

Tesis de Posgrado

Estudios quimiotaconómicos en especies del género *Ascobolus* (Ascobolaceae-Pezizales)

Dokmetzian, Diana Ana

1999

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:

Dokmetzian, Diana Ana. (1999). Estudios quimiotaconómicos en especies del género *Ascobolus* (Ascobolaceae-Pezizales). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3167_Dokmetzian.pdf

Cita tipo Chicago:

Dokmetzian, Diana Ana. "Estudios quimiotaconómicos en especies del género *Ascobolus* (Ascobolaceae-Pezizales)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3167_Dokmetzian.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

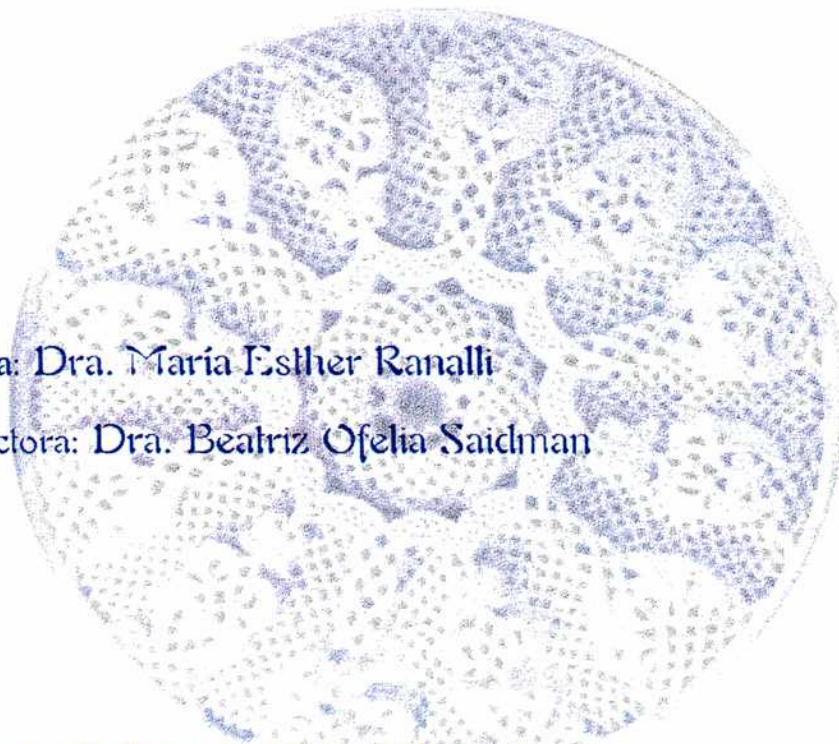
Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

FCE y N BIBLIOTECA

**Estudios quimiotaenómicos
en especies del género *Ascobolus***
(Ascobolaceae - Pezizales)

Lic. Diana Ana Dokmetzian



Directora: Dra. María Esther Ranalli

Co Directora: Dra. Beatriz Ofelia Saidman

Tesis presentada para optar al título de:

Doctor de la Universidad de Buenos Aires

№ 3167

Ej. 2

Buenos Aires
1999

Agradecimientos

A María Esther, directora de esta tesis, mi más profundo agradecimiento por su permanente estímulo, por su apoyo incondicional y por no permitirme claudicar. Gracias por ser parte de mi vida.

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

A Marce, mi compañera isoenzimática, quien siempre me acompañó, me brindó todo su apoyo, supo resolver mis problemas y sin su ayuda hubiera sido imposible culminar esta difícil tarea.

A Flavia, que durante tantos años de convivencia ocupó el lugar de una “hermana”, siempre dispuesta a escuchar cualquier problema micológico o de los otros.

A Oscar por ser mi maestro en computación y de quien aprendí a ejercer la docencia hace ya tantos años.

A Luis, compañero de tantos años por su ayuda a cada momento y solución a las dudas informáticas.

A María Delia y Laura por sus sonrisas y disposición a cada momento

A Paula de quien extraño las charlas durante los almuerzos.

A los “jóvenes” del laboratorio 8: Ramiro y Leandro.

A Alicia por la cámara fotográfica que se mudó a mi casa.

A la gente del laboratorio 12: Alicia G., Alicia M., Nadia y Vivi. A todas por su impulso y preocupación constante.

Al laboratorio de genética por el préstamo de las lentes y en particular a Laura por su ayuda.

A Alex y Matías por la ayuda frente a las bandas.

A la gente de los laboratorios 5 y 6: Silvia, Daniel, Andrea, Ceci, Vero y Laura. Al Dr. Wright por el examen de inglés.

A las Sras. Mercedes y Bruna.

A Ana María mi amiga del alma.

A Esteban por permitirme no existir tantos días y ser una madre “hijodependiente”

A Carlos por su infinita paciencia, su comprensión, su amor, sus sugerencias y ayudas gráficas.

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

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue la delimitación de doce especies del género *Ascobolus* a partir de los caracteres morfológicos y de cultivo, los cruzamientos interespecíficos, el crecimiento vegetativo en cultivo y los patrones electroforéticos de isoenzimas intracelulares. Para ello se utilizaron 47 cepas monospóricas y 22 siembras mixtas de cepas sexualmente compatibles. En los cruzamientos interespecíficos de *A. immersus* x *A. bistisii*, los oídios colocados sobre el micelio base no germinaron y tampoco indujeron la formación de ascogonios. Los cruzamientos entre las demás especies formaron primordios incipientes pero no fértiles. Los resultados sugieren la existencia de una sustancia hormonal responsable en la formación de los apotecios muy similar en estas especies y por tal razón *A. furfuraceus* está más relacionada a *A. gamundii* que a las otras especies.

Los resultados obtenidos al estudiar el crecimiento vegetativo en cultivo en medio líquido muestran variación entre las especies, que difieren entre sí en la extensión de las fases de la curva. Considerando la duración de la fase de crecimiento exponencial, se reconocen tres grupos. La fase estacionaria, de variada longitud, frecuentemente es muy corta, entrando rápidamente en la fase de muerte, acompañada por la autólisis del micelio.

Se examinaron los caracteres micro y macromorfológicos y se aplicaron técnicas numéricas. En el análisis isoenzimático se utilizaron los patrones de bandas de seis sistemas isoenzimáticos: AAT, EST, ACP, GDH, IDH y SOD. Los fenogramas obtenidos a partir del análisis de agrupamientos (UPGMA) mostraron dos grupos principales de especies correspondientes a dos secciones del género: secc. *Ascobolus* y secc. *Dasyobolus*, con algunas diferencias dentro de cada sección. Aunque existe homogeneidad intraespecífica ya que no se observaron grandes diferencias en los estados de los caracteres entre las cepas monospóricas y siembras mixtas, se encontró variación para EST en *A. gamundii* y para ACP en *A. ferrugineus*. Los resultados de este trabajo permitieron establecer que las doce especies estudiadas constituyen unidades taxonómicas independientes.

Palabras claves: hongos - *Ascobolus* - taxonomía - sexualidad - isoenzimas.

Summary

The aim of this work was the delimitation of twelve species of the genus *Ascobolus* on the base of the analysis of morphological and cultural characters, the vegetative growth in liquid culture media and electrophoretic patterns of intracellular enzymes. Forty seven monosporic strains and twenty two mixed cultures of compatible strains of the genus were used.

In *A. immersus* x *A. bistisii* interfertility crossing, when oidia were placed on a block of agar lying on a base mycelium, germination failed and there was no induction of ascogonium formation. Crossing between other species, formed incipient primordia, but none of them were fertile. These results suggest that hormonal substances responsible for apothecial formation are very similar in some of these species being, *A. furfuraceus* more closely related to *A. gamundii* than to other species.

Vegetative growth of the different species showed variation in the duration of the different phases of the growth cycle. Three groups can be recognised considering the extension of the exponential phase of growth. The stationary phase, which differs in its length, is frequently very short, entering quickly in the phase of death, accompanied by the autolysis of the mycelium.

Morphological characters were examined and numerical techniques were used. Six intracellular isozyme systems were analyzed: AAT, EST, ACP, GDH, IDH and SOD. The phenograms obtained from the analysis of grouping (UPGMA) showed two groups of species, corresponding to the two sections of the genus: sec. *Ascobolus* and sec. *Dasyobolus* with some differences within of each section.

Though a high intraespecific homogeneity was observed since there were not differences in the status of the characters among monosporic strains and mixed cultures some variation was observed in EST patterns of *A. gamundii* and ACP patterns of *A. ferrugineus*. The results of this research let establish that the twelve species studied are independent taxonomical entities.

Keywords: fungi – *Ascobolus* – taxonomy – sexuality – isozymes.

Indice

1. Introducción	
1. 1. Género <i>Ascobolus</i>	1
1. 1. 1. Generalidades	1
1. 1. 2. El hábitat coprófilo	2
1. 2. Cruzamientos.....	4
(Figura 1. 1)	
1. 3. Sistemática bioquímica	7
1. 3. 1. Generalidades	7
1. 3. 2. Técnicas electroforéticas de isoenzimas	9
1. 3. 3. Aplicaciones del análisis isoenzimático.....	11
1. 4. Taxonomía numérica	15
(Figura 1. 2)	
Objetivos	19
2. Materiales y Métodos	
2. 1. Organismos utilizados.....	20
2. 1. 1. Recolección de material.....	20
2. 1. 2. Obtención de ascosporas.....	20
2. 1. 3. Germinación de ascosporas	20
2. 1. 4. Obtención de las cepas compatibles y su polaridad	21
(Tabla 2. 1)	
2. 1. 5. Cruzamientos	21
(Tabla 2. 2 y Tabla 2. 3)	
2. 1. 6. Estudio de la cinética de crecimiento del micelio	25
(Tabla 2. 4)	
2. 1. 7. Obtención del micelio.....	26
2. 2. Medios de cultivo	26
2. 2. 1. Medios sólidos	26

2. 2. 2. Medio líquido.....	26
2. 3. Condiciones de cultivo.....	27
2. 4. Estimación del crecimiento.....	27
2. 5. Obtención de las muestras.....	28

(Tabla 2. 5)

2. 6. Técnicas electroforéticas para el análisis isoenzimático.....	30
2. 6. 1. Sistemas isoenzimáticos analizados.....	30

(Tabla 2. 6)

2. 6. 2. Condiciones de electroforesis y preparación de los geles.....	31
2. 6. 3. Siembra del material en los geles.....	31
2. 6. 4. Corrida electroforética.....	32
2. 6. 5. Buffers de corrida y de los geles.....	32
2. 6. 6. Tinciones enzimáticas.....	34
2. 6. 7. Detalle de las tinciones enzimáticas.....	36
2. 6. 7. 1. Aspartato aminotransferasa.....	36
2. 6. 7. 2. Esterasa.....	37
2. 6. 7. 3. Fosfatasa ácida.....	38
2. 6. 7. 4. Glutamato dehidrogenasa.....	39
2. 6. 7. 5. Isocitrato dehidrogenasa.....	40
2. 6. 7. 6. Superóxido dismutasa.....	41
2. 6. 8. Acondicionamiento de los geles.....	42
2. 6. 9. Cálculo de la movilidad relativa de las bandas.....	42
2. 7. Técnicas numéricas.....	42
2. 7. 1. Análisis de los caracteres morfológicos y de cultivo.....	42

(Tabla 2. 7)

2. 7. 2. Análisis de los caracteres isoenzimáticos.....	42
2. 7. 3. Análisis de agrupamientos.....	44

3. Resultados y Discusión

3. 1. Identificación de las especies.....	46
3. 2. Caracteres morfológicos y de cultivo.....	46

3. 2. 1. Sexualidad.....	46
3. 2. 2. Desarrollo del apotecio.....	48
(Diagrama 3. 1)	
3. 2. 3. Apotecio.....	49
3. 2. 4. Ascosporas.....	51
3. 2. 5. Ascosporas.....	51
3. 2. 6. Germinación de ascosporas en AA.....	52
3. 2. 7. Cultivo en PF.....	52
3. 2. 8. Oídios.....	53
3. 2. 9. Construcción de la matriz básica de datos.....	53
(Tabla 3. 1)	
3. 3. Cruzamientos.....	55
3. 3. 1. Sección <i>Ascobolus</i>	55
3. 3. 1. 1. Cruzamientos intraespecíficos.....	55
(Figura 3. 1)	
3. 3. 1. 2. Cruzamientos interespecíficos.....	57
3. 3. 2. Sección <i>Dasyobolus</i>	57
3. 3. 2. 1. Cruzamientos intraespecíficos.....	58
3. 3. 2. 2. Cruzamientos interespecíficos.....	58
3. 4. Cinética de crecimiento del micelio.....	61
(Figuras 3. 2 – 3. 7)	
3. 5. Sistemas isoenzimáticos analizados.....	71
3. 5. 1. Aspartato aminotransferasa.....	71
(Figura 3. 8)	
3. 5. 2. Esterasa.....	73
(Figuras 3. 9 a 3. 11)	
3. 5. 3. Fosfatasa ácida.....	77
(Figuras 3. 12 y 3. 13)	
3. 5. 4. Glutamato dehidrogenasa.....	80
(Figura 3. 14)	

3. 5. 5. Isocitrato dehidrogenasa	80
(Figura 3. 15)	
3. 5. 6. Superóxido dismutasa.....	83
(Figura 3. 16)	
3. 6. Construcción de la matriz básica de datos	85
(Tabla 3. 2)	
3. 7. Electromorfos de los 6 sistemas isoenzimáticos presentes en cada muestra ..	85
(Tabla 3. 3)	
3. 8. Técnicas numéricas.....	90
3. 8. 1. Matriz básica de datos morfológicos.....	90
(Figura 3. 17)	
3. 7. 2. Matriz básica de datos isoenzimáticos	92
(Figura 3. 18)	
4. Conclusiones.....	103
5. Bibliografía.....	106

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1. 1. Género *Ascobolus*

1. 1. 1. Generalidades

Cuando en 1857 los hermanos Crouan (Crouan y Crouan, 1857) descubrieron el opérculo en el ápice del asco en especies de *Ascobolus*, pensaron que constituía un hecho único característico del género. En los años siguientes, muchos micólogos comenzaron a estudiar *Ascobolus*, Karsten (1861, 1870), Coemans (1862), Cooke (1864), de Notaris (1864), Berkeley y Broome (1865), Fuckel (1866) y Boudier (1869). Este último, especialmente, estudió el género en detalle.

