Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Estudios quimiotaxonómicos en especies del género Saccobolus. : (Ascobolaceae-Pezizales)

Ramos, Araceli Marcela

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Ramos, Araceli Marcela. (1998). Estudios quimiotaxonómicos en especies del género Saccobolus. : (Ascobolaceae-Pezizales). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3030_Ramos.pdf

Cita tipo Chicago:
Ramos, Araceli Marcela. "Estudios quimiotaxonómicos en especies del género Saccobolus. : (Ascobolaceae-Pezizales)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3030_Ramos.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudios quimiotaxonómicos en especies del género *Saccobolus*. (Ascobolaceae-Pezizales)

Lic. Araceli Marcela Ramos

Directora: Dra. María Esther Ranalli
Co-Directora: Dra. Flavia Forchiassin

Tesis presentada para optar al título de: Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires
1998

Agradecimientos

A la Dra. María Esther Ranalli y a la Dra. Flavia Forchiassin por sus consejos, su paciencia y su guía.

A la Dra. Beatriz Saidman por su ayuda y su apoyo.

A mis compañeros de laboratorio, a Andre y Pauli por la alegría y las buenas ondas, a Luis y Alejandro, por los momentos compartidos y las charlas del mediodía, a Oscar por el asesoramiento informático, a Lauri por nuestras charlas en el Tour a Flores.

A Diani, mi compañera de ruta isoenzimática, con quien compartí los momentos buenos y malos, las alegrías y frustraciones de una parte del camino.

A María Delia por estar siempre dispuesta a dar un consejo y una palabra de apoyo.

A Alex y a Matías por la ayuda ante las vicisitudes isoenzimáticas.

A la gente del laboratorio 12.

A la gente del laboratorio 5 y aledaños.

A la gente del laboratorio de genética por el préstamo de las "lentillas" y por responder a todas mis preguntas, siempre con una sonrisa.

A Alicia por el préstamo de la cámara.

A la señora Mercedes.

A mis queridos amigos, por ser mis hermanos del alma, los que se eligen.

A Gustavo, Teresa, Matías y Paula, a la distancia.

A Rodo por su asesoramiento fotográfico.

A Dani por su indispensable asesoramiento informático y por estar siempre, en las buenas y en las malas.

A Manolo y a Nora por el apoyo siempre.

A mis hijas Mariana y Eli por las sonrisas, la ternura y la alegría.

A mis padres por mostrarme el camino para no claudicar.

Al CONICET y a la Universidad de Buenos Aires por la financiación de este trabajo. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por otorgarme el lugar de trabajo.

RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron establecer, a partir del análisis de los patrones electroforéticos de isoenzimas intracelulares, de ciertos caracteres de cultivo, y de la producción y patrones electroforéticos de endo β-D-1,4 glucanasa, la delimitación de diez especies del género ***Saccobolus***. Se utilizaron para el mismo 114 cepas monospóricas del género. Se analizaron seis sistemas isoenzimáticos intracelulares: AAT, ACP, G6PD, IDH, EST, SOD, y uno extracelular: endo β-D-1,4 glucanasa. El fenograma obtenido a partir del análisis de agrupamientos (UPGMA) muestra dos grupos principales de especies, correspondientes a cada una de las dos secciones en las que se divide el género. Se observó una alta homogeneidad intraespecífica ya que no se observaron diferencias en los estados de los caracteres entre las cepas monospóricas de cada aislamiento geográfico y aún entre distintos aislamientos geográficos. El análisis de los fenogramas muestra un alto grado de asociación entre las especies, lo cual concuerda con las observaciones morfológicas y el comportamiento fisiológico del grupo donde las especies aparecen como un continuo. Los resultados de este trabajo avalan el uso de los patrones isoenzimáticos de las enzimas testeadas, y las diferencias en los parámetros fisiológicos, para la delimitación de las especies del género. Los mismos indican que las diez especies estudiadas constituyen unidades taxonómicas independientes, avalando lo establecido, para alguna de ellas, a partir del análisis de los patrones morfológicos, y fisiológicos previamente estudiados. Esta metodología constituye una herramienta adicional a la taxonomía tradicional del género, que utiliza sólo caracteres morfológicos.

Palabras Claves: Ascobolaceae, ***Saccobolus***, isoenzimas, taxonomía fúngica, fenograma, endo β-D-1,4 glucanasa.

SUMMARY

The aim of this work was to establish the delimitation of ten species of the genus ***Saccobolus*** on the base of the analysis of electrophoretic patterns of intracellular enzymes, cultural characters and production and electrophoretic pattern of endo β-D-1,4 glucanase. A hundred and fourteen monosporic strains of the genus were used throughout, six intracellular and one extracellular isozyme systems were analyzed: AAT, ACP, G6PD, IDH, EST, SOD and endoglucanase. The phenogram obtained from the analysis of grouping (UPGMA) showed two groups of species, corresponding to the two sections of the genus. A high intraspecific homogeneity was observed, since there were not differences in the status of the characters among the monosporic strains of each geographical isolement, and not even among different geographical isolements. The analysis of phenograms showed a high degree of association among species, which correlates with morphological observations and physiological behavior of the taxa. The results of this research support the use of isozyme patterns of enzymes tested as well as the differences in physiological parameters for the delimitation of species in this genus. They show that the ten species studied are independent taxonomical entities, supporting the taxa established by the analysis of morphological and physiological patterns previously studied. This methodology constitutes an additional tool to traditional taxonomy of the genus, that uses only morphological characters.

Key Words: Ascomycetes, ***Saccobolus***, isozymes, fungal taxonomy, phenogram endoglucanase.

INDICE

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Sistemática bioquímica*

1.1.1 *Antecedentes* 1

1.1.2 *Electroforesis de isoenzimas* 2

1.1.3 *Análisis isoenzimático en taxonomía fúngica. Aplicaciones* 5

1.2 *El género Saccobolus*

1.2.1 *El habitat coprófilo* 9

1.2.2 *Degradación de celulosa. Producción del sistema enzimático extracelular. Usos Taxonómicos* 13

1.2.3 *Características morfológicas* 15

OJETIVOS 18

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 *Organismos utilizados* 19

2.2 *Obtención de las cepas monospóricas* 19

2.3 *Mantenimiento de las cepas y obtención de inóculos* 25

2.4 *Medios de cultivo* 25

2.4.1 *Medios sólidos* 25

2.4.2 *Medios líquidos* 26

2.5 *Condiciones de esterilización* 27

2.6 *Condiciones de cultivo* 27

2.7 *Crecimiento vegetativo* 27

2.7.1 *Estimación del crecimiento* 28

2.7.1.1 *Peso seco del micelio* 28

2.7.1.2 *Proteínas totales de micelio* 28

2.8 *Producción y zimogramas de endo-β-D-1,4-glucanasa* (EC 3.2.1.4)

2.8.1 *Medición de actividad endo-β-D-1,4-glucanasa* 29

2.8.2 *Zimogramas de endo-β-D-1,4-glucanasa* 30

Fraccionamiento electroforético

2.8.2.1 *Preparación de la muestra* 30

2.8.2.2 *Condiciones de electroforesis* 31

2.8.2.3 *Preparación de los geles de poliacrilamida* 31

2.8.2.4 *Corrida electroforética* 33

2.8.2.5 *Detección de las bandas de actividad* 34

2.8.2.6 *Técnicas numéricas. Construcción de la matriz básica de datos* 35

2.8.2.7 *Análisis de agrupamientos* 37

2. 9 *Análisis isoenzimático de enzimas intracelulares* 37

2.9.1 *Organismos utilizados* 37

2.9.2 *Sistemas isoenzimáticos analizados.* 38

Caracterización de los sistemas enzimáticos utilizados 39

2.9.3 *Obtención del micelio* 42

2.9.4 *Preparación de la muestra* 42

2.9.5 *Condiciones de electroforesis* 43

2.9.6 *Preparación de los geles de poliacrilamida. Buffers empleados.* 43

2.9.7 *Siembra de las muestras en los geles* 45

2.9.8 *Corrida electroforética* 45

2.9.9 *Buffers de corrida* 46

2.9.10 *Tinciones enzimáticas* 47

Fosfatasa ácida (ACP) 49

Esterasas (EST) 49

Glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G6PD) 49

Aspartato aminotransferasa (AAT) 50

(Glutamato oxalacetato transaminasa)

Isocitrato dehidrogenasa (IDH) 50

Superóxido dismutasa (SOD) 51

2.9.11 *Número de clasificación de las enzimas* 51

2.9.12 *Acondicionamiento y almacenamiento de los geles* 52

2.9.13 *Técnicas numéricas* 52

2.9.13.1 *Construcción de la matriz básica de datos* 52

2.9.13.2 *Análisis de agrupamientos* 53

2.9.13.3 *Análisis de congruencia* 53

2.10 *Análisis con todos los caracteres* 55

2.10.1 *Construcción de la matriz básica de datos* 55

2.10.2 *Análisis de agrupamientos* 55

3. RESULTADOS

3.1 *Identificación de las especies. Obtención de las cepas monospóricas* 59

3.2 *Curvas de crecimiento en medio con glucosa* 59

3.3 *Crecimiento producción y zimogramas de endo-β-D-1,4-glucanasa*

3.3.1 *Curvas de crecimiento, medición de actividad endo-β-D-1,4-glucanasa, proteínas y pH final en el sobrenadante* 66

3.3.2 *Zimogramas de endo-β-D-1,4-glucanasa* 76

3.3.3 *Técnicas numéricas. Matriz básica de datos* 79

3.3.4 *Análisis de agrupamientos* 79

3.4 *Análisis isoenzimático*

3.4.1 *Organismos utilizados*

3.4.2 *Sistemas isoenzimáticos analizados*

Fosfatasa ácida (ACP)

Esterasas (EST)

Glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G6PD)

Aspartato aminotransferasa (AAT)

(Glutamato oxalacetato transaminasa)

Isocitrato dehidrogenasa (IDH)

Superóxido dismutasa (SOD)

3.4.3 *Técnicas numéricas. Matriz básica de datos*

3.4.4 *Análisis de agrupamientos*

3.5 *Análisis de congruencia*

3.6 *Análisis de caracteres isoenzimáticos y fisiológicos*

4. DISCUSIÓN

5. BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCION

1.1 *Sistemática bioquímica.*

1.1.1 *Antecedentes*

La clasificación tradicional de los hongos, está basada sobre caracteres macro y micromorfológicos, relacionados con las hifas vegetativas, la reproducción sexual y asexual, color, forma o septación de las esporas y otros caracteres similares.

Si todos los estados morfológicos apropiados se encuentran presentes en el hongo, vivo o muerto, éste puede ser identificado con el método que utiliza sólo caracteres morfológicos. En otros casos, debido a la carencia de factores de diagnóstico apropiados, este método puede tener valor limitado, o bien pueden necesitarse condiciones especiales para seguir el desarrollo de los hechos morfológicos. Una clasificación basada puramente en la morfología, también puede ser difícil de aplicar en el caso de hongos polimórficos, que pueden producir según las condiciones, uno o varios tipos de esporas o en casos en que una forma relativamente simple de reproducción asexual puede desarrollar a partir de diferentes formas perfectas.

Actualmente, con el avance en la metodología analítica y el perfeccionamiento de las técnicas, la caracterización química de los organismos está avanzando rápidamente. La sistemática bioquímica consiste, esencialmente, en el examen de la distribución de los componentes químicos en una serie de organismos relacionados, lo que es de particular valor en grupos críticos donde hay dificultad para utilizar los métodos clásicos de la taxonomía tradicional.

Desde hace aproximadamente treinta años, a partir de las investigaciones de Chang et al. (1962) en ***Neurospora*** spp y de Clare (1963) en ***Phytophthora*** spp, ha habido un notable interés en aplicar análisis bioquímicos en la identificación y clasificación de los hongos. Hunter y Burstone (1960), Bent (1967), Franke et al.

(1968), Meyer y Renard (1969), Franke y Berry (1972), Stipes et al. (1982), Erselius y Vallavieille (1984), Maghrabi y Kish (1985 a y b, 1986, 1987), ltavaara, (1988), Neate et al. (1988), Oudemans y Coffey (1991), Surve-lyer et al. (1995), Latorre et al. (1995), Rinyu et al.(1995), Harrington et al. (1996).

1.1.2 *Electroforesis de isoenzimas*

La técnica electroforética se desarrolló alrededor de 1930 (Tiselius, 1937) y junto con la determinación de los patrones isoenzimáticos (zimogramas) (Hunter y Markert, 1957) ha sido utilizada para resolver numerosos problemas taxonómicos.

El método fue posteriormente mejorado por otros investigadores desarrollando la electroforesis en gel de almidón (Smithies, 1955; Smithies y Poulik, 1956; Poulik, 1957) y en poliacrilamida (Raymond y Weintraub, 1959; Ornstein y Davis, 1959); utilizando luego métodos de coloración para localizar las zonas de actividad enzimática (Hunter y Markert, op.cit.; Smith, 1968; Brewer y Sing, 1970; Chrambach y Rodbard, 1971). Combinando la electroforesis con técnicas de tinción específicas es posible distinguir una enzima entre cientos. Así Hunter y Markert, (op.cit.), desarrollaron la técnica del zimograma para identificar las diferentes bandas que aparecen en el gel. Los fenotipos resultantes son bandas de colorante que indican regiones de actividad enzimática que reciben el nombre de electromorfos (King y Ohta, 1975). La electroforesis es actualmente, junto con la cromatografía líquida y la ultracentrifugación, uno de los métodos más usados para el fraccionamiento de mezclas moleculares (Gordon et al., 1988)

Las isoenzimas son diferentes formas moleculares de una enzima, capaces de catalizar la misma reacción. Así, el conjunto de bandas (electromorfos) observados en el gel luego de la tinción, representan múltiples formas de la

enzima con la misma especificidad catalítica aunque quizás difieren levemente en las propiedades cinéticas (Markert y Moller, 1959).

Las isoenzimas pueden estar presentes en el mismo individuo o en individuos diferentes de la misma especie o taxa. Historicamente, éstas formas heterogéneas de la enzima fueron interpretadas como "artificios" contaminantes o moléculas degradadas. Actualmente se sabe que esas enzimas catalizan reacciones que ocurren en diferentes compartimientos celulares o tejidos, o bajo diferentes condiciones metabólicas u ontogenéticas (Markert, 1975). El uso relativamente extenso del término en algunas publicaciones (Brewer y Sing, op.cit.; Harris y Hopkinson, 1976) difiere con la definición más restrictiva utilizada los últimos años (Gottlieb, 1983; Buth, 1984; Wendel y Weeden, 1989).

Las presencia de isoenzimas puede deberse a tres fenómenos genéticos y bioquímicos diferentes (Harris y Hopkinson, op. cit.; Kephard, 1990; Micales et al., 1992).

1) **Multiples loci codificando para una misma enzima. (Isoenzimas en sentido estricto):** Una serie estructuralmente distinta de isoenzimas pueden estar codificadas por loci múltiples. Estos pueden haberse originado por duplicación génica y divergencia debido a mutaciones puntuales. Pueden ser sintetizadas (expresadas) en diferentes etapas del desarrollo en diferentes tejidos y tener distinta localización intracelular. Sus propiedades catalíticas o regulatorias son distintas y están asociadas a diferencias en su función. Generalmente éstas formas presentan gran variación de movilidad electroforética, pudiendo ser distinguidas a partir de ella. La distribución de loci es usualmente constante dentro de una especie determinada. En general todos los miembros de una población poseen esas formas múltiples, el locus

múltiple es, en general, común a todos los miembros de la especie (Harris y Hopkinson, op. cit.)

2) Multiple alelismo de un locus simple (Aloenzimas): Son diferentes formas de enzimas, codificadas por diferentes alelos de un locus génico, que suelen diferir en muy pocos residuos aminoacídicos. Cada alelo codifica para una cadena polipeptídica estructuralmente distinta. Sus propiedades reguladoras y catalíticas son semejantes y dentro de una población pueden existir un elevado número de formas diferentes. Estas variaciones son las que se emplean con mayor frecuencia en el análisis genético. En un individuo, el patrón de bandas, como expresión de éstas formas, dependerá del número de alelos presentes en el locus, el cual a su vez depende de la condición nuclear (monocarionte, dicarionte), del nivel de ploidía (haploide, diploide, poliploide) y del carácter genético (homocigota, heterocigota) del organismo. Individuos haploides u homocigotas producen patrones de bandas simples debido a la expresión de alelos simples. Organismos dicariontes o diploides y heterocigotas, producen patrones de bandas más complejos debido a la expresión de dos alelos distintos. Los patrones de bandas también dependen de la estructura cuaternaria de la enzima (número de cadenas polipeptídicas o subunidades enzimáticas). El alelismo múltiple produce diferencias en el patrón de isoenzimas entre los miembros individuales de la especie (Harris y Hopkinson, op. cit.).

3) Enzimas secundarias : Los patrones de bandas pueden ser distintos a los esperados, debido a modificaciones post-transduccionales y otros eventos que dan lugar a la formación de enzimas secundarias. Estas modificaciones incluyen entre otras, deaminaciones de residuos aminoacídicos como glutamina y asparagina, oxidaciones, acetilaciones, remoción o adición de carbohidratos, clivaje por proteasas, agregación o polimerización de la

proteína. La formación de estas enzimas secundarias es uniforme dentro de la especie y el resultado es la producción de una serie de bandas por cada alelo (Harris y Hopkinson, op. cit.). El isomerismo conformacional también produce enzimas secundarias. Algunas enzimas pueden tener varias configuraciones estables las cuales varían en su estructura terciaria o cuaternaria. Todas las configuraciones son usualmente aisladas en la preparación de la muestra de siembra y dan como resultado la aparición de una serie de bandas para un alelo simple.

1.1.3 *Analisis isoenzimático en taxonomía fúngica. Aplicaciones*

El análisis isoenzimático es una técnica que tiene gran aplicación en fitopatología y micología y es utilizado para resolver problemas taxonómicos, identificar taxa fúngicos desconocidos, analizar el nivel de variabilidad genética de una población e identificar niveles de ploidía a través del ciclo de vida del organismo, entre otras aplicaciones (Micales et al., op. cit).

Las enzimas que están codificadas por diferentes alelos o por loci genéticos separados, frecuentemente poseen diferentes movilidades electroforéticas. Esas diferencias se deben a variaciones en el contenido de aminoácidos de la molécula las cuales dependen de la secuencia de nucleótidos en el ADN. Los patrones electroforéticos son frecuentemente predecibles, ya que, ellos son dependientes de la condición genética y nuclear del organismo.

A-*Delineamiento de taxa fúngicos.*

El análisis isoenzimático es utilizado frecuentemente para resolver problemas taxonómicos, particularmente cuando hay superposiciones en los parámetros morfológicos utilizados para la clasificación, que hacen dificultosa la determinación de las especies o dichos parámetros son plásticos dentro del género o la especie. El mismo ha sido aplicado a diferentes niveles taxonómicos, y frecuentemente fue utilizado en la separación de las especies. Las diferencias en los patrones isoenzimáticos fueron usadas para separar especies de ***Agaricus*** (Kerrigan y Ross, 1988), ***Armillaria*** (Morrison et al., 1985; Cha e Igarashi, 1995), ***Aspergillus*** (Kurzeja y Garber, 1973), ***Botrytis*** (Backhouse et al., 1984), ***Glomus*** (Hepper et al., 1988), ***Heterobasidion annosum*** (Otrosina et al., 1989), ***Penicillium*** (Cruikshank y Pitt, 1987), ***Phytophthora*** (Bielenin et al., 1988; Erselius y de Vallavieille, op. cit.; Blaha et al., 1994; McHau y Coffey, 1995), ***Pleurotus*** (Boisselier-Dubayle, 1983; May y Royse, 1988); ***Puccinia*** (Burdon y Marshall, 1981; Burdon et al.,1983; Newton et al., 1985); ***Rhizopogon*** (Ho y Trappe, 1987) y ***Tremella*** (Hanson, 1991).

La posibilidad de utilizar técnicas electroforéticas para distinguir especies fúngicas depende del nivel de variación genética dentro de la población. Organismos con altos niveles de variabilidad genética expresan grandes niveles de variación intraespecífica, de este modo, oscurecen variaciones interespecíficas. La elección de los sistemas enzimáticos es crítica, ya que distintos tipos de enzimas exhiben distintos grados de variabilidad debido a la intensidad de la presión de selección, y muchos estudios que sólo utilizan enzimas que detectan muy altos niveles de variación intraespecíficas son incapaces de distinguir o diferenciar especie (Johnson, 1974; Racine, 1980).

Las enzimas regulatorias involucradas en el metabolismo energético con roles bioquímicos bien definidos presentan un número predecible de loci. Cada una de las isoenzimas expresadas tendrá una localización celular y una estructura conservada, mostrando a menudo menor variación que las enzimas no regulatorias (sustrato variables), como esterasas y fosfatasas. Estas muestran considerabe variación en el número de isoenzimas expresadas, número de isoenzimas por compartimiento subcelular y número de subunidades por enzimas .

La electroforesis ha sido usada también para distinguir taxa subespecíficos. A través del análisis isoenzimático han sido diferenciadas variedades y subespecies de ***Phytophthora megasperma*** (Bielenin et al., op.cit), ***Leptographium wageneri*** (Otrosina y Cobbs, 1987; Zambino y Harrington, 1989), ***Gaeumnanomyces graminis*** (Abbott y Holland, 1975) y ***Scytinostroma galactinum*** Donk, (Nakasone y Micales, 1988). Faris et al. (1986) usaron los patrones isoenzimáticos para detectar dos subgrupos de ***Phytophthora megasperma*** var ***medicaginus*** los cuales también expresaban diferentes características de cultivo y diferían en su patogenicidad. Se obtuvieron también variados resultados en la diferenciación de razas, formas especiales y subgrupos que diferían en la preferencia por el huesped, la patogenicidad y la virulencia. Estas separaciones fueron hechas para: ***Cryphonectria cubensis*** (Alfenas et al., 1984), ***Fusarium oxysporum*** (Bosland y Williams, 1987), ***Puccinia striiformis*** (Newton et al., op cit.) y ***Phyllotopsis nidulans*** (***Pleurotus nebrodensis***) (Boisselier-Dubayle, op. cit.).

B- ***Identificación de hongos desconocidos.***

Algunos sistemas enzimáticos no muestran variación dentro de taxa o poblaciones. Estos loci genéticos que tienen escasa o nula variación entre los

individuos son llamados monomórficos y son definidos como loci en los cuales el 99% o más de los individuos expresan el alelo más común. En estos casos, los fenotipos alozímicos mostrados por un aislamiento desconocido, pueden ser utilizados como un buen criterio para asignar dicho aislamiento a un taxa particular. El nivel de variación genética dentro de los hongos es extremadamente variable (Newton, 1987), pero casi todas las especies tienen algún locus monomórfico que puede ser usado para este propósito. Existen numerosos ejemplos de la utilización de estos marcadores para la identificación a partir de estos loci (Stipes, 1970; Wong y Willets, 1973, 1975; Baptist y Kurtzman, 1976; Burdon y Marshall,1981; Scala et al., 1981; Scott, 1981; Royse y May, 1982; Sweetingham et al., 1986,).

C-*Variación genética*.

Los patrones isoenzimáticos pueden ser usados para estimar el nivel de variación genética en poblaciones o especies fúngicas.

Las mejores estimaciones de polimorfismo se obtienen con la utilización para las mismas de gran número de aislamientos y sistemas enzimáticos.
Los resultados entre diversos estudios varían de acuerdo al número de aislamientos y sistemas enzimáticos empleados (Otrosina y Cobbs, op. cit.; Zambino y Harrington, op. cit.).

D-*Determinación de niveles de ploidía.*

Los patrones de bandas isoenzimáticas pueden ser utilizados para determinar el nivel de ploidía de los aislamientos. Los aislamientos haploides y homocigotas deberían producir bandas isoenzimáticas simples. Los

organismos heterocigotas, dicarióticos o diploides y con niveles altos de ploidía tipicamente producen patrones de bandas más complicados.

1.2. Género *Saccobolus*

1.2.1 *El habitat coprófilo.*

El género ***Saccobolus*** pertenece a la familia Ascobolaceae (Ascomycotina-Discomycetes-Pezizales). Dentro de los Discomycetes, el orden Pezizales, que incluye a los hongos operculados, presenta numerosas especies cuyo hábitat característico, aunque no exclusivo es el estiércol de animales herbívoros. Los mecanismos de dispersión de muchos de estos hongos sugieren una relación cíclica entre estiércol-hierba-tracto intestinal del herbívoro-estiércol, mostrando una dispersión enterófila (Parker- Rhodes, 1950). La dispersión de las esporas a la hierba requiere un mecanismo de descarga; en muchos casos estas son expulsadas violentamente llegando a grandes distancias (Ingold, 1971). La evolución en la escala zoológica hacia los animales de sangre caliente parece haber sido de gran importancia en la evolución del habitat coprófilo, ya que se han encontrado numerosas especies en el estiércol de aves y mamíferos, pero muy pocas en el estiércol de reptiles (Webster, 1970).

Los hongos coprófilos tienen en general distribución cosmopolita, debido a su tipo de dispersión, realizada por los animales, el viento, el agua y por esporas adheridas al forraje que a veces es transportado a grandes distancias. Debido a que el estiércol es un sustrato equivalente a islas, muchos o la mayoría de los hongos coprófilos son homotálicos, una adaptación que aumenta la posibilidad de supervivencia, ya que las esporas frecuentemente quedan aisladas en esos trozos de sustrato. En las especies heterotálicas, cuando las esporas quedan aisladas, estas germinan dando un micelio

vegetativo que permanece en ese estado en ausencia del micelio de compatibilidad apropiada. Son entonces, incapaces de producir esporas que permitan el escape o colonización a otros sustratos mediante el ciclo hierba-tracto digestivo-estiércol. En ***Ascobolus furfuraceus***, por ejemplo, los oidios producidos son dispersados por moscas y ácaros (Dowding, 1931). Los oídios de una compatibilidad sexual promueven el desarrollo de los órganos sexuales en el micelio de polaridad opuesta (Bistis y Raper, 1963).

Pocos de los hongos presentes como esporas o micelio sobre las hierbas, sobreviven para fructificar sobre el estiércol (Bonner y Fergus, 1959). La selección la ejercen: 1) el proceso de digestión; 2) la alta temperatura y 3) la competencia con otros microorganismos. De este modo ciertos grupos tienen numerosos representantes coprófilos y otros, como los Discomycetes inoperculados, tienen muy pocos (Dennis, 1968).

Las características de los hongos coprófilos que les permiten sobrevivir sobre el estiércol son : 1) Capacidad para resistir a la digestión, ya que si bien son numerosas las esporas que hay en la hierba, no todas pueden sobrevivir a la misma. 2) Capacidad para competir por los nutrientes, ya que aunque algunos sobreviven a la digestión y son capaces de germinar no pueden competir por los nutrientes con otros microorganismos. 3) Capacidad de fructificar en ese sustrato, ya que algunos sólo pueden crecer vegetativamente, porque el sustrato es desfavorable para la fructificación. 4) Dormancia constitutiva o exógena, mecanismo adaptativo valioso en su nicho ecológico; la dormición les impide germinar en la hierba.

En el laboratorio, estas esporas requieren de tratamientos inductores con soluciones alcalinas e incubación a 37°C de temperatura, durante determinado período de tiempo, ambos relacionados con las condiciones que existen en el tracto digestivo de los animales de sangre caliente.

El estiércol de herbívoros es un sustrato natural de numerosas especies. Si bien gran parte de la descomposición de la celulosa se lleva a cabo en el intestino de los herbívoros, una cantidad importante de ésta no es degradada y forma parte del estiércol, (Lodha, 1974). Aún en rumiantes, sólo una parte del material lignocelulósico ingerido por el animal es degradado (Deacon, 1985). La celulosa remanente en el estiércol de herbívoros es degradada por un conjunto de microorganismos, siendo los hongos los responsables de la mayor parte de la celulólisis.

Los hongos coprófilos inician su ciclo de vida con la ingesta por parte de los animales de las esporas presentes en la hierba. El pasaje de las mismas por el tracto digestivo facilita su germinación sobre el estiércol. Posteriormente se produce el crecimiento del micelio, la formación de las fructificaciones y la dispersión de las esporas hacia la hierba. La aparición de los esporangios y las fructificaciones sigue una sucesión, Zigomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina, con algunos miembros de Deuteromycotina. Según Webster (op. cit.), sólo las especies capaces de utilizar la forma de carbono disponible pueden crecer y fructificar en el estiércol, los factores nutricionales serían entonces los principales responsables de la sucesión en el estiércol de herbívoros. Entre los Ascomycetes celulolíticos se encuentran ***Sordaria fimícola***, especies de los géneros ***Podospora y Chaetomium*** y miembros de la familia Ascobolaceae, cuyas fructificacines aparecen tempranamente, seguidos por los cuerpos fructíferos de ***Coprinus***. Harper y Webster (1964) demostraron que no habría apreciables diferencias en la longitud de los períodos de latencia para la germinación de las esporas de distintos hongos endocoprófilos. En la mayoría de los casos la germinación ocurre unas pocas horas después de la defecación. Tampoco habría correlación entre la tasa de crecimiento miceliano y el tiempo de aparición de las fructificaciones en el estiércol. De este modo, especies de elevada tasa de

crecimiento pueden producir fructificaciones más tarde que especies de más lento crecimiento. Esta falta de correlación entre la tasa de crecimiento miceliano y la aparición de las fructificaciones ha sido descripta para varias especies de hongos por Wicklow y Hirschfield (1979) y por Safar y Cooke (1988). Las especies crecen vegetativamente antes de que su presencia sea evidente con la aparición de las fructificaciones, o sea que la sucesión depende más del tiempo que tarda cada especie en dar la fructificación que de la secuencia de colonización. Yocom, (1977) y Yocom y Wicklow, (1980) demostraron que la comunidad fúngica ésta regulada por microclimas locales (factores abióticos) que regulan la esporulación. La humedad aparecería como el más importante (Angel y Wicklow, 1975; Angel, 1977; Dickinson y Underhay, 1977; Harrower y Nagy, 1979).

La preeminencia de los hongos filamentosos en el proceso de descomposición de la celulosa, se debe a la eficiencia y diversidad de sus sistemas celulolíticos, y al hábito de crecimiento, siendo éste el que les confiere su superioridad sobre los microorganismos unicelulares. El hábito de crecimiento miceliano les permite colonizar rápidamente una mayor área de sustrato que a las bacterias unicelulares y penetrar y ramificarse dentro del mismo, transportando a grandes distancias los productos de degradación de los polímeros, a través de su red hifal. (Markham y Bazin, 1990).

Los miembros de la familia Ascobolaceae junto con otros hongos coprófilos cumplen un rol importante en el reciclado de la materia orgánica ya que son capaces de colonizar el estiércol de herbívoros (Wicklow et al., 1980) realizando la degradación biológica de la celulosa.

1.2.2 *Degradación de celulosa. Producción del sistema enzimático extracelular. Usos taxonómicos.*

La degradación de la celulosa ocurre debido a la producción de un sistema enzimático extracelular capaz de hidrolizar la celulosa a productos solubles. Dicho sistema está constituído básicamente por tres grupos de enzimas: a) endoglucanasas (EC 3.2.1.4); b) exoglucanasas, representados por dos grupos de enzimas: celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) y glucohidrolasas (EC 3.2.1.74); c) ß-glucosidasas (EC 3.2.1.21). Estos sistemas actúan de modo sinérgico y es frecuente que su producción esté regulada por inducción y represión catabólica (Wood y Garcia Campayo, 1990). En diversas especies fúngicas, se ha demostrado la existencia de varias isoenzimas para cada tipo enzimático (Canevascini et al., 1983; Labudova y Farkas, 1983; Coughlan, 1988; Carder, 1989; Wood y García Campayo, op. cit.; Ramos y Forchiassin, 1996 b; Pardo et al., 1997).

Existen estudios sobre degradación de celulosa y producción de enzimas celulolíticas por hongos pertenecientes a la familia Ascobolaceae (Mercuri, 1987(a) y (b), 1996 (a) (b) y (c); Mercuri y Diorio, 1995; Ramos y Forchiassin, op. cit.; Levin et al., 1996; Magnelli et al., 1996; Sívori et al, 1996, 1997; Pardo et al., op. cit.), y algunos sobre la actividad celulolítica de otros hongos coprófilos (Wicklow et al., op. cit.; Taj Alden et al., 1990).

El análisis isoenzimático ha sido aplicado a diferentes niveles taxonómicos y frecuentemente fue utilizado en la separación de las especies. Las diferencias en los patrones de endo β-D-1,4 glucanasa han sido usados para identificar especies de ***Verticillium*** (Carder, op. cit)., ***Aspergillus*** (Sing et al., 1996), en la identificación de cepas de ***Heterobasidion annosum*** (Maijala et al., 1995) y se ha demostrado su posible valor taxonómico en especies de la

tribu Iodophaneae (Pardo et al., op. cit.) y en otras especies dentro del género ***Saccobolus*** (Ramos y Forchiassin, op. cit.). A diferencia de lo que ocurre con las enzimas intracelulares, que requieren el procesamiento previo del micelio, la producción del sistema enzimático extracelular presenta la indudable ventaja de permitir la siembra directa del sobrenadante de cultivo en un gel de poliacrilamida, para el fraccionamiento electroforético de las enzimas presentes en el mismo y el posterior análisis comparativo de los patrones electroforéticos de las distintas especies.

Existen trabajos sobre el uso de patrones isoenzimáticos de otras enzimas extracelulares, tales como peroxidasa, fosfatasa ácida, pectinesterasa (Chang y Mills, 1992); lacasa (Wu et al., 1995), enzimas amilolíticas, (Kurzeja y Garber, op. cit.), hemicelulasas (Maijala et al., op. cit.), poligalactouronasas y pectinasas (Lecours et al., 1994).

Ciertos caracteres de cultivo y la producción de endo β-D-1,4 glucanasa por los individuos pertenecientes al género ***Saccobolus***, que es de esperar sean producidas en forma sistemática debido a su habitat característico, pueden ser utilizados con criterio taxonómico como expresión de la forma miceliana. Las características de la forma miceliana deben ser consideradas en la taxonomía, porque una clasificación jerárquica, debe tener toda la información válida acerca de la totalidad del organismo. En general los caracteres de cultivo de los hongos saprobios pretenden enriquecer la información, ya que pueden ser una síntesis de lo concerniente a algunas de sus características micelianas (Rayner, 1994).

1.2.3 *Características morfológicas*

El género ***Saccobolus***, fue establecido por Boudier (1869) y caracterizado por la presencia de una envoltura mucilaginosa hialina que recubre a las ascosporas reunidas en paquete dentro del asco. Van Brummelen (1967) incluyó este género dentro de la sub-familia Ascoboloideae. En el género ***Saccobolus*** se distinguen dos secciones: la sección ***Saccobolus*** y la sección ***Eriobolus***. En la primera se encuentran ubicadas especies cuyo receptáculo, es decir la parte exterior y lateral del apotecio excluyendo el himenio, es amarillo, amarillento o ambarino, paráfisis con contenido amarillo-citrino, amarillento anaranjado o anaranjado amarillento. No hay pigmento intercelular amorfo y las ascosporas se disponen en el paquete de acuerdo al patrón I (van Brummelen, op. cit.).

En la sección ***Eriobolus*** se encuentran ubicadas especies con receptáculo blanco, violado pálido, violado o castaño, con paráfisis hialinas. Con frecuencia suele presentar pigmento intercelular amorfo, ubicado entre los extremos de las paráfisis o en el excípulo, la vaina mucilaginosa nunca rodea completamente al paquete de ascosporas, las cuales están dispuestas conforme a los patrones estereométricos II a IV (van Brummelen, op. cit.).

En el género ***Saccobolus***, cuando se observan las características de gran número de aislamientos existen, con frecuencia, superposiciones en los parámetros morfológicos utilizados para la clasificación, que hacen dificultosa la determinación de las especies. Esto se entiende como resultado de la constante selección y evolución, progresiva o regresiva, a la que se encuentran sometidas las poblaciones en la naturaleza. De la observación y estudio de numerosos aislamientos y cultivos provenientes de ascosporas de diferentes especies del

género ***Saccobolus***, se han encontrado notables coincidencias en caracteres morfológicos, microscópicos, citológicos y de desarrollo, que han llevado, en algunos casos, a plantear dudas acerca de la delimitación de algunas especies.

