

INFLUENCIA DE FACTORES FÍSICOQUÍMICOS EN LA MORFOGÉNESIS DE ESTRUCTURAS ASEXUALES EN MICELIOS DE *PSILOCYBE CAERULESCENS* MURRILL

CELIA DUBOVOY *

TEÓFILO HERRERA **

RESUMEN

Fue emprendido un estudio sobre la acción de factores físicoquímicos en la morfogénesis de estructuras asexuales de micelios de *Psilocybe caerulescens* Murrill.

Se encontró que, aunque los factores genéticos tienen un papel fundamental en la formación de estructuras asexuales, operan únicamente bajo ciertas condiciones del medio ambiente externo. El estudio se refiere, especialmente, a la relación de fuentes de carbono y de nitrógeno en la presencia de la fase asexual y, en particular, se registran estudios en medios con un bajo contenido en carbohidratos; pero también se hace mención de estudios en medios con un alto contenido en carbohidratos, los cuales se están realizando actualmente.

Se señalan varios tipos de estructuras asexuales, que son registrados por primera vez para esta especie, así como para todo el género *Psilocybe*. En cultivos sumergidos, con bajo contenido de dextrosa, y peptona al 1%, se encontraron especialmente artrosporas endógenas y artrosporas con formación endógena. En el presente trabajo se detallan los mecanismos de origen de estas estructuras. Un nuevo término para la denominación de artrosporas endógenas ha sido propuesto aquí, dado que no se considera que éste sea adecuado de acuerdo con el origen y el desarrollo subsecuente y la liberación de estas estructuras. Son denominadas en este trabajo, endosporas hifales.

En micelios aéreos, que crecieron en el mismo tipo de medio, se encontraron oidióforos y diversos tipos de oídios; todos sus mecanismos de formación están ilustrados y son detalladamente discutidos. Se concluye que una baja relación carbono-nitrógeno, cuando la fuente de nitrógeno es orgánica, tiene un papel fundamental en la formación de ambas estructuras. Otros factores limitantes, que conducen a una u otra de estas estructuras, son discutidos.

Por primera vez, se encontraron clamidosporas formadas en filíidas y de muchas otras maneras; los mecanismos de su formación, así como los factores físicoquímicos que conducen a su presencia, son discutidos.

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

** Del Instituto de Biología UNAM.

Que esto no era contaminación, fue claramente comprobado por la presencia casi constante de una fibula en la base de la fiálida. Es propuesta una ampliación del término clamidospóra, que incluya a todas las esporas asexuales con pared de resistencia, independientemente de su forma y origen. Dado que en estudios con altas concentraciones de dextrosa, los autores de este trabajo encontraron que, aun la misma cepa, puede formar 3 tipos de clamidosporas: lisas, finamente espinulosas y crenadas, se discute el problema que esto constituye para el taxónomo. También se discute la ventaja de este tipo de estudios para permitir que los hongos expresen, tanto como sea posible, sus potencialidades genéticas, estudios que probablemente ayudarían a una clasificación más natural de los hongos imperfectos.

SUMMARY

A study on the action of physicochemical factors in morphogenesis of asexual structures in mycelia of *Psilocybe caerulea* Murrill was undertaken.

It was found that even though genetic factors play a major rôle in the formation of non-sexual reproductive structures, they are operative only under certain external environmental conditions. Our study was specially concerned with the relationships of carbon and nitrogen sources in the presence of the asexual stage, and studies in media with low carbohydrate content are recorded in this paper; mention is also made to studies in media with high carbohydrate content, which are carrying on now in our laboratory.

Several types of asexual structures are recorded for the first time for this species, as well as for the whole genus *Psilocybe*. In submerged cultures with low dextrose content and 1% peptone, specially, endogenous arthrospores and arthrospores with an endogenic formation were found. In this work all the mechanisms of origin of these structures are detailed. A new term for denomination of endogenous arthrospores is proposed since these ones don't fit, according to the genesis and subsequent development and liberation of typical arthrospores; they were called by us hyphal endospores.

In aerial mycelia, grown in the same type of medium, oidiophores and several types of oidia were found, all their mechanisms of formation are illustrated and discussed in detail. It is concluded that the low carbon-nitrogen relationship, when nitrogen is from an organic source, plays a major rôle in the formation of both structures. Other limiting factors which lead to one, or to the other of these structures, are discussed.

For the first time, the authors of this paper found chlamydospores which were formed in phialides and in several other ways. Mechanisms of formation, as well as physicochemical factors which lead to their presence, are discussed in detail.

That this was not a contamination was clearly proved by the constant presence of clamp connections in the basis of the phialide. From the results of the present research an amplification of the term chlamydospore is proposed, including all non sexual spores with a resistant wall, regardless their form and origin.

In studies with high dextrose contents, it was found recently that even the same strain can form 3 types of chlamydospores: smooth, delicately spinulose and crenate; the problem that this presents to the taxonomist is discussed.

It is also discussed the advantage of this type of studies, to let the fungi express, as far as possible, their genetic potentialities, studies which could probably be helpful for a more natural classification of imperfect fungi.

INTRODUCCIÓN

Los estudios morfológicos y fisiológicos son muy escasos; prácticamente no se menciona la morfogénesis de las estructuras de reproducción asexual en Basidiomycetes

asexuales ni la influencia de diversos factores en la presencia de éstas.

En general, lo poco que se menciona se refiere a la presencia de oídios (Buller 1958, Brodie 1936, Hughes 1953), en raras ocasiones conidios de tipo "Oedoccephalum" y "Botrytis" (Tubaki 1963), y, más rara vez, a la presencia de clamidosporas (McKay 1967, Singer 1962, Gómez Nava 1967, Hawker 1957). Heim,

1958, describe fases oidiales o de artrosporas de diversos tipos para determinadas especies del género *Psilocybe*, y considera a éstas como un carácter importante en la clave de clasificación que proporciona, basada en las diversas estructuras miceliales. Sin embargo, este autor no observó la reproducción asexual de la especie aquí estudiada, y la indica, en su clave, como ausente.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se empleó como medio control malta agar (Difco), en el cual fueron sembradas todas las cepas obtenidas en los distintos medios de cultivo utilizados para el estudio morfogenético. Para estos estudios morfogenéticos se emplearon diversos medios naturales y semisintéticos, restringiéndolos, particularmente, por razones especiales, a los estudios en medios líquidos. Debido a que de un estudio anterior realizado por los autores de esta nota sobre la morfología de micelios de *Psilocybe caerulescens* Murrill (Dubovoy & Herrera 1967), se encontró que ciertas cepas que no presentaban reproducción asexual en malta-agar (Difco) la presentaron en medio de Kaufmann y en papa-dextrosa; en primer lugar, se decidió repetir los estudios en estos medios.

Los cultivos fueron hechos en tubos de ensayo de 150 x 15 mm. Para este estudio, 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, con el objeto de ver el efecto de un diferente grado de oxigenación.

Las siembras 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 26° C.

Posteriormente, con el objeto de ver el efecto de la relación carbono-nitrógeno en la reproducción asexual, se hizo el estudio de la morfogénesis de los micelios en diversas concentraciones de dextrosa, con una concentración constante de fuente nitrogenada orgánica y, para esto, se decidió seguir la fórmula del medio de Sabouraud, colocando constantemente 1% de peptona y variando las concentraciones de dextrosa desde 0.05% hasta 8%.

En este trabajo únicamente se indican los resultados de estudios en bajas concentraciones de dextrosa, dado que las restantes serán discutidas en un estudio que se está realizando actualmente.

El estudio fue hecho utilizando 2 tubos de 15 x 150 mm por cada cepa, colocando en cada uno 10 cc de medio, y sembrando de cada cepa, uno con inóculo sumergido y otro con inóculo aéreo. Los cultivos también se incubaron a 26°C.

Debido a los resultados que se obtuvieron con bajas concentraciones de dextrosa, se considera necesario un estudio en agua peptonada, para observar la influencia de una ausencia de fuente hidrocarbonada especial, presentándose únicamente como

fuelle carbonada, el propio polipéptido. Para el estudio se siguió el mismo método que en el caso anterior.

Debido a que, como se indicará posteriormente, se encontraron tanto oidios como clamidosporas, se consideró de gran importancia ver la secuencia de formación de este tipo de estructuras, particularmente por lo que respecta a las clamidosporas, dado que éstas, en los Basidiomycetes en general, son muy raras y únicamente se han registrado en algunos géneros de la familia Tricholomataceae (Singer 1962) y en algunos representantes de las familias Polyporaceae (McKay 1967) y Thelephoraceae (Gómez Nava 1967).

Para este estudio decidimos hacer cultivos en lámina, que nos revelaron la secuencia clara de formación de estas estructuras y su relación con el micelio.

Los cultivos fueron hechos en gota suspendida de agua peptonada al 1%, colocada sobre un cubreobjetos, a su vez colocado sobre un anillo que se encontraba

en un portaobjetos estéril; todo esto se introdujo a una caja de Petri con algodón y papel filtro humedecidos.

Con la finalidad de observar la influencia de otros factores, como oxígeno, mantenimiento de mayor humedad y de tratar de evitar la rápida sequedad de la gota de medio, se hicieron las siguientes variantes:

En unos casos se colocó el cubreobjetos sobre el anillo en forma normal; en otros, en diagonal; algunos no sellados y otros lacrados perfectamente con vaselina; en otros casos, a la cámara húmeda se le agregaba diariamente una cierta cantidad de agua destilada estéril, para mantener una cierta constancia de humedad.

Las cámaras húmedas ya sembradas, fueron colocadas a la temperatura del laboratorio. Para este estudio fueron seleccionadas dos cepas, haciéndose una preparación diariamente, a partir del sexto día de la siembra del micelio.

En todos los casos fue utilizado el azul láctico para teñir el micelio.

RESULTADOS

En nuestro medio control (malta-agar), y sin haberse realizado aún varias resiembras, en general, no observamos fase asexual en las cepas estudiadas, pero en una de ellas: cepa 107 (obtenida de contexto de pileo), se encontró, por primera vez, la fase asexual de tipo oidial de esta especie, o sea una fase asexual correspondiente a la fase imperfecta, tipo "Geotrichum" (Hughes 1953).

Es notable mencionar que este mismo medio y con la misma concentración, fue empleado por Roger Heim (1958) en sus cultivos y, después de la observación de muchísimas cepas, nunca comunicó haber visto la fase asexual. Esto habla en parte de la invalidez de su clave, ya que se observó en este caso que fue carácter

ue cepa la presencia de esta fase; esta cepa continuamente ha permanecido en fase asexual; sin embargo, se notó que, cuantitativamente, ésta puede variar en los distintos medios que se empleen. Se anota que en el estudio de la reproducción asexual y de los factores que influyen en esto, siempre hay que tomar en consideración el aspecto cuantitativo y no únicamente el cualitativo de esta fase. Como aspecto cuantitativo se quiere indicar la proporción o relación de la fase vegetativa micelial con la fase asexual.

A continuación se describe el estudio inicial de la fase asexual de la cepa 107 en malta-agar.

La fase asexual es parcial y se encontraron varias hifas que, en ningún caso,

presentaban fibulas; sin embargo, por la morfología restante (presencia de un gran número de ramificaciones acromoniformes, así como el tipo de estructuras asexuales que es idéntico al de otras especies de *Psilocybe*), se aseguró que no era contaminación.

Se observó gran cantidad de oídios formados en oidióforos de forma muy diversa (fig. 1). Prácticamente se observaron oidióforos de todos los tipos descritos por Roger Heim para otras especies, y considerados por él como carácter específico. El único tipo de oidióforos no encontrado fue el de oidióforo en haz. El tipo dominante fue el de oidióforo con cabezuela conidiosporífera en el que, en ocasiones, los oídios se comprimen y toman forma redondeada a manera de conidios (fig. 1, e, i, l), oidióforos enrollados (fig. 1, a, b) oidióforos en cruz (fig. 1, d, h) enrollados en cruz (fig. 1, j) helicoidales sigmoideos, rectos (fig. 1, g), etc.

Los oídios son generalmente rectangulares, con excepción de los formados en cabezuelas conidiosporíferas.

Desde esta ocasión, se consideró interesante el hecho de que, frecuentemente en los oídios, el citoplasma tendía a condensarse separándose de las paredes laterales y transversales, dando origen a formaciones endógenas.

Es decir, el oidióforo se fragmenta normalmente en varias células, cuyo contenido citoplasmático se condensa; lógicamente, la parte que presenta la condensación citoplasmática, es la única capaz de germinar, pero surgió la pregunta sobre el funcionamiento de esta estructura el cual podría ser de dos formas.

1º Por un lado, que la separación del oídio se realizara en forma normal, por disyunción de las células en los septos, entre una y otra, siendo un oídio típico, pero con formación endógena que es la única parte capaz de germinar.

