

MORFOGÉNESIS DE FÍBULAS I. DESDICARIOTIZACIÓN
DE MICELIOS DE *PSILOCYBE CAERULESCENS*
MURRILL EN DIVERSOS MEDIOS
LÍQUIDOS DE CULTIVO

CELIA DUBOVY *
TÉOFILO HERRERA **

RESUMEN

Se presenta un estudio sobre los factores fisicoquímicos que influyen en la morfogénesis de fíbulas en micelios de *Psilocybe caerulescens* Murrill.

Por primera vez se encontró una pérdida constante de fíbulas en cultivos estacionarios sumergidos, en caldo-extracto de malta, en 13 cepas sometidas a prueba.

Cultivos sumergidos mantenidos en agitación desde que iniciaron su crecimiento, no perdieron las fíbulas; con esto, se tuvo una evidencia clara de que un buen intercambio de gases, es uno de los factores de mayor importancia para la persistencia del dicarion.

Se hicieron estudios en varios medios sintéticos y semisintéticos, con el objeto de ver su influencia en la desdicariorización de los micelios; los resultados de estos estudios son discutidos en detalle.

La baja tensión superficial en el fondo del tubo, con relación a la existente en las hifas aéreas, no tiene influencia en la formación de fíbulas; las presiones osmóticas elevadas tampoco tienen influencia en la desdicariorización, así como el pH, que únicamente tiene una influencia indirecta por su acción en el potencial de oxidorreducción total.

Un bajo potencial de oxidorreducción tiene el papel más importante como causante de la pérdida de fíbulas. En casi todos los casos, las fíbulas no se pierden en el principio del desarrollo del micelio, sino únicamente después de que un cierto metabolismo se ha presentado; esto fue concluyente, para pensar que algunos productos catabólicos del micelio originan la pérdida de fíbulas. Únicamente medios con un potencial de oxidorreducción muy bajo, o con sustancias tóxicas como Fe^{++} en dosis tóxica (0.03%), originaron desdicariorización del micelio desde el principio del crecimiento.

La desdicariorización puede ser total o parcial, de acuerdo con el potencial redox del medio.

* Becaria del Instituto Nacional de la Investigación Científica en el Instituto de Biología.

** Del Instituto de Biología UNAM.

Como resultado de otro estudio se encontró que la acumulación de CO_2 en ciertas cantidades, es uno de los factores que originan dedikariotización del micelio; pero, por diversas razones que son detalladamente discutidas en este trabajo, no se pensó que sea el único factor que actúa en la dedikariotización en cultivos sumergidos, ya que se tienen evidencias de un cierto tipo de crecimiento microaerófilico en *Psilocybe caerulescens*. Por los resultados de estudios hechos con CO_2 y con azida de sodio, se ve que existe una gran posibilidad de que la dedikariotización también sea debida a productos catabólicos de un crecimiento microaerófilico.

La dedikariotización origina formación de diversos tipos de heterocariones que, en transferencias sucesivas a malta-agar, originan micelios monocarióticos con oídios.

La dedikariotización se realiza especialmente en 2 formas:

- 1) Formación de ramificaciones subseptales.
- 2) Presencia de dos fíbulas en la misma célula, desarrolladas en dirección opuesta.

La recuperación del dicarion a partir de cultivos parcialmente dedikariotizados, se logró en malta-agar, y probablemente sea debida a un fenómeno de Buller unilateral.

Han sido iniciados algunos estudios con el objeto de observar si uno de los núcleos se pierde por el tratamiento y, en este trabajo se presentan los primeros resultados.

En transferencia a malta-agar de micelios que perdieron totalmente las fíbulas, no se logró la recuperación del dicarion; en lugar de ello, se recuperaron micelios monocarióticos.

De estudios hechos hasta el momento, parece ser que se pueden recuperar ambos núcleos, pero uno de ellos con menor frecuencia que el otro.

Una continuación de estos estudios se está realizando actualmente en nuestro laboratorio. La importancia de la dedikariotización de micelios, por cambios en el potencial redox, es discutida, pensando que esto también pueda suceder en la naturaleza, especialmente en micelios que se encuentran demasiado profundos en el sustrato, y se discute la posibilidad de la restricción de formación de carpóforos en la naturaleza por este método.

SUMMARY

A study of the influence of physicochemical factors in morphogenesis of clamp connections in mycelia of *Psilocybe caerulescens* Murrill was undertaken in our laboratory.

It was found for the first time, a constant loss of clamp connections in submerged stationary cultures in Malt Extract Broth Medium, in 13 strains tested.

Submerged cultures kept in agitation since the beginning of their growth, did not lose clamp connections; with this founding we got a clear evidence that a good gas—exchange is one of the major factors for persistence of the dikaryon.

We made studies in several synthetic and semisynthetic culture media, to see their influence in dedikaryotization of mycelia; the results are detailly discussed.

The low surface tension in the bottom of the tube, as related with the surface tension in aeral hyphae, has no influence in clamp connection formation; also high osmotic pressures, as well as pH, do not have an influence in dedikaryotization; pH has only an indirect influence by its action on total oxidation-reduction potential.

A low oxidation-reduction potential plays a major rôle in loss of clamp connections.

Almost in all cases, clamp connections are not lost in the beginning of the growth, but only after some metabolism has occurred; this was conclusive to think that some catabolic products of the mycelium lead to loss of clamp connections. Only media with a very low oxidation reduction potential or with some toxicants like iron in toxic doses (0.03%) lead to dedikariotization of the mycelium since the beginning of the growth.

Dedikaryotization can be total or only partial, according to the redox potential of the medium.

As a result of another study it was found that CO_2 accumulation in certain amounts is one of the factors which lead also to dedikaryotization of the mycelium but, for several reasons which are discussed in this paper, it should not be the only factor which acts in dedikaryotization in submerged cultures. The authors of this paper have evidences of some type of microaerophilic growth in *Psilocybe caerulescens* from studies made with CO_2 and with sodium azide, and there is a great possibility that dedikaryotization will be due also to some catabolic products of microaerophilic growth.

Dedikaryotization leads to the formation of several types of heterokaryons which on further transferences to Malt Agar give monokaryotic mycelia with oidia.

Dedykaryotization takes place specially in two ways:

- 1) Formation of subseptal branches.
- 2) Presence of two clamps in the same cell, in opposite direction one to the other.

Recovery of dikaryons from partial dedikaryotized cultures was achieved in Malt Agar, probably due to a unilateral Buller phenomenon.

Some studies to see if one nucleus is lost by treatment were started, and in this paper the first results are given.

The dikaryon was not recovered, from mycelia with a complete loss of clamp connections on transference to Malt Agar, in stead, monokaryotic mycelia were recovered.

From studies made until now it seems that both nuclei can be recovered, but one of them with a lower frequency than the other; further studies on this regard are being carried in our laboratory.

The importance of the dedikaryotization of mycelia with changes in redox potential is discussed thinking that this can also happen in nature, specially in mycelia which are very deep in the substratum, and the possibility of restriction of formation of fruit bodies in nature, by this method, is discussed.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los factores genéticos que determinan la formación de fíbulas, ha tenido un gran incremento en los últimos años, habiendo muchos trabajos a este respecto (Raper, J. R., 1966 Miles, P. G. & Raper, J. R. 1956 Parag, Y. 1962 Ahmad, S. S. comunicación personal, etcétera). Aún así, únicamente se está principiando a comprender la morfogénesis de dichas estructuras, consideradas durante mucho tiempo como un carácter taxonómico de significación considerable en el diagnóstico de Basidiomycetes.

Estudios más recientes han revelado que este carácter no es tan generalizado en

Basidiomycetes como anteriormente se pensaba y, debido a la irregularidad de su presencia en ciertos grupos, se ha puesto en duda su valor taxonómico.

Aunque la genética ha avanzado mucho en los estudios de estas estructuras, prácticamente los trabajos sobre la influencia de diversos factores fisicoquímicos que permitan o inhiban la expresión de dicha potencialidad genética son muy escasos: únicamente encontramos cuatro (Kniep V. H., 1918; Miles, P. G. & Raper, J. R., 1956; Kerruish R. M. y Da Costa E. W. B., 1963).

El presente trabajo fue enfocado particularmente al estudio morfogénico de di-

chas estructuras, en diversos medios líquidos sintéticos y semisintéticos en micelios de *Psilocybe caerulescens* Murrill, dado que para esta especie, no hay estudios de este tipo y que Heim (1957) asienta en su libro constancia de la existencia de fíbulas en las hifas de esta especie, la cual no fue observada por nosotros desde nuestros estudios iniciales sobre morfogénesis de micelios del mencionado *P. caerulescens*.

Desde la iniciación de nuestros estudios sobre esta especie, en forma casual se observó que en dos matraces con el mismo medio de cultivo, el micelio de uno de ellos

presentaba fíbulas, mientras que el otro no las presentaba, asegurándose por morfología restante del micelio, que esto no era una contaminación, y siendo la misma cepa la sembrada, teniendo como única diferencia en uno y otro caso el tamaño del matraz empleado y el volumen de medio, que fue el mismo para los dos matraces, se consideró que el oxígeno era un posible factor en la presencia de fíbulas. Esto condujo posteriormente a un estudio intensivo de la influencia de factores fisicoquímicos en la morfogénesis de fíbulas, del cual presentamos la primera parte.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron diversas cepas de *Psilocybe caerulescens* obtenidas de contexto de pileo, de estípite y de esporas, parte de las cuales fue aislada de hongos procedentes de Huautla de Jiménez (Oaxaca) en el año de 1965 por Teófilo Herrera y Martha Zenteno, y otras obtenidas de aislamientos de hongos procedentes de la misma localidad, hechos en 1967, por Teófilo Herrera y Evangelina Pérez.

Se observará que, en una parte de nuestro estudio, se utilizaron unas cepas y posteriormente otras, conservando tres cepas del estudio inicial para observaciones comparativas; esto se hizo principalmente, debido a que algunas de las cepas que ya tenían más de 15 resiembras, presentaban una ligera descidariotización parcial, lo cual no era conveniente para una correcta evaluación de nuestro estudio, que se hizo con cepas que siempre eran dicariones perfectos y muy fibuladas, sin áreas carentes de dichas estructuras.

Los aislamientos iniciales de todas las cepas fueron hechos en malta-agar (Difco). Este mismo medio fue empleado por nosotros como medio control, para observar la estabilidad del dicarion sin tratamiento;

en este medio se hicieron las resiembras de cada cepa y asimismo, se resembró cada uno de los micelios obtenidos en medios líquidos. Nuestros estudios iniciales fueron hechos en los siguientes medios líquidos:

- a) Caldo-extracto de malta (Malt extract broth, Difco).
- b) Sabouraud líquido (Difco).
- c) Medio de Raulin.
- d) Medio de Kaufmann
- e) Papa-dextrosa
- f) Tioglicolato-casitona-extracto de levadura-dextrosa (Thioglycollate fluid Medium Difco).

Los cultivos en la iniciación de nuestro estudio, fueron hechos en tubos de ensaye de 15 × 150 mm. De cada medio se hicieron 4 tubos por cepa, dos de los cuales contenían 3 cc de medio y los otros dos 10 cc de medio, particularmente con la finalidad de observar la influencia del oxígeno sobre la presencia de fíbulas y la estabilidad del dicarion.

Cada una de las cepas fue sembrada con asa, sin asegurar el tamaño del inóculo,

tomando un fragmento del micelio obtenido en malta agar. Las siembras para cada cepa se hicieron de la siguiente manera:

Un tubo con 3 cc de medio con inóculo aéreo.

Un tubo con 3 cc de medio con inóculo sumergido, y lo mismo para cada uno de los tubos con 10 cc de medio. Los tubos fueron incubados a temperatura de 26° C y a los 20 o 30 días de la siembra se hicieron preparaciones teñidas con azul láctico; se hicieron varias preparaciones de cada micelio, y si en éste había una ausencia total de fíbulas, era sembrado a malta-agar, con la finalidad de observar si se presentaba recuperación de dichas estructuras.

Por los resultados obtenidos en este estudio se consideró que para una mayor comprobación de la influencia del oxígeno en la morfogénesis de fíbulas (el cual parece ser uno de los factores fundamentales), era necesario hacer cultivos sumergidos mantenidos en agitación. Para este estudio se procedió de la siguiente manera:

De cada cepa, fueron sembrados simultáneamente 4 tubos con 10 cc de caldo extracto de malta, con inóculos sumergidos; dos tubos de cada cepa fueron mantenidos estáticos a temperatura de 26° C, mientras los otros 2 fueron agitados en agitadora mecánica, aproximadamente a 175 revoluciones por minuto, mantenidos en cuarto de incubación a temperatura de 28° C, la cual tratamos de igualar con la temperatura de los cultivos estáticos, rodeando de asbesto los recipientes en los que estaban los tubos. De cada uno de los tubos fueron hechas preparaciones cada 8 días a partir del decimoquinto de sembrada la cepa. En cada caso las preparaciones fueron hechas de la porción de desarrollo más reciente, para observar si había cambios en la descáriotización con relación al tiempo. Este estudio reveló un dato interesante, ya que por primera vez se observó que en las etapas iniciales del desarrollo del micelio en

medio sumergido en cultivos en caldo extracto de malta, siempre se presentaban fíbulas.

