

ESTUDIO SISTEMÁTICO Y BIOLÓGICO DE LAS ASCOBOLACEAS DE ARGENTINA. V.

POR MARIA E. RANALLI¹

SUMMARY

In the present contribution the life-cycle of two species of *Saccobolus* are studied, viz: *S. saccoboloides* and *S. succineus*. The two species are first recorded for Argentina. Ascospores of *S. saccoboloides* germinate without a resting period, but with an inductive treatment consisting of: 0.4 % HONa during 10 minutes and incubation at 37° C for 48 hours. Ascospores of *S. succineus* needs a resting period and the best result was given with 0.4 % OHNa during 10 minutes and incubation at 37° C for 48 hours. Single-spores cultures of the two mentioned species gave fruit-bodies which demonstrated that they are homothallic. Type of development in the three species studied is paragymnohymenial. *S. succineus* and *S. saccoboloides* are not affected by light since they complete the life cycle at darkness, although the development is slower.

INTRODUCCION

Continuando con el estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina, nos referiremos en la presente contribución a dos especies del género *Saccobolus* Boud.: *S. saccoboloides* y *S. succineus*, citadas por primera vez para Argentina, siguiendo la metodología empleada en trabajos anteriores.

Saccobolus saccoboloides (Seaver apud Dodge & Seaver) van Brumm.

Persconia Suppl., 1: 168, fig. 55; pl. 14, fig. A, 1967.

Ascobolus saccoboloides Seaver apud Dodge & Seaver. *Myc.* 38: 640, 1946.

Apotecios: pequeños, de menos de 1 cm de diámetro, solitarios o gregarios, a veces confluentes, superficiales, sésiles, al comienzo amarillo pálido, luego amarillo intenso, a veces anaranjado, estando el color de la fructificación influenciado por la luz (cuanto mayor es la intensidad, ma-

¹Departamento 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.

yor es la pigmentación), al principio subglobosos, tornándose pulvinados a medida que avanza su desarrollo, hasta que maduros llegan a ser hemisféricos. Himenio convexo, del que sobresalen como puntos oscuros los ascos maduros, dándole una coloración castaño-amarillenta cuando maduros; margen no diferenciado. Consistencia carnosa y blanda. Diámetro: 176-464 μ .

Ascos: octosporados, claviformes, con ápice chato, opérculo central bien distinguible, pared amiloide tanto en el asco joven como en el maduro; 84-108 \times 14-20 μ . Cuando las ascosporas aún no han madurado pero ya se encuentran algo pigmentadas, el contenido del asco se torna rosado-vinoso con Melzer y la pared da una tenue coloración azul, mientras que en los ascos inmaduros, el contenido no reacciona con Melzer, pero la pared es intensamente amiloide. En los ascos jóvenes, se pone de manifiesto un casquete apical granuloso y de color vinoso con Melzer.

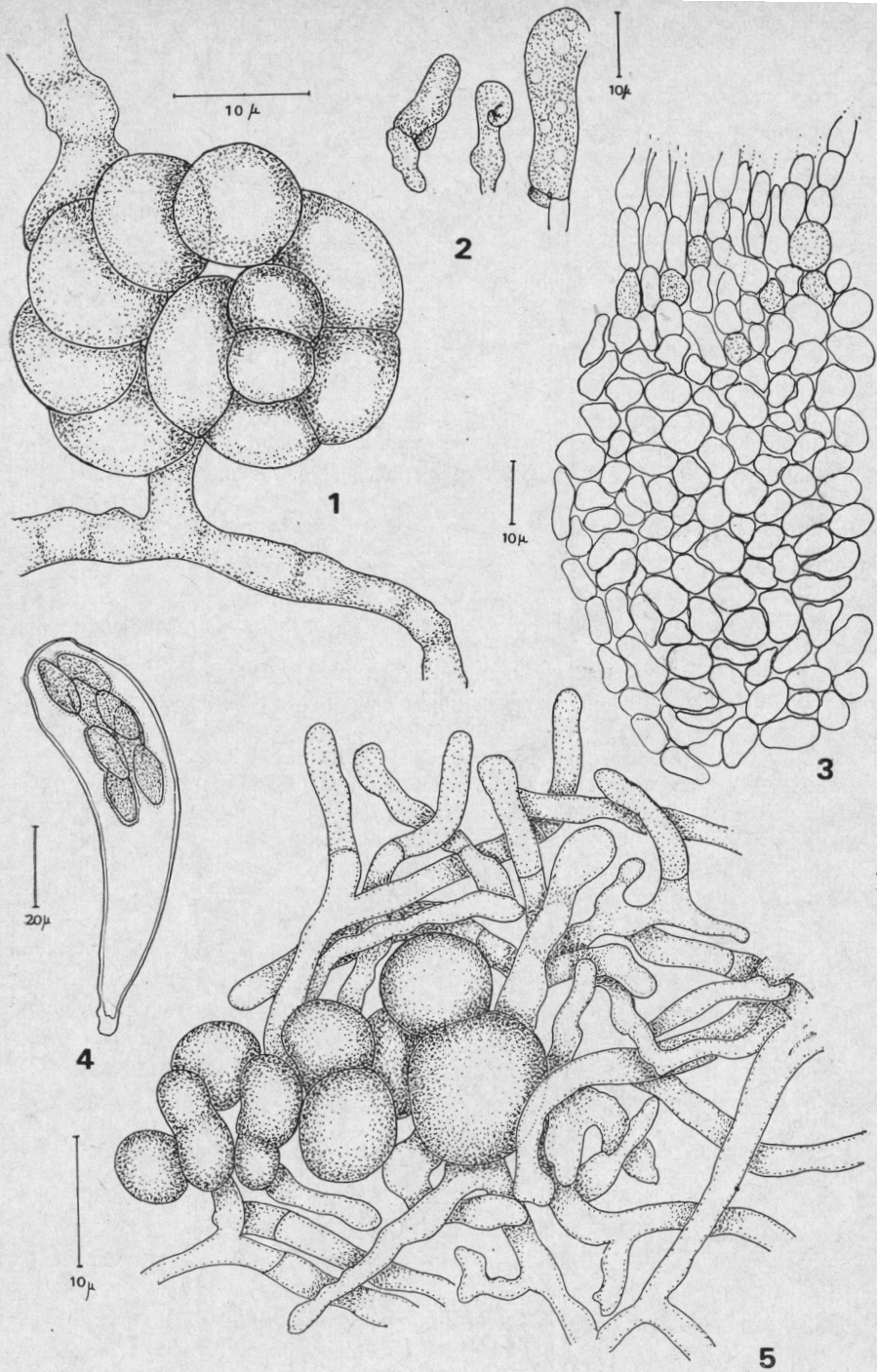
Paráfisis: filiformes, con el ápice algo ensanchado, pluriseptadas, muy poco ramificadas, con las células terminales repletas de pigmento amarillo, sobre todo en apotecios jóvenes. Diámetro: 2,5-4,1 μ .