2º Dado que en algunos casos se obser-

vó que la condensación citoplasmática presentaba una pared propia, se podría pensar que los oídios tuviesen un origen endógeno en el interior del oidióforo, y que por lisis de las paredes originales en determinados puntos, salieran al exterior.

Ambas hipótesis fueron comprobadas en estudios posteriores, particularmente la primera y, en algunas ocasiones, la segunda.

En los estudios en medio de Kaufmann y en papa-dextrosa se obtuvieron los siguientes resultados:

En medio de Kaufmann, el micelio aéreo de la cepa 106 (obtenida de contexto de píleo) en tubos con 3 cc de medio, presentó una iniciación de fase asexual, encontrándose en una zona dos oidióforos enrollados y algunos oídios sueltos; el resto presentaba fase vegetativa característica.

En micelios sumergidos en tubos con 3 cc de medio, no se presentó fase asexual, al igual que en micelios aéreos y sumergidos obtenidos de tubos con 10 cc de medio.

La cepa 107 (obtenida de contexto de píleo) perdió la fase asexual en micelios sumergidos, con cualquier cantidad de medio, y la presentó en micelios aéreos, en una proporción similar a la inicial.

En las cepas 78 y 81 (obtenidas de esporas) en tubos con 3 cc de medio de Kaufmann, se observó la fase asexual típica, las hifas son sumamente escasas y casi la totalidad se encuentra transformada en oidióforos de diversos tipos. Se observaron oidióforos en forma de "C", enrollados en cruz, helicoidales, sigmoideos y algunas cabezuelas conidiosporíferas.

Aquí predominaron grandemente los oidióforos enrollados y no las cabezuelas conidiosporíferas predominantes en la cepa 107, observándose claramente las diferencias en la morfogénesis de los oidióforos según la cepa utilizada, aunque el medio de cultivo y las demás condiciones sean idénticas. Hay que considerar que la formación de cabezuelas conidiosporíferas im-

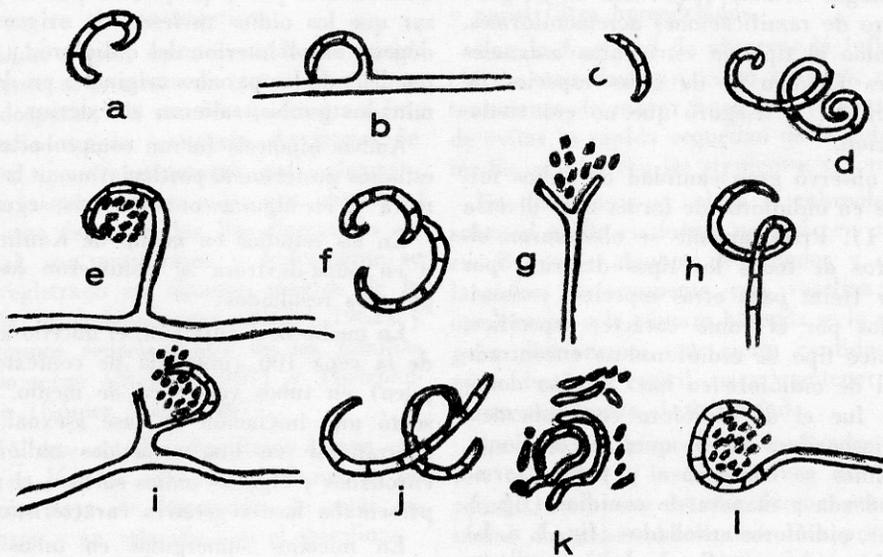


Figura 1

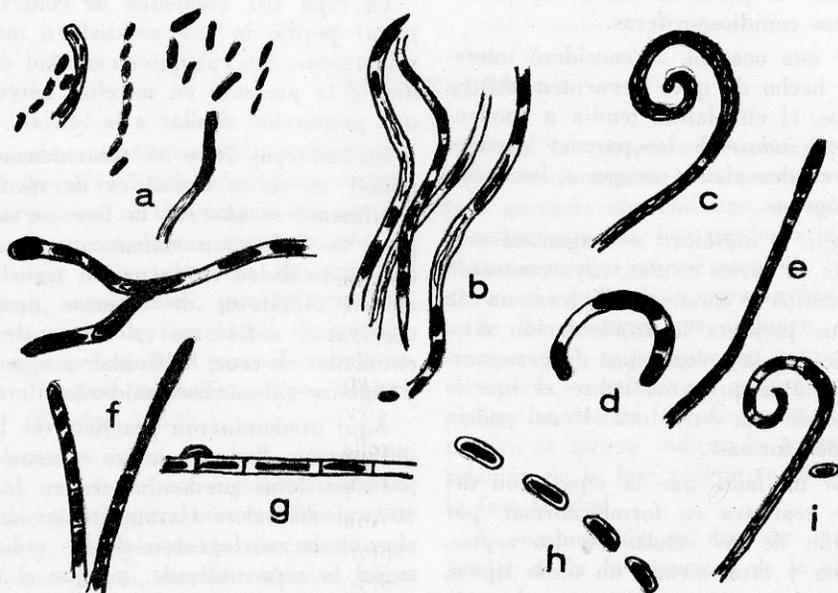


Figura 2

plica una mayor división. En el micelio sumergido en tubos con 3 cc del mismo medio, y en el aéreo y en el sumergido en tubos con 10 cc de medio, no se observó fase asexual.

En papa-dextrosa, los resultados con las distintas cepas fueron exactamente los mismos que los encontrados con medio de Kaufmann, con distintos volúmenes de medio y con las distintas cepas, encontrándose una dominancia cuantitativa de la fase asexual en las cepas 78 y 81 (obtenidas de esporas) con relación a la cepa 106 (de contexto de pileo), en que ésta apenas se esboza. Se presentó aquí la fase asexual únicamente en micelios aéreos en tubos con 3 cc de medio con un predominio de cabezuelas conidiosporíferas. Tanto en medio de Kaufmann como en papa-dextrosa, únicamente una de las cepas estudiadas no presentó indicios de fase asexual, cepa 103 (obtenida de estípites); esto indica la clara influencia del factor genético de las cepas, cuya potencialidad de expresión puede alterarse en forma positiva o negativa, por las condiciones ambientales.

En el presente estudio, en medios con 1% de peptona y dextrosa en cantidades muy bajas, o totalmente ausente, observamos el máximo incremento en el desarrollo de la fase asexual y la mayor variación de ésta.

En micelios obtenidos en peptona al 1% y 0.05% de dextrosa se observó lo siguiente:

En general, las hifas tienden a presentar condensaciones citoplasmáticas pequeñas a veces muy regulares y de forma rectangular (fig. 2 a, b, y fig. 3), dando la impresión de un mecanismo endógeno de formación de artrosporas, pero en ocasiones estas condensaciones son protoplastos irregulares o redondeados que, según se observó, quedan libres por lisis de la pared original (fig. 2, e, g).

Se indicó una gran tendencia del cito-

plasma de todas las cepas a fragmentarse previamente a la fase asexual propiamente dicha. En micelios sumergidos se observó la presencia de fase asexual en todas las cepas estudiadas, lo que en principio indica que la relación carbono-nitrógeno es básica para la presencia de fase asexual y, particularmente, una relación baja.

En general, en micelios sumergidos, la fase asexual es atípica y poco clara, de aparición algo tardía, lo que indica que hay una cierta dependencia de ésta con relación al consumo de sustancias nutritivas del medio. Además, se encuentra sumamente escasa y es, comparativamente con la fase micelial, extremadamente baja; aunque en ocasiones ya se presentan oidióforos perfectamente claros y fragmentados en oídios, en la mayoría de los casos se presentan oidióforos en iniciación, aún no tabicados; en algunas ocasiones se observa iniciación de cabezuelas conidiosporíferas y células redondeadas aisladas como conidios; entre éstas puede presentarse raramente algún oidióforo de forma diversa, particularmente enrollado en cruz, que ya se ha tabicado.

Dentro de lo que hay de fase asexual, los oidióforos son extremadamente escasos en todas las cepas estudiadas y, como se indicó, en su mayoría no tabicados; algunas cepas como la 107 (pileo), no presentaron oidióforos. La fase asexual se encuentra representada en las diversas cepas por masas de hifas, cuyas células tienden a separarse, pero en algunos casos aún no se encuentran perfectamente separadas (fig. 2, b).

La fase asexual dominante en micelios sumergidos presenta ligeras variaciones según la cepa utilizada, pero en la mayoría predomina la formación de artrosporas y no de oídios. Con respecto a la formación de artrosporas, se observó que no existe únicamente un solo mecanismo, como normalmente se indica, por tabicación simple de células y disyunción posterior de éstas.

El mecanismo normal descrito de formación de artrosporas se observó en micelios sumergidos de la cepa 106 (obtenida de *estípite*); en esta misma cepa, en un caso, se observó una variante de la formación de artrosporas típicas: la mayoría de las células de la hifa parecían haberse fragmentado como artrosporas normales, pero en dos puntos, entre dos células intensamente teñidas con el azul láctico, se observó que se encuentra una célula algo más angosta e irregular, de citoplasma muy tenue, como si fuese una célula de disyunción, lo cual hace pensar que, previamente, se formaron condensaciones citoplasmáticas posteriores a una tabicación simple y que, entre estas condensaciones, quedó la célula disyuntora (fig. 2, f).

El mecanismo fundamentalmente encontrado de formación de artrosporas es la formación de artrosporas endógenas y lo que aquí se ha llamado artrosporas con formación endógena (fig. 2, e, f).

Se encontraron las artrosporas endógenas prácticamente en casi todas las cepas estudiadas, pero en forma particular en el micelio sumergido de la cepa 81 (de esporas), en la cual es dominante la fase asexual.

En el caso de artrosporas endógenas el mecanismo de formación es el siguiente:

En primer lugar hay tabicación y, posteriormente, una retracción del citoplasma de las células formadas por tabicón, tanto de las paredes laterales de éstas como de las transversales; el citoplasma retraído toma una forma rectangular muy regular y se rodea de una membrana propia; no se ha observado la salida de estas artrosporas más que en una ocasión, por lo que, inicialmente, se pensó que en este caso podría suceder lo que en los oídios, y que la artrospora se separara en la forma normalmente conocida y únicamente germinara la porción endógena. Sin embargo, lo raro era que ésta formase pared propia. En la ocasión en que las vimos salir, observamos que la salida se realiza por la porción

apical de la célula con disolución de las paredes transversales (Fig. 2, e).

Por otro lado, en la mayoría de las cepas, se encontraron hifas en las que se forman artrosporas por fragmentación y en el interior de éstas el citoplasma se condensa sin formar membrana propia. (Fig. 2, e, g).

Esto podría ser simplemente una transición al tipo de artrosporas anteriormente citado, o bien podría suceder lo que con los oídios, siendo la separación normal y germinando únicamente una parte; nunca fueron vistas separadas, por lo que no se puede decir cuál de las dos hipótesis es correcta. Obviamente se observó que existen mecanismos distintos para la formación de artrosporas que los comúnmente descritos, y que es necesario un estudio detallado de éstos.

Son muy escasos los estudios hechos sobre este tema: únicamente se encontraron tres, hechos en otras especies (Hughes 1953, Barron 1962, Subramanian 1958).

Ocasionalmente, en algunas cepas se encontraron 1 ó 2 blastosporas.

Se hace notar que, en general, en micelios sumergidos de todas las cepas predominan artrosporas en lugar de oídios y muchos oidióforos, lo que nos indica que la morfogénesis del oidióforo en sí, requiere condiciones especiales de oxigenación, como se indicará posteriormente.

Ha surgido la pregunta de que si las artrosporas formadas endogénicamente, deben en realidad ser consideradas con este nombre, ya que aun etimológicamente sería inadecuado; se propone más bien denominarlas esporas endógenas hifales (endosporas hifales).

Por otro lado, en los micelios aéreos obtenidos en peptona al 1% - dextrosa al 0.05%, se encontró que presenta fase asexual (oidal) típica y no es frecuente la presencia de artrosporas, aunque en ocasiones puede haber una hifa que las presente, como en la cepa 106 (*estípite*), en

la cual una hifa las formó normalmente en sucesión al parecer basípeta, ya que su formación no se había completado aún en la totalidad de la hifa (Fig. 4, a).

En todos los casos se observó fase asexual oídial típica pudiendo ser muy variable el mecanismo de formación de los oídios, no únicamente según la cepa, sino que, aun dentro de una misma cepa, pueden presentarse varios mecanismos; el tipo de oidióforos es muy variable en forma. Cuantitativamente la fase asexual varía según la cepa.

En los mecanismos de formación, se encontró lo mismo que en las artrosporas, más otras variantes.

