

Crecimiento de especies del género *Ascobolus*. II. (Pezizales - Ascomycota)

Diana Ana Dokmetzian y María Esther Ranalli

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Resumen Se estudió la cinética del crecimiento en cultivo en medio líquido de seis especies del género *Ascobolus*. Los resultados obtenidos muestran variación entre las especies, que difieren entre sí en la extensión de las fases de la curva. Considerando la duración de la fase de crecimiento exponencial, se reconocen cuatro grupos. La fase estacionaria, de variada longitud, frecuentemente es muy corta, entrando rápidamente en la fase de muerte, acompañada por la autólisis del micelio.

Palabras clave Pezizales, *Ascobolus*, Crecimiento, Hongos

Growth in species of the genus *Ascobolus*. II. (Pezizales- Ascomycota)

Summary The kinetics of growth of six heterothallic species of the genus *Ascobolus* was studied in liquid culture media. The results obtained showed variation among the species in the duration of the different phases of the growth cycle. Four groups can be recognized considering the extension of the exponential phase of growth. The stationary phase, which differs in its length, is frequently very short, entering quickly in the phase of death, accompanied by the autolysis of the mycelium.

Key words Pezizales, *Ascobolus*, Growth, Fungi

Desde hace aproximadamente cuarenta años, a partir de las investigaciones de Chang et al. [1] en *Neurospora* spp y de Clare [4] en *Phytophthora* spp, ha habido un notable interés en aplicar análisis moleculares en la identificación y clasificación de los hongos.

Los sistemas de clasificación biológicos procuran colocar a los organismos en una disposición ordenada y conveniente, se basa en general, en relaciones genéticas, constituyendo una clasificación natural. La misma está firmemente arraigada, y tiene sin duda, valores sobresalientes. Sin embargo, tiene limitaciones y éstas pueden y deben ser reconocidas.

La caracterización molecular de los organismos ha avanzado rápidamente. Esto es de particular valor en grupos críticos, donde existe dificultad para la utilización de los métodos clásicos de la taxonomía tradicional. Sin embargo, los componentes celulares utilizados como parámetros son influenciados, en muchos casos, por la compo-

sición y el pH de los medios de cultivo, la temperatura de incubación, así como por el tipo y edad fisiológica del cultivo. Por tal motivo, debe procurarse estandarizar las condiciones culturales para realizar comparaciones entre los individuos.

Con tal fin, en este trabajo, se encaró el estudio de la cinética del crecimiento de seis especies del género *Ascobolus*, algunas de ellas cercanamente relacionadas entre sí y difíciles de separar por los métodos tradicionales.

Ascobolus gamundii Dokmetzian & Ranalli, *Ascobolus michaudii* Boud., *Ascobolus bonaerensis* Dokmetzian, Giménez M, Cinto & Ranalli, *Ascobolus campanensis* Dokmetzian, Giménez M, Cinto & Ranalli son especies heterotálicas y *Ascobolus crenulatus* P. Karst. y *Ascobolus stictoideus* Speg. son homotálicas. Todas pertenecen a la familia Ascobolaceae (Ascomycota - Pezizales), cuyo habitat natural, aunque no excluyente, es el estiércol de animales herbívoros.

Se han realizado varios estudios nutricionales en especies del género *Ascobolus*: *Ascobolus immersus* [13], *Ascobolus crenulatus* [6], *A. furfuraceus* [8]. En *Ascobolus biguttulatus* se estudió el crecimiento vegetativo en distintas concentraciones de glucosa, asparagina y vitaminas [2,3], sugiriéndose un medio de cultivo sintético adecuado para su crecimiento y sin variación de pH a lo largo de la curva [6].

En este trabajo se realizaron y compararon las curvas de crecimiento de las especies homotálicas y de las dos cepas sexualmente compatibles de cada una de las especies heterotálicas estudiadas, utilizando peso seco como medida de estimación del crecimiento, con estos datos se realizaron las curvas de crecimiento y se delimitaron las

Dirección para correspondencia:

Dra. Diana Ana Dokmetzian
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires
Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina
Correo electrónico: dokmetzi@bg.fcen.uba.ar

Aceptado para publicación el 30 de agosto de 2004

distintas fases de las mismas. Asimismo, se compararon los días en que el crecimiento vegetativo del micelio llega a su punto máximo y la cantidad de biomasa obtenida en dicho punto.

