

ENSAYOS DE NUTRICION  
EN *ASCOBOLUS CRENULATUS* P. KARST.  
(FUNGI: ASCOMYCETES)<sup>1</sup>

POR MIGUEL ANGEL GALVAGNO<sup>2</sup>

SUMMARY

A synthetic medium for vegetative growth and apothecial formation of a strain of *A. crenulatus* has been formulated as follows:  $K_2HPO_4$ , 0.6 g;  $KH_2PO_4$ , 0.5 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5 g; trace elements sol. 1 ml; asparagine, 5 g (for vegetative growth), or urea, 0.5 g (for apothecial production); glucose, 20 g (for v.g.) or 10 g (for a.p.); biotin, 5  $\mu$ g; thiamine, 100  $\mu$ g; and bi-distilled water 1 lit. For the production of apothecia "Difco's Bacto-agar" 20 g and "Whatman's" cellulose powder 10 g was added. This strain can utilize  $(NH_4)_2HPO_4$  and organic N as asparagine, urea and casein hydrolysate for vegetative growth, and  $KNO_3$ , urea and asparagine for apothecial production, whereas  $(NH_4)_2HPO_4$  and casein hydrolysate were very poor or inhibitory N sources for sporulation. A concentration of 0.05 %  $KNO_3$  produced ascocarps with abnormal ontogenetic development. Mannose, glucose and di- and polysaccharides producing glucose by hydrolysis were the best C sources both for vegetative growth and for sexual reproduction; dextrine was a good C source for sporulation but not for vegetative growth. This strain could not use galactose, sorbose, lactose, sucrose, inulin and Na acetate under the experimental conditions investigated.

The optimum C/N ratio was 1 % glucose and 0.05 % urea. The concentration of urea in the medium conditions the formation of ascospores with exosporium. The strain of *A. crenulatus* tested exhibited deficiency in the synthesis of biotin and thiamine.

INTRODUCCION

*Ascobolus crenulatus* P. Karst., es un Ascomycete homotálico, perteneciente al orden Pezizales, familia Ascobolaceae, que desarrolla normalmente en estiércol, principalmente de herbívoros. El micelio crece por debajo de la superficie del sustrato, y produce fructificaciones que emergen de éste; en la madurez, los ascos expulsan las ascosporas con violencia, las

<sup>1</sup>Trabajo realizado con el aporte de un subsidio otorgado por la U.N.B.A. a la profesora María E. Ranalli de Cinto.

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (U.N.B.A.).

que se adhieren al follaje. Cuando éste es ingerido por algún animal, las ascosporas pasan a través del tracto digestivo del herbívoro, y bajo condiciones favorables germinan en el estiércol expulsado.

Varias especies del género *Ascobolus* fueron cultivadas con éxito en el laboratorio por diversos autores en sus sustratos naturales (Dangeard, 1907; Dodge, 1912 a, 1912 b; Ramlow, 1915; Dowding, 1931; Rizet, 1939) y en medios naturales y semisintéticos, entre otros por: Gwynne-Vaughan y Williamson, 1933; Wood, 1953; Yu, 1954; Gamundí y Ranalli, 1963, 1964, 1966, 1969; Ranalli y Cinto, 1972. El primer ensayo llevado a cabo en un medio sintético fue realizado por Green (1931) con *A. stercorarius*; más tarde Yu-Sun (1964) realizó estudios nutricionales en *A. immersus* utilizando diversos medios sintéticos.

Hasta el momento no se conocen estudios sobre los requerimientos nutricionales de *A. crenulatus* P. Karst. El presente trabajo tuvo por objeto la obtención de un medio de cultivo sintético, sencillo y fácil de reproducir para el crecimiento vegetativo y la reproducción sexual de una cepa de *A. crenulatus* que ya ha sido estudiada desde el punto de vista de su ciclo de vida y desarrollo (Gamundí y Ranalli, 1966). La obtención de tal medio es un prerequisite indispensable para estudios posteriores dirigidos a dilucidar los mecanismos que condicionan las respuestas de ésta y otras especies del género *Ascobolus* frente a estímulos externos, su metabolismo, citología y posición taxonómica, aspectos que ya se están estudiando en este laboratorio.

#### MATERIALES Y METODOS

Se trabajó con la cepa C-2179 de *A. crenulatus* P. Karst. depositada en la micoteca de nuestro Departamento, de la cual se hicieron aislamientos monospóricos a partir de ascosporas obtenidas de cultivos en estiércol de vaca tindalizado; éstos se repitieron periódicamente para evitar el alargamiento del ciclo de vida debido al continuo repicaje de la cepa y a la permanencia a bajas temperaturas, que pueden conducir a su esterilización al cabo de dos años (Gamundí y Ranalli, 1966). Las ascosporas obtenidas en agar-agua al 2.5 % fueron tratadas con una solución de OHNa al 0.05 % para inducir la germinación. Los aislamientos monospóricos se mantuvieron en medio standard (PF) (Gamundí y Ranalli, 1966) en el refrigerador a 10° C hasta el momento de su utilización. El inóculo para los ensayos nutricionales fue un disco de 2 mm de diámetro tomado de una colonia que creció en 25 ml de un medio agarizado en el cual el hongo no esporula y al que llamamos medio Inóculo<sup>3</sup>.

<sup>3</sup>El medio Inóculo consiste en: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.6 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g; d-glucosa, 10 g; l-asparagina, 5 g; sol. de elem. vestigiales (Mycological Society of America, 1970), 1 ml; biotina, 5 µg; HCl de tiamina, 100 µg; bacto-agar (Difco), 20 g; agua bidestilada, 100 ml.

El material de vidrio fue sometido durante 24 horas a la acción de una solución de bicromato de potasio y ácido sulfúrico, lavado luego con detergente especial, enjuagado 6 veces con agua de canilla caliente y 3 veces con agua bidestilada por vidrio. En las experiencias que involucran sustancias de crecimiento, los enjuagues con agua bidestilada fueron aumentados a 6.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 20 min. a 121° C. Los mono-, oligo- y polisacáridos se esterilizaron separadamente y se añadieron estérilmente al medio basal para evitar su alteración (Maillard, 1912; Englis y Hanahan, 1945; Lilly y Barnett, 1951). Las sustancias de crecimiento se esterilizaron a través de filtros esterilizantes Seitz y se añadieron al medio basal en las concentraciones requeridas. Se prepararon soluciones acuosas madre, las que fueron congeladas hasta el momento de su uso. Las soluciones preparadas a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  fueron las de: 1-ácido ascórbico, ácido fólico, ácido nicotínico, ácido *p*-aminobenzoico, HCl de piridoxal, riboflavina, HCl de tiamina; las soluciones de biotina e *i*-inositol contenían respectivamente: 5  $\mu\text{g/ml}$  y 5 mg/ml de dichas vitaminas. En las experiencias que involucran sustancias de crecimiento, los medios de cultivo basales, sin la adición de los elementos vestigiales, fueron calentados 2 veces hasta ebullición con carbón activado (Norit A, 5 g/1); los medios empleados para estas experiencias se consideraron libres de vitaminas (Lilly y Barnett, 1951). Los tapones de algodón de los Erlenmeyer en donde creció el hongo fueron protegidos con gasa medicinal para evitar la contaminación de los medios de cultivo con partículas de algodón, las que pueden aportar sustancias de crecimiento (Leonian y Lilly, 1942; Sherwood y Singer, 1944).

El pH inicial de todos los medios varió entre 6.3 y 6.6 (rango que se consideró satisfactorio tanto para el crecimiento vegetativo como para la producción de apotecios). Cuando fue necesario ajustar los valores de pH dentro de ese rango, se utilizaron soluciones 0.1 N de NaOH o de HCl. El ajuste se realizó antes de esterilizar en autoclave; experimentos exploratorios mostraron que el pH no cambiaba apreciablemente por este procedimiento. Las soluciones de oligo- y polisacáridos se ajustaron a pH 7, para minimizar las posibilidades de hidrólisis durante la esterilización por calor (Bretzloff, 1954). El pH de los medios agarizados fue determinado con papel Macherey Nagel & Nagel: 516 Düren, escala 0.2 unidades, y el de los líquidos con pH-metro Photovolt.

Para producción de apotecios, el hongo se cultivó en cajas de Petri de 90 mm diam., conteniendo 25 ml de medio de cultivo agarizado, con el agregado de 1 % de polvo de celulosa (Whatman). Experimentos preliminares mostraron que esta concentración de polvo de celulosa es la apropiada para la obtención de fructificaciones (Forchiassin, comunicación oral); Yu (op. cit.) encontró que *A. viridulus* (= *A. crenulatus*) no precisaba papel de filtro para la producción de apotecios. En los ensayos sobre crecimiento vegetativo, el hongo fue cultivado en Erlenmeyer de 125 ml, conteniendo 25 ml de medio líquido. De cada experiencia se hicieron

cultivos por triplicado, repitiéndose al menos 2 veces; los cultivos infectados fueron descartados.

