

Tesis de Posgrado

Factores que afectan el desarrollo de *iodophanus carneus*

Diorio, Luis Alberto

1994

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:

Diorio, Luis Alberto. (1994). Factores que afectan el desarrollo de *iodophanus carneus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2661_Diorio.pdf

Cita tipo Chicago:

Diorio, Luis Alberto. "Factores que afectan el desarrollo de *iodophanus carneus*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2661_Diorio.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Factores que afectan el desarrollo
de *Lodophanus carneus***

Autor: Luis Alberto Diorio
Directora: Prof. Dra. Flavia Forchlassin
Lugar de Trabajo: Departamento de Ciencias
Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas
y Naturales. UBA.

Tesis presentada para optar por el título de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

- 1994 -

Flavia
26/6/1
(2 ejes)

Indice

	Pág.
AGRADECIMIENTOS.	9
INTRODUCCION.	11
EL DESARROLLO DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS. GENERALIDADES.	
A. Crecimiento y diferenciación.	11
B. Desarrollo y metabolismo.	13
C. Desarrollo sexual.	14
D. Factores que afectan al desarrollo.	15
FACTORES QUE AFECTAN AL DESARROLLO.	
A. Factores internos.	16
B. Factores externos.	18
<i>Factores nutricionales.</i>	18
Fuentes carbonadas.	18
Fuentes nitrogenadas.	21
Relación C/N.	22
Minerales, vitaminas y factores de crecimiento.	23
<i>Concentración del ion hidrógeno.</i>	24
<i>Potencial osmótico y mátrico.</i>	25
<i>Condiciones atmosféricas.</i>	26
<i>Condiciones de cultivo.</i>	26
<i>La luz.</i>	27
Crecimiento vegetativo.	27
Desarrollo sexual.	28
Luz y pigmentación.	30
Fotoinducción y calidad de luz.	31
<i>La temperatura.</i>	32
Crecimiento vegetativo.	32
Desarrollo sexual.	32

FOTOCONTROL DEL DESARROLLO.

A. Recepción del estímulo lumínico.	33
<i>Las flavoproteínas como fotorreceptores.</i>	33
<i>El microcromo.</i>	35
B. Consecuencias inmediatas de la absorción de luz.	35
<i>Micosporine.</i>	35
<i>Papel del AMPc.</i>	36
<i>AMPc y el metabolismo del glucógeno.</i>	37

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.	39
---------------------------	----

MATERIALES Y METODOS.	41
-----------------------	----

A. Organismo.	41
<i>Obtención de cultivos monospóricos.</i>	41
B. Medios de cultivo.	41
<i>Medio agar agua.</i>	41
<i>Medio PF.</i>	42
<i>Medio sintético (sólido y líquido).</i>	42
Medio basal.	42
Fuentes de carbono.	42
Fuentes de nitrógeno.	43
Relación C/N.	44
Medio de cultivo normal.	45
<i>Esterilización.</i>	45
C. Condiciones de cultivo.	45
<i>Inóculos y siembra.</i>	45
<i>Incubación.</i>	46
<i>Variación de la temperatura.</i>	46
<i>Intensidad lumínica.</i>	46
<i>Calidad de luz.</i>	46
D. Determinaciones.	48
<i>Crecimiento.</i>	48
<i>Número y diámetro de los apotecios.</i>	48
<i>Medición del pH.</i>	48

<i>Métodos químicos.</i>	48
Proteínas totales del micelio.	48
Glucógeno.	49
Glucosa residual.	49
Hidratos de carbono totales.	49
<i>Métodos histoquímicos.</i>	50
Glucógeno.	50
E. Agregados.	50
F. Extracción de pigmentos.	50
G. Gráficos y estadísticos.	51
RESULTADOS Y DISCUSION.	53
CINETICA DE CRECIMIENTO.	
RESULTADOS.	53
<i>Medio sólido.</i>	53
<i>Medio líquido.</i>	55
DISCUSION.	57
NUTRICION CARBONADA Y NITROGENADA.	
RESULTADOS.	60
A. Variación de la concentración de carbono y de nitrógeno.	
<i>Variación de carbono en medio sólido.</i>	60
<i>Variación de nitrógeno en medio sólido.</i>	63
<i>Variación de carbono y de nitrógeno en medio líquido.</i>	63
B. Relación C/N.	66
<i>Medio sólido.</i>	66
<i>Medio líquido.</i>	68
C. Variación de la fuente de carbono.	68
<i>Medio sólido.</i>	68
<i>Medio líquido.</i>	70
D. Mezcla de fuentes carbonadas.	72
E. Variación de la fuente de nitrógeno.	74

<i>Medio sólido.</i>	74
<i>Medio líquido.</i>	74
DISCUSION.	78
LUZ Y DESARROLLO.	
RESULTADOS.	85
A. Efecto de la luz blanca sobre el desarrollo sexual.	85
<i>Variación de la luminosidad.</i>	85
<i>Respuesta a irradiaciones de 24 horas.</i>	87
<i>Respuesta a períodos de oscuridad crecientes.</i>	89
<i>Respuesta a irradiaciones alternadas.</i>	89
<i>Respuesta a distintos tiempos de exposición.</i>	91
<i>Irradiaciones puntuales durante el 5º día.</i>	92
B. Desarrollo sexual ante distintas calidades de luz.	94
<i>Inducción del desarrollo sexual en condiciones de</i> <i>iluminación continua.</i>	94
<i>Inducción por irradiaciones de 24 hs.</i>	94
<i>Inhibición por irradiaciones de 24 hs. aplicadas</i> <i>en el 2º día.</i>	100
C. Aspectos nutricionales.	102
D. Luz y crecimiento vegetativo.	104
<i>Medio sólido.</i>	104
<i>Medio líquido.</i>	106
DISCUSION.	108
ASPECTOS METABOLICOS.	
RESULTADOS.	117
A. Respuestas a agregados en oscuridad (fotomimetismo).	117
<i>Agregado de db-AMPc en colonias de distintas</i> <i>edades.</i>	117
<i>Agregados durante el 5º día.</i>	117
B. Metabolismo del glucógeno.	119
DISCUSION.	122

TEMPERATURA Y DESARROLLO.

RESULTADOS.	125
A. Desarrollo sexual.	125
<i>Temperatura e iluminación constante.</i>	125
<i>Temperatura y condiciones lumínicas no inductoras.</i>	125
<i>Temperatura y condiciones lumínicas inductoras.</i>	128
<i>Temperatura e inhibición del estímulo lumínico.</i>	128
B. Crecimiento vegetativo.	128
<i>Medio sólido.</i>	128
<i>Medio líquido.</i>	129
DISCUSION.	131

PIGMENTACION.

RESULTADOS.	133
A. Curva de absorción.	133
B. Pigmentación en distintas calidades de luz.	133
DISCUSION.	135

CONDICIONES DE CULTIVO Y OTROS FACTORES.

RESULTADOS.	138
A. Variación del medio de cultivo sólido.	138
<i>Volumen del medio.</i>	138
<i>Concentración del medio de cultivo basal.</i>	138
B. Variación del medio de cultivo líquido.	140
<i>Volumen del medio y del frasco.</i>	140
<i>Respuesta al agregado de PEG-6000.</i>	142
C. Sellado de cajas.	142
<i>Iluminación constante.</i>	142
<i>Oscuridad constante.</i>	145
D. Siembra de inóculos de distintos grados de madurez.	145

Agradecimientos

A todos mis compañeros de trabajo por su ayuda, comprensión y amistad.

A quienes me enseñaron a construir usando las manos, la mente y el alma, siempre el alma.

A la Dra. F. Forchiassin por sus consejos y ayuda en la elaboración de este trabajo, y su inagotable paciencia y capacidad.

A María Inés, Soledad, Agustina y Ana Belén, porque sólo por ellas puedo construir.

A Ramalac.

Abuelo, tío, va por ustedes...

Introducción

EL DESARROLLO EN LOS HONGOS FILAMENTOSOS. GENERALIDADES

A. CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION.

El ciclo de vida de los hongos filamentosos es generalmente breve y en él se pueden producir esporas de origen sexual o asexual de las que depende la continuidad de las especies. Esta serie de cambios que sufre el organismo a lo largo de su ciclo de vida reciben, en un sentido general, el nombre de *desarrollo* (Wareing y Phillips, 1982).

El concepto de desarrollo engloba a un conjunto de procesos complejos, con mecanismos poco conocidos, que mantienen sus características de una generación a otra y que son afectados en sus manifestaciones por numerosos factores ambientales. Pero esta noción tiene dos componentes fundamentales que son: el crecimiento que cubre el aspecto cuantitativo del desarrollo, y la diferenciación, que se refiere a los cambios cualitativos.

Garraway y Evans (1984) consideran que el *crecimiento* es el incremento en la masa de un organismo que ocurre dentro de un período de incubación, siendo el resultado neto de una multitud de cambios moleculares, celulares y morfológicos. Esa variación sería la consecuencia de un incremento en el número de células y/o del almacenamiento de sustancias sólidas. Si se grafica dicha variación expresada, por ejemplo, como peso seco de micelio en función del tiempo se puede obtener una curva como la que muestra la figura 1.1 y en la que se pueden diferenciar distintas etapas. La primera es la etapa lag, en ella el organismo trata de adaptarse al nuevo ambiente involucrando posiblemente la inducción y/o derepresión de enzimas que aprovechen los nutrientes disponibles; su duración dependerá de los factores ambientales en juego y de

Medida del crecimiento

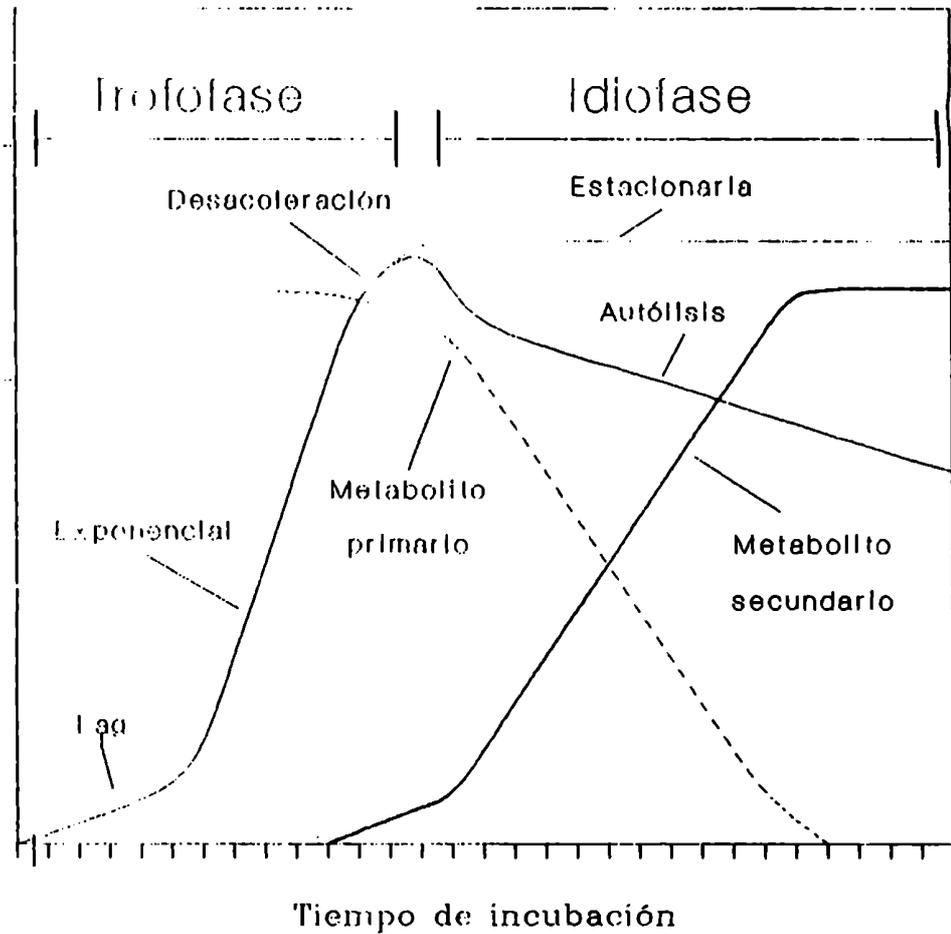


Figura 1.1. Curva de crecimiento. Curva de crecimiento modelo de un hongo filamentos mostrando las distintas fases del desarrollo vegetativo, y la actividad de dos metabolitos, uno primario y el otro secundario.

la potencialidad genética del organismo en adaptarse a dicho medio.

La segunda es la fase exponencial que se caracteriza porque el individuo alcanza el máximo ritmo de crecimiento para el conjunto de condiciones ambientales dadas. Pero si los nutrientes llegan a concentraciones limitantes o se producen cambios ambientales desfavorables en factores tales como la tensión de oxígeno, el pH, o la presencia en el medio de metabolitos secretados que le resulten tóxicos, el organismo disminuye su ritmo de crecimiento y entra en la llamada fase de desaceleración. Eventualmente el crecimiento llega a un plateau o fase estacionaria, y si las condiciones que limitan el crecimiento persisten se produce la fase de declinación o de autólisis del micelio, en la que predominan los procesos degradativos.

Como se mencionó anteriormente, durante el desarrollo no sólo ocurren cambios cuantitativos sino también cualitativos que reciben el nombre de *diferenciación* (Wareing y Phillips, *op.cit.*), y que incluyen las modificaciones morfológicas y fisiológicas que sufre el organismo, como por ejemplo la ramificación y maduración hifal y el desarrollo de estructuras reproductivas.

Cuando el término desarrollo se refiere a cambios exclusivamente morfológicos, se habla usualmente de *morfogénesis*.

B. DESARROLLO Y METABOLISMO.

Puede demostrarse que existe una correlación entre el desarrollo y el metabolismo de un hongo. Mientras se desarrolla en un medio sin factores que limiten su crecimiento, privan en su metabolismo las llamadas vías primarias por las que se toman y utilizan los nutrientes a un ritmo máximo para sus posibilidades (fase exponencial). En ella la producción de

metabolitos secundarios es rara. A esta etapa se la llama usualmente *trofofase* (Fig. 1.1).

Para Borrow *et al.* (1961) cuando los nutrientes se tornan limitantes cesan las divisiones celulares, aunque puede registrarse aumento del peso seco por la acumulación de sustancias de reserva, y se inicia la etapa de autólysis y con ella la síntesis de metabolitos secundarios. Este estado recibe el nombre de *idiofase*. Berry (1975) amplía el concepto definiendo un desbalance metabólico ante un nutriente esencial limitante, con lo que el metabolismo se desviaría hacia vías no fundamentales para el crecimiento.

Estos metabolitos secundarios son fenotípicamente específicos y su producción es extremadamente sensible a las condiciones de cultivo e historia previa del organismo (Bu'Lock, 1975), siendo de gran importancia científica y técnica. Entre los metabolitos secundarios se encuentran los antibióticos, los pigmentos y las micotoxinas entre otros.

C. DESARROLLO SEXUAL.

La reproducción sexual es un punto importante dentro del ciclo de vida de los hongos filamentosos, en ella se observan los cambios morfogenéticos más dramáticos.

En muchos casos el desarrollo sexual necesita de un período de crecimiento vegetativo previo para que el organismo resulte competente en su posterior diferenciación, y a menudo la misma es inducida cuando algún factor externo o interno empieza a ser limitante (Smith, 1975).

Así el desarrollo vegetativo, el sexual y el metabólico estarían relacionados entre sí. En *Nectria ditissima* (Dehorter y Perrin, 1983 b) y *N. galligena* (Dehorter y Bernillon, 1983) los primordios de los peritecios aparecieron en los cultivos líquidos el mismo día del pico de crecimiento para la primera (80 a 90), o tres días después en la última (pico en el día 110 y primordios en el 140), completándose el

desarrollo sexual en ambos casos durante la etapa de autóli-
sis.

D. FACTORES QUE AFECTAN AL DESARROLLO.

El proceso morfogenético de un organismo podría ser considerado como una compleja sucesión de expresiones génicas diferenciales que serían controladas por factores genéticos y ambientales (luz, temperatura, cantidad y calidad de nutrientes, pH, etc.).

En *Sordaria brevicollis* (Broxholme *et al.*, 1991) se pudo determinar una correlación entre distintas etapas morfo-
genéticas (incluyendo la vegetativa), la expresión de polipéptidos y la translación de mRNA. De un total de 200 polipéptidos, 31 fueron asociados con los distintos estadios del desarrollo de los peritecios.

Por otro lado, muchas enzimas pueden ser activadas a nivel transcripcional o post transcripcional por factores externos como la luz (Galland y Senger, 1988).

Algunos factores externos pueden modificar el medio interno favoreciendo la esporulación o evitándola, y generalmente con rangos más acotados que los correspondientes para la reproducción asexual o el crecimiento vegetativo (Lilly y Barnett, 1951).

Un caso especial es el del heterotalismo, muy común en Ascomicetes. En las formas homotálicas la secuencia del desarrollo sexual es constitutiva, dependiendo su inicio y progreso de factores ambientales y de condiciones internas favorables. En cambio en las heterotálicas, el comienzo de la morfogénesis sexual es gatillada por la interacción de dos micelios compatibles (Turian, 1978).

Finalmente, no sólo es importante la acción de uno o varios factores para gatillar los procesos de diferenciación reproductivos sino también el efecto que tuvieron esos, u otros factores, en las etapas previas del desarrollo.

FACTORES QUE AFECTAN AL DESARROLLO

Son muchos los factores que influyen sobre el crecimiento y la diferenciación de los hongos filamentosos; las interacciones que se dan entre los factores internos, propios del individuo, y las características físicas y químicas del medio ambiente, modelan las distintas fases del desarrollo.

A. FACTORES INTERNOS.

El desarrollo puede ser afectado profundamente por el genotipo del hongo, el tiempo de almacenaje del micelio, por la historia previa y la edad del micelio o grado de desarrollo alcanzado y por los ritmos internos.

La constitución genética difiere de unas a otras especies e incluso lo hace entre aislamientos de una misma especie, por lo que las respuestas fenotípicas potenciales dependerán de dicha constitución y del tenor y tipo de factores que le estén afectando.

La conservación de las cepas siempre trae aparejados cambios morfológicos y fisiológicos independientemente del método utilizado -como por ejemplo la tensión de oxígeno, la crioconservación, la desecación, etc.- (Dupont *et al.*, 1986). En el caso de *Saccobolus platensis* se observaron alteraciones importantes cuando se le enfrentó a sucesivos repiques y al mantenimiento a bajas temperaturas. Conforme aumentaba el tiempo de conservación disminuía el número de apotecios en medio sólido, así como también la velocidad de crecimiento en medio líquido y las velocidades de asimilación de glucosa y la síntesis de glucógeno (Forchiassin y Diorio, en prensa), y las proteínas solubles sufrían alteraciones cuali y cuantitativas (Diorio y Forchiassin, en prensa).

En las Ascoboláceas es común la pérdida de fertilidad por almacenamiento, por lo que se apela generalmente a la regeneración de las cepas cultivándolas en sus medios naturales.

A lo largo del crecimiento de las colonias sus hifas sufren con el transcurso del tiempo una serie de cambios irreversibles que afectan su desarrollo, así las células de una misma colonia podrán tener distintos grados de desarrollo.

Un factor importante en la edad de las hifas es la pared celular. Existen diferencias estructurales y de composición entre la pared de la zona apical en expansión y la de las zonas más alejadas lo que indicaría una relación entre la edad del micelio y sus características morfológicas y fisiológicas (Fencl, 1978). Estas diferencias también se evidencian en la expresión génica, en *Neurospora crassa* no se detectó una importante disminución en la formación de proteínas y ácidos nucleicos en las zonas más viejas del micelio con respecto a las apicales (Zalokar, 1959 b), pero pueden existir diferencias cualitativas de forma tal que diferentes enzimas pueden ser sintetizadas en diferentes loci, dependiendo de la edad de las células en cuestión (Zalokar, 1959 a y b); un buen ejemplo se encuentra en *Aspergillus niger* en el que la síntesis de proteasas se produce recién a 40 μm del ápice y nunca en él (Fencl, *op. cit.*). Como veremos más adelante, la edad del micelio mostrará una gran importancia con respecto a su madurez para recibir estímulos externos que le permitan iniciar el proceso sexual.

Otro factor interno interesante son los ritmos endógenos que consisten en oscilaciones no lineales que se mantienen por sí mismas con diferentes frecuencias y asociadas a distintos factores (Nongkynrih y Sharma, 1992), se pueden presentar con períodos de fracciones de segundo hasta de varios años, siendo los más conocidos los ritmos circadianos.

Las actividades rítmicas en los hongos se pueden dar en cualquier estado de su ciclo de vida e incluyen efectos

tales como la formación de bandas de crecimiento vegetativo o de esporulación, descarga de esporas periódicas, bioluminiscencia, oscilaciones en la evolución del CO_2 , en los contenidos de ATP y NADH, y en la síntesis de ADN y ritmos mitóticos, aunque sus mecanismos no son conocidos (Lysek, 1978).

Evidencias detalladas de ritmos en hongos sólo se han hecho para Ascomicetes (principalmente en *Neurospora crassa* y *Podospora anserina*, ambas pertenecientes a la familia Sordariaceae).

B. FACTORES EXTERNOS.

Los factores ambientales que afectan al desarrollo de los hongos filamentosos son numerosos e incluyen a los nutricionales, pH del medio, la temperatura, la luz, la aireación, y hasta los métodos de inoculación y esterilización. En estas líneas haremos hincapié en aquellos que se encuentran relacionados con la labor experimental del trabajo.

Factores nutricionales.

La nutrición es un aspecto importante del desarrollo de los hongos, tiene influencia la calidad y la cantidad de la fuente y la etapa del desarrollo del organismo que es afectada.

Fuentes carbonadas.

Las fuentes carbonadas tienen dos funciones esenciales: i) el aporte del carbono necesario para la síntesis de los esqueletos carbonados de los carbohidratos, las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos; ii) la obtención de energía tras su oxidación.

Los compuestos aprovechables por los hongos son numerosos y abarcan desde carbohidratos simples, aminoácidos, ácidos orgánicos, compuestos policíclicos y alcaloides hasta sustancias complejas como el almidón, la celulosa y la lig-

nina. Pero cada especie posee sus propias habilidades para utilizar compuestos determinados.

Cuando se comparó el comportamiento de cinco especies del género *Helminthosporium* en distintas fuentes de carbono se encontró los mejores crecimientos en glucosa y manosa para todas las especies excepto para *H. rostratum*, que mostró un pobre desarrollo vegetativo en el primer azúcar (Reddy, 1969).

En términos generales la glucosa es el monosacárido más usado por los hongos para su desarrollo pero, como se pudo observar en el último ejemplo, no es el único.

El aprovechamiento de fuentes más complejas dependerá de la capacidad del organismo para degradarla extracelularmente. Así *Pisolithus tinctorius* creció mejor en manitol (280 mg de peso seco/100 ml) y glucosa (268 mg/100 ml), aprovechando también sacarosa (242 mg/100 ml (Smith, 1982). *Pleospora gaudefroyi* creció en manosa (65.9 mg de peso seco/25 ml), fructosa (52.7 mg/25 ml), glucosa (38.9 mg/25 ml), almidón (28.1 mg/25 ml) y CMC (9.6 mg/25 ml), al tiempo que en *Camarosporium roumeguerii* se obtuvieron resultados distintos (47.4, 58.0, 66.1, 35.0 y 7.3 mg/25 ml de crecimiento respectivamente) evidenciando un mejor aprovechamiento de glucosa y almidón por parte de la última especie (Crabtree y Gessner, 1982).

El desarrollo sexual también se encuentra determinado en gran medida por el tipo de fuente carbonada disponible. Para *Nectria haematococca* las fuentes que favorecieron la producción de cuerpos fructíferos fueron ribosa, maltosa y manosa (Qureshi y Page, 1972); para *Cordyceps militaris* almidón y sacarosa, pero en glucosa no hubo desarrollo (Basith y Madelin, 1968); en *Podosordaria leporina* almidón (Koehn, 1971); y en *Venturia inaequalis* sacarosa y maltosa (Ross y Hamlin, 1965).

Se puede afirmar entonces que un hongo podrá aprovechar una determinada fuente carbonada para su crecimiento y/o desarrollo sexual si: i) posee los mecanismos extracelulares

necesarios para la hidrólisis en el caso de los polímeros, ii) que existan los sistemas de transportes de membranas específicos (constitutivos o inducibles) y iii) que el compuesto pueda integrarse al metabolismo del hongo.

Pero no sólo el tipo de fuente es importante sino también la cantidad, ya que un aumento del carbono aprovechable por el organismo en el medio de cultivo y dentro de ciertos límites (sin alterar principalmente el balance osmótico) benefician al crecimiento vegetativo, pero suelen inhibir a la reproducción sexual. Esta, generalmente, se ve favorecida por concentraciones de carbono menores.

En *Sclerotinia sclerotiorum* los apotecios se desarrollaron más rápido y en mayor cantidad en medios con 0.1 a 0.3% de sacarosa, mientras que en concentraciones de 1% o más no hubo cuerpos fructíferos (Budge y Whipps, 1991).

En otro ejemplo James y McLaughlin (1988) lograron inducir la fructificación de *Clavicornia pixidata* al pasarla desde un medio rico (YPG) a uno limitado; pero la inducción se producía aunque en el medio pobre las concentraciones de carbono fuesen relativamente altas (entre 20 y 40 g/l). Así, no sólo es importante la cantidad de la fuente de carbono, sino también el de los restantes nutrientes o factores de crecimiento presentes en el medio de cultivo.

Una misma fuente carbonada puede afectar a las distintas etapas del desarrollo de un organismo de maneras distintas. Así por ejemplo, el crecimiento de *Aspergillus niger* en medio sólido fue importante en fuentes como maltosa, xilosa, o glucosa al igual que el desarrollo de esclerocios, pero en ribosa, manitol, y en los ácidos malónico, fumárico y cítrico no hubo esclerocios a pesar de haber alcanzado índices de crecimiento vegetativo similares a los obtenidos en las primeras (Agnihotri, 1969). En *Saccobolus platensis* se detectó un crecimiento hifal importante con fructosa, maltosa y CMC y con nitrato de amonio como fuente de nitrógeno, pero la densidad de apotecios fue reducida al compararlas con las

obtenidas en glucosa o almidón, ambas con crecimientos vegetativos favorables (Forchiassin, 1989).

Fuentes nitrogenadas.

Los hongos necesitan fuentes nitrogenadas para la síntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas, glucosamina, varias vitaminas, etc.; todos ellos constituyentes celulares fundamentales. Para ello pueden utilizar una gran variedad de compuestos nitrogenados.

En un trabajo ya clásico de Robbins (1937) se clasifica a los hongos en cuatro grupos de acuerdo a su capacidad para metabolizar N_2 , NO_3^- , NH_4^+ , y/o nitrógeno orgánico.

Cada especie poseerá (como en el caso de las fuentes de carbono) sus propias necesidades para alcanzar un crecimiento óptimo. Según Lima y Mercuri (1984) *Ascobolus furfuraceus* mostró un buen crecimiento en medios con carbonato de amonio, asparagina y nitrato de sodio (más de 5 mg de peso seco/ml); en menor proporción en urea, acetato de amonio y fosfato dibásico de amonio (entre 4 y 2 mg/ml); y un crecimiento pobre en nitrato de amonio, sulfato de amonio y cloruro de amonio (menos de 0.5 mg/ml).

La capacidad de fijación del nitrógeno molecular por parte de los hongos no tiene todavía evidencias inequívocas (Garraway y Evans, 1984).

El uso del ion nitrito suele ser tóxico para la mayoría de las especies debido, posiblemente, a su habilidad para deaminar y a la interferencia que produce sobre el metabolismo del azufre, por su semejanza con el ion sulfito (Pateman y Kinghorn, 1976).

El nitrato es utilizable por muchos hongos salvo para ciertos grupos como los Basidiomycetes, Saprolegniaceae y Blastocladales, que son incapaces de sintetizar nitrato reductasa (Whitaker, 1976). Esta enzima es reprimida por el amonio por lo tanto, ante la presencia de ambas sustancias en el medio, un hongo que pueda utilizarlas tomará primero al amonio.

La urea es generalmente una buena fuente de nitrógeno para el crecimiento y es hidrolizada extracelularmente en HCO_3^- y NH_4^+ (Friedrich y Magasanik, 1977; Hutner, 1972) dándose con ello la posible incorporación del HCO_3^- (Roon y Levenberg, 1970).

Los aminoácidos suelen ser buenas fuentes de nitrógeno, aunque específicos para cada organismo. En muchos casos pueden actuar también como fuente de carbono. En *Aphanomyces laevis* y *Pythium ultimum* fue evidente el uso de alanina y glutamato como fuentes de carbono, alcanzando crecimientos semejantes a los de glucosa (Gleason et al., 1970).

En lo que respecta a la diferenciación sexual las mejores fuentes de nitrógeno suelen ser los aminoácidos o las mezclas de ellos, mientras los compuestos con amonio suelen ser pobres para el desarrollo de ascocarpos debido, tal vez, a la variación del pH que provocan en el medio (Moore-Landecker, 1992).

El desarrollo sexual puede ser alterado por los niveles de nitrógeno presentes en el medio de cultivo. La maduración de los apotecios de *Pyronema domesticum* fue favorecida por casaminoácidos en una concentración de hasta 1 g/l, concentraciones mayores reprimieron la maduración de ascogonios e hifas ascógenas (Moore-Landecker, 1975). En *Neurospora crassa* 25 mM de nitrato de amonio inhibieron la producción de protoperitecios mientras que una concentración de 0.25 mM favoreció su desarrollo (Sommer et al., 1987).

Relación C/N.

Los hongos filamentosos suelen necesitar una cantidad de carbono mayor que la de nitrógeno en el medio de cultivo para completar el desarrollo sexual, de esta manera surge el concepto de la relación carbono/nitrógeno que para muchos autores es característica de cada especie.

Hall (1971), utilizando glucosa o maltosa como fuentes de carbono y nitrato de potasio como fuente de nitrógeno, observó en *Sordaria fimicola* que la mayor cantidad de fructi-

ficaciones se daban dentro de relaciones C/N 5:1 a 10:1, aunque el crecimiento y las fructificaciones aumentaron dentro de este rango con el aumento de las concentraciones de cada fuente. En *Pisolithus tinctorius* las mejores relaciones, usando glucosa y sulfato de amonio, fueron de 10:1 a 20:1 (Smith, 1982).

Pero en otros casos como el de *Leptosphaeria typhae* (Vidal *et al.*, 1975) se determinó que la fructificación variaba de acuerdo a la fuente de carbono utilizada y no a la C/N; así para maltosa fue de 40:1 a 80:1, en glucosa de 40:1 a 160:1 y en xilosa de 7:1 a 18:1.

Minerales, vitaminas y factores de crecimiento.

Los hongos necesitan de determinados elementos inorgánicos llamados esenciales, ya que sin ellos el crecimiento vegetativo decae o se reduce su capacidad de reproducción. Algunos de estos nutrientes minerales son necesarios en cantidades relativamente grandes en el medio de cultivo y son llamados macronutrientes, en contraposición se llama micronutrientes a aquellos de los cuales sólo se necesitan trazas.

Entre los macronutrientes encontramos al magnesio, importante como cofactor de numerosas enzimas e involucrado, junto con el manganeso, en la transferencia de grupos fosfato. Fósforo, componente de macromoléculas como DNA, RNA y fosfolípidos o de moléculas menores como NAD, FAD, vitamina B₁₂ y coenzima A, constituyente de nucleótidos como ATP, GTP, etc. Potasio, involucrado en procesos de transporte de membrana y control osmótico. Azufre, componente de proteínas y vitaminas. Calcio, relacionado a procesos de agregación celular y en el funcionamiento de microtúbulos y microfilamentos.

En el caso de los micronutrientes se desconoce para la mayoría de los hongos su importancia, aunque muchos actúan como cofactores de enzimas; el cobre de varias oxidasas, el molibdeno de la nitrato reductasa, el hierro en grupos hemo y el zinc en la alcohol deshidrogenasa.

Los hongos difieren grandemente en lo que respecta a sus requerimientos de vitaminas, incluso dentro de cepas de una misma especie, aunque estos compuestos son necesarios para el desarrollo. Suelen funcionar como coenzimas o constituyentes de coenzimas.

Muchas vitaminas pueden ser sintetizadas por los hongos pero la mayoría de ellos necesitan tiamina y biotina. Las principales vitaminas son la tiamina, implicada en reacciones de remoción y transferencia de grupos aldehído. Biotina, relacionada con reacciones de carboxilación. Riboflavina, involucrada en el transporte de electrones y los fenómenos de fotorrecepción. Niacina que es un componente del NAD(H) y el NADP(H). Y la piridoxina involucrada en las reacciones de transaminación.

Los llamados factores de crecimiento incluyen a compuestos orgánicos que promueven el desarrollo fúngico sin ser fuentes nutritivas ni actuar como coenzimas. Suelen intervenir en concentraciones pequeñas al igual que las vitaminas.

En muchos hongos, como en *Ceratocysis ulmi* (Marshall *et al.*, 1982), el agregado de ácidos grasos y principalmente ácido linoléico, estimularon el desarrollo de cuerpos fructíferos. En *Armillaria mellea* el agregado de ácido oleico, linoléico y linolénico favorecieron a la iniciación y crecimiento del rizomorfo; pero dichos ácidos grasos no actuaron como fuentes de carbono, la que debió ser agregada al medio para detectar sus efectos (Moody y Weinhold, 1972).

Las hormonas vegetales como el ácido indolacético y la giberelina pueden afectar el crecimiento de los hongos filamentosos. Muchos hongos parásitos de plantas suelen necesitar extractos de sus hospedantes para completar su desarrollo en medios sintéticos.

Concentración del ion hidrógeno.

Los hongos generalmente presentan rangos de pH dentro de los cuales pueden completar su desarrollo, fuera de dichos valores se limitan el crecimiento vegetativo y el desarrollo

sexual. Dichos requerimientos suelen estar relacionados con el hábitat natural del organismo (Moore-Landecker, 1992).

El pH del medio de cultivo puede variar a lo largo del crecimiento fúngico afectando a etapas determinadas del desarrollo. Estos cambios se pueden deber al aumento de bases en el medio por la utilización de aminoácidos y de proteínas, a la utilización de aniones o de cationes, o a la formación de ácidos a partir de compuestos neutros como las sales inorgánicas. En todos los casos se produce un desbalance iónico en el medio a causa del metabolismo fúngico y del tipo de fuente.

Los mecanismos por los cuales el pH afecta al desarrollo son muy diversos. Así, puede alterar la solubilidad de los nutrientes inorgánicos o la actividad de las enzimas extracelulares.

Pero la influencia del pH también depende de las calidades de los distintos nutrientes. Por ejemplo en *Sordaria fimicola* no se observó crecimiento a pH 3.6 ó 3.8, pero si a pH 4.0. aunque el agregado de tiamina a medios con pH 3.6 ó 3.8 favoreció el crecimiento vegetativo y la diferenciación de peritecios (Lilly y Barnett, 1947).

Potencial osmótico y mátrico.

El potencial osmótico y el potencial mátrico del medio de cultivo pueden alterar tanto al crecimiento cuanto a la reproducción de los hongos. En *Saprolegnia diclina* y *S. ferax* sus biomasas y producción de esporas disminuyeron con la reducción del potencial agua con KCl o manitol, o por la disminución del potencial mátrico con PEG 6000 (Smith *et al.*, 1990).

En *Pyrenophora tritici-repentis* (Pfender *et al.*, 1988) y en *Chalara elegans* (Punja, 1992) el crecimiento vegetativo ocurrió dentro de rangos de potenciales agua mayores que los que permitieron el desarrollo reproductivo.

Condiciones atmosféricas.

La atmósfera dentro del entorno de los cultivos contiene una amplia variedad de gases y de metabolitos volátiles.

La aireación constante de cultivos de *Pyronema domesticum* pudo sustituir al requerimiento de luz para la formación de apotecios (Moore-Landecker y Shropshire, 1982).

En *Chaetomium globosum* la producción de peritecios se vio favorecida por el dióxido de carbono, encontrándose su máximo en una proporción del 10% del gas (Buston et al., 1966).

La producción de metabolitos volátiles por parte del micelio pueden inhibir (Moore-Landecker y Shropshire, 1984) o estimular (Basith y Madelin, 1968) la producción de ascocarpos.

Condiciones de cultivo.

Las condiciones bajo las que se cultiva al hongo (medio líquido o sólido, volumen del medio, soportes sólidos, etc.) son importantes y determinan al trabajo experimental. El desarrollo completo, vegetativo y sexual, en un medio de cultivo líquido presenta una serie de ventajas en cuanto al análisis de variables metabólicas que no reúne el medio sólido. Pero en la mayoría de los Ascomicetes el desarrollo sexual no se produce satisfactoriamente en medios de cultivo líquido (Asina et al., 1977; Moore-Landecker, 1992) debido probablemente a la falta de un sustento sólido.

Nectria ditissima es uno de los pocos Ascomicetes en los que se han obtenido fructificaciones en medio líquido estático, aunque para ello requirió de intensidades de luz mayores que las necesarias en medio sólido (Dehorter y Perrin, 1983 b).

El volumen del medio de cultivo puede determinar el desarrollo de un hongo. Para *Magnaporthe salvinii* 15 ml de medio sólido fueron más efectivos en la producción de peritecios que 10 ó 20 ml, y un 1.2 a 2% de agar indujeron un ma-

yor número de fructificaciones que proporciones de agar menores o mayores a las indicadas (Tsuda *et al.*, 1982). En *Pleurotus meliloti*, hongo con esporulación fotoinducible, se obtuvieron picnidios en oscuridad al disminuir la cantidad de medio en la caja de Petri hasta unos 3 ml (Zafar y Colotelo, 1979).

Las características físicas de la superficie del medio de cultivo también pueden alterar el desarrollo. En *Phoma sp.* y *Ascochyta pisi*, ambas con esporulación fotoinducible, se produjeron esporas en oscuridad cuando sobre el medio se colocó un disco de papel de celofán (Suryanarayanan y Swamy, 1981). Los autores postularon un "efecto de contacto" provocado por la presencia del celofán, que favorecería la diferenciación sexual en estos hongos.

Un caso similar se encuentran en *Leptosphaerulina crassiasca*, donde se observó la producción de peritecios en presencia de luz, y almidón o celulosa como fuentes de carbono, pero en medios con mono o disacáridos sólo hubo fructificaciones si se le agregaba una lámina de papel celofán sobre la superficie del medio sólido, (Suryanarayanan y Swamy, 1980). En *Cochliobolus heterostrophus* se obtuvieron peritecios cuando se lo cultivó sobre una membrana de diálisis (Fukuki y Aragaki, 1973).

La luz.

La luz puede estimular o inhibir muchos procesos incluyendo al crecimiento vegetativo, el desarrollo de cuerpos fructíferos, la descarga de esporas y la síntesis de carotenos. Las partes del espectro más efectivas son las del ultravioleta cercano (300-380 nm), azul (380-490 nm), y hasta longitudes de onda que incluyen el verde, amarillo y rojo (490-740 nm) y rojo lejano (mayores de 740 nm).

Crecimiento vegetativo.

Si bien no hay muchos estudios de la influencia de la luz sobre el crecimiento hifal, se encuentran fenómenos tanto

de inducción como de inhibición. Así en *Blastocladiella emersonii* en medio líquido e iluminación, el crecimiento fue tres a cuatro veces mayor que el determinado en oscuridad (Cantino y Horenstein, 1956); pero en *Pyronema domesticum* el crecimiento con iluminación continua fue aproximadamente un 84% menor que el medido en oscuridad (Moore-Landecker y Shropshire, 1982).

Para Carlile (1965) el metabolismo fúngico es similar en luz y en oscuridad mientras las condiciones de cultivo sean óptimas. Un claro ejemplo de esto lo hallamos en *Karlingea rosea* que mostró un buen crecimiento bajo iluminación constante y con glucosa como fuente de carbono, pero cuando se utilizó celobiosa se produjo una disminución (Haskins y Weston, 1950).

Desarrollo sexual.

Muchos hongos no responden a tratamientos lumínicos o sólo muestran cambios en alguna característica de su desarrollo como por ejemplo en el caso de *Ascobolus albidus*, que produjo cleistotecios cuando creció en oscuridad y apotecios en condiciones de iluminación (Ranalli y Cinto, 1972).

