

ESTUDIO SISTEMÁTICO Y BIOLÓGICO DE HYPOCREALES (ASCOMYCETES) DE ARGENTINA. III

CRECIMIENTO, DESARROLLO Y CITOLOGÍA DE *NEOCOSMOSPORA VASINFECTA*¹

POR MARIA DELIA BERTONI² y MARIA ESTHER RANALLI³

SUMMARY

Cultural behaviour of single-spore cultures demonstrate that the species is homothallic. The best inductive treatment for germination of ascospores was obtained with 0,2 % of OHNa and 24 hours incubation at 37° C, which gave an 90 % germination. Ontogenic studies showed that ascoarp development is of the *Nectria* type. Cytological studies are made in vegetative hypha and asci, showing that the chromosome number is *Ca. n = 6*. Mature ascospores are binucleate.

Neocosmospora vasinfecta E. F. Smith es un ascomycete homotálico, perteneciente al orden Hypocreales, familia Hypocreaceae, según la clasificación de Rogerson (1970). Existe como saprófito en suelo de áreas tropicales, subtropicales y templadas y en los tejidos de raíz y tallo de varias angiospermas (Mahoney, 1976).

Nuestra cepa fue aislada de una muestra de estiércol de caballo, coleccionada por J. E. Wright, J. Deschamps y E. del Busto, en el año 1972, en la estancia Sta. María, Mburucuyá, Corrientes.

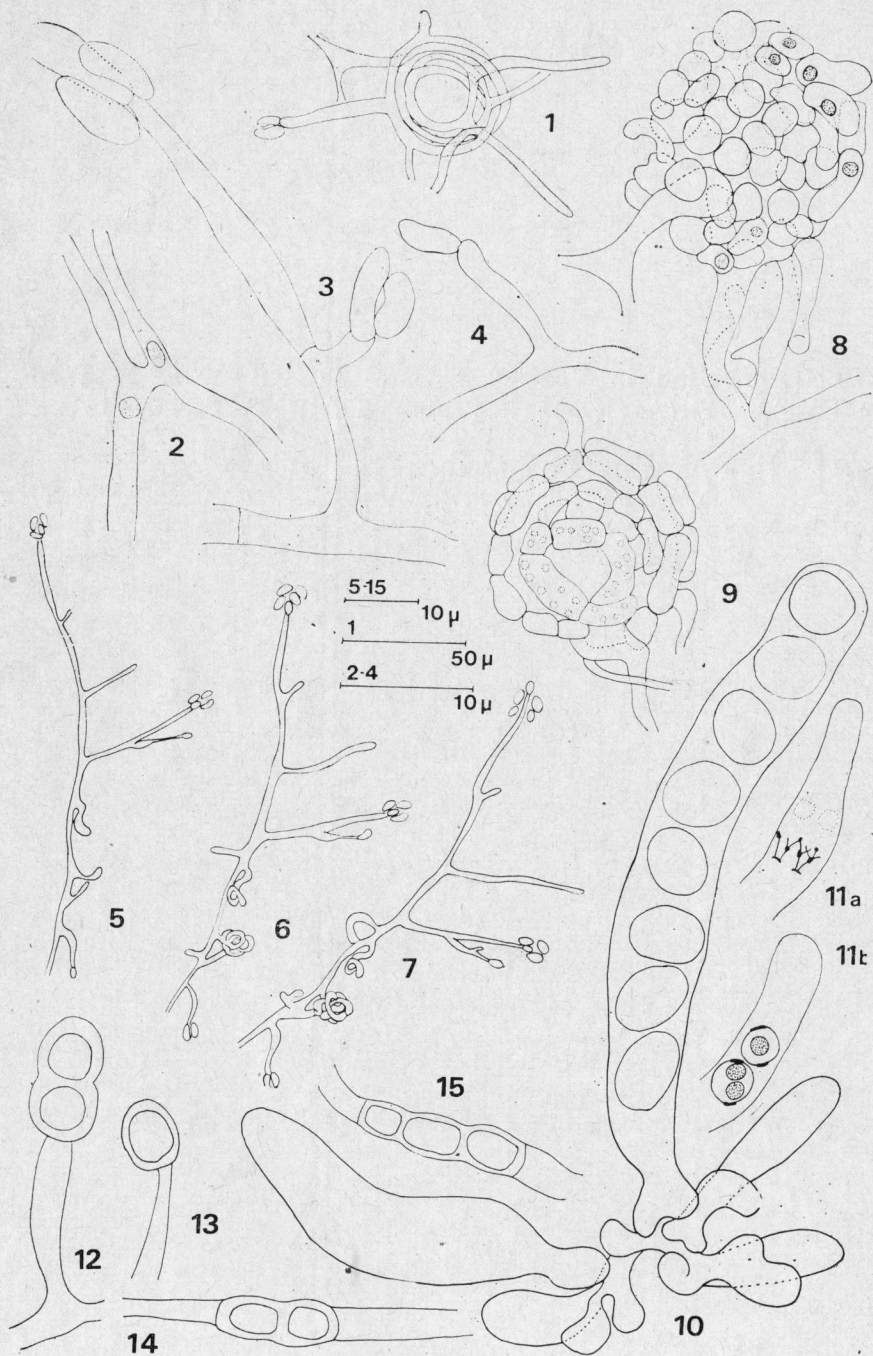
El presente trabajo forma parte del estudio de las Hypocreales de Argentina.

