

ESTUDIO SISTEMÁTICO Y BIOLÓGICO DE LAS ASCOBOLACEAS DE ARGENTINA. IV

POR MARIA E. RANALLI¹ Y RONAN O. CINTO²

SUMMARY

The present contribution deals with life cycle of *Ascobolus albidus* Cr. The best inductive treatment for germination of ascospores was obtained with 0.4 % OHNa and 48 hours incubation at 37° C, which gave an 80 % germination of ascospores derived from cultures in sterilized cow dung. Sexual behaviour of single-spore cultures demonstrated that the fungus is heterothallic. Ontogenetic studies showed that ascocarp development is "cleistohymenial" and that it opens at late "mesohymenial phase". Comparative essays of growth and development in different media demonstrated that light influences ascocarp morphology and type of development as well as pigmentation of ascospores.

INTRODUCCION

Con anterioridad al presente trabajo, fueron publicadas otras tres contribuciones de esta serie en Nova Hedwigia, VII (3/4): 517-533, 1964; X (3/4): 339-366, 1966 y XVII: 383-407, 1969, en las cuales se encaró el estudio del ciclo de vida de *Ascophanus carneus* (Pers. ex Fr.); tres especies del género *Ascobolus* y tres especies del género *Saccobolus*. En la presente contribución nos referiremos al ciclo biológico de *Ascobolus albidus* Crouan.

El género *Ascobolus* fue creado por Persoon en 1791 y en él se agrupó a cierto número de Discomycetes, la mayoría coprófilos. Boudier (1869) fue el primero que logró introducir cierto orden entre las numerosas y heterogéneas especies que constituían el género, fundando la tribu *Pseudoascoboleae* para las especies con ascosporas incoloras. Dentro de la tribu *Ascoboleae* ubicó los géneros *Ascobolus* y *Saccobolus*, caracteri-

¹ Profesora adjunta en el Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; miembro de la "carrera del investigador científico", Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

² Profesor adjunto en el Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

zando a este último por la presencia de ascosporas agrupadas en paquetes octosporados en la madurez, mientras que quedaban incluidas dentro del género *Ascobolus* aquellas especies con esporas coloradas y separadas entre sí dentro del asco. Son además, caracteres que definen al género: apotecios generalmente pequeños (no más de 1000 μ de diámetro en la mayoría de los casos), cupuliformes, subglobulares, muy rara vez lenticulares, hialinos a verde-amarillentos, superficiales o parcialmente sumergidos en el sustrato, glabros, vellosos o furfuráceos, de consistencia carnosa-blanda, con la superficie himenial plana a convexa; ascos maduros emergiendo por sobre el nivel de las paráfisis, claviformes a sub-cilíndricos, con ascosporas dispuestas en dos series o en forma irregular, siempre libres, con mucílago individual lateral o rodeándola uniformemente; paráfisis filiformes incluidas dentro de una sustancia mucilaginoso incolora o débilmente colorada. Van Brummelen (1967: 63-64) divide al género *Ascobolus* en VII secciones, de acuerdo con lo que él considera un criterio natural, opinión compartida por nosotros, y que es su *tipo de desarrollo*, avalado por otros caracteres macro y micromorfológicos, tales como la ornamentación de las esporas, forma de la fructificación, tipo de pigmento himenial, forma de los ascos, etc.

Creemos conveniente presentar aquí una traducción de la clave confeccionada por van Brummelen, que nos permitirá visualizar rápidamente, los caracteres sobresalientes de las distintas secciones.

“I. Ascoma¹ cleitohimenial². Excípulo de “textura angularis”, “globulosa” o “epidermoidea” en vista superficial.

2. Ascoma abriéndose en la fase telohimenial³ o raramente totalmente cerrado; sumergido o superficial, nunca estipitado, la superficie frecuentemente cubierta con hifas gruesas apretadas; diámetro raramente superior a 1 mm. Ascosporas elipsoidales o raramente sub-globulares. Ascos claviformes a subcilíndricos, con ápice en forma de domo. Episporio liso, granulado o verrugoso, algunas veces con grietas irregulares, nunca con un patrón de estrías anastomosadas. Fimícola.

I. *Ascobolus* sect. *Dasyobolus*

2. Ascoma abriéndose en la fase mesohimenial, superficial, liso o furfuráceo, algunas veces cubierto con finas hifas en la parte inferior, o con micelio secundario cerca de la base. Diámetro 0,3-12 mm. Ascosporas elipsoidales, sub-globulares o globulares. Ascos sub-cilíndricos. Episporio con estrías anastomosadas, con una red de estrías, o verrugoso, raramente liso o granular:

3. Ascoma abriéndose en la fase mesohimenial tardía, diámetro 0,3-1,5 mm. Ascosporas globulares. Episporio con verrugas redondeadas. Ascos claviformes, cilíndricos o cilíndrico-claviformes.

II. *Ascobolus* sect. *Sphaeridiobolus*

¹ Ascoma = ascocarpo: término general que se emplea para denominar a la fructificación fúngica que lleva ascos.

² Las definiciones de los términos empleados por van Brummelen para los distintos tipos de desarrollo del ascocarpo están dados en Gamundí y Ranalli (1969: 390).

³ Para equivalencias de nomenclatura de los períodos de desarrollo ver Gamundí y Ranalli (1969: 390).

3. Ascoma abriéndose en la fase mesohiménial temprana o media. Diámetro 0,3-12 mm. Ascosporas elipsoidales, fusiformes, subglobulares o globulares. Episporio con estrías anastomosadas, con una red de estrías o verrugas, raramente liso o granulado. Si las ascosporas son globosas el episporio no tiene verrugas redondeadas. Ascosp. cilíndrico-claviformes.

III. *Ascobolus* sect. *Ascobolus*

- I' Ascoma eugimnóhimenial o paragimnóhimenial. Excípulo frecuentemente con otro tipo de textura.

4. Ascoma paragimnóhimenial, con el hábito de *Ascodesmis*; muy pequeño, 0,1-0,5 mm de diámetro. Ascosp. relativamente cortos; la pared no se tiñe con Melzer. Ascosp. globosas o sub-globosas. Episporio consistiendo en un retículo de pigmento. Fimícola.

IV. *Ascobolus* sect. *Pseudoascodesmis*

4. Ascoma paragimnóhimenial o eugimnóhimenial; pequeños o grandes; 0,3-30 mm diám. La pared del asco da reacción amiloide con Melzer. Ascosp. elipsoidales, sin un retículo de pigmento:
5. Ascoma paragimnóhimenial o eugimnóhimenial, con el hábito de *Saccobolus*. Ascosp. cortos, de base ancha; ascosp. fusiforme-elipsoidales frecuentemente con extremos romos y asimétricas. Episporio al principio liso o granulado, luego con una red de finas crestas o verrugas. Paráfisis con contenido amarillento. En lugares quemados.

V. *Ascobolus* sect. *Pseudosaccobolus*

5. Ascoma eugimnóhimenial, no con el hábito de *Saccobolus*. Ascosp. oblongo-claviformes a cilíndrico-claviformes. Ascosp. simétricas, elipsoidales, sin tendencia a agregarse. Paráfisis sin contenido colorado:

6. Apotecios pequeños, hasta 1 mm diám.; sin zona de crecimiento marginal. Excípulo pobremente desarrollado. Episporio equinado o verrugoso.

VI. *Ascobolus* sect. *Heimerlia*

6. Apotecios grandes o medianos; 0,8-30 mm diám.; presencia de zona de crecimiento marginal con marcada actividad. Excípulo bien desarrollado. Episporio liso o finamente punteado.

