

## ESTUDIO SISTEMÁTICO Y BIOLÓGICO DE LAS ASCOBOLACEAS DE LA ARGENTINA. XV. UN MUTANTE NATURAL DE *ASCOBOLUS AMOENUS* (PEZIZALES, ASCOMYCOTINA)

por DIANA A. DOKMETZIAN\*, SILVIA DE SIMONE\* y MARIA ESTHER RANALLI\*

**Summary** *Systematic and biological study of the Ascobolaceae of Argentina. XV. A natural hybrid of Ascobolus amoenus (Pezizales, Ascomycotina). Wild strains of Ascobolus amoenus produce 8-spored asci and uninucleate ascospores with a thick, verrucose —labyrinthic ornated exosporium. A natural mutant in heterozygous condition with ascospores showing a thin exosporium traced by deep striae, was isolated. The exosporium types segregated in a ratio of 4: 4 in the ascus, suggesting a typical mendelian outcome controlled by a single allele pair. Besides the six expected patterns, some anomalous spore arrangements were observed. They could result from: 1- spindle overlapping in the 2nd and 3rd division; or 2- ascospore migration and rearrangement at the ascus maturation stage. Since mutant ascospores germinate normally, mutant homozygous cultures were obtained. Cultural studies using various media, light and temperature conditions were performed, showing no interference with the segregation pattern.*

### INTRODUCCION

*Ascobolus amoenus* Oud. es un ascomicete, miembro del orden Pezizales (ascomicetes operculados), de hábitat fímico. Es heterotático bipolar, con un sistema de compatibilidad controlado por un par de alelos Aa. La forma salvaje, previamente estudiada en nuestro laboratorio (Gamundí & Ranalli, 1966) produce apotecios normales cleistohimiales, que se abren en la fase mesohimial tardía, exponiendo ascos maduros que emergen hasta la mitad de su longitud por sobre el nivel de las paráfisis, por lo cual la superficie himenial aparece negruzca a simple vista, debido al color de las ascosporas maduras. Estas son uninucleadas, elipsoidales alargadas, aguzándose en los polos, al principio hialinas, lisas, volviéndose violadas y ornamentadas durante su maduración, para finalmente tomar una coloración castaño violada, con exosporio grueso con verrugas anastomosadas en forma laberíntica, con las crestas redondeadas. Su disposición inicial en el asco maduro es biseriada, ocupando el tercio superior del asco maduro y muy turgente, ubicándose luego irregularmente biseriadas, hasta que, finalmente, cuando el asco pierde turgencia, se disponen en forma uniseriada.

En el curso de nuestras investigaciones, aislamos a partir de estiércol de vaca colocado en cámara húmeda, lo que supusimos en principio un heterocigota mutante natural de *A. amoenus*, ya que cuando observamos sus ascos al microscopio, pudimos comprobar la presencia, en cada uno de ellos, de ocho ascosporas, de las cuales, cuatro respondían en un todo, a las características normales de *A. amoenus*, mientras que las otras cuatro, presentaban un aspecto completamente distinto. No solamente en cuanto a la forma, que a pesar de mantenerse dentro de las características generales, era menos aguzada en los polos, sino en cuanto al exosporio, dispuesto como una capa delgada, formando crestas elevadas y profundas depresiones, de consistencia muy frágil, al punto que una pequeña presión ejercida sobre el preparado, provocaba su rotura y el «descascamiento» posterior de la ascospora.

El objetivo del presente trabajo fue el de aislar el mutante natural, estudiar su comportamiento en cultivo, observar los distintos patrones de distribución de las ascosporas en el asco maduro del heterocigota y dejar en claro, que un carácter tan estable frente a las condiciones medioambientales, como lo es la ornamentación de las esporas y que suele usarse como criterio sistemático, puede alterarse genéticamente, sin que ello determine o signifique, la existencia de barreras que entorpezcan el normal cruzamiento e impidan el mantenimiento de la entidad como una única especie.

\* Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, pabellón II, 4to. piso. \* Investigadora del CONICET.

## MATERIALES Y METODOS

A partir de estiércol de vaca coleccionado en Gualaguaychú, Prov. de Entre Ríos, por la Dra. María Delia Bertoni en enero de 1988, y colocado en cámara húmeda en nuestro laboratorio, se obtuvieron fructificaciones maduras que al cabo de doce días expulsaron normalmente las ascosporas que fueron recogidas en placas de agar-agua siguiendo la metodología empleada en trabajos anteriores (Gamundí & Ranalli, 1966). Los distintos tipos de ascosporas fueron tratadas con NaOH al 0,3% durante 30 minutos e incubadas 24 horas a 37°C.

