57).  
Tortas, río Madera (30S WH57).
- Almería** <sup>(4)</sup>: Sorbas, Molino del Río Aguas, río Aguas (30S XG01).  
Sorbas, río Aguas (30S WG70).  
Tabernas, la Rambla Tabernas (30S WF48).
- Asturias** <sup>(1)</sup>: Arenas de Cabrales, río Cares (30T UN59).  
Panés, río Deva (30T UN69).  
Cangas de Onís, río Covadonga (30T UP20).
- Ávila** <sup>(3)</sup>: Gavilanes (30T UK46).  
Mijares, Puerto de Mijares (30T UK46).
- Badajoz** <sup>(5)</sup>: Fuentes de León, arroyo del Judío (29S QC11).
- Burgos** <sup>(3)</sup>: San Llorente, río Nabón (30T VN85).
- Cantabria** <sup>(1)</sup>: Agüera, río Cerneja (30T VN66).  
Berao (Potes), río Deva (30T UN67).  
Cabezón de Liébana, río Bullo (30T UN77).  
Ramales de Victoria, río Asón (30T VN89).  
Riancho, río Karrantza (30T VN69).  
Tanarrio, río Belondio (30T UN67).
- Cuenca** <sup>(3)</sup>: Alto de Vegas, río Cuervo (sota naixement) (30T WK78).  
Beamud, río Júcar (30T WK94).  
Peralejo de las Truchas, río Tajo (30T WK99).  
Tragacete, río Júcar (30T WK96).
- Guadalajara** <sup>(3)</sup>: Muriel, río Sorbe (30T WM02).  
Valdesotos, río Jarama (30T WL73).
- Huelva** <sup>(5)</sup>: Arroyomolinos de León, rivera de Montemayor (29S QC21).  
Higuera de la Sierra, riera de Maygalanes (29S QB29).  
Santa Olalla de Cala, arroyo de la Parrilla (29S QB49).  
La Nava, barranco de la Olla (29S PC92).  
La Nava, río Múrtiga (29S PC93).  
Zufre, arroyo de la Gamonita (29S QB39).
- Huesca** <sup>(5)</sup>: Adahuesca, río Vero (30T YM47).  
Aneto, barranco de Malmarruí (31T CH11).  
Ansó, río Veral (30T XN73).  
Biniés, río Veral, sobre Foz de Biniés (30T XN63).

Loporzano, río Isuela (30T YM27).  
Javierregay, río Aragón Subordán (30T XN81).  
Loporzano, barranco de Vadiello (30T YM27).  
Panzanes, río Formiga (30T YM37).  
Puente de la Reina de Jaca, río Asabón (30T WN92).  
Salinas de Sin, río Cinqueta (31T BH71).  
Santa Eulalia la Menor, río Flumen (30T YM27).  
Sesa, río Guatizalema (30T YM25).

**Mallorca** <sup>(2)</sup>: Artà, vessant marítim de Talaia Moreia (31S ED39).  
Biniaraix (Sóller), torrent de Biniaraix (31S DE70).  
Escorca, torrent de Mortitx (31SDE80).  
Palma de Mallorca, Castell de Bellver (31S DD78).  
Pollença, S'Albufereta (31S EE11).  
Pollença, torrent de Son March (31S DE91).  
Santa Maria del Camí, torrent de Coanegra (Comafreda) 31S DD79).  
Valldemossa, torrent de Valldemossa (31S DD69).

**Madrid** <sup>(3)</sup>: Cotos, Puerto de Cotos (30T VL33).  
Los Molinos, río Guadarrama (30T VL00).  
Pontones de la Oliva, presa del Atazar (30T VL63).  
Navacerrada, arroyo de la Maliciosa (30T VL11).  
Pinilla del Valle, río Lozoya (30T VL32).  
Rascafría, arroyo de la Fuensanta (30T VL33).  
Rascafría, arroyo Laguna Grande de Peñalara (30T WL12).  
Rascafría, arroyo Umbría (30T VL33).  
Rascafría, río Lozoya (30T VL33).  
Rascafría, Sillada de Garcisancho (30T VL33).  
Torremocha de Jarama, río Jarama (30T WL52).

**Murcia** <sup>(4)</sup>: Águilas (30S XG24).  
Archivel, río Argos (30S WH81).  
Baños de Mulo, río Mulo (30S XH52).  
Caravaca, Molino de abajo (30S XH02).  
El Sabinar, río Taibilla (30S WH75).  
Moratalla, río Beamor (30S WH82).

**Navarra** <sup>(1)</sup>: Belagua, riera de Belagua (30T XN75).  
Casas de Irati, riera de Urtxuria (30T XN55).  
Casas de Irati, río Irati (30T XN41).  
Isaba, río Ezka (30T XN74).  
Itzalzu, río Anduñía (30T XN55).  
Otxagabia, río Zatoia (30T XN53).  
Urzainki, río Ezka (30T XN74).  
Uztarroz, Laza Gaina, río Ezka (30T XN74).

**Teruel** <sup>(5)</sup>: Beseit, riu Matarranya (31T BF62).

La Pedrera-Beseit (31T BF62).  
Vallderoures, riu Matarranya (31T BF62).

**Jaén** <sup>(5)</sup>: Beas de Segura, riu Guadalquivir (30S WH12).  
Quesada, torrent sense nom (30S VG98).

**Segovia** <sup>(3)</sup>: Navalfrío, riu Cega (30T VL34).  
Navas de Riofrío, riu Eresma (30T VL02).  
Peñarubia de Pirón, riu Pirón (30T VL05).  
Vegas de Matute, riu Moros (30T UL91).