Ascosporas: al principio hialinas, luego violadas y finalmente castañas, fusiformes, de pared lisa a finamente granulosa, ordenadas en paquetes de ocho dentro del asco, pero separadas entre sí. Durante su desarrollo se disponen de acuerdo al patrón I de van Brummelen (1967: 41), pero una vez expulsadas se ubican en dos planos de cuatro, ligeramente desplazados. No hay mucílago único que envuelva las ocho ascosporas, sino cada una de ellas posee una delgada capa que la rodea, a veces algo confluyente con el mucílago de la célula vecina: 13,2-15,7 \times 5,8-7,4 μ .

Excípulo: muy poco visible cuando el apotecio madura. En apotecios jóvenes constituido por células más o menos globosas de "textura angularis" que se disponen en hileras, con algunas células intensamente coloradas debido a la presencia de pigmento similar al de las paráfisis.

Habitat: fimícola, encontrado por nosotros sobre estiércol de caballo y de vaca.

Material estudiado: Entre Ríos, Paraná, Barrio San Agustín, leg. Nora Prudkin, V/1970, sobre estiércol de caballo, colocado en cámara húmeda en el laboratorio a los 12 días de coleccionado y a los 10 días de preparada la cámara húmeda. BAFC 22326, C-311. Buenos Aires, Ezeiza, leg. Ranalli-Jaroslavsky, VI/1970. Aparecido en estiércol de caballo colocado en cámara húmeda en el laboratorio a los nueve meses de coleccionado y a los 10 días de preparada la cámara. BAFC 22327. Santa Fe, Recreo, leg. Ranalli-Cinto, VII/1970, aparecido sobre estiércol de vaca en cámara húmeda a los siete meses de coleccionado y a los nueve días de preparada la cámara. BAFC 22389.



Lám. I. — *Saccobolus saccoboloides* (Seaver apud Dodge & Seaver) van Brumm. 1, ascogonio en cultivo de cinco días en medio « standard »; 2, distintos estadios en la formación inicial de ascos; 3, células del exémpulo en joven apotecio en cultivo de ocho días en medio « standard »; 4, ascó maduro; 5, joven protoapotecio con hifas envolventes y paráfisis.

Observaciones: hemos determinado nuestro material utilizando la descripción original (Dodge and Seaver: 1946), y la descripción e ilustraciones de van Brummelen (*op. cit.*). Si bien los caracteres distintivos de la especie coinciden con nuestro material, hay alguna diferencia con respecto al tamaño de los apotecios, ascos y ascosporas, que en nuestro material son más pequeños.

ESTUDIO DE CULTIVOS

Las observaciones se llevaron a cabo utilizando la cepa C-311 observándose su comportamiento durante un año consecutivo. Se empleó la misma metodología que en trabajos anteriores. En las cámaras húmedas preparadas con el estiércol original, los apotecios aparecen alrededor del 9°-10° día.

a) GERMINACIÓN DE ASCOSPORAS

Dodge & Seaver (*op. cit.*) trabajando con *S. saccoboloides* encontraron cierta dificultad para inducir la germinación de las ascosporas. Utilizando como medio de cultivo una decocción de estiércol agarizada, las ascosporas tardaban mucho en germinar y el crecimiento de los tubos germinativos era tan lento, que las cajas terminaban por infectarse, debido a que eran abiertas con frecuencia para observarlas. El tratamiento con calor a que las sometieron también fue inefectivo, ya que sólo ocasionalmente germinaban algunas después de varios días. Sin embargo obtuvieron muy buenos resultados usando medio de cultivo preparado con una decocción de estiércol al que se le agregaba levadura entera o bien extracto de levadura. A las 72 horas un alto porcentaje de ascosporas estaban germinadas. Nosotros ensayamos soluciones de OHNa al 0,2, 0,3 y 0,4 % durante 10 y 30 minutos, con esporas provenientes de cultivos sobre medio PF, C y E, con 2 y 10 días de reposo, donde no hubo germinación espontánea. Los resultados obtenidos se consignan en el cuadro de la página siguiente.

Debido a la disposición tan poco compacta de las esporas en el paquete, cuando éstas alcanzan el agar se disponen en un mismo plano, pudiéndose distinguir fácilmente cuales de ellas están germinadas. Es por ello, que los porcentajes de germinación que se consignan en el cuadro, son absolutos.

Las ascosporas germinadas aumentan notablemente de tamaño, las paredes se aclaran y separan y el contenido aparece removido. La germinación se produce por medio de 1 ó 2 tubos subpolares que se ramifican profusamente a corta distancia.

Del análisis del cuadro se desprende: a) la viabilidad de las ascosporas disminuye a medida que aumenta el período de reposo; b) las diferencias en los resultados obtenidos para un tratamiento dado con ascosporas provenientes de cultivo en uno u otro medio, no son significativas.

Proc. de las esporas	Días de reposo	Tratamiento			
		Conc. HONa %	tiempo	período de inc. a 37° C	porcentaje de germinación
E	2	0,2	30'	48 hs.	88
	2	0,3	30	48 »	99,5
	2	0,4	10	48 »	100
C.....	2	0,2	30	48 »	66
	2	0,3	30	48 »	93
	2	0,4	10	48 »	95
PF	2	0,2	30	48 »	91
	2	0,3	30	48 »	75
PF	10	0,3	30	48 »	95,3
C.....	10	0,2	30	48 »	61
	10	0,3	30	48 »	100
E.....	10	0,2	10	48 »	61
	10	0,3	30	48 »	95
	10	0,4	10	48 »	87,5

