

ESTUDIO SISTEMÁTICO Y BIOLÓGICO DE LAS ASCOBOLACEAS DE ARGENTINA

VII. DESARROLLO Y CITOLOGÍA DE *SACCOBOLUS CITRINUS* *

POR MARIA E. RANALLI ** Y FLAVIA FORCHIASSIN ***

SUMMARY

In the present contribution the life-cycle and cytology of ascus development of *Saccobolus citrinus* are studied. Cultural behaviour of single-spore cultures demonstrates that this species is homothallic. The best inductive treatment for the germination of ascospores was obtained with 0,2 % OHNa and 48 hs. incubation at 37° C, which gave a 84 % germination of 5 days old ascospores. Cytological studies are made in ascogonia, ascogenous hyphae and asci, showing that the chromosome number is $n = 8$. Mature ascospores are uninucleate.

Continuando con el estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina, nos referiremos en la presente contribución a *Saccobolus citrinus*, siguiendo la metodología empleada en trabajos anteriores.

Saccobolus citrinus Boud. & Torrend, Bull. Soc. Myc. Fr. 27: 131, pl. 6, fig. 1. 1911.

Apotecios: pequeños, solitarios o gregarios, superficiales, sésiles, al principio hialinos, luego amarillo-anaranjado intenso, tornándose ocre-amarillentos a medida que aumentan de tamaño, pudiendo observarse en vista superficial bajo la lupa áreas más intensamente pigmentadas que corresponden a los ápices de las paráfisis, que alternan con áreas incolores constituidas por los ascos inmaduros, dándole aspecto reticulado. Pulvinados cuando jóvenes, luego lenticulares; himenio convexo, del que sobresalen los ascos maduros de color castaño-rojizo debido a la

* Trabajo realizado en parte con un subsidio otorgado por el Consejo Nacional de Investigaciones.

** Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Carrera del Investigador Científico, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

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

presencia de las ascosporas maduras. Margen no diferenciado. Exteriormente glabros, consistencia carnosa y blanda. Diámetro: $160-752\ \mu$.

Ascos: octosporados, claviformes, afinándose hacia la base. Pared gruesa que da reacción positiva con Melzer, evidente sobre todo en ascos jóvenes. Apice truncado, opérculo central, pie bien diferenciado: $124-158 \times 25-33\ \mu$ (lám. II, fig. 3).

Paráfisis: muy abundantes, filiformes, pluriseptadas, simples o ramificadas, alcanzando cuando el apotecio madura la misma altura que los ascos. Células inferiores no pigmentadas, vacuoladas, mientras que las dos terminales contienen gran cantidad de pigmento responsable de la coloración de la fructificación. Diámetro $2,5-4\ \mu$ (lám. II, fig. 3).

Ascosporas: al principio libres en el asco, agrupándose a medida que maduran en paquetes más o menos cilíndricos, de $41,6-52 \times 14,5-18\ \mu$. Cuando jóvenes romboidales, con los extremos truncados, pared gruesa, angulosa en el límite con las otras ascosporas, siendo el contorno más recto en el lado libre. Al principio hialinas, luego de color violado intenso y finalmente castaño-rojizas, con episporio desde finamente rugoso hasta conspicuamente verrugoso, con verrugas formadas por la confluencia de otras más pequeñas, llegando a formar crestas y con grietas que forman un retículo continuo a través del episporio. Este se deposita como una cubierta continua sobre todas las esporas componentes del paquete de modo que no hay episporio individual. Las grietas longitudinales y transversales suelen anastomosarse entre sí formando un retículo. Hay mucílago que envuelve homogéneamente el paquete. Frecuentemente se encuentran pequeños gránulos de pigmento irregularmente distribuidos sobre el paquete e incluidos en el mucílago. Diámetro: $16,6-19,9 \times 7,4-9,9\ \mu$ (lám. II, fig. 5).

Excípulo: formado por células globosas en la parte central, alargándose hacia los bordes y dispuestas en empalizada semejando paráfisis, algunas con contenido intensamente colorado, con pigmento similar al de las paráfisis (lám. II, fig. 2).

Hábitat: fimícola, obtenido por nosotros en el laboratorio sobre estiércol de oveja, vaca y caballo.

Material estudiado: Buenos Aires, Sierra de la Ventana, leg. I. Gamundí, XII-1964, sobre estiércol de oveja colocado en cámara húmeda en el laboratorio a los dos años y después de 28 días de preparada la cámara húmeda. BAFC 22324, C-356; Chaco, Colonia Benítez, leg. M. Beroqui, XI-1967, sobre estiércol de vaca en cámara húmeda, a los 30 días de coleccionado. BAFC 22325, C-2265; Tucumán, Dique El Cadillal, leg. A. Godeas, VI-1971, sobre estiércol de caballo en cámara húmeda, a los seis meses de coleccionado. BAFC 24096, C-2453; Quebrada de Lules, leg. A. Godeas, VI-1971, sobre estiércol de caballo en cámara húmeda, a los seis meses de coleccionado. BAFC 24097, C-2452.

Observaciones: Hemos determinado nuestro material basándonos en la descripción de van Brummelen (1967: 174) hecha sobre el material tipo. Existe alguna diferencia con respecto al tamaño de las fructificaciones, que alcanzan un diámetro mayor en nuestras colecciones; además, el citado autor no menciona la presencia de grietas en el episporio tan evidentes en nuestro material. Sin embargo la descripción de la especie dada por Larsen (1970: 379) incluye el dato. Por lo demás, las restantes características coinciden plenamente con las de nuestro material.

ESTUDIOS DE CULTIVOS

Los estudios de cultivos se llevaron a cabo con la cepa C-356, observándose su comportamiento durante 2 años consecutivos. Los cultivos monospóricos se obtuvieron a partir de ascoporas recogidas en cajas de agar-agua al 2,5 % invertidas sobre las cámaras húmedas originales.

A medida que los cultivos sufren repiques sucesivos, se manifiesta en esta especie el mismo fenómeno de esterilización de la cepa que ya hemos mencionado para especies anteriormente estudiadas. Es necesario, en consecuencia, reaislar periódicamente la cepa a partir de ascoporas que pueden provenir de cultivos en estiércol (donde la esterilización es menos manifiesta) o bien de fructificaciones de cultivos anteriores que se conservan secos.