Una vez germinadas, se obtuvieron cultivos monospóricos de esporas salvajes y mutantes, que se cruzaron en cajas de Petri con medio PF. (Gamundí & Ranalli, *op. cit.*). Se utilizaron los aislamientos monospóricos 54 y 55 (salvaje) y 107 y 108 (mutante) de la cepa BAFC 2357, y la cepa BAFC 2358 de *A. amoenus* aislada a partir de estiércol de vaca de la localidad de San Pedro, provincia de Buenos Aires.

Todas las cepas pertenecen a la colección de cultivos del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA.

En cada cruzamiento, se emplearon 18 cajas de Petri para cada medio de cultivo, distribuidas en dos series.

*Condiciones de cultivo:* los cultivos se desarrollaron en cámara incubadora a 15°C, 23°C y 28°C y en dos series: 1) luz continua, suministrada por cuatro tubos fluorescentes de 20W y 2) oscuridad continua.

### *Medios de cultivo sólidos:*

Medio PF: papel de filtro, extracto de levadura (Ranalli & Forchiassin, 1976) en caja de Petri y en tubo en pico de flauta.

Medio GU: glucosa, urea (Galvagno, 1976) en caja de Petri.

Medio GA: glucosa, asparagina (Galvagno, *op. cit.*) en caja de Petri.

Los cruzamientos se llevaron a cabo en cajas de Petri con 20 ml de medio.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### A) *Crecimiento y fructificación variando las condiciones de temperatura e iluminación*

Las ascosporas mutantes germinan normalmente, y llevan los alelos normales del gen de compatibilidad, lo que nos permitió cruzar los cultivos provenientes de las mismas, y obtener el

homocigota mutante. Por otra parte, cuando se cruzaron con cultivos provenientes de ascosporas salvajes, se obtuvieron los heterocigotas entre ambos en la proporción esperada. Aparentemente estas ascosporas son el resultado de la presencia de un alelo mutante para deposición del exosporio, que segrega en el asco en una relación 4: 4 con respecto al normal lo que, en términos generales, es característico de un comportamiento mendeliano clásico, controlado por un par de alelos.

Es evidente que este factor que controla la deposición del exosporio, lo hace en las últimas etapas de maduración de las ascosporas y no interfiere ni con su compatibilidad sexual ni con su viabilidad. Tiene un efecto fenotípico directo, que permite detectar su presencia en forma inmediata en las ascosporas dentro del asco, sin las complicaciones de la dominancia o recesividad, ya que éstas son uninucleadas y haploides.

Además de los seis patrones clásicos esperados en los ascos, para un par de alelos que segregan normalmente, se observaron disposiciones anómalas.

Los ensayos de compatibilidad sexual permitieron determinar que los monospóricos 54 y 107 llevan el alelo *A*, y los monospóricos 55 y 108 el *a*. El cruzamiento 54 x 55 produjo fructificaciones con ascos octosporados, con ascosporas de tipo salvaje; el cruzamiento 107 x 108, ascos con ascosporas de tipo mutante y los cruzamientos 54 x 108 y 55 x 107 produjeron abundantes fructificaciones con ascos segregantes, con cuatro ascosporas de tipo salvaje y cuatro de tipo mutante.

Cuando se cruzaron tanto el homocigota mutante como el salvaje, con las cepas testigo de *A. amoenus* provenientes de San Pedro, Prov. de Buenos Aires, (C-2358), se obtuvieron el heterocigota y el homocigota salvaje respectivamente, poniendo en evidencia la inexistencia de barreras que impidan el cruzamiento.

No se observaron diferencias entre los distintos cruzamientos con respecto a su comportamiento frente a las condiciones a que fueron sometidos. Los resultados obtenidos se resumen en las lám. 1 y 2.

*Crecimiento vegetativo:* cuando los cultivos crecen a 28°C, el micelio es de crecimiento abierto, superficial y también sumergido en el medio. El crecimiento es similar en los tres medios, tanto en luz cuanto en oscuridad.

A 15°C y a 23°C, en cambio, en condiciones de oscuridad, el micelio es denso y algodonoso en los tres medios. Las condiciones de oscuridad parecen favorecer el desarrollo miceliano vegetativo, sin embargo, un exceso de temperatura (28°C), lo inhibe.