1) Oídios formados normalmente, por simple tabicación del oidióforo; esto es frecuente en una porción de las cabezuelas conidiosporíferas (Fig. 1, e).

2) Oídios en los que el citoplasma tiende a condensarse en forma regular, rectangular, separándose de las paredes laterales y transversales del oidióforo (cepa 81). Estos, según fue observado, al parecer se separaron como oídios normales, ya que se encontraron oídios aislados con formación endógena; su evolución posterior, una vez separados, es una lisis de la pared original, aunque se haya separado la totalidad de la célula.

Esta lisis parece iniciarse en las paredes laterales originales, ya que frecuentemente observamos oídios en los que la pared original persiste únicamente como un casquete en ambos polos, y hay formación de nueva pared propia (Fig. 2, h, i).

Se debe considerar a este tipo de oídios como endógeno, ya que éstos se forman en el interior de una célula del oidióforo.

3) Oídios que se forman por retracción del citoplasma del septo transversal, dejando un espacio (vacío) que se piensa estaría ocupado por mucílago, lo cual facilitaría la disyunción en ese punto; sin embargo, no se logró demostrar la presencia de mucílago con rojo de rutenio. Otra po-

sibilidad es que esta parte, quedando muerta por falta de citoplasma, aunque no presente mucílago, se destruya fácilmente, ayudando al mismo tiempo a la disyunción.

Como tipo fundamental de oidióforos, predominan las cabezuelas conidiosporíferas; también hay oidióforos en forma de herradura, en cruz, encorvados, helicoidales, etc. En la cepa 82 frecuentemente se observó que los oidióforos helicoidales parten como ramas laterales de hifas sinuosas (Fig. 4, b).

En las distintas cepas, en pocos casos, se presentan oidióforos jóvenes aún no fragmentados en oídios, y hay casos en que predominan éstos, como en la cepa 106 (estípote) en que, por alguna circunstancia, la fase asexual parece ser algo más tardía, ya que, sembrada simultáneamente con las otras y hecha la observación al mismo tiempo, la mayoría de los oidióforos no estaban fragmentados (Fig. 4, c).

Cuantitativamente la fase asexual varió según la cepa, presentando la cepa 107 la mayor proporción de oídios y oidióforos con frecuentes fusiones de varias cabezuelas conidiosporíferas, originándose grandes masas de células redondeadas como conidios (Fig. 4, d).

Es interesante indicar que, en las distintas cepas, se encontraron ocasionalmente una que otra célula levuriforme con citoplasma condensado, entre hifas fibuladas normalmente; con frecuencia, de estas células partían pequeñas yemas.

En todas las cepas, y particularmente en la 106 (estípote) y la 82 de esporas, ocasionalmente se encontraron algunas células aisladas, redondeadas, de citoplasma condensado, con pared muy engrosada como clamidosporas. Inicialmente, al no presentar estas estructuras ninguna relación con el micelio, se pensó que podría ser una contaminación. (Fig. 4, e); sin embargo, para contaminación, eran muy escasas y ocasionales estas estructuras; en numerosos casos, en varias preparaciones de una mis-

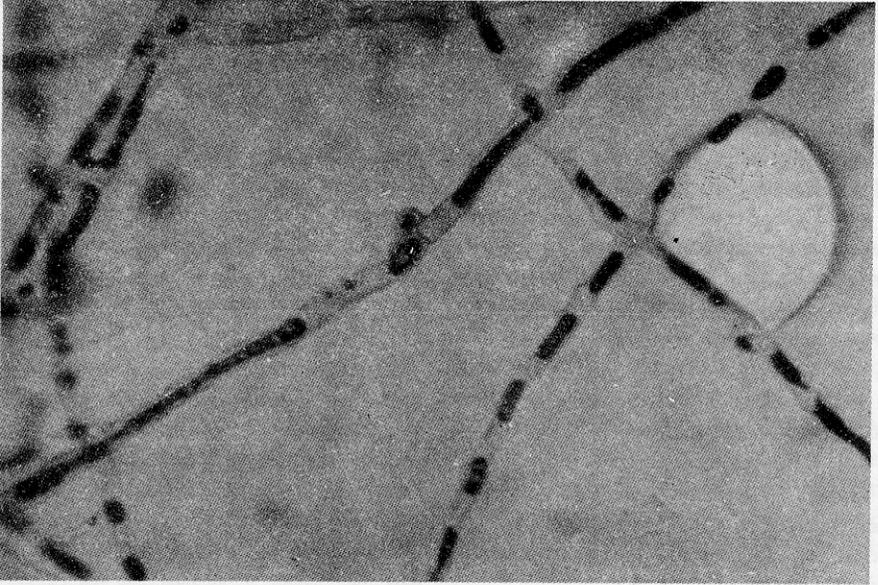


Figura 3

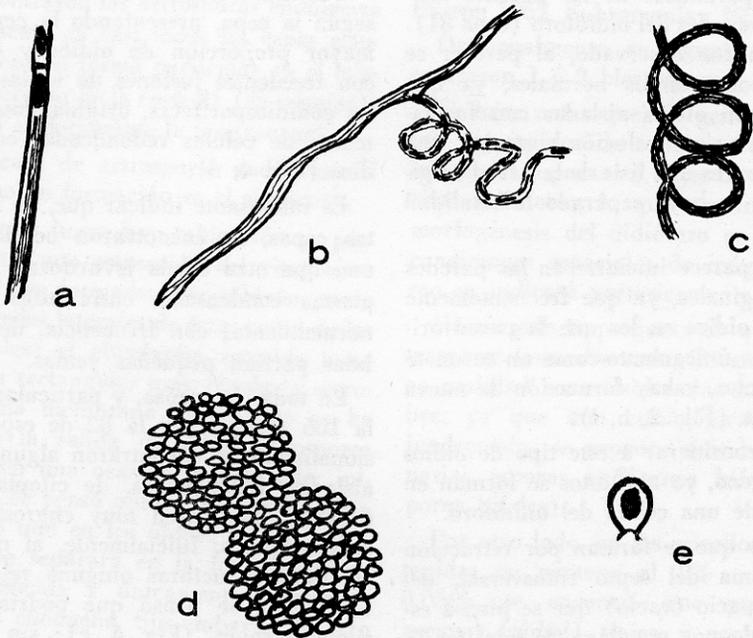


Figura 4

ma cepa podían no presentarse, y lo que pareció también extraño es que hubiese una misma contaminación en todas las cepas. Posteriormente, y después de varias repeticiones, revisando aún las cepas originales en malta -agar, para observar si no estaban contaminadas, se decidió hacer un estudio detallado, encontrando un nuevo tipo de fase asexual de *Psilocybe caeruleascens* que será descrito posteriormente en el presente trabajo.

En concentraciones de peptona al 1% -dextrosa al 0.1%, las características generales fueron esencialmente iguales a las del caso anterior. También se presentan varias hifas con condensaciones citoplasmáticas que, en numerosas ocasiones, son irregulares.

En los micelios sumergidos, predominantemente, se forman masas de hifas delgadas, algo encorvadas, cuyas células están algo separadas y, en ocasiones, son redondeadas semejando conidios; esta forma redondeada hace pensar que, en general, las masas de hifas, formadas por células separadas, sean el resultado de condensación de protoplastos hifales con pérdida de la pared original (Figs. 5 y 5, a).

En micelios sumergidos, al igual que en el otro caso, se presentan escasos oidióforos no fragmentados. En resumen, la fase asexual, aquí también, es algo atípica. En raras ocasiones se observan oidióforos tabicados, en un caso se observó uno en "C" tabicado, cuyas formaciones endógenas eran redondeadas; raras veces se observaron también oídios desprendidos.

La fase asexual, en micelios sumergidos, es sumamente localizada y muy escasa con relación a la fase vegetativa miceliana.

En micelios aéreos se presenta una fase oídial típica con oidióforos de todos los tipos y presentando también diversos mecanismos de formación de oídios, predominando, en general, la fase asexual con relación a la vegetativa, con variaciones cuantitativas según la cepa.

También aquí se observaron algunas células sueltas de citoplasma condensado, y algunas que podían ser clamidosporas de pared algo engrosada.

En concentraciones de dextrosa al 1% -peptona al 1%, se observó una disminución en la presencia de fase oídial. En micelios sumergidos se encuentra prácticamente ausente y, en los pocos casos en que se encontró, únicamente se presentaron uno o dos oidióforos no claros.

En algunas cepas hay formación de masas de hifas, como las anteriormente citadas, cuyas células tienden a separarse; todas las cepas presentan algún tipo de arthrosporas, pero éstas son extremadamente escasas; las condensaciones citoplasmáticas son muy frecuentes, en varios casos irregulares.

En micelios aéreos la fase oídial no se presentó constantemente en todas las cepas y, aunque normal, con oidióforos de varios tipos, era extremadamente escasa y localizada. En estas concentraciones, en todas las cepas, encontramos clamidosporas redondeadas tanto en micelios aéreos como sumergidos, con citoplasma condensado; eran muy escasas, 1 ó 2 por cepa y particularmente se presentaron con el envejecimiento de los micelios, lo que indicaba que un agotamiento de los materiales nutritivos, o bien productos catabólicos, favorecían su presencia. La constancia de estas estructuras hizo pensar que, definitivamente, esto no era contaminación, aunque en la mayoría de los casos aún no se había encontrado una relación clara con el micelio.

En el micelio aéreo de la cepa 106 (píleo), se observaron por primera vez tres clamidosporas unidas por un disyuntor, y en el micelio sumergido de la cepa 82 (esporas) se encontró por primera vez una relación de éstas con las hifas, presentándose en la parte terminal de una hifa normal; esto nos impulsó más aún a comprobar si era otro tipo de fase asexual de *Psilocybe caeruleascens*.

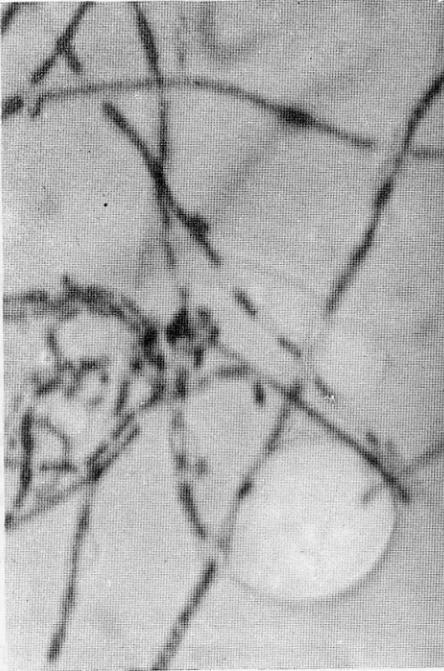


Figura 5



Figura 5A

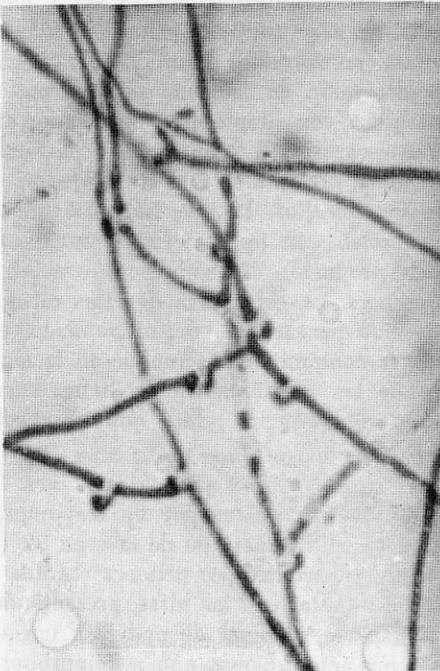


Figura 6

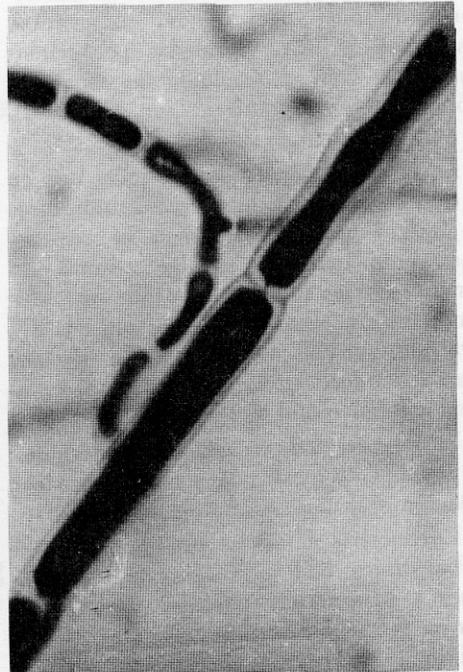


Figura 7

En los estudios en agua peptonada se observó que, en todas las cepas, las hifas presentaban condensaciones citoplasmáticas, en ocasiones irregulares y en varios casos rectangulares o redondeadas, muy regulares, como protoplastos (Figs. 6 y 7).