**Vizcaya** <sup>(1)</sup>: Astelarra, riu Oka (30T WN29).  
Balcón de Bizkaia, rierol sense nom, Guerraiz (30T WN39).  
Bermeo, riera a la carretera Bi-631 Km 28 (30T WP20).  
Bolívar, riu Bolívar (30T WN38).  
Gorbea, riu Baias (30T WN16).  
Gorozika, afluent del riu Golako (30T WN29).  
Guriezo, riu Agüera (30T VN79).  
Karral, riu Valdeveci (30T VN89).  
Leioa, riera de la UPV-EHU (30T WN09).  
Mañaria, riu Mañaria, valle de Urkiola (30T VN27).  
Mendata, afluent del riu Golako (30T WN2).  
Munitibar, riu Léar (30T WN39).  
Sarria, riu Zubialde (30T WN16).  
Trebueso, riu Agüera (30T VN79).  
Turcíos, riu Agüera (30T VN59).

#### **Centres d'acollida:**

- (1) Euskal Herriko Unibertsitatea (Leioa, Bilbao), Depto. de Biología Vegetal y Ecología.
- (2) Institut Mediterrani d'Estudis Avançats (Mallorca, CSIC).
- (3) Real Jardín Botánico de Madrid (CSIC).
- (4) Universidad de Murcia (Murcia, Campus Universitario del Espinardo), Depto. de Hidrología y Ecología.
- (5) Altres (particulars).

# 4 TAXONOMIA



# 4 TAXONOMIA

---

## 4.1 CONSIDERACIONS PRÈVIES

---

Capítol central de la memòria, on s'hi exposen els resultats. S'hi inclouen les descripcions de les espècies de tricomícets trobades, fent referència a l'hoste i hàbitat, esmentant totes les localitats on s'han recol·lectat, comentaris sobre l'espècie descrita comparant-la amb d'altres espècies, i diverses observacions sobre la seva biologia i ecologia. També s'hi inclouen les il·lustracions, microfotografies i altres representacions esquemàtiques/gràfiques de l'espècie estudiada quan sigui convenient. En les espècies que escaigui, hi ha també dades referents a cultius axènics i estudis de microscòpia electrònica (SEM).

**Mètode sistemàtic i taxonòmic seguit.**- Tal com ja s'ha dit en la introducció, la sistemàtica actual de la Classe Trichomycetes s'estructura segons el mètode proposat per LICHTWARDT (1986).

Actualment, l'equip de micòlegs de la Universitat de Kansas (Lawrence, USA), dirigit pel Dr. Robert W. Lichtwardt, és el punter pel que fa al coneixement dels tricomícets, amb diverses línies d'investigació en sistemàtica clàssica i molecular, fisiologia, ecologia, ultraestructura, etc. ([www.nhm.ukans.ukans.edu/fungi](http://www.nhm.ukans.ukans.edu/fungi)). Aquest equip ha construït les bases dels estudis moderns d'aquest grup, establint-hi els criteris taxonòmics (LICHTWARDT, 1986):

- Identificació de l'hoste. Aquesta és una valoració primària per reduir les opcions en la identificació del fong, no per determinar l'espècie. Aquest és un sistema clàssic i fàcil emprat en aquells fongs que són paràsits o mantenen relacions estrictes amb el seu hoste.
- Estudiar el major nombre possible d'hostes per tenir una visió de les possibles variacions intraespecífiques del fong.
- Fer recol·leccions en diferents èpoques de l'any i en diferents estadis de desenvolupament de l'hoste, per veure les possibles variacions temporals.
- Les variacions morfològiques substancials d'una espècie de tricomícet en una mateixa espècie d'hoste seran indicatives d'un baix grau d'especificitat, el que significa que,



en cas d'aparèixer en altres hostes, també mostrarà variacions importants. Aquest factor s'ha de considerar en fer estudis taxonòmics.

Aquestes consideracions han estat aplicades en el desenvolupament del present treball, sempre que ha estat possible, ja que aquests criteris assumeixen que les poblacions d'hostes són estables al llarg del temps i compten amb un nombre d'individus suficient per realitzar-ne un estudi exhaustiu.

**La problemàtica descriptiva.-** La plasticitat fenotípica o pleomorfisme dels fongs és coneguda per tot micòleg. El seu sistema reproductiu és complexe, i la delimitació d'espècies i gèneres és, molt sovint, un problema. Hi ha moltes definicions que intenten explicar el significat del concepte "espècie", i algunes d'elles tenen molts problemes per ser aplicades dins del món de la micologia, una ciència que estudia organismes poc coneguts, on els processos de reproducció poden esdevenir variats i complexos. És possiblement per aquesta raó, que els estudis de sistemàtica molecular ocupen cada cop un espai més important en els articles i tractats de micologia, sobretot en els grups on la diversitat morfològica és reduïda. En aquest sentit hem de destacar les anàlisis de seqüències de rDNA de diferents espècies ibèriques, que estan sent realitzades en col·laboració amb la Universitat de Kansas, i entre les quals cal fer especial esment a les espècies d'*Orphella* i *Lancisporomyces*.

**L'amplitud ecològica i la taxonomia.-** Moltes espècies de tricomícets tenen una àrea de distribució cosmopolita, tot i que no ho són la majoria de les espècies que els hostatgen. Així doncs haurem de tenir en compte quina és la distribució geogràfica del grup taxonòmic al qual pertany un hoste, per preveure la distribució potencial d'un gènere o espècie de tricomícet.

Les dades corològiques que s'han acumulat al llarg d'un segle d'estudis sobre tricomícets, han estat llavor per al desenvolupament d'hipòtesis que versen sobre l'origen d'aquests organismes o, si més no, sobre la història natural de les relacions simbiòtiques que s'establiren entre fongs Harpel·lals i artròpodes.