El género *Ascobolus* (Ascomycotina, Pezizales) fue creado por Persoon en 1791 y en él agrupó a cierto número de discomicetes, la mayoría coprófilos. Boudier (1869) fue el primero que logró introducir cierto orden entre las numerosas y heterogéneas especies que constituían el género, creando la tribu “Pseudoascobolae” para las especies con ascosporas incoloras. Dentro de la tribu “Ascobolae” ubicó los géneros *Ascobolus* y *Saccobolus*, caracterizando a este último por la presencia de ascosporas agrupadas en paquetes octosporados a la madurez, mientras que quedaban incluidas dentro del género *Ascobolus* aquellas especies con ascosporas coloreadas y separadas entre sí dentro del asco. Observó el opérculo en el ápice del asco en otros géneros de discomicetes, mientras que también encontró muchos otros géneros sin opérculo.

Boudier (1869, 1885) publicó sus ideas de una clasificación natural de los discomicetes, basada en la dehiscencia del asco, la reacción amiloide de la pared del asco tratada con lugol (Melzer), la morfología de la fructificación, la presencia o ausencia de un margen en el apotecio y otros caracteres microscópicos. Él definió allí claramente, a los discomicetes operculados e inoperculados, como taxones de categoría alta.

Van Brummelen (1967) incluyó al género *Ascobolus* dentro de la familia Ascobolaceae, sub-familia Ascoboloideae y agrupó las especies en siete secciones:

- 1) Sección *Dasyobolus*: con ascocarpo cleistohiménial, que se abre en la fase telohiménial.
- 2) Sección *Sphaeridiobolus*: con ascocarpo cleistohiménial abriéndose en la fase mesohiménial tardía, con ascosporas globosas y con verrugas.
- 3) Sección *Ascobolus*: con ascocarpo cleistohiménial que se abre en la fase mesohiménial temprana o media.
- 4) Sección *Pseudoascodesmis*: con ascocarpo paragimnohiménial y el hábito de *Ascodesmis*, pero sin reacción amiloide en el asco.
- 5) Sección *Pseudosaccobolus*: con ascocarpo para o eugimnohiménial, el hábito de *Saccobolus* y reacción amiloide en la pared del asco.
- 6) Sección *Heimerlia*: con ascocarpos pequeños eugimnohiméniales y con excípulo pobremente desarrollado.
- 7) Sección *Gymnoascobolus*: con ascocarpos eugimnohiméniales, con activa zona de crecimiento sub-marginal.

Existen numerosos trabajos que han contribuido al conocimiento de distintos aspectos del género sobre ciclo de vida, citología, nutrición y sexualidad (Gamundí y Ranalli, 1963, 1966; Ranalli y Cinto, 1972; Ranalli y Gamundí, 1975; Cinto et al. 1977, 1979; Ranalli y Forchiassin, 1979; Ranalli et al., 1981; Mercuri et al., 1983; Lima y Mercuri, 1984; Mercuri y Lima, 1985; Cinto et al., 1986; Forchiassin, 1988; Dokmetzian y Ranalli, 1992; Pardo y Forchiassin, 1993 a, b; Dokmetzian et al., 1995; Dokmetzian y Ranalli, 1991, 1992, 1999; De Simone et al., 1997).

1. 1. 2. El hábitat coprófilo

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. Sin embargo muchos están presentes como esporas o micelio sobre las hierbas, pero relativamente pocos son los que sobreviven hasta fructificar sobre el estiércol (Bonner y Fergus, 1959). El proceso de digestión, la alta temperatura y la competencia con otros microorganismos ejercen una considerable selección, encontrándose ciertos grupos con alta proporción de representantes coprófilos u otros, como los Discomycetes inoperculados, que son muy raros (Dennis, 1968).

La evolución en la escala zoológica hacia los animales de sangre caliente parece haber sido de gran importancia en la evolución del hábitat 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).

Las características de los hongos coprófilos que les permiten sobrevivir sobre el estiércol son: 1) capacidad para resistir a la digestión, ya que no todas las esporas presentes en la hierba pueden sobrevivir; 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) fructificar en ese sustrato debido a que algunos sólo pueden crecer vegetativamente; 4) necesidad de un estímulo para la germinación ya que las esporas presentan dormancia constitutiva o exógena que constituye un mecanismo adaptativo sumamente valioso.

Un hecho interesante que presentan los hongos coprófilos es su distribución cosmopolita, influenciada por su tipo de dispersión, realizado por los animales, por el viento y también por el agua, o bien por esporas adheridas al forraje que es a veces transportado a grandes distancias.

La mayoría de los hongos coprófilos son homotálicos, una adaptación que aumenta la posibilidad de supervivencia, en cambio en las heterotálicas es necesaria la presencia de dos micelios compatibles provenientes cada uno de una spora diferente para garantizar la supervivencia del individuo.

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 (Wicklów et al., 1980).

En algunas especies de *Ascobolus* y *Saccobolus* se han estudiado sistemas enzimáticos celulolíticos de gran actividad (Mercuri y Diorio, 1995; Mercuri, 1996 a, b, c, d; Sívori et al., 1996, 1997; Levin et al., 1996; Magnelli et al., 1996; Magnelli y Forchiassin, 1999).

1. 2. Cruzamientos

En líneas generales, podemos representar esquemáticamente el ciclo sexual en *Ascobolus* como muestra la **figura 1.1** (Bistis, 1998). Cuando el micelio vegetativo de *Ascobolus* llega a la madurez sexual, produce anteridios unicelulares (órganos sexuales masculinos) y ascogonios circinoides pluricelulares (órganos sexuales femeninos). De tal forma que son heterogaméticos y hermafroditas. La plasmogamia ocurre entre el tricogino del ascogonio que crece y se fusiona con un anteridio. El o los núcleos del anteridio migran a través del tricogino y llegan a las células del ascogonio, una de las cuales actuará como célula ascógena. En este punto, los núcleos sexuales no se fusionan, en cambio, la célula ascógena produce hifas a las que migran los pares de núcleos, que se dividen conjugadamente.

Al mismo tiempo, el ascogonio fecundado induce el crecimiento dirigido de las hifas del micelio cercanas a él, rodeándolo y dando origen al inicio de la fructificación. El componente fértil del ascocarpo, se origina a partir de la proliferación del sistema ascógeno (hifas ascógenas que se ramifican y extienden profusamente). Al final del desarrollo de las hifas ascógenas, los núcleos ♀ y ♂ apareados en el ápice de la hifa ascógena, sufren división conjugada, originándose un gancho que se divide dando tres células, una basal y una apical uninucleadas y una central binucleada. Es en esta célula, la célula madre del asco, donde los dos núcleos sexuales se fusionan y forman el núcleo cigótico diploide. Luego éste sufre meiosis, seguida rápidamente por una mitosis, al tiempo que el asco se expande, y se forma una hilera de ocho núcleos haploides, cada uno de estos formará parte de una de las ocho ascosporas subsecuentemente formadas.

En esencia, este ciclo representa una solución al problema de como producir más de una cigota a partir de una fusión sexual única. Funciones adicionales del ascocarpo son alimentar y proteger las cigotas y contribuir a la dispersión de las ascosporas. Este ciclo complejo requiere una docena o más de tipos celulares y sofisticados mecanismos de control, muchos de ellos aún desconocidos.

El género *Ascobolus* comprende numerosas especies, algunas homotáticas, otras heterotáticas. Dodge (1920), trabajando con *A. magnificus*, puso de manifiesto la existencia en esta especie, de un comportamiento típicamente heterotático, genéti-

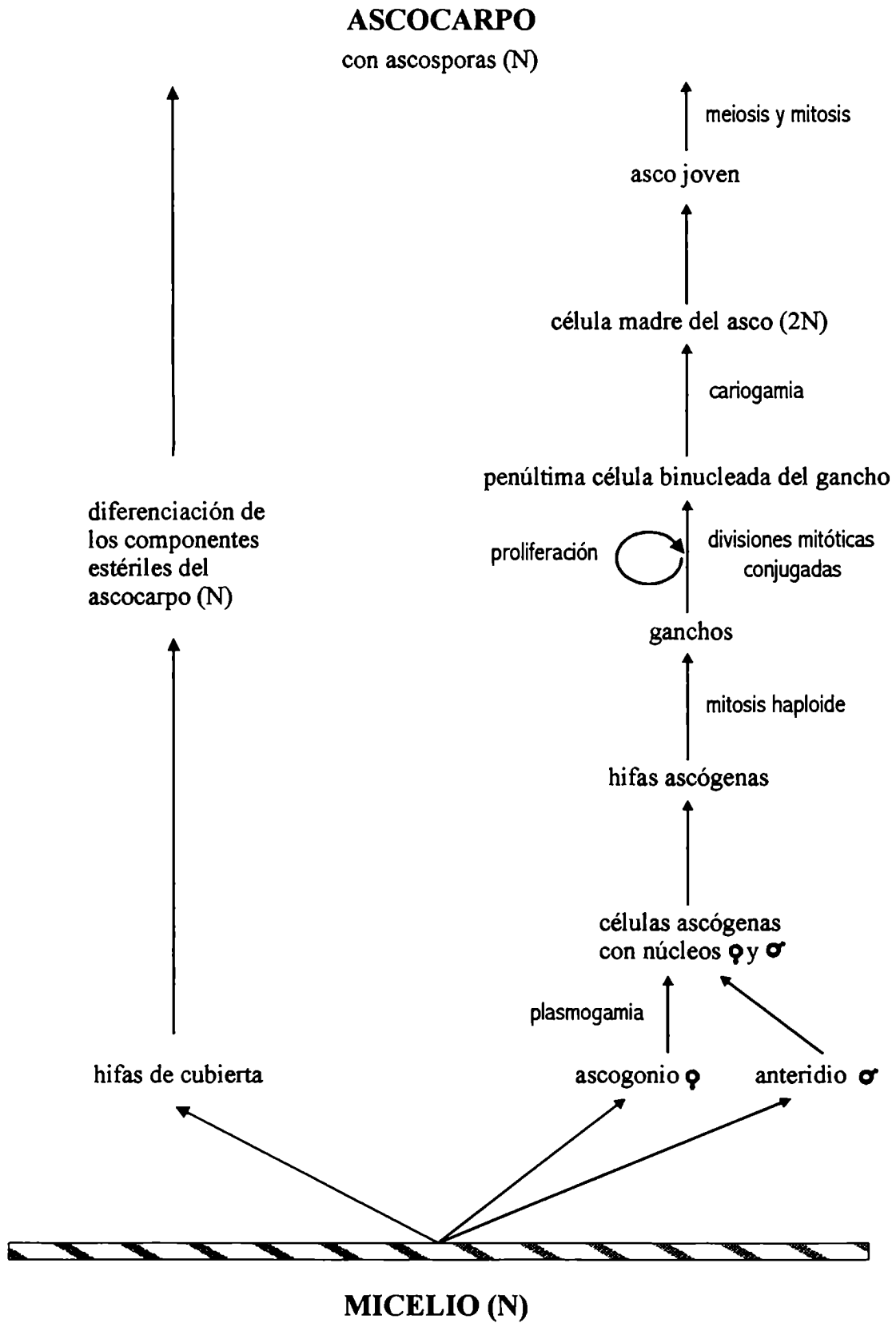


Figura 1. 1: Ciclo de vida sexual de un euascomicete

camente controlado, en el cual dos grupos de incompatibilidad están determinados por dos alelos (A, a), en un simple locus (heterotalismo bipolar, Whitehouse, 1949). Dodge sugirió que, dado que los órganos sexuales aparecen únicamente en cruzamientos A x a, estos factores genéticos deberían jugar un papel determinante en el ciclo sexual, en algún estado pre-plasmogamia.

Gywnne-Vaughan y Williamson (1932) y Drayton (1932), trabajando con *A. magnificus* y *Sclerotinia gladioli*, respectivamente, encontraron que los factores de incompatibilidad no funcionan como determinantes del sexo, ya que en estas especies, ambas cepas (A y a) son capaces de formar estructuras receptoras (♀) y dadoras (♂), pero las que finalmente reaccionan entre sí, pertenecen a factores de incompatibilidad opuestos. Esto implica que en cruzamientos A x a, pueden ocurrir dos interacciones recíprocas (A ♀ x a ♂) y (A ♂ x a ♀).

Con respecto a la presunción de Dodge sobre el papel de los alelos A y a sobre la inducción de los órganos sexuales puede aceptarse en *A. magnificus* pero no en *Sclerotinia gladioli*, donde las estructuras sexuales aparecen aún en cultivos monospóricos.

En términos clásicos, el locus relacionado con el control de la compatibilidad sexual (MAT) contiene diferentes alelos en hongos heterotálicos. Sin embargo, Metzberg (1990) ha puntualizado que el término alelo, implica que diferentes formas de un gen son muy similares, y puede esperarse que codifiquen proteínas funcionalmente equivalentes. Esto en realidad, no es cierto para los genes de compatibilidad sexual, que ocupan el locus MAT, los que contienen ADN con secuencias muy disímiles y codifican proteínas no relacionadas. Metzberg (1990) ha introducido el término idiomorfo para marcar las diferencias en secuencia, función y posiblemente origen de los genes dentro del locus MAT.

