

ESTUDIO SISTEMÁTICO Y BIOLÓGICO DE LAS ASCOBOLACEAS DE LA ARGENTINA. XVI. CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE *ASCOBOLUS MANCUS*. (ASCOMYCOTINA, PEZIZALES)

Por SILVIA DE SIMONE, DIANA A. DOKMETZIAN y MARIA ESTHER RANALLI*

Summary: *Systematic and biological study of the Ascobolaceae of Argentina. XVI. Growth and development of Ascobolus mancus* (Ascomycotina, Pezizales). This contribution deals with studies on *A. mancus* for: bulbil production and ascocarp development in several media and culture conditions; bulbil morphology, ontogeny, germination and viability; sexual behaviour and ascospore germination. Bulbils germinated after long drought periods. Mycelium developed from bulbils possessed the same mating type as the mycelium from which they differentiated. *A. mancus* showed clear sexual behaviour differences between mainly male and mainly female strains. Two factors determined constitutive ascospore dormancy: a metabolic deficiency and a hard epispodium.

Key words: *Ascobolaceae, Pezizales, Growth, Development, Ascobolus mancus*

INTRODUCCION

Ascobolus mancus (Rhem) Brum. es una Ascobolácea-coprófila heterotálica. El micelio crece por debajo de la superficie del sustrato y produce apotecios diminutos, sésiles, con tipo de desarrollo cleistohimial abriéndose en la fase telohimial (van Brummelen, 1967). El himenio posee ascos octosporados, claviformes, de ápice redondeado y base larga y delgada; ascosporas elipsoidales, hialinas durante las primeras etapas de su formación, castaño oscuras al final de la misma con ornamentación verrugosa y mucílago lateral.

Es una especie poco estudiada y desde la cita de van Brummelen (op. cit.), no existe hasta el presente ningún otro trabajo referido a ella. En cuanto a su distribución, el citado autor sólo menciona Canadá, Estados Unidos, Francia y Alemania. Por lo tanto ésta es, además, la primera cita para la Argentina y el hemisferio Sur.

Presenta como característica particular, la formación de "bulbillos", estructuras de propagación vegetativa que hasta el momento no han sido observados en ninguna de las especies de la familia Ascobolaceae estudiadas en nuestro laboratorio.

Dada su particularidad, se estudió en cuanto a su aspecto vegetativo: 1) la producción de bulbillos

en distintos medios variando las condiciones de iluminación, 2) su morfología y ontogenia y 3) su germinación y viabilidad. Con respecto a la sexualidad: 1) el comportamiento sexual, 2) la formación de cuerpos fructíferos en distintos medios variando las condiciones de iluminación y 3) la germinación de las ascosporas.

MATERIAL Y METODOS

Se trabajó con la cepa BAFC 2770 de *A. mancus* aislada de estiércol de vaca coleccionado en San Pedro (prov. de Buenos Aires) siguiendo la metodología de trabajos anteriores (Gamundí y Ranalli, 1963), y depositada en la colección de cultivos del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA.

En las cámaras húmedas preparadas con estiercoles originales, las fructificaciones aparecieron entre el 8°-10° día. Las ascosporas obtenidas en agar agua se dejaron en reposo por 5 ó 10 días; posteriormente se trataron con soluciones de HONa 0.1%, 0.18%, 0.2% y 0.3% durante 30 minutos para inducir la germinación y se incubaron a 37°C durante 24 hs.

Para los cruzamientos, se utilizaron los cultivos monospóricos 1 y 2. Cuando se los hace crecer separadamente, éstos se comportan en forma idéntica en cuanto a su crecimiento vegetativo.

Los cultivos se mantuvieron en heladera a 5°C en tubos con medio PF en pico de flauta (Gamundí y Ranalli, 1966).

*Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, Pab. II, 4to. piso. 1428 Buenos Aires. ° Investigadora del CONICET

Medios de cultivo sólidos:

ET: estiércol tindalizado.

PF: papel de filtro, extracto de levadura (Ranalli y Forchiassin, 1976) en cajas de Petri y en tubos en pico de flauta.

GU: glucosa, urea (Galvagno, 1976), en caja de Petri.

GA: glucosa, asparagina (Galvagno, op. cit.), en caja de Petri.

AA: agar 18 gr. agua destilada 1000 ml, en caja de Petri.

Condiciones de cultivo: la incubación se realizó en cámara de cultivo New Brunswick G-27 a 23°C con luz provista por 4 tubos fluorescentes de 20 W cada uno.

Fijación: se fijaron en Carnoy bloques de cultivo crecidos en GA y a las 24 hs se transfirieron a alcohol 70°. Se realizaron cortes de 15-20 µm de espesor con micrótopo de congelación.

Coloración: las observaciones citológicas se hicieron en cultivos desarrollados sobre PF o GA. Se utilizó colorante de Giemsa y colorante de Lu. Los métodos de fijación y coloración son los descriptos anteriormente (Ranalli y Gamundí, 1975; Forchiassin y Dokmetzian, 1982) con algunas modificaciones ya que esta especie posee paredes muy gruesas que dificultan el ingreso del colorante al interior de las células.

Métodos de conteo: para el recuento de esporas germinadas se utilizó una cuadrícula de 1,5 cm² que se arrojó al azar sobre la caja en la cual fueron recogidas y tratadas las esporas. Se contó el número de esporas germinadas y no germinadas en toda la cuadrícula.