¹ Trabajo realizado en parte con un subsidio otorgado por el CONICET.

² Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

³ Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Carrera del Investigador Científico. CONICET.

Aceptado para su publicación: 23-V-1978.



MATERIALES Y METODOS

A partir del material original se preparó una cámara húmeda, que se mantuvo a temperatura ambiente y expuesta a las variaciones de luz del laboratorio. Al cabo de 7 días aparecieron sobre el estiércol primordios de peritecios que evolucionaron normalmente dando fructificaciones de color anaranjado-rojizo, que después de 15 días expulsaron las ascosporas formando cirros. A fin de obtener cultivos monospóricos, las ascosporas fueron transferidas a un tubo de ensayo con 5 ml de agua destilada estéril, volcadas en cajas de agar agua al 2% y mantenidas a temperatura ambiente. Después de 24 hs, se observó germinación y se hicieron cultivos monospóricos cortando ápices de hifas.

Para los estudios de crecimiento y desarrollo utilizamos los medios sólidos sintéticos y naturales usados por Mercuri y Ranalli (1976), en cámara de cultivo a 23° C y luz continua suministrada por 4 tubos de luz fría de 60 watt totales, durante 17 días.

Los métodos de fijación y coloración fueron los utilizados por Ranalli y Gamundi (1975) y la coloración según Rogers (1965) pero usando metanol como fijador (30 minutos).

Los estadios iniciales del desarrollo se observaron "in vivo" sobre micelio en agar agua al 2%. Las observaciones microscópicas se realizaron periódicamente y durante 3 días consecutivos. Las fotografías se sacaron colocando un cubreobjetos sobre el material para favorecer la nitidez, pero esto impidió que un mismo primordio fuese seguido a intervalos regulares de tiempo ya que el crecimiento en esas condiciones no prosigue normalmente, lo que significó que el estudio del desarrollo se completara sobre distintos primordios.

Los estadios finales se estudiaron realizando cortes con micrótopo de congelación, de material fijado en fijador de Newcomer (1953), a intervalos regulares de 24 hs y coloreados con floxina.