Éste y otros resultados, que posteriormente se indicarán, condujeron a hacer estudios en otros medios líquidos y a que nuestros estudios no se confinaran a determinadas áreas o a la parte terminal de desarrollo en un determinado lapso, sino a hacer estudios zonados desde la iniciación del crecimiento del micelio sumergido, hasta que éste llegaba a la superficie, lo cual, dependiendo del tipo de medio, duraba cerca de 2 meses o más.

Los demás medios líquidos empleados fueron los siguientes:

Peptona al 1% con dextrosa en concentración variable, la cual fue variada desde 0.01%, 0.05%, 0.10%, 1%, 2% hasta 7%.

Agua peptonada con 1% de peptona.

Czapek Dox líquido (Difco).

Czapek modificado, con una cantidad triple de cada una de las sales.

Medio sintético, modificación del de Czapek, elaborado con la siguiente fórmula:

Dextrosa 5%

Asparagina 0.140%

K₂HPO₄ 0.05%

KCl 0.05%

MgSO₄ 0.05%

pH final 4.1

Caldo-extracto de malta + 0.03% de sulfato ferroso.

Los estudios con altas y bajas concentraciones de dextrosa, se hicieron particularmente con la finalidad de observar la influencia del potencial total de oxidorreducción en la morfogénesis de fíbulas. Para los estudios en los medios líquidos indicados, se hicieron dos tubos de cada cepa, conteniendo cada uno 10 cc de medio, uno

sembrado con inóculo aéreo, y otro con sumergido (sin asegurar el tamaño del inóculo), También fueron incubados a 26° C.

En el caso de los tubos sembrados en caldo-extracto de malta + sulfato ferroso al 0.03%, inmediatamente después de sembrados, fueron lacrados con parafina, para evitar la oxidación del hierro. En la mayoría de los casos fueron hechas preparaciones por zonas; de los micelios sumergidos, a partir de la iniciación de su desarrollo hasta que éste terminara, se hicieron preparaciones aproximadamente cada 8 días. En cada caso las preparaciones se hacían de la zona de crecimiento más reciente. En algunas ocasiones en que por ciertos motivos esto no fue posible, se esperaba a que el micelio alcanzara su máximo desarrollo y entonces se le sacaba cuidadosamente en su totalidad, haciendo preparaciones de cada zona, partiendo de la porción más cercana al inóculo.

Dado que en los micelios sumergidos, se perdían continuamente las fibulas en determinado lapso, como indicaremos posteriormente, decidimos ver la influencia de una mayor concentración de CO₂ en la morfogénesis de dichas estructuras, para lo cual se hicieron cultivos en caldo-extracto de malta y en peptona 1%, dextrosa 4%, en

tubos con 10 cc de medio, sellados con parafina; de cada cepa se hicieron 2 tubos sembrados con inóculo aéreo, pero como por observaciones anteriores sobre el crecimiento de micelios aéreos, se observó que éstos en la generalidad de los casos, formaban una masa membranosa, y una vez llena la superficie del tubo ya no crecían, lo cual era inconveniente porque se perderían precisamente las etapas de mayor concentración de CO₂ producido por el metabolismo del hongo, los autores de este trabajo decidieron inclinar los tubos, para dar una mayor superficie de crecimiento.

En estudios de micelios aéreos, en todos los casos, también se hicieron preparaciones de varias porciones, para asegurar que no había ciertas áreas desdicarionizadas.

Todas las preparaciones fueron teñidas con azul láctico.

Los micelios carentes de fibulas eran resembrados a malta-agar y de ahí varios de ellos, han sido entrecruzados entre sí, y con otras cepas del mismo medio para observar si se restablece el dicarion. También recientemente fueron entrecruzados con monocariones obtenidos de cultivos monospóricos; éstos son estudios que se están realizando actualmente en nuestro laboratorio y sólo se mencionan en este trabajo algunos de los resultados iniciales.

RESULTADOS

Antes de proceder al estudio en los diversos medios, se hizo un estudio control de cada una de las cepas en malta-agar.

Se encontró que, en general, las cepas eran dicariones perfectos y estaban muy fibuladas. En general, el dicarion de *Psilocybe caeruleascens* es muy estable en condiciones adecuadas de medio, y tolera un gran número de resiembras sin monocarionizarse; se contó con cepas que tienen más

de 25 resiembras y aún no presentan áreas afibuladas.

Otras cepas presentan ciertas áreas afibuladas pero generalmente, después de más de 15 resiembras. Como ya se indicó, éstas no fueron utilizadas en estudios posteriores una vez que desarrollaban áreas afibuladas.

Se tuvo un caso excepcional, en la cepa 107 (obtenida de contexto de pileo), que carecía totalmente de fibulas al iniciarse nuestro estudio en malta-agar.

Esta cepa no fue utilizada en los estudios restantes, y es el único caso en que parece haberse presentado una monocariotización espontánea del micelio en malta-agar, por producción de una abundante fase asexual (oidial); sin embargo, esto no indica inestabilidad del dicarion, ya que de 14 cepas, únicamente ésta presentó desdicariotización espontánea.

En la cepa 78 (obtenida de esporas), que inicialmente era un dicarion perfecto, después de nueve resiembras en malta-agar, se observó una desdicariotización casi total del micelio quedando únicamente un área muy pequeña, fibulada y con cantidad muy escasa de fíbulas; en la mayoría de los casos no se observó más de una por hifa. Esta cepa, fue abandonada a partir de este momento, para ser utilizada en estudios posteriores. Aquí se observó claramente cómo la estabilidad de un dicarion puede variar según la cepa empleada.

La cepa 81 (obtenida de esporas) después de 15 resiembras, presentó algunas áreas oidiales desdicariotizadas que, aunque escasas, indujeron a los que esto escriben, a no continuar con su estudio.

De las cepas restantes, obtenidas en 1965, se siguió trabajando aún con las cepas 103 (estípita), cuya desdicariotización ha sido muy ligera, 106 (píleo), 106 (estípita) y 82 (esporas) que, en malta-agar, se han conservado como dicariones perfectos, además de las cepas obtenidas en 1967 como la cepa 6 (píleo), cepa 54 (píleo), cepa 4 (estípita) y cepa 5 (láminas) que también son dicariones perfectos.

Es importante indicar que lo que consideramos como dicarion perfecto, es variable según la cepa, ya que es raro encontrar fíbulas cada dos células, que sería el número teórico de éstas para un dicarion perfecto; esta condición únicamente se observó en algunas cepas (cepa 5 [láminas], 54 [píleo] y 106 [píleo]). De entre todas las cepas, se puede decir que,

en las de malta-agar, el 90% de las hifas son fibuladas, pero también se presentan algunas hifas afibuladas, particularmente unas ensanchadas que se tiñen intensamente con el azul láctico o, en ocasiones, también hifas regulares afibuladas.

Partiendo de estos datos se hizo el análisis del índice de estabilidad del dicarion en la siguiente forma:

$$\frac{\text{Índice de Estabilidad del dicarion} = \text{Número de hifas fibuladas en malta-agar}}{\text{Número de resiembras de la cepa}}$$

De acuerdo con esto, el índice de desdicariotización para micelios aéreos, sometidos a diversos cambios fisicoquímicos del medio, sería =

$$\frac{\text{Índice de Estabilidad del dicarion}}{\text{Número de hifas dicarióticas para el tratamiento por variaciones fisicoquímicas del medio}}$$

Consideramos que el índice de desdicariotización para micelios sumergidos debe considerarse en función de los aéreos del mismo medio. Por lo tanto, índice de desdicariotización para micelios sumergidos =

$$\frac{\text{Índice de desdicariotización para micelio aéreo en medio X}}{\text{Número de hifas dicarióticas en micelio sumergido en medio X}}$$

ESTUDIOS EN CALDO-EXTRACTO DE MALTA

Como fue indicado, los estudios iniciales fueron hechos sin tomar en cuenta el tiempo que llevaba el desarrollo del micelio y, en varias ocasiones, sucedió que de las cepas cultivadas en un mismo medio, unas eran vistas en una etapa de desarrollo menor que otras.

En la cepa 103 (estípita), en caldo-extracto de malta, se observó que el micelio sumergido, obtenido de tubo con 10 cc de medio, carecía totalmente de hifas fibuladas en las áreas de crecimiento más recientes, de donde se hicieron las preparaciones.

El micelio sumergido de la misma cepa, en tubo con 3 cc de medio, presentaba fibulas en una proporción ligeramente menor que la inicial, no eran frecuentes cada dos células, y algunas hifas carecían totalmente de ellas.

El hecho de que se hubiesen presentado fibulas, aunque en proporción disminuida, en este tipo de micelio, mientras había desdicariorización total en tubo con 10 cc de medio, hizo pensar a los que esto escriben, en la influencia clara del oxígeno como causante de la desdicariorización, mas en ese momento, se pasó inadvertido el hecho de que la desdicariorización podía ser gradual, hecho que, como se indicará más adelante, se hizo evidente en estudios posteriores.

El micelio sumergido de la cepa 81 (esporas), en tubo con 3 cc de medio, presentó numerosas fibulas, en ocasiones saliendo unas de otras; hay que hacer notar que aquí las preparaciones fueron hechas de porciones más cercanas al inóculo y, prácticamente, no hubo disminución de fibulas, con relación al micelio obtenido en malta-agar.

El micelio sumergido en tubo con 10 cc de medio, perdió totalmente las fibulas en las áreas de desarrollo más reciente. En un gran número de preparaciones hechas de esta zona no se observó ninguna hifa fibulada.

En la cepa 106 (píleo), en micelios sumergidos en tubos con 3 cc de medio, se observaron fibulas en una proporción igual a la inicial, mientras que, en forma aparentemente excepcional, con relación a las cepas anteriores, en el micelio sumergido en tubo con 10 cc de medio, se observaron

fibulas numerosas en determinadas áreas, en las que su cantidad por hifa era prácticamente igual que la inicial, mientras que otras áreas eran totalmente afibuladas, o bien presentaban una o dos fibulas eventualmente. Es decir, en este micelio, por primera vez, se encontró una desdicariorización parcial. Esto permitió suponer que, posiblemente en todos los casos, la desdicariorización podía ser gradual, o bien que esta cepa presentara otro límite de tolerancia a bajas cantidades de oxígeno, y que el límite del potencial total de oxidorreducción, que influye en la desdicariorización, varía según la cepa. Estas hipótesis sobre la influencia del potencial total de oxidorreducción como factor límite en la presencia de desdicariorización, surgieron a raíz de los resultados anteriormente indicados en los que aparentemente la presencia de oxígeno es básica para la estabilidad de un dicarion, ya que, en micelios aéreos de todas estas cepas, las fibulas se presentaron en la misma proporción que en malta-agar, sin encontrarse ninguna área desdicariorizada.

Cuando fueron obtenidas las cepas del año 1967, lo primero que se trató de observar fue si su comportamiento era igual que el de las anteriores, para lo cual se sembraron micelios sumergidos en caldo-extracto de malta. Con sorpresa, se observó que, en preparaciones hechas 12 días después de la siembra, todas las cepas estaban muy fibuladas, conservando la misma proporción de fibulas que la inicial y, en ocasiones, fibulas cada dos células, como estaban en los aislamientos iniciales. Esto en un principio puso una gran interrogante, aunque los que esto escriben, estaban seguros de sus resultados en cepas anteriores y pensaron que posiblemente la diferencia estaba en el límite de potencial total de oxidorreducción, y que cepas más recientes necesitaban un potencial de oxidorreducción más bajo para la pérdida de fibulas, por lo que fueron transferidos los micelios a diversas concentraciones de dex-

trosa, observando que se perdían más rápidamente las fíbulas, a una concentración de dextrosa entre 4% y 5%. Mientras tanto, se dejaron creciendo los micelios en caldo-extracto de malta, observando que, posteriormente, todos perdieron las fíbulas. Esto fue el punto clave, que indicó que la desdicariorización se realiza en función del tiempo y, por primera vez, hizo pensar a los autores de este trabajo, que la desdicariorización, posiblemente, era debida a productos catabólicos del micelio durante su desarrollo en medio sumergido, dado que en éste, como en todos los demás medios, se observó posteriormente que la desdicariorización se realiza en función del tiempo y que siempre, en etapas iniciales y en porciones cercanas al inóculo, el micelio no se desdicarioriza.

ESTUDIOS DE MICELIOS SUMERGIDOS EN CALDO EXTRACTO DE MALTA, MANTENIDOS EN AGITACIÓN

Los micelios de las distintas cepas se mantuvieron en agitación inmediatamente después de sembrados los tubos, haciendo preparaciones cada 8 días a partir de la siembra.