El fet que una mateixa espècie de Harpel·lal s'hagi trobat en punts molt distants de la geografia mundial, en hostes de diferent espècie o gènere, sovint endèmics, ha donat peu a una teoria que situaria l'inici de la relació de simbiosis durant l'època en que s'extingueren i diversificaren els grups d'artròpodes més primitius que són, justament, aquells que actualment es relacionen amb Harpel·lals. Entre aquests hi ha plecòpters, efemeròpters i dípters nematòcers. Això succeí fa uns 250-200 milions d'anys quan la terra emergida formava un súper-continent o Pangea (ILLIES, 1965; NOONAN, 1988). Com que la capacitat de dispersió d'aquests artròpodes és molt reduïda, sobretot la de plecòpters (HYNES, 1976, 1988; STEWARDT & STARK, 1988), i la dispersió eòlica és possiblement negligible (GRESSITT, 1958), es considera que fou la deriva tectònica la que s'encarregà de dispersar entre continents els antics artròpodes, amb els seus simbionts ja establerts (LICHTWARDT, 1986). La diversificació dels artròpodes, resultant de la desaparició dels últims ponts entre continents durant l'Eocè (BROWN & GIBSON, 1983) fou més ràpida, aparentment, que la diversificació de certs gèneres de Harpel·lals, que s'han mantingut morfològicament invariables en hostes que

han sofert radiació adaptativa. Exemple d'això són *Smittium mucronatum*, a França (MANIER & MATHIEZ, 1965) i a USA (LICHTWARDT & WILLIAMS, 1999), *Bojamyces repens*, a USA, en *Leptophlebia intermedia* (LONGCORE, 1989) i a Espanya, en *Habroleptoides confusa* (VALLE & SANTAMARIA, 2005), o *Legeriomyces rarus* a Austràlia, en el gènere endèmic *Tasmanocoenis* (WILLIAMS & LICHTWARDT, 1993) i a Espanya, en l'europeu *Caenis* (VALLE & SANTAMARIA, 2005), entre d'altres tàxons de distribució disjunta.

**Consideracions nomenclaturals.** Hem revisat la nomenclatura d'alguns noms de gèneres i espècies, actualment en desús, que han estat la base per a combinacions noves, o bé que han estat directament refusades. Molts d'aquests tàxons varen ser publicats sense diagnosi llatina. D'acord amb la seva data de publicació i les normes del C.I.N.B., aquests noms no són vàlids. Tanmateix, el tractament que reberen amb posterioritat fou el de "*nomen nudum*" (e.g. LICHTWARDT, 1986). Aquesta designació és incorrecte en la majoria de casos i, quan s'escaigui, ens referirem a ells com a "*nomen invalidum*" (*nom. inval.*).

Per a les espècies que descrivim com a noves, hem seguit també la normativa del C.I.N.B., que segons el seu article 34, es pot adjudicar un nom provisional (*nomen provisorium* = *nom. prov.*) a un tàxon, en previsió d'una futura legitimació d'aquest a través d'una publicació vàlida.

## 4.2 CATÀLEG

---



# Cl. TRICHOMYCETES

DUBOSCQ, LÉGER & TUZET, ARCH. ZOOL. EXP. GEN. 86:136. 1948

---

Grup “ecològic” que inclou fongs endosimbionts obligats d'artròpodes, filamentosos, simples o ramificats, adherits a l'intestí dels seus hostes mitjançant un element de fixació (*holdfast*) cel·lular o acel·lular, de morfologia variable. Reproducció asexual mitjançant esporangiòspores, esporangis decidus apendiculats o no (tricòspores), o artròspores. Reproducció sexual per mitjà de zigòspores.

En l'actualitat, la classe Trichomycetes *s. str.* només admet dos ordres: Harpellales i Asellariales. Tal i com s'ha explicat en el capítol introductori, la classe, entesa en sentit ampli (trichomycetes), inclou fins a quatre ordres, amb Eccrinales i Amoebidiales, que s'afegeixen als dos ja esmentats. Nosaltres mantenim les Eccrinals al catàleg per les raons també explicades en el capítol 1.

---

# O. HARPELLALES

LICHTW. & MANIER, ANN. SCI. NAT. BOT. PARIS 9:519. 1978

Tal·lus simple o ramificat. Es reproduïxen formant tricòspores a partir de cèl·lules generatives diferenciades en branques fèrtils terminals o, més rarament, en quasi la totalitat de les hifes tal·lials. Poden reproduir-se sexualment mitjançant la formació de zigòspores generalment bicòniques (excepte en *Orphella*), originades de manera homo o heterotàlica. Es fixen al substrat mitjançant un holdfast cel·lular o acel·lular de morfologia variable.

Dues famílies: Harpellaceae (tal·lus simple, sense ramificar) i Legeriomycetaceae (tal·lus ramificat).