Los trabajos de Bistis (1956, 1957, 1965) y Bistis y Raper (1963) en *Ascobolus stercorarius*, con heterotalismo bipolar típico y productora de oídios que actúan como agentes espermatizantes y como elementos de propagación vegetativa, permitieron aclarar algunos aspectos de los procesos involucrados en la reproducción sexual. Utilizando la técnica de la “espermatización” pudieron determinar que la diferenciación de los ascogonios es una respuesta directa a la acción inductora del oídio compatible, acción que al no mediar el contacto directo entre micelio y oídio, debe ejercerse a través de sustancias “hormonales” que

difunden en el medio. La posterior diferenciación del tricogino y su crecimiento direccional hacia el oídio y la plasmogamia con éste, también responden a la presencia de sustancias difusibles, aún no identificadas, producidas por el oídio activado.

1. 3. Sistemática bioquímica

1. 3. 1. Generalidades

Desde hace aproximadamente treinta años, a partir de las investigaciones de Chang et al. (1962) en *Neurospora* spp y de Clare (1963) en *Phytium* 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 Vallavielle (1984), Maghrabi y Kish (1985 a y b, 1986 y 1987), Itavaara (1988), Neate et al. (1988), Oudemans y Coffey (1991 a y b), Surve-Iyer et al. (1995), Latorre et al. (1995), Rinyu et al. (1995), Harrington et al. (1996).

Los sistemas de clasificación biológicos procuran colocar a los organismos en una disposición ordenada y conveniente, basada en general, en relaciones genéticas, constituyendo una clasificación natural. Con frecuencia las clasificaciones suelen estar basadas sobre caracteres considerados como hechos de conveniencia, y muchos de ellos no tienen un gran significado genético, dando lugar, en consecuencia, a una clasificación artificial.

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 y septación de las esporas y otros caracteres similares.

El método que utiliza caracteres morfológicos con el propósito de la identificación a nivel de especie es tradicional, está firmemente arraigado y tiene sin duda, valores sobresalientes, así, si todos los estados morfológicos apropiados se encuentran presentes en el hongo, vivo o muerto, puede ser identificado con las herramientas consideradas normales en un laboratorio biológico. En otros casos, debido a la carencia de factores de diagnóstico apropiados, puede tener valor limitado, o bien pueden necesitarse condiciones especiales para seguir el desarrollo de los hechos morfológicos sobre los que está basado el sistema.

Además una clasificación basada puramente en la morfología, puede ser difícil de aplicar en el caso de hongos polimórficos, que pueden, según las condiciones, producir uno o varios tipos de esporas. También encontramos el caso, en que una forma relativamente simple de reproducción asexual puede desarrollar a partir de diferentes formas perfectas.

El sistema clásico de clasificación, ha servido, no obstante, muy bien y seguirá haciéndolo; sin embargo, tiene limitaciones y éstas pueden y deben ser reconocidas.

Actualmente, con el avance en la metodología analítica y el perfeccionamiento de las técnicas, la caracterización química de los organismos está avanzando rápidamente. El valor de estos datos bioquímicos para el taxónomo radica en el hecho que ellos están genéticamente controlados y pueden ser definidos en muchos casos, con fórmulas estructurales y configuracionales.

La sistemática bioquímica consiste, esencialmente, en la examinación 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. Sin embargo, los componentes celulares usados como parámetro son influenciados, en muchos casos por la composición del medio de cultivo, la temperatura de incubación, el pH del medio, el tipo y edad fisiológica del cultivo, de modo tal que debe procurarse por todos los medios, estandarizar las condiciones de cultivo para poder hacer comparaciones entre los individuos.

La explicación del porque se usan las proteínas (solubles, estructurales, enzimáticas) en taxonomía y sistemática ha sido puntualizado por numerosos autores. Sibley (1962) resalta que las dos actividades de los genes son replicarse a sí mismos y dirigir la síntesis proteica. Esto implica, que el genotipo de un organismo está reflejado en su composición proteica y, que el control genético de la morfología debe ser ejercido a través del metabolismo de las proteínas. Es razonable, pues, asumir que existe una relación estrecha entre el complemento de proteínas de un organismo y su morfología.

1. 3. 2. Técnicas electroforéticas de isoenzimas

La electroforesis es una técnica que permite separar proteínas bajo la influencia de un campo eléctrico.

Las enzimas, como todas las proteínas, están formadas por aminoácidos unidos covalentemente para formar un polipéptido. Como consecuencia de la naturaleza química de las cadenas laterales de los aminoácidos, las proteínas en general son anfóteras, pudiendo llevar carga neta positiva o negativa, dependiendo de la ionización de los grupos amino y carboxilo libres. Dicha ionización estará relacionada con el buffer en el que se hallen inmersas las moléculas proteicas, y es la responsable de la migración de las proteínas a través de una matriz (soporte) durante la electroforesis (Murphy et al., 1990).

La carga neta de una proteína depende del balance de aminoácidos básicos y ácidos presentes en la cadena polipeptídica. Las moléculas cargadas negativamente (aniones) migrarán hacia el electrodo positivo (ánodo) y las positivamente cargadas (cationes) migrarán hacia el electrodo negativo (cátodo) (Harris y Hopkinson, 1976).

Un precursor de esta técnica ha sido Tiselius (1937), a quien le sucedieron muchos otros investigadores que mejoraron el método desarrollando la electroforesis de zona en gel de almidón (Smithies, 1955; Smithies y Poulik, 1956; Poulik, 1957) y en poliacrilamida (Raymond y Weintraub, 1959; Ornstein y Davis, 1959). Posteriormente se desarrollaron métodos de reacción histoquímicos para localizar las zonas de actividad enzimática directamente en el medio de soporte (Hunter y Markert, 1957; Smith, 1968; Brewer y Sing, 1970; Chrambach y Rodbard, 1971).

La combinación de la electroforesis y de la tinción específica hace posible distinguir una enzima particular entre cientos que pueden estar presentes en un extracto crudo.

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).

El análisis de proteínas mediante electroforesis en gel es rápido, sencillo, requiere muestras pequeñas y aparatos no tan costosos. Por esta razón este método es ampliamente aplicado por bioquímicos y taxónomos, siendo tal vez la técnica más popular en el campo de la sistemática bioquímica. El porqué de tan importante rol de la electroforesis de proteínas para resolver problemas taxonómicos y evolutivos

específicos ha sido por sus propiedades características de estabilidad, uniformidad y aditividad de los perfiles proteicos.

Hunter y Markert (1957), denominaron zimograma al conjunto de bandas que aparecen en el gel luego de la tinción por métodos histoquímicos. Los fenotipos resultantes son bandas coloreadas que indican actividad enzimática que reciben el nombre de electromorfos (King y Ohta, 1975).

La zimografía es un método de comparación de proteínas, donde se puede teñir selectivamente proteínas que tienen actividades enzimáticas similares. Esta técnica ofrece algunas ventajas sobre los métodos más generales, ya que las enzimas, presentes en general en cantidades más pequeñas, pueden no ser detectadas con colorantes generales pero sí, en cambio, con reacciones enzimáticas específicas.

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.

Las isoenzimas pueden estar presentes en el mismo individuo o en individuos diferentes de la misma especie o taxa y catalizan reacciones que ocurren en diferentes compartimentos celulares o tejidos, o bajo diferentes condiciones metabólicas u ontogenéticas (Markert, 1975).

Las tres causas principales de formación de las isoenzimas son: a) presencia de más de un locus génico codificante para la enzima, b) presencia de más de un alelo en un mismo locus génico y c) modificaciones post-traduccionales de los polipéptidos, resultando en la formación de isoenzimas secundarias. Usualmente, el término “isoenzima” (=isozima) es usado para designar las formas derivadas de diferentes loci génicos, mientras que el término “aloenzima” (=alozima) se emplea para designar las múltiples formas que derivan de distintos alelos del mismo locus génico.

Las matrices soporte más utilizadas son el almidón y la poliacrilamida, cuyos tamaños de poros son aproximadamente del mismo orden de magnitud que el tamaño de las moléculas de proteína. El tamizado molecular resultante permite la separación electroforética de proteínas con carga similar y que difieren en tamaño y forma. Usando distintas concentraciones de poliacrilamida o almidón (con lo cual

varía el tamaño del poro del soporte) y distintos buffers (con lo que se influye en la carga neta de las proteínas), se obtienen zonas discretas en los geles, que denominamos “bandas”, para cada tipo proteico. La consideración básica de la técnica, es que los cambios en la movilidad de las enzimas en un campo eléctrico reflejan cambios en la secuencia codificante del ADN. En consecuencia, si el patrón de bandas de dos individuos difiere, se asume que estas diferencias tienen base genética, y por lo tanto, son heredables.

Existen varios principios para la visualización de enzimas en los geles. Aquí se tratarán, únicamente, aquellos basados en reacciones cromogénicas, las que incluyen cualquier reacción o conjunto de reacciones que revelen bandas de actividad enzimática a la luz del día (en contraposición con las que requieren luz UV). En la mayoría de los casos los productos primarios de una reacción enzimática no son rápidamente detectables, por lo que se agregan reactivos suplementarios que originan un producto secundario visible.

1. 3. 3. Aplicaciones del análisis isoenzimático

El análisis isoenzimático es una técnica que tiene gran aplicación en fitopatología y micología y es utilizado para resolver problemas taxonómicos, identificar taxones fúngicos desconocidos, analizar la variación genética de una población, identificar niveles de ploidía a través del ciclo de vida del organismo, delinear el origen de patógenos, etc. (Micales et al., 1992).

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 de bandas electroforéticas son dependientes de la condición nuclear del organismo. La interpretación de los datos provee mucha información acerca de la genética y la taxonomía de un grupo de organismos. Para confirmar la interpretación genética serán necesarios los cruzamientos pero ciertos patrones de bandeo son realmente muy útiles para estudios comparativos.

A. Delineación de taxones fúngicos

Frecuentemente el análisis isoenzimático es utilizado para dirimir problemas taxonómicos, particularmente cuando las características morfológicas se superponen o son plásticas dentro de un género o especie. La interpretación genética de los patrones de bandas puede ser innecesaria para la separación de taxones fúngicos; las similitudes y distancias genéticas pueden calcularse por procedimientos simples de conteo de bandas.

Se han realizado numerosos estudios isoenzimáticos de hongos patógenos de insectos y ácaros, micorrízicos, fitopatógenos y saprófitos. Este análisis se ha aplicado a diferentes niveles taxonómicos sobre todo para distinguir especies y aportar sugerencias sobre la separación o combinación de especies.

La coespecificidad de *Endothia eugeniae* y *Cryphonectria cubensis* fue avalada por estudios sobre características de cultivo y patogenicidad y Hodges et al. (1986) y Micales et al. (1987) lo confirman utilizando el análisis isoenzimático. Se ha demostrado una estrecha relación entre *Peronosclerospora sacchari* y *P. philippinensis*, importantes patógenos de caña de azúcar y maíz respectivamente en los trópicos utilizando la electroforesis en geles de almidón (Bonde et al., 1984; Micales et al., 1988). Las diferencias en los patrones isoenzimáticos se han usado para separar especies de *Agaricus* (Kerrigan y Ross, 1988), *Aspergillus* (Kurzeja y Garber, 1973), *Botrytis* (Backhouse et al., 1984), *Gaeumannomyces* (Abbott y Holland, 1975), *Glomus* (Hepper et al., 1988), *Penicillium* (Cruickshank y Pitt, 1987), *Phytophthora* (Bielenin et al., 1988; Erselius y Vallavielle, 1984), *Pleurotus* (Blaich y Esser, 1975; May y Royse, 1988), *Puccinia* (Bergquist y Pryor, 1984; Newton et al., 1985), *Rhizopogon* (Ho y Trappe, 1987), *Scytinostroma* (Nakasone y Micales, 1988), *Armillaria* (Morrison et al., 1985) entre otros.

El poder de la electroforesis para distinguir especies fúngicas depende de la variabilidad genética dentro de la población. Los organismos con altos niveles de variabilidad genética expresan grandes niveles de variación intraespecífica oscureciendo las diferencias interespecíficas. La elección de los sistemas isoenzimáticos también es importante. Johnson (1974) propone y muchos otros lo avalan, que diferentes tipos de enzimas muestran diferentes grados de variación debido a la intensidad de la presión de selección, y muchos estudios que sólo

utilizan enzimas que detectan muy altos niveles de variación intraespecífica son incapaces de distinguir o diferenciar especies (Racine y Langley, 1980).

Las enzimas regulatorias involucradas con el metabolismo energético a menudo muestran menor variación que las no regulatorias como ser esterasas y fosfatasa. Un estudio que utiliza sólo enzimas no regulatorias puede detectar altos niveles de variación intraespecífica desproporcionados y entonces ser imposible distinguir especies. Este problema puede ser subsanado con el uso de enzimas regulatorias y no regulatorias.

La electroforesis también ha sido usada para identificar y distinguir taxones subespecíficos. Se han diferenciado variedades y subespecies de *Phytophthora megasperma* (Bielenin et al., 1988) y *Leptographium wageneri* (Otrosina y Cobbs, 1987; Zambino y Harrington, 1989). Faris et al. (1986) utilizaron los patrones isoenzimáticos para detectar dos subgrupos de *Phytophthora megasperma* var. *medicaginis* que además presentaban diferentes características de cultivo y patogenicidad. En otros casos no fue posible detectar diferencias subespecíficas y varietales como por ejemplo en *Gaeumannomyces graminis* (Abbott y Holland, 1975) y *Scytinostroma galactinum* (Nakasone y Micales, 1988). También se han obtenido resultados mixtos en la diferenciación de razas, formas especiales y subgrupos que diferían en los hospedantes, en patogenicidad y virulencia. Estas separaciones se han realizado en *Cryphonectria cubensis* (Alfenas et al., 1984), *Fusarium oxysporum* (Bosland y Williams, 1987), *Puccinia graminis* (Newton et al., 1985), *Puccinia sorghi* (Bergquist y Pryor, 1984) y *Phyllotopsis nidulans* (Boisselier-Dubayle, 1983).