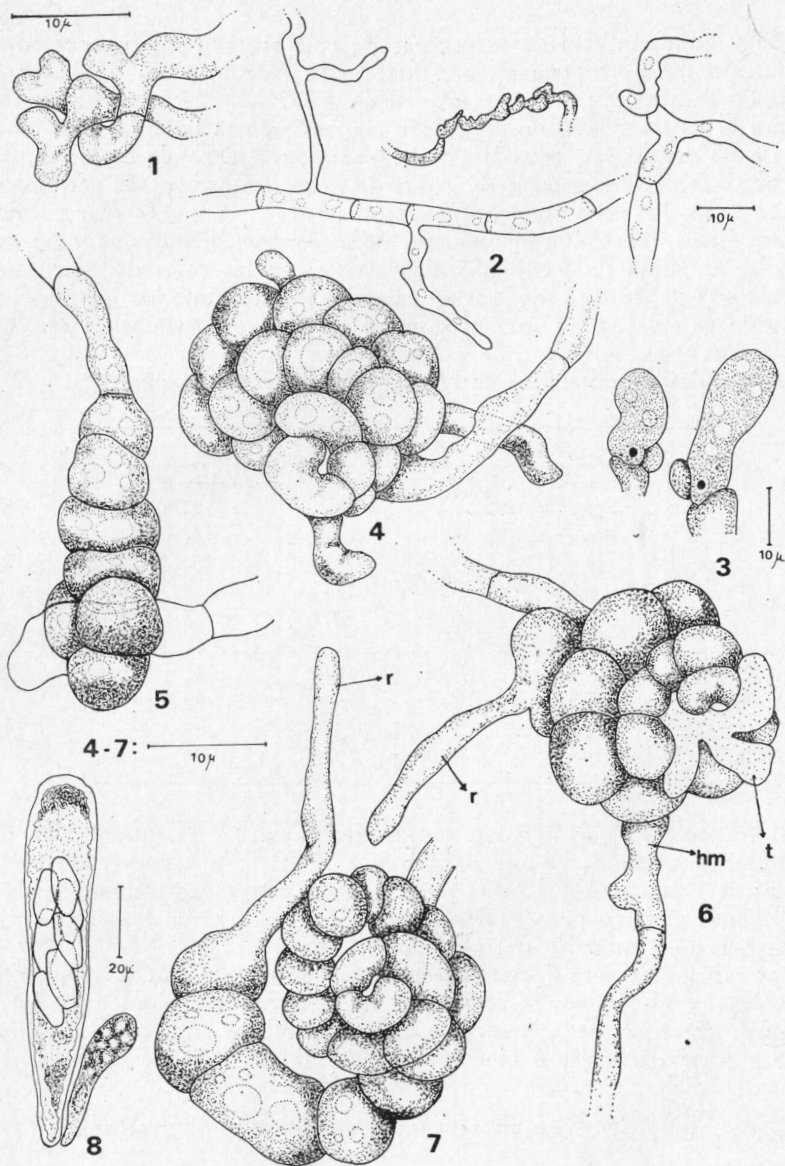
La longitud del período de fertilidad de las cepas se fue acortando con el transcurso del tiempo y los últimos ensayos debieron hacerse con aislamientos de no más de 15 días, ya que en cultivos de más edad el comportamiento fue completamente irregular.

a) GERMINACIÓN DE ASCOPORAS

Debido a que las fructificaciones obtenidas en medio "standard" (PF)¹ fueron poco abundantes, se usaron para el ensayo de germinación esporas recogidas en placas de agar-agua al 2,5 % provenientes de cultivos sobre estiércol de vaca tindalizado. Una vez recogidas, se dejaron a temperatura ambiente durante períodos que oscilaron entre 5 y 10 días, al cabo de los cuales no se observó germinación espontánea.

Se ensayaron entonces tratamientos inductores con soluciones de OHNa al 0,2, 0,3 y 0,4 % durante 30 a 40', utilizando esporas con 5 y 10 días de reposo. Los tratamientos del 0,4 %-30' y 0,3 %-40' con 5 días de reposo resultaron demasiado drásticos, obteniéndose muy poca germi-

¹ El medio "standard" (PF) consiste en: agar, 25 g, extracto de levadura Difco, 3 g, 1 disco de papel de filtro Carl Schleider and Schull N° 595, H₂O destilada, 1.000 cc; pH = 6,2-6,4 después de la esterilización.



Lám. I. — 1, iniciación del enrollamiento precursor de la formación del ascogonio alrededor del anteridio; 2, hifas vegetativas del micelio en cultivo en medio "standard" (PF); 3, ascos jóvenes formados a partir de hifas ascógenas, previa formación de ganchos; 4, ascogonio en cultivo de cinco días en medio "standard"; 5, estado inicial en la formación de un ascogonio alrededor del anteridio; 6, ascogonio de 23 μ de diámetro en cultivo de cinco días en medio "standard". Se observa el anteridio (t), la hifa madre del ascogonio (hm) y el tricogino terminal (r); 7, ascogonio con tres espiras y tricogino (r) bien diferenciado; 8, ascos jóvenes.

nación y gran cantidad de ascoporas en colapso, con las paredes rotas. La lectura del porcentaje de germinación se efectuó a las 48 horas de realizado el tratamiento, con incubación a 37° C. La germinación comienza a las 24 horas, observándose algunas puntas de hifas que emergen de las ascoporas, pero al ser incipientes, es imposible cortarlas para obtener cultivos monospóricos. A las 48 horas las ascoporas germinadas poseen tubos lo suficientemente desarrollados como para efectuar cultivos monospóricos. Se contaron paquetes de ascoporas germinadas y no germinadas en áreas de 3 cm² ubicadas al azar en las cajas de Petri, promediándose la lectura de varias cajas. El porcentaje de germinación obtenido es relativo ya que el número de esporas germinadas en cada paquete es variable, oscilando entre 2 y 4.

Los resultados obtenidos se consignan en el cuadro siguiente:

Días de reposo	Tratamiento			
	conc. de OHNa	tiempo	inc. a 37°C	porcentaje de germ.
5 días	0,2	30'	48 hs.	94
	0,3	30'	48 hs.	36
	0,3	40'	48 hs.	2
	0,4	30'	48 hs.	6
10 días	0,2	30'	48 hs.	69
	0,3	30'	48 hs.	6
	0,3	40'	48 hs.	7
	0,4	30'	48 hs.	8

El tratamiento más efectivo resultó ser el de 0,2 % durante 30' con posterior incubación durante 48 horas a 37° C, con esporas que tenían 5 días de reposo. Con 10 días de reposo, el mismo tratamiento también fue el más efectivo pero aparentemente la viabilidad de las esporas disminuye con el aumento del período de reposo.

Las ascoporas germinadas presentan el episporio aclarado, las paredes separadas y el contenido removido, no obstante no pierden la forma original. El tubo de germinación es generalmente sub-polar, ramificándose a corta distancia, o bien inmediatamente después de emerger.

b) CRECIMIENTO Y DESARROLLO EN MEDIO NUTRITIVO "STANDARD" (PF).