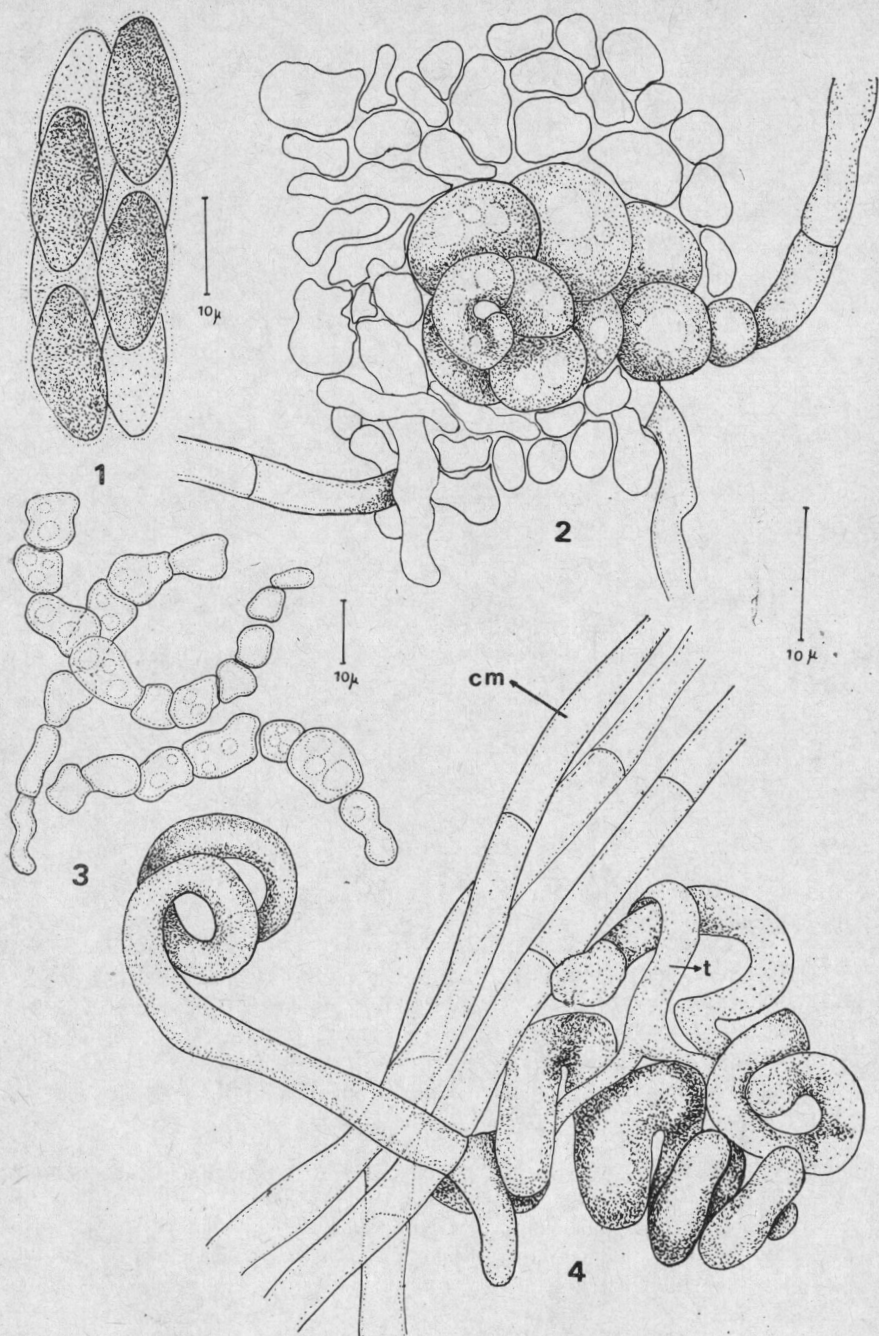
b) CRECIMIENTO Y DESARROLLO EN MEDIO NUTRITIVO
"STANDARD" (PF)¹

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 de crecimiento lento, las colonias alcanzan a los seis días entre 4 y 5 cm de diámetro. El micelio es rasante, con crecimiento abierto y radial; escaso micelio aéreo en las cercanías del inóculo. Hifas de ramifi-

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



Lám. II. — *Saccobolus saccoboloides* (Seaver apud Dodge & Seaver) van Brumm. 1, paquete de ascoporas maduras; 2, joven protoapotecio mostrando ascogonio; 3, hifas infladas del micelio en las cercanías de la base de los primordios. *Saccobolus succineus* van Brumm. 4, hifas de un cordón miceliano (cm) de las que emergen el ascogonio con forma de tirabuzón y el anteridio (t).

cación monopodial que llegan a la misma altura en el borde de modo que éste es liso. Cuando el micelio está en contacto directo con el papel de filtro (en zonas donde el medio de cultivo no se repartió homogéneamente) es más algodonoso.

Caracteres microscópicos

Micelio sumergido con hifas de dos tipos: *a*) hifas gruesas, de recorrido recto y muy extensas, con ramificaciones espaciadas y abundante contenido granuloso, muy poco vacuoladas. Diámetro: 2,6-4,1 μ ; *b*) hifas más finas, retorcidas, con abundantes anastomosis laterales. Diám.: 0,8-1,3 μ . Las hifas gruesas crecen radialmente, mientras que las más finas las entrecruzan y conectan lateralmente.

Se observan cordones micelianos constituidos por hifas trenzadas, que se extienden a grandes distancias y dan lugar, previo engrosamiento, a las células ascogoniales.