Pero cuando existe una respuesta ésta puede ser cuantitativa, cuando se observan variaciones en el número de cuerpos fructíferos, o cualitativa o absoluta si la diferenciación sólo es posible bajo una determinada condición. En el primer caso encontramos trabajos como los de Qureshi y Page (1972), quiénes hallaron en cepas homotéticas de *Nectria haematococca* una mayor producción de peritecios en condiciones lumínicas que en oscuridad. En *Neurospora crassa* se detectó un número de peritecios cinco veces mayor en micelios irradiados con luz azul por 60 segundos que en aquellos crecidos en oscuridad constante (Degli Innocenti *et al.*, 1983).

En muchos casos la luz es esencial para el desarrollo sexual estableciéndose de esta manera una fotodependencia absoluta, como por ejemplo en *Thelebolus stercoreus* (Cooke y Bark, 1964), *Ascobolus magnificus* (Yu, 1954), *Poria ambigua*

(Robbins Hervey, 1960) y *Trametes extenuatus* (Alasoadura, 1963).

La luz puede afectar al desarrollo sexual en distintos momentos, como en *Saccobolus beckii* (Gamundi y Ranalli, 1969) donde la formación de primordios fue independiente de la luz, pero la maduración de los apotecios fue fotodependiente.

También *Pyronema domesticum* requirió de unas 3 a 6 hs. de exposición a la luz blanca durante el tercer día de crecimiento para inducir el desarrollo de los ascogonios y luego, en oscuridad, se observó su expansión y un limitado desarrollo de hifas ascógenas y ascos. Exposiciones de 36 hs. o ciclos de 6:18 hs. de luz y oscuridad favorecieron el desarrollo completo de estas estructuras; y exposiciones mayores que 96 hs. inhibieron la maduración de las ascosporas. Así, los tejidos estériles y paráfisis requirieron para un máximo desarrollo menos luz que el aparato sexual, y fueron reprimidas por exposiciones excesivas (Moore-Landecker, 1979 a y b).

Pero también la luz puede inhibir el proceso de desarrollo sexual como ocurrió en *Gnomonia leptostyla* con la diferenciación de los protoperitecios y su posterior crecimiento (Hayret, 1974). En *Cochliobolus sativus* se detectó un mayor número de peritecios en oscuridad que bajo condiciones fotoperiódicas (Tinline y Dickson, 1958). *Gelasinospora reticulispora* necesitó de unas 30 hs. de oscuridad ininterrumpidas previas a su fotoinducción; la interrupción de dicha fase con breves exposiciones a luz azul o UVc previnieron la formación de peritecios (Inoue y Furuya, 1974 a y b).

Otros factores pueden interactuar con la luz en la determinación del desarrollo sexual, como en *Schizophyllum commune*, que cultivado en un medio rico en nitrógeno perdió su fotodependencia cualitativa y produjo basidiocarpos en oscuridad (Perkins, 1969). La producción de peritecios y de picnidios en *Leptosphaeria microscopica*, *L. eustomoides* y *L. arundinacea* dependió de las condiciones de iluminación, del

sustrato y de la temperatura; dichas especies fueron estimuladas por la luz sólo a 18°C (Roquebert-Hubert y Lacoste, 1971).

En general, la respuesta depende también del tiempo de exposición a la luz y de la intensidad de ésta. *Neurospora crassa* necesitó para su inducción de 1.05 Wm^{-2} de energía de luz azul durante 12 segundos, pero con una intensidad de $5.25 \times 10^{-2} \text{ Wm}^{-2}$ requirió de 240 segundos para lograr un número de peritecios semejante al del primer tratamiento (Degli Innocenti *et al.*, 1983). En contraste otros hongos requieren exposiciones más prolongadas que dificultan la determinación de la dosis necesaria; la producción de peritecios por *Nectria palligena* tuvo una exposición óptima de 7.5 a 15 Wm^{-2} por 12 a 16 hs. entre el 7º y 21º días de cultivo (Dehorter y Lacoste, 1980).

Luz y pigmentación.

La presencia de pigmentos en los hongos es un carácter común y de importancia taxonómica. Muchos pigmentos se acumulan en el micelio, cuerpos fructíferos y esporas, o pueden difundir al medio de cultivo. La síntesis de estas moléculas está determinada por factores genéticos y ambientales, pero de todos ellos la luz surge como uno de los más interesantes.

Los pigmentos son productos derivados del metabolismo secundario generalmente se hallan presentes tanto en luz cuanto en oscuridad, aunque la luz puede actuar favoreciendo los procesos de síntesis. Así se observó que la luz estimulaba la síntesis de melanina en las hifas de varias especies del género *Phomopsis* con exposiciones de solo 20 segundos y con una luminosidad de 860 lx (Ellis y Griffiths, 1975).

En *Phycomyces blakesleeanus* (Galland y Lipson, 1984) y en *Neurospora crassa* (De Fabo *et al.*, 1976) se determinó que la luz regulaba los niveles de carotenos estimulando su síntesis. En *Dacryopinax spathularia* el contenido de ca-

rotenos en sus paredes celulares fue ocho veces mayor en luz que en oscuridad (Vail y Lilly, 1968).

Para *Saccobolus citrinus*, un hongo con fructificación fotocondicionada, la producción de pigmentos aumentó conforme lo hizo el tiempo de iluminación dentro de los períodos de luz y oscuridad alternados a los que fuera expuesto (Mercuri y Porchiassin, 1978).

Fotoinducción y calidad de luz.

Los hongos responden en general a longitudes de onda del ultravioleta cercano (300 a 380 nm) o a radiaciones ultravioleta y azul (320 a 490 nm), siendo menor el número de organismos que lo hace ante longitudes de onda mayores.

Dentro de los que responden a radiaciones ultravioletas se encuentran *Pleospora herbarum* (Leach y Trione, 1966) y *Leptosphaerulina trifolii* (Leach, 1972) con la formación de ascostromas

Con respecto a las respuestas para luz ultravioleta y azul la bibliografía es más numerosa encontrando ejemplos como el de *Ascobolus crenulatus* (Ingold y Oso, 1969), *Sordaria fimicola* (Ingold y Dring, 1957) y *S. macrospora* (Walkey Harvey, 1967) estimulando la descarga de ascosporas; *Nectria haematococca* var. *cucurbitae* (Curtis, 1972) y *Neurospora crassa* (Degli Innocenti et al., 1983) induciendo el desarrollo de peritecios; *Podosordaria leporina* induciendo el desarrollo de estromas y de peritecios (Koehn, 1971); y *Pyronema domesticum* con la inhibición del desarrollo de esclerocios (Moore-Landecker y Shropshire, 1982).

En longitudes de onda mayores se hallan efectos como en *A. crenulatus* con la inhibición de la descarga de ascosporas con luz amarilla (Ingold y Oso, *op. cit.*); *Mycosphaerella ligulicola* y la producción de apotecios en rojo lejano (McCoy et al., 1975).

La temperatura.

Crecimiento vegetativo.

La temperatura juega un papel muy importante en el desarrollo vegetativo regulando la velocidad de crecimiento. Se puede establecer un rango de temperaturas para cada especie dentro de las cuales es posible su crecimiento y dentro del cual se define la temperatura óptima del proceso.

Para la mayoría de los hongos filamentosos la temperatura mínima de crecimiento se halla entre los 0 y 5°C y las máximas oscilan entre los 27 y 45 ó 50°C. Los óptimos para el crecimiento se ubican entre los 18 y 36°C (Lilly y Barnett, 1951; Garraway y Evans, 1984).

Desarrollo sexual.

Los rangos de temperatura dentro de los que se produce la reproducción sexual son más restringidos que los del crecimiento vegetativo, y distintas temperaturas pueden afectar a etapas diferentes del desarrollo. Para *Nectria haematococca* el rango de temperaturas previo a la espermatización fue de 18 a 24°C mientras que el más propicio para el desarrollo de los peritecios y de las ascosporas fue de 21 a 24°C (Dietert *et al.*, 1983).

En general se acepta que la exposición a temperaturas subóptimas afectan mucho más al desarrollo de las hifas ascógenas que a las del sistema estéril, dando como resultado fructificaciones estériles. Esto se observó en *Pyronema domesticum*, que posee una temperatura óptima para el desarrollo sexual de 20°C, y que mostró ascogonios con morfología anormal pero con apotecios fértiles en 5°C, y apotecios estériles cuando creció a 30°C (Moore-Landecker, 1975).

PHOTOCONTROL DEL DESARROLLO

Como se ha visto, la luz puede afectar el desarrollo de los hongos. La señal lumínica es recibida inicialmente por un determinado pigmento o fotorreceptor que tras su fotorreducción u oxidación, isomerización u otro tipo de reacción, la transforma en una señal bioquímica. La señal resulta amplificada ya que un mismo fotorreceptor puede gatillar numerosos procesos metabólicos que en su conjunto, generarían una respuesta fisiológica y morfológica final.

A. RECEPCION DEL ESTIMULO LUMINICO.

Las flavoproteínas como fotorreceptores.

Como se remarcó oportunamente, una de las fotorespuestas más comunes es la del UVc-azul y que puede ser llamada en forma general respuesta al "azul". Sus espectros de acción muestran comunmente picos principales alrededor de 370 y 450 nm y picos secundarios en 430 y 480 nm, sin efectos en longitudes mayores a 520 nm. (Fig 1.2). Estos espectros de acción típicos muestran semejanzas con los espectros de absorción de dos pigmentos comunes presentes en los hongos, carotenos y flavinas, lo que sugiere que ambos grupos de compuestos pueden estar involucrados en la recepción de la señal.

No obstante existen evidencias que sostienen a las flavinas, como principales responsables de las respuestas al azul. Se detectó que la luz azul inducía cambios de absorbancia *in vivo* en varios hongos (Poff y Butler, 1974; Muñoz *et al.*, 1974). Posteriormente Muñoz y Butler (1975) observaron que el cambio de absorbancia inducido por la luz en el micelio de *Neurospora crassa* involucraba la fotoreducción de un citocro-

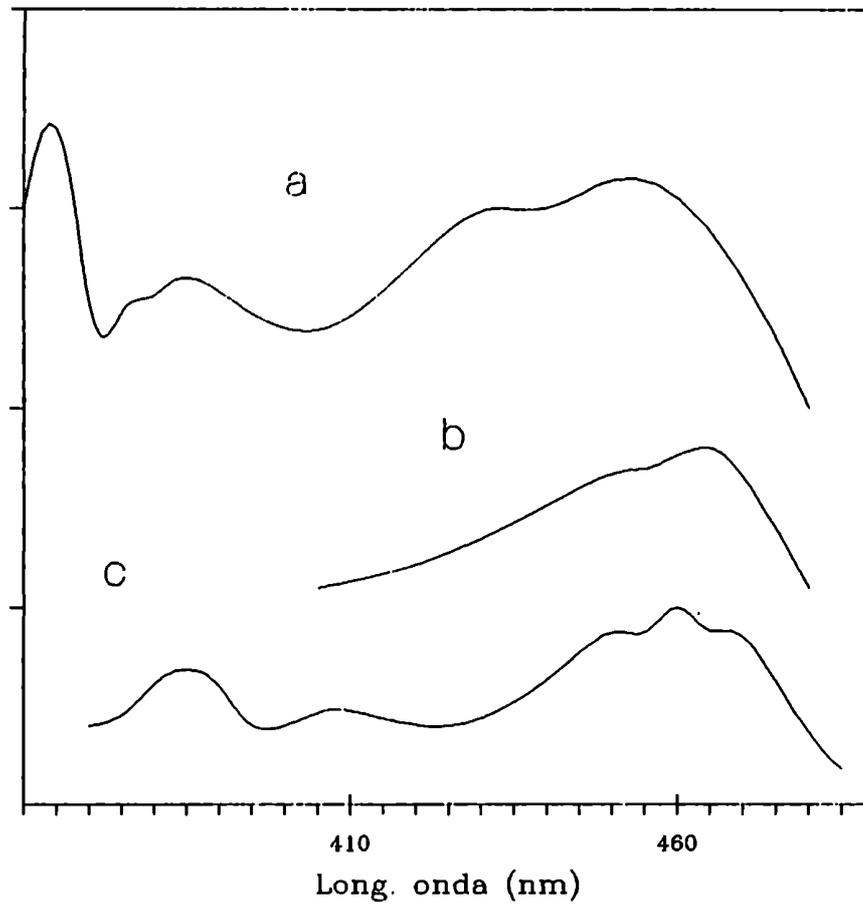


Figura 1.2. Respuestas a la luz azul. Espectros de acción típicos de las respuestas a la luz azul. a, Inducción de peritecios en *Gelasinospora reticulispora* (Inoue y Furuya, 1975); b, activación de carotenogénesis y, c, fotorreducción del citocromo b, ambos en *Neurospora crassa* (Zalokar, 1955).

mo del tipo *b*, con la reducción simultánea de una flavoproteína. Brain *et al.* (1977) hallaron fotoactividad citocromoflavina en fracciones de membrana de *N. crassa*.

Otto *et al.* (1981) observaron como *Phycomyces blakesleeanus* desplazaba su respuesta fototrópica a 529 nm al incorporar roseoflavina, un análogo de la flavina, reforzando la hipótesis de que la riboflavina es el cromóforo del fotoreceptor de luz azul.

El microcromo.

Un caso muy estudiado es el del microcromo presente en algunos Deuteromycetes y asociado a la conidiación (Honda, 1969; Kumagai y Oda, 1969).

Kumagai y Oda (1973) observaron en *Alternaria tomato* una reacción reversible azul/UVC (con picos en 410 y 300 nm) en una fracción intracelular del micelio crecido en oscuridad y mediada por el microcromo. Tras una serie de estudios (Kumagai *et al.*, 1976; Kumagai 1980) se determinó que el mecanismo era complejo, la acción de la radiación UVC sobre un pigmento reducía al segundo pigmento, y la acumulación de este último por encima de un cierto nivel, inducía a la conidiación (Kumagai, 1982).

El efecto inductivo del UVC sobre la conidiación y el efecto represivo de la luz azul, dependieron de las distintas temperaturas aplicadas en distintos momentos del desarrollo (Kumagai, 1989).

B. CONSECUENCIAS INMEDIATAS DE LA ABSORCIÓN DE LUZ.

Micosporine.

Leach (1965 a y b) aisla una sustancia llamada P₃₁₀, posteriormente micosporine, de los micelios inducidos con UVC de *Alternaria chrysantemi*, *Ascochyta pisi*, *Ophiobolus graminis*, *Pleospora herbarum* y *Pyronema omphalodes*. Dicha sustancia no se detectó en los micelios no inducidos pero si

en *A. pisi* cuando crecía en un medio que favorecía su esporulación en oscuridad.

Más tarde el P₃₁₀ fue aislado, y la aplicación en *A. pisi* y *P. herbarum* crecidos en oscuridad indujeron el desarrollo de estructuras reproductivas (Trione *et al.*, 1966).

Dehorter (1976) determinó que el agregado de P₃₁₀ en cultivos de *Nectria galligena* en oscuridad inducía parcialmente el desarrollo de peritecios. Luego se comprueba que las condiciones necesarias para la síntesis de micosporine y el desarrollo de fructificaciones en *N. galligena* eran semejantes (Dehorter y Bernillon, 1983) demostrando que dicha sustancia representaría un intermediario entre la recepción de la señal lumínica y la respuesta biológica.

Buscot y Bernillon (1991) hallan en *Morchella esculenta* el P₂₉₅, sustancia que aumenta en estadios jóvenes y desaparece con la maduración del ascocarpo, y es considerado como precursor metabólico del micosporine.

Papel del AMPc.

Cohen (1974) detectó que luego de una breve exposición a la luz de esporangióforos de *Phycomyces blakesleeanus* se producía una brusca y transitoria disminución de los niveles endógenos de AMPc. Posteriormente se comprobó *in vitro* que la fosfodiesterasa era estimulada por la luz azul (Cohen y Atkinson, 1978), relacionando de esta manera al metabolismo del AMPc con los mecanismos de recepción de la señal lumínica y los cambios en el ritmo de crecimiento de dicho hongo.

En *Saccobolus platensis*, hongo con fructificación fotoinducible, el agregado de AMPc o compuestos relacionados indujeron la fructificación en oscuridad, y la inhibición de la fosfodiesterasa de AMPc gatilló el desarrollo de apotecios en oscuridad, previa acumulación de AMPc (Galvagno *et al.*, 1984).

En *Coprinus macrohizus* (Uno e Ishikawa, 1973; Uno *et al.*, 1974) se encontró una estrecha relación entre el nivel de AMPc, las enzimas relacionadas con su metabolismo y la fo-

toinducción del desarrollo de los basidiocarpos. Una cepa monocarionte, incapaz de fructificar, mostró niveles de AMPc muy bajos y ninguna actividad de las enzimas involucradas.

En *Achlya americana* y *Saprolegnia ferax* el aumento del AMPc promovió el crecimiento vegetativo por el aumento de la actividad de lipoxigenasas, al tiempo que el GMPc favoreció la reproducción suprimiendo la actividad de dichas enzimas (Herman *et al.*, 1990).

AMPc y el metabolismo del glucógeno.

Actualmente se acepta la posibilidad de que el metabolismo del glucógeno se encuentre ligado al proceso de reproducción en muchos hongos, ya que se ha detectado un aumento en la actividad de la enzima glucógeno fosforilasa previo a la diferenciación de estructuras sexuales (Chiu y Cheung, 1991; Ji y Moore, 1993; Jirjis y Moore, 1976).

Pero también se encuentran relacionados el metabolismo de dicho polisacárido con el del AMPc y la inducción lumínica. En *C. macrorhizus* el agregado de AMPc a extractos miceliales activaron a la enzima glucógeno fosforilasa e inhibieron a la glucógeno sintetasa, iniciándose una vía metabólica que condujo a la formación de basidiocarpos (Uno e Ishikawa, 1976, 1978).

También el AMPc pudo inhibir otras quinasas de proteínas requeridas sólo para el crecimiento vegetativo, y algunas de ellas relacionadas con el metabolismo del glucógeno (Uno e Ishikawa, 1982).

En *S. commune* la mayoría del glucógeno disminuye fuertemente dentro de las 8 hs. siguientes de su transferencia a la luz, y se detectó un agudo incremento del AMPc previa a la disminución del polisacárido (Yli-Mattila, 1987).

Antecedentes y Objetivos

Loddohanus carneus (Pers.: Pers.) Koud., es una Ascobolaceae homotática, coprófila cuyo cultivo fuera estudiado inicialmente por Gamundí y Ranalli (1964). En dicho análisis se observó que el organismo desarrollaba apotecios cuando el medio de cultivo era PF y bajo condiciones de luz o de oscuridad constantes y a temperatura ambiente (20-25°C), a 29°C los apotecios eran abortivos en oscuridad.

No se observaron fructificaciones en estiércol de vaca tindalizado incubado en condiciones de oscuridad continua, tanto a temperatura ambiente cuanto a 29°C; sí las había en condiciones de iluminación constante.

Posteriormente fue analizado su desarrollo y citología (Mouso de Cachi y Ranalli, 1989).

Valadon *et al.* (1980) estudiaron sus carotenos encontrando principalmente (*trans*-Neurosporaxantina-metil éster (44.7%), neurosporaxantina (33.2%), fitoeno (10.5%) y otras ocho fracciones menores.

El objetivo del presente estudio fue el de analizar la influencia de distintos factores ambientales sobre el crecimiento vegetativo, el desarrollo sexual y la pigmentación de *L. carneus*. Para ello se investigaron factores químicos como la cantidad y calidad de las fuentes de carbono y de nitrógeno, y factores físicos como la luz y la temperatura.

Se analiza, cuando sea oportuno, la acción conjunta de dos factores ambientales sobre el desarrollo.

Se estudian también las relaciones que puedan existir entre el crecimiento vegetativo y su grado de madurez, el metabolismo del glucógeno y el desarrollo sexual, para tratar de comprender algunos de los mecanismos que diferencian y controlan a cada uno de los procesos.

Materiales y Métodos

A. ORGANISMO.

utilizó la cepa monospórica DAFC (Herb.) 21104 de *Iodophanus carneus* (Pers.: Pers.) Koud.

Los cultivos se conservaron a 5°C en medio PF.

Obtención de cultivos monospóricos.

Para la obtención de cultivos monospóricos se procedió de la siguiente forma:

i- Siembra del inóculo en estiércol de vaca tindalizado en caja de Petri y posterior cultivo en cámara a 23°C e iluminación constante.

ii- A partir del 80 día de cultivo los ascos maduros comenzaron a expulsar las esporas con violencia; se invirtieron entonces bases de cajas de Petri con agar agua sobre los cultivos para recogerlas.

iii- Las esporas germinaron espontáneamente en un alto porcentaje tras 24 hs. de exposición a 23°C y luz constante.

iv- Se realizaron los cultivos monospóricos extrayendo bloques de agar agua conteniendo una punta de hifa y repicándole en tubos de ensayo con medio PF.

v- Los tubos se incubaron en cámara a 23°C e iluminación constante.

vi- Finalmente, con la aparición de apotecios, los tubos fueron almacenados a 5°C.

B. MEDIOS DE CULTIVO.

Medio agar agua.

Medio PF.

Extracto de levadura (Difco)	3 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 ml

En cajas de Petri o tubo, con un disco o tira de papel de filtro Schleicher & Schull Nº 595.

Medio sintético (sólido y líquido).Medio basal.

SO ₄ Mg.7H ₂ O	0.5 g
PO ₄ H ₂ K	0.5 g
PO ₄ HK ₂	0.6 g
SO ₄ Cu.5H ₂ O	0.4 mg
Cl ₂ Mn.4H ₂ O	0.09 mg
BO ₄ H ₃	0.07 mg
MoO ₂ Na.2H ₂ O	0.02 mg
Cl ₃ Fe	1 mg
Cl ₂ Zn	10 mg
Biotina	5 µg
HCl-Tiamina	0.1 mg
Agua bidestilada	hasta 1000 ml
Agar (para medio sólido)	18 g

Fuentes de carbono.

Las siguientes representan las fuentes de carbono ensayadas siempre en una concentración de 3 g de C/l de medio de cultivo. Se las expresa como g de sustancia por 1000 ml de medio basal (sólido o líquido):

D(-) Ribosa	7.50 g
D(+) Xilosa	7.50 g
D(-) Arabinosa	7.50 g

D(+)	Manosa	7.50 g
D(+)	Galactosa	7.50 g
D(+)	Glucosa	7.50 g
D(-)	Fructosa	7.50 g
D(+)	Sacarosa	7.13 g
D(+)	Maltosa	7.13 g
D(+)	Melibiosa	7.13 g
D(+)	Celobiosa	7.13 g
D(+)	Rafinosa	6.99 g
D(-)	Inulina	6.99 g
	Sorbitol	7.60 g
	Manitol	7.60 g
	Almidón soluble	7.13 g
	Carboximetilcelulosa	7.13 g

Cuando se modificaron las cantidades de glucosa y fructosa los medios de cultivos estuvieron formados por medio basal, asparagina 0.2 g de N/l y las siguientes cantidades del azúcar en cuestión por 1000 ml de medio:

0 g de C/l	0 g
1 g de C/l	2.50 g
2 g de C/l	5.00 g
3 g de C/l	7.50 g
4 g de C/l	10.00 g
5 g de C/l	12.50 g

Fuentes de nitrógeno.

A continuación se indican las fuentes de nitrógeno ensayadas siempre en una concentración de 0.2 g de N/l de medio de cultivo. Se las expresa como g de sustancia por 1000 ml de medio basal (sólido o líquido):

NaNO ₃	1.21 g
KNO ₃	1.44 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.94 g

NH ₄ NO ₃	0.56 g
Acetato de amonio	1.10 g
Tartrato de amonio	1.31 g
Urea	0.43 g
Alanina	1.27 g
Asparagina	0.94 g
Glicina	1.07 g
Glutamina	1.04 g
Metionina	2.13 g
Prolina	1.64 g
Leucina	1.87 g
Fenilalanina	2.36 g
Triptofano	1.46 g

Quando se modificaron las cantidades de asparagina los medios de cultivo estuvieron formados por medio basal, glucosa 3 g de C/l y las siguientes cantidades del aminoácido por 1000 ml de medio:

0 g de N/l	0 g
0.05	0.24 g
0.1	0.48 g
0.2	0.96 g
0.4	1.92 g
0.8	3.84 g

Relación C/N.

Para la variación de las concentraciones de glucosa y asparagina manteniendo C/N constante, se utilizó el medio basal más las siguientes cantidades de una y otra fuente por 1000 ml de medio:

Glucosa	Asparagina
2.50 g (1 g C/l)	0.33 g (0.07 g N/l)
5.00 g (2 g C/l)	0.85 g (0.18 g N/l)

7.50 g (3 g C/l)	0.96 g (0.20 g N/l)
10.00 g (4 g C/l)	1.27 g (0.27 g N/l)
12.50 g (5 g C/l)	1.56 g (0.33 g N/l)

Medio de cultivo normal.

El medio más utilizado fue el de glucosa 3 g de C/l y asparagina 0.2 g de N/l más el medio basal. El pH final, después de autoclavado, fue de 6.2.

Todas las drogas fueron de grado analítico.

Esterilización.

Los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C, 1 kg/cm², 20 minutos. La urea se esterilizó por filtrado a través de membrana nitrocelulósica de 0.2 µm de poro, y agregada estérilmente al resto del medio previamente autoclavado.

C. CONDICIONES DE CULTIVO.

Los cultivos en medio sólido se realizaron en cajas de Petri de 90 mm de diámetro con 20 ml de medio. Los cultivos en medio líquido se realizaron en frascos Erlenmeyer de 50 ml de volumen con 5 ml de medio. El volumen de los Erlenmeyers y el del medio sólido y líquido sufrieron modificaciones en algunos ensayos, las mismas serán indicadas oportunamente.

Las determinaciones en el medio sólido se realizaron en el 14º día y las de medio líquido en el 8º.

Se realizaron tres experiencias por duplicado.

Inóculos y siembra.

Se inculó con cubos de unos 3 mm de lado, tomados de los bordes de una colonia crecida en oscuridad durante dos días sobre agar agua.

Las siembras se realizaron bajo una luz Eastman-Kodak de 600 nm.

Incubación.

Los cultivos en medio sólido se incubaron en cámara de cultivo New Brunswick Psicrotherm G-27, a 23 ± 0.25 °C, con cuatro tubos fluorescentes Philips Luz Día estándar de 20 W cada uno, los que generaron una intensidad de 300 b/p. Para los tratamientos de oscuridad, las cajas fueron envueltas en plástico negro e incubadas en la misma cámara.

Los cultivos en medio líquido se realizaron en condiciones estáticas y a los de oscuridad se los introdujo en cajas de cartón, siempre en la misma cámara.

Variación de la temperatura.

Se realizaron cultivos con temperaturas de 18, 23 y 28°C (± 0.25) las que se obtuvieron regulando la cámara de cultivo.

Intensidad lumínica.

Se la midió con un fotómetro Photovolt 200.

Cuando se ensayaron distintas intensidades estas fueron de 10, 50, 100, 300 y 500 b/p. Las mismas se lograron variando la distancia de las cajas a la fuente de luz y envolviéndolas, en algunos casos, en papel translúcido.

Calidad de luz.

Se lograron utilizando los siguientes filtros de acetato: azul, con un máximo de transmisión en 440 nm y rojo con un máximo en 620 nm. Para la banda ultravioleta cercano se usaron dos tubos Philips TL 40W/O8RS con pico de emisión a 350 nm (Fig. 2.1).

Materiales y métodos.

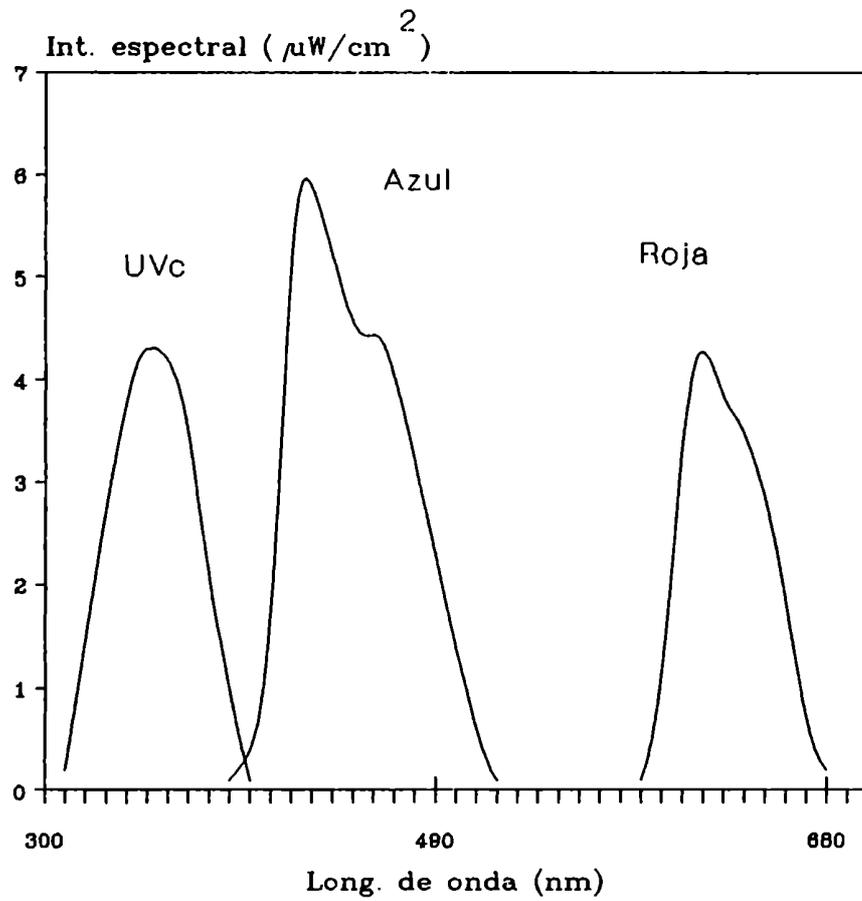


Figura 2.1. Intensidad espectral. Gráficos de intensidad espectral de las calidades de luz utilizadas.

D. DETERMINACIONES.

Crecimiento.

En los cultivos sólidos se midió el radio de las colonias con un calibre en distintos momentos del crecimiento. Se realizaron tres experiencias por triplicado.

En medio líquido el micelio fue cosechado con la ayuda de una pinza, y lavado por sucesivos pasajes de agua bidestilada. El micelio fue pesado tras el secado en estufa a 70°C durante 18 horas sobre papel de filtro.

Número y diámetro de los apotecios.

Se contó la totalidad de los apotecios producidos por caja con un contador de colonias New Brunswick Scientific C-110; se diferenciaron tres zonas dentro de cada colonia que se detallan oportunamente, y sobre las que se hicieron recuentos parciales.

El diámetro se determinó bajo lupa aumentado 80 veces, con ocular graduado y tarado. El número de apotecios medidos por caja varió dependiendo de la productividad bajo las condiciones dadas, llegando a un máximo de 40.

Medición del pH.

El pH del medio de cultivo líquido fue determinado con un pHmetro Photovolt 110 con electrodo de vidrio.

Métodos químicos (medio líquido).

Proteínas totales del micelio.

Se hidrolizaron muestras de micelio seco y molido con NaOH 1N a 100°C durante 30 minutos, se las dejó 60 minutos a temperatura ambiente para ser finalmente centrifugadas a 2000 g, 10 minutos.

Se determinó la concentración de proteínas en alícuotas del sobrenadante agregadas a 3 ml del reactivo de Bradford (1976). Las lecturas se realizaron a 590 nm con un estándar de albúmina bovina (Sigma) en solución 1 mg/ml.

Glucógeno.

Las muestras fueron homogeneizadas en potter con 1 ml de agua bidestilada refrigerada; la extracción se repitió tres veces para llevar la muestra a 5 ml finales en tubo graduado. Se centrifugó a 2000 g, 20 minutos.

Se determinó el glucógeno por el método de Krisman (1962) leyendo a 460 nm y el estándar fue de glucógeno de hígado de conejo Tipo III (Sigma) en solución 1 mg/ml.

Los resultados de este método fueron erráticos debido probablemente a los pigmentos contenidos en el micelio.

Glucosa residual.

Se utilizaron dos métodos. El de Fleming y Pegler (1963) usando glucosa oxidasa (Tipo VII), peroxidasa (Tipo II) y o-dianisidina (Sigma). A la muestra de medio de cultivo se le agregó 1 ml del reactivo, se incubó durante 60 minutos a 25°C; se agregaron 2 ml de ácido sulfúrico 5 N. Se usó un patrón de glucosa (Mallinckrodt) de 1 mg/ml y se leyó a 525 nm.

El segundo fue el de Somogyi (1952) y Nelson (1944). Se agregaron a 0.1 ml de muestra 0.4 ml de agua destilada y 0.5 ml de reactivo, se calentó a 100°C durante 15 minutos, luego de enfriado se le agregaron 6 ml de agua destilada. Se usó un patrón de glucosa (Mallinckrodt) de 1 mg/ml y se leyó a 540 nm.

Hidratos de carbono totales.

Se utilizó el método de Dubois *et al.* (1956). Las muestras, secadas y molidas, fueron suspendidas en 0.5 ml de agua destilada y 0.5 ml de fenol 5%, luego de agitado se les agregó SO_4H_2 concentrado. Se utilizó un patrón de glucosa (Mallinckrodt) de 1 mg/ml y se leyeron a 480 nm.

Métodos histoquímicos.

Glucógeno.

Se tiñó el micelio cubriéndolo con I₂/KI por dos minutos, luego se secó el exceso con papel de filtro y se observaron las hifas directamente al microscopio con aumentos de 100 y 400 x. La coloración, pardo rojiza, fue estable por unos 8 minutos.

E. AGREGADOS.

Se prepararon soluciones acuosas de las siguientes sustancias: N⁶, O²-dibutiril monofosfato de adenosina 3'-5' cíclico (4 mM); D(+) Glucosa (6 g de C/l); D(-) Arabinosa (6 g de C/l); Asparagina (0.4 g de N/l) y extracto de levadura (6 g/l).

Se aplicó una gota de solución sobre la colonia crecida en oscuridad durante el 50 día de crecimiento, salvo otra indicación. Se utilizó agua bidestilada como control.

Las aplicaciones se realizaron en oscuridad bajo luz roja y se continuó la incubación en oscuridad hasta el 140 día.

Se realizaron tres experiencias por duplicado.

F. EXTRACCION DE PIGMENTOS.

Las colonias crecieron en oscuridad, luz blanca, azul o UVc constantes y se extrajeron el 80 día. El micelio, seco y molido, fue suspendido en CHCl₃ por 15 minutos y luego centrifugado a 2000 g durante 20 minutos.

La lectura e impresión del espectro de absorción de los pigmentos se realizó, punto por punto, con un espectrofotómetro Jasco 7850 UV/VIS, entre 300 y 600 nm contra un blanco de CHCl₃.

G. GRAFICOS Y ESTADISTICOS

Los gráficos fueron realizados con el programa Harvard Graphics, v. 2.30 (1990) de Software Publishing Corp. Los promedios y errores fueron calculados con el programa GraphPad InStat tm, v. 2.02 (1993) de GraphPad Software.

Resultados y Discusión

CINETICA DE CRECIMIENTO

Resultados

Se utilizó el medio basal con glucosa (3 g de C/l) y asparagina (0.2 g de N/l). Las experiencias fueron realizadas a 23°C e iluminación constante de 300 b/p.

Medio sólido.

Las colonias alcanzaron el borde de la caja de Petri al 50 día (Fig. 3.1) con velocidades lineales de crecimiento que aumentaron progresivamente desde 4.7 ± 0.53 mm/día durante el 10 día, hasta unos 11.5 ± 0.78 mm/día en el 50. Desde ese momento el micelio mostró una coloración naranja cuya intensidad aumentó hasta el 70 día.

Los protoapotecios aparecieron a partir del 50 día para llegar a la madurez en el 80. El número total de apotecios maduros por caja aumentó durante toda la experiencia, aunque de manera más marcada desde el 70 día al 100 (Fig. 3.1). En lo referido a sus diámetros se produjo un máximo alrededor del día 150 alcanzando valores que fluctuaron entre 600 y 1000 μm , desde entonces sus dimensiones disminuyeron.

La distribución de los cuerpos fructíferos sobre la colonia demostró la existencia de tres zonas claramente definidas de acuerdo a la edad o grado de desarrollo del micelio. La primera se halló entre los 0 y 23-26 mm de radio de la colonia comprendiendo a los 3 primeros días de crecimiento, en ella las fructificaciones se distribuyeron homogéneamente y su número fue reducido bajo las condiciones experimentales dadas (Fig 3.2). La segunda se prolongó hasta unos 30-33 mm de radio incluyendo así al micelio crecido durante el 40 día, y fue la de mayor cantidad de apotecios maduros.

Cinética de crecimiento. Resultados.

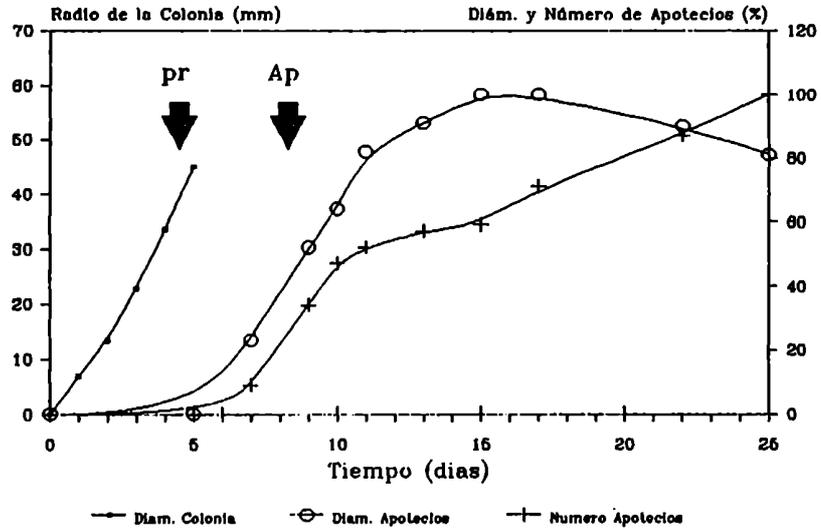


Figura 2.1. Desarrollo en medio sólido. Evolución del radio de la colonia, y del diámetro y número de fructificaciones en función del tiempo. pr, protoapotecios; Ap, apotecios maduros.

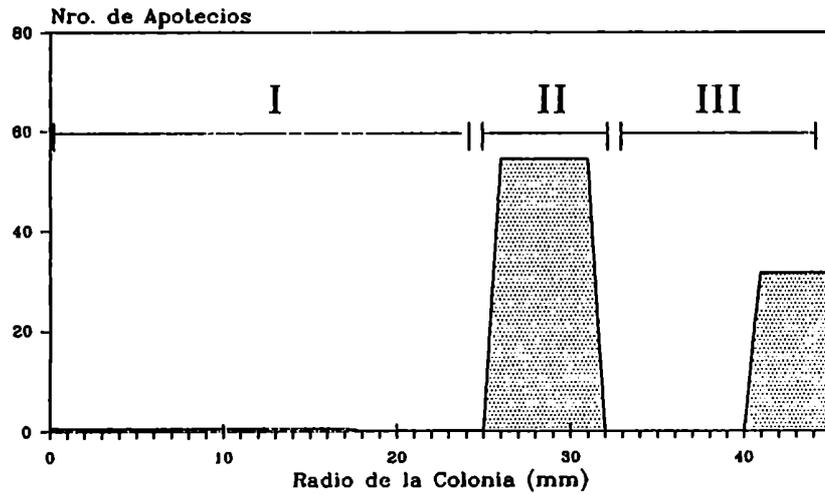


Figura 3.2. Distribución de apotecios. Distribución de los apotecios sobre las colonias, indicando las cantidades relativas de cada zona.

La tercera se desarrolló hasta el borde de la caja de Petri y coincidió con el micelio crecido durante el 50 día, dentro de ella los cuerpos fructíferos aparecieron en los últimos 5-6 mm.

Medio líquido.

La curva de crecimiento se representa en la figura 3.3. *I. carneus* demostró, como en el medio sólido, una gran rapidez en el desarrollo con una etapa lag breve y una fase exponencial que culminó en un pico de crecimiento en el 80 día (4.3 ± 0.47 mg de peso seco/ml de medio de cultivo). A lo largo de este período el micelio formó una trama compacta de color naranja muy intenso que ocupó paulatinamente la totalidad del medio de cultivo. Luego del máximo se inició la etapa de decaimiento, muy marcada en sus comienzos pero leve desde el día 110 hasta el final de la experiencia, y en la cual el micelio apareció vacuolizado, formando una trama de apariencia floja y de color naranja pálido.