RESULTADOS

Colonia en APG⁴ que alcanza 7 cm de diámetro a los 17 días a temperatura ambiente (25-28° C). Micelio aéreo, algodonoso, con exudado rosado. Margen de la colonia sumergido, de 1-1,5 cm. Reverso amarillento con zonas pardas que corresponden a la ubicación de los peritecios. Peritecios anaranjado-parduscos, con cuello corto; crecen

Lám. 1. — Fig. 1: Anillo de hifas con conidióforo; Fig. 2: Anastomosis y núcleos; Fig. 3: Conidióforo maduro con masa de conidios; Fig. 4: Conidióforo joven; Figs. 5-7: Etapas sucesivas en la formación del primordio; Fig. 8: Primordio de peritecio con la capa externa con células uninucleadas; Fig. 9: Primordio con ascogonio; Fig. 10: Racimo de ascos; Fig. 11a: Rastros de centriolos en el ascó con 4 núcleos; Fig. 11b: Ascosporas jóvenes con centriolos asociados a su pared; Fig. 12: Clamidospora terminal, bicelular; Fig. 13: Clamidospora terminal, unicelular; Fig. 14: Clamidospora intercalar, bicelular; Fig. 15: Clamidospora intercalar, tricelular.

⁴ Para la composición de los medios de cultivo, ver Mercuri y Ranalli (1976).

agrupados y miden 312-405 x 234-280 μ . Ascospas cilíndricos, de 79-104 x 9,6-11,5 μ , con pie corto, dispuestos en racimos (Lám. 1, fig. 10). Ascospas globosas a subglobosas, de 9,7-10,5 x 9-9,7 μ , de pared rugosa, castaño claras, con gotas refringentes cuando jóvenes y con una gútula central cuando maduras; 8 por asco. Estado conidial tipo *Cephalosporium* (Lám. 1, fig. 3,4), con un conidióforo corto, de 34-47 x 2,4-3,2 μ , que surge del micelio, recto y simple, afinándose hacia el extremo donde sostiene la masa de conidios. Conidios elípticos, rectos o curvados, hialinos, uni a bicelulares (raro trichelulares) de extremos redondeados (Lám. 2, figs. 23, 25, 26), agregados en masas mucosas. Los unicelulares miden 6,5-13 x 2,4-4 μ y los bicelulares 11,4-17,9 x 3,2-4 μ . Clamidospas (sobre medio agar agua al 2%), hialinas o amarillo pálido, globosas u oblongas, terminales o intercalares, solas o en cadenas, lisas la mayoría pero algunas rugosas (Lám. 1, figs. 12-15), de 8,4-19,5 x 3,2-7,7 μ .

Nuestro material coincide con la descripción dada por Moreau (1953), von Arx et al. (1954), Doguet (1956), Udagawa (1963) y Bertoni et al. (1973) aunque presenta ligeras diferencias con respecto a las medidas.

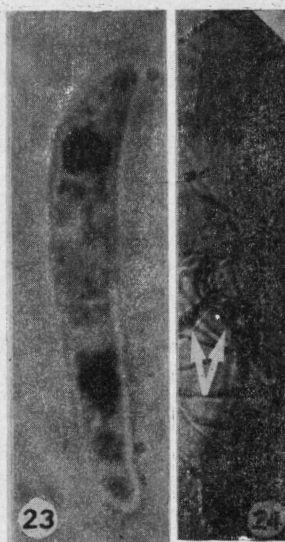
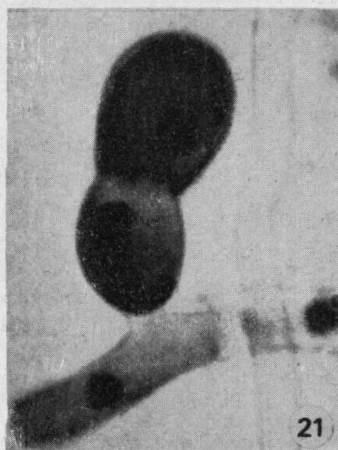
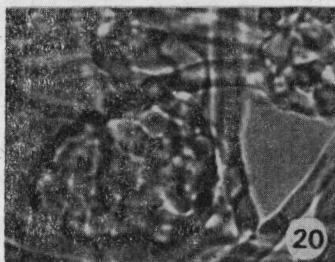
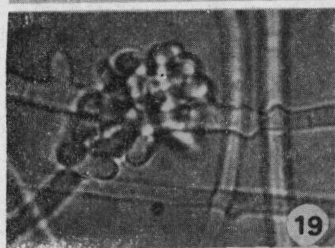
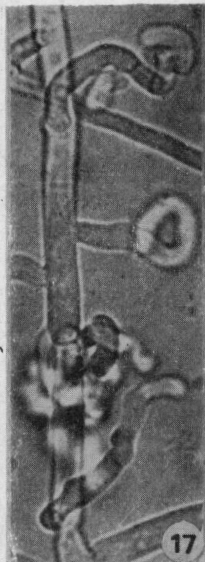
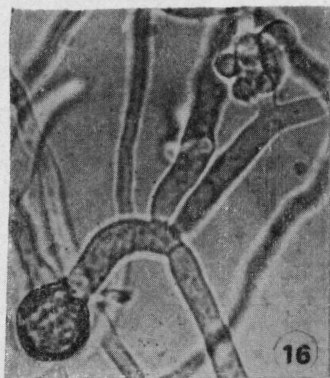
ESTUDIO DE CULTIVOS

