

Taxonomía y biología de los primeros registros de acrásidos en la República Argentina

Eduardo M. Vadell

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; Universidad de Buenos Aires. Lab. 70, 4º piso, Pabellón II. (1428) Ciudad Universitaria. Buenos Aires, República Argentina. Correo electrónico: eduardo.vadell@gmail.com.

Resumen

Se aislaron y estudiaron miembros del Phylum Acrasiomycota y taxones afines de muestras de suelo y varios sustratos extraídos del Parque Nacional Iguazú, Misiones, Argentina, durante cuatro campañas entre 1995 y 2003. Los acrásidos (*s. lat.* Orden Acrasiales) comprende un grupo reducido de organismos que comparten entre sí la naturaleza ameboidea de sus individuos, que generalmente se agregan entre sí. Son aerobios, consumidores de bacterias y partículas de tamaño bacilar; viven en el suelo, heces, cortezas, y otros sustratos. Un taxón afín al grupo tiene importancia médica. Se describen los caracteres taxonómicos de *Acrasis rosea* (Acrasiaceae), *Copromyxa protea* (Copromyxaceae), *Guttulinopsis nivea* (Guttulinaceae), y *Sappinia pedata* (Sappiniaceae) y sus ciclos de vida, aislados de suelos y distintos sustratos. Estos taxones son nuevos registros para la República Argentina. Otras especies amebianas, relacionadas, tanto morfológica como ecológicamente, son descritas con fines comparativos. También se analiza la sistemática del orden, como las características morfológicas, ultraestructurales, biológicas y ecológicas.

Taxonomy and biology of the first records of acrasids from Argentina

Summary

A number of members of the phylum Acrasiomycota (acrasids) and other affinity taxa were isolated and studied from soils and various substrata of Iguazú National Park, Misiones, Argentina, during four expeditions between 1995 and 2003. The acrasids (*s. lat.* Order Acrasiales) include a small group of organisms. Their members share the ameboid nature of their individual cells, commonly aggregating. They are aerobic, bacterial and yeast consumers, living in soils, feces, crusts, among other substrata. An affinity taxon has medical importance. *Acrasis rosea* (Acrasiaceae), *Copromyxa protea* (Copromyxaceae), *Guttulinopsis nivea* (Guttulinaceae), and *Sappinia pedata* (Sappiniaceae), isolated from soils and different substrata are described mostly in their taxonomic characters, as well as their life cycles. These taxa are new records for the Argentine Republic. Other amoebae of similar habitats are mentioned with comparative purposes. Systematic, morphological, ultrastructural, biological and ecological aspects of these organisms are presented in the Introduction and Discussion of this research as a brief revision of the group.

Palabras clave: Acrasiomycota - acrásidos - taxonomía - biología.

Key words: Acrasiomycota - acrasids - taxonomy - biology.

Introducción

Se aislaron y estudiaron miembros de los phyla Acrasiomycota y Dictyosteliomycota (Alexopoulos y col., 1996) procedentes de cuatro campañas llevadas a cabo en agosto de 1995, abril de 1999, noviembre de 2001 y febrero de 2003, en el Parque Nacional Iguazú, Provincia de Misiones, República Argentina (25° 28' S; 56° 1' O). Algunos registros y nuevas especies de la familia Dictyosteliaceae (Dictyosteliomycota) fueron publicados previamente (Vadell y Cavender, 1995; Vadell y Cavender, 2007). Los acrásidos (orden Acrasiales, Acrasiomycota), junto a algunas especies afines (Amebozoa), son grupos de organismos que comparten entre sí la naturaleza ameboidea de sus individuos. Comúnmente forman un cuerpo de fructificación y, salvo excepción, son aerobios de vida libre, fagótrofos de bacterias, levaduras, de otras formas vivas y de partículas de tamaño bacilar; habitan en el suelo, heces y detritos tanto de broza, cortezas, frutos, inflorescencias como de partes florales.

Además de distintos tipos de pseudopodios, de características nucleares y mitocondriales y de una bioquímica de agregación diversa –a veces desconocida– existen entre los acrásidos y los dictiostélidos diferencias remarcables. Mientras que en muchos miembros de Dictyosteliomycota, después del desarrollo del cuerpo de fructificación, se forma un tubo de células muertas de sostén, con una diferenciación celular muy marcada, en los Acrasiomycota el sostén del cuerpo de fructificación está conformado por células vivas totipotentes (Raper, 1984), con escasa o ninguna diferenciación celular. Se estudian aquí las especies encontradas en la Argentina. Se mencionan en este trabajo, con fines comparativos, algunas especies pertenecientes a los géneros *Copromyxa* (Raper y col., 1978), *Fonticula* (Worley y col., 1979) y *Pocheina* (Olive y col., 1983), aún no registradas en suelos argentinos, entre otras formas amebianas más conocidas de implicancia sanitaria.

La clasificación de los acrásidos se basa en cuatro caracteres taxonómicos de importancia: el patrón de formación o sorogénesis, el tipo de sorocarpo, la presencia o la ausencia de células flageladas y el tipo de crestas mitocondriales (laminares para los géneros *Acrasis*, *Pocheina*, *Guttulinopsis* y *Fonticula*; tubulares, para *Copromyxa* y *Copromyxa*) (Blanton, 1990). *Sappinia peddata* comparte algunos caracteres con los acrásidos, protostélidos y dictiostélidos.

Se incluye aquí *Sappinia* a fin de no omitir un taxón relevante, estudiado como un acrárido inferior (Dangeard, 1900), que reviste importancia médica y que comparte el hábitat, al menos en una de sus fases, de la mayoría de los acrásidos y los dictyostélidos, además de constituir una especie históricamente considerada en las primeras clasificaciones.

Raper (1984) consideró y estudió las familias Acrasiaceae (géneros *Acrasis* y *Pocheina*), Copromyxaceae (géneros *Copromyxa* y *Copromyxa*), Guttulinaceae (*Guttulinopsis*) y Fonticulaceae (*Fonticula*) dentro del orden Acrasiales, subclase Acrasidae, clase Acrasiomycetes, división Myxomycota del Reino Mycetozoa. A partir de 1990, según Blanton, estas familias se agrupan directamente dentro del Phylum Acrasiales (que equivale a Acrasiomycota) con 5 géneros y 15 especies.

Se adoptan en este trabajo algunos criterios taxonómicos clásicos de Blanton (1990), Olive (1975) y Raper (1984) de importancia práctica e histórica. Finalmente, se resume los aspectos taxonómico-sistemáticos, biológicos, ultraestructurales y ecológicos. El objetivo de este trabajo es el registro de las especies aisladas de acrásidos y afines de la foresta del Iguazú como nuevos para la Argentina y elaborar un informe sobre las características biológicas y fenoeológicas de los taxones tratados, así como la importancia médica que pueden tener algunas especies amebianas aisladas del suelo.

El ciclo de vida de los acrásidos presenta una fase vegetativa trófica unicelular, una fase pseudoplasmodial y una fase adulta multiesporal (excepto, por lo general, en *Sappinia*). El conjunto de células produce un cuerpo de fructificación. En la fase trófica, las mixamebas tienen comúnmente un solo núcleo y un nucléolo. Las amebas son de tipo “limax” (alargadas, cilíndricas) (Raper, 1984) y se movilizan con rapidez mediante el surgimiento abrupto de pseudopodios, sin subpseudopodios (Blanton, 1990), llamados lobopodios (Raper, 1984). Las mixamebas tienen un extremo romo uridial con una gran vacuola. Las amebas que no se agregan, pueden enquistarse sobre el sustrato como microcistos o quistes: células esféricas de paredes celulares finas (Olive, 1975). Excepto *Guttulinopsis vulgaris*, todos los acrásidos producen microcistos.

Acrasis rosea, descrita por Lindsay Olive y

Stoianovich (1960) junto a *Protostelium mycophaga*, de hábitat semejante, es el único miembro actual del género. Su cuerpo de fructificación consta de un talo o soróforo, con base, que sostiene hileras de esporas, frecuentemente ramificado. En *Copromyxa protea* los cuerpos de fructificación son columnares y solitarios, de 1 a 3 mm de altura, formados por células indistinguibles entre sí. *Guttulinopsis nivea* produce soróforos a partir de la convergencia de mixamebas que forman paquetes no compactos de células sin vacuolas, dentro de una matriz mucilaginosa. *Sappinia pedata* fue descrita en 1896 y, nuevamente, en 1900, como un eslabón intermedio entre acrásidos y mixomicetes (Dangeard, 1900). Su descripción fue incluida en el contexto de los niveles progresivos de complejidad de algunos Mycetozoa (Raper, 1960). Edgard Olive la estudió en 1902, mientras que Linsay Olive, en 1975, la excluyó de los micetozoos.