El desarrollo de apotecios maduros bajo estas condiciones de cultivo fue desigual, su número varió entre 2 y 12 por frasco, pero cuando los hubo su crecimiento se inició durante el 70 día para completar su maduración en el 110.

Las proteínas totales del micelio se comportaron de igual manera que su peso seco con un máximo de 168.7 ± 8.44 µg de proteínas/ml de medio de cultivo en el día 80 (Fig. 3.3).

El contenido de glucosa del medio de cultivo disminuyó drásticamente hasta llegar a niveles mínimos en el 80 día (Fig. 3.4) coincidiendo con el pico de crecimiento vegetativo, mientras que los hidratos de carbono totales del micelio progresaron hasta un máximo en el 60 día (153.5 ± 11.4 µg/mg de micelio) para disminuir abruptamente hacia el 70 y luego más sutilmente (Fig. 3.4).

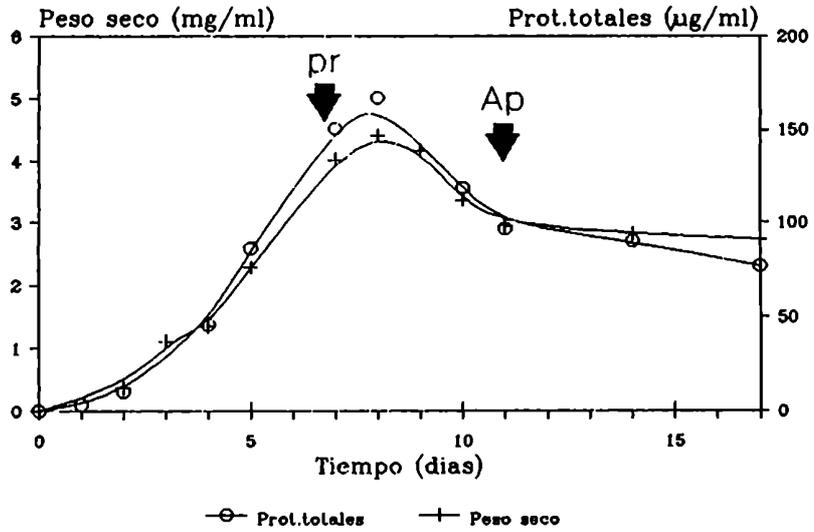


Figura 3.3. Desarrollo en medio líquido. Variación del peso seco y de las proteínas totales del micelio en medio líquido. pr, protoapotecios; Ap apotecios maduros.

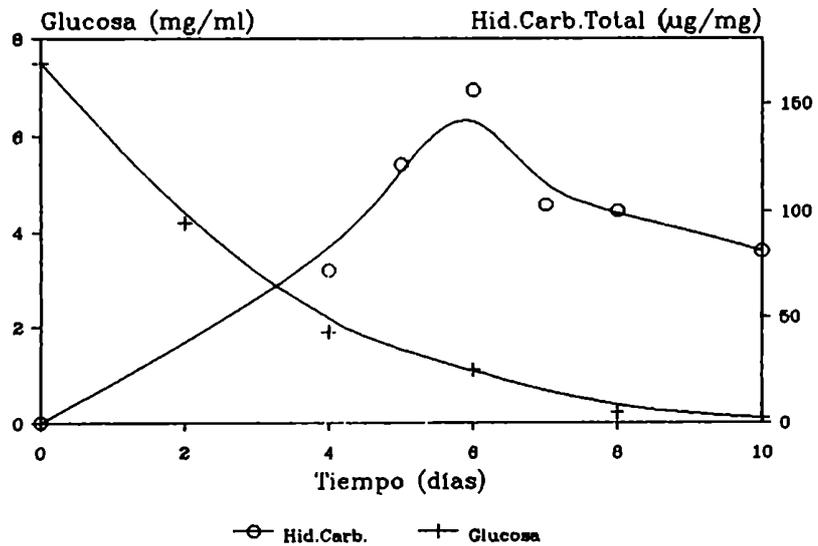


Figura 3.4. Glucosa residual e hidratos de carbono totales. Comportamiento de la glucosa residual y de los hidratos de carbono totales del micelio en medio líquido.

Discusión

I. carneus mostró una gran velocidad de crecimiento hifal en medio sólido al cubrir la totalidad de la placa en 5 días, 7 menos que el evidenciado en otras Ascobolaceas como *Saccobolus platensis* (Forchiassin, 1989). En medio líquido y condiciones estáticas de cultivo llegó a su máximo crecimiento el 80 día, pero si bien estas condiciones no son las más usadas se encuentran registros como el de *Calonectria camelliae* (Sandhu y Kalra, 1985) que llegó al pico de crecimiento al 60 día y al 40 en condiciones de agitación, o los observados en *Nectria catalinensis* (Pardo y Forchiassin, 1993 a) con un pico en el día 290 sin agitación y en el 200 con agitación. *S. platensis* (Forchiassin y Diorio, en prensa) presentó un máximo al 100 día y *Ascobolus furfuraceus* (Groisman et al., 1981) al 160, ambos cultivados en condiciones de agitación; todos ellos con menores crecimientos que los de *I. carneus*.

El número de cuerpos fructíferos en *I. carneus* en medio sólido aumentó durante toda la experiencia y el tamaño de los apotecios registró una disminución en el día 170 producto de la liberación de esporas y/o del desarrollo de nuevos apotecios jóvenes que disminuyeron los promedios.

Los apotecios se desarrollaron dentro de áreas bien definidas dentro de las colonias y relacionadas con el grado de madurez de las hifas. La presencia de un mayor número de fructificaciones maduras dentro de la zona II (correspondiente al 40 día de crecimiento) indicaría que es en ella donde se inicia el proceso sexual y los ascocarpos de las zonas I y III surgirían posteriormente por la difusión de sustancias inductoras desde la zona II o por inducciones locales de áreas de microdesarrollo.

En medio líquido el desarrollo de las fructificaciones se mostró relacionado con la biomasa, la glucosa re-

sidual del medio de cultivo y los hidratos de carbono totales del micelio. El máximo crecimiento fue alcanzado cuando la glucosa residual fue mínima. *Sordaria fimicola* mostró un pico de crecimiento el día 160 lo que coincidió con el agotamiento de la glucosa del medio (Bretzloff, 1954), *Acremonium persicinum* alcanzó su máximo crecimiento tres días después del agotamiento de la glucosa que ocurrió en el 40 (Pitson et al., 1991). Esta relación se corresponde con la acumulación de sustancias de reserva por parte del micelio durante su crecimiento lineal y su posterior consumo cuando la fuente de carbono del medio se ha agotado. Relaciones similares entre glucosa residual - crecimiento vegetativo - glucógeno fueron hallados en *A. furfuraceus* (Mercuri et al., 1984) y en *S. platensis* (Forchiassin y Diorio, op. cit.). Si bien en *I. carneus* no se pudo determinar el glucógeno por la interferencia de sus pigmentos con el método, se puede considerar que los hidratos de carbono totales determinados representarían en gran medida el comportamiento de ese polímero en el organismo; si esto fuera así los datos obtenidos se corresponderían con lo registrado en otros hongos.

El inicio de la producción de apotecios fue en los momentos previos al pico de crecimiento completándose su desarrollo durante la fase de autólisis. En *Nectria ditissima* (Dehorter y Perrin, 1983 b) y *N. galligena* (Dehorter y Bernillon, 1983) los primordios de los peritecios aparecieron en los cultivos líquidos el mismo día del pico de crecimiento para la primera (80 a 90), o tres días después en la última (pico en el día 110 y primordios en el 140), completándose el desarrollo sexual en ambos casos durante la etapa de autólisis. Por otro lado en *Sordaria fimicola* la glucosa fue consumida en el 90 día de crecimiento llegando al pico en el día 110, pero las fructificaciones aparecieron mucho antes, en el 40 día (Hall, 1971).

En medio sólido el desarrollo sexual se inicia cuando la colonia ha alcanzado el borde de la caja de cultivo; en ese momento se puede asumir que la concentración de glucosa

del medio debió reducirse notoriamente. Una prueba de ello son los resultados obtenidos en *Rhizoctonia cerealis* (Robson *et al.*, 1987), donde conforme la colonia avanzaba sobre el medio de cultivo sólido, la glucosa disminuía hasta ser consumida totalmente en las áreas más maduras.

Por lo tanto el modelo propuesto para el desarrollo en medio líquido en cuanto a la fructificación y su relación con la disponibilidad de carbono en el medio, podría ser extrapolado al medio sólido.

De esta manera se observa una estrecha relación entre biomasa - glucosa residual - sustancias de reserva - desarrollo sexual, en un medio de cultivo y en otro. Como se verá más adelante, muchos autores coinciden en relacionar el metabolismo del glucógeno con la diferenciación sexual.

NUTRICION CARBONADA Y NITROGENADA

Resultados

A. VARIACION DE LA CONCENTRACION DE CARBONO Y DE NITROGENO.

Se realizaron cultivos de *I. carneus* con medio basal y glucosa o fructosa como fuentes de carbono en concentraciones que variaron entre 0 y 6 g de C/l (con asparagina 0.2 g de N/l), y cultivos variando la concentración de asparagina de 0 a 0.8 g de N/l (con glucosa 3 g de C/l). Todas las experiencias se hicieron a 23°C y con iluminación constante de 300 b/p. Las determinaciones se realizaron en el día 14 para el medio sólido y en el 8 para el líquido.

Variación de carbono en medio sólido.

Para las concentraciones de glucosa de 0 y 1 g de C/l el número de apotecios totales fue reducido detectándose el mayor número de ascocarpos con 2 g de C/l (Fig. 3.5). Concentraciones mayores provocaron una disminución de dicha respuesta y a partir de 5 g de C/l se observó únicamente crecimiento vegetativo. En fructosa se desarrollaron apotecios con una concentración de 1 g de C/l y su número fue en aumento hasta los 3 g de C/l (Fig. 3.6), observándose a partir de los 4 g de C/l sólo crecimiento vegetativo.

El diámetro de los apotecios aumentó con el incremento de las concentraciones de una u otra fuente (Figs. 3.7 y 3.8), aunque siempre fueron mayores los desarrollados en glucosa.

El análisis de los ascos desarrollados por apotecio arrojó los siguientes resultados: En glucosa, de 0 a 1 g de C/l se encontraron solo cuerpos fructíferos sin ascos maduros (Fig. 3.5), de 2 a 3 g de C/l se hallaron números mayores a

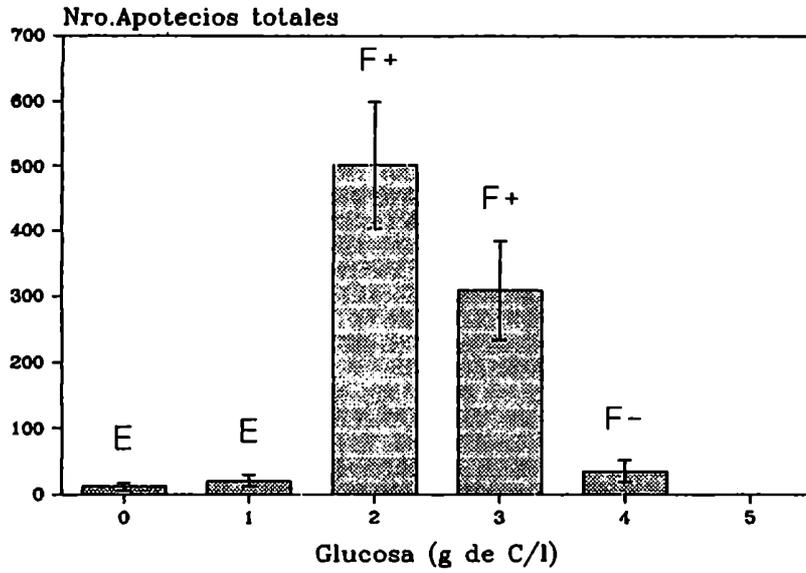


Figura 3.5. Número de apotecios en glucosa. Número de apotecios totales por caja en distintas concentraciones de glucosa. E, sin ascos; F-, menos de 40 por apotecio; F+, 40 ó más por apotecio.

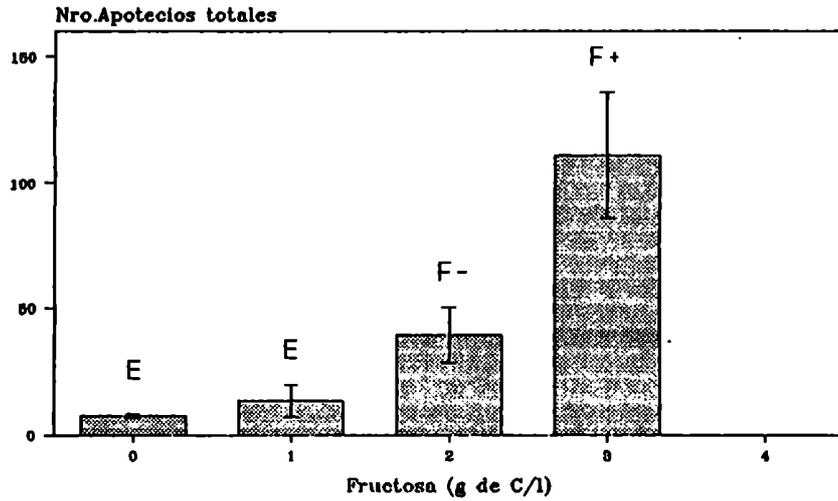


Figura 3.6. Número de apotecios en fructosa. Número de apotecios totales por caja en distintas concentraciones de fructosa. E, sin ascos; F-, menos de 40 por apotecio; F+, 40 ó más por apotecio.

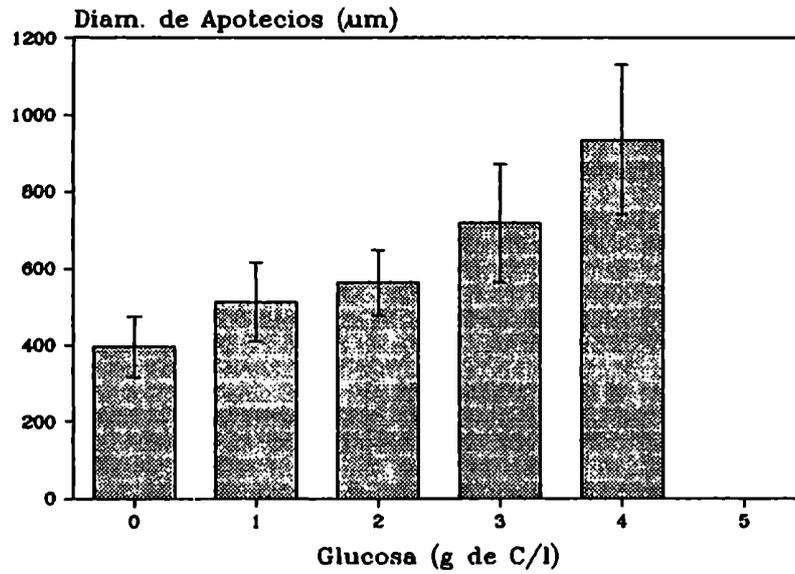


Figura 3.7. Diámetro de apotecios en glucosa. Variación del diámetro de los apotecios ante distintas concentraciones de glucosa.

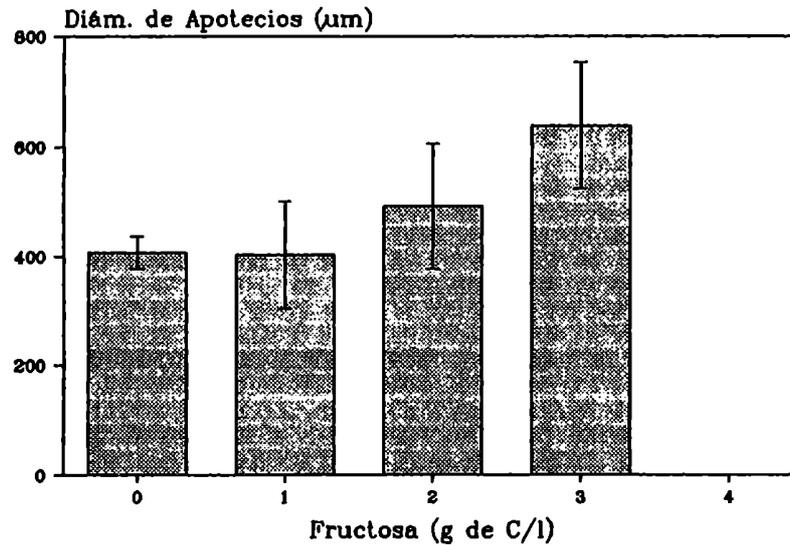


Figura 3.8. Diámetro de apotecios en fructosa. Variación del diámetro de los apotecios ante distintas concentraciones de fructosa.

40 ascos por apotecio, y en 4 g de C/l el número fue menor a 39 por apotecio. Para fructosa, en 1 g de C/l los apotecios no presentaron ascos maduros (Fig. 3.6), con 2 g de C/l menos de 39 ascos por apotecio y en 3 g de C/l se obtuvieron más de 40.

En ambos casos el color de los apotecios fue naranja intenso mientras que el del micelio se hizo más intenso conforme aumentaron las concentraciones de los monosacáridos.

Variación de nitrógeno en medio sólido.

El mayor número de apotecios totales por caja se encontró en una concentración de asparagina de 0.2 g de N/l (Fig. 3.9), el aumento o la disminución de este valor influyó negativamente sobre dicha medida aunque su reducción fue más crítica: con 0.05 g de N/l de asparagina sólo hubo crecimiento vegetativo y con 0.1 g de N/l el número de fructificaciones fue muy pequeño (menos de 14 ascocarpos por caja). El testigo sin fuente de nitrógeno no creció.

El diámetro de los apotecios mostró un máximo en 0.2 g de N/l (Fig. 3.10).

En cuanto a la formación de ascos maduros sólo fueron registrados en concentraciones de 0.2 g de N/l o superiores y siempre en números mayores a los 40 por apotecio (Fig. 3.9). El color de los apotecios fue siempre naranja intenso aunque más acentuado en las concentraciones de 0.2 a 0.4 g de N/l.

Variación de carbono y de nitrógeno en medio líquido.

A medida que aumentó la concentración de glucosa también lo hizo el crecimiento vegetativo (Fig. 3.11) hallándose en general como puntos importantes el crecimiento en el testigo sin glucosa (0.5 ± 0.01 mg/ml) y el desarrollo parejo medido para 3 y 4 g de C/l. El color del micelio fue naranja intenso para las concentraciones de 0 a 3 g de C/l, mientras que en 4 y 5 g de C/l el micelio fue más claro y vacuolizado.

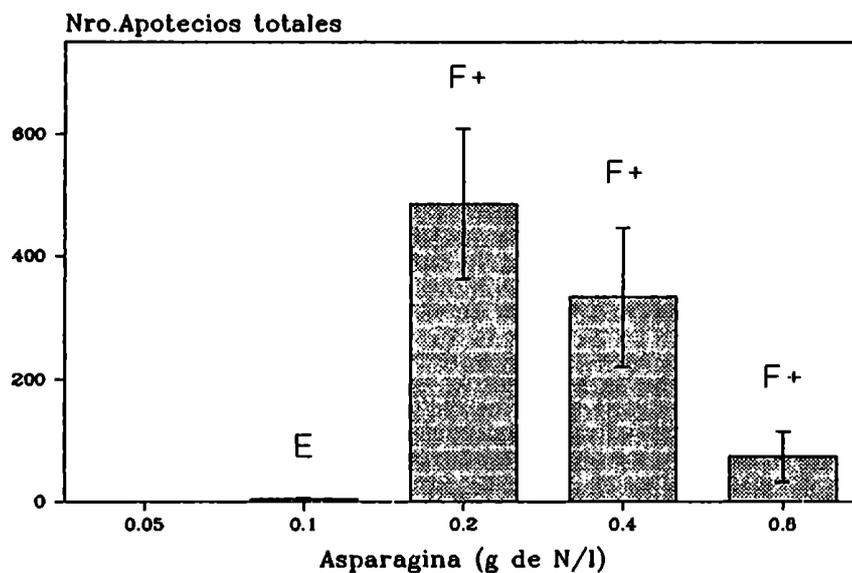


Figura 3.9. Número de apotecios en asparagina. Número de apotecios totales por caja en distintas concentraciones de asparagina. E, sin ascas; F-, menos de 40 por apotecio; F+, 40 ó más por apotecio.

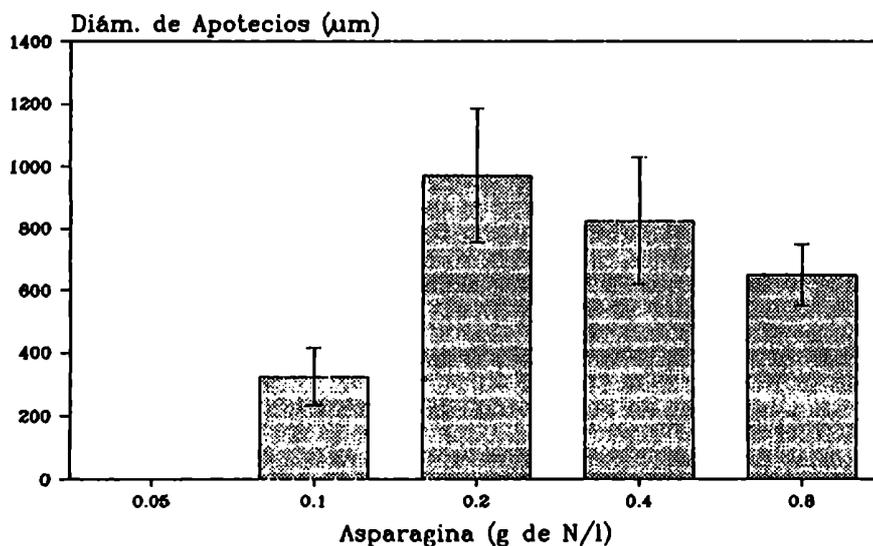


Figura 3.10. Diámetro de apotecios en asparagina. Variación del diámetro de los apotecios ante distintas concentraciones de asparagina.

Nutrición. Resultados.

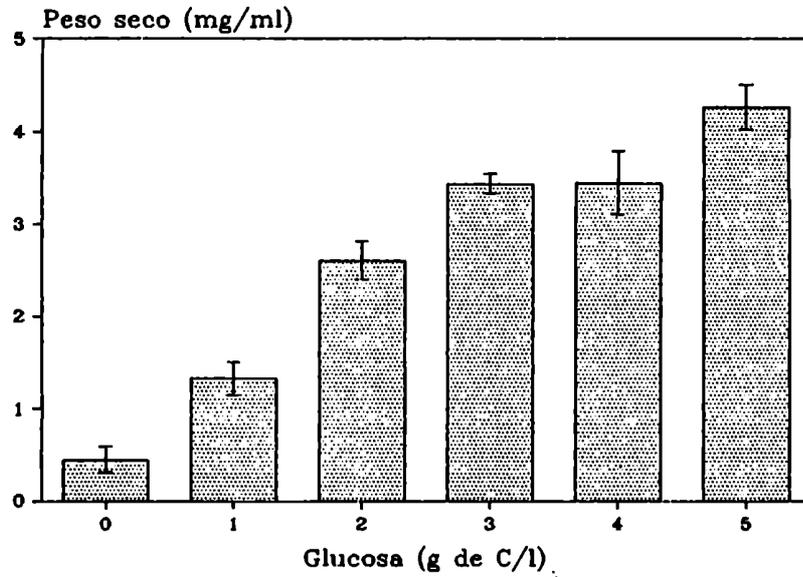


Figura 3.11. Crecimiento y glucosa. Crecimiento vegetativo ante distintas concentraciones de glucosa en el medio líquido.

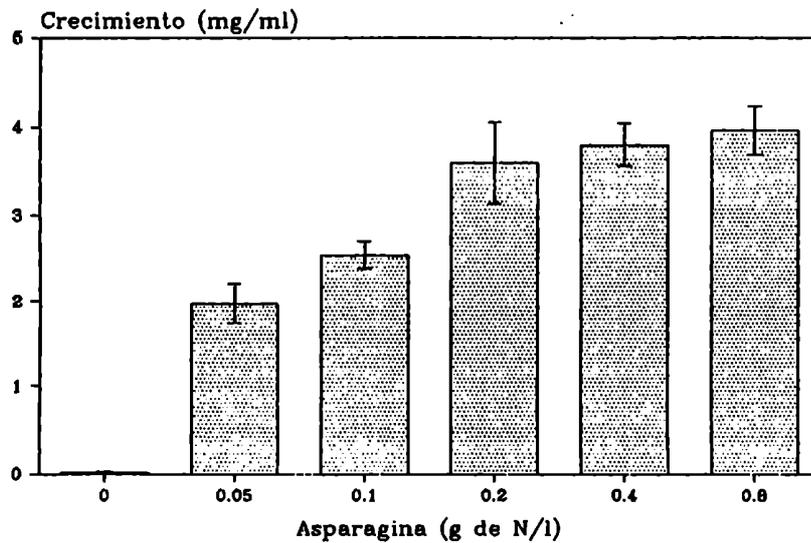


Figura 3.12. Crecimiento y asparagina. Crecimiento vegetativo ante distintas concentraciones de asparagina en el medio líquido.

El pH inicial (6.2) sufrió variaciones para las concentraciones de 0, 1 y 2 g de C/l (pH finales de 7.2, 7.9 y 7.1 respectivamente) pero se mantuvo para las de 3, 4 y 5 g de C/l. Sólo se detectó desarrollo sexual en 3 g de C/l.

En asparagina el comportamiento fue semejante (Fig. 3.12) aunque no hubo crecimiento en el testigo sin fuente de N. El color del micelio fue naranja intenso para las concentraciones de hasta 0.2 g de N/l y naranja pálido, con aspecto vacuolizado, para concentraciones de 0.4 g de N/l o mayores. El pH final solo varió en las concentraciones de 0.4 y 0.8 g de N/l (7.2 y 7.6 respectivamente). Se encontró desarrollo sexual únicamente en 0.2 g de N/l.

B. RELACION C/N.

A partir de las últimas experiencias descritas se pudo determinar que las concentraciones de glucosa y de asparagina óptimas para el desarrollo completo de *I. carneus* en medio sintético son de 3 g de C/l y de 0.2 g de N/l respectivamente. Dichos valores definen una relación C/N de 15 (sin tener en cuenta el C aportado por la asparagina). Con estos datos se variaron las concentraciones de una y otra fuente manteniendo siempre la misma C/N. Todas las experiencias se realizaron a 23°C y con iluminación constante de 300 b/p.

Medio sólido.

El número de cuerpos fructíferos fue máximo en una concentración de glucosa de 2 g de C/l y asparagina 0.13 g de N/l con un promedio de 808.1 ± 15.82 por caja, siendo este valor un 26% mayor al observado en 1 g de C/l y 0.07 g de N/l, y un 46% superior al de 3 g de C/l y 0.2 g de N/l (Fig. 3.13). En las concentraciones de 4 y 5 g de C/l (0.27 y 0.33 g de N/l respectivamente) el número de apotecios disminuyó aun más llegando a promedios de 64.4 ± 6.51 y 38.2 ± 2.43 apotecios por caja respectivamente.

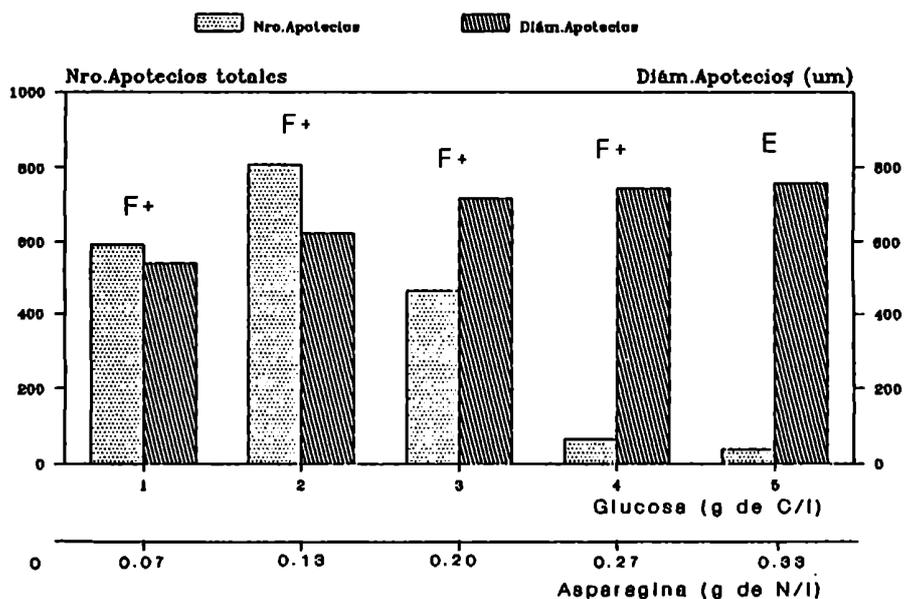


Figura 3.13. Desarrollo ante variaciones de C y N. Número y diámetro de los apotecios ante la variación de las concentraciones de glucosa y asparagina, manteniendo C/N constante. E, sin ascos; F-, menos de 40 por apotecio; F+, 40 ó más por apotecio.

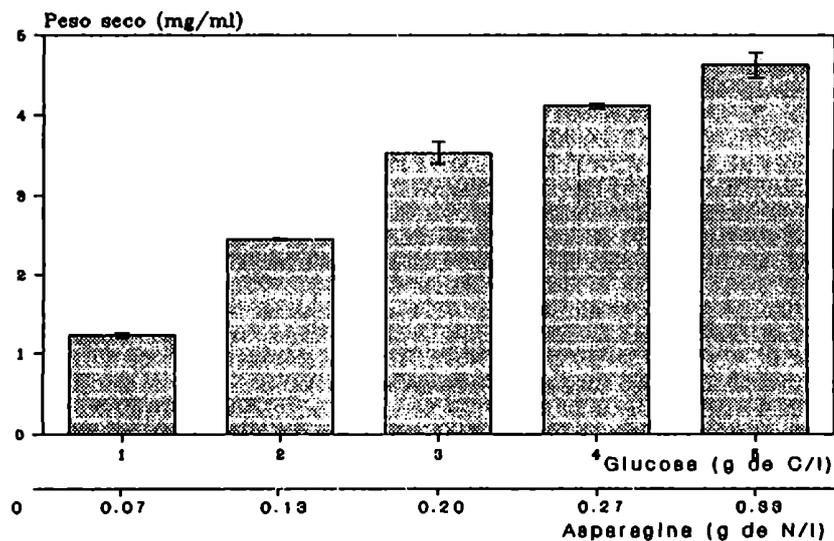


Figura 3.14. Crecimiento ante variación de C y N. Variación del crecimiento vegetativo en medio líquido ante la variación de las concentraciones de C y N, manteniendo C/N constante.

El diámetro de las fructificaciones aumentó gradualmente desde las menores concentraciones hacia las mayores (Fig. 3.13).

En todas las concentraciones los apotecios presentaron ascos maduros salvo en 5 g de C/l, donde se hallaron ascos muy vacuolizados y sin esporas.

No hubo variaciones de importancia en la pigmentación de los micelios ni en la de las fructificaciones.

Medio líquido.

Los resultados se muestran en la figura 3.14. En ella se puede observar que el crecimiento vegetativo del organismo aumenta en la medida que lo hacen las concentraciones de C y de N. No se registraron variaciones significativas del pH y el color del micelio siempre fue naranja intenso.

En cuanto al desarrollo sexual se detectaron cuerpos fructíferos únicamente en una concentración de glucosa 3 g de C/l (0.2 g de N/l).

C. VARIACION DE LA FUENTE DE CARBONO.

Se probaron 19 fuentes distintas de C, tanto en medio sólido como en líquido, con una concentración de 3 g de C/l y con asparagina 0.2 g de N/l como fuente de N. Se cultivó a 23°C e iluminación constante de 300 b/p.

Medio sólido.

El número de apotecios fue máximo para glucosa y manosa con aproximadamente 400 por caja (Tabla 3.I) mientras que el resto de las fuentes sólo mostraron niveles menores a los 90 ascocarpos por caja. Arabinosa y galactosa representaron casos particulares ya que en ellas no se formaron apotecios y el crecimiento hifal fue pobre, con colonias de 1 a 9 mm de diámetro.

Tabla 3.1. Desarrollo sexual con distintas fuentes de C, en medio sólido. O, sin ascos; #, con menos de 40 por apotecio; # #, 40 ó más por apotecio. -, sin coloración; +, coloración pobre; + +, coloración marcada; + + +, coloración muy marcada. p, presencia; a, ausencia de cristales. Entre paréntesis se indican los errores estándar.

FUENTE DE CARBONO	Número de apotecios por caja	Tamaño de apotecios (µm)	Ascos por apotecio	Color apotecio	Color micel.	Crist.
Ribosa	34.6 (3.50)	502.5 (43.15)	#	+ +	-	a
Xilosa	78.1 (4.24)	907.8 (74.05)	#	+ + +	+ +	a
Arabinosa	N	N	N	N	-	a
Manosa	416.3 (8.49)	592.5 (51.91)	# #	+ + +	+ +	a
Galactosa	N	N	N	N	-	a
Glucosa	407.8 (47.47)	658.9 (64.36)	# #	+ + +	+ + +	a
Fructosa	64.2 (10.14)	842.3 (30.88)	# #	+ + +	+ + +	a
Sacarosa	4.2 (1.54)	360.0 (37.92)	#	+	-	p
Maltosa	61.5 (4.36)	858.8 (65.22)	O	+ +	+	a
Melibiosa	2.2 (1.67)	429.2 (51.03)	O	+ +	-	p
Celobiosa	84.5 (6.19)	801.1 (95.10)	# #	+ +	+	a
Rafinosa	9.4 (2.53)	335.0 (69.44)	O	+ +	-	p
Inulina	2.3 (1.41)	375.0 (34.02)	O	+ +	-	p
Almidón	67.1 (3.24)	509.6 (47.79)	#	+	+	a
CMC	1.8 (1.99)	330.4 (54.87)	O	-	-	p
Sorbitol	11.8 (2.83)	360.0 (84.04)	O	+ +	-	p
Manitol	5.5 (0.71)	356.3 (23.94)	O	+ +	-	p
Testigo s/C	8.1 (2.33)	416.7 (54.95)	O	+	-	p

En lo que respecta al diámetro de los apotecios, estas fuentes pueden ser divididas en tres grupos. El primero estaría constituido por xilosa, maltosa, fructosa y celobiosa, con apotecios mayores a los 800 μm de diámetro (Tabla 3.I); el segundo por glucosa, manosa, ribosa y almidón con diámetros comprendidos entre 500 y 700 μm ; y por último las restantes fuentes con magnitudes inferiores a los 430 μm . Es importante destacar que el testigo sin fuente de C (salvo el aportado por la asparagina) llegó a evidenciar niveles semejantes a los obtenidos en melibiosa y superiores a los de, por ejemplo, sacarosa y rafinosa.

La producción de ascos maduros fue máxima en glucosa, manosa, fructosa y celobiosa con números mayores a los 40 ascos por apotecio (Tabla 3.I); ribosa, xilosa, sacarosa y almidón mostraron cifras menores a los 39; mientras que en las restantes fuentes en las que había apotecios, no se detectó el desarrollo de ascos maduros.

En cuanto a los niveles de pigmentación de los apotecios y del micelio la mayor intensidad se dio en xilosa, manosa, glucosa y fructosa (Tabla 3.I).

En sacarosa, melibiosa, rafinosa, inulina, CMC, sorbitol, manitol y en el testigo sin C se encontraron numerosos cristales ahusados dentro del medio de cultivo con unos 2-8 mm de largo y 0.2 mm de espesor y sin color.

Medio líquido.

El mayor crecimiento se dio en glucosa, fructosa, manosa y xilosa (Tabla 3.II). Las restantes fuentes mostraron bajo crecimiento llegando en algunos casos (por ejemplo en rafinosa) a cifras inferiores a las del testigo sin fuente de C. Arabinosa y galactosa fueron las fuentes en las que hubo menor crecimiento.

En todos los medios cuyas fuentes eran azúcares simples el pH inicial no se alteró o sólo sufrió variaciones pequeñas, pero aquellos medios que contenían disacáridos, poli-

Nutrición. Resultados.

Tabla 3.II. Crecimiento vegetativo con distintas fuentes de C.
 Variación del peso seco y del pH (pH_f - pH_i). Entre paréntesis se indican los errores estándar.

FUENTE DE CARBONO	Peso seco del micelio (mg/ml)	pH _i	pH _f	Var. pH
Ribosa	0.7 (0.04)	6.2	6.2	0
Xilosa	3.1 (0.03)	6.2	6.2	0
Arabinosa	0.2 (0.01)	6.2	6.2	0
Manosa	3.1 (0.19)	6.4	6.4	0
Galactosa	0.3 (0.02)	6.4	6.6	0.2
Glucosa	4.1 (0.11)	6.2	6.2	0
Fructosa	3.9 (0.19)	6.3	6.2	-0.1
Sacarosa	1.2 (0.08)	6.4	7.4	1.0
Maltosa	1.1 (0.03)	6.2	7.1	0.9
Melibiosa	0.8 (0.01)	6.4	7.0	0.6
Celobiosa	1.9 (0.09)	6.3	6.4	0.1
Rafinosa	0.6 (0.11)	6.3	7.2	0.9
Inulina	0.7 (0.08)	6.3	7.3	1.0
Almidón	0.7 (0.03)	6.3	7.3	1.0
CMC	0.4 (0.01)	6.2	7.0	0.8
Sorbitol	0.8 (0.07)	6.3	7.6	1.3
Manitol	0.8 (0.02)	6.4	7.1	0.7
Testigo s/C	0.7 (0.07)	6.2	7.1	0.9

sacáridos o polialcoholes manifestaron aumentos importantes que oscilaron entre 0.6 y 1.2 (Tabla 3.II).

El micelio filtrado mostró grados de pigmentación semejantes a los del medio sólido.

D. MEZCLA DE FUENTES CARBONADAS.

Se trató de revertir la inhibición manifestada en arabinosa y galactosa con el agregado de glucosa en proporciones de 1:4, 1:1 y 4:1 manteniendo una concentración final de 3 g de C/l. De igual modo se probaron azúcares simples favorables como ribosa, xilosa y manosa para analizar su interacción con la glucosa. Se utilizó medio basal sólido con asparagina 0.2 g de N/l y cultivados a 23°C e iluminación constante de 300 b/p.

Para la ribosa una mínima adición de glucosa (relación 1:4) elevó la producción de apotecios hasta 3 veces con respecto al testigo de glucosa y unas 16 veces sobre el testigo de ribosa (Fig. 3.15). El aumento de la concentración relativa de glucosa evidenció una disminución en dicha magnitud. En xilosa el número de fructificaciones se mantuvo por debajo de su testigo salvo cuando la concentración de glucosa fue máxima (4:1), donde su valor resultó superior al del testigo de glucosa. En manosa se observó un importante aumento en la mezcla de máxima concentración de glucosa. Los medios con arabinosa y galactosa mostraron desarrollo de apotecios a partir de una relación 1:1.

Con respecto al diámetro de los apotecios no se hallaron variaciones significativas dentro de las distintas mezclas y testigos, manteniendo sus valores entre 600 y 1100 μm .

En la mayoría de los casos el agregado de glucosa mejoró la producción de ascos, la única excepción fue la manosa que presentó apotecios sin ascos maduros cuando la relación fue de 1:1 (Fig. 3.15).