Burdon y Roelfs (1985 a y b) encontraron una correlación en la población asexual de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* que no ocurre en la población sexual el cual presenta mayor grado de variabilidad genética. Comúnmente la preferencia de hospedantes, la patogenicidad y la virulencia no están relacionados con las diferencias en los patrones isoenzimáticos, tal es el caso en *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (Torp y Andersen, 1982), *Pleurotus ostreatus* (Blaich y Esser, 1975), *Rhizopogon* (Ho y Trappe, 1987) y *Rhynchosporium secalis* (Newman, 1985).

El origen geográfico de un aislamiento puede determinarse por el análisis isoenzimático. Esta información se puede utilizar para determinar el origen de un patógeno introducido y trazar el desarrollo de los epífitos. La población local de

Morchella deliciosa, *Morchella esculenta* (Gessner et al., 1987) y *Neurospora intermedia* (Spieth, 1975) mostraron ser genéticamente diferentes. Bonde et al. (1988) separan aislamientos de *Phakopsora pachyrhizi*, causante de la roya en soja coleccionados en el hemisferio oriental y occidental. *Puccinia recondita* fue introducida en los Estados Unidos de Norteamérica (Burdon y Roelfs, 1985 a y b) y *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* en Australia (Burdon et al., 1982).

En Argentina se ha utilizado el análisis isoenzimático para delimitar las especies del género *Saccobolus* (Ramos, 1998) y las especies sudamericanas del género *Ganoderma* (Gottlieb, 1997). También se ha estudiado la variabilidad genética de los endofitos de tres especies de *Festuca* pertenecientes al género *Neotyphodium* (Cabral, 1999).

B. Identificación de hongos desconocidos

Dentro de una especie, algunos loci genéticos tienen escasa o nula variación entre los individuos. Estos loci 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 usarse con este fin. 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; Royce y May, 1982; Sweetingham et al., 1986).

C. Variación genética

Los patrones isoenzimáticos pueden usarse 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, 1987; Zambino y Harrington, 1992).

D. Determinación de niveles de ploidía

Los patrones de bandas isoenzimáticas pueden utilizarse 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 típicamente producen patrones de bandas más complicados.

1. 4. Taxonomía numérica

La taxonomía numérica ha sido definida por Sneath y Sokal (1973) como la evaluación numérica de la afinidad o similitud entre unidades taxonómicas y el agrupamiento de éstas unidades en taxones basándose en el estado de sus caracteres. El enfoque planteado por la taxonomía numérica comprende un aspecto filosófico basado en la teoría clasificatoria denominada feneticismo y en las técnicas numéricas, que son el camino operativo para aplicar dicha teoría (Crisci y López Armengol, 1983).

Actualmente, se utilizan dichas teorías numéricas para establecer relaciones entre agrupamientos de objetos en general, lo que no implica la necesaria aceptación de todos los principios del feneticismo. Las técnicas numéricas tratan a todos los caracteres, elegidos a priori, asignándoles el mismo peso. Sin embargo, el peso de un carácter está expresado por el número de caracteres que se utilizan para describirlo (Sneath y Sokal, 1973).

Este tipo de estudios pretende actuar en forma objetiva, pero la influencia subjetiva que introduce el investigador no se puede descartar por completo, aunque sí reducir. El conocimiento del grupo en estudio puede generar un cierto prejuicio en la elección de los caracteres, que puede minimizarse aumentando el número de caracteres.

Es ampliamente conocido que actualmente la tendencia es hacia enfoques cladísticos que reflejen la historia evolutiva de los grupos naturales (monofiléticos) para poder construir un sistema clasificatorio basado en esa historia común. Sin embargo, para poder aplicar las técnicas del cladismo, previamente se debe tener

una clara delimitación de las especies. La taxonomía numérica ha resultado de gran ayuda en esa delimitación debiéndose poner especial atención en la:

- 1) Elección de las unidades: se eligen los organismos a estudiar y se definen las unidades a clasificar denominadas “Unidades Taxonómicas Operativas” (OTU).
- 2) Elección de los caracteres: se eligen los caracteres que describan a las OTU y se registra el estado de los caracteres presentes en ellas.
- 3) Construcción de la matriz básica de datos: con la información obtenida en los pasos anteriores se construye una matriz básica de datos (MBD) de OTU por estado de los caracteres.
- 4) Obtención de un coeficiente de similitud para cada par posible de OTU: en base a la MBD y utilizando un coeficiente adecuado a los datos que contiene, se calcula la similitud para cada par posible de las unidades taxonómicas.
- 5) Construcción de una matriz de similitud: con los valores de similitud calculados en el paso anterior se construye una matriz de similitud OTU por OTU.
- 6) Conformación de grupos: a base de la matriz de similitud del paso anterior y mediante la aplicación de distintas técnicas (por ejemplo, análisis de agrupamientos) se obtiene la estructura taxonómica del grupo en estudio.
- 7) Generalizaciones: se formulan las generalizaciones acerca de los taxones, tales como: elección de caracteres discriminatorios, relación entre los organismos, inferencias acerca de los taxones, etc.

La **figura 1. 2** constituye un diagrama de flujo de los pasos elementales de las técnicas numéricas.

Finalmente podemos decir, que una clasificación correcta dentro del orden Pezizales que permita definir ajustadamente familias y géneros, debe apoyarse en caracteres que sean claros e independientes. Si comparamos las diferentes clasificaciones propuestas para el orden, podemos observar un cambio gradual de la importancia asignada a caracteres principalmente morfológicos, microscópicos, citológicos y de desarrollo, hacia caracteres ultraestructurales, cariológicos, químicos y moleculares (Carroll, 1967; van Brummelen, 1974, 1975, 1978, 1986, 1987, 1989 a y b, 1993; Samuelson, 1975, 1978 (a, b, c, d); Hung, 1977; Kimbrough

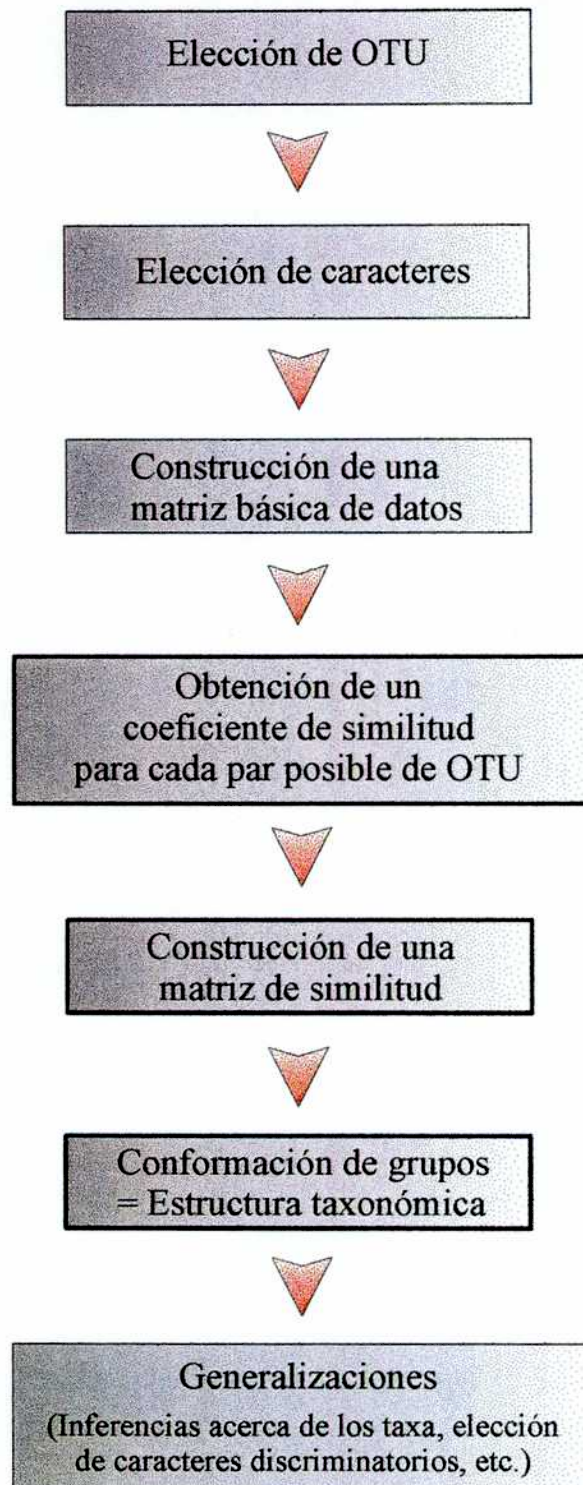


Figura 1. 2. Diagrama de flujo de los pasos elementales para la aplicación de las técnicas de taxonomía numérica. Los pasos recuadrados con líneas de mayor grosor se realizan con la ayuda de computadoras.

y Benny, 1978; Kimbrough y Curry, 1985; Curry y Kimbrough, 1983; Samuelson y Kimbrough, 1978; Samuelson et al., 1980; Bellemere et al., 1990).

Sin embargo, en el caso particular del género *Ascobolus* hay pocos trabajos que intenten diferenciar o caracterizar especies dentro del género, que involucren características que no sean macro y micromorfológicas (Kimbrough y Curry, 1985), (Dokmetzian y Ranalli, 1994).

Objetivos

Con frecuencia en la clasificación tradicional del género *Ascobolus* quedan dudas para establecer los límites entre especies relacionadas o supuestamente relacionadas, muy parecidas morfológicamente entre sí.

Con tal motivo el objetivo del presente trabajo fue establecer la identidad de doce especies del género: *Ascobolus amoenus*, *A. bahiensis*, *A. biguttulatus*, *A. bistisii*, *A. crenulatus*, *A. ferrugineus*, *A. furfuraceus*, *A. gamundii*, *A. immersus*, *A. mancus*, *A. michaudii* y *A. stictoideus* utilizando:

- ◆ los métodos clásicos de la Taxonomía Tradicional
- ◆ las características de cultivo
- ◆ los cruzamientos interespecíficos
- ◆ el análisis isoenzimático.

***MATERIALES
y MÉTODOS***

2. Materiales y Métodos

2. 1. Organismos utilizados

Se trabajó con 4 cepas monospóricas de doce especies del género *Ascobolus*: *A. bahiensis*, *A. gamundii*, *A. biguttulatus*, *A. furfuraceus*, *A. michaudii*, *A. cremulatus*, *A. ferrugineus*, *A. amoenus*, *A. mancus*, *A. bistisii*, *A. immersus* y *A. stictoideus*. Las seis primeras especies pertenecen a la sección *Ascobolus* y las demás a la sección *Dasyobolus* (van Brummelen, 1967).

Todas las cepas pertenecen a la colección de cultivos del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA (BAFC) (tabla 2. 1).

El procedimiento para la obtención de las distintas cepas fue:

2. 1. 1. Recolección de material

Muestras de estiércol procedentes de distintas regiones de la Argentina y de Estados Unidos de América, previamente secadas para eliminar contaminantes superficiales, se colocaron en cajas de Petri con papel de filtro humedecido e incubadas en cámara a 23°C e iluminación constante con el fin de obtener fructificaciones maduras.

2. 1. 2. Obtención de ascosporas

Al madurar las fructificaciones, los ascos expulsaron las ascosporas con violencia; se invirtieron entonces bases de cajas de Petri con agar agua sobre los cultivos para recogerlas. Se trató de obtener cultivos monospóricos axénicos, ya sea a partir de la fructificación original, o bien de las obtenidas a partir de cultivos masivos en el laboratorio.

2. 1. 3. Germinación de ascosporas

Las ascosporas se trataron con NaOH en concentraciones que variaron entre 0.05% y 0.3% dependiendo de las especies, durante 10, 20 ó 30 minutos e incubadas 24 - 48 horas a 37°C (Gamundí y Ranalli, 1964).

2. 1. 4. Obtención de las cepas compatibles con su correspondiente polaridad

Una vez germinadas las ascosporas se realizaron los cultivos monospóricos cortando bloques de agar agua conteniendo una punta de hifa, repicándolos en tubos de ensayo con medio PF en pico de flauta y mantenidas a 5°C. Para obtener las cepas compatibles y determinar su polaridad, se cruzaron de a dos enfrentadas en caja de Petri con medio PF. Cada uno de los cultivos monospóricos de un par compatible se cruzó con cada uno de los cultivos monospóricos de otro par compatible en cajas de Petri con medio PF (Gamundí y Ranalli, 1964) y se incubaron en cámara de cultivo a 23°C y luz constante.

Todas las especies estudiadas son heterotálicas a excepción de *A. cremulatus* y *A. stictoideus* que son homotálicas en cuyo caso no se realizó el cruzamiento entre las cepas.

La **tabla 2. 1** muestra la localidad, sustrato, fecha de recolección, número de cepa (BAFC) y polaridad de todos los aislamientos.

2. 1. 5. Cruzamientos

Los cruzamientos se realizaron en cajas de Petri con medio estándar PF y con papel de filtro al que se le practicaron 8 agujeros de 6 mm de diámetro a 1 cm del borde de la caja; esto último para permitir la observación directa bajo microscopio de los eventos producidos durante el cruzamiento.

Las especies involucradas fueron: *A. furfuraceus*, *A. biguttulatus*, *A. gamundii* y *A. bahiensis* de la sección *Ascobolus* y *A. bistisii* y *A. immersus* de la sección *Dasyobolus*.

Cultivos de 6 días de edad, considerados maduros sexualmente, fueron utilizados como micelio base o como fuente del elemento fertilizante (oídio). En este último caso, la superficie del cultivo se raspó con un ansa y los oídios fueron suspendidos en agua estéril, filtrados a través de algodón para retener restos de hifas, y ajustada su dilución con agua estéril hasta obtener aproximadamente, entre 10-20 oídios por campo visual.

