

Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina XX. Aislamiento y cultivo de cinco especies de *Saccobolus* (ascomycota) nuevas para Argentina

María Cecilia GIMÉNEZ, Araceli Marcela RAMOS
& María Esther RANALLI*

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires,
Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina.
E-mail: araceli@bg.fcen.uba.ar

Resumen – En este trabajo, se aislaron y cultivaron cinco especies del género *Saccobolus*: *S. glaber*, *S. truncatus* (sección *Saccobolus*); *S. verrucisporus*, *S. infestans* y *S. versicolor* (sección *Eriobolus*). En todos los casos se estudió su comportamiento y desarrollo en tres medios de cultivo: PF, GA y ET, variando las condiciones de iluminación (luz, luz-oscuridad y oscuridad completa). Del análisis comparativo, pueden extraerse varias conclusiones: 1) Los tres medios de cultivo son adecuados para la fructificación, siendo el ET el mejor; 2) Las ascosporas tienen dormancia constitutiva. Tratamientos inductores con NaOH e incubación a 37°C, permiten obtener excelente germinación en todos los casos; 3) La luz es un factor determinante para la fructificación. En *S. verrucisporus*, *S. infestans* y *S. versicolor* (secc. *Eriobolus*), en oscuridad no se producen fructificaciones, solo crecimiento vegetativo en todos los medios. En *S. glaber* y *S. truncatus* (secc. *Saccobolus*), si bien se producen fructificaciones en oscuridad, las esporas no son liberadas y la ornamentación y la disposición en el paquete es aberrante.

***Saccobolus* / Ascomycota / Coprófilo / Desarrollo / Luz**

Résumé – Dans cet article, cinq espèces du genre *Saccobolus* ont été isolées, cultivées et décrites : *S. glaber*, *S. truncatus* (section *Saccobolus*); *S. verrucisporus*, *S. infestans* et *S. versicolor* (section *Eriobolus*). Pour chacune, le développement et le cycle biologique ont été étudiés sur trois milieux de culture (PF, GA et ET) avec différentes photopériodes. Après analyse des résultats, les conclusions suivantes peuvent être déduites : 1) Les trois milieux de culture étudiés conviennent à la production d'ascocarpes. Les meilleurs résultats ont toutefois été obtenus avec le milieu naturel ET ; 2) Les ascospores possèdent une dormance constitutive. Après traitements par NaOH, une incubation à 37 °C permet d'obtenir la germination des ascospores pour toutes les espèces étudiées ; 3) La lumière est un facteur très important pour l'obtention des fructifications. A l'obscurité, *S. verrucisporus*, *S. infestans* et *S. versicolor* (section *Eriobolus*) n'en produisent pas. *S. glaber* et *S. truncatus* (section *Saccobolus*) en produisent, mais les ascospores ne sont pas libérées et possèdent une ornamentation et une disposition aberrantes.

***Saccobolus* / Ascomycota / Coprophile / Développement / Lumière**

* Miembro de la carrera del investigador CONICET

Abstract – In the present contribution, five species of *Saccobolus* were isolated, cultured and described: *S. glaber*, *S. truncatus* (section *Saccobolus*); *S. verrucisporus*, *S. infestans* and *S. versicolor* (section *Eriobolus*). In all of them, development and life cycle were studied varying the culture media and photoperiod. After the comparative analysis, we could reach to the following conclusions: 1) The ascospores have constitutive dormancy: induction treatments made with NaOH solutions followed by incubation at 37°C, allow to obtain excellent germination in all cases; 2) All the culture media studied are good for fruiting bodies production, being horse dung the best one; 3) Light is a relevant factor for fruiting bodies production: under continuous darkness conditions, *S. verrucisporus*, *S. infestans* and *S. versicolor* do not produce them but do have vegetative growth in every media studied; *S. glaber* and *S. truncatus* do produce fruiting bodies without light periods, but spores are not released and have an abnormal ornamentation, and spore-clusters are aberrant.

***Saccobolus* / Ascomycota / Coprophilous / Development / Light**

INTRODUCCIÓN

Continuando con el estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina, en el presente trabajo se estudian cinco especies de *Saccobolus* citadas por primera vez para Argentina: *S. truncatus* Vel., 1934, *S. glaber* Pers., 1794, *S. versicolor* Karst., 1867, *S. verrucisporus* Brumm., 1961, *S. infestans* Brumm., 1967. Los trabajos sobre esta familia fueron iniciados en nuestro laboratorio por Gamundi & Ranalli, 1966, 1969 y continuados por Ranalli & Cinto, 1972 y otros autores.

El género se divide en dos secciones (van Brummelen, 1967): por la presencia de pigmento en las paráfisis, *S. truncatus* y *S. glaber* pertenecen a la sección *Saccobolus*, mientras que *S. versicolor*, *S. verrucisporus* y *S. infestans*, cuyas paráfisis son hialinas, pertenecen a la sección *Eriobolus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Al colocar estiércol de vaca de distintas procedencias en cámara húmeda se obtuvieron apotecios maduros de las siguientes especies: *Saccobolus glaber* (en estiércoles procedentes de Hernández, provincia de Entre Ríos y de Mburucuyá, provincia de Corrientes), *S. truncatus* (en estiércoles procedentes de Tandil, provincia de Buenos Aires y Bahía Craft, provincia de Río Negro), *S. infestans* (en estiércoles procedentes de Adrogué, provincia de Buenos Aires, y de San Pablo, Brasil), *S. verrucisporus* (a partir de estiércoles procedentes de Gobernador Castro, provincia de Buenos Aires y Gualaguaychú, provincia de Entre Ríos) y *S. versicolor* (en estiércoles procedentes de Hernández, provincia de Entre Ríos y de Ezeiza provincia de Buenos Aires).