VII. *Ascobolus* sect. *Gymnoascobolus*"

Teniendo en cuenta esta clasificación, *Ascobolus albidus* está ubicado en la sect. *Ascobolus* van Brumm.

***Ascobolus albidus* Crouan**

Ann. Sci. Nat. (Bot.) Ser. IV, 10: 193, pl. 13 A, figs. 1-6. 1868.

Ascobolus glaber var. *albidus* (Crouan) March. in Bull. Soc. Bot. Belg. 34: 131. 1895.

Ascobolus glaber var. *lenticularis* Boud. in Ann. Sci. Nat. (Bot.) Ser. V, 10: 224, pl. 7, fig. 15. 1869.

Ascobolus albidus forma *macrosporus* Svrček in Česká Mykol. 13: 211. 1959.

Apotecios: pequeños, aunque cuando menos numerosos más grandes y perfectamente visibles a ojo desnudo; aislados o gregarios, superficiales y sésiles; piriformes a sub-globosos cuando jóvenes, achatándose generalmente a medida que maduran, con una porción "inferior" de color ocráceo y con aspecto superficial furfuráceo que corresponde al excípulo y una parte "superior" que emerge de la anterior, translúcida, cristalina, que corresponde al himenio, con numerosas paráfisis sumergidas en una sustancia mucilaginosa incolora y los ascosp. que al comienzo de la madura-

ción van emergiendo de a pocos (4 a 10) rompiendo la porción superior del apotecio; posteriormente, en algunos casos, éste se hace pulvinado debido a un incremento del crecimiento intercalar del himenio, sub-himenio y médula. Himenio plano, en el que sobresalen los ascos maduros, por lo que la superficie himenial aparece oscura a simple vista. Otras veces, sin embargo, los apotecios permanecen separados unos de otros, cilíndricos a sub-globosos, con regular cantidad de ascos maduros emergiendo de la superficie del himenio de la misma forma que lo hacen los ascos de *Ascobolus amoenus* (en este último caso, los apotecios son más pequeños). Consistencia carnosa y blanda. Diámetro: 272-592 μ .

Ascos: octosporados, subcilíndricos, con un pie bien notable, raramente bifurcado, pared medianamente gruesa, que da una pálida reacción amiloide con Melzer. Operculados, con opérculo central bien marcado en los ascos maduros. 192-380 \times 28-36 μ (Lám. 3, fig. 15).

Ascosporas: biseriadas en el asco maduro, elipsoidales, con los extremos aguzados, al principio hialinas, dispuestas en una sola hilera ocupando prácticamente todo el asco, luego violado-claro y finalmente violadas, con mucílago individual dispuesto comúnmente en forma unilateral, granuloso, a veces translúcido y otras de color violado intenso durante el período de deposición del exosporio; este mucílago se pierde rápidamente cuando las esporas se montan en agua; exosporio surcado por grietas longitudinales, más o menos paralelas, a veces oblicuas y conectadas entre sí transversalmente. 24,07-28,22 \times 9,96-13,28 μ (Lám. 3, fig. 10).

Paráfisis: filiformes, simples o ramificadas, pluriseptadas, hialinas, embebidas en una sustancia mucilagínosa translúcida, rápidamente soluble en agua. Diámetro en el ápice: 1,8-3,2 μ (Lám. 2, fig. 7).

Médula: constituida por células isodiamétricas y otras más o menos rectangulares, dispuestas laxamente entre sí ("textura globulosa"), dejando lagunas mucho más evidentes en las cercanías de la base del apotecio.

Corteza: constituida por varias capas de células de paredes gruesas, isodiamétricas a ligeramente alargadas en sección, dispuestas apretadamente ("textura angularis"), con deposición intercelular de una sustancia colorada, muy abundante en la corteza superior del apotecio inmaduro (Lám. 3, fig. 14).

Habitat: fimícola, sobre estiércol de vaca y de caballo.

Material estudiado: Buenos Aires, Ezeiza, leg. J. E. Wright, VII-1968, sobre estiércol de caballo recientemente coleccionado y colocado en cámara húmeda en el laboratorio al cabo de 7 días, BAFC 22321, C-2374; Ezeiza, leg. Ranalli-Jaroslavsky, VI-1970, sobre estiércol de caballo colocado en cámara húmeda en el laboratorio al mes de coleccionado, BAFC 22322; Capital Federal, leg. Ranalli, V-1970, sobre estiércol de vaca colocado en cámara húmeda en el laboratorio a los dos meses de coleccionado, BAFC 22323.

Observaciones: hemos determinado nuestro material utilizando la descripción e ilustraciones de van Brummelen (*op. cit.*) que están basadas en el lectotipo. No existen diferencias notables entre las características de nuestro material y su descripción.

El citado autor comenta que *Ascobolus albidus* sólo es conocido en el hemisferio norte; por lo tanto es la primera vez que se halla en el hemisferio sur.

ESTUDIO DE CULTIVOS

Los estudios de cultivos fueron llevados a cabo con la cepa C-2374, que se obtuvo a partir de esporas recogidas en placas de agar-agua al 2,5 % y sometidas a un tratamiento inductor de la germinación. Primeramente se realizaron cultivos polisporicos en tubos con medio "standard" (PF)⁴ que luego se utilizaron para inocular cajas con estiércol de vaca tindalizado a fin de obtener nuevamente fructificaciones. Una vez que éstas maduraron y expulsaron las ascosporas, fueron recogidas nuevamente en placas de agar-agua, sometidas a tratamiento inductor de la germinación y finalmente, cortando ápices de hifas provenientes de esporas recientemente germinadas, se procedió a realizar los aislamientos monospóricos en tubos con medio "standard", que se incubaron en cámara de cultivo a 23° C y a luz continua. Cuando el micelio cubrió totalmente la estría, se guardaron en heladera a 5° C. Se observó el comportamiento de la cepa continuamente durante dos años, debiendo realizarse periódicamente nuevos reaislamientos monospóricos, debido a la progresiva esterilización que sufre la cepa a medida que se la somete a repiques sucesivos.

a) GERMINACIÓN DE ASCOSPORAS

Las ascosporas expulsadas violentamente por los ascos, se recogieron en cajas de agar-agua al 2,5 %. Son expulsadas en grupos de ocho, pero separadas entre sí. Se utilizaron esporas provenientes de cultivos en medio "standard" y en estiércol de vaca tindalizado, teniendo en cuenta la posibilidad de un comportamiento diferente frente a un tratamiento determinado.

La germinación espontánea a temperatura ambiente es muy rara. En algunos casos se observaron esporas germinadas espontáneamente a las 48 horas de recogidas, pero invariablemente se trataba de esporas hialinas, sin formación de exosporio.

Se ensayaron concentraciones de OHNa que variaron entre 0,2 y 0,4 % durante 10 a 30 minutos e incubación posterior a 37° C durante 48 horas⁵.

⁴El medio "standard" (PF) consiste en: agar: 25 grs., extracto de levadura "Difco": 3 grs., 1 disco de papel de filtro Carl Schleider and Schull, N° 595; H₂O destilada: 1000 cc; pH = 6,2-6,4 después de la esterilización.

⁵La germinación se produce recién a las 72 horas, después de 48 horas de incubación a 37° C y 24 horas a temperatura ambiente.

Los períodos de reposo de las esporas se tomaron variables entre 2 días y 17 días.