El crecimiento vegetativo se valoró tomando el peso seco del hongo creciendo a 25° C durante un período de 7 días; el micelio fue filtrado por embudo Buchner a través de papel de filtro (Carl Schleicher & Schull N° 595) y secado en estufa a 90° C hasta peso constante (Beadle y Horowitz, 1943); durante estas operaciones se tomaron las precauciones necesarias para evitar el fenómeno de "sopping" (Bretzloff, op. cit.). Los valores de peso seco, aproximados al miligramo, fueron registrados en una balanza analítica Mettler H5. Las determinaciones de pH final fueron tomadas del líquido remanente.

La producción de apotecios se estimó visualmente teniendo en cuenta la abundancia relativa de fructificaciones formadas por caja de Petri de acuerdo al método utilizado para *Neurospora crassa* por Westergaard y Mitchell (1947), quienes asignaron al número relativo de peritecios valores arbitrarios desde 0 a 10, computando la producción de esporas como + o—; los valores asignados a la producción de apotecios en estas experiencias incluyen la expulsión y abundancia relativa de ascosporas. En las experiencias de reproducción sexual los cultivos se mantuvieron a 23-24° C y los resultados se registraron al cabo de un período de 14 días (en algunos casos al cabo de períodos más prolongados). El control lo constituyó un cultivo del hongo creciendo en un medio con: extracto de levadura (Difco), 3 g; d-glucosa, 10 g; polvo de celulosa (Whatman), 10 g; sales y agar; al que se le dio el valor 8 en la escala precitada.

Para todas las experiencias los cultivos se incubaron en cámara de crecimiento a luz continua suministrada por 3 tubos fluorescentes de luz fría de 20 watts.

## RESULTADOS

### A) Efecto de las sustancias de crecimiento

En ensayos preliminares se estudió el crecimiento vegetativo de la cepa C-2179 de *A. crenulatus* en el medio Inóculo líquido, no suplementado con vitaminas, al que llamamos medio A; observándose sólo vestigios de crecimiento, planteándose la posibilidad de que el crecimiento casi nulo del hongo en esas condiciones podría deberse a la ausencia de esas dos vitaminas en el medio de cultivo. A fin de estudiar el efecto de las sustancias de crecimiento sobre el desarrollo vegetativo del hongo, se utilizó como medio basal el medio A.

Se hicieron once cultivos, cada uno por triplicado; en 9 de ellos fue omitida una de las 9 sustancias de crecimiento y las otras 8 agregadas, se utilizaron 2 controles: uno consistió en el medio A y el otro en el medio A conteniendo las 9 sustancias de crecimiento. Biotina e i-inositol se utilizaron en concentraciones de 0.125 y 125 µg/25 ml respectivamente, las

restantes fueron agregadas a una concentración de 2.5 µg/25 ml (Hackbarth y Collins, 1961).

Al cabo del período de incubación, se tomaron los valores de peso seco del hongo y de pH final del medio de cultivo, observándose que en aquellos tratamientos donde se omitió biotina o tiamina, el crecimiento volvió a resultar prácticamente nulo, explicándose el escaso crecimiento en estos casos como debido a vestigios de esas dos vitaminas aportados por el inóculo, siendo los valores de peso seco y de pH finales semejantes a los del testigo no suplementado; en cambio, en los tratamientos en los cuales se había omitido una de las restantes sustancias de crecimiento, los valores de peso seco y de pH finales fueron semejantes a los del control suplementado con las 9 sustancias de crecimiento y a los del medio A suplementado con biotina y tiamina. Se concluyó que de las sustancias de crecimiento ensayadas, solamente biotina y tiamina limitan el crecimiento vegetativo de la cepa C-2179 de *A. crenulatus*, en las condiciones experimentales ensayadas.

Los resultados de estas experiencias se ilustran en la *Tabla 1*.

TABLA 1

Efecto de las sustancias de crecimiento sobre el crecimiento vegetativo de la cepa C-2179 de «*A. crenulatus*»: cada sustancia de crecimiento fue agregada, en las concentraciones indicadas (ver texto), al medio basal que contenía: d-glucosa, 1 %; l-asparagina, 0.5 %; sales y micronutrientes.<sup>1</sup>

Sustancia de crecimiento	Peso seco (mg/25 ml)	pHi	pHf
Ninguna .....	Tr	6.6	6.6
Todas menos ácido ascórbico .....	93	6.6	5.9
» » » fólico .....	90	6.6	5.9
» » » nicotínico .....	85	6.6	5.9
» » » p-aminobenzoico ..	86	6.6	5.8
» » HCl-piridoxal .....	91	6.6	5.9
» » riboflavina .....	84	6.6	5.8
» » HCl-tiamina .....	Tr	6.6	6.5
» » biotina .....	10	6.6	6.6
» » i-inositol .....	96	6.6	5.8
Todas .....	89	6.6	5.7
Biotina y HCl-tiamina .....	92	6.6	5.9

<sup>1</sup> Cada valor representa el promedio de 9 Erlenmeyer triplicados en 3 experiencias.

Tr: Valores inferiores a 10 mg/25 ml.

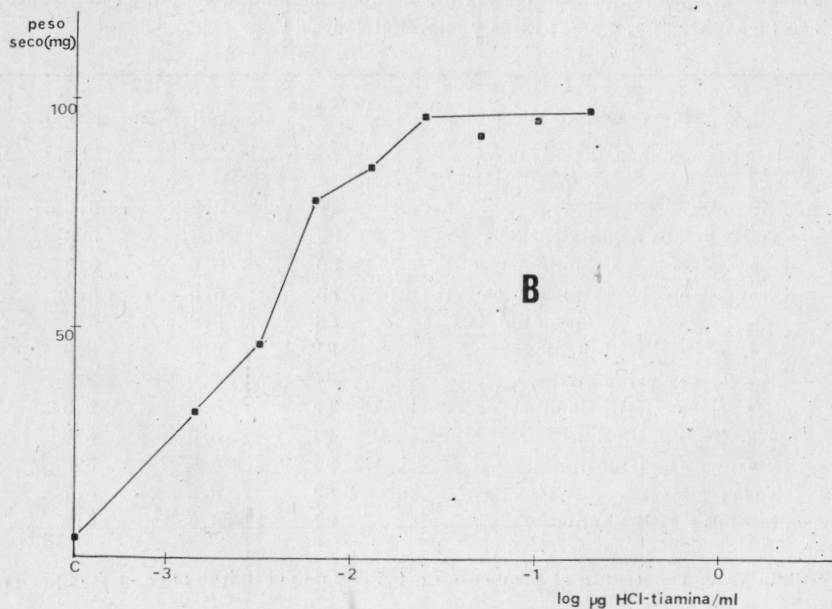
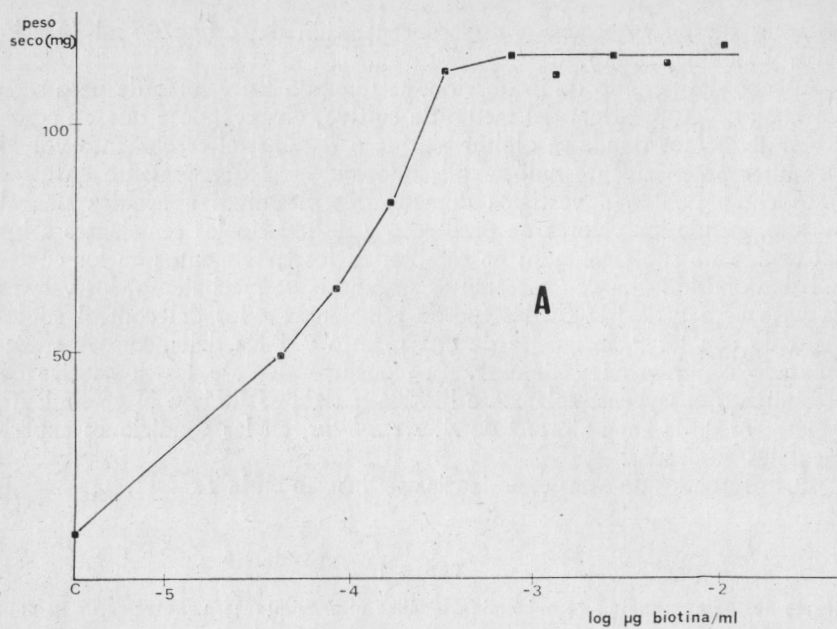


Gráfico 1. — Peso seco de la cepa C-2179 de *A. crenulatus* creciendo en varias concentraciones de biotina (A) y tiamina (B). Cada punto representa el peso seco promedio de 9 cultivos, triplicados en 3 experiencias. "C" en abscisas representa el testigo sin vitaminas.

Con el objeto de determinar las concentraciones óptimas de biotina y tiamina para el crecimiento vegetativo, se hicieron las siguientes experiencias: se agregaron concentraciones variables de biotina a 27 Erlenmeyer con 25 ml de medio A al que se le adicionó una concentración constante de  $10^{-1}$   $\mu\text{g}$  de tiamina/ml de medio A. Se utilizaron concentraciones de biotina que variaron desde  $4 \times 10^{-5}$  a  $10^{-2}$   $\mu\text{g}$ /ml de medio A. El promedio de los pesos secos de micelio que creció en medio líquido, indicó que el crecimiento vegetativo óptimo ocurrió en el medio en el cual la concentración de biotina fue de  $3 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g}$ /ml de medio A, o mayor, como lo muestra el Gráfico 1-A.