Las ascosporas fueron recogidas en agar agua AA (agar 18 g, agua destilada 1000 ml); siguiendo la metodología de trabajos anteriores (Gamundi & Ranalli, 1966); posteriormente, para inducir la germinación, las ascosporas fueron tratadas con NaOH al 0,2% y 0,3% durante 30 minutos a temperatura ambiente e incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas. A partir de las ascosporas germinadas

se realizaron cultivos monospóricos en tubos con medio PF en pico de flauta (Gamundi & Ranalli, 1969) que fueron conservados en heladera a 5°C. Los cultivos monospóricos fueron inoculados en los siguientes medios de cultivo: ET (estiércol de vaca tindalizado), PF (papel de filtro y extracto de levadura, Gamundi & Ranalli, *op. cit.*), GA (glucosa y asparagina, Galvagno, 1976). La incubación se realizó a 23°C con luz continua (L), oscuridad continua (O) o con un fotoperíodo luz 12 hs. – oscuridad 12 hs. (L-O), en cámara de cultivo New Brunswick G-27 con cuatro tubos fluorescentes de 20 W cada uno.

Se trabajó con las siguientes cepas monospóricas BAFC: 2957, 2958, 2959, 2960 y 2961 para *S. glaber*; 2595, 2887, 2888, 2889, 2890, 2821, 2891, 2892, 2893 y 2894 para *S. truncatus*; 2831, 2899, 2900, 2901, 2902, 2903, 2904, 2905, 2906, 2908, 2832, 2909, 2910, 2911 y 2912 para *S. infestans*; 2823, 2926, 2927, 2928, 2929, 2930, 2931, 2932, 2933, 2934, 2935, 2936, 2937, 2938 y 2939 para *S. verrucisporus* y 2952, 2953, 2954, 2955 y 2956 para *S. versicolor*, pertenecientes a la colección de cultivos del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

RESULTADOS

Saccobolus glaber (Pers.) Lamb

Apotecios: pequeños, superficiales, densamente gregarios, sésiles, pulverizados; al principio globosos y hialinos, luego amarillentos y hemiesféricos. Superficie himenial convexa de la que emergen los ascos por sobre el nivel de las paráfisis. Al madurar, el himenio se observa citrino, por el pigmento ámbar de las paráfisis; los ascos se observan como puntos negros muy marcados y distribuidos en forma muy prolija, separados por abundantes paráfisis (Fig. 1D). Himenio con una gran cantidad de ascos que maduran al mismo tiempo. Subhimenio de células pequeñas apretadas, abundantes, hialinas. Exteriormente glabros y de consistencia carnosablanda. Diám.: 290-670 μm . **Ascosporas:** octosporadas, claviformes, adelgazándose hacia la base, emergen netamente por encima de las paráfisis (Fig. 1B); opérculo central bien marcado, pared intensamente amiloide. Con constricción subopercular marcada. Medidas: (94)107-169 \times 26,8-40,2 μm . **Paráfisis:** filiformes, simples o ramificadas, pluricelulares, hialinas, con poco pigmento amarillo en las células apicales. Le dan el color a los apotecios. Muy delgadas, de células alargadas uniformes, desaparecen rápidamente a pesar de ser abundantes. 2-2,5 μm . **Ascosporas:** reunidas en paquetes cilíndricos alargados octosporados. 44,3-52,5 \times 16,4-19,7 μm . A la madurez se las observa rodeadas por un muclago incoloro, depositado uniformemente alrededor de todo el paquete, y que se disuelve en agua. Ascosporas dispuestas según el patrón I de van Brummelen, uninucleadas, elipsoidales, fusiformes. Al principio hialinas, luego violadas y finalmente, castañas. Episporio liso a finamente punteado, frecuentemente con grietas (Fig. 1G). 18-20,15 \times 9,75-13 μm . **Excipulo:** muy poco conspicuo, no diferenciado, de células pequeñas y globosas, laxamente dispuestas, de 8-20 μm de diámetro.

Observaciones: parecido a *S. succineus*, se diferencia de este fundamentalmente en las ascosporas: en *S. succineus* existe una ornamentación más marcada del episporio, y el tamaño de las ascosporas es mayor. Nuestro material posee