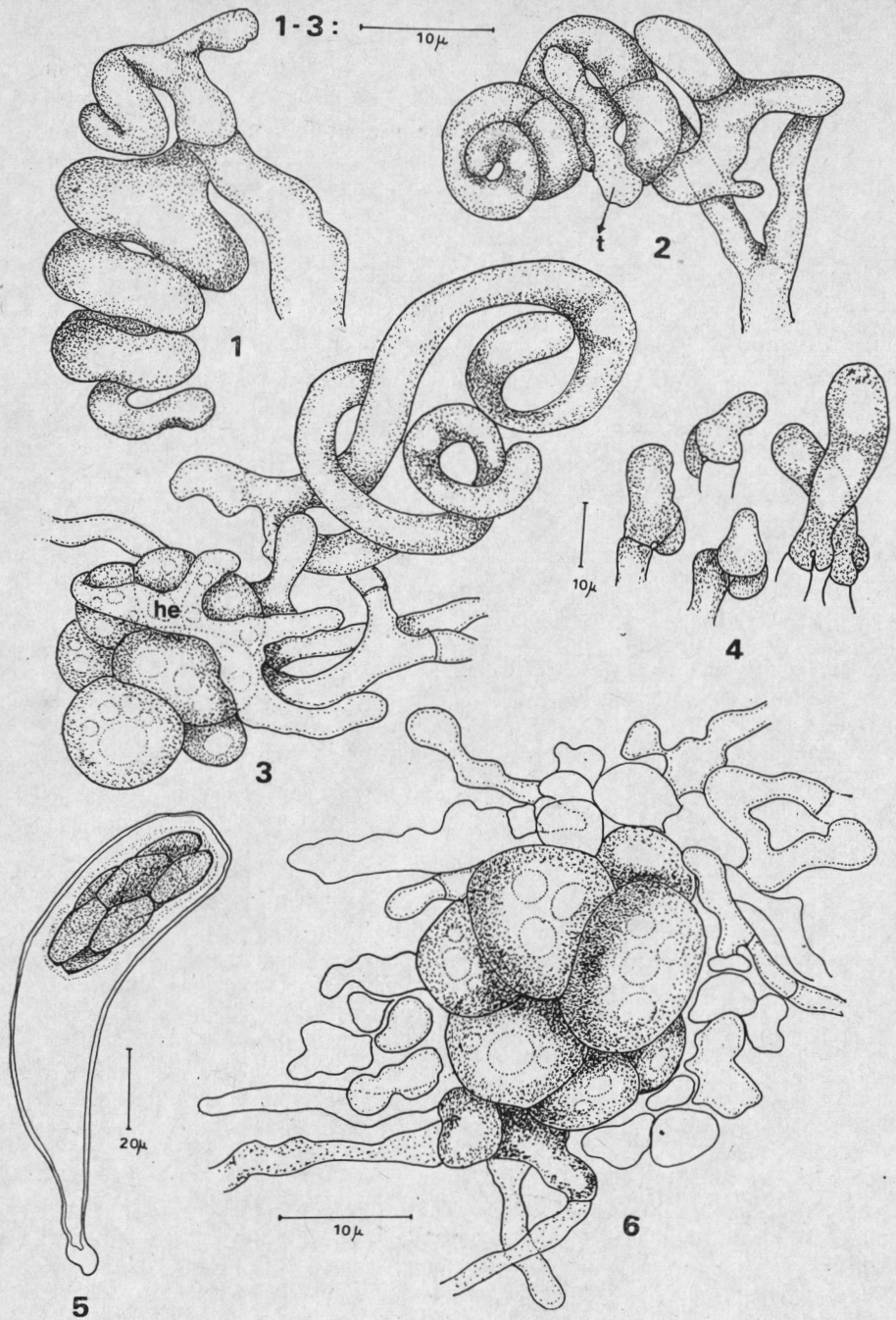
c) SEXUALIDAD

Los cultivos monospóricos forman al 5º-6º día numerosos primordios translúcidos, luego amarillentos, superficiales, concrecentes o bien separados unos de otros, que se distribuyen irregularmente en la caja. La maduración es centrífuga y comienza alrededor del 9º-10º día. El hongo es homotálico.

d) DESARROLLO DEL APOTECIO

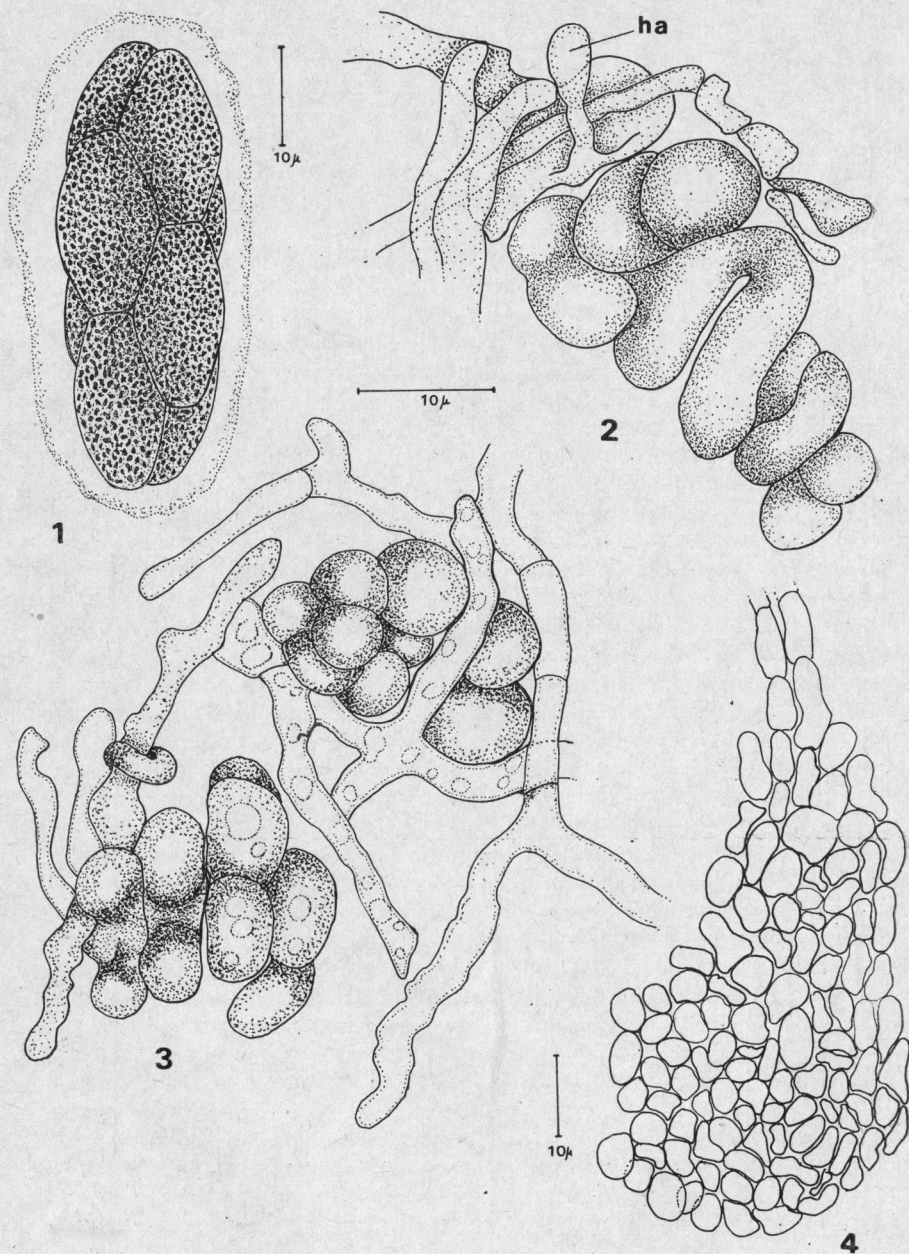
El *período inicial*¹ comienza alrededor del 3º-4º día, con la formación de los cordones micelianos ya mencionados, a partir de los cuales se diferencian ascogonios, que aparecen en los preparados generalmente de perfil, debido a que las espiras que los constituyen están separadas, dándole aspecto de tirabuzón (Lám. 1, fig. 5). Una vez diferenciado el ascogonio, comienzan a rodearlo hifas envolventes que se disponen laxamente y configuran en conjunto el joven protoapotecio; a cierta distancia, sobre el mismo cordón miceliano, se diferencia otro ascogonio, el que sigue posteriormente el mismo camino. También es frecuente encontrar dos o más ascogonios muy próximos y cuando las hifas envolventes comienzan a rodearlos, los incluyen en un mismo protoapotecio, es decir, que podemos encontrar primordios con 1, 2 o más ascogonios. También se observan ascogonios individuales, sostenidos por la hifa madre, similar a las vegetativas pero algo más engrosada, independiente de los cordones micelianos (Lám. I, fig. 1). Las células ascogoniales, globosas y en número variable, de 7-12 μ de diám., describen 3-4 vueltas, alcanzando los ascogonios, diá-

¹ Para nomenclatura de períodos de desarrollo ver Gamundí y Ranalli (1963).