Se hicieron observaciones "in vivo" sobre cultivos monospóricos desarrollados en cajas de Petri, en cámara incubadora a 23° C y a luz continua suministrada por 8 tubos fluorescentes de luz fría de 20 W. El estudio del desarrollo del apotecio se complementó con observaciones de secciones realizadas con micrótopo de congelación, utilizando los métodos citados en Gamundí y Ranalli (1963: 394).

Caracteres macroscópicos de la colonia

Micelio rasante, denso en la zona central de la colonia, más abierto hacia los bordes. El contorno de la colonia es parejo, con las últimas ramificaciones de las hifas que llegan a la misma altura, crecimiento lento, alcanzando un diám. de 2,5-3,5 cm al 6º día de desarrollo, cuando comienzan a aparecer los primordios. El borde de la caja se alcanza recién entre el 13º y 14º día.

A medida que el cultivo envejece, el micelio se hace más algodonoso y es muy frecuente observar, en zonas localizadas del cultivo, preferentemente sobre el inóculo o en sus inmediaciones, la presencia de mechones de hifas que se elevan de la superficie de la caja, al principio blancos, tornándose blanco-amarillentos al envejecer el cultivo. La presencia de estos mechones de hifas está asociada invariablemente a una muy escasa producción de fructificaciones, y en algunos casos, a la total esterilidad del cultivo. Observados al microscopio, están constituidos por hifas más o menos paralelas que se disponen en forma compacta, elevándose por sobre la superficie del agar sembrando sinemas.

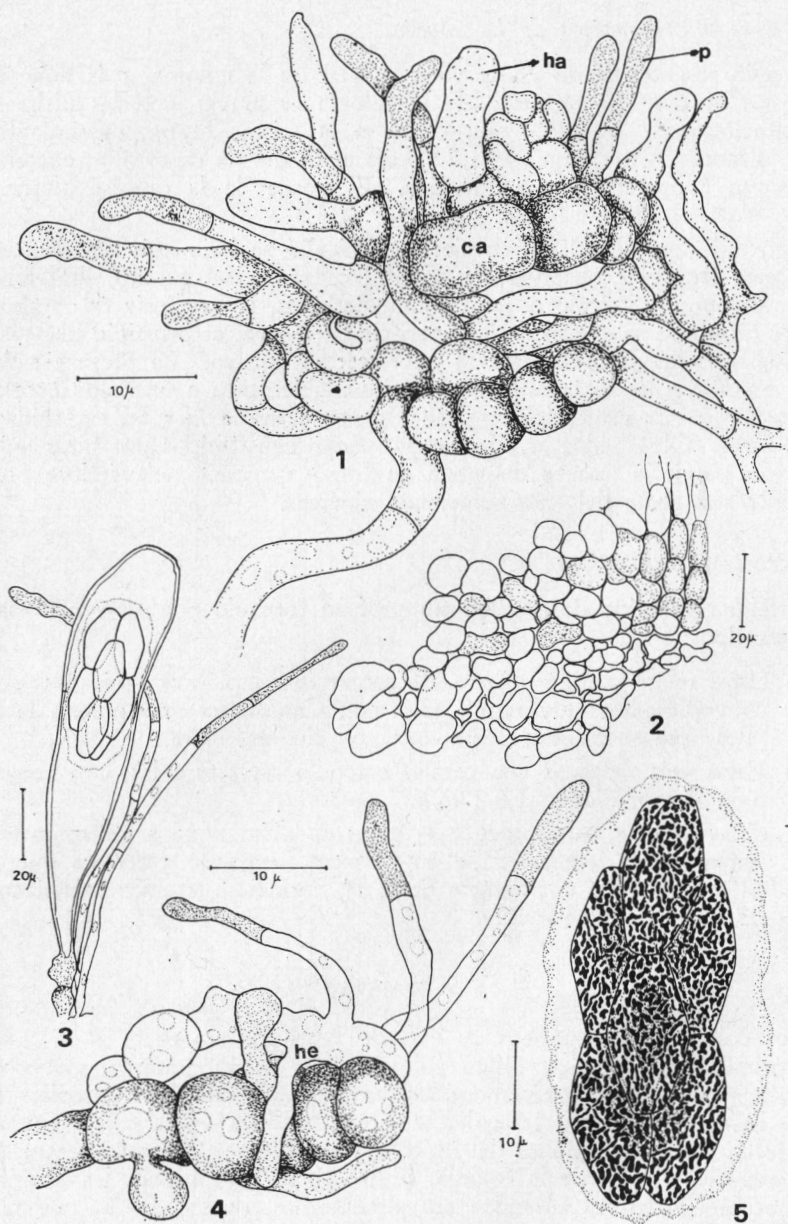
Caracteres microscópicos

Micelio sumergido de crecimiento profuso formado por hifas hialinas, de tres tipos:

- a) Hifas relativamente gruesas, de recorrido recto, muy tabicadas, poco vacuoladas, muy ramificadas, con abundantes anastomosis laterales, que se coloran débilmente con floxina, diám.: 3,7-4,5 μ .
- b) Hifas más delgadas con células catenuladas, retorcidas, con contenido denso, diám.: 1,6-2,08 μ .
- c) Hifas gruesas, que miden 8,3-10,4 μ de diám., que se tiñen intensamente con floxina, y se entrecruzan formando cordones que a su vez vuelven a trenzarse entre sí, formando grumos micelianos de espesor muy variable.

c) SEXUALIDAD

Los cultivos monospóricos en caja de Petri forman entre el 6º y 7º día primordios pequeños, difíciles de observar a ojo desnudo, globosos, al principio hialinos, semisumergidos en el agar, tornándose amarillos al poco tiempo. Aparecen irregularmente distribuidos en la caja, generalmente en las inmediaciones del inóculo y también en pequeños manchones hacia los bordes de la colonia. Entre el 10º y 13º días, las fructificaciones maduran, expulsando normalmente las ascosporas, lo que nos permite comprobar que la especie es homotálica.



Lám. II. — 1, protoapotecio de 50 μ de diámetro con hifas ascógenas (ha), células ascogoniales (ca) y jóvenes paráfisis (p); 2, células del excípulo; 3, asco maduro y paráfisis con células apicales intensamente coloradas; 4, comienzo del desarrollo de hifas envólventes (he) alrededor del ascogonio diferenciado; 5, paquete de esporas maduras con mucílago.

d) DESARROLLO DEL APOTECIO

El *periodo inicial*² es muy corto y comienza alrededor del 4º o 5º día, con la aparición de ascogonios circinoides formados por células globosas de $4-8\ \mu$ de diám., en número variable que describen de 2 a 3 vueltas y que alcanzan $23-30\ \mu$ de diám. Están sostenidos por una célula basal (lám. I, figs. 4-7), de naturaleza similar a las hifas vegetativas, pero algo más engrosada, con contenido muy denso. La célula terminal del ascogonio remata en un tricogino (lám. I, fig. 7r) muy bien desarrollado, con abundante contenido citoplasmático, sin vacuolas.