A los 8 días de sembradas, todas las cepas presentaron numerosas fíbulas, en varios casos cada dos células y, en algunas ocasiones, unas saliendo de otras; su cantidad no había disminuido con relación a la inicial, y no se presentó desdicariorización.

A los 15 días de sembradas las cepas, las fíbulas persistieron en todas ellas al igual que a las tres semanas, no presentándose áreas desdicariorizadas en este caso. Al mes todas las cepas presentaban gran cantidad de fíbulas, y la mayoría de las hifas eran dicarióticas; sin embargo, debido a efectos de la agitación, varias hifas estaban fragmentadas y, lógicamente, los fragmentos perdían las fíbulas, así como varias hifas habían perdido su individua-

lidad formando células poliédricas. Sin embargo, todas las hifas normales presentaron fíbulas en todas las cepas.

Esto indicaba en una forma clara que el oxígeno, o bien el intercambio de gases, influye en la estabilidad del dicarion, y comprobaba el efecto de estos factores que hacen que el micelio aéreo no se desdicariorice.

ESTUDIOS DE MICELIOS EN SABOURAUD LÍQUIDO

En la cepa 103 de *estípite*, los micelios aéreos presentaron numerosas fíbulas, en proporción no disminuida con relación a la del tubo de malta-agar; éstas se presentaron tanto en hifas regulares como en hifas varicosas; también frecuentemente, se encontraron asas septales.

En ocasiones, las fíbulas presentaron el septo basal desplazado, y en ocasiones un septo adicional, recto u oblicuo con relación al septo hifal.

En micelio sumergido en tubo con 3 cc de medio, se observaron 2 fíbulas en una hifa, y una rama de ésta y el resto del micelio se encontraba totalmente desdicariorizado. En micelio sumergido, en tubo con 10 cc de medio, en una porción se observaron 2 hifas dicarióticas y el resto del micelio desdicariorizado totalmente; dejándole unos días más de crecimiento, no se presentó ninguna área fibulada en las preparaciones hechas.

En la cepa 81 (de esporas), observamos un comportamiento prácticamente igual al de la anterior, con persistencia de fíbulas en micelios aéreos, disminución en sumergido con 3 cc presentándose un 90% de las áreas desdicariorizadas y una que otra área dicariótica, con muy escasas fíbulas; pérdida total de fíbulas en micelio sumergido con 10 cc de medio.

En la cepa 106 los resultados fueron iguales que en el caso anterior, con la ex-

cepción de que, en el micelio sumergido con 3 cc de medio, el área aún no desdicariotizada fue algo mayor y en la porción aérea formadã de inóculo sumergido, en un área se encontraron dos hifas con tres fibulas.

El hecho de no haber observado fibulas en este caso, con relación a los resultados obtenidos en caldo-extracto de malta en esta cepa, nos indica que la desdicariotización, aunque gobernada genéticamente, puede ser afectada en su expresión por determinados factores del medio. Además, hay que considerar que, en este medio, el crecimiento del micelio es más rápido y, por lo tanto, el metabolismo es más acelerado, produciéndose posiblemente los catabolitos causantes de la desdicariotización más rápidamente, y concentrándose más en un lapso menor, causando así una más rápida pérdida total de las fibulas.

ESTUDIOS EN MEDIO DE RAULIN

En la cepa 103 (estípíte), en medio de Raulin, los micelios aéreos fueron muy fibulados. En el aéreo, en tubo con 3 cc de medio, no todas las hifas presentaron fibulas, pero un 95% presentó por lo menos una.

El micelio aéreo en tubo con 10 cc de medio presentó fibulas no disminuidas, en proporción, con relación a las del tubo de malta agar, y es interesante indicar que presentando dos tipos de hifas, unas muy modificadas y otras normales, el número de fibulas es mayor en las hifas regulares, que en las modificadas vesiculosas o varicosas.

El micelio sumergido en tubo con 10 cc de medio, en el momento en que se le observó, presentaba desdicariotización casi total, pero aún se encontraron dos fibulas en distintas áreas.

En la cepa 81 (esporas) los micelios aéreos presentaron gran cantidad de fibulas, en varias ocasiones saliendo unas de

otras. El micelio sumergido en tubo con 3 cc de medio, al llegar a la porción aérea, presentaba aproximadamente un 80% de hifas desdicariotizadas y el resto con un número muy escaso de fibulas; se encontraron 7 fibulas en una preparación, 5 en otra, y otras totalmente carentes de ellas.

El micelio sumergido en tubo con 10 cc de medio, se desdicariotizó totalmente. La cepa 106 (píleo), en este medio, presentó un comportamiento excepcional; los micelios aéreos se comportaron igual que en las otras cepas; pero en los sumergidos, tanto en 3 cc como en 10 cc de medio, se observó una gran cantidad de fibulas, numerosas hifas las presentaron cada dos células, no se presentó ningún área desdicariotizada, y la proporción de las fibulas no disminuyó con relación a los micelios aéreos.

A este respecto, hay que indicar que, como veremos posteriormente, esta cepa presentó en varios casos un comportamiento excepcional, no desdicariotizándose en muchos medios en que otras lo hacían; en general, esta cepa en cultivo se comporta de modo diferente a las demás, produciendo una gran cantidad de exopigmento anaranjado en la base, y en ocasiones en el micelio; en algunos medios produce un pigmento intensamente negro que, en ocasiones, se difunde en el medio; estos pigmentos parecen ser derivados de quinonas, y esto podría indicar un cierto metabolismo desviado del normal, en el que las quinonas actúan en las reacciones terminales de la respiración, en lugar de oxígeno molecular, lo que podría dar las diferencias observadas en la morfogénesis de fibulas.

ESTUDIOS EN MEDIO DE KAUFMANN

En medio de Kaufmann, el comportamiento de las distintas cepas, por lo que respecta a la morfogénesis de fibulas, está

ligado a la capacidad que tiene este medio de producir en micelios aéreos una fase asexual (oidial) desdicarriotizando al micelio de esta manera por formación de oídios monocarióticos, y finalmente produciendo un monocarion que logramos distinguir fácilmente debido a la abundante fase asexual oïdial, que coincide con una carencia total de fíbulas, tanto en las hifas que persisten como en los oïdióforos. Se sabe, por otros estudios que los autores de este trabajo están realizando, que el monocarion obtenido de germinación de una basidiospora, entra en una fase oïdial muy precozmente y, además, que la fase asexual no siempre implica desdicarriotización, ya que en otros estudios se ha reconocido fase asexual (oidial) conservándose numerosas fíbulas (Dubovoy y Herrera 1968). Así, en las cepas 81 y 106, en tubos con 3 cc de medio, se observó ausencia de fíbulas en los micelios aéreos debido a la presencia de fase asexual.

En la cepa 106 la fase asexual era escasa, y muy abundante el número de hifas, pero ninguna presentaba fíbulas; aparentemente el micelio, en este caso, se monocarriotiza, por formación previa de un heterocarion.

En los micelios aéreos de tubos con 10 cc de medio, estas dos cepas no presentaron fase asexual y presentaron una cantidad muy grande de fíbulas, aún más que en malta-agar, siendo frecuentes cada dos células y encontrándose tanto en hifas regulares como irregulares y aún en hifas piliiformes. Aquí, el micelio dicariótico era un dicarion perfecto en el sentido estricto de la definición de este término.

Los micelios sumergidos de la cepa 81 no presentaron fase asexual ni en 3 cc ni en 10 cc de medio. En 3 cc de medio, encontramos una cierta cantidad de fíbulas, pero disminuídas en más de un 75% con relación al micelio aéreo; éstas fueron encontradas en hifas vesiculosas particularmente, y tres fueron encontradas en hifas

regulares. En 10 cc de medio la desdicarriotización fue total en micelio tomado de área superior, después de 3 semanas de crecimiento.

En la cepa 106, en micelio sumergido con 3 cc de medio, en porción cercana al inóculo, las fíbulas no estaban disminuías con relación al micelio aéreo y se presentaban aún en hifas piliiformes.

En el micelio sumergido en tubo con 10 cc de medio, se presentó desdicarriotización total. La cepa 103 no presentó fase asexual en micelios aéreos, y no hubo desdicarriotización, presentándose numerosas fíbulas, en ocasiones unas saliendo de otras.

En micelio sumergido, en tubo con 10 cc de medio, hubo desdicarriotización total.

ESTUDIOS EN PAPA DEXTROSA

En la cepa 81, los resultados obtenidos con papa-dextrosa fueron exactamente iguales a los obtenidos en medio de Kaufmann, habiendo también una desdicarriotización total en micelio aéreo, en tubo con 3 cc, por presencia de fase oïdial.

En la cepa 103 también se presentaron los mismos resultados que en el medio de Kaufmann. Los micelios aéreos de la cepa 106 presentaron numerosas fíbulas, pero su número no era tan grande como en medio de Kaufmann; casi nunca se presentaron cada dos células. En micelio sumergido con 3 cc de medio, se presentó aproximadamente un 5% de hifas dicarióticas, aunque en ocasiones las fíbulas, no eran claramente apreciables, por la dificultad de discernir el septo hifal.

El micelio sumergido, en tubo con 10 cc de medio, presentó desdicarriotización total.

ESTUDIOS EN MEDIO DE TIIOGLICOLATO CASITONA EXTRACTO DE LEVADURA DEXTROSA

Estos estudios se emprendieron especialmente tomando en cuenta que éste es un

medio muy reductor, y que proporciona una microaerofilia característica, dado que los resultados obtenidos anteriormente indicaban una clara influencia de la escasez de oxígeno, o bien de la acumulación de CO_2 en el medio, en la desdicariorización de micelios. En este caso se hicieron los estudios únicamente en micelios aéreos, dado que los sumergidos no crecieron en este medio. Hay que indicar también que el medio posee un pH ligeramente superior al neutro, pero se ha comprobado que este factor no influye en la morfogénesis de fíbulas. En todas las cepas se comprobó que el oxígeno es uno de los factores importantes en la morfogénesis de fíbulas, ya que fue el único caso en que los micelios aéreos estudiados, se encontraban completamente desdicariorizados. Esto, exceptuando la cepa 106 (de píleo), que en este medio formó una masa membranosa de micelio con un pigmento negro intenso. Esta cepa presentó numerosas fíbulas, con una ligera disminución con relación a los controles, la cual se presentó particularmente en hifas vesiculosas, aunque éstas también presentaban un cierto número de fíbulas, pero no tan grande como en las hifas regulares, en las que, en numerosas ocasiones, se presentaron cada dos células. Había unas hifas vesiculosas intensamente teñidas con el azul láctico que particularmente carecían de estas estructuras.

Debido a que pudiese existir una influencia del potencial total de oxidorreducción en la pérdida de fíbulas, con desdicariorización consecuente del micelio, se hizo un estudio de medios con peptona al 1% y diversas concentraciones de dextrosa.

Es necesario indicar que en el transcurso del estudio se utilizaron dos peptonas, una de la Pfanstiehl Chemical Corporation, y otra, la bacto-peptona (Difco). Se hace particular énfasis en la utilización de estas dos sustancias, dado que, en el transcurso de los estudios se observó una

diferencia drástica en la morfogénesis de fíbulas utilizando una o la otra, como será indicado posteriormente.

Desde la iniciación de este estudio y de acuerdo con los resultados anteriormente obtenidos, nuestros estudios de micelios sumergidos fueron zonados desde las primeras etapas del desarrollo hasta la terminación de éste.

A partir de este momento se empezó a trabajar con las 8 cepas seleccionadas, ya citadas anteriormente.

Los resultados obtenidos en cultivos aéreos y sumergidos en peptona (Pfanstiehl Chemical Corporation) al 1% y concentraciones muy bajas de dextrosa, como son 0.05 y 0.01%, se pueden sintetizar de la siguiente forma:

En general, la desdicariorización es gradual y tardía, en micelios sumergidos de las cepas que llevaban pocas resiembras o de cepas que en el tubo original presentaban fíbulas cada dos células y el 95% de las hifas fibuladas; se presenta en un lapso más corto en micelios que llevan un mayor número de resiembras, o que en el tubo original son dicarióticos en una menor proporción, con escasas hifas presentando fíbulas cada dos células, como en la cepa 103 (estípita); tenemos una excepción, en la cepa 106 (píleo) que, habiendo sido muy sembrada, aún presenta desdicariorización algo tardía.

Como dato muy importante hay que indicar que en estos medios, en general, la desdicariorización total no se presenta en las distintas zonas, y únicamente llega a presentarse en los micelios aéreos formados a partir de inóculo sumergido, que tardan, en ocasiones, dos meses para formarse.