## CLAU PER A LA DETERMINACIÓ DELS GÈNERES IBÈRICS DE HARPEL·LALS:

1. Tal·lus simple, no ramificat, fixat a l'intestí mig (mesodeu) de larves d'insectes (F. Harpellaceae)..... 2
- 1'. Tal·lus ramificat, fixat a l'intestí posterior de larves d'insectes (F. Legeriomycetaceae)..... 4
2. Tricòspores cilíndriques, de forma alantoide, o més o menys cargolades en hèlix, no presenten collaret i duen de 2 a 4 apèndixs. En Simuliidae (Diptera) ..... *Harpella*
- 2'. Tricòspores diferents ..... 3
3. Tricòspores d'ovoides a lleugerament reniformes, disposades excèntricament a la correponent cèl·lula generativa, no presenten collaret i duen tres apèndixs. Poden presentar zigòspores bicòniques del tipus II. En Thaumaleidae (Diptera) ..... *Harpellomyces*
- 3'. Tricòspores ovalades, gairebé bicòniques, o bé el·líptiques, amb o sense collaret i amb un apèndix únic. Poden presentar zigòspores bicòniques del tipus I. En larves de Chironomidae i més rarament Psychodidae (Diptera) ..... *Stachylina*
4. Tricòspores sense apèndix ..... 5
- 4'. Tricòspores amb un o més apèndixs ..... 7
5. Les tricòspores es desprenen individualment ..... 6
- 5'. Les tricòspores es desprenen juntament amb altres cèl·lules (unitat de dispersió: cèl·lula generativa i cèl·lula terminal, a vegades també una cèl·lula de suport) ..... *Orphella*
6. Tal·lus amb llargues hifes que emeten ramificacions esparses i formen cèl·lules generatives de manera intercalar, mai en sèries terminals. En Caenidae o Leptophlebiidae..... *Bojamyces* (*B. repens*)
- 6'. Tal·lus d'aspecte diferent, amb ramificacions verticil·lades i disposades a mode d'umbel·la terminal. En Leptophlebiidae ..... *Tectimyces*
7. Tricòspores amb un apèndix ..... 8
- 7'. Tricòspores amb més d'un apèndix ..... 11
8. Tal·lus amb llargues hifes que emeten ramificacions esparses i formen cèl·lules generatives de manera intercalar, no en sèries terminals. En Caenidae o Leptophlebiidae ..... *Bojamyces* (*B. transfuga*)

8'. Tal·lus amb caràcters diferents .....	9
9. Tricòspores amb collaret. Zigòspores del tipus II. En larves de Dípters .....	<i>Smittium</i>
9'. Tricòspores sense collaret. Zigòspores diferents. En larves d'Efemeròpters .....	10
10. Tal·lus amb una cèl·lula basal bulbosa, productora de propàguls per a la dispersió vegetativa. Tricòspores petites (7,5-16 x 2-3 µm) disposades en llargues sèries terminals en branques fèrtils, amb un apèndix estirat molt finet .....	<i>Graminella</i>
10'. Tal·lus amb una cèl·lula basal lobulada. Tricòspores més grans, en nombre poc elevat per branca fèrtil, amb un apèndix que sol sortir embolicat en una espècie de nus .....	<i>Spartiella</i>
11. Tricòspores amb dos apèndixs .....	12
11'. Tricòspores amb més de dos apèndixs .....	16
12. Apèndixs de les tricòspores disposats en sacs apendiculars (es veuen taques opaques), paral·lels a la paret de la corresponent cèl·lula basal .....	13
12'. Apèndixs de les tricòspores disposats helicoidement dintre la corresponent cèl·lula generativa .....	14
13. Zigòspores del tipus I. En larves de Simuliidae .....	<i>Simuliomyces (S. microsporus)</i>
13'. Zigòspores del tipus II. En larves de plecòpters .....	<i>Capniomyces (C. celatus)</i>
14. Zigòspores del tipus IV. Tal·lus amb un eix principal prostrat, amb holdfasts subsidiàris i nombroses ramificacions pinnades. En plecòpters .....	<i>Lancisporomyces</i>
14'. Caràcters diferents .....	15
15. Zigòspores del tipus I. Tricòspores subcilíndriques .....	<i>Baetimyces</i>
15'. Zigòspores del tipus II. Tricòspores d'ovato-el·líptiques a obpiriformes .....	<i>Legeriomyces</i>
16. Tricòspores ovalades, lleugerament asimètriques a la base, amb 5-7 apèndixs molt finets i difícils d'observar. Zigòspores del tipus III .....	<i>Genistellospora</i>
16'. Caràcters diferents .....	17
17. Tal·lus ramificat de manera més o menys radiada a partir de la cèl·lula basal. Tricòspores ovato-el·líptiques, de 10,5-13 x 3 µm. Apèndixs de les tricòspores gruixuts i evidents dintre la cèl·lula generativa, en nombre desconegut. Zigòspores bicòniques, de 35-38 x 5-6 µm. En plecòpters .....	<i>Capniomyces (C. celatus)</i>
17'. Caràcters diferents. En Simuliidae .....	18
18. Zigòspores del tipus I. Apèndixs de les tricòspores petaloïdes o filiformes, en nombre de 3-6. Cèl·lula basal secretora de material amorf cimentant amb petites berruguetes esparses .....	<i>Stipella</i>
18'. Zigòspores del tipus III. Apèndixs de les tricòspores filiformes, en nombre de 4-7. Cèl·lula basal secretora de material amorf cimentant sense berruguetes esparses .....	<i>Pennella</i>

## F. HARPELLACEAE

LÉGER & DUBOSCQ, COMPT. REND. HEBD. ACAD. SCI. PARIS 188:951. 1929b

Typus.- *Harpella* Léger & Duboscq, Compt. Rend. Hebd. Acad. Sci. Paris 188:951. 1929b

Tal·lus simple, no ramificat. Fixat a la matriu peritròfica de l'intestí mig (mesodeu) de larves aquàtiques d'insectes.

Cinc gèneres. A la Península Ibèrica i Illes Balears només hem trobat espècies dels gèneres *Harpella*, *Harpellomyces* i *Stachylina*, i dels dos primers tan sols una espècie, mentre que de *Stachylina*, el gènere més diversificat dintre de les Harpellaceae, hem pogut identificar-ne set espècies.

### HARPELLA Léger & Duboscq, Compt. Rend. Hebd. Acad. Sci. Paris 188:951. 1929b

Generitypus.- *Harpella melusinae* Léger & Duboscq, Compt. Rend. Hebd. Acad. Sci. Paris, 188:951. 1929b.  
Generitypus specimen.- vide *H. melusinae*.