Si bien el tratamiento con OHNa al 0,4 % durante 30 minutos resultó eficaz con esporas provenientes de estiércol tindalizado con 2 días de reposo, utilizado con esporas provenientes de cultivos en medio "standard" y con 17 días de reposo resultó drástico, observándose plasmolización de las esporas, las que presentaban sus paredes muy separadas y en colapso.

Los resultados obtenidos se resumen en el siguiente cuadro:

Procedencia de las ascosporas	Días de reposo	Tratamiento				
		Conc. de OHNa	Tiempo	Período de inc. a 37°C	Incubación temp. amb.	% de germinación
E.....	2	0,4 %	30'	48 hs.	24 hs.	80
	15	0,3 %	30'	48 hs.	24 hs.	45
	17	0,2 %	30'	48 hs.	24 hs.	50
PF.....	15	0,3 %	10'	48 hs.	24 hs.	68
	17	0,2 %	30'	48 hs.	24 hs.	45

E = estiércol de vaca tindalizado.

Las ascosporas germinantes presentan las paredes notablemente separadas, con el exosporio aclarado, el contenido removido y el volumen notablemente aumentado. Generalmente germinan por un tubo sub-polar, que se ramifica rápidamente, originando un micelio hialino y laxo.

La viabilidad de las ascosporas oscila entre dos meses y dos años y medio. Ascosporas de material seco con dos años de antigüedad, dieron muy bajo porcentaje de germinación (0,68 %) sometidas al tratamiento más efectivo.

b) CRECIMIENTO Y DESARROLLO EN MEDIO PF ("standard")

Las observaciones se realizaron "in vivo" sobre cultivos monospóricos desarrollados en cajas de Petri, en cámara incubadora a 23°C y a luz continua suministrada por ocho tubos General Electric, de 20 W. Distancia de las cajas a la fuente luminosa: 29 cm.

Estas observaciones se completaron con secciones de las fructificaciones realizadas con micrótopo de congelación y coloradas con azul láctico y carmín propiónico.

Caracteres macroscópicos de la colonia

Colonias con micelio rasante, laxo, sin desarrollo aéreo. Hifas que crecen radialmente y que alcanzan el borde de la caja al 6to. día de la inoculación; de recorrido recto, que puede apreciarse bien bajo la lupa. El medio no toma coloración alguna. Olor característico, similar al de *Ascobolus amoenus*.

Caracteres microscópicos de la colonia

Observado al microscopio, el micelio presenta características similares a las puntualizadas para especies anteriormente estudiadas. Hay hifas de dos tipos: unas más gruesas, con abundante contenido, vacuoladas, regularmente septadas, de paredes delgadas; diámetro: 3,12-8,3 μ . En estas hifas, que se tiñen muy bien con floxina, pueden verse los tabiques transversales que aparecen como anillos delgados, poco colorados, a ambos lados de los cuales se observan de 2 a 5 gránulos refringentes, conocidos como cuerpos de Woronin (Buller, 1933: 127). (Lám. 2, fig. 8).

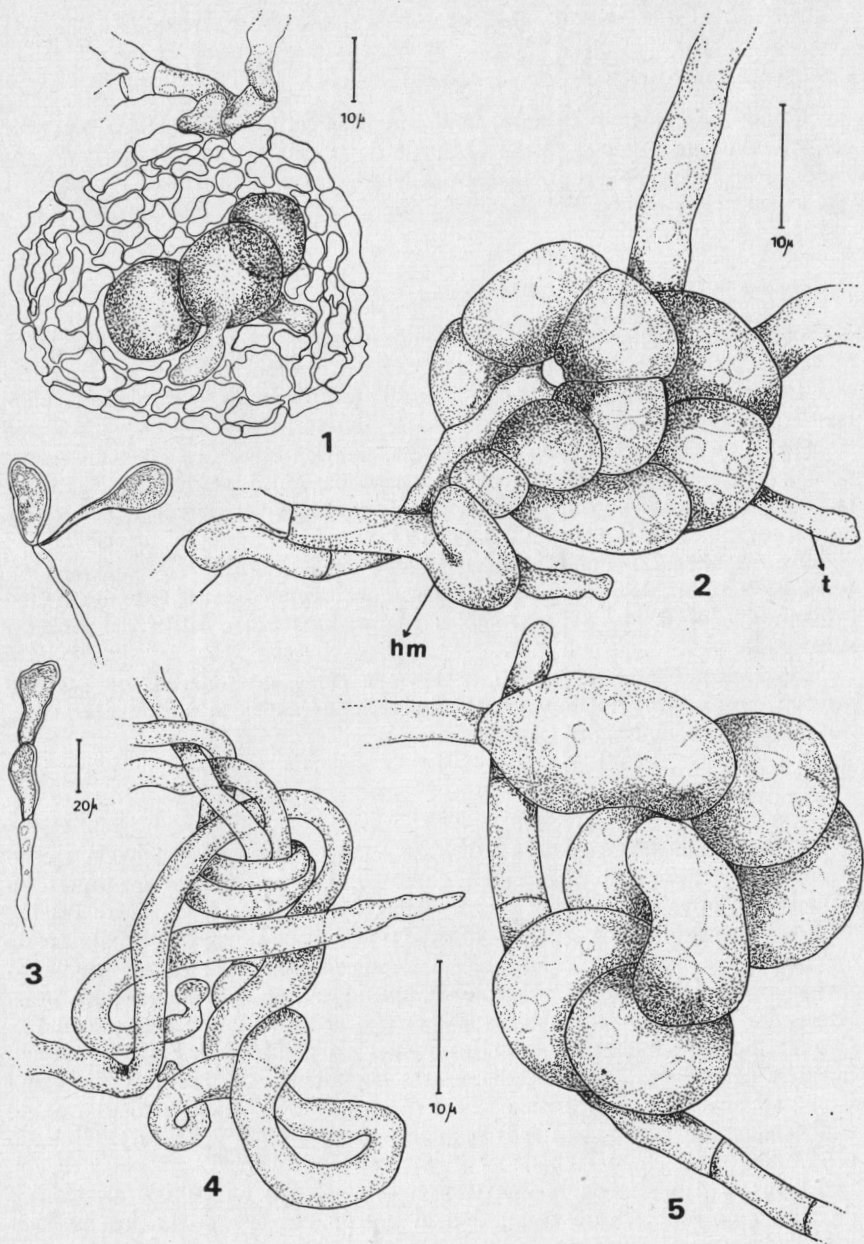
Hay un segundo tipo de hifas, mucho más delgadas (2,8-3,2 μ), vacuoladas y retorcidas que las anteriores, que forman frecuentemente nudos múltiples. Se observan anastomosis abundantes entre hifas del micelio sumergido.

Muy esporádicamente suelen observarse hifas catenuladas, de paredes gruesas, con contenido muy vacuolado, que se ramifican abundantemente. Se tiñen muy débilmente con floxina.

c) SEXUALIDAD

Cultivos monospóricos de 12 días de edad en cajas de Petri con medio "standard", presentan primordios globosos, hialinos cuando se inician a ocráceos al envejecer, que alcanzan diámetros comprendidos entre 60,4 y 114,4 μ , poseen pared gruesa, formada por varias capas de células de espesor (5 a 7 generalmente), con deposición abundante de pigmento intercelular. Observados en sección longitudinal, su interior aparece prácticamente vacío, con pocas hifas globosas que no se coloran con azul láctico y que probablemente sean los restos de células ascogoniales en colapso, y otras hifas delgadas, dispuestas laxamente, de "textura intricata" y que se tiñen con azul láctico. Este último "tejido" está particularmente presente en los primordios más pequeños (entre 62,4 y 83,2 μ). Cuando el tamaño oscila entre 104 y 114 μ aparecen vacíos.

