Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Estudio sistemático y biológico de las ascobolaceas e hypocreales de Argentina

Ranalli de Cinto, María Esther

1982

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Ranalli de Cinto, María Esther. (1982). Estudio sistemático y biológico de las ascobolaceas e hypocreales de Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1707_RanallideCinto.pdf

Cita tipo Chicago:
Ranalli de Cinto, María Esther. "Estudio sistemático y biológico de las ascobolaceas e hypocreales de Argentina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1707_RanallideCinto.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO SISTEMATICO Y BIOLOGICO DE LAS ASCOBOLACEAS E HYPOCREALES DE ARGENTINA

María Esther Ranalli de Cinto

Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas, de acuerdo a la 2da. parte del artículo 20º del Reglamento de Doctorado vigente.

-1982-

A G R A D E C I M I E N T O S

Quiero expresar aquí mi profundo agradecimiento a la Dra. Irma J. Gamundí de Amos, quien supo despertar en mi el gusto por el estudio de los Hongos y ha sido mi maestra y guía.

Al Dr. Jorge E. Wright, quien generosamente y durante muchos años, puso a mi disposición el uso del microscopio con el equipo de fotomicrografía y supo atender y resolver, dudas y consultas.

A los Licenciados Flavia Forchiassin, Oscar A. Mercuri, María Delia Bertoni, Nora Mouso de Cachi, Diana Dokmetzian y Carlos E. Lima, colaboradores directos en Introducción a la Botánica y en los trabajos de investigación, quienes me ayudaron en todo momento muy eficientemente.

A mis amigas y colegas, las Dras. Elena Ancibor e Inge M. Thiel, por su impulso y aliento permanente.

A mi esposo, mis hijas y mi madre, por su comprensión y estímulo, y sin cuya ayuda infinita no hubiera podido redondear este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología, por la ayuda financiera prestada a este proyecto.

I N D I C E

Introducción 1

Mi incorporación en la investigación 6

Materiales y Métodos 10

Resultados y Conclusiones 23

Estudio de Cultivos 23

A) Germinación de Ascosporas 23

B) Crecimiento vegetativo en medio nutritivo "standard" 28

1) Caracteres macroscópicos de las colonias 29

2) Caracteres microscópicos 30

C) Sexualidad y compatibilidad 31

Características morfológicas de las estructuras sexuales 34

a) Estructura sexual femenina 34

b) Estructura sexual masculina 36

1) especies homotálicas 37

2) especies heterotálicas 37

i) especies que no forman oídios 37

ii) especies formadoras de oídios 38

D) Desarrollo del apotecio 40

1) Período inicial 41

2) Período de diferenciación 41

3) Período de crecimiento 41

4) Período de maduración 42

Tipos de Desarrollo 45

a) cleistohimenial 49

b) gimnohimenial 49

1) paragimnohimenial 49

2) eugimnohimenial 49

E) Crecimiento y fructificación en diferentes medios variando las condiciones de iluminación y temperatura 54

Medios de cultivo 55

Temperatura 55

Luz 55

F) Citología 59

Discusión

Bibliografía

INTRODUCCION

El tema central de la investigación llevada a cabo hasta el presente se refiere al estudio sistemático y biológico de las Ascobolá ceas de Argentina, al que agregamos, a partir de 1975, el estudio de las Hypocreales de Argentina, motivados por la existencia de divergencias de criterio bastante acentuadas entre los diversos autores sobre la ubicación sistemática y las afinidades entre los miembros de las Hy pocreales.

La familia Ascobolaceae, dentro de los Ascomycetes, pertenece a la Serie Discomycetes, donde se encuentran ubicados aquellos hongos que tienen como fructificación, un apotecio. Dentro de la familia están incluídas numerosas especies, cuyo habitat característico, aunque no exclusivo, es el estiércol de animales herbívoros. Este brinda, además de las Ascoboláceas, un fascinante conjunto de hongos, maravillo samente adaptados, tanto fisiológico como balísticamente a un amplio ran go de condiciones.

Un trozo de estiércol colocado en cámara húmeda e iluminado, es una fuente segura de numerosos representantes fúngicos, que aparecen y maduran en una sucesión casi perfecta. Los Ascomycetes pueden aparecer tempranamente, algunos alrededor del 4to. día, pero generalmente la aparición es posterior alrededor del 7mo-9no. día, en que géneros copró filos característicos incluyen Discomycetes como Iodophanus, Cheilymenia, Ascobolus, Saccobolus y Pyrenomycetes como Sordaria, Podospora y

Sporormia, estos tres últimos, muy estudiados en lo que respecta a su ciclo reproductivo (Hawker, 1939 a, b; 1957; Ingold, 1965; Walkey y Harvey 1966 a, b; 1968; Austin, 1968 a,b.).

Los mecanismos de dispersión de muchos de estos hongos sugieren una relación cíclica entre estiércol-hierba-tracto intestinal del herbívoro -estiércol. Sin embargo muchos son los presentes como esporas o micelio sobre las hierbas, pero relativamente pocos los que sobreviven hasta fructificar sobre el estiércol (Bonner y Fergus, 1959). El proceso de digestión, la alta temperatura y la competencia con otros microorganismos ejercen una considerable selección, encontrándose ciertos grupos con alta proporción de representantes coprofilos y otros, como los Discomycetes inoperculados, que son muy raros (Dennis, 1968). La evolución en la escala zoológica hacia los animales de sangre caliente, parece haber sido de gran importancia en la evolución del hábitat coprófilo, ya que si bien un gran número de especies se ha encontrado en estiércol de aves y mamíferos, muy pocas lo han sido en estiércol de reptiles.

Un hecho interesante que presentan los hongos coprófilos en general, es su distribución cosmopolita, sin duda influenciada por su tipo de dispersión, realizado por los mismos animales, por el viento y también por el agua, o bien por esporas adheridas al forraje que es a veces transportado a grandes distancias.

Hay varias características de los hongos coprófilos que permiten su éxito y supervivencia, a saber: 1º) Capacidad para sobre-

vivir a la digestión. Relativamente son pocos los hongos que fructifican sobre estiércol comparados con las numerosas y variadas esporas adheridas a las hierbas. Podemos suponer que no soportan la digestión; sin embargo, muchas pueden sobrevivir y germinar, pero pueden ser incapaces de competir por los nutrientes con otros microorganismos. Puede también haber crecimiento vegetativo, pero el sustrato ser desfavorable para la fructificación. Se han hecho numerosas experiencias, entre ellos inocular pan estirilizado con suspensiones de esporas variadas y conocidas y observar cuales aparecen sobre el estiércol en cámara húmeda. Harper (1962) demostró que el tiempo necesario para la producción de tubos germinativos a temperatura ambiente después de haber sometido a una serie de esporas a un tratamiento con pancreatina alcalina durante 5 horas a 37ºC, variaba entre 4 y 72 horas, lo que podría estar relacionado con el tiempo que la comida está normalmente dentro del intestino; 4 - 6 horas para conejos (Brandt y Tacker, 1958, 25-40 horas o hasta 72 horas para ganado vacuno (Sineshchekov, 1965; Dukes, 1942).

2º) Necesidad de un estímulo para la germinación. Las esporas de numerosos coprófilos no germinan fácilmente cuando se siembran en agar-nutritivo. Teniendo en cuenta su nicho ecológico, resulta ventajoso para las esporas no germinar fácilmente sobre los pastos cuando éstos son humedecidos. La dormancia, constitutiva o exógena, constituye pues, un mecanismo adaptativo sumamente valioso.

3º) Supervivencia y crecimiento dentro de un am-

plio rango de temperaturas. La temperatura del tracto intestinal de animales de sangre caliente oscila alrededor de 37ºC y las esporas de hongos coprófilos deben sobrevivir a esta temperatura por períodos que varían de unas pocas horas hasta 3 días. No hay demasiadas evidencias de si pueden sobrevivir en estado miceliano, pero de las observaciones hechas "in vitro" se concluye que muy pocas son capaces de crecer a 37ºC.

Con respecto a la nutrición en coprófilos, el estiércol es un medio muy complejo y particular que contiene, además de los restos de hierbas ingeridas por el animal, productos de desecho tales como productos de la degradación de glóbulos rojos, pigmentos biliares, remanentes de poblaciones microbianas que, muertas, son importante fuente de nitrógeno, y vivas, son capaces de sintetizar vitaminas solubles, de tal forma que el estiércol contiene un rico suplemento de factores de crecimiento. La obtención de un medio sintético que permita al hongo cumplir su ciclo biológico normalmente, requiere un análisis minucioso de los diferentes factores nutricionales.

En los últimos años ha habido un incremento notable en el interés de aplicar análisis bioquímicos a la identificación y clasificación de los hongos, la cual, tradicionalmente, está basada sobre caracteres morfológicos relacionados con las hifas vegetativas, la reproducción sexual y asexual, color, forma y tabicamiento de esporas y otros caracteres similares. Algunos rasgos usados son fundamentales, otros

triviales. En el caso particular de las Ascoboláceas, se han realizado estudios sobre ciclo de vida, citología y sexualidad de algunas especies, pero el tratamiento sistemático de esta familia se ha hecho exclusivamente sobre la base de caracteres macro y micromorfológicos. Con la esperanza de encontrar nuevos criterios que fundamenten la separación de las especies y el grado de afinidad entre ellas y entre los géneros, se ha encarado el estudio monográfico de las Ascoboláceas de Argentina, con un enfoque fisiológico y ontogenético. Más aún, el enfoque biológico que se le da al tema, que rebasa los límites geográficos en el sentido de que la mayoría de las especies son cosmopolitas, permitirá ahondar el conocimiento actual de las mismas. Por otra parte, el estudio de los requerimientos nutricionales, tendientes a la obtención de medios de cultivo totalmente sintéticos, que permitan a los organismos estudiados cumplir su ciclo de vida normalmente en el laboratorio, bajo condiciones controladas, permitirá usar este extraordinario material biológico en el estudio y dilucidación de problemas genéticos.

MI INCORPORACION EN LA INVESTIGACION

Mientras cursaba mi segundo año de la Carrera, tuve la oportunidad de ponerme en contacto con la Dra. Amoa, quien regresaba de Estados Unidos, donde había trabajado con George Bistis en Ascoboláceas. Supo de mi interés por los hongos y generosamente me ofreció la oportunidad de trabajar a su lado, como ayudante de laboratorio. Allí comenzó mi aprendizaje, cumpliendo todas las tareas básicas de laboratorio que me permitieron familiarizarme con las Ascoboláceas, aprender a reconocerlas,a tratar de aislarlas en cultivo, a partir de ese fascinante mundo que es un trozo de estiércol puesto en cámara húmeda. Desde entonces y hasta la finalización de mi Carrera continúe trabajando y aprendiendo bajo la dirección de la Dra. Amos, en el Departamento de Ciencias Biológicas, donde comencé, mi carrera docente. En 1965 la Dra. Amos se trasladó a la Universidad Nacional de La Plata como Profesora Titular, pero seguimos trabajando en el tema en colaboración. Por ese entonces comencé a trabajar en colaboración con la Dra. Rosa M. de Lederkremer, del Departamento de Química Orgánica, analizando la composición química de los estromas fértiles de Cyttaria harioti, de la que estudiamos los Hidratos de Carbono simples y polioles. Mi incursión en el tema fue breve, ya que si bien me interesaba, no quería perder de vista el aspecto biológico, por lo que no continué con la investigación, dedicándome enteramente a la biología de las Ascoboláceas. En colaboración con el Lic. Ronán Cinto, publicamos el 4to. trabajo de la

serie monográfica sobre Ascoboláceas, con la supervisión de la Dra. Amos, quien por entonces, nos derivó esta línea de trabajo.

En mayo de 1972, y debido a las gestiones que realizara el Dr. Jorge Wright, entonces director del Departamento de Ciencias Biológicas pude asistir al curso de post-grado, que sobre "Cromosomas en la evolución y sistemática", dictara el Dr. Keith Jones en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Mi interés por la citología en Ascoboláceas me había llevado en aquella oportunidad a probar diversas técnicas, con resultados bastantes satisfactorios. De allí en adelante, se agregó a la línea de trabajo original el estudio citológico de las especies analizadas, con la intención de aportar nuevos datos complementarios en la caracterización de estos organismos. Con el transcurso del tiempo, se fueron añadiendo al plan original nuevos temas: así se estudiaron los requerimientos nutricionales de Ascobolus biguttulatus, utilizándose en el análisis estadístico de los datos, Técnicas de Superficie de Respuesta. Con el empleo de técnicas especiales que permiten preservar sin mayores deterioros las estructuras sexuales, pudimos observar y estudiar los rasgos estructuras en vista superficial de los estados iniciales en la formación de la fructificación de Ascobolus bistisii, hasta la maduración y liberación de las ascosporas, empleando el Microscopio Electrónico de Barrido. En colaboración con el Departamento de Química Orgánica de nuestra Facultad, aislamos y caracterizamos el glicógeno obtenido del micelio de Ascobolus fur-

fursceus y ultimamente hemos incluído el análisis electroforético en gel de poliacrilamida, de las proteínas solubles del micelio, ya que consideramos que puede proporcionarnos datos que contribuirán al esclarecimiento de las relaciones taxonómicas de organismos relacionados o supuestamente relacionados,sobre todo de aquellos donde hay dificultad para utilizar los métodos clásicos de la Taxonomía tradicional. Para estos trabajos cuento con la colaboración inestimable del personal docente auxiliar con dedicación exclusiva del Laboratorio de Introducción a la Botánica, quienes abarcan diversos aspectos parciales del plan de investigación.

Los trabajos publicados hasta el momento pueden dividirse en tres grupos a saber:

1) Relacionados con el crecimiento, la ontogenia, la sexualidad, la citología y la nutrición de Ascoboláceas (principalmente de Argentina, aunque incluyen dos trabajos realizados con material proveniente de Estados Unidos de Norteamérica). Trabajos 1 - 15 inclusive.

2) Relacionados con el crecimiento, la ontogenia y la citología de Hypocreales de Argentina. Trabajos 16 - 18 inclusive.

3) Un único trabajo relacionado con la composición química de Cyttaria harioti Fisher, en el que se analizó el contenido de Hidratos de Carbono simples y polioles en el estroma fértil de Cyttaria harioti. Como explicara previamente, no se continuó con esta línea de trabajo.

A continuación, presentaré la metodología, resultados y conclusiones extraídas hasta el presente, en el "Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina".

ESTUDIO SISTEMATICO Y BIOLOGICO DE LAS ASCOBOLACEAS DE ARGENTINA

MATERIALES Y METODOS

Debido a que el estiércol de animales herbívoros es el principal, aunque no único habitat de las Ascoboláceas, el método de la cámara húmeda, practicado por los micólogos desde el siglo pasado, sigue siendo el habitual para la obtención de fructificaciones en el laboratorio. Para ello se utiliza estiércol previamente secado y se lo coloca en una caja de Petri sobre papel de filtro, suministrándosele suficiente humedad. Al cabo de 8 - 10 días, los apotecios de la mayoría de las especies de Ascoboláceas alcanzan la madurez. Entonces se invierte una caja de Petri con agar-agua al 2,5% sobre el estiércol con el objeto de recoger las ascosporas, que al ser expulsadas violentamente al menor movimiento del aire, se adhieren fuertemente al agar, debido al característico mucílago que generalmente las envuelve.