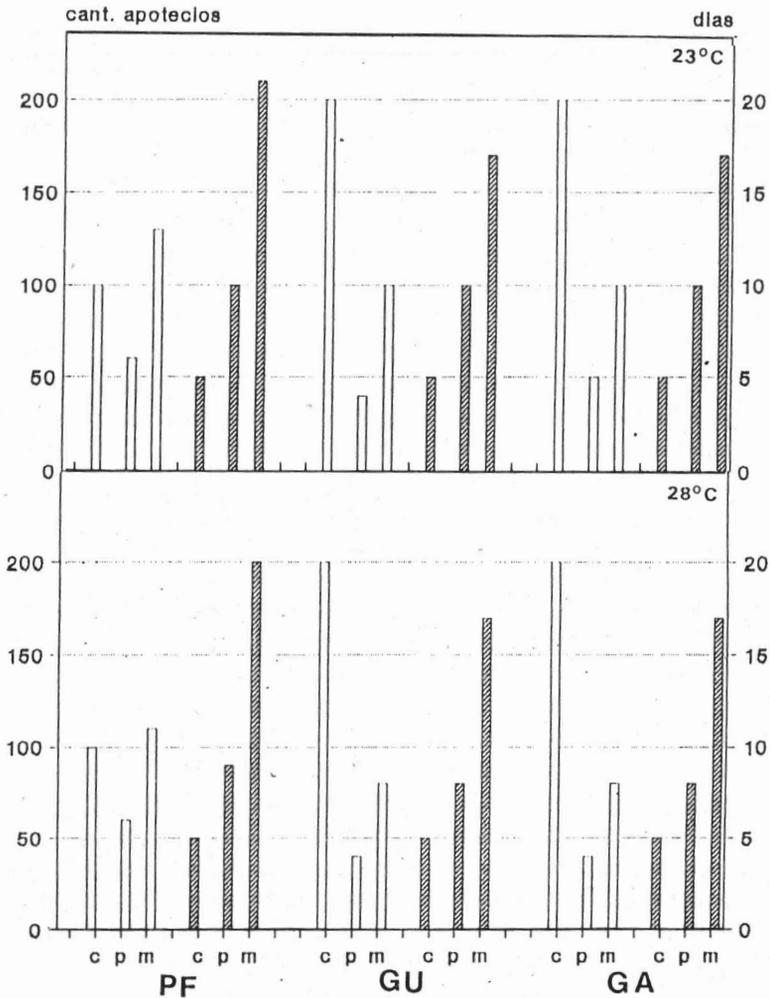


Lámina 1.—Producción de apotecios y tiempo de desarrollo a 23°C y 28°C, en condiciones de luz y oscuridad en medio PF, GU y GA. c: cantidad de apotecios, referidos al control en PF, luz continua, 23°C. p: día en que aparecen los primordios. m: día de maduración de ascosporas. Cepa BAFC 2357, cruzamiento 54 x 108.

*Crecimiento reproductivo:* la luz no parece ser necesaria para el desencadenamiento del proceso sexual y la formación de fructificaciones; sin embargo, a 15°C, éstas no maduran normalmente y a 23°C y a 28°C, se alarga notablemente el período de maduración, y las ascosporas, si bien maduran, no son expulsadas por los ascos.

Los heterocigotas 54 x 108 y 55 x 107 cultivados en PF a 15°C y en condiciones de oscuridad, forman fructificaciones de tipo «cleistotecio», semejantes a los producidos en oscuridad por *Ascobolus albidus* (Ranalli & Cinto, 1972), con ascos delicuescentes, en los cuales, las cuatro ascosporas salvajes depositan su exosporio y las cuatro restantes, permanecen hialinas.

La incapacidad para expulsar las ascosporas maduras en condiciones de oscuridad parecería

estar relacionada con la menor producción de paráfisis y con problemas osmóticos que modifican la turgencia normal en los ascos.

Con respecto a la distribución de las fructificaciones en PF, éstas aparecen regularmente dispersas en la caja, pero en GA y GU, son gregarias, y producen menor cantidad de ascos que en PF.

#### B) Germinación de ascosporas

Las ascosporas provenientes del homocigota salvaje 54 x 55 presentan el exosporio con las características normales descritas para la especie, mientras que las ascosporas del homocigota mutante 107 x 108 tienen el exosporio delgado, con crestas y depresiones, y sumamente friable. Las ascosporas de los heterocigotas (54 x 108, 55 x 107), segregan

