

**ESTUDIO SISTEMÁTICO Y BIOLÓGICO DE LAS ASCOBOLÁCEAS DE
ARGENTINA XIX. DOS NUEVAS ESPECIES DE ASCOBOLUS
(ASCOMYCOTA)**

DIANA A. DOKMETZIAN, MARÍA C. GIMENEZ, ISABEL E. CINTO & MARÍA E. RANALLI ¹

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

ABSTRACT: Dokmetzian, D. A., Giménez, M. C., Cinto, I. E. & Ranalli, M. E. 2004. Systematic and biological study of Ascobolaceae of Argentina XIX. Two new species of *Ascobolus* (Ascomycota). *Hickenia* 3(49): 205-211.

In the present contribution, two new species of *Ascobolus* are described: *A. campanensis* sp. nov. and *A. bonaerensis* sp. nov. Both species are heterothallic and belong to section *Dasyobolus*. Ontogenetic studies showed a "cleistohymenial" ascocarp development which generally opens at late "telohymenial" phase. In darkness neither fructifications are formed nor sporulation occurs in *A. bonaerensis*; however in *A. campanensis* ascomata are formed with ascospores without perisporium, few paraphyses and hymenial mucilage that difficult ascocarp opening and ascospore discharge.

Key words: Diversity, Fungi, *Ascobolus*, Development.

RESUMEN: Dokmetzian, D. A., Giménez, M. C., Cinto, I. E. & Ranalli, M. E. 2004. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina XIX. Dos nuevas especies de *Ascobolus* (Ascomycota). *Hickenia* 3(49): 205-211.

Se describen dos nuevas especies de *Ascobolus*: *A. campanensis* sp. nov. y *A. bonaerensis* sp. nov. Ambas son heterotálicas, cleistohiméniales abriéndose en la fase telohiménial y pertenecen a la sección *Dasyobolus*. La luz es determinante para la producción de fructificaciones en *A. bonaerensis* que no esporula en oscuridad completa. En *A. campanensis*, se obtienen ascomas en oscuridad pero con ascosporas sin perisporio, con pocas paráfisis y escaso mucílago himénial, lo que dificulta la apertura de la fructificación y la liberación de las ascosporas.

Palabras clave: Diversidad, Hongos, *Ascobolus*, Desarrollo.

INTRODUCCIÓN

Continuando con el estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina, en este trabajo se describen dos nuevas especies de *Ascobolus* Pers. per Hook.: *Ascobolus bonaerensis* y *Ascobolus campanensis*. Ambas

especies son heterotálicas y por sus características micro y macromorfológicas, así como por su tipo de desarrollo, se encuentran ubicadas dentro de la sección *Dasyobolus* (Sacc.) Brumm. (Brummelen, 1967).

¹ Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de los apotecios obtenidos en las cámaras húmedas con el estiércol original, recogimos ascosporas, y siguiendo la metodología que empleamos en trabajos anteriores (Gamundí & Ranalli, 1966) obtuvimos cultivos monospóricos axénicos en medio nutritivo estándar (PF) que conservamos a 5 °C. Para los estudios de sexualidad, crecimiento y desarrollo utilizamos medios sólidos semisintético GA (glucosa-asparagina) (Galvagno, 1976) y naturales ET (estiércol tindalizado) en cámara incubadora a temperatura constante de 23 °C y luz continua (Ranalli & Gamundí, 1975).

Utilizando ascosporas de cultivos secos de *A. amoenus* conservados en nuestro laboratorio, obtuvimos aislamientos monospóricos que empleamos en ensayos de inter cruzamientos. Cepas monospóricas compatibles de *A. immersus* obtenidas a partir de fructificaciones en estiércol de vaca coleccionado en la granja de la Ciudad Universitaria de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y recientemente aisladas fueron utilizadas con el mismo propósito.

Métodos isoenzimáticos: los micelios crecidos en medio líquido GA (Galvagno, 1976) fueron cosechados el día de máximo crecimiento (Dokmetzian & Ranalli, 2003), molidos con nitrógeno líquido y posteriormente con buffer de extracción (Dokmetzian, 1999). Se empleó la técnica de electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida (Beckman & Johnson, 1964) al 7 % a 4 °C con una diferencia de potencial de 120 volts. Los sistemas isoenzimáticos analizados fueron SOD (superóxido dismutasa) y EST (esterasa) para los cuales se utilizó Tris-citrato pH 8,5 como buffer de gel y borato de litio pH 8,1 como buffer de corrida (Scandalios, 1969; Saidman, 1985). La tinción de los geles se realizó según Wendel & Weeden (1989) y se determinó la movilidad relativa (Rf) de cada banda con respecto al frente de azul de bromofenol.