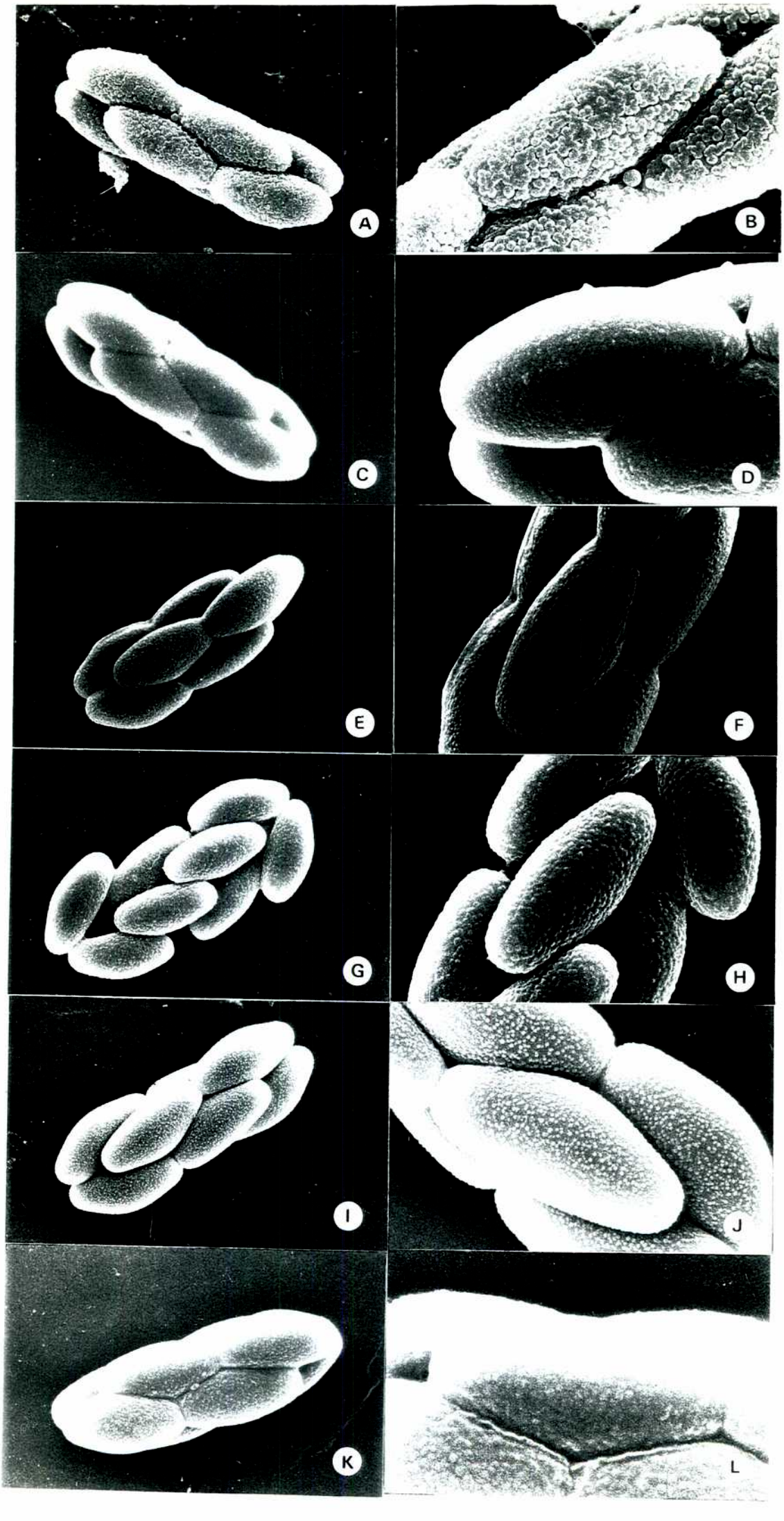
Diferentes autores han realizado contribuciones al conocimiento de distintos aspectos del género, Van Brummelen (op. cit.), Carrol (1967), Gamundi y Ranalli (1969), Ranalli y Gamundi (1975), Ranalli y Forchiassin (1976), Mercuri y Forchiassin (1978), Forchiassin y Dokmetzian (1982), Forchiassin (1983), Galvagno et al. (1984), Dokmetzian et al. (1986), Mouso y Ranalli (1986), Ranalli y Gonzalez Castelain (1994), Ranalli et al. (1994), Ramos (1994), Ramos y Forchiassin (1996, a y b), Ranalli y Mercuri (1995), Zelada et al. (1994).

Los caracteres taxonómicos básicos usados para la clasificación de las especies dentro del género son: el color del apotecio, el tamaño del asco, el tamaño del paquete, el color, ornamentación, tamaño y patrón de disposición de las ascosporas, el color y la ramificación de las paráfisis y las características de la vaina mucilaginosa. Otras características, tales como la germinación de las ascosporas, pueden ser usadas como caracteres taxonómicos para la clasificación (**tabla I-1**). Si bien estos caracteres tienen una importancia de peso en la clasificación de las especies del género, en muchos casos los mismos han dejado cierta incertidumbre sobre la identificación incuestionable de algunas especies, entre las cuales se observa una variación continua de los mismos. Todo esto avala la necesidad de corroborar los resultados obtenidos a partir del análisis de caracteres micromorfológicos con una metodología como el análisis isoenzimático.

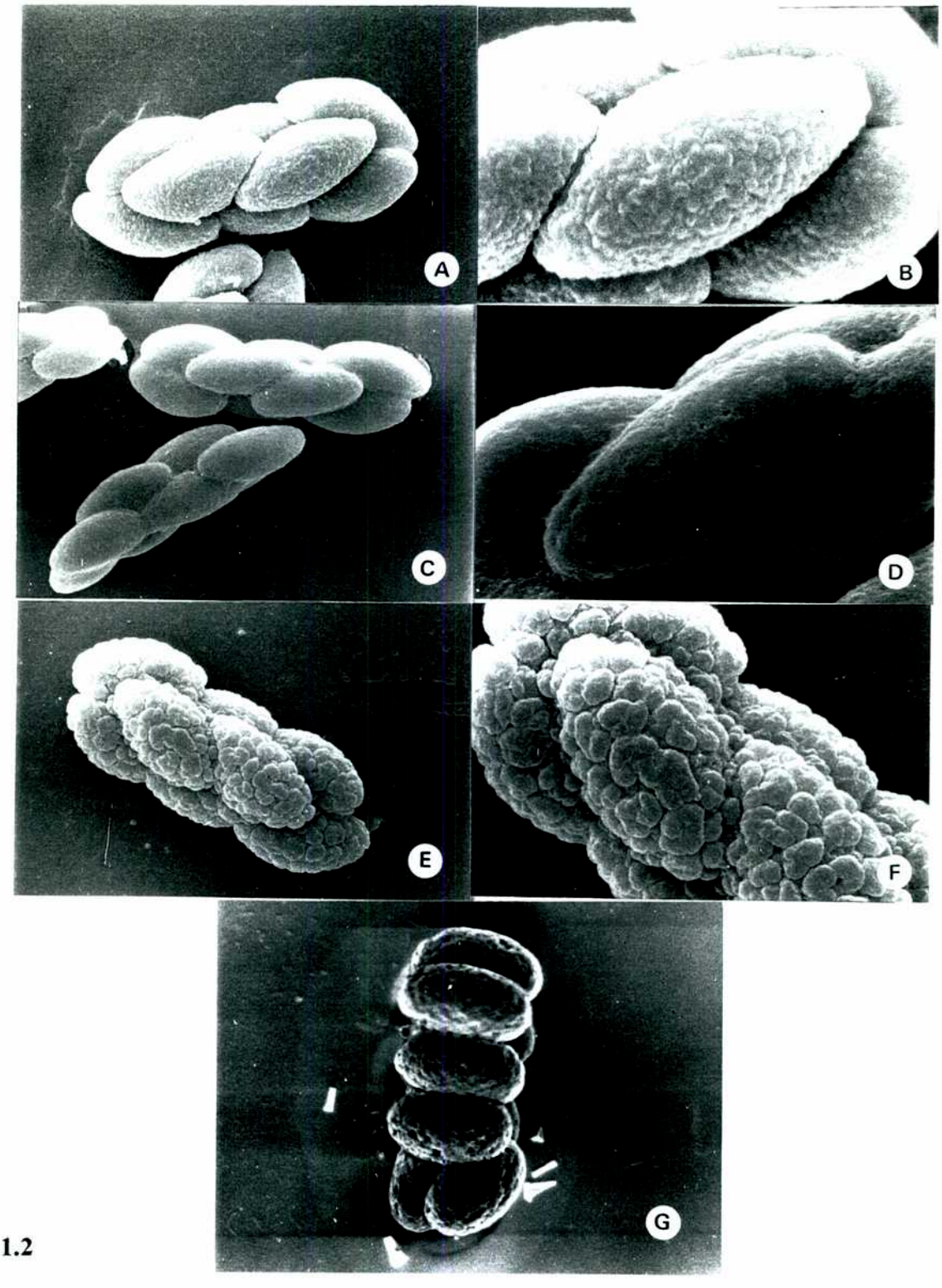
La **lámina I-1** muestra las fotos obtenidas con microscopio electrónico de barrido de los paquetes de ascosporas, de las diez especies del género, mostrando el patrón estequiométrico y la ornamentación del exosporio.

Tabla I-1. Matriz de datos morfológicos.

CARACTER		*S. depauperatus*	*S.infestans*	*S.seudodepauperatus*	*S.verrucisporus*	*S.citrinus*	*S.longevisporus*	*S.platensis*	*S.saccoboloides*	*S.succineus*	*S.truncatus*
apotecio	color	no amarillo				amarillo					
	diámetro (micrones)	160-270	80-160	170-600	130-200	160-752	179-964	190-470	176-464	304-640	100-300
asco	largo (micrones)	68-84	60-100	66-93	90-110	124-156	88-104	64-124	84-108	108-136	74-97
	ancho (micrones)	20-24	12 a 19	15-20	26-29	25-33	21-27	16-32	14-20	24-28	16-23
paquete de	largo (micrones)	30-40	21-28	30-34	33-39	41,6-52	32-42	36-40	-	44,8-56	(20-)29-42(-48)
ascosporas	ancho (micrones)	13,5-15	10,5-14	10-11,6	14-16	14,8-18	10,5-15	14-18	-	15,7-18,2	(14-)16-19(-22)
ascospora	color	castaño negruzco oscuro	castañas	castañas-rojizas	violeta oscuro	castaño-rojizas	castañas claras	violeta intenso	castañas	castaño-vinosas	castaño-violeta
	patron I	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	patron II	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	patron III	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	patron IV	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	largo (micrones)	13,3-15	9 a 11	11,2-12,4	14-16	16,6-19,9	12,3-14,3	13,3-17,4 (18,2)	13,2-15,7	19-21,5	14-17,5
	ancho (micrones)	6,6-7,5	5-6,5	5,8-6,6	8 a 9	7,4-9,9	6,5-7,5	5,7-7,5 (8,3)	5,8-7,4	8,3-9,3	7,5-6,5
mucus		parcial	parcial	parcial	parcial	completo	completo	completo	rodeando cada ascospora	completo	completo
parafisis	color	hialinas	amarillo verdosas	hialinas	hialinas	amarillas	amarillas	amarillo verdosas	amarillas	amarillas	amarillas
	ramificación	simples raramente ramificadas	simples o ramificadas	ramificadas (raro simples)	ramificadas	simples o ramificadas	simples o ramificadas	simples o ramificadas	poco ramificadas	simples o ramificadas	simples o ramificadas
distrib. de apotecios		solitarios	solitarios o gregarios	solitarios o densamente gregarios	solitarios o pequeños grupos	solitarios o gregarios	densamente gregarios	densamente gregarios	solitarios o gregarios	solitarios o gregarios	solitarios o gregarios
G¹ de ascosporas	%OHNa	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,3	0,4	0,4	0,3
	temp. trat	30 minutos	30 minutos	30 minutos	30 minutos	30 minutos	30 minutos	30 minutos	10 minutos	30 minutos	30 minutos
	periodo de incubación a 37°C	24 horas	24 horas	48-72 horas	24 horas	48 horas	72 horas	48 horas	48 horas	48 horas	48 horas



I.1.1



I.1.2

Lámina I.1.1, I.1.2 Paquete de ascosporas y detalle de los mismos.

I.1.1. Especies de la sección ***Saccobolus. S. citrinus*** **(A).** MEB 2500x, **(B).** MEB 5700x. ***S.longevisporus*** **(C)** MEB 3100x, **(D).** MEB 7400x. ***S. platensis*** **(E).** MEB 2500x, **(F)** MEB 5000x. ***S. saccoboloides*** **(G).** MEB 2500x, **(H).** MEB 5000x. ***S. succineus*** **(I).** MEB 2300x, **(J).** MEB 5000x. ***S. truncatus*** **(K).** MEB 3100x, **(L).** MEB 7400x.

I.1.2. Especies de la sección ***Eriobolus. S. depauperatus*** **(A).** MEB 3100x, **(B).** 7400x. ***S. seudodepauperatus*** **(C).** MEB 2300x, **(D).** MEB7400x. ***S. verrucisporus*** **(E).** MEB 2500x, **(F).**MEB 5700x. ***S. infestans*** **(G).** MEB 2500x.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

- Determinar homologías isoenzimáticas y fisiológicas para ser utilizadas como información complementaria sobre las diferencias y similitudes entre diez especies del género.
- Determinar variaciones interespecíficas, como aporte a las establecidas a partir del análisis de los patrones morfológicos.
- Corroborar la delimitación de las especies, establecida a partir de los caracteres morfológicos.

Se analizaron para ello seis sistemas isoenzimáticos en distintos aislamientos geográficos de diez especies del género, seis de ellas pertenecientes a la sección ***Saccobolus*** (***S. citrinus, S. longevisporus, S. platensis, S. saccoboloides, S. succineus*** y ***S. truncatus)*** y cuatro a la sección ***Eriobolus*** (***S. depauperatus, S. infestans, S. seudodepauperatus*** y ***S. verrucisporus***).

Se eligieron los sistemas isoenzimáticos que presentaron buena resolución para todos los aislamientos. Los mismos fueron : aspartato aminotransferasa (AAT), fosfatasa ácida (ACP), glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G6PD), isocitrato dehidrogenasa (IDH), esterasa (EST), superóxido dismutasa (SOD).

Se analizaron el crecimiento en medio con glucosa y en medio con celulosa, la producción y los patrones electroforéticos de endo β-D-1,4 glucanasa, en distintos aislamientos geográficos de las diez especies del género.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 *Organismos utilizados*

Se trabajó con diez especies del género ***Saccobolus***, seis de ellas pertenecientes a la sección ***Saccobolus*** (***S. citrinus, S. longevisporus, S. platensis, S. saccoboloides, S. succineus*** y ***S. truncatus)*** y cuatro a la sección ***Eriobolus*** (***S. depauperatus, S. infestans, S. seudodepauperatus*** y ***S. verrucisporus***). Las cepas monósporicas utilizadas, la localidad, el sustrato (estiércol), fecha de colección y número de cepa (BAFC) de los distintos aislamientos geográficos utilizados se detallan en la **tablas M-1 y M-2**.

2.2 *Obtención de las cepas monospóricas*

Las cepas monospóricas fueron obtenidas a partir de la germinación de ascosporas provenientes de cultivos polispóricos obtenidos de estiércol puesto en cámara húmeda. Para ello se utilizó estiércol, coleccionado en distintas localidades geográficas, previamente secado y puesto sobre papel de filtro en una caja de Petri, al cual se le suministró humedad suficiente. Al cabo de un período de 8-10 días, cuando los apotecios alcanzaron la madurez, se invirtió sobre el estiércol una caja de Petri con AA 2% para recoger las ascosporas expulsadas. Se trataron con OHNa a una concentración de 0,2% a 0,4% durante 30 minutos según la especie, se incubaron a 37 °C hasta la germinación de las mismas y se realizaron los aislamientos monospóricos transfiriendo pequeños bloques de agar conteniendo una ascospora germinada, o bien una punta de hifa, a medio PF.

Se incubaron los cultivos a temperatura ambiente o en cámara termostatizada a 23 ° C.

Tabla M- 1. Listado de cepas utilizadas en el análisis isoenzimático de los sistemas intracelulares

SIGLA	CEPAS	LOCALIDAD	SUSTRATO	FECHA	BAFC #
CltER 1	*S. citrinus* ER	Gualeguaychú, PER,Arg	Estiércol de vaca	ene-88	2838
CltER 2	*S. citrinus* ER	Gualeguaychú, PER,Arg	Estiércol de vaca	ene-88	2839
CltER 3	*S. citrinus* ER	Gualeguaychú, PER,Arg	Estiércol de vaca	ene-88	2840
CltER 4	*S. citrinus* ER	Gualeguaychú, PER,Arg	Estiércol de vaca	ene-88	2841
CltER 5	*S. citrinus* ER	Gualeguaychú, PER,Arg	Estiércol de vaca	ene-88	2842
CltII 1	*S. citrinus* I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2826
CltII 3	*S. citrinus* I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2843
CltII 5	*S. citrinus* I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2844
CltFAC 1	*S. citrinus* FAC	Ciud. Universitaria, BA, Arg	Estiércol de vaca	abr-94	2827
CltFAC 3	*S. citrinus* FAC	Ciud. Universitaria, BA, Arg	Estiércol de vaca	abr-94	2845
CltFAC 5	*S. citrinus* FAC	Ciud. Universitaria, BA, Arg	Estiércol de vaca	abr-94	2846
Long 0	*S. longevisporus* PD	Puerto Deseado, PSC, Arg	Estiércol de vaca	nov-83	2847
Long 1	*S. longevisporus* PD	Puerto Deseado, PSC, Arg	Estiércol de vaca	nov-83	2848
Long 2	*S. longevisporus* PD	Puerto Deseado, PSC, Arg	Estiércol de vaca	nov-83	2849
Long 3	*S. longevisporus* PD	Puerto Deseado, PSC, Arg	Estiércol de vaca	nov-83	2850
Long 4	*S. longevisporus* PD	Puerto Deseado, PSC, Arg	Estiércol de vaca	nov-83	2851
PlatAg 0	*S. platensis* AG	Agronomía, BA, Arg	Estiércol de vaca	jul-92	2852
PlatAg 2	*S. platensis* AG	Agronomía, BA, Arg	Estiércol de vaca	jul-92	2853
PlatAg 3	*S. platensis* AG	Agronomía, BA, Arg	Estiércol de vaca	jul-92	2854
PlatAg 5	*S. platensis* AG	Agronomía, BA, Arg	Estiércol de vaca	jul-92	2855
PlatSM 1	*S. platensis* SM	San Martín , PN.Arg	Estiércol de caballo	ene-96	2856
PlatSM 2	*S. platensis* SM	San Martín , PN.Arg	Estiércol de caballo	ene-96	2857
PlatSM 3	*S. platensis* SM	San Martín , PN.Arg	Estiércol de caballo	ene-96	2858
PlatSM 4	*S. platensis* SM	San Martín , PN.Arg	Estiércol de caballo	ene-96	2859
PlatSM 5	*S. platensis* SM	San Martín , PN.Arg	Estiércol de caballo	ene-96	2860
PlatSP 0	*S. platensis* SP	San Pedro, PBA, Arg	Estiércol de vaca	may-91	2861
PlatSP 1	*S. platensis* SP	San Pedro, PBA, Arg	Estiércol de vaca	may-91	2862
PlatSP 2	*S. platensis* SP	San Pedro, PBA, Arg	Estiércol de vaca	may-91	2863
PlatSP 3	*S. platensis* SP	San Pedro, PBA, Arg	Estiércol de vaca	may-91	2864
PlatSP 5	*S. platensis* SP	San Pedro, PBA, Arg	Estiércol de vaca	may-91	2865
SaccBC 2	*S.saccoboloides* BC	Villla La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	ene-87	2596
SaccBC 3	*S.saccoboloides* BC	Villla La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	ene-87	2866
SaccBC 6	*S.saccoboloides* BC	Villla La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	ene-87	2867
SaccBC 7	*S.saccoboloides* BC	Villla La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	ene-87	2868
SaccBC 8	*S.saccoboloides* BC	Villla La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	sep-88	2869
SaccT 3	*S.saccoboloides* T	Tafí del Valle, PT, Arg	Estiércol de vaca	sep-88	2822
SaccT 4	*S.saccoboloides* T	Tafí del Valle, PT, Arg	Estiércol de vaca	sep-88	2870
SaccT 6	*S.saccoboloides* T	Tafí del Valle, PT, Arg	Estiércol de vaca	sep-88	2871

BA: Ciudad de Buenos Aires, PBA: Provincia de Buenos Aires, PER: Provincia de Entre Ríos, PN: Provincia de Neuquén, PRN: Provincia de Río Negro, PSC: Provincia de Santa Cruz, PT: Provincia de Tucumán.

Tabla M- 1. Listado de cepas utilizadas en el análisis isoenzimático de los sistemas intracelulares

SIGLA	CEPAS	LOCALIDAD	SUSTRATO	FECHA	BAFC #
Sacc Ez 9	*S.saccoboloides* EZ	Ezeiza, PBA, Arg	Estiércol de caballo	mar-94	2872
Sacc Ez 10	*S.saccoboloides* EZ	Ezeiza, PBA, Arg	Estiércol de caballo	mar-94	2873
Sacc Ez 11	*S.saccoboloides* EZ	Ezeiza, PBA, Arg	Estiércol de caballo	mar-94	2874
Sacc Ez 12	*S.saccoboloides* EZ	Ezeiza, PBA, Arg	Estiércol de caballo	mar-94	2875
Sacc Ez 13	*S.saccoboloides* EZ	Ezeiza, PBA, Arg	Estiércol de caballo	mar-94	2876
SuccSM 0	*S. succineus* SM	San Martín , PN.Arg	Estiércol de caballo	ene-96	2877
SuccSM 4	*S. succineus* SM	San Martín , PN.Arg	Estiércol de caballo	ene-96	2878
SuccSM 5	*S. succineus* SM	San Martín , PN.Arg	Estiércol de caballo	ene-96	2879
SuccSM 6	*S. succineus* SM	San Martín , PN.Arg	Estiércol de caballo	ene-96	2880
SuccSM 8	*S. succineus* SM	San Martín , PN.Arg	Estiércol de caballo	ene-96	2881
SuccV 0	*S. succineus* ER	Gualeguaychú, PER ,Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2882
SuccV 1	*S. succineus* ER	Gualeguaychú, PER ,Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2883
SuccV 2	*S. succineus* ER	Gualeguaychú, PER ,Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2884
SuccV 3	*S. succineus* ER	Gualeguaychú, PER ,Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2885
SuccV 4	*S. succineus* ER	Gualeguaychú, PER ,Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2886
TruncBC 2	*S. truncatus* BC	Villla La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	ene-97	2595
TruncBC 3	*S. truncatus* BC	Villla La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	ene-97	2887
TruncBC 4	*S. truncatus* BC	Villla La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	ene-97	2888
TruncBC 5	*S. truncatus* BC	Villla La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	ene-97	2889
TruncBC 6	*S. truncatus* BC	Villla La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	ene-97	2890
TruncT 0	*S. truncatus* T	Tandil, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ene-92	2821
TruncT 1	*S. truncatus* T	Tandil, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ene-92	2891
TruncT 2	*S. truncatus* T	Tandil, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ene-92	2892
TruncT 3	*S. truncatus* T	Tandil, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ene-92	2893
TruncT 4	*S. truncatus* T	Tandil, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ene-92	2894
DepF 1	*S.depauperatus* FAC	Ciudad Universitaria, BA, Arg	Estiércol de caballo	sep-94	2895
DepF 3	*S.depauperatus* FAC	Ciudad Universitaria, BA, Arg	Estiércol de caballo	sep-94	2896
DepF 4	*S.depauperatus* FAC	Ciudad Universitaria, BA, Arg	Estiércol de caballo	sep-94	2897
DepF 4'	*S.depauperatus* FAC	Ciudad Universitaria, BA, Arg	Estiércol de caballo	sep-94	2898
Dep I 1	*S.depauperatus* II	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2833
Dep I 2	*S.depauperatus* II	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2811
Dep I 3	*S.depauperatus* II	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2812
In AD 1	*S. infestans* AD	Adrogué, PBA,Arg.	Estiércol de caballo	mar-91	2831
In AD 2	*S. infestans* AD	Adrogué, PBA,Arg.	Estiércol de caballo	mar-91	2899
In AD 3	*S. infestans* AD	Adrogué, PBA,Arg.	Estiércol de caballo	mar-91	2900
In AD 4	*S. infestans* AD	Adrogué, PBA,Arg.	Estiércol de caballo	mar-91	2901
In AD 5	*S. infestans* AD	Adrogué, PBA,Arg.	Estiércol de caballo	mar-91	2902
In AD 6	*S. infestans* AD	Adrogué, PBA,Arg.	Estiércol de caballo	mar-91	2903

BA: Ciudad de Buenos Aires, PBA: Provincia de Buenos Aires, PER: Provincia de Entre Ríos, PN: Provincia de Neuquén, PRN: Provincia de Río Negro, PSC: Provincia de Santa Cruz, PT: Provincia de Tucumán.

Tabla M- 1. Listado de cepas utilizadas en el análisis isoenzimático de los sistemas intracelulares

SIGLA	CEPAS	LOCALIDAD	SUSTRATO	FECHA	BAFC #
In AD 7	*S. infestans* AD	Adrogué, PBA,Arg.	Estiércol de caballo	mar-91	2904
In AD 8	*S. infestans* AD	Adrogué, PBA,Arg.	Estiércol de caballo	mar-91	2905
In AD 9	*S. infestans* AD	Adrogué, PBA,Arg.	Estiércol de caballo	mar-91	2906
In AD 10	*S. infestans* AD	Adrogué, PBA,Arg.	Estiércol de caballo	mar-91	2908
In PA 13	*S. infestans* PA	Porto Alegre, Brasil	Estiércol de vaca	may-91	2832
In PA 14	*S. infestans* PA	Porto Alegre, Brasil	Estiércol de vaca	may-91	2909
In PA 15	*S. infestans* PA	Porto Alegre, Brasil	Estiércol de vaca	may-91	2910
In PA 16	*S. infestans* PA	Porto Alegre, Brasil	Estiércol de vaca	may-91	2911
In PA 17	*S. infestans* PA	Porto Alegre, Brasil	Estiércol de vaca	may-91	2912
Seu I 2	*S.seudodepauperatus* I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2913
Seu I 3	*S.seudodepauperatus* I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2914
Seu I 4	*S.seudodepauperatus* I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2915
Seu I 6	*S.seudodepauperatus* I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2916
Seu I 8	*S.seudodepauperatus* I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2917
Seu V 2	*S.seudodepauperatus* I V	Campana, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ago-94	2828
Seu V 3	*S.seudodepauperatus* I V	Campana, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ago-94	2919
Seu V 4	*S.seudodepauperatus* I V	Campana, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ago-94	2920
Seu V 5	*S.seudodepauperatus* I V	Campana, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ago-94	2921
Seu V 6	*S.seudodepauperatus* I V	Campana, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ago-94	2922
Seu EZ 1	*S.seudodepauperatus* EZ	Ezeiza, PBA, Arg	Estiércol de caballo	jun-91	2829
Seu EZ 2	*S.seudodepauperatus* EZ	Ezeiza, PBA, Arg	Estiércol de caballo	jun-91	2923
Seu EZ 3	*S.seudodepauperatus* EZ	Ezeiza, PBA, Arg	Estiércol de caballo	jun-91	2924
Seu EZ 4	*S.seudodepauperatus* EZ	Ezeiza, PBA, Arg	Estiércol de caballo	jun-91	2925
Ver GC 0	*S.verrucisporus* GC	Gob.Castro,PBA, Arg	Estiércol de caballo	jun-83	2823
Ver GC 1	*S.verrucisporus* GC	Gob.Castro,PBA, Arg	Estiércol de caballo	jun-83	2926
Ver GC 2	*S.verrucisporus* GC	Gob.Castro,PBA, Arg	Estiércol de caballo	jun-83	2927
Ver GC 3	*S.verrucisporus* GC	Gob.Castro,PBA, Arg	Estiércol de caballo	jun-83	2928
Ver GC 4	*S.verrucisporus* GC	Gob.Castro,PBA, Arg	Estiércol de caballo	jun-83	2929
Ver GC 5	*S.verrucisporus* GC	Gob.Castro,PBA, Arg	Estiércol de caballo	jun-83	2930
Ver G 1	*S.verrucisporus* G	Gualeguaychú,PER, Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2931
Ver G 2	*S.verrucisporus* G	Gualeguaychú,PER, Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2932
Ver G 3	*S.verrucisporus* G	Gualeguaychú,PER, Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2933
Ver G 4	*S.verrucisporus* G	Gualeguaychú,PER, Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2934
Ver G 5	*S.verrucisporus* G	Gualeguaychú,PER, Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2935
Ver G 6	*S.verrucisporus* G	Gualeguaychú,PER, Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2936
Ver I I 6	*S.verrucisporus* I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2937
Ver I I 7	*S.verrucisporus* I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2938
Ver I I 8	*S.verrucisporus* I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2939

BA: Ciudad de Buenos Aires, PBA: Provincia de Buenos Aires, PER: Provincia de Entre Ríos, PN: Provincia de Neuquén, PRN: Provincia de Río Negro, PSC: Provincia de Santa Cruz, PT: Provincia de Tucumán.

Tabla M-2. Listado de cepas de la sección Saccobolus utilizadas para el análisis de las variables de crecimiento, producción de endo ß-D-1,4 glucanasa, y patrones isoenzimáticos de la misma.

SIGLA	CEPAS	LOCALIDAD	SUSTRATO	FECHA	BAFC #
CitER 1	*S. citrinus* ER	Gualeguaychú,PER,Arg	Estiércol de vaca	ene-88	2838
CitII 1	*S. citrinus* I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2826
CitIIV 1	*S. citrinus* I IV	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2825
Long 0	*S. longevisporus* PD	Puerto Deseado, PSC, Arg	Estiércol de vaca	nov-83	2847
Long 1	*S. longevisporus* PD	Puerto Deseado, PSC, Arg	Estiércol de vaca	nov-83	2848
Long 2	*S. longevisporus* PD	Puerto Deseado, PSC, Arg	Estiércol de vaca	nov-83	2849
PlatAg 0	*S. platensis* AG	Agronomía, BA, Arg	Estiércol de vaca	jul-92	2852
PlatAg 2	*S. platensis* AG	Agronomía, BA, Arg	Estiércol de vaca	jul-92	2853
PlatSP 0	*S. platensis* SP	San Pedro, PBA, Arg	Estiércol de vaca	may-91	2861
PlatSP 2	*S. platensis* SP	San Pedro, PBA, Arg	Estiércol de vaca	may-91	2863
PlatSP 5	*S. platensis* SP	San Pedro, PBA, Arg	Estiércol de vaca	may-91	2865
SaccBC 2	*S.saccoboloides* BC	Villa La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	ene-87	2596
SaccBC 3	*S.saccoboloides* BC	Villa La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	ene-87	2866
SaccT 3	*S.saccoboloides* TAFI	Tafí del Valle, PT, Arg	Estiércol de vaca	sep-88	2822
SaccT 4	*S.saccoboloides* TAFI	Tafí del Valle, PT, Arg	Estiércol de vaca	sep-88	2870
SuccV 0	*S. succineus* ER	Gualeguaychú, PER ,Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2882
SuccV 1	*S. succineus* ER	Gualeguaychú, PER ,Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2883
SuccVC 2	*S. succineus* VC	Villa Clara, PER ,Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2805
SuccVC 3	*S. succineus* VC	Villa Clara, PER ,Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2808
SuccVC 4	*S. succineus* VC	Villa Clara, PER ,Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2809
TruncBC 2	*S. truncatus* BC	Villa La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	ene-97	2595
TruncBC 4	*S. truncatus* BC	Villa La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	ene-97	2888
TruncT 0	*S. truncatus* T	Tandil, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ene-92	2821
TruncT 1	*S. truncatus* T	Tandil, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ene-92	2891
TruncT 2	*S. truncatus* T	Tandil, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ene-92	2892

BA: Ciudad de Buenos Aires, PBA: Provincia de Buenos Aires, PER: Provincia de Entre Ríos, PRN: Provincia de Río Negro, PSC: Provincia de Santa Cruz, PT: Provincia de Tucumán.

Tabla M-2. Listado de cepas de la sección Eriobolus utilizadas para el análisis de las variables de crecimiento, producción de endo ß-D-1,4 glucanasa y patrones isoenzimáticos de la misma.

SIGLA	CEPAS	LOCALIDAD	SUSTRATO	FECHA	BAFC #
DepF 1	*S.depauperatus* FAC	Ciud. Universitaria, BA, Arg	Estiércol de caballo	sep-94	2895
DepF 3	*S.depauperatus* FAC	Ciud. Universitaria, BA, Arg	Estiércol de caballo	sep-94	2896
DepF 4	*S.depauperatus* FAC	Ciud. Universitaria, BA, Arg	Estiércol de caballo	sep-94	2897
DepF 4'	*S.depauperatus* FAC	Ciud. Universitaria, BA, Arg	Estiércol de caballo	sep-94	2898
In 1	*S. infestans* AD	Adrogué, PBA,Arg.	Estiércol de caballo	mar-91	2831
In 2	*S. infestans* AD	Adrogué, PBA,Arg.	Estiércol de caballo	mar-91	2899
In 3	*S. infestans* AD	Adrogué, PBA,Arg.	Estiércol de caballo	mar-91	2900
In 6	*S. infestans* AD	Adrogué, PBA,Arg.	Estiércol de caballo	mar-91	2903
In 13	*S. infestans* PA	Porto Alegre, Brasil	Estiércol de vaca	may-91	2832
In 14	*S. infestans* PA	Porto Alegre, Brasil	Estiércol de vaca	may-91	2909
In 15	*S. infestans* PA	Porto Alegre, Brasil	Estiércol de vaca	may-91	2910
Seu 2	*S.seudodepauperatus* I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2913
Seu 6	*S.seudodepauperatus* I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	ago-94	2916
Seu V 2	*S.seudodepauperatus* I V	Campana, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ago-94	2828
Seu V 3	*S.seudodepauperatus* I V	Campana, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ago-94	2919
Seu V 4	*S.seudodepauperatus* I V	Campana, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ago-94	2920
Seu EZ 1	*S.seudodepauperatus* EZ	Ezeiza, PBA, Arg	Estiércol de caballo	jun-91	2829
Ver GC 0	*S.verrucisporus* GC	Gob.Castro,PBA, Arg	Estiércol de caballo	jun-83	2823
Ver GC 1	*S.verrucisporus* GC	Gob.Castro,PBA, Arg	Estiércol de caballo	jun-83	2926
Ver G 2	*S.verrucisporus* G	Gualeguaychú,PER, Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2932
Ver G 4	*S.verrucisporus* G	Gualeguaychú,PER, Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2934

BA: Ciudad de Buenos Aires, PBA: Provincia de Buenos Aires, PER: Provincia de Entre Ríos.

2.3 *Mantenimiento de las cepas y obtención de inóculos*

Las diferentes cepas fueron mantenidas rutinariamente en tubos con medio PF (Gamundi y Ranalli, 1964) en pico de flauta a 5° C, luego de 15 días de crecimiento a temperatura ambiente.

Para la obtención de los inóculos para el crecimiento vegetativo de las cepas monospóricas en los medios de cultivo líquidos, se sembraron las mismas en cajas de petri con medio AA y se incubaron a 23°C durante un período de 5 a 10 días.

2.4 *Medios de cultivo*

2.4.1 *Medios sólidos*

Medio AA

Bacto Agar (Difco)..... 20 g

Agua bidestilada..... 1000 ml csp

Medio PF

Agar.....20 g

Extracto de levadura (Difco).....3 g

Agua bidestilada.....1000 ml csp

Papel de fitro de 1 cm x 4 cm en cada tubo o un disco de 9 cm de diámetro en cada caja.

2.4.2 *Medios líquidos*

Medio GA

D(+)- glucosa.....15 g

asparagina.....4 g

$MgSO_4.7H_2O$.....0,5 g

KH_2PO_4.....0,5 g

K_2HPO_4.....0,6 g

$CuSO_4.5H_2O$.....0,4 mg

$MnCl_2.4H_2O$.....0,09 mg

H_3BO_3.....0,07 mg

$Na_2MoO_4.2H_2O$.....0,02 mg

$FeCl_3$.....1 mg

$ZnCl_2$.....10 mg

Biotina.....5 µg

Hidrocloruro de tiamina.....0,1 mg

H_2O bidestilada.....1000 ml csp

Medio CC

Celulosa cristalina.....10 g

asparagina.....4 g

$MgSO_4.7H_2O$.....0,5 g

KH_2PO_4.....0,5 g

K_2HPO_4.....0,6 g

$CuSO_4.5H_2O$.....0,4 mg

$MnCl_2.4H_2O$.....0,09 mg

H_3BO_3.....0,07 mg

$Na_2MoO_4.2H_2O$.....0,02 mg

$FeCl_3$.....1 mg

$ZnCl_2$.....10 mg

Biotina.....5 μg

Hidrocloruro de tiamina.....0,1 mg

Agua bidestilada.....1000 ml csp

Para cada cultivo la celulosa cristalina fue pesada por separado

2.5 *Condiciones de esterilización*

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121° C y 1.2 atm, durante 20 minutos.

2.6 *Condiciones de cultivo*

Los cultivos en medio sólido se realizaron en cajas de Petri, con 20 ml de medio o en tubos de ensayo 12 x 150 mm, con 10 ml de medio en "pico de flauta".

Los cultivos en medio líquido se realizaron en erlenmeyers de 125 ml con 50 ml de medio de cultivo. Fueron inoculados con discos de 5 mm de diámetro cortados del borde de una colonia de 5 a 10 días de crecimiento en Bacto agar 2%. La incubación se llevó a cabo en cámara de cultivo termostatizada a 24° C, con agitación contínua a 125 rpm.