En realidad, la interpretación de estas estructuras ha sido muy difícil hasta el momento, pero parecen tener una cierta relación con la reproducción asexual.

En la cepa 103 (estípote) se observó una de estas condensaciones, ya rodeada de pared propia, saliendo por la porción apical de la hifa, por lisis de la pared de ésta (Fig. 8, a); posteriormente se ha observado lisis de la pared en muchas otras ocasiones; sin embargo, no se sabe aún la fisiología de estas estructuras, que únicamente se dilucidará con un estudio en vivo.

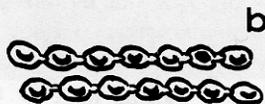


a

En los micelios sumergidos se presentaron, al igual que en los casos anteriores, artrosporas de diversos tipos, predominando las endógenas cuya salida, según se observó, es por lisis de la pared original, particularmente en la porción apical de la hifa y en los septos transversales, en numerosas ocasiones la salida de las endosporas es por lisis de las paredes laterales. También se presentaron masas de hifas en las que las células se encuentran muy separadas, en ocasiones con forma perfectamente redondeada; esto hace pensar que esas masas de hifas pudiesen ser protoplastos que han salido de la pared original y que formaron una propia, de otra manera no se puede explicar la repentina formación de células redondeadas.

Los oidióforos, en general, son poco claros y no muy divididos; son de tipos muy diversos y escasos. En ocasiones se presentan oídios aislados con citoplasma polarizado.

Se indica, como dato importante, la presencia en todas las cepas, de clamidosporas en un número mayor que las encontradas en micelios con bajas concentraciones de dextrosa, pero aún muy escasas, comparadas con la fase vegetativa y reproductora restante; en su mayoría eran pequeñas y redondas, se encontraron aisladas o en grupos de 3 a 5 y en dos cepas, formando cadenas en las que cada clamidospora se hallaba separada por un disyuntor muy tenue. En la cepa 82 (esporas) se observó una doble cadena de clamidosporas muy unidas entre sí; en general, no se observó relación de las clamidosporas con el micelio, e inicialmente fue difícil interpretar cómo se había realizado la división para la formación de esta cadena (Fig. 8, b).



b

En la cepa 81 (esporas) se observó una clamidospora muy grande de 6.3μ de largo x 5.1μ de ancho.

También, en algunas cepas, se observaron células aisladas como conidios con citoplasma condensado en su parte central que, como se indicará posteriormente, en determinados casos son transiciones hacia la formación de clamidosporas.

Las clamidosporas se observaron tanto en micelios aéreos como en sumergidos. Ocasionalmente se observaron, en ambos tipos de micelios, blastosporas que se originan en la parte lateral de una hifa.

En los micelios aéreos, se observaron condensaciones citoplasmáticas, algunas saliendo por la parte apical.

En este tipo de micelios, al igual que en los de bajas concentraciones de dextrosa, en general, no se presentan artrosporas. La fase asexual oídial, en los micelios aéreos es muy clara, aunque algo escasa con relación a la fase vegetativa, y localizada



Figura 10



Figura 11



Figura 12

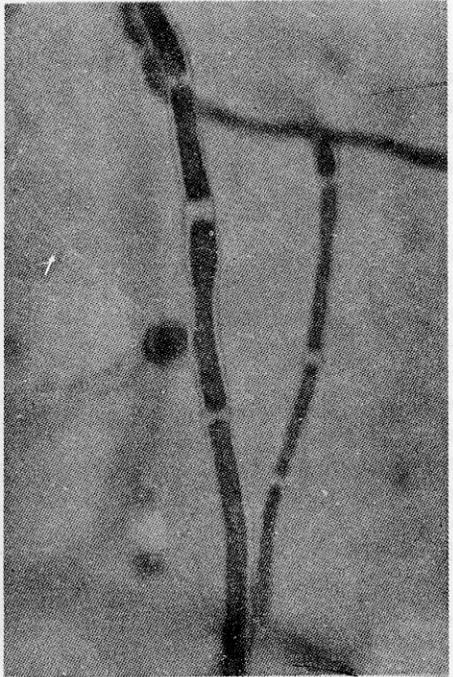


Figura 13

únicamente en determinadas porciones del micelio; se presentan oidióforos de muy diversos tipos; en varias ocasiones hay fusión de cabezuelas conidiosporíferas.

Los oídios, en su mayoría, presentan formaciones endógenas, las que se hacen más aparentes en oídios aislados; en ocasiones, estas condensaciones son redondeadas (Fig. 10). En algunos casos, hay oidióforos muy ensanchados que parecen provenir de las hifas gruesas del micelio (Fig. 9).



Figura 9

La presencia de fase oídial en micelios aéreos varía de relación al tiempo. En micelios observados a los 10 días de sembrados está generalmente ausente, mientras que, a partir de los 13 días, va aumentando progresivamente

Como se indicó anteriormente, la constancia de la presencia de clamidosporas indujo al estudio en cultivos en lámina, para observar la génesis de estas estructuras.

Por observaciones iniciales, se pensó que, en ambas cepas empleadas en nuestro estudio, y particularmente en la cepa 82 (esporas), era conveniente considerar al micelio formado, cuando menos, por un sistema dimítico de hifas, cada una de las cuales sigue su propia secuencia en la reproducción asexual:

- 1o. Sistema formado por hifas muy ensanchadas.
- 2o. Sistema formado por hifas muy delgadas o piliformes. Fue encontrado fundamentalmente en la cepa 106 (estípite).

Esta clasificación fue particularmente útil en el estudio de la cepa 82, que presenta con gran claridad ambos sistemas, con predominio de uno o del otro, según el inóculo que se haya empleado.

OBSERVACIONES EN LA CEPA 82, SECUENCIA EN SISTEMA DE HIFAS ENSANCHADAS

En la preparación hecha a los seis días, se encontró que las hifas forman protoplastos regulares, con pared propia (Fig. 11).

Aquí se observó que, frecuentemente, se forman esporas que parten de las paredes laterales de hifa, a manera de yemas o blastosporas, pero con pared muy engrosada y citoplasma condensado en la parte central; en ocasiones se separan de la hifa que las originó por medio de una constricción que da la impresión de un corto pedicelo (Fig. 12) y en ocasiones por un septo (Fig. 13); son verdaderas clamidosporas que se originan como blastosporas.

En raros casos se les encontró aisladas, y únicamente en un caso, sin separarse de la hifa, vuelven a reproducirse por gemación formando clamidosporas en sucesión acrópeta (Fig. 14, a).

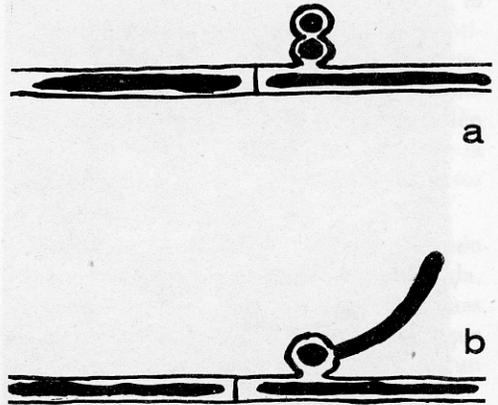


Figura 14

En otros casos forman ramas sin separarse de su punto de origen (Fig. 14, b). Fue encontrada una hifa normal en cuya parte terminal se forma una clamidospora pero prácticamente no se presentan estas estructuras aisladas. También se encontraron tres clamidosporas intercalares (Figs. 15, 16 y 17).

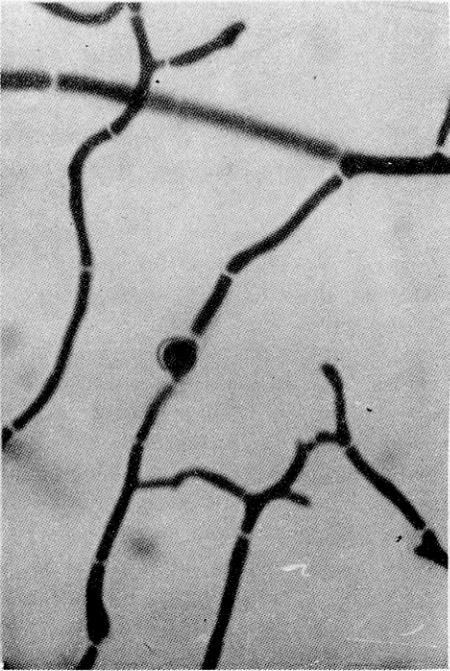


Figura 15



Figura 16



Figura 17

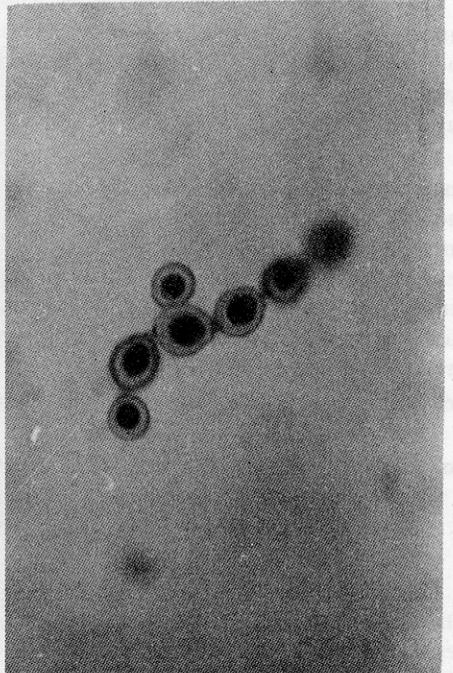


Figura 18

En una preparación hecha a los 11 días, en la que también predominan las hifas gruesas y el cubreobjeto de la cual no había sido sellado ni se había mantenido la humedad constante, se observó la máxima formación de clamidosporas y los diversos mecanismos por los cuales éstas se originan, encontrándose, en forma sorprendente, que un gran número de ellas se forman en fiálidas. Prácticamente toda la preparación estaba formada por clamidosporas; la cantidad de micelio era comparativamente muy escasa.

Las clamidosporas presentan una doble pared muy engrosada, y algunas de ellas alcanzan grandes dimensiones. Independientemente de su origen, en todas, el citoplasma se encuentra condensado e intensamente teñido con el azul láctico, dejando un cierto espacio entre citoplasma y pared. Es importante indicar que, aunque la pared está muy engrosada, el colorante aún penetra, lo cual nos puede indicar, por un lado, un engrosamiento desigual de la pared o, más bien, posiblemente una diferente permeabilidad de la pared debida a una diferencia en constitución química, por la falta de hidratos de carbono en el medio.

Muchas de las clamidosporas aisladas se encuentran unidas unas a otras en cadenas que generalmente presentan un disyuntor claro entre ellas (Fig. 18).

Parecen presentar una porción más adelgazada o un poro por el cual germinan; únicamente se encontró una vacía, con una porción adelgazada en la pared apical.

El inóculo también presentaba clamidosporas, aunque más escasas, lo cual hizo pensar inicialmente que, aun éstas, podrían presentarse en el tubo de malta-agar de donde se hizo la siembra, pero en una revisión cuidadosa de éste, no se encontró ninguna, lo que indicaba claramente la influencia del medio, aún en el inóculo inicial.

Se encontró que las clamidosporas pueden tener un origen muy diverso.

1o. *Clamidosporas formadas en fiálidas:*

- a) Clamidosporas formadas en una fiálida lateral única, la cual frecuentemente presenta en su parte terminal una porción hialina (Figs. 19, 20, 21, 22 y 22, a).
- b) Clamidosporas formadas en fiálidas laterales dispuestas en verticilos (Figs. 23 y 24). Este tipo se encontró en muy raras ocasiones.
- c) Clamidosporas formadas en verticilos o racimos de fiálidas terminales (Figs. 25 y 26).

Las clamidosporas que se forman en fiálidas se originan en sucesión basípeta, siendo por tanto, más grandes y viejas las apicales (Fig. 19).

En numerosos casos una fiálida origina únicamente una sola clamidospora.

Es de interés hacer notar que, aunque el micelio en general presenta escasas fibulas, éstas son frecuentes en la base de la fiálida, lo que asegura mejor la dicarionización de ésta. Sin embargo, hay que considerar que si ésta las posee, el resto del micelio que da origen a la fiálida también necesariamente será dicarionítico, sin que la dicarionización se realice en todos los casos por fibulas.

Realmente el hecho de haber encontrado estas estructuras en la base de la fiálida, fue para nosotros una gran ayuda, pues nos permitió confirmar completamente, que la fase asexual encontrada no es la de un contaminante (Figs. 19, 20 y 21).