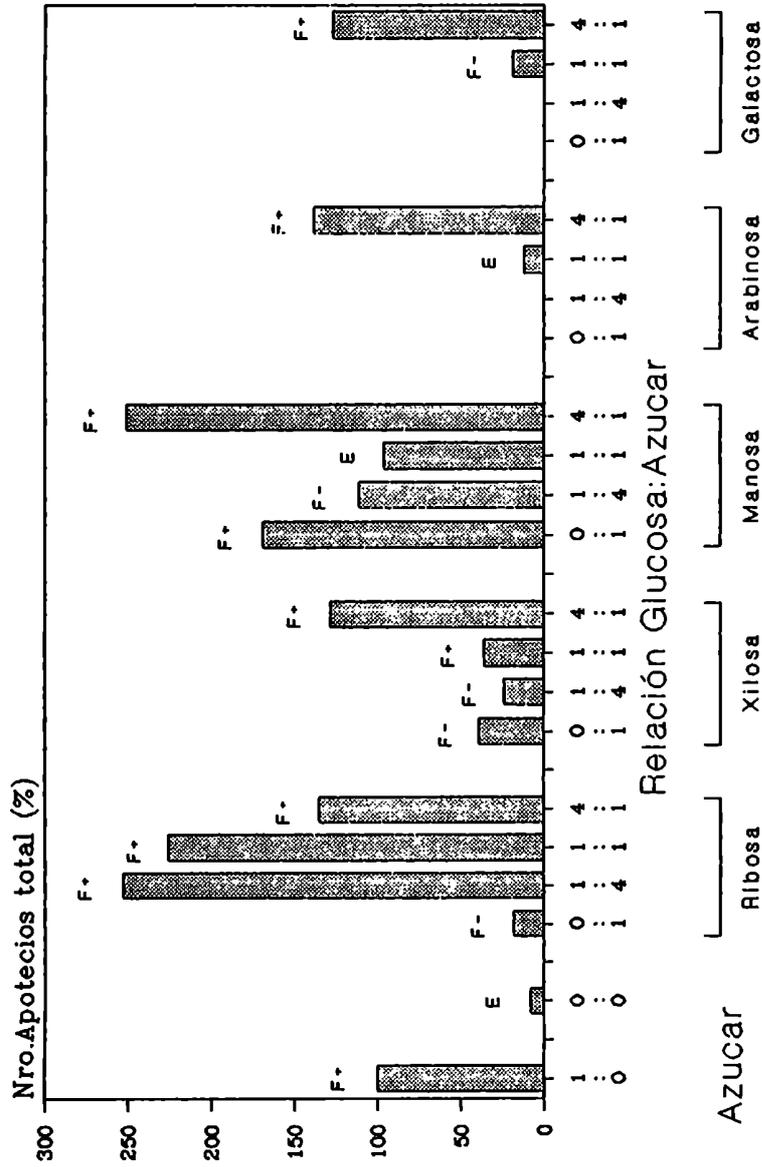


Figura 3.15. Desarrollo sexual ante mezclas de fuentes de C. Número de apotecios totales por caja ante la mezcla de glucosa con otras fuentes carbonadas y en distintas proporciones. E, sin ascos; F-, menos de 40 por apotecio; F+, 40 ó más por apotecio.

E. VARIACION DE LA FUENTE DE NITROGENO.

Se utilizaron 16 fuentes de N distintas en concentraciones de 0.2 g de N/l y usando glucosa 3 g de C/l como fuente de C. Los cultivo se mantuvieron a 23°C e iluminación constante de 300 b/p.

Medio sólido.

Unicamente en asparagina, acetato de amonio, glicina, KNO_3 , NaNO_3 y urea se desarrollaron apotecios (Tabla 3.III), las sales de amonio, tartrato de amonio y la mayoría de los aminoácidos probados no permitieron el desarrollo sexual. Los mayores números de apotecios fueron generados en asparagina, acetato de amonio y glicina mientras que en urea y en mayor medida en NaNO_3 , el número de cuerpos fructíferos fue muy reducido.

El diámetro de dichas estructuras no mostró en general diferencias significativas con medidas que variaron entre 600 y 700 μm (Tabla 3.III), salvo en los casos de urea y KNO_3 en las que sus tamaños fueron mayores a los 800 μm . En cuanto al número de ascos desarrollados por apotecio fue siempre superior a los 40 con la única excepción del NaNO_3 que mostró menos de 40 ascos maduros.

El color del micelio fue más intenso en fenilalanina (Tabla 3.III), encontrándose menos pigmentados los crecidos en asparagina, glicina, acetato de amonio y leucina; y aún menos los de urea, NaNO_3 y KNO_3 . La de los apotecios fue mayor en asparagina, glicina y acetato de amonio. En el caso del triptofano el medio de cultivo mostró una coloración pardo oscura.

Medio líquido.

Sólo en asparagina y en glicina se detectaron crecimientos superiores a los 3 mg/ml (Tabla 3.IV) seguidas por urea y acetato de amonio con unos 2 mg/ml, las restantes fuentes mostraron crecimientos menores resaltándose los casos

Tabla 3.III. Desarrollo sexual con distintas fuentes de N, en medio sólido. #, con menos de 40 ascos por apotecio; # #, 40 ó más ascos por apotecio. -, sin coloración; +, coloración pobre; + +, coloración marcada; + + +, coloración muy marcada; + + + +, coloración extremadamente marcada. Entre paréntesis se indican los errores estándar.

FUENTE DE NITROGENO	Número de apotecios por caja	Tamaño de apotecios (µm)	Ascos maduros	Color apot.	Color micel.
NaNO ₃	13.5 (2.55)	619.2 (44.68)	#	+ +	-
KNO ₃	134.3 (16.53)	835.0 (93.03)	# #	+ + +	+ +
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0	0	N	N	-
NO ₃ NH ₄	0	0	N	N	-
Acetato	453.5 (52.43)	627.8 (74.91)	# #	+ + +	+ +
Tartrato	0	0	N	N	-
Urea	49.3 (5.26)	836.8 (66.06)	# #	+ +	+ +
Alanina	0	0	N	N	-
Asparagina	484.0 (33.94)	643.9 (45.68)	# #	+ + +	+ + +
Glicina	383.2 (55.78)	685.4 (63.63)	# #	+ + +	+ + +
Glutamina	0	0	N	N	-
Metionina	0	0	N	N	+ +
Prolina	0	0	N	N	-
Leucina	0	0	N	N	+ + +
Fenilalanina	0	0	N	N	+ + + +
Triptofano	0	0	N	N	-
Testigo s/N	0	0	N	N	-

Tabla 3.IV. Crecimiento vegetativo con distintas fuentes de N.
 Variación del peso seco y del pH (pH_I - pH_F). Entre paréntesis se indican los errores estándar.

FUENTE DE NITROGENO	Peso seco del micelio (mg/ml)	pH _I	pH _F	Var. pH
NaNO ₃	1.8 (0.02)	6.2	7.1	0.9
KNO ₃	1.3 (0.25)	6.2	7.6	1.4
(NH ₄) ₂ HPO ₄ ⁻	1.3 (0.06)	6.6	3.6	-3.0
NO ₃ NH ₄	0.6 (0.16)	6.2	3.7	-2.5
Acetato	2.1 (0.03)	6.2	4.9	-1.3
Tartrato	0.4 (0.03)	6.2	4.0	-2.2
Urea	2.4 (0.25)	6.2	6.0	-0.2
Alanina	1.5 (0.19)	6.2	6.2	0
Asparagina	3.6 (0.05)	6.2	6.1	-0.1
Glicina	3.8 (0.18)	6.2	6.2	0
Glutamina	0.6 (0.08)	6.2	3.7	-2.5
Metionina	0.6 (0.09)	6.1	6.9	-0.2
Prolina	0.2 (0.11)	6.2	6.3	0.1
Leucina	1.1 (0.19)	6.2	6.5	-0.7
Fenilalanina	0.6 (0.01)	6.2	6.2	-1.0
Triptofano	0	6.2	6.3	0.1
Testigo s/N	0	6.2	6.2	0

del testigo sin fuente de N y del triptofano que no mostraron desarrollo hifal.

El pH inicial no mostró modificaciones significativas en asparagina, glicina, alanina, metionina, urea, triptofano y prolina (Tabla 3.IV); en cambio sufrió aumentos de importancia en NaNO_3 y KNO_3 o importantes disminuciones en las sales inorgánicas de amonio, acetato de amonio, tartrato de amonio, glutamina, fenilalanina y leucina.

El micelio filtrado mostró coloraciones semejantes a las observadas en el medio de cultivo sólido incluyendo la pigmentación parda obtenida con el triptofano.

Discusión

Los rangos de concentraciones de glucosa y fructosa en los que hubo desarrollo de fructificaciones fértiles en *I. carneus* fueron estrechos (de 2-4 y de 2-3 g de C/l respectivamente) comparados con los de otros hongos como *Clavicornona pyxidata* (James y McLaughlin, 1988) de 2.5 a 80 g de glucosa/l (1 a 32 g de C/l) y *Calonectria camelliae* (Shipton, 1977) de 0.001 a 10 g de C/l.

En función de la relación C/N, *I. carneus* fructificó entre valores de 10:1 y 20:1 en medio sólido con glucosa y asparagina como fuentes de C y N, con una relación óptima para el número de apotecios de 10:1 (2 g de C/l), y de 15:1 (3 g de C/l) para el tamaño de los mismos. Estos valores son similares a los registrados en *Sordaria fimicola* (Hall, 1971) de 5:1 a 10:1, *Pisolithus tinctorius* (Smith, 1982) de 10:1 a 20:1, *Calonectria camelliae* (Shipton, *op. cit.*) de 10:1 a 20:1 y *Pleospora gaudefroyi* y *Camarosporium roumeguerii* (Crabtree y Gessner, 1982) con óptimos en 5:1 y 20:1 respectivamente.

Para Hall (*op. cit.*) existiría una relación C/N inicial óptima para la reproducción sexual de *S. fimicola*, con límites independientes de las concentraciones absolutas de C y N. Pero cuando se variaron en *I. carneus* las concentraciones de C y de N manteniendo C/N constante (15:1), se produjeron apotecios fértiles sólo entre 1 y 4 g de C/l de glucosa (0.07 y 0.27 g de N/l de asparagina), por lo que en este caso los límites del rango que permitirían el desarrollo sexual son estrechos, no concordando con lo propuesto por Hall en cuanto a las concentraciones absolutas de C y N.

El aumento de las concentraciones de glucosa o de asparagina en el medio de cultivo líquido favoreció al crecimiento vegetativo, incrementándolo hasta las máximas concentraciones usadas (5 g de C/l y 0.8 g de N/l respectiva-

mente), aunque sólo se observó desarrollo sexual cuando el medio basal contuvo inicialmente 3 g de C/l de glucosa y 0.2 g de N/l de asparagina.

De esta forma el rango de concentraciones de las fuentes de C y N dentro de las que observa crecimiento vegetativo, tanto en medio sólido cuanto en el líquido, son más amplios que el correspondiente para el desarrollo sexual. Casos semejantes se hallan en *Sclerotinia sclerotiorum* (Budge y Whipps, 1991), *Sclerotium rolfsii* (Wheeler y Sharan, 1965), y en *Pyronema domesticum* (Moore-Landecker, 1987). No obstante las condiciones necesarias para la fructificación en medio líquido fueron claramente más limitadas que las del sólido.

Resultados similares en cuanto al crecimiento y la fructificación se encontraron cuando *I. carneus* creció en medios líquidos con C/N constante y concentraciones variadas de glucosa y de asparagina. Es importante recalcar que el aumento de peso seco detectado fue más marcado que el observado cuando se varió sólo la concentración de asparagina, por lo que en este último caso la cantidad disponible del monosacárido debió actuar como un factor limitante del crecimiento.

Siempre que se aumentó la concentración de C (en glucosa, fructosa y las experiencias de C/N) también lo hizo el diámetro de los apotecios, poniéndose así de manifiesto una estrecha relación entre el crecimiento vegetativo, el tamaño de las fructificaciones y la cantidad de C disponible. Relaciones semejantes se encuentran en *Sclerotinia sclerotiorum* donde el peso fresco de los esclerocios aumentó junto con el peso seco del micelio a medida que se aumentaba la concentración de sacarosa (Budge y Whipps, 1991) o de glucosa (Wang y Le Tourneau, 1971). En *Clavicornia pyxidata* (James y McLaughlin, *op. cit.*) ocurrió lo mismo con el peso seco de las fructificaciones ante glucosa, fructosa y celulosa (tipo Whatman CF-11). En *Agaricus bisporus* (Claydon *et al.*, 1988) se halló una correlación directa entre la actividad endocelulasa extracelular y el peso fresco de las fructificaciones, postulándose que el organismo utilizaba la glucosa liberada

por las celulasas en el rápido crecimiento de las fructificaciones. En cambio la variación de la asparagina afectó al diámetro de las fructificaciones de manera negativa para concentraciones mayores de 0.2 g de N/l.

El número de apotecios y la presencia de ascos tuvo un comportamiento opuesto para glucosa y fructosa, evidenciando que la diferenciación y el desarrollo del sistema ascógeno fue profundamente afectado, y de distintas maneras, por el tipo y calidad de la fuente de C. Para Alberghina *et al.* (1979) el metabolismo intermediario del micelio en crecimiento de *Neurospora crassa* puede diferir de un medio de cultivo dado a otro de distinta composición.

Con distintas fuentes de carbono fue en glucosa y manosa donde se halló una mayor producción de apotecios con ascos maduros y un mejor crecimiento vegetativo. Las bondades de la glucosa y la manosa dentro de la nutrición fúngica se hallan ampliamente documentadas (Lilly y Barnett, 1951; Garraway y Evans, 1984) principalmente para la primera, estando ambos azúcares muy relacionados a través de sus semejanzas estructurales. Como contrapartida en arabinosa y galactosa se produjo una inhibición del crecimiento y de la fructificación, tal como en *Ascobolus crenulatus* con la galactosa (Galvagno, 1976).

El desarrollo en medios con disacáridos o hidratos de carbono más complejos fue pobre, lo que evidenciaría una baja eficiencia o inhabilidad para incorporarlos al metabolismo, dentro de los límites experimentales propuestos. Una prueba de ello sería el aumento del pH detectado en dichos medios y en el testigo sin fuente de carbono, generado posiblemente por la utilización alternativa de la estructura carbonada del aminoácido; este posible recurso en la obtención de C por parte de los hongos fue expuesto por Lilly y Barnett (*op. cit.*), Papavizas y Ayer (1964) y Herr (1973). También en *Aphanomyces laevis* y *Pythium ultimum* fue evidente el uso de alanina y glutamato como fuentes de carbono alcanzando con

ellos niveles de crecimiento semejantes a los de glucosa (Gleason *et al.*, 1970).

No ocurrió lo mismo en celobiosa donde se registró un desarrollo sexual equiparable al de fructosa y un importante crecimiento vegetativo sin variaciones significativas del pH, indicativos de la posible presencia de glucosidasas.

En medios de cultivo con maltosa o almidón el número de apotecios resultó semejante aunque sólo fueron fértiles en los que contenían al polisacárido. Si bien Singh (1982) describió un caso similar en cuanto a la producción de esporas en *Acrocyldrium oryzae* esta respuesta no es la más frecuente. En otros trabajos con maltosa como fuente, se registran grados de desarrollo semejantes o superiores a los obtenidos en almidón, apareciendo incluso como inductor de la fructificación (Dehorter y Perrin, 1983 a; James y McLaughlin, *op. cit.*), o generando niveles de crecimiento semejantes a los obtenidos en glucosa (Singh y Wasini, 1980).

De esta manera puede considerarse que la aparición de ascos maduros en almidón se debería a un "efecto de contacto" (tal como fuera descrito por Suryanarayanan y Swamy, 1981) favorecido por la presencia del polisacárido, y no a un proceso puramente nutricional.

Los mayores diámetros de las fructificaciones coincidieron generalmente con los mayores crecimientos vegetativos, lo que se correlaciona con los datos obtenidos al variar las concentraciones de C.

En términos generales la mayor producción de apotecios fértiles coincidió con altas tasas de crecimiento vegetativo y con grados elevados de pigmentación del micelio, aunque esta última característica no fue una condición fundamental como lo demuestran los resultados obtenidos en celobiosa.

La aparición de cristales en medios de cultivo sólido con sacarosa, melibiosa, rafinosa, inulina, CMC, sorbitol y manitol, coincidió con bajos números y diámetros de apotecios, con la falta de ascos maduros (excepto en sacarosa),

poco crecimiento hifal y falta de pigmentación miceliana. Cristales aéreos de morfología similar aparecen en los Basidiomicetes *Clitocybe illudens* (Carey, 1974), y *Xylobolus frustulatus* (Van Eijk *et al.*, 1984) siendo identificados como los del sesquiterpeno (+)torreyol, producto del metabolismo secundario de ambos organismos. Si bien en *I. carneus* no fueron identificados, su presencia reflejaría el uso de vías metabólicas secundarias alternativas, o la acumulación de algún producto metabólico por el bloqueo de una vía secundaria, favorecido por ciertas fuentes de carbono, y que alterarían el desarrollo sexual normal.

El agregado de glucosa a medios con ribosa, xilosa, manosa, arabinosa y galactosa produjo un fuerte incremento en el número de apotecios y de ascos desarrollados con respecto a los correspondientes testigos, pudiéndose también observar la pérdida del efecto inhibitorio de arabinosa y galactosa. El aumento del número de apotecios en xilosa, arabinosa y galactosa podría ser explicado a partir de un efecto exclusivo de la glucosa, dado que los niveles de desarrollo observados en su máxima concentración relativa (2.4 g de C/l de concentración absoluta) son semejantes a los de ese mismo azúcar actuando individualmente con una concentración de 2 g de C/l.

En las mezclas de glucosa y ribosa en proporciones 1:1 y 1:4, el número de apotecios se incrementó en forma muy marcada. Se hallan efectos similares cuando ciertos niveles de glucosa mejoran la utilización de otra fuente carbonada incrementando el crecimiento vegetativo (Griffin, 1981; Lilly y Barnett, *op. cit.*; Taber y Taber, 1987). Por otro lado cuando glucosa y manosa se mezclaron en una proporción 1:1, se observó una disminución del número de apotecios y la falta de ascos maduros, pero cuando dicha relación se desplazó hacia uno u otro extremo el número de apotecios se incrementó y aparecieron numerosos ascos maduros, evidenciando la existencia de una interacción entre ambas fuentes que afectaría al proceso sexual en forma amplia.

Los resultados obtenidos, tanto del análisis del efecto de las distintas fuentes de carbono como de sus mezclas, pusieron de manifiesto que el número de apotecios fue una característica mucho más variable de una a otra fuente que sus respectivos diámetros, evidenciando nuevamente que el desarrollo del sistema ascógeno se desencadenaría dentro de límites más estrechos que los del sistema estéril.

El estudio del desarrollo de *Iodophanus carneus* ante distintas fuentes nitrogenadas reveló que la mayoría de los aminoácidos probados resultaron inhábiles para generar un buen crecimiento vegetativo y desarrollo sexual. Sólo en asparagina y glicina el desarrollo fue completo, siendo finalmente las mejores fuentes nitrogenadas.

En general los aminoácidos suelen representar buenas fuentes de nitrógeno y no se encuentra dentro de la bibliografía una especificidad como la demostrada en *I. carneus*. Así, en *Monascus purpureus* (McHan y Johnson, 1979) hubo un crecimiento equiparable en arginina, glicina, tirosina, glutamina, ácido aspártico, valina, leucina y treonina; en *Leptolegnia sp.* (Nolan, 1983) en glutamina, alanina, ácido aspártico, prolina y ácido glutámico, mientras que hubo un bajo crecimiento en treonina, glicina, y serina y no lo hubo en metionina, tirosina, lisina y fenilalanina. Para *Phytophthora* (Elliott, 1989) glutamato, glicina, asparagina y valina fueron efectivos induciendo la producción de oosporas.

El triptofano inhibió el crecimiento vegetativo alterando la coloración del medio de cultivo, aunque este resultado no puede ser relacionado con el pH ya que su variación, como con el resto de los aminoácidos, fue despreciable.

Para la mayoría de los aminoácidos el pH del medio no varió por lo que la influencia sobre el desarrollo de *I. carneus* sería ejercida sólo por su mayor o menor eficacia metabólica. Solamente se encontraron disminuciones significativas en glutamina, fenilalanina y leucina, por lo que en estos casos, además del posible papel metabólico podría existir una influencia importante del pH sobre el desarrollo.

Disminuciones de un orden semejante fueron detectadas en *Trametes trogii* (Levin et al., 1992) creciendo en prolina y ácido aspártico.

Un hecho importante fue el bajo crecimiento y producción de apotecios en urea, fuente que en general resulta positiva para el desarrollo. En *Ascobolus crenulatus* (Galvagno, 1976) urea fue la mejor fuente de nitrógeno, seguida con un número de apotecios 50% menor por asparagina y nitrato de potasio, otras fuentes como ácido aspártico, ácido glutámico y caseína hidrolizada mostraron números inferiores. En *Ascobolus biguttulatus* (Pardo y Forchiassin, 1993 b) se observaron niveles de crecimiento vegetativo superiores a los detectados con asparagina.

Las sales inorgánicas de amonio resultaron ineficaces para el desarrollo sexual y el crecimiento debido probablemente al brusco descenso del pH que se observa frecuentemente en ellas debido a la más rápida incorporación del amonio que la del anión correspondiente (Lima y Mercuri, 1984; Kraft y Erwin, 1967; Nicholas, 1965). Las orgánicas, en cambio, arrojaron resultados distintos; mientras en tartrato el desarrollo fue pobre y se observaba una importante disminución del pH del medio, en acetato la disminución fue menor y se produjeron apotecios fértiles, demostrando una utilización más efectiva de ésta última por parte del hongo.

Las sales de nitrato favorecieron el desarrollo completo de *I. carneus* con un leve aumento del pH debido a que el anión sería incorporado con mayor rapidez que el catión correspondiente, provocando el aumento de OH^- de intercambio (Lima y Mercuri, op. cit.; Morton y MacMillan, 1954). *A. biguttulatus* (Pardo y Forchiassin, 1993 c) mostró una pobre fructificación en nitrato de sodio, carbonato de amonio y sulfato de amonio; en *Saccobolus platensis* (Forchiassin, 1989) nitrato de sodio fue una buena fuente para la fructificación, pero no los hubo en nitrato y fosfato de amonio.

LUZ Y DESARROLLO

Resultados

A. EFECTO DE LA LUZ BLANCA SOBRE EL DESARROLLO SEXUAL.

Variación de la luminosidad.

Se cultivaron colonias de *I. carneus* en medio basal sólido con glucosa (3 g de C/l) y asparagina (0.2 g de N/l), y distintas luminosidades (0, 10, 50, 100, 300 y 500 b/p) durante 14 días, y con una temperatura de 23°C.

En oscuridad continua no se detectaron fructificaciones. Conforme aumentó la luminosidad también lo hizo, y de manera muy marcada, el número total de apotecios por caja hasta 100 b/p, con intensidades mayores los promedios disminuyeron levemente (Fig. 3.16). Las fructificaciones se produjeron en tres áreas definidas dentro de las colonias y relacionadas con la edad del micelio: la zona I, incluyó al micelio crecido durante los tres primeros días (desde 0 a 24 ± 1 mm del inóculo); la zona II, comprendió al cuarto día de crecimiento (hasta 32 ± 3 mm); y la zona III, abarcó al quinto día (hasta el borde de la caja). El número de apotecios en cada una de ellas varió notoriamente con cada tratamiento.

En la zona I el número de ascocarpos se mantuvo más o menos estable si se comparan los cinco tratamientos (Fig. 3.17). En la zona II el número fue máximo en 300 b/p deca- yendo marcadamente con el aumento o la disminución de la intensidad. En la zona III el mayor número se detectó en 100 b/p.

Pero en esta última zona las fructificaciones siempre se desarrollaron sobre el borde de la caja o zona IIIb (correspondiente a las últimas horas de crecimiento del día

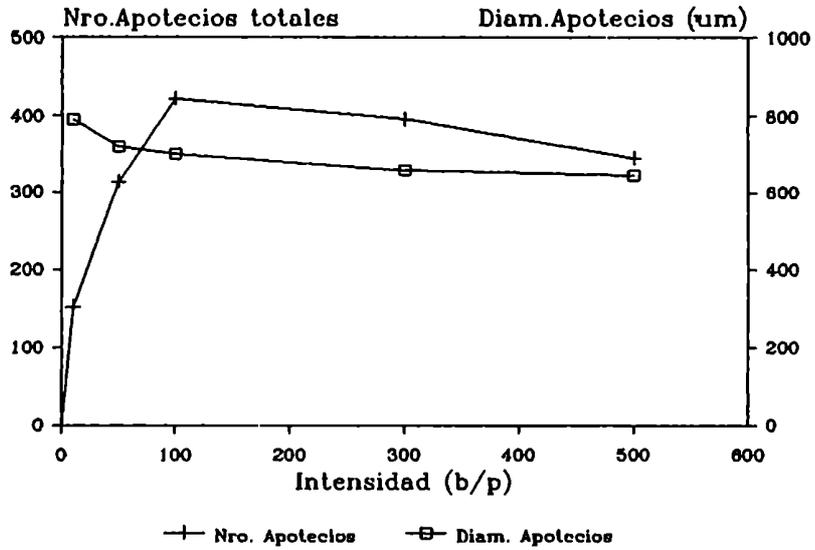


Figura 3.16. Intensidad lumínica y desarrollo sexual. Variación del número total de apotecios por caja y del sus diámetros ante distintas intensidades de luz.

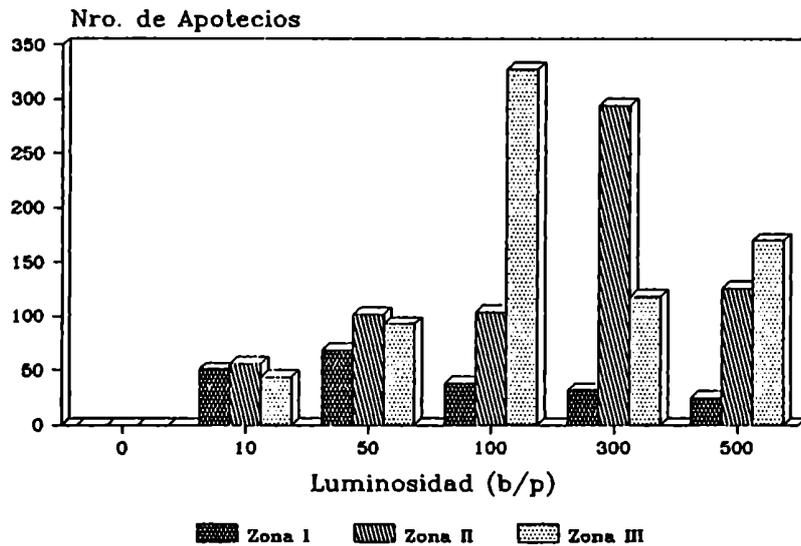


Figura 3.17. Intensidad y distribución de apotecios. Distribución de los apotecios sobre colonias desarrolladas bajo distintas intensidades lumínicas.

50), encontrándose la zona IIIa (correspondiente a las primeras horas de crecimiento del 50 día) sin apotecios.

El diámetro de los ascocarpos disminuyó levemente con el aumento de la luminosidad (Fig. 3.17), pero no se hallaron diferencias significativas en el tamaño de las fructificaciones de las distintas zonas de cada tratamiento.

Los apotecios presentaron ascos con ascosporas en todos los tratamientos. La pigmentación del micelio y de los apotecios fue muy marcada y no varió ante las distintas luminosidades, en cambio no se la detectó en los micelios crecidos en oscuridad.

Respuesta a irradiaciones de 24 horas.

Se expusieron cultivos de distintas edades y crecidos en oscuridad, a irradiaciones de 300 b/p durante 24 hs. para mantenerlos finalmente en oscuridad hasta el día 140. La temperatura se mantuvo a 23°C.

Los tratamientos en el 50 y 60 días mostraron el mayor número de fructificaciones por caja, con valores incluso superiores a los del testigo de luz continua (Fig. 3.18). El número de apotecios producidos por las colonias expuestas durante el 40 días fue semejante al del testigo, y en el 30, 70, 80, 90 y 100 días fueron marcadamente inferiores. En los tratamientos del 10 y 20 días y en el testigo de oscuridad no se hallaron apotecios.

Si bien el tamaño de las fructificaciones fue levemente mayor en los micelios irradiados en el 40 y 50 días, siempre fueron menores que los del testigo de luz continua (Fig. 3.18).

Se encontraron ascos en todos los tratamientos. La coloración del micelio fue imperceptible en los expuestos en el 10, 20, 30 y 40 días, los tratados desde el 50 día en adelante mostraron grados de pigmentación mayores aunque nunca tan marcados como los del testigo de luz continua. La de los apotecios, si bien siguió los mismos patrones que la de sus respectivos micelios, fue siempre mayor.

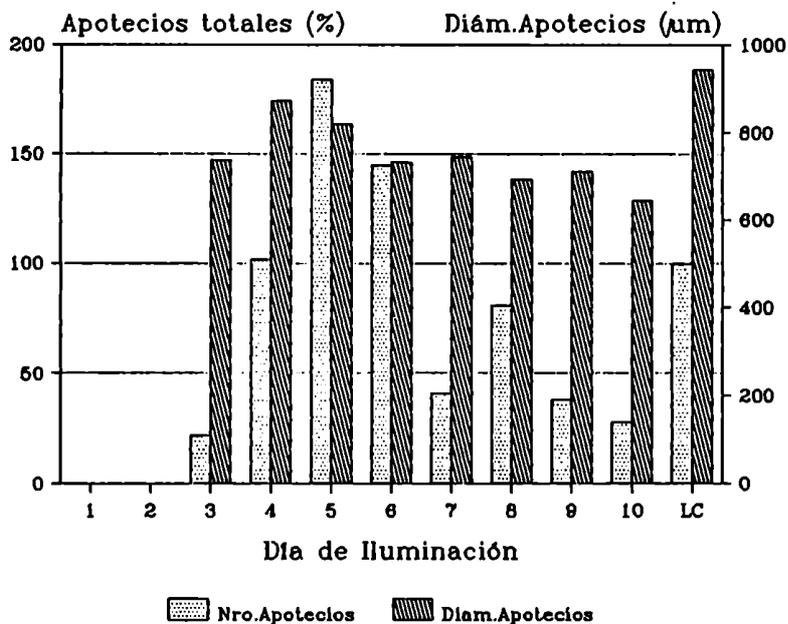


Figura 3.18. Irradiaciones de 24 hs. y desarrollo sexual. Apotecios totales por caja, expresados como porcentaje del testigo de luz continua (LC), y sus diámetros ante irradiaciones de 24 hs. aplicadas en distintos días.

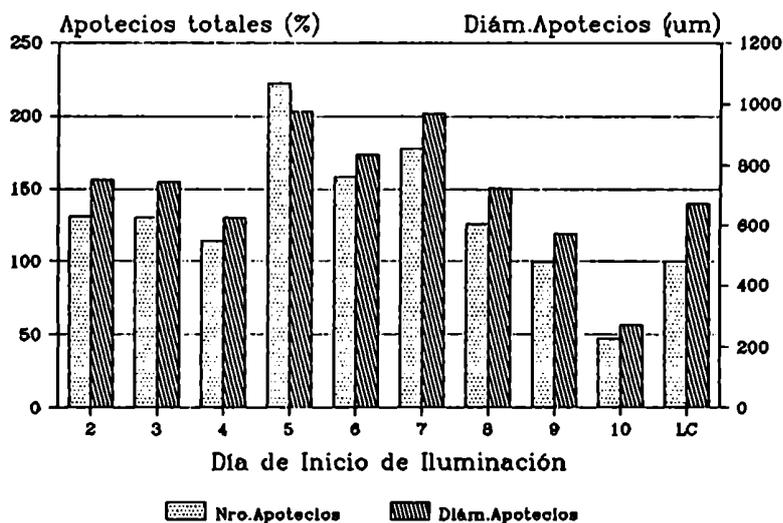


Figura 3.19. Periodos de oscuridad crecientes y desarrollo sexual. Apotecios totales por caja, expresados como porcentaje del testigo de luz continua (LC), y sus diámetros ante periodos de oscuridad crecientes.

Respuesta a períodos de oscuridad crecientes.

Los cultivos crecieron inicialmente en oscuridad por períodos variables para ser expuestos finalmente a luz continua de 300 b/p hasta el día 140. La temperatura se mantuvo en 23°C.

El número total de apotecios por caja aumentó progresivamente hasta alcanzar un máximo para aquellos micelios expuestos a la luz desde el 50 día (Fig. 3.19). Si bien los tratamientos del 30 al 80 días mostraron promedios superiores que los del testigo de iluminación continua, en los del 100 el número total de ascocarpos fue inferior.

El diámetro de los apotecios fue mayor en las colonias expuestas desde los días 50 al 70 (Fig. 3.19).

Los ascocarpos siempre presentaron ascos con ascosporas. La pigmentación del micelio y de los apotecios fue semejante, para todos los tratamientos, a las del testigo de luz continua.

Respuesta a irradiaciones alternadas.

Las dos experiencias recién citadas dejaron entrever la posibilidad de un efecto inhibitor de la fructificación, activado por la luz durante los primeros días de crecimiento de la colonia.

Para determinar los alcances de dicha inhibición, se realizaron cultivos en oscuridad y se los expuso a dos períodos de luz de 24 hs. cada uno y de una luminosidad de 300 b/p. El primer tratamiento se hizo el 10 ó 20 día de crecimiento, y el segundo en el 40, 50 ó 60 día, para mantenerlos en oscuridad constante hasta el final de la experiencia, el día 140. La temperatura se mantuvo en 23°C.

Los testigos irradiados los días 10 ó 20 sólo mostraron crecimiento vegetativo mientras que en los iluminados en el 40, 50 ó 60 se observó desarrollo sexual (Fig. 3.20). El testigo del 50 día produjo un número de apotecios totales muy

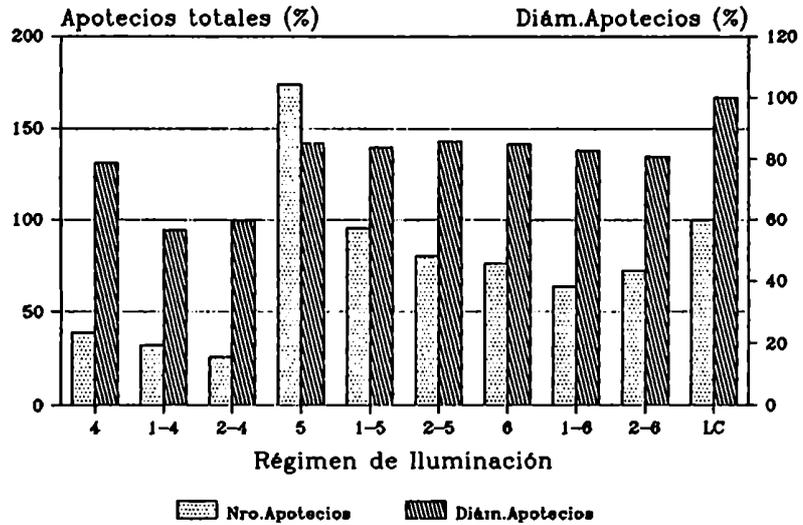


Figura 3.20. Irradiaciones alternadas y desarrollo sexual. Número total de apotecios por caja, expresados como porcentaje del testigo de luz continua (LC), y sus diámetros ante irradiaciones de 24 hs. alternadas.

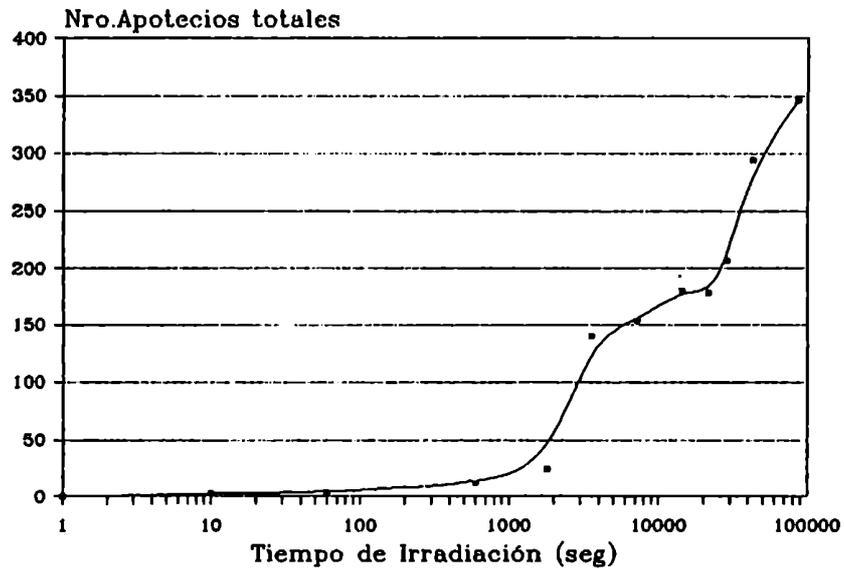


Figura 3.21. Distintos tiempos de exposición. Número total de apotecios por caja frente a distintos tiempos de exposición a la luz durante el día 6.

superior que la de los cultivos desarrollados en luz continua.

Cuando se aplicaron en forma combinada dos períodos lumínicos, el número de fructificaciones totales siempre disminuyó con respecto a sus correspondientes testigos (Fig. 3.20). Este efecto fue particularmente notable para los procedimientos que incluyeron al día 50, cuando la inhibición alcanzó niveles del 50% aproximadamente.

El tamaño de los apotecios de los tratamientos que involucraron al 40 día resultaron marcadamente inferiores a los restantes (Fig. 3.20), aunque éstos siempre fueron menores que los del testigo de luz continua.

Todos los tratamientos mostraron ascos con esporas excepto los de los días 1-4 y 2-4.

El grado de pigmentación del micelio fue imperceptible para los tratamientos de los días 1, 2, 1-4, 2-4; poco marcado para 1-5, 2-5, 1-6 y 2-6; y abundante para los iluminados en los días 5 y 6, aunque siempre fueron menores que los del testigo de luz continua. La pigmentación de los apotecios no mostró diferencias entre tratamientos y siempre resultó muy marcada, salvo en los que involucraron al día 40 en los que el grado de pigmentación fue menor.

Respuesta a distinto tiempo de exposición.

Micelios crecidos en oscuridad constante fueron expuestos, desde el comienzo del 50 día, a distintos períodos de luz blanca (10, 20 y 60 segundos; 10, 30 y 60 minutos; y 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas). Las colonias crecieron durante 14 días a 23°C.

Irradiaciones de 10 segundos fueron eficaces para inducir el desarrollo de apotecios (Fig. 3.21) aunque en un número muy bajo (9.1 ± 2.33 apotecios/caja), estos valores aumentaron levemente hasta exposiciones de 30 minutos (25.0 ± 4.52 apotecios/caja). Ante períodos mayores la producción de apotecios aumentó de manera marcada y este efecto se acentuó

desde inducciones de 8 horas (234.4 ± 16.67 apotecios/caja) o más.

Con exposiciones menores a 6 horas fue frecuente la aparición de apotecios agregados, los que se manifestaron raramente en micelios irradiados con 8 a 12 horas pero no fueron detectados con irradiaciones de 24 horas.

No se detectaron diferencias significativas en cuanto al diámetro de las fructificaciones, que mantuvieron un promedio de aproximadamente 743.6 ± 99.28 μm .

Los ascos con ascosporas aparecieron a partir de irradiaciones de 4 horas, aunque su número fue pobre; sólo desde exposiciones de 8 horas se observaron numerosos ascos por apotecio.

La pigmentación del micelio y de los apotecios fue pobre para todos los tratamientos, aunque con exposiciones de 12 a 24 horas la de los apotecios fue más marcada.

Irradiaciones puntuales durante el 50 día.

Colonias crecidas en oscuridad fueron irradiadas con luz blanca de una intensidad de 500 b/p al inicio del 50 día de crecimiento, a través de una ventana de 6 mm de diámetro hecha sobre el papel negro que envolvía las cajas. Distintas colonias fueron irradiadas en dos zonas: a unos 8 mm del inóculo (sobre micelio maduro), o sobre el borde de la colonia a unos 33 mm del inóculo (micelio joven).

La irradiación de micelio joven produjo un número de apotecios totales de 69.7 ± 4.64 distribuidos homogéneamente dentro de una zona comprendida entre unos 30 mm del inóculo hasta el borde de la caja (Fig. 3.22, A). El diámetro de los cuerpos fructíferos fue de 760.2 ± 162.48 μm y en todos ellos hubo ascos con ascosporas.