Para medir la densidad de apotecios producidos por el cruzamiento de las cepas 1 y 2 en distintos medios, se utilizó un aro de metal de 38,5 mm² arrojado al azar sobre la mitad de la caja que produjo los apotecios.

Los datos presentados son el promedio de la lectura de 3 cajas en todos los casos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Crecimiento vegetativo

1) Producción de bulbillos en distintos medios variando las condiciones de iluminación.

Se realizó el estudio de la colonia y la producción de bulbillos en ET, PF, GU, GA y AA con luz continua y en oscuridad. En medio nutritivo PF y con luz continua el micelio es de crecimiento rasante con escaso desarrollo aéreo al principio y afieltrado al 3er. día cuando ha cubierto completa-

mente la caja de Petri. Hacia el 5°-6° día se distingue una zona periférica de micelio aéreo con mechones blanquecinos que se elevan de la superficie de cultivo. Sobre este micelio aéreo se forman los bulbillos (Hotson, 1912, 1917) aéreos de 100-175 µm diám., blanquecinos y de borde indefinido.

Paralelamente, a partir del 5° día se observa en la periferia de la caja una tenue coloración citrina del sustrato y la formación de bulbillos sumergidos mucho más grandes que los aéreos (350)375-450(500) µm, globosos a subglobosos, a veces subcilíndricos, inicialmente blanquecinos, luego amarillentos a levemente anaranjados.

La observación microscópica de la colonia revela la presencia de un micelio constituido por hifas delgadas (3-4 µm diám.) y gruesas (9-11 µm diám.), hialinas, de crecimiento vigoroso, ramificado, con abundantes anastomosis laterales y células multinucleadas (Fig. 1 A). Las hifas delgadas de paredes más finas, constituyen la mayor parte del micelio sumergido y, a medida que el micelio crece, emite ramificaciones relativamente cortas de hifas catenuladas, retorcidas, con células redondeadas de aproximadamente 13 µm diám. (Fig. 1 B).

El crecimiento de la colonia desarrollada en GU y GA y con luz continua es igualmente veloz, ya que entre el 3° y 4° día cubre la caja de Petri y hacia el 5° día se hace cada vez más denso con abundante micelio sumergido, lo cual confiere a la colonia un aspecto ceroso de bordes irregulares. A diferencia de lo que ocurre en PF no se observa micelio aéreo ni la formación de bulbillos.

Observadas las cajas a trasluz, se advierte que el crecimiento del micelio no es homogéneo en GU, sino que es más denso en determinados puntos regularmente distribuidos en toda la caja. Esta diferencia no se observa en GA donde el crecimiento miceliano es más homogéneo.

El análisis microscópico muestra la presencia de hifas gruesas e hifas catenuladas en el micelio sumergido crecido en GU, con la formación de nudos o esbozos de bulbillos (Willets y Wong, 1971) que se corresponden con los puntos observados macroscópicamente a trasluz, mientras que el micelio en GA está formado exclusivamente por hifas catenuladas.

En AA y con luz continua el crecimiento es ralo, rasante, y el micelio con hifas delgadas y gruesas; sin hifas catenuladas. En cultivos obtenidos a partir de los primeros repiques de los aislamientos monospóricos, se observó al 7° día la formación de bulbillos semisumergidos, subglobosos alrededor del inóculo, con menor densidad que en PF, pero que, tras sucesivos y repetidos repiques, dejaron de producirse.