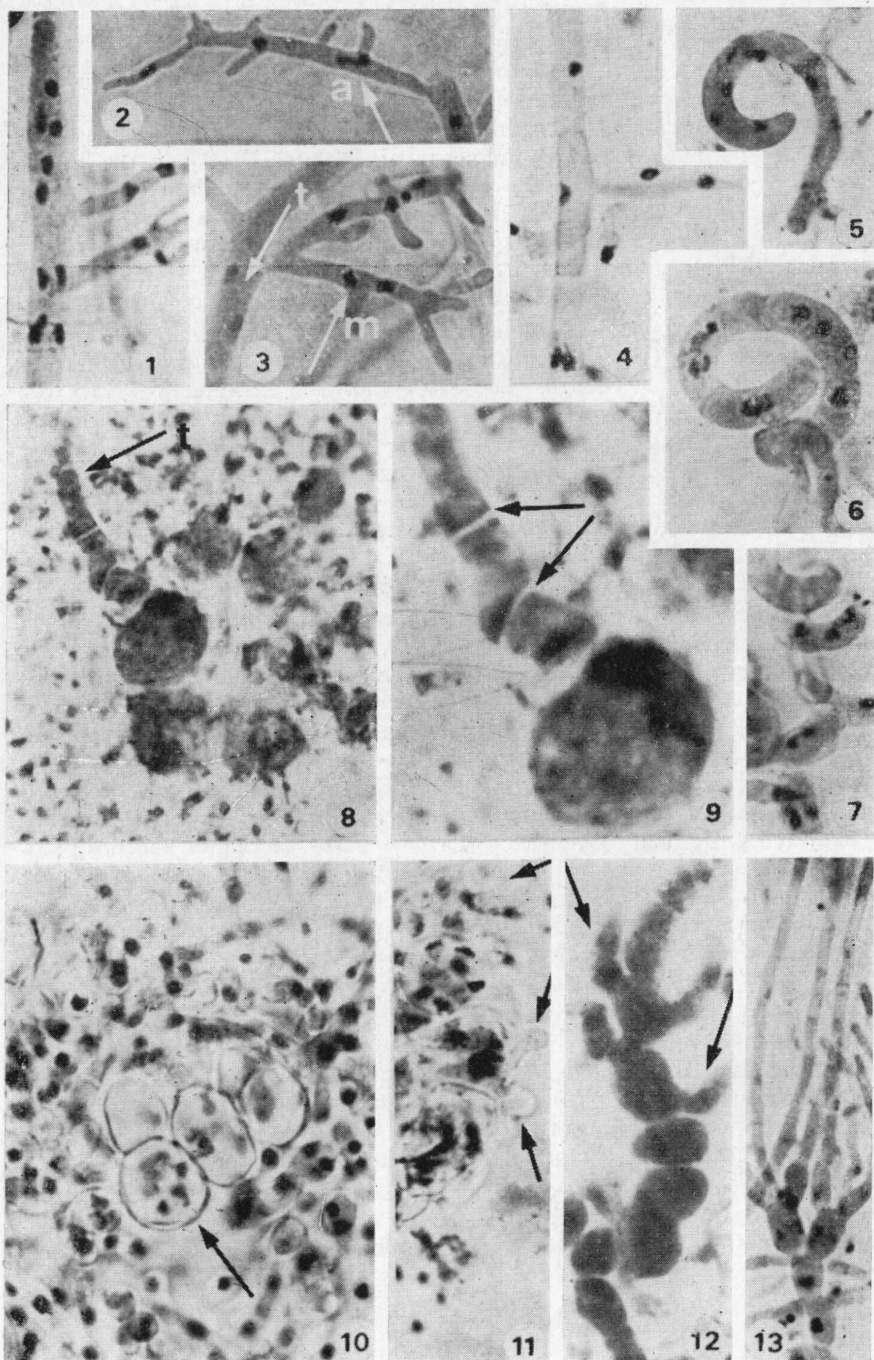
Las células ascogoniales comienzan su desarrollo envolviéndose alrededor de otra hifa (posiblemente el anteridio) (lám. I, figs. 1, 5), completando de 2 a 3 vueltas. Los ascogonios son terminales y una vez completamente diferenciados, comienzan a aparecer hifas que los envuelven parcial y laxamente (lám. II, fig. 4), algunas de las cuales son ramificaciones de la hifa madre del ascogonio. Al principio, estas hifas envolventes crecen centrípetamente hacia el ascogonio, pero luego se dirigen hacia arriba, distinguiéndose claramente de las células ascogoniales por su menor tamaño y su pared delgada. El diámetro de los protoapotecios en este estado varía entre 33 y $49\ \mu$.

El *periodo de diferenciación* comienza cuando los protoapotecios miden aproximadamente $50\ \mu$ de diám. (lám. II, fig. 1), ya se distinguen hifas ascógenas que nacen de las células ascogoniales centrales, y como dedos de guante, crecen hacia arriba y hacia afuera (lám. II, fig. 1, ha; lám. III, figs. 11, 12). Se observan también abundantes paráfisis, que presentan las células terminales coloradas, dispuestas en la parte superior del apotecio joven. Las hifas ascógenas se coloran intensamente con floxina o con azul láctico y rápidamente comienzan a formar ganchos ascógenos (lám. I, fig. 3; lám. III, figs. 14-19). A partir de dichos ganchos ascógenos se forman ascos del tipo pleurorrinco (según la terminología de Chadeaud, 1943: 77). En los ascos jóvenes, el núcleo único se dispone en la zona central, el contenido es granuloso, con vacuolas uniformemente distribuidas e intensamente carminófilico.

El *periodo de crecimiento* se superpone con el de diferenciación y y cuando el diámetro de los apotecios es de aproximadamente $100-130\ \mu$, las hifas envolventes que han seguido creciendo se entrelazan muy laxamente en la parte basal del apotecio, adquiriendo una "textura intricata laxa" y constituyendo ya un esbozo del excípulo. Los apotecios en este estado son casi totalmente superficiales, con el ascogonio ubicado en la zona central basal y con células ascogoniales aún persistentes.

En apotecios de $170\ \mu$ de diám., los ascos son aún uninucleados, alcanzando una altura máxima de $14\ \mu$, las paráfisis, que han seguido aumentando en número y en tamaño, sobresalen netamente sobre los ascos,

² Para nomenclatura de períodos de desarrollo ver Gamundí y Ranalli (1963).