Se observan las ascosporas durante los días subsiguientes y si germinan a temperatura ambiente, se hacen cultivos monospóricos transfiriendo pequeños bloques de agar conteniendo una ascospora germinada o bien una punta de hifa, a medio nutritivo "stadard" (agar: 25 g ., extracto de levadura "Difco": 3g., agua destilada 1000 ml. y un disco de papel de filtro Manaco Duren Nº 615 o similar). Se incuban los cultivos a temperatura ambiente o bien en cámara incubadora a

23ºC ± 1ºC, a luz contínua. Si por el contrario, al cabo de 10 a 15 días no han germinado, se ensayan tratamientos inductores de la germinación. Estos tratamientos se aplican a ascosporas que tengan un "período de reposo" mínimo de cinco días, contados a partir de su expulsión del asco. Este período parece ser indispensable para las especies de Ascobolus, aunque no es absolutamente necesario para las especies de Saccoblus. Los tratamientos inductores pueden ser:

a) Calor: consiste en suministrar a las ascosporas una temperatura de 37ºC durante un tiempo que varia de 24 horas a varios días, según los casos, o bien el llamado "shock" de calor, por el que se somete a las ascosporas durante un lapso de 1 - 3 minutos a altas temperaturas (80ºC a 90ºC) en un horno eléctrico, haciéndose bajar paulatinamente la temperatura hasta que alcance unos 20-23ºC, con lo que se da por finalizado el tratamiento. Luego se dejan a temperatura ambiente.

b) Soluciones alcalinas: El tratamiento se efectúa con soluciones de OHNa e OHK de concentraciones inferiores al 1%. La concentración de las soluciones a emplearse depende del espesor de la pared de la espora y de la presencia o no de grietas. El tiempo de acción del alcali es variable, habiéndose ensayado tiempos que oscilaron entre 2 y 60 minutos, al cabo de los cuales se neutraliza con una solución 1N de HCl. Se vuelca el líquido, se lava, y se incuba a 37ºC por un período que puede variar de 24 horas a varios días. A partir

de las 24 horas, del tratamiento, se observan las ascosporas diariamente y si el porcentaje de germinación es de 40 a 50% al cabo de 24-48 horas, se considera efectivo el tratamiento.

Una vez aisladas las ascosporas germinadas en cultivos monospóricos sobre medio "stadard", se observa el desarrollo del micelio durante dos o tres semanas, y si sólo hay crecimiento vegetativo abundante, se sospecha que pueda tratarse de una especie heterotálica. Para determinar la compatibilidad sexual de las cepas monospóricas, se las cruza de a pares en caja de Petri, observándose la aparición de las fructificaciones, generalmente en la línea de contacto de las colonias.

En los casos en que existen oídios que actúan como agentes espermatizantes, con el fin de estudiar los mecanismos de interacción entre oídios y micelio compatible, recurrimos a la "espermatización". Para ello, se colocaron bloques de agar-agua al 2%, de 5 x 5 x 2 mm., con oídios provenientes de cultivos de 5 días, que fueron obtenidos por filtrado estéril como una suspensión libre de micelio, sobre micelio base de la misma edad, de la cepa compatible, creciendo en cajas de Petri con medio "atadard", y se siguió la evolución del proceso con el microscopio óptico. La concentración de oídios debe ser tal que nos permita obtener un número uniforme de fructificaciones por bloque de agar, y de tamaño medianamente parejo. De esta manera, los primeros estadíos se observaron "in vivo", fotografiando las secuencias desde que se activan los oídios y se inicia la diferenciación de los ascogonios hasta la

formación de los protoapotecios. Paralelamente se fueron fijando los bloques de agar con las fructificaciones a intervalos regulares, hasta la maduración de los mismos en fijador de Newcomer (1953).

Para las observaciones del desarrollo realizadas con MEB, los bloques de agar conteniendo los diferentes estadíos de desarrollo del apotecio fueron fijados en glutaraldehido al 2,5% en "buffer" de Milloning a pH 7,3 (Dawes, 1971), durante 3 a 5 horas a temperatura ambiente. La fijación inicial fue seguida por tres lavados de 15 minutos cada uno en el mismo "buffer" y dejados toda la noche en el mismo. El material fue luego post-fijado en OsO_4 al 1% en "buffer" de Milloning durante 2 horas: 1 hora a 3ºC; 30 minutos a 12ºC y 30 minutos a temperatura ambiente. Luego fue deshidratado con acetona al 15, 25, 35, 45, 55, 65, y 75% a 3ºC, durante 10 minutos en cada etapa. Finalmente fueron sometidos al proceso del "Punto crítico" y observados con el Microscopio Electrónico de Barrido.

El estudio ontogenético de los apotecios se realizó con material fijado, seccionado y colorado, complementado con observaciones "in vivo" de cultivos desarrollados en caja de Petri, sobre medio "standard". El estudio comparativo del crecimiento vegetativo y de las fructificaciones se efectuó con ensayos simultáneos en, por lo menos, tres de los siguientes medios de cultivo:

a) Medio "standard" (sigla PF) (Bistis, 1956:389).

b) Medio de Caseína(sigla C) (Wood, 1953: 4) modificado utilizando caseína en lugar de caseína hidrolizada.

c) Medio M (Olive, 1950:759).

d) Medio de Yu (sigla Y) (Ranalli y Gamundí, 1975:740).

e) Extracto de estiércol - urea (sigla E-U): 1 litro de decocción de estiércol filtrada, 5 g. de glucosa. 1g de nitrato de amonio, 2g de urea, 20g de agar.

f) Estiércol de vaca, caballo, oveja, cabra, etc. esterilizado (sigla E).

En el caso del género Ascodesmis, tanto la germinación de las ascosporas, como el desarrollo de las fructificaciones, fueron llevadas a cabo sobre el siguiente medio: almidón soluble 10 gr, extracto de levadura "Difco" 5 gr, H_2KPO_4: 1 gr, $SO_4Mg.7H_2O$:0,5 gr, agar 20 gr, agua de canilla 1000 ml.

En cuanto a las condiciones ambientales, muchas experiencias, sobre todo las de los trabajos iniciales, se realizaron a temperatura ambiente registrada con termográfo. En los trabajos posteriores, contando con cámaras de cultivo, las experiencias fueron realizadas a temperatura controlada de 23ºC $\pm$ 1ºC. Las condiciones de iluminación se variaron, para poder observar el efecto de la luz sobre los cultivos, haciéndose silmultáneamente dos series, una a la luz y otra a oscuridad, otras agregándose a las dos anteriores una serie con exposición a la variación diurna de luz o a períodos diarios controlados de luz y oscuri-

dad. En algunos casos, se expusieron los cultivos a la oscuridad durante un lapso de su desarrollo, dejándose a luz contínua durante el tiempor subsiguiente. La luz contínua se proveyó por un tubo fluorescente de 20 watt, dentro de una cámara de madera de 70 x 45 x 45 cm, donde se registró la temperatura, o bien en cámara de cultivo New Brunswick, suministrada por tres tubos fluorescentes de 20 watt, a temperatura constante de 23ºC ± 1ºC. Para los ensayos de oscuridad, se envolvieron las cajas de Petri con papel negro.

Para la fijación del material se usó fijador de Newcomer (1953) procediendo a fijar cada 24 horas pequeños bloques de agar conteniendo primordios de apotecios desde su aparición en cultivo hasta llegar a la madurez de las fructificaciones. El mínimo de tiempo de fijación fue una semana y el máximo un mes. Antes de seccionar el material con el micrótomo de congelación, se lo hidrató y luego se lo montó en la mezcla de Hamilton (Clayden, 1958) para tal fin. Se efectuaron secciones longitudinales de las fructificaciones de 8 a 20 µm de espesor, que posteriormente se coloraron con carmín propiónico (Olive, 1950:759) y con azul láctico (Le Gal, 1947:79) para su estudio ulterior. Las secciones más ilustrativas fueron fotografiadas.

Las porciones del estiércol original, con las fructificaciones secas quedaron depositadas en el Herbario del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (BAFC), así como trozos del estiércol esterilizado y reinoculado con la especie es

tudiada, al estado seco. Los cultivos se mantienen en la colección de cultivos de hongos del Departamento citado (C-).

Métodos citológicos.

Las observaciones citológicas se hicieron en micelio y en fructificaciones obtenidas sobre medio "atandard" o bien en medio "Y". Para tal fin, a partir generalmente del 3er-4to. día de la inoculación del micelio en el medio respectivo, se fijaron pequeños bloques de agar conteniendo el micelio y/o las jóvenes fructificaciones.

Fijación: se utilizaron distintos fijadores, dependiendo del colorante a emplear en cada caso:

a) Fijador de Carnoy (3 partes de alcohol absoluto, 1 parte de ácido acético glacial), durante 30 minutos a varios días (no más de cinco).

b) Fijador de Lu modificado (Lu, 1962, 1967), compuesto por: 9 partes de alcohol etílico absoluto, 6 partes de ácido propiónico y 2 partes de solución acuosa al 10% de ácido crómico. La fijación se realizó durante 24 horas a 10 días. Los mejores resultados fueron obtenidos con material fijado durante 24-48 horas.

En ambos casos los bloques de agar se colocaron en pequeños

frascos con fijador, dejándolos a temeperatura ambiente hasta la coloración.

Coloración: Varias fueron ensayadas:

a) carmín en ácido propiónico al 65% (Wells, D. 1956).

b) Aceto-lacto-orceína (Day, Boone y Weitt, 1956).

c) Giemsa HCl (Rogers, 1965).

d) Hematoxilina-propiono-férrica (Lu, 1967).

Los mejores resultados fueron obtenidos con las dos últimas coloraciones, por lo que se emplearon rutinariamente.

Coloración con Giemsa: pequeños bloques de agar fueron fijados en Carnoy (3:1) durante 30', lavados rápidamente en alcohol 70% y a continuación en 2 cambios de agua destilada e hidrolizados en HCl 1N durante 30' a varias horas, a temperatura ambiente, o bien durante 20' en HCl 1N a 60ºC.

Después de hidrolizado, el material fue lavado con agua destilada y colocado en buffer de pH 7,2 preparado según Jensen (1962), llevado sobre un porta-objetos y luego de absorber el exceso de buffer con papel de filtro, se agregaron 2 gotas de buffer fresco y una gota de solución stock sin diluir de colorante de Giemsa, preparado de acuerdo con Ward y Ciurysek (1962). Después de colorar durante 15-45' se lavó con varios cambios de agua destilada y buffer respectivamente. Nuevamente, el exceso de buffer fue eliminado. Completando la coloración se agregó sobre el material una gota de solución acuosa de OHK al 3%, colocando un cu-

bre-objetos y aplastando vigorosamente. El material nuclear aparece rojo purpúreo, mientras que el citoplasma permanece incoloro o levemente rosado. La coloración persiste durante 12-15 horas, después de las cuales se desvanece. (En heladera puede durar varios días, protegiendo los preparados de la desecación).

Coloracion con hematoxilina-propiono-ferrica: Las fructificaciones fueron fijadas en fijador de Lu modificado, generalmente durante 24 horas, aunque en materiales que permanecieron en el fijador a temperatura ambiente durante 10 días, las placas centriolares se tiñeron con mayor nitidez.

Después de la fijación, las fructificaciones fueron hidratadas a través de la serie de alcoholes e hidrolizadas en HCl 1N durante 5' a temperatura ambiente, calentando luego a 60ºC en baño de agua, durante 15-20 minutos. Se lavaron repetidas veces con fijador de Singleton (1953) para eliminar todo rastro de HCl que interfiere con la posterior coloración. La hidrólisis facilita el aplastado de los ascos y el citoplasma se colora menos. El colorante fue preparado mezclando partes iguales de una solución al 0,5% de alumbre de hierro en ácido propiónico al 50% y hematoxilina al 2% en ácido propiónico al 50%.

Si la solución de hematoxilina es reciente, el colorante no debe usarse hasta después de 24 horas de preparada la mezcla, que mantiene sus propiedades alrededor de cuatro semanas si se guarda en un frasco color de caramelo. Las fructificaciones se dejaron el el colorante durante 2-24 horas, luego se aplastaron en una gota de colorante fresco sobre un porta-objetos, y antes de bordear con parafi-

na se calentaron suavemente, intensificándose la coloración de los núcleos, nucleolos y cromosomas, y aclarándose el citoplasma.

Ensayos sobre nutrición

Se estudió la respuesta cuantitativa de Ascobolus biguttulatus a cuatro fuentes nutritivas: biotina y tiamina, vitaminas para las cuales mostró deficiencia y D-glucosa y L(-) asparagina como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente. Para ello se trabajó con el aislamiento monospórico Nº 19 de la cepa C-1220, cuyos repiques se mantuvieron en medio "standard" en heladera a 10ºC hasta el momento de su utilización. El inóculo para los ensayos fue un disco de 2mm de diámetro tomado de una colonia que fue repicada 2 veces en caja de Petri con Bacto-agar "Difco" al 2%. El material de vidrio fue lavado con detergente especial para vidrio, sometido luego a la acción de una solución de bicromato de K y ácido sulfúrico y enjuagado primero con agua corriente caliente y luego 6 veces con agua bidestilada por vidrio. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 121ºC, la glucosa se esterilizó separadamente y se añadió estérilmente al medio basal. Las vitaminas se esterilizaron a través de filtro 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 utilización (biotina: 5µg/ml y tiamina 100 µg/ml). Los tapones de algodón de los Erlenmeyers en donde creció el hongo fueron protegidos con gasa medicinal para evitar la contaminación de los medios de cultivo con partículas de algodón

(Sherwood y Singer, 1944).

El pH inicial de todos los medios varió entre 6,2 y 6,4 antes de esterilizar. Cuando fue necesario ajustar los valores de pH dentro de ese rango, se utilizaron soluciones 0,1 N de OHNa y HCl. Los cultivos se realizaron en Erlenmeyers de 250 ml conteniendo 100 ml. de medio líquido que consistió en: D-glucosa, L(-) asparagina (ambas en concentraciones variable según el diseño experimental), K_2HPO_4:0,6 gr, KH_2PO_4:0,5 gr, $MgSO_4.7H_2O$: 0,5 gr y solución de micronutrientes: 1 ml (Galvagno, 1976); biotina y tiamina (en concentraciones variables según el diseño experimental), H_2O destilada hasta 1000 ml. Las drogas utilizadas fueron pro-análisis.

El crecimiento vegetativo se valoró tomando el peso seco del hongo creciendo a 24ºC durante un período de 6 días; el micelio fue filtrado por embudo Buchner a través de papel de filtro (Carl Schleicher and Schull Nº 595), enjuagado con agua bidestilada y secado a 90ºC hasta peso constante. Los valores de peso seco aproximados al miligramo, fueron registrados en una balanza analítica Mettler H_5. Para todas las experiencias los cultivos se incubaron en cámara de crecimiento a luz contínua, suministrada por tres tubos fluorescentes de luz fría de 20 watt, con agitación constante a 125 rpm. El análisis estadístico de los datos se efectuó empleando Técnicas de Superficie de Respuesta.