RESULTADOS

Ascobolus campanensis Dokmetzian, Giménez, Cinto & Ranalli, sp. nov. TIPO: Argentina. Buenos Aires: Partido Campana, Otamendi,

leg. *María Esther Ranalli*, 10-06-99, in fimo vaccino (holotipo, BAFC 51250 conservatus est.).

Apothecia sessilia, 260–700 mm diam. *Receptaculum initio subglobulare vel ovoideum deinde oblongo-ellipsoideum vel cylindricum, saepe basi angustatum, albidum. Excipulum textura intricata.*

Asci clavati, 180–270 x 20–27 mm, 8-spори, *pariete iodo saturate caeruleo.*

Paraphyses 2–2,5 mm *crassae, simplices, pluriseptatae in matrice mucilaginosae, Ascosporae* 18–21 x 8–10 mm, *ellipsoideae primo hyalinae, deinde violaceae, denique castanea.*

Apotecios: pequeños 260–700 mm diám. por 300–500 mm de altura, superficiales, solitarios a gregarios, translúcidos de color blanco con tintes rojizos. Cleistohimiales, abriéndose en la fase telohimial tardía, piriformes a subglobosos cuando jóvenes, con una porción basal lisa que corresponde al excípulo y una porción superior que emerge de la anterior, constituida por los ápices de las paráfisis y los ascos maduros, sumergidos en abundante mucílago himenial, translúcido e incoloro.

Ascospores: 180–270 x 20–27 mm, cilíndricos a subcilíndricos, curvados generalmente hacia la luz cuando ésta incide lateralmente. Opérculo central persistente en el asco que ha expulsado sus ascosporas. Octosporados, con ascosporas uniseriadas cuando jóvenes, biseriadas al madurar, ubicándose en la porción apical del asco maduro. Reacción amiloide positiva.

Ascospores: 18–21 x 8–10 mm, biseriadas, elipsoidales alargadas, al comienzo hialinas, luego violado intenso y finalmente castañas. Perisporio con espinas muy finas. Cada espóra rodeada por mucílago dispuesto lateralmente.

Paráfisis: 2–2,5 mm de diámetro, simples, pluricelulares, con células alargadas, plurinucleadas, hialinas, embebidas en la zona apical en abundante mucílago transparente.

Excípulo: de textura “intricata”, no diferenciado en corteza y médula, con células de paredes engrosadas, con pigmento intercelular amorfo, de color ferrugíneo. Hacia afuera suelen encontrarse grupos de células globosas de contenido pobre y pared gruesa constituyendo furfuraciones.

Observaciones: esta especie parece estar relacionada con *A. hawaiiensis* Brumm. de la cual se distingue por el mayor tamaño de las fructificaciones, los ascos más pequeños y las ascosporas con una relación largo-ancho mayor. También se encuentra aparentemente relacionado con *A. elegans* J. Klein, del cual se distingue por el color de las fructificaciones, el tamaño de las ascosporas y el mucílago himenial.

Ascobolus bonaerensis Dokmetzian, Giménez, Cinto & Ranalli, sp. nov. TIPO: Argentina. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ciudad Universitaria, leg. *M. E. Ranalli*, in fimo vaccino, 12-08-99 (holotipo, BAF 51249 conservatus est.).

Apothecia sessilia, superficialia, 360–600 mm diam. Receptaculum globulare, initio clausum denique prope apicem irregulariter fissum, sordide albidum, laeve vel pilis hyalinis villosum. Excipulum textura globulosa. Asci 8-spori, clavati, pariete iodo coerulescentibus 400–600 x 52–60 mm. Ascosporae biseriatae, ellipsoideae, 29–36 x 16,5–19 mm primo hyalinae, deinde violaceae, denique castanea, perisporio fissurato. Paraphyses pluriseptatae in matrice mucilaginoso incolora immersus 2,5–3 mm diam.

Apotecios: pequeños 360–600 mm diám. por 195–550 mm de altura, solitarios pero más comúnmente gregarios. Blancos, superficiales, lisos o, más frecuentemente, revestidos con hifas hialinas, especialmente cerca de la base, cleistocárpicos, abriéndose en la fase telohimnial tardía, empujando el techo por la presión de las paráfisis y los ascos maduros, que en número variable emergen netamente por sobre el nivel de las paráfisis. Mucílago himenial abundante y translúcido.