También hay que indicar que, inicialmente, pensamos que la desdicariorización era debida a la presencia de la fase asexual algo atípica, y con artrosporas, que se presenta en estos micelios, pero se comprobó

que esta idea definitivamente era errónea, por un lado al haber encontrado una fíbula en un oidióforo que, incidentalmente se encontró en la cepa 81 y, particularmente, porque los micelios aéreos presentaban una abundante fase asexual (oidial), siendo aún más fibulados que los micelios en malta-agar, en algunas ocasiones. Se piensa que la fase asexual tiende a ser monocariónica generalmente en micelios sumergidos, debido a la acción del medio en la desdicariorización de las hifas y dicariorización en aéreos, sin que ésta tenga una influencia directa en la desdicariorización, aunque puede influir ligeramente por la producción incidental de oídios monocarióticos.

Todas las cepas a los 8 días de sembradas, o sea en porciones muy cercanas al inóculo, presentaron fíbulas. Las cepas 103 y 81 presentaron una proporción de fíbulas ligeramente menor que la inicial, y mucho menor con relación a la de micelio aéreo; las restantes la conservaron igual, para ambas concentraciones de dextrosa. Estas dos cepas tendieron a desdicariorizarse más rápidamente; a los 15 días ya presentaban más del 50% de las hifas desdicariorizadas y a los 28 días, en concentración de 0.05% de dextrosa, las fíbulas se encontraron únicamente en forma eventual, en una que otra hifa en la cepa 103, y se presentó aparentemente desdicariorización total en concentración de 0.1% (fue el único caso de desdicariorización total antes de llegarse a formar micelio aéreo).

En la cepa 81 persistió una cierta cantidad de fíbulas en micelios tomados a 1.5 cm de la superficie, aunque eran eventuales; y en concentración de 0.05% de dextrosa, en varias ocasiones se encontraron fíbulas, en las hifas áreas de la preparación que presentaba reproducción asexual.

En las cepas 82, 106 (píleo), 106 (estipite), 6, 5, 54 y 4, a los 15 días de sembradas, se observó una ligera dismi-

nución en la proporción de fíbulas con relación a los micelios aéreos y un número ligeramente mayor de hifas desdicariorizadas sin presentarse áreas afibuladas propiamente, y presentándose aún varias hifas con fíbulas cada dos células. Las fíbulas se presentaron tanto en hifas regulares como irregulares (vesiculosas y varicosas), estas últimas muy frecuentes en la cepa 106 (estipite). En la cepa 106 (píleo), se encontró que, en esta etapa, se presentan fíbulas de cuya parte lateral se origina una rama, paralela u oblicua con relación a la hifa original, lo que posiblemente tendería a desdicariorizar al micelio; únicamente se observaron unas cuantas fíbulas sin esta característica, la cual tiende a presentarse fundamentalmente en micelios con una concentración de 0.1% de dextrosa.

Al mes y una semana de sembradas estas cepas, a 1.5 o 2 cm de la superficie, la desdicariorización era casi total, pero aún se presentó una que otra hifa dicariorítica en ciertas preparaciones de todas las cepas. La desdicariorización es mucho más rápida a partir de la segunda semana de la siembra.

Al llegar a la superficie, todas las cepas estaban totalmente desdicariorizadas, presentando una fase asexual (oidial) muy abundante. El micelio de la cepa 106 (píleo) presentó en todos los tubos una intensa pigmentación negra, al llegar a la superficie.

Los micelios aéreos en ambas concentraciones de dextrosa, presentaron frecuentemente un número de fíbulas mayor que en malta-agar, siendo frecuentes cada dos células; su proporción fue menor en la cepa 103, en la que había algunas hifas afibuladas, y la frecuencia de fíbulas en una hifa no era regular, pero aún en ella su cantidad era algo mayor que en malta-agar y, en forma incidental, se encontró una hifa que presentaba dos fíbulas en un mismo septo.

En las cepas restantes con fase asexual (oidial), las fíbulas se encuentran en todas las hifas que originan oidióforos; aunque no se presenten a éstos, propiamente, cuando ya se están fragmentando, son muy abundantes y su presencia es muy regular cada dos células en la mayoría de las hifas. En la cepa 106 (estípote) también se presentó una hifa con dos fíbulas en un mismo septo.

Del estudio en bajas concentraciones de dextrosa, se llegó a la conclusión de que el potencial del oxidorreducción total del medio, influía en cierto grado en la desdicariorización, ya que hacía que el proceso fuera más tardío y, en los micelios aéreos, originaba una situación muy próxima a la teórica, con fíbulas cada dos células. Se pensó entonces en hacer un estudio en un medio con ausencia total de dextrosa como reductora, realizándose el estudio de los micelios en agua peptonada; también se hicieron cultivos en lámina de algunas cepas, dado que en éstos, como el micelio crece en una sola capa, hay un máximo de oxigenación.

En los cultivos en lámina, hechos colocando una gota de medio (peptona al 1%-dextrosa al 0.05%) sobre un cubreobjetos, a su vez colocado en forma diagonal (para permitir la entrada de aire) sobre un anillo sellado sobre un portaobjetos, dentro de una cámara húmeda, se lograba la condición ideal esperada, presentándose en todas las cepas estudiadas, todas las hifas y las ramas de ellas, con fíbulas cada dos células, y encontrándose también fíbulas en todas las anastomosis en "H" y escalariformes. Esto fue prueba concluyente 100% de que una oxigenación buena, ligada a una condición en la que no se acumulen gases como CO_2 , son los factores de máxima importancia en la morfogénesis de fíbulas, pudiéndose lograr una condición dicariorítica ideal, que no es fácil que se presente en otros medios, ni aún en Malta-Agar, debido al crecimiento del micelio en varios planos.

ESTUDIOS EN AGUA PEPTONADA (PEPTONA PFANSTIEHL AL 1%)

Los micelios sumergidos, de todas las cepas, presentaron una desdicariorización gradual, algo más rápida que en peptona al 1% con baja cantidad de dextrosa.

En forma sorprendente, la cepa 106 (píleo) se desdicariorizó muy rápidamente, habiendo perdido casi el 90% de las fíbulas diez días después de la siembra. En general, el comportamiento de esta cepa fue algo extraño también en el micelio aéreo, como se indicará posteriormente.

Las cepas restantes presentaron desdicariorización gradual, similar a la encontrada en peptona al 1% y dextrosa al 0.1%, pero los micelios se desdicariorizaron totalmente en un lapso menor que los anteriores, habiendo una pérdida de fíbulas más rápida.

Esto indica que es necesaria una cierta cantidad de dextrosa para la morfogénesis de dichas estructuras, para iniciar un metabolismo rápido mientras se presenta una cierta degradación de la peptona.

En la cepa 106 (de estípote), a los 15 días, el 75% del micelio estaba desdicariorizado, pero aún se presentaron algunas áreas muy fibuladas, con fíbulas muy frecuentes cada dos células; observamos que de estas fíbulas parten ramificaciones afibuladas que posiblemente tenderían a desdicariorizar posteriormente al micelio.

Las cepas restantes, más o menos siguieron una forma de desdicariorización igual; en todas las cepas, a los 28 días de sembradas, se encontró una que otra fíbula eventual, y al mes y 5 días, la desdicariorización fue total.

Es importante indicar que la desdicariorización en todas las cepas en este medio, se realiza aparentemente por formación de ramas subseptales que corren paralelas u oblicuas a la hifa que les dio origen, es decir, se origina la rama inicial de la fi-

bula; ésta no induce a formación de rama telemórfica en la célula adyacente, sino se continúa como una rama normal afibulada.

Estas ramas fueron muy abundantes en todas las cepas, y, cuando aún había áreas dicarióticas, observamos que estas áreas eran las únicas que carecían de ellas. También, hacemos hincapié en que la desdicariotización fue gradual, a pesar de una fase asexual intensa de muy diversos tipos.

En micelios aéreos se observó que aunque todos son muy fibulados, la proporción de fibulas disminuye en cierto grado con relación a la de malta-agar, lo que puede ser debido a dos causas fundamentales:

- 1º En estos micelios se observa una fase asexual muy intensa de diversos tipos, que ocasionalmente podría dar origen a pequeñas áreas monocarióticas.
- 2º Que según se indicó para micelios sumergidos, una cierta cantidad de dextrosa o de fuente carbonada que se metabolice más rápidamente que la peptona, sea necesaria como fuente energética inmediata, para el proceso de división que implica la formación de fibulas.

En general, en estos micelios observamos una fase asexual muy intensa que la mayoría de las ocasiones no tuvo influencia en la desdicariotización, ya que en todas las cepas se presentaron numerosas fibulas en áreas asexuales. En todas las cepas las fibulas se encontraron en hifas regulares, irregulares y piliformes.

En la cepa 82 encontramos una área en la que las fibulas eran sumamente escasas, careciendo de ellas la mayoría de las hifas; presentaba hifas con condensaciones citoplasmáticas muy frecuentes, y con esporas endógenas; posiblemente en este caso sí se trataba de un área monocariotizada por fase asexual, ya que el resto del micelio

era muy fibulado. Sin embargo, en otras áreas de reproducción asexual sí se encontraron fibulas.

En las demás cepas se observa una cantidad regular de fibulas menor que en malta-agar, habiendo hifas que las presentan en gran número y otras totalmente carentes de ellas. Generalmente estas últimas presentan el citoplasma retraído, tanto de las paredes laterales como de las transversales, o presentan algún tipo de clamidospora.

Se encontraron, sin embargo, también varias fibulas en áreas completamente asexuales. En este medio observamos claramente que el índice de desdicariotización de micelios sumergidos es necesario tomarlo con relación a los aéreos del mismo medio, y en este caso el índice de desdicariotización para los sumergidos disminuye, siendo casi equivalente al de los sumergidos con peptona al 1%, dextrosa al 0.05 y al 0.1% considerando que los micelios aéreos están muy ligeramente desdicariotizados.

A partir de los estudios hechos en peptona (Pfanstiehl Chemical Corporation) al 1% y dextrosa desde al 1% hasta el 7%, se observó que, en todas las cepas, la desdicariotización de micelios sumergidos era cada vez más rápida a medida que se aumentaba la concentración de dextrosa hasta que, al llegar a una concentración de 4%, por primera vez las fibulas se perdieron totalmente desde etapas iniciales del desarrollo del micelio, en todas las cepas examinadas, sin excepción.

A partir de esta concentración de dextrosa, ya en ninguna se observaron fibulas, produciéndose la desdicariotización total a los 8 días de sembradas las cepas.

MICELIOS AÉREOS

En micelios aéreos, con peptona Pfansstiehl al 1% y dextrosa al 1%, se obser-

varon numerosas fíbulas, prácticamente en proporción igual a la de malta-agar.

En micelios aéreos en concentración de 2% y 3% de dextrosa, las fíbulas siguieron siendo muy numerosas en todas las cepas, con excepción de la cepa 103, que presentó varias hifas afibuladas, y una irregularidad muy fuerte en el número de fíbulas de cada hifa, presentándose en varias ocasiones una sola por hifa.

En peptona al 1%-dextrosa al 4%, en general las fíbulas fueron numerosas, pero disminuidas con relación a las de malta-agar para casi todas las cepas, con excepción de la 82 y la 106 (píleo) en que su proporción fue la misma que la inicial, presentándose, en la cepa 82, fíbulas en hifas muy irregulares y, en ocasiones, en base de vesículas o de receptáculos.

En la cepa 103, su proporción disminuyó algo más y había ya algunas áreas muy pequeñas desdicariorizadas. Sin embargo, aún había una cantidad bastante numerosa de fíbulas con distribución irregular; aproximadamente 5% de las hifas estaban desdicariorizadas.

En peptona al 1%-dextrosa al 5%, los micelios aéreos de las cepas 81 y 103 presentaron una desdicariorización franca, estando más del 50% desdicariorizado y las áreas restantes con hifas con fíbulas que nunca se encontraron cada dos células. En las cepas restantes se presentó un cierto número mayor de hifas afibuladas que en los micelios con 4% de dextrosa, pero aún no había áreas completas desdicariorizadas.

A partir de una concentración de 6% de dextrosa, hubo un cambio drástico en todas las cepas y la mayoría se encontraba desdicariorizada, prácticamente en su totalidad.

En varios casos observamos únicamente, en la totalidad de los micelios aéreos, de 2 a 6 fíbulas.

Se observó que, en general, existe poca tendencia a la división celular, encontrán-

dose septación muy escasa en las hifas. Posiblemente en este caso haya una acción directa de los componentes del medio que impide la división celular, y con ésta, la formación de fíbulas.

En los micelios aéreos con 7% de dextrosa, la desdicariorización también fue casi total, conservándose de una a tres fíbulas en la totalidad de micelio, según la cepa.

Haciendo el análisis de los resultados anteriormente indicados, en un principio se pensó que podían ser dos factores fundamentales los causantes de la desdicariorización en este medio:

- 1) Disminución del potencial de óxidoreducción debida a las altas concentraciones de dextrosa.
- 2) Elevada presión osmótica.

Respecto a la presión osmótica elevada, como será indicado posteriormente, se logró demostrar con claridad que no tiene ninguna influencia en la morfogénesis de fíbulas.