Cuando se irradiaron hifas maduras se produjeron unos 67.5 ± 6.13 apotecios concentrados sobre los bordes de la colonia, pero no se los detectó dentro de una zona triangular desarrollada desde el punto de irradiación hasta el borde del cultivo (Fig. 3.22, B). El diámetro de los ascocarpos fue de

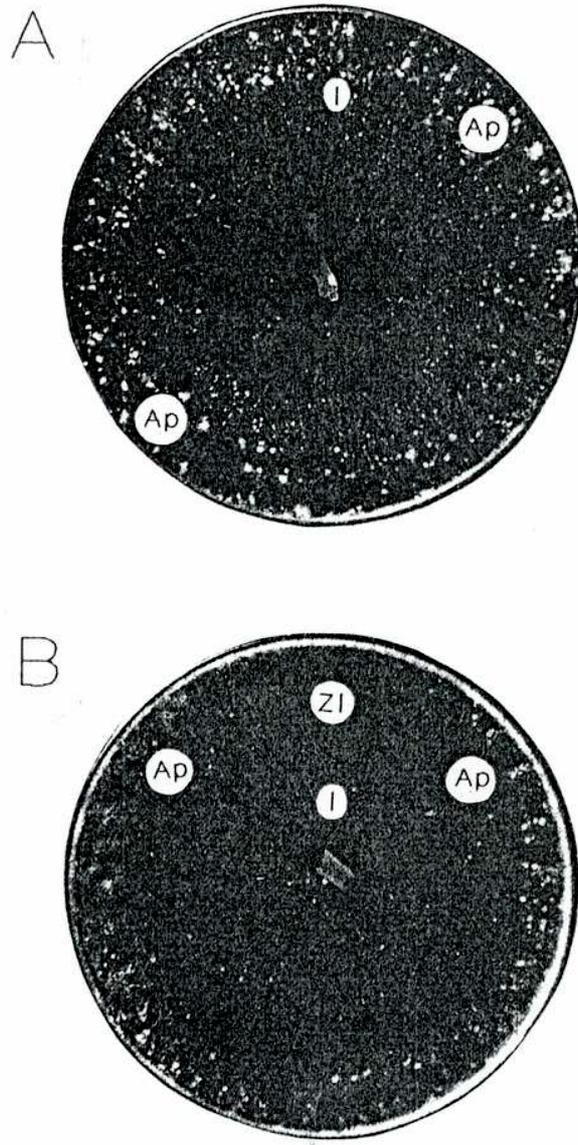


Figura 3.22. Iluminaciones puntuales. Irradiaciones puntuales durante el quinto día sobre micelio joven (A) o micelio maduro (B). I, punto de irradiación; Ap, apotecios; ZI, zona de inhibición.

unos $574.4 \pm 88.60 \mu\text{m}$, y no se hallaron ascos desarrollados.

El micelio no mostró pigmentación en ninguno de los dos tratamientos, pero los apotecios mostraron una pigmentación marcada.

B. DESARROLLO SEXUAL ANTE DISTINTAS CALIDADES DE LUZ.

Inducción del desarrollo sexual en condiciones de iluminación continua.

Los micelios se desarrollaron en condiciones de iluminación continua con luces de distintas calidades durante 14 días y a una temperatura de 23°C .

El mayor número de ascocarpos se detectó en luz blanca seguida por la azul (Fig. 3.23). Los promedios observados en luz roja fueron inferiores, representando el 48% de los obtenidos en luz blanca y el 59% de los de luz azul. Para el caso de UVc dichos valores fueron aún menores, siendo el 19% de los de luz blanca y el 24% de los de azul.

No se hallaron diferencias en cuanto a la distribución de las fructificaciones sobre las colonias entre los distintos tratamientos (Figs. 3.24 a 3.26, E; Fig. 3.27, D) detectándose en todos los casos una mayor cantidad sobre la zona II.

El diámetro de las fructificaciones fue semejante para todos los tratamientos (Fig. 3.23). Se hallaron ascos con ascosporas en todos los tratamientos.

La pigmentación tanto del micelio cuanto de los ascocarpos fue intensa para todos los casos.

Inducción por irradiaciones de 24 hs.

Las colonias se desarrollaron en oscuridad constante para ser expuestas durante 24 hs. el 4^o, 5^o, 6^o ó 7^o día.

El número de apotecios totales por caja observados en los tratamientos de luz blanca de los días 5^o y 6^o, representaron aproximadamente el 180% y 150% respectivamente,

Luz. Resultados.

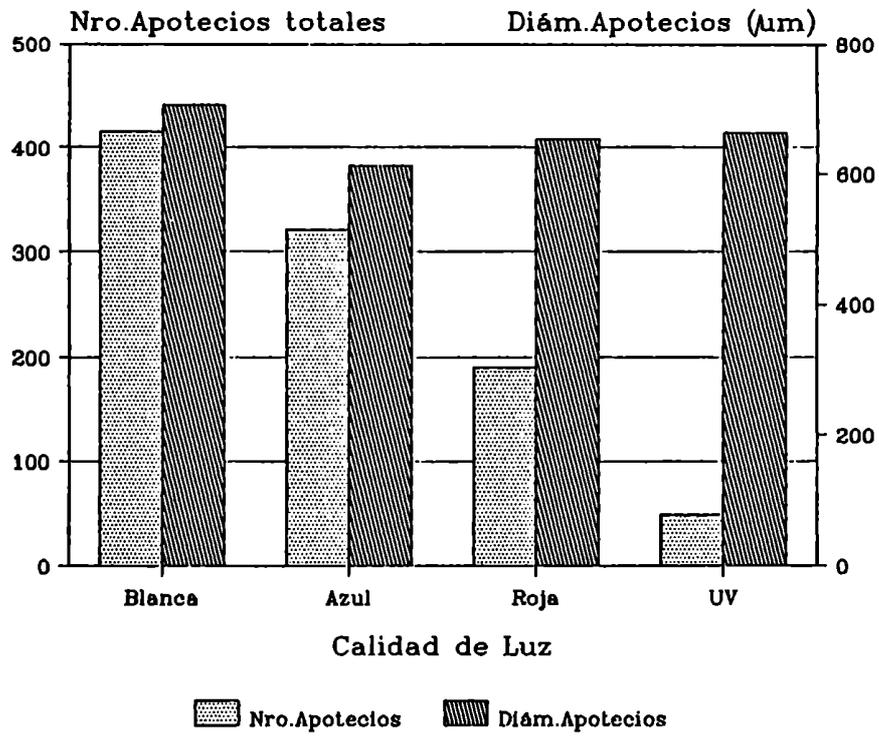


Figura 3.23. Calidad de luz y desarrollo sexual. Número total de apotecios por caja y sus diámetros en colonias crecidas bajo distintas calidades de luz aplicadas en forma continua.

Luz. Resultados.

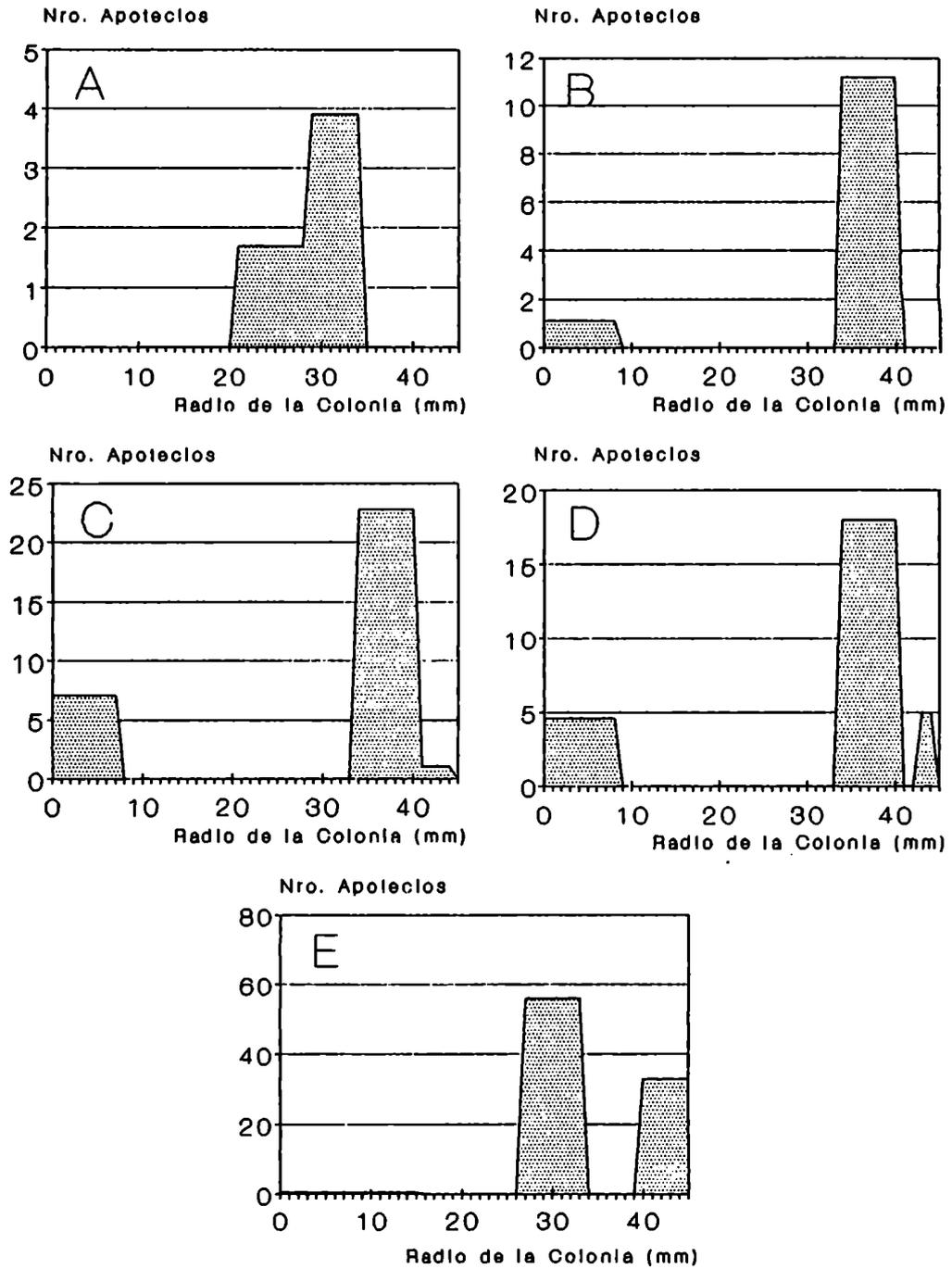


Figura 3.24. Distribución de apotecios en distintos tratamientos con luz blanca. Irradiaciones de 24 hs durante el cuarto (A), quinto (B), sexto (C) y séptimo día (D); y luz continua (E). Se representa el número de apotecios por mm dentro del área medida.

Luz. Resultados.

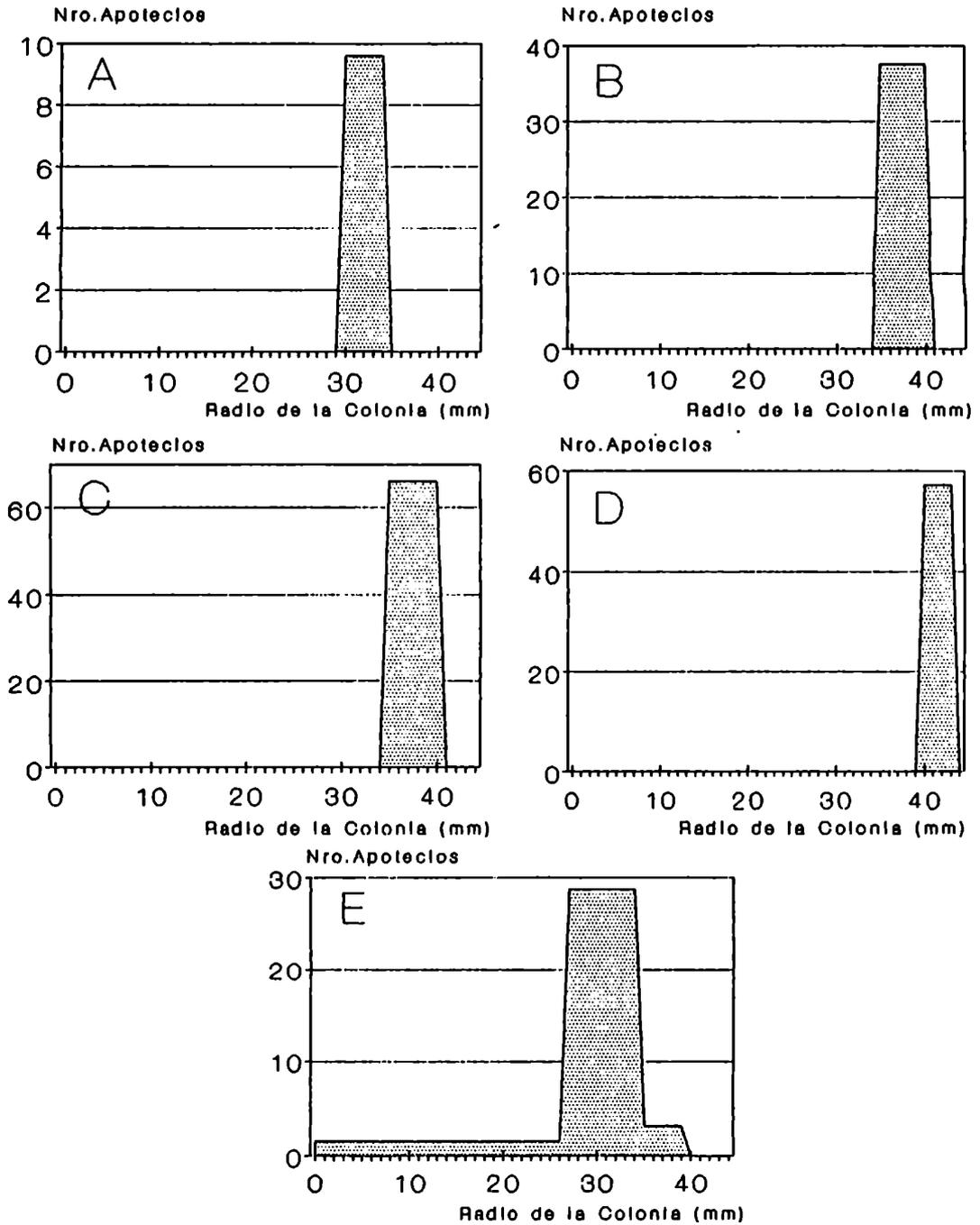


Figura 3.25. Distribución de apotecios en distintos tratamientos con luz azul irradiaciones de 24 hs. durante el cuarto (A), quinto (B), sexto (C) y séptimo día (D); y luz continua (E). Se representa el número de apotecios por mm dentro del área medida.

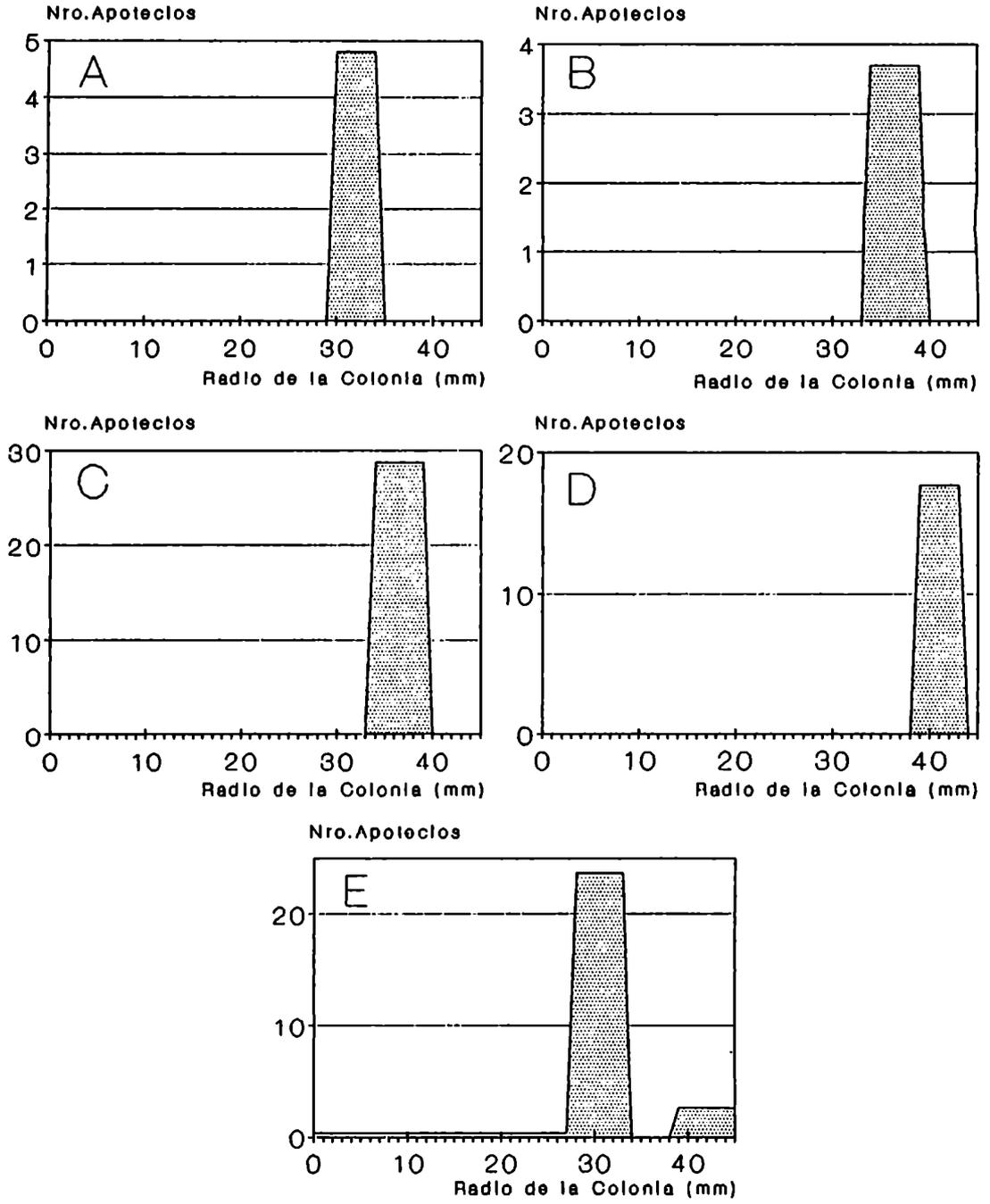


Figura 3.26. Distribución de apotecios en distintos tratamientos con luz roja. Irradiaciones de 24 hs. durante el cuarto (A), quinto (B), sexto (C) y séptimo día (D); y luz continua (E). Se representa el número de apotecios por mm dentro del área medida.

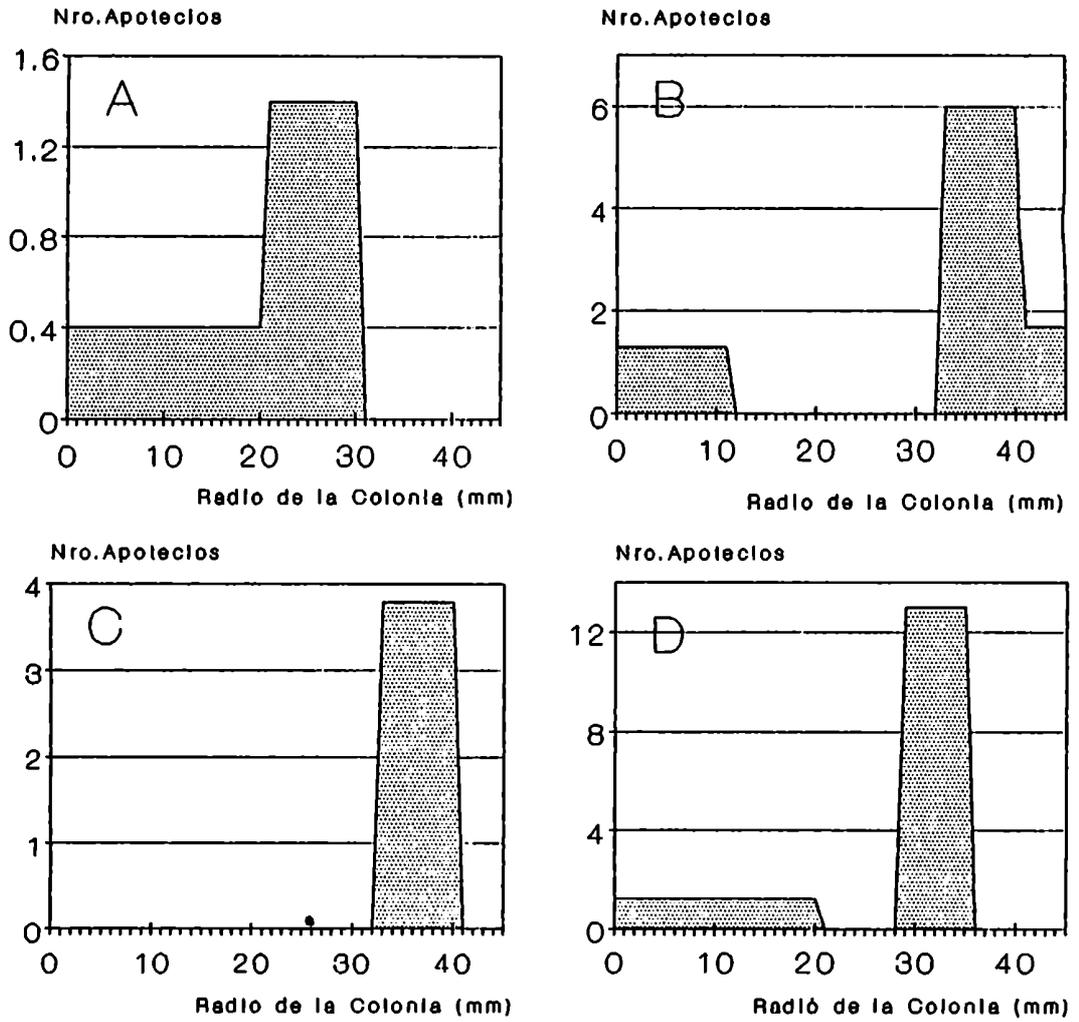


Figura 3.27. Distribución de apotecios en distintos tratamientos con UVo. Irradiaciones de 24 hs. durante el cuarto (A), quinto (B) y sexto día (C); y UVc continuo (D). Se representa el número de apotecios por mm dentro del área medida.

de los de luz blanca continua (Figs. 3.18, 3.23 y 3.28); pero los valores detectados en las colonias irradiadas los días 40 y 70 fueron menores que dicho testigo. Para la luz azul únicamente los tratamientos del 50 día superaron los valores de los micelios crecidos bajo luz azul constante, representando en este caso el 130%.

En luz roja no se hallaron diferencias significativas entre el número de apotecios totales de los tratamientos del 50 día y los de luz roja constante, los observados en los días 40, 60 y 70 fueron menores que aquellos. El caso de las colonias tratadas con UVc fue semejante al de luz roja, aunque en éste no se detectó desarrollo sexual en los tratamientos del 70 día (Fig. 3.28).

La distribución de los cuerpos fructíferos sobre las colonias siguió el mismo patrón con luz blanca, azul y roja. Las colonias expuestas en el 40 día mostraron apotecios mayormente en la zona II (Figs. 3.24 a 3.27, A), las irradiadas durante el 50 ó 60 días los generaron sobre la zona IIIa (Figs. 3.24 a 3.27, B y C), y las irradiadas durante el 70 día los produjeron sobre la zona IIIb (Figs. 3.24 a 3.26, D). En UVc, los patrones fueron semejantes, aunque se observó una clara tendencia al desarrollo de apotecios sobre áreas más viejas de las colonias (Fig. 3.27, A y B).

El tamaño de las fructificaciones siguió el mismo patrón para las cuatro luces ensayadas, siendo máximo para los tratamientos del 50 día (Fig. 3.29). Los mayores valores se observaron en los tratamientos del 50 día con luz azul, y los del 50 y 60 de UVc (Fig. 3.29).

La presencia de ascos fue normal para todas las calidades de luz probadas salvo para UVc, donde no fueron detectados.

Inhibición por irradiaciones de 24 hs. en el 20 día.

Los micelios fueron irradiados durante el 20 día de crecimiento con luz blanca, azul, roja o UVc; aplicándoseles en el

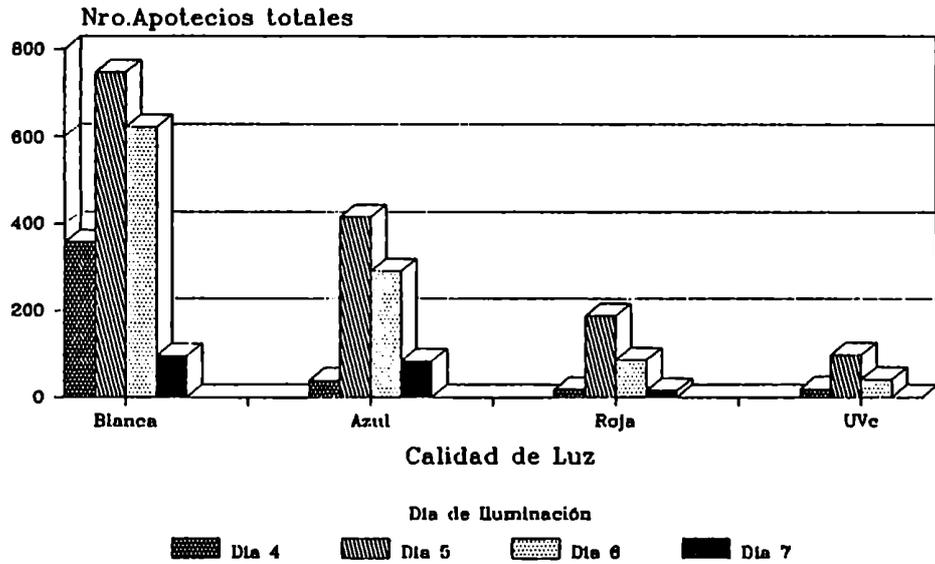


Figura 3.28. Número de apotecios con distintos tratamientos lumínicos. Número total de apotecios por caja ante irradiaciones de 24 hs. aplicados en distintos días y con calidades de luz blanca, azul, roja o UVc.

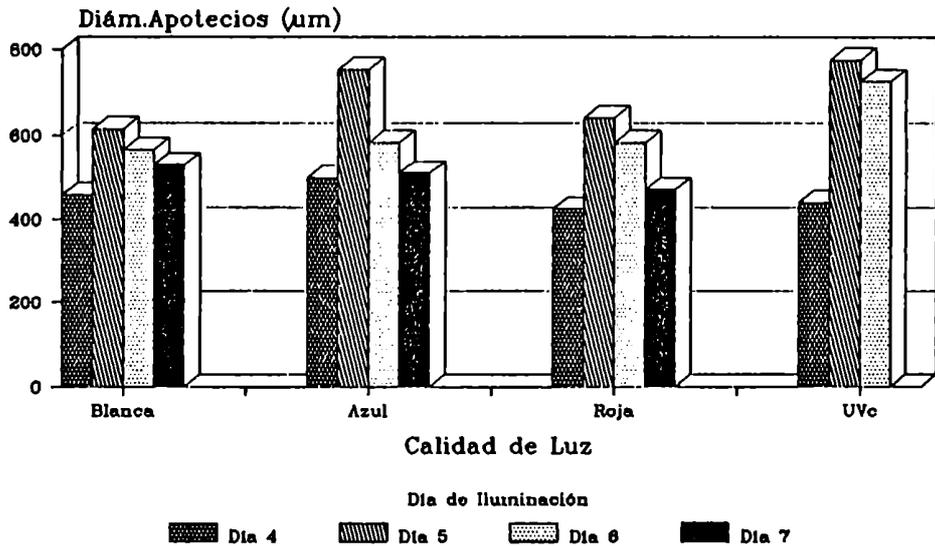


Figura 3.29. Diámetro de apotecios con distintos tratamientos lumínicos. Diámetro de los apotecios ante irradiaciones de 24 hs. aplicadas en distintos días y con calidades de luz blanca, azul, roja o UVc.

50 luz blanca. En los restantes días fueron mantenidos en oscuridad.

El número de apotecios producidos fue mayor en aquellos micelios expuestos a luz blanca o UVc durante el 20 día de crecimiento, seguidos por azul y roja (Fig. 3.30).

A partir de los datos expuestos se puede definir un cociente entre el número de apotecios producidos en los tratamientos de inducción (50 día de irradiación) y el obtenido tras la inhibición (irradiación en el 20 y 50 días). Este cociente dará una idea más concreta sobre el grado de inhibición de cada tratamiento.

Así, el grado de inhibición fue máximo para la luz blanca (8.7), seguida por la azul (6.6) y la roja (4.6), observándose en el caso de UVc un efecto inhibitorio casi nulo (0.9).

En todas las calidades de luz probadas las fructificaciones se produjeron sobre la zona II, aunque en luz azul y UVc se detectaron números reducidos en la zona IIb (Fig. 3. 31).

En cuanto al diámetro de los apotecios, se hallaron diferencias significativas entre los producidos en luz blanca y azul con los de UVc y luz roja (Fig. 3.30).

Sólo se hallaron ascos desarrollados en las cajas tratadas con luz blanca durante el 20 día.

C. ASPECTOS NUTRICIONALES.

En los ensayos nutricionales en medio sólido y bajo oscuridad constante que involucraron la variación del contenido de C y de N, la relación C/N, las mezclas de fuentes carbonadas y todos los tipos de fuentes de C y de N, no se observó la presencia de desarrollo sexual ni pigmentación en el micelio.

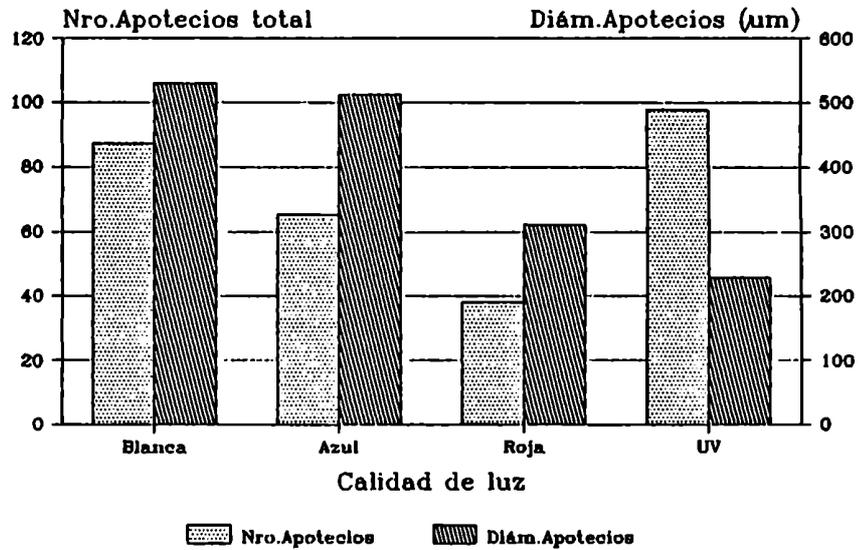


Figura 3.30. Inhibición. Número total de apotecios por caja y sus diámetros tras iluminación de 24 hs. con luz blanca, azul, roja o UVc en el segundo día, y 24 hs. de luz blanca en el quinto.

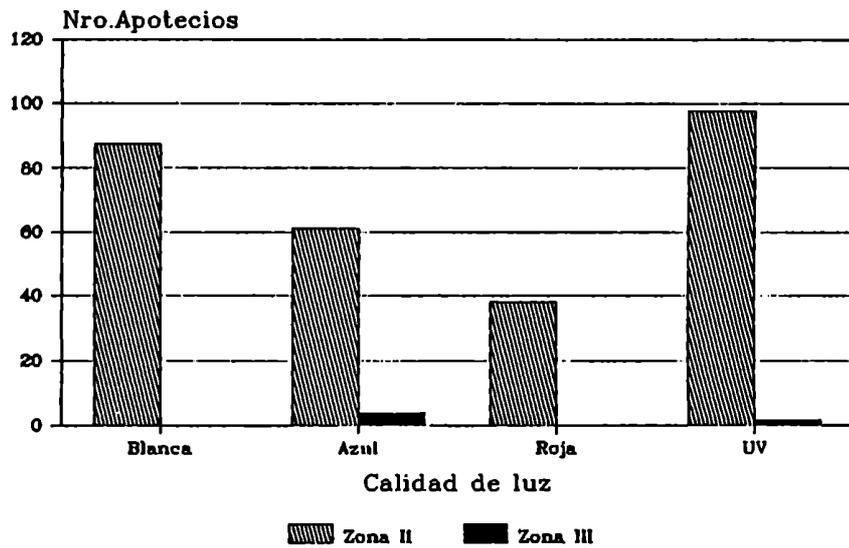


Figura 3.31. Inhibición y distribución de apotecios. Distribución de los apotecios por zonas de colonias crecidas bajo condiciones lumínicas inhibitorias.

Se realizaron cultivos en medio sólido con una concentración de glucosa de 2 ó 3 g de C/l, concentraciones en las que el número de apotecios fértiles fue mayor (ver capítulo de nutrición). Estos, luego de crecer en oscuridad, fueron expuestos a irradiaciones de luz blanca de 300 b/p por 24 hs. en distintos momentos de su crecimiento para mantenerlos finalmente en oscuridad hasta el día 15. La temperatura se mantuvo a 23°C.

El número de apotecios totales observados para uno y otro tratamiento mostraron comportamientos distintos. En glucosa 2 g de C/l se detectaron apotecios con irradiaciones en el día 40 hasta el 70 (Fig. 3.32), mientras que en 3 g de C/l fueron observados con tratamientos desde el 30 al 100 días (Fig. 3.18).

El mayor número de fructificaciones en 2 g de C/l se dió en el 40 día y decayó hacia el 60, y sus valores siempre fueron inferiores a los del testigo de luz continua.

El diámetro de los cuerpos fructíferos aumentó desde los tratamientos del 40 hasta los del día 60 (Fig. 3.32) siendo los promedios del 50 y 60 mayores aún que los del testigo de luz continua. Los apotecios siempre presentaron ascos con ascosporas.

El micelio no presentó pigmentación en ninguno de los tratamientos, los apotecios fueron naranja pálidos, incluso para el testigo de luz continua.

D. LUZ Y CRECIMIENTO VEGETATIVO.

Medio sólido.

Cuando las colonias fueron expuestas a condiciones de oscuridad o de iluminación constantes, alcanzaron el borde de las cajas durante el 50 día en luz blanca; el 60 en luz azul, roja o UVc; y en el 70 en oscuridad constante. Pero mientras en los micelios expuestos la velocidad de crecimiento aumentó

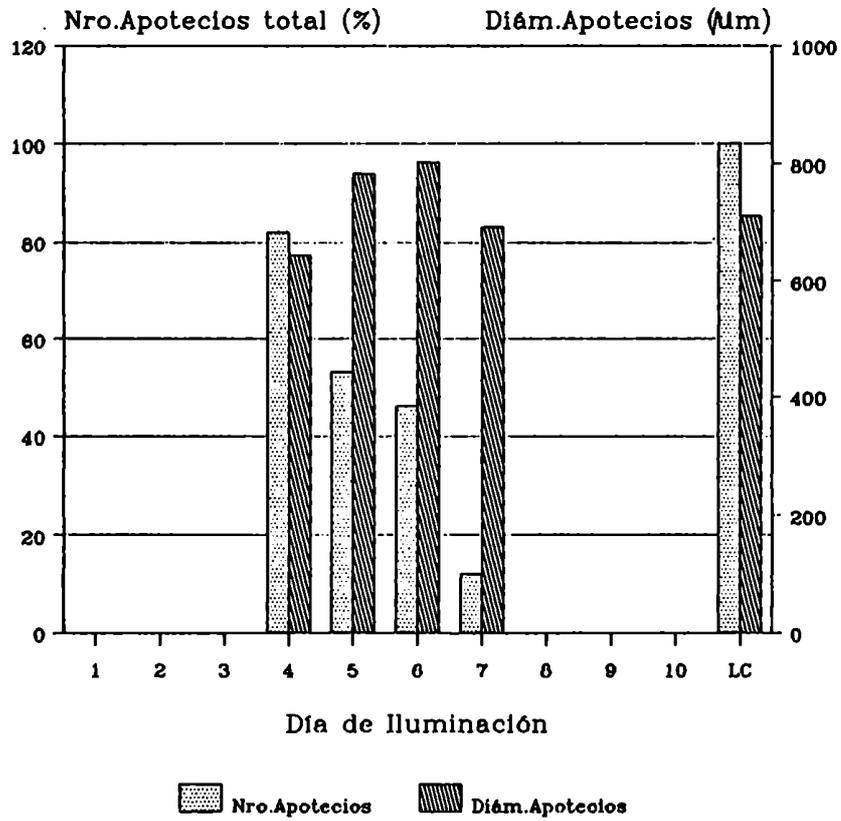


Figura 3.32. Irradiaciones de 24 hs. en medios con 2 g C/l de glucosa. Número total de apotecios por caja, expresado como porcentaje del testigo de luz continua (LC) y sus diámetros, tomados de colonias crecidas en una concentración de glucosa de 2 g C/l, e irradiadas con luz blanca durante 24 hs. en distintos días.

día a día, en las colonias desarrolladas en oscuridad constante la velocidad disminuyó (Fig. 3.33).

Medio líquido.

Los micelios desarrollados en oscuridad continua mostraron una velocidad de crecimiento mayor que las observadas en los restantes tratamientos, logrando un pico en el 50 día (Fig. 3.34). Le siguieron la luz blanca y azul con picos en el 80 día y en UVc el máximo crecimiento se alcanzó el 90 día.

En lo que respecta a la magnitud del crecimiento alcanzada el día del pico, no se hallaron diferencias significativas entre las de luz blanca, azul y oscuridad, pero sí con respecto a UVc, que permitió un crecimiento pobre (Fig. 3.34).

La pigmentación de los micelios fue intensa en luz blanca y azul y muy intensa en aquellos irradiados con UVc.

En luz blanca como en azul y UVc, se registró el desarrollo de apotecios alrededor del 80 día de crecimiento, aunque sólo fueron fértiles en luz blanca. En los cultivos expuestos a oscuridad no se produjo diferenciación sexual.

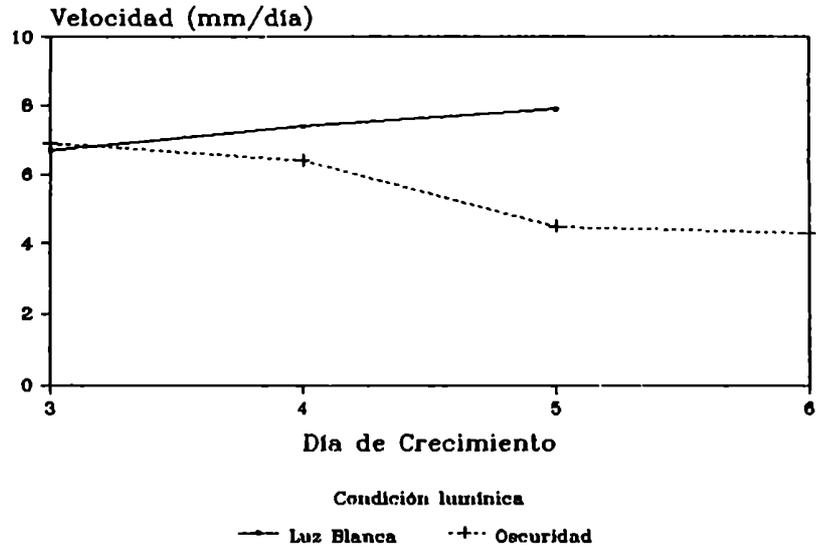


Figura 3.33. Crecimiento en medio sólido, en luz y oscuridad. Velocidad de crecimiento en medio sólido en condiciones de oscuridad o iluminación con luz blanca, continuas.

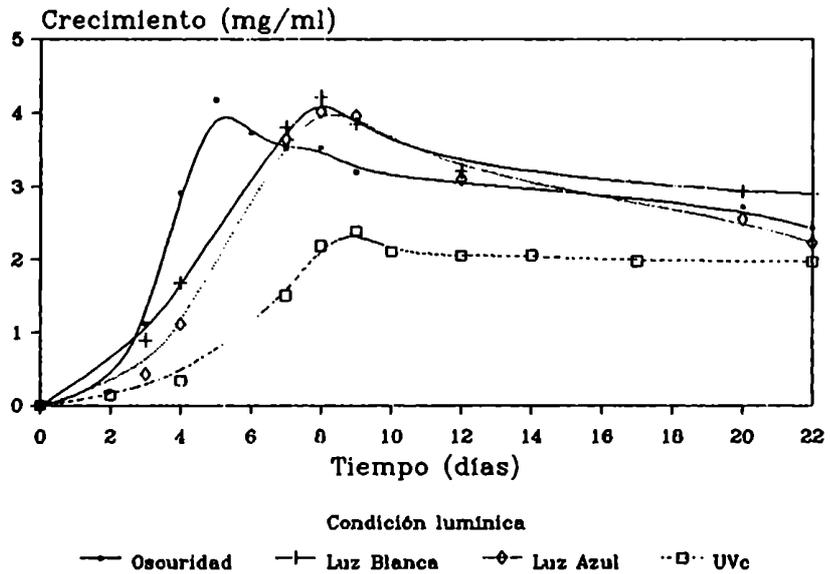


Figura 3.34. Crecimiento en medio líquido, en distintas calidades de luz. Curvas de crecimiento en medio líquido con luz blanca, azul y UVC, u oscuridad constantes.