2.7 *Crecimiento vegetativo*

Se realizaron curvas de crecimiento en medios **GA** y **CC** de los organismos detallados en la **tabla M-3.** La cosecha se realizó a lo largo de 18 días para las

curvas en medio **GA** y a lo largo de 30 días para las de **CC**. Para el resto de las cepas de la **tabla M-2** se cosechó 3 días fijos alrededor del máximo.

El micelio, o el micelio más la celulosa cristalina fue cosechado por filtración, a través de papel de filtro Whatman GP, en embudo Buchner a presión reducida, lavado con agua bidestilada y secado a 80°C durante 18 horas. Para los cultivos en medio **CC** los sobrenadantes y los sólidos (micelio más celulosa cristalina) previamente pesados y molidos, fueron guardados a -20 °C.

Tabla M-3

SIGLA	CEPAS	LOCALIDAD	SUSTRATO	FECHA	BAFC #
CitER 1	*S. citrinus* ER	Gualeguaychú,PER,Arg	Estiércol de vaca	ene-88	2838
Long 0	*S. longevisporus* PD	Puerto Deseado, PC, Arg	Estiércol de vaca	nov-83	2847
PlatSP 0	*S. platensis* SP	San Pedro, PBA, Arg	Estiércol de vaca	may-91	2861
SaccBC 8	*S.saccobololdes* BC	Villla La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	sep-88	2869
SuccV 0	*S. succineus* ER	Gualeguaychú, PER ,Arg	Estiércol de vaca	abr-89	2882
TruncBC 2	*S. truncatus* BC	Villla La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	ene-97	2595
DepF 1	*S.depauperatus* FAC	Ciudad Universitaria, BA, Arg	Estiércol de caballo	sep-94	2895
In AD 1	*S. infestans* AD	Adrogué, PBA,Arg.	Estiércol de caballo	mar-91	2831
In PA 13	*S. infestans* PA	Porto Alegre, Brasil	Estiércol de vaca	may-91	2832
Seu V 2	*S.seudodepauperatus* I V	Campana, PBA, Arg	Estiércol de caballo	ago-94	2828
Ver GC 0	*S.verrucisporus* GC	Gob.Castro,PBA, Arg	Estiércol de caballo	jun-83	2823

2.7.1 *Estimación del crecimiento*

2.7.1.1 *Peso seco del micelio.*

Para obtener los valores de peso seco como estimador de crecimiento en el medio **GA**, se pesaron los papeles de filtro con el micelio retenido. Se expresaron los valores como mg de micelio en 50 ml de medio de cultivo.

2.7.1.2 *Proteínas totales de micelio*

Para estimar el crecimiento en el medio que contenía celulosa cristalina como fuente de carbono, alícuotas de 50 mg de micelio molido y guardado a -20 °C fueron hidrolizados por 30 minutos a 100 °C en OHNa 1N. Las muestras se

centrifugaron 20 min. a 1000 g y las proteínas extraídas en el sobrenadante, fueron dosadas por el método de Bradford, (Bradford, 1976), utilizando BSA (albúmina bovina) 1 mg/ml en NaOH 1N como estándar. Los resultados se expresan como µg de proteínas de micelio/ml de medio de cultivo.

2.8 *Producción y zimogramas de endo-β-D-1,4-glucanasa* (EC 3.2.1.4)

En medio con CC se midió crecimiento como proteínas totales. Se midió pH final y proteínas en el sobrenadante de cultivo. Los sobrenadantes fueron guardados como fuente de enzimas. La **tabla M-2** detalla la procedencia, sustrato (estiércol), fecha de colección y número de cepa (BAFC) de los distintos aislamientos geográficos de las diez especies de ***Saccobolus,*** utilizados para el análisis del crecimiento y la producción de endo-β-D-1,4-glucanasa en medio CC y el análisis de los zimogramas de dicha enzima.

2.8.1 *Medición de actividad endo-β-D-1,4-glucanasa*

En el sobrenadante de cultivo, obtenido directamente de la filtración de los mismos, se midió actividad de endo β-D-1,4-glucanasa.

La actividad fue ensayada por medición de azúcares reductores, obtenidos por degradación de CMC (carboximetilcelulosa), por el método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952 ; Nelson, 1944).

La mezcla de reacción contenía 400 µl de CMC-Na 0,5% en solución buffer acetato de sodio 0,1M (pH 4,8) más 100 µl de sobrenadante de cultivo. La mezcla de reacción fue incubada durante 30 minutos a 50 °C.

Unidad de actividad : Una unidad de actividad enzimática (UE) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para obtener azúcar reductor equivalente a 1

nmol de azúcar reductor $min.^{-1}$, expresado como equivalente de glucosa. La actividad enzimática fue expresada como UE/ml de cultivo.

Las curvas estándar para determinar azúcares reductores fueron hechas con glucosa. Todos los datos representan el promedio de tres ensayos con dos repeticiones cada uno.

2.8.2 *Zimogramas de endo-β-D-1,4-glucanasa. Fraccionamiento electroforético*

Se realizó el fraccionamiento electroforético de proteínas del sobrenadante de cultivo con celulosa cristalina, que registró la máxima actividad de endo-β-D-1,4-glucanasa en cada especie.

2.8.2.1 *Preparación de la muestra.*

Un volumen de 50 ml de dicho sobrenadante fue previamente liofilizado hasta volumen final de 1 ml. Se midió la actividad endo-β-D-1,4-glucanasa, para ajustar el volumen de siembra en los geles.

Las muestras fueron disueltas en solución buffer de muestra en una relación 1:1.

Buffer de muestra. pH 6,8

Tris .....0,15 g

HCl 1N.....12 ml

azul de bromofenol 1%.....40 µl

glicerol .....2 ml

Agua bidestilada.....10 ml

Tris (Tris (hidroximetil aminometano).

2.8.2.2 *Condiciones de electroforesis*

La electroforesis fue realizada en geles de poliacrilamida 9 % en placas verticales, en condiciones desnaturalizantes, (Andrews, 1986) utilizando el sistema descripto por Shaw & Koen, (1968); Laemmli, (1970). Se utilizaron placas verticales lo que permitió una mejor resolución para el sistema isoenzimático de la endo-β-D-1,4-glucanasa. Cada gel estuvo constituído por dos partes, el gel concentrador de poro grueso, en la parte superior y el gel separador de poro fino en el resto. Se utilizaron cubas de acrílico para electroforesis vertical, con dos recipientes uno anódico y otro catódico. Cada recipiente se llenó con aproximadamente 250 ml del buffer de corrida. Cada cuba tuvo capacidad para un gel.

2.8.2.3 *Preparación de los geles de poliacrilamida*

Los geles fueron preparados como se detalla a continuación :

Gel concentrador o de poro grueso

Solución 1

Acrilamida .....10 g
Bisacrilamida.....2,5 g
Agua bidestilada.....100 ml csp

Bisacrilamida (N, N'-metilen-bis-acrilamida)

Solución 2. pH 6,8

Tris.....5,98 g
HCl 1N.....48 ml

Agua bidestilada.....100 ml csp

Preparación.

Solución 1.....1,5 ml

Solución 2.....1,2 ml

TEMED.....15 µl

SDS (10%).....5 µl

Persulfato de amonio (10%).....50 µl

Agua bidestilada.....2,2ml

TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina)

SDS (Dodecil sulfato de sodio)

Gel separador o de poro fino

Solución 1

Acrilamida .....30 g

Bisacrilamida.....0,8 g

Agua bidestilada.....100 ml csp

Bisacrilamida (N, N'-metilen-bis-acrilamida)

Solución 2. PH 8,8

Tris.....36,3 g

HCl 1N.....48 ml

Agua bidestilada.....100 ml csp

Tris (Tris (hidroximetil) aminometano).

Preparación.

Solución 1.....9 ml

Solución 2.....3,75 ml

glicerol.....0,5 ml

TEMED.....15 µl

SDS (10%).....0,45 ml

Persulfato de amonio.....pta. espátula

Agua bidestilada.....15,45 ml

TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina)

SDS (Dodecil sulfato de sodio)

Se colocaron dos vidrios de 16 x 19 cm separados por varillas de teflón, se sellaron por fuera con cinta adhesiva y por dentro con una solución de agar 1%. Se preparó la solución del gel de poro fino, se echó entre los vidrios con pipeta, se dejó polimerizar. Se preparó la solución del gel de poro grueso, se echó con pipeta en la parte superior del gel de poro fino polimerizado y se puso un peine de teflón. El gel de poro grueso polimerizó entre los dientes del peine, dejando delimitadas, al sacar el mismo, las calles para la siembra de las muestras.

2.8.2.4 *Corrida electroforética*

Buffer de corrida

Tris glicina, pH 8,3

Tris.....6g

Glicina.....28,8g

SDS.....2g

Agua bidestilada.....1000ml csp

SDS (Dodecil sulfato de sodio)

Tris (Tris (hidroximetil) aminometano).

Para usar se diluyó 1 :1 con H_2O bidestilada.

Siembra de las muestras en los geles

Se sacó la varilla inferior, se colocaron los vidrios con el gel polimerizado en la cuba vertical y se selló la interfase vidrio acrílico con agar 1 % . Se sembraron 20 µl de la mezcla de la muestra con el buffer conteniendo 30.10^3 UE de endo-ß-D-1,4-glucanasa.

La corrida se llevó a cabo en cámara termostatizada a 4 °C para evitar el calentamiento de los geles durante la migración y la consecuente desnaturalización de las enzimas. La intensidad de corriente aplicada fue de 30 mA durante el proceso de concentración y de 40 mA durante el proceso de separación, que fue de aproximadamente 4 horas. La migración se realizó, hasta que el frente alcanzó una distancia de 11 cm desde el punto de siembra, luego de lo cual el gel fue retirado de la cuba y se procedió a revelar las zonas de actividad enzimática.

2.8.2.5 ***Detección de las bandas de actividad***

Para la detección de las bandas con actividad endo-β-D-1,4-glucanasa, el SDS del gel fue lavado con la siguiente solución buffer de pH 6,3

Acido cítrico.....2,58 g

Fosfato monosódico.....17,9 g

Agua bidestilada.....1000 ml

y luego se colocó sobre un gel Agar-CMC con la siguiente composición:

Agar.....2 g

CMC.....0,1 g

Buffer cítrato-fosfato monosódico.....100 ml

Ambos fueron incubados a 50 °C. Luego de 60 minutos el gel de CMC fue sumergido en una solución de Rojo Congo (0,1%) y el exceso de colorante fue lavado con una solución de NaCl 1N. Las bandas de actividad enzimática se visualizaron como bandas claras (Beguin, 1983 ; Coughlan, 1988). Para cada una de las bandas proteicas reveladas se determinó el Rf, como la relación entre la distancia de migración de la proteína y la distancia de migración del frente.

2.8.2.6 *Técnicas numéricas. Construcción de la matriz básica de datos.*

Los veinte aislamientos geográficos de las diez especies del género ***Saccobolus*** consignadas en la **tabla M-2** constituyeron las unidades taxonómicas operativas (OTU).

Los caracteres usados fueron obtenidos a partir de los estudios realizados en el material que se detalla en la **tabla M-2**. El total de caracteres fue de 38, representado cada uno por una banda de actividad de endo-β-D-1,4-glucanasa y por los siguientes valores :

1-Máximo crecimiento en GA

2-Día de máximo crecimiento en GA

3-Máximo crecimiento en CC

4-Día de máximo crecimiento en CC

5-Máxima producción de endo-β-D-1,4-glucanasa en CC

6-Día de máxima producción de endo-β-D-1,4-glucanasa en CC

En la matriz básica de datos, **tabla M-4**, para todos los aislamientos monospóricos de la **tabla M-2**, los estados posibles de cada carácter fueron codificados como: presencia 1, ausencia 0, para las bandas de actividad,

Tabla M-4. Matriz básica de datos. Variables fisiológicas y sistema isoenzimático de endo ß-D-1,4 glucanasa

Rf/OTU	S.dep. FAC	S. inf. AD	S. inf. PA	S.saud.II	S.saud.IV	S.saud. EZ	S.verr. GC	S.verr.G	S. citr. ER	S. citr.IIV	S. citr.II	S. long. PD	S. plat. AG	S. plat. SP	S.saccob. BC	S.saccob. TAFI	S. aucc. ER	S. aucc. VC	S. trunc. BC	S. trunc. T
16	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
30	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
41	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
47	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
50	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
75	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
76	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
83	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
84	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
90	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
99	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	208,5	384,5	408	384	384,3	385	202	212	274	270	274	340	338	345,3	431,5	426	427,5	412,6	402,5	397,3
2	12	8	13	7	7	7	7	7	8	8	8	10	8	8	8	8	9	8	10	10
3	202	282,5	121,6	314,5	310,6	290	327,7	304	270	265	250	186,7	256	230	380	382,5	215	200	283	283,7
4	12	8	12	7	7	7	7	7	9	9	8	12	10	10	10	10	10	10	10	10
5	92,25	105,75	77,3	143	134,6	120	96,7	94	67	58	60	60	49	48,3	148	138,5	75	64,3	69	61,3
6	12	8	13	8	8	8	8	8	10	10	10	12	10	10	10	10	11	11	12	12

mientras que, las variables cuantitativas representadas por los parámetros fisiológicos fueron consignados como valores medios. No se observaron diferencias significativas en los estados de los caracteres entre las cepas monospóricas de los distintos aislamientos geográficos pertenecientes a la misma especie para los patrones de endo-β-D-1,4-glucanasa, aunque si se observaron leves diferencias en las variables fisiológicas.

2.8.2.7 *Análisis de agrupamientos*

A partir de la matriz básica de datos se calculó el coeficiente de similitud de Gower (Sneath & Sokal, 1973) para cada par posible de OTU. Se eligió el coeficiente de Gower ya que el mismo permite el procesamiento de matrices que contengan datos binarios y cuantitativos. La matriz resultante fue analizada por el método de medias no ponderadas (UPGMA) (Sneath & Sokal, op. cit.). El análisis se realizó con el programa Multivariate Statistical Package (MVSP) (Kovack, 1993). La distorsión producida durante el análisis de agrupamiento se calculó a partir del coeficiente de correlación cofenética (r) (Sokhal & Rohlf, 1962) utilizando el programa NTSYS-PC (Rolf, 1993).

2.9 *Análisis isoenzimático de enzimas intracelulares*

2.9.1 *Organismos utilizados*

La **tabla M- 1** detalla la procedencia, sustrato (estiércol), fecha de colección y número de cepa (BAFC) de los distintos aislamientos geográficos utilizados para el análisis isoenzimático.

2.9.2 *Sistemas isoenzimáticos analizados*

Se probaron trece sistemas enzimáticos: alcohol dehidrogenasa (ADH), aspartato aminotransferasa (AAT), catalasa (CAT), fosfatasa ácida (ACP), fosfatasa alcalina (AK), glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G6PD), glutamato dehidrogenasa (GDH (NADP)), isocitrato dehidrogenasa (IDH), peroxidasa (PER), esterasa (EST), malato dehidrogenasa NADP dependiente (MDH) (NADP), malato dehidrogenasa NAD dependiente (MDH) (NAD) y superóxido dismutasa (SOD).

Para obtener buena resolución en las bandas se emplearon diferentes buffers en las cubas electroforéticas y en la preparación de los geles. Se utilizaron diferentes sistemas de revelado para cada sistema isoenzimático. Se probaron varias combinaciones de buffer/sistema de revelado y varios pH en la mezcla de reacción, empleándose sólo aquellas que presentaron una mejor resolución de bandas para todos los aislamientos. Se clasificaron los sistemas en: enzimas con buena resolución para todos los aislamientos, enzimas con buena resolución sólo para algunos aislamientos, y enzimas con pobre o ninguna resolución. Se eligieron los sistemas isoenzimáticos que presentaron buena resolución para todos los aislamientos. Los mismos fueron: aspartato aminotransferasa (AAT), fosfatasa ácida (ACP), glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G6PD), isocitrato dehidrogenasa (IDH), esterasa (EST) y superóxido dismutasa (SOD). Las pruebas para la elección de las condiciones para cada sistema se realizaron con ***S. seudodepauperatus*** Campana, Provincia de Buenos Aires, Argentina (BAFC N° 2828) y ***S. verrucisporus*** Gobernador Castro, Provincia de Buenos Aires, Argentina, (BAFC N° 2823) ambos de la seción ***Eriobolus*** y ***S. platensis,*** San Pedro, Provincia de Buenos Aires, Argentina (BAFC N° 2861), ***S. saccoboloides*** Ezeiza, Provincia de Buenos Aires, Argentina (BAFC N° 2872) y ***S. succineus,*** San Martín de los

Andes, Provincia de Río Negro, Argentina (BAFC N° 2877) pertenecientes a la sección ***Saccobolus***.

CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS ENZIMÁTICOS UTILIZADOS.

FOSFATASA ÁCIDA.

Las fosfatasas, al igual que las esterasas, son enzimas no regulatorias del metabolismo intermedio y están sujetas a variaciones ambientales, requieren el uso de sustratos artificiales en los ensayos ya que generalmente se desconocen sus sustratos naturales al igual que su localización intracelular. Están presentes en bacterias, hongos, algas verdes, plantas, protozoarios, invertebrados y vertebrados. Catalizan la hidrólisis de ésteres fosfato según la siguiente reacción (Manchenko, 1994).

monoéster ortofosfórico + H_2O $\longrightarrow$ Alcohol + ortofosfato

ASPARTATO-AMINO-TRANSFERASA,(GLUTAMATO-OXALACETATO TRANSAMINASA)

La aspartato aminotransferasa es una enzima que está presente en bacterias, protozoarios, hongos, plantas, invertebrados y vertebrados. Pertenece al grupo de enzimas llamadas aminotransferasas o transaminasas, que catalizan las reacciones de transaminación de numerosos aminoácidos. La mayor parte de ellas precisan al α-cetoglutárico como aceptor del grupo amino. La aspartato aminotransferasa cuyo nombre más corriente es aspartato-transaminasa cataliza la siguiente reacción de transaminación (Manchenko, op. cit.).

L-aspartato + α - cetoglutarato $\longrightarrow$ oxalacetato + L-glutamato

Para éste sistema se han mencionado isoenzimas en distintos compartimientos subcelulares. Las enzimas de este sistema intervienen en una transaminación citoplasmática y en el metabolismo mitocondrial de aminoácidos.

ESTERASAS

Las esterasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de uniones éster de numerosos ésteres carboxílicos. Están presentes en bacterias, protozoarios, hongos, plantas, invertebrados y vertebrados. Pertenecen a un grupo complejo y heterogéneo de enzimas que presentan amplia especificidad por sustratos, catalizan la hidrólisis de una gran cantidad de ésteres diferentes, con baja especificidad por el sustrato, variando las velocidades de reacción.. Las esterasas no pertenecen a las enzimas regulatorias del metabolismo energético, y pueden clasificarse como enzimas no regulatorias del metabolismo intermedio. Muchas de estas enzimas están sujetas a variaciones ambientales, ya que las mismas actúan directamente sobre sustratos exógenos, (Johnson, op. cit.). Los métodos que se utilizan para su detección son inespecíficos.

GLUCOSA 6-FOSFATO DEHIDROGENASA

La glucosa 6-fosfato dehidrogenasa, cataliza la dehidrogenación de la glucosa-6 fosfato que es la primera etapa en la ruta de las pentosas fosfato o ruta del fosfogluconato. Es ésta una ruta alternativa para catabolizar la glucosa 6-fosfato. Utiliza NADP como aceptor electrónico y produce 6-fosfogluconolactona. Provee el NADPH necesario en la biosíntesis reductora de los ácidos grasos y de los esteroides y la producción de la ribosa 5-fosfato destinada a la biosíntesis de los ácidos nucleicos. Permite además la

interconversión de varios azúcares de tres, cuatro, cinco, seis, siete carbonos, conectándolos metabolicamente con la secuencia glucolítica. (Lehninger, 1981). Se la reconoce como una enzima dimérica, (Manchenko, op. cit.). Está presente en bacterias, hongos, algas verdes, plantas, protozoarios, invertebrados y vertebrados.

ISOCITRATO DEHIDROGENASA

La oxidación del isocítrico a α-cetoglutárico en el ciclo de Krebs es catalizado por la enzima isocitrato dehidrogenasa. Es ésta una enzima regulatoria del metabolismo energético. La mayoría de los organismos presentan tres tipos de isocitrato dehidrogenasa, una NAD dependiente presente en las mitocondrias y dos NADP dependientes, una presente en el citosol y la otra en mitocondrias. Se cree que la isocitrato NAD dependiente es el catalizador principal para la oxidación del isocitrato en el ciclo de Krebs (Lehninger, op. cit.).Está presente en hongos, plantas, vertebrados e invertebrados. La isocitrato dehidrogenasa NADP dependiente está presente en bacterias, hongos, plantas, protozoarios, vertebrados e invertebrados.

SUPERÓXIDO DISMUTASA

La superóxido dismutasa es la enzima que convierte al superóxido en peróxido de hidrógeno y en oxígeno molecular, el peróxido de hidrógeno se descompone luego por la catalasa en los peroxisomas. Se encuentra en dos formas, una en el citosol y otra en la mitocondria. La citosólica compuesta por dos subunidades que contienen Cu^{2+} y Zn^{2+}, y la mitocondrial que contiene Mn^{2+} (Lehninger, op. cit.). Estas enzimas se encuentran en elevada concentración y son extraordinariamente activas, sugiriendo que los radicales superóxido que son muy tóxicos se producen continuamente durante la

reducción enzimática del oxígeno, por parte de diversas enzimas y sistemas enzimáticos y son rápidamente eliminados. Está presente en bacterias, hongos, plantas, protozoarios, vertebrados e invertebrados. Catalizan la siguiente reacción, (Manchenko, op. cit.) :

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

2.9.3 *Obtención del micelio*

Se realizaron cultivos en medio líquido **GA**, con el fin de obtener las muestras a procesar para su posterior siembra en los geles de poliacrilamida. Se cosechó el micelio el día de máximo crecimiento establecido para cada especie a partir de las curvas de crecimiento, el mismo fue lavado tres veces con agua bidestilada, secado con papel de filtro, fraccionado y guardado a -70° C hasta su procesamiento. Las condiciones de cultivo y la cosecha del micelio se detallan en las sección **2.6** y **2.7**.

2.9.4 *Preparación de la muestra.*

El micelio fue molido con buffer de extracción (100 mM Buffer Tris-HCl, pH 7,5, 0,1% v/v 2-mercaptoetanol, 1 mM EDTA, 10 mM ClK, 10 mM $Cl_2Mg.6H_2O$, 10 % PVP 10000 (polivinilpirrolidona) (Soltis et al., 1983) en tubos "Polistor" a 0 °C sobre hielo, separado en alícuotas en frasquitos de azafrán y guardado a -70° C hasta la siembra.

2.9.5 *Condiciones de electroforesis*

Se empleó la técnica de electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida, utilizándose el sistema esencialmente descripto por Beckman & Johnson, (1964).

2.9.6 *Preparación de los geles de poliacrilamida*

Se utilizaron geles de poliacrilamida concentración 7 %, (Saidman, 1985). Los geles fueron preparados como se detalla a continuación :

Acrilamida .....5,6 g
Bisacrilamida.....0,16 g
TEMED.....100 µl
Persulfato de amonio.....punta de espátula
Buffer.....80 ml

Bisacrilamida (N, N'-metilen-bis-acrilamida)
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina)

Buffers empleados en la preparación de los geles:

A : pH 8 (Scandalios, 1969, modificado).
Se mezclaron las soluciones **a** y **b** en una proporción de 1**a** : 9**b**

a . Borato de litio pH 8,2

Hidróxido de litio.....2,51 g
Acido bórico.....18,55 g
Agua bidestilada.....1000 ml

b. Tris citrato pH 8,5

Tris.....3,63 g

Citrato de sodio monohidrato.....1,05 g

Agua bidestilada.....1000 ml

Tris (Tris (hidroximetil) aminometano).

El buffer **A** se empleó para la preparación de los geles de: aspartato aminotransferasa (AAT), esterasa (EST) y superóxido dismutasa (SOD).

B : Tris citrato pH 6,5 (Selander et al., 1971, modificado)

Tris.....0,97 g

Citrato de sodio monohidrato.....0,63 g

NaOH.....0,11 g

Agua bidestilada.....1000 ml

Tris (Tris (hidroximetil) aminometano).

El buffer **B** se usó para la preparación de los geles de: fosfatasa ácida (ACP) e isocitrato dehidrogenasa (IDH).

C : Tris citrato pH 8 (Soltis, op. cit.)

a. Tris.....16,34 g

Acido cítrico.anhidro.....6,18 g

Agua bidestilada.....1000 ml

Tris (Tris (hidroximetil) aminometano)

67 ml de **a** se llevaron a 1000 ml con H_2O bidestilada.

El buffer **C** se usó para la preparación de los geles de: glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G6PD).

La solución para la preparación de cada gel se volcó en cubetas de vidrio de 17 cm de ancho por 15 cm de largo por 2 mm de espesor. Cada cuba fue cubierta por un vidrio. Los geles fueron dejados a temperatura ambiente hasta el día siguiente.

2.9.7 *Siembra de las muestras en los geles*

Los extractos fueron absorbidos en rectángulos de papel Whatmann 3 MM de (2 x 4 mm) para todos los sistemas isoenzimáticos, excepto para la AAT en que se utilizaron rectángulos de (2 x 8 mm). Los papeles fueron introducidos en ranuras hechas a 2 cm del extremo del gel con un peine de acero inoxidable con 20 dientes de 4 mm de ancho x 2 mm de espesor, separados entre sí por espacios de 2 mm. En el caso de la siembra para la AAT se unieron con un bisturí dos ranuras y se introdujeron los papeles de (2 x 8 mm) embebidos en las muestras.

Una vez realizada la siembra se cubrieron las calles, con una solución de azul de bromofenol (4 mg/ml) como colorante de frente. Los geles fueron cubiertos con un papel transparente por encima del cual se ubicaron los vidrios, para evitar la evaporación y el secado, antes y durante la corrida. Todas las bandas de los sistemas isoenzimáticos estudiados fueron de migración anódica, por lo cual las ranuras se practicaron a 2 cm de distancia del extremo correspondiente al cátodo.

2.9.8 *Corrida electroforética*

La corrida se llevó a cabo en cámara termostatizada a 4°C para evitar el calentamiento de los geles durante la migración y la consecuente desnaturalización de las enzimas. Los geles fueron sometidos a una diferencia de potencial de alrededor de 120 volts (corriente contínua), durante aproximadamente 5 horas, para lo cual se utilizaron cubas de acrílico de 40 cm

de largo, 20 cm de ancho y 7 cm de alto, con dos recipientes uno anódico y otro catódico separados entre sí por un espacio de 6 cm. Cada recipiente se llenó con aproximadamente 250 ml del buffer de corrida correspondiente. Cada cuba tuvo capacidad para dos geles y el contacto entre la solución buffer y el gel se realizó mediante paños esponja tipo "Mortimer", de 18 cm x 12 cm, los cuales fueron lavados y enjuagados con agua destilada después de cada corrida. Una vez armados los puentes con dos geles por cuba, se cubrió cada uno de ellos con el papel transparente de polietileno y la placa de vidrio. La migración se realizó con una diferencia de potencial de alrededor de 10 volts por cm, hasta que el frente alcanzó una distancia de 11 cm desde el punto de siembra, luego de lo cual los geles fueron retirados de la cuba y se procedió a revelar las diferentes zonas de actividad enzimática.

2.9.9 *Buffers de corrida*

a : Borato de litio pH 8,2 (Scandalios, op. cit., modificado)

Hidróxido de litio.....2,51 g

Acido bórico.....18,55 g

H_2O bidestilada.....1000 ml

(descripto en preparación de los geles **2.9.6**)

Se utilizó en las cubas para los sistemas aspartato aminotransferasa (AAT), esterasa (EST), superóxido dismutasa (SOD).

b : Tris citrato pH 7 (Selander et al, op. cit., modificado)

Tris.....27 g

Citrato de sodio monohidrato.....19,7 g

NaOH.....2 g

H_2O bidestilada.....1000 ml

Tris (Tris (hidroximetil) aminometano)

El buffer **b** se usó en las cubas para los sistemas: fosfatasa ácida (ACP) e isocitrato dehidrogenasa (IDH).

c : Tris citrato pH 8 (Soltis, op. cit.)

Tris.....16,34g

Acido cítrico.....6,18g

H_2O bidestilada.....1000ml

El buffer **c** se usó en las cubas para la glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G6PD).

2.9.10 *Tinciones enzimáticas*

Se probaron trece sistemas enzimáticos. La **tabla M-5** muestra los sistemas enzimáticos ensayados y los buffers empleados para cada uno. La tinción para AAT fue realizada según Vallejos, 1983; las tinciones para ACP, G6PD, AK, IDH, GDH (NADP), ADH, CAT, PER, fueron realizadas según Manchenko, op. cit.; y las de EST, SOD, MDH (NADP), MDH (NAD), fueron realizadas según Wendel y Weeden, 1989. Se eligieron los sistemas isoenzimáticos que presentaron buena resolución para todos los aislamientos. Los mismos fueron: aspartato aminotransferasa (AAT), fosfatasa ácida (ACP), glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G6PD), isocitrato dehidrogenasa (IDH), esterasa (EST) y superóxido dismutasa (SOD).

Tabla M-5. Sistemas enzimáticos ensayados, número EC, abreviaturas, Buffers de gel y buffers de corrida.

SISTEMA ENZIMATICO	ABREVIATURA	Nº	BUFFER DE GEL	BUFFER DE CORRIDA
Enzimas con buena resolución para todos los aislamientos				
Aspartato aminotransferasa	AAT	EC: 2.6.1.1	A	a
Esterasa	EST	EC: 3.1.1...	A	a
Fosfatasa ácida	ACP	EC: 3.1.3.2	B	b
Glucosa -6-fosfato dehidrogenasa	G6PD	EC: 1.1.1.49	C	c
Isocitrato dehidrogenasa	IDH	EC: 1.1.1.42	B	b
Superóxido dismutasa	SOD	EC: 1.15.1.1	A	a
Enzimas con buena resolución sólo para algunos aislamientos				
Fosfatasa alcalina	AP	EC: 3.1.3.1	B	b
Glutamato dehidrogenasa	GDH	EC: 1.4.1.3	B	b
Malato dehidrogenasa NAD dependiente	MDH (NAD)	EC: 1.1.1.37	A	a
Malato dehidrogenasa NADP dependiente (Enzima málica)	MDH (NADP)	EC: 1.1.1.40	A	a
Enzimas con pobre o ninguna resolución				
Alcohol dehidrogenasa	ADH	EC: 1.1.1.1	A	
Catalasa	CAT	EC: 1.11.1.6	A	
Peroxidasa	PER	EC: 1.11.1.7	A	

A : BORATO DE LITIO, pH 8 #
B: TRIS-CITRATO, pH 6,5 *
C: TRIS-CITRATO, pH 8 .

a: BORATO DE LITIO, pH 8,2 #
b: TRIS-CITRATO, pH 7 *
c:TRIS-CITRATO, pH 8

Scandalios,1969 (modificado)
* Selander et al. 1971 (modificado)
. Soltis et al., 1983

ACP : Fosfatasa ácida (Manchenko, op.cit., modificado)

Buffer acetato 50 mM pH 5.....50 ml

Ácido α-naftil fosfato de Na.....50 mg

Fast black K.....50 mg

$MgCl_2$ (100mM).....0,5 ml

Los geles se sumergieron en ésta solución y fueron incubados durante una hora en estufa a 37 °C hasta la aparición de las bandas de actividad enzimática.

EST : Esterasa (Wendel y Weeden, op.cit, modificado por Saidman, op. cit.)

Buffer fosfato 100mM pH 6.....50ml.

α-naftil.acetato.....30mg

β-naftil. acetato.....30mg

Fast blue RR *.....50mg

* Se disuelve el colorante en el buffer con calor y agitación, se filtra y se agregan los sustratos disueltos en 1 ml de acetona cada uno, se agita brevemente.

Los geles fueron sumergidos en la solución, e incubados en estufa a 37 °C durante una hora, hasta la aparición de las bandas.

G6PD : Glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (Manchenko, op. cit.)

Buffer Tris HCl 100 mM pH 8.....50 ml

Glucosa 6-P Na_2.....20 mg

NADP.....10 mg

NBT.....10 mg

PMS.....1 mg

$MgCl_2$ (100 mM).....1 ml

NBT (Azul de Nitrotetrazolio)

PMS (Fenacina metasulfato)

Los geles fueron cubiertos con ésta solución e incubados a 37°C durante aproximadamente una hora hasta la aparición de las bandas azules.

AAT : Aspartato aminotransferasa (Vallejos, op. cit.)

Los geles fueron sumergidos en la siguiente solución:

Buffer Tris HCl 100 mM pH 8,5.....50 ml

Acido L-aspártico.....100 mg

Acido α-cetoglutárico.....50 mg

Fast blue BB salt.....150 mg

Piridoxal 5´fosfato.....10 mg

Se incubaron en oscuridad (envueltos en papel negro), a 37°C durante aproximadamente una hora, hasta la aparición de las bandas azules en los geles.

IDH : Isocitrato dehidrogenasa (Manchenko, op.cit., modificado)

Buffer Tris HCl 100 mM pH 8.....50 ml

Acido isocítrico .....50 mg

NADP.....10 mg

NBT.....10 mg

PMS.....2 mg

$MgCl_2$ (100 mM).....0,5 ml

NBT (Azul de Nitrotetrazolio)

PMS (Fenacina metasulfato)

Los geles se sumergieron en ésta solución y se incubaron en estufa a 37 °C, durante una hora 30 minutos. Las zonas de actividad enzimática aparecen como bandas azules.

SOD : Superóxido dismutasa (Wendel y Weeden, op. cit.)

Buffer Tris HCl 100 mM pH 8.....50 ml

NBT.....10 mg

PMS.....2,5 mg

NAD.....12,5 mg

EDTA.....pta de espátula

Los geles sumergidos en la solución, fueron cubiertos con papel "Saran". Incubados bajo una lámpara de 75 W (luz y calor), hasta la aparición de las bandas de actividad enzimática, bandas claras sobre un fondo azul intenso.

2.9.11 *Número de clasificación de las enzimas*

Se utilizaron para designar a las isoenzimas los números de clasificación de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC-IUB (Enzyme Nomenclature, 1979). Los mismos están consignados en la **tabla M-5**.

2.9.12 *Acondicionamiento y almacenamiento de los geles*

En todos los casos, los geles fueron lavados varias veces con agua bidestilada, luego de la aparición de las bandas de actividad enzimática, y sumergidos en una solución fijadora de etanol : agua : ácido acético en una proporción de 5 : 5 : 1. Luego fueron fotografiados y guardados en bolsas de polietileno que fueron selladas con calor .

Se midieron las distancias desde el origen a cada banda para cada sistema enzimático. Se calcularon los Rf (migración relativa) como el cociente entre la distancia recorrida por cada banda y la distancia del frente. Los geles, embolsados y sellados, fueron finalmente almacenados en cajas.

2.9.13 *Técnicas numéricas*

2.9.13.1 *Construcción de la matriz básica de datos*

Los veinticuatro aislamientos geográficos de las diez especies del género ***Saccobolus*** consignados en la **tabla M-1** constituyeron las unidades taxonómicas operativas (OTU).

Los caracteres usados fueron obtenidos a partir de los estudios realizados en el material que se detalla en la **tabla M-1.** El total de caracteres fue de 48 representado cada uno por una banda de actividad enzimática de los seis sistemas analizados (las bandas comunes a todos los OTU se excluyeron para el análisis posterior). Los estados posibles de cada carácter se codificaron como, presencia 1, ausencia 0, para todos los aislamientos monospóricos consignados en la **tabla M-1**. No se observaron diferencias en los estados de los caracteres entre las distintas cepas de una especie de una determinada

procedencia geográfica, determinándose por lo tanto que cada aislamiento constituía una unidad taxonómica operativa.

La matriz básica de datos se obtuvo a partir del registro del estado de cada uno de los caracteres en cada una de las 24 OTU **tabla M-6.**

2.9.13.2 *Análisis de agrupamientos*

A partir de la matriz básica de datos se calcularon diferentes coeficientes de similitud : Gower (Sneath & Sokal, op. cit.), Sorensen (1948) y Jaccard (1908) para cada par posible de OTU. La matriz resultante fue analizada por el método de medias no ponderadas (UPGMA) (Sneath & Sokal, op. cit). El análisis se realizó con el programa Multivariate Statistical Package (MVSP), (Kovack, op. cit). La distorsión producida durante el análisis de agrupamiento se calculó a partir del coeficiente de correlación cofenética (r) (Sokhal & Rohlf, op. cit), utilizando el programa NTSYS-PC (Rolf, op. cit). Los valores de dicho coeficiente habitualmente oscilan entre 0,6 y 0,9 siendo los cercanos o mayores de 0,9, indicadores de escasa distorsión.