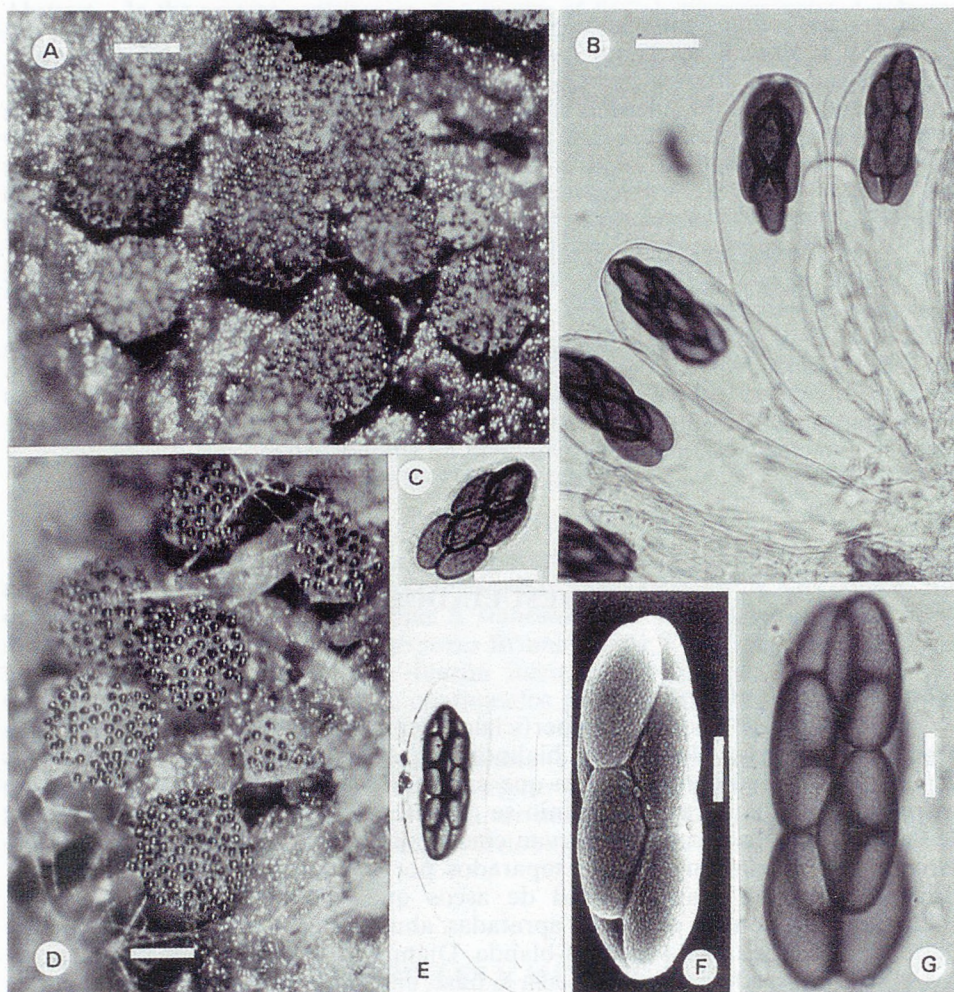


Fig. 1. Sección *Saccobolus*. *Saccobolus truncatus*: A, C, E y F; A: apotecios (bar: 220 μm); C: paquete acortado con ascosporas maduras (bar: 16 μm); E: asco conteniendo un paquete alargado con ascosporas inmaduras (bar: 22 μm); F: paquete de ascosporas (bar: 6 μm). *Saccobolus glaber*: B, D, y G; B: ascos (bar: 24 μm); D: apotecios (bar: 200 μm); G: paquete de ascosporas (bar: 8 μm).

ascos y ascosporas algo más pequeños que la descripción original, que se mantiene a través de todos los aislamientos, pero se encuentran dentro de un rango aceptable de variación.

Hábitat: estiércol de vaca.

Material estudiado: Entre Ríos, Hernández, abril de 2002, sobre estiércol de vaca, Leg. M. C. Giménez. Corrientes, Mburucuyá, Estancia Santa María, al margen del estero, Leg. Wright-Deschamps, 7 de marzo de 1972, sobre estiércol de vaca.

Estudios de cultivo : Recogidas en agar agua, las ascosporas no germinaron espontáneamente. La germinación resultó óptima tanto al 0,2% como al 0,3% de NaOH 30 minutos e incubación a 37°C durante 24-48 hs.

Se obtuvieron cultivos monospóricos. Los resultados para día de aparición de los primordios en *S. glaber* bajo condiciones de L fueron comparables: en los tres medios de cultivo utilizados, los primordios aparecen entre los 6 y los 10 días de cultivo desde la inoculación. Se observa únicamente una leve diferencia entre los medios PF (donde aparecen principalmente a los 6 u 8 días) y GA (donde aparecen preferentemente entre los 8 y 10 días). Los días de aparición de primordios en L-O en los medios PF y ET son similares entre sí y con los valores obtenidos en condiciones de L. Pero en medio GA los primordios se producen antes: entre los 3 y los 5 días de crecimiento, lo cual no coincide con los valores obtenidos en condiciones de luz.

Tanto en GA como en PF y en ambas condiciones de iluminación, los días transcurridos hasta la obtención de fructificaciones maduras varían entre 16 y 19. En estiércol, la obtención de las mismas ocurre entre los 13 y 15 días bajo L y entre los 10 y 12 días en L-O. Esto indica que si bien en GA los primordios aparecen antes que en el medio ET en L-O o en días similares a la aparición en ET, con luz continua, el ciclo es más largo en medio GA que en ET, donde los primordios pueden aparecer más tarde. Mejor resultado: ET en condiciones de L-O.

En oscuridad continua se obtuvieron fructificaciones en los tres medios de cultivo utilizados; los primordios aparecen aproximadamente a los 27 días y no llegan en ningún caso a liberar sus ascosporas; se los encuentra homogéneamente distribuidos sobre el sustrato con aspecto de abortivos, pero con enorme cantidad de ascos, mucho más pequeños y globosos que en luz (65-90 μm); se observa menor cantidad de paráfisis filiformes, levemente pigmentadas; las ascosporas se encuentran agrupadas en paquetes deformados, más o menos esféricos, dispuestas en forma irregular. Se las observa con su ornamentación normal, y si bien en ET el color es idéntico al de las ascosporas obtenidas a la luz, en PF son mucho más claras debido a que la deposición de esporio es pobre, formando una capa muy delgada de la que resultan ascosporas de color gris-castaño muy tenue, las cuales conservan su forma romboidal con ápices romos.