Tabla 2. 1. Listado de cepas utilizadas

SIGLA	ESPECIE	CEPA	POL.	LOCALIDAD	SUS	FECHA	BAFC
bah 2	<i>A. bahiensis</i>	2	+	S. M. de los Andes, NQ, Arg.	vaca	ene-87	719
bah 16	<i>A. bahiensis</i>	16	+	S. M. de los Andes, NQ, Arg.	vaca	ene-87	734
bah 3	<i>A. bahiensis</i>	3	-	S. M. de los Andes, NQ, Arg.	vaca	ene-87	737
bah 15	<i>A. bahiensis</i>	15	-	S. M. de los Andes, NQ, Arg.	vaca	ene-87	745
gam 4	<i>A. gamundii</i>	4	+	Recreo, SF, Arg.	vaca	jun-71	748
gam 1	<i>A. gamundii</i>	1	+	Recreo, SF, Arg.	vaca	jun-71	755
gam 5	<i>A. gamundii</i>	5	-	Recreo, SF, Arg.	vaca	jun-71	765
gam 7	<i>A. gamundii</i>	7	-	Recreo, SF, Arg.	vaca	jun-71	766
big 3	<i>A. biguttulatus</i>	3	+	Michigan, EEUU	conejo	jun-69	769
big 6	<i>A. biguttulatus</i>	6	+	Michigan, EEUU	conejo	jun-69	772
big 4	<i>A. biguttulatus</i>	4	-	Michigan, EEUU	conejo	jun-69	775
big 5	<i>A. biguttulatus</i>	5	-	Michigan, EEUU	conejo	jun-69	792
fur 13	<i>A. furfuraceus</i>	13	+	New York, EEUU	vaca	may-57	793
fur 14	<i>A. furfuraceus</i>	14	-	New York, EEUU	vaca	may-57	794
fur 20	<i>A. furfuraceus</i>	20	-	New York, EEUU	vaca	may-57	802
mich 6	<i>A. michaudii</i>	6	+	Cdad. Universitaria, BA, Arg.	vaca	abr-94	807
mich 15	<i>A. michaudii</i>	15	+	Cdad. Universitaria, BA, Arg.	vaca	abr-94	808
mich 5	<i>A. michaudii</i>	5	-	Cdad. Universitaria, BA, Arg.	vaca	abr-94	815
mich 3	<i>A. michaudii</i>	3	-	Cdad. Universitaria, BA, Arg.	vaca	abr-94	821
cren 1	<i>A. crenulatus</i>	1	Homo	Campana, PBA, Arg.	vaca	abr-94	826
cren 2	<i>A. crenulatus</i>	2	Homo	Campana, PBA, Arg.	vaca	abr-94	827
cren 3	<i>A. crenulatus</i>	3	Homo	Campana, PBA, Arg.	vaca	abr-94	828
cren 4	<i>A. crenulatus</i>	4	Homo	Campana, PBA, Arg.	vaca	abr-94	829
fer 1	<i>A. ferrugineus</i>	1	+	Mburucuyá, CR, Arg.	cuis	sep-72	830
fer 9	<i>A. ferrugineus</i>	9	+	Mburucuyá, CR, Arg.	cuis	sep-72	831
fer 2	<i>A. ferrugineus</i>	2	-	Mburucuyá, CR, Arg.	cuis	sep-72	832
fer 8	<i>A. ferrugineus</i>	8	-	Mburucuyá, CR, Arg.	cuis	sep-72	833
amo 55	<i>A. amoenus</i>	55	+	Guauguaychú, ER, Arg.	vaca	ene-88	836
amo 108	<i>A. amoenus</i>	108	+	Guauguaychú, ER, Arg.	vaca	ene-88	837
amo 54	<i>A. amoenus</i>	54	-	Guauguaychú, ER, Arg.	vaca	ene-88	838
amo 107	<i>A. amoenus</i>	107	-	Guauguaychú, ER, Arg.	vaca	ene-88	840
man 4	<i>A. mancus</i>	4	+	San Pedro, PBA, Arg.	caballo	may-91	841
man 5	<i>A. mancus</i>	5	+	San Pedro, PBA, Arg.	caballo	may-91	847
man 3	<i>A. mancus</i>	3	-	San Pedro, PBA, Arg.	caballo	may-91	848
man 6	<i>A. mancus</i>	6	-	San Pedro, PBA, Arg.	caballo	may-91	849
bis 8	<i>A. bistisii</i>	8	+	Ezeiza, PBA, Arg.	vaca	mar-94	850
bis 10	<i>A. bistisii</i>	10	+	Ezeiza, PBA, Arg.	vaca	mar-94	851
bis 7	<i>A. bistisii</i>	7	-	Ezeiza, PBA, Arg.	vaca	mar-94	852
bis 9	<i>A. bistisii</i>	9	-	Ezeiza, PBA, Arg.	vaca	mar-94	853
imm 3	<i>A. immersus</i>	3	+	Guauguaychú, ER, Arg.	vaca	ene-88	854
imm 9	<i>A. immersus</i>	9	+	Guauguaychú, ER, Arg.	vaca	ene-88	855
imm 7	<i>A. immersus</i>	7	-	Guauguaychú, ER, Arg.	vaca	ene-88	856
imm 10	<i>A. immersus</i>	10	-	Guauguaychú, ER, Arg.	vaca	ene-88	857
stic 4	<i>A. stictoides</i>	4	Homo	Campana, PBA, Arg.	vaca	abr-94	858
stic 5	<i>A. stictoides</i>	5	Homo	Campana, PBA, Arg.	vaca	abr-94	859
stic 6	<i>A. stictoides</i>	6	Homo	Campana, PBA, Arg.	vaca	abr-94	860
stic 7	<i>A. stictoides</i>	7	Homo	Campana, PBA, Arg.	vaca	abr-94	863

Los oídios así obtenidos fueron depositados sobre bloquecitos de agar agua de 5 x 5 x 1 mm de altura y transferidos a la superficie del micelio base, a la altura de las perforaciones del papel de filtro.

Cuando lo que se transfirió sobre el micelio base fueron ápices de hifas, éstos se obtuvieron cortando bloquecitos de agar de 5 x 5 x 1 mm de altura, del borde de una colonia de 6 días de edad, desarrollada sobre agar agua.

Los cruzamientos interespecíficos fueron realizados en todas las combinaciones posibles dentro de cada sección, usando alternativamente las cepas con los alelos A y a de cada especie, como micelio base y elemento fecundante respectivamente. Se hicieron tres réplicas de cada uno y las experiencias se repitieron cinco veces.

Los resultados fueron observados a las 12 - 24 - 48 hs. y 10 días de efectuado el cruzamiento. Cada cruzamiento interespecífico fue acompañado por el cruzamiento específico de cada especie, como testigo.

Los cruzamientos realizados se detallan en las **tablas 2. 2 y 2. 3.**

Tabla 2. 2. Cruzamientos interespecíficos sección *Dasyobolus*

Especies cruzadas	Tipo de cruzamiento	Micelio base	Elemento fecundante	Cruzamientos
<i>A. bistisii</i> x <i>A. immersus</i>	micelio x micelio	<i>A. bistisii</i>	<i>A. immersus</i>	$A_b \times a_i$ $A_b \times A_i$ $a_b \times a_i$ $a_b \times A_i$
<i>A. immersus</i> x <i>A. bistisii</i>	micelio x oídio	<i>A. immersus</i>	<i>A. bistisii</i>	$A_i \times a_b$ $A_i \times A_b$ $a_i \times a_b$ $a_i \times A_b$

A y a: factores de incompatibilidad. b: *A. bistisii*. i: *A. immersus*

Tabla 2. 3. Cruzamientos interespecíficos sección *Ascobolus*

Especies cruzadas	Micelio base	Oídios	Cruzamientos
<i>A. furfuraceus</i> x <i>A. gamundii</i>	<i>A. furfuraceus</i>	<i>A. gamundii</i>	$A_f \times a_g$ $A_f \times A_g$ $a_f \times a_g$ $a_f \times A_g$
<i>A. gamundii</i> x <i>A. furfuraceus</i>	<i>A. gamundii</i>	<i>A. furfuraceus</i>	$A_g \times a_f$ $A_g \times A_f$ $a_g \times a_f$ $a_g \times A_f$
<i>A. furfuraceus</i> x <i>A. bahiensis</i>	<i>A. furfuraceus</i>	<i>A. bahiensis</i>	$A_f \times a_{ba}$ $A_f \times A_{ba}$ $a_f \times a_{ba}$ $a_f \times A_{ba}$
<i>A. bahiensis</i> x <i>A. furfuraceus</i>	<i>A. bahiensis</i>	<i>A. furfuraceus</i>	$A_{ba} \times a_f$ $A_{ba} \times A_f$ $a_{ba} \times a_f$ $a_{ba} \times A_f$
<i>A. furfuraceus</i> x <i>A. biguttulatus</i>	<i>A. furfuraceus</i>	<i>A. biguttulatus</i>	$A_f \times a_{bi}$ $A_f \times A_{bi}$ $a_f \times a_{bi}$ $a_f \times A_{bi}$
<i>A. biguttulatus</i> x <i>A. furfuraceus</i>	<i>A. biguttulatus</i>	<i>A. furfuraceus</i>	$A_{bi} \times a_f$ $A_{bi} \times A_f$ $a_{bi} \times a_f$ $a_{bi} \times A_f$
<i>A. gamundii</i> x <i>A. bahiensis</i>	<i>A. gamundii</i>	<i>A. bahiensis</i>	$A_g \times a_{ba}$ $A_g \times A_{ba}$ $a_g \times a_{ba}$ $a_g \times A_{ba}$
<i>A. bahiensis</i> x <i>A. gamundii</i>	<i>A. bahiensis</i>	<i>A. gamundii</i>	$A_{ba} \times a_g$ $A_{ba} \times A_g$ $a_{ba} \times a_g$ $a_{ba} \times A_g$
<i>A. gamundii</i> x <i>A. biguttulatus</i>	<i>A. gamundii</i>	<i>A. biguttulatus</i>	$A_g \times a_{bi}$ $A_g \times A_{bi}$ $a_g \times a_{bi}$ $a_g \times A_{bi}$
<i>A. biguttulatus</i> x <i>A. gamundii</i>	<i>A. biguttulatus</i>	<i>A. gamundii</i>	$A_{bi} \times a_g$ $A_{bi} \times A_g$ $a_{bi} \times a_g$ $a_{bi} \times A_g$

Tabla 2. 3 (continuación)

Especies cruzadas	Micelio base	Oídios	Cruzamientos
<i>A. bahiensis</i> x <i>A. biguttulatus</i>	<i>A. bahiensis</i>	<i>A. biguttulatus</i>	$A_{ba} \times a_{bi}$ $A_{ba} \times A_{bi}$ $a_{ba} \times a_{bi}$ $a_{ba} \times A_{bi}$
<i>A. biguttulatus</i> x <i>A. bahiensis</i>	<i>A. biguttulatus</i>	<i>A. bahiensis</i>	$A_{bi} \times a_{ba}$ $A_{bi} \times A_{ba}$ $a_{bi} \times a_{ba}$ $a_{bi} \times A_{ba}$

A y a: factores de incompatibilidad

f: *A. furfuraceus*; g: *A. gamundii*; ba: *A. bahiensis*; bi: *A. biguttulatus*.

2. 1. 6. Estudio de la cinética de crecimiento del micelio

Se estudió la cinética de crecimiento de ambas cepas (+ y -) de un par compatible de cada una de las especies detalladas en la tabla 2. 4, en medio líquido GA y bajo condiciones estrictamente controladas de temperatura, iluminación y tiempo de incubación, determinándose el día de máximo crecimiento vegetativo, dato que fue utilizado posteriormente para realizar la cosecha.

Tabla 2. 4. Listado de las cepas utilizadas en el estudio de crecimiento

ESPECIE	CEPA	POL.	LOCALIDAD	SUS	FECHA	BAFC
<i>A. bahiensis</i>	2	+	S. M. de los Andes, NQ, Arg.	vaca	ene-87	719
<i>A. bahiensis</i>	3	-	S. M. de los Andes, NQ, Arg.	vaca	ene-87	737
<i>A. gamundii</i>	4	+	Recreo, SF, Arg.	vaca	jun-71	748
<i>A. gamundii</i>	5	-	Recreo, SF, Arg.	vaca	jun-71	765
<i>A. biguttulatus</i>	6	+	Michigan, EEUU	conejo	jun-69	772
<i>A. biguttulatus</i>	5	-	Michigan, EEUU	conejo	jun-69	792
<i>A. furfuraceus</i>	13	+	New York, EEUU	vaca	may-57	793
<i>A. furfuraceus</i>	14	-	New York, EEUU	vaca	may-57	794
<i>A. michaudii</i>	6	+	Cdad. Universitaria, BA, Arg.	vaca	abr-94	807
<i>A. michaudii</i>	5	-	Cdad. Universitaria, BA, Arg.	vaca	abr-94	815
<i>A. crenulatus</i>	2	homo	Campana, PBA, Arg.	vaca	abr-94	827
<i>A. ferrugineus</i>	1	+	Mburucuyá, CR, Arg.	cuis	sep-72	830
<i>A. ferrugineus</i>	2	-	Mburucuyá, CR, Arg.	cuis	sep-72	832
<i>A. amoenus</i>	108	+	Gualeguaychú, ER, Arg.	vaca	ene-88	837
<i>A. amoenus</i>	54	-	Gualeguaychú, ER, Arg.	vaca	ene-88	838
<i>A. mancus</i>	5	+	San Pedro, PBA, Arg.	caballo	may-91	847
<i>A. mancus</i>	6	-	San Pedro, PBA, Arg.	caballo	may-91	849
<i>A. bistisii</i>	10	+	Ezeiza, PBA, Arg.	vaca	mar-94	851
<i>A. bistisii</i>	9	-	Ezeiza, PBA, Arg.	vaca	mar-94	853
<i>A. immersus</i>	3	+	Gualeguaychú, ER, Arg.	vaca	ene-88	854
<i>A. immersus</i>	7	-	Gualeguaychú, ER, Arg.	vaca	ene-88	856
<i>A. stictoides</i>	6	homo	Campana, PBA, Arg.	vaca	abr-94	860

2. 1. 7. Obtención del micelio

Manteniendo las mismas condiciones experimentales que en el estudio de las cinéticas de crecimiento, se cosechó el micelio de las cepas +, - y mixtas (+ -).