Se siguió el mismo procedimiento para la determinación de la concentración óptima de tiamina. La concentración de biotina se mantuvo constante en  $5 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g}$ /ml de medio A. Se agregaron concentraciones variables de tiamina a 24 Erlenmeyer, aumentándose éstas desde  $1.5 \times 10^{-3}$  a  $2 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g}$ /ml de medio A. El promedio de los pesos secos obtenidos indicó que el crecimiento vegetativo óptimo ocurrió en el medio en el cual la concentración de tiamina fue de  $2.5 \times 10^{-2}$   $\mu\text{g}$ /ml de medio A, o mayor, como lo muestra el Gráfico 1-B.

De acuerdo con estos resultados se incorporaron concentraciones óptimas de biotina y tiamina al medio A para los posteriores ensayos nutricionales.

#### B) *Efecto de las fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento vegetativo y la reproducción sexual.*

Se utilizó el medio A suplementado con cantidades óptimas de biotina y tiamina al cual llamamos medio B, el que se utilizó para los ensayos subsiguientes.

Se realizaron experiencias a fin de determinar las concentraciones óptimas de asparagina y glucosa del medio B para el crecimiento vegetativo. Los mejores valores de peso seco se obtuvieron con 0.5 % de asparagina y 2 % de glucosa.

Para la determinación de las concentraciones óptimas de fuentes nitrogenadas y carbonadas para la reproducción sexual, se utilizó el medio B agarizado y suplementado con 1 % de polvo de celulosa (Whatman), al que llamamos medio BC. Previamente se realizaron ensayos comparativos de producción de apotecios utilizando asparagina y urea como fuentes nitrogenadas. Los mejores resultados se obtuvieron con 0.1 y 0.2 % de asparagina, y con 0.05 % de urea. Al superar estas concentraciones la esporulación se vio disminuida en cada caso, aumentando la producción de micelio aéreo. Al trabajar con una concentración de urea de 0.1 %, también se obtuvo una buena producción de apotecios, pero las ascosporas expulsadas no poseían exosporio, y germinaron espontáneamente en la tapa de la caja de Petri donde quedaban adheridas; las ascosporas fueron recogidas en agar-agua al 2,5 % y puestas a germinar, los cultivos obtenidos se sembraron en estiércol de vaca tindalizado, en medio standard (PF), en

medio BC con una cantidad de nitrógeno libre equivalente a la contenida en 0.05 % de urea pero aportada por asparagina y en medio BC con 0.05 % de urea. En todos los casos se produjeron apotecios que expulsaron ascosporas normales. Cuando los cultivos obtenidos a partir de ascosporas hialinas se repicaron en medio BC con una cantidad de nitrógeno libre equivalente a 0.1 % de urea pero aportada por asparagina, sólo se desarrollaron primordios de fructificaciones que no produjeron ascosporas, mientras que en el medio BC suplementado con 0.1 % de urea se obtuvieron apotecios que volvieron a expulsar ascosporas sin exosporio, demostrándose así la influencia de la fuente nitrogenada utilizada en la producción de ascosporas de la cepa C-2179 de *A. crenulatus*. Se comprobó además, que al utilizar urea como fuente nitrogenada, el hongo completó su ciclo de vida en una semana; en concentraciones óptimas de asparagina el ciclo vital se alargó de 3 a 4 días (cf. Gamundí y Ranalli, 1966).

La producción de apotecios de *A. crenulatus* aumentó con la concentración de glucosa, hasta una concentración de dicha fuente del 1 %; con concentraciones mayores se observó una paulatina disminución en la producción de fructificaciones y paralelamente un aumento en la producción de micelio aéreo.

De acuerdo con los resultados anteriores, en los ensayos sobre crecimiento vegetativo se trabajó con el medio B suplementado con 0.5 % de asparagina, u otra fuente nitrogenada, y 2 % de glucosa, u otra fuente carbonada. En las experiencias en las cuales se estudió la esporulación del hongo en el medio BC, se trabajó con 0.05 % y 0.1 % de urea, u otra fuente nitrogenada, y con 0.5 % y 1 % de glucosa u otra fuente carbonada.

Para estudiar el efecto de varias fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento vegetativo y la esporulación, se utilizaron tanto fuentes de nitrógeno inorgánico como orgánico. La Tabla 2 ilustra los valores de peso seco obtenidos con las distintas fuentes nitrogenadas utilizadas, así como los valores de pH iniciales y finales registrados.

Los resultados tabulados indican que *A. crenulatus* puede utilizar tanto nitrógeno inorgánico como orgánico, y que el mejor crecimiento vegetativo ocurrió en el medio suplementado con caseína (hidrol. enzim.), asparagina o urea; la caseína (hidrol. ácida) y el  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  resultaron buenas fuentes nitrogenadas, no así el  $\text{KNO}_3$ . Comparando el crecimiento vegetativo en las dos fuentes inorgánicas de amonio, se observa que los valores de peso seco en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  son significativamente inferiores, lo que coincidió con un desarrollo anormal, que se tradujo en una baja densidad de micelio, y con valores de pH inhibitorios para el crecimiento, posiblemente por acumulación de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en el medio de cultivo (Hawker, 1950); cuando se utilizó glutamina como fuente nitrogenada, también se observó baja densidad de micelio y bajos valores de pH final.

Los valores de peso seco en los aminoácidos ensayados resultaron intermedios.

TABLA 2

Efecto de las distintas fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento vegetativo de la cepa C-2179 de «*A. crenulatus*»; cada fuente nitrogenada fue agregada, en las concentraciones indicadas, al medio basal que contenía: d-glucosa, 2%; sales, micronutrientes, biotina y tiamina.<sup>1</sup>

Fuente nitrogenada (0.5 %)	Peso seco (mg/25 ml)	pHi	pHf
Ninguna . . . . .	Tr	6.5	6.5
KNO <sub>3</sub> . . . . .	18	6.4	6.6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	95	6.4	5.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . . .	Tr	6.3	4.4
1-asparagina . . . . .	130	6.5	5.5
dl-ácido aspártico . . . . .	49	6.5	6.3
1-glutamina . . . . .	21	6.3	4.5
1-ácido glutámico . . . . .	48	6.5	6.4
Caseína (hidrolizada ácida) . . . . .	98	6.5	5.0
Caseína (hidrolizada enzimática) . . . . .	164	6.5	5.6
Urea (esterilizada por Seitz): . . . . .	125	6.5	8.2

<sup>1</sup> Cada valor representa el promedio de 9 Erlenmeyer triplicados en 3 experiencias.

El crecimiento, aunque escaso, en el tratamiento testigo, puede explicarse sobre la base de la pequeña cantidad de nitrógeno aportada por el inóculo, o porque el agar de por sí puede servir como fuente nitrogenada (Leal et al., 1967).

En la Tabla 3 se muestran los efectos de algunos compuestos nitrogenados sobre la producción de fructificaciones.

De la tabla anterior se deduce que la mejor producción de apotecios se obtuvo con urea al 0.05 %. En el caso de las otras fuentes, en las cuales se obtuvo una buena producción, la concentración óptima fue del 0.1 % de fuente nitrogenada.

Las fructificaciones obtenidas cuando se utilizó KNO<sub>3</sub> al 0.05 % eran totalmente cerradas y contenían ascosporas hialinas no encerradas por una pared ascal evidente, no observándose formación de paráfisis, en un período de 14 días; a los 25 días aparecieron fructificaciones normales en el borde de las cajas de Petri.

Cuando se usaron aminoácidos y caseína al 0.1 %, las fructificaciones, en muy pequeño número (= 1 de la escala) aparecieron al 12º día y maduraron cinco días más tarde. Con estas fuentes, la mayoría de las fructificaciones quedaron sumergidas en el medio de cultivo agarizado.

TABLA 3

Efecto de las distintas fuentes nitrogenadas sobre la reproducción sexual de la cepa C-2179 de «*A. crenulatus*»; cada fuente nitrogenada fue agregada, en las concentraciones indicadas, al medio basal que contenía: d-glucosa, 1%; sales, micronutrientes, biotina, tiamina, agar y polvo de celulosa, 1%.<sup>1</sup>

Fuente nitrogenada	Producción de apotecios	
	0.05 %	0.1 %
Ninguna .....	0	0
KNO <sub>3</sub> .....	3	6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0	0
l-asparagina .....	5	7
dl-ácido aspártico .....	Tr	Tr
l-glutamina .....	0	0
l-ácido glutámico .....	Tr	Tr
Caseína (hidrolizada enzimática) ..	Tr	Tr
Urea (esterilizada por Seitz) .....	10	6

<sup>1</sup> Cada valor representa el promedio de 9 cajas de Petri triplicadas en 3 experiencias.