Discusión

El desarrollo sexual de *I. carneus* fue totalmente fotodependiente manifestando una respuesta típicamente cualitativa. Estos resultados coinciden plenamente con los obtenidos por Gamundí y Ranalli (1964) cuando el medio de cultivo fuera estiércol de vaca tindalizado; en medio estándar PF o caseína, siempre cultivados en oscuridad, se desarrollaron primordios tardíamente y sus apotecios resultaron abortivos.

Se obtuvieron fructificaciones fértiles dentro de un amplio rango de luminosidades (10 hasta 500 b/p) aunque fue máximo entre 100 y 300 b/p, con luminosidades mayores hubo una leve inhibición del proceso sexual. Otras especies mostraron rangos similares como *Nectria haematococca*, entre 537 y 2150 lux, unas 50-200 b/p (Curtis, 1972); *Peurotus cornupiae* entre 75 y 2000 lux, 7-190 b/p (Delmas y Mamoun, 1982); o más amplios como en *Saccobolus platensis* entre 600 y 9000 lux, 55-840 b/p (Forchiassin, 1989).

Las bajas luminosidades favorecieron el desarrollo de apotecios de mayor diámetro lo que indicaría una inhibición en la expansión de dichas estructuras con altas luminosidades, y fue en los tratamientos de iluminación constante donde se encontraron siempre los mayores diámetros. *Pyronema domesticum* requirió para el máximo desarrollo de las paráfisis y excípulo intensidades menores que las necesarias para aparato sexual (Moore-Landecker, 1979 b). La cantidad de luz que necesitó *Ascobolus immersus* para la inducción de sus apotecios fue insuficiente para el normal desarrollo de su meiosis, dando como resultado ascos vacuolados (Lewis, 1975).

Cuando se aplicaron períodos de 24 hs. de luz blanca a colonias de distintas edades se pudo comprobar que *I. carneus* era más receptivo al estímulo en el 5º día de crecimiento. Este comportamiento indicaría la necesidad de una etapa previa de crecimiento vegetativo para alcanzar la com-

pleta madurez de los sistemas fotodependientes involucrados en la diferenciación de las estructuras sexuales, tal como ocurrió en *Ascobolus magnificus* (Yu, 1954), en *Gibberella zeae* (Tschanz et al., 1976) y en *Saccobolus platensis* (Forchiassin, 1983).

El tiempo mínimo de exposición a la luz blanca necesario para la inducción en el 5º día de crecimiento fue de 10 segundos, con lo que se observó sólo el desarrollo de la estructura estéril de los apotecios. Únicamente con exposiciones de 4 hs. o más se indujo el desarrollo de fructificaciones fértiles. De esta manera la cantidad de luz requerida para gatillar el inicio del proceso sexual es menor que la necesaria para su completa maduración.

Si bien muchos organismos requieren largos tiempos de exposición para lograr la inducción, como por ejemplo *Pyronema domesticum*, que necesitó de 6 horas para inducir el desarrollo de gametangios y de 12 para lograr apotecios normales (Moore-Landecker, 1979 a), *I. carneus* se encontraría entre aquellos que sólo requieren de períodos de iluminación breves, de unos pocos segundos, entre los que se hallan *Psilocybe cubensis* (Badham, 1980), *Pleospora herbarum* (Leach, 1963) *Poria ambigua* (Robbins y Hervey, 1960) y *Trichoderma harzianum* (Horwitz et al., 1990).

El hecho de que los tratamientos de 24 hs. mostraran números de apotecios mayores en los días 5º y 6º que los observados en los de luz continua, demostró la existencia de una etapa fotoinhibitoria del desarrollo sexual en los tres primeros días de crecimiento, lo que se comprobó finalmente con la aplicación de períodos iniciales de oscuridad crecientes y con los tratamientos de iluminación de dos períodos combinados.

Este efecto dual de la luz y dependiente de la edad de la colonia representaría un caso intermedio de inhibición entre el de *Gelasinospora reticulispora*, que no fructificó cuando fue irradiado durante las primeras 30 hs. de crecimiento, por lo que esa fase recibió el nombre de período

inductivo (Inoue y Furuya, 1974 a y b); y el caso de *Saccobolus platensis* (Forchiassin, 1983) donde la inhibición no fue tan marcada como en *I. carneus*.

En *Sordaria fimicola* (Surapipith y Lindenmayer, 1969) el inicio del desarrollo de los peritecios fue inhibido por la luz en hifas de menos de 18 hs. de crecimiento en oscuridad. Se observan otros efectos inhibitorios cuando se comparan tratamientos de luz constante con la alternancia de luz y oscuridad en *Diaporthe phaseolorum* var. *bataatatis* (Timnick et al., 1951) e *Hypomyces solani* f. *cucurbitae* (Curtis, 1964).

En las experiencias con distintos tratamientos fotoinductores, el diámetro de las fructificaciones disminuyó conforme el período de iluminación fuera aplicado más tardíamente y debido probablemente al menor tiempo disponible para completar su desarrollo. Pero también resultaron en una disminución del diámetro aquellos tratamientos que involucraron a los primeros días de crecimiento, como en las colonias iluminadas 24 hs. con luz blanca en el 3º día ó cuando una fase de luz constante se inició en el 2º, 3º ó 4º día, también con la alternancia de 24 hs. de iluminación los días 1º y 4º ó 2º y 4º, y finalmente con luz azul, roja o UVc aplicadas durante el 4º, lo que indicaría que la fotoinducción sobre áreas cercanas a las de inhibición podrían afectar al desarrollo de los apotecios.

Los micelios irradiados con distintas calidades de luz continua mostraron una mayor producción de ascocarpos en luz azul. Este tipo de respuesta a la luz azul es común en los hongos filamentosos fotosensibles (Curtis, 1972; Inoue y Furuya, 1975; Gressel, 1979; Dehorter y Lacoste, 1980; Senger, 1982; Forchiassin, 1983; Innocenti et al., 1983), aunque en todos los casos registrados también existió una respuesta al UVc.

El proceso inhibitorio que se manifestó durante los tres primeros días de crecimiento en *I. carneus* fue favorecido también por la luz azul. En *G. reticulispora* las calidades de luz más eficaces para la inhibición de la fructi-

ficación fueron azul y UVc (Inoue y Furuya, 1974 b), de esta manera se remarca una importante semejanza entre este modelo de fotoinhibición y fotoinducción, y el observado en *I. carneus*.

No hubo desarrollo de ascos por irradiaciones de 24 hs. de UVc durante los días 4º, 5º y 6º, aunque si en los tratamientos de UVc continua, mostrando la necesidad de mayores tiempos de exposición para esta calidad de luz.

El efecto dado por los mecanismos de inhibición e inducción no sólo representaron un efecto temporal sino también espacial, que se hizo evidente principalmente cuando las colonias fueron expuestas 24 hs. en distintos momentos de su desarrollo con luces de distintas calidades. Así los apotecios surgieron dentro de zonas definidas y predecibles sobre las colonias y relacionadas con el momento de la irradiación.

En términos generales los apotecios se desarrollaron sobre áreas en forma de anillos estrechos ubicadas a distancias determinadas del inóculo, que concordaron con las de micelio joven irradiado inicialmente o zona de crecimiento periférico definida por Trinci (1971), y constituida por hifas jóvenes poco diferenciadas y con un activo crecimiento exponencial sobre un medio de cultivo aún rico.

Comportamientos similares se encuentran en los trabajos de Ross (1982) con *Coprinus congregatus* y Raudaskoski e Yli-Mattila (1985) en *Schizophyllum commune*. Estos últimos autores determinaron que la zona de inducción comprendía 1 mm desde el ápice hifal, y la respuesta se daba en células de más de 26 hs. de vida. Perkins (1969) estimó que las células capaces de una diferenciación sexual fotoinducida estarían dentro de los primeros 1 a 13 mm desde el ápice al momento de la iluminación, representando unas 2 a 21 hs. de edad.

Si bien en *I. carneus* no se determinó con exactitud la zona capaz de recibir el estímulo lumínico, juzgando por el ancho de las áreas medidas, y en base a su ubicación y desarrollo en el tiempo, probablemente serían células jóvenes las encargadas de recibir el estímulo lumínico.

La existencia de dichas áreas y la falta de desarrollo sexual fuera de las mismas, principalmente cuando los tratamientos fueron efectuados con luz azul o roja, podría deberse a variadas causas como: i) distintos grados de madurez de las células y su consiguiente respuesta diferencial, ii) decaimiento del sistema fotoreceptor, iii) acción de un efecto inhibitor desde las áreas más viejas, o iv) el desplazamiento del sistema fotoreceptor junto con el crecimiento vegetativo. Los tres últimos puntos fueron ya propuestos por Ross (1982) aunque de los resultados del presente trabajo gana en importancia el punto referido al efecto inhibitorio ya probado en *I. carneus*.

Una experiencia que aporta interesantes datos fue la de irradiaciones puntuales. La iluminación de células jóvenes en el 50 día de crecimiento con luz blanca indujo el desarrollo de apotecios con ascos maduros sobre un área en forma de anillo completo que coincidió con parte del 40 día y con el 50 de crecimiento vegetativo. Este hecho no sólo refuerza la hipótesis de que son las células jóvenes las encargadas de recibir el estímulo, sino que algún intermediario producido por el proceso de transducción de la señal lumínica podría difundir rápidamente en forma lateral hacia células con un mismo grado de diferenciación, para inducir en ellas el desarrollo sexual.

La irradiación puntual de células maduras durante el 50 día indujo, de manera simultánea, dos procesos bien distintos: el primero fue el desarrollo de apotecios sin ascos ubicados sobre el borde de la colonia; esta inducción se daría probablemente sobre áreas microdiferenciadas de partes maduras de la colonia, y existiría una rápida difusión del estímulo en el sentido radial y lateral para producir finalmente una respuesta sobre células con un grado de diferenciación determinado, al igual que en el caso anterior. Al mismo tiempo la luz activaría un proceso inhibitor del desarrollo sexual que demuestra una influencia estricta desde el punto

de irradiación hasta el borde de la colonia y con una importante difusión en el sentido radial.

Estos resultados demuestran que el proceso inhibitorio no es activado sólo en las hifas en crecimiento durante los días 10 al 30, sino que las mismas mantienen dicha capacidad incluso hasta el 50 día; y se detecta también una importante difusión en el sentido radial.

Aparentemente la capacidad fotoinductora sería funcional incluso durante los primeros días de crecimiento, pero la respuesta sexual quedaría prevenida por la alta influencia del proceso inhibitorio.

La falta de ascos en los apotecios producidos por los micelios irradiados en los días 10 y 40 ó 20 y 40, indicarían que dicho efecto afectaría también al desarrollo de estas estructuras y la posibilidad de una difusión lateral, aunque mucho más lenta que la del inductor.

La obtención de apotecios con ascos maduros tras la inducción puntual demuestra que su completo desarrollo es independiente de la luz pero dependiente del equilibrio establecido entre dicho proceso y el de inhibición.

Las respuestas de *I. carneus* ante distintas calidades de luz indican la existencia de uno o más fotorreceptores con un rango de absorción dentro del azul (380-480 nm), y una muy baja respuesta en el UVc (300-380 nm).

Con respecto al número de fotorreceptores involucrados existirían por lo menos dos posibilidades: la presencia de varios fotorreceptores con rangos de acción similares. El primero se encontraría ligado al proceso de inhibición del desarrollo sexual y se ubicaría en las células crecidas durante los tres primeros días y su actividad se mantendría, como ya fuera visto, hasta por lo menos el 50 día de crecimiento. Un segundo fotorreceptor estaría ligado al proceso de inducción sexual y se ubicaría en células jóvenes de la colonia. El tercero estaría involucrado con el crecimiento vegetativo.

La segunda alternativa se basa en la existencia de un único fotorreceptor que, desencadenaría distintas vías metabólicas, dependiendo del grado de diferenciación de las células involucradas. Dichas vías podrían favorecer el desarrollo sexual o no.

Los posibles pigmentos implicados en la recepción del estímulo lumínico son las flavinas y los carotenos; estos últimos no absorben dentro del rango del UVc (Galland y Senger, 1988). De esta manera el o los fotorreceptores de *I. carneus* podrían pertenecer a cualquiera de las dos familias de pigmentos mencionadas ya que en ambos casos puede absorber en el rango del azul.

La similitud existente entre los espectros de acción definidos en *Neurospora* para la fotorreducción del citocromo b y la fotoinhibición del ritmo circadiano de conidiación, y las obtenidas en otros hongos son, para Muñoz y Butler (1975), elementos de juicio suficientes como para pensar que en todos ellos estaría involucrado el mismo tipo de pigmento, es decir una flavina. Aunque para Briggs e Iino (1983) el espectro de acción no reflejaría necesariamente el espectro de absorción del pigmento fotorreceptor.

El uso de análogos de las flavinas (rosioflavina) en *Phycomyces blakesleeanus* (Otto *et al.*, 1981) permitió la obtención de respuestas fototrópicas positivas de sus esporangióforos en 529 nm, longitud no absorbida por la riboflavina y reemplazándola en su actividad en este caso.

En *I. carneus* no es posible determinar, con los datos disponibles, si el fotorreceptor corresponde a una flavina o a un caroteno, aunque en *G. reticulispora* (Inoue y Furuya, 1974 a y b, 1975) y *S. platensis* (Forchiassin, 1989) hongos que presentaron comportamientos similares en cuanto a su desarrollo sexual, el efecto de una flavina fue evidente.

En lo que respecta a la relación entre la luz, la nutrición carbonada y nitrogenada, y el desarrollo sexual de *I. carneus*, no se detectaron apotecios en oscuridad en ninguno de los distintos tipos fuentes de carbono o de nitrógeno

indicadas ni ante la variación de sus cantidades, demostrando que su respuesta cualitativa a la luz es estricta.

El número de trabajos en los que se relacionan los factores lumínicos y los nutricionales es pobre, pero se pueden citar los trabajos hechos sobre *Clavicornia pixidata* (James y McLaughlin, 1988) donde el requerimiento de luz fue absoluto para la inducción de su fructificación, independientemente de la fuente de carbono utilizada, *Nectria ditissima* (Dehorter y Perrin, 1983 a y b) y *Ascobolus biguttulatus* (Pardo y Forchiassin, 1993 c) que también fructificaron en un amplio espectro de fuentes carbonadas y nitrogenadas, pero el requerimiento de luz fue independiente de las fuentes usadas.

En cambio los efectos de inhibición y de inducción sí se vieron alterados por la cantidad de glucosa disponible en el medio. Con una concentración de 2 g de C/l e irradiaciones de 24 hs. con luz blanca en distintos momentos del desarrollo de las colonias, no se observó el efecto inhibitorio y el máximo día de respuesta fue el 40, luego de un período de insensibilidad. Aparece entonces aquí una clara etapa de madurez de la colonia, previa a la inducción, como fuera propuesto por Leach (1971) y otros autores y ya tratada en este trabajo, y que sería enmascarada por la acción del efecto de inhibición cuando la concentración de glucosa es de 3 g de C/l.

El crecimiento vegetativo de *I. carneus* se vio afectado profundamente por la luz y por las condiciones de cultivo. La luz favoreció el crecimiento en medio sólido pero en medio líquido lo retrasó.

En medio sólido las colonias desarrolladas en luz azul, roja o UVc se comportaron de manera semejante, tardando un día más en llegar al borde de las cajas (60) que las crecidas en luz blanca; aunque las de oscuridad continuaron alcanzaron dicho límite en el 70 día.

En cambio, en medio líquido los micelios de oscuridad lograron su máximo crecimiento en el 50 día, tres días antes que los de luz blanca y azul, y cuatro que los de UVc. El

caso de los micelios desarrollados bajo UVc fue el único en el que se vió afectado el peso seco producido ya que representó, en el día de su mayor crecimiento, un 52% del producido por influencia de las otras luces en sus respectivos picos.

Si bien existen pocos estudios precisos sobre éste tema, se hallan casos, como los de *Pyronema domesticum* (Moore-Landecker y Shropshire, 1982), *Ostracoblaha implexa* (Alderman y Jones, 1971), *Alternaria tagetica* (Cotty y Misaghi, 1985) y *Aspergillus ornatus* (Hill, 1976), en los que la luz inhibió el crecimiento; mientras que en *Blastocladiella emersonii* (Cantino y Hornstein, 1956) y *Verticillum albo-atrum* (Brandt, 1967), la luz le favoreció.

En ninguno de los casos citados se compararon distintas condiciones de cultivo pero resulta evidente que estas afectan de manera muy distinta al desarrollo. Para Carlile (1965) la luz en condiciones de cultivo óptimas promovería el mayor crecimiento del organismo al tiempo que en condiciones subóptimas lo disminuiría, y cualquier desviación de estas condiciones afectaría a los procesos de modo diferente. En *I. carneus* las condiciones de cultivo afectan a su desarrollo de manera bien distinta, haciendo muy difícil la posibilidad de extrapolar resultados de una condición de cultivo a otra.

ASPECTOS METABOLICOS

Resultados .

A. RESPUESTAS A AGREGADOS EN OSCURIDAD (FOTOMIMETISMO).

Agregado de db-AMPc en colonias de distintas edades.

Las colonias crecieron en medio sólido, oscuridad constante y 23°C. Se les agregó en distintos momentos de su crecimiento una gota de db-AMPc (4 mM) sobre el micelio.

El número total de apotecios por caja aumentó desde los agregados en el 20 día hasta llegar a una máxima producción en el 50, en micelios de mayor edad el número de fructificaciones decayó (Fig. 3.35).

El diámetro de los apotecios aumentó de manera muy significativa desde el 20 día hasta alcanzar un valor máximo en el 70 (Fig. 3.35). En ningún caso se detectó la presencia de ascos con ascosporas.

El micelio no mostró pigmentación y los apotecios fueron de color naranja pálido.

Agregados durante el 50 día.

A cultivos crecidos en oscuridad constante se les agregó durante el 50 día, una gota de una de las siguientes soluciones: db-AMPc (4 mM); glucosa, arabinosa (6 g de C/l); asparagina (0.4 g de N/l) o extracto de levadura (6 g/l).

El mayor número de apotecios se observó en db-cAMP, aunque siempre fue muy inferior a los testigos de luz (Tabla 3.V), le siguieron glucosa y asparagina. El diámetro de las fructificaciones para estos tres agregados no mostraron diferencias significativas (Tabla 3.V). Los tratamientos con extracto de levadura mostraron números de apotecios semejan-

Metabolismo. Resultados.

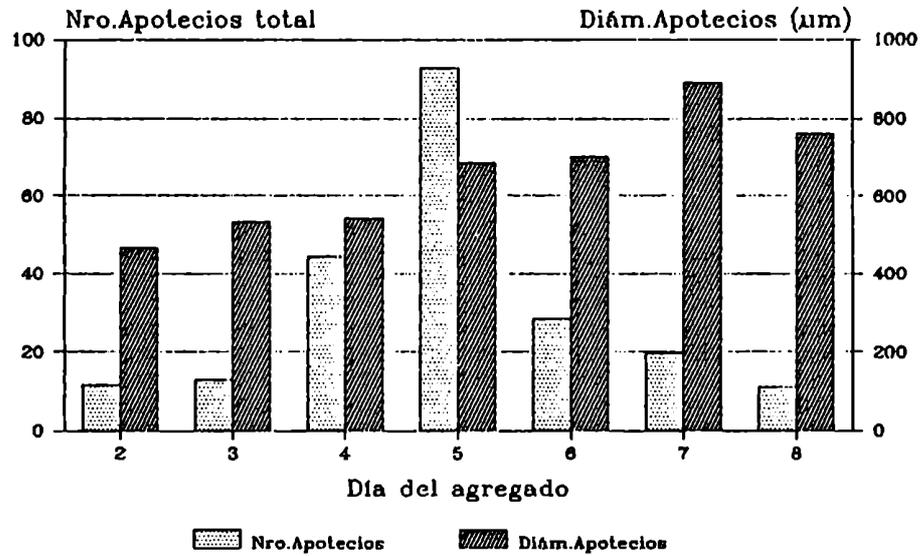


Figura 3.35. db-AMPC y el desarrollo sexual. Producción de apotecios y sus diámetros, tras el agregado de db-AMPC en distintos días, sobre colonias desarrolladas en oscuridad continua.

Tabla 3.V. Agregados en oscuridad y desarrollo sexual. Producción de apotecios y sus diámetros tras el agregado de distintas sustancias o extractos, durante el quinto día en colonias crecidas en oscuridad constante.

Agregado	Nro. Apotecios total	Diám. Apotecios (µm)
db-AMPC	81.5 (2.64)	687.4 (66.32)
Glucosa	50.7 (3.66)	607.9 (93.27)
Arabinosa	26.1 (3.73)	598.8 (89.95)
Asparagina	35.8 (7.65)	637.5 (37.56)
Ext. de Levadura	20.1 (9.32)	712.8 (109.69)
Test. de luz (día 5)	734.6 (34.31)	703.1 (32.60)
Test. con agua	0	0

tes a los obtenidos en arabinosa, pero el diámetro promedio del primero fue significativamente mayor a los de los restantes tratamientos.

Las fructificaciones nunca mostraron ascos desarrollados.

Los micelios no evidenciaron pigmentación al igual que los ascocarpos desarrollados con glucosa, asparagina y extracto de levadura, en cambio los producidos en arabinosa y db-AMPC mostraron una pigmentación naranja pálida.

B. METABOLISMO DEL GLUCOGENO.

Las colonias crecieron en medio sólido, en oscuridad o luz blanca de 300 b/p constantes y a 23°C. Se trataron cajas con I₂/KI cada 24 hs. para determinar la presencia de glucógeno y su cantidad relativa.

La coloración en las células se manifestó como pequeños gránulos presentes en las células apicales de las colonias crecidas tanto en luz cuanto en oscuridad, o en forma difusa dentro de células maduras y con mayor intensidad en aquellas en forma de rosario, pero siempre intercaladas con células sin coloración. Cuando la coloración llegó a ser muy marcada, se observó un aspecto granulado muy denso.

En las colonias crecidas en oscuridad la presencia de glucógeno se hizo evidente desde el 30 día de crecimiento (Tabla 3.VI), a partir del 50 día hasta el 130 el nivel del polisacárido fue alto para alcanzar en los días 140 y 150 los mayores grados.

En cambio, los micelios crecidos en luz blanca se caracterizaron por la falta de glucógeno salvo en los días 20, 60 y 110 y con mayor intensidad los días 30 y 120, pero en ningún caso se observó un nivel tan alto como el alcanzado por las colonias crecidas en oscuridad.

Con respecto a las estructuras sexuales observadas en las colonias irradiadas los ascogonios mostraron contenidos pobres del polisacárido al igual que las hifas ascógenas

(Tabla 3.VI), en éstas se acumuló principalmente sobre las células apicales. En los ascos únicamente se hallaron niveles elevados en sus etapas juveniles, durante los días 70 y 80. Las ascosporas, las paráfisis y las células del excípulo no evidenciaron coloración en ningún momento.

Discusión

Se ha encontrado en distintos hongos una relación directa entre la inducción sexual mediada por la luz y el AMPc (Uno e Ishikawa, 1973; Uno *et al.*, 1974; Sharada *et al.*, 1992; Galvagno *et al.* 1984).

La producción de apotecios en oscuridad por el agregado de db-AMPc en *I. carneus* sugiere una estrecha ligazón entre el efecto de la luz y el del AMPc sobre la formación de fructificaciones, coincidiendo el día de máxima respuesta (5º) con el de inducción por luz blanca.

Inducciones semejantes se produjeron en *Saccobolus platensis* (Galvagno *et al.*, *op. cit.*) aunque en *I. carneus* la respuesta fue pobre en el número final de fructificaciones observadas y, principalmente, en la falta de ascos desarrollados.

La inducción de la diferenciación de cuerpos fructíferos en el 2º y 3º días ratificaría las observaciones realizadas en el capítulo anterior sobre la superposición espacial de este efecto con el de inhibición.

No obstante, el AMPc es un compuesto que en *I. carneus* reemplaza al efecto fotoinductor, posiblemente a través de la activación de enzimas específicas y con ello, de vías metabólicas involucradas en la diferenciación sexual. Pero esta inducción sería incompleta ya que los apotecios desarrollados no mostraron ascos manifestándose así la existencia de otros mecanismos involucrados en el proceso y no gatillados durante la experiencia.

EL efecto inductivo provocado por el agregado de glucosa, asparagina, arabinosa y extracto de levadura podría deberse a microcambios producidos por el súbito aumento de la concentración de estos compuestos sobre las células. Posiblemente el micelio crecido en oscuridad continua se encuentre con sus mecanismos metabólicos preparados para recibir el

estímulo lumínico necesario para desencadenar el proceso sexual, este grado de hipersensibilización le llevaría a producir una respuesta sexual ante el estímulo provocado por agregado de dichos compuestos. De todas formas es imposible determinar bajo las presentes condiciones experimentales si existen diferencias en los mecanismo de una u otra sustancia.

Si bien no existe una amplia bibliografía sobre este tema, se puede mencionar la inducción provocada en *Blastocladiella emersonii* por tiamina y timidina (Turian y Cantino, 1959), o por mezclas equimolares de succinato y glioxalato (Cantino y Horenstein, 1959) o por la acción de distintos compuestos oxidantes en *Pyronema domesticum* (Moore-Landecker, 1983).

Las técnicas histoquímicas revelaron que en *I. carneus* el comportamiento del glucógeno estuvo significativamente ligado a la condición lumínica a la que fuera expuesto.

De esta manera en las colonias crecidas en oscuridad constante y en las que no hubo desarrollo sexual, sus células mostraron cantidades de glucógeno acumulado muy elevadas si se las compara con las detectadas en las colonias de luz continua. En estas últimas debió existir una degradación y movilización del polisacárido hacia las células en proceso de diferenciación.

Resultados similares se encuentran en *Pyronema domesticum* (Moore-Landecker, 1981 a y b) donde el glucógeno se acumuló en los micelios expuestos a condiciones no favorables para la inducción sexual y sólo se hallaron niveles pobres en los fructificados. También se detectaron niveles importantes en el sistema ascógeno (Moore-Landecker, 1981 b) como en el caso presente.

Una relación semejante se encontró en *I. carneus* en medio líquido, donde la degradación de los hidratos de carbono totales se inició durante el 60 día de crecimiento (equiparable con el comportamiento del glucógeno del micelio), antecediendo al inicio del desarrollo sexual en el 70,

y al pico de crecimiento vegetativo y al consumo total de la glucosa del medio de cultivo, en el 80. Eventos semejantes fueron detectados en *Coprinus cinereus* (Jirjis y Moore, 1976; Moore *et al.*, 1979).

De esta manera se puede sostener la idea de que en *I. carneus* existiría una correlación entre la luz, el metabolismo del glucógeno y la diferenciación sexual.

Para muchos autores el metabolismo del glucógeno se encontraría ligado con la diferenciación sexual. Así durante el desarrollo del cuerpo fructífero de *Coprinus cinereus* grandes cantidades de glucógeno se acumularon en el píleo para ser degradados durante la formación de las basidiosporas, la expansión del píleo y la elongación del pie (Ji y Moore, 1993); datos similares se obtuvieron en *Volvariella volvacea* y *Pleurotus sajor-caju* (Chiu y Cheung, 1991), aunque en este último finalmente no se le relacionó directamente con la inducción sexual (Chiu y To, 1993).

El AMPc jugaría un importante rol, activando enzimas específicas relacionadas con el proceso sexual, este efecto fue comprobado sobre enzimas claves del metabolismo de los hidratos de carbono (Pall, 1984). En *Coprinus macrorhizus* (Uno e Ishikawa, 1976 y 1978) la activación de la enzima glucógeno fosforilasa parcialmente purificada, e involucrada en la degradación del polisacárido, requirió de una fracción celular que contenía una proteína quinasa AMPc dependiente. En *Schizophyllum commune* (Yli-Mattila, 1987) luego de exponer los cultivos a la luz se detectó un fuerte incremento del AMPc, y posteriormente una caída de la reservas del polisacárido.

Los datos experimentales obtenidos en *I. carneus* reflejan, como se ha indicado anteriormente, un comportamiento semejante.

TEMPERATURA Y DESARROLLO

Resultados

A. DESARROLLO SEXUAL.

Temperatura e iluminación constante.

Las colonias se desarrollaron durante 14 días con luz blanca de 300 b/p continua y a temperaturas de 18, 23 ó 28°C.

El mayor número de apotecios se halló en los tratamientos de 23°C (Fig. 3.36) al tiempo que las colonias crecidas a 28°C mostraron números muy reducidos aunque con numerosos protoapotecios.

La distribución de los apotecios sobre las colonias crecidas con iluminación constante y a distintas temperaturas arrojaron datos interesantes (fig. 3.37). A 18°C se desarrollaron sobre la zona comprendida entre unos 27 y 42 mm desde el inóculo (5º y parte del 6º día de crecimiento); con 23°C lo hicieron entre 25 y 33 mm (4º día); y a 28°C entre 26 mm y 42mm (4º y parte del 5º día).

El diámetro de las fructificaciones fue semejante para los tratamientos de 18 y 23°C ($675.3 \pm 76.74 \mu\text{m}$) y en 28°C tuvieron tamaños menores ($521.2 \pm 89.56 \mu\text{m}$). Sólo se hallaron ascos con ascosporas en 23°C.

Todos los micelios y apotecios mostraron marcados grados de pigmentación.

Temperatura y condiciones lumínicas no inductoras.

Las colonias se desarrollaron durante 15 días en oscuridad constante o fueron irradiados con luz blanca de 300 b/p durante el 2º día de crecimiento, bajo las temperaturas ya indicadas.

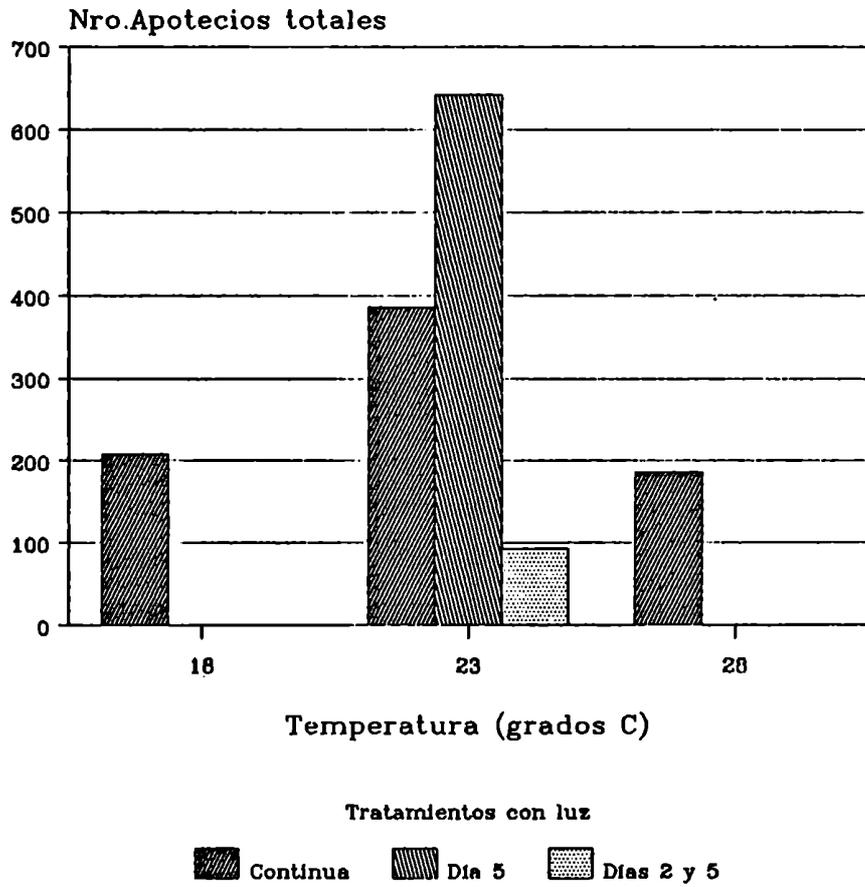


Figura 3.36. Temperatura y luz. Número total de apotecios por caja frente a tratamientos lumínicos inductores, inhibidores, o de luz continua, efectuados a 18, 23 ó 28 grados C.

Temperatura. Resultados.

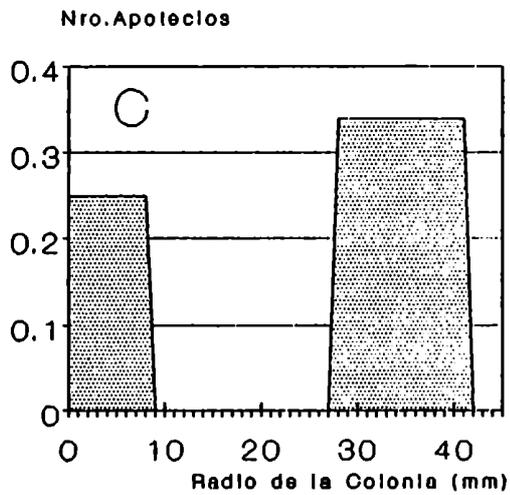
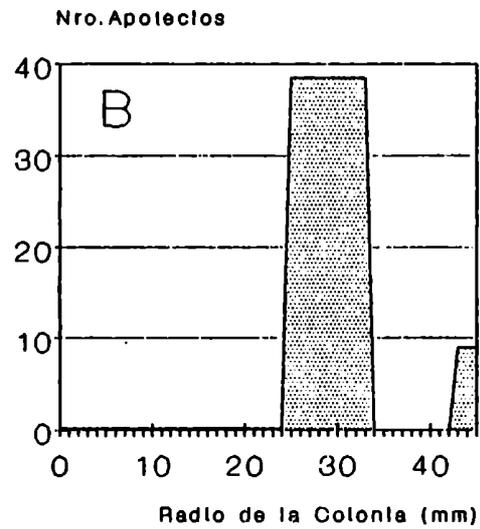
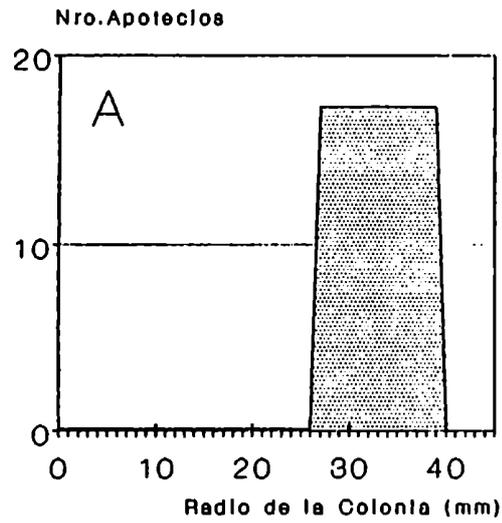


Figura 3.37. Distribución de apotecios a distintas temperaturas. Distribución de los apotecios sobre colonias expuestas a luz blanca continua, y a temperaturas de 18 (A), 23 (B) y 28 (C) grados centígrados.

No se observó desarrollo sexual ni pigmentación de los micelios en ninguno de los tratamientos realizados.

Temperatura y condiciones lumínicas inductoras.

Los cultivos se desarrollaron bajo las mismas condiciones usadas en la experiencia anterior, pero el período de iluminación se aplicó durante el 50 día.

En los micelios que crecieron a una temperatura de 18°C no hubo desarrollo sexual (Fig. 3.36), con 23°C se produjeron apotecios únicamente dentro de la zona IIIa, todos ellos con esporas, y en aquellos expuestos a 28°C no se hallaron apotecios maduros aunque si se observaron numerosos primordios dentro de la zona IIIa y b.

El grado de pigmentación de los micelios fue marcado al igual que el de los cuerpos fructíferos.

Temperatura e inhibición del estímulo lumínico.

Las colonias fueron iluminadas durante el 20 y el 50 días.

En los tratamientos de 18°C y 28°C no se observó desarrollo sexual (Fig. 3.36). Si se detectaron apotecios con esporas en los tratamientos de 23°C ubicados dentro de la zona IIIa.

El grado de pigmentación de los micelios fue marcado al igual que el de los cuerpos fructíferos.

B. CRECIMIENTO VEGETATIVO.

Medio sólido.

Las colonias se desarrollaron bajo luz blanca de 300 b/p constantes durante 15 días y a las temperaturas indicadas.

No hubo diferencias significativas entre las velocidades de crecimiento para 23 y 28°C, y en ambos casos las colonias llegaron al borde de las cajas durante el 50 día. En

cambio los micelios sometidos a 18°C mostraron una velocidad de crecimiento mucho menor, alcanzando el borde de la caja durante el 80 día de crecimiento (Fig. 3.38).

Medio líquido.

Los cultivos se realizaron en erlenmeyers de 50 ml con 5 ml de medio, con luz blanca constante de 300 b/p y a las temperaturas indicadas.

La principal diferencia que mostraron los cultivos se manifestó en las velocidades de crecimiento exponencial, así sus respectivos picos se dieron más tardíamente cuanto menor fue la temperatura (Fig. 3.39), de esta manera a 18°C el pico se alcanzó en el 110 día, a 23°C en el 80, y a 28°C en el 60. La magnitud del crecimiento en el momento del pico no mostró diferencias significativas entre los tratamientos.

En 18 y 23°C se detectó el desarrollo de apotecios, en el primer caso durante el 180 día de crecimiento, y en el segundo a lo largo del 100 día aunque sólo fueron fértiles en 23°C. A 28°C no se observó desarrollo sexual.

La pigmentación del micelio y de los apotecios fue siempre marcada.

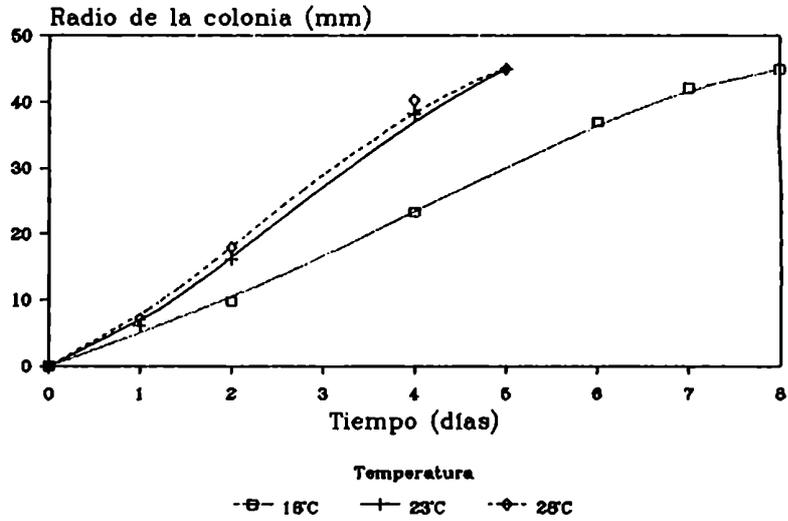


Figura 3.38. Crecimiento en medio sólido. Crecimiento en medio sólido de colonias expuestas a 18, 23 ó 28 grados centígrados.

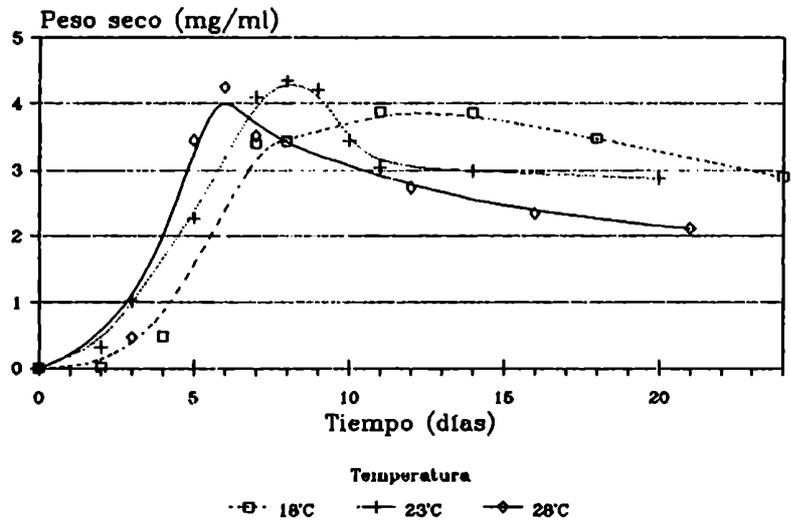


Figura 3.39. Crecimiento en medio líquido. Crecimiento en medio líquido de micelios expuestos a 18, 23 ó 28 grados centígrados.