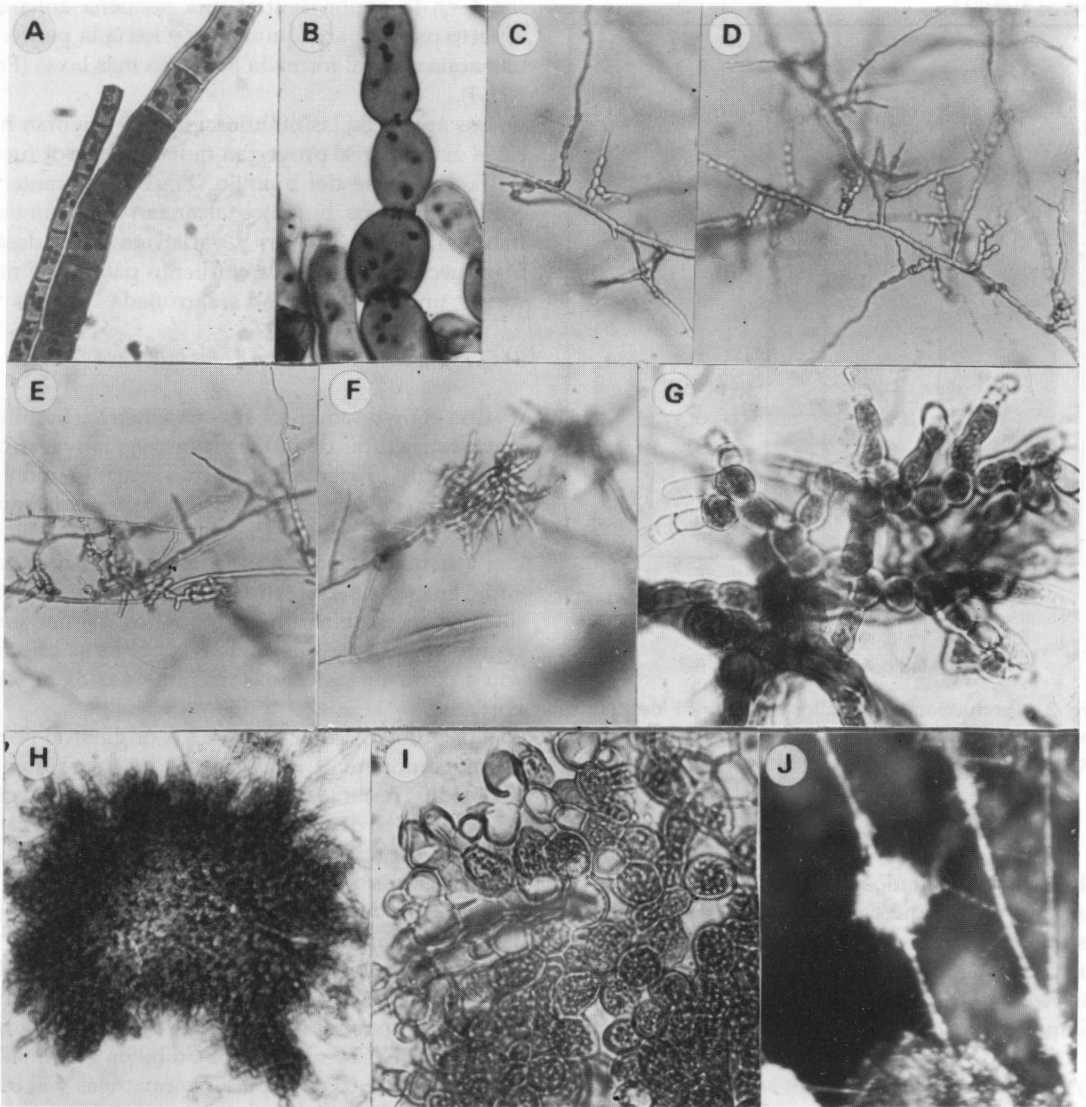


Fig. 1.—Estadíos sucesivos en la formación de bulbillos. A: hifas delgadas y gruesas con células multinucleadas, x900, Col. Giemsa. B: hifas catenuladas, x225, Col Hematoxilina. C, D, E y F: estadíos sucesivos de bulbillos, x225. G x900. H: corte longitudinal de bulbillo maduro, x 225. I: detalle del corte anterior, x900. J: bulbillo maduro en vista superficial sobre estiércol, x50.

En ET y luz continua los bulbillos aparecen al 3°-4° día de inoculación, inicialmente hialinos, luego levemente amarillentos, subglobosos, de borde indefinido y superficie irregular, de los cuales emergen abundantes hifas, dándole un aspecto pilosos (Fig. 1 J).

El micelio desarrollado en oscuridad sobre PF tiene abundante crecimiento aéreo, algodonoso, con una mayor producción de bulbillos aéreos que en cultivos con luz continua. En GU no presentó diferencias significativas respecto a lo observado en

condiciones de iluminación, salvo la presencia de esbozos de bulbillos. En GA el crecimiento de las colonias fué mucho más lento y muy denso, alcanzando al 5°-6° día sólo 6 cm diám., con borde irregular, aspecto cremoso en la porción central y ceroso en la periferia. Los cultivos monospóricos desarrollados en oscuridad exhibieron una mayor producción de bulbillos en todos los medios.

La conservación de las cepas en PF y AA a bajas temperaturas (5°C) disminuye la producción de bulbillos, siendo más drástica en AA (Fig. 2). Se

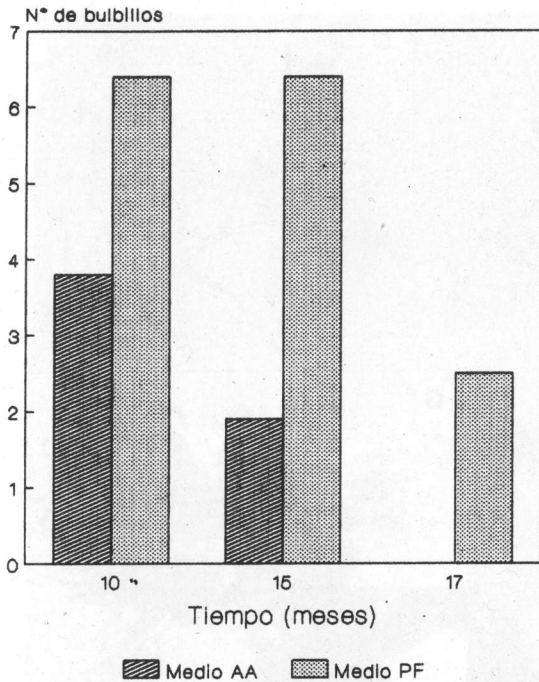


Fig. 2.- Producción de bulbillos en AA y PF después de mantener los cultivos en PF a 5°C durante distintos períodos de tiempo.

observaron resultados similares con el aumento del número de repiques sucesivos de las cepas. Esto estaría vinculado con la paulatina esterilización de las cepas, también observada en otras especies de *Ascobolus* (Gamundí y Ranalli, op. cit.; Ranalli y Gamundí, op. cit.; Mouso de Cachi, 1982).

2) Morfología y ontogenia de los bulbillos.

Al inocular el aislamiento monospórico 2 en una caja de Petri con AA, al cabo de 4 días se desarrolló una colonia de 3 cm diám. formada por numerosas hifas radiales, gruesas, abundantemente ramificadas en los bordes. Los bulbillos maduros, pequeños, globosos y hialinos se encuentran cercanos al inóculo mientras que hacia la periferia; pueden observarse con la lupa numerosas iniciales de bulbillos.