2.9.13.3. *Análisis de congruencia*

Se realizó el correspondiente análisis de congruencia taxonómica entre las clasificaciones, basadas en las dos fuentes de caracteres: una, referida a los sistemas isoenzimáticos micelianos, y la otra al comportamiento fisiológico en cuanto a crecimiento en distintos medios de cultivo, producción de una enzima celulolítica extracelular inducible y los patrones isoenzimáticos de la misma. La coincidencia entre las matrices de similitud se calculó a partir del coeficiente de correlación (r) (Sokhal & Rohlf, op. cit), utilizando el programa NTSYS-PC (Rolf, op. cit).

Tabla M-6. Matriz básica de datos. Sistemas isoenzimáticos intracelulares.

Rf/OTU																								
ACP6	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACP9	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACP14	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ACP16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACP18	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACP24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
ACP26	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACP32	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST 9	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST17	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
EST18	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
EST21	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST22	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST25	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
EST27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST29	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
EST30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1
EST39	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
EST44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EST46	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST64	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G6PD20	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G6PD21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
G6PD22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
G6PD23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
G6PD26	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IDH18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
IDH19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
IDH21	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IDH22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IDH23	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IDH24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IDH27	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IDH29	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAT18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AAT24	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAT26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAT28	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAT30	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SOD 21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SOD38	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
SOD39	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SOD40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SOD41	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SOD45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0

2.10 *Análisis con todos los caracteres*

2.10.1 *Construcción de la matriz básica de datos*

La **tabla M-7** muestra la matriz básica de datos construída con las dos fuentes de caracteres. Los dieciocho aislamientos geográficos para los cuales se realizó tanto el estudio de los sistemas isoenzimáticos micelianos, como el referido al comportamiento fisiológico y los patrones isoenzimáticos de la endo-β-D-1,4-glucanasa, constituyeron las unidades taxonómicas operativas (OTU).

El total de caracteres fue de 86 representado cada uno por una banda de actividad enzimática de los sistemas intracelulares y de la endo-β-D-1,4-glucanasa y por las variables cuantitativas representadas por los parámetros fisiológicos.

2.10.2 *Análisis de agrupamientos*

A partir de la matriz básica de datos se calculó el coeficiente de similitud de Gower (Sneath & Sokal, op. cit.) para cada par posible de OTU. La matriz resultante fue analizada por el método de medias no ponderadas (UPGMA) (Sneath & Sokal, op. cit.). El análisis se realizó con el programa Multivariate Statistical Package (MVSP) (Kovack, op. cit.). La distorsión producida durante el análisis de agrupamiento se calculó a partir del coeficiente de correlación cofenética (r) (Sokhal & Rohlf, op. cit.) utilizando el programa NTSYS-PC (Rolf, op. cit.).

Tabla M-7. Matriz básica de datos. Sistemas isoenzimáticos intracelulares, Variables fisiológicas y sistema isoenzimático endo ß-D-1,4 glucanasa.

Rf/OTU	*S.dep.* FAC	*S. inf.* AD	*S. inf.* PA	*S.seud.* I I	*S.seud.* I V	*S.seud.* EZ	*S.verr.* GC	*S.verr.* G	*S. citr.* ER	*S. citr.* I I	*S. long.* PD	*S. plat.* AG	*S. plat.* SP	*S.saccob.*	*S.saccob.* TA	*S. succ.* ER	*S. trunc.* BC	*S. trunc.* T
ACP6	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACP9	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACP14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
ACP16	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
ACP18	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACP24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
ACP26	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACP32	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST 9	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
EST11	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST17	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
EST18	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
EST21	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST22	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST25	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
EST27	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST29	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
EST30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1
EST39	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
EST44	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
EST46	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EST53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
EST64	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G6PD20	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G6PD21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
G6PD22	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
G6PD23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
G6PD26	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IDH18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
IDH19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla M-7. Matriz básica de datos. Sistemas isoenzimáticos intracelulares, Variables fisiológicas y sistema isoenzimático endo ß-D-1,4 glucanasa.

Rf/OTU	S.dep. FAC	S. inf. AD	S. inf. PA	S.seud. II	S.seud. IV	S.seud. EZ	S.verr. GC	S.verr. G	S. citr. ER	S. citr. II	S. long. PD	S. plat. AG	S. plat. SP	S.saccob. BI	S.saccob. TA	S. succ. ER	S. trunc. BC	S. trunc. T
IDH21	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IDH22	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
IDH23	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IDH24	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
IDH27	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IDH29	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAT18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
AAT24	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAT26	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AAT28	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAT30	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SOD 21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
SOD38	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
SOD39	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SOD40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SOD41	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SOD45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
15	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
30	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
41	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
47	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla M-7. Matriz básica de datos. Sistemas isoenzimáticos intracelulares, Variables fisiológicas y sistema isoenzimático endo ß-D-1,4 glucanasa.

Rf/OTU	S.dep. FAC	S. inf. AD	S. inf. PA	S.seud. I I	S.seud. I V	S.seud. EZ	S.verr. GC	S.verr. G	S. cltr. ER	S. cltr. I I	S. long. PD	S. plet. AG	S. plet. SP	3.saccob.	Bl.saccob. TA	S. succ. ER	S. trunc. BC	S. trunc. T
49	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
50	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
70	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
75	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
76	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
83	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
84	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
90	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
94	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
99	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	208,5	384,5	406	364	364,3	365	202	212	274	274	340	338	345,3	431,5	426	427,5	402,5	397,3
2	12	8	13	7	7	7	7	7	8	8	10	8	8	8	8	9	10	10
3	202	252,5	121,6	314,5	310,6	290	327,7	304	270	260	185,7	255	230	380	382,5	215	283	283,7
4	12	8	12	7	7	7	7	7	9	9	12	10	10	10	10	10	10	10
5	82,25	105,75	77,3	143	134,6	120	96,7	94	67	60	60	49	48,3	148	138,5	75	69	61,3
6	12	8	13	8	8	8	8	8	10	10	12	10	10	10	10	11	12	12

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 *Identificación de las especies. Obtención de las cepas monospóricas*

Al cabo de un período de 8-10 días, cuando los apotecios alcanzaron la madurez, se realizó, a partir del análisis de los caracteres micromorfológicos la identificación de las distintas especies que crecieron en los trozos de estiércol, coleccionados en distintas localidades geográficas. Se recogieron las ascosporas expulsadas y se obtuvieron los cultivos monospóricos.

3.2 *Curvas de crecimiento en medio con glucosa*

Las **figuras R-1 a 6** muestran las curvas de crecimiento en medio líquido con glucosa como fuente de carbono de las diez especies del género *Saccobolus*: ***S. citrinus, S. longevisporus, S. platensis, S. saccoboloides, S. succineus*** y ***S. truncatus,*** de la sección ***Saccobolus*** y ***S. depauperatus, S. infestans, S. seudodepauperatus*** y ***S. verrucisporus***, de la sección ***Eriobolus.***

Las cepas monósporicas utilizadas, la localidad, el sustrato (estiércol), la fecha de colección y el número de cepa (BAFC) de las mismas se detallan en la **tabla M-3**.

En el medio que contiene glucosa como fuente de carbono todas las especies mostraron un elevado crecimiento registrándose los máximos entre los días 7° y 13°, luego de los cuales se observó una rápida disminución del peso ingresando en la fase de autólisis.

Los valores máximos de peso seco obtenidos fueron de alrededor de 400 mg para ***S. saccoboloides***, ***S. succineus*** y ***S. truncatus*** (**Figura R-2-B, R-3-A** y **R-3-B**) y de un mínimo cercano a los 200 mg para ***S. depauperatus.*** y ***S. verrucisporus*** (**Figura R-4** y **R-6-B**).

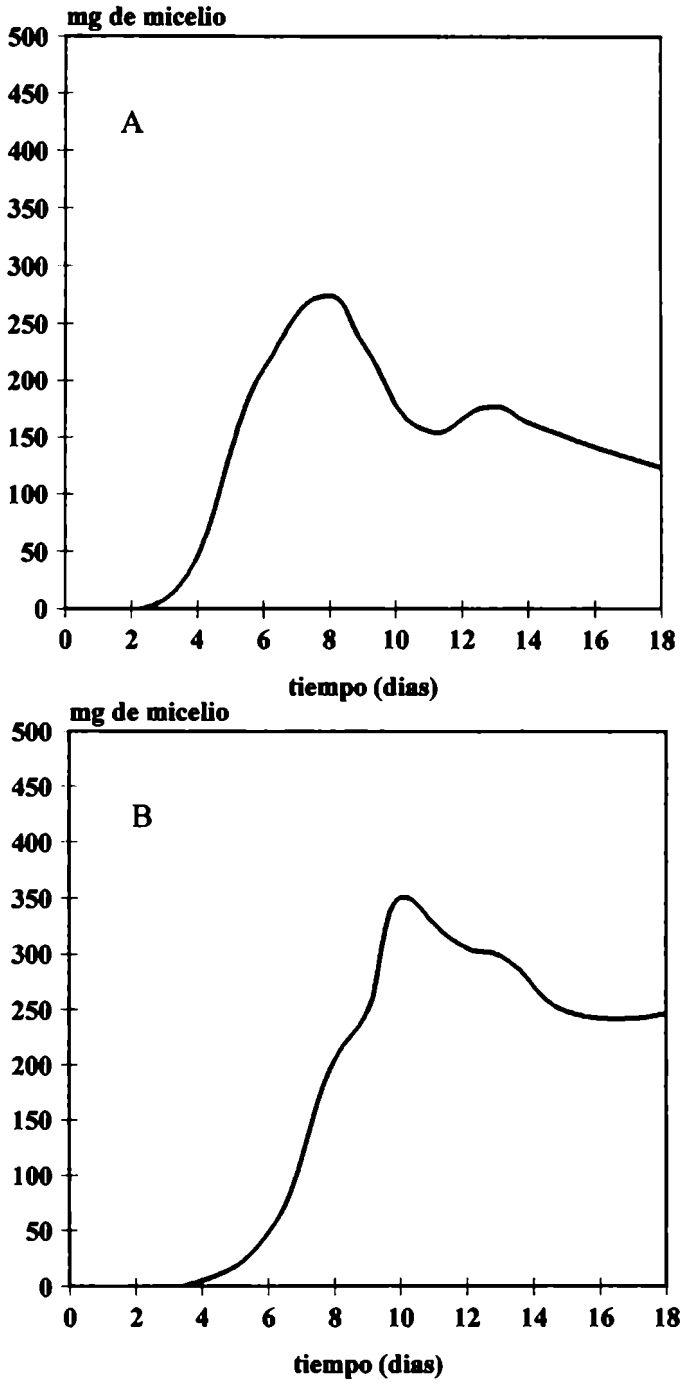


Figura R-1. (A) ***S. citrinus*** **ER (B)** ***S. longevisporus*** **PD**

Figuras R-1 a 3. Crecimiento en medio de cultivo con glucosa. Sección ***Saccobolus.***

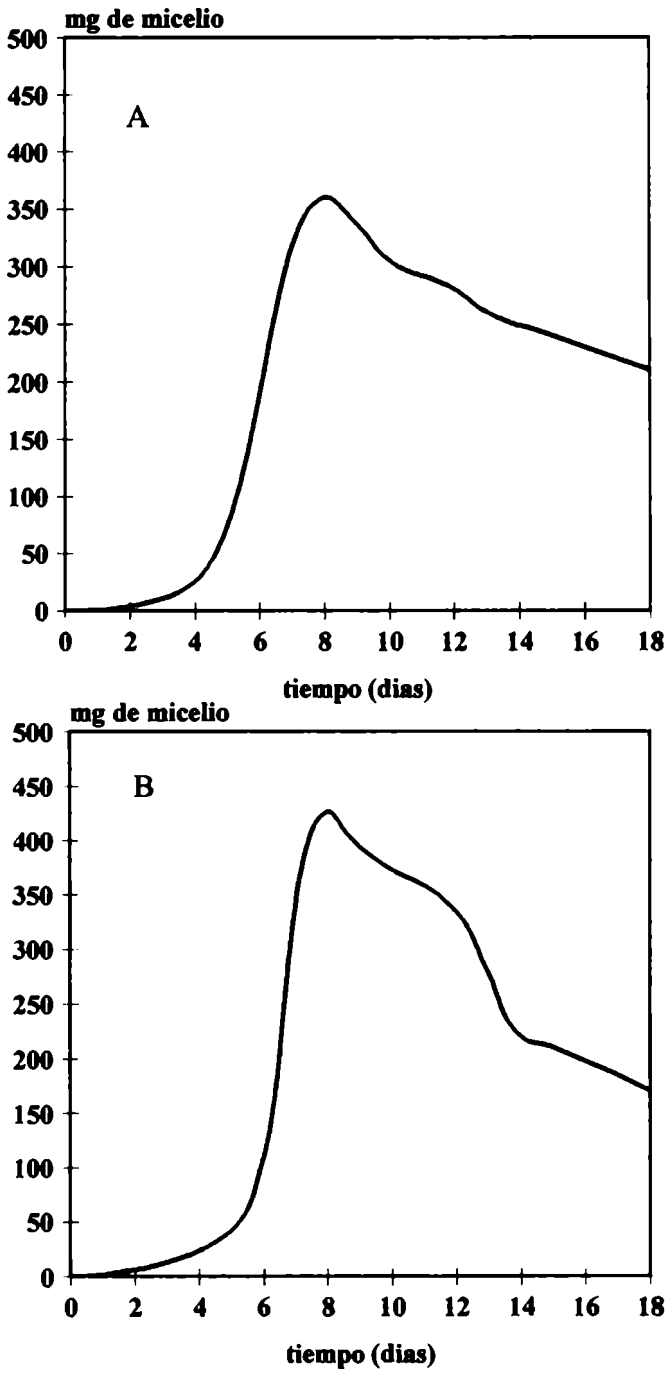


Figura R-2. (A) *S. platensis* SP (B) *S. saccoboloides* BC

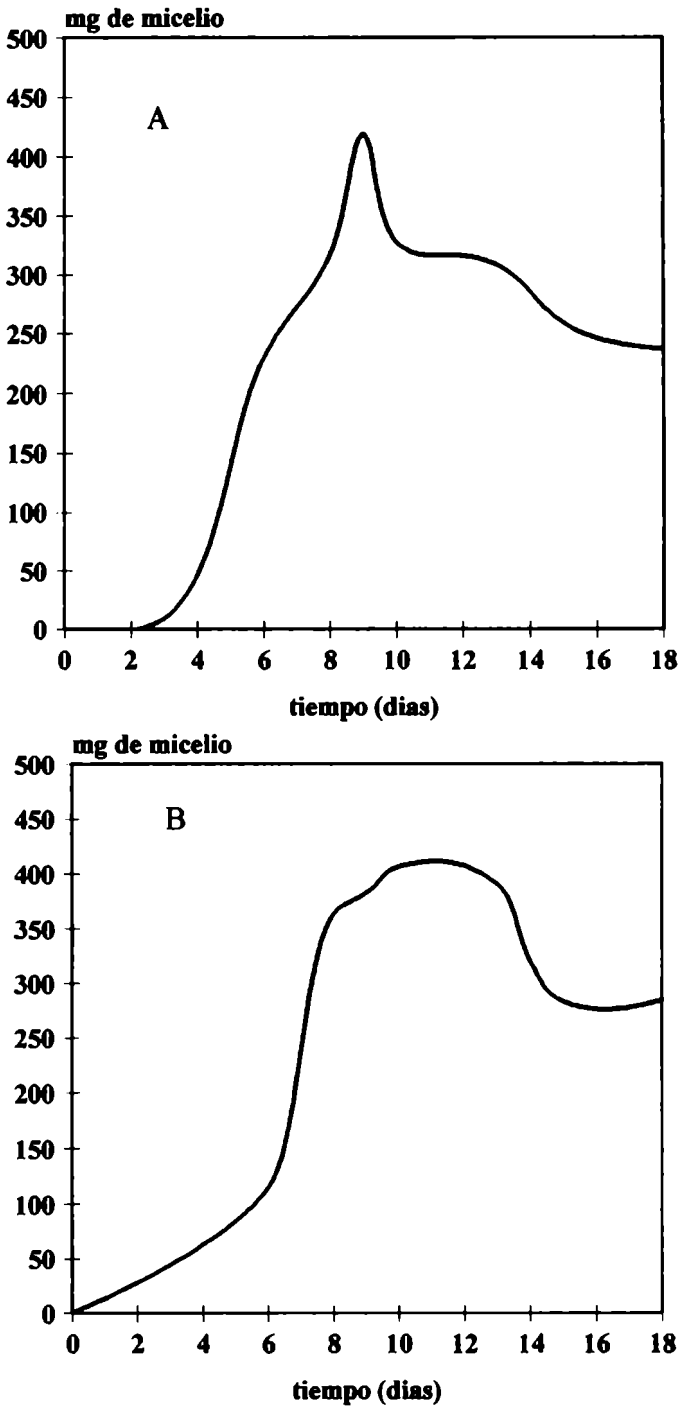


Figura R-3. (A) *S. succineus* ER (B) *S. truncatus* BC

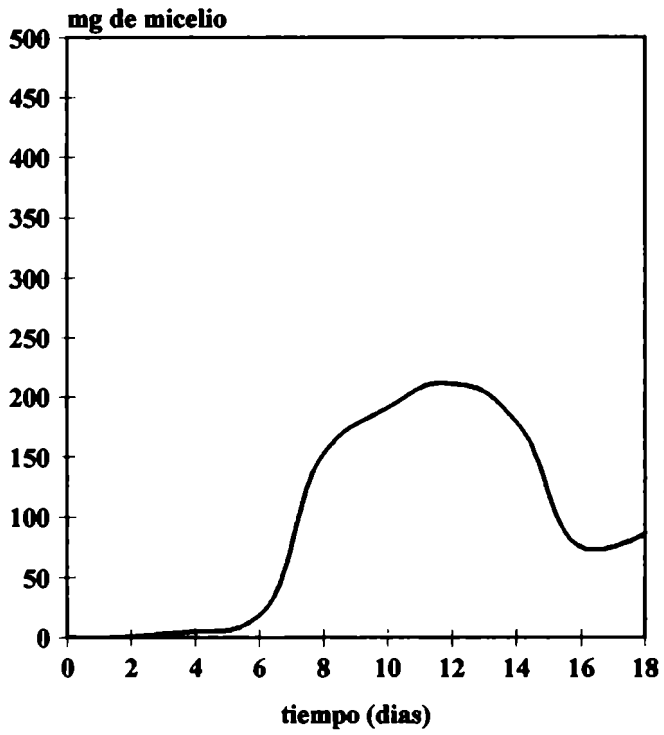
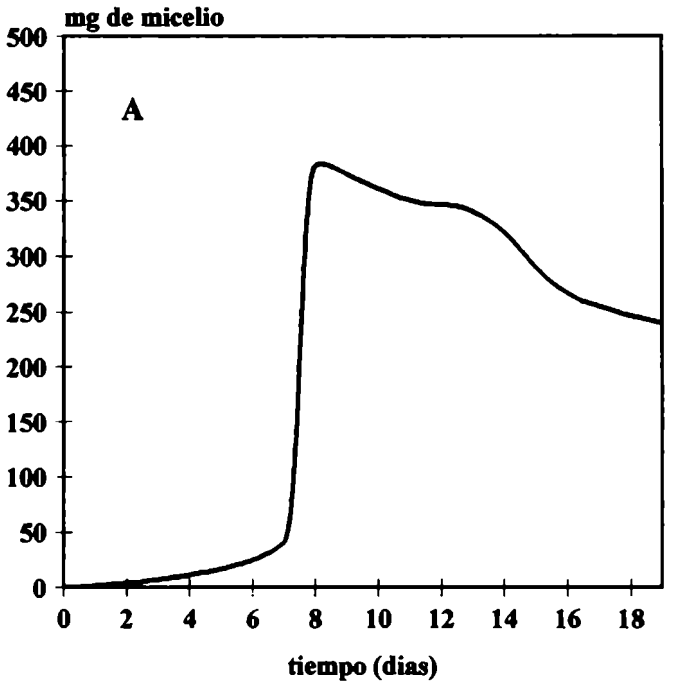


Figura R-4. ***S. depauperatus*** **II**

Figuras R-4 a 6. Crecimiento en medio de cultivo con glucosa. Sección ***Eriobolus***



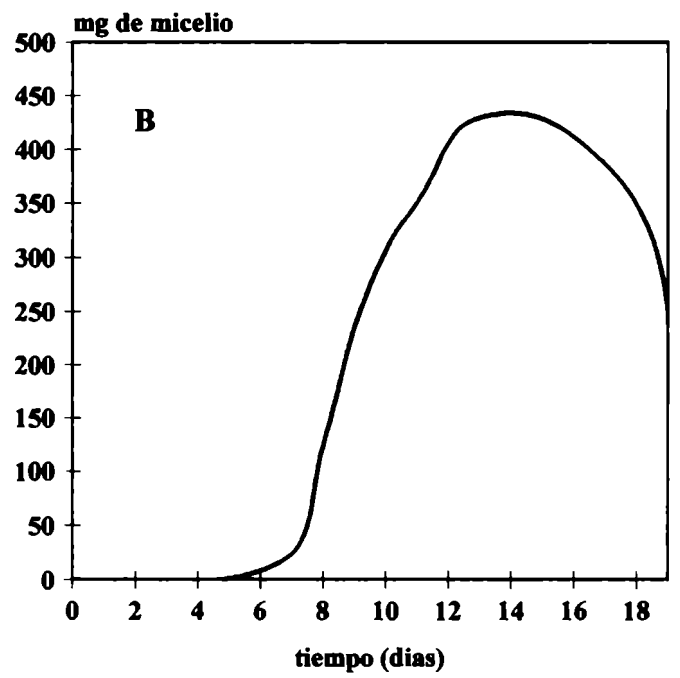


Figura R-5. (A) *S. infestans* (AD) (B) *S. infestans* (PA)

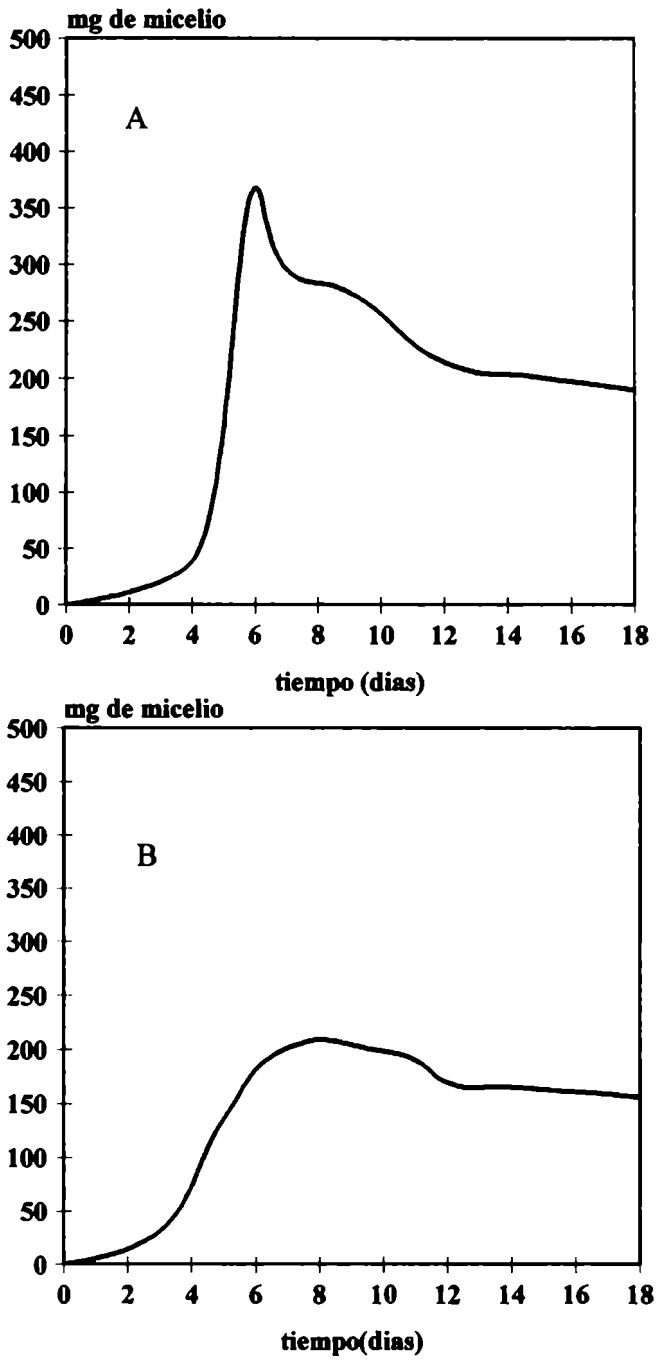


Figura R-6. (A) *S.seudodepauperatus* I V (B) *S.verrucisporus* GC .

3.3 *Crecimiento, producción y zimogramas de endo-β-D-1,4-glucanasa*

3.3.1 *Curvas de crecimiento, medición de actividad endo-β-D-1,4-glucanasa, proteínas y pH final en el sobrenadante de cultivo.*

Todas las especies crecieron en el medio con celulosa cristalina como única fuente de carbono. Las **Figuras R-7 a 9** muestran el crecimiento, pH, producción de endo-β-D-1,4-glucanasa y de proteínas extracelulares de las seis especies de la sección ***Saccobolus***. Las **Figuras R-10 a 12** muestran la evolución de dichas variables para las cuatro especies de la sección ***Eriobolus***.

S. citrinus presentó el máximo crecimiento, el día 9, ***S. platensis***, ***S. saccoboloides***, ***S. succineus*** y ***S. truncatus*** el día 10 y ***S. longevisporus*** el día 12. Los días de máxima actividad de la enzima coincidieron con el día de máximo crecimiento en ***S. platensis*** y ***S. longevisporus***, o estuvieron levemente desfasados con respecto al mismo, en ***S. citrinus***, ***S. succineus***, ***S. truncatus*** y ***S. saccoboloides*** cuya ocurrencia fue los días 10, 11 y 12 respectivamente.

S. seudodepauperatus y ***S. verrucisporus*** registraron el día 7 el máximo crecimiento y alrededor del día 8 la máxima actividad enzimática. Los dos aislamientos geográficos de ***S. infestans*** mostraron diferencias en su comportamiento en el cultivo con celulosa cristalina. ***S. infestans*** (AD) presentó ambos picos coincidentes en el día 8 y ***S. infestans*** (PA) el día 12 , siendo además los valores obtenidos para éste último, alrededor de la mitad de los del otro aislamiento geográfico. ***S. depauperatus*** presentó el máximo crecimiento el día 12 y la máxima producción enzimática más tarde. Durante la fase exponencial de crecimiento aumentó, en todos los casos, la secreción al medio de proteínas extracelulares, incrementándose concomitantemente, la actividad endo-β-D-1,4-glucanasa medida en el sobrenadante. El pH mostró una leve disminución inicial

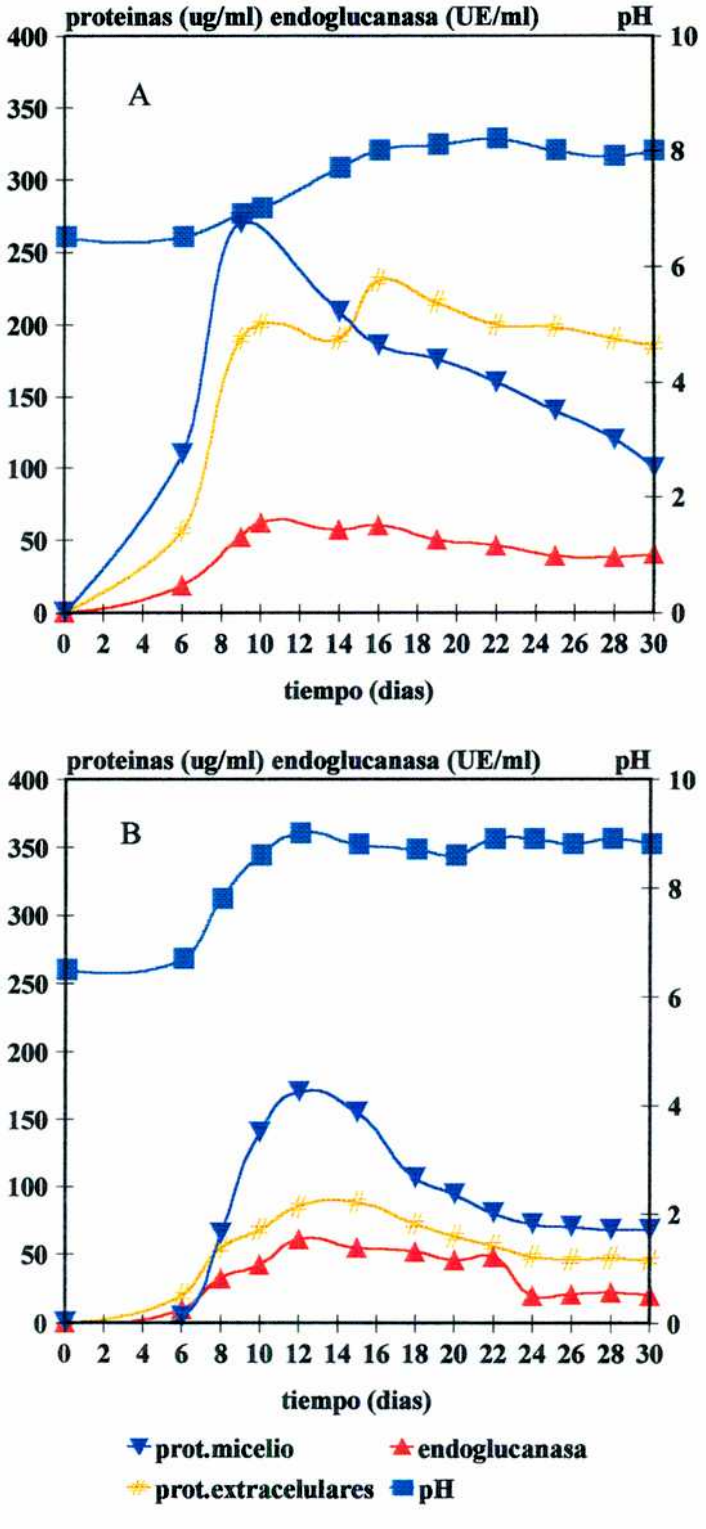


Figura R-7. (A) *S.citrinus* ER (B) *S.longevisporus* PD

Figuras R-7 a 9 . Crecimiento, producción de endo ß-D-1,4 glucanasa y proteínas extracelulares en medio de cultivo con celulosa cristalina. Sección ***Saccobolus***

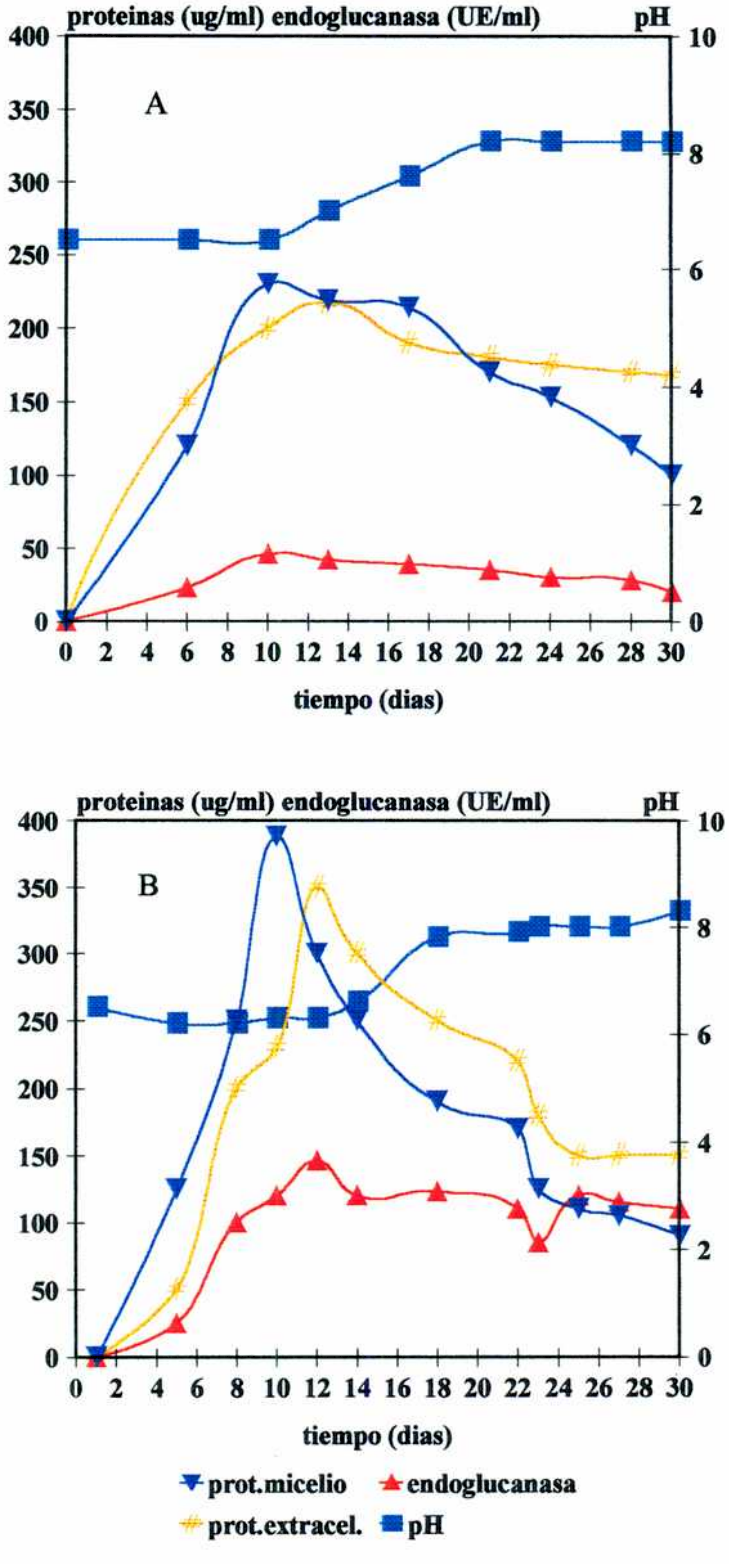


Figura R-8. (A) ***S. platensis*** SP **(B)** ***S.saccoboloides*** BC

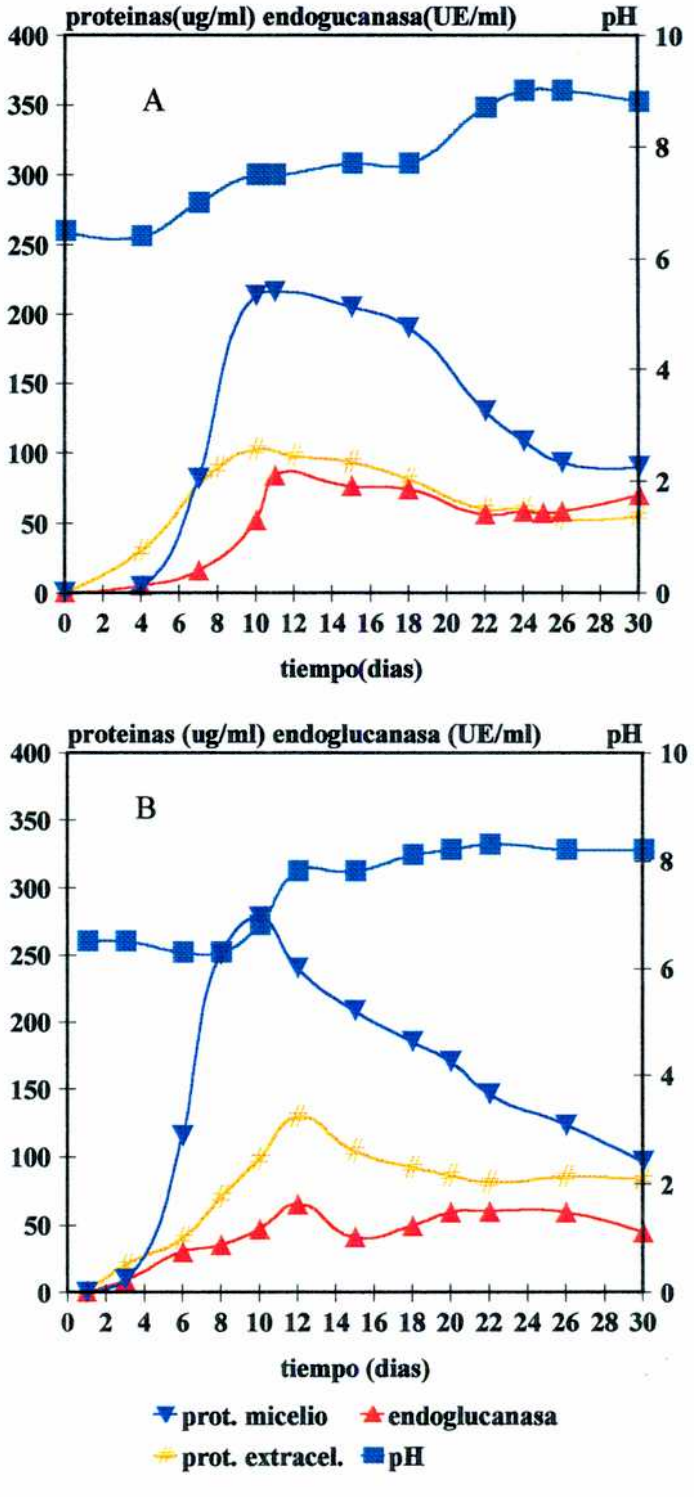


Figura R-9. (A) *S. succineus* ER, (B) *S. truncatus* BC

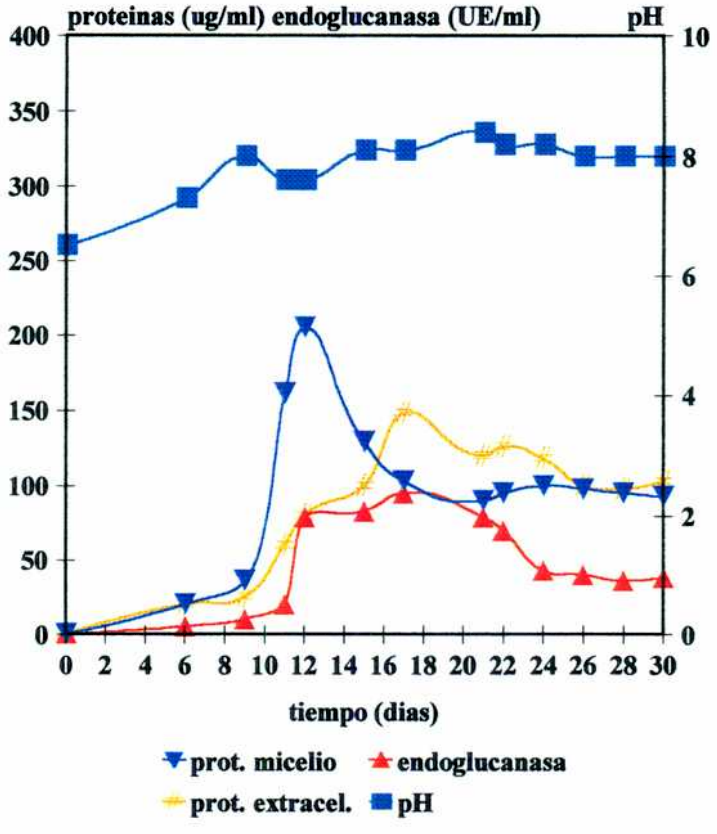


Figura R-10. ***S.depauperatus*** **II**

Figuras R- 10 a 12. Crecimiento, produccion de endo ß-D1,4 glucanasa y proteinas extracelulares en medio de cultivo con celulosa cristalina. Seccion ***Eriobolus***