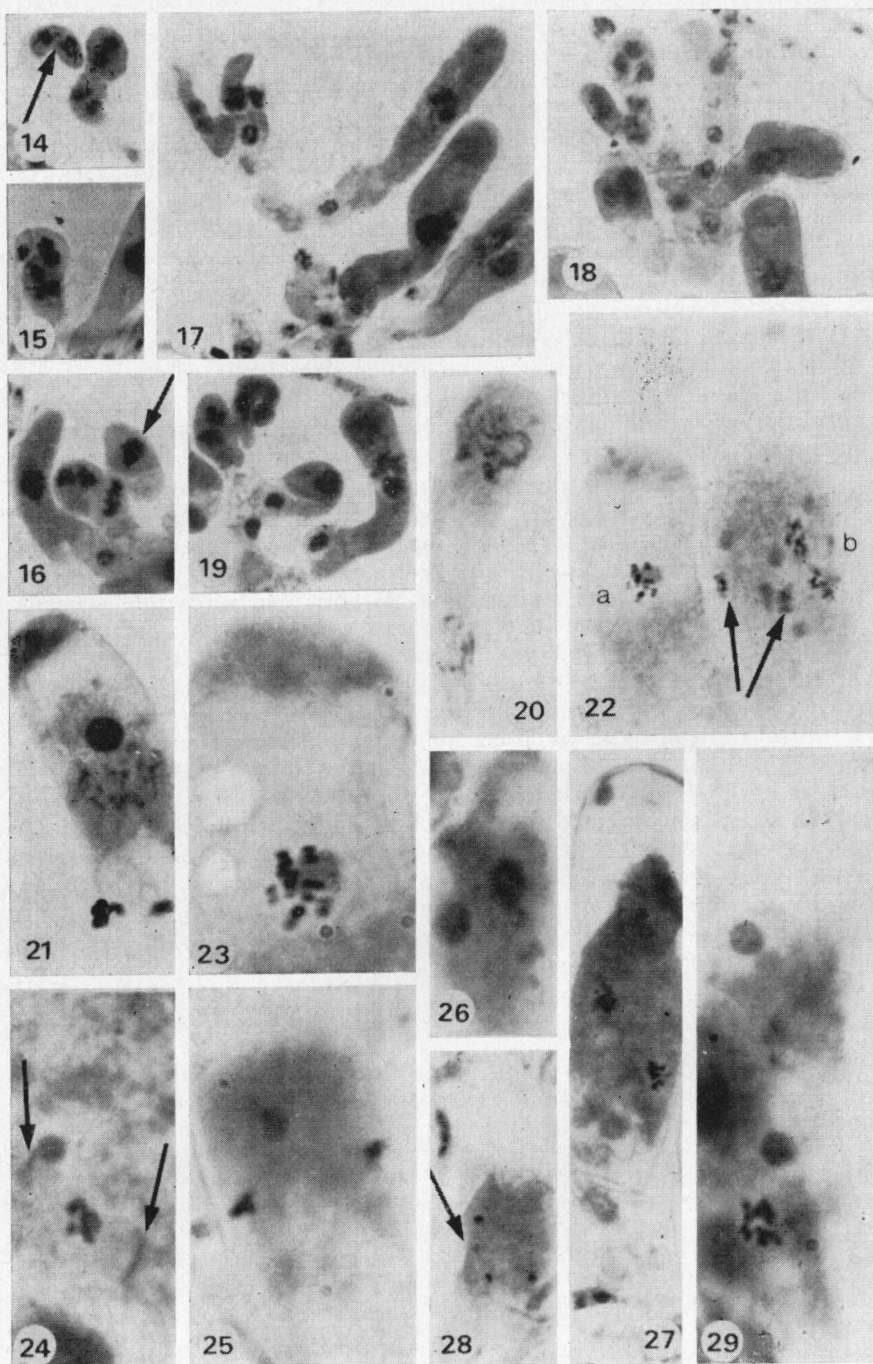


en la zona del borde del apotecio son más cortas y dispuestas más apretadamente que en la zona central. El excípulo ya está bien diferenciado, es de "textura globulosa" en la zona central, mientras que en la zona cortical las células son más alargadas, disponiéndose casi paralelamente y curvándose hacia arriba, rematando en las paráfisis que delimitan lateralmente el apotecio, sin que haya un margen diferenciado (lám. II, fig. 2). Muchas de estas células excipulares contienen abundante pigmento. A pesar de la diferente configuración de las células excipulares en la zona basal central del apotecio y en la zona cortical, no es posible distinguir claramente médula y corteza.

Desde el comienzo de su formación, las paráfisis poseen en sus células terminales abundante cantidad de pigmento amarillo-anaranjado en masa; amarillo-limón aisladas y son responsables de la coloración característica de la fructificación. La cantidad de pigmento presente está regulada por la cantidad de luz recibida. Las células basales son multinucleadas (lám. III, fig. 13).

Cuando los apotecios alcanzan $250\ \mu$ de diám., los ascos que aún no han comenzado a diferenciar las esporas miden como máximo $52\ \mu$, el contenido granuloso en la mitad superior se colora intensamente con azul láctico, floxina o carmín propiónico, mientras que en la mitad inferior presenta una gran vacuola. Las paráfisis aún sobresalen marcadamente por sobre el nivel de los ascos, y el subhimenio, bien diferenciado, es de "textura intricata". Cuando los apotecios alcanzan $300\ \mu$ de diám., alrededor del 10º día de desarrollo, los ascos que miden ya $96\ \mu$ comienzan a diferenciar las ascosporas, con paredes engrosadas en el ecuador y que se afinan hacia los extremos, uninucleadas, con contenido granuloso, al principio dispuestas en dos hileras más o menos paralelas entre sí, algo encimadas pero independientes unas de otras, ocupando prácticamente todo el asco. A medida que progresa el proceso de diferenciación, los ascos se van ensanchando y las ascosporas se ubican en la zona central agrupándose para formar el paquete. Al principio se disponen cuatro en un plano y cuatro en otro plano, luego los planos se yuxtaponen y las esporas se acercan más entre sí, para finalmente agruparse de acuerdo al patrón I de van Brummelen.

Lám. III. — 1, hifa vegetativa gruesa; 2, ápice de hifa en crecimiento con núcleos en división; *a*, núcleo en anafase; 3, hifa vegetativa con núcleos en división; *m*, metafase; *t*, telofase; 4, hifa vegetativa fina; 5, 6 y 7, distintos estadios en la formación de un ascogonio; 8, ascogonio mostrando tricogino (*t*); 9, detalle del tricogino mostrando sus tabiques; 10, corte de un protoapotecio joven mostrando el ascogonio central con células multinucleadas; 11, ascogonio mostrando iniciación de hifas ascógenas; 12, otro ascogonio aplastado en el que se observan hifas ascógenas saliendo de dos células; 13, paráfisis con células uninucleadas y células basales con número de núcleos variado. En todos los casos la coloración es Giemsa y el aumento $1300\times$, salvo la figura 9, $2600\times$.