Por otro lado, también se demostró, posteriormente, que no es la concentración de dextrosa elevada propiamente la que causa desdicariorización, por disminución del potencial de óxidoreducción, sino la interacción de ésta, con los componentes de la peptona (Pfanstiehl Chemical Corporation), los cuales desafortunadamente por el momento son desconocidos, dado que no se ha podido obtener la fórmula de esta peptona, es la causante de la pérdida de fíbulas. Esto lo demostramos claramente utilizando bacto-peptona (Difco) con altas concentraciones de dextrosa, medios en los cuales, como será indicado posteriormente, se obtuvieron resultados muy distintos en la desdicariorización de micelios sumergidos, y no se presentó desdicariorización en los aéreos.

Los que esto escriben consideran y han comprobado en forma indirecta, que aparentemente la peptona (Pfanstiehl) tiene algunos componentes más reductores que

no se presentan en la bacto-peptona (Difco), la cual posee cistina y fierro en forma de ion férrico, que equilibrarían algo al sistema.

Se puede indicar que la peptona (Pfansstiehl) es muy probable que tenga componentes más reductores, dado que en cultivos en lámina en los que se logra una máxima oxigenación, las fíbulas no desaparecen con peptona al 1% y 6% de dextrosa. Sin embargo, pueden existir posibilidades mucho mayores que la citada por nosotros y que no únicamente sea el potencial de óxidoreducción el que cause desdicarioritización, sino su interacción con otros factores del medio. Por lo pronto, es importante indicar la influencia del medio en la morfogénesis de fíbulas, mientras se obtiene la fórmula de la peptona (Pfansstiehl), para poder entrar en detalles.

ESTUDIOS EN BACTO PEPTONA (DIFCO) Y DIVERSAS CONCENTRACIONES DE DEXTROSA

En general, en los micelios sumergidos de todas las cepas, en las porciones cercanas al inóculo, se encontraron fíbulas, independientemente de la concentración de dextrosa empleada.

El número de fíbulas en etapas iniciales, varía según la cepa y según la concentración de dextrosa, con tendencia a ser algo menor a medida que la concentración de dextrosa aumenta.

A medida que uno se aleja del inóculo, la proporción de áreas fibuladas va siendo cada vez menor, variando esto según la concentración de dextrosa y alternando áreas totalmente afibuladas con áreas fibuladas, hasta que las áreas fibuladas son eventuales y, finalmente se alcanza una desdicarioritización total.

Al principio, parece presentarse una desdicarioritización gradual pero una vez desdicarioritizado el micelio en determinadas áreas, el crecimiento del micelio afibulado

es más rápido, y la desaparición total de fíbulas más drástica.

Esto se presentó en todas las cepas estudiadas, con excepción de la cepa 106 (píleo) que en ninguna concentración de dextrosa llegó a perder las fíbulas y se encontraron muy numerosas, casi en cada dos células, aún después de un mes de realizada la siembra.

La cantidad de dextrosa tiene una influencia de cierta importancia para que la desdicarioritización total sea más rápida, pero no es tan drástica a como se podría pensar por los estudios hechos con peptona (Pfansstiehl), y no hace que en ningún momento el micelio se desdicarioritice desde etapas iniciales por un posible equilibrio del potencial oxidoreducción total dado por otras sustancias diferentes de la bacto-peptona, como es la cistina.

En la cepa 54 observamos también un comportamiento excepcional. En concentración de dextrosa de 5%, aún después de pasado un mes y 8 días de crecimiento, se presentaron numerosas fíbulas, en ocasiones cada dos células; tanto en porciones muy cercanas al inóculo, como en porciones intermedias y distantes de éste, no se encontró ninguna área afibulada.

En cambio, en concentraciones de 6% y 7% de dextrosa se observó una gradación en la pérdida de fíbulas, presentándose después de tres semanas una desdicarioritización total, en los micelios con 6% de dextrosa, y a los 18 días una desdicarioritización total en los micelios con 7%. En porciones cercanas al inóculo, aunque las fíbulas fueron abundantes en ambas concentraciones, se notó que en la concentración de 6%, eran más frecuentes cada dos células, y en ocasiones unas salían de otras mientras que su frecuencia fue más irregular en la de 7%, además de que había una que otra área afibulada.

Puede apreciarse que en esta cepa el patrón general de desdicarioritización es el mismo que en las otras, pero por alguna

causa se requieren, en este medio, condiciones más drásticas para que se presente. La diferencia en un gramo de dextrosa origina efectos suínamente marcados. Parece existir una concentración límite en la que se pierden dichas estructuras. Posiblemente esto sea debido a una concentración límite de determinados productos catabólicos tóxicos, que ocasionan dicha pérdida.

Los micelios sumergidos de las demás cepas se comportaron en la forma general descrita en la parte inicial de este estudio. La cepa 82 en medio con una concentración de 5% de dextrosa, en la porción cercana al inóculo, presenta numerosas fíbulas, en ocasiones cada dos células. Algunas hifas de pared ondulada y en cierto modo muy ensanchadas, que se tiñen intensamente con el azul láctico, carecen de fíbulas.

Hay algunas áreas en las que las fíbulas son algo escasas y muchas hifas carecen totalmente de ellas. En porciones de mayor crecimiento se observa una desdicarioritización parcial, con un 20% aproximadamente de hifas desdicarioritizadas; posteriormente, la proporción va aumentando y, a las tres semanas, ya únicamente se presenta una que otra fíbula; al mes, una desdicarioritización total, que en realidad parece haberse establecido antes de este tiempo, ya que áreas de desarrollo anterior, también estaban desdicarioritizadas.

Las cepas restantes siguieron más o menos el mismo comportamiento para esta concentración de dextrosa; en la cepa 4 la proporción inicial de fíbulas en una porción cercana al inóculo, fue menor que en las otras cepas. En varios casos, como en la cepa 4 y en la cepa 6, la desdicarioritización aparentemente se realiza por formación de ramificaciones subseptales, las cuales se presentan con una gran frecuencia.

En la cepa 103 también observamos que la porción cercana al inóculo tenía un número notablemente menor de fíbulas que las restantes, habiendo varias hifas afibu-

ladas, y en raras ocasiones presencia regular de fíbulas cada dos células. Esta cepa se desdicarioritizó totalmente, únicamente en un lapso muy ligeramente menor que la 82, a las 3 semanas y 2 días de realizada la siembra.

En concentración de dextrosa de 6%, las cepas presentaron en una porción próxima al inóculo numerosas fíbulas, pero en menor cantidad que en la concentración anterior, no siendo frecuentes cada dos células y habiendo un mayor número de hifas carentes de ellas. Se encontraron fíbulas en hifas regulares, vesiculosas, varicosas y serpentiformes; en algunos casos, como en la cepa 82, se presentaron hifas piliformes carentes de ellas, y en esta misma cepa, en etapa inicial, se observó una área pequeña con hifas no fibuladas. Aquí encontramos una hifa con dos fíbulas dirigidas en sentido contrario una de la otra hacia la misma célula; éste también sería uno de los mecanismos de desdicarioritización del micelio.

La cepa 103 presentó un área totalmente afibulada en porción próxima al inóculo. A los 15 días de sembradas las cepas, ya se encontraba en la mayoría, un 90% del micelio desdicarioritizado, siendo la desdicarioritización total más rápida que en 5% de dextrosa.

En una concentración de 7% de dextrosa, se notó que la desdicarioritización era más drástica. En porciones cercanas al inóculo, se observaron fíbulas confinadas a una cierta área; las áreas restantes carecen de ellas, aunque en el área en que se presentan puedan encontrarse cada dos células, esto indica que sí existe una influencia de la dextrosa, por el cambio que provoca en el potencial de oxidorreducción. En la cepa 103 las fíbulas, en la porción próxima, ya fueron extremadamente escasas.

A los 15 días de sembrados, todos los micelios presentaron desdicarioritización total.

En micelios aéreos, en concentración de 4% de dextrosa, se observan numerosas fíbulas muy frecuentes cada dos células, y que en ocasiones se presentan aun en bases de receptáculos; únicamente la cepa 103 presentó un menor número de fíbulas, con irregularidad en su presencia y con varias hifas carentes de ellas.

En dextrosa al 5% las observaciones fueron similares, pero al ir aumentando la concentración de dextrosa se observó que en la cepa 103, con 6% de dextrosa, el micelio presenta aún un gran número de fíbulas, pero mucho menor que el de otras cepas. Es importante indicar que las fíbulas tendieron a presentarse con mayor regularidad en las hifas ensanchadas y, en cambio, se encontró un área de hifas muy regulares, en la que estas estructuras tenían una franca tendencia a disminuir, siendo sumamente escasas, y estando ausentes en un gran número de hifas. En las cepas restantes excepto 106 (estípite) y 106 (píleo) en concentración de 7% de dextrosa, entre porciones muy fibuladas, se encontraron pequeñas áreas en las cuales las fíbulas tendían a ser muy escasas y eventuales. Es de gran interés indicar que, en concentraciones altas de dextrosa los micelios aéreos presentan una tendencia a la disminución localizada de fíbulas, y sobre todo que en todos los casos se encontró confinada a cierto tipo de hifas, particularmente a las más regulares; en cambio, las ensanchadas las poseen en una proporción mucho mayor. Esto es de gran interés, y totalmente opuesto a las ideas del Dr. A. Teixeira, (1960, 1962 a y b) quien sostiene que las hifas ensanchadas, evolutivamente deben ser afibuladas, ya que en ellas no hay problema en el paso de núcleos para la dicarionización del micelio, mientras que las hifas más delgadas deben poseer fíbulas para facilitar el paso de núcleos. Sus estudios fueron basados en cuerpos fructíferos de poliporáceos. No se considera que el comportamiento de las fíbulas sea diferente en los micelios dicarióticos con

relación al de un cuerpo fructífero. No se considera que pueda ser sostenida su teoría, por lo siguiente:

1ª Durante el proceso de formación de una fíbula hay citodíéresis y, simplemente, los núcleos podrían pasar libremente antes de la formación del septo hifal, sin necesidad de pasar por la fíbula. 2ª Normalmente, por la fíbula pasa uno solo de los núcleos, mientras que el otro se une a su respectivo núcleo compatible en la forma anteriormente citada, de manera que parece haber un cierto grado de atracción entre núcleos compatibles, sin que la fíbula sea necesaria para su paso. Aparentemente a este autor le pasó inadvertido que el septo doliporo se forma después de que los núcleos han emigrado, uno hacia la fíbula y otro a la región apical de la hifa, entonces sí, impidiendo el paso de mayor número de núcleos y la consiguiente disolución del dicarion.

Una hifa ensanchada tendría los mismos problemas de paso nuclear que una delgada. Se considera, de acuerdo con varias observaciones, que las hifas ensanchadas necesitan un mayor flujo citoplasmático en el que ayudan notablemente las fíbulas ya que el flujo queda duplicado en un momento dado, probablemente cuando el núcleo de la fíbula emigra a la penúltima célula de la hifa. Sin embargo, se hace hincapié en que esto no es más que una hipótesis personal, y que el problema no podrá dilucidarse hasta que haya mayores conocimientos sobre la fisiología de las fíbulas. Por lo pronto, es de gran interés el hecho de que las fíbulas se presenten en un tipo de hifas y en otro no, lo que podría ser una indicación más de diferenciación fisiológica en las distintas hifas de un micelio.

ESTUDIOS EN CZAPEK-BOX LÍQUIDO

Todas las cepas presentaron un crecimiento extremadamente raquítico; a los 2 meses y 10 días de sembradas, algunas

presentaron apenas unos cuantos milímetros, y la que mayor crecimiento alcanzó (cepa 5), no llegaba a 1 cm del fondo del tubo.

Los estudios fueron hechos en micelios sumergidos, observándose en todas las cepas, después de dos meses y medio de sembradas, un gran número de fíbulas, en la mayoría de las ocasiones cada dos células. El hecho de que las fíbulas se hayan presentado con tanta regularidad después de haber transcurrido un tiempo tan largo desde la siembra puede deberse a lo siguiente:

En primer lugar, el micelio presentó un crecimiento tan raquítico que no originó un consumo de oxígeno tal, que pudiera agotarlo en un cierto grado del fondo del tubo; asimismo, debido al crecimiento tan raquítico, no hubo una acumulación grande de productos catabólicos o de CO_2 que pudiese causar la desdicariorización del micelio. Por otro lado, hay que considerar que en este medio se presenta sulfato ferroso precipitado en el fondo del tubo, el cual desde luego en un principio actuaría como reductor, pero observamos que posteriormente la mayor parte de él se había transformado en sulfato férrico por la entrada de oxígeno atmosférico; en esta etapa aún no iniciaba su desarrollo el micelio, o apenas y se esbozaba, por lo que podría considerarse que esta substancia, actuando como oxidante, pudo haber ayudado en cierta manera al mantenimiento de las fíbulas.

También se comprobó con este estudio que un pH cercano al neutro no tiene influencia sobre la morfogénesis de fíbulas, dado que, el Czapek-Dox líquido, presenta un pH de 7.3.