Tr: Valores inferiores a 1.

C) *Efecto de las fuentes carbonadas sobre el crecimiento vegetativo y la reproducción sexual.*

Se utilizó el medio B para estudiar el crecimiento vegetativo, y el medio BC para estudiar la producción de apotecios, reemplazando la glucosa por otra fuente carbonada, y utilizando como fuente nitrogenada asparagina al 0.5 % para el primer caso y urea al 0.05 % para la producción de apotecios; de acuerdo a los resultados de las tablas 2 y 3.

La Tabla 4 muestra el efecto de varias fuentes carbonadas, que incluyen: hidratos de carbono, bajo la forma de mono-, di- y polisacáridos, ácidos grasos y un alcohol derivado de la glucosa, sobre el crecimiento vegetativo de *A. crenulatus*.

Los valores registrados en la tabla 4 indican que *A. crenulatus* es capaz de usar hidratos de carbono como única fuente carbonada, y que tanto los monosacáridos glucosa y manosa, el disacárido maltosa y el polisacárido almidón soluble son excelentes fuentes carbonadas para el crecimiento vegetativo de esta cepa. La pentosa ensayada resultó una buena fuente carbonada para el crecimiento vegetativo.

TABLA 4

Efecto de las distintas fuentes carbonadas sobre el crecimiento vegetativo de la cepa C-2179 de «*A. crenulatus*»; cada fuente carbonada fue agregada, en las concentraciones indicadas, al medio basal que contenía: l-asparagina, 0.5%; sales, micronutrientes, biotina y tiamina.<sup>1</sup>

Fuente carbonada (% *)	Peso seco (mg/25 ml)	pHi	pHf
Ninguna .....	Tr	6.6	6.6
d(+)xilosa .....	95	6.5	5.9
d-glucosa .....	135	6.5	5.6
Galactosa .....	25	6.5	6.4
d(+)manosa .....	186	6.5	5.6
Fructuosa .....	35	6.4	6.3
l-sorbosa .....	0	6.4	6.5
Maltosa .....	160	6.4	5.8
Celobiosa .....	103	6.5	5.5
Lactosa .....	10	6.5	6.5
Sacarosa .....	20	6.5	6.6
Almidón soluble * .....			
Dextrina .....	66	6.5	5.7
Inulina .....	11	6.5	6.7
Tween 40 ** .....	20	5.2	5.1
Tween 80 ** .....	25	5.2	5.1
Acetato de Na. ....	14	6.6	8.0
Sorbitol .....	28	6.5	6.7

<sup>1</sup> Cada valor representa el promedio de 9 Erlenmeyer triplicados en 3 experiencias.

\* No se pudieron registrar valores de peso seco, ni de pH, pero el crecimiento, estimado visualmente, fue comparable al obtenido en Glucosa o Maltosa.

\*\* En estos casos los valores de pH fueron registrados con papel para pH.

El desarrollo en el resto de los monosacáridos ensayados, resultó comparativamente inferior al obtenido en glucosa o manosa. Los resultados obtenidos en sorbosa, son significativos ya que se obtuvo menor crecimiento en dicha fuente comparado con el tratamiento testigo (no suplementado).

Respecto del crecimiento vegetativo del hongo en celobiosa, sacarosa y lactosa, comparado con el mismo en maltosa, resultó bueno en el caso del primero y muy pobre en el de los dos últimos.

TABLA 5

Efecto de las distintas fuentes carbonadas sobre la reproducción sexual de la cepa C-2179 de «*A. crenulatus*»; cada fuente carbonada fue agregada, en las concentraciones indicadas, al medio basal que contenía: urea (esteril por Seitz), 0.05 %; sales, micronutrientes, biotina, tiamina, agar y polvo de celulosa, 1%.<sup>1</sup>

Fuente carbonada	Producción de apotecios	
	0.5 %	1 %
Ninguna.....	Tr	Tr
d(+)-xilosa.....	4	5
d-glucosa.....	6	10
Galactosa.....	0	0
Manosa.....	6	8
Fructosa.....	3	2
Maltosa.....	6	8
Celobiosa.....	6	7
Almidón soluble.....	5	6
Dextrina.....	7	9
Span 20.....	0	0
Tween 80.....	Tr	3
Acetato de Na.....	0	0

<sup>1</sup> Cada valor representa el promedio de 6 cajas de Petri duplicadas en 3 experiencias.

El desarrollo miceliano en dextrina e inulina, resultó inferior al mismo en almidón soluble, y también menor que en sus productos de hidrólisis.

El sorbitol, alcohol derivado de la glucosa, resultó una fuente carbonada inferior a ésta; aparentemente el grupo aldehído del azúcar debe estar presente para una eficaz utilización.

El crecimiento vegetativo en acetato de Na y en los monoderivados polioxietilén-sorbitán de los ácidos grasos de alto PM, palmítico y oleico (Tween 40 y 80 respectivamente), resultó escaso.

La influencia de las distintas fuentes carbonadas sobre la producción de apotecios se puede visualizar en la Tabla 5.

Comparando los resultados de la tabla anterior con los obtenidos en las experiencias en donde se estudió la influencia de distintas fuentes carbonadas sobre el crecimiento vegetativo, resulta evidente que aquellas fuentes carbonadas que originaron los valores de peso seco más altos, fueron las mismas que produjeron una buena producción de apotecios, excepto en el caso de la dextrina. Con galactosa se observó un escaso crecimiento miceliano, pero resultó inhibitoria para la esporulación, al igual que con Span

20 (sorbitán monolaurato) y con acetato de Na; por el contrario un escaso crecimiento vegetativo en Tween 80, correspondió a una producción de apotecios moderada.

La producción de apotecios en el caso del tratamiento testigo, suplementado solamente con polvo de celulosa como fuente carbonada (sin tener en cuenta la pequeña cantidad de carbono aportada por la urea), se explica por ser éste un hongo celulolítico.

D) *Efecto de la variación de las concentraciones de glucosa y urea sobre la reproducción sexual. Relación carbono/nitrógeno.*

Se estudió la relación C/N en la reproducción sexual de la cepa C-2179 de *A. crenulatus*, para determinar qué combinación de dichas concentraciones es la mejor para una esporulación óptima.

Estas experiencias se llevaron a cabo en 24 medios de cultivo agarizados (medio BC), en los cuales se varió las concentraciones de urea y glucosa. Los resultados se observan en la Tabla 6 y en las Láminas 1 y 1'.

Se observó que a medida que se aumentó la concentración de urea más allá de 0.07 %, una concentración de glucosa inferior a 0.75 % resultó limitante; además, a medida que se aumentó la concentración de urea debió aumentarse también la concentración de glucosa para obtener fructificaciones que expulsen ascosporas con exosporio.

Entre las combinaciones de urea y glucosa ensayadas, la combinación: 0.05 % de urea y 1.00 % de glucosa, dio los mejores resultados.

**TABLA 6**

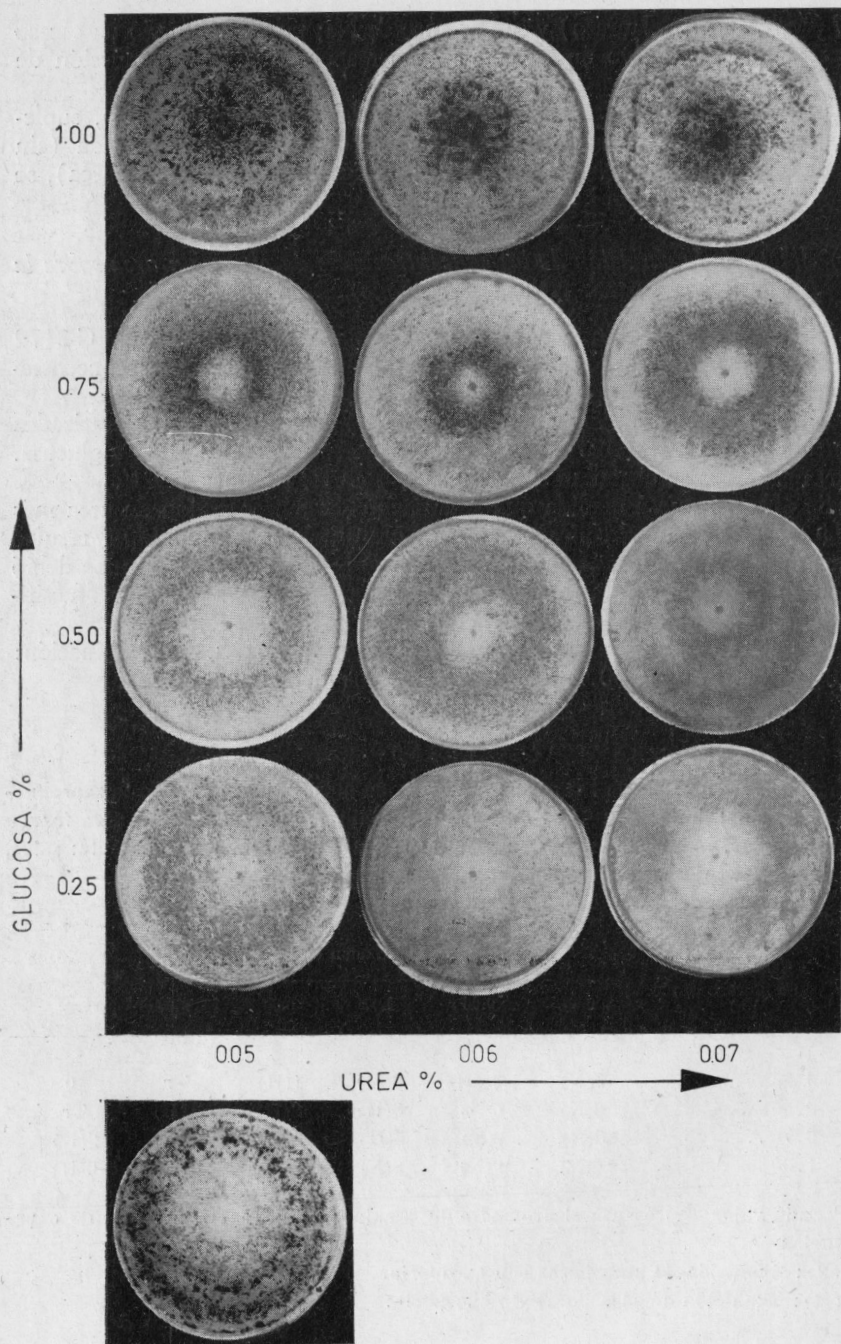
**Efecto de la variación de las concentraciones de glucosa y urea sobre la reproducción sexual de la cepa C-2179 de «*A. crenulatus*». La glucosa y la urea fueron agregadas, en las concentraciones indicadas, al medio basal que contenía: sales, micronutrientes, biotina, tiamina, agar y polvo de celulosa, 1 %.**<sup>4</sup>