Materiales y métodos

Muestras

Se muestrearon varios ambientes del "Parque Nacional Cataratas del Iguazú" y sus alrededores; un área de aproximadamente 550 km² donde la temperatura media anual varía de 20 a 21 °C y la media anual de precipitaciones es de 1.700 mm. Cada muestra consistió en 20 gramos de suelo-broza de la superficie en los siguientes sitios: 1. Sendero Macuco. 2. Sendero Yacaratia. 3. Circuitos superior e inferior de las Cataratas del Iguazú. 4. Puerto Canoas, dentro del Parque Nacional. 5. Reserva aborígen Yry-Apú, fuera del Parque Nacional. Se tomaron asimismo, frutos secos, detritos y broza de los distintos senderos. La altura general del terreno sobre el nivel del mar va de 50 a 250 m, con pendientes. La broza varió de escasa (ca. 3 cm) a abundante (ca. 15 cm) anualmente, y en distintos sitios. Los valores de pH promedio del suelo variaron de 5,8 a 6,6 y la razón C/N, de 11,3 a 15,7, en valores medios. El nivel de humedad ambiental cambia mucho de un sitio a otro con el viento, influenciado por las nubes de vapor que produce el cordón de cascadas de casi 3 km de ancho, que conecta la Argentina con Brasil (Vadell, 2003).

La nomenclatura de las plantas vasculares se realizó según Dimitri (1974). Existen unas 2.000 especies vasculares en Iguazú. Entre las especies

arbóreas pueden mencionarse *Aspidosperma polyneuron*, *Parapiptadenia rigida*, *Patagonula americana*, *Cabralea oblongifoliola*, *Inga uruguensis*, *Nectandra megapotamica*, *Ocotea diospyrifolia*, *Lonchocarpus muehlberianus*, *Cedrela fissilis*, *Tabebuia ipe*, *Bastardiopsis densiflora*, *Helietta apiculata*, *Balfourodendron riedelianum*, *Machaerium stipitatum*, *Ocotea diospyrifolia*, *Luehea divaricata*, *Arecastrum romansoffianum*, *Cecropia adenopus*, *Chusquea ramosissima*, *Ficus monkii* y *Chrysophyllum gonacarpum*. Se pueden consultar más datos biogeográficos en Cabrera y Willink (1982).

Cultivos

Las muestras fueron procesadas según el método de dilución y sembrado sobre agar heno descrito por Cavender y Raper (1965a), a fin de obtener clones de distintas amebas sociales. Para obtener diferencialmente *Acrasis rosea* se procedió según el método descrito más adelante. Además, en los casos en que germinaron clones espontáneamente en el agar heno, utilizado comúnmente para los dictiostélidos, se reinoculó *Acrasis* en los medios y condiciones que se describen a continuación.

Acrasis rosea (Olive and Stoianovich, 1960)

El aislamiento y el cultivo de *Acrasis* se obtuvo a partir de restos vegetales o de suelo con heces. Se diluyó y se sumergió el material colectado en agua estéril durante 30 minutos, con agitación. Luego se tomaron alícuotas o pequeños fragmentos que se dejaron secar sobre un agar infusión (0,6 g Na₂HPO₄ y 7 H₂O; 1,5 g KH₂PO₄; 8 g de heno de *Poa pratensis* seca; 15 g "Bacto-Agar" comercial en 1 L H₂O destilada; autoclave: 15 min a 121 °C, (Cavender y Raper, 1965 modificado). A los 3-5 días se transfirieron esporas o sorocarpos a un medio enriquecido de agar-maíz (17 g/l), dextrosa (2 g/l) y extracto de levadura (1 g/l) (Olive, 1975), a 20-24 °C. Los sustratos alimenticios para el cultivo *in vitro* incluyeron mezclas de levaduras y bacterias (Weitzman, 1962; Blanton, 1990; Olive, 1975). En distintos cultivos se alimentó a las mixamebas de *A. rosea* en el laboratorio con las levaduras *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula anomala* y con bacterias como *Flavobacterium* sp y *Escherichia coli* en asociación con *H. anomala*, entre otras levaduras. Es interesante consultar el trabajo de Olive y col. (1961) sobre el

tipo efímero de recombinación en cepas de *A. rosea* evidenciados por experiencias con la dieta alimentaria. Las cepas se mantuvieron en el medio de Blanton (1990).

Guttulinopsis nivea (Olive, 1901)

Se la cultivó con *Escherichia coli* sobre agar-agua al 1%; crece con rapidez en un medio con 1,25 g de extracto de levadura, 1,25 g de triptona, 0,25 g de dextrosa, 0,25 g de K_2HPO_4 por litro de H_2O a 20-25 °C, a partir de alícuotas de suspensión de suelo en agua, 1:25 (adaptado de Raper, 1984). Puede utilizarse alternativamente, *Klebsiella pneumoniae* o *Aerobacter aerogenes*.

Copromyxa protea

Cultivada con *Rhodotorula rubra* y *Escherichia coli* sobre agar infusión al 2%, a 25 °C. Se sembraron alícuotas de suspensión de suelo en agua, 1: 25.

Sappinia pedata (Dangeard, 1900)

Cultivada con *E. coli* y *R. rubra* sobre agar-agua al 2% y agar-heno 1-2% a 24-27 °C. Se sembraron alícuotas de suspensión de suelo en agua, 1:25. El medio de mantenimiento de Blanton (1990) para *Sappinia* es: 0,02 g de extracto de malta, 0,02 g de extracto de levadura, 0,76 g de K_2HPO_4 , 15 g de agar, por litro de agua.

Sappinia también puede crecer en medio de agar heno o agar-agua, levemente enriquecido con 0,05 g lactosa y 0,05 g peptona.

Técnicas de observación

El estudio morfológico se realizó con una lupa óptica binocular Reichert (Austria 257566), un microscopio de contraste de fase compuesto marca Zeiss Germany (Axioscope). Las mixamebas, las esporas, los cistos y los soróforos fueron suspendidos en la solución salina de Bonner (1947) para las medidas microscópicas. Para las observaciones bajo la lupa se utilizaron los cultivos en sus medios primarios y secundarios, como se describió.

Resultados

Taxonomía y biología

Familia Acrasiaceae

- *Acrasis rosea* L.S. Olive and Stoianovich 1960, Bull. Torrey Bot. Club 87: 1-20.

Cuerpo de fructificación arborescente, con ramas de esporas encadenadas, no mayor a 0,9 mm en altura (Figura 1 D), simple, monoseriada (Figura 1 C) a ramificada (Figuras 1 D; E; 2), a veces en racimos (Figura 1 E). Esporas esféricas, anaranjadas, de 10 a 20 μm o menores, adheridas en forma uniseriada a un soróforo o tubo de sostén celular multi o uniseriado (Figuras 1 G; 2), recubierto de una vaina continua. Células pigmentadas y viables para germinar; las del talo ligeramente poliédricas y con grandes lagunas intercelulares. Las mixamebas emergen de aperturas longitudinales en las esporas; coloración rosada. Las mixamebas tróficas miden entre 20 y 30 μm (Figura 1 F). Pseudoplasmodios rosados a anaranjados intensos.

Tipo

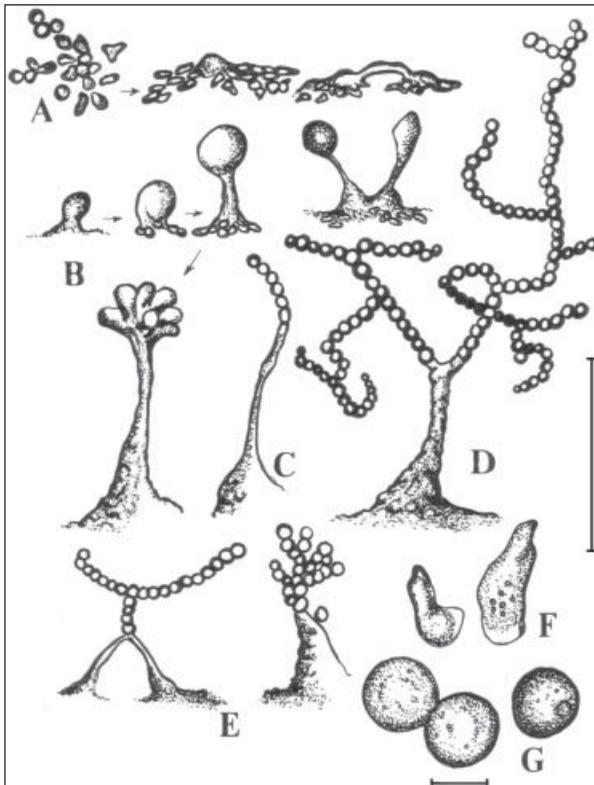
E. F. Haskins Mya-3364, congelado (ATCC). Medio de cultivo: ATCC 2472; temp. 20,0 °C. (EE.UU., Barbados, Hasting: , 1978).