Lám. III. — *Saccobolus succineus* van Brumm. 1, joven ascogonio en cultivo de seis días en medio « standard »; 2, otro estadio en la formación del ascogonio alrededor del anteridio (t); 3, joven protoapotecio con incipientes hifas envlventes (he); 4, distintos estadios en la formación de ascos; 5, asco maduro; 6, joven protoapotecio coñ ascogonio completamente diferenciado e hifas envlventes. •

metros comprendidos entre 23-30 μ . Los protoapotecios en el período inicial miden 30-60 μ de diám., las hifas envolventes rodean muy laxamente el o los ascogonios (“textura intricata laxa” en vista superficial). No se ha observado la presencia de anteridio ni tampoco plasmogamia con hifas adyacentes, por lo que se supone que el apotecio es partenocárpico. El *período de diferenciación* comienza cuando los primordios alcanzan alrededor de 60 μ ; en secciones de los mismos ya puede diferenciarse la parte apical de la basal (Lám. I, fig. 5). La presencia de jóvenes paráfisis, poco numerosas pero perfectamente distinguibles por su recorrido recto, pared más gruesa y contenido apical pigmentado, facilitan la visualización. Al mismo tiempo que se diferencian las paráfisis, comienzan a aparecer hifas ascógenas (Lám. I, fig. 5) que previa formación de un gancho apical originan ascos, del tipo pleurorrinco. Jóvenes apotecios de 106 μ de diám. presentan el himenio perfectamente diferenciado, con abundantes paráfisis entre las cuales se observan ascos que recién han comenzado a formarse. El *período de crecimiento* se superpone con el de *diferenciación*. Jóvenes apotecios de 87 μ de altura tienen el excípulo diferenciado, constituido por células globosas de “textura globulosa” a “angularis” en la zona central que correspondería a la médula y por células más alargadas y curvadas hacia arriba, dispuestas en forma más compacta, que terminan en la base de las paráfisis y marcan el límite exterior del apotecio, que no tiene borde diferenciado. No se puede distinguir bien entre médula y corteza. Los jóvenes ascos alcanzan en este estado 14 μ de longitud y las paráfisis, muy abundantes, sobresalen hasta 18 μ por encima de los ascos. El himenio tiene un espesor de alrededor de 40 μ . En la zona central basal se observan lagunas, probablemente donde estuvo el ascogonio, cuyas células ya no se distinguen. El crecimiento se manifiesta por un aumento progresivo del diámetro del apotecio y un cambio en la forma, llegando a ser hemisférico, con el himenio convexo y una curvatura en la zona central basal que corre paralela a la curvatura del himenio. Cuando los apotecios alcanzan 200 μ de diám. y 100 μ de altura, se observan ascos con 8 ascosporas diferenciadas y que ya han alcanzado la altura de las paráfisis. El excípulo en la zona central basal se hace aún más lacunoso, y los bordes del apotecio están demarcados por las paráfisis. Alrededor del 8° día, los apotecios alcanzan 330 μ de diám., y ya son netamente hemisféricos, con ascosporas que han comenzado a depositar el episporio, marcando el comienzo del *período de maduración*. Los ascos maduros llegan a la altura de las paráfisis, pero sólo las sobrepasan inmediatamente antes de expulsar las ascosporas. Vistos superficialmente, la gran cantidad de ascos maduros le confiere a la fructificación un color castaño anaranjado característico. No obstante, aún hay gran cantidad de ascos inmaduros. En cultivos de 10 días, cuando los apotecios alcanzan 420 μ , el período de maduración está en su apogeo. El apotecio tiene un tipo de desarrollo *paragimnohimiental*.



Lám. IV. -- *Saccobolus succineus* van Brumm. 1, paquete de ascoporas maduras; 2, ascogonio joven mostrando ya uña hifa ascógena (ha); 3, dos ascogonios en vías de formación en cultivos de seis días sobre medio «standard»; 4, células del excipulo.

e) CULTIVO EN DIFERENTES MEDIOS VARIANDO LAS CONDICIONES DE ILUMINACIÓN

Se utilizó el aislamiento monospórico N° 9 de la cepa C-311. Se emplearon 30 cajas de Petri: 10 con medio nutritivo "standard" (PF); 10 con medio de Wood¹ modificado y 10 con estiércol de vaca tinalizado (E), que se distribuyeron 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 permanecieron a temperatura constante de 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 18 días y se repitió 3 veces, manteniéndose las mismas condiciones anteriores, pero utilizando cultivos monospóricos recientemente aislados a partir de esporas recogidas en el ensayo anterior. Los resultados obtenidos se resumen en el siguiente cuadro:

Medio	Luz Continua				Oscuridad			
	Apar. de primordios		Mad. de apotecios		Apar. de primordios		Mad. de apotecios	
PF.....	5°	6°	10°	15°	7°	12°	9°	15°
C.....	6	10	10	15	8	10	12	14
E.....	10	14	14	18	—	8	—	13

A los 18 días maduran las fructificaciones en todos los medios en ambas series. Si bien en estiércol de vaca tinalizado el desarrollo es más lento, la cantidad de fructificaciones producidas es mayor que en los otros dos medios.

Saccobolus succineus van Brumm.

Persoonia 5, Part. 3: 229, fig. 4. 1969.

Apotecios: solitarios o gregarios, superficiales, sésiles; 304-640 μ de diám., al principio subglobosos, finalmente pulvinados, de color amarillo claro al comienzo, luego amarillo intenso y finalmente cuando maduros, amarillo claro; glabros, margen no diferenciado, himenio convexo, con los ápices de los ascos maduros emergiendo por sobre la superficie, oscuros, observándose por transparencia bajo la lupa, los paquetes de ascosporas.