Estos se inician como pequeñas ramificaciones intercalares de 2-3 células globosas y tras un corto recorrido se ramifican dicotómicamente (Fig. 1 C a G). En un estadio posterior y como resultado de ramificaciones adicionales, el bulbillito aumenta gradualmente de tamaño y adquiere una forma subglobosa, alcanzando 100-125 µm diám., sin diferenciación interna. En sección longitudinal se ob-

servó en la región central una pequeña zona de aspecto pseudoparenquimatoso y hacia la periferia una zona cortical formada por hifas más laxas (Fig. 1 H, I).

Los ápices de las ramificaciones se orientan hacia el exterior y se proyectan radialmente por fuera de la superficie del bulbillito (Fig. 1 J). Durante la maduración, los bulbillos alcanzan un diámetro máximo de 250-300 µm y varían en color desde blanquecinos, hacia un amarillento pálido y, finalmente, una leve tonalidad amarronada.

3) Germinación y viabilidad de los bulbillos.

Con el fin de comprobar el papel de los bulbillos como estructuras de propagación vegetativa, se colocaron los provenientes del aislamiento monospórico 2 crecido en PF y AA sobre un disco de papel de filtro estéril para retirarles la humedad superficial y se mantuvieron a 23°C tanto en luz continua como en oscuridad. Transcurridas entre 20-24 hs de incubación germinaron en todos los medios emitiendo varios tubos germinativos; éstos se originaron a partir de las células más internas de la zona cortical.

Los bulbillos colocados en AA originaron pocos tubos germinativos muy gruesos, mientras que en los medios restantes, el número fue mucho mayor y las colonias se desarrollaron más velozmente. Estas colonias produjeron nuevos bulbillos con iguales características que los que le dieron origen, salvo en GA y GU, donde hubo abundante micelio catenulado sin bulbillos.

Una situación similar se observó con bulbillos germinados en oscuridad, y la única diferencia residió en una mayor producción de bulbillos aéreos.

El micelio obtenido de los bulbillos germinados se cruzó sobre ET de a pares compatibles y al cabo de 3-4 días se observó la aparición de fructificaciones que maduraron y expulsaron normalmente sus esporas. Se obtuvieron idénticos resultados en PF, GA y GU.

Con el fin de comprobar si estos bulbillos, además de funcionar como estructuras de propagación vegetativa también podrían actuar como estructuras de resistencia, se los sometió a distintos períodos de sequía, variando las condiciones de iluminación y se evaluó la viabilidad de los mismos calculando el porcentaje de germinación.

Se colocaron bulbillos provenientes de PF, sobre discos de papel de filtro estériles y se los mantuvo a 23°C durante 10, 20 y 30 días en dos series, a luz continua y en oscuridad. Al cabo de ese período de tiempo, se inocularon un número equivalente de bulbillos en PF, ET y AA y se los incubó a 23°C y las mismas condiciones de iluminación.

Los bulbillos germinaron en los tres medios ensayados tanto en luz como en oscuridad, pero aquellos sometidos a períodos de sequedad entre 4-10 días germinaron a las 24-48 hs. Si el período se prolonga a 20-30 días, no germinan hasta el 9° día.

El porcentaje de germinación se midió en PF y luz continua (Fig. 3) siendo entre 40-45% en los sometidos a períodos de sequía de 10 y 20 días y del 7% cuando el período de sequía fué de 30 días. En ensayos aislados se observó que los bulbillos mantenidos durante 90 días también germinan en ET y PF.

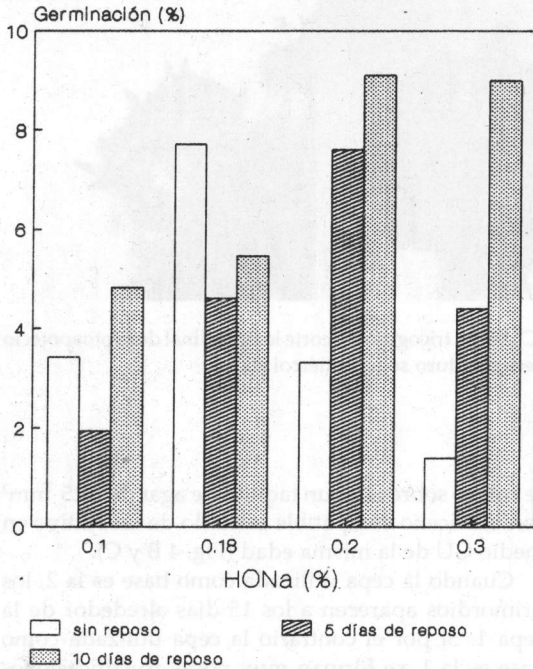


Fig. 3.— Porcentaje de germinación de bulbillos procedentes de un cultivo en PF y mantenidos en condiciones de sequedad durante distintos períodos de tiempo.

SEXUALIDAD

Los cultivos monospóricos crecidos en GU a 23°C y luz continua no formaron fructificaciones sexuales. Se cruzaron en forma sistemática varios aislamientos monospóricos, algunos de los cuales produjeron al 8°-9° día pequeños primordios que maduraron al 15° día con la formación de las ascosporas. Los aislamientos resultaron sexualmente compatibles y la especie heterotálica.