Ascos: 400–600 x 52–60 mm, claviformes a cilíndricos cuando completan su desarrollo, octosporados, ascosporas inmaduras uniseriadas, finalmente biseriadas, ocupando el tercio superior del asco. Opérculo central persistente en el asco vacío. Reacción amiloide positiva cuando jóvenes, con reacción leve en ascos maduros.

Ascosporas: 29–36 x 16,5–19 mm, al principio hialinas, luego violado intenso y finalmente castaño violáceo. Perisporio finamente asperulado con 1 ó 2 grietas longitudinales. Abundante mucílago que rodea asimétricamente la ascospora y se disuelve fácilmente en agua; al secarse las ascosporas expulsadas, sobre algunas de ellas se deposita formando cristales que tienen fósforo y potasio en su composición.

Paráfisis: filiformes, pluricelulares y multinucleadas, simples o ramificadas en la base, sumergidas en abundante mucílago incoloro.

Excípulo: de textura “globulosa” a “angularis”.

Observaciones: si bien existen diferencias morfológicas, esta especie está relacionada con *A. immersus* Pers. per Pers. del cual se diferencia, fundamentalmente, por el tamaño de las ascosporas, el color de las fructificaciones y el mucílago himenial. No obstante estas diferencias, aislamos y seleccionamos pares de cepas compatibles de *A. immersus* del mismo estiércol y realizamos los cruzamientos interespecíficos que no produjeron fructificaciones en ningún caso. También supusimos que podría estar cercanamente relacionada con *A. amoenus* Oud., del cual se diferencia fundamentalmente, por el color de las fructificaciones y la ornamentación de las ascosporas. Pero, dado que en *A. amoenus* puede genéticamente variar el tipo de ornamentación de las ascosporas, sin que pierdan la capacidad de cruzarse sexualmente (Dokmetzian et al., 1995), decidimos reaislar *A. amoenus* a partir de ascosporas de cultivos mantenidos en nuestro laboratorio. Una vez obtenidos los aislamientos compatibles, los

intercruzamos en todas las combinaciones posibles y no obtuvimos fructificaciones en ningún caso.

Finalmente, y dado que el análisis de los patrones isoenzimáticos puede ser una herramienta que nos ayude a comparar y relacionar especies del género *Ascobolus* (Dokmetzian, 1999) utilizamos la comparación de los patrones para superóxido dismutasa y esterasa entre *A. amoenus* y *A. bonaerensis*. Las dos especies presentan patrones de bandas diferentes para los dos sistemas utilizados lo que confirmó que ambos son entidades taxonómicas distintas (Fig. 1).

Estudios de cultivo

Tanto las ascosporas de *A. campanensis* cuanto las de *A. bonaerensis* recogidas en agar agua no germinaron espontáneamente. Se ensayaron tratamientos inductores con soluciones de HONa de concentración variada. Los mayores porcentajes de germinación (100 %) se obtuvieron con ascosporas de *A. bonaerensis* sin período de reposo, tratadas al 0,3 % de HONa durante 30 minutos e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Las ascosporas de *A. campanensis* germinaron con dificultad. Sólo se obtuvo un 20 % de germinación con concentraciones de HONa al 0,2 % e incubación a 37 °C durante 24 horas. Esporas recogidas sobre medio GA y tratadas del mismo modo que las recogidas en agar agua germinaron mejor, con un 30 % de germinación. No se descarta la posibilidad de que haya inhibición nutricional de la germinación.

A partir de las ascosporas germinadas, se realizaron cultivos monospóricos de ambas especies, con los que se inocularon cajas de Petri con medio nutritivo estándar (Ranalli & Gamundí, 1975). En ningún caso obtuvimos fructificaciones, de modo que cruzamos en forma sistemática varios aislamientos monospóricos, obteniendo cruzamientos compatibles que produjeron en ambos casos abundantes primordios que maduraron y expulsaron sus ascosporas. Ambas especies son heterotálicas y no producen oídios.