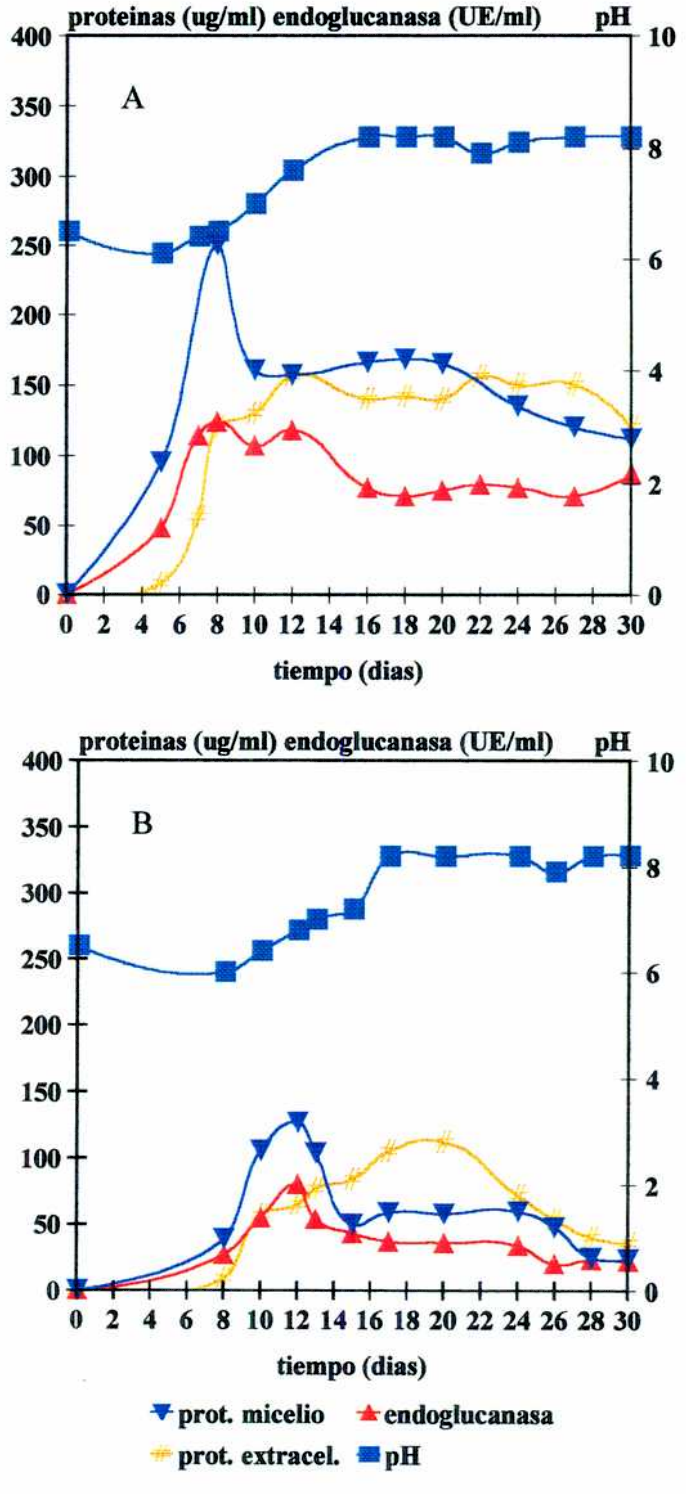


Figura R-11. (A) *S.infestans* (AD). (B) *S.infestans* (PA)

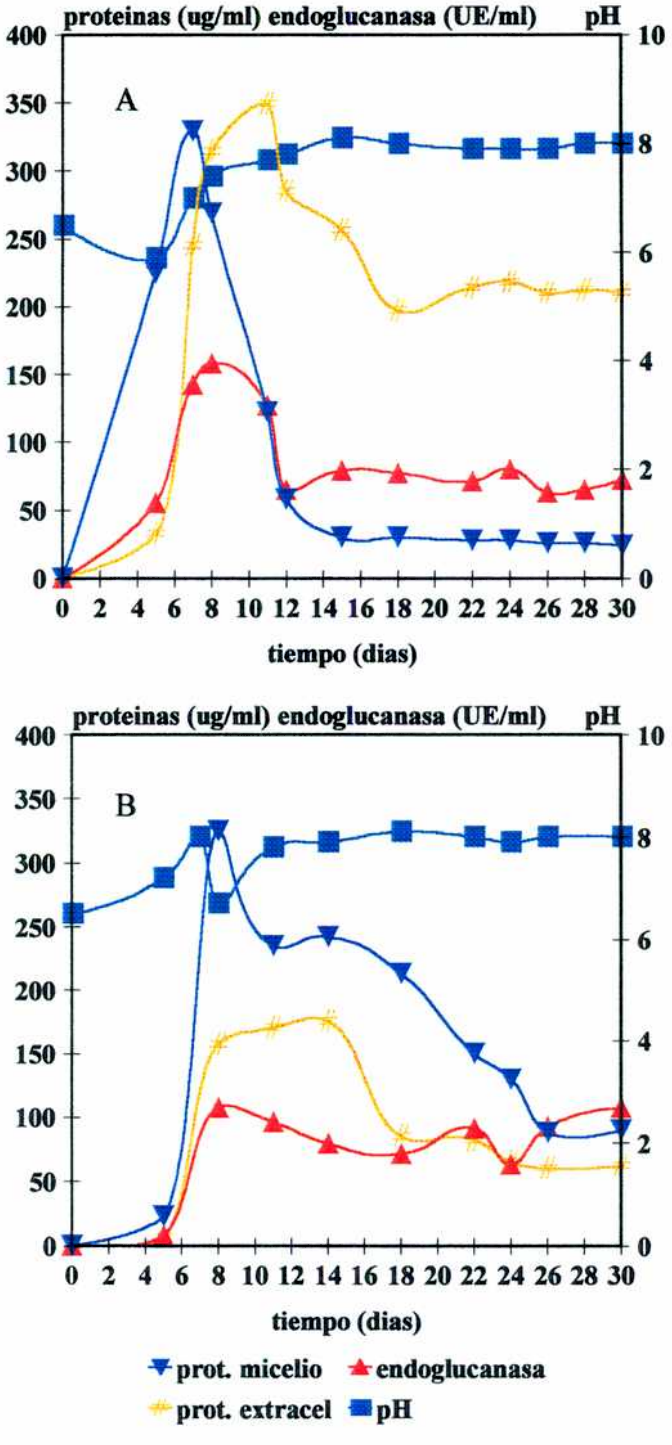


Figura R-12. (A) *S.seudodepauperatus* I V (B). *S.verrucisporus* GC

aumentando hasta llegar a un pH igual o mayor que 8 luego de iniciada la fase de autólisis.

La **tabla R-1** muestra los valores de máximo crecimiento, máxima actividad endo-β-D-1,4-glucanasa y los días de ocurrencia de los mismos de todos los aislamientos geográficos de las diez especies. No se observaron diferencias significativas entre los parámetros alcanzados por las distintas cepas monospóricas de un mismo aislamiento geográfico de una determinada especie. Excepto para ***S. infestans***, tampoco fueron significativas las diferencias entre los distintos aislamientos geográficos de la misma especie. ***S. saccoboloides*** y ***S. seudodepauperatus*** fueron las especies que mostraron una mayor producción de endoglucanasa, con valores que oscilaron entre 135 y 150 UE/ml para la primera y entre 120 y 150 UE/ml para la segunda. Ambas especies mostraron un muy buen crecimiento con valores entre 370 y 390 μg/ml de proteína para las cepas de ***S. saccoboloides*** y entre 290 y 330 μg/ml para las de ***S. seudodepauperatus***. Uno de los aislamientos de ***S. infestans*** (AD) presentó buena actividad de la enzima con valores entre 90 y 130 UE/ml que duplicaron los obtenidos por el otro aislamiento geográfico, ***S. infestans*** (PA), cuyos valores fueron entre 70 y 84 UE/ml, los valores de crecimiento obtenidos para ambos aislamientos también reflejaron éstas diferencias alcanzando valores entre 230 y 270 μg/ml para ***S. infestans*** (AD) y entre 115 y 130 μg/ml para ***S. infestans*** (PA). Todos los aislamientos de ***S. verrucisporus*** mostraron una moderada actividad enzimática con valores entre 88 y 106 UE/ml, acompañados por buen crecimiento, con valores para ésta variable entre 304 y 350 μg/ml. ***S. depauperatus*** fue la especie de la sección ***Eriobolus*** que mostró los valores más bajos de crecimiento y de actividad enzimática, oscilando los mismos entre 195 y 208 μg/ml para la primera variable y entre 76 y

Tabla R-1 Datos de crecimiento de las cepas de la sección Saccobolus en cultivos con glucosa y con celulosa cristalina, producción de endo ß-D-1,4 glucanasa.

CEPA	Máximo crecimiento en CC, Proteínas de micelio (ug/mL)	Máxima producción de endo ß-D-1,4 glucanasa	Día de máximo crecimiento en CC	Día de máxima producción de endo ß-D-1,4 glucanasa	Máximo crecimiento en GA (mg de micelio)	Día de maximo crecimiento en GA
CltER 1	270	60	9	10	274	8
CltIIV1	265	58	9	10	270	8
CltII 1	250	67	9	10	274	8
Long 0	190	60	12	12	350	10
Long 1	187	62	12	12	350	10
Long 2	180	58	12	12	320	10
PlatAg 0	260	56	10	10	330	8
PlatAg 2	250	42	10	10	346	8
PlatSP 0	240	52	10	10	336	8
PlatSP 2	230	47	10	10	360	8
PlatSP 5	220	46	10	10	340	8
SaccBC 2	390	146	10	10	426	8
SaccBC 3	370	150	10	10	437	8
SaccT 3	385	142	10	10	430	8
SaccT 4	380	135	10	10	422	8
SuccV 0	210	80	10	11	430	9
SuccV 1	220	70	10	11	425	9
SuccVC 2	200	60	10	11	432	9
SuccVC 3	210	68	10	11	426	9
SuccVC 4	190	65	10	11	380	10
TruncBC 2	290	70	10	12	410	10
TruncBC 4	276	68	10	12	395	10
TruncT 0	280	58	10	12	387	10
TruncT 1	286	66	10	12	415	10
TruncT 2	285	60	10	12	390	10

Tabla R-1. Datos de crecimiento de las cepas de la sección Eriobolus en cultivos con glucosa y con celulosa cristalina, producción de endo ß-D-1,4 glucanasa.

CEPA	Máximo crecimiento en CC, Proteínas de micelio (ug/mL)	Máxima producción de endo ß-D-1,4 glucanasa	Día de máximo crecimiento en CC	Día de máxima producción de endo ß-D-1,4 glucanasa	Máximo crecimiento en GA (mg de micelio)	Día de maximo crecimiento en GA
depF 1	200	80	12	12	210	12
depF 3	208	76	12	12	198	12
depF 4	195	83	12	12	215	12
depF 4'	205	90	12	12	211	12
InAD 1	250	130	8	8	380	8
InAD 2	270	108	8	8	394	8
InAD 3	230	90	8	8	386	8
InAD 6	260	95	8	8	378	8
InPA 13	115	84	12	13	420	13
InPA 14	120	70	12	13	408	13
InPA 15	130	78	12	13	390	13
Seu I 2	320	148	7	8	368	7
Seu I 6	309	138	7	8	360	7
Seu V 2	330	150	7	8	370	7
Seu V 3	298	130	7	8	373	7
Seu V 4	304	124	7	8	350	7
Sen EZ 1	290	120	7	8	365	7
Ver GC 0	325	106	7	8	200	7
Ver GC 1	350	88	7	8	196	7
Ver GC 2	308	96	7	8	210	7
Ver G 4	304	94	7	8	212	7

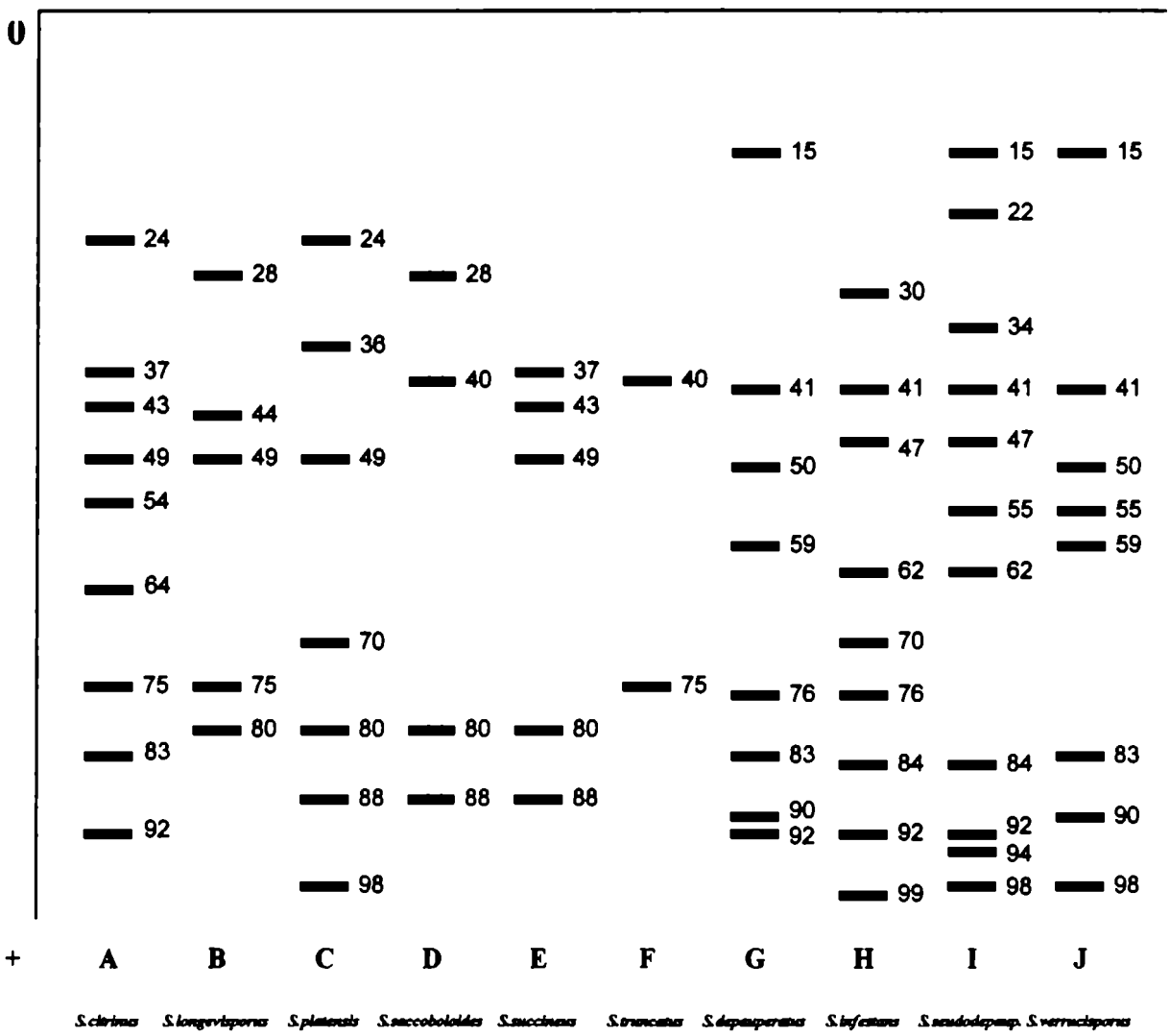
90 UE/ml para la segunda. El resto de las especies mostraron valores de actividad enzimática significativamente más bajos. ***S. citrinus*** alcanzó valores entre 58 y 67 UE/ml, ***S. longevisporus*** entre 58 y 62 UE/ml, ***S. platensis*** entre 42 y 56 UE/ml, ***S. succineus*** entre 60 y 80 UE/ml y ***S. truncatus*** entre 58 y 70 UE/ml. Los valores de crecimiento alcanzados por éstas especies fueron considerables. ***S. citrinus*** mostró valores entre 250 y 270 μg/ml, ***S. longevisporus*** entre 180 y 190 μg/ml, ***S. platensis*** entre 220 y 260μg/ml, ***S. succineus*** entre 190 y 220 μg/ml y ***S. truncatus*** entre 276 y 290 μg/ml. Las especies de la sección ***Eriobolus*** estudiadas mostraron, en general una mayor actividad endoglucanasa que las de la sección ***Saccobolus***, excepto ***S. saccoboloides*** que si mostró una muy buena producción de la enzima.

3.3.2 *Zimogramas de endo-β-D-1,4-glucanasa*

La **figura R-13** muestra los diagramas con los diez electromorfos para endo-β-D-1,4-glucanasa. Cada especie mostró un patrón de bandas isoenzimático característico, (patrones **A** a **J**). No se observaron diferencias entre las cepas monospóricas de cada aislamiento geográfico y fueron escasas y sólo cuantitativas entre los distintos aislamientos geográficos de la misma especie. No se observaron diferencias en el patrón de bandas de los dos aislamientos geográficos de ***S. infestans***, que mostró considerables diferencias para las variables de crecimiento y actividad enzimática. El patrón de bandas de degradación de CMC por la endo-β-D-1,4-glucanasa, mostró la existencia de varias isoenzimas características de cada especie. En el patrón de los aislamientos de ***S. seudodepauperatus*** (**figura R-13, I**) se registraron 11 bandas isoenzimáticas, 9 en los patrones de ***S. citrinus*** y ***S. infestans***, (**figura R-13, A** y **H**) ; 8 en el de ***S. depauperatus*** y ***S. verrucisporus*** (**figura R-13, G** y **J**) ; 7 en los

de *S. platensis* (**figura R-13**, C), 5 en *S. longevisporus* y en *S. succineus*, (**figura R-13**, **B** y **E**); 4 en *S. saccoboloides*, (**figura R-13**, **D**) y 2 en *S.truncatus*, (**figura R-13**, **F**). Se encontraron bandas comunes a varias especies dentro de cada una de las secciones, observándose en general mayor coincidencia entre las especies pertenecientes a la misma sección. En la sección *Saccobolus*, *S. citrinus* y *S. platensis* mostraron dos bandas en común de Rf 24 y Rf 49, la banda de Rf 49 estuvo presente en otras dos especies de la sección, *S. longevisporus S. succineus*. La banda de Rf 80 apareció en cuatro especies de la sección, *S. platensis*, *S. longevisporus*, *S. saccoboloides* y *S. succineus*, la banda de Rf 88 en *S. platensis*, *S. saccoboloides* y *S. succineus* y la banda de Rf 75 en *S. citrinus*, *S. longevisporus* y *S truncatus*. *S. citrinus* y *S. succineus* mostraron, además de la banda de Rf 49 otras dos bandas comunes la de Rf 37 y la de Rf 43. En la sección *Eriobolus* la banda de Rf 15 se encontró presente en tres especies, *S. depauperatus*, *S. seudodepauperatus y S. verrucisporus*. La banda de Rf 41 estuvo presente en las cuatro especies de la sección, las de Rf 47 y 62 en *S. infestans* y *S. seudodepauperatus*, las de Rf 50 y 59 en *S. depauperatus* y *S. verrucisporus*, la de Rf 76 en *S. depauperatus* y *S. infestans*, la de Rf 83 en *S. depauperatus*, *S. verrucisporus* y en *S. citrinus* de la sección *Saccobolus*, la de Rf 84 en *S. infestans* y *S. seudodepauperatus*, la de Rf 92 en *S. depauperatus*, *S. infestans*, *S. seudodepauperatus* y en *S. citrinus* de la sección *Saccobolus* y la de Rf 98 estuvo presente en *S. seudodepauperatus* y *S. verrucisporus* de la sección *Eriobolus* y en *S. platensis* de la otra sección.

Figura R-13. Diagrama de electromorfos (A a J) de endo-ß-D-1,4-glucanasa identificados en cada especie.



3.3.3 *Técnicas numéricas. Matriz básica de datos.*

Los veinte aislamientos geográficos de las diez especies del género ***Saccobolus***, consignadas en la **tabla M-2** de materiales y métodos, constituyeron las unidades taxonómicas operativas (OTU).

La matriz básica de datos resultante, **tabla M-4** de materiales y métodos fue de 20 OTU_s x 38 caracteres.

3.3.4 *Análisis de agrupamientos*

A partir de la matriz básica de datos, **tabla M-4**, se calculó el coeficiente de similitud: Gower (Sneath & Sokal, 1973), para cada par posible de OTU. La matriz resultante fue analizada por el método de medias no ponderadas (UPGMA). La distorsión producida durante el análisis de agrupamiento se calculó a partir del coeficiente de correlación cofenética (r) cuyo valor fue de 0,93298, indicando una muy escasa distorsión

EL fenograma obtenido a partir del análisis de agrupamientos (UPGMA), **figura R-14**, muestra que las dos secciones en las que se divide el género quedan claramente diferenciadas en dos grupos de especies. Cada uno de esos grupos abarca todos los aislamientos geográficos de las especies previamente incluídas dentro de cada sección. El primero, que incluye los aislamientos de las especies de la sección ***Eriobolus***, muestra dos subgrupos, el primero formado por ***S. depauperatus*** y ***S. verrucisporus*** y el segundo representado por ***S. infestans*** y ***S. seudodepauperatus***. El grupo que incluye los aislamientos de las especies de la sección ***Saccobolus*** muestra un núcleo formado por cinco especies ***S. longevisporus, S. saccoboloides, S. truncatus S. platensis*** y ***S. succineus*** y uno aislado del resto formado por las cepas de los aislamientos de ***S. citrinus***. Los dos grupos, que corresponden a ambas

secciones, están asociados entre sí con un índice de similitud del 56%. Excepto para *S. infestans* que mostró una clara separación entre las cepas de las dos poblaciones consideradas, el resto de las especies mostró escasas diferencias entre las cepas monospóricas de las poblaciones de una misma especie, con índices de similitud cercanos al 100%, lo que indica fenotipos casi idénticos. Dentro del grupo de especies de la sección Eriobolus, las cepas de la única población de *S. depauperatus* (Nuñez, Buenos Aires) DepF se asocia al núcleo representado por los aislamientos de distintas poblaciones de *S. verrucisporus*, con un índice del 80%. Las cepas de las dos poblaciones de *S. verrucisporus*, VerGC (Gobernador Castro, provincia de Buenos Aires) y VerG (Gualeguaychú, provincia de Entre Ríos) están asociadas entre sí con un índice cercano al 100% lo que indica un fenotipo idéntico. El segundo grupo dentro de la sección *Eriobolus* muestra dos subgrupos formados por las poblaciones de *S. infestans* y las de *S. seudodepauperatus*. El primero representado por cepas de las dos poblaciones de *S. infestans*: InfAD, (Adrogué, provincia de Buenos Aires) e Inf PA, (Porto Alegre, Brasil), ligadas entre sí con un índice del 88%, que representa el menor índice de similitud entre aislamientos de poblaciones de la misma especie. El grupo formado por *S. infestans* se asocia al núcleo que constituyen los aislamientos de las poblaciones de *S. seudodepauperatus*, con un índice del 65%. Dentro de estas últimas se observa un núcleo formado por aislamientos de las dos poblaciones de Campana, provincia de Buenos Aires (SeuIV y SeuII) y otro grupo constituído por aislamientos de la población de Ezeiza, provincia de Buenos Aires (SeuEZ), estos dos núcleos están ligados entre sí con un índice cercano al 100%. El primer grupo de especies de la sección *Eriobolus* representado por *S. depauperatus,* y *S. verrucisporus* y el segundo representado por *S. infestans* y *S. seudodepauperatus,* se asocian entre sí con un índice del 60%.

Dentro del grupo de especies de la sección ***Saccobolus***, en el núcleo formado por cinco especies, los aislamientos de la única población de ***S. longevisporus*** considerada, LongPD (Puerto Deseado, Provincia de Santa Cruz), están ligados al segundo grupo representado por los aislamientos de las poblaciones de ***S. truncatus***, y de ***S. saccoboloides*** con un grado de similitud del 80%. Las cepas de distintas poblaciones de ***S. saccoboloides***, SaccT (Tafí del Valle, Provincia de Tucumán) y SaccBC (Bahía Craft, Provincia de Rio Negro) están ligadas entre sí con un índice de similitud superior al 97 %, lo que refleja mínimas diferencias entre los aislamientos de las poblaciones de esta especie. Las cepas de las dos poblaciones de ***S. truncatus*** TruncBC (Bahía Craft, Provincia de Rio Negro) y TruncT (Tandil, provincia de Buenos Aires) conforman un grupo con fenotipos casi idénticos, ya que están asociados con un índice de similitud cercano al 100%. Las poblaciones de ***S. saccoboloides*** y las poblaciones ***S. truncatus*** están ligadas entre sí con un índice del 83%.

Los aislamientos de las dos poblaciones de ***S. platensis*** consideradas, PlatAG, (Agronomía, Buenos Aires) y PlatSP, (San Pedro, provincia de Buenos Aires) presentan leves diferencias entre sí conformando un grupo de fenotipos casi idéntico, estos se asocian a las cepas de poblaciones de ***S. succineus***, Gualeguaychú, Provincia de Entre Ríos (SuccER) y las de Villa Clara, provincia de Entre Ríos (SuccVC), que también poseen un índice de similitud, cercano al 100%. El núcleo formado por las poblaciones de ***S. platensis*** se asocia al grupo de poblaciones de ***S. succineus*** con un índice del 80%.

El núcleo formado por los aislamientos de ***S. platensis*** y ***S. succineus*** se asocia al formado por ***S. longevisporus, S. truncatus*** y ***S. saccoboloides,*** con un índice del 78 %.

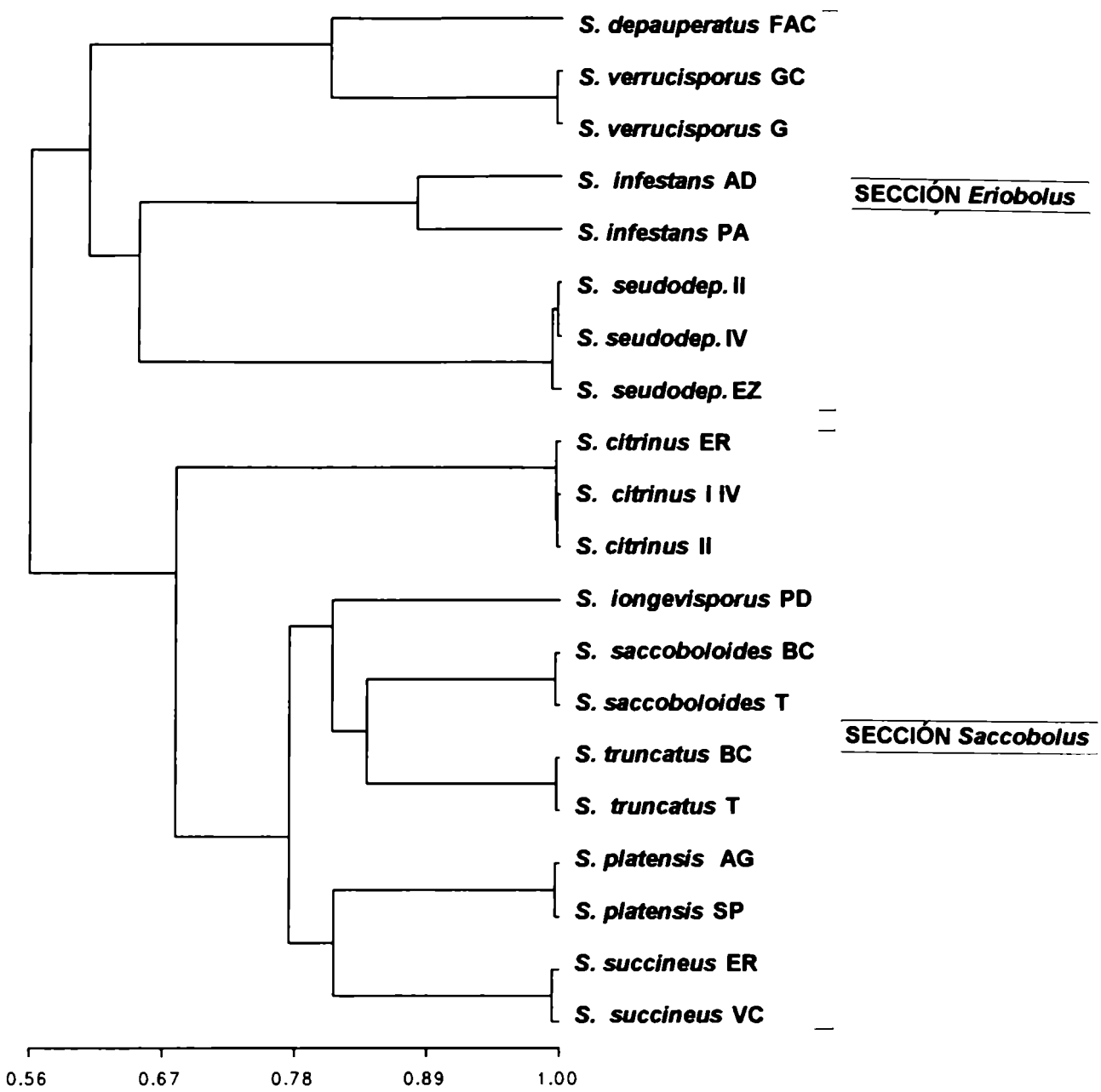


Figura R-14. Fenograma obtenido a partir de los datos fisiológicos y patrones de endo-β-D-1,4-glucanasa. Análisis de agrupamientos realizado por el método de medias no ponderadas (UPGMA).

Las aislamientos de las tres poblaciones de ***S. citrinus***, que constituyen un grupo aislado del resto, presentan leves diferencias fenotípicas entre sí separándose en un núcleo constituído por las cepas de las poblaciones de Campana, provincia de Buenos Aires (CitII) y (CitIV), que se asocian a las cepas de la población de Gualeguaychú, provincia de Entre Ríos (CitER). El núcleo formado por las cepas de las poblaciones de ***S. citrinus*** se asocia al grupo representado por los aislamientos de las poblaciones de las otras cinco especies con un grado de similitud de alrededor del 68%.

3.4.*Análisis isoenzimático de enzimas intracelulares*

3.4.1 *Organismos utilizados*

La **tabla M-1** detalla la procedencia, el sustrato (estiércol), la fecha de colección y el número de cepa (BAFC) de los distintos aislamientos geográficos utilizados para el análisis isoenzimático de los sistemas intracelulares.

3.4.2 *Sistemas isoenzimáticos analizados*

De los trece sistemas enzimáticos probados se eligieron para el análisis aquellos que presentaron buena resolución para todos los aislamientos. Los mismos fueron: aspartato aminotransferasa (AAT), fosfatasa ácida (ACP), glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G6PD), isocitrato dehidrogenasa (IDH), esterasa (EST) y superóxido dismutasa (SOD). Las **figuras R-15 a 20** muestran los zimogramas con los 44 electromorfos característicos para los 6 sistemas. Las especies del género ***Saccobolus*** presentan una alta homogeneidad intraespecífica, ya que no se observaron diferencias entre las

cepas monospóricas de cada aislamiento geográfico y fueron escasas entre los distintos aislamientos geográficos de la misma especie.

FOSFATASA ÁCIDA

La **Figura R-15** muestra seis patrones de bandas distintos para ambas secciones. ***S. citrinus, S. longevisporus*** el patrón (**A**), ***S. platensis, S. succineus, S. truncatus*** y ***S. depauperatus*** el (**B**), ***S. saccoboloides*** el (**C**), y ***S. infestans, S. seudodepauperatus*** y ***S. verrucisporus*** el (**D, E** y **F**) respectivamente.

Los electromorfos **A, B** y **D** presentan una sola banda y el **C, E** y **F** dos. El patrón **C** muestra una banda de Rf 14 común a la única banda del electromorfo **B** y otra de Rf 24 que le es propia. Este patrón solo se encontró presente en ***S. saccoboloides***. El patrón **A** con una sola banda de Rf 16 correspondió a ***S. citrinus*** y ***S. longevisporus*** mientras que ***S. platensis, S. succineus, S. truncatus*** y ***S. depauperatus*** mostraron el patrón **B**. El patrón **D** con la banda de Rf 6 apareció en ***S. infestans***. Los patrones **E** y **F** con dos bandas cada uno de Rf 26 y 32 el primero y RF 9 y 18 el segundo correspondieron a ***S. seudodepauperatus*** y ***S. verrucisporus***, respectivamente.