Especímenes representativos examinados

EE.UU. (Ohio, Athens) mayo 1990, Cavender s/n (cultivo fructificado). Id. New Jersey, Princeton, abril 1991, Cavender s/n. (cultivo fructificado). Argentina (Misiones: Iguazú, Reserva aborigen Yry-Apú, marzo 2003, Vadell N° RA19-03 (cultivo).

Hábitat y distribución

En la Argentina se han aislado colonias a partir de broza y frutos de distintos árboles y arbustos, desprendidos o no de sus plantas madres, de Iguazú recogidos del suelo, en medios en que crecen las levaduras autóctonas de los frutos de origen, cultivadas a 20-24 °C. Puede aislarse a partir de heces de distintos animales como monos, perros, roedores y caballos, entre otros sustratos (Olive, 1975). Se la ha hallado también en la hojarasca seca de los bosques de Avon, Wisconsin, EE.UU. (Cavender y Raper, 1965a), en inflorescencias secas de *Fragmites* sp (Raper, 1984) y en los frutos de *Cissus canadiensis* de los bosques implantados del Condado de Athens, Ohio, entre otras partes florales y sitios del hemisferio norte (Cavender, com. pers. 2003). La distribución de la especie abarca desde los trópicos y subtropicos hasta regiones templadas del hemisferio norte (Olive, 1975), probable cosmopolita (Raper, 1984). En el hemisferio sur de América, en las selvas subtropicales del Iguazú y, presumiblemente, en toda la selva atlántica del dominio amazónico.

Figura 1.- Caracteres de *Acrasis rosea*

A Agregación (secuencia: células preagregativas a la izquierda, agregadas al centro, y una alternativa entre dos agregaciones a la extrema derecha, que culmina en el cuerpo fructífero representado en E).

B Secuencia del desarrollo de un sorógeno que formará esporas multiseriadas.

C Talo y formación de un cuerpo fructífero monoseriado.

D Cuerpo fructífero maduro típico, multiseriado y ramificado.

E Cuerpos fructíferos inmaduros; bifurcado (izquierda) y en racimo (derecha).

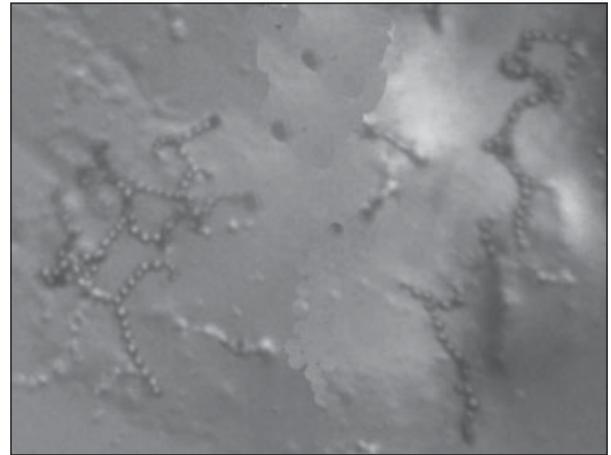
F Mixamebas con extremo uridial romo.

G Esporas esféricas con algunas granulaciones; una con hilio.

Barras: A, B, C, D, E = 200 μm C, F, G = 10 μm
(Dibujo del natural del autor)

Observaciones

Durante el desarrollo las células se agregan en cúmulos (Figura 1 A) o en forma aislada formando un pseudoplasmodio anaranjado intenso, como lo han observado también Olive y Stoianovich (1960) y L. Olive (1975). La sorogénesis continúa con la síntesis de una vaina que recubre toda la estructura, llamada ahora sorógeno, que puede

Figura 2.- Fotomicrografías de un medio donde ha crecido *Acrasis rosea*

Distintos estados de desarrollo y hábitos: monoseriado y multiseriado (x 120).

(Fotografía del autor)

subdividirse y formar pequeños sorógenos que se elevan hacia la mitad del eje primario a medida que las células conforman el tubo de sostén (Figura 1 B). En cuanto al tubo está formado las células del sorógeno, que aún son ameboideas, comienzan a evaginarse hacia arriba y a formar lóbulos celulares uniseriados (Figura 1 C) y en forma digitada (Figura 1 B). Yu Akulov y Leontiev, de la Universidad de Ucrania, remitieron al autor en 2001 excelentes fotografías de este estado en *A. rosea*. Las ramificaciones son posibles mientras las células estén dentro de la vaina y mientras esta esté intacta. Una vez que las ramificaciones o los ejes están conformados en filas de células, cada una de estas comienza a producir una pared y a circularizarse, y se convierten en una espora esférica. La vaina se evanesce solo en las ramificaciones con esporas encadenadas, pero los puntos de contacto entre las esporas retienen restos de la vaina. El talo permanece con vaina (Blanton, 1990). La germinación de cada espora ocurre tanto en agua como sobre el agar, en aproximadamente 1-2 horas y las nuevas amebas comienzan a fagocitar microorganismos (la levadura *Rhodotorula rubra* u otra) al tiempo que la población crece por bipartición celular. No se ha demostrado que la agregación de amebas se deba a quimiotaxismo. La conservación de cepas de *Acrasis rosea* se hace en sílica gel como agente

preservante (Rehinaradt, 1966), pero no fue posible preservar la cepa de Iguazú.

Familia Copromyxaceae

- *Copromyxa protea* (Fayod) Zopf (1885), Die Pilzthiere oder Schleimpilze. Encykl. Naturwiss.3: 1-174.

Cuerpos fructíferos de hasta 3 mm, en diferentes direcciones, a veces ramificados, en un mismo cultivo. Cuando son ramificados, presentan ramas cónicas, de bases ensanchadas por la gran producción de mucílago; irregulares y variables en longitud y curvatura, efímeros (Figuras 3.3 F; 4 B). Sorocistos subesféricos a irregulares, sin hilio, de 4 μm , hasta 5-9 μm de diámetro (Figura 3.3 C). Sorógenos asincrónicos multiformes, a veces bífidos (Figura 3.3 B). Coloración ocre-marrón en todos los cultivos de cierta antigüedad (Vadell, 2003), el resto de los caracteres son típicos de la especie descrita por Fayod (1883).

Tipo

No designado. No existe material biológico tipo. Dibujos y descripción original de Zopf (1885).

Especímenes representativos examinados

Alemania, Tübingen, julio 1998, Vadell N° RK1, BAFC 51165, Plant material (cultivo leg. R. Kirschner, de heces de coleóptero, preservado en seco). Argentina, (Misiones, Parque Nacional Iguazú, circuito superior), abril 1999, Vadell N° CS13-A99 (cultivo).

Hábitat y distribución

Presuntamente ubicuo en suelos templados, tropicales y subtropicales donde abundan herbívoros, aunque raramente aislado. Detritos vegetales de hojarasca y suelo contaminado con heces de animales herbívoros.

Observaciones

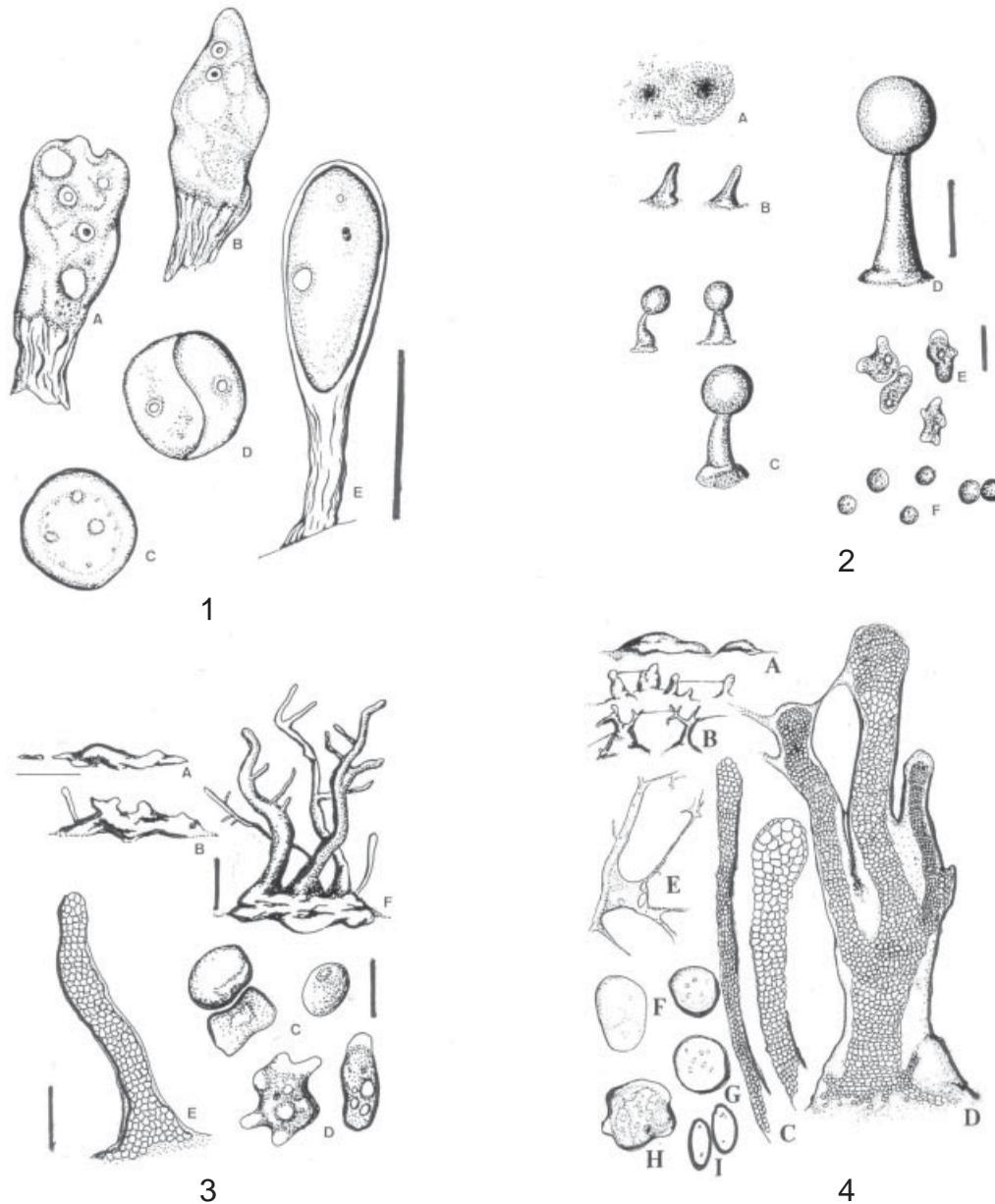
En *Copromyxa protea* los soróforos y las ramas tienen la misma composición celular con varias hileras de sorocistos; las mixamebas miden entre 25 y 35 μm , generalmente uninucleadas (Figura 3.3 D), con un nucléolo central y con una o varias vacuolas contráctiles (Raper, 1984). Los microcistos son indistinguibles de los sorocistos (Figura 4 A). Las agregaciones se forman a partir de una célula cen-