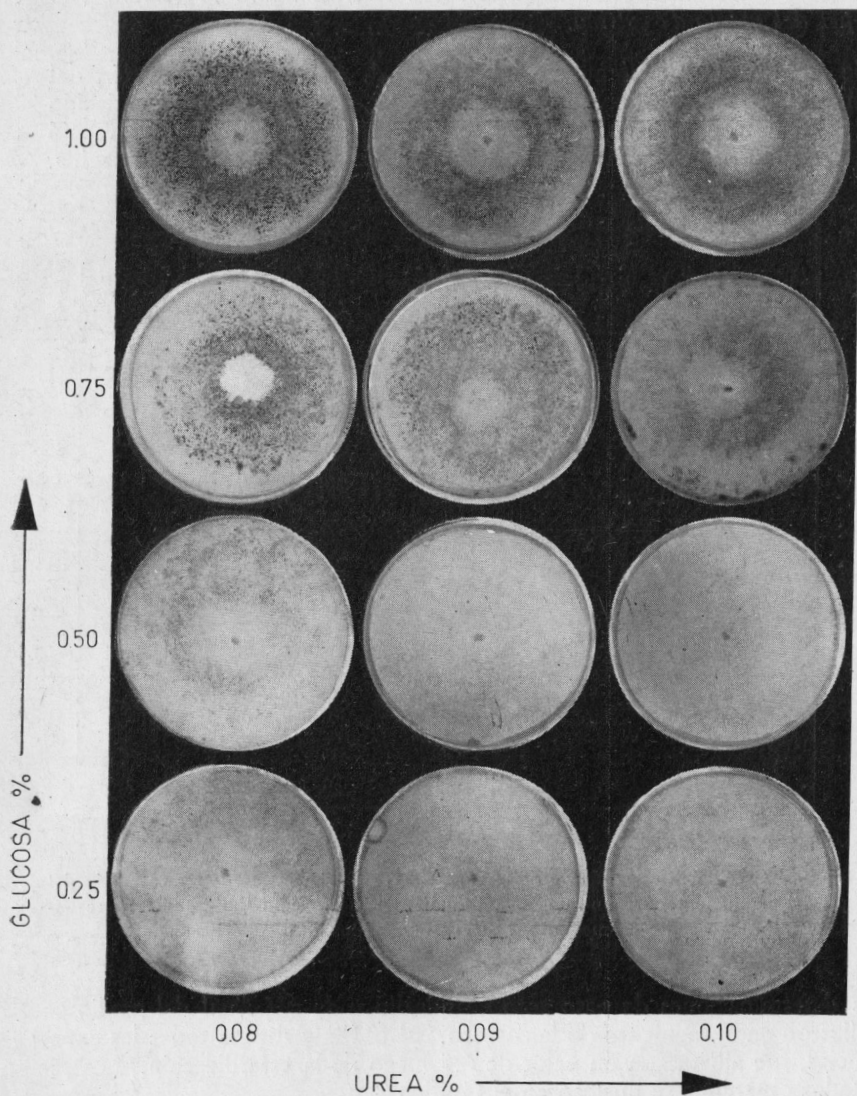
Concentración de glucosa (%)	Concentración de urea (%)					
	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10
0.25 .....	5(N)	3(H)	2(H)	1(H)	Tr	0
0.50 .....	6(N)	5(N)	3(H)	2(H)	1(H)	Tr
0.75 .....	8(N)	7(N)	6(H)	4(H)	3(H)	2(H)
1.00 .....	10(N)	9(N)	8(N)	8(H)	7(H)	6(H)

<sup>4</sup> Cada valor representa el promedio de 9 cajas de Petri triplicadas en 3 experiencias.

(N): Expulsión de ascosporas con exosporio.

(H): Expulsión de ascosporas sin exosporio.





Láminas 1 y 1'. — Producción de apotecios de la cepa C-2179 de *A. crenulatus* en relación con las concentraciones de glucosa y urea en el medio de cultivo. El control se muestra en la parte inferior izquierda de la lámina 1.

## E) Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento vegetativo y el pH del medio de cultivo.

Se estudió el crecimiento vegetativo de *A. crenulatus* en función del tiempo de incubación (curva de crecimiento) en relación con la variación del pH del medio de cultivo durante un período de 16 días; se trabajó con el medio B suplementado con 2 % de glucosa y 0.5 % de asparagina.

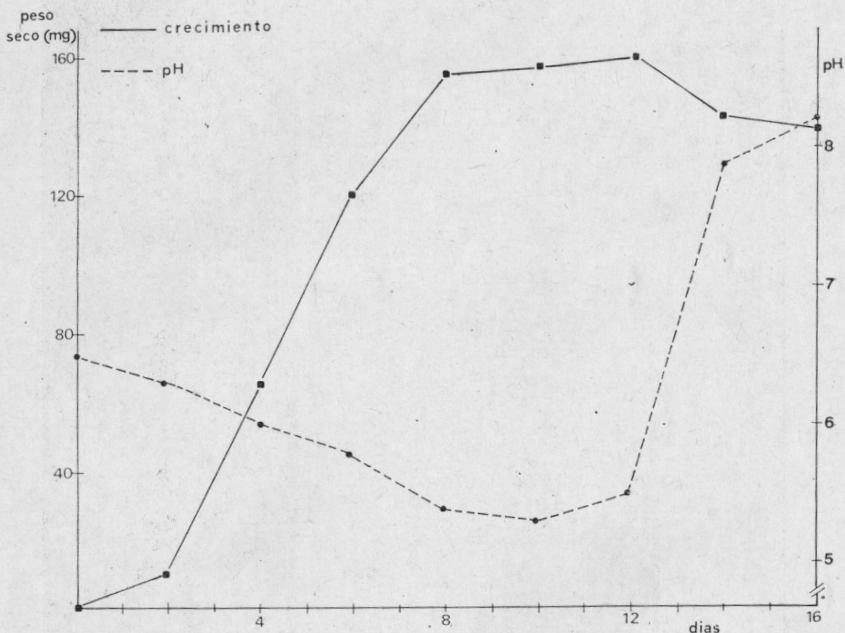


Gráfico 2.— Crecimiento vegetativo de la cepa C-2179 de *A. crenulatus*, y variación del pH del medio de cultivo en función del tiempo de incubación. Cada punto representa el peso seco y pH promedio de cultivos triplicados en 3 experiencias.

Las determinaciones de peso seco de micelio y de pH final del medio se realizaron en el momento de la cosecha. El pH inicial para todas las experiencias, fue ajustado a un valor de 6.5 luego de la esterilización. Los resultados obtenidos se ilustran en el Gráfico 2.

Se observó que a medida que el hongo crece se registra una disminución del pH inicial, alcanzándose el mínimo valor al 10° día de incubación, y luego un aumento del mismo, que se hizo evidente al 14° día, lo que coincidió con los primeros valores registrados de la fase de autólisis. Al mismo tiempo se observó un continuo aumento del peso seco hasta el 8° día de incubación, siendo proporcionalmente menor hasta el 12° día.