***Saccobolus truncatus* Vel.**

Apotecios: pequeños, densamente gregarios, sésiles, pulvinados al principio y hemiesféricos al madurar; translúcidos, hialinos cuando jóvenes, pero rápidamente tornándose amarillentos con un tinte citrino, dependiendo de la intensidad de la luz. Superficie himenial rugosa por la emergencia de los ascos por sobre el nivel de las paráfisis, aún estando inmaduros (Fig. 1A). Al madurar, los ascos aparecen como emergencias castaño-rojizas. Exteriormente glabros y de consistencia carnosa blanda. Diám.: 290-590 μm . **Ascos:** octosporados, claviformes, adelgazándose hacia la base; ápice truncado, opérculo central bien marcado (Fig. 1E); pared gruesa, intensamente amiloide (azul intenso con el reactivo de Meltzer). Con constricción subopercular apenas a bastante marcada. Medidas: 104,5-126 \times 18,7-29,5 μm . **Paráfisis:** filiformes, simples o ramificadas, pluricelulares, con abundante pigmento de color amarillo intenso en las células superiores. Células alargadas, las del ápice más globosas. Es lo que le da fundamentalmente el color a los apotecios. Ancho: 2,4-3,3 μm bajo el ápice y 3,3-4,9 μm en el ápice. **Ascosporas:** reunidas en paquetes cilíndricos alargados, acortándose pronunciadamente al madurar (Fig. 1C). (21,3) 29,5-42,6 \times 14-16,4 μm . A la madurez se las observa rodeadas por un mucílago incoloro, que se disuelve rápidamente en agua. Ascosporas dispuestas según el patrón I de van Brummelen; uninucleadas, elip-

soidales, fusiformes, con los extremos truncados (Fig. 1F). Al principio hialinas, luego violadas y finalmente castaño-rojizas. Episorio liso a finamente punteado. (11,7)14,3-16,25 × 7,15-8,45 µm. **Excípulo:** pobremente desarrollado pero compacto, con células globosas (4,9-11,5 µm de diámetro) de paredes delgadas y color ligeramente amarillento. En apotecios inmaduros las más externas constituyen una empalizada de células subglobosas, poco apretadas.

Observaciones: la especie es muy parecida a *Saccobolus succineus*, de la cual se diferencia netamente por el acortamiento de los paquetes cuando maduran los ascos. Estos son muy abundantes y prominentes por sobre el nivel de las paráfisis.

Hábitat: estiércol de vaca y de caballo.

Material estudiado: Buenos Aires, Tandil, enero de 1992 sobre estiércol de caballo, Leg. A. Wulf; Río Negro, Villa La Angostura, Bahía Craft, enero de 1997 sobre estiércol de vaca, Leg. J. R. González Castelain.

Estudios de cultivo : Las ascosporas recogidas en agar agua fueron tratadas con distintas concentraciones de NaOH e incubadas a 37°C, resultando óptima la germinación tanto al 0,2% como al 0,3% de NaOH 30 minutos. Con ambas concentraciones la germinación ocurrió a las 24-48 hs. de incubación; no hubo germinación espontánea.

Se realizaron cultivos monospóricos, los que se inocularon en cajas de petri con los tres medios de cultivo utilizados. La aparición de primordios ocurrió, en los tres medios de cultivo, entre los 5 y los 8 días de inoculación, tanto en condiciones de luz (L) como en condiciones de luz-oscuridad (L-O), pudiendo dilatarse hasta los 11 días en el caso de L-O en medio ET. La maduración de los apotecios ocurrió principalmente entre los 10 y los 14 días en los tres medios, tanto en L como en L-O. En ET la maduración de los apotecios se demoró en algunos casos en comparación con los medios GA y PF, pudiendo llegar hasta los 16-17 días tanto en L como en L-O. En medio GA se encontraron diferencias en el tiempo de maduración de los apotecios en L (10 a 12 días) y en L-O (13-19 días). Aparentemente el mejor medio sería GA en condiciones de luz continua.

En oscuridad el micelio fructificó dando primordios entre los 15 y 20 días de la inoculación; sin embargo, los mismos nunca llegan a expulsar sus ascosporas. Los apotecios obtenidos son gregarios y se observan muy oscuros por la presencia de abundantes ascos con ascosporas de color y ornamentación normal, pero que se encuentran agrupadas en los paquetes muchas veces en distintas disposiciones anormales; hay paráfisis gruesas y pigmentadas, si bien en menor cantidad que en apotecios provenientes de cultivos expuestos a la luz. Estos apotecios se observaron a partir del séptimo día de la inoculación hasta completar 40 días de crecimiento. En ningún caso expulsaron sus ascosporas, lo que concuerda con datos previos acerca de la necesidad de la luz para la maduración de las fructificaciones.

Saccobolus infestans (Batista & Pontual) Brumm.