tral (Blanton, 1990). Las mixamebas en el estado trófico son de forma alargada y las esporas, en el estado de fructificación, son de ovals a oblongas, hasta triangulariformes (Fayod, 1883). La figura 3.3 C; D y la figura 3.4 F; G; H; I muestran los tipos celulares; la figura 3.3 E y la figura 3.4 D muestran la disposición de las células en el cuerpo fructífero. Las agregaciones son pequeñas entre los 23 y 25 °C (Figuras 3.3; 3.4 A). Las células apicales son levemente pequeñas y formadas (Figura 3.4 I). Otra cepa estudiada de *Copromyxa*, levemente distinta de la de Iguazú, fue hallada en bosques del centro norte de Europa, aislada de un coleóptero lignícola en 1998 por Roland Kirschner, en la Universidad de Tubinga, Alemania, que fue remitida al autor para su estudio. Resultó presentar algunas diferencias respecto a la cepa de Iguazú que probablemente representen una variedad de *C. protea*: un mucílago conector entre los cuerpos fructíferos (Figura 3.4 B; C). La cepa de R. Kirschner (fotografiada y dibujada), (Figura 3.4), no pudo preservarse por liofilizado (Vadell, 2003). Cultivos secundarios fueron remitidos a James C. Cavender, Richard Blanton y Frederick Spiegel, este último investigador opinó que la cepa de R. Kirschner no difería substancialmente de la especie de Fayod (Spiegel, com. pers. 2006).

Familia Guttulinaceae

- *Guttulinopsis nivea* Raper, Worley y D. Kessler, *Mycologia* 69: 1016-1030 (1977).

Cuerpos fructíferos solitarios, erectos, levemente inclinados, de 0,15-0,5 mm de altura (Figura 3.2 D; C). Soros blancos, grandes, de 175-300 μm (Figura 4 D). Esporas esféricas a oblongas o subglobosas, a veces con granulaciones, irregulares, generalmente de 5-7,5 μm diámetro, o más pequeñas, de 4 a 6 μm diámetro (Figura 3.2 F), en mucílago. Soróforos cónicos y amplios. Bases pseudodiscoides y expandidas, que puede superar 100 μm de diámetro (Figura 4 C); construidas con células no diferenciadas de disposición laxa y con grandes vacuolas (Figura 3.2 E). Amebas post-agregativas conforman un tubo laxo dentro de una matriz mucilaginosa, que luego secretan una vaina membranosa. Las mixamebas agregadas ascienden por este tubo membranoso hasta madurar en esporas y se ubican en la matriz del soro (Figura 3.2 A; B).

Figura 3.- Taxones afines a *Acrasis*

3.1. Caracteres de *Sappinia pedata*. **A.** célula trófica, **B.** ameba migrante binucleada con formación de manto estriado, **C.** cisto unicelular, **D.** cisto bicelular, **E.** pseudoespora con formación de pedicelo.

Barra: A = 30 μ m.

3.2. Caracteres de *Guttulinopsis nivea*. **A.** agregación, **B.** secuencia del desarrollo del cuerpo fructífero que culmina en **C.** cuerpo fructífero maduro de base ensanchada, **E.** mixamebas lobosas con grandes vacuolas, **F.** Esporas esféricas.

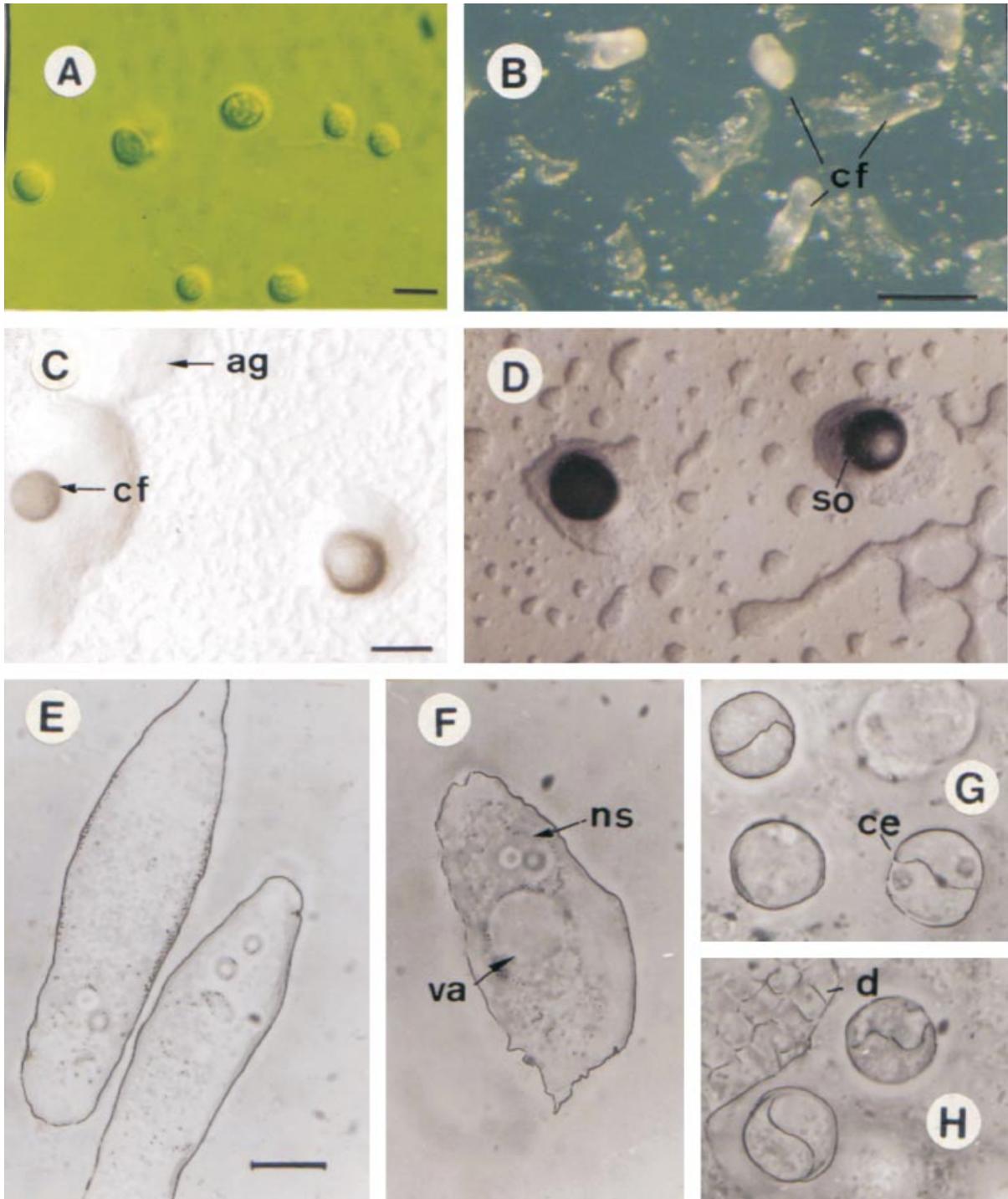
Barras: A = 100 μ m; B y D = 250 μ m; E y F = 10 μ m.