Al 3er. y 4to. día de la inoculación se observan en cultivo ascogonios de tipo escorpioide, que responden al patrón encontrado en las especies estudiadas anteriormente. Sus células son globosas, con diámetro que oscila entre 7 y 23 μ , en número difícil de precisar, pero que describen 2-3 vueltas, enrollándose sobre sí mismas. La célula basal del ascogonio está conectada a una hifa de aspecto similar al resto de las hifas vegetativas, sumamente vacuolada y que toma muy poco la coloración con azul láctico.



Lám. I. — *Ascobolus albidus* Crouan. 1, joven protoapotecio mostrando hifas ascógenas; 2, ascogonio completamente diferenciado mostrando hifa madre (hm) y anteridio (t); 3, elementos sub-globulares presentes entre las paráfisis, sobre todo en apotecios provenientes de cultivos sobre estiércol; 4, nudos micelianos, en cultivo de seis días en medio « standard »; 5, joven ascogonio en formación.

Teniendo en cuenta que los cultivos monospóricos a pesar de producir ascogonios y de formar "primordios" con los caracteres anotados, no completan el ciclo, se cruzaron sistemáticamente en cajas de Petri con medio "standard" diferentes cultivos monospóricos, los cuales desarrollaron normalmente el micelio, llegando las colonias a ponerse en contacto entre el 5to. y 7mo. día, apareciendo en el área de contacto numerosos primordios piriformes a sub-globosos, parcial o totalmente sumergidos en el agar, hialinos, que fueron aumentando prontamente de tamaño, y que entre el 10mo. y 12mo. día de efectuado el cruzamiento, maduraron normalmente, expulsando sus esporas. Es decir, que *Ascobolus albidus* Crouan responde a la condición heterotálica de la misma manera que *A. amoenus*, *A. bistisii* y *A. furfuraceus*, anteriormente estudiados.

Tenemos que dejar constancia que también con esta especie se presentaron los mismos problemas de esterilización progresiva de las cepas a medida que se las repicaban repetidamente y conservaba a 5° C en heladera, por lo que debimos recurrir a reaislar las cepas a partir de material conservado desecado. Es también interesante destacar, que a diferencia de lo que ocurría en *A. bistisii* y *A. amoenus*, la esterilización de las cepas es de tal importancia, que después de tres meses de conservadas en heladera, ni siquiera fructificaron sobre estiércol de vaca tindalizado, y el reislamiento debió hacerse a partir de material seco.

Observando los cultivos compatibles después de haberse entrecruzado los micelios, se comprueba la presencia en la zona de contacto, de numerosos ascogonios que responden a las mismas características que los encontrados en cultivos monospóricos aislados, pero con la diferencia de que las células ascogoniales se enroscan alrededor de una hifa de aspecto semejante al resto del micelio, con contenido denso (anteridio?). (Lám. 1, fig. 2). No se ha observado la presencia de tricogino. En un estado más avanzado de desarrollo, hifas adyacentes crecen hacia el ascogonio y comienzan a rodearlo, formando un ovillo que constituye el protoapotecio. Las capas superficiales de éste (1 a 2) son de "textura angularis", mientras que las internas son de "textura globulosa". El ascogonio se observa por transparencia y cuando el diámetro de los protoapotecios alcanza aproximadamente entre 80 y 120 μ se ven salir de las células ascogoniales centrales, hifas ascógenas que emergen a modo de dedo de guante, rechonchas, en número variable por célula, difícil de determinar (hemos contado hasta seis por célula). (Lám. 1, 2; figs. 1, 6).

Observaciones:

Tres características que presentan los cultivos de *Ascobolus albidus* han llamado poderosamente nuestra atención y ellas son:

- 1) Se observan en cultivo dos tipos distintos de apotecios que difieren en diámetro, longitud y ancho de ascos, tamaño de las ascosporas, cantidad de ascos maduros a la vez y fase del ciclo de vida en que su himenio queda expuesto.

Los apotecios que llamamos de *tipo I*, responden perfectamente a la descripción de la especie dada por van Brummelen (1967: 100): piriformes a sub-globosos, semisumergidos en el medio, con 3 a 5 ascos maduros que juntamente con las paráfisis rompen el techo y emergen quedando expuestos recién cuando las ascosporas están maduras; el número de ascos maduros simultáneamente aumenta rápidamente después de que el himenio ha quedado expuesto, y los apotecios maduros toman el mismo aspecto que los de *A. amoenus*. El tamaño de las fructificaciones oscila entre 272 y 320 μ , siendo los más comunes y frecuentes de 320 μ . Ascosporas normales: 192-380 \times 28-36 μ . Ascosporas normales: 24-28 \times 9,96-13,28 μ .

Los apotecios que llamamos de *tipo II*, cuando maduros son pulvinados, con la superficie del himenio al principio plana, pero a medida que completa la maduración se hace convexa (sobre todo en cultivo sobre medio "standard" y medio W⁶), ya que en cultivo sobre estiércol de vaca tindalizado presentan el aspecto de típicas copitas y son gregarios; el techo se rompe debido a la presión ejercida por las paráfisis y el mucílago himenial al final de la fase mesohiménial, antes de que se complete la maduración de las ascosporas. Numerosos ascos maduros emergen luego a modo de dedos de guante por encima del nivel de las paráfisis y apuntando en todas direcciones. Las células corticales presentan color ocráceo debido a la deposición de abundante pigmento intercelular y la superficie exterior de la corteza presenta aspecto furfuráceo, debido a la presencia de grupos de células corticales muertas que quedan adheridas. En estos apotecios, el aumento de volumen por crecimiento intercalar de ascos y paráfisis es más manifiesto que en el tipo anterior y determina la más temprana ruptura del techo del apotecio. El tamaño de los apotecios oscila entre 324 μ (los más raros) hasta 592 μ , que son los más comunes y numerosos. Ascosporas: 216-228 \times 30-36 μ ; ascosporas: 23,24-26,56 \times 9,96-11,62 μ . En los apotecios de este tipo son muy frecuentes los ascos que presentan anisosporia, con 3 a 4 esporas abortivas, siendo las restantes normales. Además, no es constante, pero suele haber, abundante pigmento que colorea el mucílago que envuelve a las paráfisis además de aumentar también considerablemente el pigmento intercelular de la corteza.

Ambos tipos de apotecios coexisten en la misma caja, entremezclados, o bien pueden presentarse de un solo tipo en unas cajas y del otro tipo en otras cajas, lo que es notable, teniendo en cuenta que: a) las cepas cruzadas son las mismas para todas las cajas; b) las observaciones se hacen en cultivos de la misma edad; c) todas las cajas se mantienen en la cámara de cultivo bajo las mismas condiciones estrictas. En cultivo sobre

⁶ El medio que llamamos W consiste en: Casamino acids: 0,2 grs. Carbonato de Sodio: 0,5 grs.; Fosfato de K (dibásico): 0,5 grs.; Cloruro de amonio: 0,5 grs.; Sulfato de Zinc: trazas; Sulfato ferroso: trazas; glucosa: 0,5 grs.; extracto de levadura Difco. 4,0 grs.; agua destilada 1000 cc; agar: 25 grs.; 1 hoja de papel de filtro Carl Schleicher and Schull, N° 595. Se ajusta el pH antes de esterilizar con ácido sulfúrico concentrado, entre 4 y 5.