Para el aislamiento y caracterización del glicógeno presente en micelio de Ascobolus furfuraceus, se utilizó un aislamiento monospórico de la cepa C-233 que fue mantenido en medio "standard" en heladera a 10ºC. Los cultivos se realizaron en Erlenmeyers de 250 ml. conteniendo 100 ml de medio líquido que consistió en: K_2HPO_4: 0,5 gr, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$:0,5 gr; Cl_2Zn, 10mg; SO_4Cu: 0,4 mg; Cl_2Mn: 0,09 mg; BO_3H_3:0,07mg; $O_4MoNa_2:2H_2O$:0,02 mr; Cl_3Fe: 1 mg; biotina: 5 ug; tiamina 0,1 mg; D-glucosa:20 gr; L(-) asparagina: 4 gr; y H_2O destilada hasta 1000 ml. El micelio para determinación del glicógeno fue lavado con etanol y secado al vacío a temperatura ambiente.

Métodos analíticos.

La cromatografía en papel fue llevada a cabo por el método descendente en papel Whatmann Nº 1 con 1-butanol-piridina-agua (6:4:3 v/v). El revelado se efectuó con: a) Nitrato de plata-hidróxido de Na (Trevelyan y col., 1950); b) p-anisidina-hidrocloruro (Hough y col., 1950), y c): ninhidrina (Teonnies y Kole, 1951).

Los índices de rotación fueron registrados con un polarímetro Perkin-Elmer. El espectro del complejo iodo-glicógeno fue registrado con un espectrofotómetro Beckman DK-2A, en presencia y ausencia de sulfato de amonio respectivamente (Archibal y col., 1961). El total de Hidratos de carbono fue determinado por el método del fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956). La hidrólisis ácida fue llevada a cabo calentando la muestra (5 mg) con HCl. 2N a 100ºC durante 2 horas en atmósfera

de nitrógeno. El glicógeno fue extraído del micelio de 6 días de edad siguiendo 2 métodos:

1) Extracción con H_2O fría

El micelio (1,42 gr) fue homogeneizado en un Potter enfriado a 0ºC, y extraído con H_2O, 30 ml por vez, repetidamente, hasta que el test de iodo diera negativo. Después de la centrifugación a 1700g durante 30', el glicógeno fue precipitado del sobrenadante por adición de 2 volúmenes de etanol. El precipitado (0,50 gr) fue redisuelto en 30 ml de agua y centrifugado a 4500g durante 30' para remover el material insoluble. El glicógeno fue reprecipitado de la solución con etanol. La purificación fue repetida varias veces hasta índice de rotación constante.

2) Extracción con una mezcla de fenol-agua

El procedimiento se basó en el método usado por Laskov y Margoliash (1963) para la preparación del glicógeno a partir de hígado de rata. 3,5 gr de micelio seco fue reducido a polvo y extraído con 120ml de fenol 45% durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla fue centrifugada a 1200g durante 30', la fase acuosa fue separada y se realizó una segunda extracción con un volumen similar de agua. El glicógeno fue precipitado de los extractos acuosos combinados por adición de 2 volúmenes de etanol. Después de tres purificaciones se obtuvo un glicógeno de índice de rotación constante.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

ESTUDIO DE CULTIVOS

A) GERMINACION DE ASCOSPORAS

Las ascosporas expulsadas violentamente por los ascos maduros fueron recogidos sobre placas de agar-agua al 2,5% y observadas diariamente luego de recogidas. Sólo en casos excepcionales se obtuvo germinación espóntanea sobre agar-agua, ya que las ascosporas estaban dormidas.

La dormancia en esporas de hongos puede ser de dos tipos (Suss man, 1965): a) dormancia exógena, cuando el desarrollo está diferido debido a condiciones físicas o químicas desfavorables del medio. b) dormancia constitutiva, cuando el desarrollo se pospone debido a una propiedad innata del estado de dormición, tal como la existencia de una barrera a la penetración de nutrientes o agua, un bloqueo metabólico o bien la existencia de una autoinhibición. Ambos tipos de dormancia se encuentran representadas, en general, en los hongos coprófilos, y en particular en las Ascoboláceas estudiadas por nosotros. Sin embargo uno de los problemas que se presentó al estudiarla, es la heterogeneidad fisiológica de las poblaciones de esporas de una especie dada, y aún entre las esporas provenientes de una misma fructificación.

La necesidad de un "tratamiento digestivo" para que la germinación ocurra varía aún dentro de hongos muy relacionados. Por ejemplo, Mucor mucedo, que es solo coprófilo facultativo, es prácticamente, indiferente al tratamiento inductor (Webster, 1970), mientras que otras especies tienen requerimientos perfectamente definidos.

Para activar la germinación de una especie dada, pueden servir, por otro lado, una"variedad de activadores. Por ejemplo, Ascobolus stercorius germina después de un tratamiento a 38ºC en un extracto acuoso de estiércol de vaca; después de 30 minutos a temperaturas entre 60-70ºC; a 37ºC después de ser sometidas las escoasporas durante 30 minutos a la acción de una solución acuosa de OHNa al 0,35%, o bien, cuando son tratadas con sales biliares. Este amplio rango de estímulos se entiende, cuando se analiza la gran variación del medio químico a lo largo del tracto intestinal que deben recorrer las esporas antes de ser depositadas con las deyecciones.

La gran diversidad de agentes capaces de activar la germinación, es similar a la encontrada en otros hongos no coprófilos, en los que se han analizado con detalle, las causas de la dormancia (Sussmanm 1965, 1966; Sussman y Halvorson, 1966; Fries, 1966).

Las posibles causas de la dormancia pueden ser:

a) Deficiencias metabólicas: en muchos casos, el agregado de nutrientes al medio es suficiente para activar la germinación.

b) Impermeabilidad de la pared de la espora: el efecto de alcalis y otros agentes activadores sobre la superficie de la espora, consiste en aumentar la permeabilidad de la pared de la misma al agua.

c) Presencia de inhibidores enzimáticos que deben ser destruídos.

d) Precursores enzimáticos que deben ser convertidos en la enzima correspondiente.

e) Enzimas separadas en el espacio, de su sustrato correspondiente: la activación determina su puesta en contacto.

Los resultados obtenidos con las especies de Ascoboláceas estudiadas nor permiten ejemplificar algunas de estas posibilidades. Así, Ascophanus carneus (= Iodophanus carneus) fue prácticamente la única especie que presentó al 6to. día de la expulsión, germinación espontánea. Obtuvimos 28% de germinación a temperatura ambiente que osciló entre 21-22ºC. Un aumento de la temperatura favoreció la germinación y así, a las 72 horas de expulsadas y sometidas a 37ºC, registramos un 37% de germinación espontánea. En el resto de las especies estudiadas, fue necesario recurrir a un tratamiento inductor de la germinación, previo sometimiento de las ascosporas a un período de reposo variable entre 2 y 10 días, lo que parecería indicar la presencia de inhibidores que deben ser destruídos o precursores que deben ser convertidos, antes de que ocurra la germinación.

Los tratamientos inductores con soluciones alcalinas permitieron demostrar que el exosporio contituye una barrera efectiva a la en-

trada de agua. Ascobolus albidus, produjo en cultivo ascosporas hialinas, sin exosporio, que germinaron espontáneamente una vez expulsadas, mientras que las ascosporas normales necesitaron tratamiento inductores con soluciones de OHNa de concentraciones que variaron entre el 0,2 y el 0,4%, durante 10 a 30' e incubación posterior a 37ºC durante 48 horas. Parecería ser que el exosporio es aquí la única barrera mecánica opuesta a la entrada de agua e iniciación de la germinación y si hay inhibidores (requieren período de reposo) podría ser el lugar físico donde estén ubicados.

La permeabilidad del exsosporio varía de acuerdo con:

1) Medio de cultivo sobre el que desarrolla las fructificaciones que expulsan las ascosporas. Tratamientos inductores efectivos en ascosporas provenientes de cultivos o de estiércol tindalizado, resultaron drásticos aplicados en ascosporas provenientes de cultivos en medios "standard". Esto pudo ser observado en A. albidus y en A. ferrugineus y podría estar relacionado con el espesor del exosporio.

2) Duración del período de reposo. En A. ferrugineus, al aumentar el período de reposo, tanto las ascosporas provenientes de medio "standard", como las de estiércol, necesitan mayores concentraciones de OHNa paragerminar, lo que indicaría que se produce una modificación del exosporio ("endurecimiento") y no una disminución de la viabilidad, ya que ascosporas provenientes de E con 10 días de reposo y un tratamiento inductor con una concentración de OHNa al 0,1% durante

30', no germinaron, mientras que al 0,2% presentaron un 85% de germinación. Al 0,3% disminuye el porcentaje ya que el tratamiento es muy drástico; aparecen numerosas esporas con las paredes rotas y el contenido desparramado. Este comporatamiento no es general, y en A. albidus ocurre lo contrario; al envejecer, las concentraciones requeridas para la germinación son menores.

3) La regularidad en la disposición del exosporio. En A. bistisii, los resultados obtenidos con la aplicación de un tratamiento inductor dado, fueron muy variables, comportamiento que atribuimos a la desigual cantidad de grietas presentes de espora a espora, lo que puede influir en la penetración desigual de la solución alcalina, y afectar, en consecuencia, la imbibición de la ascospora.

Las deficiencias metabólicas como causa de dormancia, también fueron comprobadas. Ascosporas de A. furfuraceus, A. stercorarius y Ascodesmis sp, recogidas sobre placas de Bacto-agar, no germinaron, aún cuando fueron sometidas a los tratamiento inductores óptimos. Si lo hicieron, cuando fueron colocadas las dos primeras, en agar-agua común (con impurezas, que aportan, sin duda, factores nutritivos) y Ascodesmis en el medio de cultivo apropiado, en el cual no necesitaron tratamiento inductor con soluciones alcalinas, y germinaron espontáneamente a las 24-48 horas de ser recogidas.

Comprobamos que otro factor que influye sobre la germinación de las ascosporas, es su densidad en la caja donde son recogidas. En

un tratamiento inductor dado, la germinación es mayor en áreas de mayor densidad de esporas. Esto podría interpretarse como el resultado del desprendimiento, durante la iniciación de la germinación, de productos volátiles activadores de esta. Mc Teague, Hutchinson y Reed (1959) y Löse (1967) demostraron que la germinación de las esporas de Agaricus bisporus puede estimularse por la presencia de micelio vegetativo o por productos volátiles producidos por su propio micelio o micelio de otros hongos. Los vapores del ácido iso-valérico, que es un ácido graso de cadena corta, son activos estimulantes de la germinación, y se sabe que son producidos por el micelio de Agaricus bisporus y otros hongos. Nosotros encontramos que el porcentaje de germinación de ascosporas de Saccobolus succineus y S. citrinus sometidas a un efectivo tratamiento inductor, aumentaba considerablemente con un incremento en la densidad de ascosporas en la caja.

En todas las especies estudiadas, al iniciarse la germinación se separan las paredes, el ascosporio se aclara, el volumen aproximadamente se duplica y el contenido aparece removido. Se producen de 1 a 4 tubos germinativos, frecuentemente 2, emitidos polar o sub-polarmente, que se ramifican a corta distancia, originando un micelio hialino y laxo

8) CRECIMIENTO VEGETATIVO EN MEDIO NUTRITIVO "STANDARD"

Las observaciones se realizaron "in vivo" en cultivos monos-

póricos que crecían en cajas de Petri sobre medio "standard".

1) Caracteres macroscópicos de las colonias

De las observaciones realizadas, podemos establecer una neta diferencia con respecto a la velocidad de crecimiento de la colonia. Sin excepción todas las especies de Ascobolus estudiadas presentan un crecimiento rápido, alcanzando el borde de la caja entre el 3º y 4º día, con escaso desarrollo aéreo al principio, pero abundante crecimiento aéreo a partir del 4º-5º día, sobre todo en especies formadoras de oídios. El micelio es laxo, hialino, de crecimiento radial, con ramificación monopodial. El borde de la colonia es ondulado a liso, el sustrato no toma coloración alguna o bien adquiere tonalidades citrinas o verdosas. El olor del cultivo es dulzón, semejante al de la flor del manzano o membrillo a ligeramente pútrido o estercóreo.

Las especies de Saccobolus, en cambio, son de crecimiento lento, alcanzando la colonia generalmente entre 4 a 6 cm. diám. cuando las fructificaciones maduran. El borde de la caja se alcanza entre el 9º-14º día. De aspecto cremoso, principalmente en la zona central, tiene borde irregular a liso, con crecimiento rasante, menos denso hacia el exterior. Suelen presentar en zonas aisladas, preferentemente sobre el inóculo o en sus inmediaciones, "almohadillas" de micelio aéreo blanco, algodonoso, de aspecto seco, cuyo conjunto semeja un esporodoquio estéril. La presencia de estas "almohadillas" esta asociada, invariablemente, a una muy escasa producción de fructificaciones y, en algunos casos, a la total esterilización del cultivo. Observadas microscópicamente,

están formadas por haces de hifas paralelas, de distinta longitud, raras veces ramificadas, y que terminan en ápices ondulados. El sustrato puede permanecer incoloro o tomar, al envejecer el cultivo, una coloración ocre.

2) Caracteres microscópicos

Tanto el micelio de Ascobolus como el de Saccobolus presenta fundamentalmente, 2 tipos de hifas:

a) Hifas radiales, gruesas, cuando jóvenes con contenido denso y refringente, muy vacuoladas al envejecer, de paredes gruesas, a veces con espesamientos notables a la altura de los septos transversales. Diámetro entre 6 - 20 µm para especies de Ascobolus, y 3 - 6 µm para especies de Saccobolus. Las células son típicamente multinucleadas en Ascobolus y con 2 a 5 núcleos en Saccobolus. En estos últimos, suelen con frecuencia, enroscarse entre sí, formando largos "cordones micelianos", a partir de los cuales se forman luego los ascogonios. A ambos lados de los septos transversales, se observan nítidamente de 2 a 10 "cuerpos de Woronin" (Buller, 1933:137).

b) Hifas finas, que aparecen como ramificaciones laterales de las hifas gruesas, y que constituyen la mayor parte del micelio sumergido, muy ramificadas, de recorrido tortuoso y regularmente septadas, con citoplasma denso, poco vacuoladas, con 3 a numerosos núcleos por célula en especies de Ascobolus (diám. 1,6-6,6 µm), y generalmente uninucleadas, especies de Saccobolus (diám. 0,5-1,5 µm).

C) SEXUALIDAD Y COMPATIBILIDAD

Las especies de Ascobolus y Saccobolus estudiadas en nuestro laboratorio, han sido particularmente útiles para ejemplificar el homotalismo y el heterotalismo en hongos.

Blakeslee (1904,a,b) empleó por primera vez los términos homotálico y heterotálico en hongos, haciéndolos corresponder a los de monoico y dioico en plantas superiores y concluye diciendo que el micelio de una especie homotálica es bisexual, mientras que el micelio de una heterotálica es unisexual. Whitehouse (1949) dice que se ha producido una confusión acerca del término heterotalismo, resultado de la aplicación del mismo a dos fenómenos distintos. Por un lado se lo ha empleado como equivalente de haplo-dioicismo al describir el compotamiento de Dyctyuchus monosporus Leitg (Couch, 1926), y por otro como equivalente de autoincompatibilidad en Ascobolus magnificus Dodge (Gwynne-Vaugham y Williamson,1932). Ambos hongos se parecen a Mucorales heterotálicas en que los gametangios se forman al ponerse en contacto las cepas compatibles, pero en Dyctyuchus monoporus anteridios y oogonios son producidos por distintas cepas, en A. magnificus cada cepa forma ambos, pero un ascogonio puede solamente ser fertilizado por un anteridio del micelio compatible.