En los cruzamientos compatibles se observó, a partir del 5° día una leve coloración verdoso-amarillenta del sustrato en la zona de contacto de ambas cepas (Fig. 4 A). Sobre este sector, entre el 7°-8° día se formaron ascogonios intercalares circinoides, con tres espiras y un número variable de células globosas (6 a 8). La última termina en un tricogino filiforme que remata en una célula apical (Fig. 5 A, B y C) bifurcada, a través de la cual ocurre la plasmogamia por anastomosis con el ápice de una hifa vegetativa cercana.

Paralelamente, otras hifas adyacentes crecen centrípetamente envolviendo el ascogonio en un ovillo compacto de 50-60 μm diám. constituyendo el protoapotecio (Fig. 5 D). Entre el 10°-11° día cuando los apotecios han alcanzado 200 μm diám. se observan ascos inmaduros (Fig. 5 E) y paráfisis filiformes. Hacia el 15° día se inicia la maduración de las ascosporas, se rompe el techo del apotecio y 24 hs más tarde los ascos comienzan a emerger hasta 1/2-1/3 de su longitud por encima del himenio (Fig. 5 F) hasta la expulsión violenta de las ascosporas a través de un opérculo apical central.

1) Comportamiento sexual de las cepas compatibles.

Al inocular los aislamientos monospóricos 1 y 2 en puntos opuestos de la caja, se observó que los

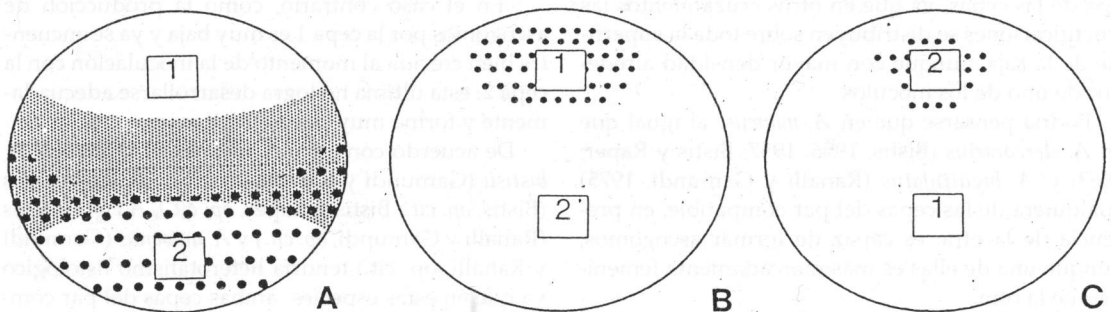


Fig. 4.— Comportamiento sexual de cepas compatibles. A: cruzamiento de las cepas 1 y 2 en puntos opuestos de la caja. B: cruzamiento usando como base la cepa 2 y el taquito con la cepa 1. C: cruzamiento usando como base la cepa 1 y el taquito con la cepa 2.

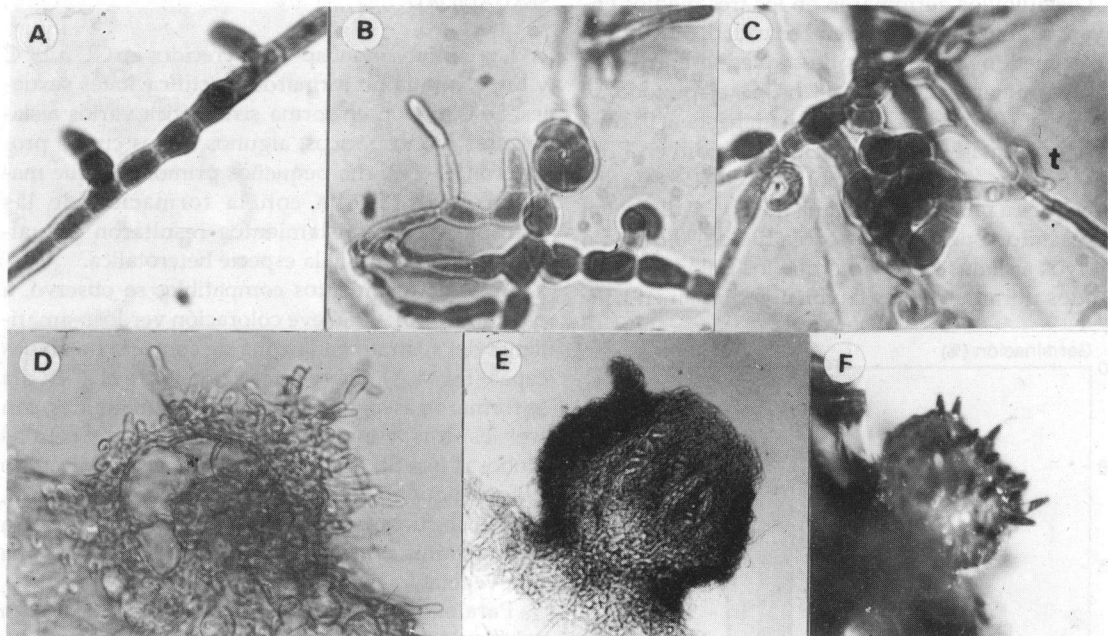


Fig. 5.—Sucesivos estadios en la formación del ascocarpo. A, B y C x900, t: tricogino. D: corte longitudinal de protoapotecio x900. E: corte longitudinal de apotecio inmaduro x225. F: apotecio maduro sobre estiércol x50.

primordios aparecen siempre en una mitad de la caja alrededor de la cepa 2 y sobre el inóculo de la cepa 1. Este comportamiento es similar al observado en *A. ferrugineus* (Ranalli y Forchiassin, 1978) en el cual una de las cepas actuaría como donante y la otra como receptora. Al igual que en *A. ferrugineus* tampoco se pudo distinguir cepas femeninas o masculinas ya que ambas cepas son idénticas y no forman estructuras sexuales cuando crecen separadamente sino que éstas se forman al ser inducidas por la presencia del micelio compatible.