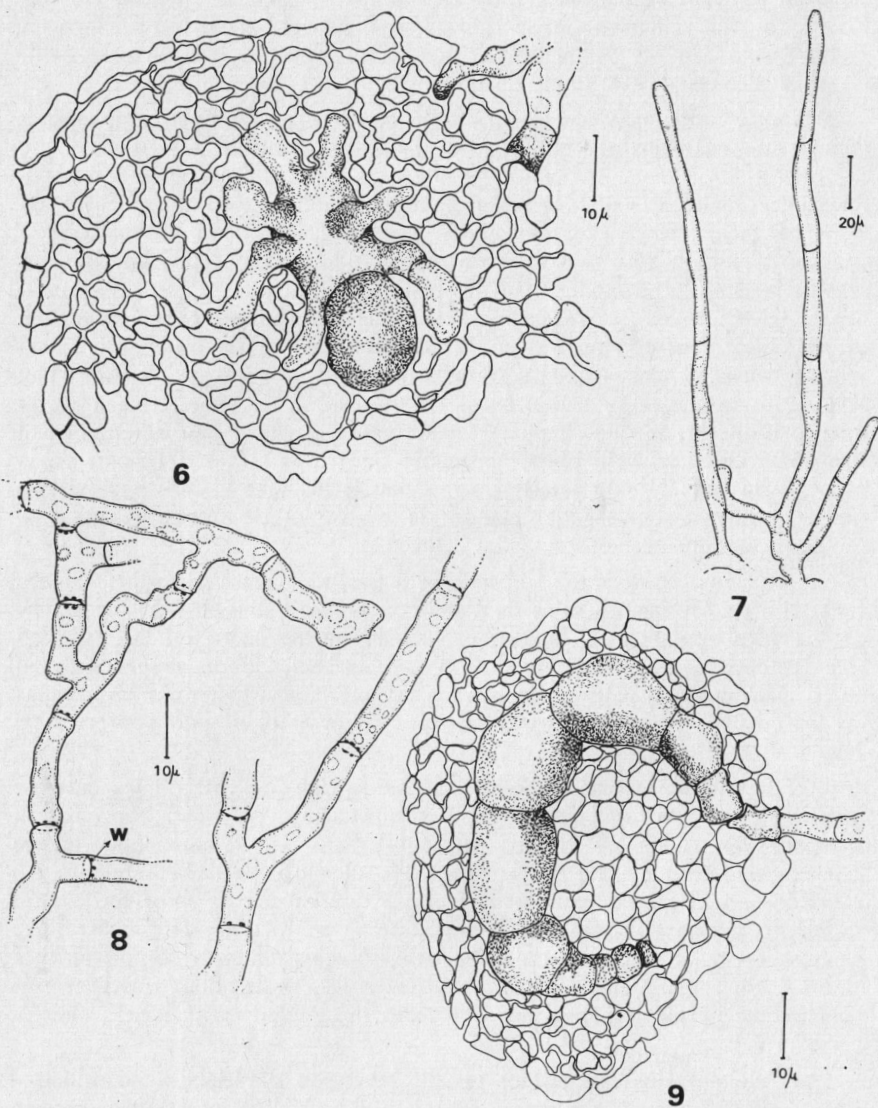
estiércol de vaca tindalizado, muy raramente se encuentran apotecios de tipo I, la gran mayoría son de tipo II, que difieren de los cultivados en medio "standard" y en medio W por su tamaño, ya que en este caso, llegan a alcanzar hasta 2 mm de diámetro.

2) La segunda característica notable consiste en la aparición esporádica de algunas cajas con cultivos que producen apotecios de tipo II, que completan su ciclo normalmente, pero en los que las ascosporas son absolutamente hialinas, sin formación de exosporio. Suelen encontrarse en estos apotecios, ascos con ascosporas normales, pero con muy baja frecuencia. También aquí se comparan estas fructificaciones con las de cajas sembradas simultáneamente, bajo las mismas condiciones y con las mismas cepas. Estos ascos con ascosporas hialinas las arrojan normalmente, e invirtiendo cajas con agar-agua las recogimos a fin de obtener cultivos monospóricos. Dejadas a temperatura ambiente, al cabo de 48 horas hay abundante germinación espontánea, sin necesidad de someterlas a tratamiento inductor, lo que demuestra claramente el papel que desempeña el exosporio como barrera poco permeable que impide la hidratación de la espora y la consiguiente puesta en marcha de los mecanismos enzimáticos que le permitirán pasar del estado de reposo al de micelio vegetativo metabólicamente activo.

Los cultivos monospóricos obtenidos a partir de estas ascosporas se enfrentaron de a pares en cajas de Petri con medio "standard", W y estiércol de vaca tindalizado. Se observó su comportamiento en las cajas en que las cepas enfrentadas resultaron compatibles, donde se encontraron fructificaciones que respondieron a las características generales observadas en los cultivos provenientes de ascosporas normales, dando apotecios de *tipo I* y de *tipo II*.

3) Finalmente, la otra característica fue la que presentaron los cultivos mantenidos a oscuridad completa. Estos cruzamientos produjeron fructificaciones en todos los medios probados, pero con la particularidad de que respondieron a un tipo de desarrollo cleistohimial, totalmente sumergidos en el medio, con ascos que no quedaron expuestos en ningún momento y que al completar la maduración se hicieron delincuescentes. Las ascosporas producidas en estos "cleistotecios" fueron completamente hialinas, de tamaño normal y muy abundantes, pudiéndose observar por transparencia, que llenaban por completo la cavidad central del "cleistotecio" maduro.

Los "cleistotecios" obtenidos no diferenciaron paráfisis, y cuando maduros, su diámetro osciló entre 144 y 208 μ . Vistos en sección, poseen una pared formada por 3 a 5 capas de células de espesor, y en la parte central se encuentran numerosas esporas maduras, incoloras, libres dentro de la fructificación, pero ordenadas en hileras lo que hace evidente que los ascos estaban ordenados constituyendo el himenio.



Lám. II. — *Ascobolus albidus* Crouan. 6, joven protoapotecio en cultivo de nueve días en medio «standard», mostrando células ascogoniales e hifas ascógenas; 7, parásisis de apotecio maduro; 8, hifas del micelio vegetativo en cultivo de seis días en medio «standard», mostrando tabiques y cuerpos de Woronin (w); 9, joven protoapotecio en cultivo de nueve días en medio «standard».

d) DESARROLLO DEL APOTECIO

Las observaciones hechas "in vivo" sobre cultivos en medio "standard" y en medio W, fueron completadas con el análisis de secciones obtenidas con micrótopo de congelación, de material que se fue fijando cada 24 horas a partir del momento en que comienzan a verse a simple vista los primordios de las fructificaciones, en fijador de Newcomer (Newcomer, 1953: 161), y se coloró con carmín propiónico y con azul láctico.