El micelio fue cosechado por filtración en embudo Buchner a presión reducida a través de papel de filtro Whatman GP. El micelio retenido fue lavado con agua bidestilada y secado en estufa a 70°C durante 24 hs.

2. 2. Medios de cultivo

2. 2. 1. Medios sólidos

Medio AA (agar agua)

Agar	18 g
Agua destilada	1000 ml

Medio PF (papel de filtro)

Extracto de levadura (Difco)	3 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 ml

En cajas de Petri o tubo, con un disco o tira de papel de filtro Schleider et Schuell N° 859.

2. 2. 2. Medio líquido

Medio sintético GA (glucosa - asparagina)

SO ₄ Mg.7H ₂ O	0.5 g
PO ₄ H ₂ K	0.5 g
PO ₄ HK ₂	0.6 g
SO ₄ Cu.5H ₂ O	0.4 mg
Cl ₂ Mn.4H ₂ O	0.09 mg
BO ₃ H ₃	0.07 mg
MoO ₂ Na.2H ₂ O	0.02 mg
Cl ₃ Fe	1 mg
Cl ₂ Zn	10 mg

Biotina	5	µg
HCl-Tiamina	0.1	mg
Glucosa	15	g
L- asparagina	4	g
Agua bidestilada	hasta 1000	ml

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

2. 3. Condiciones de cultivo

Los cultivos en medios sólidos se realizaron en cajas de Petri de 90 mm de diámetro con 20 ml de medio y un disco de papel de filtro estéril y en tubo de ensayo con medio en pico de flauta y una tira de papel de filtro de 1 x 5 cm.

Los cultivos en medio líquido se realizaron en frascos erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio, se taparon con tapones de algodón forrados con gasa quirúrgica y se cubrieron con papel de aluminio.

Inóculos e incubación

Los cultivos se inocularon con cubos de 9 mm² provenientes del borde de una colonia de 3 - 4 días de crecimiento en AA.

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

2. 4. Estimación del crecimiento

Se utilizó el peso seco como estimador del crecimiento en el tiempo y éste se realizó pesando el micelio retenido en el filtro y secado. Los resultados presentados son el promedio de dos mediciones para cada punto con un error estándar menor al 5% y se expresan como mg de micelio por ml de medio de cultivo.

2. 5. Obtención de las muestras

Para obtener las muestras a procesar se cosechó el micelio crecido en medio líquido GA por filtración a través de papel de filtro en embudo Buchner y a presión reducida, el día de máximo crecimiento hallado para cada una de las cepas de los pares compatibles de cada especie.

Las muestras mixtas se obtuvieron inoculando los erlenmeyers con medio líquido GA con cada una de las cepas de los pares compatibles y se cosechó el día de máximo crecimiento menor cuando existían diferencias entre las dos cepas; en caso contrario se mantuvo el mismo criterio que en las cepas únicas.

El micelio fue lavado tres veces con agua bidestilada, secado con papel de filtro y guardado a -70°C hasta su procesamiento (Dessauer et al., 1984).

El micelio creció formando masas esféricas de consistencia "dura", por lo que fue necesario moler con mortero al menos tres veces luego de congelarlo con aire líquido (nitrógeno líquido) cada vez.

Posteriormente fue molido con buffer de extracción (Soltis et al., 1983), fraccionado en alícuotas y congelado a -70°C hasta la siembra (Dessauer, 1984).

Buffer de extracción

Buffer Tris-HCl 100 mM, pH 7.5	25 ml
2- mercaptoetanol (0.1% v/v)	0.025 ml
Ac. etilendiaminotetracético (EDTA) (1mM)	0.010 g
ClK (10 mM)	0.019 g
$\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 mM)	0.05 g
Polivinilpirrolidona (PVP) 10.000 (10% p/ v)	2 g

El total de las muestras analizadas se consignan en la **tabla 2. 5**.

**Tabla 2. 5. Listado del total de las muestras utilizadas en el análisis
isoenzimático**

Sección Ascobolus				Sección Dasyobolus			
SIGLA	ESPECIE	CEPA	POL.	SIGLA	ESPECIE	CEPA	POL.
bah 2+	<i>A. bahiensis</i>	2	+	fer 1+	<i>A. ferrugineus</i>	1	+
bah 16 +	<i>A. bahiensis</i>	16	+	fer 9+	<i>A. ferrugineus</i>	9	+
bah 3 -	<i>A. bahiensis</i>	3	-	fer 2-	<i>A. ferrugineus</i>	2	-
bah 15-	<i>A. bahiensis</i>	15	-	fer 8-	<i>A. ferrugineus</i>	8	-
bah 2+3	<i>A. bahiensis</i>	2 y 3	mixta	fer 1+2	<i>A. ferrugineus</i>	1 y 2	mixta
bah 16+15	<i>A. bahiensis</i>	16 y 15	mixta	fer 9+8	<i>A. ferrugineus</i>	9 y 8	mixta
gam 4+	<i>A. gamundii</i>	4	+	amo 55+	<i>A. amoenus</i>	55	+
gam 1+	<i>A. gamundii</i>	1	+	amo 108+	<i>A. amoenus</i>	108	+
gam 5-	<i>A. gamundii</i>	5	-	amo 54-	<i>A. amoenus</i>	54	-
gam 7-	<i>A. gamundii</i>	7	-	amo 107-	<i>A. amoenus</i>	107	-
gam 4+5	<i>A. gamundii</i>	4 y 5	mixta	amo 55+54	<i>A. amoenus</i>	55 y 54	mixta
gam 1+7	<i>A. gamundii</i>	1 y 7	mixta	amo 108+107	<i>A. amoenus</i>	108y 107	mixta
big 3+	<i>A. biguttulatus</i>	3	+	amo 108+54	<i>A. amoenus</i>	108y54	mixta
big 6+	<i>A. biguttulatus</i>	6	+	amo 55+107	<i>A. amoenus</i>	55y 107	mixta
big 4-	<i>A. biguttulatus</i>	4	-	man 4+	<i>A. mancus</i>	4	+
big 5-	<i>A. biguttulatus</i>	5	-	man 5+	<i>A. mancus</i>	5	+
big 3+4	<i>A. biguttulatus</i>	3 y 4	mixta	man 3-	<i>A. mancus</i>	3	-
big 6+5	<i>A. biguttulatus</i>	6 y 5	mixta	man 6-	<i>A. mancus</i>	6	-
fur 13+	<i>A. furfuraceus</i>	13	+	man 4+3	<i>A. mancus</i>	4 y 3	mixta
fur 14-	<i>A. furfuraceus</i>	14	-	man 5+6	<i>A. mancus</i>	5 y 6	mixta
fur 20-	<i>A. furfuraceus</i>	20	-	bis 8+	<i>A. bistisii</i>	8	+
fur 13+14	<i>A. furfuraceus</i>	13 y 14	mixta	bis 10+	<i>A. bistisii</i>	10	+
fur 19+20	<i>A. furfuraceus</i>	19 y 20	mixta	bis 7-	<i>A. bistisii</i>	7	-
mich 6+	<i>A. michaudii</i>	6	+	bis 9-	<i>A. bistisii</i>	9	-
mich 15+	<i>A. michaudii</i>	15	+	bis 8+7	<i>A. bistisii</i>	8 y 7	mixta
mich 5-	<i>A. michaudii</i>	5	-	bis 10+9	<i>A. bistisii</i>	10 y 9	mixta
mich 3-	<i>A. michaudii</i>	3	-	imm 3+	<i>A. immersus</i>	3	+
mich 6+5	<i>A. michaudii</i>	6 y 5	mixta	imm 9+	<i>A. immersus</i>	9	+
mich 15+3	<i>A. michaudii</i>	15 y 3	mixta	imm 7-	<i>A. immersus</i>	7	-
cren 1	<i>A. crenulatus</i>	1	homo	imm 10-	<i>A. immersus</i>	10	-
cren 2	<i>A. crenulatus</i>	2	homo	imm 3+7	<i>A. immersus</i>	3 y 7	mixta
cren 3	<i>A. crenulatus</i>	3	homo	imm 9+10	<i>A. immersus</i>	9 y 10	mixta
cren 4	<i>A. crenulatus</i>	4	homo	stic 4	<i>A. stictoideus</i>	4	homo
				stic 5	<i>A. stictoideus</i>	5	homo
				stic 6	<i>A. stictoideus</i>	6	homo
				stic 7	<i>A. stictoideus</i>	7	homo

2. 6. Técnicas electroforéticas para el análisis isoenzimático

2. 6. 1. Sistemas isoenzimáticos analizados

Los sistemas isoenzimáticos que se probaron, su abreviatura y el número de enzima recomendado por la IUPAC-IUB (Enzyme Nomenclature, 1984) fueron:

Sistema	Abreviat.	EC N°
Alcohol dehidrogenasa	ADH	1.1.1.1
Aspartato aminotransferasa	AAT	2.6.1.1
Catalasa	CAT	1.11.1.6
Enzima málica	EM	1.1.1.40
Esterasa	EST	3.1.1...
Fosfatasa ácida	ACP	3.1.3.2
Fosfatasa alcalina	ALP	3.1.3.1
Glucosa 6-fosfato dehidrogenasa	G6PD	1.1.1.49
Glutamato dehidrogenasa	GDH	1.4.1.3
Isocitrato dehidrogenasa	IDH	1.1.1.42
Malato dehidrogenasa	MDH	1.1.1.37
Peroxidasa	PER	1.11.1.7
Superóxido dismutasa	SOD	1.15.1.1

Para lograr óptimas condiciones experimentales en cada uno de los sistemas mencionados, se emplearon diferentes buffers de corrida y en la preparación de los geles con la finalidad de lograr buena resolución en las bandas.

Las pruebas para la elección de las condiciones para cada sistema se realizaron con las muestras indicadas en la **tabla 2. 6.**

Tabla 2. 6

ESPECIE	CEPA	POL	LOCALIDAD	SUS	FECHA	BAFC
A. bahiensis	2	+	S. M. de los Andes, NQ, Arg	vaca	ene-87	719
A. gamundii	1	-	Recreo, SF, Arg	vaca	jun-71	755
A. furfuraceus	13	+	New York, EEUU	vaca	may-57	793
A. ferrugineus	8	-	Mburucuyá, CR, Arg.	cuis	sep-72	832
A. mancus	5	+	San Pedro, PBA, Arg.	caballo	may-91	847
A. bistisii	7	-	Ezeiza. PBA, Arg.	vaca	mar-94	852

2. 6. 2. Condiciones de electroforesis y preparación de los geles

Se empleó la técnica de electroforesis horizontal en geles de poli(acrilamida), (Beckman y Johnson, 1964), al 7% (Saidman, 1985). Cada gel fue preparado de la siguiente manera:

Acrilamida	5.25 g
N,N'-metilen-bis-acrilamida	0.15 g
N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED)	100 μ l
persulfato de amonio	punta de espátula
buffer	c.s.p. 75 ml

La acrilamida y la bis-acrilamida se disolvieron en el buffer elegido y se agregaron el TEMED y el persulfato de amonio como agentes gelificantes. Se agitó la solución y se volcó sobre una cubeta de vidrio cuyas dimensiones internas fueron: 15 cm de ancho x 17 cm de largo x 0.2 cm de espesor. La polimerización se produjo en ausencia de aire, lo que se logró cubriendo la cubeta con una placa de vidrio evitando la formación de burbujas. Los geles se dejaron a temperatura ambiente hasta el día siguiente.

2. 6. 3. Siembra del material en los geles

Una vez descongelado el material y siempre trabajando en frío, se absorbieron los extractos en rectángulos de papel Whatmann 3 MM de 2 mm x 4 mm que fueron introducidos en ranuras hechas en el gel. En los casos en que se necesitaron hendiduras más largas (papeles de 2mm x 8 mm) se las realizó con un bisturí uniendo dos calles contiguas.

A 2 cm del borde de los geles polimerizados se practicaron 20 ranuras utilizando un peine de acero inoxidable con 20 dientes de 4mm de ancho x 2 mm de espesor, separados por 4 mm entre sí. De esta manera se obtuvieron 20 ranuras espaciadas regularmente y alineadas, donde se introdujeron los papeles de filtro embebidos en el homogenato de la muestra a analizar.

Sobre la siembra se colocó azul de bromofenol (4 mg/ml) como colorante de frente y se cubrió cada gel con papel adhesivo transparente "Saran Wrapp" para evitar la evaporación y secado de los geles antes de la corrida electroforética.

Dado que todas las bandas estudiadas para los diferentes sistemas isoenzimáticos analizados fueron de migración anódica, las ranuras practicadas en el gel se realizaron en el extremo correspondiente al cátodo.

2. 6. 4. Corrida electroforética

La corrida electroforética se realizó en cámara fría a 4°C para evitar el calentamiento de los geles durante la migración y la consecuente desnaturalización de las proteínas. Se utilizaron cubas electroforéticas de acrílico transparente construidas en el laboratorio, de 0.5 cm de espesor, 40 cm de largo, 20 cm de ancho y 8 cm de alto, divididas en tres sectores: el anódico, el catódico y uno intermedio. Los sectores anódico y catódico, con electrodos de acero inoxidable de 1.5 cm de ancho y 1 mm de espesor, se llenaron con aproximadamente 300 ml de buffer cada uno.

Se colocaron en cada cuba dos cubetas con los geles sembrados y los puentes de contacto entre el buffer de la cuba y los geles se realizaron utilizando paños esponja absorbentes de 18 cm x 12 cm, los que fueron enjuagados con agua destilada luego de cada corrida. Colocadas las mechas sobre los geles se cubrió todo con papel "Saran Wrapp" y una placa de vidrio.