Cuando los apotecios alcanzan $374\ \mu$ de diám., aparecen en vista superficial bajo la lupa como subglobosos, de color anaranjado intenso, con el himenio reticulado. En este estado la mayoría de los apotecios presentan ascos aún inmaduros, con las ascosporas hialinas, pero ya agrupadas en paquetes que ocupan la parte central de los ascos. Estos miden hasta $123\ \mu$ y han alcanzado la altura de las paráfisis. El excípulo tiene "textura globulosa" a "angularis", con la zona basal central lacunosa ya que las células ascogoniales han entrado en colapso.

El *periodo de maduración* comienza cuando los apotecios miden alrededor de $400\ \mu$ de diám., lo que ocurre generalmente alrededor del 13º día. Los ascos maduros emergen de la superficie del himenio apareciendo como puntos de color violado a castaño-rojizo, con las esporas en vías de maduración. Estas al principio son violado claras, luego violado intenso y finalmente castaño-rojizas, con el episporio surcado por grietas y formado por pequeñas verrugas aisladas o reunidas en hileras (lám. V, figs. 31, 32), con mucílago hialino que distribuido homogéneamente rodea completamente el paquete. Durante el proceso de maduración, los ascos pasan de cilíndricos a claviformes, achatándose en el ápice y con opérculo central. Cuando las ascosporas completan su maduración, se ubican en la zona superior del asco y finalmente son expulsadas con violencia. El tipo de desarrollo es, evidentemente, *paragimnohiménial*.

e) CULTIVO EN DISTINTOS MEDIOS VARIANDO LAS CONDICIONES DE ILUMINACIÓN

En esta experiencia se utilizó el aislamiento monospórico N° 5 de la cepa C-356. Se emplearon 30 cajas de Petri: 10 con medio nutritivo

Lám. IV. — 14, dangeardia joven con núcleos en división conjugada, $\times 1300$; 15, 16, 17, 18 y 19, distintos tipos de ramificación de hifas ascógenas y estadios en la formación de ascos, en la figura 16 se señala la célula madre del asco con los dos núcleos ya fusionados, $\times 1300$; 20, asco joven con núcleo en paquitene, $\times 1300$; 21, asco en diplotene difuso, nótese el nucleolo aún prominente, $\times 1300$; 22, a, asco en prometáfase I; b, asco en prometáfase III, 2 núcleos en un plano y 2 en otro, $\times 1300$; 23, el mismo asco de la figura 22 a con mayor aumento y donde se observan los cromosomas bien contráidos y de a pares, detrás aún perdura el nucleolo, $\times 2600$; 24, asco en metafase I, se señalan las 2 placas centriolares, $\times 2600$; 25, asco en anafase I, $\times 2600$; 26, asco con 2 núcleos, $\times 2600$; 27, asco con 2 núcleos, ambos en prometáfase, $\times 1300$; 28, anafase II, un núcleo fuera de foco, $\times 1300$; 29, otro asco con 2 núcleos, uno de ellos en prometáfase, $\times 2600$. En todos los casos la coloración es hematoxilina.

"standard" (PF); 10 con medio de Wood³ modificado y 10 con estiércol de vaca tindalizado (E) que se distribuyen en dos series, una que se mantuvo a luz constante y otra a oscuridad constante, con 5 cajas para cada uno de los medios. Ambas series se mantuvieron a 23° C en cámara incubadora, con luz suministrada por 8 tubos fluorescentes de luz fría de 20 W. La experiencia se dio por concluida a los treinta días y se repitió 3 veces, manteniéndose las mismas condiciones anteriores, pero utilizando cultivos monospóricos recientemente obtenidos a partir de esporas que se recogieron en el ensayo anterior. Los resultados se resumen en el siguiente cuadro:

Medio	luz continua				oscuridad			
	ap. de		mad. de		ap. de		mad. de	
	primordios		apotecios		primordios		apotecios	
	1)	2)	3)	4)				
PF	8°	14°	13°	19°	16°	19°	17°	21°
C	—	16°	—	19°	—	—	—	—
E	10°	13°	14°	16°	—	19°	21°	28°

1) Día en que aparecen los primordios en 2 cajas.

2) Día en que aparecen los primordios en 4 cajas.

3) Día en que maduran los apotecios en 2 cajas.

4) Día en que maduran los apotecios en 4 cajas.

El crecimiento miceliano es normal en todos los medios, con mayor formación de micelio aéreo tipo sinema en el medio de Wood (C), ya sea en oscuridad o en luz continua. La producción de fructificaciones es más abundante en estiércol, donde los apotecios son gregarios y distribuidos por toda la superficie, mientras que en PF aparecen localizados en ciertas zonas, principalmente alrededor del inóculo, y también en pequeños manchones irregulares cerca del borde de la colonia. El micelio alcanza el borde de la caja alrededor del 16° día. Las cajas con estiércol que produjeron apotecios con escasa maduración de ascosporas se dejaron una vez completado el ciclo, a temperatura ambiente y sometidas a la variación diurna de luz. En esas condiciones y después de 48 horas, los apotecios comenzaron a producir gran cantidad de ascos maduros que expulsaron normalmente las ascosporas. Considerando la posibilidad que en exceso de luz en la cámara pudiera ser el responsable

³ El medio de Wood modificado consiste en: Casamino acids, 0,2 g; carbonato de sodio, 0,5 g; fosfato de potasio dibásico, 0,5 g; glucosa, 0,5 g; extracto de levadura Difco, 4 g; trazas de sulfato de zinc y sulfato ferroso; agar, 25 g; H₂O destilada, 1.000 cc; 1 hoja de papel de filtro Carl Schleider and Schull N° 595. pH = 8 después de la esterilización.

del comportamiento anormal de los cultivos, se repitió nuevamente la experiencia utilizando los mismos medios, manteniendo la temperatura constante en 23° C, pero utilizando nada más que tres tubos fluorescentes de luz fría de 20 W y aumentando la distancia de las cajas a la fuente luminosa. Los resultados obtenidos se consignan en el siguiente cuadro:

Medio	luz continua				oscuridad			
	apar. de		mad. de		apar. de		mad. de	
	primordios		apotecios		primordios		apotecios	
	1)	2)	3)	4)				
PF	6°	8°	13°	14°	16°	19°	17°	21°
C	—	7°	—	15°	—	—	—	—
E	7°	9°	13°	15°	19°	20°	22°	23°

1) Día en que aparecen los primordios en 3 cajas.