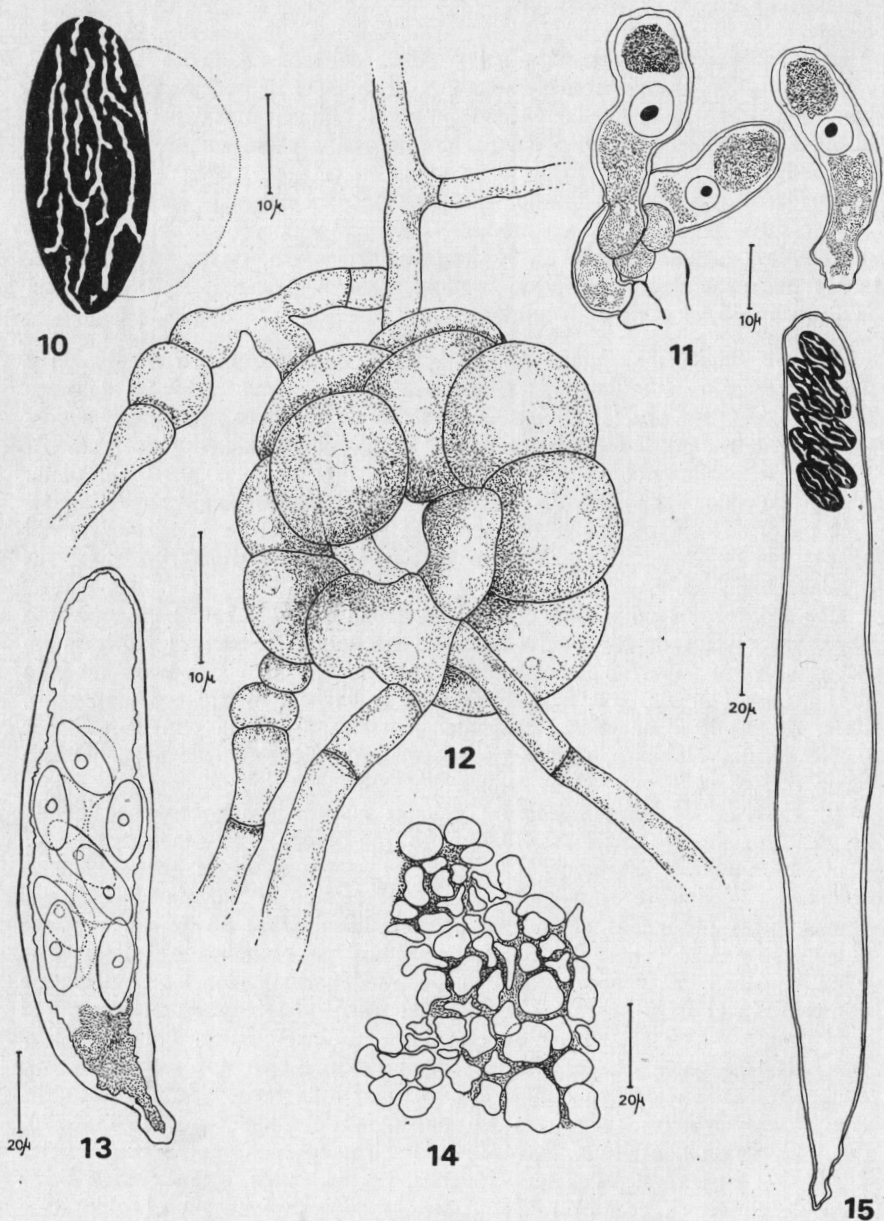
Se estudio el desarrollo en medio "standard" y en medio W, notándose diferencias exclusivamente en la longitud del ciclo, cuyos primeros estadios se encuentran algo desplazados, pero a partir del 10° día de la inoculación, coinciden totalmente.

*Periodo inicial*⁷: se inicia al 7° día de la inoculación en medio W y al 8° en medio "standard". A partir del 6° día en medio W las colonias se tocan, y entre el 7° y 8° día en la línea de contacto comienzan a aparecer regular cantidad de primordios, sub-globosos, translúcidos, sumergidos casi totalmente en el medio, apenas distinguibles a simple vista. A medida que aumentan de tamaño, van haciéndose más superficiales, y la parte del excípulo que se encuentra por encima de la superficie del agar toma color ocráceo debido a la deposición de pigmento entre las células corticales.

Los primordios cuyo diámetro oscila entre 70 y 125 μ , aparecen como pequeños ovillos de hifas entrecruzadas laxamente ("textura intricata laxa") en vista superficial, conectados con el micelio a través de un hifa más gruesa (de 7 a 8 μ de diám.), que es la hifa madre del ascogonio. Este, de 30-40 μ de diám., ubicado centralmente, está constituido por varias células globosas, de las cuales por transparencia, alcanzan a verse hasta nueve.

El *Periodo de diferenciación* comienza cuando los protoapotecios alcanzan un diámetro entre 90 y 140 μ , lo que ocurre al 8° día en medio W y al 9° en medio "standard". Las células ascogoniales se encuentran en colapso, colorándose muy poco con azul láctico o carmín propiónico. Varias hifas ascógenas salen por célula, difícilmente se puede precisar el número exacto (entre 4 y 6). Las paráfisis han comenzado a desarrollar y en la pared del protoapotecio ya se pueden distinguir las células que constituirán el techo, diferenciándose del resto de la corteza por su pared más gruesa y por la deposición de pigmento intercelular. Una vez diferenciadas las paráfisis, las hifas ascógenas comienzan a formar ganchos, en general dispuestos en cimas, dando lugar a la formación de ascos del tipo "pleurorrinco" (según la terminología de Chadeaud, 1943: 77), de maduración centrífuga. Jóvenes apotecios, cuyo diámetro oscila entre 145-235 μ presentan ascos muy jóvenes, uninucleados, que alcanzan hasta 30 μ de longitud, con el núcleo ubicado centralmente en el asco, que toma intensamente la coloración con carmín y con azul láctico y abundantes

⁷ Para nomenclatura de los períodos ver Gamundí y Ranalli, 1963: 394.