Las ascospas sembradas sobre agar agua al 2%, se incubaron a temperatura ambiente y a 37° C. A las 16-19 hs germinaron en los dos tratamientos pero en un bajo porcentaje: 20% a temperatura ambiente y 46% a 37° C. Para obtener un mayor porcentaje de germinación se probó la inducción con soluciones de OHNa inmediatamente después de preparadas las cajas de dilución y otras dejando reposar a las esporas un tiempo antes del tratamiento, no observándose diferencias apreciables entre ambos.

Con tratamiento directo después de la dilución:

conc. OHNa	Tpo. de tratam.	Incub.	% G
0,05	30'	24 hs.	5
0,1	30'	"	86
0,2	15'	"	90
0,2	30'	"	83
0,3	15'	"	62
0,3	30'	"	53

Lám. 2. — Fig. 16: Ascospa germinada con inicial de ascogonio, x1000; Figs. 17, 18: Iniciales de ascogonio, x1000; Figs. 19, 20: Primordios jóvenes, x1000; Fig. 21: Clamidospa terminal, bicelular, con células uninucleadas, x2600; Fig. 22: Clamidospa intercalar, trichelular, con células uninucleadas, x2600; Fig. 23: Conidio bicelular, con células uninucleadas, x2600; Fig. 24: Anillo de hifas con 3 conidióforos saliendo del mismo, x260; Fig. 25: Conidio con un núcleo y conidio con dos núcleos antes de la formación del tabique, x2600; Fig. 26: Conidio unicelular, uninucleado, x2600. Coloración con Giemsa.



El mayor porcentaje de germinación se obtuvo con 0,2 % de OHNa, durante 15'.

Las ascosporas germinan, en agar agua, por un extremo emitiendo una hifa recta que pronto se ramifica (Lám. 2, fig. 16). Esta hifa principal tiene mayor grosor (3,2-5,7 μ) que las ramificaciones (1,6-2,4 μ) y posee en su citoplasma gran cantidad de gotas de aceite. El micelio crece rápidamente y al 2º día se observa la presencia de anillos de hifas, muy regulares en forma y tamaño (34,7-54 μ) que se presentan en casi todos los medios ensayados y que pueden o no llevar conidióforos en sus espirales (Lám. 1, fig. 1; Lám. 2, fig. 24). La mayoría de los conidióforos surgen sobre el micelio en los primeros 3 a 4 días de cultivo como una ramificación que evoluciona en una fiálide. Los conidios originados de esta fiálide se agrupan en el extremo y quedan embebidos en una gota de mucílago. Son uninucleados (Lám. 2, figs. 23, 25, 26). Esporádicamente se han observado conidios binucleados, pero consideramos que son estadios previos a la aparición de un tabique que determinará la formación de conidios bicelulares (Lám. 2, fig. 25).

El micelio presenta además clamidosporas; éstas pueden ser intercalares o terminales, solitarias o en cadenas de 2 ó 3 en Ma, CM y muy abundantes en agar agua al 2%. Son uninucleadas (Lám. 2, figs. 21, 22).