Materiales y métodos

Organismos utilizados. Se utilizaron las siguientes cepas: *A. gamundii* BAFC 748 y 765, *A. michaudii* BAFC 807 y 815, *A. bonaerensis* BAFC 1062 y 1063, *A. campanensis* BAFC 1067 y 1068, *A. crenulatus* BAFC 827 y *A. stictoideus* BAFC 860. Todas las cepas pertenecen a la colección de cultivos del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA.

Se realizaron cultivos monospóricos para cada especie, siguiendo la metodología empleada en trabajos anteriores [7], los que se conservaron a 5 °C en medio PF en tubo en pico de flauta. En las especies heterotálicas se seleccionaron dos pares compatibles y para determinar la polaridad se cruzaron entre sí cada uno de los cultivos monospóricos de un par compatible con cada uno de los cultivos monospóricos de otro par compatible, en cajas de Petri con medio PF. La tabla 1 muestra los pares compatibles, la polaridad, localidad, sustrato y fecha de recolección.

Medios de cultivo

PF: extracto de levadura 3 g, agar: 18 g, agua destilada 1000 ml, papel de filtro.

AA: agar 18 g, agua destilada 1000 ml.

GA (glucosa-asparagina): SO₄Mg.7H₂O: 0,5 g, PO₄H₂K: 0,5 g, PO₄H₂K₂: 0,6 g, Cl₂Mn.4H₂O: 0,09 mg, BO₃H₂: 0,07 mg, MoO₄Na₂: 0,02 mg, Cl₂Fe: 1 mg, glucosa: 15 g, L(-) asparagina: 4 g, biotina: 5 µg, tiamina: 0,1 mg, agua bidestilada hasta completar 1000 ml. Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico. Las soluciones stock de vitaminas fueron esterilizadas por filtración.

Los cultivos en medios sólidos se realizaron en cajas de Petri con 20 ml de medio y un disco de papel de filtro estéril y en tubo de ensayo con medio en pico de flauta y una tira de papel de filtro de 1 x 5 cm y el líquido en frascos erlenmeyers de 125 ml con 50 ml de medio, se taparon con tapones de algodón forrados con gasa quirúrgica y se cubrieron con papel de aluminio.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120 °C, durante 20 minutos. Los frascos erlenmeyers y las cajas se inocularon con cubos de AA de 9 mm³ provenientes del borde de una colonia de 3-4 días de crecimiento y se incubaron en cámara de cultivo New

Brunswick G-27 a 23 °C con luz provista por 4 tubos fluorescentes de 20W cada uno y con agitación constante de 125 rpm en el caso de los cultivos líquidos.

El micelio fue cosechado por filtración en embudo Buchner a presión reducida a través de papel de filtro Whatman GP. El micelio retenido fue lavado con agua bidestilada, secado en estufa a 70 °C hasta peso constante.

Estimación del crecimiento. Se utilizó el peso seco como estimador del crecimiento. Los resultados presentados son el promedio de tres mediciones para cada punto con un error estándar inferior al 5 %.

Resultados

La figura 1 muestra las curvas de crecimiento de las especies del género *Ascobolus* estudiadas en medio líquido GA. En las especies heterotálicas, el comportamiento entre las dos cepas compatibles no presenta diferencias entre sí o son leves (Figura 1a,b,c,d). Todas las especies mostraron un buen crecimiento y los máximos se registraron entre los días 6 y 35. Los valores máximos de peso seco obtenidos fueron de alrededor de 6.5 mg/ml para *A. gamundii* (Figura 1b) y un mínimo de 4 mg/ml para *A. campanensis* (Figura 1d).

Considerando las distintas fases de las curvas de crecimiento encontramos que los períodos de preparación (*lag*) muestran marcadas diferencias; en *A. crenulatus*, *A. stictoideus*, *A. michaudii* y *A. gamundii* es alrededor de cinco días; en *A. campanensis* de ocho días y en *A. bonaerensis* es mucho más prolongado llegando a los quince días.

Al considerar la fase de activo crecimiento (exponencial) vemos que las curvas de crecimiento de las dos cepas de *A. michaudii* tienen mayor pendiente, alcanzando el pico máximo antes que las demás (Figura 1a).