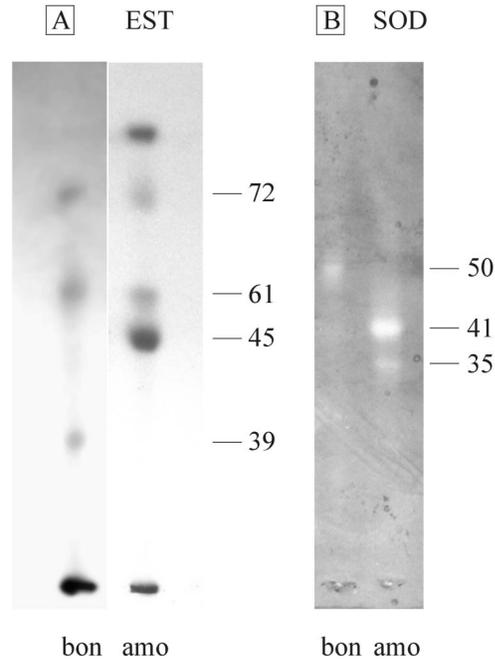


Fig. 1.- Patrones isoenzimáticos de *A. bonaerensis* (bon) y *A. amoenus* (amo). A: superóxido dismutasa. B: esterasa. Los números indican los Rf.

El crecimiento miceliano es rápido, alcanzando las colonias el borde de la caja entre el 4to. y 5to. día de siembra. Las hifas son de dos tipos, hifas gruesas, superficiales, de paredes gruesas con citoplasma denso y multinucleadas, 4,5-5 mm diám.; hifas finas muy ramificadas de recorrido tortuoso, 2-2,5 mm diám.

El desarrollo del ascoma, en ambas especies, comienza con la diferenciación del ascogonio circinoide en el que no distinguimos la presencia regular de un tricogino funcional. El desarrollo posterior conduce a la formación de un ascoma cleistohimial. La apertura se produce en la fase telohimial tardía, como consecuencia de la presión que ejercen sobre el techo, las paráfisis sumergidas en abundante mucílago y los ascos maduros que se alargan abruptamente. En *A. campanensis*, los apotecios maduros tienen entre 10 y 20 ascos (Fig. 2 A, B y C) que emergen simultáneamente. En *A. bonaerensis*, en cambio, 2 ó 3 ascos maduros a la vez, apuntando en direcciones variadas (Fig. 2 D y E).