Apotecios: pequeños y esparcidos, aunque en ocasiones pueden formar agregados densos; superficiales y sésiles. Cuando jóvenes pulvinados, tornándose hemisféricos al madurar, por el abundante crecimiento intercalar de ascos y paráfisis. Translúcidos, tornándose de color violáceo al madurar las ascosporas; ascos emergiendo ligeramente por sobre el nivel de las paráfisis. Glabros, margen no diferenciado. Consistencia carnoso-blanda. Diám.: 180-400 µm. **Ascos:** octosporados, claviformes, afinándose abruptamente hacia la base. Apice romo, con opérculo central bien marcado (Fig. 2B). Pared intensamente amiloide. Medidas: 60-100 × 11,5-17,2 µm. **Paráfisis:** filiformes, simples, pluricelulares, de células terminales

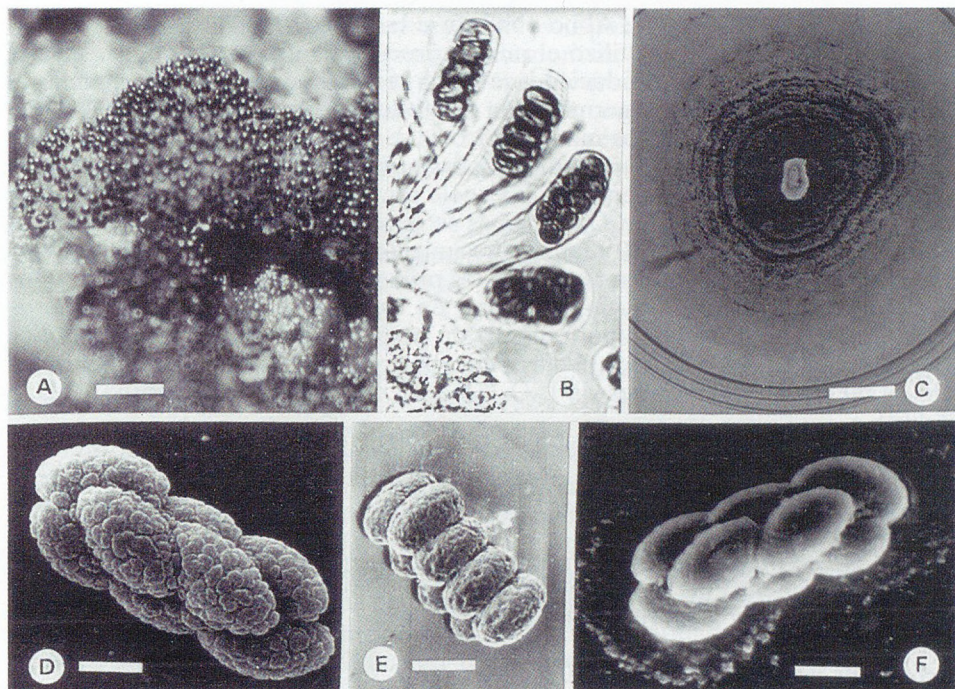


Fig. 2. Sección Eriobolus. *Saccobolus verrucisporus*: A y D; A: apotecios (bar: 180 μ m); D: paquete de ascosporas (bar: 7 μ m). *Saccobolus infestans*: B y E; B: ascos (bar: 18 μ m); E: paquete de ascosporas (bar: 7 μ m). *Saccobolus versicolor*: C y F; C: bandas concéntricas de fructificaciones al exponer al cultivo en crecimiento a un fotoperíodo 12 L-12 O (bar: 1.2 cm); F: paquete de ascosporas (bar: 9 μ m).

ensanchadas con abundante pigmento amarillo solubilizado en el citoplasma. Diámetro 1-2 μ m bajo el ápice y 3 μ m en el ápice. **Ascosporas:** reunidas en paquetes cilíndricos que ocupan al madurar la porción superior del asco. 9,1-14 \times 19,5-28 μ m. A la madurez se las observa rodeadas por un mucílago incoloro que se disuelve en agua. Ascosporas dispuestas con su eje mayor transversalmente en el asco, en dos hileras longitudinales de acuerdo al patrón IV de van Brummelen. Uninucleadas, elipsoidales, con los extremos notablemente redondeados. Al principio hialinas, luego violadas y finalmente castaño-claras, con episporio liso a finamente rugoso (Fig. 2E). 9-11 \times 4,2-6,5 μ m. **Excípulo:** muy pobremente desarrollado, compacto, con células globosas (4,1-5,8 μ m diám.), de paredes delgadas y color violáceo ligeramente amarillento. No diferenciado en médula y corteza; subhimenio escaso.

Observaciones: a pesar de poseer paráfisis pigmentadas el resto de sus caracteres morfológicos, así como también su comportamiento, lo ubican indiscutiblemente en la secc. Eriobolus, criterio que también es compartido por van Brummelen (*op. cit.*).

Hábitat: estiércol de caballo.

Material estudiado: Buenos Aires, Adrogué, marzo de 1991, en estiércol de caballo, Leg. Irma Gamundi.

Estudios de cultivo : Al no observarse tampoco aquí germinación espontánea de las ascosporas se utilizó el mismo procedimiento que para las especies anteriormente descritas, produciéndose la germinación óptima al ser tratadas al 0,2% NaOH 30 minutos. La germinación se produjo a las 24 horas de incubación.

Se realizaron cultivos monospóricos y se inocularon los medios ET, PF y GA. En condiciones de L y en medio GA los primordios de *S. infestans* aparecen a los 15 o 16 días de crecimiento; en ET suele ser bastante variable, obteniéndose entre los 11 y los 20 días. En GA además se observan primordios abortivos que aparecen alrededor de los 10 días de crecimiento como pequeñas manchas castaño-oscuro sobre el agar. En medio PF los primordios aparecen entre los 7 y los 11 días en condiciones de L, mientras que, en L-O este valor va de los 12 a los 14 días. En medio GA el tiempo transcurrido hasta la aparición de los primordios es igual en L-O que en L (15 a 16 días), mientras que en ET, la amplitud del intervalo es menor en condiciones de L-O (15 a 17 días) que en luz continua (11 a 20 días).