Después de alcanzar el máximo crecimiento, *A. bonaerensis* (Figura 1c) y *A. campanensis* (Figura 1d) entran en una fase estacionaria corta que lleva a un decaimiento abrupto en el peso seco, mientras que en *A. gamundii* (Figura 1b) y *A. michaudii* (Figura 1a) la fase estacionaria es más larga y el decaimiento mucho más gradual. Las especies homotálicas presentan curvas de crecimiento semejantes entre sí con un período lag corto, fase estacionaria intermedia y decaimiento gradual (Figura 1e y f).

En cuanto a la morfología de las colonias, se observó que éstas desarrollan en masas esféricas con una zona marginal de activo crecimiento alrededor del micelio más viejo crecido sobre el inóculo. Estas colonias varían en forma y/o textura como consecuencia de la ramificación de las hifas. Las seis especies estudiadas presentan un patrón de crecimiento «globoso».

Tabla 1. Especies de *Ascobolus*, pares compatibles, polaridad, sustrato y fecha de recolección.

Especie	Cepa	Polaridad	Localidad	Sustrato (estiercol)	Fecha
<i>A. gamundii</i>	4	+	Recreo, SF, Arg	Vaca	Junio, 1971
<i>A. gamundii</i>	5	-	Recreo, SF, Arg	Vaca	Junio, 1971
<i>A. michaudii</i>	6	+	Cdad. Universitaria, BA, Arg.	Vaca	Abril, 1994
<i>A. michaudii</i>	5	-	Cdad. Universitaria, BA, Arg.	Vaca	Abril, 1994
<i>A. bonaerensis</i>	7	+	Cdad. Universitaria, BA, Arg.	Vaca	Abril, 1994
<i>A. bonaerensis</i>	5	-	Cdad. Universitaria, BA, Arg.	Vaca	Abril, 1994
<i>A. campanensis</i>	1	+	Campana, PBA, Arg.	Vaca	Abril, 1994
<i>A. campanensis</i>	3	-	Campana, PBA, Arg.	Vaca	Abril, 1994
<i>A. crenulatus</i>	2	homo	Campana, PBA, Arg.	Vaca	Abril, 1994
<i>A. stictoideus</i>	6	homo	Campana, PBA, Arg.	Vaca	Abril, 1994