3.3. Caracteres de *Copromyxa protea* (cepa Iguazú). **A.** agregación, **B.** sorógenos tempranos y tardíos asincrónicos, **C.** células ameboides del cuerpo fructífero, **D.** células tróficas, **F.** cuerpos fructíferos.

Barras: A, B y F = 200 μ m; C y D = 15 μ m; E = 50 μ m.

3.4. Caracteres de *Copromyxa protea* (cepa de Kirschner). **A.** agregaciones, **B.** sorógenos conectados por músculo (E), **F** y **G.** células del cuerpo fructífero, **H.** mixameba trófica, **I.** células del ápice. Escalas igual que figuras 3. 3.3.

(Dibujos del natural del autor)

Figura 4.- Caracteres microscópicos de algunos taxones de Amebozoa

Fotomicrografías. **A, B.** *Copromyxa protea*. **A.** esporas y cistos, **B.** cuerpos fructíferos (cf) poco ramificados. **C, D.** *Guttulinopsis nivea*. **C.** cuerpo fructífero (cf) y agregación (ag) (barra: 200 μm), **D.** soros (so) que por efecto de la luz parecen oscuros. **E, H.** *Sappinia pedata*. **E.** dos amebas post-tróficas binucleadas en traslación, **F.** ameba formando su manto con gran vacuola (va) y núcleos muy próximos con nucleolos centrales y grandes (ns), **G.** cistos bicelulares mononucleados (ce) y unicelulares (izquierda), **F.** cistos esféricos bicelulares, que forman “S” en la observación con microscopio óptico. A la izquierda parte de un soróforo de un dictiostélido (barra 10 μm). (Fotografías del autor)

Tipo

No designado. La especie fue primeramente descrita como un miembro del género *Guttulina*, basado en un aislamiento a partir de heces de mono colectados por Dietrich Kessler en 1958 (Raper, 1984). La sepa descrita previamente concuerda con las descripciones de los aislamientos de Raper de las colecciones de suelo de Kessler y con los registros fotográficos de Raper y col., (1977) y de Raper (1984), y con los especímenes previamente estudiados.

Especímenes representativos examinados

Guatemala, Petén, Tikal: , 1989, Cavender s/n, (cultivo). Guatemala, Petén, Tikal, diciembre 1990, Holmes N° HGT3, OH 535 KBR. Id. Petén, Tikal: , diciembre 1991, Vadell No TK15-91, OH 613 KBR; Belice, 1992, Swanson s/n. Argentina, Misiones, Parque Nacional Iguazú, Puerto Canoas, septiembre 1995, Vadell N° IG45-95, 902 BAFC. Id. Parque Nacional Iguazú, sendero Yacaratia, septiembre 1995, Vadell s/n (cultivo en vivo).

Hábitat y distribución

Suelos de bosques y selvas tropicales y subtropicales, suelos fértiles con heces de animales de Panamá y México (Kessler y Raper, 1960; Cavender y Raper, 1968); Guatemala (Holmes, 1991; Vadell, 1993). También en el sudeste asiático (Cavender, 1976), en las selvas del norte de Perú (Cavender, com. pers. 2003) y en Belice (Swanson, com. pers., 1992).

Observaciones

Varias cepas fueron halladas en los trópicos y subtropicos americanos del hemisferio norte, sin apreciarse una variabilidad digna de mención (Raper, 1984). Algunas cepas fueron aisladas a partir de broza-suelo contaminado con heces en las selvas de Tikal, Petén, Guatemala, entre 1988 y 1993, en las selvas de Panamá en 1960 y 1968 y en las del sudeste asiático en 1976, entre otros ambientes, determinada entonces como *Guttulina nivea*. Es especialmente abundante durante los períodos secos en Tikal, Guatemala (Holmes, 1991). Aislada en Belice y Perú (Swanson, 1992; Cavender 2003, com. pers.) y en la selva atlántica del Distrito Paranaense de Iguazú, Misiones, Argentina; está presente en sustratos semejantes, con drásticos cambios de los niveles hídricos del suelo (Vadell, 2003). Las heces de monos son sustratos hallables en estas selvas. Se la aísla

utilizando el método de Cavender y Raper (1965a). Cultivada sobre medio enriquecido, las mixamebas se alimentan con bacterias por fagocitosis, cambiando de forma y dirección con rapidez. Los cuerpos fructíferos pueden presentarse a veces sésiles. El cultivo fructifica entre 12 y 24 horas a partir del inóculo. Su permanencia es efímera, no supera los 3 ó 4 días a 23-25 °C (Vadell, 2003). Aun cuando puede fructificar bien, se diferencian dos tipos de células, sobre un medio no nutritivo (agar-agua), el mejor medio es el indicado por Raper (1984), ya descrito, donde el crecimiento de la bacteria está en equilibrio con el crecimiento de las mixamebas a 24 °C. Las cepas se desarrollan también preferentemente en un medio que contenga suelo fértil y heces de diversos animales y tienen un amplio margen de temperaturas subóptimas de crecimiento (Vadell, 1993). El género fue descrito por primera vez por Edgard Olive en 1901. Se mencionan cinco especies para este género, aunque Raper reconoce dos, *G. nivea* y *G. vulgaris*. La última difiere de la primera en que tiene mixamebas más pequeñas, entre otras diferencias (Raper 1984). Las esporas de *G. vulgaris* son ligeramente mayores (2,6-7,8 por 3,9-9,2 µm) a las de *G. nivea* (L. S. Olive, 1965). Asimismo, la forma cónica ampliada hacia la base del soróforo de *G. nivea* la distingue fácilmente de la otra especie.

Familia Sappiniaceae

- *Sappinia pedata* Dangeard, 1896, *Le Botaniste* 5: 1-20.

Amebas solitarias, grandes, ovaladas, 30-60 µm de largo, con pocos pseudópodos lobulados y generalmente con dos núcleos de 2-4 µm, de refracción diferencial a la observación microscópica con contraste de fase; cuando se encuentran en estado trófico están muy cercanas entre sí (Figuras 3.1 A; B; 4 E; F; 5). Cada núcleo presenta un nucléolo grande, de posición central. Ectoplasma hialino y endoplasma claramente diferenciable (Figuras 4 E; F; 5). Al término del estado trófico, las amebas se alargan y adquieren su mayor tamaño (valores medios, 51,8 por 19,2 µm) (Figura 4 E). Existe un acoplamiento de dos células que transfieren material citoplasmático, y luego enquistamiento señalado por una línea divisoria en forma de "S" (Figuras 3.1 D; 4 G; H). La ameba trófica produce secreción ectoplásmica con membrana rugosa en su superficie, estriada en

sentido longitudinal (Figuras 3.1 A; B). Alternativamente, las amebas individuales forman un pedicelo de sostén acelular, que se condensa, a partir de la secreción que se fija desde su extremo distal a un sustrato sólido o semisólido (Figura 3.1 E). Pueden agregarse en pequeños grupos. Se forma una pseudoespora cuando el pie se ha fijado (Figura 4 C). El cisto es uninucleado y vesicular con nucléolos grandes y periféricos (Figuras 3.1 C; 4 G).

Tipo. (Descripción y dibujos de Dangeard, 1896, 1900)

Especímenes representativos examinados

Argentina. Misiones, Parque Nacional Iguazú, Circuito superior, abril 2001, Vadell N° IG69-01, 1042B BACF e IG78-01, 51172B BACF. Id. Parque Nacional Iguazú, Reserva aborigen Yry-Apú, abril 2001, Vadell N° RA13-01 (cultivo), Id. Parque Nacional Iguazú, sendero Macuco, abril 2001, Vadell N° M59-01, BACF 930B. Id., Parque Regional Iguazú, Reserva aborigen Yry-Apú, enero 2003, Vadell N° YA37-03, 708B BACF.

Figura 5.- Fotomicrografía de contraste de fase de dos amebas migrantes de *Sappinia pedata* (1000 x)



Hábitat y distribución

Probable cosmopolita en subtropicales y zonas templadas. Suelos, aguas y broza contaminados con heces de herbívoros de Iguazú, Misiones, en cuatro sitios distintos (rango de pH de 5,25 a 5,75). En dos oportunidades asociado a *Dictyostelium brevicaulis* Olive, 1901 (Vadell y Cavender, 2006a) y a *Dictyostelium* sp A BACF 708 (Vadell, 2003).