Para distinguir entre estos dos fenómenos, hasta el momento incluídos bajo el término heterotalismo, varios autores, entre otros Gwynne-Vaugham (1928), Hansen y Snyder (1943), Dodge (1945), sugirie-

ron que el término dioico o haplo-dioico fuera aplicado a la condición en la cual hay una separación de los sexos en diferentes individuos y el término heterotálico restringido a las especies con autoincompatibilidad. Whitehouse (op. cit.) aclara que se han formulado numerosas objeciones a esta denominación y propone el uso de los términos heterotalismo morfológico y heterotalismo fisiológico, respectivamente. Define al heterotalismo (utilizando palabras de Blakeslee) como "la condición para la reproducción sexual, tal que la conjugación es posible únicamente a través de la interacción de dos talos diferentes". Al heterotalismo morfológico(haplo-dioicismo), como la reproducción sexual que ocurre solamente a través de la asociación de dos talos que difieren en sexo, es decir, en la morfología de sus gametas o gametangios y al heterotalismo fisiológico como la reproducción sexual que ocurre solamente a través de la asociación de dos talos que difieren fisiológicamente, pero que no muestran diferencias morfológicas en sus gametas o gametangios que permitan diferenciar los sexos.

De acuerdo con estas definiciones y considerando una especie homotálica como aquella capaz de cumplir su ciclo biológico a partir de una cepa monospórica, podremos agrupar las especies estudiadas en:

1) Homotálicas: Ascobolus crenulatus (= A. viridulus)
Saccobolus platensis
S. beckii
S. depauperatus

S. succineus

S. saccoboloides

S. citrinus

S. seudodepauperatus

Ascodesmis nigricans

Ascodesmis sphaerospora

2) Heterotálicas:

a) con heterotalismo fisiológico (hermafroditas, pero autoincompatibles).

Ascobolus bistisii

A. biguttulatus

A. immersus

A. furfuraceus

A. stercorarius

A. amoenus (= A. americanus)

A. albidus

Las cepas de estas especies utilizadas en los ensayos, fueron capaces de cruzarse reversiblemente, aunque en el caso de A. bistisii, una de ellas resultó marcadamente masculina y la otra marcadamente femenina.

b) con heterotalismo morfológico.

Ascobolus ferrugineus

En este caso no pudimos distinguir en las cepas monospóricas que crecían separadamente, las dos categorías morfológicas que podríamos designar como masculina y femenina, ya que los cultivos monospóricos que crecen separadamente, no forman ascogonios, y estos son inducidos en su formación por la presencia del micelio compatible. No obstante, pudimos comprobar una evidente unidereccionalidad en la transferencia de los núcleos previa a la singamia, según la cual, una de las cepas compatibles siempre actúa como receptora femenina y forma ascogonios, mientras que la otra actúa como donante masculina.

Características morfológicas de las estructuras sexuales

a) Estructura sexual femenina: ascogonios: Generalmente circinoides, formados por un número variable de células globosas, de las cuales, las tres centrales son las que alcanzan el mayor diámetro. Poseen una gruesa pared y su contenido se colora intensa y uniformemente con el cármín propiónico. Las células ascogoniales van disminuyendo de tamaño hacia los extremos del ascogonio, uno de los cuales es el pie, que se dirige hacia la base del apotecio. El ascogonio se enrosca sobre si mismo, formado por una sola espira (como en *Ascophanus carneus*, *Ascobolus biggutulatus*, *A. ferrugineus*), o varias (*Ascobolus amoenus*, *Ascobolus bistisii*, *A. viridulus* y *Saccobolus spp*). La última célula ascogonial, puede terminar en una prolongación filiforme, flexuosa, hialina, a veces bifurcada en el ápice,

que podría asimilarse a un tricogino (A. amoenus, A. biguttulatus), o bien pueden emerger un número variado de proyecciones laterales, que salen de varias células ascogoniales en diversas direcciones, también flexuosas y hialinas siempre una por célula, que actúan como tricoginos. En una de estas proyecciones al ponerse en contacto con un hifa del micelio compatible, ocurre la plasmogamia, mientras que las restantes detienen su crecimiento (A. ferrugineus). Generalmente, los ascogonios inician su desarrollo, con una ramificación lateral, multinucleada, a partir de una hifa gruesa del micelio vegetativo, de la cual se separa por un tabique basal. En A. crenulatus, sin embargo, los ascogonios son típicamente intercalares, enteriformes, enroscados sobre sí mismos formando varias espiras y muy retorcidos.

Las especies de Ascobolus estudiadas presentaron un único ascogonio por apotecio, mientras que en Saccobolus, el número fue variable, generalmente de 1 a 3 por fructificación.

Las hifas ascógenas en Ascobolus spp salen típicamente de una única célula ascogonial, central, que llamamos "célula ascógena", mientras que en Saccobolus spp, emergen de varias, ramificándose y extendiéndose en ambos casos, de variada manera al formar el subhimenio. Una mención especial merecen las estructuras sexuales encontradas en Ascodesmis. En este caso, la formación de la fructificación comienza con la proyección a partir de una hifa tortuosa del micelio

vegetativo, de una ramificación lateral, corta y grueso, multinucleada, perpendicular a la hifa madre, que se ramifica dicotónicamente repetidas veces. Después de bifurcarse y tomar aspecto de "T", se forma un tabique que la separa de la hifa soporte. En A. sphaerospora , cada primordio de fructificación se inicia generalmente a partir de una única rama lateral, mientras que en A. nigricans pueden ser una, dos ó más ramas laterales las que intervienen en su formación.

Las ramificaciones ulteriores de la "T" original se entrecruzan laxamente y finalmente se alargan; en ese momento se produce el enrollamiento de las ramas de la dicotomía final a modo de hélice. En este estado podremos hablar de gametangios, sin diferenciar ascogonios de anteridios, ya que ambos participan, luego de tabicarse y producirse la plasmogamia en la zona apical, de la formación de una hifa ascógena corta, a partir de la cual, y previa formación de un gancho se originarán los ascos. El número de bifurcaciones de la rama lateral inicial antes del comienzo del enrollamiento gametangial es variable, y de él depende la cantidad de "tirabuzones" presentes y el tamaño de la fructificación.

b) Estructura sexual masculina

Todo proceso sexual involucra apareamiento y fusión nuclear, seguido de una posterior reducción meiótica. En las especies estudiadas por nosotros, este proceso se lleva a cabo de variadas formas:

1) Especies homotálicas: Tanto en A. crenulatus como en Saccobolus spp no pudimos observar plasmogamia entre el ascogonio y otro elemento que actuara como donante de núcleos. En S. citrinus y S. seudodepauperatus se observa con frecuencia que el ascogonio se enrosca alrededor de otra hifa, bifurcada en el extremo, que podría ser el anteridio. Sin embargo, el hecho de que su presencia no sea universal y el no haber observado plasmogamia entre esta hifa y las células ascogoniales, parecería indicar que no es funcional. La presencia de hifas ascógenas y procesos en gancho que originan ascos, que al estado uninucleados tienen un típico núcleo 2n, que sufre luego reducción meiótica, demuestran claramente que estas especies no son apomícticas, sino, indudablemente, partenocárpicas.

2) Especies heterotálicas

Podemos separarlas en dos grupos:

i) especie que no forman oídios.

ii) especie que producen oídios, los que, además de funcionar como agentes de propagación vegetativa, actúan como elementos espermatizantes.

i) En este grupo se encuentran A. albidus, A. ferrugineus y A. amoenus. En los tres casos, la plasmogamia ocurre entre el ascogonio (a través de tricogino, o bien directamente con una célula ascogonial), y una hifa vegetativa sin mayor diferen-

ciación morfológica. La migración de núcleos a través de los puentes de conjugación determina el posterior apareamiento con los del ascogonio y la división conjugada de los mismos, que se disponen de a pares en la periferia de la célula ascógena, para luego migrar a la hifas ascógenas, que a modo de dedos de guante, se proyectan a partir de la superficie de la célula ascogonial.

ii) Se encuentran aquí Ascobolus bistisii, A. stercorarius, A. biguttulatus y Ascobolus furfuraceus. El proceso sexual fue estudiado por nosotros con mayor detalle en A. biguttulatus y A. bistisii, utilizando el método de la espermatización. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto la existencia de un mecanismo hormonal que rige la diferenciación ascogonial y la posterior plasmogamia con el oídio activado.

Tanto en A. biguttulatus como en A. bistisii la diferenciación de los ascogonios en el micelio base, es respuesta directa a la acción inductora del oídio compatible, acción que al no mediar el contacto directo debe ejercerse a través de sustancias que difunden en el medio. Sin embargo, en ambas especies, los cultivos monospóricos también son capaces de formar ascogonios e inclusive, llegan a la etapa de primordios abortivos con producción inclusive, de hifas ascógenas cuando el micelio envejece. Esto podría interpretarse como debido a que

la sustancia que activa al oídio y que hace que éste induzca la formación del ascogonio, se produzca normalmente en baja concentración si el micelio no está en presencia del oídio compatible, pero que se va ya acumulando en el medio hasta alcanzar la concentración adecuada y se desencadene el proceso, que de todas formas se detiene ante la imposibilidad de la cariogamia entre núcleos no compatibles.

En A. bistisii, del mismo modo que en las otras especies estudiadas los oídios pueden actuar como elementos de propagación vegetativa. Cuando se los coloca en un medio adecuado, germinan y producen micelio semejante al obtenido a partir de la germinación de ascosporas. Sin embargo, esta germinación no ocurre cuando están en presencia de su propio micelio o de micelio compatible, lo que confirmaría la existencia de alguna sustancia que inhibe su germinación y los condiciona para actuar como elementos fertilizantes.

Pudimos observar que ambas cepas compatibles pueden cruzarse actuando cualesquiera de ellas como base, pero una produce mayor cantidad de oídios y menor cantidad de ascogonios que la otra. Este resultado, que es coincidente con los obtenidos por Bistis y Raper (1963) y Bistis y Olive (1968) en A. stercorarius también fue obtenido por Padden y Linton (1976) en A. saccharifer us. La cepa más fuertemente femenina tiene crecimiento

rastrero, abierto, muy poco micelio aéreo y, en consecuencia muy baja producción de oídios. La cepa más fuertemente masculina en cambio, a partir del 3er. día de crecimiento, produce abundante micelio aéreo y gran cantidad de oídios, de tal forma que ambas cepas pueden ser distinguidas visualmente sobre el medio de cultivo.

D) DESARROLLO DEL APOTECIO

El género Ascobolus fue creado por Persoon en 1791 y en él se agrupó a cierto de 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 Ascobolae ubicó los géneros Ascobolus y Saccobolus, caracterizando a éste último por la presencia de ascosporas agrupadas en paquetes octosporados en la madurez, mientras que quedaban incluídas dentro del género Ascobolus aquellas especies con esporas coloradas y separadas entre sí dentro del asco.

Coemans (1862) fue el primer autor que dió una descripción del desarrollo de la fructificación en una especie de Ascobolus. Poco después Janczewski (1871) estudió desde éste punto de vista a Ascobolus stercorarius. Sin embargo, no son muchas las especies de Ascobolá ceas en las que se habían estudiado en detalle el desarrollo del cuerpo fructífero hasta el momento de comenzar nuestra investigación.

Los tipos de desarrollo en Pezizales, en general, están principalmente caracterizados por la fase en que el himenio queda expuesto. En términos generales, podemos distinguir dos condiciones extremas:

a) cuando el himenio de la fructificación desarrolla superficialmente desde el comienzo, en cuyo caso se lo denomina GIEMNOCAPICO (Corner, 1929b Snell y Dick, 1957).

b) Cuando el himenio inicia su diferenciación en un espacio cerrado y queda expuesto en algún momento, durante su desarrollo posterior. En éste caso se habla de un desarrollo ANGIOCARPICO.

La fase en la cual el himenio queda expuesto en un desarrollo angiocárpico difiere de acuerdo con las definiciones de varios autores (Corner, 1929b, Jackson, 1949, Snell y Dick, 1957, Ainsworth, 1961), por lo que, introdujimos el término HEMIANGIOCARPICO, tal como lo definió Singer (1949) para indicar el tipo de desarrollo en el cual el himenio, que al comienzo está encerrado, queda expuesto antes de la maduración de las esporas.

De acuerdo con nuestras observaciones, durante el desarrollo del apotecio en Ascoboláceas, pueden distinguirse cuatro "Estados" o "Períodos", a saber:

1) Período inicial
2) Período de diferenciación
3) Período de crecimiento

4) Período de maduración

El crecimiento del apotecio, que se traduce en un aumento de su volumen, se manifiesta a través de cada uno de los períodos. La denominación del tercer período como de "crecimiento" tiene como finalidad la de puntualizar que en ese momento el crecimiento es el fenómeno fundamental y la diferenciación ya se ha completado.

Después del proceso sexual, que puede ser partenogenético (en especies homotálicas) o bien mediante copulación entre cepas sexualmente compatibles (en especies heterotálicas), nos encontramos en el Período inicial del desarrollo, durante el cual, los "protoapotecios", (término utilizado para describir a los apotecios incipientes, no totalmente diferenciados), tienen en general forma esférica a ovoide, pueden superficiales o parcialmente sumergidos en el substrato y estar sostenido por hifas vegetativas gruesas. Se encuetran constituídos por uno o varios ascogonios, que generalmente ocupan las zona central basal, rodeados total o parcialmente por hifas envolventes que se originan a partir de hifas adyacentes, que crecen centrípetamente. En A. biguttulatus, una vez producida la fecundación del ascogonio, las células infértiles del mismo pueden también emitir proyecciones que actuarán como hifas envolventes.

En especies de Ascobolus, las hifas envolventes se distribuyen concéntricamente formando un "tejido" pseudo-parenquimatoso, mientras que en Saccobolus spp, si bien al principio crecen centrípetamen

te hacia el ascogonio, después lo hacen verticalmente hacia arriba, mientras el protoapotecio aumenta de tamaño.

El Período de diferenciación, que en la mayoría de los casos se superpone con el de crecimiento, se caracteriza por la diferenciación de las paráfisis, seguida por la diferenciación de los ascos, ascosporas y los tejidos excipulares. Las hifas envolventes, por crecimiento y diferenciación posterior formarán las distintas capas de la porción excipular de la fructificación, manteniendo la condición prosenquimatosa en la porción central, constituyendo la médula, pero dispuesta concéntricamente en la zona cortical, apareciendo en corte como seudoparenquimatosa A. stercorarius y A. biguttulatus presentan las capas más internas de la corteza constituídas por células compactadas, mientras que las externas están dispuestas laxamente y forman montículos que le dan el aspecto furfuráceo característico al apotecio.

En Saccobolus spp, las hifas envolventes siguen creciendo apicalmente, mientras que en la base del protoapotecio se entrelazan apretadamente, adquiriendo "textura globulosa" (según la terminología utilizada por Starbäck (1895:II) y enmendada por Korf (1951:137; 1958:13) y constituyendo el excípulo pobremente desarrollado.

Las hifas envolventes son también el punto de origen de las paráfisis, que emergen a partir de células basales, globosas, multinucleadas, con citoplasma denso y pared relativamente gruesa. Crecen hacia arriba como hifas lineales, paralelas entre sí.