2o. *Clamidosporas que se forman de partes terminales o intercalares de hifas normales o de ramificaciones de éstas* (Fig. 15, 16, 17 y 27).

Estas hifas también, frecuentemente, están fibuladas. La mayoría de las hifas forman cadenas de clamidosporas que se originan en sucesión basípeta, y en algunos casos clamidosporas únicas (Fig. 28).

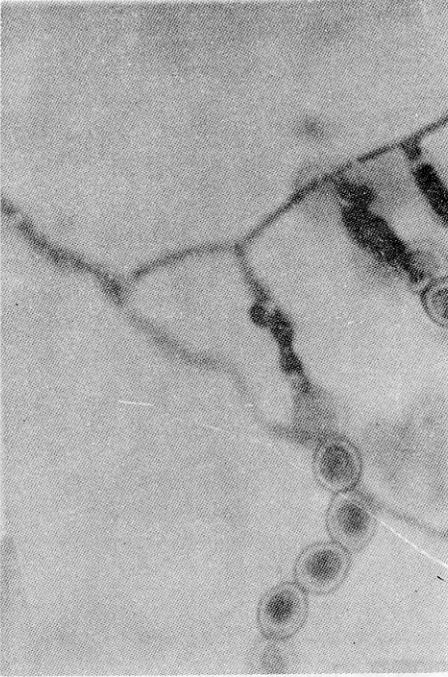


Figura 19

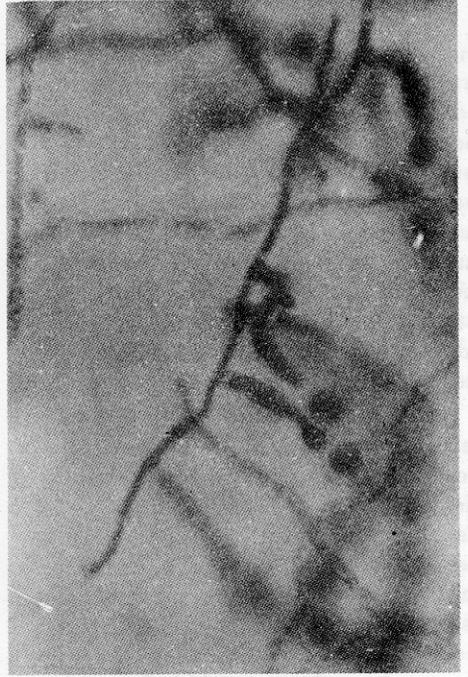


Figura 20

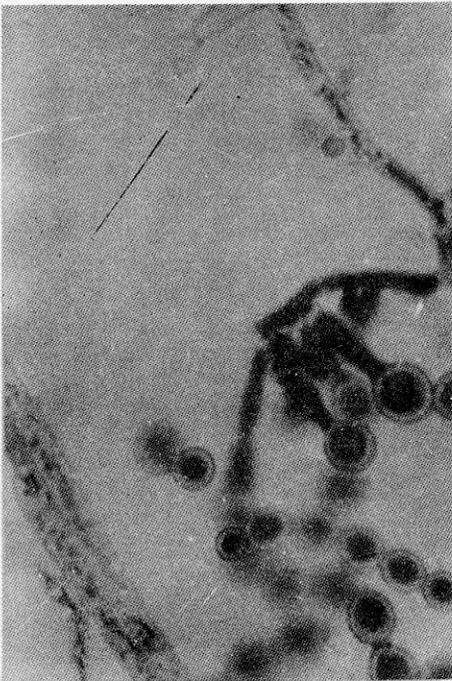


Figura 21

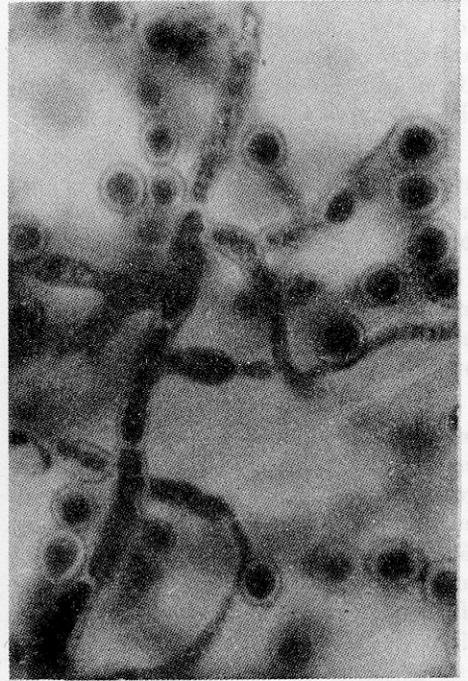


Figura 22

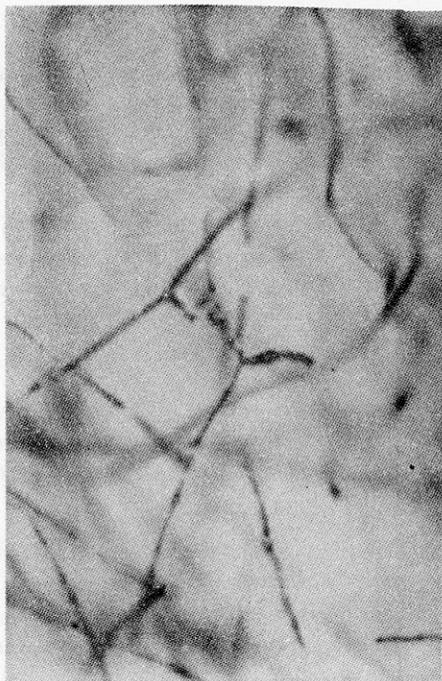


Figura 22 A

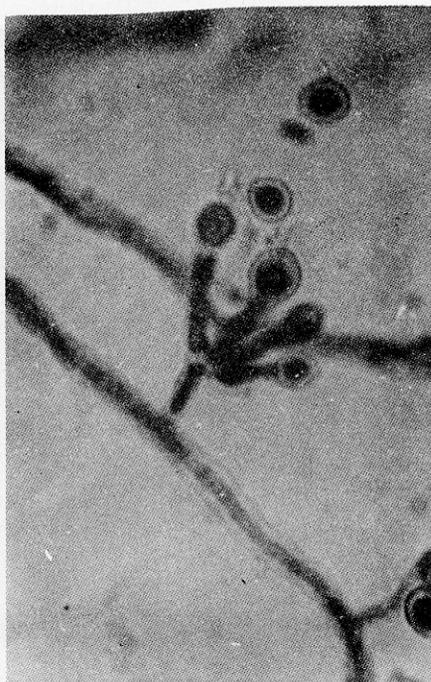


Figura 23

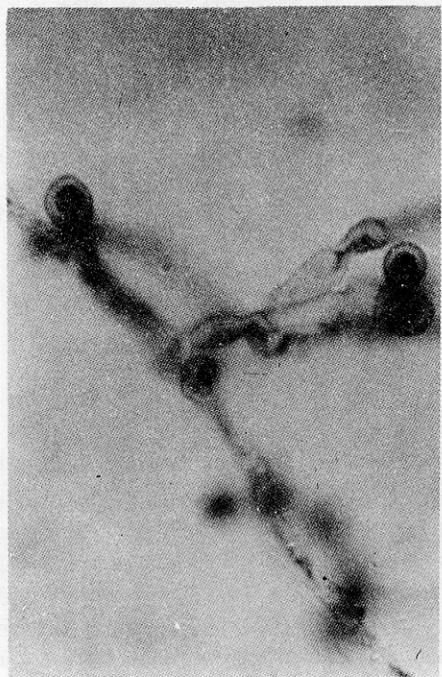


Figura 24



Figura 25

En hifas normales de las que, en la parte terminal, se inicia la diferenciación de una espora, frecuentemente la célula terminal forma protoplastos algo varicosos a partir de los cuales se diferencian en sucesión basípeta las clamidosporas.

En algunas ocasiones las clamidosporas se forman sobre ramas laterales de hifas cuyas células son muy cortas, ensachadas e irregulares, y presenta tendencia a la separación (Fig. 30).

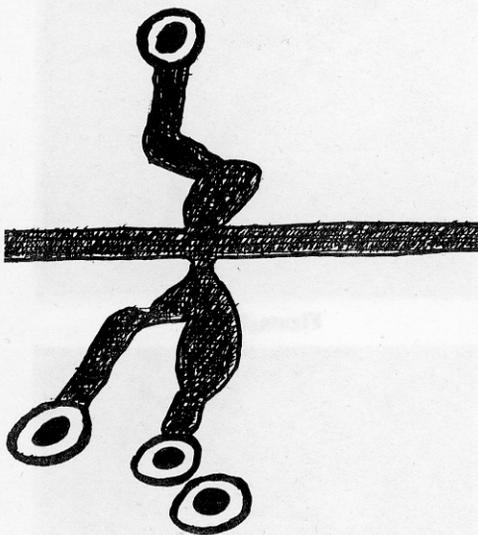


Figura 30

En una misma hifa se pueden encontrar los dos tipos de clamidosporas anteriormente citados.

30. *Clamidosporas formadas en verticilos o racimos que parten como ramas normales, sin constituir una fiálida propiamente dicha* (Fig. 29).

40. *Porciones vesiculosas de hifa que engruesan su pared* (Figs. 31 y 32).

Algunas clamidosporas se forman sobre porciones vesiculosas que se ensanchan extraordinariamente en su parte terminal y

engruesan considerablemente su pared. En estos casos no es únicamente la clamidospora, así considerada por su forma, la que engruesa la pared, sino que, también la porción de donde ésta se origina, ya tiene pared de resistencia.

En ocasiones se presenta una unión en racimo de hifas normales terminadas en clamidosporas, con hifas con grandes vesículas, que terminan en clamidosporas de gran dimensión.

50. *Clamidosporas que se originan a manera de blastosporas o yemas laterales de hifas, las cuales engruesan su pared* (Figs. 12 y 13).

Éstas frecuentemente forman cadenas que se originan en sucesión acrópeta.

Tanto en las hifas ensanchadas como en las delgadas, se forman protoplastos que frecuentemente salen por lisis de la pared original y forman pared propia (Figs. 22a, 33, 34, 35 y 36). No se sabe, a ciencia cierta, su función, pero los autores de este trabajo creen que son estructuras reproductoras, lo cual se está tratando de confirmar, en trabajos actuales. En algunas hifas, ciertas porciones de citoplasma, con todo y pared, se pierden y el citoplasma se condensa en determinados puntos, formando protoplastos ovales.

SECUENCIA DE HIFAS DELGADAS Y PILIFORMES

La reproducción asexual no es tan típica ni tan clara como en el caso anterior.

Nunca se encontraron clamidosporas aisladas y, en general, ciertas células que podrían ser consideradas como tales, por el grosor de su pared, son muy escasas.

En varios casos se presentan iniciaciones de fiálidas o en algunos casos fiálidas ya bien constituidas (Figs. 25 y 26), las observamos que a veces sólo ocasionalmen-