Los geles se sometieron a una diferencia de potencial de 120 volts, durante aproximadamente 5 horas, hasta que el frente marcado con azul de bromofenol llegó a 1 cm de la mecha del extremo anódico, luego de lo cual se procedió a revelar las diferentes zonas de actividad enzimática.

2. 6. 5. Buffers de corrida y de los geles

Buffer R: Scandalios (1969) (modificado)

Sol. A	LiOH (0.06 M)	2.51 g	
	Acido bórico (0.3 M)	18.55 g	
	H ₂ O bidestilada	csp 1000 ml	pH: 8.1

Sol. B	Tris (0.03 M)	3.63 g	
	Ac. cítrico anhidro (5 mM)	0.96 g	
	H ₂ O bidestilada	csp 1000 ml	pH: 8.5

La solución A fue utilizada como buffer de corrida y los geles se prepararon con 9B:1A.

Buffer 4: Selander et al., 1971 (modificado)

Corrida:	Tris (0.223 M)	27 g	
	Acido cítrico anhidro (0.094 M)	18.07 g	
	NaOH	2 g	
	H ₂ O bidestilada	csp 1000 ml	pH: 7
Gel:	Tris (0.008 M)	0.97 g	
	Acido cítrico anhidro (3 mM)	0.63 g	
	NaOH	0.11 g	
	H ₂ O bidestilada	csp 1000 ml	pH: 6.5

Buffer 5: Soltis, 1983

Tris (0.135 M)	16.31 g	
Acido cítrico anhidro (0.032 M)	6.18 g	
H ₂ O bidestilada	csp 1000 ml	pH: 8

Los geles se prepararon con 67 ml del buffer llevados a 1000 ml con agua bidestilada.

Buffer 6: Soltis, 1983

Corrida:	Acido bórico (0.3 M)	18.55 g	
	NaOH (0.1 M)	4 g	
	H ₂ O bidestilada	csp 1000 ml	pH: 8
Gel:	Tris (0.015 M)	1.84 g	
	Acido cítrico anhidro (0.004 M)	0.69 g	
	H ₂ O bidestilada	csp 1000 ml	pH: 8.6

Para lograr una mejor resolución de las bandas se ensayaron todos los sistemas con los buffers que se indican a continuación:

Sistemas	Buffers
AAT	R
ACP	4 y 6
ADH	5, 6 y R
ALP	4 y R
CAT	4 y R
EM	R
EST	R
G6PD	4, 5 y 6
GDH	4 y R
IDH	4
MDH	4 y R
PER	6 y R
SOD	R

2. 6. 6. Tinciones enzimáticas

Concluida la corrida electroforética se retiraron los geles del frío, se quitaron los papeles y se procedió al revelado siguiendo diferentes protocolos de tinción.

Los sistemas ACP, G6PD, ALP, IDH, ADH, CAT y PER fueron revelados según Manchenko (1994); los sistemas EST, SOD, GDH, MDH y EM según Wendel y Weeden (1989) y el sistema AAT según Vallejos (1983).

No todos los sistemas isoenzimáticos analizados tuvieron buena resolución con lo que fueron clasificados en tres grupos:

grupo A) con buena resolución para todos los aislamientos

grupo B) con buena resolución para algunos aislamientos

grupo C) con pobre o ninguna resolución.

La ausencia de bandas, la mala o escasa resolución de las mismas, determinaron la eliminación de diferentes combinaciones, empleándose entonces sólo aquellas combinaciones que mostraron mejor actividad enzimática:

grupo A	grupo B	grupo C
IDH	G6PD	ADH
GDH	ALP	CAT
EST	MDH	PER
AAT	EM	
SOD		
ACP		

Los buffers de corrida y de los geles utilizados para los sistemas elegidos (grupo A) fueron: AAT, EST y SOD: buffer R y ACP, IDH y GDH: buffer 4.

Las tinciones realizadas en los sistemas elegidos son reacciones cromogénicas, ya que forman cromóforos.

Los zimogramas pueden ser positivamente o negativamente coloreados. En los primeros aparecen bandas coloreadas, producto de la actividad enzimática sobre fondo incoloro y en los segundos, bandas incoloras sobre fondo coloreado si el color se forma por la reacción con el sustrato.

Existen diferentes reacciones cromogénicas, en este estudio sólo se utilizaron dos de ellas: 1) las que forman productos que reducen sales de tetrazolio y 2) las que forman productos capaces de acoplarse con sales de diazonio.

Pertencen al primer grupo los sistemas GDH, IDH y SOD. Estas enzimas producen NADH(PH) que es un dador de electrones; estos electrones reducen las sales de tetrazolio (que es un buen aceptor de electrones) y se forma un precipitado insoluble en agua intensamente coloreado, el formazán. La fenacina metasulfato (PMS) es un catalizador intermediario.

Los sistemas ACP, AAT y EST pertenecen al segundo grupo. Estas enzimas hidrolíticas (ACP y EST) y no hidrolíticas (AAT) se visualizan usando sustratos artificiales como los derivados del naftol y de la naftilamina.

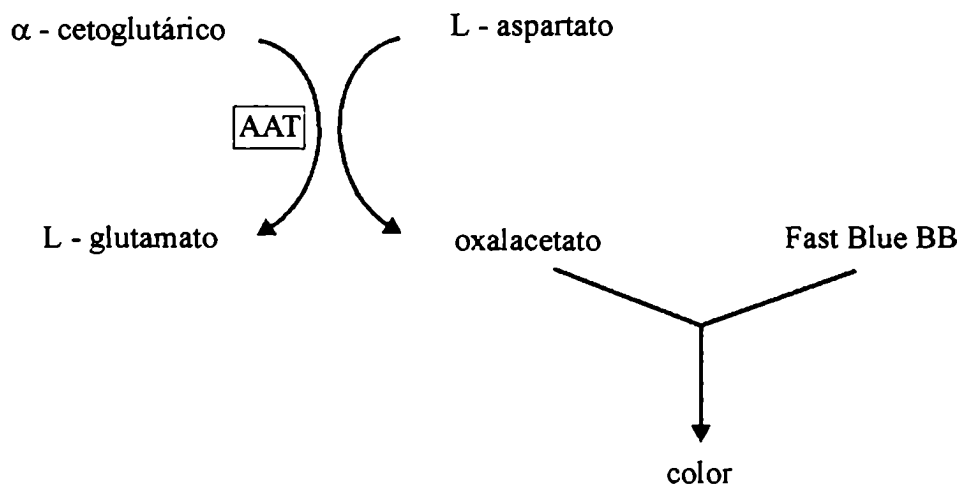
Cuando el naftol o la naftilamina se liberan enzimáticamente se acoplan con la sal de diazonio (fast black K, fast blue RR, fast blue B). Se forma un precipitado coloreado en el área del gel donde se produjo la actividad de la enzima hidrolasa.

2. 6. 7. Detalle de las tinciones enzimáticas utilizadas

2. 6. 7. 1. ASPARTATO AMINO TRANSFERASA: Protocolo de tinción según Vallejos (1983)

Buffer Tris ClH 100 mM, pH 8.5	50 ml
Ac. L-aspartico (sal monosódica)	100 mg
Ac. α -cetoglutárico (sal disódica)	50 mg
Piridoxal 5' fosfato	10 mg
Fast Blue BB	150 mg

Esquema de la reacción:

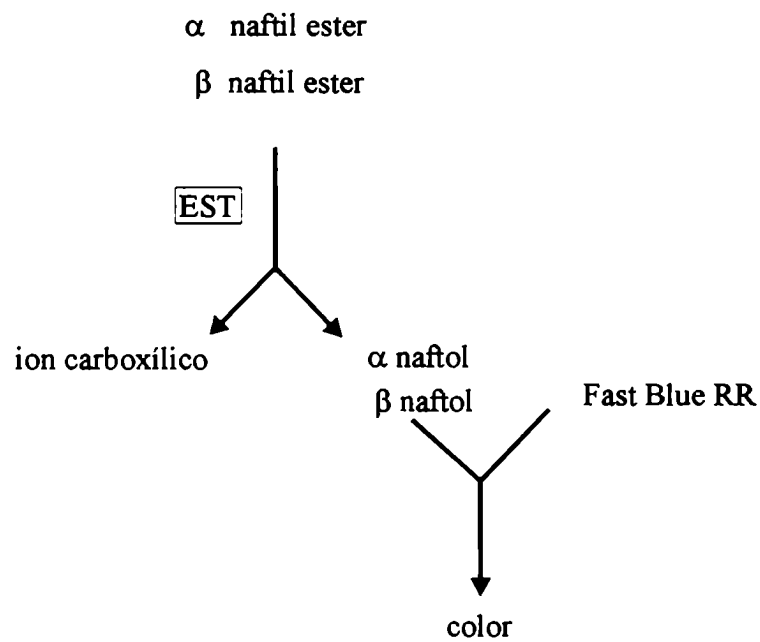


Se disolvieron los reactivos justo antes de la tinción, se volcó sobre el gel, se incubó en oscuridad envuelto en bolsa de polietileno negro y a 37°C hasta la aparición de bandas azules sobre fondo naranja rojizo. Luego se lavó el gel y se sumergió en solución fijadora universal: etanol, agua y acético (5:5:1).

2. 6. 7. 2. ESTERASA: Protocolo de tinción según Wendel y Weeden modificado por Saidman (1985)

Buffer fosfato 100 mM. pH 6.0	50 ml
α naftil acetato	30 mg
β naftil acetato	30 mg
Fast Blue RR	50 mg

Esquema de la reacción:

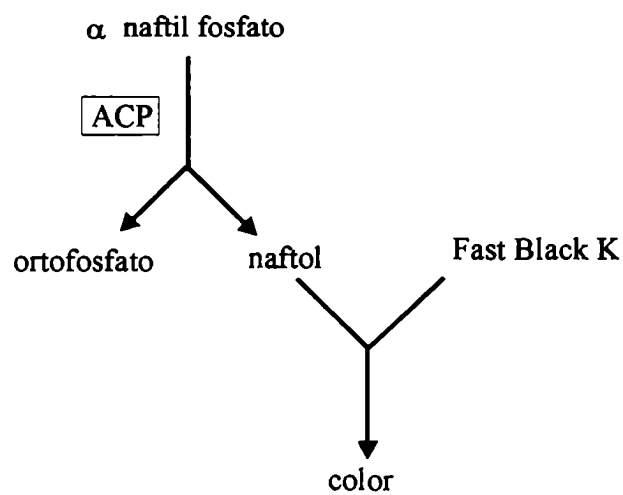


Se disolvió el colorante en el buffer con agitación y calor y los sustratos en 1 ml de acetona. Se mezclaron ambas soluciones, se volcó sobre el gel y se incubó en oscuridad y a 37°C hasta la aparición de las bandas. Luego se lavó el gel y se sumergió en solución fijadora universal.

2. 6. 7. 3. FOSFATASA ACIDA: Protocolo de tinción según Manchenko, 1994
(modificado)

Buffer acetato 50 mM, pH 5.0	50 ml
α naftil fosfato (sal disódica)	50 mg
Cl ₂ Mg 1M	0.5 ml
Fast Black K	50 mg

Esquema de la reacción:

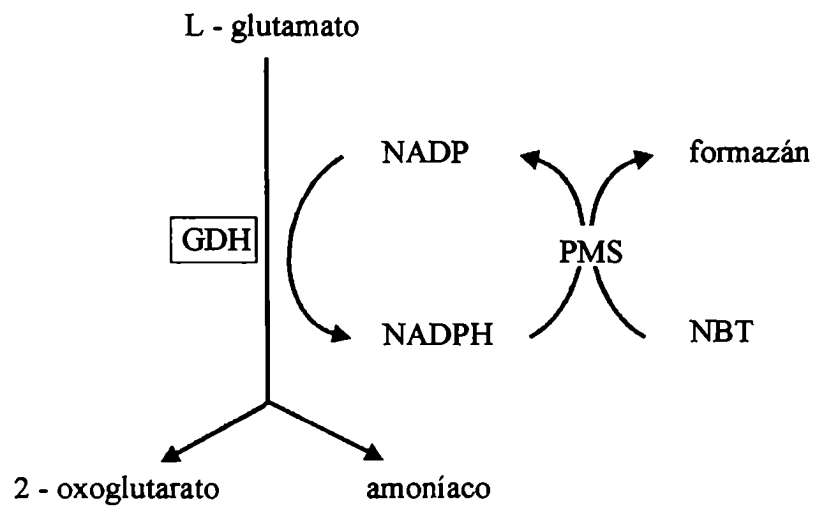


Se disolvieron la sal y el colorante en el buffer, se volcó sobre el gel y se incubó en oscuridad y a 37°C hasta la aparición de las bandas. Luego se lavó el gel y se sumergió en solución fijadora universal.

2. 6. 7. 4. GLUTAMATO DEHIDROGENASA: Protocolo de tinción según
Wendel y Weeden (1989) (modificado):

Buffer Tris ClH 50 mM, pH 8	50 ml
Acido L-glutámico	200 mg
NADP	10 mg
NBT	10 mg
PMS	2 mg

Esquema de la reacción:

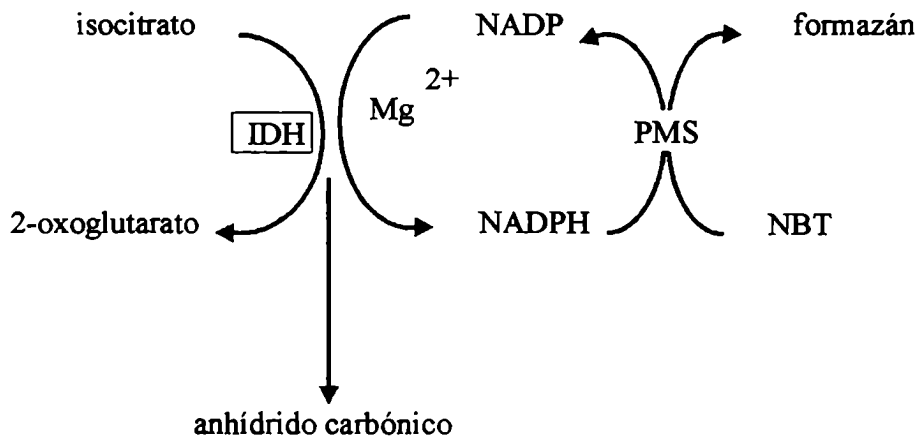


Se disolvieron los reactivos en el buffer, se volcó sobre el gel, se incubó en oscuridad y a 37°C hasta la aparición de bandas azules. Luego se lavó el gel y se sumergió en solución fijadora universal.