La producción de ascogonios no es exclusiva de una de las cepas, ya que en otros cruzamientos las fructificaciones se distribuyen sobre toda la superficie de la caja, aunque con mayor densidad alrededor de uno de los inóculos.

Podría pensarse que en *A. mancus*, al igual que en *A. stercorarius* (Bistis, 1956, 1957; Bistis y Raper, 1963) y *A. biguttulatus* (Ranalli y Gamundí, 1975) cualquiera de las cepas del par compatible, en presencia de la otra, es capaz de formar ascogonios, aunque una de ellas es más marcadamente femenina que la otra.

Con el fin de comprobar este comportamiento se sembraron las cepas 1 y 2 por separado en cajas de Petri con medio GU. Al 6° día, cuando el micelio de ambas cepas había cubierto completamente la caja,

se colocó sobre ellas un taquito de agar de 0.25 mm² con el micelio compatible extraído de un cultivo en medio GU de la misma edad (Fig. 4 B y C).

Cuando la cepa utilizada como base es la 2, los primordios aparecen a los 15 días alrededor de la cepa 1. Si por el contrario la cepa utilizada como base es la 1, se forman muy pocas fructificaciones alrededor de la cepa 2. Según estos resultados la cepa 2 exhibe un comportamiento marcadamente femenino, de modo que al momento de inocular con la cepa 1, el micelio está lo suficientemente maduro como para iniciar la diferenciación de ascogonios.

En el caso contrario, como la producción de ascogonios por la cepa 1 es muy baja y ya se encuentra bien crecida al momento de la inoculación con la cepa 2, esta última no logra desarrollarse adecuadamente y forma muy pocos ascogonios.

De acuerdo con esto, *A. mancus*, al igual que *A. bistisii* (Gamundí y Ranalli, *op. cit.*), *A. stercorarius* (Bistis, *op. cit.*; Bistis y Raper, *op. cit.*), *A. biguttulatus* (Ranalli y Gamundí, *op. cit.*) y *A. amoenus* (Gamundí y Ranalli, *op. cit.*) tendría heterotalismo fisiológico ya que en estas especies ambas cepas del par compatible son capaces de formar ascogonios en presencia del micelio (u oídio) de compatibilidad opuesta. *A. amoenus* y *A. mancus* no producen oídios, mientras que las restantes sí lo hacen.

2) Formación de cuerpos fructíferos en distintos medios variando las condiciones de iluminación.

Se utilizaron los aislamientos monospóricos 1 y 2 cultivados en ET, PF, GA y GU distribuidos en dos series: una en luz continua y otra en oscuridad. Dada la polaridad observada en el comportamiento sexual, el número de apotecios maduros se midió sobre la cepa más femenina, en este caso la cepa 2. Los resultados obtenidos en luz continua se resumen en la figura 6.

De los medios ensayados ET y GA resultaron los mejores en cuanto a número de apotecios producidos; dispersos en ET y gregarios en GA y GU. En PF, el número es menor y la distribución más homogénea. Los apotecios en PF y ET maduraron tempranamente mientras que en GA y GU el desarrollo fué más lento. En oscuridad no se produjeron fructificaciones en ninguno de los medios utilizados. Este comportamiento concuerda con lo observado en *A. biguttulatus* (Ranalli y Gamundí, op. cit.) y en *A. ferrugineus* (Ranalli y Forchiassin, op. cit.).

3) Germinación de ascosporas.

Las ascosporas provenientes de ET y recogidas en AA sólo ocasionalmente germinaron en forma

espontánea, por lo que luego de dejarlas a temperatura ambiente durante 1, 5 y 10 días se ensayaron tratamientos inductores utilizando distintas concentraciones de HONA.

Para las ascosporas sin período de reposo la concentración de HONA más eficiente fué 0.18%; concentraciones mayores (0.2%) resultaron menos eficientes y al 0.3% los resultados fueron drásticos, la mayoría de las ascosporas tenían las paredes rotas y el contenido citoplasmático desparramado.

Al aumentar el período de reposo (5-10 días), aquellas concentraciones de HONA que en ascosporas sin reposo resultaron drásticas, permitieron obtener altos porcentajes de germinación (Fig. 7). Esto indica que se produce un endurecimiento del exosporio con el tiempo y no una disminución de la viabilidad, pues ascosporas con 10 días de reposo exhibían los porcentajes más altos. De estos resultados se desprende que el exosporio es una barrera efectiva a la entrada de agua.

La permeabilidad no sólo varía con la duración del período de reposo sino también con el medio de cultivo sobre el cual se desarrollan las fructificaciones; las ascosporas provenientes de cultivos en medio PF tienen el exosporio más débil que el proveniente de ET.