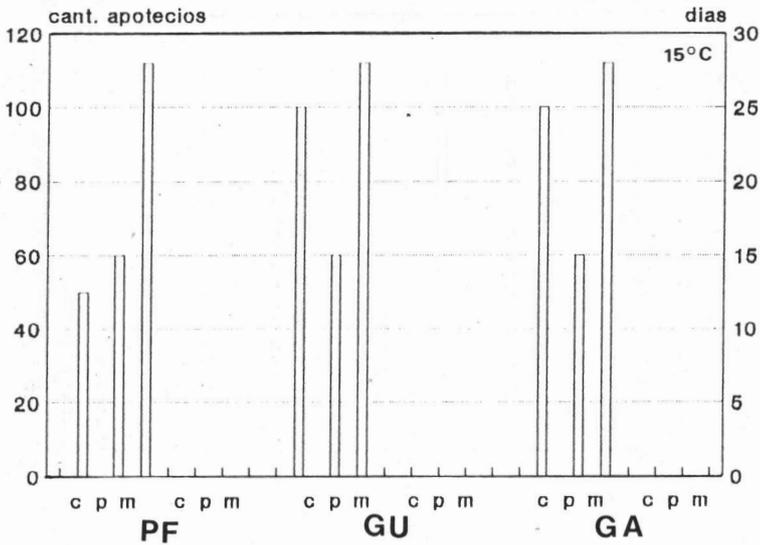


Lámina 2.— Producción de apotecios y tiempo de desarrollo a 15°C, en condiciones de luz y oscuridad en medio PF, GU y GA. c: cantidad de apotecios, referidos al control en PF, luz continua, 23°C. p: día en que aparecen los primordios. m: día de maduración de ascosporas. Cepa BAFC 2357, cruzamientos 54 x 108.

en el asco cuatro salvajes y cuatro rugosas, cada tipo con las características idénticas descritas para los homocigotas respectivos.

Esta diferencia en la naturaleza del exosporio, probablemente sea la consecuencia de deficiencia/s enzimática/s producidas en el proceso de síntesis y deposición del pigmento que formará el exosporio, y que está relacionado con la presencia del alelo mutante.

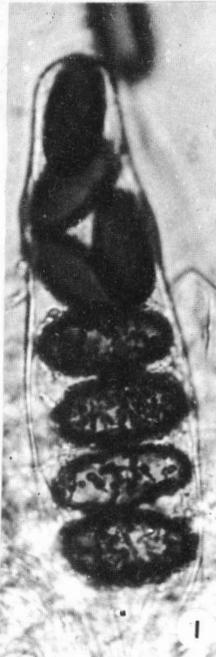
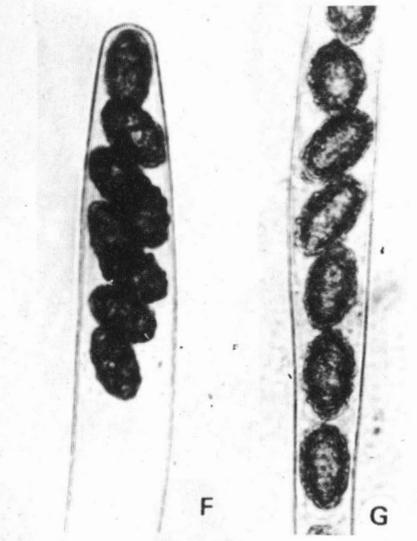
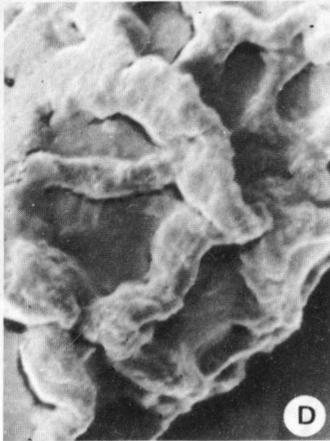
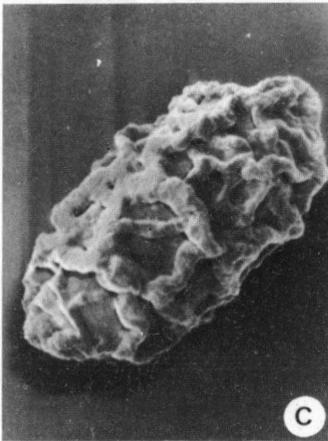
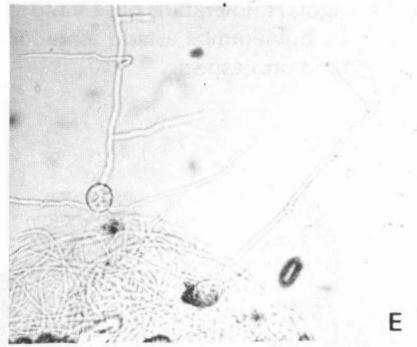
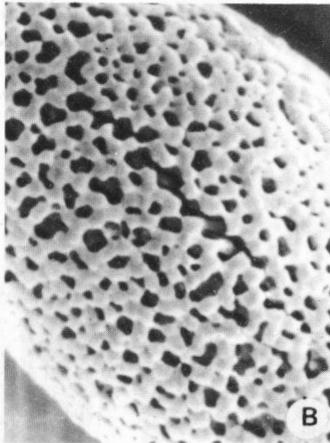
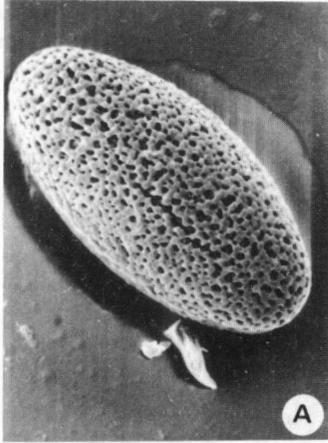
Los tratamientos inductores de la germinación, que fueron ensayados, tendieron a permear el exosporio, y permitir la imbibición de las esporas que no mostraron otro tipo de dormición. La diferente naturaleza del exosporio se vio corroborada por el hecho de que fueron necesarias concentraciones más bajas de NaOH en el tratamiento de ascosporas mutantes que en el de ascosporas salvajes. Un tratamiento con NaOH al 0,3% durante 30 minutos, dio prácticamente un 100% de germinación de ascosporas salvajes a las 24 horas; un resultado equivalente se obtuvo con NaOH al 0,1% o al 0,2% con ascosporas mutantes.