Tal·lus no ramificat, fixat a la matriu peritròfica del mesodeu de larves de Simuliidae (Diptera). Tricòspores allargades, cilíndriques, de vegades alantoides, corbades, helicoides o, rarament, rectes, mostrant variacions fins i tot en una mateixa espècie, amb 2-4 apèndixs a la base, estriats transversalment, segons les espècies. Zigòspores, difícils d'observar per la seva raresa, bicòniques, inserides de manera medial i perpendicular al zigosporòfor (tipus I).

Quatre espècies descrites, de les quals, només una ha estat trobada a la península. En larves de Simuliidae (Diptera).

### *Harpella melusinae* Léger & Duboscq, Compt. Rend. Hebd. Acad. Sci. Paris 188:951. 1929b

Ind. loc.- Fréquemment dans le tub digestif des larves de Simulie (*Simulium ornatum* Meig = *Melusina ornata*), provenant de divers ruisseaux des Alps et du midi de la France.

Tal·lus lleugerament arquejat o corbat, de longitud variable, sobrepasant sovint les 500 µm, i de 5-11 µm de diàmetre. Cèl·lula basal poc diferenciada, amb un holdfast discoide evident, que s'expandeix en el punt de contacte amb la matriu peritròfica. Tricòspores corbades, cargolades o gairebé rectes, en nombre de 2-20 per individu, de (60-)90-155 x 4-10 µm, sense

collaret, i amb diversos (normalment 4) apèndixs difícils d'observar. **Zigòspores** de 38-39 x 10-15 µm, amb un zigosporòfor de 16-25 x 9-15 µm (segons LICHTWARDT, 1986; no observades per nosaltres, tot i haver vist ponts de conjugació) (FIGS. 38.9, 39.6, 39.7).



**HOSTES I ECOLOGIA.**- Fixat a la matriu peritròfica del mesodeu de larves de Simuliidae. Prefereix aigües de corrent ràpida, ben oxigenades.

#### MATERIAL ESTUDIAT

**ALBACETE:** Paterna del Madera, Casa Rosa, ríu Madera, 30S WH57, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 15-Maig-03 [Tr1777-1778]. Chospes, ríu Jardín, 30S WJ70, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 15-Maig-03 [Tr1782].

**ALMERÍA:** Molinos del ríu Aguas, ríu Aguas, 30S XG01, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 16-Maig-03 [Tr1785-1786].

**ANDORRA:** Parròquia de Canillo, El Soldeu, Vall d'Incles, 31T CH91, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 20-Ago-00 [Tr0186]. Parròquia de Sant Julià, ríu d'Òs, en larves de *Prosimulium* sp., leg. S. Santamaria i L. Guàrdia, 12-Oct-00 [Tr0357]. Parròquia de la Massana, ríu de Montaner, Vall de Sispony, 31T CH71, en larves de *Prosimulium* sp., leg. L. Guàrdia i S. Santamaria, 13-Oct-00 [Tr0359]; ídem, 15-Maig-01 [Tr0752-0753]. Ídem, Pal, ríu de Pal, 31T CH71, en larves de *Simulium* sp., leg. L. Guàrdia, 15-Oct-02 [Tr1656]. Parròquia d'Ordino, ríu de Sorteny, 31T CH81, en larves de *Prosimulium* sp., leg. L. Guàrdia i S. Santamaria, 14-Oct-00 [Tr0367]. Parròquia de Canillo, Bordes de Ransol, afluent ríu de la Coma, 31T CH81, en larves de *Simulium* sp., leg. L. Guàrdia, 15-Oct-02 [Tr1660, 1662].

**ÁVILA:** Gavilanes, ríu Gavilanes, sierra de Gredos, 30T UK46, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 8-Oct-01 [Tr1061].

**BALEARS (MALLORCA):** Valldemossa, torrent de Valldemossa, 31S DD69, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 29-Maig-30 [Tr1817-1819].

**BARCELONA:** Fogars de Monclús, Santa Fe del Montseny, riera de Santa Fe, 31T DG52, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia i S. Santamaria, 27-Jun-00 [Tr0122-0125]. Riells, ríu Breda, 31T DG52, en larves de *Simulium* sp., leg. L. Guàrdia, 16-Ago-00 [Tr0223]. Gualba, riera de Gualba, 31T DG52, en larves de *Prosimulium* sp. i *Simulium* sp., leg. L. Guàrdia, 30-Oct-00 [Tr0384-0385, Tr0389]; ídem, 12-Mar-01 [Tr0604]; ídem, 31-Ago-01 [Tr0969]. Santa Maria de Corcó, riera de les Paganes, 31T DG 45, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 19-Feb-01 [Tr0498, Tr0503]; ídem, Sant Julià de Cabrera, riera de Sant Julià, 31T DG55, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 19-Feb-01 [Tr0518]; ídem, riera del Feu, 31T DG45, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 19-Feb-01 [Tr0530]. Sant Mateu de Bages, Salo, riera de Matamargó, 31T CG83, en larves de *Simulium* sp., leg. L. Guàrdia, 15-Mar-01 [Tr0610-0611]. L'Espunyola, riera de Navel, 31T CG95, en larves de *Simulium* sp., leg. L. Guàrdia, 2-Abr-01 [Tr0665]. Campins, torrent de Campins, 31T DG51, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 23-Gen-02 [Tr1235, 01237, 01239].

**CANTABRIA:** Agüera, ríu Cerneja, 30T VN66, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 21-Maig-01 [Tr1398]. Belondio, afluent del ríu Deva, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 30-Set-02 [Tr1588].

**CUENCA:** Beamud, ríu Júcar, 30T WK94, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 1-Oct-01 [Tr1017]. Tragurete, ríu Júcar, 30T WK96, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 1-Oct-01 [Tr1023-1024].