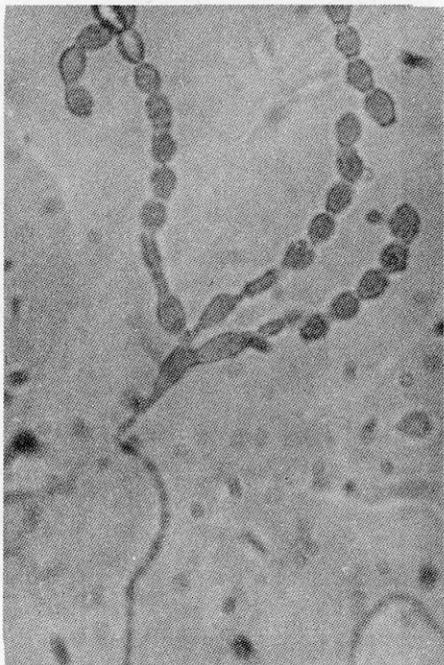


Figura 26

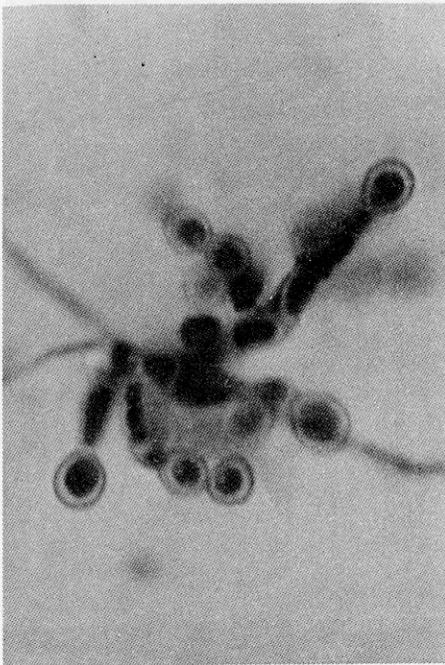


Figura 27

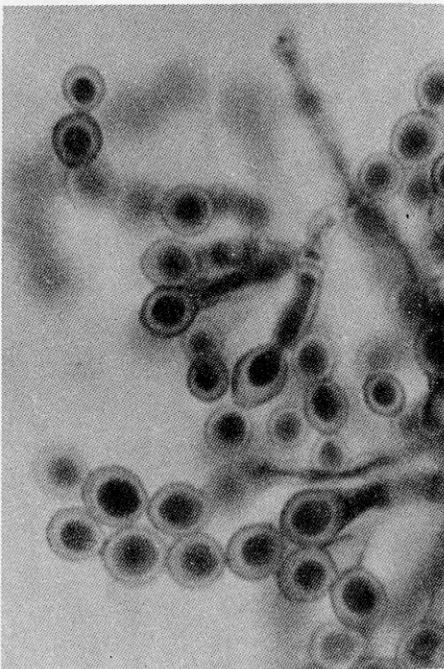


Figura 28

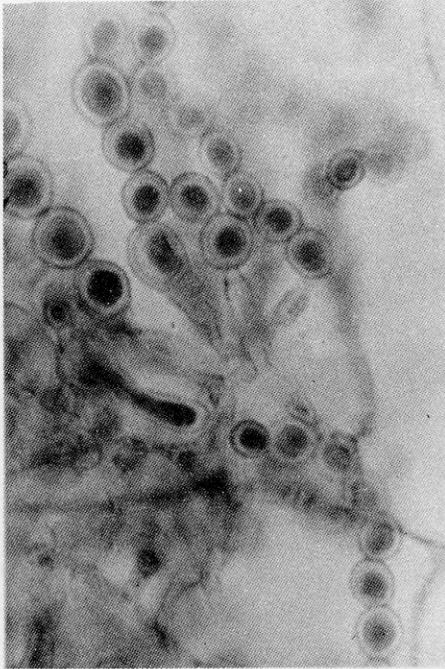


Figura 29

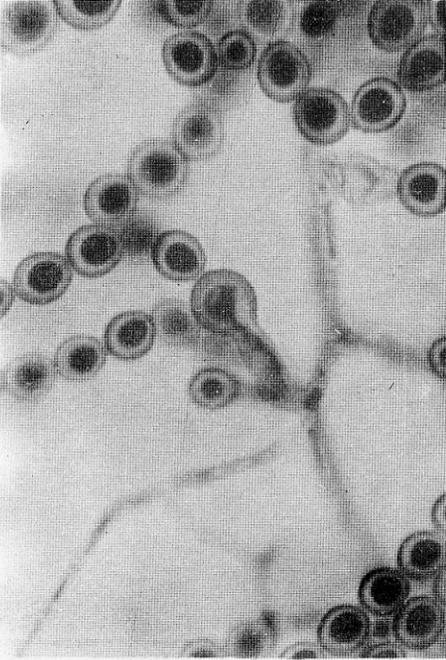


Figura 31

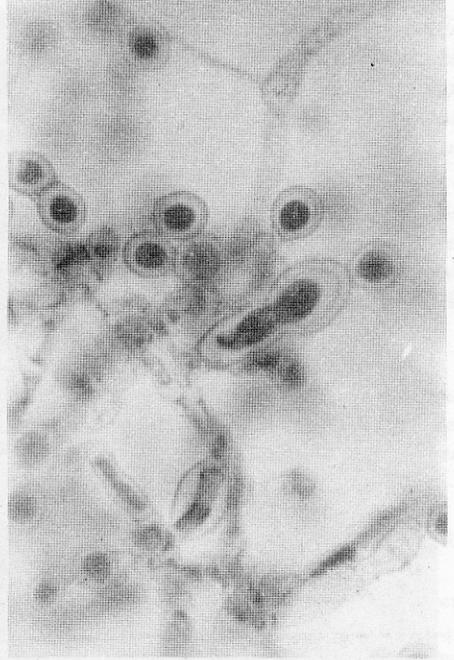


Figura 32



Figura 33



Figura 34

te forman clamidosporas; no sabemos cuál es el factor que detiene la formación de esporas en este caso.

Frecuentemente encontramos verticilos de ramas delgadas partiendo de una hifa piliforme; éstos presentan su parte terminal redondeada y con citoplasma condensado como una pequeña espora, pero no aseguramos que lo sea, ya que nunca las vimos aisladas (Fig. 39 a). En un caso observamos una yema lateral muy pequeña, redondeada, con pared engrosada, de la cual se origina una cadena de blastosporas, también de pared algo engrosada, separadas unas de otras, por medio de un disyuntor que no es más que un tenue cordón citoplásmico (Fig. 39 b).

En general, en el micelio, el citoplasma de las hifas tiende a condensarse formando protoplastos de formas diversas, frecuentemente redondeadas y unidas formando cadenas.

En una porción se presentan masas de hifas, en las que las células se han fragmentado, formando artrosporas que posiblemente tuvieron un origen endógeno (Fig. 39 C) y la pared ya desapareció por lisis. No se presentaron oidióforos típicos.

ESTUDIO DE PREPARACIONES SELLADAS DE LA CEPA 82 (ESPORAS)

Se observó que en las hifas se presenta una abundante fase asexual de tipo oídial, con oidióforos y oídios de diversas formas, los cuales se encontraron en un área donde las hifas tienen una gran tendencia a formar protoplastos; los oidióforos dominantes son las cabezuelas conidiosporíferas.

Los oídios en los oidióforos tienen forma y tamaño muy distintos, en ocasiones hasta formas redondeadas. El citoplasma de los oidióforos tiende a formar protoplastos (Fig. 37).

Hay oídios con formación endógena y otros formados endogénicamente.

También, algunas hifas forman artrosporas endógenas en sucesión basípeta.

OBSERVACIONES EN LA CEPA 106 (ESTÍPITE)

No se observa un sistema dimitico tan claro como en el caso anterior. En las hifas, en general algo delgadas, que se forman en micelios no encerrados ni sellados, la fase asexual, con presencia de clamidosporas, no es tan abundante ni tan clara como en la cepa anteriormente citada; frecuentemente se observa una iniciación de fiálidas laterales y terminales, en las que no se llegó a observar formación de clamidosporas (Fig. 22 a). En otros casos observamos una fiálida terminal con clamidosporas ovales, de pared lisa, muy engrosada.

Las clamidosporas son, en general, muy escasas; en ocasiones se forman clamidosporas muy pequeñas a partir de partes terminales de hifas casi piliformes o de ramas de hifas. Las clamidosporas se unen unas a otras por delgadísimos disyuntores (Fig. 40 a). Únicamente se observan 2 o 3 hifas piliformes formando clamidosporas.

En la parte terminal de una hifa de grosor normal, se encontró una clamidospora más típica, redondeada, como las observadas en los cultivos en tubo.

Hay pequeñas regiones en las que se presentan artrosporas regulares con formación endógena y una iniciación de formación de oídios muy irregulares en forma y tamaño, y sumamente vacuolizados. En ocasiones se observa la formación de artrosporas en sucesión basípeta, a partir de ramas laterales de hifas; estas artrosporas se forman por tabicación del citoplasma, quedando unidas unas a otras por un del-

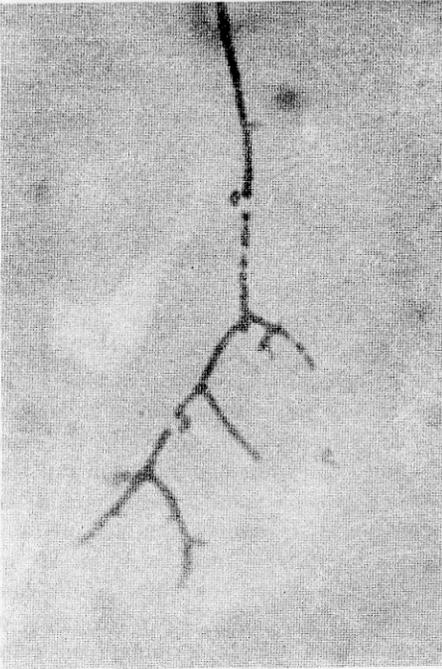


Figura 35

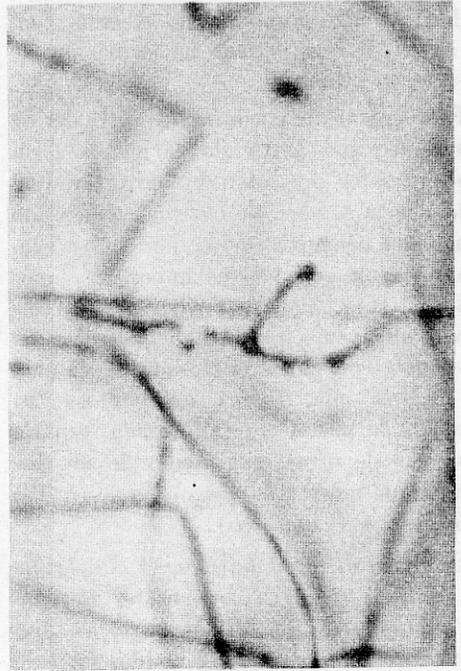


Figura 36



Figura 37

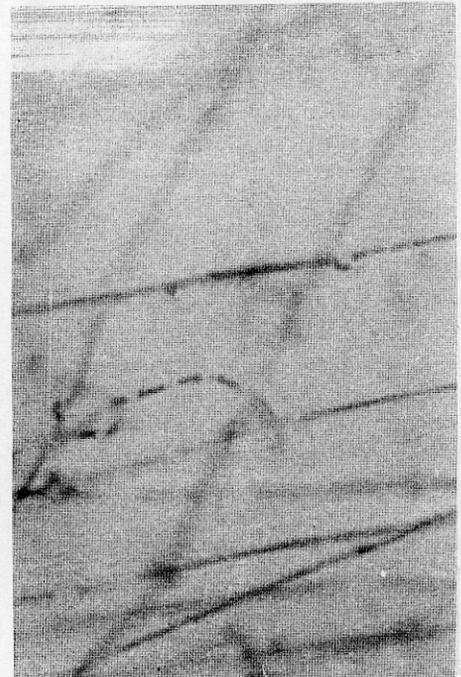


Figura 38

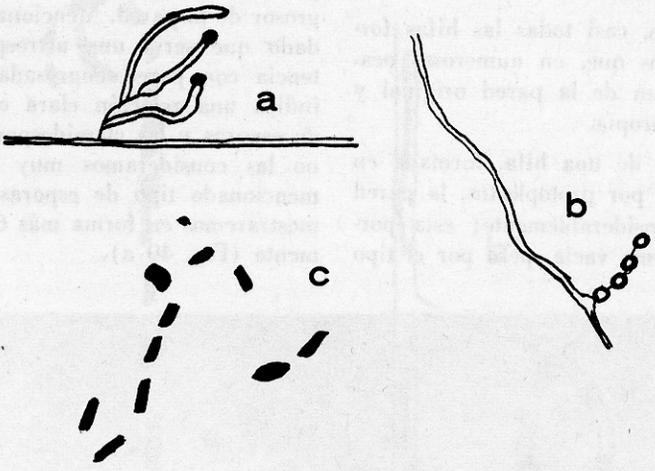


Figura 39

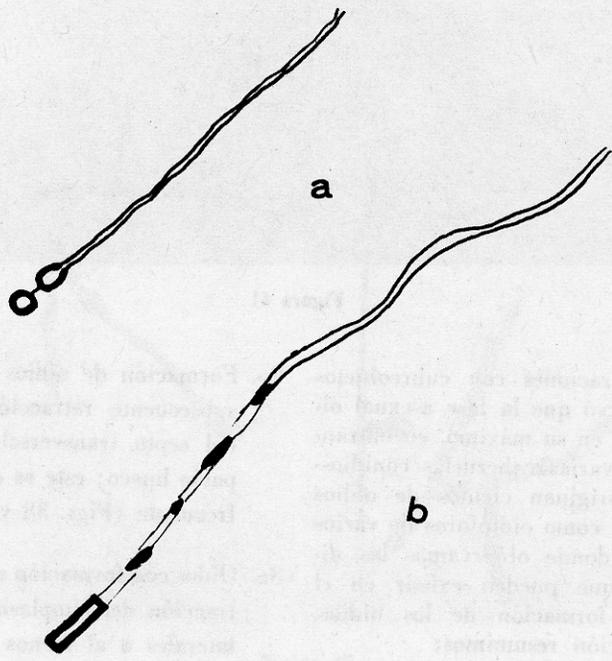


Figura 40

gado cordón citoplasmático, a manera de disyuntor (Fig. 35).