Las células del micelio son en general uninucleadas (Lám. 3, fig. 27), pero pueden hallarse algunas multinucleadas, con 7-8 núcleos (Lám. 3, fig. 28). Con Giemsa observamos figuras mitóticas típicas como ha sido citado por investigadores en otros grupos (Ward y Ciurysek, 1962; Huang et al., 1975; Huang, 1976).

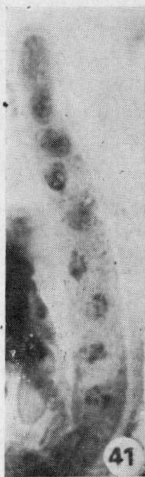
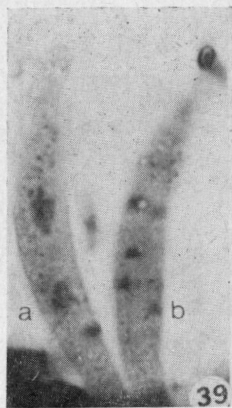
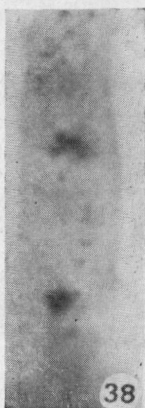
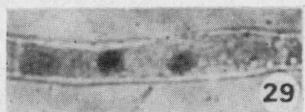
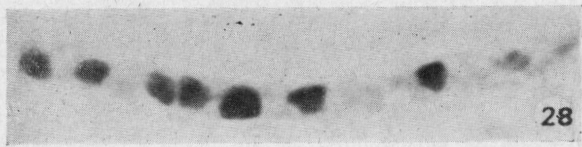
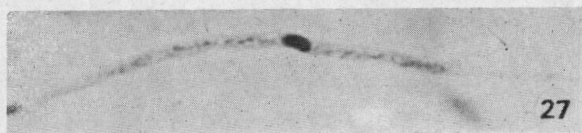
Se han observado anastomosis frecuentes entre hifas (Lám. 1, fig. 2) y conidios entre sí.

Cultivo en distintos medios variando las condiciones de iluminación

Se utilizó la cepa monospórica C⁵-1219 que fue sembrada en siete medios distintos. Las cajas se incubaron a 23° C durante 17 días en cámara de cultivos. Se realizaron dos series, una a oscuridad completa y la otra a luz continua.

⁵ C- colección de cultivos del Laboratorio de Micología del Dpto. de Cs. Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA).

Lám. 3.— Fig. 27: Hifa delgada con núcleo en interfase, x1300; Fig. 28: Hifa gruesa con 7 núcleos, x2600; Figs. 29, 31, 32: Figuras mitóticas en el micelio, 29, 31, x1300; 32, x2600; Fig. 30: Hifa ramificada con núcleos, x1300; coloración Giemsa. Fig. 33: Hifa ascógena con gancho, x1300; Fig. 34: Gancho con la célula madre del asco binucleada, x2600; Figs. 35, 36: Ascós jóvenes con núcleo en profase y nucleolo, x2600; Fig. 37: asco en Prometafase I, x2600; Fig. 38: anafase I, x2600; Fig. 39: profase II (a) y asco octonucleado (b), x1300; Fig. 40: Asco con 8 núcleos no alineados, x1300; Fig. 41: Asco con 8 núcleos en hilera, x1300; Fig. 42: Ascosporas binucleadas, x1300. Coloración con hematoxilina.



Los resultados obtenidos se consignan en el siguiente cuadro:

Medio	Luz continua		Oscuridad	
	Primordio	Maduración	Primordio	Maduración
CML	4°	8°-9°	4°-7°-8°	15°-16°
CM	3°-7°	13°-14°	11°-12°	14°-15°
Cz	4°-5°	10°	6°-7°	12°-13°
APG	4°-5°	9°	6°	13°-14°
SaM	5°	9°	6°-9°	18°
ACG	7°	15°	—	—
Ma	6°-7°	10°	—	—

Los números indican los días en que aparecen los primordios y se alcanza la maduración de los peritecios. Cada medio se controló con 10 cajas, 5 para observar el tiempo de aparición de los primordios y 5 para la maduración.