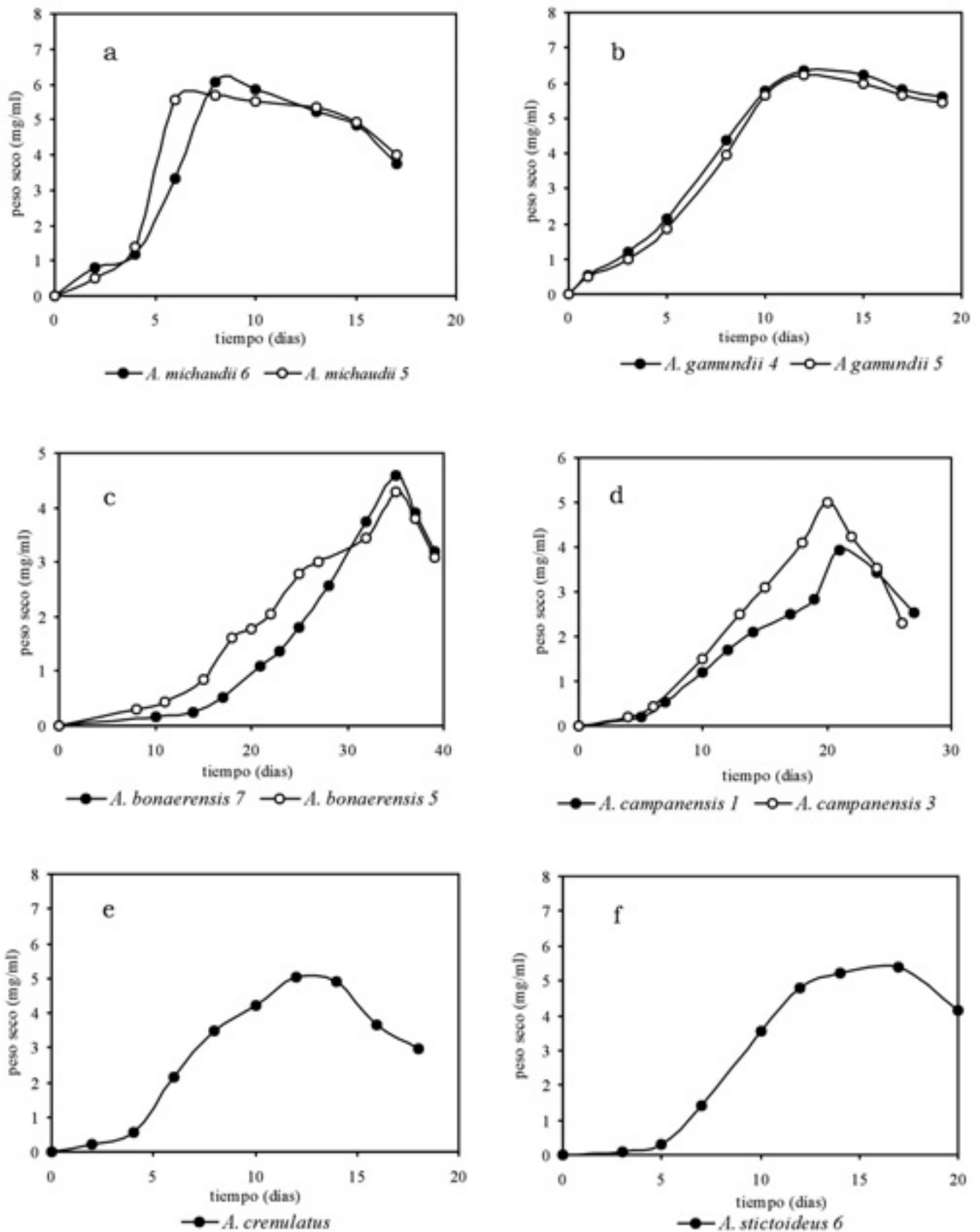


Figura 1. Crecimiento de las especies de *Ascolobolus* en medio de cultivo líquido medido como mg de peso seco de micelio/ml de medio de cultivo.

Discusión

El crecimiento es un fenómeno complejo que involucra cambios morfológicos, moleculares y celulares, que dependen del organismo y de las condiciones experimentales. El estudio de organismos filamentosos en cultivo líquido presenta algunas dificultades prácticas, tales como la presencia de heterogeneidad dentro de la biomasa, la cual puede deberse a la fijación y crecimiento del organismo sobre las paredes del recipiente de cultivo, o bien a la formación de «pellets». Estos son masas esféricas o elipsoidales de hifas con estructura variable, entrelazadas laxamente a densamente empaquetadas [11]. Yanagita et al. [12] proponen la existencia de cuatro regiones en el «pellet», la más externa con hifas viables, que rodean a una capa de hifas con signos de autólisis. En «pellets» huecos, existiría una tercera capa, con hifas de paredes irregulares, mientras que el centro contiene micelio no reconocible.

La existencia de estos factores conduce al establecimiento de áreas discontinuas de crecimiento los que afectan la producción de biomasa. Además, la heterogeneidad intrínseca del cultivo surge del tipo de crecimiento de las hifas, con extensión, pero poca biosíntesis de novo en el ápice, activa biosíntesis detrás del ápice y reducida actividad en regiones más distantes cuando la hifa envejece y se vacuoliza.

Los resultados obtenidos muestran una gran variabilidad en el comportamiento de las especies de *Ascobolus* estudiadas, variabilidad también observada en otras especies de *Ascobolus* [5] y en *Coprotus* [10]. Si bien la biomasa obtenida en el punto de máximo crecimiento no difiere mayormente entre las especies, la cinética del crecimiento es marcadamente distintiva, pudiéndose destacar los siguientes hechos:

En *A. bonaerensis* y *A. gamundii*, las dos cepas compatibles alcanzan el máximo crecimiento el mismo día, mientras que en *A. campanensis* y *A. michaudii* lo hacen con uno o dos días de diferencia lo que podría interpretarse como una pequeña diferencia en la batería enzimática disponible.

Si consideramos la duración de la etapa de crecimiento exponencial, podemos diferenciar cuatro grupos: a) período más extendido, en *A. bonaerensis* que alcanza la fase estacionaria alrededor del día 35 de la inoculación, b) Intermedios, en *A. campanensis* día 20 y *A. stictoideus* día 17, c) corto, en *A. crenulatus* y *A. gamundii* el día 11, d) período más corto en *A. michaudii* el día 6 y el 8. Estas diferencias en la velocidad específica de crecimiento podrían deberse a que los nutrientes pueden ser metabolizados a diferentes velocidades controlando de esta manera su disponibilidad para la síntesis de macromoléculas.