La naturaleza friable del exosporio mutante se puso de manifiesto en preparaciones microscópicas de aplastados de fructificaciones, donde la presión ejercida sobre el cubreobjetos fue suficiente para romperlo y permitir la germinación «*in situ*» de la espora (lám. 3, fig. E).

### C) Ubicación de las ascosporas en los ascos de los heterocigotas

Lo que inmediata e indudablemente llamó nuestra atención al observar las fructificaciones del heterocigota en el estiércol original, fue la presencia en el asco de los dos tipos de ascosporas. La bibliografía con respecto a mutantes para color de esporas en Ascomycetes es extensa: podemos citar entre otros, a Bistis & Olive, 1954; Bistis, 1956; Olive, 1956, 1959; Kitani *et al*, 1962; Stadler & Towe, 1971 y Paquette, 1978. Pero en nuestro caso, no sólo cambiaba el color, sino la apariencia externa de la ascospora, y sus dimensiones aparentes, a tal punto, que si en lugar de observar el asco del

Lámina 3.— A, ascospora salvaje, x1500; B, detalle de la ornamentación, x3000; C, ascospora mutante, x1500; D, detalle de la ornamentación, x3000; E, ascospora mutante germinada, x100; F, asco con ascosporas mutante en dos series, x300; G, asco con ascosporas uniseriadas, x300; H, I, J, K ascos heterocigotas mostrando distintos ordenamientos de las ascosporas x500. A, B, C y D con microscopio electrónico de barrido (MEB).



heterocigota, hubiéramos observado el homocigota mutante, hubiéramos estado tentados de considerarlo como otra especie.

Un segundo hecho nos llamó la atención y fue que todos los ascos observados presentaban una segregación 4: 4. Esto se confirmó y se mantuvo a