## CONCLUSIONES

A partir de las investigaciones de Schopfer (1934) en *Phycomyces blakesleeanus*, se ha encontrado que muchos hongos requieren un suministro exógeno de vitaminas para su normal desarrollo. Es frecuente que exista entre los hongos filamentosos, una deficiencia múltiple para biotina y tiamina (Lilly y Barnett, 1951). Entre los Ascomycetes que presentan este tipo de deficiencia podemos citar a *Ophiostoma* (Robbins y Ma, 1942), *Chaetomium* (Lilly y Barnett, 1949), *Lachnum* y *Spatularia* (Fries, 1950), *Endothia* y *Podospora* (Lilly y Barnett, 1951), *Sordaria* (Fields y Maniotis, 1963) y *Ascobolus immersus* (Yu-Sun, op. cit.). Teniendo como base estos antecedentes y ante el hecho de que la cepa C-2179 de *Ascobolus crenulatus* es incapaz de desarrollar en un medio líquido conteniendo glucosa, asparagina y sales minerales, y de que sólo presenta un crecimiento evidente cuando este medio es suplementado con biotina y tiamina, resultó evidente que estas dos vitaminas son sustancias de crecimiento indispensables para el desarrollo vegetativo del hongo. Aunque no se han hecho experiencias tendientes a demostrar la existencia de una deficiencia parcial (Lilly y Barnett, 1951) o condicionada (Robbins y Kavanagh, 1942), que por otra parte escapan a los objetivos del presente trabajo, podemos asegurar que tanto la biotina como la tiamina son limitantes para el desarrollo de la cepa C-2179 de *A. crenulatus*. Es de destacar que en lo referente a las cantidades óptimas requeridas de estas dos vitaminas, el comportamiento de nuestra cepa coincide casi exactamente con el de la cepa + K5 de *A. immersus* (Yu-Sun, op. cit.).

Brock (1951), trabajando con *Morchella esculenta*, destaca que en el estudio de la relación nutrición-crecimiento hay que tener en cuenta que siendo éste un proceso fisiológico complejo, un único factor de por sí, no determina el grado de crecimiento de un organismo, sino que están involucrados un complejo de factores más o menos interrelacionados; y que cualquier ensayo para dilucidar los requerimientos en compuestos nitrogenados y carbonados de un hongo, involucra necesariamente el control de todas las variables excepto las ensayadas. Los ensayos que se llevaron a cabo en el presente trabajo son limitados en extensión, ya que las experiencias de utilización de compuestos nitrogenados y carbonados se realizaron utilizando concentraciones fijas de dichas fuentes (que no corresponden necesariamente a las cantidades de nitrógeno o carbono libres en el medio), y empleando respectivamente, glucosa como fuente carbonada y asparagina, o urea, como fuentes nitrogenadas, en los ensayos respectivos. En la discusión que sigue, cualquier interpretación será considerada válida bajo las condiciones experimentales empleadas.

Al analizar las concentraciones óptimas de fuentes nitrogenadas para el crecimiento vegetativo y la reproducción sexual, se observó que una concentración óptima para el crecimiento resultó inhibitoria para la esporu-

lación; además se observó que a una concentración de 0.1 % de urea las ascosporas no formaron exosporio. Este hecho, regulado por la calidad y la cantidad de la fuente nitrogenada, fue registrado en el género *Ascobolus* por varios investigadores y como consecuencia de distintas condiciones ambientales: Dodge (1912 *b*) en *A. magnificus*; Gwynne-Vaughan y Williamson (op. cit.) trabajando entre otras especies, con *A. viridulus* (= *A. crenulatus*); y más recientemente Ranalli y Cinto (op. cit.) en *A. albidus*.

En las experiencias para determinar las concentraciones óptimas de glucosa para el crecimiento vegetativo y la reproducción sexual, se observó que una concentración óptima para el primero resultó inhibitoria para la esporulación. Hechos similares fueron observados en Ascomycetes por Hawker (1939), Hawker y Chaudhuri (1946) y Hawker (1947) entre otros.

Comparando las concentraciones tanto de fuentes nitrogenadas como carbonadas para el crecimiento y la esporulación, se verificó que los estadios reproductivos se vieron favorecidos por un medio más diluido en sus fuentes carbonadas y nitrogenadas (Hawker, 1957); Page (1960) asocia este comportamiento a la ecología del hongo (en este caso coprófilo).

Al estudiar los requerimientos en fuentes nitrogenadas para el crecimiento vegetativo de *A. crenulatus*, se observó que puede utilizar tanto nitrógeno inorgánico, bajo la forma de sales de amonio, como orgánico, bajo la forma de asparagina, urea y caseína hidrolizada. De acuerdo con estos resultados se puede incluir a esta cepa en el grupo III de la clasificación propuesta por Robbins (1937), y en este sentido se asemejaría a otros hongos coprófilos (Page, 1952 y Fries, 1955) y no a *A. immersus* (Yu-Sun, op. cit.). A pesar de que no hemos hecho experiencias para verificar si este organismo es capaz de fijar nitrógeno atmosférico, es de esperar, de acuerdo con las predicciones de Robbins (op. cit.), que ello no ocurra.

Cuando se estudió el efecto de las distintas fuentes nitrogenadas para la esporulación no se observó una correlación entre estos resultados y los hallados para el crecimiento vegetativo; así la cepa C-2179 de *A. crenulatus* no puede utilizar nitrógeno bajo la forma de  $\text{KNO}_3$  (en ensayos con  $\text{NaNO}_3$  se obtuvieron resultados similares), pero sí para la reproducción sexual. El escaso crecimiento en un medio suplementado con  $\text{KNO}_3$  puede deberse a una lenta utilización de dicha fuente, como sucede en algunas especies de Basidiomycetes (HacsKaylo et al., 1954; Fries, 1955), que no permitió un buen desarrollo del micelio vegetativo pero sí una buena producción de apotecios en los períodos de tiempo empleados.

Cuando se utilizó  $\text{KNO}_3$  al 0.05 %, se obtuvieron fructificaciones que no presentaron el desarrollo hemiangiocárpico típico de *A. crenulatus* (Gamundí y Ranalli, 1969), cleistohiménial abierto en la fase mesohiménial en el sentido de van Brummelen (1967); un comportamiento similar, aunque con algunas diferencias, fue observado por Ranalli y Cinto (op. cit.) en *A. albidus* al crecer en condiciones de oscuridad.

Cuando se utilizó nitrógeno bajo la forma de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y de caseína (hidrol. enzym.) se notó que si bien fueron buenas fuentes para el crecimiento vegetativo no lo fueron para la esporulación. Recientemente varios autores han encontrado que la formación de estructuras reproductivas en Ascomycetes superiores, se ve afectada por los compuestos inorgánicos de amonio (Ross y Hamlin, 1965; Ross y Bremmer, 1971 y Qureshi y Page, 1972). Hirsch (1954) encontró que la formación de protoperitecios en *Neurospora crassa* se vio inhibida por altas concentraciones de caseína hidrolizada, lo que coincidiría con los resultados hallados en *A. crenulatus* con dicha fuente.

Estas diferencias de respuesta del hongo creciendo en medio líquido y medio agarizado y utilizando la misma fuente nitrogenada, reflejaría la importancia de los factores ambientales en la asimilación de compuestos nitrogenados (Brock, op. cit.).

Los aminoácidos ensayados no resultaron buenas fuentes nitrogenadas ni para el crecimiento vegetativo ni para la esporulación, y aunque no hemos trabajado con otros aminoácidos, podemos postular de que no se ajustarían a la clasificación de Pelletier y Keitt (1954). En el caso del ácido aspártico, podría sugerirse que la pobre utilización de dicha fuente se debe a que se empleó la mezcla racémica en lugar de la forma levorrotatoria (Lilly y Barnett, 1951; Pelletier y Keitt, op. cit.), y comparando con los resultados obtenidos al trabajar con asparagina, la amida resultó mejor fuente nitrogenada que su correspondiente aminoácido; existiendo una extensa literatura al respecto (Leonian y Lilly, 1940 y Leaphart, 1956; entre muchos otros) y que podría explicarse por un mayor aprovechamiento del nitrógeno de la amida o por permeación diferencial a través de la membrana celular (Page, 1952; Fries, 1955).

Aunque el método usado en estas experiencias para la valoración de la producción de apotecios no permitió detectar diferencias sustanciales entre algunos de los distintos tratamientos y entre algunos de los tratamientos entre sí, en líneas generales se observó una correspondencia entre crecimiento vegetativo y reproducción sexual, en cuanto a la utilización de las distintas fuentes carbonadas. Los mejores resultados se encontraron en glucosa y en aquellos di- o polisacáridos que dan esta hexosa por hidrólisis, y en manosa (aldohexosa muy relacionada a la glucosa).

Los resultados obtenidos con fructosa, comparados con los mismos en glucosa, concuerdan con lo hallado por Margolín (1942) en varias especies de hongos. Estas diferencias en cuanto al distinto aprovechamiento de este azúcar, así como del resto de los azúcares ensayados, pueden basarse en las diferencias estructurales entre éstos (Steinberg, 1942; Cantino, 1949 a y 1949 b), o porque esta cetohexosa (al igual que la sorbosa) sufren una mayor alteración que la glucosa durante el proceso de esterilización por calor, formándose compuestos furfúricos (Newth, 1951).