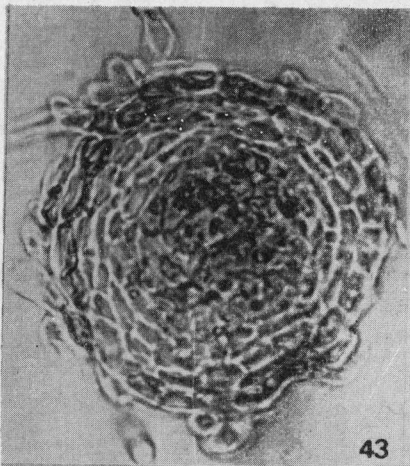
La colonia en CML, CM y Ma no presenta micelio aéreo, lo que permite visualizar fácilmente las fructificaciones. Para los estudios de desarrollo fue seleccionado CML por la cantidad de fructificaciones (estimado visualmente) que se desarrollan sobre ese medio. En los medios APG, Cz, SaM, ACG se presentan también abundantes fructificaciones, aún más que en CML, pero también gran cantidad de micelio aéreo que dificulta la observación del desarrollo. La luz demostró ser un factor importante en la producción de peritecios, ya que en condiciones de oscuridad no se producen en ACG y Ma, o en los que aparecen, la cantidad es menor y el período de maduración es más largo que a luz continua.

DESARROLLO Y CITOLOGIA

Desarrollo del peritecio

Al 3er. día de cultivo en agar agua, aparecen las iniciales del ascogonio como ramas cortas de hifas o conidióforos; crecen más o menos espiraladamente, se retuercen y terminan enroscándose sobre sí mismas

Lám. 4. — Fig. 43: Peritecio joven con ascogonio, x 1000; Fig. 44: Paráfisis apicales en empalizada, x 260; Figs. 45, 46: Estadios sucesivos con paráfisis apicales, desarrollo de ascos, parénquima subhimenial (señalado con la flecha), cuello y perífisis, x 260; Fig. 47: crecimiento de ascos y lisis de las paráfisis apicales, x 260; Fig. 48: Peritecio maduro, x 260; Fig. 49: Detalle de las paráfisis apicales formando un tejido, x 1000; coloración con floxina; Fig. 50: Filamentos de paráfisis uniseriados y uninucleados, x 1300. Coloración con hemátxilina.



43



45



46



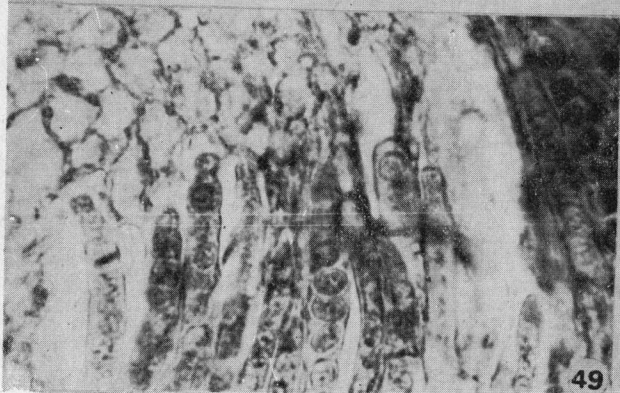
44



48



47



49



50

o con otra rama cercana (Lám. 2, figs. 17, 18). Así, en un período de 4 hs, se forma el primordio de peritecio (Lám. 1, figs. 5-7) que en sus comienzos es irregular y de carácter hifal (Lám. 2, figs. 19, 20) y mide 16-18 μ de diámetro. Con el paulatino crecimiento del mismo ocurre la diferenciación, adquiere forma globosa observándose en su parte interna el ascogonio (Lám. 1, fig. 9) como una tripa de 4-12 células multinucleadas, más o menos rectangulares, semejantes en tamaño, cuyo diámetro varía entre 2,6-3,9 μ . Cuando el primordio mide entre 60-70 x 62-73 μ , la zona central que contiene el ascogonio se colora intensamente con floxina y sus células poseen paredes delgadas. En la capa externa, pseudoparenquimatosa, las células tienen paredes gruesas y oscuras y son uninucleadas. Durante el desarrollo no fue observada la presencia de filamentos centrípetos que originan el parénquima subhiminal y las paráfisis apicales (Doguet, 1956).