2) Día en que aparecen los primordios en 5 cajas.

3) Día en que maduran los apotecios en 3 cajas.

4) Día en que maduran los apotecios en 5 cajas.

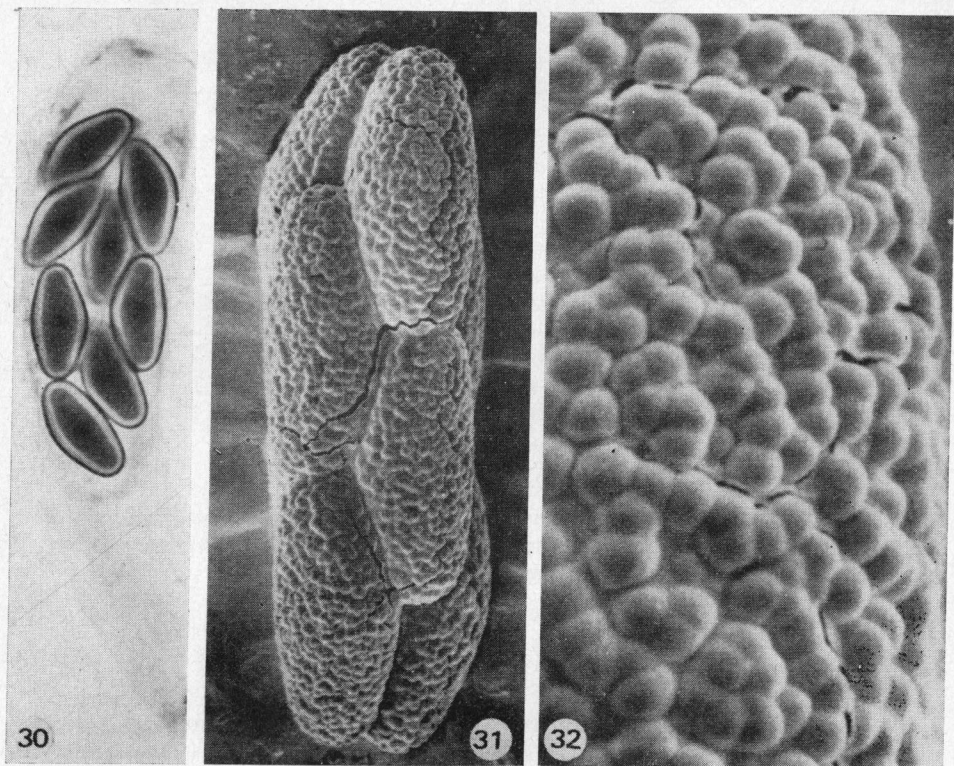
La experiencia se realizó como en los casos anteriores utilizando aislamientos monospóricos recientemente obtenidos y se repitió dos veces obteniendo en ambos casos, resultados coincidentes.

f) CITOLOGÍA

Las observaciones citológicas se hicieron en micelio vegetativo creciendo en medio nutritivo "standard" y en fructificaciones obtenidas sobre estiércol tindalizado y en medio "standard". Se utilizó Giemsa para micelio vegetativo y ascogonios, y hematoxilina para hifas ascógenas y ascos. Los métodos de fijación y coloración ya han sido descriptos previamente (Ranalli y Gamundí, 1975 b).

La observación microscópica del micelio vegetativo nos permite distinguir distintos tipos de hifas que difieren entre sí, no solo por el diámetro de sus células sino también por el número de núcleos. Las hifas gruesas poseen células de longitud variable entre 11-33 μ , y son multinucleadas (lám. III, fig. 1). Son estas las que originan ascogonios. Las hifas finas poseen células que miden entre 13-23 μ de longitud, son generalmente uninucleadas, a veces binucleadas, se ramifican profusamente y actúan como ligadoras entre las más gruesas. En estas hifas, pudimos observar la división de núcleos, que coincidentemente con lo observado por Ward y Ciurysek (1962) en *Neurospora crassa*, responde a una mitosis típica (lám. III, figs. 2, 3).

Los ascogonios, que se originan a partir de hifas gruesas, poseen generalmente un tricogino terminal (lám. III, figs. 8, 9), aparentemente no funcional (no hemos visto plasmogamia entre el tricogino y algún otro tipo de estructura). Las células ascogoniales son multinucleadas



Lám. V. — 30, asco con ascosporas uninucleadas ya formadas, hematoxilina, $\times 1300$; 31, paquete de ascosporas maduras, mostrando grietas, $\times 3000$; 32, detalle de la ornamentación de las esporas, $\times 10000$; 31 y 32, con microscopio electrónico de barrido (MEB), realizado en el servicio de microscopía electrónica de barrido del Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

(lám. III, figs. 5, 6, 7, 10) y sus núcleos se dividen activamente durante la maduración. A diferencia de lo que hemos observado en *Ascobolus biguttulatus* (Ranalli y Gamundí, 1975 a), más de una célula ascogonial actúa como célula ascógena, hecho coincidente con lo descrito para *Saccobolus pseudodepauperatus* (Ranalli y Gamundí, 1975 b). Generalmente las hifas ascógenas emergen de por lo menos dos células

ascogoniales centrales (lám. III, figs. 11, 12). A estas hifas ascógenas migran pares de núcleos, que se dividen sincrónicamente a medida que el sistema ascógeno se ramifica profusa y variadamente (lám. IV, figs. 16, 17, 18, 19) tal como Wilson (1952) observara en *Pyronema confluentis*. A partir de estas hifas ascógenas se originan los ascos que derivan de la penúltima célula binucleada de un gancho típico (lám. IV, figs. 14, 15). La cariogamia se produce allí rápidamente, antes de que comience a alargarse el asco (lám. IV, fig. 16). En este estado, los cromosomas están muy contraídos y hay un único nucleolo como consecuencia de la fusión de los nucleolos de los núcleos haploides. El joven asco aumenta rápidamente de tamaño y en paquitene (lám. IV, fig. 20) el nucleolo es prominente, se tiñe intensamente y alcanza en este estado su mayor tamaño, para luego disminuir, persistiendo aún en telofase I. Después de paquitene, los cromosomas se extienden y es mucho más difícil su tinción, entrando en el estado de diplotene difuso (lám. IV, fig. 21). El asco sigue aumentando de tamaño y el nucleolo disminuye. El eje de la primera división es transversal al eje principal del asco aunque a veces se ubica oblicuamente. Las placas centriolares han podido observarse (lám. IV, fig. 24). Se han encontrado numerosos ascos en prometafase I (lám. IV, fig. 23) y hemos podido contar allí 8 pares de cromosomas ($n = 8$), sumamente contraídos. Ascogonios en anafase I y telofase I son muy poco frecuentes, por lo que suponemos que ambos estados son fugaces (lám. IV, fig. 25).