ESTUDIOS EN CZAPEK CON CANTIDAD TRIPLE DE SALES

Este estudio se hizo con el objeto de observar si la presión osmótica tiene una cierta influencia en la morfogénesis de las

fíbulas, habiéndose demostrado claramente que una presión osmótica elevada no altera la morfogénesis de dichas estructuras. Además, se hizo este estudio, con el objeto de observar los efectos de una mayor cantidad de sulfato ferroso, precipitada en el medio.

El medio fue Czapek simple, triplicando la cantidad de cada una de sus sales, y manteniendo normal la proporción de sacarosa.

Todos los micelios presentaron un crecimiento muy raquítico, aunque ligeramente más abundante que en el Czapek-Dox líquido.

En general, en todas las cepas sumergidas y semisumergidas estudiadas, se observó una persistencia de fíbulas, en la mayoría de los casos cada dos células. A este respecto podemos indicar que, en este caso, al igual que en Czapek-Dox líquido, debido al desarrollo raquítico del micelio, no se logró acumular gran cantidad de catabolitos ni de CO_2 .

Lo más interesante de indicar es que en algunas cepas, como en la cepa 5 en la que, en el fondo del tubo, el fierro se encontraba precipitado en forma ferrosa más que férrica, se observó una pequeña área totalmente carente de fíbulas.

Esta presentó hifas regulares, el resto del micelio era muy fibulado, con fíbulas presentes aun en las hifas vesiculosas.

En otros casos, como en la cepa 82, en uno de los tubos que presentaba precipitado de sulfato férrico dominante, había una gran cantidad de fíbulas, en varias ocasiones cada dos células, sin presentarse áreas desdicariorizadas, mientras que en el otro, en el que había un mayor precipitado de sulfato ferroso, se observaron varias áreas en que las hifas presentan condensaciones citoplasmáticas y que carecen de fíbulas. Las áreas con hifas que no poseen estas características, son muy fibuladas, al igual que en el caso anterior.

En algunos casos, como en la cepa 106 (estípita), se presenta reproducción ase-

xual, o iniciación de ésta, formándose varias áreas con hifas en las que se condensa el citoplasma; muchas de éstas poseen fíbulas pero ocasionalmente se forman áreas afibuladas.

Como resultado de este estudio se ve una influencia clara del ion ferroso como reductor, sobre la morfogénesis de fíbulas. Hay que considerar que en los casos en que se presentó, su efecto fue claro, y que parece ser más drástico que el efecto con altas concentraciones de dextrosa, ya que las porciones desdicariorizadas eran muy cercanas al inóculo, que además, el fierro se encontraba precipitado y que su constante de disociación no es demasiado alta.

En los micelios aéreos en general, se presentaron fíbulas cada dos células. Ocasionalmente algunas presentaron hifas pili-formes carentes de fíbulas, o bien algunas hifas intensamente teñidas con el azul láctico, también afibuladas.

ESTUDIOS EN MEDIO SINTÉTICO
(MODIFICACIÓN DE CZAPEK HECHA POR LOS
AUTORES, CON LA FÓRMULA INDICADA
AL PRINCIPIO DE ESTE TRABAJO)

Se preparó este medio con la intención de observar el efecto de una alta concentración de dextrosa en la morfogénesis de fíbulas en un medio de fórmula conocida, así como para ver el efecto de un pH muy ácido en la morfogénesis de dichas estructuras. El pH fue de 4.1, y se observó en forma clara que no afecta a la morfogénesis de las fíbulas. El crecimiento de los micelios fue muy raquítico, llegando a presentar, como máximo, 1.5 cm al mes y medio de sembrados.

En la mayoría de las cepas se encuentra una gran cantidad de fíbulas, en ocasiones cada dos células, pero unas cepas tienden a presentar desdicariorización parcial, con algunas áreas afibuladas en una forma más precoz que otras y, además, se observa en

forma clara que la desdicariorización, en los casos en que se presenta, es más rápida que en los micelios con altas concentraciones de dextrosa, y bacto-peptona (Difco) al 1%.

Así, la cepa 82 que creció menos de un centímetro, en la porción distal al inóculo, presentó varias anastomosis en "H" que tendían aparentemente a desdicariorizar al micelio ya que, frecuentemente, se une una hifa fibulada con una no fibulada. Lo más importante es que en esta área se presentó una mayor tendencia a la desdicariorización. Aunque había hifas fibuladas y algunas con numerosas fíbulas, ya se presentaron algunas zonas carentes de dichas estructuras; en esta cepa la iniciación de la desdicariorización es más precoz que las restantes. En preparaciones hechas con porciones más cercanas al inóculo, se observó que la cepa era un dicarion perfecto, con fíbulas prácticamente cada dos células. En una hifa de esta porción se notó que no todas las fíbulas siguen el mismo sentido, sino que una de ellas se invierte.

También se encontraron, en una hifa, dos fíbulas en un mismo septo. En la cepa 4 se presentan, en la mayor parte, numerosas fíbulas; pero estas áreas alternan con áreas totalmente carentes de dichas estructuras, a pesar de que el micelio presentó un crecimiento demasiado raquítico, teniendo únicamente unos cuantos milímetros después de mes y medio de sembrado.

En algunos casos, ocasionales, unas áreas se encontraron desdicariorizadas por presencia de hifas con condensaciones citoplasmáticas que estaban en etapa inicial de reproducción asexual. En cambio, la cepa 5 presentó un crecimiento mayor que las restantes, habiendo alcanzado cerca de 2 cm y, sin embargo, no presentaba ninguna área desdicariorizada.

La cepa 103 presentó bastantes fíbulas, pero en mucho menor proporción que las restantes, y zonas con varias hifas afibuladas. En esta cepa observamos que la

desdicariorización en algunos casos se realiza de la siguiente forma:

En varias ocasiones observamos que se forma una especie de fíbula en el septo, formándose las dos ramas telemórficas normales y dirigiéndose una hacia la otra, pero en lugar de anastomarse, se continúan formando ramas que se entrecruzan en "X".

En la cepa 106 (estípito) también se encontraron áreas donde las fíbulas disminuyen considerablemente, careciendo varias hifas de ellas. Esto se encontró particularmente en áreas donde el citoplasma de las hifas tiende a condensarse en forma irregular.

En conclusión, de los resultados obtenidos en este medio sintético, se observó que los efectos de la dextrosa en el potencial de oxidorreducción total, desdicariorizan al micelio aunque sea parcialmente en forma más rápida que con altas concentraciones de dextrosa y bacto-peptona, con lo que definitivamente se comprueba, que la bacto-peptona, amortigua un poco los efectos de desdicariorización por la presencia de cistina y hierro.

ESTUDIOS EN CALDO EXTRACTO DE MALTA + SULFATO FERROSO 0.03%

Los cultivos fueron sellados inmediatamente, para evitar la oxidación del hierro.

La mayoría de las cepas no crecieron a una concentración tan elevada y tóxica; pero los micelios sumergidos de las cepas 106 (estípito), 4 y 6, crecieron en forma algo raquítica. Se observó que en todas las cepas, el micelio se desdicariorizó desde etapas iniciales de desarrollo, no presentándose ninguna fíbula en porciones cercanas al inóculo. Tampoco presentaron fíbulas dos micelios aéreos de la cepa 106 (estípito).

Se observó claramente que un oligoelemento, en cantidades tóxicas, fácilmente causa desdicariorización total del micelio.

El hierro, posiblemente, actuaría en forma tóxica, por formación de quelatos con el ATP.

Ya han sido hechos algunos estudios sobre el efecto de sustancias tóxicas, en desdicariorización de micelios (Erwin Da Costa y R. Kerruish, 1962; Amburgey A. S., 1967), pero éstos únicamente hacen referencia a desdicariorización por compuestos arsenicales y por cobre. Actualmente los que esto escriben están realizando un estudio con distintas concentraciones de sulfato ferroso ya que, como se pudo demostrar en medio sintético éste no sólo actuaría por toxicidad enzimática o por unión con sustancias altamente energéticas, sino también por los cambios que provoca en el transporte de electrones y potencial de oxidorreducción total.

ESTUDIOS DE MICELIOS AÉREOS INCLINADOS, SELLADOS CON PARAFINA, EN CALDO- EXTRACTO DE MALTA Y EN PEPTONA (PFANSTIEHL) AL 1%, DEXTROSA AL 4% CON LA FINALIDAD DE OBSERVAR LOS EFECTOS DE LA ACUMULACIÓN DE CO₂ EN DESDICARIOTIZACIÓN DE MICELIOS

Los micelios en un principio crecieron con cierta rapidez, debido a que había suficiente cantidad de oxígeno en los tubos, presentando todas las cepas un crecimiento denso; a medida que el O₂ se fue agotando y se presentó una cantidad mayor de CO₂, el crecimiento fue muy raquítico y lento. Algunas cepas, como la 82 y 103, dejaron de crecer a las tres semanas de hecha la siembra; otras, continuaron creciendo hasta los dos meses, en que el estudio se dio por terminado, y en éstas se empezó a observar una zonación después del área de crecimiento denso, presentándose áreas de crecimiento esparcido.

En varios casos, los micelios formaron una intensa cantidad de exopigmento anaranjado.

En la cepa 82 que únicamente alcanzó un cierto crecimiento, aparentemente hasta que agotó el oxígeno disponible, se observó, durante un estudio hecho en todas las zonas de micelio, que las fíbulas se conservan en una gran cantidad en todo el micelio, tanto en porciones próximas como intermedias o muy distantes al inóculo. En la mayoría de los casos se observaron cada dos células, y en varias ocasiones, unas saliendo de otras. En uno de los tubos de esta cepa, en que se observó un crecimiento ligeramente mayor que en el otro, se presentaron dos tipos de hifas: ensanchadas y muy fibuladas e hifas delgadas con condensaciones citoplasmáticas irregulares; estas hifas, en ocasiones, presentaban fíbulas, pero en general su proporción fue mucho menor que la de las hifas restantes. Aquí, ya había una cierta tendencia a desdicariorización del micelio.

Del estudio en esta cepa se pudo concluir que una cierta cantidad de CO_2 producida por el metabolismo del micelio, no influye en la morfogénesis de fíbulas, si el crecimiento podía continuarse y la cantidad de CO_2 llegaba a cierto límite, se iniciaba la desdicariorización.

De aquí se empezó a sospechar que en las cepas que habían crecido más, se presentarían, en un determinado momento, áreas desdicariorizadas, lo cual efectivamente fue observado en otras 3 cepas estudiadas hasta el momento. Así, en las cepas 54, 106 (píleo) y 106 (estípito), se hicieron las siguientes observaciones: en áreas de crecimiento denso, se presentaron hifas con una cantidad muy numerosa de fíbulas, siendo muy frecuentes cada dos células; esto se encontró en las porciones próxima e intermedia con relación al inóculo, pero en la porción más distante, de crecimiento esparcido, que era la más reciente, se presentó bruscamente una desdicariorización total del micelio.

Esto indicaba, claramente, que el CO_2 sí favorece la desdicariorización del micelio

y que, en el caso de la cepa 82, el CO_2 bloqueó el crecimiento antes de que la desdicariorización se hubiese iniciado.

En una zona de crecimiento denso de la cepa 54, que se extendió abarcando el área inferior de la porción inclinada del tubo, y que era de formación reciente, prácticamente no se presentaban fíbulas; éstas se encontraban notablemente disminuidas y su presencia era únicamente eventual en las hifas, las cuales en su mayoría presentaban citoplasma condensado en forma algo irregular, y algunas de las fíbulas, que eventualmente fueron encontradas, formaban protoplastos. De esta zona salía un área de crecimiento esparcido, totalmente carente de fíbulas.

Observamos que, en medios con peptona al 1% - dextrosa al 4%, la desdicariorización era más rápida que en los cultivos hechos en caldo-extracto de malta.

Claramente se estableció que el CO_2 es uno de los factores que influyen en la desdicariorización, y podría fácilmente ser uno de los factores causantes de la desdicariorización en micelios sumergidos, aunque no se piensa que este sea el único factor que influye en la ausencia de fíbulas, por otros datos que hemos encontrado y que dan evidencia de la posibilidad de la existencia de otros factores, como se indicará posteriormente en la discusión del presente trabajo.