Los apotecios maduran entre los 20 y los 25 días en GA y ET, tanto en L como en L-O, si bien (en pocos casos) puede producirse a los 18 días. En medio PF la maduración ocurre a los 16 o 17 días en L y 18-21 días en L-O. Mejor resultado: PF en luz.

No se produjeron fructificaciones en condiciones de oscuridad continua en ningún momento de la vida del micelio; éste creció abundantemente, principalmente en estiércol, cubriendo toda la superficie.

***Saccobolus verrucisporus* Brumm.**

Apotecios: pequeños, gregarios, superficiales, sésiles; pulvinados al principio y luego hemiesféricos; completamente hialinos. Al madurar, los ascos sobresalen por encima del himenio, dándole un tinte rojizo al apotecio. Exteriormente glabros y de consistencia carnosa- blanda (Fig. 2A). Diám.: 267-600 μm . **Ascosporas:** octosporadas, claviformes, afinándose abruptamente hacia la base; opérculo central, pared gruesa, aparato apical intensamente amiloide. Medidas: 104,5-160,7 \times 23-40,2 μm . **Paráfisis:** filiformes, ramificadas, pluricelulares, no pigmentadas. Células alargadas, uniformes. Diám: 4-10,7 μm . **Ascosporas:** ocho, reunidas en paquetes cilíndricos alargados. 31,85-46 \times 14,95-21,45 μm ; a la madurez se las observa rodeadas por un mucílago incoloro, formando dos casquetes a un costado del paquete, soluble en agua, y que puede incluir gránulos de pigmento. Ascosporas dispuestas según el patrón II de van Brummelen, uninucleadas, romboidales, con los extremos redondeados. Al principio hialinas, luego violadas y finalmente castaño-rojizo intenso. A veces la deposición del exosporio dificulta distinguir los límites entre las esporas. Episporio formando verrugas de diversos tamaños y con rajaduras que se extienden a lo largo del paquete. (8,45)12,35-18,85 \times 7,8-10,4 μm (Fig. 2D). **Excípulo:** bastante desarrollado, no diferenciado en corteza y médula. Células hialinas de 19,6-46 μm de diámetro. Se observa pigmento intercelular depositado en forma de gránulos, lo que le da al excípulo un color violado-rojizo. Abundante subhimenio con hifas ascógenas en distintos estadios de maduración.

Observaciones: los paquetes de ascosporas y las ascosporas de nuestro material son más grandes que en el material de van Brummelen, pero por las restantes características, se encuadra dentro de la especie.

Hábitat: estiércol de vaca o de caballo.

Material estudiado: Buenos Aires, Gobernador Castro, junio de 1983, en estiércol de caballo, Leg. Nora Mouso; Entre Ríos, Gualaguaychú, abril de 1989, en estiércol de vaca, Leg. María Delia Bertoni; Buenos Aires, Campana, agosto de 1994 en estiércol de vaca, Leg. María Esther Ranalli.

Estudios de cultivo : Se recogieron ascosporas en cajas de petri con agar agua. Las mismas no geminaron en forma espontánea, por lo que fueron tratadas con distintas concentraciones de NaOH e incubadas a 37°C; la germinación resultó óptima tanto al 0,2% NaOH 30 minutos cuanto a 0,3% NaOH 30 minutos, germinando en ambos casos a las 24 horas de incubación.

Se obtuvieron cultivos monospóricos, a partir de los cuales se inocularon los diferentes medios de cultivo: la aparición de primordios se produce en general antes en ET (6-9 días) que en PF (12 días), siendo variable en medio GA (7-13 días) en condiciones de luz continua. Sometido a un fotoperíodo 12 L-12 O, los resultados son similares a los obtenidos en luz continua para los medios PF y ET, pero menores en GA, donde en L-O los primordios aparecen a los 5 días de crecimiento.

La maduración de los apotecios en condiciones de L es similar en los medios ET y GA (11-13 días), extendiéndose a veces en GA hasta los 15 días. En medio PF los primordios maduran recién a los 17 o 18 días de crecimiento. En condiciones de L-O este valor puede bajar a 13 días, pero en general es similar al obtenido en L. En ET el valor en L-O es el mismo que en luz continua (11 a 13 días) mientras que en GA puede ser algo menor (8 días) que el valor obtenido en L. Mejor resultado: GA en L-O.

En oscuridad continua, el crecimiento vegetativo aéreo es muy abundante, en especial en estiércol, pero sin producción de fructificaciones en ninguno de los dos casos. Se observaron cajas crecidas en oscuridad continua a distintos tiempos, hasta la autólisis del micelio, pero no aparecieron fructificaciones.