En todas las especies de Ascobolus estudiadas por nosotros a continuación de la diferenciación de las paráfisis y el excípulo, aparece una depresión lacunar en el polo superior del protoapotecio, inmediatamente por encima del extremo aplical de las paráfisis, las que probablemente sean responsables de las secreción de alguna sustancia que provoca la lisis del "tejido " que las rodea, permitiendo así su crecimiento posterior. El himenio, formado por las paráfisis jóvenes, se encuentra protegido por un "techo" de dos a tres capas de células, más o menos estratificada. En éste estado el ascogonio es aún bien conspícuo en la zona central basal del protoapotecio, pero algunas de sus células, por lo menos, se encuentran en colapso. En todos los casos, a partir de una de sus células centrales, la que llamamos "célula ascógena" emergen, a modo de dedos de guante, abundantes hifas que se ramifican profusamente, con contenido que se colora intensamente con azul láctico, y que son las hifas ascógenas. En éste estado, progresivamente, la zona apical del protoapotecio se deprime y sus células corticales presentan una gruesa pared, intensamente colarada con azul láctico. Las hifas ascógenas que constituyen el subhimenio, comienzan a formar ascos que aparecen entre las paráfisis, en la base del himenio. A medida que el protoapotecio aumenta de diámetro, el excípulo adquiere estructura seudoparenquimatosa y en la parte medular se hace lacunoso en el lugar que ocupara el ascogonio, ahora totalmente colapsado.

Llegados a éste estado de desarrollo, podemos dividir a las

especies de Ascobolus estudiadas, en dos grupos:

a) A. stercorarius, A. furfuraceus, A. crenulatus y A. biguttulatus, en los que, el abundante crecimiento intercalar del himenio, debido al aumento del número de paráfisis y de ascos jóvenes, determina la ruptura del "techo", cuando los ascos aún no han diferenciado sus ascosporas. En estos casos, una vez expuesto el himenio, se produce la diferenciación de las ascosporas y el crecimiento pasa a ser el fenómeno principal, originando un cambio de forma en el apotecio joven, que se hace cupuliforme a turbinado. El período de maduración, que comienza alrededor del 8º - 9º día en A. stercorarius y A. crenulatus y en el 12º en A. biguttulatus, se hace evidente por el cambio de color del himenio que vira del amarillo verdoso (dado principalmente por el pigmento contenido en los ápices de las paráfisis), al castaño, debido a la maduración de las ascosporas, que comienza con el cambio de color del episporio, que al principio es hialino, luego purpúreo y finalmente castaño. El aspecto del himenio es papiloso y hay gran cantidad de ascos madururos simultáneamente. Su maduración se produce periódicamente y progresa centrífugamente, pudiendo observarse emisión de ascosporas dos veces por día, durante los 2-3 días consecutivos a la primera expulsión. Denominamos a este tipo de desarrollo: HEMIANGIOCARPICO.

b) Ascobolus amoenus, A, bistisii, A. albidus y A. ferrugineus, en los que el himenio, compuesto por paráfisis bien diferenciadas y algunos

ascos con las ocho ascosporas diferenciadas que han comenzado el cambio de coloración de su pared, todavía se halla recubierto por el "techo". En este caso, la presión simultánea de las paráfisis y del abundante mucílago himenial que se produce, determina la ruptura del techo, emergiendo con ellos, 1 ó 2 ascos con ascosporas maduras (A. amoenus), ó a punto de madurar (A. bistisii, A. albidus, A. ferrigineus). Alcanzando el período de maduración, A. amoenus, A. ferrugineus y A. albidus presentan numerosos ascos maduros simultáneamente, mientras que en A. bistisii sólo 1 o dos ascos maduran simultáneamente, manteniendo los apotecios, hasta el final, su forma sub-globosa.

En Saccobolus spp, luego de la diferenciación de las paráfisis, las hifas envolventes no encierran completamente el ascogonio. El período de diferenciación se superpone en todos los casos con el de crecimiento. Las hifas ascógenas nacen de 2 ó más células ascogoniales, que se coloran intensamente con el carmín propiónico o el azul láctico. Crecen hacia arriba y hacia afuera formando ramilletes y a corta distancia de su origen, forman ganchos ascógenos, aislados o en cimas. De ellos se forman ascos del tipo pleurorrinco (según la terminología de Chadefaud, 1943:77). Los ascos jóvenes, uninucleados, son totalmente carminófilos, pero a medida que el núcleo se divide, la zona carminófila se restringe, limitándose a la parte central y al ápice, donde aparece en forma de casquete.

Al aumentar de tamaño, los apotecios se aplanan progresivamente, llegando a ser pulvinados . Las ascosporas diferenciadas son uninucleadas, con núcleo central, intensamente carminófilo, mientras que el citoplasma es granuloso. El excípulo se desarrolla sólo basalmente y no puede hablarse de un margen distinto, ya que son las paráfisis exteriores las que delimitan marginalmente al apotecio joven. El crecimiento intercalar de los ascos es tan profuso, que el himenio se expande y en consecuencia, en la mayoría de los casos, el apotecio va adquiriendo forma hemisférica, Las ascosporas, que al principio están separadas e irregularmente dispuestas en el asco, van tomando un color violado claro y al mismo tiempo se van apretando hasta formar un paquete con la disposición típica en cada especie. Al madurar, los ascos se achatan en el ápice, donde la pared se engrosa notablemente y se afinan en el pie. El opérculo es central. Las ascosporas son arrojadas en paquetes octosporados, y están cementados por un mucílago común, homogéneamente repartido alrededor del paquete o bien más abundante en los polos, adelgazándose en la porción central.

Este tipo de desarrollo, debe ser considerado, sin lugar a dudas GIMNOCARPICO.

En Ascophanus carneus, si bien las hifas envolventes presentan en sección en el período inicial, un aspecto seudoparenquimatoso, con un esbozo de estratificación en la zona adyacente al ascogonio, las paráfisis que se originan de ellas y que crecen apicalmente de sur a nor

te, tienen su extremo libre al aire. Como el himenio está expuesto desde el principio, el desarrollo del apotecio es del tipo gimnocápico.

En su monografía mundial sobre los géneros Ascobolus y Saccobolus, van Brummelen (1967), introduce nuevos términos que se refieren al desarrollo del "ascoma" (=ascocarpio), denominación más general que la de apotecio, que nosotros usamos comunmente. Dicho autor distingue:

1) Fase arquimenial: que sigue inmediatamente al proceso sexual, y antes de que se hayan formado los elementos iniciales del himenio, que generalmente son las paráfisis.

2) Fase prohimenial: las paráfisis están presentes, pero aún no hay ganchos. En ciertos casos, cuando las paráfisis se forman tardíamente, esta fase puede ser muy corta u omitirse.

3) Fase mesohimenial: el himenio se va desarrollando, pero aún los ascos no están maduros. Esta fase es relativamente larga, y puede ser dividida en:

   a) fase mesohimenial temprana caracterizada por la formación de ganchos.

   b) fase mesohimenial media, en la cual los ganchos proliferan, las divisiones nucleares tienen lugar en ascos y las ascosporas ya están diferenciadas en los ascos más avanzados.

   c) fase mesohimenial tardía, en la cual, los ascos

más avanzados tienen ascosporas en maduración. Como el crecimiento y desarrollo de los ascos en el himenio es simpodial y en dirección centrífuga, su maduración nunca es simultánea, por lo que la fase del desarrollo se distingue por el estado de los ascos más avanzados.

4) Fase telohimenial, con ascos maduros presentes. Normalmente las ascosporas son expulsadas en esta fase.

5) Fase posthimenial, cuando en el himenio que ha madurado cesa la liberación de ascosporas y sobreviene su descomposición.

De estas cinco fases, cuatro son equivalentes a nuestros"períodos". La equivalencia de nomenclatura puede esquematizarse en el siguiente cuadro:

van Brummelen (1967)	Fase arquimenial	Fase prohimenial	Fase mesohimenial	Fase telohimenial	Fase posthimenial
Gamundí y Ranalli (1963)	Período inicial	Período de diferenciación Período de crecimiento		Período de maduración	sin equivalente

van Brummelen acota que la fase prohimenial es muy corta y pue

de omitirse. En cuanto a nuestra nomenclatura, hemos visto que en la mayoría de los casos el período de crecimiento se superpone con el de diferenciación.

En cuanto a los tipos de desarrollo del ascocarpio el citado autor distingue fundamentalmente dos:

a) cleistohimenial, donde el himenio está encerrado, al menos durante su temprano desarrollo, diferenciando sub-tipos según permanezcan permanentemente cerrados, o se abran en la fase telo, meso o prohimenial.

b) Gimnohimenial, donde el himenio está expuesto desde el principio hasta la maduración de los ascos, en el cual distingue:

1) paragimnohimenial, donde el ascogonio está recubierto por hifas de crecimiento limitado, no formando una vaina cerrada durante el desarrollo futuro.

2) eugimnohimenial, donde el ascogonio no está recubierto por hifas distinguiendo, a su vez, dos subtipos: uno, en el cual se forma excípulo, y otro en el cual no se forma.

Estos tipos están esquematizados en su obra (pl. 17) y son más precisos que los de angiocárpico, hemiangiocárpico y gimnocárpico, clásicamente usados y que nosotros empleamos en los primeros trabajos, por lo que fueron adoptados en los trabajos posteriores. En forma de cuadro podemos ubicar en su esquema, estableciendo las equivalencias correspondientes, las Ascoboláceas cuyo desarrollo estudiáramos hasta el presente:

	CLEISTOHIMENIAL					GIMNOHIMENIAL		
	cerrado	abierto en fase telo-himenial	abierto en fase mesohimenial			paragimno-himenial	eugimnohimenial	
			temprana	media	tardía		con excípulo	sin excípulo
van Brummelen (1967)		*A. americanus* (=*A. amoenus*)	*A. viridulus* (= *A. crenulatus*) *A. stercorarius* *A. furfuraceus*	*A. biguttulatus* *A. ferrugineus* *A. albidus*	*A. bistisii* *A. albidus* *A. ferrugineus*	*Ascophanus carneus* *Saccobolus platensis* *S. beckii* *S. depauperatus* *S. succineus* *S. saccoboloides* *S. citrinus* *S. seudodepauperatus*		*Ascodesmis nigricans* *A. sphaerospora*
Gamundí y Ranalli (1963)	Angiocárpico		Hemiangiocárpico			Gimnocárpico		

El género Ascodesmis fue creado por van Tieghem (1876) con A. nigricans como especie tipo. Su ubicación taxonómica y sus relaciones filogenéticas han sido y son contravertidas. La simplicidad en las estructuras de la fructificación ha hecho que en diversas oportunidades se lo relaciona con Gymnoascaceae. Huang (1975) y von Arx (1971) consideran a Eleutherascus (ubicado por algunos autores dentro de Gymnoascaceae), como un Discomycete primitivo o degenerado, relacionado con Ascodesmis por la similitud con sus gametangios, la forma y ornamentación de las ascosporas y lo reducido de la fructificación. Sin embargo, como lo destacan Jeng y Cain (1976), la presencia de ascos operculados, la compleja estructura inicial de la fructificación y su habitat coprófilo, excluyen a Ascodesmis de las Gymnoascaceas. Coinciden con las apreciaciones de Obrist (1961) y con Le Gal (1949) en que Ascodesmis representa un nivel altamente evolucionado más que una forma primitiva de los Discomycetes operculados.

van Brummelen (op. cit.) divide a la familia Ascobolaceae en tres subfamilias: Ascoboloideae, Ascodesmidoideae y Theleboloideae, las cuales pueden separarse sobre la base de la presencia de médula y excípulo en el cuerpo fructífero, el color y la formación del pigmento presente en el episporio y la forma del ascogonio. Ubica a Ascodesmis dentro de la subfamilia Ascodesmidoideae, caracterizada por la ausencia de médula y excípulo, con episporio marrón a marrón rojizo en forma de retículo elevado, o bien como crestas, espinas o verrugas.

Eckblad (1968) reconoce sólo dos subfamilias: Ascoboloideae y Ascodesmidoideae y reune en ésta última a los géneros Ascodesmis, Boudiera y Svrcekia, considerándolas fromas aberrantes derivadas de Ascobolus. Kimbrough (1970) acepta esta clasificación, mientras que Korf (1972, 1973) conserva la ubicación de Ascodesmis en la subfamilia Ascodesmidoideae pero dentro de la familia Pyronemataceae, con caracteres poco definidos, junto con otros género quizás relacionados con él.

Al estudiar A. nigricans y A. sphaerospora encontramos características sexuales particulares que distinguen a Ascodesmis de Ascobolus y Saccobolus. Sin embargo, dado que la sexualidad como criterio taxonómico ha tenido escaso éxito, ya que como dice Gaümann(1928) dentro de una misma familia podemos encontrar una gran variedad de tipos de sexualidad, nos inclinamos por mantener a Ascodesmis como un género de la subfamilia Ascodesmioideae, dentro de las Ascoboláceas.

Tanto en A. nigricans como en A. sphaerospora, una vez diferenciados y enrollados los gametangios, se diferencian las paráfisis, como consecuencia de la proliferacion de las células basales de las bifurcaciones, que crecen hacia arriba entre y rodeando los pares de gametangios. Al mismo tiempo que se forman las paráfisis, los gametangios que son multinucleados se tabican en la zona apical, quedando delimitada en cada uno de ellos una célula uninucleada terminal. La plasmogamia ocurre entre esas dos células uninucleadas, dando lugar a la formación de una célula dicariótica, que por crecimiento pos

terior se transforma en una hifa ascógena corta. Esta hifa ascógena, posteriormente, por el típico proceso en gancho, dará origen a los ascos que se producen en cimas, ya que la célula terminal y la basal de un gancho típico se fusionan y forman ganchos sucesivos. Las ramificaciones de las ramas laterales a partir de las cuales se inician las fructificaciones, dejan una maraña de células relativamente cortas, multinucleadas, que quedan en la parte basal del apotecio joven, a modo de un muy laxo "tejido excipular", que evidentemente no se puede considerar un verdadero excípulo, pero que constituye la porción basal estéril del apotecio maduro. Es decir, aquí no hay crecimiento envolvente o no de hifas estériles que acompañan al o los gametangio, sino que las mismas iniciales dan origen por un lado, y después de sucesivas ramificaciones, a los gametangios en los que ocurrirá la plasmogamia, y por otro lado, a la porción estéril del apotecio (paráfisis y células basales). No hay margen definido en la fructificación, sólo las paráfisis que proliferan abundantemente delimitan el apotecio. Podemos considerar, en consecuencia, a Ascodesmis spp., como de desarrollo tipicamente EUGIMNOHIMENIAL, sin formación de un verdadero excípulo.

E) CRECIMIENTO Y FRUCTIFICACION EN DIFERENTES MEDIOS VARIANDO LAS CONDICIONES DE ILUMINACION Y TEMPERATURA.

Los ensayos realizados, si bien en todos los casos tuvieron co

mo objetivo comparar el creci miento y la producción de fructificaciones en distintos medios y observar la influencia de la luz y la temperatura sobre la formación y maduración de ascosporas no siempre fueron uniformes. Los medios utilizados, así como las condiciones de temperatura e iluminación no fueron siempre las mismas, de modo que no podemos ordenar los resultados en un único cuadro general, pero sí podemos extraer conclusiones que son, en líneas generales, universales.