A pesar del tratamiento inductor aplicado, los porcentajes de germinación resultaron en general

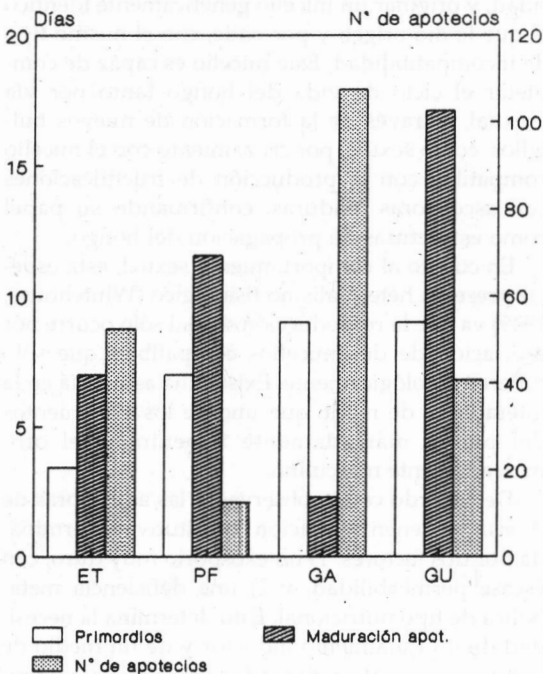


Fig. 6.- Días en que aparecen los primordios, maduran los apotecios y cantidad de fructificaciones en los distintos medios de cultivo a 23°C y con luz continua.

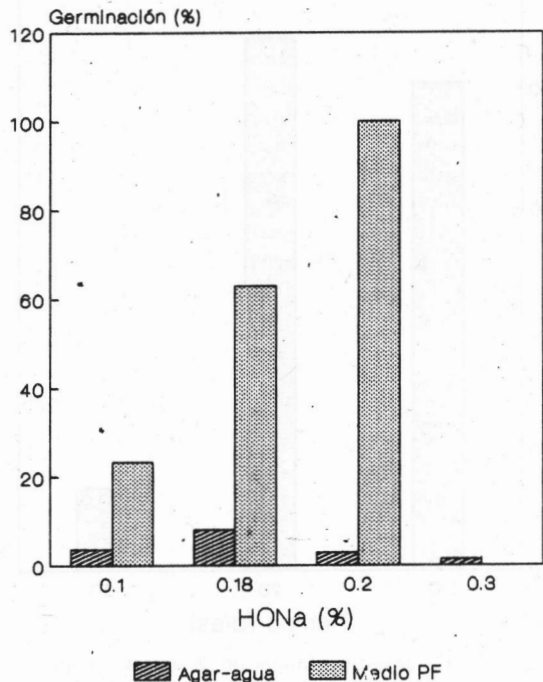


Fig. 7.- Porcentaje de germinación de ascosporas provenientes de cultivos en estiércol recogidas en AA, con distintos períodos de reposo y distintos tratamientos con HONA.

muy bajos, por lo cual se supuso que debería existir otro tipo de dormición implicada en el proceso de germinación. Para corroborar esta hipótesis, las ascosporas provenientes de ET fueron recogidas en placas con medio nutritivo estandar (PF), pero sin papel, y a las 24 hs de expulsadas se les aplicó el tratamiento inductor (Fig. 8).

Se observó que para un mismo período de reposo los porcentajes de germinación de ascosporas recogidas en PF son mucho mayores que los de las recogidas en AA, indicando que en esta especie la dormición de las ascosporas opera principalmente a través de alguna deficiencia metabólica o requerimiento de algún factor nutricional que debe ser aportado exógenamente por el medio para inducir la germinación. Incluso en cajas de PF sin tratar, mantenidas a temperatura ambiente, hubo mayor porcentaje de germinación espontánea respecto al observado en AA.

Las concentraciones de HONa óptimas registradas fueron 0.2% para ascosporas recogidas en PF y 0.18% para las recogidas en AA. Las ascosporas recogidas en PF mostraron, además, una mayor sensibilidad a altas concentraciones ya que al 0.3%

no germinaron. De todos modos, se observó que a concentraciones crecientes de HONa, el porcentaje de germinación aumentó tanto en esporas recogidas en AA como en PF.

CONCLUSIONES

La morfología y crecimiento del micelio de *A. mancus*, y la formación de bulbillos, varía según el medio de cultivo utilizado y las condiciones de iluminación. En luz, se forman en PF, ET y AA y no se forman en GU y GA. En oscuridad, la cantidad de bulbillos y el diámetro de los mismos es mayor que en luz para todos los medios ensayados.

Tanto bulbillos como esclerocios (Willetts, 1977) tienen como característica común la capacidad para sobrevivir como estructuras independientes en condiciones desfavorables durante períodos variables; en este caso en condiciones de sequedad por 30 días, durante las cuales el micelio vegetativo muere.

Según las apreciaciones de Townsend y Willetts (1954), los bulbillos de *A. mancus* presentan en sus estadios iniciales un tipo de desarrollo "laxo" a diferencia del de los esclerocios que consiste en una masa de células compactadas e internamente diferenciadas.

Se observó que estas estructuras son capaces de germinar aún después de ser sometidas a períodos prolongados de sequía, tanto en luz como en oscuridad, y originar un micelio genéticamente idéntico al que le dió origen y por ende, con el mismo tipo de incompatibilidad. Este micelio es capaz de completar el ciclo de vida del hongo tanto por vía asexual, a través de la formación de nuevos bulbillos, como sexual, por cruzamiento con el micelio compatible con la producción de fructificaciones con ascosporas maduras, confirmando su papel como estructuras de propagación del hongo.