La galactosa resultó una mala fuente carbonada para el crecimiento vegetativo; los bajos valores de peso seco en este azúcar pueden explicarse por

un lento aprovechamiento de este monosacárido, que se traduce en una lenta velocidad de crecimiento en el medio de cultivo suplementado con galactosa (Horr, 1936); Edgecombe, 1938), postulándose la necesidad de producir enzimas adaptativas para el aprovechamiento de este monosacárido (Spiegelman, 1950). El escaso crecimiento en galactosa parece ser bastante frecuente en los distintos grupos de hongos (Hawker, 1939; Shade, 1940; Margolín, op. cit.; Page, 1952; Lilly y Barnett, 1953; Fries, 1955; Howard y Bigelow, 1969, entre otros). El efecto francamente inhibitorio de este compuesto (que se manifestó durante un período muy prolongado de incubación) sobre la reproducción sexual de la cepa C-2179 de *A. crenulatus* es comparable al efecto tóxico de la galactosa en las plantas verdes (Knudson, 1915, 1917), efecto que en general no se encuentra en los hongos (Edgecombe, op. cit.).

La sorbosa resultó inhibitoria para el crecimiento vegetativo. Barnett y Lilly (1951), encontraron inhibición de la extensión hifal y muerte de extremos hifales de varias especies de hongos creciendo en un medio suplementado con sorbosa como única fuente carbonada; más recientemente Moore y Stewart (1972), también observaron inhibición de la extensión hifal en *Coprinus lagopus*.

La diferencia de respuesta de la cepa C-2179 de *A. crenulatus* en maltosa y celobiosa demostraría que el enlace  $\alpha$  1-4 de la maltosa es roto con mayor facilidad que el  $\beta$  1-4 de la celobiosa; no pasa lo mismo con el  $\beta$  1-4 de la lactosa, que resultó una fuente carbonada muy pobre para el crecimiento vegetativo de esta especie; el escaso crecimiento en lactosa (azúcar de la leche de los mamíferos, no encontrado en plantas superiores) es un hecho bastante generalizado en los hongos, sobre todo cuando el tiempo de incubación es corto, lo que sugeriría la posible intervención de una enzima adaptativa, la que llevaría a cabo la hidrólisis de la lactosa (Lilly y Barnett, 1953). El escaso crecimiento en sacarosa coincide con lo hallado por Hawker (1939, 1947) en *Melanospora destruens* y por Margolín (op. cit.) en un considerable número de hongos y reflejaría también una deficiencia en la síntesis de la sacarasa.

Los resultados encontrados en los polisacáridos ensayados mostraron gran variación. El menor crecimiento vegetativo en inulina y dextrina, comparado con el mismo en almidón soluble, podría explicarse en el primer caso por la lentitud en la síntesis de la enzima hidrolítica correspondiente (Cochrane, 1963); el segundo caso resultó llamativo porque si bien la dextrina resultó una fuente carbonada comparable al almidón soluble para la esporulación, no lo fue para el crecimiento vegetativo, a pesar de que los valores de pH finales registrados parecieran demostrar lo contrario; este resultado merece una verificación posterior.

Las conclusiones respecto a la deficiencia en la síntesis de las enzimas hidrolíticas correspondientes son limitadas en cuanto no se han realizado experiencias utilizando mezclas de azúcares simples, aunque Horr (op. cit.) y Hawker (1947) establecen que no siempre es posible hacer este tipo de extrapolaciones.

El acetato de Na resultó una mala fuente carbonada, tanto para el crecimiento vegetativo como para la esporulación, esto posiblemente se debió a que se alcanzaron rápidamente pH alcalinos inhibitorios para el desarrollo del hongo, debido a que el ión acetato fue intercambiado rápidamente del medio de cultivo. Según Cochrane (op. cit.) este compuesto es tóxico para la mayoría de los hongos, y de acuerdo a Lilly y Barnett (1961) inhibitorio del crecimiento.

A pesar de su mayor permeación a través de la membrana celular (Page, 1952), los Tweens ensayados, en general, no resultaron buenas fuentes carbonadas, tal vez porque el pH inicial no pudo ajustarse dentro del rango óptimo, o porque de acuerdo con la procedencia de la droga no podemos asegurar su calidad.

Excepto en el caso de la urea se observó, en líneas generales, que un buen crecimiento vegetativo estuvo acompañado por una acidificación del medio en los períodos de incubación empleados.

Podemos concluir que los requerimientos en fuentes carbonadas de la cepa C-2179 de *A. crenulatus* coinciden, en rasgos generales con los encontrados por Yu-Sun (op. cit.) en las cepas estudiadas de *A. immersus*.

Se comprobó que la esporulación y las características morfológicas de las ascosporas de *A. crenulatus*, se vieron afectadas por el balance C/N, lo que ya se ha verificado para varias especies de hongos (Nitimargi, 1937), *Neurospora crassa* (Westergaard y Mitchell, op. cit. y Hirsch, op. cit.), *Pilobolus kleinii* (Page, 1960) y algunas especies de *Phytophthora* (Leal et al., op. cit.).

Los resultados obtenidos cuando se estudió el tiempo de incubación sobre el crecimiento vegetativo y las variaciones de pH del medio de cultivo, están de acuerdo con los conceptos de Lilly y Barnett (1951), que expresan que los procesos de formación de ácidos predominan en los primeros estadios del crecimiento. Además, el tipo de curva obtenida de variación de pH con el tiempo, es frecuente en los hongos: Dimond y Peltier (1945) en *Penicillium notatum* en un medio con glucosa y distintas fuentes nitrogenadas; Lilly y Barnett (1947) en *Sordaria fimicola*, en un medio glucosa-caseína; y finalmente, en rasgos generales, con Yu-Sun (op. cit.) en la cepa + K<sub>3</sub> de *A. immersus*, en un medio dextrina-asparagina.

#### AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer en primer lugar; y muy especialmente, a la profesora Lic. María E. Ranalli de Cinto por su constante asesoramiento y colaboración, sin los cuales no habría sido posible la realización de este trabajo. Al Dr. Jorge E. Wright y a la Dra. Irma G. de Amos, por la lectura y corrección del manuscrito. Al Sr. Jorge L. Kikuchi por la realización de las fotografías que se incluyen.

## BIBLIOGRAFIA

- BARNETT, H. L. and V. G. LILLY, 1951. The inhibitory effects of sorbose on fungi. *Science* 114: 439-440.
- BEADLE, G. W. and N. H. HOROWITZ, 1943. A microbiological method for the determination of choline by the use of a mutant of *Neurospora*. *Jour. Biol. Chem.* 150: 325-333.
- BRETZLOFF, C. W., 1954. The growth and fruiting of *Sordaria fimicola*. *Am. Jour. Bot.* 41: 58-67.
- BROCK, T. D., 1951. Studies on the nutrition of *Morchella esculenta* Fries. *Mycologia* 43: 402-422.
- BRUMMELEN, J. van., 1967. A world monograph of the genera *Ascobolus* and *Saccobolus* (Ascomycetes, Pezizales). *Persoonia* Suppl. Vol. 1: 1-260.
- CANTINO, E. C., 1949 a. The physiology of the aquatic Phycomycete *Blastocladia pringsheimii*, with emphasis on its nutrition and metabolism. *Am. Jour. Bot.* 36: 95-112.
- 1949 b. The growth and nutrition of *Pythiogeton*. *Am. Jour. Bot.* 36: 747-756.
- COCHRANE, V. W., 1963. *Physiology of Fungi*. John Wiley & Sons, Inc. New York: 524 pp.
- DANGEARD, P. A., 1907. Recherches sur le développement du périthèce chez les Ascomycetes. *Le Botaniste* 10: 1-385.
- DIMOND, A. E. and G. L. PELTIER, 1945. Controlling the pH of cultures of *Penicillium notatum* through its carbon and nitrogen nutrition. *Am. Jour. Bot.* 32: 46-50.
- DODGE, B. O., 1912 a. Methods of culture and the morphology of the archicarp in certain species of Ascobolaceae. *Bull. Torrey Bot. Club* 39: 139-197.
- 1912 b. Artificial cultures of *Ascobolus* and *Aleuria*. *Mycologia* 4: 218-222.
- DOWDING, E. S., 1931. The sexuality of *Ascobolus stercorarius* and the transportation of oidia by mites and flies. *Ann. Bot.* 45: 621-638.
- EDGEcombe, A. E., 1938. The effect of galactose on the growth of certain fungi. *Mycologia* 30: 601-624.
- ENGLIS, D. T. and D. J. HANAHAN, 1945. Changes in autoclaved glucose. *Jour. Am. Chem. Soc.* 67: 51-54.
- FIELDS, W. G. and J. MANIOTIS, 1963. Some cultural and genetic aspects of a new heterothallic *Sordaria*. *Am. Jour. Bot.* 50: 80-85.
- FRIES, L., 1955. Studies in the physiology of *Coprinus*. I. Growth substance, nitrogen and carbon requirements. *Svensk Bot. Tidskr.* 49: 475-535.
- FRIES, N., 1950. Growth factor requirements of some higher fungi. *Svensk Bot. Tidskr.* 44: 379-386.
- GAMUNDÍ, I. J. y M. E. RANALLI, 1963. Apothecial development of *Ascobolus stercorarius*. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 46: 393-400.
- 1964. Estudio sistemático y biológico de las Ascobolaceae de Argentina. I. *Nova Hedwigia* 7 (3/4): 517-533, Tab. 39-41.
- 1966. Ibid. II. l.c. 10: (3/4): 339-366, Tab. 106-112.
- 1969. Ibid. III. *Nova Hedwigia* 17: 383-407, Tab. 97-102.
- GREEN, E., 1931. Observations on certain Ascobolaceae. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 15: 321-332.
- GWYNNE-VAUGHAN, H. C. I. and H. S. WILLIAMSON, 1933. Notes on the Ascobolaceae. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 18: 127-134.
- HACKBARTH, R. D. and R. P. COLLINS, 1961. A study of the vitamin requirements of three species of the genus *Gelasinospora*. *Am. Jour. Bot.* 48: 603-606.
- HACKSKAYLO, J., V. G. LILLY and H. L. BARNETT, 1954. Growth of fungi on three sources of nitrogen. *Mycologia* 46: 691-701.