Observaciones

Sappinia pedata puede presentar grandes núcleos vesiculados con nucléolos múltiples y periféricos, como en *Amoeba terricola*. La forma pedicelada es una condición previa al estado de descanso, en que se forman la pseudoespora (Raper, 1960). En los registros de Iguazú, migran hacia la periferia de los cultivos a 7-10 días de inoculados entre los 25 y 27 °C. Pueden o no agregarse en cúmulos de 3 a 6 amebas. El pedúnculo rugoso-estriado tiene una longitud media de 16,2 µm, y no superan con la pseudoespora los 100 µm de altura sobre el sustrato (Figura 3.1 E), en general de 60 a 70 µm. En *S. pedata* existen formas pequeñas en que los núcleos son difícilmente visibles, y se hallan cercanas al punto de siembra del clon; estas amebas se hallaron migrando en sorocarpos de dictiostélidos (en cultivos mixtos). Los cistos bicelulares y uninucleados (Figura 4 H) también fueron observados en las cercanías de las bases de algunos dictiostélidos pequeños (Vadell, 2003). Esta cepa no resistió el proceso de liofilización.

Discusión

Sistemática

van Tieghem (1880) describió en términos generales a *Acrasis granulata* en 1880, especie que no ha vuelto a ser aislada, y creó el orden Acrasieae, donde también ubicó a *Copromyxa protea* (Fayod) Zopt (1885) y a *Dictyostelium mucoroides* Brefeld, 1869. Las clasificaciones antiguas y más actualizadas, que incluyen a estos y otros taxones responden a filogenias parcialmente conocidas o ignoradas, lo que permite la inclusión de formas *incertae sedis* para su estudio (Vadell, 2003). Los Acrasiomycota (Alexopoulos y col., 1996) son de origen polifilético como lo sugieren las evidencias ultraestructurales (Erdos y Raper, 1978) y moleculares. La sistemática actual es aún controvertida. Los acrásidos pueden ubicarse dentro del Phylum Rhizopoda (Blanton,

1990) con excepción a *Guttulinopsis* que no reúne todos sus caracteres (Erdos y Raper, 1978).

Los miembros de la subclase Acrasidae (*sensu* Raper, 1960) son diferentes de otros organismos. Roger y col. (1996) los clasifican como protistas, clase Heterolobosea y encuentran un vínculo entre *Acrasis rosea* y *Naegleria andersoni* (Schizopyrenida), sugerido anteriormente por Page (1978) y Page y Blanton (1985), separando a *Acrasis* y *Naegleria* de los Metazoarios (como *Dictyostelium discoideum*). Al menos una especie de *Naegleria* (*N. fowleri*) y otra de *Sappinia* (*S. diploidea*) son patógenas humanas. Blanton (1990) y Alexopoulos y col. (1996), emplazan a *Guttulinopsis* independientemente de la familia Dictyosteliaceae, pero compartiendo los patrones de desarrollo parecidos, el mismo hábitat y dentro de una misma trama trófica. El criterio utilizado para ubicar a *Guttulinopsis* dentro de la familia Acrasidae fue el comportamiento de las amebas libres que luego de un estado postvegetativo producían una agregación para formar comunidades de células que se desarrollan en fructificaciones multicelulares de construcción relativamente simple (Olive, 1901; Raper y col., 1977).

Algunos autores ubican a *Sappinia*, junto con otras amebas del suelo, como *Hartmannella* (Ray y Hayes, 1954) en el Phylum Rhizopoda *sensu* Schuster (1990). Existen otras amebas de caracteres comparables, algunas estudiadas desde principios del siglo XX, como *Amoeba binucleata*, *A. verucosa*. *S. pedata* fue investigada por Cook e Iveney (1939) y su determinación como entidad taxonómica, obtenible a partir de heces y detritos, es indubitable. Se la ha clasificado dentro de la familia Amoebidae Bronn, orden Amoebida Ehrenberg, subclase Rhizopoda Siebold, clase Sarcodina Hertwig and Lesser (Kudo, 1966) (Amebozoa). Smirnov y Brown la incluyen, junto con *Acrasis*, *Guttulinopsis*, *Hartmannella* y *Pocheina*, dentro de Gymnamoebae, y la ubican en Thecamoebidae, siguiendo el criterio de Scaeffler de 1926 (Smirnov y Brown, 2004). *S. diploidea* (Hartmann y Nagel, 1908) Alexeieff, 1912, responde a caracteres semejantes a *S. pedata*. Se considera a veces *S. pedata* como *nomine dubius* (Kirk y col., 2001). Smirnov (com. pers., 2004) opina que *S. diploidea* y *S. pedata* probablemente sean sinónimos. *S. diploidea* también tiene importancia médica, y su identidad taxonómica reviste máxima relevancia.

Biología y ultraestructura

Las observaciones de van Tieghen, Ciencowsky,

Dangeard, Zopf, Raper, Lindsay Olive y Stoianovich, entre otros, que han trabajado exhaustivamente en estos grupos, son meticulosas y mantienen actualidad.

En *Acrasis rosea* las esporas tienen hilos o areolas (Olive, 1975) que marcan los puntos de contacto entre ellas (Blanton, 1981), carácter ultramicroscópico de gran importancia taxonómica (Figura 1 E). Este organismo responde a las variaciones de luz (Rehinaradt y Mancinelli, 1968) y contiene una alta proporción del pigmento xantofila-toruleno respecto de otros (Fuller y Rakatansky, 1966). Los lapsos de oscuridad mínimos requeridos son de 8 horas para formar las fructificaciones y el espectro de luz azul es el más efectivo para estimular este desarrollo en el laboratorio (Rehinaradt, 1968). La ultraestructura de *A. rosea* muestra que los núcleos son complejos, con cuerpos granulares y laminares (Hohl y Hamamoto, 1969), de carácter vesicular, con un nucléolo central. El núcleo se desintegra durante la profase y la membrana nuclear permanece intacta durante la anafase; se abre luego en el área de los haces entre los núcleos hijos. Estos haces llegan a las cercanías de los polos de la célula. Los centríolos están ausentes (Page y Blanton, 1985), así como el aparato de Golgi. Las mitocondrias tienen crestas lobuladas, rodeadas de retículo endoplasmático rugoso y con granulaciones. En las células sorogénicas se observan manojos de filamentos en algunos pseudopodios (Hohl y Hamamoto, 1968), filamentos de actina que en las amebas de esta especie se proyectan desde el endoplasma-ectoplasma hacia el pseudopodio, dirigiendo su extensión (Hellsten y Ross, 1998).

En *Copromyxa protea* se estudiaron dos tipos distintos de cistos o sorocistos, unos pigmentados y rugosos llamados esferocistos, y otros propiamente sorocistos sin pigmentar: los tipos sexuales se reconocen por los esferocistos marrones, más regulares que los sorocistos y con superficie rugosa (Spiegel y Olive, 1978).

En *Guttulinopsis vulgaris* se destaca la presencia de fibras intranucleares; se diferencian de *G. nivea* por su ultraestructura. Ambas especies se relacionan estrechamente por la producción de microcuerpos en el espacio perinuclear, así como por las paredes celulares bilaminares (carácter que, entre otros, aparta a este género de *Acrasis*) y un citoplasma denso (Erdos y Raper, 1978). Los haces de microfilamentos estriados, hallados también en *Guttulinopsis* y posibles complejos proteína-

glucopolisacáridos, existen en algunas especies de hongos superiores de los géneros *Russula* y *Pleiochaeta*. En *Guttulinopsis* existen microfilamentos de una proteína-colágeno similar a la hallada en foraminíferos (*Halishsema* y *Gromia*) y en un protozoario (*Paramecium*), lo que sugiere la posibilidad de emplazar a *Guttulinopsis* en un nuevo orden (Erdos y Raper, 1978).

Sappinia pedata, en los términos de microscopía óptica de Dangeard (1896, 1900), está perfectamente definida y descrita y se representa según lo observado, en la figura 1 A- E, y en las fotomicrografías de las figuras 4 E; F; G; H; 5.

Otra especie, *Sappinia diploidea*, tiene núcleos y citoplasmas que se fusionan. En *Sappinia* sp, en el nivel ultramicroscópico se define un firme manto o glycocalix. El pie acelular resultante es el sostén de la pseudoespora, a diferencia de las otras formas en que los sostenes son celulares.

En géneros como *Protostelium* y *Acytostelium*, entre otras especies, de grupos distintos y distantes filogenéticamente, pasa otro tanto con sostenes acelulares, lo que sugiere una secuencia génica definida para cada grupo, para este carácter.

El quiste sexual, luego de la emisión de cuerpos reduccionales, vuelve a ser binucleado, pero a diferencia de *S. pedata* no forma secreción peduncular de sostén (Goodfellow y col., 1974). *S. diploidea* forma cistos a partir de dos amebas binucleadas puestas en contacto y secretan una envoltura quística (Kudo, 1966). Sus trofozoitos (amebas), capaces de consumir células sanguíneas, fueron reconocidos en tejido encefálico. Los dos núcleos, teñidos con Giemsa y ácido de Schiff, estaban estrechamente conectados por filamentos perpendiculares bien distinguibles (Gelman y col., 2003). Queda por comprobar si la formación del pedúnculo de sostén en *S. pedata* no se da en *S. diploidea*, entre otras diferencias, y si estos caracteres requieren de secuencias específicas de ADN propias de una u otra especie.