**HUELVA:** La Nava, riu Múrtiga (curs paral·lel), Sierra de Aracena, 29S PC90, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia i S. Santamaria, 5-Nov-03 [Tr1867-1868]; ídem, cap a Encinasola, barranco de la Olla, 29S PC92, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia i S. Santamaria, 5-Nov-03 [Tr1869].

**HUESCA:** Aneto, barranc de Malmarruí o d'Aneto, 31T CH11, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia i Ll. Sáez, 30-Jul-01 [Tr0936].

**GIRONA:** Setcàses, riu Ter, 31T DG59, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia i S. Santamaria, 27-Jun-00 [Tr0131]; ídem, 12-Set-00 [Tr0271]. Espinelves, Mas Joan, riera Major, 31T DG53, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 10-Jul-00 [Tr0133-0134, Tr0136-0138, Tr0140, Tr0142-0143, Tr0145-147].

**GUADALAJARA:** Muriel, riu Sorbe, 30T WM02, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 19-Set-01 [Tr0980-0981].

**JAÉN:** Vadillo-Castril, sèquia paral·lela del riu Guadalquivir (Cazorla), 30S WG38, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia i Ll. Sáez, 12-Jul-01 [Tr0913, Tr0916, Tr0919].

**LLEIDA:** Guils de Cerdanya, riera cap als Llacs de Meranges, 31T DH00, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 13-Jul-00 [Tr0154]. Bolvir de Cerdanya, riera de Bolvir, 31T DG09, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 13-Jul-00 [Tr0165-0166]. Lles de Cerdanya, Viliella, torrent de la Llosa, 31T CG99, en larves de *Simulium* sp., leg. L. Guàrdia, L. Ribes i S. Santamaria, 7-Ago-00 [Tr0197]. Bellver de Cerdanya, l'Inglà de Baix, riu de l'Inglà, 31T CG98, en larves de *Simulium* sp., leg. L. Guàrdia, L. Ribes i S. Santamaria, 9-Ago-00 [Tr0209-0210]. Meranges, prop Refugi de Malniu, rec de Foguerades, 31T DG00, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, L. Ribes i S. Santamaria, 8-Ago-00 [Tr0214]. Guixers, La Casa Nova de Valls, riu Aigua de Valls, 31T CG86, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia i S. Santamaria, 30-Ago-00 [Tr0233]. Vilallonga de Ter, Tregurà de Dalt, riera de Tregurà, 31T DG48, en larves de *Simulium* sp., leg. L. Guàrdia, 12-Set-00 [Tr0264, Tr0266]. Alt Àneu, Isavarre, riu Noguera Pallaresa, 31T CH42, leg. L. Guàrdia, 9-Nov-00 [Tr0404]. Rialp, Barranc Rialp, 31T CH40, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 17-Jun-01 [Tr0842]. Alins, Araós, barranc de Besan, afluent del riu Noguera de Vallferrera, 31T CH51, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 18-Jun-01 [Tr0845]. Vall de Cardós, Estaon, riu d'Estaon, 31T CH51, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 20-Jun-01 [Tr0870-0872]. Espot, Estany Negre (Vall del Peguera), 31T CH41, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 21-Jun-01 [Tr0878-0879]. Sant Joan de Toran, riu Toran, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia i Ll. Sáez, 31-Jul-01 [Tr0946]. Barruera, barranc de Barruera, 31T CH10, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 1-Ago-01 [Tr0959].

**MADRID:** Pinilla del Valle, riu Lozoya, 30T VL32, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 3-Oct-01 [Tr1040-1041]. Sierra de Guadarrama, Arroyo Umbría, 30T VL33, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 3-Oct-01 [Tr1052].

**MURCIA:** El Sabinar, riu Taibilla, 30S WH75, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 13-Maig-03 [Tr1769-1771].

**TARRAGONA:** Vimbodí, Prades, riu Vall de Castellfollit, 31T CF37, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 30-Gen-01 [Tr0460].

**VIZCAYA [BIZKAIA]:** Sarria, riu Zubialde (Parque Nat. Gorbea), 30T WN16, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia i I. Salcedo, 25-Maig-02 [Tr01412]. Guerricaiz, Balcón de Bizkaia, 30T WN39, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 27-Maig-02 [Tr1415]. Bolívar, riera de Bolívar, 30T WN38, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 27-Maig-02 [Tr1417-1421]. Trebuesto, riu Agüera, 30T VN79, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 29-Maig-02 [Tr1429-1431]. Mendata, afluent del riu Golako, Reserva de Urdaibai, 30T WN29, en larves de Simuliidae, leg. L. Guàrdia, 7-

Oct-02 [Tr1638-1639]. Gorozika, affluent del río Golako, 30T WN29, en larves de Simuliidae, leg. L. Gu ardia, 7-Oct-02 [Tr1648-1649].