¹El medio de Wood modificado consiste en: casamino acids: 0,2 g; CO₃Na₂: 0,5 g; PO₄HK₂: 0,5 g; glucosa: 0,5 g; extracto de levadura "Difco": 4 g; trazas de SO₄Zn y SO₄Fe; agar: 25 g; agua destilada 1000 cc y 1 disco de papel filtro Carl Schleider and Schull N° 595 en cada caja; pH = 8 después de la esterilización.

Ascos: claviformes, afinándose hacia la base, ápice chato, opérculo central, octosporados, frecuentemente curvados; $108-136 \times 24-28 \mu$. Pared amiloide débil (Lám. III, fig. 5).

Paráfisis: abundantes, filiformes, simples o ramificadas, pluriseptadas, con abundante contenido colorado, salvo una o dos células basales incolores; diám.: $3,2-4,1 \mu$.

Ascosporas: dispuestas en paquetes siguiendo el patrón I de van Brummelen, con mucílago que envuelve completamente el paquete: $44,8-56 \times 15,7-18,2 \mu$ (Lám. IV, fig. 1), fusiformes, al principio hialinas, luego violadas y finalmente castaño-vinosas: $19-21,5 \times 8,3-9,3 \mu$. Esporidio finalmente granuloso, esporádicamente con finas grietas.

Excípulo: muy escaso, reducido a una pequeña zona en la parte basal central del apotecio maduro; constituido por células globosas, de "textura globulosa" en la zona basal propiamente dicha y más alargadas en la parte superior. Células hialinas, sin pigmento intra o intercelular (Lám. IV, fig. 4).

Habitat: fimícola, sobre estiércol de caballo y vaca.

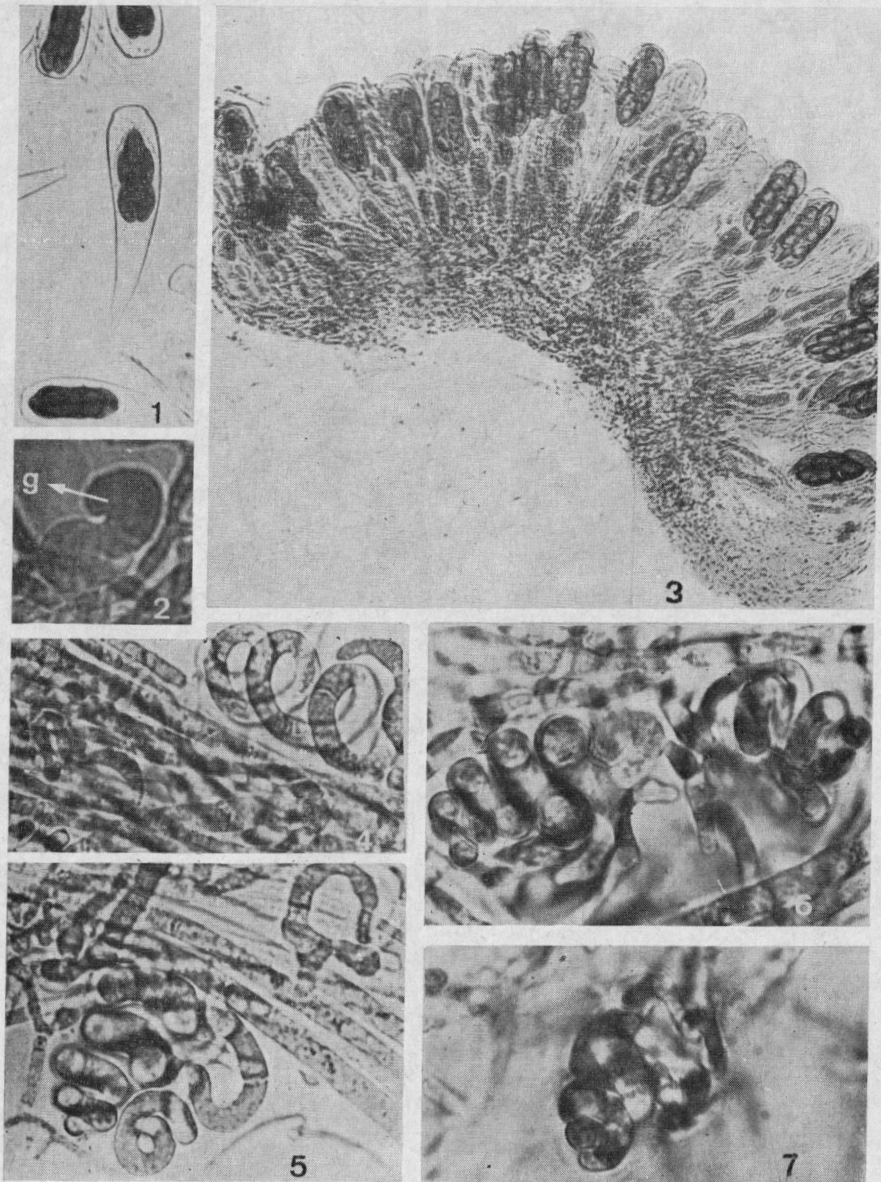
Material estudiado: Entre Ríos, Paraná, barrio San Agustín, leg. Nora Prudkin, V/1970, sobre estiércol de caballo en cámara húmeda en el laboratorio, a los 12 días de coleccionado y a los 10 días de colocado. BAFC 22329 C-308. Buenos Aires, Campana, leg. N. Jaroslavsky, VI/1970, sobre estiércol de vaca en cámara húmeda en el laboratorio a los dos meses de coleccionado y a los 10 días de colocado. BAFC 22330, C-2281. Ezeiza, leg. Ranalli-Jaroslavsky, VI/1970, sobre estiércol de caballo en cámara húmeda en el laboratorio, a los cuatro meses de coleccionado y a los 9 días de colocado. BAFC 22390, C-348.

Observaciones: Determinamos nuestro material basándonos en la descripción original hecha por van Brummelen (1969: 229). Hay una pequeña diferencia con respecto al tamaño de las fructificaciones, que en nuestro material son más grandes, además, en las colecciones examinadas no encontramos anisosporia en los paquetes. Por lo demás, el resto de los caracteres coincide plenamente.

Especie citada por primera vez para Argentina.

ESTUDIO DE CULTIVOS

Se llevaron a cabo con la cepa C-308, cuyo comportamiento se observó durante un año consecutivo, empleando la misma metodología que en casos anteriores.