Ecología e importancia

La dispersión de esporas en *Acrasis rosea* se produce por leves movimientos de aire (Olive, 1975) y en la naturaleza, tanto las corrientes de aire, la lluvia como los contactos entre frutos secos, en planta o caídos, permitirían una buena dispersión entre especies vasculares de los distintos sustratos del bosque. De los muestreos en la República Oriental del Uruguay, Piaggio (1989), de los de Punta Lara, en

la provincia de Buenos Aires (Vadell, 2000) y de los de la Patagonia argentina (Landolt y col., 2005) no se obtuvieron amebas de esta especie, ni del resto de las especies estudiadas en este trabajo, por lo que su distribución parece termo e hidrodépendiente en el hemisferio sur de América. La observación de laboratorio muestra que las poblaciones de amebas, levaduras y bacterias son abundantes en la mayoría de los frutos secos o semisecos.

Copromyxa protea fue aislada por primera vez de heces de caballo y vaca por Fayod en 1883 quien la asignó al género *Guttulina* de Cienkowsky (1873), describió las células redondeadas y cubiertas con paredes rugosas (Fayod, 1883).

Guttulinopsis nivea es típicamente tropical-subtropical, se halla tanto en las selvas de Iguazú como en las de Tikal, Belice, Guatemala, Panamá, Perú, sudeste asiático, y sigue el patrón de biodistribución aparentemente pantropical-subtropical ya que no ha sido aislada de suelos por debajo del paralelo 34 de latitud Sur, según se infiere de los resultados de Piaggio (1989), Vadell (2000) y Landolt y col. (2005).

Sappinia pedata es coprófila; aislada originalmente de heces de caballo (Dangeard, 1896). Se ha obtenido a partir de heces de alces y búfalos en Wyoming, EE.UU. (Noble, 1958). Cavender, quien la aisló en varias oportunidades (Cavender y Raper, 1965b), la reconoció, mediante la descripción escrita del autor, en suelos de Iguazú (com. pers. 2000). Por otra parte, Spiegel la halló repetidamente en ambos Hemisferios (Spiegel, com. pers., 2006).

Sappinia puede hallarse en suelos inundables y aguas servidas. Aislada en suelos de Iguazú, pero no en sustratos de la provincia de Buenos Aires, Latitud 34° 49' S (Vadell, 2000), donde los grandes herbívoros en estado salvaje son escasos y en los que el período invernal es más largo y frío.

S. diploidea fue aislada originalmente de heces de lagarto en Alemania (Kudo, 1966) y luego en EE.UU. en 1958 (Noble, 1958), y de heces de bovinos en Inglaterra (Kudo, 1966), todos ambientes no tropicales ni subtropicales. No ha sido aislada en Sudamérica ni existen informes médicos que sostengan que sea agente etiológico de encefalitis en humanos. *S. diploidea* tiene importancia sanitaria como otras amebas patógenas oportunistas de vida libre (Visvesvara y col., 1990; Schuster, 2002) así como las no oportunistas en humanos, que producen distintas encefalitis y queratitis, en algunos ca-

sos asociadas a pacientes inmunocomprometidos, en especial con sida.

Posiblemente otros géneros de amebas también puedan ser agentes causales de enfermedades humanas (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). No obstante, los casos de infestación del sistema nervioso central (y otros tejidos) por amebas de vida libre como *Balamuthia mandriallaris*, *Naegleria fowleri* y las *Acanthamoeba* spp son excepciones en los EE.UU. (Tolan, 2005) en particular las últimas, entre otras, por su alta frecuencia en tierras inundadas (Ramírez y col., 2005) resultan poblacionalmente riesgosas para la salud humana. Junto a *Sappinia diploidea*, estas amebas, y posiblemente otras, causan infecciones humanas oportunistas y no oportunistas tratables con diferentes agentes antimicrobianos (Schuster y Visvesvara, 2004).

Todas las especies estudiadas de Iguazú, que no sean parásitas, contribuyen al control supranumerario de poblaciones bacterianas patógenas y no patógenas y levaduriformes del suelo, broza o cápsulas de frutos de un modo que aún no es posible establecer cuantitativamente. Las alertas actualizadas sobre los cambios climáticos y el calentamiento global deberían tomar en cuenta los estudios sobre el incremento en las infecciones de etiología amebiana. No obstante, faltan datos epidemiológicos para establecer qué causas medioambientales parecen restar frecuencia a estas infecciones en la Argentina, que pueden ser frecuentes en otros países. Resta plantear una nueva revisión del carácter de *nomine dubius* (Kirk y col., 2001) con secuenciamientos de genes de la subunidad 18 S rDNA para *S. peddata*, debido a las diferencias existentes con *S. diploidea*, ya que así lo sugieren los antecedentes experimentales, biogeográficos y bibliográficos expuestos.

Agradecimientos

Al personal del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). A James C. Cavender (Ohio Univ., OH, EE.UU.), Frederick Spiegel (Arkansas Univ., AR, EE.UU.), Asimismo a Richard Blanton y a Alexander Smirnov. A Alexander Yu Akulov y a Dimitry Leontiev, (Univ. de Ucrania, Ucrania); Roland Kirschner (Univ. de Tubinga, Alemania). A Marcelo L. Wagner (Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA) y a

Fabián Font (FCEN, UBA) por sus contribuciones y oportunas sugerencias.

Referencias bibliográficas

- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W and Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. Chapter 27. John Wiley y Son (eds.), New York: 759-774.
- Blanton, R.L. (1981). "The spore hilum of *Acrasis rosea*". *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 97: 95-100.
- Blanton, R.L. (1990). "Phylum Acrasea" in: Margulis, L.; Corliss, J.O.; Melkonian, M.; Chapman, D.J. (eds.). *Handbook of Proctotista*. Heather I. McKhann (ed. coord.) Jones y Bartlett Publishers, Boston, Mass.: 75-87.
- Brefeld, O. (1884). *Polysphondylium violaceum* und *Dictyostelium mucoroides* nebst Bemerkungen zur Systematik der Schleimpilze. *Untersuchung aus dem Gesamtgebiet der Mykologie* 6: 1-34.
- Bonner, J.T. (1947). "Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*". *J. Exptl. Zool.* 106: 1-26.
- Cavender, J.C. (1973). "Geographical distribution of Acrasidae". *Mycologia* 65: 1044-1054.
- Cavender, J.C. (1976). "Cellular Slime Molds of Southeast Asia. II. Occurrence and Distribution". *Amer. J. Bot.* 63(1): 71-73.
- Cavender, J.C. and Raper, K.B. (1965a). "The Acrasieae in nature. I. Isolation." *Amer. J. Bot.* 52: 294-296.
- Cavender, J.C. and Raper, K.B. (1965 b). "The Acrasieae in Nature. II. Forest soil as a primary habitat." *Amer. J. Bot.* 52: 297-302.
- Cavender, J.C. and Raper, K.B. (1968). "The Occurrence and Distribution of Acrasieae in Forest of Subtropical and Tropical America". *Amer. J. Bot.* 55(4): 504-513.
- Cabrera, A.L. y Willink, A. (1982). *Biogeografía de América Latina*. Serie Biología. Monografía 13. OEA, Washington D.C. pp 122.
- Cienkowsky, L. (1873). *Guttulina rosea*. *Trans. Bot. Section 4th meeting Russian naturalists at Kazan*.
- Cook, W. and Iveney, R. (1939). "Some observations on *Sappinia pedata* Dang". *Trans. British Mycol.* 22: 302-306.
- Dangeard, P.A. (1896). "Contribution a l' étude des Acrasiées". *Le Botaniste* 5: 1-20.
- Dangeard, P.A. (1900). "Étude de la karyokinéses