**OBSERVACIONS.-** Aquesta  s una de les espècies més cosmopolites i freqüents de totes les Harpella's. De les diverses espècies de *Harpella* que han estat descrites, aquesta és la que ha estat més citada arreu (LÉGER & DUBOSCQ, 1929b; LÉGER & GAUTHIER, 1935b; MANIER, 1950, 1970b; TUZET & MANIER, 1955; LICHTWARDT, 1967; MOSS, 1970; FROST & MANIER, 1971; BRASSARD et al., 1971; REICHLER & LICHTWARDT, 1972; CROSBY, 1974; MOSS & LICHTWARDT, 1977). Totes les mostres del gènere *Harpella* que hem recollit poden ésser

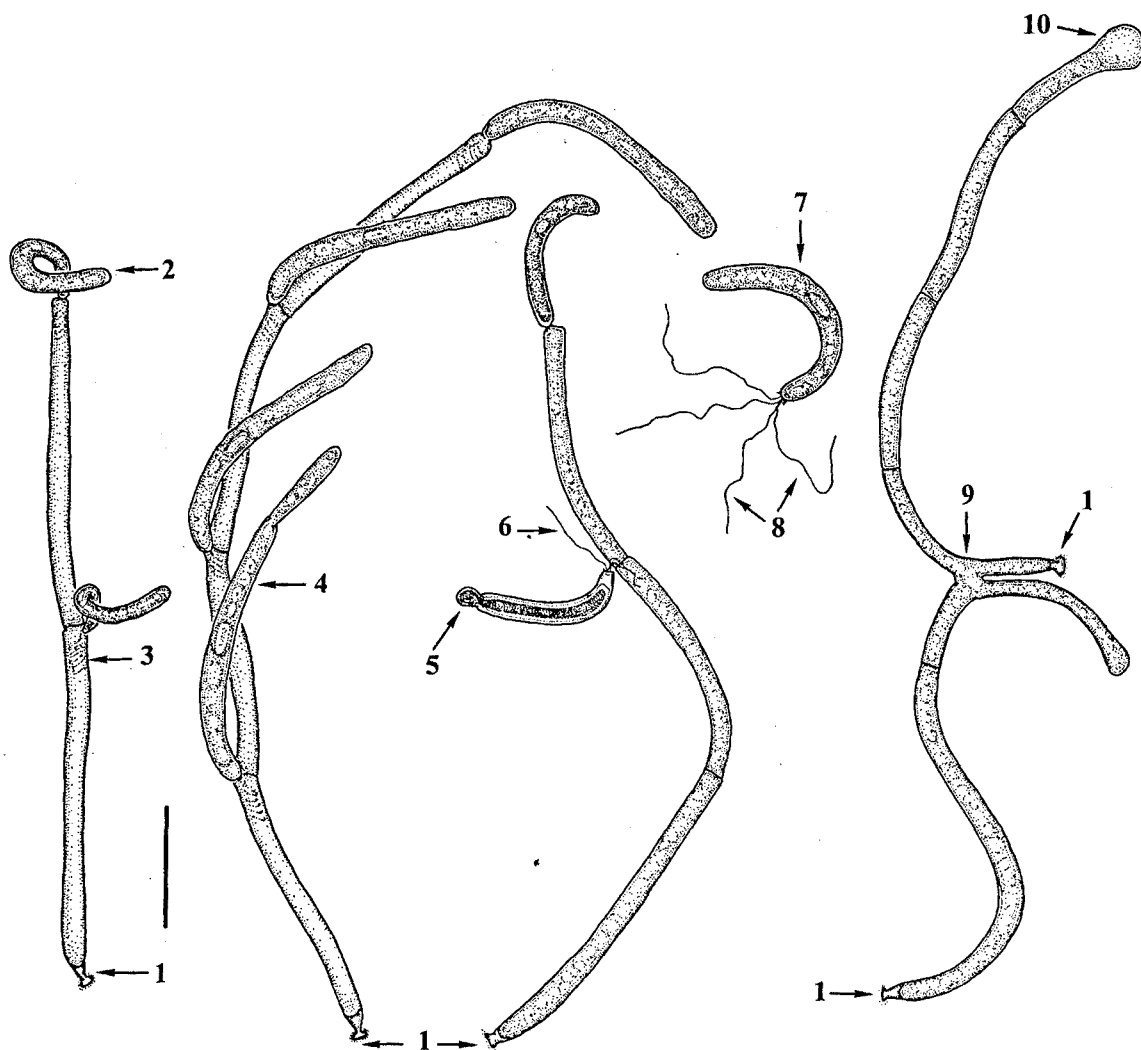


FIG. 38. *Harpella melusinae*. Tal·lus mostrant la diversitat morfològica de les tricòspores. 1, holdfast, sempre de morfologia constant. 2, tricòspora enroscada, en posició terminal. 3, apèndixs de la tricòspora visibles dintre la cèl·lula generativa. 4, tricòspora corbada que comença a germinar per l'extrem distal. 5, tricòspora corbada que inicia la germinació, alhora que es separa de la cèl·lula generativa i deixa veure els apèndixs (6). 7, tricòspora lliure. 8, apèndixs. 9, pont de conjugació entre dos tal·lus. 10, zona engruixida, possiblement degut a la formació d'una zigòspora. Escala = 50 m.

encabides dintre de *H. melusinae*, un tàxon que mostra una variabilitat molt acusada en la mida, i sobretot, disposició de les tricòspores, que poden ser des de quasi rectes fins a enroscades en espiral (FIGS. 39.1, 39.2, 39.4, 39.5, 39.8). Una de les espècies més pròximes a *H. melusinae* és, probablement, *H. leptosa* Lichtw. & Moss, diferenciable de l'anterior per l'ultraestructura de l'apèndix, i pel tal·lus sinuós i acabat en punta dels individus més joves de *H. leptosa*, els quals, en ésser madurs, produeixen tricòspores més petites que les de *H. melusinae* (MOSS & LICHTWARDT, 1980). Nosaltres hem observat tal·lus que, perfectament integrats en els paràmetres descrits per *H. melusinae*, presenten tal variabilitat espòrica que, per algunes de les seves tricòspores, podríem designar algun individu com a *H. leptosa*. No obstant, essent el cas que no podem aplicar estudis microestructurals per a diferenciar cadascun dels individus dubtosos, optem per determinar-los tots com *H. melusinae*, àmpliament estesa pel territori europeu i de reconeguda plasticitat fenotípica.