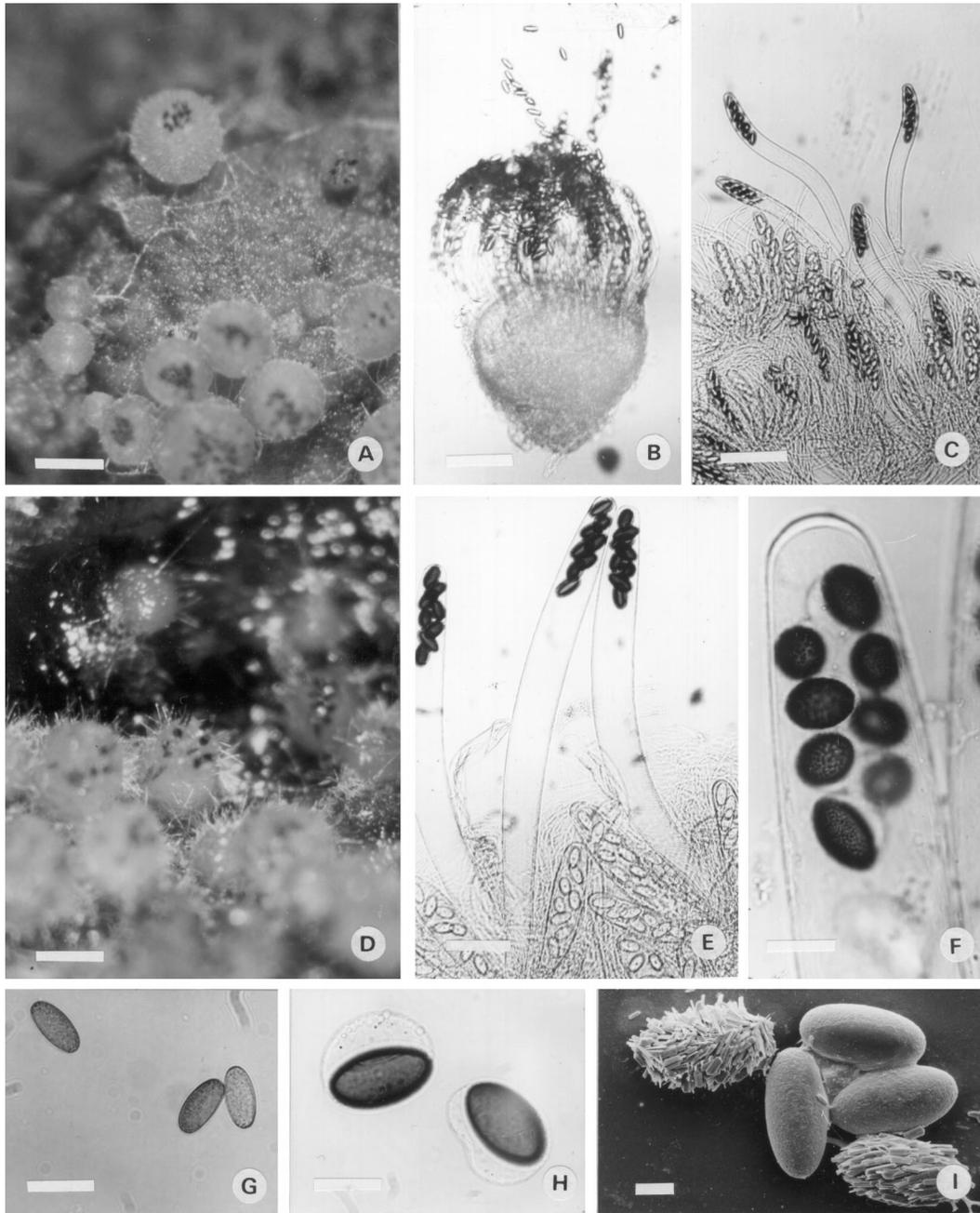


Fig. 2.- *A. campanensis* A-C, G. A: fructificaciones sobre estiércol tindalizado (bar: 500 mm); B: apotecios con el conjunto de ascos emergiendo simultáneamente (bar: 200 mm); C: ascos (bar: 90 mm); G: ascosporas (bar: 20 mm). *A. bonaerensis* D-F, H-I. D: fructificaciones sobre estiércol tindalizado (bar: 500 mm); E: conjunto de ascos (bar: 100 mm); F: ascos con ascosporas (bar: 24 mm); H: ascosporas (bar: 22 mm); I: ascosporas con mucílago cristalizado (bar: 13 mm).

Desarrollo en luz y oscuridad

En *Ascobolus bonaerensis* con luz continua, los cultivos maduran y expulsan las ascosporas entre el 7mo. y 8vo. día de la inoculación pero en oscuridad hay abundante crecimiento miceliano sin fructificaciones en todos los medios ensayados. En *A. campanensis* con luz continua, las fructificaciones se producen y maduran normalmente en todos los medios ensayados, aunque son más abundantes y de mayor tamaño en ET; completan su ciclo en siete días y expulsan las ascosporas en forma continua durante 2 ó 3 días, al cabo de los cuales, los apotecios comienzan su descomposición. En oscuridad se producen abundantes fructificaciones en todos los medios ensayados. Sin embargo, las ascosporas son hialinas, sin perisporio y quedan retenidas dentro de los ascos, los que, salvo en casos aislados, no emergen rompiendo el techo, pocas paráfisis, los apotecios son completamente hialinos, sin pigmento intercelular en el excípulo.

Tanto *A. campanensis* cuanto *A. bonaerensis* son coprófilos, las ascosporas son liberadas con violencia por los ascos, poseen mucílago lateral, que se disuelve rápidamente en agua, y que puede proteger a las ascosporas contra la desecación y contribuir a su adhesión a los pastos circundantes (Fig. 2 F, G y H). En *A. bonaerensis*, muchas esporas aparecen cubiertas por cristales (Fig. 2 I), en cuya composición intervienen fósforo y potasio y que parecen ser el resultado de la cristalización del mucílago lateral. Todas las esporas poseen mucílago, pero no en todas está cristalizado lo que podría deberse a variaciones en la composición del mismo.

DISCUSIÓN

Ascobolus campanensis y *A. bonaerensis* son especies coprófilas, heterotálicas, que por su tipo de desarrollo y características micromorfológicas están ubicadas en la sección *Dasyobolus*, con la peculiaridad de poseer ascomas translúcidos, blanquecinos y abundante mucílago incoloro, que contribuye, junto

con las paráfisis y ascos maduros, a la ruptura del techo, y en consecuencia a la liberación de ascosporas. La deposición de pigmento intercelular en el excípulo le confiere a la fructificación madura, un tinte rojizo.