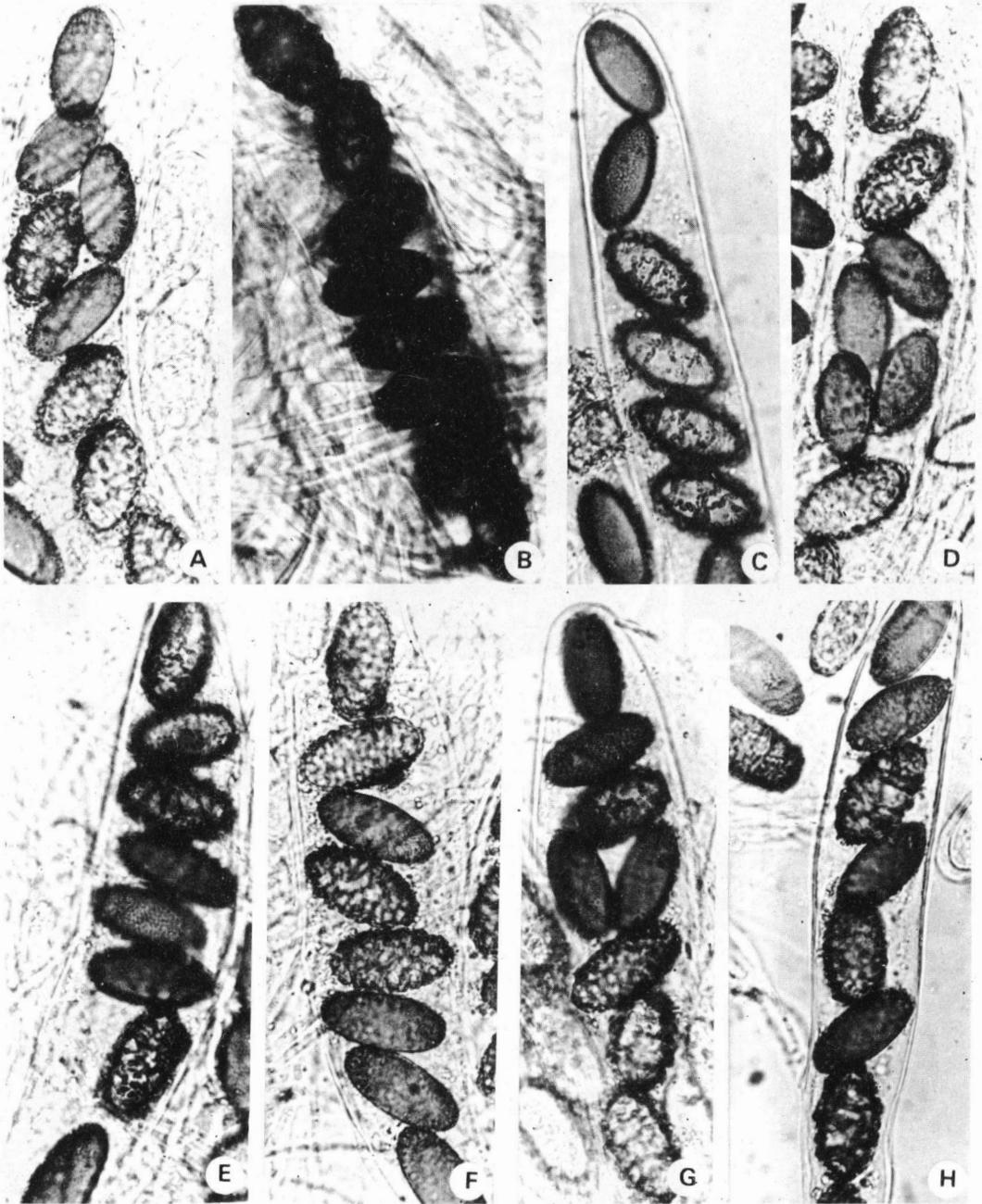


Lámina 4.— Diferentes ordenamientos de las ascosporas en el ascó heterocigota. B, C, E, F y H ascosporas uniseriadas; A, D y G ascosporas parcialmente ordenadas. x500.

través de todos los cruzamientos heterocigotas que estudiamos posteriormente. El orden en que estas ascosporas se encontraban dispuestas en los ascos, no siempre respondía a los clásicos 6 tipos que es dable esperar en la segregación de un par de alelos que pueden hacerlo en la primera o en la segunda división, según haya o no sobrecruzamiento. Observábamos que dos pares de ascosporas adyacentes, donde cada par supuestamente aparece por mitosis de un único producto meiótico, se encontraba erróneamente emparejado, con respecto a esa diferencia alélica detectable en los padres del cruzamiento.

En *Neurospora crassa* y *N. sithophila* el patrón de disposición con respecto a cualquier par de alelos es una réplica ordenada de la segregación meiótica en el asco, ya que no hay superposición de husos ni migración nuclear o de ascosporas en el asco (Ryan, 1943; Lindegren, 1953).

En *Ascobolus stercorarius* (Bisti, 1956), la situación es bastante más compleja: los husos de la segunda división pueden ser paralelos o ligeramente oblicuos, pero no transversales. En cambio,

los husos de la tercera división pueden encontrarse en cualquier dirección, lo que determina la posibilidad de superposición de los mismos y, como inmediata consecuencia, la aparición de más de seis patrones de disposición de las ascosporas en el asco.

Lo primero que tuvimos que determinar fue: si la ubicación de las ascosporas en el asco reflejaba una disposición ordenada de los núcleos producto de las sucesivas divisiones, o bien las ascosporas aparecían desordenadas en el asco, lo cual podría deberse a distintas causas, tales como: superposición de los husos de las divisiones meióticas y/o mitóticas, o bien a un desplazamiento de las ascosporas en formación durante la maduración de los ascos.