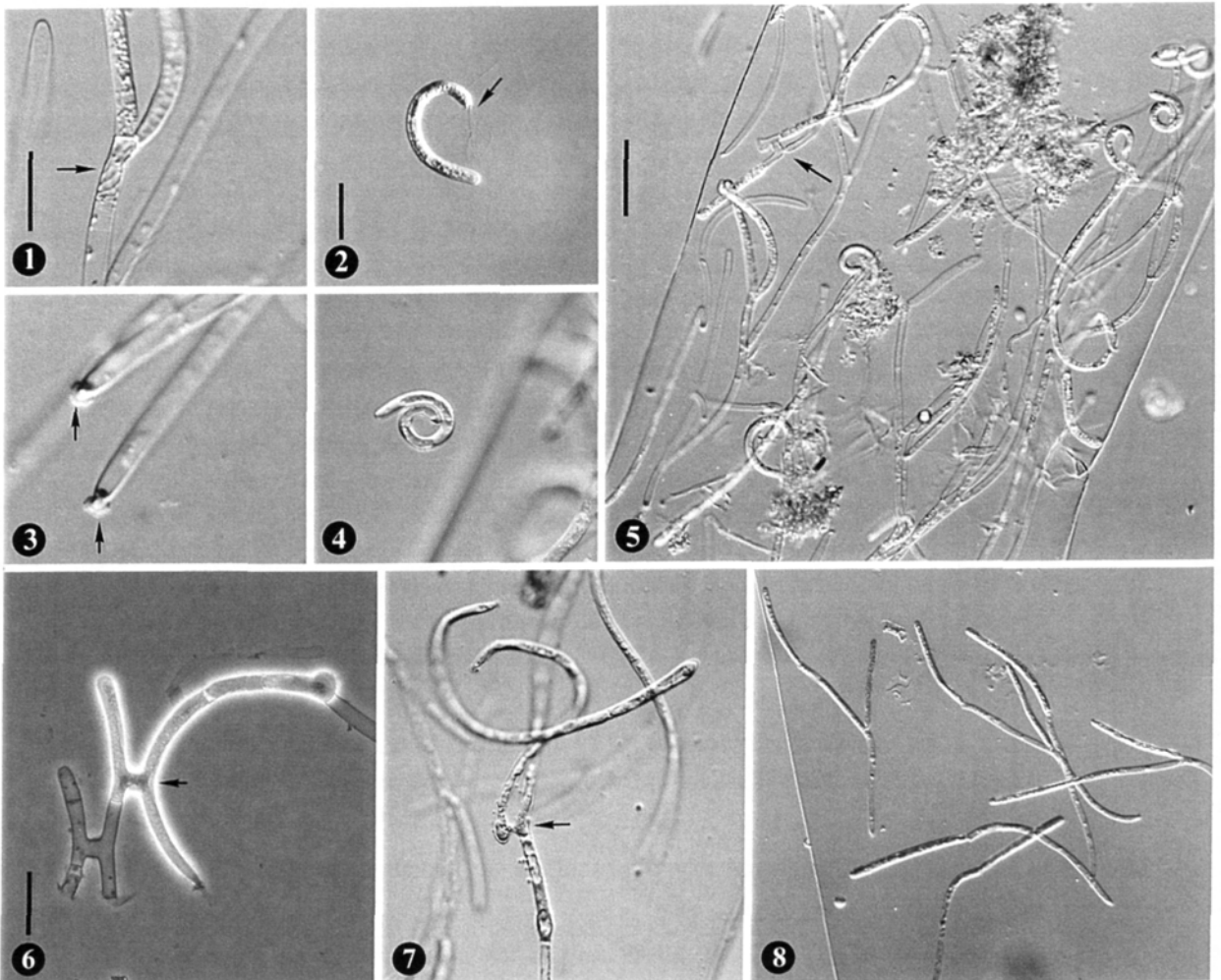


FIG. 39. *Harpella melusinae*. 1, apèndix d'una tricòspora a l'interior de la corresponent cèl·lula generativa [Tr1858]. 2, tricòspora lliure amb apèndix (fletxa) [Tr1792]. 3, holdfasts discoides (fletxes) [Tr1858]. 4, tricòspora fortament enroscada lliure al medi [Tr1858]. 5, diversos tal·lus madurs amb tricòspores, dos d'ells han establert un pont de conjugació (fletxa) [Tr1858]. 6-7, ponts de conjugació (fletxes) [Tr1858, Tr1418]. 8, diversos tal·lus amb tricòspores molt estirades, poc cargolades [Tr0214]. Escales = 25 µm en 1 (la mateixa escala per 1, 3), 2 (la mateixa escala per 2, 4, 7), 6; = 50 µm en 5 (la mateixa escala per 5, 8).

*Harpella meridionalis* Lichtw. & Arenas és també molt similar a *H. melusinae*, tant per caràcters espòrics com tal·lials, essent la principal característica d'aquesta espècie, la formació de tricòspores sensiblement més petites (en diàmetre i llargada) i sempre fortament cargolades (LICHTWARDT & ARENAS, 1996).

En les mostres de *Harpella* trobades hem observat com, en nombroses ocasions, es produeix la germinació de les tricòspores quan aquestes encara estan unides a la corresponent cèl·lula generativa (FIG. 38.5) o bé quan tot just han estat alliberades, sense necessitat d'haver estat consumides prèviament per l'hoste adequat. Les espores que són així alliberades semblen germinar dintre del propi intestí, incrementant la infecció. Això ha estat observat també en algun espècimen d'*Orphella* (FIG. 101.5, veure apartat corresponent), tot i que en aquest gènere l'extrusió pot ocórrer en el medi extern de l'hoste, donada la particularitat en que els extrems dels tal·lus sobresurten per l'anús de l'hoste.