Discusión

La temperatura afectó profundamente el desarrollo sexual de *I. carneus*. En condiciones de iluminación constante y con una temperatura de 18 ó 28°C se produjeron menos apotecios que en 23°C (aunque en la temperatura máxima existieron numerosos primordios), y sin ascos desarrollados. Efectos semejantes se reportaron en *Ceratocystis fagacearum* (Cobb *et al.*, 1961), *Monilinia vaccinii-corymbosi* (Milholland, 1974) y *Polystigma ochraceum* (Ghazanfari y Banihashemi, 1976).

Los tratamientos de inducción con luz por 24 hs. durante el 5º día mostraron una falta total de desarrollo sexual a 18°C, lo que indicaría la necesidad de un mayor tiempo de irradiación para favorecer la inducción, o la falta de madurez del sistema de diferenciación en esas condiciones de cultivo. A 28°C, por el contrario, la presencia de numerosos primordios reveló el inicio del desarrollo sexual de manera similar a lo observado en condiciones de iluminación constante.

Si bien las altas temperaturas no afectan la inducción del desarrollo sexual en *I. carneus*, podrían prevenir el normal progreso del mismo. Distintas temperaturas pueden afectar a etapas diferentes del desarrollo, así en *Nectria haematococca* el rango de temperaturas previo a la espermatización fue de 18 a 24°C mientras que el más propicio para el desarrollo de los peritecios y de las ascosporas fue de 21 a 24°C (Dietert *et al.*, 1983). En *Pyronema domesticum*, con un óptimo para el desarrollo sexual de 20°C, en 5°C mostró ascongonios con morfología anormal pero con apotecios fértiles; a 30°C sólo se hallaron apotecios estériles (Moore-Landecker, 1975).

Pero debe considerarse también la posibilidad de que una mayor actividad del sistema inhibitor de la fructi-

ficación a 18 y 28°C, pueda afectar el normal desarrollo de los ascocarpos.

La temperatura afectó al crecimiento vegetativo de *Iodophanus carneus* en los medios de cultivo líquido y sólido, alterando sus velocidades de crecimiento durante la fase exponencial, y con ello, el día del pico de crecimiento o el instante en el que se cubrió la totalidad del medio de cultivo sólido. Pero siempre fue mayor el efecto de desaceleración del crecimiento detectado a 18°C, que el de aceleración observado a 28°C. Estos hechos son congruentes con lo registrado en la bibliografía (Lilly y Barnett, 1951; Garraway y Evans, 1984).

No se vió alterado el valor del peso seco obtenido en el momento del pico de crecimiento para los medios líquidos.

El crecimiento vegetativo se dió dentro de un rango de temperaturas mucho mayor que el evidenciado por el desarrollo sexual, lo que coincide con las observaciones hechas en otros hongos (Lilly y Barnett, *op. cit.*; Garraway y Evans, *op. cit.*; Moore-Landecker, 1992).

PIGMENTACION

Resultados

A. CURVA DE ABSORCION.

Los pigmentos se extrajeron de colonias crecidas en luz blanca continua de 300 b/p en el 80 día de crecimiento en medio líquido. Se usaron 25 mg de peso seco de micelio para un volumen final de 4 ml de cloroformo.

El espectro de absorción se representa en la figura 3.40 y evidencia un único pico en 480 nm en cloroformo.

B. PIGMENTACION EN DISTINTAS CALIDADES DE LUZ.

Los pigmentos fueron extraídos en el 80 día de crecimiento de colonias expuestas a luz blanca, azul, UVc u oscuridad constantes. Se utilizaron para la extracción 10 mg de peso seco de micelio para un volumen final de 2 ml de cloroformo.

La mayor absorbancia se observó para las colonias crecidas bajo luz blanca y UVc (Tabla 3.VII), los valores registrados para la luz azul resultaron intermedios al tiempo que los cultivos desarrollados en oscuridad registraron absorbancias mínimas.

Pigmentación. Resultados.

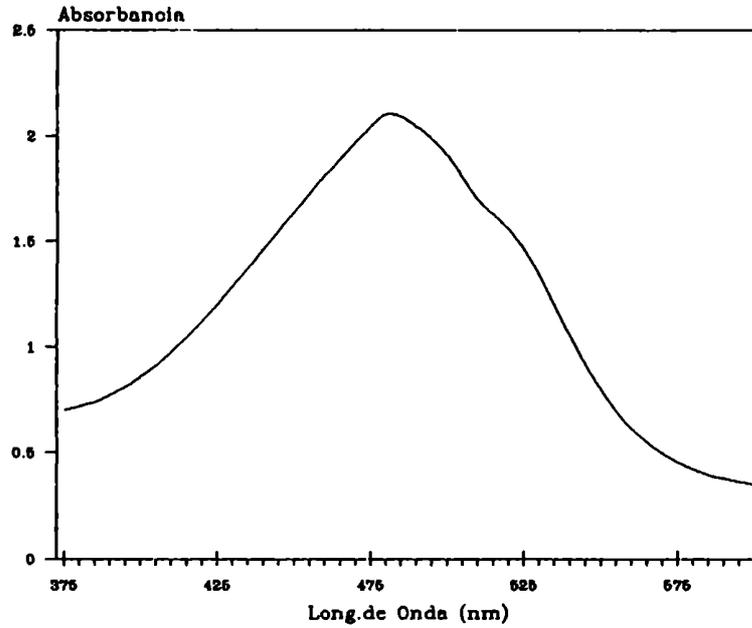


Figura 3.40. Curva de absorción. Curva de absorción de los carotenos extraídos del micelio de *I. carneus*.

Tabla 3.VII. Pigmentación y calidad de luz. Grados de pigmentación de micelios desarrollados en luz blanca, azul o UVc y en oscuridad continuas, medidos como absorbancia de sus extractos.

Calidad de Luz	Absorbancia
Blanca	0.29
Azul	0.11
Oscuridad	0.06
UVc	0.22

Discusión

La calidad y cantidad de las fuentes de carbono y de nitrógeno afectaron de manera importante la pigmentación de *I. carneus*.

La coloración del micelio siempre aumentó junto con el aumento de las concentraciones de glucosa, fructosa o asparagina en el medio de cultivo líquido y sólido, mientras en ellas no se registrara una vacuolización en las células. En *Aspergillus giganteus* mut. *alba* la producción de carotenos aumentó junto con la cantidad de glucosa presente en el medio, hasta alcanzar un pico en una concentración de 10% del azúcar; igual comportamiento siguieron el glucógeno y la altura de los conidióforos (Zurzycka, 1991).

Cuando la relación C/N se mantuvo constante en un valor de 15, la coloración miceliana fue siempre intensa. Así, la síntesis de carotenos en el micelio se encontró relacionada de manera directa con la concentración de las fuentes de carbono y de nitrógeno del medio de cultivo.

La variación del tipo de fuente de carbono afectó profundamente a la pigmentación del micelio siendo intensa en aquellas favorables para la fructificación, poco intensa en las que mostraron una baja producción de apotecios, o no detectable en las que el crecimiento fue inhibido o en las que existió una clara alteración del metabolismo secundario.

Las mismas relaciones se encontraron cuando se varió el tipo de fuente de nitrógeno aunque sobresalieron entre ellas leucina y principalmente fenilalanina, con una muy alta pigmentación miceliana, pero sin fructificaciones, evidenciando el papel estimulador de dicha vía metabólica.

Con ello se determina la profunda incidencia del tipo de fuente de carbono o de nitrógeno presente en el medio y la respuesta del metabolismo de los carotenos, tal como ocurrió en *Camarosporium rougerii* (Crabtree y Gessner, 1982).

De las experiencias de nutrición también surge una relación directa entre la presencia de pigmentación miceliana y la producción de fructificaciones, teniendo como únicas excepciones a leucina y fenilalanina.

En lo referido al factor lumínico, la falta de pigmentación en los micelios de *I. carneus* crecidos en oscuridad constante indicarían que la síntesis de carotenos estaría inducida por la luz, efecto característico en muchos hongos (Carlile y Friend, 1956; Codner y Platt, 1959; Leach, 1971; Govind y Cerdá-Olmedo, 1986).

Las exposiciones en distintos tiempos provocaron una pigmentación menor a la detectada en los testigos de iluminación continua. En *Pyronema domesticum* (Moore-Landecker, 1979 a) también la pigmentación fue mayor cuanto mayor fue el período de exposición a la luz.

La iluminación de las colonias que involucraron a los 4 primeros días de crecimiento (iluminaciones de 24 hs. en los días 1º al 4º ó tratamientos combinados entre el 1º y 4º ó en el 2º y 4º días) no evidenciaron pigmentación. En los tratamientos combinados entre el 1º y 5º, 2º y 5º, 1º y 6º ó 2º y 6º, existió una pigmentación pobre; y muy marcada cuando las exposiciones se realizaron desde el 5º día en adelante.

De esta manera el grado de inducción del metabolismo de los carotenos en *I. carneus* dependería del tiempo de exposición a la luz blanca y del momento en el que la misma es aplicada. Sobre este último punto es importante remarcar la posibilidad de que en los tratamientos sobre micelios jóvenes, la falta de inducción se deba a la inmadurez de los mecanismos de carotenogénesis o a la acción sobre ellos del proceso de inhibición ya tratado.

Esta última posibilidad se encuentra afirmada por la pobre pigmentación de los micelios expuestos en los tratamientos combinados de los días 1º y 5º, 2º y 5º ó 1º y 6º cuando se las compara con las altas pigmentaciones detectadas en los tratamientos de 24 hs. del 5º ó 6º días, lo que indicaría una modulación negativa de la síntesis de pigmentos por

parte del proceso de inhibición de la fructificación, también fotodependiente.

La inducción por el agregado de sustancias en oscuridad no desencadenó la síntesis de carotenos en el micelio, pero si la producción de apotecios estériles, poniendo de manifiesto una activación parcial o de mecanismos distintos con estos tratamientos y los de iluminación.

En *I. carneus* fueron reconocidos 11 pigmentos carotenoides (Valadon *et al.*, 1980), siendo *trans*-Neurosporaxantina-metil ester (44.7 %), Neurosporaxantina (33.2 %) y Fitoeno (10 %) los que se encuentran en mayores cantidades relativas. Los dos primeros poseen tres picos de absorción ubicados entre 440-448 nm el primero, 470-474 nm el segundo y 501-503 nm el último, dependiendo cada uno de ellos del pigmento en cuestión y del solvente utilizado en la lectura.

La curva de absorción realizada con cloroformo en el presente estudio reveló un rango de absorbancia comprendido entre 420 y 550 nm y un pico en 480 nm valores que incluyen a los mencionados para los principales carotenos presentes en este organismo y que permitió el análisis del comportamiento global de los pigmentos.

El uso de distintas calidades de luz en *I. carneus* mostró una mayor producción de pigmentos carotenoides en UVc, mientras que en luz azul la medición fue un 50 % menor. Las medidas de oscuridad resultaron ínfimas. La luz azul y UVc se mostraron como importantes inductores de la carotenogénesis en numerosos hongos (Moore-Landecker y Shropshire, 1982; Harding y Shropshire, 1980).

Como fuera expuesto en capítulos previos la absorción dentro del rango de la luz azul, pero principalmente del UVc, involucraría a una flavina en la recepción del estímulo lumínico inductor, tal como fuera detectado en *Phycomyces blakesleeanus* y *Dictyostelium discoideum* (Poff y Butler, 1974) y *Neurospora crassa* (Muñoz y Butler, 1975).

CONDICIONES DE CULTIVO Y OTROS FACTORES

Resultados

A. VARIACION DEL MEDIO DE CULTIVO SOLIDO.

Volumen del medio.

Se hicieron cultivos en cajas de Petri con 10, 15, 20 ó 30 ml de medio sólido estándar. Las colonias crecieron durante 15 días bajo luz blanca constante de 300 b/p y a 23°C de temperatura.

Las velocidades de crecimiento aumentaron conforme lo hizo el volumen del medio (Fig. 3.41). Los cultivos con 10 y 15 ml alcanzaron el borde de las cajas durante el 6º día de crecimiento mientras que los crecidos en 20 y 30 ml lo hicieron a lo largo del 5º día.

El número de apotecios totales fue en aumento desde 10 hasta 15 ml de medio de cultivo (Fig. 3.42), con volúmenes mayores dicha cifra disminuyó marcadamente. En todos los casos los ascocarpos se desarrollaron principalmente sobre la zona II.

El diámetro de las fructificaciones aumentó significativamente junto con el aumento del volumen del medio de cultivo (Fig. 3.42). Los cuerpos fructíferos mostraron ascos maduros con ascosporas para todos los volúmenes experimentados.

Concentración del medio de cultivo basal.

Se modificó la concentración total del medio de cultivo para un volumen final de 20 ml, y se las expresará a partir de sus respectivas concentraciones de C (1.5, 2.25, 3 y 4.5 g de C/l). De esta manera las cantidades de nutrientes

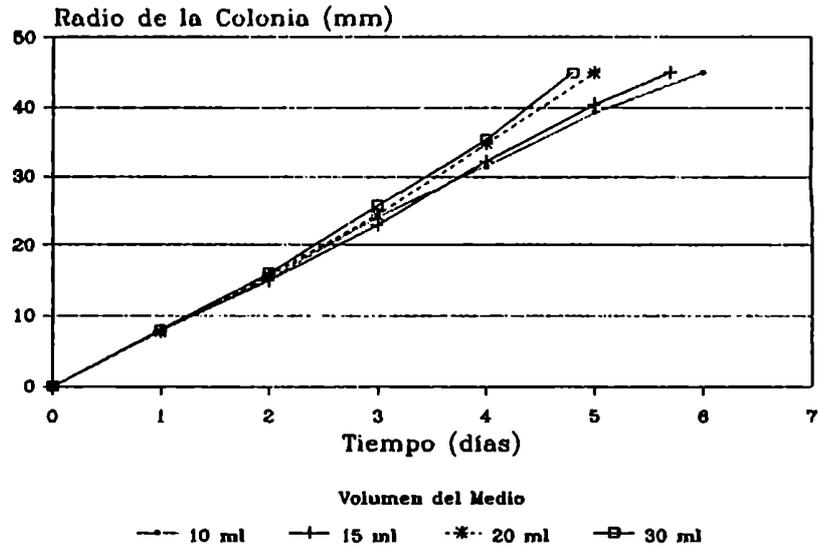


Figura 3.41. Crecimiento en medio sólido. Crecimiento de colonias desarrolladas en distintos volúmenes de medio de cultivo sólido.

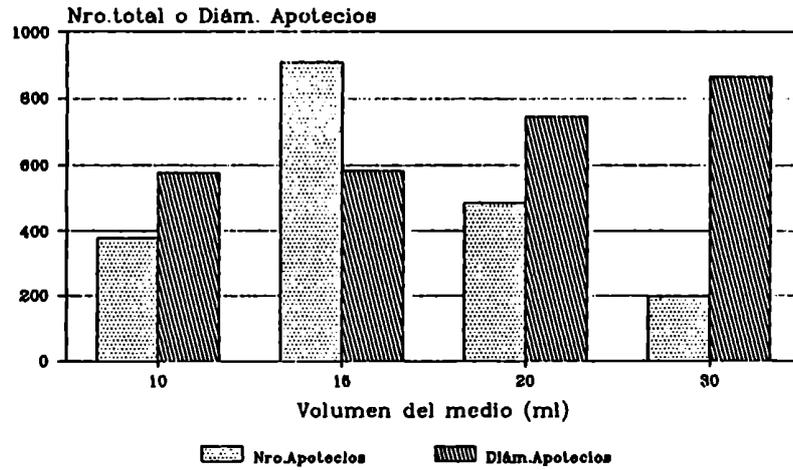


Figura 3.42. Desarrollo sexual en medio sólido. Número total de apotecios por caja y sus diámetros, producidos en distintos volúmenes de medio de cultivo sólido.

disponibles fueron semejantes a las de la experiencia anterior (10, 15, 20 y 30 ml de medio de cultivo).

Las velocidades de crecimiento vegetativo fueron semejantes a las observadas en la serie experimental anterior.

El número total de apotecios por caja fue mayor para la menor concentración (Fig. 3.43) y disminuyó con el aumento de la concentración del medio. En la mayor concentración privó la presencia de apotecios múltiples. La distribución de los ascocarpos fue similar a la observada en la experiencia de variación del volumen del medio.

El diámetro de los apotecios individuales aumentó junto con las cantidades de medio de cultivo basal (Fig. 3.43).

El número de ascos desarrollados por ascocarpo fue reducido en los medios con 1.5 g de C/l (menos de 10), se hallaron numerosos ascos en 2.25 y 3 g de C/l; y en 4.5 g de C/l no se encontraron ascos.

B. VARIACION DEL MEDIO DE CULTIVO LIQUIDO.

Volumen del medio y del frasco.

Se realizaron cultivos en frascos Erlenmeyer de distintas capacidades, con volúmenes variables de medio de cultivo estándar (frascos de 50 ml con 5 ó 10 ml de medio; frascos de 100 ml con 10 ó 20 ml de medio y frascos de 250 ml con 25 ó 50 ml de medio). Se los cultivó durante 8 días con luz blanca de 300 b/p y 23°C.

No se detectaron diferencias significativas en el peso seco alcanzado al 8º día de crecimiento para los distintos tratamientos (Tabla 3.VIII).

En las series de frascos de 100 y 250 ml de volumen con 20 ó 50 ml de medio de cultivo las colonias mostraron células muy vacuolizadas, evidenciando una clara fase de autólisis; en los restantes tratamientos las células no tuvieron esa apariencia.

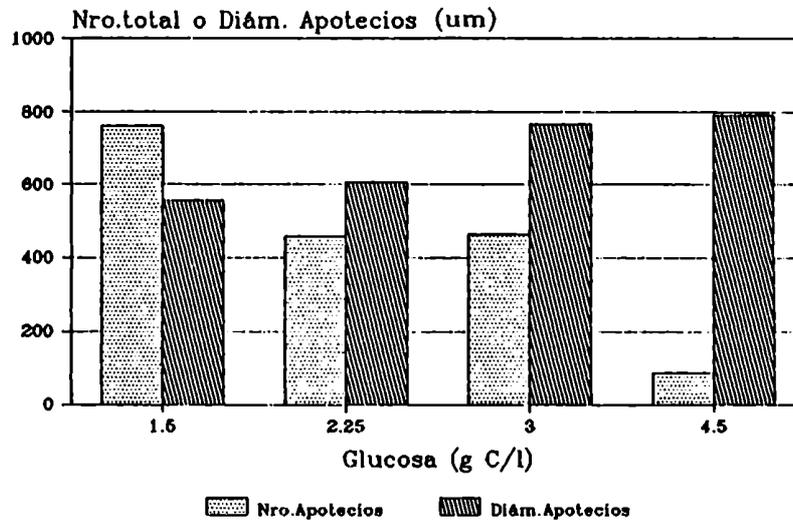


Figura 3.43. Variación de la concentración del medio de cultivo. Número total de apotecios por caja y sus diámetros ante la variación de la concentración total del medio de cultivo, manteniendo el volumen final en 20 ml. La concentración del medio se expresa como concentración de glucosa.

Tabla 3.VIII. Crecimiento y desarrollo sexual en medio líquido. Crecimiento y número de apotecios totales por frasco, frente a la variación del volumen del medio de cultivo líquido, y el de los frascos.

Vol. Erlenmeyer (ml)	Vol. del Medio (ml)	Peso seco (mg/ml)	Nro. Apotecios por frasco
50	5	2.96	7.0
50	10	3.14	2.3
100	10	2.89	4.75
100	20	3.03	0
250	25	3.15	0
250	50	2.74	0

Sólo se detectó desarrollo de apotecios en los tratamientos que involucraron frascos de 50 ml de volumen y en los de 100 ml con 10 ml de medio de cultivo (Tabla 3.VIII).

La mayor producción se detectó en los de 50 ml con 5 ml de medio. Los ascocarpos fueron fértiles en todos los casos.

Respuesta al agregado de PEG-6000.

Se agregó PEG-6000 al medio de cultivo en distintas proporciones (1, 2.5, 5, 7.5 ó 10%), modificando así la viscosidad del medio. Los cultivos fueron hechos en frascos de 50 ml con 5 ml de medio durante 8 días con luz blanca constante de 300 b/p y 23°C.

El peso seco aumentó conforme lo hizo la proporción de PEG-6000 (Tabla 3.IX). El número de fructificaciones observadas por frasco Erlenmeyer también aumentó junto con las concentraciones de PEG-6000 hasta un valor del 7.5% (Tabla 3.IX) y dicho aumento fue muy marcado entre 5 y 7.5%; un 10% de PEG-6000 previno la formación de ascocarpos.

Los apotecios mostraron ascos con ascosporas en 0 y 1% del polímero, con concentraciones mayores los ascocarpos fueron estériles.

C. SELLADO DE CAJAS.

Las cajas fueron selladas con Parafilm para reducir el intercambio gaseoso con el medio. Se incubaron durante 15 días en oscuridad o luz blanca constante de 300 b/p y 23°C.

Iluminación constante.

Las colonias crecidas en cajas selladas mostraron un número total de ascocarpos muy reducido con respecto a los desarrollados en cajas no selladas (Tabla 3.X).

La distribución de los apotecios en las colonias fue semejante para las cajas selladas y no selladas (Fig. 3.44, A y C), ubicándose principalmente dentro del zona II.

Tabla 3.IX. Desarrollo en medio líquido con PEG-6000. Crecimiento vegetativo y número de apotecios totales por frasco, en micelios desarrollados en medio líquido, con distintas cantidades de PEG-6000.

Concentración de PEG-6000 (%)	Crecimiento (mg/ml)	Nro. Apotecios por frasco
0	3.22	3.3
1	3.37	3.8
2.5	3.70	3.5
5	4.41	6.7
7.5	6.63	11.5
10	6.77	1.2

Tabla 3.X. Desarrollo en cajas selladas. Número total de apotecios por caja y sus diámetros de colonias desarrolladas en luz u oscuridad constantes y en cajas selladas, o no.

Tratamiento	Nro. Apotecios	Diám. Apotecios (um)
Luz c/Parafilm	73.7 (4.19)	791.7 (62.48)
Luz s/Parafilm	387.9 (43.37)	756.6 (49.87)
Osc.c/Parafilm	10.2 (2.35)	608.3 (82.49)
Osc.s/Parafilm	0	0

Cultivo. Resultados.

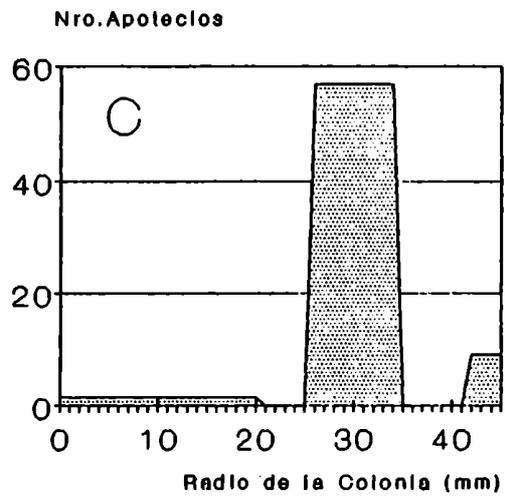
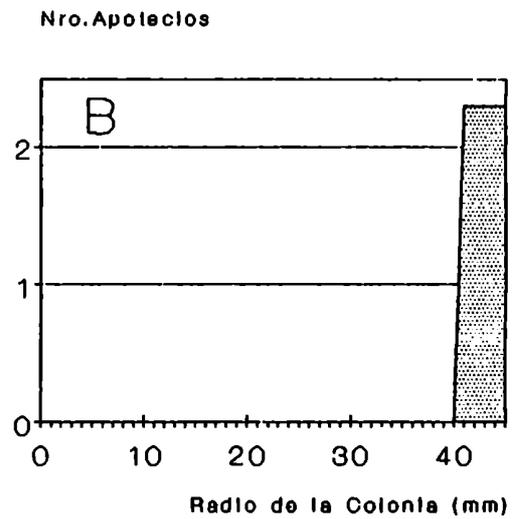
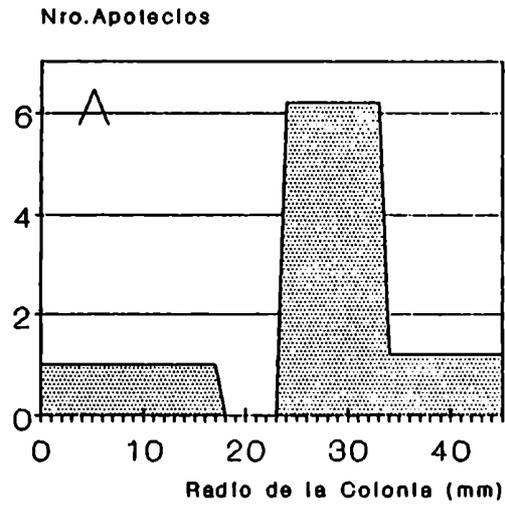


Figura 3.44. Distribución de apotecios en cajas selladas. Distribución de los apotecios en colonias desarrolladas en luz continua y cajas selladas (A); oscuridad constante y cajas selladas (B), o en luz constante y cajas no selladas (C).

No se hallaron ascos desarrollados en las cajas selladas con Parafilm.

La pigmentación del micelio y de los cuerpos fructíferos no mostró diferencias evidentes entre los tratamientos.

Oscuridad constante.

Los micelios crecidos en cajas no selladas no mostraron desarrollo sexual. Si en cambio lo hubo en el crecido en las cajas selladas donde se observaron reducidos números de apotecios totales (Tabla 3.X). Dichas estructuras se concentraron en la zona IIIb (Fig. 3.44, B). Los ascocarpos nunca mostraron ascosporas ni ascos.

Los micelios y cuerpos fructíferos observados en estas experiencias no evidenciaron la presencia de pigmentos.

D. SIEMBRA DE INOCULOS CON DISTINTOS GRADOS DE MADUREZ.

Se sembraron inóculos de distintas edades de cultivos crecidos durante 15 días bajo iluminación constante. Dichos inóculos se sacaron de las áreas correspondientes a los días 10, 20, 30 (zona Ia, Ib y Ic respectivamente), 40 (zona II) y 50 (zona III) de crecimiento vegetativo, y fueron expuestos durante 14 días a oscuridad constante. En ambos casos la temperatura fue de 23°C.

Los cultivos originados a partir del crecimiento de inóculos extraídos de la zona I mostraron un crecimiento vegetativo pobre que llegó a unos 36 mm de distancia del inóculo en la mayoría de los casos, y llegando al borde de la caja de Petri en otros. En cambio las colonias desarrolladas a partir de inóculos de las zonas II y III crecieron normalmente hasta alcanzar el borde de las cajas.

En ningún caso se observó desarrollo sexual. La pigmentación del micelio fue pobre sobre los primeros 21-30 mm

de radio de la colonia y desde allí hasta el borde no había pigmentación evidente.

Pero cuando estas cajas fueron reincubadas, luego de crecer 14 días en oscuridad constante, en condiciones de iluminación constante, se detectó el desarrollo de apotecios al 40 día del cambio de condiciones. Los cultivos correspondientes a los inóculos de las zonas Ia y Ib evidenciaron un número de apotecios totales por caja de 74.8 ± 13.93 , todos ellos ubicados en una banda de unos 21 a 30 mm de radio. Estas fructificaciones mostraron ascos vacuolizados sin esporas.

Las colonias correspondientes a los inóculos de las zonas Ic, II y III mostraron un número similar de ascocarpos totales por caja, que fue de unos 158.7 ± 43.35 . Estos cuerpos fructíferos se ubicaron dentro de una banda desarrollada desde unos 36 mm del inóculo hasta el borde de la caja, y poseían ascos con ascosporas.

E. PRESENCIA DE BARRERAS FISICAS.

Sobre la superficie del medio de cultivo sólido se fijaron vidrios cubreobjetos de 20 mm de largo por 6 mm de ancho de dos maneras: clavados verticalmente en el medio de cultivo, o apoyados sobre la superficie del medio. Siempre ubicados de manera tangencial al inóculo y a distancias variables del mismo. Las colonias crecieron luego a oscuridad o luz blanca constantes y a 23°C.

En los tratamientos de oscuridad siempre se desarrollaron apotecios (4 a 7), sin ascos y con muy poca pigmentación en los bordes de los obstáculos colocados verticalmente, y sin importar la posición de los mismos sobre el cultivo. Cuando los cubreobjetos fueron ubicados en forma llana sobre el medio, no se detectó desarrollo sexual.

En los tratamientos de luz continua la presencia de obstáculos no pareció modificar los patrones normales del desarrollo sexual.

Discusión

La producción de apotecios ante distintos volúmenes del medio de cultivo sólido mostró variaciones de importancia en cuanto a su número y diámetro. Las mismas fueron similares a las observadas cuando se modificó el contenido de glucosa en el medio de cultivo en el capítulo de nutrición. El comportamiento en las concentraciones de 1, 2, 3 y 4 g de C/l fueron semejantes a las detectadas con 10, 15, 20 ó 30 ml de medio de cultivo, tanto para el número cuanto para el diámetro de las fructificaciones. Por lo tanto los resultados obtenidos ante la variación del volumen del medio podrían deberse a un efecto nutricional, aunque debe tenerse en cuenta que se modificó no sólo el nivel de glucosa sino también las cantidades relativas de todos los componentes del medio de cultivo.

Tras la variación del volumen del medio, todos los apotecios poseyeron ascos maduros, marcando una importante diferencia con la serie de nutrición, donde sólo fueron fértiles en 2 y 3 g de C/l, evidenciando la posible acción de un fenómeno distinto del nutricional y que favorecería el desarrollo de los ascos.

Cuando se varió la cantidad total de los componentes del medio de cultivo y se mantuvo el volumen final constante en 20 ml, el comportamiento del número total de apotecios fue distinto, disminuyendo desde las menores concentraciones hacia las mayores. De esta manera, no existiría un efecto nutricional directo sobre el número de apotecios generados en estas dos últimas experiencias, cobrando importancia la cantidad de agar presente y el volumen final del medio.

En *Magnaporthe salvinii*, 15 ml de medio sólido fueron más efectivos en la producción de peritecios que 10 ó 20 ml, y un 1.2 a 2% de agar indujeron un mayor número que proporciones de agar menores o mayores a las indicadas (Tsuda et

al., 1982). También en *Plenodomus meliloti*, hongo fotoinducible, se observó la formación de picnidios en oscuridad cuando se disminuyó el volumen del medio sólido hasta 3 ml, y adjudicaron el hecho a un "efecto de contacto" (Zafar y Colotelo, 1979).

De manera semejante pueden explicarse las variaciones en el desarrollo de ascos maduros.

Por el contrario, el diámetro de los apotecios y el crecimiento vegetativo aumentaron conforme lo hicieron las cantidades relativas de los nutrientes, hecho que coincide plenamente con lo discutido en el capítulo de nutrición.

La variación del volumen de medio de cultivo líquido y del volumen del frasco utilizado también afectó al desarrollo de *I. carneus*. El crecimiento vegetativo no mostró diferencias significativas salvo para el caso de los frascos de 250 ml con 50 ml de medio que, junto con los de 100 ml con 20 ml de medio, fueron los únicos en los que se detectó signos de autólisis.

El desarrollo sexual se vió favorecido por los bajos volúmenes de medio pero sólo hasta frascos de 100 ml.

La obtención de apotecios en medio líquido representa un hecho de importancia, ya que son muy pocos los casos registrados de Ascomycetes que fructifiquen en esas condiciones debido, probablemente, a la falta de un sustento sólido (Asina *et al.*, 1977; Moore-Landecker, 1992). En muchos Basidiomycetes la fructificación en medio líquido se ve favorecida por el agregado de vermiculita (Tan y Moore, 1992).

Nectria ditissima es uno de los pocos Ascomycetes en los que se observó fructificaciones en medio líquido estático, aunque para ello se requirieron mayores intensidades de luz que las necesarias en medio sólido (Dehorter y Perrin, 1983 a).

El agregado de PEG-6000 favoreció el desarrollo de *I. carneus*. El número de apotecios por frasco encontró un valor máximo en una proporción del polímero del 7.5% aunque sólo se hallaron ascos maduros en 0 a 1%. El crecimiento hifal tam-

bién se vió favorecido por el aumento de la concentración del polímero en el medio de cultivo.

En *Saprolegnia diclina* y *S. ferax* altas concentraciones de PEG-6000 (o bajo potencial mátrico en el medio de cultivo) afectaron negativamente el crecimiento hifal y a la producción de oogonios (Smith *et al.*, 1990).

La aireación del micelio, o la falta de ella, pueden provocar importantes alteraciones en el desarrollo fúngico (Moore-Landecker y Shropshire, 1982; States, 1975; Plunkett, 1956).

En *I. carneus* se halló una baja producción de apotecios en cajas selladas con Parafilm en luz continua, lo que podría explicarse en base a la acumulación de dióxido de carbono en la atmósfera. Altas presiones de dióxido de carbono inhibieron la producción de fructificaciones en *Schizophyllum commune* (Raudaskoski y Viitanen, 1982; Bromberg y Schwalb, 1976) y alteraron el desarrollo en *Penicillium isariiforme* (Graafmans, 1973), en *Lentinula edodes* la falta de aireación afectó la expansión de sus primordios (Leatham y Stahlmann, 1987).

Para otros autores la evaporación del agua del medio de cultivo en las cajas no selladas favorecería el desarrollo de fructificaciones (States, *op. cit.*; Plunkett, *op. cit.*).

La producción de apotecios en oscuridad en cajas selladas es un proceso más complejo, aunque el hecho de que todos se diferenciaron sobre los borde de las cajas indicaría la presencia de un probable "efecto de borde" favorecido por el sellado. Muchos autores proponen la existencia de metabolitos volátiles emitidos por el micelio que podrían inhibir (Moore-Landecker y Shropshire, 1984) o estimular (Basith y Madelin, 1968) la fructificación, hipótesis que no puede ser totalmente descartada en *I. carneus*.

Los micelios desarrollados a partir de inóculos de distintas edades y fructificados no mantuvieron su capacidad de diferenciación sexual en la oscuridad. También el ritmo de crecimiento fue bajo principalmente en aquellas colonias ori-

ginadas de inóculos de las zonas más viejas, poniendo de manifiesto un alto grado de diferenciación de las células en la colonia original.

Tras su reincubación en luz mostraron un rápido desarrollo sexual, aunque sólo se detectaron ascos con ascosporas en los provenientes de las regiones más jóvenes de la colonia original. De esta manera se pone de manifiesto que los sistemas involucrados en la diferenciación sexual son estrictamente fotodependientes, y que aquellos involucrados en el inicio del desarrollo fueron más estables en esta experiencia que aquellos involucrados en el desarrollo de las ascosporas. La falta de esporas se debió probablemente a la decadencia de un sistema fotorreceptor específico, o a la de los mecanismos metabólicos involucrados en el proceso.

En *Schizophyllum commune* los inóculos provenientes de regiones más jóvenes de la colonia tuvieron respuestas menores a la luz que la de aquellos extraídos de zonas más viejas (Raudaskoski e Yli-Mattila, 1985).

El desarrollo de fructificaciones sin ascos ante la presencia de una barrera física introducida en el medio de cultivo, pone en evidencia el delicado equilibrio interno del organismo, y la importancia que los factores internos, aún desconocidos, tienen sobre los procesos de diferenciación sexual en los hongos. La inducción dada en estas condiciones se debió probablemente a un cambio en los patrones de crecimiento hifal y su ramificación, o a la inhibición del crecimiento vegetativo por la presencia de las barreras.

En *Phoma sp.* y *Ascochyta pisi* se encontraron fructificaciones en oscuridad cuando se agregó papel celofán sobre el medio de cultivo (Suryanaraynan y Swamy, 1981). Los autores consideraron que estos micelios poseían mayor cantidad de hifas aéreas y un mayor número de ramificaciones sobre los bordes de la colonia, lo que sería de gran importancia en el cambio de la fase vegetativa a reproductiva.

Conclusiones

El desarrollo de *Iodophanus carneus* se vio afectado por diversos factores externos que modularon tanto su crecimiento vegetativo cuanto su diferenciación sexual. Entre los más sobresalientes encontramos:

Nutrición.

- Desarrollo de apotecios y esporas dentro de rangos limitados de concentraciones iniciales de glucosa y fructosa (2-4 y de 2-3 g de C/l respectivamente).
- La relación C/N óptima inicial (con glucosa y asparagina) para el número de apotecios fue de 10:1 y para el tamaño de los mismos de 15:1.
- El aumento de las concentraciones de C o de N en el medio de cultivo incrementó el crecimiento vegetativo.
- El diámetro de los apotecios mostró siempre una correlación positiva con el crecimiento vegetativo y la cantidad de nutrientes disponibles en el medio.
- Glucosa y manosa fueron las fuentes de C más favorables para el desarrollo sexual y el crecimiento.
- Arabinosa y galactosa inhibieron el crecimiento.
- Asparagina, glicina y acetato de amonio fueron las fuentes de N más favorables.
- Triptofano inhibió el crecimiento.
- La pigmentación del micelio aumentó junto con el aumento de las concentraciones de C o N.
- Existió una relación directa entre el tipo de fuente de C o de N del medio, la pigmentación del micelio y la fructificación. Las únicas excepciones fueron leucina y principalmente fenilalanina que presentaron una alta pigmentación miceliana pero sin fructificaciones.

Luz.

- El desarrollo sexual fue totalmente fotodependiente, manifestando una respuesta típicamente cualitativa.

- Se obtuvieron fructificaciones fértiles dentro de un rango de luminosidades de 10 hasta 500 b/p.
- Irradiaciones de 10 seg. durante el 5º día fueron suficientes para inducir la diferenciación de apotecios, pero se necesitó un mínimo de 4 hs. para inducir el desarrollo de ascosporas.
- La inducción del desarrollo sexual con luz blanca fue máxima durante el 5º día de crecimiento, pero se demostró la existencia de una etapa inhibitoria de dicho proceso y activada por la luz durante los tres primeros días de crecimiento.
- Los apotecios se desarrollaron dentro de zonas definidas y predecibles sobre las colonias y relacionadas con el momento de la irradiación, evidenciando distintos grados de respuesta al estímulo y dependientes de la madurez del micelio.
- La fotoinducción generaría una sustancia o grupo de ellas, capaces de una rápida difusión en el sentido radial y lateral de la colonia, para producir finalmente una respuesta sobre células con un grado de diferenciación determinado. La luz también activaría un proceso inhibitor del desarrollo sexual y que difundirían principalmente en el sentido radial.

Los fotorreceptores de uno y otro procesos poseerían un comportamiento espacial distinto. Los encargados de la activación del inhibitorio se encontrarían sobre las hifas crecidas durante los días 1º al 3º, y mantendrían su capacidad de fotoinhibición incluso hasta el 5º día de crecimiento. La capacidad fotoinductora siempre se halló relacionada con las zonas de crecimiento de la colonia.

Así la ubicación de los apotecios sobre la colonia y su número dependerían de la competencia entre el proceso de inhibición y el de inducción y del grado de respuesta potencial de las células a este último efecto.

- La inducción y la inhibición se vieron favorecidas por la luz azul, indicando la posibilidad de que el fotorreceptor sea una flavina.

- La mayor producción de carotenos se dio en UVc, manifestando la posible presencia de una flavina en la recepción del estímulo.
- La luz afectó negativamente la velocidad de crecimiento en el medio de cultivo líquido, pero le aumentó cuando el medio fue sólido.
- No hubo desarrollo sexual en oscuridad en ninguno de los distintos tipos fuentes de C o de N probadas ni ante la variación de sus cantidades.
- Los efectos de inhibición y de inducción dependieron de la cantidad de glucosa disponible en el medio.

Metabólicos.

- El agregado de AMPc en oscuridad indujo el inicio del desarrollo sexual, lo que pondría de manifiesto su posible papel de intermediario en el proceso.
- Se encontró una correlación directa entre el metabolismo del glucógeno, la luz y la diferenciación sexual, con una acumulación del polisacárido en oscuridad y su degradación ante el desarrollo de fructificaciones en luz.

Temperatura.

- La inducción con luz durante el 5º día fue ineficaz a 18°C y a 28°C sólo se hallaron numerosos primordios, demostrándose de esta manera la influencia de la temperatura sobre el proceso de diferenciación sexual y su respuesta a la luz.
- La temperatura alteró la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial y así el día del pico de crecimiento, o el momento en el que se cubrió la totalidad del medio de cultivo sólido. Pero no se modificó notoriamente la biomasa en el momento del pico de crecimiento para los medios líquidos.