Ascogonios en interfase II (lám. IV, fig. 26) no son frecuentes y ambos núcleos entran rápidamente en la segunda división. Pueden dividirse sincrónicamente (lám. IV, figs. 27, 28), pero es frecuente encontrarlos también en distintas etapas (lám. IV, fig. 29).

De la tercera división, la metafase parece ser muy larga (lám. IV, fig. 22), ya que se encontraron numerosos ascogonios en este estado. Nuevamente el aparato centriolar, que se visualizó en la división I, es perfectamente distinguible. Completada la telofase el citoplasma del asco se delimita alrededor de cada uno de los 8 núcleos, organizándose las 8 ascogonios uninucleadas (lám. V, fig. 30). Desde prometafase I hasta telofase III el asco no aumenta de tamaño, después de la diferenciación de las ascogonios y hasta su maduración, se agranda notablemente.

CONCLUSIONES

El desarrollo de *Saccobolus citrinus* responde al tipo que van Brummelen (1967) denomina "paragimnohiménial" y coincide con lo observado por nosotros en especies del mismo género anteriormente estudiadas. De los factores externos que se variaron y que afectaron la producción de fructificaciones, la luz fue el más importante.

Saccobolus citrinus demostró tener límites mínimos y máximos por fuera de los cuales las fructificaciones o no se producen o son anormales.

En medio (C) no fructificó en oscuridad continua, mientras que en PF y E completó el ciclo normalmente. Este resultado es interesante, sobre todo si tenemos en cuenta que el medio (C) es similar al medio PF, del que difiere por el agregado de caseína hidrolizada, sales y glucosa. ¿Cuál es la causa entonces de que en ausencia de luz no se formen fructificaciones en este medio y en PF si? Podríamos aventurar dos posibilidades: a) la formación por parte del micelio que crece en medio (C) de una o más sustancias fotolábiles que inhiban el desarrollo de las fructificaciones; b) que la luz sea indispensable para que *Saccobolus citrinus* creciendo en medio (C) pueda completar las reacciones necesarias para la síntesis de sustancias específicas sin las cuales las fructificaciones no se producen.

A altas intensidades de luz el hongo no fructifica o si lo hace, las fructificaciones no son normales. Otra característica influenciada por la luz, es la cantidad de pigmento depositado en las paráfisis, y que es responsable del color de las fructificaciones. Cultivos mantenidos en oscuridad completa, producen fructificaciones apenas coloradas, mientras que en luz continua son anaranjado intensas.

Las esporas no requieren período de reposo para germinar, por el contrario, su viabilidad disminuye con la edad.

Desde el punto de vista citológico, las secuencias observadas durante el desarrollo de los ascos, obedecen al patrón general que ha sido descripto para otros ascomicetes por numerosos autores (Carr y Olive, 1958; Singleton, 1953; Rogers, 1965, 1970; Zuk y Swietlińska, 1965; Zickler, 1967; Kish, 1974). De la misma forma que en *Saccobolus pseudodepauperatus* (Ranalli y Gamundí, 1975 b), el estadio encontrado con mayor frecuencia corresponde a paquitene, en el que los cromosomas se tiñen muy bien y los homólogos apareados son bien visibles. Anafase I y telofase I son poco frecuentes y por lo tanto pensamos que son etapas fugaces. En prometafase I pudimos contar con bastante claridad 8 bivalentes, hecho coincidente con lo visto en *Saccobolus pseudodepauperatus*. En ambos casos el eje de la primera división es transversal al eje principal del asco. Un hecho que hemos observado en las especies de *Ascobolus* y *Saccobolus* estudiadas hasta ahora y en las que se encuentran en estudio en nuestro laboratorio nos parece interesante, y es que en *Ascobolus* una única célula del ascogonio, generalmente ubicada centralmente, es la que produce hifas ascógenas, mientras que en *Saccobolus* estas se producen en varias células ascogoniales.

AGRADECIMIENTOS

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

BIBLIOGRAFIA

- VAN BRUMMELEN, J., 1967. A world monograph of the genera *Ascobolus* and *Saccobolus* (Ascomycetes, Pezizales). *Persoonia Suppl.*, 1: 1-260.
- CARR, A. J. H. y L. S. OLIVE, 1958. Genetics of *Sordaria fimicola*. II. Cytology. *Am. J. Bot.* 45: 142-150.
- CHADEFAUD, M., 1943. Sur les divers types d'éléments dangeardiens des Ascomycetes et sur la formation des asques chez la pézize *Pustularia catinus*. *La Révue Scient.* 81: 77-80.
- GAMUNDI, I. J. y M. E. RANALLI, 1963. Apothecial development of *Ascobolus stercorarius*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 46 (3): 393-400.
- KISH, L. P., 1974. Culture and cytological development of *Coprotus lacteus* (Pezizales). *Mycologia* 66 (3): 422-435.
- LARSEN, K., 1970. The genus *Saccobolus* in Denmark. *Botanisk Tidsskrift*, 65 (7): 371-389.
- RANALLI, M. E. e I. J. GAMUNDI, 1975a. *Ascobolus biguttulatus* sp. nov. (Ascomycetes, Pezizales). Estudios de cultivo y citología. *Physis, Secc. C* 34 (88): 1-15.
- 1975b. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. VI. Morfología y desarrollo de *Saccobolus pseudodepauperatus* sp. nov. Citología del asco. *Nova Hedwigia* 26 (4): 737-763.
- ROGERS, J. D., 1965. Hypoxylon fuscum. I. Cytology of the ascus. *Mycologia* 57: 789-803.
- 1970. Cytology of *Poronia oedipus* and *P. punctata*. *Can. J. Bot.* 48 (9): 1665-1668.
- SINGLETON, J. R., 1953. Chromosome morphology and the chromosome cycle in the ascus of *Neurospora crassa*. *Am. J. Bot.* 40: 124-144.
- WARD, E. W. B. y K. W. CIURYSEK, 1962. Somatic mitosis in *Neurospora crassa*. *Am. J. Bot.* 49 (4): 393-399.
- WILSON, I. M., 1952. The ascogenous hyphae of *Pyronema confluens*. *Ann. Bot. (London)*, N. S. 16: 121-138.
- ZICKLER, D., 1967. Analyse de la méiose du champignon Discomycete *Ascobolus immersus*. *Pers. C. R. Acad. Sci. Paris, Serie D*, 265: 198-201.
- ZIK, J. y Z. SWIETLINSKA, 1965. Cytological studies in *Ascobolus immersus*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 34 (2): 171-179.