La observación continuada de numerosísimos ascos heterocigotas, en variados cruzamientos, nos permitió concluir, finalmente, que esta última causa expuesta ocurre, sin dudas, en los ascos heterocigotas de *A. amoenus*. Durante el proceso de división nuclear en el asco en formación, el huso de la primera división meiótica es transversal al eje

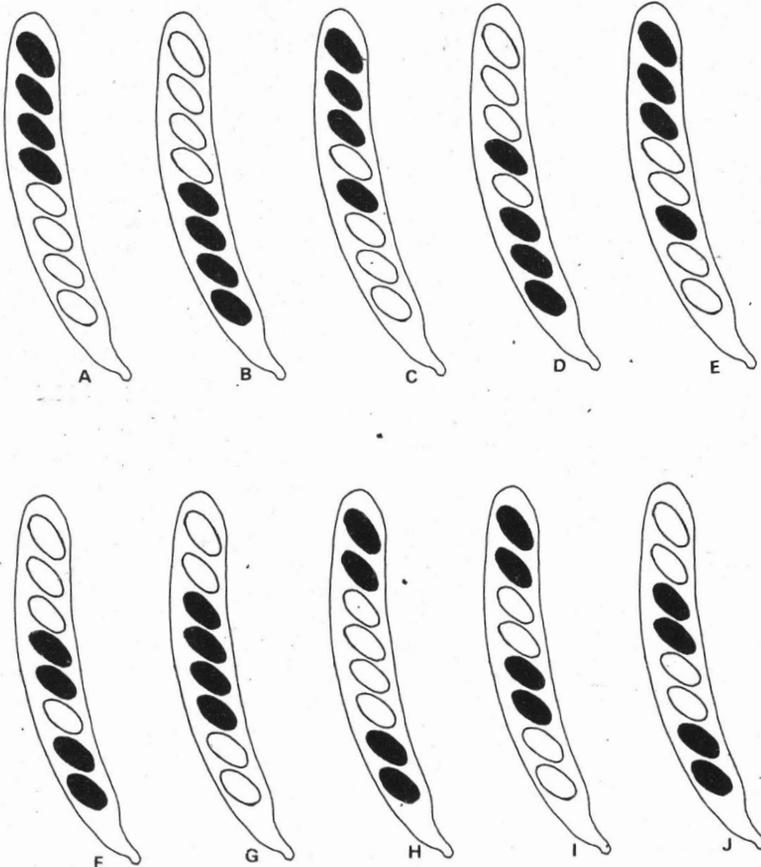


Lámina 5.— Diferentes ordenamientos de las ascosporas en el asco heterocigota. A, B, G, H, I y J patrones clásicos de segregación para un par de alelos. C, D, E y F disposiciones anómalas. La línea equivale a 20  $\mu$ m.

longitudinal del asco, y ligeramente oblicuo; los husos de las dos divisiones siguientes (Meiosis II y Mitosis) son paralelos al eje longitudinal del asco resultando ocho núcleos, dispuestos en dos series paralelas, ligeramente desplazadas.

Mientras transcurre el proceso de división nuclear, el asco se alarga notablemente, y también se ensancha, y las ascosporas maduras se disponen finalmente en dos series, ligeramente desplazadas, que ocupan el tercio superior del asco turgente. Durante la posterior pérdida de turgencia del asco, que trae aparejada una disminución del volumen, las ascosporas tienden a ubicarse en una serie, a lo largo del asco completo; es en este movimiento de desplazamiento, que surgen las distintas posibilidades observadas, y que son ilustradas en la lám. 3, fig. F-K; lám. 4, fig. A-H y lám. 5, fig. A-J.

Claro está, y la bibliografía abundante al respecto lo demuestra (Lindegren, 1953; Roman, 1956; Mitchell, 1955a, b, 1959; Case & Giles, 1958; Strickland, 1958; Stadler, 1959 a, b; Whitehouse, 1963; Holliday, 1964), que dejamos abierta la posibilidad que un estudio posterior, llevado a cabo por genetistas, pueda decidir si, además, también aquí estamos en presencia de una segregación postmeiótica, como ha sido observada en mutantes de *Ascobolus immersus* (Leblon, 1972; Leblon & Rossignol, 1973; Lissouba *et al.*, 1962; Stadler & Towe, 1971; Paquette, 1978), y que pueda conducir a la formación de ascos aberrantes con segregación 4: 4.

Durante el desarrollo de nuestro trabajo pudimos comprobar que esta mutación que observamos no afecta ni incluye a los factores de compatibilidad sexual, que segregan normalmente y que permiten la obtención de los homocigotas salvaje y mutante. Por otro lado, los parámetros estudiados en cuanto a crecimiento y fructificación, tampoco indican diferencias notables entre el homocigota salvaje, el homocigota mutante y el heterocigota. Cabe entonces preguntarse, ¿por qué el mutante es tan poco abundante en la naturaleza? Después de muchos años de estudiar las Ascoboláceas, es la primavera vez que lo encontramos y no lo hemos visto citado en la bibliografía.