Conclusiones.**Condiciones de cultivo.**

- La cantidad de agar del medio de cultivo sólido alteró el desarrollo sexual del hongo.
- Se obtuvo el desarrollo sexual completo en medio líquido, mejorándose con el agregado de PEG-6000.
- El sellado de las cajas de Petri modificó el desarrollo de las fructificaciones en luz y en oscuridad, provocando un efecto fotomimético en ésta última.
- Los inóculos provenientes de las zonas más viejas de las colonias mostraron un crecimiento pobre y una respuesta sexual incompleta, evidenciando un alto grado de diferenciación de dichas áreas.

Bibliografía

- AGNIHOTRI, V.P.. 1969. Some nutritional and environmental factors affecting growth and production of sclerotia by a strain of *Aspergillus niger*. Can. J. Microbiol., 15: 835-840.
- ALASOADURA, S.O.. 1963. Fruiting in *Sphaerobolus* with special reference to light. Ann. Bot. (G.B.), 27: 123-145.
- ALBERGHINA, L., E. STURANI, M.G. CONSTANTINI, E. MARTEGANI & R. ZIPPEL. 1979. Regulation of macromolecular composition during growth of *Neurospora crassa*. En "Fungal walls and hyphal growth". British Mycological Society Symposium 2 (ed. J.H. Burnett & A.P.J. Trinci) pp. 385-401. Cambridge University Press, Cambridge.
- ALDERMAN, D.J. & E.B.G. JONES. 1971. Physiological requirements of two marine Phycomycetes (*Althornia crouchii* and *Ostracoblaha implexa*). Trans. Br. mycol. Soc., 57: 213-225.
- ASINA, S., K. JAIN & R.F. CAIN. 1977. Factors influencing growth and ascocarp production in three species of *Sporormiella*. Can. J. Bot., 55: 1915-1925.
- BADHAM, E.R. 1980. The effect of light upon basidiocarp initiation in *Psilocybe cubensis*. Mycologia, 62: 136-142.
- BASITH, M. & M.F. MADELIN. 1968. Studies on the production of perithecial stromata by *Cordyceps militaris* in artificial culture. Can. J. Bot., 46: 473-480.
- BERRY, D.R.. 1975. The Environmental Control of the Physiology of Filamentous Fungi. En "The Filamentous Fungi", vol.1 (ed. J.E. Smith & D.R. Berry) pp. 16-32. John Wiley, New York.
- BORROW, A, E.G. JEFFERYS, R.H.J. KESSELL, E.C. LLOYD & I.S. NIXON. 1961. The metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. Can. J. Microbiol., 7: 227-276.
- BRADFORD, M.M.. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-254.
- BRAIN, R.D., J. FREEBERG, C.V. WEISS & W.R. BRIGGS. 1977. Blue light-induced absorbance changes in membrane fractions from corn and *Neurospora*. Plant Physiol., 59: 948-952.
- BRANDT, W.H.. 1967. Influence of near ultraviolet light on hyphal elongation in *Verticillium*. Mycologia, 59: 736-739.

- BRETZLOFF, C.W. 1954. The growth and fruiting of *Sordaria fimicola*. Am. J. Bot., 41: 58-67.
- BRIGGS, W.R. & M. IINO. 1983. Blue-light-absorbing photoreceptors in plants. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 303: 347-359.
- BROMBERG, S.K. & M.N. SCHWALB. 1976. Studies on basidiospore development in *Schizophyllum commune*. J. Gen. Microbiol., 96: 409-413.
- BROXHOLME, S.J., N.D. READ & D.J. BOND. 1991. Developmental regulation of proteins during fruit-body morphogenesis in *Sordaria brevicollis*. Mycol. Res., 95: 958-969.
- BUDGE, S.P. & J.M. WHIPPS. 1991. Effect of sucrose concentration on sclerotia production and subsequent apothecial formation by *Sclerotinia sclerotiorum*. Mycol. Res., 95: 195-198.
- BU'LOCK, J.D.. 1975. Secondary Metabolism in Fungi and its Relationships to Growth and Development. En "The Filamentous Fungi", vol.1 (ed. J.E. Smith & D.R. Berry) pp. 33-58. John Wiley; New York.
- BUSCOT, F. & J. BERNILLON. 1991. Mycosporins and related compounds in field and cultured mycelial structures of *Morchella esculenta*. Mycol. Res., 95: 752-754.
- BUSTON, H.W., M.O. MOSS & D. TYRREL. 1966. The influence of carbon dioxide on growth and sporulation of *Chaetomium globosum*. Trans. Br. mycol. Soc., 49: 387-396.
- CANTINO, E.C. & E.A. HORENSTEIN. 1956. The stimulatory effect of light upon growth and CO₂ fixation in *Blastocladiella*. I. The SKI cycle. Mycologia, 48: 777-799.
- CANTINO, E.C. & E.A. HORENSTEIN. 1959. The stimulatory effect of light upon growth and CO₂ fixation in *Blastocladiella*. III. Further studies, in vivo and in vitro. Physiol. Plant, 12: 251-263.
- CAREY, S.T.. 1974. *Clitocybe illudens*: its cultivation, chemistry and classification. Mycologia, 66: 951-968.
- CARLILE, M.J.. 1965. The photobiology of Fungi. Ann. Rev. Plant Physiol., 16: 175-202.
- CARLILE, M.J. & J. FRIEND. 1956. Carotenoids and reproduction in *Pyronema confluens*. Nature, 178: 369-370.

- CHIU, S.W. & H.P. CHEUNG. 1991. Involvement of endogenous glycogen in fruiting of *Volvariella volvacea* and *Pleurotus sajor-caju*. Mycol. Res., 95: 632-634.
- CHIU, S.W. & S.W. TO. 1993. Endogenous glycogen is not a trigger for fruiting in *Pleurotus sajor-caju*. Mycol. Res., 97: 363-366.
- CLAYDON, N., M. ALLAN & D.A. WOOD. 1988. Fruit body biomass regulated production of extracellular endocellulase during periodic fruiting by *Agaricus bisporus*. Trans. Br. mycol. Soc., 90: 85-90.
- COBB, F.W., C.L. FERGUS & W.J. STAMBAUGH. 1961. The effect of temperature on ascogonial and perithecial development in *Ceratocystis fagacearum*. Mycologia, 53: 91-97.
- CODNER, R.C. & B.C. PLATT. 1959. Light induced production of carotenoid pigments by *Cephalosporia*. Nature, 184: 741-742.
- COHEN, R.J.. 1974. Cyclic AMP levels in *Phycomyces* during a response to light. Nature, 251: 144-146.
- COHEN, R.J. & M.M. ATKINSON. 1978. Activation of *Phycomyces* adenosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase by blue light. Biochem. Biophys. Res. Comm., 83: 616-621.
- COOKE, J.C. & M.E. BARK. 1964. The taxonomic position of the genus *Thelebolus*. Mycologia, 56: 763-769.
- COTTY, P.J. & I.J. MISAGHI. 1985. Effect of light on the behavior of *Alternaria tagetica* in vivo and in vitro. Phytopathol., 75: 366-370.
- CRABTREE, S.L. & R.V. GESSNER. 1982. Growth and nutrition of the salt-marsh fungi *Pleospora gaudefroyi* and *Camarosporium roumeguerii*. Mycologia, 74: 640-647.
- CURTIS, C.R.. 1964. Physiology of sexual reproduction in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. II. Effect of radiant energy on sexual reproduction. Phytopathol., 54: 1141-1145.
- CURTIS, C.R.. 1972. Action spectrum of the photoinduced sexual stage in the fungus *Nectria haematococca* Berk. and Br. var. *cucurbitae* (Snyder and Hansen) Dingley. Plant Physiol., 49: 235-239.
- DE FABO, E.C., R.W. HARDING & W. SHROPSHIRE Jr. 1976. Action spectrum between 260 and 800 nanometers for the photoinduction of carotenoid biosynthesis in *Neurospora crassa*. Plant Physiol., 57: 440-445.

- DEGLI INNOCENTI, F., U. POHL & V.E.A. RUSSO. 1983. Photoinduction of protoperithecia in *Neurospora crassa* by blue light. *Photochem. Photobiol.*, 37: 49-51.
- DEHORTER, B.. 1976. Induction des périthèces de *Nectria galligena* Bres. par un photocomposé mycelien absorbant a 310 nm. *Can. J. Bot.*, 54: 600-604.
- DEHORTER, B. et J. BERNILLON. 1983. Photoinduction des périthèces du *Nectria galligena*: production et activité photomorphogène des mycosporines. *Can. J. Bot.*, 61: 1435-1442.
- DEHORTER, B. et L. LACOSTE. 1980. Photoinduction des périthèces du *Nectria galligena*. I. Influence de la lumière blanche. *Can. J. Bot.*, 58: 2206-2211.
- DEHORTER, B. et R. PERRIN. 1983 a. Production, in vitro, de périthèces du *Nectria ditissima*, agent du chancre du hêtre (*Fagus silvatica*). I. Influence du milieu de culture et de la température. Application à la réalisation d'infections artificielles du hêtre. *Can. J. Bot.*, 61: 1941-1946.
- DEHORTER, B. et R. PERRIN. 1983 b. Production, in vitro, de périthèces du *Nectria ditissima*, agent du chancre du hêtre (*Fagus silvatica*). II. Effets de la composition carbone-azote du milieu nutritif et influence de la lumière. *Can. J. Bot.*, 61: 1947-1954.
- DELMAS, J. et M. MAMOUN. 1982 Influence de la lumière sur la fructification *in vitro* du peurote en corne d'abondance, *Peurotus cornupiae* Fr. ex P. *Agronomie*, 2: 379-388.
- DIETERT, M.F., H.D. Van ETEN & P.S. MATTHEWS. 1983. *Nectria haematococca* mating population. VI. Cultural parameters affecting growth, conidiation, and perithecial formation. *Can. J. Bot.*, 61: 1178-1184.
- DIORIO, L.A. y F. FORCHIASSIN. En prensa. Patrones de proteínas solubles en *Saccobolus platensis*. *Physis* (Buenos Aires) Secc. C.
- DUBOIS, M., K.A. GILLES, J.K. HAMILTON, P.A. REBERS & F. SMITH. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- DUPONT, J., P. JOLY, M. ROQUEBERT et C. DE BIEVRE. 1986. Conservation et instabilité des souches de champignons filamenteux. Impact de la cryoconservation. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 133, Act. bot.: 105-124.

- ELLIOTT, C.G.. 1989. Some aspects of nitrogen nutrition and reproduction in *Phytophthora*. Mycol. Res., 92: 34-44.
- ELLIS, D.H. & D.A. GRIFFITHS. 1975. Melanin deposition in the hyphae of a species of *Phomopsis*. Can. J. Microbiol., 21: 442-452.
- FAYRET, J.. 1974. Photoinhibition de la formation des périthèces au cours de la morphogenèse sexuée chez *Gnomonia leptostyla*. C. R. Acad. Sci., Sér. D, 278: 2909-2912.
- FENCL, Z.. 1978. Cell Ageing and Autolysis. En "The Filamentous Fungi", vol.3 (ed. J.E. Smith & D.R. Berry) pp. 389-405. John Wiley, New York.
- FLEMING, I.D. & H.F. PEGLER. 1963. The determination of glucose in the presence of maltose and isomaltose by a stable, specific enzyme reagent. Analyst, 88: 967-968.
- FORCHIASSIN, F.. 1983. Influencia de la luz sobre el desarrollo de *Saccobolus platensis*. Rev. Arg. Microbiol., 15: 213-218.
- FORCHIASSIN, F.. 1989. Estudios fotobiológicos en *Saccobolus platensis*. Tesis Doctoral. FCEyN, UBA. 153 pp..
- FORCHIASSIN, F. y L.A. DIORIO. En prensa. Crecimiento y pérdida de fertilidad en *Saccobolus platensis*. Physis (Buenos Aires) Secc. C.
- FRIEDRICH, B. & B. MAGASANIK. 1977. Urease of *Klebsiella aerogenes*. J. Bacteriol., 131: 446-452.
- FUKUKI, K.A. & M. ARAGAKI. 1973. Perithecial formation by *Cochliobolus heterostrophus* on dialyzing membrane. Mycologia, 65: 705-709.
- GALUN, E.. 1971. Morphogenesis in *Trichoderma*: induction of conidiation by narrow-beam illumination of restricted areas of fungal colony. Plant Cell Physiol., 12: 779-783.
- GALVAGNO, M.A.. 1976. Ensayos de nutrición en *Ascobolus crenulatus*. Bol. Soc. Argent. Bot., 17: 95-118.
- GALVAGNO, M.A., F. FORCHIASSIN, M.L. CANTORE & S. PASSERON. 1984. The effect of light and cyclic AMP metabolism on fruiting body formation in *Saccobolus platensis*. Exp. Mycol., 8: 334-341.
- GALLAND, P. & E.D. LIPSON. 1984. Photophysiology of *Phycomyces blakesleeianus*. Photochem. Photobiol., 40: 795-800.

- GALLAND, P. & H. SENGER. 1988. The role of flavins as photoreceptors. *J. Photochem. Photobiol.*, 1: 277-294.
- GAMUNDI, I.J. y M.E. RANALLI. 1964. Estudio sistemático y biológica de las Ascoboláceas de la Argentina. I. *Nova Hedwigia*, 7: 517-533.
- GAMUNDI, I.J. y M.E. RANALLI. 1969. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de la Argentina. III. *Nova Hedwigia*, 17: 383-407.
- GARRAWAY, M.O. & R.C. EVANS. 1984. *Fungal Nutrition and Physiology*. J. Wiley & Sons, New York. 401 pp.
- GHAZANFARI, J. & Z. BANIHASHEMI. 1976. Factors influencing ascocarp formation in *Polystigma ochraceum*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 66: 401-406.
- GLEASON, F.H., T.D. STUART, J.S. PIERCE & E.T. NIEBACH. 1970. Growth of certain aquatic Oomycetes on amino acids. II: *Apodachlya*, *Aphanomyces* and *Pythium*. *Physiol. Plant.*, 23: 769-774.
- GOVIND, N.S. & E. CERDA-OLMEDO. 1986. Sexual activation of carotenogenesis in *Phycomyces blakesleeanus*. *J. Gen. Microbiol.*, 132: 2775-2780.
- GRAAFMANS, W.D.J.. 1973. The influence of carbon dioxide on morphogenesis in *Penicillium isariiforme*. *Arch. Microbiol.*, 91: 67-76.
- GRESSEL, J.. 1979. Blue light photoreception. *Photochem. Photobiol.*, 30: 749-754.
- GRIFFIN, D.N.. 1981. *Fungal Physiology*. John Wiley & Sons., New York. 383 pp.
- GROISMAN, J.F., F. FORCHIASSIN, M.E. RANALLI & R.M. de LEDERKREMER. 1981. Isolation and characterization of glucogen from mycelium of *Ascobolus furfuraceus*. *Exp. Mycol.* 5: 253-257.
- HALL, R.. 1971. Effect of carbon-nitrogen ratios on production of perithecia by *Sordaria fimicola*. *Can. J. Microbiol.*, 17: 132-134.
- HARDING, R.W. & W. SHROPSHIRE Jr.. 1980. Photocontrol of carotenoid biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31: 217-238.
- HASKINS, R.H. & W.H. WESTON. 1950. Studies in the lower Chytridiales. I. Factors affecting pigmentation, growth and metabolism of strain of *Karlingea (Rhizophlyctis) rosea*. *Am. J. Bot.*, 37: 739-750.

- HERMAN, R.P., M.M. LUCHINI, Y.M. MARTINEZ, C.A. HERMAN & A.D. GARCIA. 1990. Cyclic nucleotides modulate lipoxygenase activity and reproduction in Oomycetes. *Exp. Mycol.*, 14: 322-330.
- HERR, L.J.. 1973. Growth of *Aphanomyces cochlioides* in synthetic media as affected by carbon, nitrogen, methionine, and trace elements. *Can. J. Bot.*, 51: 2495-2503.
- HILL, E.P.. 1976. Effect of light on growth and sporulation of *Aspergillus ornatus*. *J. Gen. Microbiol.*, 95: 39-44.
- HONDA, Y.. 1969. Studies on effect of light on the sporulation of *Helminthosporium oryzae*. *Bull. Inst. Agric. Res., Tohoku Univ.*, 21: 63-132.
- HORWITZ, B.A., A. PERLMAN & J. GRESSEL. 1990. Induction of *Trichoderma* sporulation by nanosecond laser pulses: evidence against cryptochrome cycling. *Photochem. Photobiol.*, 51: 99-104.
- HUNTER, S.H.. 1972. Inorganic nutrition. *An. Rev. Microbiol.*, 26: 313-346.
- INGOLD, C.T. & V.J. DRING. 1957. An analysis of spore discharge in *Sordaria*. *Ann. Bot.*, 21: 465-477.
- INGOLD, C.T. & B.A. OSO. 1969. Light and spore discharge in *Ascobolus*. *Ann. Bot.*, 33: 463-471.
- INNOCENTI, F.D., U. POHL & V.E.A. RUSSO. 1983. Photoinduction of protoperithecia in *Neurospora crassa* by blue light. *Photochem. Photobiol.*, 37: 49-51.
- INOUE, Y & M. FURUYA. 1974a. Perithecial formation in *Gelasinospora reticulispora*. II. Promotive effects of near ultraviolet and blue light after light incubation. *Plant Cell Physiol.*, 15: 195-204.
- INOUE, Y & M. FURUYA. 1974b. Perithecial formation in *Gelasinospora reticulispora*. III. Inhibitory effects of near-ultraviolet and blue light during the inductive dark period. *Plant Cell Physiol.*, 15: 469-475.
- INOUE, Y. & M. FURUYA. 1975. Perithecial formation in *Gelasinospora reticulispora*. IV. Action spectra for the photoinduction. *Plant Physiol.*, 55: 1098-1101.
- JAMES, S.W. & D.J. McLAUGHLIN. 1988. The influence of carbohydrate source and concentration and light on fruit body development in *Clavicornia pyxidata*. *Mycologia*, 80: 89-98.

- JI, J. & D. MOORE. 1993. Glycogen metabolism in relation to fruit body maturation in *Coprinus cinereus*. Mycol. Res., 97: 283-289.
- JIRJIS, R.I. & D. MOORE. 1976. Involvement of glycogen in morphogenesis of *Coprinus cinereus*. J. Gen. Microbiol., 95: 348-352.
- KOEHN, R.D.. 1971. Laboratory culture and ascocarp development of *Podosordaria leporina*. Mycologia, 63: 441-458.
- KRAFT, J.M. & D.C. ERWIN. 1967. Effects of nitrogen source on growth of *Phytium ultimum* and *P. aphanidermatum*. Phytopathol., 57: 374-376.
- KRISMAN, C.R.. 1962. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. Anal. Biochem., 4: 17-23.
- KUMAGAI, T.. 1980. Blue and near ultraviolet reversible photoreaction in conidial development of certain fungi. En "The blue light syndrome" (ed. H. Senger) pp. 251-260. Springer-Verlag, Berlin.
- KUMAGAI, T.. 1982. Blue and near ultraviolet reversible photoreaction in the induction of fungal conidiation. Photochem. Photobiol., 35: 123-125.
- KUMAGAI, T.. 1989. Temperature and mycochrome system in near-UV light inducible and blue light reversible photoinduction of conidiation in *Alternaria tomato*. Photochem. Photobiol., 50: 793-798.
- KUMAGAI, T. & Y. ODA. 1969. Blue and near ultraviolet reversible photoreaction in conidial development of the fungus *Alternaria tomato*. Devel. Growth Diff., 11: 130-142.
- KUMAGAI, T. & Y. ODA. 1973. Blue and near ultraviolet reversible photoreaction with intracellular particulate fraction of the fungus *Alternaria tomato*. Plant Cell Physiol., 14: 1107-1112.
- KUMAGAI, T., N. YOSHIOKA & Y. ODA. 1976. Further studies on the blue and near ultraviolet reversible photoreaction with an intracellular particulate fraction of the fungus *Alternaria tomato*. Biochem. Biophys. Acta, 421: 133-140.
- LEACH, C.M.. 1963. The cuanlitative and quantitative relationship of monochromatic radiation to sexual and asexual reproduction of *Pleospora herbarum*. Mycologia, 55: 151-163.

- LEACH, C.M.. 1965 a. Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. *Can. J. Bot.*, 43: 185-200.
- LEACH, C.M.. 1965 b. Detection of ultraviolet-absorbing substances in living mycelia of fungi. *Mycologia*, 57: 291-300.
- LEACH, C.M.. 1971. A practical guide to the effects of visible and ultraviolet light on fungi. En "Methods in microbiology" vol.4 (ed. C. Brooth) pp. 609-664. Academic Press, London.
- LEACH, C.M.. 1972. An action spectrum for light induced sexual reproduction in the Ascomycete fungus *Leptosphaerulina trifolii*. *Mycologia*, 64: 475-490.
- LEACH, C.M. & E.J. TRIONE. 1966. Action spectra for light-induced sporulation of the fungi *Pleospora herbarum* and *Alternaria dauci*. *Photochem. Photobiol.*, 5: 621-630.
- LEATHAM, G.F. & M.A. STAHMANN. 1987. Effect of light and aeration on fruiting of *Lentinula edodes*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 88: 9-20.
- LEVIN, L., M.S. NADAL, F. FORCHIASSIN y M.A. GALVAGNO. 1992. Estudios nutricionales en *Trametes trogii* (Aphyllophorales, Basidiomycetes). *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 28: 19-25.
- LEWIS, L.A.. 1975. Effect of visible light on the partial synchronization of meiosis in *Ascobolus immersus*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 65: 148-152.
- LILLY, V.G. y H.L. BARNETT. 1947. The influence of pH and certain growth factors on mycelial growth and perithecial formation by *Sordaria fimicola*. *Am. J. Bot.*, 34: 131-138.
- LILLY, V.G. & H.L. BARNETT. 1951. *Physiology of the Fungi*. McGraw-Hill Book Company, New York. 464 pp.
- LIMA, C.E. y O.A. MERCURI. 1984. Ensayos de nutrición en *Ascobolus furfuraceus*. Fuentes de nitrógeno. *Rev. Arg. Microbiol.*, 16: 177-186.
- LYSEK, G.. 1978. Circadian Rhythms. En "The Filamentous Fungi", vol.3 (ed. J.E. Smith & D.R. Berry) pp. 378-388. John Wiley, New York.

- MACDONALD, D.J. & D.J. BOND. 1976. Genetic and environmental factors influencing the production and distribution of protoperithecia in *Sordaria brevicollis*. J. Gen. Microbiol., 95: 375-380.
- MARSHALL, M.R., D.F. HINDAL & W.L. MacDONALD. 1982. Production of perithecia in culture by *Ceratocystis ulmi*. Mycologia, 74: 376-381.
- McCOY, R.E., R.K. HORST & A.W. DIMOCK. 1975. Environmental factors regulating sexual and asexual reproduction by *Mycosphaerella ligulicola*. Phytopathol., 65: 1188-1195.
- McHAN, F & G.T. JOHNSON. 1979. Some effects of zinc on the utilization of nitrogen sources by *Monascus purpureus*. Mycologia, 71: 160-169.
- MERCURI, O.A. y F. FORCHIASSIN. 1978. Fotobiología de *Saccobolus citrinus*. Physis (B.A.), Secc. C, 38: 69-82.
- MERCURI, O.A., J.F. GROISMAN & R.M. de LEDERKREMER. 1984. Production of glucogen from microcrystalline cellulose by *Ascobolus furfuraceus*. An. Asoc. Quím. Argent., 72: 65-69.
- MILHOLLAND, R.D.. 1974. Factors affecting apothecium development of *Monilinia vaccinii-corymbosi* from mummled highbush blueberry fruit. Phytopathol., 64: 296-300.
- MOODY, A.R. & A.R. WEINHOLD. 1972. Fatty acids and naturally occurring plant lipids as stimulants of rhizomorph formation in *Armillaria mellea*. Phytopathol., 62: 264-267.
- MOORE, D., M.M.Y. ELHITI & R.D. BUTLER. 1979. Morphogenesis of the carpophore of *Coprinus cinereus*. New Phytol., 83: 695-722.
- MOORE-LANDECKER, E.. 1975. Effect of cultural conditions on apothecial morphogenesis in *Pyronema domesticum*. Can. J. Bot., 53: 2759-2769.
- MOORE-LANDECKER, E.. 1979 a. Effect of cultural age and single photoperiod on morphogenesis of the Discomycete *Pyronema domesticum*. Can. J. Bot., 57: 1541-1549.
- MOORE-LANDECKER, E.. 1979 b. Effect of light regimes and intensities on morphogenesis of the Discomycete *Pyronema domesticum*. Mycologia, 71: 699-712.

- MOORE-LANDECKER, E.. 1981 a. Histochemical observations on apothecia, permanently vegetative hyphae, and sclerotia of *Pyronema domesticum* with special reference to light. *Can. J. Bot.*, 59: 1726-1737.
- MOORE-LANDECKER, E.. 1981 b. Histochemical observations on the Discomycete, *Pyronema domesticum*, with special reference to apothecial ontogeny. *Mycologia*, 73: 301-320.
- MOORE-LANDECKER, E.. 1983. Chemical induction of *Pyronema domesticum* apothecia in the dark. *Mycologia*, 75: 832-838.
- MOORE-LANDECKER, E.. 1987. Effects of medium composition and light on formation of apothecia and sclerotia by *Pyronema domesticum*. *Can. J. Bot.*, 65: 2276-2279.
- MOORE-LANDECKER, E.. 1992. Physiology and biochemistry of ascocarp induction and development. *Mycol. Res.*, 96: 705-716.
- MOORE-LANDECKER, E. & W. SHROPSHIRE Jr.. 1982. Effects of aeration and light on apothecia, sclerotia and mycelial growth in the Discomycete *Pyronema domesticum*. *Mycologia*, 74: 1000-1013.
- MOORE-LANDECKER, E. & W. SHROPSHIRE Jr.. 1984. Effects of ultraviolet A radiation and inhibitory volatile substances on the Discomycete *Pyronema domesticum*. *Mycologia*, 76: 820-829.
- MORTON, A.G. & A. MacMILLAN. 1954. The assimilation of nitrogen from ammonium salts and nitrate by fungi. *J. Exper. Bot.*, 5: 232-252.
- MOUSO de CACHI, N. & M.E. RANALLI. 1989. Systematic and biological study of Ascobolaceae of Argentina. XII. Development and cytology of *Iodophanus carneus* (Pezizales-Ascobolaceae). *Nova Hedwigia*, 49: 49-59.
- MUÑOZ, V., S. BRODY & W.L. BUTLER. 1974. Photoreceptor pigment for blue light responses in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 58: 322-327.
- MUÑOZ, V. & W.L. BUTLER. 1975. Photoreceptor pigment for blue light in *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.*, 55: 421-426.
- NELSON, N.. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153: 375-380.

- NICHOLAS, D.J.D.. 1965. Utilization of inorganic nitrogen compounds and aminoacids by fungi. En "The Fungi"; vol. 1 (ed. Ainsworth & Sussman) pp. 349-376. Academic Press, New York.
- NOLAN, R.A.. 1983. Physiological and nutritional studies with an isolate of *Leptolegnia* sp. from the freshwater nematode *Neomesomermis flumenalis*. Mycologia, 75: 472-486.
- NONGKYNRIH, P. & V.K. SHARMA. 1992. Biological clocks: mechanisms and developments. J. Photochem. Photobiol. 13: 201-217.
- OTTO, M.K., M. JAYARAM, R.M. HAMILTON & M. DELBRUCK. 1981. Replacement of riboflavin by an analogue in the blue light photoreceptor of *Phycomyces*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 266-269.
- PALL, M.L.. 1984. Is there a general paradigm of cyclic AMP action in eucariotes ?. Mol. Cell. Biochem., 58: 187-191.
- PAPAVIZAS, G.C. & W.A. AYER. 1964. Effect of various carbon sources on growth and sexual reproduction of *Aphanomyces euteiches*. Mycologia, 56: 816-830.
- PARDO, A.G y F. FORCHIASSIN. 1993 a. Aspectos nutricionales de *Nectria catalinensis*. Bol. Soc. Argent. Bot., 29: 191-195.
- PARDO, A.G. y F. FORCHIASSIN. 1993 b. Estudios nutricionales en *Ascobolus biguttulatus* (Fungi, Ascomycetes). Crecimiento vegetativo. Bol. Soc. Argent. Bot., 29: 233-239.
- PARDO, A.G. Y F. FORCHIASSIN. 1993 c. Effect of light and nutrition on fruiting of *Ascobolus biguttulatus*. Curr. Microbiol., 27: 69-72.
- PATEMAN, J.A. & J.R. KINGHORN. 1976. Nitrogen Metabolism. En "The Filamentous Fungi", vol. 2 (ed. J.E. Smith & D.R. Berry) pp. 159-237. John Wiley, New York.
- PERKINS, J.H.. 1969. Morphogenesis in *Schizophyllum commune*. I. Effects of white light. Plant Physiol., 44: 1706-1711.
- PFENDER, N.F., C.A. PACEY & W. ZHANG. 1988. Saprophytic growth and pseudothecia production by *Pyrenophora tritici-repentis* in plant tissue held at controlled water potentials. Phytopathol., 78: 1205-1210.

- PITSON, S., R.J. SEVIOUR, J. BOTT & S.J. STASINOPOULOS. 1991. Production and regulation of β -glucanases in *Acremonium* and *Cephalosporium* isolates. *Mycol. Res.*, 95: 352-356.
- PLUNKETT, B.E.. 1956. The influence of factors of the aeration complex and light upon fruit-body form in pure cultures of an agaric and a polypore. *Ann. Bot.*, 20: 563-586.
- POFF, K.L. & W.L. BUTLER. 1974. Absorbance changes induced by blue light in *Phycomyces blakesleeianus* and *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 248: 799-801.
- PUNJA, Z.K.. 1992. Influence of culture conditions on mycelial growth and phialospore production and germination in *Chalara elegans*. *Can. J. Bot.*, 71: 447-456.
- QURESHI, A.A. & O.T. PAGE. 1972. Observations on morphological and nutritional aspects of perithecial formation of *Nectria haematococca* and *Hypomyces solani*. *Can. J. Bot.*, 50: 2443-2448.
- RANALLI, M.E. y R.O. CINTO. 1972. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de la Argentina. IV. *Bol. Soc. Arg. Bot.*, 14: 285-305.
- RAUDASKOSKI, M. & H. VIITANEN. 1982. Effect of aeration and light on fruitbody induction in *Schizophyllum commune*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 78: 89-96.
- RAUDASKOSKI, M. & T. YLI-MATTILA. 1985. Capacity for photoinduced fruiting in a dikaryon of *Schizophyllum commune*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 85: 145-151.
- REDDY, S.M.. 1969. Utilization of monosaccharides by five species of *Helminthosporium*. *Path. Microbiol.*, 33: 185-190.
- ROBBINS, W.J.. 1937. The asimilation by plants of various forms of nitrogen. *Am. J. Bot.*, 24: 243-250.
- ROBBINS, W.J. & A. HERVEY. 1960. Light and the development of *Poria ambigua*. *Mycologia*, 52: 231-247.
- ROBSON, G.D., S.D. BELL, P.J. KUHN & A.P.J. TRINCI. 1987. Glucose and penicillin concentration in agar medium bellow fungal colonies. *J. Gen. Microbiol.*, 133: 361-367.
- ROON, R.J. & B. LEVENBERG. 1970. CO₂ Fixation and the involvement of allophanate in the biotin-enzyme-catalized cleavage of urea. *J. Biol. Chem.*, 245: 4593-4595.

- ROQUEBERT-HUBERT, M.F. et L. LACOSTE. 1971. Etude systematique de quelques *Leptosphaeria* graminicoles II. Role des facteurs externes, principalement de l'eclaircissement dans le determinisme de la fructification de *L. eustomoides*, *L. arundinacea*, *L. microscopica*. Bull. Soc. Myc. Fr., 87: 67-72.
- ROSS, I.K.. 1982. Localization of carpophore initiation in *Coprinus congregatus*. J. Gen. Microbiol., 128: 2755-2762.
- ROSS, R.G. & S.A. HAMLIN.. 1965. Influence of nutrients on perithecial production of *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. Can. J. Bot., 43: 959-965.
- SANDHU, D.K. & M.K. KALRA. 1985. Effect of cultural conditions on production of fertile perithecia of *Calonectria camelliae*. Trans. Br. mycol. Soc., 84: 251-258.
- SENGER, H.. 1982. The effect of blue light on plants and microorganisms. Photochem. Photobiol., 35: 911-920.
- SHARADA, K., H. IKEGAMI & M. HYAKUMACHI. 1992. 2,4-D induced, c-AMP mediated, sclerotial formation in *Rhizoctonia solani*. Mycol. Res., 96: 863-866.
- SHIPTON, W.A.. 1977. Some nutritional factors regulating formation of fertile perithecia of *Calonectria camelliae*. Trans. Br. mycol. Soc., 69: 59-62.
- SINGH, N.. 1982. Carbon and nitrogen nutrition of *Acrocyldrium oryzae* and production of pectic and cellulolytic enzymes. Trans. Br. mycol. Soc., 69: 59-62.
- SINGH, N & A.A. WASINI. 1980. Effect of nutrition on growth and sporulation of a tropical isolate of *Pilobolus crystallinus*. Mycologia, 72: 558-563.
- SMITH, J.E.. 1975. The Structure and Development of Filamentous Fungi. En "The Filamentous Fungi", vol.1 (ed. J.E. Smith & D.R. Berry) pp. 1-15. John Wiley, New York.
- SMITH, R.A.. 1982. Nutritional study of *Pisolithus tinctorius*. Mycologia, 74: 54-58.
- SMITH, S.N., E. INCE & R.A. ARMSTRONG. 1990. Effect of osmotic and matrix potential on *Saprolegnia diclina* and *S. ferax*. Mycol. Res., 94: 71-77.

- SOMMER, T., F. DEGLI INNOCENTI & V.E.A. RUSSO. 1987. Role of nitrogen in the production of protoperithecia and carotenoids in *Neurospora crassa*. *Planta*, 170: 205-208.
- SOMOYI, M.. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 159: 19-23.
- STATES, J.S.. 1975. Normal basidiocarp development of *Gloeophyllum (Lenzites) saepiarium* in culture. *Mycologia*, 67: 1166-1175.
- SURAPIPITH, V & A. LINDENMAYER. 1969. Thioguanine-dependent light sensitivity of perithecial initiation in *Sordaria fimicola*. *J. Gen. Microbiol.*, 57: 227-237.
- SURYANARAYANAN, T.S. & R.N. SWAMY. 1980. Light-induced fruiting in *Leptosphaerulina crassiasca* as influenced by carbon and nitrogen sources. *Proc. Indian nat. Sci. Acad.*, B, 46: 718-722.
- SURYANARAYANAN, T.S. & R.N. SWAMY. 1981. Fruiting of some light-requiring fungi as influenced by cellophane. *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)*, 90: 137-142.
- TABER, W.A & R.A. TABER. 1987. Carbon nutrition and respiration of *Pisolithus tinctorius*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 89: 13-26.
- TAN, Y.H. & D. MOORE. 1992. Convenient and effective methods for *in vitro* cultivation of mycelium and fruiting bodies of *Lentinus edodes*. *Mycol. Res.*, 96: 1077-1084.
- TIMNICK, M.B., V.G. LILLY & H.L. BARNET. 1951. Factors affecting sporulation of *Diaporthe phascolorum* var. *batatatis* from soybean. *Phytopathol.*, 41: 327-336.
- TINLINE, R.D. & J.G. DICKSON. 1958. *Cochliobolus sativus*. I. Perithecial development and the inheritance of spore color and mating type. *Mycologia*, 50: 697-706.
- TOMKINS, G.M.. 1975. The metabolic code. *Science*, 189: 760-763.
- TRINCI, A.P.J.. 1961. Influence of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies. *J. Gen. Microbiol.*, 67: 325-344.
- TRIONE, E.J., C.M. LEACH & J.T. MUTCH. 1966. Sporogenic substances isolated from fungi. *Nature*, 212: 163-164.
- TSCHANZ, A.T., R.K. HORST & P.E. NELSON. 1976. The effect of environment on sexual reproduction of *Gibberella zeae*. *Mycologia*, 68: 327-340.

- TSUDA, M., T. WAKI, M. TAGA & A. VEYAMA. 1982. Ascocarp production of *Magnaporthe salvinii* in culture. Trans. Br. mycol. Soc., 78: 515-519.
- TURIAN, G.. 1978. Sexual Morphogenesis in the Ascomycetes. En "The Filamentous Fungi", vol.3 (ed. J.E. Smith & D.R. Berry) pp. 315-333. John Wiley, New York.
- TURIAN, G. & E.C. CANTINO. 1959. The stimulatory effect of light on nucleic acid synthesis in the mould *Blastocladiella emersonii*. J. Gen. Microbiol., 21: 721-735.
- UNO, I. & T. ISHIKAWA. 1973. Metabolism of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and induction of fruiting bodies in *Coprinus macrorhizus*. J. Bacteriol. 113: 1249-1255.
- UNO, I. & T. ISHIKAWA. 1976. Effect of cyclic AMP on glycogen phosphorylase in *Coprinus macrorhizus*. Biochim. Biophys. Acta, 452: 112-120.
- UNO, I. & T. ISHIKAWA. 1978. Effect of cyclic AMP on glycogen synthetase in *Coprinus macrorhizus*. J. Gen. Appl. Microbiol., 24: 193-197.
- UNO, I. & T. ISHIKAWA. 1982. Biochemical and genetic studies on the initial events of fruitbody formation. En "Basidium and basidiocarp. Evolution, cytology, function and development" (ed. K. Wells & E.K. Wells) pp. 113-123. Springer Verlag, New York.
- UNO, I., M. YAMAGUCHI & T. ISHIKAWA. 1974. The effect of light on fruiting body formation and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate metabolism in *Coprinus macrorhizus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71: 479-483.
- VAIL, W.J. & V.G. LILLY. 1968. The location of carotenoid pigments and thickness of the cell wall in light and dark grown cells of *Dacryopinax spathularia*. Mycologia, 60: 902-907.
- VALADON, L.R.G., R.S. MUMMERY, G.W. VAN EIJK, H.J. ROEYMANS & G. BRITTON. 1980. Taxonomic implications of the carotenoids of *Iodophanus carneus*. Trans. Br. mycol. Soc., 74: 187-190.
- VAN EIJK, G.W., H.J. ROEIJMANS & P.E.J. VERWIEL. 1984. Isolation and identific of the sesquiterpenoid (+)torreyol from *Xylobolus frustulatus*. Exp. Mycol., 8: 273-275.

- VIDAL, G.; T. LEBBE et L. LACOSTE. 1975. Etude des conditions de developpement et de reproduction sexuee du *Leptosphaeria typae*. Mise au point d'un milieu de culture chimiquement defini. Rev. Mycologie, 34: 43-52.
- WALKEY, D.G.A. & R. HARVEY. 1967. Spore discharge rhythms in Pyrenomycetes. III. Ascospore production and quantitative and cualitative influences of light on spore discharge in *Sordaria macrospora*. Trans. Br. mycol. Soc., 50: 241-249.
- WANG, S.Y.C. & D. Le TOURNEAU. 1971. Carbon sources, growth, sclerotium formation and carbohydrate composition of *Sclerotinia sclerotiorum*. Arch. Microbiol., 80: 219-233.
- WAREING, P.F. & I.D.J. PHILLIPS. 1982. Growth and Differentiation in Plants. Pergamon Press, New York. 343 pp.
- WHEELER, B.E.J. & N. SHARAN. 1965. The production of sclerotia by *Sclerotium rolfsii*. I. Effects of varying the supply of nutrients in an agar medium. Trans. Br. mycol. Soc., 48: 291-301.
- WHITAKER, A.. 1976. Amino acid transport. An essay. Trans. Brit. mycol. Soc., 67: 365-376.
- YLI-MATTILA, T.. 1987. The effect of UV-A light on cAMP level in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. Physiol. Plantarum, 69: 451-455.
- YU, C.C.C.. 1954. The culture and spore germination of *Ascobolus* with emphasis on *A. magnificus*. Am. J. Bot., 41: 21-30.
- ZAFAR, S.L. & N. COLOTELO. 1979. Replacemen of light by depleting nutrient supply for pycnidium production by *Plenodomus meliloti*. Mycologia, 71: 219-223.
- ZALOKAR, M.. 1959a. Enzyme activity and cell differentiation in *Neurospora*. Am. J. Bot., 46: 555-559.
- ZALOKAR, M.. 1959b. Growth and differentiation of *Neurospora* hyphae. Am. J. Bot., 46: 602-610.
- ZURZYCKA, A.. 1991. The effect of light intensity and glucose concentration on the development of *Aspergillus giganteus* mutant *alba*. Mycol. Res., 95: 1197-1200.


DRA. FLAVIA FORCIASSI


 Luis A. David