***Saccobolus versicolor* (Karst.) Karst.**

Apotecios: pequeños, solitarios a gregarios, sésiles, al principio pulvinados y más tarde hemiesféricos; las puntas de los ascos emergen por sobre el nivel de las paráfisis, dándole al apotecio el aspecto de una almohadilla. Glabros, completamente hialinos, de consistencia carnosa blanda. Al madurar, los ascos aparecen como emergencias castaño-violáceas. Diám.: 267-480 μm . **Ascosporas:** octosporadas, claviformes, de pie largo; ápice truncado, opérculo central bien marcado; pared gruesa, intensamente amiloide. (110)134,5-150,9 \times 31,16-36,1(45) μm . **Paráfisis:** hialinas, filiformes, ramificadas, pluricelulares y gruesas; uniformes. Células alargadas, la del ápice redondeada, a veces formando una pequeña vesícula apical. Diám.: 3,68-4,92 μm . **Ascosporas:** reunidas en paquetes cilíndricos alargados. 42,6-45,5 \times 16,4-18,04 μm . Ocupando a la madurez la parte superior del asco. Se las observa rodeadas por un mucílago incoloro, hidrosoluble, formando dos casquetes a un lado del paquete (Fig. 2F). Ascosporas dispuestas según el patrón II de van Brummelen; uninucleadas, fusiformes, romboidales y asimétricas, con los extremos redondeados. Al principio hialinas, luego violadas y finalmente castaño-oscuras. Episporio formando pinches cortos y que a la madurez se agrieta dándole a la ascospora un aspecto verrucoso. 15,6-18,2 \times 9,1-9,75 μm . **Excípulo:** de células pequeñas, muy apretadas, de textura angularis; con pigmento intercelular que al microscopio se observa de color castaño-verdoso, pero en masa le da al excípulo un color castaño-violado. No diferenciado en médula y corteza, subhimenio poco notable. Diám. células: 4,3-6,56 μm .

Observaciones: la ornamentación de las esporas es más fina que en *S. verrucosporus*, y las verrugas no son reales a diferencia de éste último ya que se forman a partir del cuarteado del episporio formando una red laxa de rajaduras en todo el paquete.

Hábitat: estiércol de vaca y de caballo.

Material estudiado: Buenos Aires, Ezeiza, sobre estiércol de caballo, Leg. M. E. Ranalli, julio de 1972; Entre Ríos, Hernández, sobre estiércol de vaca, Leg. M. C. Giménez, abril de 2002.

Estudios de cultivo: Dado que no germinaron espontáneamente, las ascosporas recogidas en cajas de petri con agar agua fueron tratadas al 0,2% y al 0,3% de NaOH 30 minutos obteniéndose 100% de germinación a las 24-48 horas de incubación a 37°C.

Se realizaron cultivos monospóricos. *S. versicolor* produce primordios a los 7-11 días en los tres medios de cultivo utilizados y bajo condiciones de L. Cuando en cambio se someten a un fotoperíodo 12 L-12 O los primordios aparecen a los 4 o 5 días de crecimiento. La maduración de las fructificaciones se produce en los tres medios de cultivo y a luz continua entre los 10 y los 13 días siguientes a la inoculación; en L-O los resultados son similares aunque en muchos casos se observan primordios a los 8 días tanto en GA (Fig. 2C), como en PF y en ET. Mejor resultado: PF en L-O.

En oscuridad continua sucede lo mismo que en las otras dos especies descritas pertenecientes a la sección *Eriobolus*: se produce abundante micelio aéreo pero en ningún momento el micelio produce apotecios.

La tabla 1 resume los datos de los caracteres morfológicos y de los requerimientos para la germinación de las especies estudiadas.

DISCUSIÓN

Este trabajo representa la primera cita para la República Argentina de cinco especies del género *Saccobolus*, así como también su primer estudio cultural. Tales especies nunca antes habían sido cultivadas y estudiado su comportamiento (producción de fructificaciones con distintas condiciones de luz) en medio natural (ET), medio semisintético (PF) ni en medio sintético (GA); por esto, la importancia de los resultados reside en definir las condiciones nutricionales para el aislamiento y el mantenimiento de las cepas en cultivo, el medio y las condiciones de iluminación más propicias para la producción de ascocarpos, y los requerimientos para la inducción de la germinación de las ascosporas.

La observación de los resultados nos permiten arribar a varias conclusiones, a saber:

a) Los tres medios de cultivo utilizados son adecuados para la fructificación, siendo ET el mejor.

b) Las ascosporas tienen dormancia constitutiva (probablemente provocada por la pared de la ascospora que dificulta la difusión del agua hacia el interior). Los tratamientos inductores con NaOH e incubación a 37°C permiten obtener excelente germinación en todos los casos.

c) Si bien la luz es un factor absolutamente relacionado con la inducción de fructificaciones y su maduración normal (Forchiassin, 1989), hay una diferencia de comportamiento de las especies de la sección *Saccobolus* y las de la sección *Eriobolus*. Las especies estudiadas pertenecientes a la sección *Eriobolus*, sólo producen crecimiento vegetativo en oscuridad completa, no diferenciando estructuras sexuales en ningún momento, mientras que, en las especies de la sección *Saccobolus*, la ausencia de luz no impide la formación de fructificaciones y ascosporas, que no obstante, no se comportan normalmente y no son expulsadas.

Tabla 1. Tabla comparativa de los caracteres morfológicos (en μm), y de los requerimientos para la germinación de las especies estudiadas. Cl: claviforme; Ci: cilíndrico; E: elipsoidal; F: fusiforme; R: romboidales; A: asimétricas; Re: redondeadas.