ESTERASAS

Los resultados del análisis electroforético de los zimogramas de esterasas en las especies estudiadas mostró a éste sistema como el único que evidenció diferencias en el patrón de bandas entre algunos aislamientos geográficos de la misma especie. La **Figura R-16** muestra 15 patrones de bandas distintos para

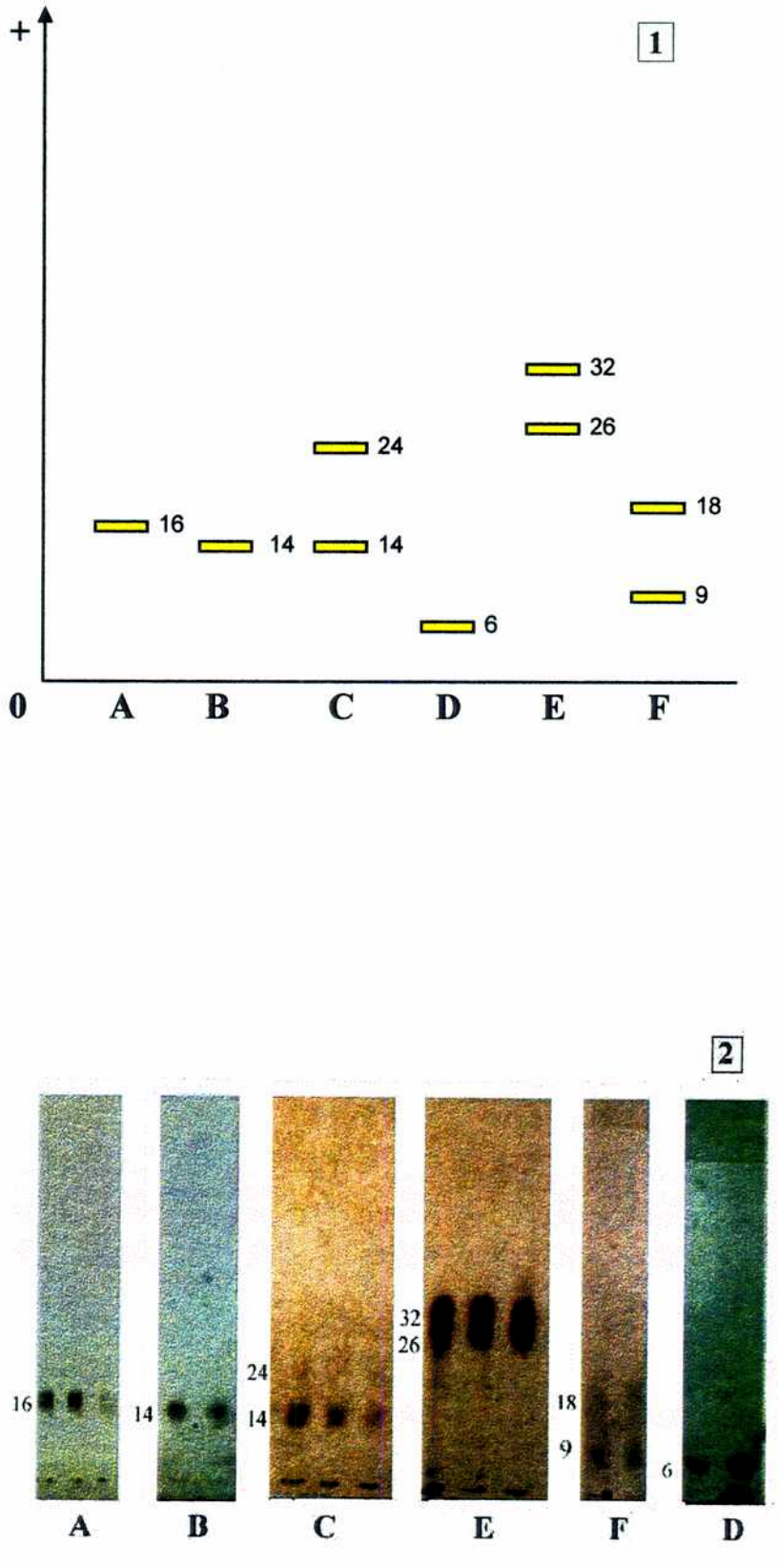


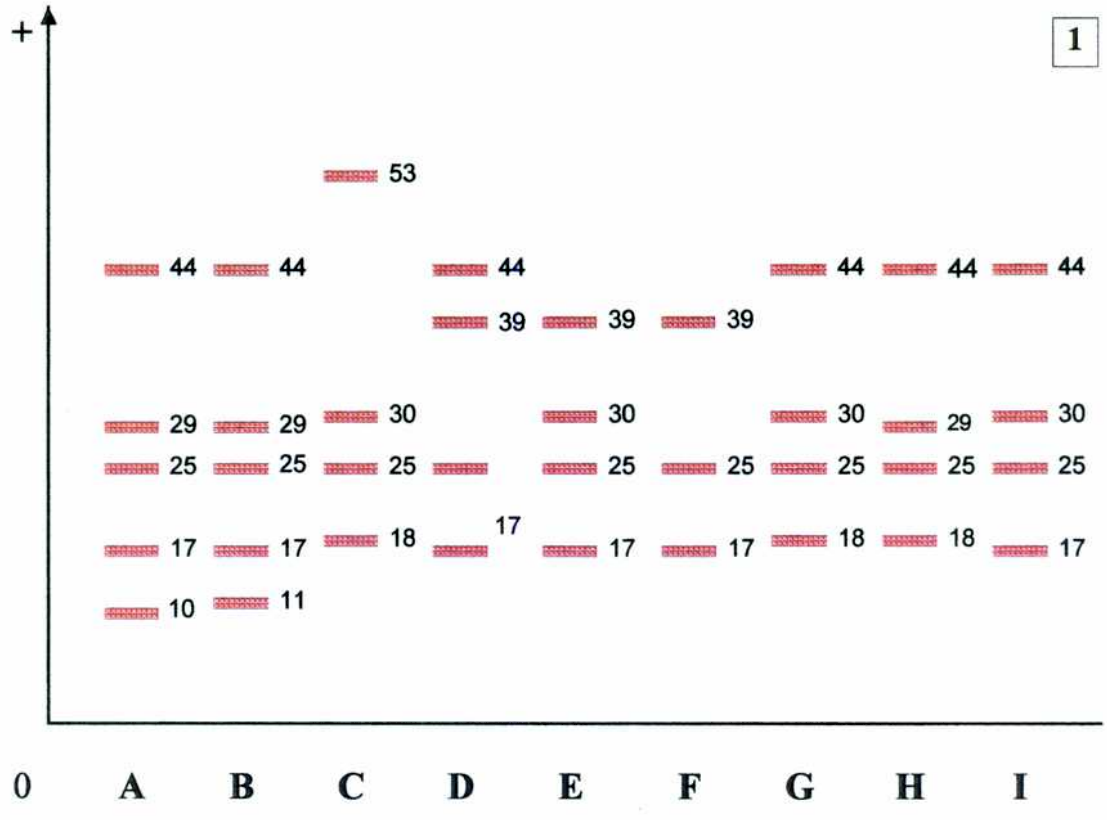
Figura R-15. Diagramas (1) de los electromorfos (A a F) identificados en el sistema enzimático fosfatasa ácida ACP. Zimogramas (2). Los números indican los Rf.

este sistema. Los patrones (**A** a **I**) correspondieron a las especies de la sección ***Saccobolus***. ***S. longevisporus*** (**C**), ***S. platensis*** (**D**) y ***S. truncatus*** (**I**) no mostraron diferencias entre aislamientos geográficos, mientras que si aparecieron diferencias de algunas bandas para ***S. citrinus*** (**A** y **B**), ***S. saccoboloides*** (**E** y **F**) y ***S. succineus*** (**G** y **H**). La sección ***Eriobolus***, muestra seis patrones de bandas distintos para las esterasas (**J** a **O**). ***S. infestans*** (**K**) y ***S depauperatus*** (**J**) no presentan diferencias entre los aislamientos para este sistema, mientras que, ***S. seudodepauperatus*** (**L** y **M**) y ***S. verrucisporus*** (**N** y **O**) mostraron diferencias entre algunos de los aislamientos.

Las cepas de ***S. citrinus*** pertenecientes al aislamiento geográfico de Campana, Provincia de Buenos Aires (CitII) presentan el patrón **A** mientras que las cepas de Gualeguaychú, provincia de Entre Ríos (CitER) y las de Nuñez, Capital Federal (CitFAC) muestran el patrón **B**. Ambos patrones presentan cuatro bandas comunes de Rf 44, 29, 25, 17 y una banda de Rf 10 presente en el electromorfo **A** y otra más rápida de Rf 11 presente en el **B**. Los aislamientos de ***S. saccoboloides*** muestran dos patrones, el **E** presente en las cepas de los aislamientos de Tafí del Valle, provincia de Tucumán (SaccT) y de Villa La Angostura provincia de Río Negro (SaccBC), y el **F** en las cepas del aislamiento de Ezeiza, provincia de Buenos Aires (SaccEz). Ambos patrones mostraron tres bandas comunes de Rf 17, 25 y 39. La banda de Rf 30 sólo aparece en el electromorfo **E**. ***S. succineus*** muestra dos electromorfos **G** y **H** con tres bandas comunes de Rf 18, 25 y 44 y una banda de Rf 30 (electromorfo **G**) presente en el aislamiento de San Martín de los Andes, provincia de Neuquén y una de Rf 29 (electromorfo **H**) presente en el aislamiento de Gualeguaychú, provincia de Entre Ríos. Los electromorfos

muestran la existencia de algunas bandas comunes. La banda de Rf 25 es compartida por todas las especies de la sección ***Saccobolus*** (electromorfos **A** a **I**), mientras que la banda de Rf 17 aparece en ***S. citrinus***, ***S. platensis***, ***S. saccoboloides*** y ***S. truncatus*** (electromorfos **A**, **B**, **D**, **E**, **F**, **I**). La de Rf 18 en ***S. longevisporus*** y ***S. succineus*** (electromorfos **C**, **G** y **H**), la de Rf 29 en ***S. citrinus*** y en un aislamiento de ***S. succineus*** (electromorfos **A**, **B** y **H**), la de Rf 30 en ***S. longevisporus*** (electromorfo **C**), ***S. truncatus*** (electromorfo **I**), en un aislamiento de ***S. saccoboloides*** (electromorfo **E**) y en uno de ***S. succineus*** (electromorfo G), la banda de Rf 39 en ***S. platensis*** (electromorfo **D**) y ***S. saccoboloides*** (electromorfos **E** y **F**) y la de 44 en ***S. citrinus*** (electromorfos **A** y **B**), ***S. platensis*** (electromorfo **D**), ***S. succineus*** (electromorfo **G** y **H**) y ***S. truncatus*** (electromorfo **I**). La banda de Rf 53 sólo está presente en ***S. longevisporus*** .(electromorfo **C**)

Entre las especies de la sección ***Eriobolus*** los aislamientos de ***S. seudodepauperatus*** muestran dos patrones: el **L**, presente en las cepas de uno de los aislamientos de Campana, provincia de Buenos Aires (Seu V) y de Ezeiza, provincia de Buenos Aires (SeuEz), y el **M** en las cepas del otro aislamiento de Campana , provincia de Buenos Aires (Seu I). Ambos patrones tienen cuatro bandas comunes de Rf 46, 39, 27 y 22. La banda de Rf 18 sólo aparece en el electromorfo **L**. ***S. verrucisporus*** mostró dos electromorfos **N** y **O** con tres bandas comunes de Rf 27, 25 y 17 y una banda de Rf 29 (electromorfo **O**) presente en los aislamientos de Gualeguaychú, provincia de Entre Ríos (Ver G). El patrón **N** está presente en los aislamientos de Gobernador Castro, provincia de Buenos Aires (VerGC) y de Campana, provincia de Buenos Aires (VerII). Los electromorfos muestran la existencia de



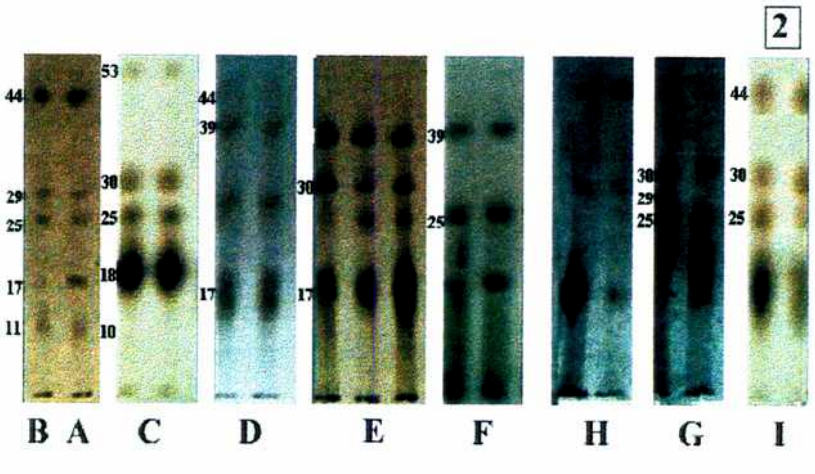


Figura R-16. Diagramas (1) de los electromorfos (A a I) identificados en el sistema enzimático esterasa (EST). Zimogramas (2). Los números indican los Rf.

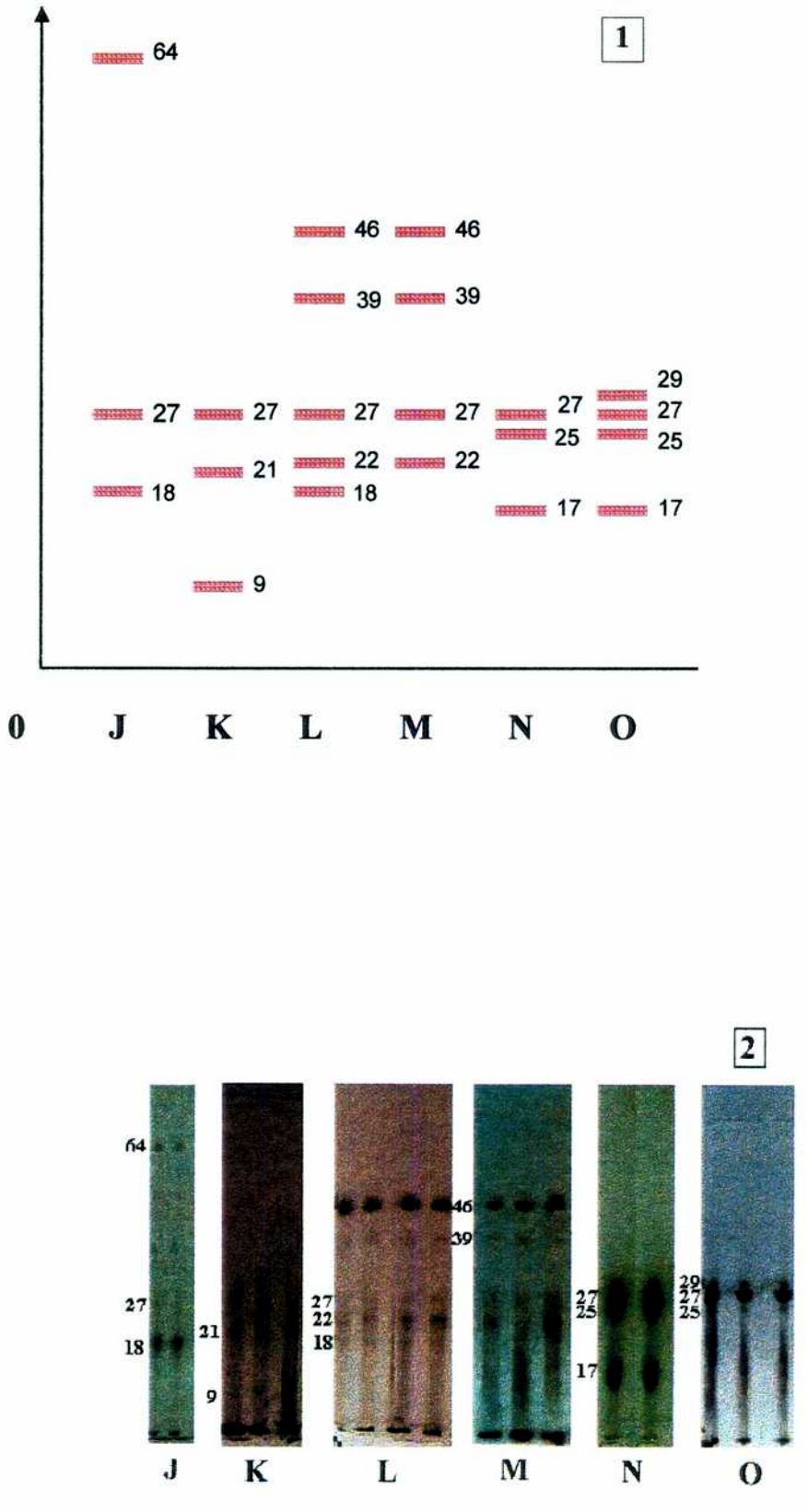


Figura R-16. Diagramas (1) de los electromorfos (J a O) identificados en el sistema enzimático esterasa (EST). Zimogramas (2). Los números indican los Rf.

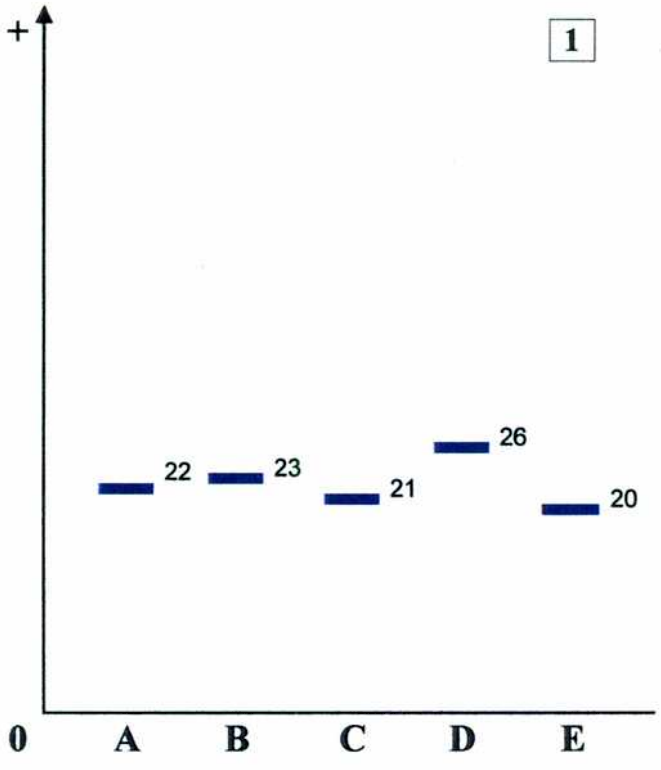
algunas bandas comunes. La banda de Rf 27 es compartida por todas las especies (electromorfos **J** a **O**), mientras que la banda de Rf 18 aparece en *S depauperatus* y en uno de los aislamientos de *S. seudodepauperatus* (electromorfos **J** y **L**).

Ambas secciones comparten algunas bandas, la de Rf 44 presente en *S. citrinus* (electromorfos **A** y **B**), *S. platensis* (electromorfo **D**), *S. succineus* (electromorfos **G** y **H**) y *S. truncatus* (electromorfo **I**), la de Rf 39 presente en *S. platensis* (electromorfo **D**), *S. saccoboloides* (electromorfos **E** y **F**) y *S. seudodepauperatus* (electromorfos **L** y **M**), la de Rf 18 presente en *S. longevisporus* (electromorfo **C**), *S. succineus* (electromorfos **G** y **H**), *S depauperatus* (electromorfo **J**) y en uno de los aislamientos de *S. seudodepauperatus* (electromorfo **L**) y, la de Rf 17 presente en *S. citrinus* (electromorfos **A** y **B**), *S. platensis* (electromorfo **D**), *S. saccoboloides* (electromorfos **E** y **F**), *S. truncatus* (electromorfo **I**), y *S. verrucisporus* (electromorfos **N** y **O**).

GLUCOSA 6-FOSFATO DEHIDROGENASA

La glucosa 6-fosfato dehidrogenasa **Figura R-17**, muestra seis electromorfos, con una única banda cada uno. Las especies de la sección *Saccobolus* muestran tres patrones de bandeo. El electromorfo **A**, Rf 22 se encuentra en *S. citrinus*, *S. platensis* y *S. saccoboloides*, el **B**, Rf 23, en *S. longevisporus* y *S. succineus* y el **C**, Rf 21 en *S. truncatus*.

La sección *Eriobolus* muestra dos patrones con una sola banda cada uno, el **D**, Rf 26, presente en *S. depauperatus* y el **E** Rf 20 en *S. infestans*, *S. seudodepauperatus* y *S. verrucisporus* .



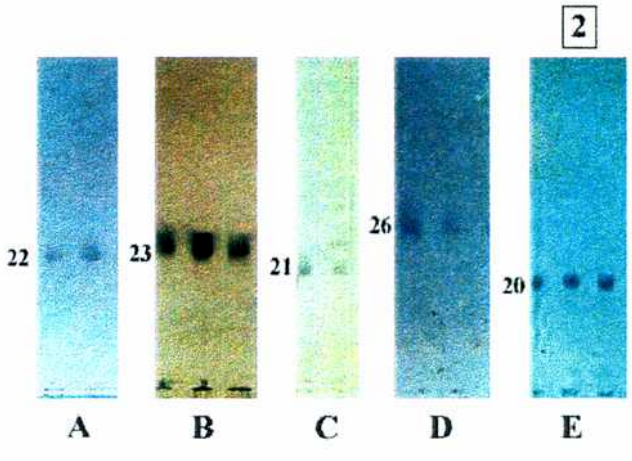


Figura R-17. Diagramas (1) de los electromorfos (A a E) identificados en el sistema enzimático glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G-6PDH). Zimogramas (2) . Los números indican los Rf.

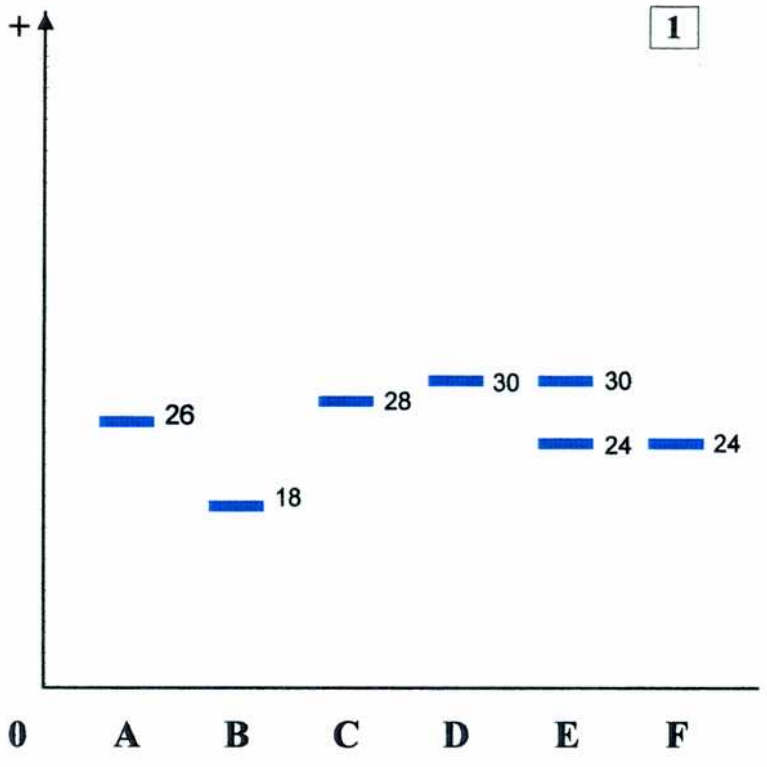
ASPARTATO AMINOTRANSFERASA

La aspartato aminotransferasa, **Figura R-18,** presenta sólo dos electromorfos con una sola banda para la sección ***Saccobolus***. El primero **A** con una banda de Rf 26 perteneciente a ***S. citrinus***, y el segundo **B**, con la banda de Rf 18 que aparece en ***S. longevisporus***, ***S. platensis***, ***S. saccoboloides***, ***S. succineus*** y ***S. truncatus.***

La sección ***Eriobolus*** presenta, un patrón de bandas característico de cada especie. ***S. depauperatus***, presenta el patrón **C** con una banda de Rf 28, ***S. infestans***, el patrón **D** con una banda de Rf 30 y ***S. verrucisporus*** el patrón F con una banda de Rf 24. El patrón **E** presente en ***S. seudodepauperatus*** muestra dos bandas una de Rf 30 común a éste y al electromorfo **D** y otra de Rf 24 compartida con el electromorfo **F**.

ISOCITRATO DEHIDROGENASA

La isocitrato dehidrogenasa, **Figura R-19** presenta cuatro patrones de bandeo, con dos bandas cada uno. En la sección ***Saccobolus***, ***S. citrinus*** presenta el electromorfo **A** con una banda de Rf 22 y otra de Rf 24, el resto de las especies de la sección (***S. longevisporus***, ***S. platensis***, ***S. saccoboloides***, ***S. succineus*** y ***S. truncatus***) presentan un electrormorfo común con bandas de Rf 18 y 19 (electromorfo **B**). En la sección ***Eriobolus***, ***S. seudodepauperatus*** muestra el patrón **D**, con bandas de Rf 27 y 29 y ***S. infestans***, ***S. depauperatus*** y ***S. verrucisporus*** presentan el patrón **C** con dos bandas de Rf 21 y 23.



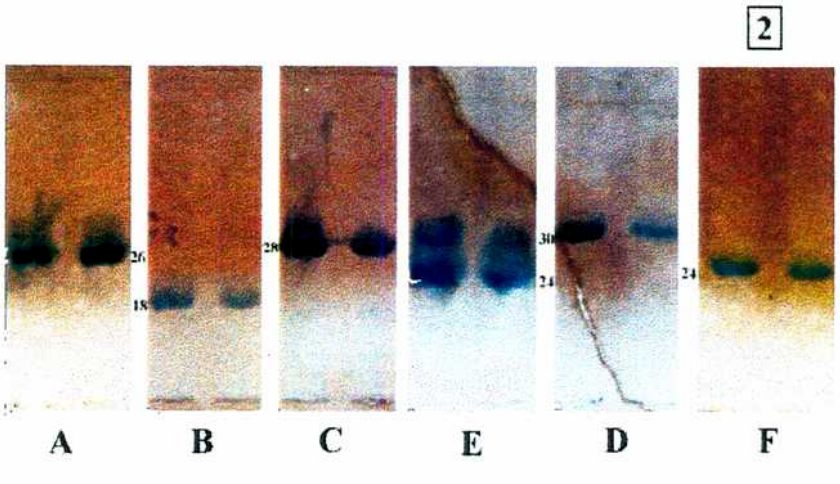


Figura R-18. Diagramas (1) de los electromorfos (A a F) identificados en el sistema enzimático aspartato aminotransferasa AAT. Zimogramas (2) . Los números indican los Rf.

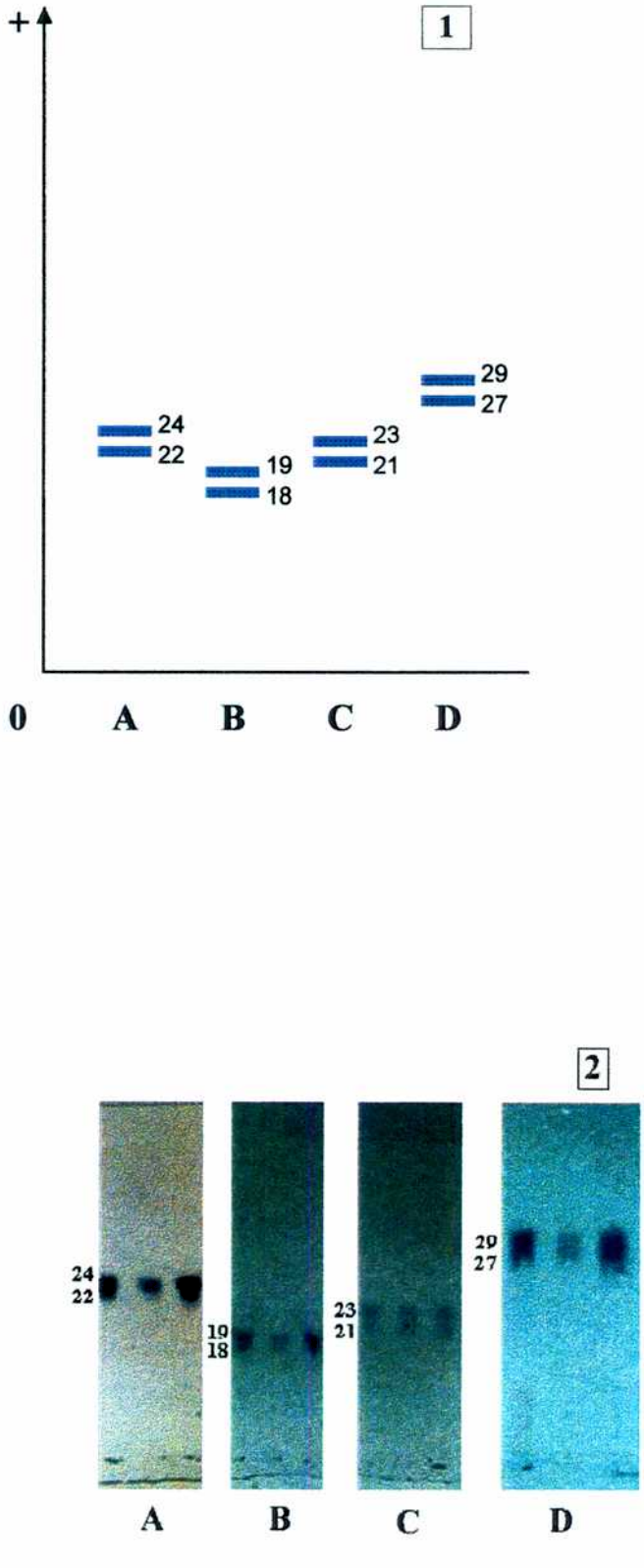


Figura R-19. Diagrama (1) de los electromorfos (A a D) identificados en el sistema enzimático isocitrato dehidrogenasa IDH. Zimograma (2). Los números indican los Rf.

SUPERÓXIDO DISMUTASA

La **Figura R-20** muestra cinco patrones de bandeo para las especies de la sección ***Saccobolus***: ***S. citrinus*** **A**, ***S. longevisporus*** **B**, ***S. platensis*** **C**, ***S. saccoboloides*** y ***S. succineus*** **D** y ***S. truncatus*** **E**, y tres para la sección ***Eriobolus*** (**F** a **H**). El **F** es común a ***S. depauperatus*** y a ***S. verrucisporus*** y el **G** y el **H** corresponden a ***S. infestans*** y ***S. seudodepauperatus.***. Los electromorfos muestran la existencia de algunas bandas comunes: las bandas de Rf 98, 24 y 16 aparecen en todas las especies. (electromorfos **A** a **H**), la banda de Rf 21 aparece en todas excepto en ***S. longevisporus***, la banda de Rf 45 aparece en ***S. longevisporus, S. platensis, S. saccoboloides*** y ***S. succineus*** (electromorfos **B**, **C**, y **D**), la de RF 39 es común a ***S. infestans*** y ***S. seudodepauperatus*** (electromorfos **G** y **H**) y, la de Rf 38 aparece en ***S. platensis, S. truncatus*** y ***S. infestans*** (electromorfos **C**, **E** y **G**).

Electromorfos de los seis sistemas isoenzimáticos presentes en cada cepa.

La **tabla R-2** detalla los electromorfos presentes en cada cepa para cada sistema analizado.

De los seis sistemas isoenzimáticos analizados sólo la glucosa 6-fosfato dehidrogenasa muestra una sola banda para todas las cepas analizadas lo cual concuerda con el hecho de que ***Saccobolus*** es un organismo haploide de un locus por enzima. La presencia de más de una banda para algunas de las especies en el resto de los sistemas analizados, con un máximo de seis para SOD, plantea la posibilidad de duplicación génica o la formación de enzimas secundarias (Harris y Hopkinson, Micales et al., 1992).

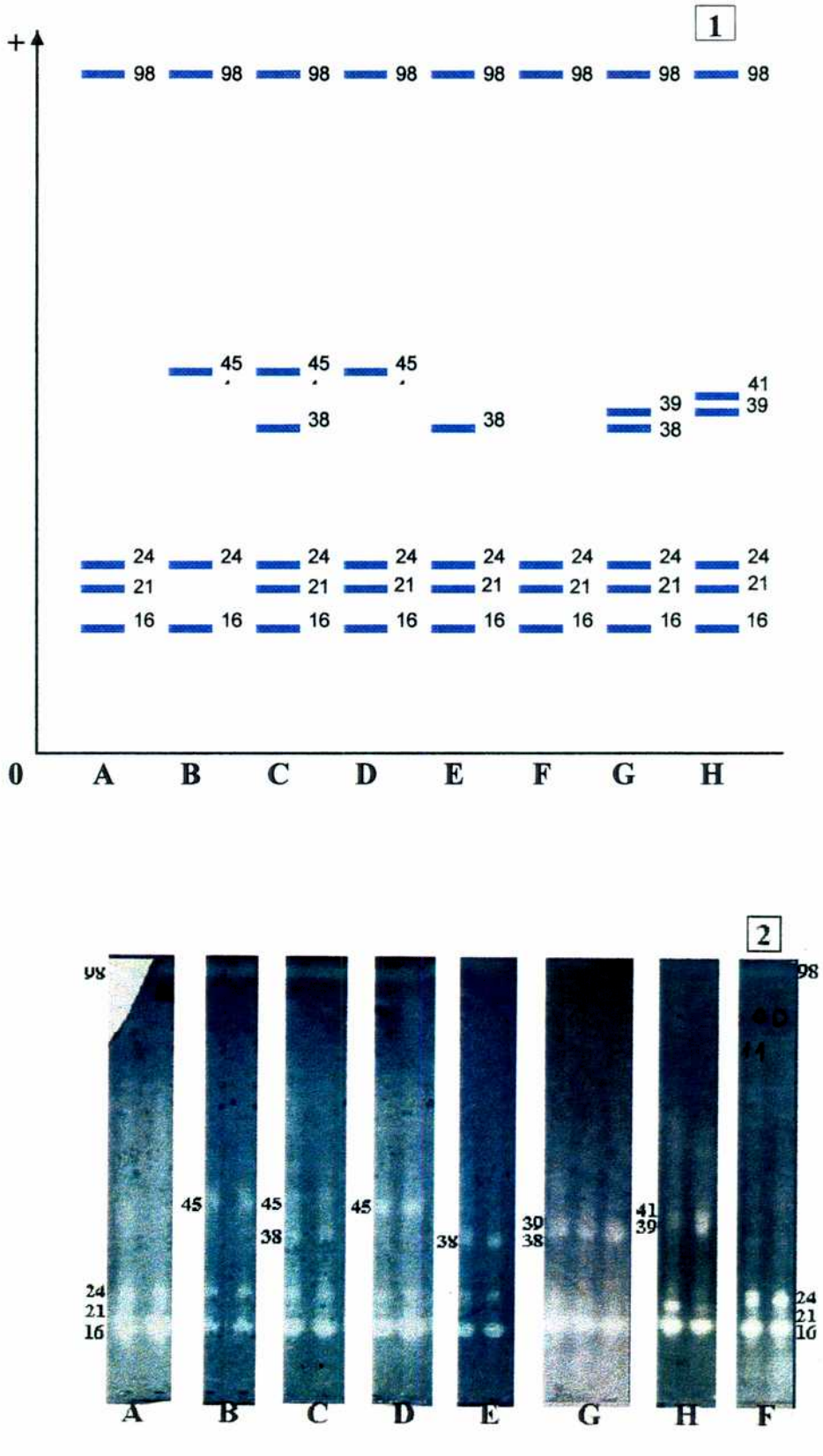


Figura R-20. Diagrama (1) de los electromorfos (A a H) identificados en el sistema enzimático superóxido dismutasa (SOD). Zimograma (2). Los números indican los Rf.

Tabla R-2. Electromorfos de los seis sistemas enzimáticos presentes en cada cepa.

			SISTEMAS ENZIMÁTICOS					
SIGLA	BAFC #	LOCALIDAD	ACP	EST	G6PDH	AAT	IDH	SOD
CitER 1	2838	PER,Arg	A	B	A	A	A	A
CitER 2	2839	PER,Arg	A	B	A	A	A	A
CitER 3	2840	PER,Arg	A	B	A	A	A	A
CitER 4	2841	PER,Arg	A	B	A	A	A	A
CitER 5	2842	PER,Arg	A	B	A	A	A	A
CitII 1	2826	PBA, Arg	A	A	A	A	A	A
CitII 3	2843	PBA, Arg	A	A	A	A	A	A
CitII 5	2844	PBA, Arg	A	A	A	A	A	A
CitFAC 1	2827	BA, Arg	A	B	A	A	A	A
CitFAC 3	2845	BA, Arg	A	B	A	A	A	A
CitFAC 5	2846	BA, Arg	A	B	A	A	A	A
Long 0	2847	PC, Arg	A	C	B	B	B	B
Long 1	2848	PC, Arg	A	C	B	B	B	B
Long 2	2849	PC, Arg	A	C	B	B	B	B
Long 3	2850	PC, Arg	A	C	B	B	B	B
Long 4	2851	PC, Arg	A	C	B	B	B	B
PlatAg 0	2852	BA, Arg	B	D	A	B	B	C
PlatAg 2	2853	BA, Arg	B	D	A	B	B	C
PlatAg 3	2854	BA, Arg	B	D	A	B	B	C
PlatAg 5	2855	BA, Arg	B	D	A	B	B	C
PlatSM 1	2856	PN.Arg	B	D	A	B	B	C
PlatSM 2	2857	PN.Arg	B	D	A	B	B	C
PlatSM 3	2858	PN.Arg	B	D	A	B	B	C
PlatSM 4	2859	PN.Arg	B	D	A	B	B	C
PlatSM 5	2860	PN.Arg	B	D	A	B	B	C
PlatSP 0	2861	PBA, Arg	B	D	A	B	B	C
PlatSP 1	2862	PBA, Arg	B	D	A	B	B	C
PlatSP 2	2863	PBA, Arg	B	D	A	B	B	C
PlatSP 3	2864	PBA, Arg	B	D	A	B	B	C
PlatSP 5	2865	PBA, Arg	B	D	A	B	B	C
SaccBC 2	2596	PRN, Arg	C	E	A	B	B	D
SaccBC 3	2866	PRN, Arg	C	E	A	B	B	D
SaccBC 6	2867	PRN, Arg	C	E	A	B	B	D
SaccBC 7	2868	PRN, Arg	C	E	A	B	B	D
SaccBC 8	2869	PRN, Arg	C	E	A	B	B	D
SaccT 3	2822	PT, Arg	C	E	A	B	B	D
SaccT 4	2870	PT, Arg	C	E	A	B	B	D
SaccT 6	2871	PT, Arg	C	E	A	B	B	D

Tabla R-2. Electromorfos de los seis sistemas enzimáticos presentes en cada cepa.