- HAWKER, L. E., 1939. The influence of various sources of carbon on the formation of perithecia by *Melanospora destruens* Shear in the presence of accessory growth factors. *Ann. Bot., Lond., N. S.*, 3: 455-468.
- 1947. Further experiments on growth and fruiting of *Melanospora destruens* Shear in the presence of various carbohydrates, with special reference to the effects of glucose and sucrose. *Ann. Bot., Lond., N. S.*, 11: 245-259.
- 1950. *Physiology of Fungi*. London. University of London Press, Ltd.: 360 pp.
- 1957. *The physiology of reproduction in Fungi*. Cambridge University Press: 128 pp.
- HAWKER, L. E. and S. D. CHAUDHURI, 1946. Growth and fruiting of certain ascomycetous fungi as influenced by the nature and concentration of carbohydrate in the medium. *Ann. Bot., Lond., N. S.*, 10: 185-194.
- HIRSCH, H. M., 1954. Environmental factors influencing the differentiation of protoperithecia and their relation to tyrosinase and melanin formation in *Neurospora crassa*. *Physiol. Plant.* 7: 72-97.
- HORR, W. H., 1936. Utilization of galactose by *Aspergillus niger* and *Penicillium glaucum*. *Plant. Physiol.* 11: 81-99.
- HOWARD, K. L. and H. E. BIGELOW, 1969. Nutritional studies on two Gasteromycetes: *Pballus ravenellii* and *Crucibulum levis*. *Mycologia* 61: 606-613.
- KNUDSON, L., 1915. Toxicity of galactose for certain of the higher plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 2: 659-666.
- 1917. The toxicity of galactose and mannose for green plants and the antagonistic action of other sugars toward these. *Am. Jour. Bot.* 4: 430-437.
- LEAL, J. A.; M. E. GALLEGLY and V. G. LILLY, 1967. The relation of the carbon-nitrogen ratio in the basal medium to sexual reproduction in species of *Phytophthora*. *Mycologia* 59: 953-964.
- LEAPHART, C. D., 1956. Physiological studies of some fungi associated with pole blight of western white pine. *Mycologia* 48: 25-40.
- LEONIAN, H. L. and V. G. LILLY, 1940. Studies on the nutrition of fungi IV. Factors influencing the growth of some thiamin-requiring fungi. *Am. Jour. Bot.* 27: 18-26.
- 1942. The effect of vitamins on ten strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. Jour. Bot.* 29: 459-464.
- LILLY, V. G. and H. L. BARNETT, 1947. The influence of pH and certain growth factors on mycelial growth and perithecial formation by *Sordaria fimicola*. *Am. Jour. Bot.* 34: 131-138.
- 1949. The influence of concentrations of nutrients, thiamin and biotin upon growth and formation of perithecia and ascospores by *Chaetomium convolutum*. *Mycologia* 41: 186-196.
- 1951. *Physiology of the Fungi*. Mc Graw-Hill, New York: 464 pp.
- 1953. The utilization of sugars by fungi. *West Va., Univ. Agr. Expt. Sta., Bull.* 362 T: 58 pp.
- 1961. Acetate as carbon source for fungi. *Proc. West Va. Acad. Sci.* 33: 5-10.
- MAILLARD, M. L. C., 1912. Action des acides aminés sur les sucres, formation des mélanoides par voie méthodique. *Comp. Rend. Acad. Sci. (Paris)* 154: 66-68.
- MARGOLIN, A. S., 1942. *The effect of various carbohydrates upon the growth of some fungi*. Thesis, West Va. University.
- MOORE, D. and G. R. STEWART, 1972. Effects of 2-deoxy-D-glucose, D-glucose-amine and L-sorbose on the growth of *Coprinus lagopus* hyphae. *Jour. Gen. Microbiol.* 71: 333-342.
- MYCOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA, 1970. *Mycology Guidebook*: 942 pp. (Mimeo.).
- NEWTH, F. H., 1951. The formation of furan compounds from hexoses. *Advances in Carbohydrate Chem.* 6: 83-106.
- NITIMARGI, N. M., 1937. Studies in the genera *Cytosporina*, *Phomopsis* and *Diaporthe* VII. Chemical factors influencing sporing characters. *Ann. Bot., Lond.* 49: 19-40.

- PAGE, R. M., 1952. The effect of nutrition on growth and sporulation of *Pilobolus*. *Am. Jour. Bot.* 39: 731-738.
- 1960. The effect of ammonia on growth and reproduction of *Pilobolus kleinii*. *Mycologia* 52: 480-489.
- PELLETIER, R. L. and G. W. KEITT, 1954. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. VI. Amino acids as sources of nitrogen. *Am. Jour. Bot.* 41: 362-371.
- QURESHI, A. A. and O. T. PAGE, 1972. Observations on morphological and nutritional aspects of perithecial formation of *Nectria haematococca* and *Hypomyces solani*. *Can. Jour. Bot.* 50: 2443-2448.
- RAMLOW, G., 1915. Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Ascoboleen. *Mycol. Centralbl.* 5: 177-198.
- RANALLI, M. E. y R. O. CINTO, 1972. Estudio sistemático y biológico de las Ascobolaceas de Argentina IV. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 14: 285-304.
- RIZET, G., 1939. Sur les spores dimorphes et l'hérédité de leurs caracteres chez un nouvel *Ascobolus* hétérothalique. *Comp. Rend. Acad. Sci. (Paris)* 208: 1669-1671.
- ROBBINS, W. J., 1937. The assimilation by plants of various forms of nitrogen. *Am. Jour. Bot.* 24: 243-250.
- ROBBINS, W. J. and V. KAVANAGH, 1942. Vitamin deficiencies of the filamentous fungi. *Bot. Rev.* 8: 411-471.
- ROBBINS, W. J. and R. MA, 1942. Vitamin deficiencies of *Ceratostomella* and related fungi. *Am. Jour. Bot.* 29: 835-843.
- ROSS, R. G. and F. D. J. BREMNER, 1971. Effect of ammonium nitrogen and amino acids on perithecial formation of *Venturia inaequalis*. *Can. Jour. Plant. Sci.* 51: 29-33.
- ROSS, R. G. and S. A. HAMLIN, 1965. Influence of nutrients on perithecial production of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Can. Jour. Bot.* 43: 959-965.
- SCHOPFER, W. H., 1934. Les vitamines cristallisées B1 comme hormones de croissance chez un microorganisme (*Phycomyces*). *Arch. Mikrobiol.* 5: 511-549.
- SHADE, A. L., 1940. The nutrition of *Leptomitus*. *Am. Jour. Bot.* 27: 376-384.
- SHERWOOD, M. B. and E. D. SINGER, 1944. Folic acid in cotton. *Jour. Biol. Chem.* 155: 361-362.
- SPIEGELMAN, S., 1950. Modern aspects of Enzymatic Adaptation. Chap. 6, Vol. 1, Part 1 of "The Enzymes", Ed. by J. B. Sumner and K. Myrbäck. New York Academic Press Inc.
- STEINBERG, R. A., 1942. The process of amino acid formation from sugars in *Aspergillus niger*. *Jour. Agr. Res.* 64: 615-633.
- WESTERGAARD, M. and H. K. MITCHELL, 1947. *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *Am. Jour. Bot.* 34: 573-577.
- WOOD, J. L., 1953. A cytological study of ascus development in *Ascobolus magnificus* Dodge. *Bull. Torrey Bot. Club* 80: 1-15.
- YU, C. C., 1954. The culture and spore germination of *Ascobolus* with emphasis on *A. magnificus*. *Am. Jour. Bot.* 41: 21-30.
- YU-SUN, C. C., 1964. Nutritional studies of *Ascobolus immersus*. *Am. Jour. Bot.* 51: 231-237.