En un estadio posterior, cuando las fructificaciones alcanzan 114-127 x 114-139 μ , se observa una zona central indiferenciada constituida por paráfisis apicales ordenadas en empalizada (Lám. 4, fig. 44) que a continuación se diferenciará en tres zonas: a) la superior con un tejido celular integrado por los filamentos de las paráfisis apicales; b) la intermedia, donde se hallan las hifas ascógenas; c) la inferior, el parénquima subhiminal, de 24-27 μ , constituida por dos o tres capas de células vacuoladas (Lám. 4, figs. 45, 46).

Las paráfisis apicales son filamentos uniseriados y uninucleados (Lám. 4, fig. 50), cuyas células miden 9,8-13 x 4,9-5,7 μ y forman una masa compacta que tiene la apariencia de un tejido pseudoparenquimático (Lám. 4, fig. 49).

Las hifas ascógenas de la zona central, desarrollan los ascos que crecen entre las paráfisis y como resultado de este crecimiento se produce la desintegración del tejido celular. Los ascos al crecer también comprimen el parénquima subhiminal que se transforma en una capa delgada.

En el estadio final, la fructificación es piriforme, ya se ha formado el cuello y las paráfisis, el centro está ocupado por los ascos y no se distingue parénquima subhiminal (Lám. 4, figs. 47, 48).

El patrón de desarrollo observado es "tipo *Nectria*" según la nomenclatura dada por Lutrell (1951).

Desarrollo de los ascos

No se pudo observar la producción de hifas ascógenas a partir del ascogonio, pero sí la modificación de estas últimas para dar origen a los ascos, mediante la formación de ganchos (Lám. 3, fig. 33). La penúltima célula de una hifa ascógena es la que da lugar al asco, mientras que la apical y la basal mantienen la potencialidad de dar nuevos

ganchos, quedando de este modo los ascos agrupados en racimos (Lám. 1, fig. 10).

Después de ocurrida la fusión de núcleos en la célula madre del asco que es binucleada (Lám. 3, fig. 34), el asco joven se alarga. Inicialmente es corto y ancho, de $9,4-26 \times 4-5,7 \mu$; su núcleo posee un nucleolo prominente, de $1,6 \times 2,6 \mu$ (Lám. 3, figs. 36, 37). Durante la profase de la 1ª división meiótica, el asco aumenta de tamaño (Lám. 3, fig. 37) alcanzando casi su longitud final. Se encontraron pocos ascos en metafase I, por lo que consideramos que es un etapa fugaz; aún así en ésta como en metafase II se contaron ca. $n = 6$ cromosomas. Doguet (1956) menciona que en el núcleo meiótico con la reacción de Feulgen se ponen en evidencia 6 a 8 "corpúsculos".

El eje de la 1ª división es paralelo al eje longitudinal del asco (Lám. 3, fig. 38). En la 2ª división el eje es ligeramente oblicuo con respecto al eje mayor y se obtienen 4 núcleos que están dispuestos de a dos lateralmente. Al finalizar esta división o al comienzo de la siguiente se observaron rastros de lo que podrían ser centriolos asociados a fibras del huso y a los cromosomas. Esta configuración fue observada dos veces y no pudo ser fotografiada (Lám. 1, fig. 11a).

La 3ª división da como resultado un asco con 8 núcleos no alineados, ya que el eje es oblicuo (Lám. 3, figs. 39,40). Estos núcleos se reacomodan formando una hilera continua dentro del asco (Lám. 3, fig. 41). Durante estos estadios los ascos miden $32,6-43,3 \times 5-6,5 \mu$.