En el micelio, casi todas las hifas forman protoplastos que, en numerosas ocasiones, se liberan de la pared original y forman pared propia.

En un punto de una hifa, formada en su mayor parte por protoplastos, la pared se engruesa considerablemente; esta porción aparece como vacía, pero por el tipo

de refringencia, se observa que no hubo penetración del azul láctico, debido al grosor de la pared. Mencionamos este caso, dado que sería una artrospora de resistencia con pared engrosada, lo cual nos indica una relación clara entre este tipo de esporas y las clamidosporas que, en sí, no las consideramos muy diferentes del mencionado tipo de esporas, como lo demostraremos en forma más clara posteriormente (Fig. 40 a).

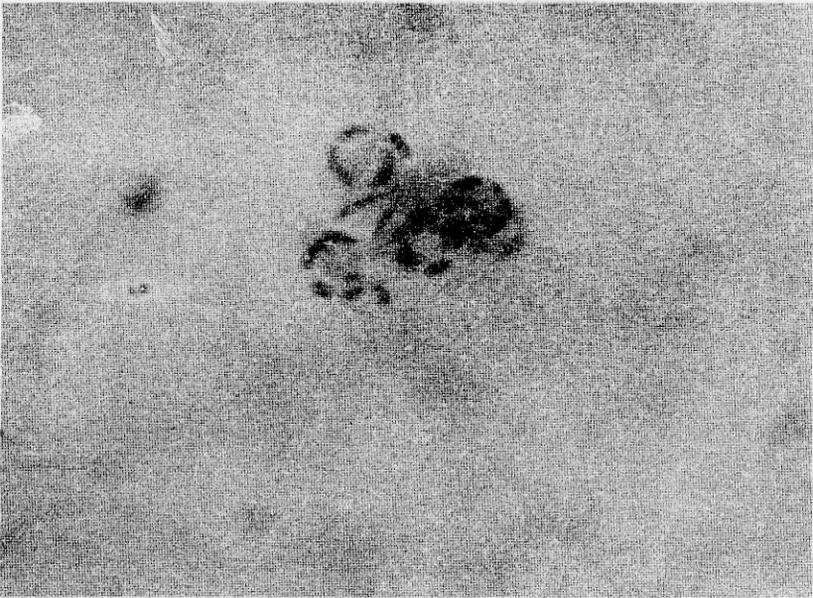


Figura 41

En las preparaciones con cubreobjetos sellados se observó que la fase asexual oídial, se presenta en su máximo, encontrándose fusión de varias cabezuelas conidiosporíferas que originan cientos de oídios redondeados, así como oidióforos de varios tipos. Es aquí donde observamos las diversas formas que pueden existir en el mecanismo de formación de los oídios, que a continuación resumimos:

1o. Formación de oídios por simple tabicación mayor del oidióforo.

2o. Formación de oídios por tabicación y subsecuente retracción del citoplasma del septo transversal, dejando un espacio hueco; este es el mecanismo más frecuente (Figs. 38 y 41).

3o. Oídos con formación endógena y con retracción del citoplasma de las paredes laterales o al menos de una de ellas; en éstos, frecuentemente, al separarse el citoplasma, se polariza. (Fig. 37).

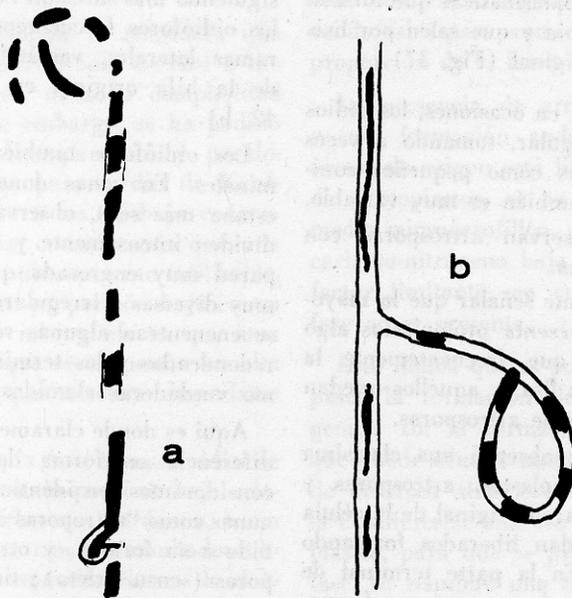


Figura 42

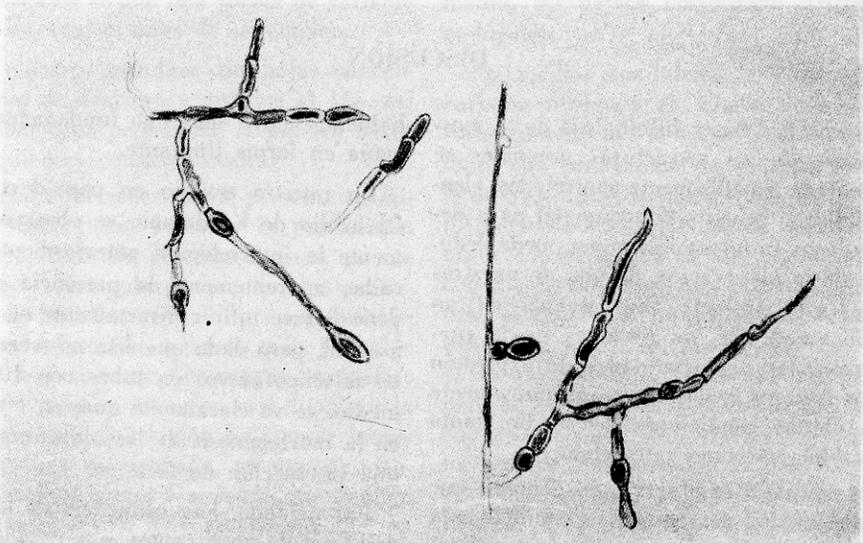


Figura 43

40. Oídios endógenos formados por condensaciones citoplasmáticas que forman una pared propia y que salen por lisis de la pared original. (Fig. 37).

Observamos que, en ocasiones, los oídios son de forma irregular, tomando a veces formas redondeadas como pequeños conidios; su tamaño también es muy variable.

También se observan artrosporas con formación endógena.

Aquí es importante señalar que la mayoría de las hifas presenta protoplastos algo irregulares, pero que frecuentemente la pared de la hifa se lisa, y aquéllos quedan liberados a manera de artrosporas.

En una zona se observó una clarísima transición de protoplastos, artrosporas y oídios, ya que la pared original de la célula se disuelve y quedan liberados formando paredes propias. En la parte terminal de estas mismas hifas observamos una formación de verdaderos oidióforos (Fig. 42, a).

Se observó que la fragmentación de los

oidióforos se inicia en el ápice, al parecer siguiendo una sucesión basípeta (Fig. 34); los oidióforos frecuentemente parten como ramas laterales, vaciándose el citoplasma de la hifa original en este punto (Fig. 42, b).

Los oidióforos también pueden ser terminales. En zonas donde la preparación estaba más seca, observamos hifas que se dividen intensamente y forman células de pared muy engrosada que son de formas muy diversas e irregulares, entre las cuales se encuentran algunas rectangulares, otras redondeadas y las terminales ovaladas, como verdaderas clamidosporas (Fig. 43).

Aquí es donde claramente se observó una diferencia en forma de estructuras, que consideramos son idénticas, apareciendo algunas como "artrosporas de resistencia" (debido a su forma), y otras como clamidosporas (sensu stricto); tienen el mismo origen y no deben ser tomadas como estructuras diferentes, por la variación morfológica.

DISCUSIÓN

Aunque las bases fisiológicas de la morfogénesis de las estructuras asexuales se encuentran genéticamente controladas, siendo el factor genético fundamental para desencadenar su formación, como puede deducirse de la observación de una de nuestras cepas, que presentó fase asexual en un medio en el que las restantes no la presentaron, las potencialidades de expresión de los factores genéticos operan únicamente bajo ciertas condiciones del medio, tanto extracelulares como intracelulares.

En conjunto se observó, en general, que la fase asexual no siempre es condicionada por la variación de un sólo factor sino, como ocurre con la morfogénesis tanto de estructuras vegetativas como reproductoras, existe una interacción de diversos factores,

habiendo entre ellos uno fundamental, que actúa en forma limitante.

En nuestro estudio en papa-dextrosa y en medio de Kaufmann, se observó claramente la interrelación anteriormente indicada; aparentemente la presencia de oxígeno parece influir directamente en la fase asexual, pero dado que ésta no se encontró en micelios aéreos en tubos con 10 cc de medio, se ve claramente que, en este caso, en la morfogénesis de los oidióforos existe una interacción de factores.

Por un lado, hay influencia de la cantidad total de nutrimentos, observándose que a menor cantidad disponible, la fase asexual aumenta notablemente y, por otro lado, este factor tiene sujeta su acción a la pre-

sencia de una cierta cantidad de oxígeno en el medio.

En estos dos medios, se considera que es imposible atribuir la fase asexual a determinados factores, dada la complejidad que presentan; sin embargo, se ha podido hacer una cierta comparación y paralelismo de resultados para medio de Kaufmann, con relación a los de baja concentración de dextrosa, considerando que una fuente carbonada directamente utilizable, que se encuentra en proporción baja en un medio, tendría el mismo efecto que una fuente carbonada que se encuentra en alta proporción, pero que necesita degradarse para ser utilizada.

En ambos casos, la fase asexual oïdial se presenta no únicamente por una baja relación total entre carbono y nitrógeno, como en apariencia se ve con los resultados obtenidos con bajas concentraciones de dextrosa, sino por la relación baja entre fuente de carbono utilizable y nitrógeno.

Así, considerando que el medio de Kaufmann tiene maltosa y extracto de malta, lo más probable es que esta fuente de carbono deba degradarse antes de su empleo.

De nuestros estudios con bajas concentraciones de dextrosa y peptona al 1%, así como con agua peptonada, se pueden hacer las siguientes consideraciones:

El medio microaerofílico, presente en micelios sumergidos, favorece la producción de protoplastos de diversas formas, ya sea regulares o irregulares, que tienden a liberarse de la hifa original, y cuya función nos es desconocida, pero lo más probable es que actúen como estructuras asexuales; la producción de éstos, no está ligada a la presencia de una relación baja entre fuente carbonada y nitrogenada, ya que de estudios recientes hemos observado que tienden a producirse, y en mayor cantidad aún, en medios con una relación carbono-nitrógeno extremadamente elevada, utilizando altas concentraciones de dextrosa; claro está, que en este último caso también podría influir

la presión osmótica como inductora, lo cual no hemos llegado a demostrar utilizando sales para aumentarla, sin variar la proporción de la fuente carbonada.

La presencia de artrosporas endógenas y con formación endógena, cuyo mecanismo de origen está ligado a la presencia de protoplastos, se ve favorecida en un medio microaerofílico, actuando la relación carbono-nitrógeno baja, en este caso como factor limitante, en cuya ausencia dicha fase no se presenta.

Esto indica que es posible dividir en dos pasos la formación de artrosporas endógenas: 1o. la formación de protoplastos, que puede ocurrir tanto en concentraciones de dextrosa altas como muy bajas, y 2o. la citodíesis: una vez formados los protoplastos, para que se presente esta segunda fase, se requiere una mayor oxidación en el medio, como se indicará posteriormente para nuestros resultados obtenidos en la formación de oídios y, por esto, en altas concentraciones de dextrosa, hasta el momento, no hemos encontrado artrosporas endógenas.

En medios isotónicos, la baja relación carbono-nitrógeno es básica en el desencadenamiento de la reproducción asexual, tanto con producción de artrosporas como la de tipo oïdial, siempre y cuando la fuente nitrogenada sea orgánica, ya que no se ha observado presencia de esta fase en medios con nitrógeno inorgánico, como el de Czapek, al cual se le introdujeron ciertas modificaciones. En la producción de oídios se ve que éste es el factor más importante, pero no es sino una interacción de factores, como la entrada de oxígeno a un patrón metabólico desconocido, la que hace que esta fase asexual se manifieste en su totalidad. Este factor influye directamente en la morfogénesis de oidiófonos y de oídios, particularmente en la de estos últimos, influyendo directamente en la división del oidióforo.

Esta importante relación de la fase asexual (oidial) con el oxígeno, ha hecho pensar, a los autores de este trabajo, en la influencia del potencial de oxidorreducción total en la presencia de esta fase, estudio que se está realizando en la actualidad y, de los resultados obtenidos hasta el momento, se puede sugerir la posibilidad de que la baja relación carbono-nitrógeno, no actúe únicamente en forma directa, sino que su influencia puede ser también, en nuestro caso, debida a que la fuente de carbono sea reductora o no. Por lo que respecta a estos estudios, es necesaria una mayor comprobación.