Lám. V. — *Saccobolus succineus* van Brumm. 1, asco maduro $\times 240$; 2, hifa ascógena con gancho (g). Coloración con floxina $\times 1250$; 3, sección longitudinal radial de un apotecio maduro. Coloración con azul láctico $\times 350$; 4, sector de un cordón micéliano mostrando una hifa espiralada que inicia la formación de un ascogonio. Coloración con floxina $\times 1000$; 5, ascogonio en estado más avanzado. Coloración con floxina $\times 1000$; 6-7, dos ascogonios en cultivo sobre medio «standard». Coloración con floxina $\times 1000$.

a) GERMINACIÓN DE ASCOSPORAS

Se ensayaron tratamientos inductores con soluciones de OHNa al 0,2; 0,3 y 0,4 % durante 10 a 30', con ascosporas procedentes de cultivos en PF y E, con 5 y 10 días de reposo. Los resultados obtenidos se resumen en el cuadro siguiente:

Proc. de las esporas	Días de reposo	Tratamiento			
		conc. OHNa %	tiempo	período de inc. a 37° C	porcentaje de germinación
E.....	10	0,3	30'	48 hs.	62,5
	10	0,2	30	48 »	7
	10	0,4	10	48 »	3,5
	10	0,4	30	48 »	62,5
E.....	5	0,3	30	48 »	59,0
	5	0,2	30	48 »	41,0
	5	0,4	30	48 »	12,0
	5	0,4	10	48 »	22,0
PF.....	10	0,3	30	48 »	19,5
	10	0,2	30	48 »	81,0
	10	0,4	30	48 »	76,5
	10	0,4	10	48 »	89,0
PF.....	5	0,3	30	48 »	66,5
	5	0,2	30	48 »	28,0
	5	0,4	30	48 »	63,0
	5	0,4	10	48 »	4,5

A pesar de que los resultados son bastante aleatorios, se observó que a diferencia de los hallados en *S. saccoboloides*, las esporas germinan mejor cuando son sometidas a períodos de reposo.

b) CRECIMIENTO Y DESARROLLO EN MEDIO NUTRITIVO "STANDARD"

Se siguió la misma metodología que para la especie anterior.

Caracteres macroscópicos de la colonia

Aspecto de la colonia semejante al de *S. saccoboloides*, micelio rasante, de crecimiento radial abierto, sin micelio aéreo. Al cabo de 7 días se forman primordios y la colonia alcanza entre 4,5-5 cm de diám. cuando las fructificaciones maduran.

Caracteres microscópicos

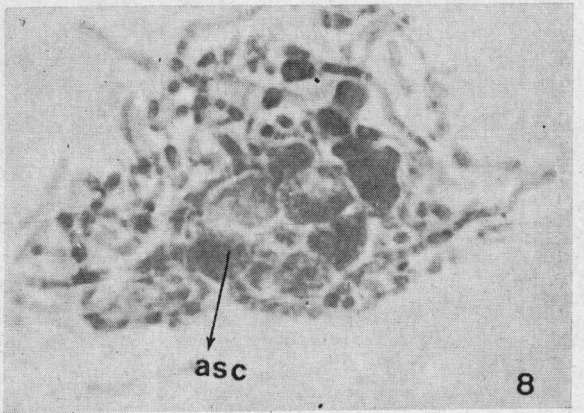
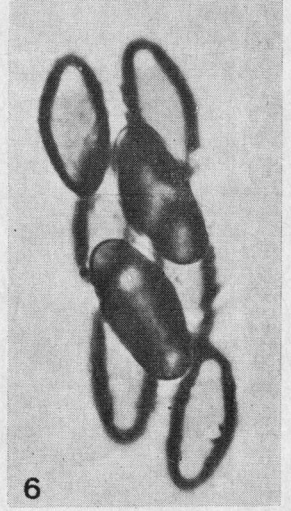
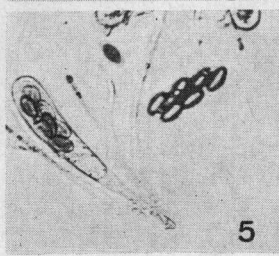
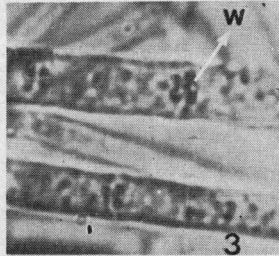
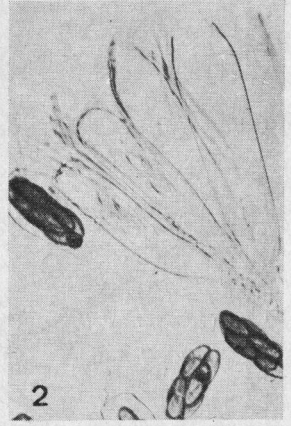
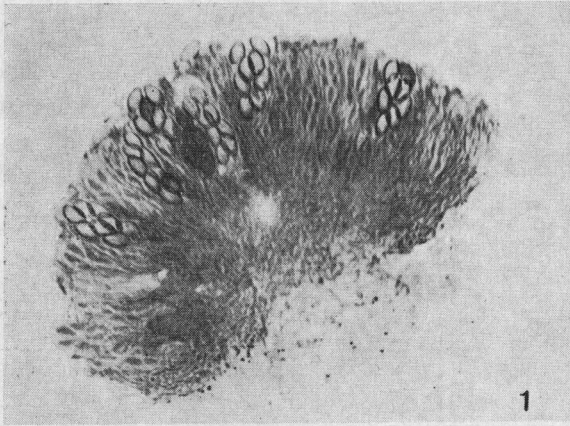
Micelio sumergido con dos tipos de hifas: a) gruesas, de recorrido recto, con tabiques bien visibles, donde se observan 3-5 cuerpos de Woronin. Contenido denso, pocas vacuolas, se tiñen intensamente con floxina. Forman cordones de hifas más o menos paralelas entre sí, menos compactas que en *S. saccoboloides*: 2,6-4,8 μ de diám.; b) hifas delgadas, retorcidas, ramificadas abundantemente, con frecuencia muy vacuoladas, que se ubican entre las gruesas: 0,8-1,5 μ de diám.

c) SEXUALIDAD

Cultivos monospóricos en caja de Petri maduran y arrojan normalmente las esporas al cabo de nueve días. El hongo es *homotálico*.