- chez l' *Amoeba hyalina* sp. nov". *Le Botaniste*. Ser. 7: 49-83.
- Dimitri, M.J. (1974). *La flora arbórea del Parque Nacional Iguazú*. Anales de Parques Nacionales. XII. pp 181.
- Erdos, G.W. and Raper, K.B. (1978). "Ultrastructural aspects of two species of *Guttulinopsis*". *Am. J. Bot.* 65: 552-561.
- Fayod, V. (1883). "Beitrag zur Kenntniss niederer Myxomyceten". *Botanische Zeitung* 41: 170-178.
- Fuller, M.S. and Rakatansky, R.M. (1966). "A preliminary study of the carotenoids in *Acrasis rosea*". *Can. J. Bot.* 44: 269-274.
- Goodfellow, L.S.; Belcher, J.H. and Page, F.C. (1974). "A light and electron-microscopical study of *Sappinia diploidea*, a sexual amoeba". *Protistologica* 10(2): 207-216.
- Gelman, B.B.; Popov, V.; Chaljub, G; Nader, R.; Rauf, S.J.; Nauta, H.W. and Visvervara, G.S. (2003). "Neweopatogical and ultrastructural features of amebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*". *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* Oct. 62 (Raper, 1984): 990-8.
- Hellsten, M. and Ross, U.P. (1998). "The actomyosin cytoskeleton of amoebae of the cellular slime molds *acrisis rosea* and *Protostelium mycophaga*: structure, biochemical properties, and function". *Fungal Genet. Biol.* Jun 24 (1-2): 123-145.
- Hohl, H.R. and Hamamoto, S.T. (1968). "Lamellate structures in the nucleolus of the cellular slime mold *Acrasis rosea*". *Pacific Science* 22: 402-407.
- Hohl, H.R. and Hamamoto, S.T. (1969). "Ultrastructure of *Acrasis rosea*, a cellular slime mold, during development". *J. of Protozoology* 16: 333-344.
- Holmes, M.T. (1991). *Seasonal variations in the distribution of dictyostelid cellular slime molds at three sites at Tikal, Guatemala and their taxonomy*. M.S. Tesis, Ohio University, Athens, USA. Pp. 170.
- Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; David, J.C. and Stalpers, J.A. (2001). *Ainsworth y Bisby's Dictionary of the Fungi*. CABI. 9th Ed. International Mycological Institute, Egham, United Kingdom.
- Kudo, R.R. (1966). *Protozoología*. Compañía Editorial Continental, SA. México. España, Argentina, Chile. pp 905. Primera edición castellana, 1969.
- Landolt, J.; Vadell, E.M.; Stephenson, S.L.; Cavender, J.C. (2005). "Dictyostelid Cellular Slime Molds of Patagonia and Tierra del Fuego". (Abstr.) *ICSEM* 5. Tlaxcala, México, p.14.
- Marciano-Cabral, F. and Cabral, G. (2003). "*Acanthamoeba* spp. As Agent of Disease in Humans". *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 16(2): 273-307.
- Noble, G.A. (1958). "Coprozoic protozoa from Wyoming mammals". *J. Protozool.* 5: 69.
- Olive, E.W. (1901). "A preliminary enumeration of the sorophoreae". *Proc. Aer. Acad. Arts y Sci.* 37: 340.
- Olive, E.W. (1902). "Monograph of the Acrasieae". *Proc. Boston Soc Nat. Hist.* 30: 451-513.
- Olive, L.S. (1965). "A Developmental Study of *Guttulinopsis vulgaris* (Acrasiales)". *Amer. J. of Bot.* 52: 513-519.
- Olive, L.S. (1975). *The Mycetozoans*. Academic Press, New York: 293.
- Olive, L.S. and Stoianovich, C. (1960). "Two new members of the Acrasiales". *Bull. Torrey Bot. Club* 87: 1-20.
- Olive, L.S.; Dutta, S.K. and Stoianovitch, C. (1961). "Variation in the cellular slime mold *Acrasis rosea*". *J. Protozool.* 8: 467-472.
- Olive, L.S.; Stoianovich, C. and Bennett, W.E. (1983). "Descriptions of acrasid cellular slime molds: *Pocheina rosea* and a new species, *Pocheina flagellata*". *Mycologia*: 1019-1029.
- Page, F.C. (1978). "*Acrasis rosea* and the possible relationship between Acrasida and Schizopyrenida". *Archiv fur Protistenkunde* 120: 169-181.
- Page, F.C. and Blanton, R.L. (1985). "The Heterolobosea (Sarcodina: Rhizopoda), A new class uniting the Schizopyrenida and the Acrasida (Acrasida)". *Protistologica* 21: 121-132.
- Piaggio, M.J. (1989). "Distribution of dictyostelid cellular slime molds in two grazing land soils in Uruguay". *Cryptogamie* 10: 173-178.
- Raper, K.B., (1960). "Levels of cellular interactions in amoebae populations". *Proc. Amer. Phil. Soc.* 104: 579-604.
- Ramírez, E.; Robles, E.; Bonilla, P.; Sainz, G.; López, M.; De La Cerda, J.M. and Warren, A. (2005). "Occurrence of Pathogenic Free-Living Amoebae and Bacterial Indicators in a Constructed Wetland Treating Domestic Wastewater from a Single Household". *Engineering in Life Sciences* 5(3): 253-258.

- Raper, K.B. (1984). *The Dictyostelids*. Princeton University Press. Princeton. pp. 453.
- Raper, K.B.; Worley, A.C and Kessler, D. (1977). "Observations on *Guttulinopsis vulgaris* and *G. nivea*". *Mycologia* 69: 1016-1030.
- Raper, K.B.; Worley, A.C.Y.; Kurzynski, T.A. (1978). "*Copromyxella*: a new genus of Acrasidae". *Am. J. Bot.* 65: 1011-1026.
- Ray, D.L. and Hayes, R.E.. (1954). "*Hartmannella astronxis*: a new species of free-living amoeba". *J. Morphol.* 98: 159-188.
- Rehinaradt, D.J. (1966). "Silica gel as preserving agent for the cellular slime mold *Acrasis rosea*". *J. Protozool.* 13: 225-226.
- Rehinaradt, D.J. (1968). "The effects of light on the development of the cellular slime mold *Acrasis rosea*". *Am. J. Bot.* 55: 77-86.
- Rehinaradt, D.J. and Mancinelli, A.L. (1968). "Developmental responses of *Acrasis rosea* to visible light spectrum". *Develop. Biol.* 18: 30-41.
- Roger, A.J.; Smith, R.M.; Doolittle, W.F. (1996). "Evidence for the Heterolobosea from phylogenetic analysis of genes encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase". *J. of Euk. Microbiol.* 43: 475-485.
- Schuster, F.L. (1990). "*Phylum Rhizopoda*". in: Margulis, L., Corliss, J.O.; Melkonian, M. and Chapman, D.J. (eds). *Handbook of Proctotista*. Heather I. McKhann (ed. coord.) Jones y Bartlett Publishers, Boston, Mass.: 3-18.
- Schuster, F.L. (2002). "Cultivation of Pathogenic and opportunistic Free-living Amebas". *Clinical Microbiology Review*, 15(3): 342-354.
- Schuster, F.L. and Visvesvara, G.S. (2004). "Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment". *Drug. Resist. Updat.* 7(1): 41-51.
- Spiegel, F.W. and Olive, L.S. (1978). "New evidence for the validity of *Copromyxa protea*". *Mycologia*: 843-847.
- Smirnov, A.M. and Brown, S. (2004). "Guide to the methods of Study and Identification of Soil Gymnamoebae". *Protistology* 3(3): 148-1990.
- Tolan, R.W. (2005). "Amebic Meningoencephalitis". Article on line: <http://www.emedicine.com/ped/topic81.htm>. (Consulta: junio 30 de 2005).
- Vadell, E.M. (1993). *Taxonomy, ecology and karyotypes of the cellular slime molds of Tikal, Guatemala*. M.S Tesis, Ohio University. pp. 213.
- Vadell, E.M. (2000). "Dictiostélidos (Eumycetozoa) de suelos de Punta Lara, Provincia de Buenos Aires, Argentina". *Rev. Arg. Microbiol.* 32: 89-96.
- Vadell, E.M. (2003). *Contribución a la Sistemática y Ecología de los Dictiostélidos del Parque Nacional Iguazú, Misiones, Argentina*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Departamento de Biodiversidad y Biología Ambiental. 237 pp.
- Vadell, E.M. and Cavender, J.C. (1995). "Dictyostelid cellular slime molds from forest soils of the Iguazú Falls and the Jesuitic Missions Ruins of Argentina". In: Lado, C.; Hernández, J.C. (ed.) Volume of the *Second International Congress on the Systematics and Ecology of Myxomycetes (ICSEM 2)* 1: 110 (abstract).
- Vadell, E.M. and Cavender, J.C. (2007). "Dictyostelids living in the soils of the Atlantic Forest. Iguazú region, Misiones, Argentina. I. Description of new species". *Mycologia* 99(1): 112-124.
- van Tieghen, Ph. (1880). "Sur quelques Myxomycetes a plasmode agrégé". *Bull. Soc. Bot. Fr.* 27: 317-322.
- Visvesvara, G.S.; Martínez, A.J.; Schuster, F.L.; Leitch, G.J.; Wallace, S.V.; Sawyer, T.K. and Anerson, M. (1990). "Leptomysid amoeba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals". *J. Clinic Microbiol.* 28: 2750-2756.
- Weitzman, I. (1962). "Studies on the nutrition of *Acrasis rosea*". *Mycologia* 54: 113-1115.
- Worley, A.C., Raper, K.B. and Hohl, M. (1979). "*Fonticula alba*: a new cellular slime mold (Acrasiomycetes)". *Mycologia* 61: 746-760.
- Zopf, W. (1885). "Die Pilzthiere oder Schleimpilze". *Encykl. Naturwiss.* 3: 1-174.