Las razones que se nos ocurren son fundamentalmente dos y están relacionadas con la fragilidad del exosporio:

1) Hemos observado y comprobado que es muy fino y quebradizo y es probable que las ascosporas germinen fácilmente, una vez expulsadas, antes de ser ingeridas por los herbívoros, y no puedan completar su ciclo normalmente fuera del sustrato habitual.

2) Otra situación podría presentarse: que no pudiera la ascospora, dada la naturaleza frágil del

exosporio, resistir normalmente el paso por el tracto intestinal del herbívoro, y en consecuencia, sea incapaz de germinar sobre el estiércol.

También cabría preguntarse, ¿será ésta una mutación reciente?

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Jorge E. Wright por la lectura crítica del manuscrito. Al CONICET por la financiación de este trabajo. Al servicio de microscopía electrónica de barrido (MEB) del CONICET.

#### BIBLIOGRAFIA

- BISTIS, G. 1956. Studies on the genetics of *Ascobolus stercorarius* (Bull.) Schrot. *Bull. Torrey Bot. Club* 83 (1): 35-61.
- & L. S. OLIVE. 1954. Ascomycete spore mutants and their use in genetic studies. *Science* 120: 105-106.
- CASE, M. E. & N. H. GILES. 1958. Evidence from tetrad analysis for both normal and aberrant recombination between allelic mutants in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)* 44: 378-390.
- GALVAGNO, M. A. 1976. Ensayos de nutrición en *Ascobolus crenulatus* P. Karst. (Fungi-Ascomycetes). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 17 (1-2): 95-118.
- GAMUNDI, I. J. & M. E. RANALLI. 1966. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. II. *Nova Hedwigia* 10 (3/4): 339-366.
- HOLLIDAY, R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* 5: 282-304.
- KITANI, Y., L. S. OLIVE & A. S. EL-ANI. 1962. Genetics of *Sordaria fimicola*. V. Aberrant segregation at the G locus. *Amer. J. Bot.* 49: 697-706.
- LEBLON, G. 1972. Mechanism of gene conversion in *Ascobolus immersus*. I. Existence of a correlation between the origin of mutants induced by different mutagens and their conversion spectrum. *Mol. Gen. Genet.* 115: 36-48.
- & J. L. ROSSIGNOL. 1973. Mechanism of gene conversion in *Ascobolus immersus*. II. The interaction of heteroalleles in the conversion process. *Mol. Gen. Genet.* 122: 165-182.
- LINDEGREN, C. C. 1953. Gene conversion in *Saccharomyces*. *Jour. Genet.* 51: 625-637.
- LISSOUBA, P., J. MOUSSEAU, G. RIZET & J. L. ROSSIGNOL. 1962. Fine structure of genes in *Ascobolus immersus*. *Adv. Genet.* 11: 343-380.
- MITCHELL, M. B. 1955a. Aberrant recombination of pyridoxine mutants of *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)* 41: 215-220.
- . 1955b. Further evidence of aberrant recombination in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)* 41: 935-937.
- . 1959. Detailed analysis of a *Neurospora* cross. *Genetics* 44: 847-856.
- OLIVE, L. S. 1956. Genetics of *Sordaria fimicola*. I. Ascospore color mutants. *Amer. J. Bot.* 43: 97-107.
- . 1959. Aberrant tetrads in *Sordaria fimicola*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)* 45: 727-732.

- PAQUETTE, N. 1978. Detection of aberrant 4: 4 asci in *Ascobolus immersus*. *Can. J. Genet. Cytol.* 20: 9-17.
- RANALLI, M. E. & O. R. CINTO. 1972. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. IV. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 14 (4): 285-304.
- & F. FORCHIASSIN. 1976. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. VII. Desarrollo y citología de *Saccobolus citrinus*. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 17 (3-4): 262-279.
- ROMAN, H. 1956. Studies of gene mutation in *Saccharomyces*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 21: 175-185.
- RYAN, F. J. 1943. Crossing-over and second division segregation in fungi. *Bull. Torrey Bot. Club* 70: 605-611.
- STADLER, D. R. 1959a. Gene conversion of cysteine mutants in *Neurospora*. *Genetics* 44: 647-655.
- . 1959b. The relationship of gene conversion to crossing over in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)* 45: 1625-1629.
- & A. M. TOWE. 1971. Evidence for meiotic recombination in *Ascobolus* involving only one member of a tetrad. *Genetics* 68: 401-413.
- STRICKLAND, W. N. 1958. Abnormal tetrads in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Roy. Soc., B*, 149: 533-542.
- WHITEHOUSE, H. L. K. 1963. A theory of crossing-over by means of hybrid deoxyribonucleic acid. *Nature (London)*, 199: 1034.