La morfología y la citología de las hifas vegetativas coincide en ambas especies con lo observado anteriormente en otros *Ascobolus* estudiados (Ranalli & Gamundí, 1975; Ranalli & Forchiassin, 1979; Dokmetzian & Ranalli, 1995). Se observaron hifas gruesas con células multinucleadas que están relacionadas fundamentalmente con la formación de ascogonios e hifas envolventes, e hifas finas, muy anastomosadas, que ligan y entrelazan entre sí a las hifas gruesas.

La luz es un factor determinante para la reproducción sexual en *A. bonaerensis*, no así en *A. campanensis*, donde en oscuridad completa se producen fructificaciones, aunque las ascosporas no depositan perisporio y generalmente los cleistotecios no se abren. Este comportamiento coincide con el de *A. albidus* (Ranalli & Cinto, 1972) y *A. stictoideus* (Dokmetzian & Ranalli, 2003).

Los cristales que se depositan sobre la superficie de algunas ascosporas en *A. bonaerensis*, posiblemente contribuyan a la protección de las esporas adheridas a los pastos, que deben resistir el pasaje a través del tracto intestinal del herbívoro y germinar en el estiércol.

AGRADECIMIENTOS

Al CONICET (PIP 4560/96) y a la Universidad de Buenos Aires (UBACYT, X018) por la financiación de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Beckman, L. & Johnson, F. M. 1964. Esterase variation in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas* 51: 51-212.
- Brummelen, J. van. 1967. A world monograph of the genera *Ascobolus* and *Saccobolus* (Ascomycetes, Pezizales). *Persoonia* (Suppl.) 1: 1-260.
- Dokmetzian, D. A. 1999. *Estudios quimiotáxicos en especies del género Ascobolus*. Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad

- de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 132 pp.
- & Ranalli, M. E. 1995. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina XV. Dos nuevas especies de *Ascobolus* (Ascomycetes, Pezizales). *Physis, Secc. C*, 50: 1-10.
- & — 2003. Crecimiento de especies del género *Ascobolus* II (Pezizales Ascomycotina). *Revista Iber. Micol.* (en prensa)
- , De Simone, S. & Ranalli, M. E. 1995. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina XVI. Un mutante natural de *Ascobolus amoenus*. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 30: 231-239.
- Galvagno, M. A. 1976. Ensayos de nutrición en *Ascobolus crenulatus* P. Karst. (Fungi: Ascomycetes). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 17: 95-118.
- Gamundí, I. J. & Ranalli, M. E. 1966. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina II. *Nova Hedwigia* 10: 339-366.
- Ranalli, M. E. & Cinto, R. O. 1972. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. IV. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 14: 285-304.
- & Forchiassin, F. 1979. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. VII. *Ascobolus ferrugineus* sp. nov. Estudios de cultivo y citología. *Physis, Secc. C*, 38: 43-55.
- & Gamundí, I. J. 1975. *Ascobolus biguttulatus* sp. nov. (Ascomycetes, Pezizales). Estudios de cultivo y citología. *Physis, Secc. C*, 34: 1-15.
- Saidman, B. O. 1985. *Estudio de la variación alozímica en el género Prosopis*. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 231 pp.
- Scandalios, J. G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants, a review. *Biochem. Genet.* 3:37-79.
- Wendel, J. F. & Weeden, N. F. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes in D. E. Soltis & P. S. Soltis (eds.), *Isozyme in Plant biology* 1: 5-45.

Original recibido el 23 de junio e 2003, aceptado el 24 noviembre de 2003.

Hickenia agradece a los siguientes revisores de los artículos publicados en la presente entrega del volumen 3:

Dra. Angélica Arambarri (Universidad Nacional de La Plata, Argentina)
Prof. Nélica M. Bacigalupo (Instituto de Botánica Darwinion, Argentina)
Dr. Marcus A. Nadruz Coelho (Jardín Botánico de Río de Janeiro, Brasil)
Prof. Maria E. Múlgura de Romero (Instituto de Botánica Darwinion, Argentina)
Dr. José Pensiero (Universidad Nacional del Litoral, Argentina)
Lic. Sara G. Tressens (Universidad Nacional del Nordeste, Argentina)
Dra. Carmen Ulloa (Missouri Botanical Garden, Estados Unidos de Norte América)
Dr. Jorge Wright (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Dr. Fernando O. Zuloaga (Instituto de Botánica Darwinion, Argentina)