La declinación de la velocidad de crecimiento estaría producida por el envejecimiento del medio, el consumo exhaustivo de los nutrientes que se tornan limitantes, así como también, por la acumulación de productos de desecho. Al alcanzar el máximo crecimiento, *A. bonaerensis* y *A. campanensis* entran en una fase estacionaria muy corta, que lleva a una disminución brusca del peso seco, entrando rápidamente en la fase de muerte, acompañada por la autólisis del micelio. En las restantes especies la fase estacionaria es más larga y el decaimiento es gradual.

Finalmente, podemos decir que los resultados obtenidos nos permiten concluir que la cinética del crecimiento muestra marcadas diferencias dentro de las especies estudiadas del género *Ascobolus*, lo que lo diferencia netamente del género *Saccobolus*, en el que las curvas de crecimiento son similares en las distintas especies, sin fase estacionaria y con una disminución abrupta del peso seco, al comenzar la autólisis [9].

El conocimiento de la cinética del crecimiento bajo condiciones controladas y perfectamente definidas, nos permitirá la obtención de muestras de micelio de las distintas especies, en estados fisiológicos comparables. Dado los resultados obtenidos para cada una de las especies estudiadas se ha determinado el intervalo de 1 a 3 días previos a la iniciación de la fase estacionaria como el ideal para obtener dichas muestras.

Nuestros agradecimientos al CONICET y a la Universidad de Buenos Aires por la financiación de este trabajo.
María Esther Ranalli es investigadora del CONICET.

Bibliografía

- Chang LO, Srb AM, Steward FC. Electrophoretic separations of the soluble proteins of *Neurospora*. Nature 1962; 193: 756-759.
- Cinto RO, Galvagno M, Forchiassin F, Ranalli ME. Estudio de la relación entre las concentraciones de biotina, tiamina, d-glucosa, L(-) asparagina y el crecimiento vegetativo de *Ascobolus biguttulatus* (Fungi-Ascomycetes), usando técnicas de superficie de respuesta I. Physis Secc C 1977; 37: 282-302.
- Cinto RO, Galvagno M, Forchiassin F, Ranalli ME. Estudio de la relación entre la concentración de biotina, tiamina, d-glucosa y L(-) asparagina y el desarrollo vegetativo de *Ascobolus biguttulatus* (Fungi-Ascomycetes), usando técnicas de superficie de respuesta II. Physis Secc C 1978; 38: 7-32.
- Clare BG. Starch gel electrophoresis of proteins from species of *Phytophthora*. Comparison of six species. Nature 1963; 200: 803-804.
- Dokmetzian DA, Ranalli ME. Crecimiento de especies del género *Ascobolus* (Pezizales-Ascomycetes). Rev Arg Microbiol 1998; 30: 195-199.
- Galvagno MA. Ensayos de nutrición en *Ascobolus crenulatus* P. Karst. (Fungi, Ascomycetes). Bol Soc Arg Bot 1976; XVII: 95-118.
- Gamundí IJ, Ranalli ME. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina II. Nova Hedwigia 1966; X: 339-366.
- Lima CE, Mercuri OA. Ensayos de nutrición en *Ascobolus furturaceus*. Fuentes de nitrógeno. Rev Arg Microbiol 1984; 16: 177-186.
- Ramos AM. Estudios quimiotaaxonómicos en especies del género *Saccobolus* (Ascobolaceae, Pezizales). Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires 1998.
- Ramos AM, Dokmetzian DA, Ranalli ME. Cinética de crecimiento en especies del género *Coprotus* (Thelebolaceae-Ascomycetes). Physis Secc C 2000; 58(134-135): 27-30.
- Wittler R, Baumgartl H, Lubbers DW, Schugler K. Investigations of oxygen transfer into *Penicillium chrysogenum* pellets by microprobe measurement. Biotechnol Bioeng 1986; 28: 1024-1026.
- Yanagita T, Kogane F. Cytochemical and physiological differentiation of mould pellets. J Gen Appl Microbiol 1963; 9: 171-187.
- Yu-Sun CC. Nutritional studies of *Ascobolus immersus*. Am J Bot 1964; 51: 231-237.