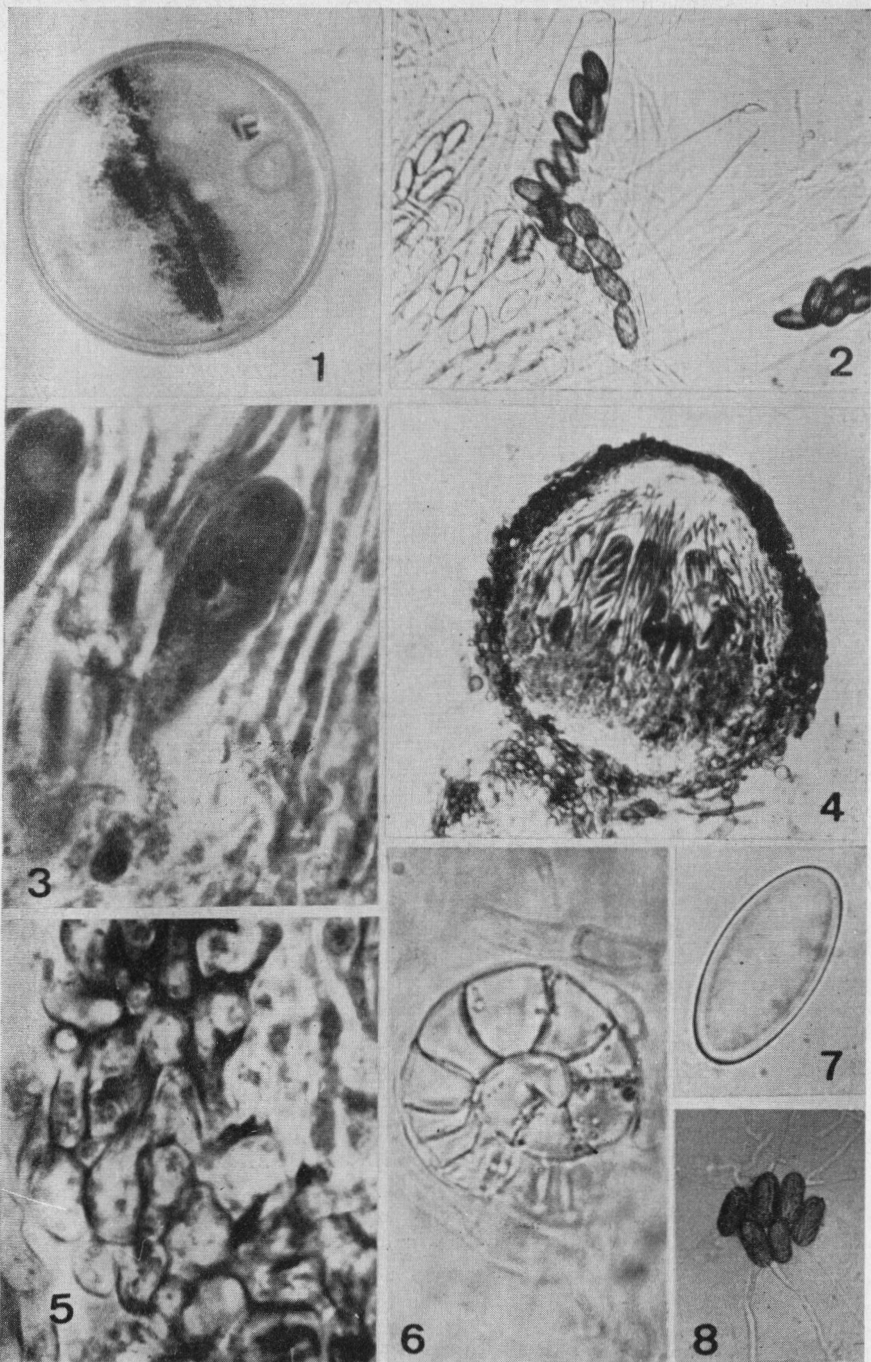


Lám. III. — *Ascobolus albidus* Crouan. 10, ascospora madura, exoperio con grietas y mucílago lateral; 11, jóvenes ascos uninucleados; 12, ascogonio joven en cultivo de cinco días en medio « standard »; 13, ascó inmaduro; 14, células del exopériplo con pigmento intercelular; 15, ascó maduro.

paráfisis que sobresalen hasta 30μ por sobre el nivel de los ascos, recubiertas por el techo, quedando un espacio vacío entre los ápices de las mismas y el techo del protoapotecio. El crecimiento de las paráfisis determina un aumento del diámetro del apotecio comenzando entonces el *período de crecimiento* que se superpone con el de *diferenciación*. Estos fenómenos son análogos a los que ocurren en *Ascobolus amoenus* pero la velocidad de crecimiento de los ascos es mucho menor. Las células corticales externas se compactan y la deposición de pigmento intercelular en la parte aérea de la fructificación se hace evidente. La médula es de "textura intricata" a "textura globulosa", con espacios vacíos sobre todo en las proximidades de la base del apotecio; el ascogonio se muestra en colapso. En sección los apotecios aparecen piriformes, con el diámetro mayor a la altura del sub-himenio, aguzándose notablemente hacia arriba. La altura de los apotecios oscila entre 165 y 190μ . El sub-himenio mide alrededor de 20μ , mientras que el himenio alcanza aproximadamente 60μ de altura.

Cultivos de 9 días en medio W presentan apotecios de tamaño similar a los del día anterior, en los que no se observa un incremento notable del número de paráfisis, pero sí ascos que han aumentado de tamaño y poseen ya diferenciadas las ocho ascosporas, aún inmaduras, con pared muy gruesa, sobre todo en el ecuador, adelgazándose hacia los polos, con el contenido que se tiñe intensamente con azul láctico, pudiendo distinguirse un núcleo único. Hay un aumento de la altura de los apotecios que alcanzan hasta 200μ , ya que el alargamiento de los ascos y de las paráfisis va empujando el techo que todavía persiste.

En apotecios de 10 días no se observa un incremento notable de tamaño, no hay aumento apreciable del número de paráfisis, pero sí hay incremento en el tamaño de los ascos que ya miden entre 70 y 104μ de altura y prácticamente han alcanzado la altura de las paráfisis; las ascosporas aún inmaduras miden ya entre $12,5-14,5 \times 3,2-6,2 \mu$, son fusoides, con los polos aguzados. La cantidad de ascos con 8 ascosporas diferenciadas es mucho mayor que el día anterior. El techo persiste en la mayoría de los apotecios, pero algunos presentan la ruptura del mismo, debido a la presión que ejercen sobre él, las paráfisis y la abundante cantidad de mucílago himenial en que están incluidas. No hay margen diferenciado; la parte cortical externa del excípulo está constituida por varias capas de células (3 a 5) de paredes gruesas. Las lagunas medulares se hacen más notables. Observados los apotecios con la lupa en este estado, es decir cuando comienza la ruptura del techo, aparecen globosos, con la parte superior superficial como una excrecencia cristalina; las ascosporas inmaduras llenan totalmente el asco. El crecimiento de los apotecios se ha manifestado a partir del 8º día hasta ahora por un cambio en la forma del apotecio que de piriforme pasó a globular hasta obcónico, debido al aumento del volumen de los ascos y a la expansión lateral de las paráfisis, sin que el diámetro mayor y la altura se modificaran. En este estado, que correspondería a la fase mesohiménial tardía, alcanzan dimensiones que van de $190-300 \mu$ de diám. y de $200-310 \mu$ de altura.



Lám. IV. — *Ascobolus albidus* Crouan : 1, aspecto superficial de la caja de cultivo en medio « standard », mostrando la línea de contacto entre los micelios compatibles, donde se han producido las fructificaciones. $\times 1/2$; 2, aplastado de un apotecio maduro mostrando ascos con opérculo ascosporas maduras y paráfisis. $\times 215$; 3, asco uninucleado de apotecio en cultivo en medio « standard ». Coloración con azul láctico. $\times 1250$; 4, Sección longitudinal radial de un apotecio en cultivo de 10 días en medio « standard ». Coloración con azul láctico. $\times 375$; 5, células de la corteza de un apotecio en cultivo de 10 días en medio « standard », $\times 1000$; 6, ascogonio en cultivo de 7 días en medio « standard ». $\times 625$; 7, espora madura producida por apotecios formados en oscuridad. $\times 1250$; 8, grupo de ascosporas germinadas. $\times 250$.

El *Período de maduración* comienza al 11º día, cuando la mayoría de los apotecios presentan el techo roto, paráfisis y ascos expuestos y muy pocos ascos con ascosporas maduras, que sobresalen por encima del nivel de las paráfisis. De acuerdo con lo observado, en consecuencia, el apotecio se abre en la fase mesohiménial tardía, es decir, inmediatamente antes de que las esporas maduren.