En los estudios hechos en cultivo en lámina se observó que también influye la oxigenación en la formación de oidios, la cual en este caso no es problema, ya que, además de que el micelio posee una gran cantidad de oxígeno disponible, crece en una sola capa, lo que da aún mayor facilidad de oxigenación, y por esto consideramos que, aun en cubreobjetos sellados, no hay un gran detrimento de este factor, dado que el anillo se encuentra sellado al portaobjetos sólo parcialmente. Aquí se observó claramente la presencia de otro factor limitante, como es la humedad, que en cultivos líquidos no tiene problema, pero que en cultivos en lámina viene a ser el factor de máxima importancia en el condicionamiento de dos tipos diferentes de fase asexual. En primer lugar, se observó que en cubreobjetos sellados, en los que la gota de medio no se seca con facilidad, se forman oidióforos y oídios y no clamidosporas que, aunque se forman, su proporción es notablemente menor. Asimismo, se observó que se forman oídios, si se añade diariamente una cierta cantidad de agua para conservar la humedad de la cámara. En agua peptonada se observó que la presencia de fase oïdial en micelios aéreos o en cultivos en lámina, con las condiciones ya indicadas, aumenta progresivamente con relación al tiempo, y en estadios iniciales no se presenta, lo cual no sucede cuando

hay bajas concentraciones de dextrosa, esto posiblemente sea debido a que se necesita una mayor fuente de energía para la formación de oidióforos y, particularmente, para la división de éstos, la cual no existe inicialmente; pero posteriormente, por ruptura de aminoácidos de la peptona y síntesis de carbohidratos, llega un momento en el que hay mayor energía y posiblemente es entonces cuando se desencadena la división intensa.

En el caso de fase asexual de tipo oïdial, y de artrosporas, confirmamos plenamente el principio que Klebs da para otros hongos en el que, como ley general, indica que la reproducción se favorece quitándole al micelio uno o más nutrimentos y esto, particularmente, por lo que se refiere a las fuentes de carbono y de nitrógeno.

Por lo que respecta a la formación de clamidosporas, en un principio se pensó que también era desencadenada por una baja relación carbono-nitrógeno, pero en nuestros estudios recientes se ha observado que esta consideración es errónea, y que en forma interesante el principio de Klebs no se aplica en este caso y, por lo tanto, no debería generalizarse en la forma en que este autor lo ha hecho, ya que se ha encontrado formación de clamidosporas tanto con una relación carbono-nitrógeno muy alta, aumentando la concentración de la fuente carbonada, en relación al medio isotónico, así como una relación carbono-nitrógeno muy baja, en relación con el mismo medio; realmente su presencia se encuentra en los extremos de concentraciones de fuente hidrocarbonada, y de aquí se dedujo la explicación de las grandes contradicciones entre los varios autores que han estudiado una determinada especie, en la que uno dice que las clamidosporas se forman a altas concentraciones y el otro autor, que trata sobre la misma especie, dice que se forman a bajas concentraciones. Simplemente, de estos autores, cada uno ha analizado un límite diferente de concentraciones.

Aún no sabemos si la secuencia de formación de clamidosporas es la misma en bajas y en altas concentraciones de dextrosa, estudio que se está realizando actualmente. Sin embargo, es interesante aclarar lo siguiente: por el momento, en concentraciones altas de dextrosa, hemos observado, aun en una misma cepa, clamidosporas lisas, finamente erizadas y crenadas, hecho no observado en ningún momento en bajas concentraciones, en las que siempre las observamos lisas.

Lo que no se sabe es si sea un mismo factor el determinante de la producción de clamidosporas en ambos límites, cosa que se considera muy poco factible; sin embargo, en relación con otro factor posible en el límite de concentraciones altas, como es la presión osmótica, ya se observó, empleando medios con concentraciones elevadas de sales, que no es el inductor en forma directa.

Lo que sí hemos demostrado claramente, es que la fuente nitrogenada debe ser orgánica para la formación de clamidosporas; ya que, en medio de Raulin en el que se presenta una alta relación carbono-nitrógeno, pero la fuente nitrogenada es de sales de amonio, nunca se observó formación de clamidosporas.

De los estudios de clamidosporas en cultivos en lámina, es importante señalar lo siguiente:

En bajas concentraciones de dextrosa, la formación de dos estructuras asexuales diferentes, como son los oídos y las clamidosporas, parece estar condicionada, en los estadios iniciales, por un mismo factor que, en este caso, es la relación ya citada, pero la evolución posterior y delimitación de una u otra estructura, con dominancia de cualquiera de ellas, está condicionada por un factor limitante entre las dos que, en este caso, son la humedad y la cantidad de medio nutritivo disponible. La formación de clamidosporas se desencadena más fácilmente cuando la cantidad

de medio nutritivo disponible es menor y cuando se disminuye notablemente el grado de humedad, como en los casos de las cámaras húmedas, conservadas en cajas de Petri que no se humedecieron más que inicialmente, o bien en los cultivos en los que el cubreobjetos no fue sellado.

Son siempre condiciones más drásticas del medio las que determinan la formación de clamidosporas. Aquí se ve un aprovechamiento inmediato del poco medio disponible para una división inicial intensa, de la cual se originan estructuras que pueden soportar condiciones adversas, asegurándose así la subsistencia del hongo.

La humedad fue aquí el factor más importante en el tipo de estructuras asexuales formadas.

Se puede considerar la formación de clamidosporas en dos fases:

- 1a. Iniciación y presencia en mínima cantidad, de acuerdo con la relación carbono-nitrógeno extremadamente alta o baja con una fuente nitrogenada orgánica compleja como la peptona,
- 2a. Desarrollo al máximo de las diversas estructuras formadoras de clamidosporas y por lo tanto, la máxima presencia de éstas, limitada por otros factores más drásticos, como la humedad.

Es necesario aclarar que, mientras que a los cultivos en tubo se les mantuvo en temperatura constante de 26° C, a las cajas de Petri se les mantuvo a la temperatura ambiente; asimismo, los tubos se mantuvieron en la obscuridad, mientras que las cajas tenían una alternancia de luz del día y obscuridad. Aún no se ha estudiado la influencia de estos factores en la reproducción asexual de esta especie pero, por lo pronto, debe considerarse como una variante más.

En general, se observó cómo la reproducción asexual se presenta en un límite mucho más corto de condiciones ambientales, que el crecimiento vegetativo.

Si se comparan los resultados observados en la cepa 106 (estípote), con relación a la 82 (esporas), por lo que respecta a las secuencias tanto oidiales como de clamidosporas, se puede concluir que las dos se comportan prácticamente de la misma manera, con la variación de los mismos factores ambientales, pero que, en general, la cepa 106 presenta una potencialidad mucho menor de formación de clamidosporas, y que necesita condiciones de baja humedad, más drásticas que en el caso anterior, para dicha formación. Esto nuevamente nos conduce a la consideración ya indicada de las características genéticas que influyen en la formación de una determinada estructura, cuyas potencialidades varían, como lo hemos descrito, por factores ambientales.

En el estudio de la cepa 82, es muy importante señalar la diferencia fisiológica clara de los distintos tipos de hifas de un mismo micelio, algunos con potencialidad para formar mayor número de estructuras asexuales y de clamidosporas.

Esto ya indica un tipo similar a la organización que hay en un cuerpo fructífero. Por otro lado, no se explica una cierta constancia de fíbulas en la base de la fiálida; se sugirió la posibilidad de un cierto tipo de fase sexual miceliana, lo cual no se cree factible, debido a la presencia de una gran fase repetitiva con formación de gran cantidad de esporas, y a la ausencia de formación de estructuras en tétradas, independientemente de la presencia de fíbulas en la base de la fiálida, por lo que no se piensa que ésta sea una fase sexual. La fíbula contribuye, quizá, únicamente al mantenimiento de un micelio dicariótico. Esta idea había surgido a raíz de la publicación del trabajo de McKay en *Polyporus meliae*, en cuyo micelio encuentra clamidosporas endógenas y basidios con basidiosporas; pero ahí se observa claramente, en el basidio, la formación de tétradas, y la situación es to-

talmente diferente de la observada por los que esto escriben.

Observando todo en conjunto, se considera que, a bajas concentraciones de dextrosa, la formación de oídios o artrosporas y de clamidosporas en esta especie, no deben considerarse por separado, y que una estructura fácilmente puede modificarse en la otra por una variación mínima del medio y, además, que en la formación de todas estas estructuras, en este caso, en los estadios iniciales, intervienen los mismos factores.

En los diversos mecanismos y secuencia de formación de clamidosporas, se ve un cierto paralelismo con las de formación de oidióforos y oídios.

Como resultado de todos nuestros estudios se ve, en forma clara, que las clasificaciones que se tienen en el momento de las esporas asexuales de los diversos hongos, posiblemente son algo arbitrarias ya que, en ciertos casos, se transforman unas en otras y, aún en forma más clara, se observó en las estructuras reproductoras como las fiálidas, que no siempre forman "fialosporas" en el sentido en que son conocidas por los micólogos, aunque el nombre de dichas esporas puede conservarse ya que, etimológicamente, es correcto para las verdaderas fialosporas y aun para las clamidosporas que se originan en una fiálida.

Como consecuencia del presente estudio, por lo menos, se propone una ampliación del término clamidospora, para designar a toda espora asexual con pared engrosada, independientemente de su forma y de su origen.

Tanto el hecho de producir esporas por diferentes mecanismos, las cuales van a tener la misma forma final y, más aún, el hecho de que una misma estructura pueda tener diversas formas finales, aun en una misma cepa, como ha sido demostrado en otra investigación sobre la presencia de clamidosporas en altas concen-

traciones de dextrosa, son situaciones que ponen en grandes problemas a los taxónomos, que buscan caracteres diagnósticos estables, pero que plantean problemas complejos y atrativos al micólogo experimental.

El hecho de haber encontrado y comprobado una fase asexual con formación de estructuras tan poco características para un Basidiomiceto, permite considerar que este tipo de estudios sería de gran ayuda en la clasificación de hongos imperfectos, ya que, variando las condiciones ambien-

tales, se puede hacer que éstos expresen el mayor número de potencialidades genéticas que tienen y, de acuerdo con esto, se tendería a una clasificación más natural de este grupo. Se aclara que esto sería muy difícil, ya que no se puede someter a un hongo a todas las variantes fisicoquímicas factibles, y menos a todo un grupo; pero cualquier estudio hecho en este sentido, por mínima que fuese su aportación, ciertamente tendería a una clasificación algo más natural.

LITERATURA

- BARRON, G. L. 1962. New species and new records of *Oidiodendron*. *Canadian J. Bot.* 40: 589-607.
- BRODIE, H. J. 1936. The occurrence and function of oidia in the Hymenomycetes. *Amer. J. Bot.* 23: 309-327.
- BULLER, A. H. R. 1922-1933 (reimpresión 1958). *Researches on Fungi*. Vols. II-V. Hafner Publishing Co. New York.
- COCHRANE, V. W. 1958. *Physiology of Fungi*, John Wiley & Sons, Inc.
- DUBOVOY, C. y T. HERRERA. 1967. Estudio morfológico de micelios de *Psilocybe caerulescens* Murrill, en diversos medios líquidos de cultivo. *An. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México.* 38. Ser. Bot. (1): 111-150.
- GÓMEZ NAVA, MARÍA DEL SOCORRO. 1967. Examen morfológico comparativo de especímenes de *Rhizoctonia* D. C. aislados de semilleros forestales. *Boletín Técnico No. 21 de la Secretaría de Agricultura y Ganadería*, México, D. F.
- HAWKER, L. E. 1957. *The physiology of reproduction in fungi*. Cambridge University Press.
- HEIM, R. 1958. *Les Champignons Hallucinogènes du Mexique*. Editions du Muséum National d'Histoire Naturelle. Paris.
- HUGHES, S. J. 1953. Conidiophores, conidia and classification. *Canadian J. Bot.* 31: 577-659.
- MADLINE, M. F. 1966. *The Fungus Spore*. *Colston papers No. 18*; The genesis of spores of higher fungi, pp. 15-36.
- MC KAY, H. 1967. Cultural Studies of *Polyporus meliae* and two similar species. *Mycologia* 59 (6): 1050-1058.
- SINGER, R. 1962. *The Agaricales in Modern Taxonomy*. Published by J. Cramer, Weinheim, p. 64.
- SUBRAMANIAN, C. V. 1958. Hyphomycetes V. J. *Indian Bot. Soc.* 37: 47-64.
- TUBAKI, K. 1963. Taxonomic study of Hyphomycetes. In Ainsworth, *The Fungi*; Volumen II (1966). Academic Press. pp. 113-131.