d) DESARROLLO DEL APOTECIO

El *periodo inicial* comienza al 3º-4º día cuando aparecen en el micelio los ascogonios que se forman sobre los cordones micelianos y comienzan como hifas vegetativas que se enrollan generalmente alrededor de una hifa de características similares a las hifas vegetativas (anteridio?), su contenido se tiñe intensamente con floxina. Suele haber, igual que en *S. saccoboloides* más de uno por apotecio. En general se observan muy pocos ascogonios aislados sobre el micelio, mientras que son muy abundantes sobre los cordones. Esto podría explicar la disposición regular y ordenada de las fructificaciones en las cajas de cultivos, formando círculos concéntricos y radios. En cultivos de 5 días, los protoapotecios son visibles a ojo desnudo, constituidos por uno o dos ascogonios rodeados laxamente por hifas envolventes que se dirigen centrípetamente hacia el ascogonio (Lám. III, fig. 3). Protoapotecios con un ascogonio alcanzan en el período inicial, hasta 66 μ de diám., los que contienen más de uno llegan a medir 133 μ . El *periodo de diferenciación* se inicia alrededor del 6º día, cuando los protoapotecios miden 66-140 μ ; ya hay abundantes paráfisis, dispuestas paralelamente entre sí, alternando con hifas ascógenas, que previa formación de un gancho apical, originan los ascos. El excípulo co-



mienza a diferenciarse con características similares a *S. saccoboloides*. Cuando los apotecios alcanzan 206 μ de diám., tienen abundantes ascos uninucleados y muy pocos con las ascosporas diferenciadas, romboidales, de paredes gruesas, uninucleadas, que ocupan completamente el asco. El *período de crecimiento* se superpone con el de *diferenciación*, los apotecios aumentan de tamaño debido a la proliferación de ascos y paráfisis y al aumento de tamaño que experimentan los ascos en vías de maduración, siendo finalmente pulvinados, con el excípulo limitado a la zona central basal, con margen no diferenciado. El *período de maduración* comienza al 8º día, cuando los apotecios alcanzan 300 μ de diám., con características similares a las descritas para *S. saccoboloides*. El tipo de desarrollo es *paragimnobia*.

e) CULTIVO EN DIFERENTES MEDIOS VARIANDO LAS CONDICIONES DE ILUMINACIÓN

Se utilizó el aislamiento Nº 7 de la cepa C-308. Los resultados obtenidos se resumen en el siguiente cuadro:

Medio	Luz continua				Oscuridad			
	Apar. de primordios		Mad. de apotecios		Apar. de primordios		Mad. de apotecios	
PF.....	5º	6º	9º	12º	6º	8º	10º	16º
C.....	6	7	9	13	7	9	11	16
E.....	7	8	10	14	9	10	12	18

Lám. VI. — *Saccobolus saccoboloides* (Seaver apud Dodge & Seaver) van Brumm. 1, sección longitudinal radial de un apotecio maduro. Coloración con azul láctico $\times 350$; 5, asco inmaduro, paráfisis y un paquete de ascosporas maduras $\times 360$; 6, paquete de ascosporas maduras $\times 2000$. *Saccobolus succineus* van Brumm.; 2, grupo de ascos mostrando opérculos $\times 390$; 3, hifas del micelio vegetativo donde se observan los tabiques y los cuerpos de Woronin (w). Coloración con floxina $\times 2000$; 4, sección longitudinal radial de un apotecio donde se observan las células del excípulo (ce); paráfisis del borde (p), asco uninucleado (an) y ascosporas inmaduras (ai). Coloración con azul láctico $\times 850$; 7, paquete de ascosporas maduras $\times 2000$; 8, sección longitudinal radial de un protoapotecio con ascogonio (asc) bien diferenciado. Coloración con azul láctico $\times 1250$.

CONCLUSIONES

Del estudio comparativo realizado con las dos especies de *Saccobolus*, no surgen diferencias notables en el comportamiento fisiológico y hay coincidencia con respecto a su tipo de desarrollo que es *paragimnobia* en ambas.

La presencia de cordones micelianos a partir de los cuales se originan los ascogonios, es también una característica, pero mientras en *S. saccoboloides* pueden encontrarse abundantes ascogonios aislados en el micelio, en *S. succineus* son muy poco frecuentes.

A diferencia de otras especies estudiadas anteriormente, la ausencia de luz no les impide cumplir su ciclo normalmente en los tres medios nutritivos ensayados, aunque se alarga. La cantidad de pigmento presente en las paráfisis es directamente proporcional a la cantidad de luz recibida. Cultivos mantenidos en oscuridad completa producen fructificaciones apenas coloradas, mientras que en luz continua son anaranjadas intensas.

Las esporas de *S. saccoboloides* no requieren períodos de reposo para germinar, por el contrario, su viabilidad disminuye, mientras que los tratamientos inductores de la germinación probados con esporas de *S. succineus* son más efectivos cuando éstas tienen 10 días de reposo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Irma Gamundí de Amos su asesoramiento y sugerencias, así como la lectura crítica del manuscrito, a la Lic. Norma Jaroslavsky su valiosa colaboración en los cultivos, y al Sr. Jorge Kikuchi por las fotografías.

BIBLIOGRAFIA

- BISTIS, G., 1956. Sexuality in *Ascobolus stercorarius* I. *Am. J. Bot.* 43 (6): 389-394.
- BOUDIER, J. L. E., 1869. Mémoire sur les Ascobolés. *Ann. Sci. Nat. (Bot.)* V, 10: 191-268. Lám. 3-4.
- BULLER, R., 1933. *Researches on fungi*. London, 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.
- 1969. Studies on Discomycetes III. *Persoonia Suppl.*, 5: 225-231.
- CHADEFAUD, M., 1943. Sur les divers types d'éléments dangeardiens des Ascomycetes et sur la formation des asques chez la pézize *Pustularia catinus*. *La Revue 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: 262-274, 4 figs.
- 1929 b. Studies in the morphology of Discomycetes II. *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.
- DODGE, B. and SEAVER, F., 1946. Species of *Ascobolus* for genetic study. *Mycologia* 38 (6): 639-651.
- GAMUNDÍ, I. y RANALLI, M. E., 1963. Apothecial development of *Ascobolus stercorearius*. *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. and WILLIAMSON, H. S., 1933. Notes on the Ascobolaceae. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 18 (2): 127-134, 21 figs.
- LARSEN, K., 1970. The genus *Saccobolus* in Denmark. *Botanisk Tidsskrift*, 65 (4): 371-389.
- 1971. Danish endocoprophilous fungi and their sequence of occurrence.
- MOORE, R. T. and MCALEAR, J. H., 1962. Fine structure of mycota. 7. Observations on septa of Ascomycetes and Basidiomycetes. *Am. J. Bot.* 49: 86-94, figuras 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. J. Bot.* 41: 21-30.
- YU-SUN, C. C., 1964. Nutritional studies of *Ascobolus immersus*. *Am. J. Bot.* 51: 231-237.