El diámetro de los apotecios maduros varía entre 272 y 592 μ . Las características de las células del excípulo se mantienen como en los días anteriores; en los apotecios más delgados suele permanecer parte de las capas celulares que constituían el techo enmarcando ascos y paráfisis (en los apotecios que llamamos de *tipo I*), mientras que en aquellos en que el crecimiento intercalar fue más marcado desaparecen y el apotecio toma aspecto pulvinado. En la zona central del excípulo las células se encuentran en colapso, pero se mantiene la "textura globulosa" a "angularis" característica de la zona sub-himénial, con células más pequeñas e intensamente coloradas, haciéndose lacunosa hacia la zona basal del apotecio. Apotecios de 12 días presentan características similares a los del día anterior, pero con numerosos ascos maduros en cada apotecio, que se mantienen erguidos por sobre la superficie del himenio y muestran una marcada respuesta fototrópica. El proceso de maduración de las ascosporas es semejante al de *A. amoenus*; en cuanto a la progresiva pigmentación de las paredes que al comienzo son violado claras y finalmente violadas. La mayoría de las ascosporas son expulsadas violentamente a través de un opérculo central, independientemente unas de otras. El tipo de desarrollo puede considerarse *cleistohiménial*, abriéndose en la fase mesohiménial tardía. Los períodos de desarrollo en medio "standard" y medio W se encuentran algo desfasados al comienzo, manteniéndose el desfase hasta el 10º día, pero a partir del 11º día, las etapas se superponen, lo que pone en evidencia que el período es más corto en medio "standard" que en medio W.

e) CULTIVO EN DISTINTOS MEDIOS VARIANDO LAS CONDICIONES DE ILUMINACIÓN

En este ensayo se utilizaron los aislamientos monospóricos 14 y 25 recientemente aislados, que se cruzaron inoculando las cajas de Petri en dos puntos opuestos. Se emplearon 40 cajas, distribuidas de la siguiente manera: 10 con medio nutritivo "standard"; 10 con medio W; 10 con medio C (medio W modificado, sin ajustar el pH, de tal modo que el pH de este medio oscila entre 8 y 8,3 antes de esterilizar) y 10 cajas con estiércol de vaca tindalizado. Se distribuyeron en dos series, una que se mantuvo en oscuridad completa y otra en luz continua, en cámara de cultivo. Distancia de las cajas a la fuente luminosa: 29 cm. La experiencia tuvo la duración de 1 mes, y fue repetida 3 veces en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos se consignan en el cuadro siguiente:

M E D I O

	Serie A. Luz continua				Serie B. Oscuridad			
	Aparición de primordios		Maduración apotecios		Aparición de primordios		Maduración apotecios	
PF	9° ¹	10° ²	11° ³	13° ⁴	12°	15°	21°	—
W	8°	9°	12°	13°	13°	16°	21°	—
C	9°	10°	13°	15°	—	16°	19°	—
E	9°	10°	12°	13°	16°	—	20°	—

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.

DISCUSION

De los ensayos realizados con *Ascobolus albidus* quedan varios interrogantes planteados a saber:

- 1) ¿Qué es lo que determina los tipos morfológicos I y II? Existe la posibilidad de que sean mutaciones las que determinen el tipo de apotecio presente en el cultivo. Hipótesis no muy viable, ya que cultivos monospóricos obtenidos a partir de ascoporas provenientes de apotecios de tipo II, dan fructificaciones de ambos tipos en la misma caja, cuya distribución y probabilidad de aparición es semejante a la de los cultivos originales. Lo mismo ocurre con esporas obtenidas a partir de apotecios de tipo I.
- 2) ¿Cuál es la causa de que se formen ascos maduros anormales (con esporas hialinas debido a la falta de deposición del exosporio) en apotecios de tipo II? Esta característica se ha demostrado que no se mantiene, ya que cultivos obtenidos a partir de dichas ascosporas y que se cruzaron entre sí, dieron fructificaciones con esporas normales.
- 3) ¿De qué manera el proceso de síntesis y deposición del pigmento que constituye el exosporio es bloqueado por la ausencia de luz? Cultivos mantenidos en oscuridad completa formaron únicamente "cleistotecios" con ascosporas hialinas. Sin embargo, practicando orificios en el papel negro con que se cubrieron las cajas, se pudieron iluminar áreas restringidas del cultivo, en las cuales se formaron apotecios normales con esporas coloradas. Por otra

parte, cultivos obtenidos a partir de ascosporas hialinas formadas en "cleistotecios" en oscuridad se comportaron normalmente cuando se sembraron en luz.

- 4) ¿Qué relación existe entre las esporas hialinas producidas esporádicamente en apotecios de tipo II en cultivos en luz y las formadas en oscuridad?
- 5) La ausencia absoluta de paráfisis y el carácter delicuescente de los ascos son las causas por las cuales las fructificaciones obtenidas en oscuridad no se abren, siendo entonces la luz un factor que juega un papel muy importante en la diferenciación de dichas estructuras.

De lo precedentemente expuesto se deduce que *Ascobolus albidus* presenta interrogantes muy interesantes desde el punto de vista genético y fisiológico que aún no han sido contestados y que serán motivo de un estudio posterior.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar aquí de manera muy especial, nuestro profundo agradecimiento a la Dra. Irma Gamundí de Amos por su constante asesoramiento y sugerencias y por la lectura crítica del manuscrito y al Dr. Jorge E. Wright por la lectura y corrección del manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

- BISTIS, G. 1956. *Sexuality in Ascobolus stercorarius* I. Am. Journ. Bot. 43 (6): 389-394.
- BOUDIER, J. L. E. 1869. *Memoire sur les Ascobolés*. Ann. Sc. Nat. (Bot.) Ser. V 10: 191-268.
- BULLER, R. 1933. *Researches on fungi*. London. Vol. 5: 127.
- VAN BRUMMELEN, J. 1962. *Studies on Discomycetes I. Type of species of Ascobolus and Saccobolus in Spegazzini's Herbarium*. Persoonia 2 (2): 195-199.
- 1967. *A world monograph of the genera Ascobolus and Saccobolus (Ascomycetes, Pezizales)*. Persoonia Suppl., 1: 1-260, pls. 1-17.
- CHADEFAUD, M. 1943. *Sur les divers types d'elements dangeardiens des Ascomycetes et sur la formation des asques chez la pezizé Pustularia catinus*. La Révue Scient. 81: 77-80, figs. 1-20.
- CORNER, E. J. H. 1929 a. *Studies in the morphology of Discomycetes I. The marginal growth of apothecia*. Trans. Brit. Myc. Soc. 14: 263-274, 4 figs.
- 1929 b. *Studies in the morphology of Discomycetes II. The structure and development of the ascocarp*. Trans. Brit. Myc. Soc. 14: 275-291, 7 figs.
- 1930. *Studies in the morphology of Discomycetes IV. The evolution of the ascocarp*. Trans. Brit. Myc. Soc. 15: 121-134, 1 fig.
- GAMUNDÍ, I. J. Y RANALLI, M. E. 1963. *Apothecial development of Ascobolus stercorarius*. Trans. Brit. Myc. Soc. 46 (3): 393-400.
- 1964. *Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina I*. Nova Hedwigia 7 (3/4): 517-533, tab. 39-41.
- 1966. *Ibid. II*. Nova Hedwigia 10 (3/4): 339-366, tab. 106-112.
- 1969. *Ibid. III*. Nova Hedwigia 17: 383-407, tab. 97-102.

- GWYNNE-VAUGHAN, H. y WILLIAMSON, H. S. 1933. *Notes on the Ascobolaceae*. Trans. Brit. Myc. Soc. 18 (2): 127-134, 21 figs.
- MANIOTIS, J. 1965. *A cleistothecial mutant of the perithecial fungus Gelasinospora calospora*. Mycologia 57: 23-35, 8 figs.
- MOORE, R. T. & McALEAR, J. H. 1962. *Fine structure of mycota. 7 Observations on septa of Ascomycetes and Basidiomycetes*. Am. Journ. Bot. 49: 86-94, figs. 1-18.
- NEWCOMER, E. H. 1953. *A New cytological and histological fixing fluid*. Science 11 (3058): 161.
- YU, C. C. 1954. *The culture and spore germination of Ascobolus with emphasis on A. magnificus*. Am. Journ. Bot. 41: 21-30.
- YU-SUN, C. C. 1964. *Nutritional studies of Ascobolus immersus*. Am. Journ. Bot. 51: 231-237.