			SISTEMAS ENZIMÁTICOS					
SIGLA	BAFC #	LOCALIDAD	ACP	EST	G6PDH	AAT	IDH	SOD
Sacc Ez 9	2872	PBA, Arg	C	F	A	B	B	D
Sacc Ez 10	2873	PBA, Arg	C	F	A	B	B	D
Sacc Ez 11	2874	PBA, Arg	C	F	A	B	B	D
Sacc Ez 12	2875	PBA, Arg	C	F	A	B	B	D
Sacc Ez 13	2876	PBA, Arg	C	F	A	B	B	D
SuccSM 0	2877	PN.Arg	B	G	B	B	B	D
SuccSM 4	2878	PN.Arg	B	G	B	B	B	D
SuccSM 5	2879	PN.Arg	B	G	B	B	B	D
SuccSM 6	2880	PN.Arg	B	G	B	B	B	D
SuccSM 8	2881	PN.Arg	B	G	B	B	B	D
SuccV 0	2882	PER ,Arg	B	H	B	B	B	D
SuccV 1	2883	PER ,Arg	B	H	B	B	B	D
SuccV 2	2884	PER ,Arg	B	H	B	B	B	D
SuccV 3	2885	PER ,Arg	B	H	B	B	B	D
SuccV 4	2886	PER ,Arg	B	H	B	B	B	D
TruncBC 2	2595	PRN, Arg	B	I	C	B	B	E
TruncBC 3	2887	PRN, Arg	B	I	C	B	B	E
TruncBC 4	2888	PRN, Arg	B	I	C	B	B	E
TruncBC 5	2889	PRN, Arg	B	I	C	B	B	E
TruncBC 6	2890	PRN, Arg	B	I	C	B	B	E
TruncT 0	2821	PBA, Arg	B	I	C	B	B	E
TruncT 1	2891	PBA, Arg	B	I	C	B	B	E
TruncT 2	2892	PBA, Arg	B	I	C	B	B	E
TruncT 3	2893	PBA, Arg	B	I	C	B	B	E
TruncT 4	2894	PBA, Arg	B	I	C	B	B	E
DepF 1	2895	BA, Arg	B	J	D	C	C	F
DepF 3	2896	BA, Arg	B	J	D	C	C	F
DepF 4	2897	BA, Arg	B	J	D	C	C	F
DepF 4'	2898	BA, Arg	B	J	D	C	C	F
Dep I 1	2833	PBA,Arg.	B	J	D	C	C	F
Dep I 2	2811	PBA,Arg.	B	J	D	C	C	F
Dep I 3	2812	PBA,Arg.	B	J	D	C	C	F
In AD 1	2831	PBA,Arg.	D	K	E	D	C	G
In AD 2	2899	PBA,Arg.	D	K	E	D	C	G
In AD 3	2900	PBA,Arg.	D	K	E	D	C	G
In AD 4	2901	PBA,Arg.	D	K	E	D	C	G
In AD 5	2902	PBA,Arg.	D	K	E	D	C	G
In AD 6	2903	PBA,Arg.	D	K	E	D	C	G

Tabla R-2. Electromorfos de los seis sistemas enzimáticos presentes en cada cepa.

			SISTEMAS ENZIMÁTICOS					
SIGLA	BAFC #	LOCALIDAD	ACP	EST	G6PDH	AAT	IDH	SOD
In AD 7	2904	PBA,Arg.	D	K	E	D	C	G
In AD 8	2905	PBA,Arg.	D	K	E	D	C	G
In AD 10	2908	PBA,Arg.	D	K	E	D	C	G
In PA 13	2832	P. Alegre, Brasil	D	K	E	D	C	G
In PA 14	2909	P. Alegre, Brasil	D	K	E	D	C	G
In PA 15	2910	P. Alegre, Brasil	D	K	E	D	C	G
In PA 16	2911	P. Alegre, Brasil	D	K	E	D	C	G
In PA 17	2912	P. Alegre, Brasil	D	K	E	D	C	G
Seu I 2	2913	PBA, Arg	E	M	E	E	D	H
Seu I 3	2914	PBA, Arg	E	M	E	E	D	H
Seu I 4	2915	PBA, Arg	E	M	E	E	D	H
Seu I 6	2916	PBA, Arg	E	M	E	E	D	H
Seu I 8	2917	PBA, Arg	E	M	E	E	D	H
Seu V 2	2828	PBA, Arg	E	L	E	E	D	H
Seu V 3	2919	PBA, Arg	E	L	E	E	D	H
Seu V 4	2920	PBA, Arg	E	L	E	E	D	H
Seu V 5	2921	PBA, Arg	E	L	E	E	D	H
Seu V 6	2922	PBA, Arg	E	L	E	E	D	H
Seu EZ 1	2829	PBA, Arg	E	L	E	E	D	H
Seu EZ 2	2923	PBA, Arg	E	L	E	E	D	H
Seu EZ 3	2924	PBA, Arg	E	L	E	E	D	H
Seu EZ 4	2925	PBA, Arg	E	L	E	E	D	H
Ver GC 0	2823	PBA, Arg	F	N	E	F	C	F
Ver GC 1	2926	PBA, Arg	F	N	E	F	C	F
Ver GC 2	2927	PBA, Arg	F	N	E	F	C	F
Ver GC 3	2928	PBA, Arg	F	N	E	F	C	F
Ver GC 4	2929	PBA, Arg	F	N	E	F	C	F
Ver GC 5	2930	PBA, Arg	F	N	E	F	C	F
Ver G 1	2931	PER, Arg	F	O	E	F	C	F
Ver G 2	2932	PER, Arg	F	O	E	F	C	F
Ver G 3	2933	PER, Arg	F	O	E	F	C	F
Ver G 4	2934	PER, Arg	F	O	E	F	C	F
Ver G 5	2935	PER, Arg	F	O	E	F	C	F
Ver G 6	2936	PER, Arg	F	O	E	F	C	F
Ver I I 6	2937	PBA, Arg	F	N	E	F	C	F
Ver I I 7	2938	PBA, Arg	F	N	E	F	C	F
Ver I I 8	2939	PBA, Arg	F	N	E	F	C	F

3.4.3 *Técnicas numéricas. Matriz básica de datos.*

Los veinticuatro aislamientos geográficos de las diez especies del género *Saccobolus* consignadas en la **tabla M-1** constituyeron las unidades taxonómicas operativas (OTU).

La **tabla M-6** de materiales y métodos muestra la matriz básica de datos construída a partir del registro del estado de cada uno de los caracteres en cada una de las veinticuatro OTU_S. La matriz resultante fue de 24 OTU_S x 48 caracteres.

3.4.4 *Análisis de agrupamientos*

A partir de la matriz básica de datos se calcularon diferentes coeficientes de similitud: Gower, Sorensen y Jaccard, para cada par posible de OTU_S. Se eligió el coeficiente de Gower ya que el mismo permite el procesamiento de matrices que contengan datos binarios y cuantitativos. La utilización de dicho coeficiente para el análisis de los datos isoenzimáticos permitió la realización del posterior análisis de congruencia taxonómica entre las clasificaciones obtenidas a partir de los dos tipos de caracteres, midiendo la coincidencia entre las matrices obtenidas utilizando la misma técnica clasificatoria debiendo aplicar, por lo tanto, el mismo coeficiente de similitud a ambas matrices. La estructura de los distintos fenogramas obtenidos a partir de la aplicación de los distintos índices no presentó diferencias, encontrándose sólo diferencias a nivel de los coeficientes de similitud. La matriz resultante fue analizada por el método de medias no ponderadas (UPGMA). La distorsión producida durante el análisis de agrupamiento se calculó a partir del coeficiente de correlación cofenética (r). El valor de dicho coeficiente fue de 0,92741 indicando una

escasa distorsión entre la matriz de similitud y el fenograma obtenido, avalando la utilización del coeficiente de Gower para el análisis..

EL fenograma obtenido a partir del análisis de agrupamientos (UPGMA) **Figura R-21** muestra dos grupos principales de especies. Esos dos grupos que corresponden cada uno a las dos secciones en las que se divide el género, están ligados entre sí con un índice de similitud superior al 60%. El grupo que incluye a las especies de la sección ***Eriobolus*** muestra un subgrupo formado por tres especies, ***S. depauperatus, S. infestans*** y ***S. verrucisporus*** y una OTU aislada de las demás representada por ***S. seudodepauperatus.*** El otro grupo, que incluye a las especies de la sección ***Saccobolus***, muestra un núcleo formado por cinco especies: ***S. longevisporus, S. succineus, S. platensis, S. saccoboloides,*** y ***S. truncatus*** y uno aislado del resto formado por las poblaciones de ***S. citrinus***. Dentro del grupo formado por las cinco especies aparecen dos subgrupos: uno constituído por ***S. longevisporus*** y ***S. succineus*** y otro, formado por ***S. platensis, S. saccoboloides,*** y ***S. truncatus***. Dentro del primero, los aislamientos de las poblaciones de ***S. longevisporus*** y ***S. succineus*** están asociados entre sí con un índice del 87%. Los aislamientos de la población de ***S. succineus***, Gualeguaychú, provincia de Entre Ríos (SuccER) y los aislamientos de la población de San Martín de Los Andes, provincia de Neuquén (SuccSM), a pesar de separarse en dos núcleos, muestran entre sí, un elevado índice de similitud.

En el segundo subgrupo, ***S. saccoboloides*** y ***S. platensis*** aparecen estrechamente asociados entre sí con un grado de similitud superior al 93% . Los aislamientos de diferentes poblaciones de ***S. platensis,*** PlatAG, PlatSM y PlatSP conforman un grupo con fenotipos idénticos. Los aislamientos de distintas poblaciones de ***S. saccoboloides*** muestran un núcleo de idéntico índice de similitud constituído por los aislamientos de la población de Bahía

Craft, provincia de Rio Negro (SaccBC) y los de la población de Tafí del Valle, provincia de Tucumán (SaccT), éste núcleo se asocia a las cepas de la población de ***S. saccoboloides*** Ezeiza, provincia de Buenos Aires (SaccEZ) con un índice de similitud superior al 97 %, lo que refleja mínimas diferencias entre las cepas de ésta y las de las otras dos poblaciones de la misma especie. El grupo formado por los aislamientos de las poblaciones de ***S. platensis*** y ***S. saccoboloides*** se liga al núcleo constituído por los aislamientos de las poblaciones de ***S. truncatus***, TruncBC y TruncT, que poseen un fenotipo idéntico entre sí, con una similitud del 87%.

Los dos subgrupos, el primero formado por ***S. longevisporus*** y ***S. succineus*** y el segundo constituído por ***S. platensis, S. saccoboloides,*** y ***S. truncatus,*** se asocian entre sí con un índice del 82 %.

Las cepas de las tres poblaciones de ***S. citrinus***, que constituyen un núcleo aislado del resto, presentan leves diferencias fenotípicas entre sí separándose en un grupo representado por los aislamientos de la población de Gualeguaychú, provincia de Entre Ríos (CitER) y por los aislamientos de la población de Nuñez, Capital Federal (CitFAC) que poseen idéntico índice de similitud. Este grupo se asocia a los aislamientos de la población de Campana, provincia de Buenos Aires (CitII), con un índice del 97%. El núcleo formado por cepas de las poblaciones de ***S. citrinus*** se asocia al grupo representado por las otras cinco especies con un grado de similitud de alrededor del 70%. Los pares de especies con mayor similitud fueron, ***S. saccoboloides*** y ***S.platensis***.

En la sección ***Eriobolus*** se reconoce un núcleo aislado del resto constituído por los aislamientos de las poblaciones de ***S. seudodepauperatus*** y un conjunto formado por tres especies, ***S. depauperatus, S. infestans y S. verrucisporus***. Las cepas de las poblaciones de ***S. depauperatus*** y ***S. verrucisporus*** aparecen ligadas entre sí con un índice de similitud mayor al

77%. Los aislamientos de las dos poblaciones de ***S. depauperatus***, depF (Nuñez, Buenos Aires) y depII (Campana, provincia de Buenos Aires) presentan fenotípos idénticos. Las cepas de las poblaciones de ***S. verrucisporus*** VerGC y VerII, pertenecientes a las localidades de Gobernador Castro y de Campana, provincia de Buenos Aires, forman un grupo de igual índice de similitud. Este se asocia a las cepas de la población de Gualeguaychú, provincia de Entre Ríos (VerG) con un índice de similitud mayor al 97%. Los aislamientos de las dos poblaciones de ***S. infestans***, InAD (Adrogué, provincia de Buenos Aires) e InPA (Porto Alegre, Brasil) que constituyen un núcleo de idéntico índice de similitud se asocian al grupo formado por aislamientos de ***S. depauperatus*** y ***S. verrucisporus*** con un índice superior al 75%. Los aislamientos de las poblaciones de ***S. seudodepauperatus*** forman un núcleo constituído por las cepas de las tres poblaciones. Las cepas de las poblaciones de Campana, provincia de Buenos Aires (SeuIV) y los aislamientos de Ezeiza, provincia de Buenos Aires (SeuEZ) que tienen un fenotipo idéntico están ligadas a los aislamientos de la otra población de Campana, provincia de Buenos Aires (SeuII) con un índice de similitud del 98%. El grupo formado por los aislamientos de ***S. seudodepauperatus*** se asocia al núcleo formado por ***S. depauperatus***, ***S. verrucisporus*** y ***S. infestans*** con un índice de similitud cercano al 65%, valor similar al de asociación entre las dos secciones que fue de alrededor del 60 %.

Las leves diferencias en cuanto a los índices de similitud que aparecen entre las cepas pertenecientes a distintas poblaciones de la misma especie se deben a las diferencias de algunas bandas entre aislamientos geográficos que sólo aparecen para esterasas. El resto de las enzimas no mostraron diferencias entre los aislamientos geográficos.

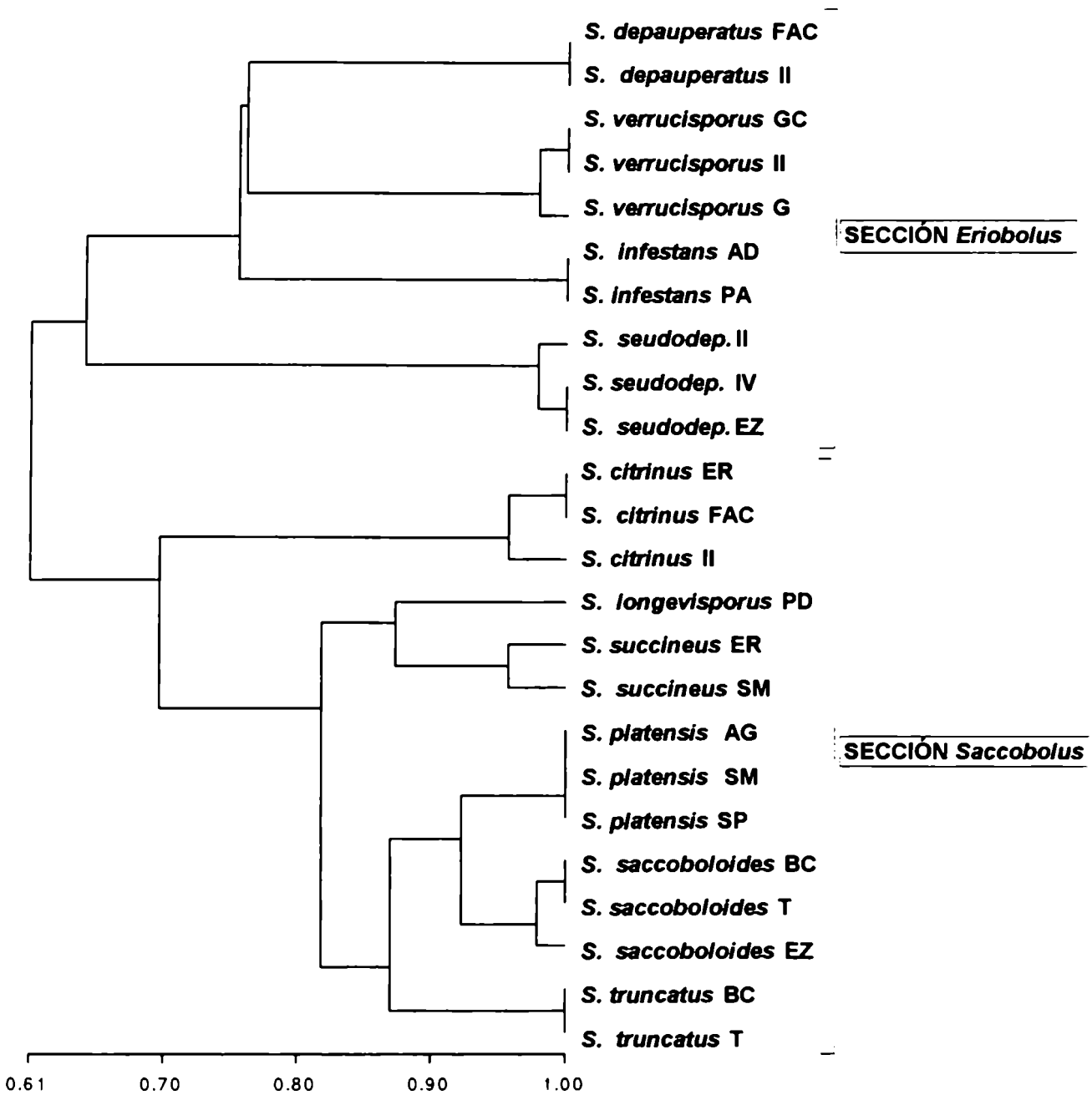


Figura R-21. Fenograma obtenido a partir de los datos isoenzimáticos. Análisis de agrupamientos realizado por el método de medias no ponderadas (UPGMA).

3.5 *Análisis de congruencia*

Se realizó el correspondiente análisis de congruencia taxonómica entre las clasificaciones, basadas en las dos fuentes de caracteres uno referido a los sistemas isoenzimáticos micelianos, y el otro al comportamiento fisiológico referido a crecimiento en distintos medios de cultivo, producción de una enzima celulolítica extracelular inducible y los patrones isoenzimáticos de la misma. La coincidencia entre las matrices de similitud se calculó a partir del coeficiente de correlación (r). El coeficiente obtenido fue de 0,95015 indicando muy buena correlación entre los fenogramas de la **figura R-14** y de la **figura R-21.**

3.6 *Analisis de caracteres isoenzimáticos y fisiológicos*

Con el fin de realizar el correspondiente análisis, basado en todas las fuentes de caracteres, se construyó la matriz básica de datos referidos a los sistemas isoenzimáticos micelianos, al comportamiento fisiológico en distintos medios de cultivo, a la producción de una enzima celulolítica extracelular inducible y patrones isoenzimáticos de la misma. La matriz resultante **tabla M-7** fue de 18 OTU_S x 86 caracteres. Se calculó el coeficiente de similitud de Gower, para cada par posible de OTU_S. La matriz resultante fue analizada por el método de medias no ponderadas (UPGMA). La distorsión producida durante el análisis de agrupamiento se calculó a partir del coeficiente de correlación cofenética (r), que fue de 0,94666.

EL fenograma obtenido a partir del análisis de agrupamientos (UPGMA) **figura R-22**, muestra un patrón similar, para las especies de la sección ***Saccobolus***, al obtenido a partir de los datos isoenzimáticos micelianos **figura**

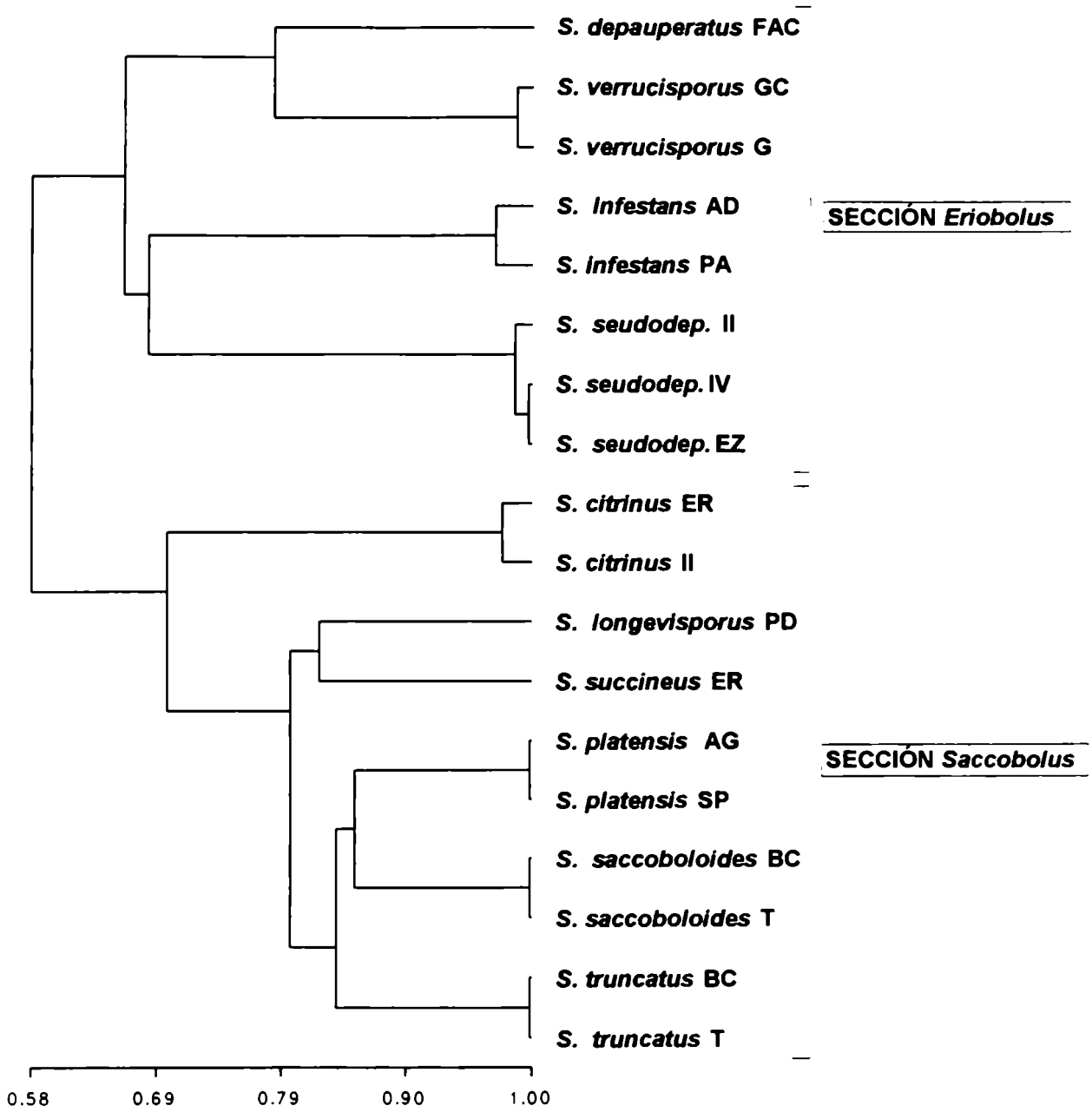


Figura R-22. Fenograma obtenido a partir de los datos fisiológicos e isoenzimáticos. Análisis de agrupamientos realizado por el método de medias no ponderadas (UPGMA).

R-21, aunque difiere en los valores de similitud. Para las especies de la sección ***Eriobolus*** el patrón es similar al del fenograma de la **figura R-14.**

Se calculó la correlación entre el fenograma de la **figura R-14 ;** y el de la **figura R-22,** que fue de r 0,98571 y entre el fenograma de la **figura R-21**y el de la **figura R-22,** que fue de r 0,98152.

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

La utilización de las técnicas isoenzimáticas en este trabajo permitió determinar con absoluta certeza la existencia de las especies del género como entidades totalmente identificables. Las mismas mostraron patrones de bandas característicos para la mayoría de los sistemas isoenzimáticos analizados. La utilización de parámetros fisiológicos para el análisis agregó nuevos caracteres para la identificación detectando diferencias en los valores de dichos parámetros a nivel de especie.

La observación de coincidencias en caracteres morfológicos, microscópicos, citológicos y de desarrollo, en el estudio de numerosos aislamientos y cultivos provenientes de ascosporas de diferentes especies del género ***Saccobolus***, planteaba dudas acerca de la delimitación clara de las mismas. Muchos de los parámetros morfológicos utilizados para la clasificación, mostraban superposiciones parciales de los rangos establecidos, que hacían dificultosa la determinación de las especies, sobre todo en la sección ***Saccobolus***. Por otra parte caracteres tales como la morfología de los apotecios y su distribución sobre el sustrato, variaban notablemente dependiendo de las condiciones de cultivo y del medio de cultivo utilizado, lo que también se observaba en las poblaciones naturales.

La observación con MEB (Microscopio Electrónico de Barrido) de las ascosporas, su disposición en el paquete y la ornamentación del exosporio, si bien ratificó lo observado con microscopía óptica, no aportó mayor definición al problema.

Los resultados del análisis isoenzimático (fenograma isoenzimático) en las diez especies del género mostraron dos grupos principales de especies que corresponden cada uno a las dos secciones en las que se divide el género. La Sección ***Saccobolus*** a la que pertenecen seis de ellas (***S. citrinus, S.***

longevisporus, S. platensis, S. saccoboloides, S. succineus y *S. truncatus)* y la sección *Eriobolus* constituída por *S. depauperatus, S. infestans, S. seudodepauperatus* y *S. verrucisporus*.

El fenograma obtenido a partir del análisis de los datos fisiológicos y patrones de endo β-D-1,4 glucanasa mostró también, dos grupos de especies, que corresponden cada uno a las dos secciones, pero los agrupamientos dentro de cada sección fueron diferentes a los observados en el fenograma derivado de los datos enzimáticos.

El fenograma obtenido a partir del análisis realizado con todas las fuentes de caracteres, tanto isoenzimáticos como fisiológicos (**figura R-22**), mostró para las especies de la sección *Saccobolus*, un patrón casi idéntico al obtenido a partir de los datos isoenzimático (**figura R-21**), aunque difirió en los índices de similitud entre especies. Para las especies de la sección *Eriobolus*, en cambio, el patrón de dicho fenograma es igual al de la **figura R-14** obtenido a partir de los datos fisiológicos y patrones de endo β-D-1,4 glucanasa.

Cuando se compararon los resultados obtenidos, con estudios morfológicos y fisiológicos previos, se observó que los pares de especies con mayores valores de índices de similitud generalmente presentaron mayor similitud en los caracteres morfológicos y algunas características fisiológicas. Concomitantemente, aquellas especies que mostraron menores índices de similitud reflejaron mayores diferencias morfológicas y fisiológicas.

S. saccoboloides y *S. platensis* que mostraron el índice de similitud más alto, se presentaron también como especies estrechamente ligadas entre sí, cuando se analizaron los caracteres morfológicos y de cultivo (Ranalli y Mercuri, op. cit.). *S. saccoboloides* descripto por Dodge y Seaver (1946) fue incluído en el género *Ascobolus*, debido a que generalmente, al alcanzar la madurez, las ascosporas permanecen casi libres entre sí dentro del asco o formando un paquete muy laxo. Sin embargo el epíteto específico aludió a su

semejanza con ***Saccobolus,*** a donde finalmente fue transferido. Evidentemente el caracter de ascosporas libres, por sí solo, no es suficiente para separar ambos géneros. El análisis isoenzimático corroboró sin lugar a dudas su inclusión dentro del género ***Saccobolus*** y su estrecha relación con ***S. platensis***.

S. citrinus, especie que aparece en los fenogramas claramente diferenciada del núcleo o grupo que incluye al resto de las especies de la sección ***Saccobolus***, presentó un comportamiento fisiológico y de cultivo netamente diferenciado del resto, aunque éstas diferencias no se expresan en su morfología.

S. truncatus y ***S. platensis***, que aparecen claramente diferenciadas como dos especies en los fenogramas, mostraban dudas acerca de su clara delimitación desde el punto de vista morfológico. Estas dos especies se separan entre sí, fundamentalmente por el tamaño del paquete de ascosporas. En ***S. truncatus***, al madurar las ascosporas, el paquete se comprime resultando acortado con respecto al paquete de ***S. platensis***. Esto no ocurre en todos los casos, de modo que, en la población se encuentran paquetes de distintos tamaños, planteando la duda sobre la posibilidad de diferenciarlas como dos especies. La imposibilidad de realizar cruzamientos no permitió dilucidar la cuestión. El análisis isoenzimático mostró a ***S. truncatus*** y ***S. platensis*** como dos especies.

S. infestans, caracterizada tipicamente por la disposición de las ascosporas en el paquete, fue ubicada tentativamente por van Brummelen (op. cit:) en la sección ***Eriobolus***, a pesar de presentar paráfisis pigmentadas, en contraposición con el resto de las especies de dicha sección. El análisis isoenzimático nos permitió constatar lo acertado de su ubicación y su cercana relación con ***S. depauperatus*** y ***S. verrucisporus***.

En general existe un alto grado de asociación entre las especies cuando se analizan los fenogramas. Esto concuerda con el continuo que se observa

cuando se analizan los caracteres morfológicos de las distintas especies, debido a la superposición encontrada en algunos de los caracteres utilizados para la clasificación.

La existencia de patrones de bandas comunes a dos o más especies para algunos de los sistemas isoenzimáticos analizados, coinciden con la alta superposición de los parámetros morfológicos observados.

La escasa a nula variabilidad isoenzimática intraespecífica de las especies del género ***Saccobolus***, podría reflejar una real homogeneidad genética dentro de las mismas. Numerosos autores refieren baja variabilidad isoenzimática, relacionada con poca variabilidad intraespecífica: Oudemans y Coffey (op. cit.) en especies de ***Phytophthora,*** Harrington et al. (op. cit.) en especies del complejo ***Ceratocystis coerulescens***, Vágvolgyi et al. (1996) en ***Mucor piriformis***.

Tampoco se observaron diferencias entre las cepas monospóricas de las especies del género ***Saccobolus***, en las otras características fisiológicas testeadas (crecimiento y producción enzimática), lo cual avalaría la existencia de homogeneidad genética.

Vágvolgyi et al. (op. cit.), coincidentemente, observaron que en ***Mucor piriformis*** especie que mostraba baja variabilidad isoenzimático no se registraba variabilidad intraespecífica para otras características fenotípicas (crecimiento y morfología) y fisiológicas (patogenicidad).

Otros autores que realizaron trabajos en el género ***Saccobolus,*** observaron también escasa a nula variabilidad intraespecífica con respecto a otras características fenotípicas (morfológicas y de cultivo) (Ranalli y Mercuri, op. cit.).

Esta baja variabilidad observada dentro de las especies del género ***Saccobolus***, podría estar relacionado con su tipo de reproducción sexual.

Todas las especies del género estudiadas son homotálicas, es decir son capaces de cumplir su ciclo biológico a partir de una cepa monospórica.

Se ha propuesto que el nivel de variabilidad concuerda o está en relación directa con el grado de reproducción sexual en la población. En poblaciones de ***Phakopsora pachyrhizi*** (Bonde et al., 1988) y ***Puccinia striiformis*** (Newton et al., op. cit.), patógenos que no se reproducen sexualmente, se registraron bajos niveles de diversidad enzimática. Anteriormente, Burdon et al. (op. cit.), determinaron que no había variabilidad genética entre las colecciones de ***Puccinia graminis*** f. sp. ***tritici*** de Australia cuando eran mantenidas asexualmente.

Harrington et al. (op. cit.), en ***Ceratocystis*** correlacionó la variabilidad enzimática con el tipo de reproducción, observando una baja a nula variabilidad isoenzimática en las especies homotálicas y en una de las especies que sólo se reproducía asexualmente y mayor variabilidad en las especies heterotálicas.

Newton (1987), por otro lado, correlaciona el nivel de variabilidad isoenzimática en las especies con su especialización fisiológica. Especies de parásitos obligados, sometidos a sustratos y condiciones ambientales bastante uniformes muestran en general niveles bajos de variabilidad isoenzimática, mientras que especies que se encuentran sometidas a condiciones ambientales y de sustratos variables presentan elevado grado de variabilidad isoenzimática.

Vágvolgyi (op. cit.) en ***Mucor piriformis***, especie que crece como parásito y saprofíticamente en el suelo, en parte de su ciclo de vida, sobreviviendo a expensas de frutos caídos como remanentes de la infección, observó bajo nivel de variabilidad isoenzimática. Se plantea que el ambiente homogéneo durante todo el ciclo de vida aún en condiciones de

saprofitismo, juega un papel importante en el mantenimiento del bajo nivel de variabilidad isoenzimática.

Habría una importante influencia de la heterogeneidad ambiental sobre el grado de variabilidad isoenzimática. En el ambiente heterogéneo, la estrategia evolutiva óptima para las enzimas regulatorias sería tener formas alternativas de la enzima, más que una sola forma con alta capacidad (Johnson, op. cit.).

Las especies del género ***Saccobolus***, como muchas de las especies coprófilas, son homotálicas (non-out crossing, término utilizado por Rayner, 1990), como adaptación al sustrato isla que determina su aislamiento reproductivo, dificultandose, en el caso de los individuos heterotálicos (out-crossing, Rayner, op. cit.), la unión con el micelio compatible (Wicklow, 1981). El mantenimiento de la forma de reproducción sexual permite la dispersión de las esporas a través del mecanismo de descarga de las mismas. La principal fuente de variación en la forma homotálica (non out crossing) de un organismo haplonte es la mutación lo cual explica la escasa variación observada, dentro de cada especie en el género. De este modo, mientras que, el tipo homotálico (non out-crossing) produce descendencia clonal, el heterotálico (out-crossing), via recombinación, produce descendencia variable (Rayner, op. cit.). La población homotálica es equivalente a un clon. El proceso de cambio, será entonces más lento ya que las variaciones entre los individuos de las poblaciones y, entre las poblaciones mismas, se deberán principalmente a una fuente de variación. La mutación y la selección podrán, sin embargo, conducir a la divergencia genética y a aumentar los niveles de variabilidad en la población homotálica (non out-crossing). Si hay ausencia de variación genética esto puede indicar que ha pasado tiempo insuficiente para permitir tal variación.

Los hongos coprófilos, y en particular las especies del género ***Saccobolus***, están sometidas a condiciones ambientales y un sustrato (estiércol) bastante homogéneos, ya que las condiciones de humedad y temperatura existentes y la composición del mismo suelen ser relativamente constantes, creando verdaderos microambientes. Se plantea la posibilidad de que la forma non-outcrossing, pueda estar asociada con una reducida heterogeneidad espacial (ambiente homogéneo) aunque ésta significación ecológica no es clara (Rayner, op. cit.).

Si la forma homotálica derivó de la heterotálica, por aparición de cambios al azar, esa forma fue seleccionada por un ambiente relativamente homogéneo y por el sustrato isla, donde esa forma se vió favorecida.

En el género ***Saccobolus*** la escasa a nula variabilidad intraespecífica existente, debido probablemente a su tipo de reproducción, permitió resaltar las diferencias interespecíficas y separar, claramente las especies entre sí. La baja variabilidad intraespecífica observada tanto en los sistemas enzimáticos como en las otras variables analizadas, permitió el uso de los mismos para determinar la variabilidad interespecífica que muchas veces es oscurecida por la excesiva variación dentro de cada especie. Numerosos estudios avalan el uso de los sistemas isoenzimáticos que presentan baja a nula variabilidad dentro de la especie, para determinar las diferencias interespecíficas (Oudemans y Coffey, op. cit.; May y Royse, op.cit.; Huss et al., 1996).

En un estudio donde se desee determinar la variabilidad intraespecífica en el género, será necesario, debido a la alta homogeneidad dentro de las especies, el análisis de un alto número de sistemas isoenzimáticos. Sin embargo es frecuente, que aún usando un elevado número de sistemas, estos no sean capaces de resolver esta cuestión en organismos muy homogéneos, ya que el análisis isoenzimático sólo detecta diferencias significativas en la estructura de las enzimas. No todas las mutaciones producen cambios en la

composición de aminoácidos, porque muchos aminoácidos son codificados por más de un codón, y, además, no todas las sustituciones de aminoácidos producen cambios en la actividad o en la carga. La electroforesis de isoenzimas sólo detecta alrededor de un 30% de todas las sustituciones aminoacídicas, por lo tanto la variación detectada por éste método subestima el nivel real de variación (Nei y Chakraborty, 1973).

Se plantea la necesidad de utilizar otros métodos o técnicas moleculares como RAPD (Ramdom amplified polymorphic DNA) y RFLP (Restriction fragment lenght polymorphism), que detectan muy pequeños cambios en el genoma de un organismo, ya que reflejan directamente la variabilidad genética del mismo, aportando información sobre las diferencias genotípicas entre los aislamientos de cada especie del género.

La existencia de patrones de bandas múltiples para algunos de los sistemas testeados, cuando por tratarse de un organismo haploide se esperaría la producción de bandas simples debido a la expresión de alelos simples, plantea la posibilidad de que las bandas adicionales sean enzimas secundarias, producto de procesos post-transduccionales o bien, deberse a la expresión de alelos de diferentes locus (Harris y Hopkinson, op. cit.; Micales et al., op. cit.).