CARÁCTER		<i>S. glaber</i>	<i>S. truncatus</i>	<i>S. infestans</i>	<i>S. verrucisporus</i>	<i>S. versicolor</i>
apotecio	color	amarillento-citino	amarillento-citino	violáceo	rojizo	castaño-violáceo
	diámetro	290-670	290-590	180-400	267-600	267-480
	forma	hemiesférico	hemiesférico	hemiesférico	hemiesférico	hemiesférico
	distribución	densamente gregarios	densamente gregarios	gregarios	solitarios a gregarios	solitarios a gregarios
asco	largo	107-169	104.5-126	60-100	104.5-160.7	134.5-150.9
	ancho	26.8-40.2	18.7-29.5	11.5-17.2	22.96-40.2	31.16-36.1
	forma	CI	CI, ápice truncado	CI, ápice romo	CI	CI
paquete	largo	44.3-52.5	29.5-42.6	19.5-28	31.85-46	42.6-45.5
	ancho	16.4-19.7	14-16.4	9.1-14	14.95-21.45	16.4-18
	patrón	I	I	IV	II	II
	forma	Ci, alargado	Ci, acortado al madurar.	Ci, alargado	Ci, alargado	Ci, alargado
ascospora	color	castaño	castaño-rojizo	castaño claro	castaño-rojizo	castaño-oscuro
	largo	18-20.15	14.3-16.25	9-11	12.35-18.85	15.6-18.2
	ancho	9.75-13	7.15-8.45	4.2-6.5	7.8-10.4	9.1-9.75
	forma	E, F	E, F truncades	E, Re	R, Re	R, A, Re
	ornament.	lisas a punteadas	lisas a punteadas	lisas a rugosas	verrugas, grietas	espinas pequeñas
mucus	extensión	completa	completa	completa	parcial	parcial
paráfisis	color	amarillento	amarillo	amarillo	hialinas	hialinas
	ramific.	simples-ramificadas	simples-ramificadas	simples	ramificadas	ramificadas
excíspulo	color	amarillento	amarillento	violáceo	violáceo-rojizo	castaño-violado
	células	8.1-20	4.9-11.5	4.1-5.8	19.6-46	4.3-6.56
G. de ascosporas	% NaOH	0.2-0.3	0.2-0.3	0.2	0.2-0.3	0.2-0.3
	tiempo	30 minutos	30 minutos	30 minutos	30 minutos	30 minutos
	incub. 37°C	24-48 hs.	24-48 hs.	24 hs.	24 hs.	24-48 hs.

Un comportamiento parecido fue observado en *Ascobolus albidus* (Ranalli & Cinto, 1972) donde las fructificaciones obtenidas en oscuridad permanecen cerradas, no se forman paráfisis, y las ascosporas no depositan exosporio, aunque germinan normalmente, comprobándose experimentalmente que los caracteres tales como tipo de fructificación: apotecio vs cleistotecio, espora lisa vs. ornamentada, presencia de paráfisis vs. ausencia, están controlados por condiciones medioambientales. Es decir que las condiciones de iluminación pueden modificar notablemente caracteres morfológicos usados tradicionalmente en taxonomía tradicional. Frecuentemente dichos caracteres usados para determinar la posición taxonómica de determinados taxa, arrojan datos que no se corresponden con estudios que utilizan otro tipo de caracteres (por ejemplo marcadores moleculares). Esto podría deberse, en algunos casos, al hecho de que los caracteres morfológicos pueden variar notablemente con las condiciones medioambientales. Stchigel *et al.*, 2001, comparando las secuencias ITS de especies pertenecientes a distintos órdenes de Ascomycetes no encuentra relación estrecha entre miembros de Onygerales y de Pezizales (*Saccobolus depauperatus*, por ejemplo) que han sido relacionadas estrechamente entre sí en base a estructuras morfológicas similares. Esto coincide con la posición adoptada por Guarro *et al.*, 1992, quien no está de acuerdo que sobre la base de estructura simple del ascoma y del asco puedan establecerse relaciones entre, por ejemplo, Pezizales y Onygenales. No sería la primera vez que se confunde un apotecio con un cleistotecio y se lo describe como perteneciente a un género distinto (von Arx & Müller, 1955).

Agradecimientos. Al CONICET y a la Universidad de Buenos Aires por la financiación de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- ARX J. A. VON & MÜLLER E., 1955 — Über die Gattungen *Selinia* Karst. und *Seliniella* Nov. Gen. und ihre phylogenetische Bedeutung. *Acta Botanica Neerlandica* 4(1): 116-125.
- BRUMMELEN J. VAN, 1967 — A world monograph of the genera *Ascobolus* and *Saccobolus* (Ascomycetes, Pezizales). *Persoonia, Suppl.* 1: 1-260.
- FORCHIASSIN F., 1989 — Estudios fotobiológicos en *Saccobolus platensis*. *Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.*
- GALVAGNO M. A., 1976 — Ensayos de nutrición en *Ascobolus crenulatus* Karst (Fungi-Ascomycetes). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 17: 95-118.
- GAMUNDI I. J. & RANALLI M. E., 1966 — Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina II. *Nova Hedwigia* 10(3/4): 339-366.
- GAMUNDI I. J. & RANALLI M. E., 1969 — Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina III. *Nova Hedwigia* 17: 383-407.
- GUARRO J., GENÉ J. & VROEY C. DE, 1992 — *Amaurascopsis* a new genus of Eurotiales. *Mycotaxon* 45: 171-178.
- RANALLI M. E. & CINTO R. O., 1972 — Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina IV. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 14(4): 285-304.
- STCHIGEL A. M., CANO J., MAC CORMACK W. & GUARRO J., 2001 — *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. *Mycological Research* 105: 377-382.