ESTUDIOS DE TRANSFERENCIA DE MICELIOS SUMERGIDOS AFIBULADOS O CON ESCASA CANTIDAD DE FÍBULAS A MALTA AGAR, CON LA FINALIDAD DE OBSERVAR SI SE PRESENTA RECUPERACIÓN DE FÍBULAS

No fue posible hacer estudios de transferencias de todos los medios empleados en el presente trabajo pero, en general, de varias transferencias hechas se observó lo siguiente:

Cuando hay una ausencia total de fíbulas en el inóculo, éstas no se recuperan en los micelios obtenidos en malta-agar. Aparentemente, la desdicarionización origina heterocariones de diversos tipos, muchos de los cuales, en morfología microscópica, tienen similitud con el heterocarion común B de *Schizophyllum commune* (Raper J. R.); por la presencia de pseudofíbulas o de ramificaciones subseptales, estos heterocariones frecuentemente se monocariotizan en malta-agar inmediatamente después de ser transferidos a este medio, o bien después de una o dos resiembras. El diagnóstico del monocarion se hizo por comparación con la morfología de monocariones obtenidos de cultivos monospóricos, la cual es exactamente la misma, presentándose una fase oidial intensa con numerosas cabezuelas conidiosporíferas y numerosas hifas serpentiniformes. No se pudo recurrir a otro tipo de diagnóstico, dado que se han encontrado grandes dificultades de tinción nuclear en micelios de *Psilocybe caerulescens*.

Actualmente se investiga si en los monocariones así obtenidos, hay dominancia selectiva de uno de los núcleos, o bien si no hay pérdida total de uno de ellos.

Se considera que la selectividad nuclear, puede variar según el tipo de tratamiento empleado para la desdicarionización.

Actualmente se ha iniciado únicamente este estudio, pero ya se tiene el resultado de una de las cepas. La cepa 106 (estípita) que se desdicarionizó totalmente en micelio sumergido en lacto-peptona (Difco) al 1% - dextrosa al 5%, que al ser sembrada a malta-agar se monocariotizó; tomando la morfología anteriormente indicada, varias porciones monocarióticas de este micelio fueron tomadas y sembradas en cajas de Petri, con inóculos muy cercanos, para observar el entrecruzamiento.

De uno de los entrecruzamientos se obtuvo un dicarion, pero no perfecto, que aún

presentaba algunas áreas afibuladas. Esto indicaba que, al menos en este caso, no se presenta pérdida de un núcleo, aunque aparentemente parece haber una mayor frecuencia de uno de los componentes del dicarion que del otro.

Se está realizando este estudio en el momento y, por lo pronto, únicamente se presentarán los datos iniciales.

Este fue el primer caso de obtención de un dicarion, a partir de micelios desdicarionizados, en el presente trabajo. Por otro lado, al sembrar en malta-agar micelios con unas cuantas fíbulas, sí se obtiene una recuperación bastante buena del dicario. Esto se observó en varios casos, y en forma particularmente clara, en una transferencia de la cepa 103 obtenida en medio de Raulin con 10 cc; en esta cepa se observaron escasas fíbulas, y al ser transferida a malta-agar, hubo una gran recuperación del dicarion, habiendo en numerosos casos fíbulas cada dos células. Esto hace pensar que el micelio desdicarionizado poseía en cada célula un núcleo, y que habiendo un cierto número de células dicarióticas, hubo una posibilidad de fácil paso nuclear por anastomosis, restableciéndose el dicarion. Esta interpretación es muy distinta, a decir que el dicarion se restablece cuando vuelve a condiciones adecuadas de medio, lo cual no parece suceder en ningún caso en que la desdicarionización haya sido de 100% en la porción de micelio empleada para la transferencia. Por otro lado, si consideramos que puede haber recuperación en condiciones de mejor oxigenación, los micelios aéreos provenientes de cultivos sumergidos deberían presentar una cierta cantidad de fíbulas, cosa que nunca se llegó a observar. Sobre los resultados obtenidos en el presente trabajo, debe indicarse que discrepan de los resultados obtenidos por Hans von Kniep, quien indica que cultivos sumergidos de *Schizophyllum commune* pierden las fíbulas, y que al pasarlos a medio normal las recuperan iguales a como

las tenían inicialmente. Se considera que este autor no utilizó micelios perfectamente desdicariorizados, como sucedió en los casos ya citados. Además, una recuperación total

de un dicarion, a partir de un heterocarion, es más difícil sin una previa monocariotización. Hans von Kniep no indica si sus cultivos se monocariotizaron.

DISCUSIÓN

Aunque la morfogénesis de las fíbulas se encuentra genéticamente controlada por la interacción de los núcleos existentes en el heterocarion especializado llamado dicarion, la potencialidad de expresión de éste se presenta únicamente bajo ciertas condiciones del medio.

En general, podemos decir que no es un solo factor el determinante de la desdicariorización del micelio que se expresa en la ausencia de fíbulas, sino que actúa un conjunto de factores cuya acción final es, en muchos casos, indirecta, sobre un factor limitante de gran importancia en la desdicariorización, que en nuestro caso vendría a ser el potencial de oxidorreducción total del medio y la cantidad total de CO_2 que éste presenta.

El control genético intrínseco de la morfogénesis de fíbulas, independientemente del medio, lo observamos claramente en la cepa 107, que tuvo una desdicariorización espontánea; asimismo, observamos este control en varias cepas que tienden a desdicariorizarse, unas más rápidamente que otras, después de varias resiembras sucesivas en un mismo medio. Esto podría ser debido a que los factores de compatibilidad A y B están formados por lo menos por dos subunidades, cada una de las cuales se encuentra compuesta de una serie de alelos múltiples, estando controlada la expresión total de cada factor A o B por la composición individual de cada subunidad, y puede suceder que, en algunos casos, los alelos de una subunidad sean algo menos viables que en otros, lo que originaría la

tendencia a una desdicariorización algo más rápida.

En general, el dicarion de *Psilocybe caerulea* es muy estable, y factores mecánicos como la resiembra, tienen poca influencia en la desdicariorización, variando el tiempo de viabilidad de un dicarion perfecto, por los factores intrínsecos de la cepa. Sin embargo, aunque muy ligera, la influencia de estos factores, desde luego, ayuda a la desdicariorización ya que, en resiembras sucesivas, se pueden ir tomando varios fragmentos monocarióticos que contribuirán a un aumento de áreas desdicariorizadas que, en varias ocasiones, podrán ser heterocarióticas, debido a la existencia de un fenómeno de Buller unilateral, en ciertos casos.

El hecho de que algunas cepas como la 106 (pileo) no presenten desdicariorización aún después de 25 resiembras, podría ser debido a la existencia de un fenómeno de Buller bilateral, lo cual se tratará de comprobar con mayor claridad.

La presencia de un fenómeno de Buller bilateral haría que las partes monocariotizadas tuviesen la posibilidad de volverse a dicariorizar, aceptando núcleos compatibles de las porciones dicarióticas.

En las cepas en las que se observó desdicariorización espontánea, ésta generalmente se originó por formación de oidios monocarióticos.

De nuestros estudios realizados en diversos medios líquidos, se pudo concluir que ciertos factores físicos no influyen en la desdicariorización del micelio; así, la ten-

sión superficial menor que se encuentra en el fondo de un tubo, en relación con la que se presenta en el micelio aéreo, no interviene en la desdicarioritización, lo que se comprobó claramente porque todos los micelios presentaban fíbulas en etapas iniciales de desarrollo.

Por otro lado, se comprobó que la presión osmótica elevada tampoco influye en la desdicarioritización del micelio, dado que los micelios sumergidos, obtenidos en Czapek modificado con cantidad triple de sales fueron muy fibulados, este dato fue precisamente el que hizo considerar que los efectos de desdicarioritización obtenidos en altas concentraciones de dextrosa, no eran debidos a presión osmótica, sino al potencial total de oxidorreducción.

El pH neutro o muy ácido, no influye en forma directa ya que, por ejemplo, se tuvo un pH inicial muy ácido (4.1) en medio de Czapek modificado por nosotros con asparagina y dextrosa, y este pH no influyó en la pérdida de fíbulas en etapas iniciales del desarrollo del micelio; sin embargo, el pH actúa indirectamente por su influencia en el potencial de oxidorreducción.

Observamos que los factores químicos son la causa primordial de la desdicarioritización, y los distintos medios de cultivo afectan a ésta, pero en la mayoría de las ocasiones no es la acción directa de un determinado medio con X sustancias, la que provoca la desdicarioritización, sino la acción que éste pueda tener sobre determinado factor limitante que origina la pérdida de fíbulas, es decir, no hemos demostrado que una determinada sustancia de un medio de cultivo actúe desdicarioritizando al micelio por sí misma, sino siempre hay una interacción de factores, de los cuales uno es el factor limitante más importante. Esto lo podemos generalizar para todos los medios estudiados, con excepción del caso del caldo-extracto de malta - sulfato ferroso en que es directamente la toxicidad del

Fe^{2+} la causante de la desdicarioritización, lo que se refleja claramente en una pérdida de fíbulas desde las etapas iniciales del desarrollo, hecho no observado en ningún otro medio, excepto en peptona (Pfanstiehl) con altas concentraciones de dextrosa, pero en la que claramente se demostró que la desdicarioritización en etapas iniciales no es por la peptona o por la dextrosa, dado que en micelios con bajas concentraciones de dextrosa no hay desdicarioritización en etapas iniciales, sino que es debida al efecto de esta sustancia sobre el potencial de oxidorreducción.

En general logramos demostrar dos factores que determinan la estabilidad de un dicarion:

- 1) Potencial total de oxidorreducción alto.
- 2) Oxigenación adecuada (actuando sobre el primer factor), y liberación adecuada del CO_2 del medio de cultivo.

Los estudios de micelios agitados en caldo-extracto de malta demuestran claramente que el mantener una oxigenación adecuada y permitir la liberación del CO_2 hace que los micelios sumergidos no lleguen a desdicarioritizarse.

En general se observó que, en todos los medios, la desdicarioritización se realiza con relación al tiempo y casi nunca se presenta en etapas iniciales de desarrollo; esta observación implica directamente que ciertos productos catabólicos del micelio son los causantes de la pérdida de fíbulas, ya que se necesita que éste llegue a determinada etapa de desarrollo para que se presente la pérdida de fíbulas. El hecho de que la desdicarioritización sea gradual, implica que hay una determinada sustancia que está aumentando en concentración en el medio y que, al alcanzar un cierto límite, desdicarioritiza totalmente al micelio.

De acuerdo con los resultados obtenidos en cultivos aéreos sellados, se podría pos-

tular que, en todos los casos, en micelios sumergidos, la desdicarioritización podría ser causada por una acumulación de CO_2 en el medio, si bien este puede ser uno de los factores condicionantes de la pérdida de fíbulas, como se demostró en los cultivos sellados; no se considera tampoco que su efecto sea tan drástico, ya que hay una cierta tolerancia al CO_2 , manteniéndose el dicarion como un dicarion perfecto hasta ciertos límites muy amplios de concentración de CO_2 , así, por ejemplo, en la cepa 82 la concentración de CO_2 llegó a un límite tan elevado que logró inhibir el crecimiento; sin embargo, todo el micelio que se había desarrollado, hasta ese momento, seguía como un dicarion perfecto. Esto indica que las concentraciones de CO_2 necesitan ser algo elevadas, para poder causar la desdicarioritización.

En las cepas restantes, se observó una mayor tolerancia de CO_2 en el crecimiento, manteniéndose éste aún después de un mes de la siembra, aunque ya a esas concentraciones mayores de CO_2 el micelio se desdicarioritiza totalmente.

En conclusión, consideramos que, aunque la acción del CO_2 es clara, lo más probable es que éste no sea el único factor que interviene en la pérdida de fíbulas en micelios sumergidos, dado que su concentración no llega a ser extremadamente drástica, debido a que hay salida continua de este gas, aunque su difusión sea algo lenta. El hecho de tolerancia de grandes cantidades de CO_2 para el crecimiento, nos puede indicar la existencia de un cierto tipo de metabolismo microaerofílico, de cuya existencia se tienen ya ciertas evidencias por estudios recientes hechos con azida de sodio 10^{-4} M, en los que se observó que el crecimiento de micelios sumergidos no se bloquea. De acuerdo con esto, podemos emitir la hipótesis sobre la posibilidad de existencia de sustancias tóxicas, producto de un metabolismo microaerofílico, como

causantes de desdicarioritización de *Psilocybe caerulea*, aparte de los factores ya citados.

El potencial de oxidorreducción total es el límite más importante en la desdicarioritización, influyendo directamente en el lapso en el que ésta se presenta, ya que se observó una clara disminución en relación con el tiempo, para lograr una desdicarioritización total a medida que se aumentan las concentraciones de dextrosa.

Los resultados obtenidos con peptona (Pfanstiehl) y altas concentraciones de dextrosa, también revelan la clara influencia de este factor; posiblemente, si se hubiese aumentado más la cantidad de dextrosa en los estudios hechos con dextrosa y bacto-peptona, de acuerdo con los resultados obtenidos hasta el momento, se llegaría a un punto en que, si la concentración de dextrosa permite aún el desarrollo del micelio, las fíbulas se perderían desde el origen de éste. Con esto se quiere indicar que los resultados obtenidos con peptona (Pfanstiehl) son muy similares a los obtenidos con bacto-peptona, excepto que existe una diferencia en el límite de concentración al que se pierden las fíbulas por la amortiguación en el potencial redox que proporciona la cistina. También es importante indicar el hecho de que, al aumentar el potencial de oxidorreducción, aumenta la proporción de fíbulas en micelios aéreos, con relación a la cantidad existente en malta-agar, o evita que se presente la desdicarioritización total en micelios sumergidos.