El análisis de los patrones isoenzimáticos provee una invalorable información sobre las diferencias y similitudes entre las especies del género indicando que las diez especies estudiadas constituyen unidades taxonómicas independientes, avalando lo establecido, para alguna de ellas, a partir del análisis de los patrones morfológicos, y fisiológicos previamente estudiados, (Van Brummelen, op. cit., Ranalli y Gamundi, op. cit.; Ranalli y Forchiassin, op. cit.; Mouso y Ranalli, op. cit.; Ranalli y Gonzalez Castelain, op. cit.; Ranalli et al., op. cit.; Ranalli y Mercuri, op. cit.).

El análisis de congruencia taxonómica entre las clasificaciones, basadas en las distintas fuentes de caracteres: datos referidos a los sistemas isoenzimáticos

micelianos, y al comportamiento fisiológico en distintos medios de cultivo; producción de una enzima celulolítica extracelular inducible y patrones isoenzimáticos de la misma, muestra una buena coincidencia entre las matrices de similitud (análisis de congruencia).

La congruencia taxonómica expresa el grado de correspondencia entre distintas clasificaciones del mismo conjunto de organismos. Dos clasificaciones son completamente congruentes si muestran los mismos agrupamientos (Crisci y López Armengol, 1983).

Al comparar los resultados obtenidos con otros previos de un análisis morfológico dentro del género tampoco se observa una total congruencia. Es importante para este análisis, distinguir entre la fase somática y la fase reproductiva del ciclo de vida. Si se trabaja con isoenzimas como expresión de la fase somática y se comparan con las características morfológicas observadas (que son la suma de la expresión de numerosos genes durante esa fase reproductiva) se está comparando indirectamente dos fases que están sometidas a distintas presiones de selección, por lo tanto los resultados pueden o no ser los mismos. Por su verdadera naturaleza, esas fases ocupan distintos microambientes, tienen funciones contrastantes, y son seleccionadas independientemente por la selección natural. Esto aumenta la relativa importancia taxonómica de esas fases. Sin embargo, la forma y la función de la fase reproductiva no son independientes de las propiedades de la fase miceliana. La estructura y aún la existencia misma de las estructuras reproductivas son dependientes de los aportes del micelio. Además, como esas estructuras son derivadas de componentes hifales, los patrones generadores de procesos involucrados en su formación están inevitablemente sujetas a la organización miceliana . Finalmente, algunos atributos somáticos dependen de los procesos reproductivos, en particular si la forma de reproducción es clonal

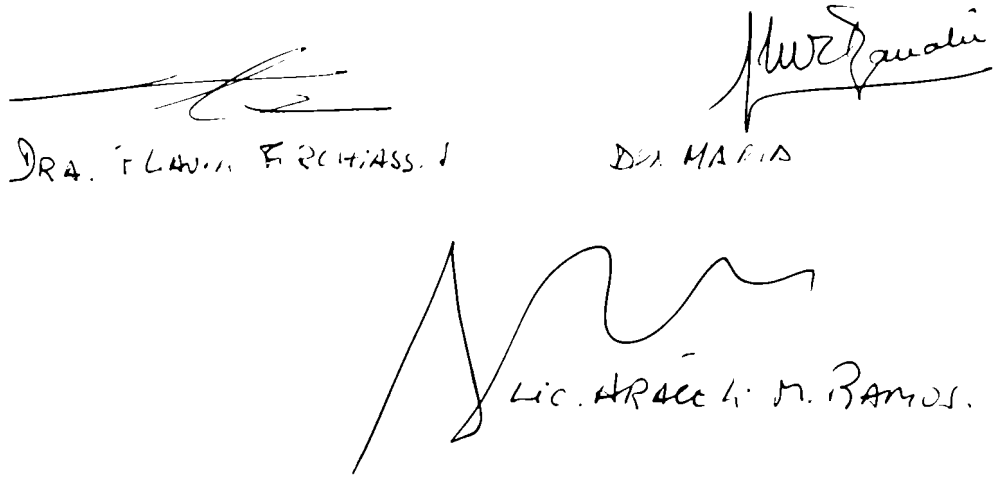
o recombinatoria. Las interrelaciones entre forma miceliana, forma reproductiva y función son entonces elementos claves de la sistemática.

Como con las plantas vasculares, las características de la fase reproductiva son usualmente utilizadas con más valor en la taxonomía de los Ascomycetes, debido a que esa fase exhibe (aparentemente) gran diversidad en forma pero menor plasticidad fenotípica que la fase somática.

Sokal y Sneath (1963) formularon la hipótesis de la no especificidad de los caracteres, conforme lo cual, no existen distintas clases de genes que afecten exclusivamente a una clase de caracteres o que afecten a regiones especiales del organismo. Un fenotipo no puede ser dividido en clases de genes, de tal manera que cada una de estas influya exclusivamente en una sola clase de caracteres fenotípicos. No cabría entonces esperar que un conjunto de genes controle caracteres morfológicos y otro conjunto de genes, independientemente del anterior, controle caracteres químicos. Está hipótesis se basa en la idea de que cada carácter es en realidad, el producto final de muchos genes.

Si así fuera debería haber congruencia total entre las clasificaciones obtenidas a partir de diferentes tipos de caracteres. Sin embargo el hecho es que no se obtienen nunca congruencias perfectas aunque se utilicen muchísimos caracteres. Crisci y López Armengol,(op. cit.) plantean que esto puede deberse tanto a causas biológicas como metodológicas. Los fenómenos interactuantes que encontramos entre las primeras serían: la diferente actividad de los genes en diferentes células de un mismo organismo; la plasticidad fenotípica o expresión diferencial de un genotipo en diferentes ambientes; las mutaciones somáticas que determinan que dentro de un orgamismo existan genotipos ligeramente distintos; las diferentes presiones de selección (en intensidad, dirección y naturaleza) que actúan sobre diferentes partes o estadíos de un mismo orgamismo; la evolución en mosaico, ya que la velocidad

de evolución de los distintos caracteres puede ser distinta, (Mayr, 1968). Las causas metodológicas incluyen aquellos pasos técnicos que pueden producir distorsiones como la cantidad y la calidad de los caracteres; la codificación; el tipo de evaluación de la congruencia. Un enfoque evolucionista o fenético está siempre sometido a incongruencia debido a los fenómenos biológicos anteriormente expuestos. Por lo tanto el análisis de nuevos caracteres producirá, generalmente, cambios en los resultados. Crisci y López Armengol, (op. cit.) recomiendan por lo tanto los estudios biosistemáticos que analizan al organismo a lo largo de todo su ciclo vital y consideran todos sus aspectos.



BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFIA

ABBOT, L. K. & HOLLAND, A. A. 1975. Electrophoretic patterns of soluble proteins and isozymes of ***Gaeumannomyces graminis***. Aust. J. Bot. 23:1-12.

ALFENAS, A. C.; JENG, R. & HUBBES, M. 1984. Isoenzyme and protein patterns of isolates of ***Cryphonectria cubensis*** differing in virulence. Can. J. Bot. 62: 1756-1762.

ANDREWS, A. T. 1986. Electrophoresis. Theory, techniques and biochemical and clinical applications. En: Peacocke AR, Harrington WF (Eds.). Monographs on Physical Biochemistry Clarendon Press, Oxford. 452 pp.

ANGEL, K. 1977. Structure, composition and development of coprophilous fungal communities in three grassland ecosystems. Ph. D. Thesis, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pa.

ANGEL, K. & WICKLOW, D. T. 1975. Relationships between coprophilous fungi and fecal substrates in a Colorado grassland. Mycologia 67: 63-74.

BACKHOUSE, D.; WILLETTS, H. J. & ADAM, P. 1984. Electrophoretic studies of ***Botrytis*** species. Trans.Br. Mycol. Soc. 82: 625-630.

BAPTIST, J. N. & KURTZMAN, C. P. 1976. Comparative enzyme patterns in ***Cryptococcus laurentii*** and its taxonomic varieties. Mycologia 68: 1195-1203.

BECKMAN, L. & JOHNSON, F. M. 1964. Esterase variations in ***Drosophila melanogaster***. Hereditas 51: 212.

BEGUIN, P. 1983. Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using Congo Red-Stained agar replicas. Anal. Biochem. 131: 333-336.

BENT, K. J. 1967. Electrophoresis of proteins of 3 ***Penicilium*** species on acrylamide gels. J. Gen. Microbiol. 49: 195-200.

BIELENIN, A.; JEFFERS, S. N.; WILCOX, W. F. & JONES, A. L. 1988. Separation by protein electrophoresis of six species of ***Phytophthora*** associated with deciduous fruit crops. Phytopathology 78: 1402-1408.

BISTIS, G. N. & RAPER, J.R. 1963. Heterothallism and sexuality in ***Ascobolus stercorarius***. Am. J. Bot. 50: 880-891.

BLAHA, G.; HALL, G.; WAROKKA, J. S.; CONCIBIDO, E. & ORTIZ GARCÍA, C. 1994. ***Phytophthora*** isolates from coconut plantations in Indonesia and Ivory Coast: characterization and identification by morphology and isozyme analysis. Mycol. Res. 98: 1379-1389.

BOISSELIER-DUBAYLE, M. C. 1983. Taxonomic significance of enzyme polimorphism among isolates of ***Pleurotus*** (Basidiomycetes) from umbellifers. Trans. Br. Mycol. Soc. 81:121-127.

BONDE, M. R.; PETERSON, G. L. & DOWLER, W. M. 1988. A comparison of isozymes of ***Phakopsora pachyrhizi*** from the eastern hemisphere and the new world. Phytopathology 78:1491-1494.

BONNER, R. D. & FERGUS, C. N. 1959. The fungus flora of cattle feeds. Mycologia 51: 855-863.

BOSLAND, P. & WILLIAMS, P. H. 1987. An evaluation of ***Fusarium oxysporum*** from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. Can. J. Bot. 65: 2067-2063.

BOUDIER, E. 1869. Mémoire sur les Ascobolés. Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. 10: 191-268

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 722: 248-254.

BREWER, G. R. & SING, S. H. 1970. An introduction to isozyme technique. Academic Press. New York, USA. 186 pp.

BRUMMELEN, J. VAN 1967. A world monograph of the genera ***Ascobolus*** and ***Saccobolus*** (Ascomycetes, Pezizales). Persoonia suppl 1.

BURDON, J. J. & MARSHALL, D. R. 1981. Isozyme variation between species and formae speciales of the genus ***Puccinia***. Can. J. Bot. 59: 2628-2634.

BURDON, J. J.; LUIG, N. H. & MARSHALL, D. R. 1983. Isozyme uniformity and virulence in ***Puccinia graminis*** f. sp. tritici and ***P. recondita*** f. sp. tritici in Australia. Aust. J. Biol. Sci. 36: 403-410.

BUTH, D. G. 1984. The application of electrophoretic data in systematic studies. Ann. Rev. Ecol. Systemat. 15: 501-522.

CANEVASCINI, G.; FRACHEBOUD, D. & MEIER, H. 1983. Fractionation and identification of cellulases and other extracellular enzymes produced by ***Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile*** during growth on cellulose or cellobiose. Can. J. Microbiol. 29: 1071-1080.

CARDER, J. H. 1989. Distinctions between celullase isoenzyme patterns of five plant-pathogenic ***Verticillium*** species. Mycol. Res. 92: 297-301.

CARROL, G. C. 1967. The ultrastructure of ascospore delimitation in ***Saccobolus kerverni***. J. Cell Biol. 33: 218-224.

CHA, J.Y. & IGARASHI., T. 1995. ***Armillaria*** species associated with ***Gastrodia elata*** in Japan. Eur. J. For. Pathol. 25: 319-326.

CHANG, L. O.; SRB, A. M. & STEWARD, F. C. 1962. Electrophoretic separations of the soluble proteins of ***Neurospora***. Nature 193: 756-759.

CHANG, Y. S. & MILLS, A. K. 1992. Re-examination of ***Psilocybe subaeruginosa*** and related species with comparative morphology, isozymes and mating compatibility studies. Mycol. Res. 96: 429-441.

CHRAMBACH, A. & RODBARD, D. 1971. Polyacrylamide gel electrophoresis . Science 172: 440-451.

CLARE, B. G. 1963. Starch gel electrophoresis of proteins from species ***Phytophthora***. Nature 200: 803-804.

COUGHLAN, M. P. 1988. Staining techniques for the detection of the individual components of cellulolytic enzyme systems. Meth. Enzymol. 160: 135-144.

CRISCI, J. V. & LOPEZ ARMENGOL, M. F. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Secretaría Gral. de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D. C. Monog. 26, 132 .pp.

CRUICKSHANK, R. H. & PITT, J. I. 1987. Identification of species in ***Penicillium*** subgenus ***Penicillium*** by enzyme electrophoresis. Mycologia 79: 614-620.

DEACON, J. W. 1985. Decomposition of filter paper cellulose by thermophilic fungi acting singly, in combination and in sequence. Trans. Br. Mycol. Soc. 85: 663-669.

DENNIS, R. W. G. 1968. British Ascomycetes. Lehre Verlag Von J. Cramer. 455 pp.

DICKINSON, C. H. & UNDERHAY, V. H. S. 1977. Growth of fungi in cattle dung. Trans. Br. Mycol. Soc. 69: 473-477.

DODGE, B. O. & SEAVER, F. J. 1946. Species of ***Ascobolus*** for genetic study. Mycologia 38: 639-651.

DOKMETZIAN, D. A.; FORCHIASSIN, F & RANALLI, M. E. 1986. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina X. Physis, secc. C, 44: 29-38.

DOWDING, E. S. 1931. The sexuality of ***Ascobolus stercorarius*** and the transportation of the oidia by mites and flies. Ann. Bot. 45: 621-637.

ERSELIUS, L. J. & DE VALLAVIEILLE, C. 1984. Variation in protein profiles of ***Phytophthora***. Comparison of six species. Trans. Br. Mycol. Soc. 83: 463-472.

FARIS, M. A.; SABO, F. E & CLOUTIER, Y. 1986. Intraspecific variation in gel electrophoresis patterns of soluble mycelial proteins of ***Phytophthora magasperma*** isolated from alfalfa. Can. J. Bot. 64: 262-265.

FORCHIASSIN, F. 1983. Effect of light the development of ***Saccobolus platensis***. Rev. Arg. Microb. 15: 213-218.

FORCHIASSIN, F. & DOKMETZIAN, D. A 1982. Estudios citológicos en ***Saccobolus succineus***. Physis, secc. C, 40: 47-52.

FRANKE, R. G.; BALEK, R. W. & VALENTIN, L. 1968. Taxonomic significance of isozyme patterns of some Myxomycetes, order Phyasarales produced with starch gel electrophoresis. Mycologia 60: 331-339.

FRANKE, R. G. & BERRY, J. A. 1972. Taxonomic application of isozyme patterns produced with disc electrophoresis of some Myxomycetes, order Physarales. Mycologia 64: 830-840.

GAMUNDI, I. J. & RANALLI, M. E. 1964. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina I. Nova Hedwigia 7: 517-533.

GAMUNDI, I. J. & RANALLI, M. E. 1969. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina III Nova Hedwigia 17: 383-407.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F.; CANTORE, M. L. & PASSERON, S. 1984. The effect of light and cyclic AMP metabolism on fruiting body formation in ***Saccobolus platensis***. Exper. Mycol. 8: 334-341.

GORDON, M.; HUANG, X.; PENTONEY, S. & ZARE, R. 1988. Capillary electrophoresis. Science 242: 224-228.

GOTTLIEB, L. 1983. Isozyme number and phylogeny. En: U. Jensen and D. Fairbrothers (eds.), Protein and nucleic acids in plant systematics. Springer-Verlag, Berlín. pp 209-221.

HANSON, L. C. & KENNETH, W. 1991. Characterization of three ***Tremella*** species by isozyme analysis. Mycologia 83: 446-454.

HARPER, J. E. & WEBSTER, J. 1964. An experimental analysis of the coprophilous fungus sucession. Trans. Br. Mycol. Soc. 47: 511-530.

HARRINGTON, T. C.; STEIMEL, J. P.; WINGFIELD, M. J.; KILE, G. A. 1996. Isozyme variation and species delimitation in the ***Ceratocystis coerulescens*** complex. Mycologia 88: 104-113.

HARRIS, H. & HOPKINSON, D. A. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

HARROWER, K. M. & NAGY, L. A. 1979. Effects of nutrients and water stress on growth and sporulation of coprophilous fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 72: 459-462.

HEPPER, C. M.; SEN R., AZCON AGUILAR, C. & GRACE, C. 1988. Variation in certain isozymes amongst different geographical isolates of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi ***Glomus clarum, Glomus monosporum*** and ***Glomus mosseae.*** Soil Biol. Biochem. 20: 51-59.

HO, I. & TRAPPE, J. M. 1987. Enzymes and growth substances of ***Rhizopogon*** species in relation to mycorrhizal host and infrageneric taxonomy. Mycologia. 79: 553-558.

HUNTER, R. L. & BURSTONE, M. S. 1960. The Zymogram as a tool for the characterization of enzyme substrate specificity. J. Histochem. Cytochem. 8:58-62.

HUNTER, R. L. & MARKERT C. L. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science 125: 1294-1295.

HUSS, M. J.; CAMPBELL, C. L.; JENNINGS, D. B. & LESLIE, J. F. 1996. Isozyme variation among Biological species in the ***Gibberella fujikuroi*** species complex (***Fusarium*** Section *Liseola*). Appl. Env. Microbiol. 3750-3756.

INGOLD, C. T. 1971. Fungal spores, their liberation and dispersal. Clarendon Press, Oxford.

ITAVAARA, M. 1988. Identification of Shiitake strains and some other Basidiomycetes protein profile, esterase and acid phosphatase zymograms as and aid in taxonomy. Trans. Br. Myc. Soc. 91: 295-304.

IUPAC-IUB. 1979. Enzyme nomenclature. Recomendations (1978) of the nomenclature committee of the International Union of Biochemistry. Acad. Press. New York. San Francisco. London.

JACCARD, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 44: 223-270

JOHNSON, G. B. 1974. Enzyme polymorphism and metabolism. Science 184: 28-37.

KEPHART, S. R. 1990. Starch gel electrophoresis of plants isozymes: a comparative analysis of techniques. Amer. J. Bot. 77: 693-712.

KERRIGAN, R. W. & ROSS I. K. 1988. Extracellular laccases: biochemical markers for ***Agaricus*** systematics. Mycologia 80: 689-695.

KING, J. L. & OHTA, T. 1975. Polyallelic mutational equilibria. Genetics 79: 131-144.

KOVACK, W. L. 1993. MVSP-A multivariate statistical package for IBM-PCs, versión 2.1. Kovach Computing Services, Pentraeth , Wales, UK.

KURZEJA, K. C. & GARBER E. D. 1973. A genetic study of electrophoretically variant extracellular amylolitic enzymes of wild-type strains of ***Aspergillus nidulans***. Can. J. Genet. Cytol. 15: 275-287.

LABUDOVA, Y. & FARKAS, V. 1983. Multiple enzyme forms in the cellulase system of ***Trichoderma reesei*** during growth on cellulose. Biochim. Biophys. Acta 744: 135-140.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophase T_4. Nature 227: 680-685.

LATORRE, B. A.; PEREZ, G. F.; WILCOX, W. F. & TORRES, R. 1995. Comparative protein electrophoretic and isoenzymic patterns of ***Phytophthora cryptogea*** isolates from Chilean kiwifruit and North American deciduous fruits. Plant Dis. 79: 703-708.

LECOURS, N.; TOTI, L.; SIEBER, T. N. & PETRINI, O. 1994. Pectic enzyme patterns as a taxonomic tool for the characterization of ***Gremmeniella*** spp. isolates. Can. J. Bot. 72: 891-896.

LEHNINGER, A. L. 1981. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2da Ed. Ediciones Omega Barcelona. 1117 pp.

LEVIN, L. N.; SÍVORI, A. S. & PARDO, A. G. 1996. Actividad celulolítica de hongos coprófilos. Rev. Arg. Microbiol. 28: 132-138.

LODHA, B. C. 1974. Decomposition of digested litter. En: Dickinson C.H., Pugh G.F.H.(Eds.), Biology of plant litter decomposition, Acad. Press, New York. pp 213-241.

MAGNELLI, P. E.; RAMOS, A. M. & FORCHIASSIN, F. 1996. Factors influencing cellulase production by ***Saccobolus saccoboloides***. Mycologia 88: 249-255.

MAGHRABI., H. A. & KISH, L. P. 1985 (a). Isozyme characterization of Ascosphaerales associated with bees l ***Ascosphaera apis, Ascosphaera proliperda*** and ***Ascosphaera aggregata.*** Mycologia 77:358-365.

MAGHRABI., H. A. & KISH, L. P. 1985 (b). Isozyme characterization of Ascosphaerales associated with bees II. ***Ascosphaera major*, *Ascosphaera atra*** and ***Ascosphaera asterophora.*** Mycologia 77:366-372.

MAGHRABI., H. A. & KISH, L. P. 1986. Isozyme characterization of Ascosphaerales associated with bees III. ***Bettsia alvei.*** Mycologia 78: 676-677.

MAGHRABI., H. A. & KISH, L. P. 1987. Isozyme characterization of Ascosphaerales associated with bees IV. Analyses. Mycologia 79:519-523.

MAIJALA, P.; RAUDASKOSKI, M. & VIIKARI, L. 1995. Hemicellulolytic enzymes in P-strains and S-strains of ***Heterobasidion annosum.*** Microbiology 141 :743-750.

MANCHENKO, P. 1994. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 341 pp.

MARKAM, P. & BAZIN, M. J. 1990. Decomposition of cellulose by fungi. En: Handbook of applied Mycology. Arora DK et al. (ed.)1: 379-424.

MARKERT, C. L. & MOLLER, F. 1959. Multiple forms of enzymes tissue ontogenetic and species patterns. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 45: 753-763.

MARKERT, C. L. 1975. Biology of isozymes. En C. Markert (ed.), Isozymes, 1-9. Academic Press, New York.

MAY, B. & ROYSE, D. J. 1988. Interspecific allozyme variation within the fungal genus ***Pleurotus***. Trans. Br. Mycol. Soc. 90: 29-36.

MAYR, E. 1968. Especies animales y evolución. Universidad de Chile en coedición con Ediciones Ariel, S. A., Barcelona. 808 pp.

McHAU, G. R. A. & COFFEY, M. D. 1995. Evidence for the existence of two subpopulations in ***Phytophthora capsici*** and a redescription of the species. Mycol. Res. 99: 89-102.

MERCURI, O. A. 1987 (a). Degradación biológica de celulosa por ***Ascobolus furfuraceus***. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

MERCURI, O. A. 1987 (b). Macromorphological patterns of cellulolytic fungi growing in vitro. Nova Hedwigia, 44:465-472.

MERCURI, O. A. 1996 (a). Cinética de crecimiento y degradación de celulosa por ***Ascobolus furfuraceus*** (Fungi, Ascomycotina) empleando nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. Bol. Soc. Arg. Bot. 31: 173-175.

MERCURI, O. A. 1996 (b). Efecto del ión bicarbonato sobre la degradación de celulosa por ***Ascobolus furfuraceus*** (Fungi, Ascomycotina). Bol. Soc. Arg. Bot. 31: 221-224.

MERCURI, O. A. 1996 (c). Efecto de cationes metálicos sobre la degradación de celulosa cristalina por ***Ascobolus furfuraceus***. Physis, secc. C, 51: 31-39.

MERCURI, O. A. & DIORIO, L. A. 1995. Evaluación de la capacidad celulolítica de ***Ascobolus furfuraceus*** (Fungi, Ascomycotina). Rev. Arg. Microb. 27: 130-138.

MERCURI, O. A. & FORCHIASSIN, F. 1978. Fotobiología de ***Saccobolus citrinus***. Physis, secc. C, 38: 69-82.

MEYER, J. A. & RENARD, J. L. 1969. Protein and esterase pattern of two formae speciales of ***Fusarium oxysporum.*** Phytophathology 59: 1409-1411.

MICALES, J. A.; BONDE, M. R. & PETTERSON, G. L. 1992. Isozyme analysis in fungal taxonomy and molecular genetics. En : Handbook of Applied Mycology. Arora, D. K. (eds.) Vol. 4 p. 57-79.

MORRISON, D. J.; THOMSON, A. J.; CHU, D.; PEET, F. G. & SAHOTA, T. S. 1985. Isozyme patterns of ***Armillaria*** intersterility groups ocurring in British Columbia. Can. J. Microbiol. 31: 651-653.

MOUSO DE CACHI, N. & RANALLI, M. E. 1986. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. XI. Citología y desarrollo de ***Sacccobolus platensis*** . Physis, secc. C, 44: 83-91

NAKASONE, K. K. & MICALES, J. A. 1988. ***Scytinostroma galactinum*** species complex in the United States. Mycologia 80: 546-559.

NEATE, S. M.; CRUICKSHANK, R. H. & ROVIRA, R. D. 1988. Pectic enzyme pattern of ***Rhizoctonia solani*** isolates from agricultural soils in South Australia. Trans. Br. Mycol. Soc. 90: 37-42.

NEI, M. & CHAKRABORTY, R. 1973. Genetic distance and electrophoretic identity of proteins between taxa. Journ. Molec. Evol. 2: 323-328.

NELSON N. J. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biochem. 153: 375-380.

NEWTON, A. C.; CATEN, C. E & JOHNSON, R. 1985. Variation for isozymes and double-stranded RNA among isolates of ***Puccinia striiformis*** and two other cereal rusts. Plant Pathol. 34: 235-247.

NEWTON, A. C. 1987. Markers in pathogen populations. En: Genetics and plant Pathogenesis (P. R. Day and G. J. Jellis, eds.), Blackwell Scientific, Oxford, pp. 187-194.

ORNSTEIN, L. & DAVIS, B. J. 1959. Disc electrophoresis. Distillation Products Industries. Division of Eatsman Kodak Co.

OTROSINA, W. J. & COBBS, F. W. 1987. Analysis of allozymes of three distinct variants of ***Verticicladiella wageneri*** in western North America. Phytopathology 77: 1360-1363.

OTROSINA, W. J.; CHASE, T. E. ; COBBS, F. W. & TAYLOR, J. W. 1989. Isozyme structure of ***Heterobasidion annosum*** isolates relating to intersterility groups. En: Proceedings of the Seventh International Conference on Root and Butt Rots Forest Trees , Forestry Canada Victoria, British Columbia, pp. 406-416.

OUDEMANS, P. & COFFEY, M. D. 1991. Isozyme comparison within and among wordlwide sources of three morphologically distinct species of ***Phytophthora***. Mycol. Res. 95: 19-30.

PARDO, A. G.; SÍVORI, A. S. & RANALLI, M. E. 1997. Comparative study of cellulolytic enzyme zymograms of species of the Iodophaneae (Ascobolaceae-Pezizales). Mycotaxon 63: 269-286.

PARKER-RHODES, A. F. 1950. The Basidiomycetes of Skokholm Island. III. Genetic isolation in ***Panaeolus papilionaceus***. New. Phytol. 49: 328-354.

POULIK, M. D. 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. Nature 180: 1447-1479.

RACINE, R. R. & LANGLEY, C. H. 1980. Genetic heterozygosity in a natural population of ***Mus musculus*** assessed using two-dimensional electrophoresis. Nature 283: 855-857.

RAMOS, A. M. 1994. Desarrollo de ***Saccobolus longevisporus*** (Fungi, Ascomycetes) con distintas fuentes de nitrógeno. Bol. Soc. Arg. Bot. 30: 71-76.

RAMOS, A. M. & FORCHIASSIN, F. 1996 (a). Amilasas en cuatro especies del género ***Saccobolus,*** (Fungi, Ascomycetes). Bol. Soc. Arg. Bot. 31: 217-220.

RAMOS, A. M. & FORCHIASSIN, F. 1996 (b). Producción de endoglucanasa en cuatro especies del género ***Saccobolus***. Rev. Arg. Microbiol. 28: 55-62.

RANALLI, M. E. & FORCHIASSIN, F. 1976. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. VII. Desarrollo y Citología de ***Sacccobolus citrinus***. Bol. Soc. Arg. Bot. 17: 262-279.

RANALLI, M. E. & GAMUNDI, I. J. 1975. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. VI. Morfología y desarrollo de ***Sacccobolus seudodepauperatus*** sp. Nov. Citología del asco. Nova Hedwigia 26: 737-763.

RANALLI, M. E. & GONZALEZ CASTELAIN, R. J. 1994. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. XIII. Una nueva especie de ***Sacccobolus*** (Ascomycetes-Pezizales). Physis, secc. C, 49: 11-17.

RANALLI, M. E.; GONZALEZ CASTELAIN, R. J & FORCHIASSIN F. 1994. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina XIV. Desarrollo del apotecio y del sistema ascógeno de ***Sacccobolus longevisporus***. Physis, secc. C, 49: 51-59.

RANALLI, M. E. & MERCURI, O. A. 1995. Taxonomy of some Argentine species of ***Saccobolus***. Mycotaxon 54: 3125-327.

RAYMOND, S. & WEINTRAUB, L. 1959. Acrylamide gel as supporting medium zone electrophoresis. Science 130: 711.

RAYNER, A. D. M. 1990. Natural genetic transfer systems in higher fungi. Trans. Mycol. Soc. Japan 31: 75-87.

RAYNER, A. D. M. 1994. Evolutionary processes affecting adaptation to saprotrophic life styles in Ascomycete population. En: Ascomycete systematics. Problems and Perspectives in the Nineties, (D. L. Hawsksworth, ed.), NATO ASI series, Plenum Press, New York. 453 pp.

RINYU, E.; VARGA, J. & FERENCZY, L.1995. Phenotypic and genotypic analysis of variability in ***Aspergillus fumigatus***. Journ. Clin. Microbiol. 33: 2567-2575.

ROLF, J. F. 1993. NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.8 Exeter Software Applied Biostatistics Inc., N.Y.

ROYSE, D. J. & MAY, B. 1982. Use of isozyme variation to identify genotypic classes of ***Agaricus brunnescens*** . Mycologia, 75: 1030-1035.

SAFAR, M. H. & COOKE, R. C. 1988. Exploitation of faecal resource units by coprophilous Ascomycetes. Trans. Br. Mycol. Soc. 90: 593-599.

SAIDMAN, B. O. 1985. Estudio de la variación alozímica en el género ***Prosopis*** . Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

SCALA, F.; CRISTINZIO, G.; MARZIANO, F. & NOVIELLO, C. 1981. Endopolygalactouronase zymograms of ***Fusarium*** species. Trans. Br. Mycol. Soc. 77: 587-591.

SCANDALIOS, J. G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants, a review. Biochem. Genet. 3:37-79.

SCOTT, S. W. 1981. Separation of ***Sclerotinia*** isolates collected from herbage legumes . Trans. Br. Mycol. Soc. 76:321-323.

SELANDER, R. K.; SMITH, M. H.; YANG, S. Y.; JOHNSON, W. E. & GENTRY, J.B. 1971. IV. Biochemical polymorphism and systematics in the genus ***Peromyscus***. I. Variation in the old-field mouse (***Peromyscus polionotus***). Univ. Texas Publ. 103:49-90.

SHAW, C. R. & KOEN, A. L. 1968. Zone electrophoresis of enzymes. In Smith, I. (ed.). Chromatography and electrophoresis, 2nd ed., Interscience publishers, New York.

SIBLEY, C. G., 1962. The comparative morphology of protein molecules as data for clasification. Syst. Zool. 11:108-118.

SING, S.; BRAR, J. K.; SANDHU, D. K. & KAUR, A. 1996. Isozyme polymorphism of cellulases in ***Aspergillus terreus***. J. of Basic Microbiol. 36: 289-296.

SIVORI, A. S.; MERCURI, O. A. & FORCHIASSIN, F., 1996. Cinética de producción de xilanasas y celulasas por ***Ascobolus gamundii*** (Fungi, Ascomycotina). Rev. Arg. Microbiol. 28: 9-15.

SIVORI, A. S.; MERCURI, O. A. & FORCHIASSIN, F. 1997. Producción de celulasas por tres especies de ***Ascobolus*** (Ascomycotina, Pezizales). Bol. Soc. Arg. Bot. 33: 1-6.

SMITH, J. 1968. Chromatographic and electrophoretic techniques. II. Smith, J. (Ed.) London. Pitman Press. 524 pp.

SMITHIES, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels : group variation in the serum proteins of normal human adults. Biochem. J. 61: 629-640.

SMITHIES, O. & POULIK, M. D. 1956. Two dimensional electrophoresis of proteins. Nature 177: 1033.

SNEATH, P. H. & SOKAL, R. R. 1973. Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman & Co, San Francisco, USA.

SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. 1962. The comparison of dendrograma by objetive methods. Taxon 11: 33-40..

SOKAL, R. R. & SNEATH, P. H. 1963. Principles of Numerical Taxonomy. W. H. Freeman & Co, San Francisco, USA, 359 pp.

SOLTIS, D. E.; HAUFLER, C. H; DARROW, D. C. & GASTONY, G. J. 1983. Starch gel electrophoresis of Ferns A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules . Am. Fern J. 73: 9-27.

SOMOGY, M. J. 1952. Notes on sugar determination. Biol. Chem. 159: 19-23.

SORENSEN, T. 1948. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. Biol. Skr. 5:1-34.

STIPES, R. J.; MERT, G. H. E. & BROWN, R. D. 1982. Differentiation of ***Endothia gyrosa*** and ***Endothia parasitica*** by disc electrophoresis of intramycelial enzymes and proteins. Mycologia 74: 138-141.

STIPES, R. J. 1970. Comparative mycelial protein and enzyme patterns in four species of ***Ceratocystis***. Mycologia 62: 987-995.

SURVE-IYER, R. S.; ADAMS, G. C.; IEZZONI, A. F. & JONES, A. L. 1995. Isozyme detection and variation in ***Leucostoma*** species from ***Prunus*** and ***Malus***. Mycologia 87: 471-482.

SWEETINGHAM, M. W.; CRUIKSHANK, R. H. & WONG, D. H. 1986. Pectic zymograms and taxonomy and pathogenicity of the Ceratobasidiaceae. Trans. Br. Mycol. Soc. 86: 305-311.

TAJ-ALDEN, S. J.; AL-HABBEB, E. K.& ABDULLA, S. K. 1990. Cellulolytic activity of coprophilous fungi. Cryptog. Bot. 2: 25-29.

TISELIUS, A. 1937. A new apparatus for electrophoresis analysis of colloidal mixtures. Trans. Farady Soc. 33: 524-531.

VÁGVÖLGYI, C.; PAPP, T.; PALÁGYI, Z. & MICHAILIDES, T. J. 1996. Isozyme variation among isolates of ***Mucor piriformis***. Mycologia 88: 602-607.

VALLEJOS, C. E. 1983. Enzyme activity staining . En Isoenzymes in Plant genetics and Breding. Eds. S. D. Tanksley and T. J. Orton. A: 469-516. Amsterdam, Elsevier.

WEBSTER, J. 1970. Coprophilous fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 54: 161-180.

WENDEL, J. F. & WEEDEN, N. F. 1989.Visualization and interpretation of plants isozymes. En: D.E. Soltis and P.S. Soltis (eds.). Isozyme in Plant Biology. Cap. 1: 5-45.

WICKLOW, D. T.1981.The coprophilous fungal community: A mycological system for examining ecological ideas. En: The fungal community: Its organisation and role in the ecosystem. Wicklow, D. T and Carroll (eds.). Marcel Dekker, Inc, New York. pp 47-76.

WICKLOW, D. T.; DETROY, R. W. & ADAMS, S. 1980. Differential modification of the lignin and cellulose components in wheat straw by fungal colonists of ruminant dung: ecological implications. Mycologia 72: 1065-1076.

WICKLOW, D. T. & HIRSCHFIELD, B. J. 1979. Evidence of competitive hierachy among coprophilous fungal populations. Can. J. Microbiol. 25: 855-858.

WONG, A. L. & WILLETTS, H. J. 1973. Electrophoretic studies of soluble protein and enzymes of ***Sclerotinia*** species. Trans. Br. Mycol. Soc. 61: 167-178.

WONG, A. L. & WILLETTS, H. J. 1975. Electrophoretic studies of Australasian, North American and European isolates of ***Sclerotinia sclerotiorum*** and related species. J. Gen. Microbiol. 90: 355-359.

WOOD, T. M. & GARCIA CAMPAYO, V. 1990. Enzymology of cellulose degradation. Biodegradation 1: 147-161.

WU, Q.; HUGHES, K. W. & PETERSEN, R. H. 1995. A reevaluation of taxa of ***Clavicorona*** subg. ***Ramosa*** based on morphology, compatibility, and laccase electrophoretic patterns. Sydowia 47: 89-124.

YOCOM, D. H. 1977. Community differentiation along a dune succession: an experimental approach with coprophilous fungi. M. A. Thesis, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pa.

YOCOM, D. H. & WICKLOW, D. T. 1980. Community differentiation along a dune succession : an experimental approach with coprophilous fungi. Ecology 61: 868-880.

ZAMBINO, P. J. & HARRINGTON T. C. 1989. Isozyme variation within and among host-specialized varieties of ***Leptographium wagneri***. Mycologia 81: 122-133.

ZELADA, A. M.; SAMELA, A.; PASSERON, S. & CANTORE, M. L. 1994. Occurrence of GTP-binding proteins in the Ascomycete ***Saccobolus platensis***. Exper. Mycol. 18: 330-337.