En cuanto al comportamiento sexual, esta especie presenta heterotalismo fisiológico (Whitehouse, 1949) ya que la reproducción sexual sólo ocurre por asociación de dos micelios compatibles que sólo difieren fisiológicamente. Existe una asimetría en la interacción, de modo que uno de los aislamientos del par es marcadamente femenino y el otro marcadamente masculino.

De acuerdo con lo observado, las ascosporas de *A. mancus* tienen dormición constitutiva determinada por dos factores: 1) un exosporio muy duro, con escasa permeabilidad, y 2) una deficiencia metabólica de tipo nutricional. Esto determina la necesidad de un tratamiento inductor y de un medio de cultivo con fuente carbonada, nitrogenada, vitaminas y micronutrientes que permita la germinación.

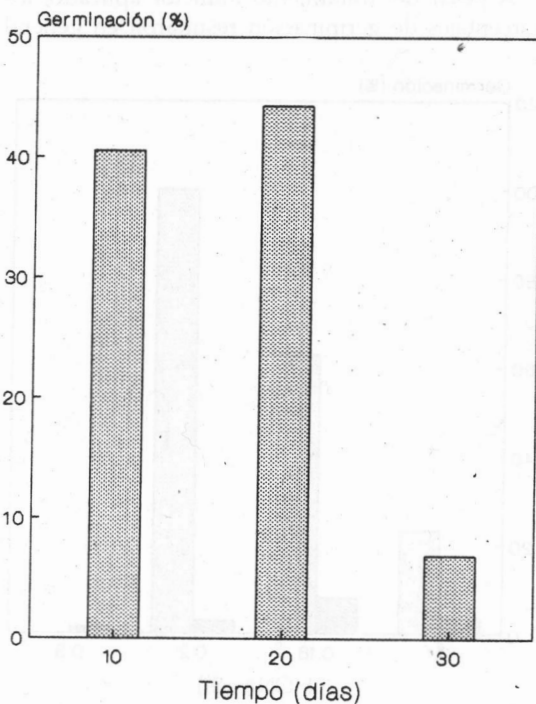


Fig. 8.- Porcentaje de germinación de ascosporas provenientes de cultivos en estiércol recogidas en AA y PF a las 24 hs de expulsadas, tratadas con concentraciones crecientes de HONa.

BIBLIOGRAFIA

- BISTIS, G. N. 1956. Sexuality in *Ascobolus stercorarius*. I. Morphology of the ascogonium; plasmogamy; evidence for a sexual hormonal mechanism. *Am. J. Bot.* 43: 389-394.
- 1957. Sexuality in *Ascobolus stercorarius*. II. Preliminary experiments on various aspects of the sexual process. *Am. J. Bot.* 44: 436-443.
- & J. R. RAPER. 1963. Heterothallism and sexuality in *Ascobolus stercorarius*. *Am. J. Bot.* 50: 880-891.
- BRUMMELEN, J. van. 1967. A world monograph of the genera *Ascobolus* and *Saccobolus* (Ascomycetes, Pezizales). *Persoonia* (Suppl.) 1: 1-260.
- FORCHIASSIN, F. & D. A. DOKMETZIAN. 1982. Estudios citológicos en *Saccobolus succineus*. *Physis*, Secc. C, BA, 40 (100): 47-52.
- GALVAGNO, M. A. 1976. Ensayos de nutrición en *Ascobolus crenulatus* P. Karst. (Fungi-Ascomycetes). *Bol. Soc. Arg. Bot.* 17 (1-2): 95-118.
- GAMUNDI, I. J. & M. E. RANALLI. 1963. Apothecial development of *Ascobolus stercorarius*. *Trans Br. Myc. Soc.* 46 (3): 393-400.
- 1966. Estudios sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. II. *Nova Hedwigia* 10: 339-366.
- HOTSON, J. W. 1912. Culture studies of fungi producing bulbils and similar propagative bodies. *Proc. Amer. Acad.* 48: 225-306.
- 1917. Notes on bulbiferous fungi with a key to described species. *Botanical Gazette* LXIV (4): 265-283.
- MOUSO DE CACHI, N. 1982. Estudios sobre la sexualidad y fertilidad en *Ascobolus biguttulatus*. *Physis*, Secc. C. BA. 41 (100): 1-8.
- RANALLI, M. E. & F. FORCHIASSIN. 1976. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. VII. Desarrollo y citología de *Saccobolus citrinus*. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 17: 262-279.
- 1978. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. VIII. *Ascobolus ferrugineus* sp. nov. Estudios de cultivo y citología. *Physis*, Secc. C, BA, 38 (94): 43-55.
- & GAMUNDI, I. J. 1975. *Ascobolus biguttulatus* sp. nov. (Ascomycetes, Pezizales). Estudios de cultivo y citología. *Physis*, Secc. C, BA. 34 (88): 1-15.
- TOWNSEND, B. B. & WILLETTS, H. J. 1954. The development of sclerotia of certain fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 37: 213-221.
- WHITEHOUSE, H. L. K. 1949. Heterotalism and sex in the fungi. *Biol. Rev.* 24: 41-447.
- WILLETTS, H. J. 1977. Sclerotium formation. In J. Smith, D. Berry (Eds.). *The filamentous fungi*. Vol. 3: 197-213. Department of applied Microbiology, University of Strathclyde, Glasgow.
- & WONG, A. L. 1971. Ontogenetic diversity of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and related species. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57: 515-524.