Medios de cultivo: de todos los medios utilizados, el estiércol de vaca tindalizado resultó, sin lugar a dudas, el mejor. En él, las fructificaciones en todos los casos fueron normales, con excepción de *A. albidus*, el que, en condiciones de oscuridad completa, aún en este medio, formó cleistotecios. En medio nutritivo "standard" obtuvimos también, muy buena fructificación y maduración en la mayoría de los casos.

Temperatura: temperaturas superiores a 23ºC afectaron desfavorablemente la formación y maduración normal de las fructificaciones. La temperatura óptima resultó entre 22º y 23ºC, tanto para el crecimiento vegetativo, como para la esporulación.

Luz: La luz actuó, en la mayoría de los casos, acortando el ciclo de vida. En *S. citrinus* un exceso de luz provocó la esterilidad total de las cepas, o bien la anormalidad de las fructificaciones. La ausencia completa de luz impidió la maduración de los apotecios en *S. beckii* en medio "standard" y Caseína, y en E directamente no se formaron. En

A. biguttulatus y A. ferrugineus en oscuridad completa no se formaron fructificaciones en todos los medio utilizados.

S. depauperatus y S. citrinus mostraron un comportamiento similar cuando fueron cultivados en medio C en condiciones de oscuridad completa: no fructificaron, o bien las esporas de S. depauperatus no maduraron a pesar de formar las fructificaciones. Este resultado es interesante, sobre todo si tenemos en cuenta que el medio C es similar al medio "standard" del que difiere por el agregado de caseína hidrolizada, sales y glucosa. ¿ Cuál es la causa, entonces, de que en ausencia de luz no se forman las fructificaciones en este medio y en medio "standard" sí? Podríamos aventurar dos posibilidades: a) la formación por parte del micelio que crece en medio C, de una o más sustancias fotolábiles que inhiben el desarrollo de las fructificaciones; b) que la luz sea indispensable para que S. citrinus y S. depauperatus, creciendo en medio C pueden completar las reacciones necesarias para la síntesis de sustancias específicas, sin las cuales, las fructificaciones o no se producen, o no maduran.

Mercuri y Forchiassin (1978) en un trabajo posterior, cultivando S. citrinus en medio "standard", concluyen que en éste la producción de apotecios no es un proceso fotodependiente, sino fotocondicionado, y el "condicionamiento" de la producción de apotecios por la luz se verifica en dos aspectos:

1) una primera etapa de diferenciación en la cual la luz ejerce un con-

trol negativo (banda del azul).

2) Una segunda etapa - de maduración - que está condicionada por la luz. Este condicionamiento de la luz se traduce en tres efectos morfogenéticos:

a) maduración: el número de apotecios maduros se corresponde con la longitud del período de luz que sigue a la etapa de oscuridad inicial. En oscuridad se diferencian apotecios que no maduran.

b) Pigmentación: los apotecios de los tratamientos con períodos de luz más largos, luego de la oscuridad, se presentan más pigmentados.

c) Tamaño: los apotecios madurados en períodos de oscuridad largos son de menor tamaño (1:2) que aquellos en luz contínua.

El comportamiento de A. albidus con respecto a la luz fue por demás interesante. Los cultivos mantenidos en oscuridad completa produjeron fructificaciones en todos los medios ensayados, pero con la particularidad de que respondieron a un tipo de desarrollo cleistohimenial, totalmente sumergidos en el medio de cultivo, con ascos que no quedaron expuestos al aire en ningún momento y que, al completar la maduración, se hicieron delicuescentes. Las ascosporas producida en estos "cleistotecios" fueron completamente hialinas, sin episporio, pero 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. Este hecho y el carácter delicuescente en los ascos son las causas por las cuales las fructificaciones no se abren. De modo que, podemos concluir en este caso, que la luz actúa fundamentalmente por lo menos en dos aspectos:

1) En la síntesis y deposición del pigmento que constituye el episporio, ya que su ausencia completa bloquea el proceso.

2) En la diferenciación de paráfisis y ascos (éstos se forman, pero son delicuescentes).

Otro fenómeno en el cual tiene influencia la luz, es la pigmentación de las fructificaciones, que está dada, principalmente, por la acumulación de pigmento en las células epicales de las paráfisis y, en menor grado, por la deposición intercelular en el excípulo cortical. En todos los casos, las fructificaciones a la luz fueron notablemente más coloradas que las de oscuridad. Unicamente en S. seudodepauperatus la presencia y cantidad de pigmento en las fructificaciones no está influenciada por la intensidad y cantidad de luz recibida, pero sí varía según el medio sobre el cual están desarrollando. Apotecios cultivados en medio Y producen abundante pigmento amorfo que colora el mucílago que envuelve a las paráfisis, y en menor cantidad, se encuentra también, entre las células del excípulo. En E, PF y C son prácticamente incoloras.

F) CITOLOGIA

Con anterioridad a nuestra investigación, varias especies de Ascobolus fueron estudiadas citológicamente. La existencia de una doble fusión nuclear en Ascobolus y otros géneros relacionados, fue discutida durante mucho tiempo. Autores como Welsford (1907), Fraser (1909), Fraser y Brooks (1909) y Gwynne -Vaughan y Williamson (1932), sostienen que la primera fusión nuclear ocurre en el ascogonio de las especies de Ascobolus estudiadas por ellos. Porsupuesto, que también aceptan que una segunda cariogamia ocurre en el asco, de modo que además de la primera división meiótica que ocurre en el asco, la segunda o tercera división debería ser también reduccional.

Otros investigadores, tales como Dangeard (1907), Moreau (1930), niegan terminantemente la existencia de la fusión nuclear en el ascogonio, habiendo observado en algunos casos, apareamiento nuclear, pero sin fusión.

Trabajos posteriores, tales como los de Olive (1949 b, 1950); Hirsch (1950), Wood (1953 a,b); Bistis (1956 b) y Zuk y Swietlinska (1965) sostienen esta última posibilidad, que también ha sido comprobada por nosotros.

La secuencia de los hechos observados durante el desarrollo del asco hasta la formación y maduración de las ascosporas en las especies estudiadas por nosotros, es similar a la descripta para otros Ascomycetes por varios autores (Wood, op. cit., Singleton, 1953, Carr

y Olive, 1958, Rogers, 1964, 1965, 1967; Beckett y Wilson, 1968; Zuk y Swietlinska, op. cit., Lu, 1967; Ranga Rao y Mukerji, 1970, 1971). La cariogamia ocurre en la penúltima célula del gancho, que a continuación comienza a crecer, pasando el núcleo diploide a través de 3 divisiones sucesivas, las dos primeras corresponden a meiósis y la tercera es una mitósis. De acuerdo con Singleton, (op. cit.), las llamamos Div. I; II y III respectivamente.

La formación de los ascos comienza con la proyección a partir del ascogonio de las hifas ascógenas. En Saccobolus spp, una o genelmente dos ó más células ascogoniales típicamente multinucleadas son capaces de producir hifas ascógenas, que se proyectan en todas direcciones. En Ascobolus spp, como ya lo destacamos, una vez producida la plasmogamia con el oídio o la hifa compatible fecundante, los núcleos de éstos migran hacia el ascogonio, ubicándose en una única célula ascogonial que formará las hifas ascógenas. Al continuar el proceso, los núcleos contenidos en la célula ascógena se dividen y aumentan de tamaño. Puede distinguirse en ellos el núcleolo prominente y la red cromosómica es menos compacta. La célula ascógena se agranda notaolemente en relación con las demás células ascogoniales, que no intervendrán en la formación de hifas ascógenas. El contenido se pone turgente y los núcleos, apareados, se disponen en la superficie celular. Poco después comienzan a emerger, a manera de dedos de guante y en todas direcciones, las hifas ascógenas, a las que migran pares de núcleos. En Sacco-

bolus spp, las hifas ascógenas que emergen de varias células ascogoniales, también reciben en este estado, pares de núcleos.

El crecimiento y ramificación posterior de las hifas ascógenas determina la rápida proliferación de los ascos, que en distintos estados de desarrollo se diferencian, invariablemente, a partir de la célula central de un gancho típico. En A. biguttulatus, las hifas ascógenas crecen y se ramifican de dos maneras: 1) proyectando ramas laterales a las cuales migran pares de núcleos que se dividen conjugadamente. Este mecanismo también pudo observarse en S. citrinus, S. seudodepauperatus y A. ferrugineus. 2) formando ganchos sucesivos linealmente. Es decir, la hifa ascógena se curva en el ápice, los dos núcleos se dividen conjugadamente y dos tabiques separan tres células, la central binucleada, la basal y la apical uninucleada. La célula central, en lugar de dar un asco, se alarga y vuelve a repetir en el ápice el mismo proceso, un número variado de veces. Al mismo tiempo, puede producirse plasmogamia entre la célula basal y la apical y a partir de allí formarse un nuevo gancho. De esta forma, el sistema ascógeno puede proyectarse rápidamente hacia arriba y los costados, formando una intrincada red subhimenial.

La sinapsis entre los cromosomas homólogos ocurre precozmente en la célula madre del asco y los nucleólos de los núcleos en cariogamia se fusionan rápidamente. Este comportamiento es coincidente con lo encontrado en otros Ascomycetes (Carr y Olive, 1958; Singleton,

1958, Rogers, 1965) y parece confirmar que la sinapsis precoz es un hecho característico asociado al ciclo nuclear en Ascomycetes. El estado encontrado más abundantemente corresponde a paquitene; los cromosomas se tiñen muy bien y pueden observarse los homólogos apareados, aunque es difícil individualizarlos completamente. Durante este estadío los cromosomas alcanzan su máxima elongación. El nucléolo comienza a reducir su tamaño a partir del diplotene difuso, estadío en que los cromosomas no se tiñen muy bien. El núcleo toma un aspecto característico, pudiendo observarse zonas heterocromáticas intensamente teñidas y otras que evidentemente no toman el colorante. Este aspecto es similar a lo observado por otros autores. En interfase ya no se observa el viejo nucléolo, mientras que cada núcleo haploide ha organizado el suyo.

El eje de la primera división es paralelo al eje longitudinal del asco o ligeramente oblicuo en A. biguttulatus y A. ferrugineus, mientras que en S. citrinus y S. seudodepauperatus es transversal, de modo que los núcleos haploides en el asco binucleado se encuentran uno al lado del otro, generalmente a la misma altura, a diferencia de lo que ocurre en la mayor parte de los Ascomycetes estudiados. Además, tanto durante la II como la III división, los núcleos de un asco pueden o no dividirse sincrónicamente. Lo más frecuente es que la división sea asincrónia, hecho que parece ser también característico de las divisiones nucleares en Ascomycetes.

Placas centriolares y huso acromático fueron claramente dis-

tinguibles en la primera división nuclear en A. biguttulatus, no así en la II y III div. En S. seudodepauperatus, en cambio, sólo fueron observadas en la tercera división coincidiendo, en parte, con lo observado por Singleton (op. cit.) en Neurospora crassa, donde las placas centriolares son más evidentes y visibles durante la III división, aunque también se encuentran en las otras divisiones. Beckett y Wilson(1968) y Lu (1967), por el contrario, pueden seguir su comportamiento a través de las tres divisiones con la misma claridad.

Diversos autores han tratado de relacionar la placa centriolar, al huso y el aparato astral, con la delimitación de las ascosporas dentro del asco. Rogers (1965), y Zuk y Swietlinska (op. cit.) piensan que dichas estructuras son fundamentales en la delimitación de las ascosporas, mientras que Hayman (1964) sostiene que tanto el mecanismo centriolar como un simple clivaje pueden ser los responsables, dependiendo de la especie en cuestión. El observó pequeñas vacuolas a lo largo de la línea demarcatoria de las ascosporas jóvenes en Rosellinia limoniispora. En nuestras observaciones, también con frecuencia hemos encontrado pequeñas vacuolas delimitando las paredes de las ascosporas, una vez completada la tercera división nuclear, mientras que el aparato centriolar no pudo ser observado en detalle, por lo que no podemos descartar la posibilidad de que intervenga en dicho proceso.

En Ascodesmis, una vez producida la plasmogamia entre las

dos células terminales uninucleadas de ambos gametangios, la célula dicariótica resultante se alarga y se transforma en un hifa ascógena corta. Los núcleos apareados se dividen conjugadamente y se forman dos tabiques que separan las tres células de un típico gancho. La célula basal y la apical se fusionan y originan un nuevo gancho y así repetidas veces, lo que permite la rápida proliferación de los ascos, que se observan en ramilletes o cimas, en diferentes estados de maduración. En algunos casos, sin embargo, la célula resultante de la plasmogamia inicial, origina directamente un asco. Al progresar la división nuclear, es posible distinguir las placas centriolares en una posición transversal-oblicua al eje principal del asco siendo, en consecuencia, transversal el eje de la primera división. Los hechos observados hasta completar la formación de las ocho ascosporas, son similares a los anteriormente descriptos para Ascobolus y Saccobolus.

Dentro de la familia Ascobolaceae se ha determinado el número cromosómico de varias especies de Ascobolus y Saccobolus, lo que se detalla en el cuadro siguiente:

Especie	publicado por	nº cromosómico
Ascobolus immersus	Zuk y Zwietlinska (1965)	8 - 9 cromosomas (n=8 - 9)
Ascobolus magnificus	Wood (1953)	alrededor de 8 cromosomas (n = 8)
A. immersus	Zickler (1967)	12 cromosomas (n = 12)
S. citrinus	Ranalli y Forchiassin (1976)	8 cromosomas (n = 8)
A. ferrugineus	Ranalli y Forchiassin (1978)	8 cromosomas (n = 8)
S. seudodepauperatus	Ranalli y Gamundí (1975)	8 - 9 cromosomas (n= 8 ó 9)
A. biguttulatus	Ranalli y Gamundí (1975)	10 cromosomas (n= 10)
A. nigricans y A. sphaerospora	Ranalli, Forchiassin y Mercuri (en prensa)	5 cromosomas (n= 5)

D I S C U S I O N

Si bien en el pasado se sobrevaloró la importancia del tipo de desarrollo de la fructificación como criterio taxonómico sigue siendo, según nuestro criterio, una importante herramienta taxonómica dentro de las Ascoboláceas, y permite establecer, por lo menos dentro del género Ascobolus una agrupación natural de las especies.

Los diferentes medios de cultivo, las condiciones de iluminación y temperatura acortan o alargan el período de maduración, el tamaño y número de los apotecios, intensifican o diluyen la pigmentación de las fructificaciones, pero no modifican las características microscópicas de ascos, ascosporas, paráfisis y excípulo, ni tampoco el tipo de desarrollo, los que se mantienen constantes y, por lo tanto, pueden considerarse caracteres genotípicos de importancia para la determinación de las especies.

Ascobolus albidus constituye a este respecto, una excepción, y no estaría comprendido en la generalización antedicha. Los cultivos presentaron tres características, que por ser excepcionales, atrajeron poderosamente nuestra atención. Ellas son:

1) Producción en cultivo de 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 res

ponden a la descripción original de la especie pero tienen un desarrollo típicamente cleistohimenial, abriéndose en la fase telohimenial, mientras que los apotecios de tipo II, tienen un diámetro mayor, ascos y ascosporas más pequeñas y un tipo de desarrollo cleistohimenial, abriéndose en la fase mesohimenial media. Ambos tipos de apotecios coexisten en la misma caja, entremezclados, o bien pueden presentarse de un sólo tipo en unas cajas y del otro tipo en otras, lo que es notable teniendo en cuenta que: a) las cepas son las mismaspara todas las cajas; b) las observaciones se hicieron en cultivos de la misma edad y c) todas las cajas se mantuvieron en cámara de cultivo, bajo las mismas condiciones estrictas.