La acción de altas concentraciones de dextrosa es debida, por un lado, a una posible mayor concentración de CO_2 , ya que existe mayor cantidad de sustrato que se puede metabolizar; sin embargo, ésta no sería su única acción, ya que el coeficiente económico es bajo y el micelio tiende a crecer menos en mayores concentraciones de dextrosa, lo cual podría implicar que no toda la cantidad que se presenta, es

aprovechada en la misma proporción; sin embargo, una cierta cantidad mayor podría ser aprovechada, y esto originaría un acúmulo más rápido de CO_2 .

Observamos que la acción de los distintos factores y el límite al que éstos actúan varía según la cepa, por caracteres genéticos intrínsecos de ésta, pero en general, los mismos factores desdicarioritizaron a todas las cepas variando únicamente la relación cuantitativa de ellos, necesaria para la pérdida de fibulas, excepto en la cepa 106 (pileo), en que la desdicarioritización se presentó en una forma irregular en unos medios y en otros nunca se presentó. Aunque se carece de una explicación 100% segura sobre el comportamiento de esta cepa, se observa que, en algunos medios, como en bacto-peptona con alta concentración de dextrosa, el micelio aéreo produce un pigmento anaranjado muy intenso que, en ocasiones, no únicamente se presenta en la base, sino también en las hifas aéreas. Estos pigmentos parecen ser del tipo de las quinonas, y se observó que, cuando se presentan, en ese mismo medio, el micelio sumergido no pierde las fibulas. Esto podría indicar que, en la fase terminal de la respiración, esta cepa tiene la posibilidad de seguir su metabolismo por otra vía (quinonas), lo cual ayudaría a que la desdicarioritización no se presentara; esto estará correcto considerando, como se ha demostrado, que para todas las demás cepas, la existencia de una cierta cantidad de oxígeno molecular, es primordial en el mantenimiento del dicarion.

Se hace notar que, en nuestro trabajo, no se asegura el tamaño del inóculo porque inicialmente no se considera que éste pudiese influir; pero, de acuerdo con los resultados obtenidos, éste sería un factor importante, ya que una mayor cantidad de inóculo podría originar una aceleración en el metabolismo que, a su vez, implicaría un acúmulo más rápido de CO_2 y otros productos catabólicos, lo que da un

ligero error al considerar la desdicarioritización con relación al tiempo, para las diversas cepas sembradas en un mismo medio.

Por otro lado, para hacer que los resultados de una determinada cepa sean comparables en los distintos medios, sería más correcto considerarlos en función de la velocidad de crecimiento del micelio en cada uno de esos medios. Nuestros resultados ya muestran diferencias drásticas en la desdicarioritización, dependientes del potencial de oxidorreducción, pero se puede asegurar que éstos tienen un límite de error y que las diferencias serían más marcadas considerando los factores anteriormente indicados.

La desdicarioritización del micelio generalmente originó heterocariones de diversos tipos, aunque se observó que en algunos medios, como el de Kaufmann, la desdicarioritización se realiza por formación de oídios, que suponemos son monocarióticos, debido a la ausencia total de fibulas.

Los distintos tipos de heterocariones, en general, tienden a monocariotizarse al ser transferidos a malta-agar o bien después de un cierto número de resiembras.

Existen varios mecanismos de desdicarioritización para formación de heterocariones; uno de ellos, que se observa muy frecuentemente, fue la presencia de ramificaciones subseptales; otro, la presencia de fibulas dirigidas en sentido opuesto hacia una misma célula, la cual queda heterocariónica, o bien se disuelve formándose dos hifas terminadas en gancho que quedarían heterocariónicas por paso de los núcleos de la célula que se disolvió.

De los resultados obtenidos en transferencias de micelios parcialmente desdicarioritizados a malta-agar, puede apreciarse que aparentemente existe un fenómeno de Buller unilateral que permite que la totalidad del micelio se vuelva a dicarioritizar, lo que nos explica resultados como

el obtenido de una transferencia de micelio parcialmente desdicarioritizado de medio de Raulin a malta-agar.

Se observó que no hay una recuperación de fíbulas en micelios totalmente desdicarioritizados transferidos a malta-agar, pero que el heterocarion, al monocarioritizarse, tiene la posibilidad de permitir que se segreguen los dos tipos de núcleos compatibles y que, en entrecruzamientos o en re-
siembras sucesivas, vuelva a formar un dicarion, como fue observado en estudios sobre la cepa 106 (estípite); aparentemente, la frecuencia de uno de los núcleos genéticamente compatibles parece ser menor que la del otro, dado que debería presentarse un mayor número de dicariones en los entrecruzamientos, que el observado; aproximadamente el 90% de los entrecruzamientos no originan micelios dicarióticos.

Por otro lado, se considera que distintos tipos de tratamiento dan origen a distintos tipos de heterocariones que, a su vez, al monocarioritizarse, lo podrían hacer de forma diferente, dando origen, en ocasiones, a micelios en que uno de los núcleos se haya perdido en su totalidad.

El hecho de tener la posibilidad de obtener monocariones por diversos métodos a partir de cultivos dicarióticos, es de una gran importancia para estudios genéticos, particularmente en los casos en que se lo-
gran recuperar los dos componentes del dicarion, lo cual es de gran utilidad en los casos en que no se puede obtener cultivos monospóricos, o bien las basidiosporas germinan con una gran dificultad.

Del presente trabajo, se concluye que el dicarion se desarrolla bajo condiciones de medio más restringidas que el heterocarion y que el monocarion.

Interesa indicar el hecho de que, en los diversos micelios, las fíbulas predominan en un tipo de hifas como en las ensanchadas, y su proporción sea menor en las delgadas, o bien que haya hifas, como

en varias ocasiones observamos, que son de pared ondulada, que se tiñen intensamente con el azul láctico y que carecen totalmente de fíbulas; esto podría hablar de un cierto grado de diferenciación fisiológica en las hifas del micelio antes de la formación del carpóforo, pero, en nuestro caso, no se observó lo encontrado por A. Lecha Teixeira en los carpóforos. Este autor encontró que en los carpóforos, las hifas esqueléticas son las que carecen de fíbulas, mientras que éstas se presentan en hifas generatrices. En el presente trabajo se encontró que, en bacto-peptona al 1% con altas concentraciones de dextrosa, en los micelios aéreos se presentaban numerosas hifas de membrana de color pardo, que serían el equivalente de las hifas esqueléticas de un carpóforo, y éstas, sin excepción, siempre se encontraron fíbulas cada dos células. Se considera que, en el interior del carpóforo, a veces se pueden realizar pérdidas de fíbulas por una oxigenación deficiente, particularmente en carpóforos más compactos, sin que esto, por lo tanto, sea un carácter de valor taxonómico.

Por último, haciendo una reconsideración general, de los mecanismos de desdicarioritización descritos en el presente trabajo y considerando que los micelios, en la naturaleza, en varios casos, se encuentran a una gran profundidad en el sustrato, como sucede con la especie aquí estudiada, particularmente la forma que se encuentra en los barrancos, existe una gran posibilidad de que fenómenos de desdicarioritización continuos estén ocurriendo en la naturaleza, lo cual originaría un desequilibrio que finalmente se traduciría en una restricción del número de cuerpos fructíferos formados. Por otra parte, sería posible, posteriormente, la recombinación de los monocariones, formándose nuevamente la fase dicariótica perfecta en zonas del sustrato más próximas a la atmósfera.

LITERATURA

- AHMAD, S. S. Comunicación personal.
- AINSWORTH, G. C. & SUSSMAN, A. S. 1966. *The Fungi* Volumen I, II. Academic Press.
- ARNAUD, G. 1951. Les boucles mycéliens des Eumycètes et la phylogenie des Urédinées. *Bull. Soc. Mycol. France* 67: 173-198.
- BERTHIER, J. 1963. Recherches cytologiques sur la naissance du mycelium secondaire d'un Hymenomycète. *Bull. Soc. Mycol. France* 79: 83-95.
- BULLER, A. H. R. 1930. The biological significance of conjugate nuclei in *Coprinus lagopus* and other Hymenomycètes. *Nature* 126: 686-689.
- BULLER, A. H. R. 1941. The diploid cell and the diploidisation process in the plants and animals, with special reference to the Higher Fungi Part I. *Bot. Rev.* 7: 335-387.
- BULLER, A. H. R. 1931-1933 (Reimpresión 1958). *Researches on Fungi* Vols. IV & V. Reprint edition, Hafner Publ. Co., New York, U.S.A.
- COCHRANE, V. W. 1958. *Physiology of Fungi*; John Wiley & Sons, Inc.
- DA COSTA, E. W. B. & KERRUSH, R. M. 1962. Production of monocaryons in basidiomycete culture by action of toxic chemicals. *Nature* 195: 726-727.
- DODGE, B. O. 1942. Conjugate nuclear division in the fungi. *Mycologia* 34: 302-307.
- DUBOVOY, C. & HERRERA, T. 1967. Estudio morfológico de los micelios de *Psilocybe caerulescens* Murrill en diversos medios líquidos de cultivo. *An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México*, 38, Ser. Bot. (1): 111-150.
- DUBOVOY, C. & HERRERA, T. 1968. Influencia de factores fisicoquímicos en la morfogénesis de estructuras asexuales en micelios de *Psilocybe caerulescens* Murrill. *An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México*, 39, Ser. Bot. (en prensa).
- FOSTER, J. W. 1949. *Chemical Activities of Fungi*. Academic Press Inc. Publishers New York, N. Y.
- GILMORE, K. A. 1926. Culture Studies of *Psilocybe coprophila* Bot. Gaz. 81: 419-433.
- HEIM, R. 1958. *Les Champignons Hallucinogènes du Mexique*, Editions du Muséum National d'Histoire Naturelle. Paris.
- HESLER, L. R. & SMITH, A. H. 1963. *North American species of Hygrophorus*. University of Tennessee Press, Knoxville, U. S. A.
- KERRUSH, R. M. & DA COSTA, E. W. B. 1963. Monocaryotization of cultures of *Lenzites Trabae* (Pers.) Fr. and other wood destroying Basidiomycetes by Chemical agents. *Ann. Bot.* 27 (2): 643-669.
- KNIEP, HANS VON. 1918. Über die Bedingungen der Schnallen bildung bei den Basidiomyceten. *Flora* (Jena) 111: 380-395.
- KUHNER, R. 1946. Recherches morphologiques et caryologiques sur le mycélium de quelques Agaricales en Culture pure. *Bull. Soc. Mycol. France* 62: 135-182.
- KUHNER, R. 1947. Nouvelles observations sur la culture pure des homobasidiés et sur les particularités de leur mycélium secondaire. *Bull. Soc. Mycol. France* 63: 133-158.
- MILES, P. G. & RAPER, J. R. 1956. Recovery of the component strains from dikaryotic mycelia. *Mycologia* 48: 484-494.
- PANTIDOU, M. E. 1962. Cultural studies of Boletaceae. Carpophores of *Phlebopus lignicola* in culture. *Canadian J. Bot.* 40: 1314-1319.
- PAPAZIAN, H. P. 1950. Physiology of the incompatibility factors in *Schizophyllum commune*. *Bot. Gaz.* 112: 143-163.
- PAPAZIAN, H. P. 1958. The genetics of Basidiomycetes. *Adv. Genet.* 9: 41-69.
- PARAG, Y. 1962. Mutations in the B. incompatibility factor of *Schizophyllum commune*. *Proc. Natn. Acad. Sci. Washington* 48: 743-750.
- RAPER, C. A. & RAPER, J. R. 1964. Mutations affecting heterokariosis in *Schizophyllum commune*. *Am. J. Bot.* 51: 503-512.
- RAPER, C. A. & RAPER, J. R. 1966. Mutations modifying sexual morphogenesis in *Schizophyllum*. *Genetics* 54: (5) 1151-1168.
- RAPER, J. R. 1966. *Genetics of Sexuality in Higher Fungi*. The Ronald Press. Company New York.

- RAPER, J. R., BAXTER, M. G. & ELLINGBOE, H. 1960. The genetic structure of the incompatibility factors of *Schizophyllum commune*: the A-factor. *Proc. Natn. Acad. Sci., U.S.*, 46: 833-842.
- SINGER, R. 1962. *The Agaricales in modern taxonomy*. J. Cramer, Weinheim.
- TEIXEIRA, A. R. 1960. Characteristics of the generative hyphae of polypores of North America, with special reference to the presence or absence of clamp connections. *Mycologia* 52: 30-39.
- TEIXEIRA, A. R. 1962a. The taxonomy of the Polyporaceae. *Biol. Rev.* 37: 51-81.
- TEIXEIRA, A. R. 1962b. Microestructuras do basidiocarpo e sistemática de genero *Fomes* (Fries) Keckx. *Rickia* 1: 13-93.