Más tarde, alrededor de cada uno de los núcleos, se delimita el citoplasma formando las ascosporas, y cada núcleo sufre una división mitótica dando como resultado ascosporas binucleadas (Lám. 3, fig. 42). Asociados a la pared de las mismas se observó la presencia de cuerpos centriolares. Lu (1967) también observó la adherencia de los centriolos a la pared de la ascospora y supone que es posible que jueguen un rol en la delimitación de las mismas (Lám. 1, fig. 11b). Las ascosporas maduras son castaño claras y poseen exosporio rugoso. Trabajando con el microscopio electrónico de barrido, van Warmelo (1976) observó que la ornamentación de las esporas está formada por una red de anillos anastomosados sobre la superficie.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irma J. Gamundí por la lectura crítica del manuscrito y al Sr. Jorge Kikuchi por el copiado de las fotografías.

BIBLIOGRAFIA

- ÄRX, J. A. VON & MÜLLER, E., 1954. Die Gattungen der amerösporen Pyrenomyceten. *Beitr. Krypt. der Schweiz* 11: 1-434.
- BERTONI, M. D., GODEAS, A. M., LOEWENBAUM, M. E. y WRIGHT, J. E., 1973. Micoflora del suelo de la Argentina IV. Formas ascospóricas adicionales de la región chaqueña. *Bol. Soc. Arg. Bot.* XV (1): 93-105.
- DOGUET, G., 1956. Morphologie et organogénie du *Neocosmospora vasinfecta* E. F. Smith et du *Neocosmospora africana* von Arx. *Ann. des Sc. Nat. Bot.* 11 e serie, p. 353-370.
- HUANG, H. C. & TINLINE, R. D., 1975. Ultrastructure of somatic mitosis in a diploid strain of the pathogenic fungus *Cochliobolus sativus*. *Can. J. Bot.* 53 (4): 403-414.
- HUANG, L. H., 1976. Cytology of *Triangularia backussi*. *Mycologia* 68 (5): 984-993.
- LU, B. C., 1967. The course of meiosis and centriole behaviour during the ascus development of the ascomycete *Gelasinospora calospora*. *Chromosoma* (Berl.) 22: 210-226.
- LUTRELL, E. S., 1951. Taxonomy of the Pyrenomycetes. *Univ. Missouri Studies* 24 (3): 1-120.
- MAHONEY, D. P., 1976. A new *Neocosmospora* from Galapagos island soil. *Mycologia* 68 (5): 1111-1116.
- MERCURI, O. A. y RANALLI, M. E., 1976. Estudio sistemático y biológico de Hypocreales (Ascomycetes) de Argentina. I. *Protocrea latissima* sp. nov. Estudios de cultivo. *Physis* 35 (91): 303-317.
- MOREAU, C. y MOREAU, M., 1950. *Neocosmospora vasinfecta* E. F. Smith. Faux wilt du cotonnier. Fiches de Phytopathologie. *Rev. Mycol.* (Paris) 15 (suppl. 2): 1-5.
- NEWCOMER, E. H., 1953. A new cytological and histological fixing fluid. *Science* 11 (3058): 161.
- RANALLI, M. E. y GAMUNDI, I., 1975. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de la Argentina. VI. Morfología y desarrollo de *Saccobolus pseudopauperatus* sp. nov. Citología del asco. *Nova Hedwigia* 26: 737-763.
- ROGERS, J. D., 1965. The conidial stage of *Coniochaeta ligniaria*, morphology and cytology. *Mycologia* 57: 368-378.
- ROGERSON, C. T., 1970. The Hypocrealean fungi. *Mycologia* 62:865-910.
- UDAGAWA, S., 1963. *Neocosmospora* in Japan. *Trans. mycol. Soc. Japan* 4 (5): 121-125.
- WARD, E. W. y CIURYSEK, K. W., 1962. Somatic mitosis in *Neurospora crassa*. *Am. J. Bot.*, 49 (4): 393-399.
- WARMELO, K. T. VAN, 1976. Scanning electron microscopy of *Neocosmospora* ascospores. *Mycologia* 68 (6): 1181-1187.