2) Otra característica fue la producción de apotecios de tipo II, con ascosporas hialinas, sin formación de episporio, las que germinaron espontáneamente sobre agar-agua al cabo de 48 horas. Cultivos obtenidos a partir de ellas, dieron fructificaciones semejantes a las obtenidas en cultivos provenientes de ascosporas normales.

3) Finalmente, la tercera característica fue la que presentaron los cultivos mantenidos en oscuridad completa, que fructificaron en todos los medios utilizados, pero formando cleistotecios típicos, sin paráfisis, con ascos delicuescentes y ascosporas hialinas.

De acuerdo con estas observaciones A. albidus, presenta interrogantes muy interesantes desde el punto de vista genético, que nos hacen coincidir con van Brummelen (1967:50) en su apreciación de la especie como material muy útil para estudios genéticos.

El crecimiento orientado de las hifas envolventes hacia el ascogonio inmediatamente después de producida la plasmogamia, demostraría en todos los casos, tal como sugiriera Bistis (1956), que el proceso estaría controlado por sustancias de tipo hormonal, segregadas por el ascogonio después de la plasmogamia. El crecimiento inicial del protoapotecio, evidenciado por un aumento de su volumen, se debe a esta masa de hifas de cubierta que se entrelazan más ó menos densamente, encerrando por completo al ascogonio (Ascobolus spp) o sólo cubriéndolo parcialmente (Saccobolus spp). Cuando las hifas ascógenas inician su desarrollo de la o las células ascógenas, el principal punto de crecimiento se localiza en el centro del protoapotecio. Las hifas envolventes continúan creciendo cierto tiempo y su actividad se manifiesta como una diferenciación de los tejidos excípulares en médula y corteza en Ascobolus spp, o bien, como un excípulo pobremente desarrollado en Saccobolus spp.

Cuando las paráfisis inician su desarrollo, un nuevo centro de crecimiento aparece en el himenio. Continúan creciendo ápicalmente hasta el comienzo de la maduración de las ascosporas. Esta observación contradice lo expuesto por Corner (1929), quien señala que la formación de ascos comienza poco de antes de que las paráfisis dejen de crecer ápicalmente. La ruptura del "techo" en especies cleistohimeniales que se abren en la fase mesohimenial media, coincide con la aparición y ordenamiento de los primordios de los ascos en la base del hime

nio. Pueden sugerirse varias hipótesis para explicar las causas de la simultaneidad en ambos fenómenos. Es probable que los ascos inicien su desarrollo donde y cuando tienen suficiente espacio. También podría pensarse que la mayor disponibilidad de oxígeno al romperse el "techo" favorecería el desarrollo de los ascos y la diferenciación de las ascosporas. Sin embargo, en A. amoenus, A. bistisii, A. albidus y A. ferrugineus, la diferenciación de los ascos y ascosporas procede en un ambiente comprimido y recubiertos por el "techo", lo que hace pensar en un determinismo temporal genéticamente controlado e independiente de condiciones ambientales localizadas. La diferencia fundamental entre ambos tipos de desarrollo estaría dada por la presencia en A. stercorarius, A. crenulatus y A. biguttulatus de un más activo crecimiento intercalar de los ascos, que no va acompañado por un incremento del número de células del excípulo ya diferenciado, lo que determina que las células del "techo" sufran tensiones que finalmente conducen a su ruptura temprana. El mecanismo de aperture en apotecios cleistohimeniales que se abren en la fase telohimenial, estaría dado, en cambio, por la presión ejercida desde abajo y sobre la cara interna del "techo", por las parafisis en rápida expansión apical, y por el abundante mucílago himenial que se produce, y que una vez expuesto el himenio, puede observarse, aún a ojo desnudo, como una gota brillante y transparente en el polo himenial del apotecio.

Con respecto a la germinación de las ascosporas, poco podemos agregar a lo dicho, salvo que observamos invariablemente, que las as-

cosporas provenientes de cultivos sobre E germinaron en mayor porcentaje y más rapidamente, en un tratamiento dado, que las provenientes de cultivos sobre otros medios, lo que podría estar relacionado con una mayor disponibilidad de sustancias de reserva y una batería enzimática más activa.

Si bien el tipo de sexualidad que presentan las distintas especies de Ascobolus es sumamente importante para llegar a conocer su biología e incursionar en la genética de la misma, es un carácter un tanto lábil y no conviene utilizarlo como criterio sistemático, excepto para caracterizar la especie como homotálica o heterotálica o bien, en especies heterotálicas muy afines morfológicamente, para determinar con experiencias de intercruzamientos, la existencia o no de barreras genéticas. Tal es el caso de A. stercorarius, A. furfuraceus y A. biguttulatus que son morfológicamente parecidos, pero que intercruzados en todas las combinaciones posibles, en ningún caso produjeron apotecios normales.

Del comportamiento sexual de A. ferrugineus, podemos sugerir que presenta un heterotalismo morfológico. Sin embargo, comparándolo con especies del mismo género estudiadas anteriormente (Dodge, 1920; Bistis, 1956; Gamundí y Ranalli, 1963, 1966, 1975 y otros) que presentan heterotalismo fisiológico, nos inclinamos a pensar, tal como Whitehouse (op. cit.) y Raper (1965) en otros casos, que se trataría de cepas unisexuales que probablemente son formas mutantes del hongo.

que normalmente es monoico. Casos similares fueron estudiados por otros autores (Hansen y Snyder, 1943, 1946; El Ani, 1956).

Drayton y Groves (1952) sostienen que Stromatina narcisii que para Whitehouse (op. cit.) significaría un caso similar, presenta un auténtico heterotalismo morfológico ya que de varios cientos de aislamientos estudiados, sólo tres de ellos mostraron carácter bisexual, aunque aberrante, por lo cual, para dichos autores, la unisexualidad parece estar bien establecida como un carácter de la especie y no meramente como una aberración genética. En nuestro caso, estudios posteriores que involucren el análisis estadístico de nuevos aislamientos, podrían aclarar el problema.

De las observaciones realizadas en Ascodemis nigricans y A. sphaerospora, se ponen de manifiesto varias características sexuales y del desarrollo que son particulares y que distinguen a Ascodesmis de Ascobolus y Saccobolus:

1) Las fructificaciones se inician como proyecciones laterales a partir de hifas vegetatativas de trayecto tortuoso que ligan y entrelazan a hifas más gruesas, de recorrido recto, que crecen radialmente. Por dicotomías sucesivas, estas ramas laterales originan el esbozo de la fructificación, que contiene finalmente gametangios, paráfisis y células basales estériles.

2) La plasmogamia ocurre entre gametangios que se enrollan uno alrededor del otro, sin que se pueda precisar por su morfología o función

cúal es el ascogonio y cúal el anteridio.

3) Hay más de una plasmogamia por fructificación, ya que los gametangios multinucleados se encuentran en número variable, generalmente más de tres pares por fructificación. Una vez producido el enrollamiento gametangial, cada gametangio diferencia una célula terminal uninucleada. Entre ellas ocurre la plasmogamia, y se forma una hifa ascógena corta a partir de la cual desarrollarán los ascos mediante el típico proceso en gancho.

4) La carencia de un verdadero tejido excípular, ya que la porción estéril del apotecio resulta de la proliferación de las células basales de los gametangios,las que también dan origen a las paráfisis que crecen hacia arriba entre y rodeando los gametangios y constituyendo la única delimitación externa del apotecio.

Si bien las estructuras morfológicas relacionas con los primeros estadíos en el desarrollo de la fructificación coinciden con las observadas por distintos autores (Usher, 1960; Swingle, 1934; Dangeard, 1903, 1907; Claussen, 1905; Delattre-Durand y Janex-Favre, 1979; O'Donnell y col. 1976), existen diferencias en cuanto a la interpretación de la morfología y función de los gametangios.

Swingle (1934) en A. nigricans y Delattre-Durand y Janex-Favre (1979) en A. microscópica, destacan la presencia de un tricogino terminal en el "ascogonio" el cual degenera rápidamente y no participa en el desarrollo posterior.

Usher (1960), citado por O'Donnell, encontró en A. sphaerospora que los "anteridios" son más grandes que los "ascogonios". Nuestras observaciones coinciden sin embargo, con las de O'Donnell (1976) en que tanto A. nigricans como A. sphaerospora, ambos gametangios presentan una morfología similar. Una vez producido el enrollamiento mutuo, delimitan una célula apical uninucleada que será la que participará en la plasmogamia. Es debido a esto que consideramos impropia la denominación de "ascogonios" y "anteridio" para los gametangios participantes en el proceso, ya que ambos desempeñan una función similar. Claussen (1905) y Swingle (op. cit.) observaron fusiones nucleares en los gametangios y en el asco joven. Sin embargo, como bien lo puntualiza Obrist, (op. cit.) es muy dificil demostrar con evidencias concretas dichas fusiones. De nuestras observaciones se desprende, sin embargo, que la única fusión nuclear ocurre en la célula madre del asco, ya que existe conincidencia entre el número cromosómico (n=5) encontrado en hifas vegetativas y en la metafase I de la división meiótica.

Por último, coincidimos con Le Gal (op. cit.) y Obrist (op. cit.) en que la estructura relativamente simple de Ascodesmis refleja un alto nivel evolutivo en el que la simplicidad es el resultado de la reducción más que una condición primitiva.

Del mismo modo, las observaciones sobre la ontogenia y la morfología de la fructificación en Ascobolus y Saccobolus aportan datos que permiten enunciar una hipótesis de la evolución de Saccobolus

a partir de Ascobolus. En efecto, durante el proceso de maduración, las ascosporas están al principio separadas y a medida que desarrollan se van agrupando hasta formar un paquete; este fenómeno puede considerarse un carácter secundario, adaptivo, ya que las esporas de Saccobolus spp, que son en general de menor tamaño que las de Ascobolus spp, al reunirse facilitan su dispersión durante la expulsión y el paquete al poseer mayor masa, alcanzaría mayor distancia.

Por otra parte, el tipo de desarrollo del apotecio -gimnocárpico- es considerado por Chadefaud (1960:530-531) como una forma neoténica, derivada por evolución regresiva -o simplificación- del tipo de desarrollo angiocárpico, opinión compartida por nosotros. La mayoría de las especies de Ascobolus son cleistohimeniales (angiocárpicas o hemiangiocárpicas), mientras que las de Saccobolus estudiadas, son gimnohimeniales (gimnocárpicas). El desarrollo del sistema ascógeno es también mucho mayor en Ascobolus que en Saccobolus, indicando aquí también una reducción del esporofito, que va aparejada con una reducción del gametofito, éste último representado por un excípulo pobremente desarrollado en Saccobolus. La evolución ha sido aquí también por simplificación.

Los ensayos de cultivos en diferentes medios y variando las condiciones de iluminación fueron realizados con el objeto de obtener datos sobre la variación de la morfología del apotecio en función de los distintos medios y de las condiciones de luz y oscuridad, y de

ningún modo significa ensayos tendientes a obtener un medio óptimo, si bien se consideró la producción de abundantes fructificaciones normales, un índice para determinar si los medios ensayados eran adecuados. En términos generales podemos concluir:

1) La luz es un factor importante en el desarrollo de las fructificaciones produciendo la oscuridad retardo o aborto de los apotecios.

2) La condición de luz contínua es óptima para algunas especies, mientras que la variación diurna de luz es más adecuada para otras.

3) La ausencia de luz provoca un mayor desarrollo de micelio aéreo.

4) El cultivo en los distintos medios ensayados no provoca ninguna variación apreciable en el tamaño y ornamentación de las ascosporas, el tipo de desarrollo, la morfología de los elementos himeniales y excípulares (excepción hecha de Ascobolus albidus, cuyo comportamiento genéticamente variable, ya hemos comentado). Sí influye sobre:

   a) el tamaño de los apotecios
   b) la duración del ciclo de vida
   c) la superficialidad de los apotecios con respecto al sustrato
   d) el color de los mismos.

B I B L I O G R A F I A

AINSWORTH, G. C. (1961). Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. Ed. 5, I-VIII, 1-547, 14 plts. Kew.

ARCHIBALD, A. R.,FLEMING, I. D., LIDDLE, A. M., MANNERS, D. J., MERCER, G.A. y WRIGHT, A. (1961). α -1,4-Glucosans. Part. XI. The absorption spectra of glycogen and amylapectin iodine complexes. J. Chem. Soc.: 1183-1190.

ARX, J. A. von (1971). Arachniotus and related genera of the Gymnoascaceae. Persoonia 6 : 371-380.

AUSTIN, B. (1968 a). Effects of airspeed and humidity changes on spore discharge in Sordaria fimicola. Ann. Bot. N. S. 32: 251-260.

AUSTIN, B. (1968 b). An endogenous rhythm of spore discharge in Sordaria fimicola. Ann. Bot. N. S. 32: 261-178.

BECKETT, A. y WILSON, I. (1968). Ascus cytology of Podospora anserina. J. Gen. Microbiol. 53: 81-87.

BISTIS, G. N. (1956 b). Sexuality in Ascobolus stercorarius I. Morphology of the ascogonium, plasmogamy; evidence for a sexual hormonal mechanism. Am. J. Bot. 43: 389-394.

BISTIS, G. N. y OLIVE, L. S. (1968). Induction of antheridia in Ascobolus stercorarius. Am. J. Bot. 55: 629-634.

BISTIS, G. N. y RAPER, J. R. (1963). Heterothallism and sexuality in Ascobolus stercorarius. Am. J. Bot. 50: 880-891.

BLAKESLEE, A. F. (1904 a). Zygospore formation: A sexual process. Science N. Y. 19: 864-866.

BLAKESLEE, A. F. (1904 b). Sexual reproduction in the Mucorineae. Proc. Am. Acad. Arts. Sci. 40: 205-319.

BONNER, R. D. y FERGUS, C. N. (1959). The fungus flora of cattle feeds. Mycologia 51: 855-863.

BOUDIER, J. L. E. (1869). Mémoire sur les Ascobolés. Annls. Sci. Nat. (Bot.) V 10: 191-268.

BRANDT, C. S. y THACKER, E. J. (1958). A concept of the rate of food passage through the gastro-intestinal tract. J. Anim. Sci. 17: 218-223.

BULLER, A. H. R. (1933). Researches on fungi 5. London: Longmans, Green and Co.

BRUMMELEN, J. van, (1967). A world monograph of the genera Ascobolus and Saccobolus (Ascomycetes, Pezizales). Persoonia (Suppl.) I: 1-260.

CARR, A. y OLIVE, L. (1958). Genetics of Sordaria fimicola II. Citology. Am. J. Bot. 45: 142-150.

CLAUSSEN, P. (1905). Zur Entwicklungsgeschichte der Ascomyceten. Boudiera. Botan. Zgt. 63: 1-28.

CLAYDEN, E. C. (1958). Preparation and staining of frozen sections in the operating theatre. Journ. Roy. Micros. Soc., Ser. III, 78(3-4): 88-91.

COEMANS, E. (1862). Spicilége mycologique I. Notice sur les Ascobolus de la flore belge. Bull. Soc. Bot. Belg. 1: 76-91.

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.

CORNER, E. J. H. (1929 b). Studies in the morphology of Discomycetes II. The structure and development of the ascocarp. Trans. Brit. myc. Soc. 14: 275-291.

CORNER, E. J. H. (1930). Studies in the morphology of Discomycetes IV. The evolution of the ascocarp. Trans. Brit. myc. Soc. 15: 121-134.

COUCH, J. N. (1926). Heterothallism in Dyctyuchus, a genus of the water moulds. Ann. Bot. Lond. 40: 849-881.

CHADEFAUD, M. (1943). Sur les divers types d'eléments dangeardiens des Ascomycetes et sur la formation des asques chez la peziza Pustularia catinus. La Révue Scient. 81: 77-80, figs. 1-20.

CHADEFAUD, M. (1960). Les vegétaux non vasculaires. (Cryptogamic). Chadefaud, M. and Emberger, L., Traité de botanique Systématique I.

DANGEARD, P. A. (1903). Sur le genre Ascodesmis. Le Botaniste 9: 33-35.

DANGEARD, P. A. (1907). Recherches sur le developpment du périthéce chez les Ascomycetes. Deuxiéme partie. Le Botaniste 10: 1-385.

DAWES, C. J. (1971). Biological techniques in electron microscopy. Barnes & Nobles, Inc., New York. 193 pp.

DAY, P., BOONE, D. y KEITT, G. (1956). Venturia inaequalis (Cke) Wint. XI. The chromosome number. Am. Jour. Bot. 43: 835-838.

DELATTRE-DURAND, F. y JANEX-FAURE, M. C. (1979). Le developpment et la structure des apothéces de l'Ascodesmis microscopica Cr. Seaver. Bull. Soc. Myc. Fr. 95(1): 49-63.

DENNIS, R. W. G. (1968). British Ascomycetes. Lehre: Cramer.

DODGE, B. O. (1920). The life history of Ascobolus magnificus origin of the ascocarp from two strains. Mycologia 12: 115-134.

DODGE, B. O. (1936). Facultative and obligate heterothallism in Ascomycetes. Mycologia 28: 399-409.

DODGE, B. O. (1945). Further remarks on mycogenetic terminology. Mycologia 37: 629-635.

DRAYTON, F. L. y GROVES, J. W. (1952). Stromatina narcisii, a new sexually dimorphic Discomycete. Mycologia 44: 119-140.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. y SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.

DUKE, S. H. H. (1942). The physiology of domestic animals. Ithaca, N. Y., Constock Publishing Company.

ECKBLAD, F. E. (1968). The genera of the operculate Discomycetes. A reevaluation of their taxonomy, phylogeny and nomenclature. Nytt. Mag. Bot. 15: 1-191.

EL ANI, A. J. (1956). Ascus development and nuclear behaviour in Hypomyces solani, f. cucurbitae. Am. Jour. Bot. 43: 769-778.

FRASER, H. C. I. (1909). Recent work on the reproduction of Ascomycetes. Trans. Brit. myc. Soc. 3: 100-107.

FRASER, H. C. I. y BROOKS, J. (1909). Further studies on the citology of the ascus. Ann. Bot. 23: 537-549, 2 pls.

FRIES, N. (1966). Chemical factors in the germination of spores of basidiomycetes. In The Fungus Spore. Colston Papers Nº 18, 189-199. Ed. por M. f. Madelim London: Butterworths.

GALVAGNO, M. A. (1976). Ensayos de nutrición en Ascobolus crenulatus P. Karst (Fungi-Ascomycetes). Bol. Soc. Arg. Bot. 17 (1-2): 95-118.

GAMUNDI, I. J. (1966). Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. II. Nova Hedwigia 10: 339-366.

GAMUNDI, I. J. y RANALLI, M. E. (1963). Apothecial development of Ascobolus stercorarius. Trans. Brit. myc. Soc. 46: 393-400.

GAUMANN, E. A. (1928). Comparative morphology of fungi. New York Mc Graw-Hill, 701 p.

GWYNNE-VAUGHAM, H. C. I., (1928). Sex and nutrition in the Fungi. Rep. Br. Ass. pp. 185-199.

GWYNNE-VAUGHAM, H. C. I. y WILLIAMSON, H. S. (1932). The cytology and development of Ascobolus magnificus. Ann. Bot. Lond. 16: 653-670.

GWYNNE-VAUGHAM, H. C. I. y WILLIAMSON, H. S. (1933). Notes on the Ascobolaceae. Trans. Brit. mycol. Soc. 18:127-134.

HANSEN, H. N. y SNYDER, W. C. (1943). The dual phenomenon and sex in Hypomyces solani f. cucurbitae. Am. J. Bot. 30:419-422.

HANSEN, H. N. (1946). Inheritance of sex in fungi. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 32:272-273.

HARPER, J. E. (1962). A comparative ecological study of the fungi on rabbit dung. Ph. D. thesis, Sheffield University.

HAWKER, L. E. (1939 a). The influence of various sources of carbon on the formation of perithecia by Melanospora destruens Shear in the presence of accesory growth factors. Ann. Bot. N.S. 3:455-468.

HAWKER, L. E. (1939 b). The nature of accesory growth substances influencing growth and fruiting of Melanospora destruens Shear

and of some other fungi. Ann. Bot. N. S. 3:657-676.

HAWKER, L. E. (1957). The physiology of reproduction in fungi. Cambridge University Press.

HAYMAN, D. S. (1964). Rosellinia limoniispora: nuclear changes in the developing ascus. Can. Journ. Bot. 42:13-21.

HIRSCH, H. E. (1950). No brachymeiosis in Pyronema confluens. Mycologia 42:301-305, 12 pl.

HOUGH, L., JONES, J. K. N., y WADMAN, W. H. (1950). Quantitative analysis of mixture of sugars by the method of partition chromatography. Part V. Improved methods for separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatogram. J. Chem. Soc. 1702-1706.

HUANG, L. H. (1975). A new species of Eleuterascus from Peruvian Soil. Mycologia 67:293-302.

INGOLD, C. T. (1965). Spore liberation. Oxford: Clarendon Press.

JACKSON, B. D. (1949). A glossary of botanic terms with their derivation and accent, I-XIII, 1-481. Revised 4th edition, London.

JANCZEWSKI, E. DE (1871). Morphologische Untersuchungen über Ascobolus furfuraceus. Bot. Ztg. 29:256 bis-262; 271-278 pl. 4.

JENG, R. S. y R. F. CAIN (1976). A new species of Ascodesmis from Venezuela. Mycotaxon 3(3):391-395.

JENSEN, W. A. (1962). Botanical histochemistry. W. H. Freeman and Co., San Francisco.

KIMBROUGH, J. W. (1970). Current trends in the classification of Discomycetes. Bot. Rev. 36(2):91-161.

KORF, R. P. (1951). A monograph of the Arachnopezizeae. Lloydia 14:129-180.

KORF, R. P. (1958). Japanese Discomycetes. Notes I-VIII. Sci. Rep. Yokohama natv. Univ. II 7:7-35, 16 fgs.

KORF, R. P. (1972). Synoptic Key to the genera of the Pezizales. Mycologia 64:937-944.

KORF, R. P. (1973). Discomycetes and Tuberales. En "The Fungi, an advanced treatise". Vol. IV A. Ed. por G. C. Ainsworth, F. K. Sparrow y A. S. Sussman. Acad. Press. N.Y. pp 249-319.

LASKOV, R. y MARGOLIASH, E. (1963). Properties of high molecular weight glycogen from rat liver. Bull. Res. Counc. Isr. Sect. A Chem. 11(4):351-362.

LE GAL, M. (1947). Recherches sur les ornamentations sporales des Discomycetes operculés. Ann. Sc. Nat., Sec. Bot. 11(8):73-297.

LE GAL, M. (1949). Deux Discomycétes mal connus: Ascodesmis nigricans van Tieghem et Ascodesmis microscopica (Crouan) Le Gal non Seaver. Rev. Mycol. 14:85-99.

LOSEL, D. M. (1967). The stimulation of spore germination in Agaricus bisporus by organic acids. Ann. Bot. N. S. 31:417-425.

LU, B. (1962). A new fixative and improved propionocarmine squash technique for staining fungus nuclei. Can. Jour. Bot. 40: 843-847.

LU, B. (1967). The course of Meiosis and centriole bahaviour during the ascus development of the Ascomycete Gelasinospora calospora. Chromosoma (Berl.) 22:210-226.

McTEAGUE, D. M., HUTCHINSON, S.A. Y REED, R. J. (1959). Spore germination in Agaricus campestris L. ex Fr. Nature, London 183:1736

MERCURI, O. A. y FORCHIASSIN, F. (1978). Fotobiología de Saccobolus citrinus. Physis, C , Bs. As., 38(94):69-82.

MOREAU, F. (1930). Le dévelopement du périthéce chez quelques Ascomycétes. Rev. Gén. Bot. 42:65-95.

NEWCOMER, E. H. (1953). A new cytological and histological fixing fluid. Science 11(3058):161.

OBRIST, W. (1961). The genus Ascodesmis. Can. J. Bot. 39:944-953.

O'DONNELL, K. L., HOOPER, G. R. y FIELDS, W. G. (1976). Scanning ultrastrural ontogeny of eugymnohymenial apothecia in the operculate Discomycetes Ascodesmis nigricans and A. sphaerospora. Can. J. Bot. 54:572-577.

OLIVE, L. S. (1949). Cytological evidence opposing the theory of brachymeiosis in Ascomycetes. Science, N. Y. 110:185.

OLIVE, L. S. (1950). A cytological study of ascus development in Patella melaloma (Alb. and Schw.) Seaver. Am. J. Bot. 37: 757-763.

PADEN, J. W. y LINTON, M. A. S., (1976). Apothecial development and sexuality in Ascobolus saccharifer us. Can. J. Bot. 54 (15):1784-1792.

RANALLI, MARIA E. y GAMUNDI, I. J. (1975). Ascobolus biguttulatus sp. nov. (Ascomycetes, Pezizales). Estudios de cultivo y citología. Physis, C, Bs. As. 34(88):1-15.

RANALLI, MARIA E. y FORCHIASSIN, F. (1976). Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina VII. Bol. Soc. Arg. Bot. 17:262-279.

RANGA RAO, V y MUKERJI, K. G. (1970). Cytology of the ascus in Ascotricha guamensis. Mycologia 62:301-306.

RANGA RAO, V. y MUKERJI, K.G. (1971). Cytology of the ascus in Achaetomium strumarium Rai. Tewari, and Mukerji. Bot. Gaz. 132(3):179-183.

RAPER, J. R. (1965). Life cycles, basic patterns of sexuality, and sexual mechanisms. En "The Fungi" 1: 473-511, Ainsworth y Sussman (ED). Academic Press, N. York.

ROGERS, J. D. (1964). Hypoxylon pruinatum: The chromosome number. Mycologia 56:369-373.

ROGERS, J. D. (1965). The conidial stage of Coniochaeta ligniaria: Morphology and cytology. Mycologia 57:368-378.

ROGERS, J. D. (1965). Hypoxylon fuscum I. Cytology of the ascus. Mycologia 57:789-803.

SHERWOOD, M. B. y SINGER, E.D. (1944). Folic acid in cotton. J. Biol. Chem. 155:361-362.

SINESHCHEKOV, A. D. (1965). Digestion and assimilation processes in the stomach and intestines of ruminant. In Physiology of digestion of the ruminant (Ed. por R. W. Dougherty), pp. 254-261. London: Butterworths.

SINGER, R. (1949). The Agaricales in modern taxonomy. Lilloa, 22:5-832.

SINGLETON, J. R. (1953). Chromosome morphology and the chromosome cycle in the ascus of Neurospora crassa. Am. J. Bot. 40:124-144.

SNELL, W. H. y DICK, E. A. (1957). A glossary of mycology, I-XXI, 1-171 15 pls. Cambridge (Mass.).

STARBACK, K. (1895). Discomyceten Studien. Bih K. Svenska Vet. Akad. Handl. III, 21(5):1-42, 2 pls.

SUSSMAN, A. S. (1965). Physiology of dormancy and germination in the propagules of cryptogamic plants. In Encyclopaedia of Plant Physiology (Ed. por A. Lang), 15(2):933-1025.

SUSSMAN, A.S. (1966). Dormancy and germination. In "The Fungi" an advanced treatise II, (Ed. por G. C. Ainsworth y A. S. Sussman), pp. 733-764. New York and London: Academic Press.

SUSSMAN, A. S. y HALVORSON, H. O. (1966). Spores, their dormancy and germination. New York and London: Harper y Row.

SWINGLE, F. J. (1934). Fertilization in Ascodesmis nigricans van Tieghem. Am. J. Bot. 21:519-545.

TIEGHEM, P. van (1876). Sur les developpement du fruit des Ascodesmis genre nouveau de l'ordre des Ascomycetes. Bull. Soc. Bot. France 23:271-279.

TOENNIES, G., y KOLE, J. J. (1951). Techniques and reagents for paper chromatography. Anal. Chem. 23:823-826.

TREVELYAN, W. E., PROCTOR, D. P. y HARRISON, J. S. (1950). Detection of sugars on paper chromatograms. Nature (London) 166:444-445.

USHER, M. L. (1960). A comparative study of the developmental stage of two coprophilic fungi. M. Sc. Thesis, University of

Toronto, Ontario.

WALKEY, D. G. A. y HARVEY, R. (1966 a). Studies of the ballistics of ascospores. New Phytol. 65:59-74.

WALKEY, D. G. A. y HARVEY, R. (1966 b). Spore discharge rhythms in Pyrenomycetes I. A survey of the periodicity of spore discharge in Pyrenomycetes. Trans. Br. Mycol. Soc. 49:583-592.

WALKEY, D. G. A. y HARVEY, R. (1968). Spore discharge rhythms in Pyrenomycetes V. The effects of temperature on spore discharge in Sordaria macrospora. Trans. Br. mycol. Soc. 51:787-789.

WARD, E. W. B., y CIURYSEK, K. W. (1962). Somatic mitosis in Neurospora crassa. Am. J. Bot. 49:393-399.

WEBSTER, J. (1970). Presidential Addreas. Coprophilous fungi. Trans. Br. Myc. Soc. 54(2):161-180.

WELLS, D. E. (1956). Nuclear changes accompanying ascus and ascospore development in Sporormia obliquisepta. Am. J. Bot. 43: 761-768.

WELSFORD, E. J. (1907). Fertilization in Ascobolus furfuraceus Pers. New Phytol. 6:156-161.

WHITEHOUSE, H. L. K. (1949). Heterothallism and sex in the fungi. Biol. Rev. 24:411-447.

WOOD, J. L. (1953 a). A cytological study of sacus development in Ascobolus magnificus Dodge. Bull. Torrey Bot. Cl. 80:1-15.

WOOD, J. L. (1953 b). A cytological study of ascus development in A. magnificus Dodge. Bull. Torrey Bot. Cl. 80:456-467.

ZICKLER, D. (1967). Analyse de la méiose du champignon Discomycete Ascobolus immersus Pers., C. R. Acad. Sc. Paris 265:198-201.

ZUK, J. y SWIETLINSKA, Z. (1965). Cytological studies in Ascobolus immersus . Acta Soc. Bot. Polon. 34:171-179.