2. 6. 7. 5. ISOCITRATO DEHIDROGENASA: Protocolo de tinción según Manchenko (1994) (modificado)

Buffer Tris ClH 0.1 M, pH 8	50 ml
Ac. isocítrico	100 mg
NADP	10 mg
NBT	10 mg
PMS	2 mg
Cl ₂ Mg 1 M	0.5 ml

Esquema de la reacción:

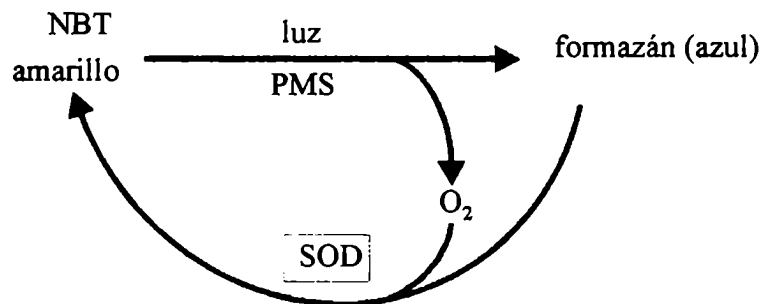


Se disolvieron los reactivos en el buffer, se volcó sobre el gel, se incubó en oscuridad y a 37°C hasta la aparición de bandas azules. Luego se lavó el gel y se sumergió en solución fijadora universal.

2. 6. 7. 6. SUPEROXIDO DISMUTASA: Protocolo de tinción según Wendel y Weeden (1989)

Buffer Tris ClH 100 mM, pH 8.0	50 ml
Nitro blue tetrazolio (NBT)	10 mg
Fenazina metasulfato (PMS)	2.5 mg
NAD	12.5 mg
Ac. etilendiaminotetracético (EDTA)	punta de espátula

Esquema de la reacción:



Se disolvieron los reactivos en el buffer, se volcó sobre el gel, se cubrió con papel plástico autoadherente para evitar la evaporación y se incubó bajo la luz de una lámpara de 75W hasta la aparición de bandas claras sobre un fondo azul intenso (zimograma negativamente coloreado). Luego se lavó el gel y se sumergió en solución fijadora universal.

2. 6. 8. Acondicionamiento de los geles

Para todos los sistemas isoenzimáticos descritos en el presente estudio, los geles fijados fueron fotografiados con una cámara reflex y con luz suministrada por un transiluminador. Posteriormente fueron guardados en bolsas de polietileno selladas con calor.

2. 6. 9. Cálculo de la movilidad relativa de las bandas

Cada corrida electroforética se repitió dos veces y se calculó la movilidad relativa (Rf) de cada una de las bandas obtenidas en los seis sistemas enzimáticos para todas las muestras, como cociente entre la distancia recorrida por cada banda y la distancia del frente.

Luego se promediaron los Rf y estos valores se utilizaron para designar las diferentes bandas.

2. 7. Técnicas numéricas

2. 7. 1. Análisis de los caracteres morfológicos y de cultivo

Se analizaron veintitrés características morfológicas y de cultivo para cada especie. Estas características se obtuvieron en los descendientes a partir del cruzamiento de los pares compatibles de cada especie crecidos en estiércol tindalizado. Las características cualitativas y de cultivo se codificaron según muestra la **tabla 2. 7**. Las variables cuantitativas se midieron en micrones.

2. 7. 2. Análisis de los caracteres isoenzimáticos

Se analizaron 41 caracteres correspondientes a las bandas de actividad enzimática.

Tabla 2. 7. Listado de los caracteres morfológicos y de cultivo

Carácter		Estados	Codificación
1. Sexualidad		homotálico	1
		heterotálico	2
2. Tipo de desarrollo		hemiangiocárpico	1
		angiocárpico	2
3. Distrib. de apotecios en sustrato natural		gregarios	1
		solitarios	2
		solitarios o gregarios	3
Apotecio	4. Color	verde amarillento	1
		verde claro	2
		isabelino	3
	5. Diámetro mín.	medido en micrones	
	6. Diámetro máx.	medido en micrones	
Asco	7. Largo mínimo	medido en micrones	
	8. Largo máximo	medido en micrones	
	9. Ancho mínimo	medido en micrones	
	10. Ancho máximo	medido en micrones	
Ascospora	11. Largo mínimo	medido en micrones	
	12. Largo máximo	medido en micrones	
	13. Ancho mínimo	medido en micrones	
	14. Ancho máximo	medido en micrones	

Tabla 2. 7 (cont.)

Germinación de ascosporas en AA	15. % de NaOH	< 0.2%	1
		≥ 0.2 %	2
	16. Tiempo tratam.	10 minutos	1
		20 minutos	2
		30 minutos	3
	17. Tiempo incub.	24 horas	1
		48 horas	2
Cultivo en PF	18. Ap. pr. 1er.día	< 5to. día	1
		≥ 5to. día	2
	19. Ap. pr. últ. día	< 6to. día	1
		≥ 6to. día	2
	20. Distr. apotec.	toda la caja	1
		línea ½ y + femenino	2
		línea ½ y toda la caja	3
	21. Lib. ascsp. 1er. d	< 10mo. día	1
		≥ 10mo. día	2
	22. Lib. ascsp. últ. d.	< 12do. día	1
≥ 12do. día		2	
23. Oídios	presencia	1	
	ausencia	2	

2. 7. 3. Análisis de agrupamientos

A partir de la matriz básica de datos se calculó el coeficiente de similitud de Gower (Sneath y Sokal, 1973), Sorensen (1948) y Jaccard (1908) 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, ternarios y cuantitativos. La matriz resultante fue analizada por el método de medias no ponderadas (UPGMA)

(Sneath y Sokal, 1973). El análisis se realizó con el programa Multivariate Statistical Package (MVSP), (Kovach, 1993). La distorsión producida durante el análisis de agrupamiento se calculó a partir del coeficiente de correlación cofénetica (r) (Sokal y Rohlf, 1962), utilizando el programa NTSYS-PC (Rohlf, 1993). Los valores de dicho coeficiente habitualmente oscilan entre 0,6 y 0,9 siendo los cercanos o mayores a 0,9, indicadores de escasa distorsión.

*RESULTADOS
y DISCUSIÓN*

3. Resultados y Discusión

3. 1. Identificación de las especies

Trozos de estiércol coleccionado en distintas localidades se colocaron en cámara húmeda y al cabo de 10 – 12 días, al madurar los apotecios y utilizando caracteres macro y micromorfológicos se identificaron las distintas especies. Se recogieron las ascosporas expulsadas y se obtuvieron los cultivos monospóricos.

En las especies heterotálicas, los cultivos monospóricos se cruzaron de a pares sobre estiércol tinalizado y se seleccionaron dos pares compatibles para cada una de ellas. En las especies homotálicas se trabajó con las cepas monospóricas.

3. 2. Caracteres morfológicos y de cultivo

Los caracteres morfológicos y de cultivo considerados para el análisis que se consignan en la **tabla 2. 7** (págs. 43-44) se obtuvieron de los cruzamientos compatibles para cada especie crecidos en estiércol tinalizado, que resultó ser el mejor medio de cultivo debido a su parecido con el sustrato natural en que se desarrollan estas especies.

3. 2. 1. Sexualidad

Dentro del género *Ascobolus* encontramos especies homotálicas y heterotálicas; ambos términos fueron empleados por primera vez en hongos por Blakeslee (1904, a, b), haciéndolos corresponder a los de monoico y dioico en plantas superiores. Concluye diciendo que el micelio de una especie homotálica es bisexual, mientras que el micelio de una heterotálica es unisexual. Whitehouse (1949) considera que se ha producido una confusión acerca del término heterotalismo, resultado de la aplicación del mismo a dos fenómenos distintos. Por un lado se lo ha empleado como equivalente de haplo-dioicismo al describir el comportamiento de *Dyctyuchus monosporus* (Couch, 1926), y por otro como equivalente de autoincompatibilidad en *Ascobolus magnificus* (Gwynne – Vaughan y Williamson, 1932). Ambos hongos se parecen a Mucorales heterotálicas en que los

gametangios se forman al ponerse en contacto las cepas compatibles, pero en *Dyctyuchus monosporus* anteridios y oogonios son producidos por distintas cepas, en *A. magnificus* cada cepa forma ambos, pero un ascogonio puede solamente ser fertilizado por un anteridio del micelio compatible.

Para distinguir entre estos dos fenómenos, hasta el momento incluidos bajo el término heterotalismo, varios autores, entre otros Gwynne – Vaughan (1928), Hansen y Snyder (1943), Dodge (1945), sugirieron que el término dioico o haplo – dioico fuera aplicado a la condición en la cual hay una separación de los sexos en diferentes individuos y el término heterotálico restringido a las especies con autoincompatibilidad.

Whitehouse (1949) aclara que se han formulado numerosas objeciones a esta denominación y propone el uso de los términos heterotalismo morfológico y heterotalismo fisiológico, respectivamente. Define al heterotalismo (utilizando palabras de Blakeslee) como “la condición para la reproducción sexual, tal que la conjugación es posible únicamente a través de la interacción de dos talos diferentes”. Al heterotalismo morfológico, como la reproducción sexual que ocurre solamente a través de la asociación de dos talos que difieren en sexo, es decir, en la morfología de sus gametas o gametangios y al heterotalismo fisiológico como la reproducción sexual que ocurre solamente a través de la asociación de dos talos que difieren fisiológicamente, pero que no muestran diferencias morfológicas en sus gametas o gametangios que permitan diferenciar los sexos.

De acuerdo con estas definiciones y considerando una especie homotálica como aquella capaz de cumplir su ciclo biológico a partir de una cepa monospórica, podemos agrupar las especies estudiadas en:

a) Homotálicas: *A. cremulatus*

A. stictoideus

b) Heterotálicas:

◆ con heterotalismo fisiológico (hermafroditas, pero autoincompatibles)

A. bahiensis

A. amoenus

A. gamundii

A. mancus

A. biguttulatus

A. bistisii

A. furfuraceus

A. immersus

A. michaudii

♦ con heterotalismo morfológico: *A. ferrugineus*

En este caso no se pudo distinguir en las cepas monospóricas que crecían separadamente, las dos categorías morfológicas que podríamos designar como masculina y femenina, ya que los cultivos monospóricos que crecen separadamente, no forman ascogonios, y estos son inducidos en su formación por la presencia del micelio compatible. No obstante, se pudo comprobar una evidente unidireccionalidad en la transferencia de los núcleos previa a la singamia, según la cual, una de las cepas compatibles siempre actúa como receptora femenina y forma ascogonios, mientras que la otra actúa como donante masculina.

3. 2. 2. Desarrollo del apotecio

Coemans (1862) fue el primer autor que dio una descripción del desarrollo de la fructificación en una especie de *Ascobolus* y posteriormente Janczewski (1871) estudió desde este punto de vista a *A. stercorarius*.

Los tipos de desarrollo en Pezizales, en general, están principalmente caracterizados por la fase en que el himenio queda expuesto. En términos generales, podemos distinguir dos condiciones extremas:

- a) Gimnocárpico: cuando el himenio de la fructificación desarrolla superficialmente desde el comienzo (Comer, 1929, a y b; Snell y Dick, 1957).
- b) Angiocárpico: cuando el himenio inicia su diferenciación en un espacio cerrado y queda expuesto en algún momento, durante su desarrollo posterior.

La fase en la cual el himenio queda expuesto en un desarrollo angiocárpico difiere de acuerdo con las definiciones de varios autores (Comer, 1929 a; Jackson, 1949; Snell y Dick, 1957; Ainsworth, 1961), por lo que, Gamundí y Ranalli (1963) introdujeron el término hemiangiocárpico, tal como lo definió Singer (1949) para indicar el tipo de desarrollo en el cual el himenio, que al comienzo está encerrado, queda expuesto antes de la maduración de las ascosporas.

Posteriormente van Brummelen (1967, 1972) introduce otros términos descriptivos, que precisan puntualmente la fase del desarrollo en la que el himenio queda expuesto, distinguiendo, cronológicamente cinco fases a saber:

- 1) Archihiménial: antes que las estructuras iniciales del himenio estén presentes.
- 2) Prohimenial: las paráfisis ya están presentes, pero aún no se han formado los ganchos (en el sistema ascógeno).
- 3) Mesohiménial: el himenio está madurando pero aún no hay ascos con ascosporas maduras.
- 4) Telohiménial: los ascos maduros están presentes y expulsan normalmente las ascosporas.
- 5) Posthimenial: el himenio está sobremaduro y se descompone.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, pueden distinguirse dos tipos principales de ascocarpo.

A) Cleistohiménial: el himenio inicia su desarrollo encerrado, los ascocarpos de este tipo pueden ser subdivididos de acuerdo a la fase en que se abren y el himenio queda expuesto.

B) Gimnohimenial: el himenio está expuesto desde el comienzo de su desarrollo, hasta su maduración.

B₁) Paragimnohimenial: ascocarpo en el que el ascogonio es rodeado por hifas envolventes de crecimiento limitado, y que no forman una cubierta continua.

B₂) Eugimnohimenial: con el ascogonio expuesto, sin ningún tipo de cubierta.

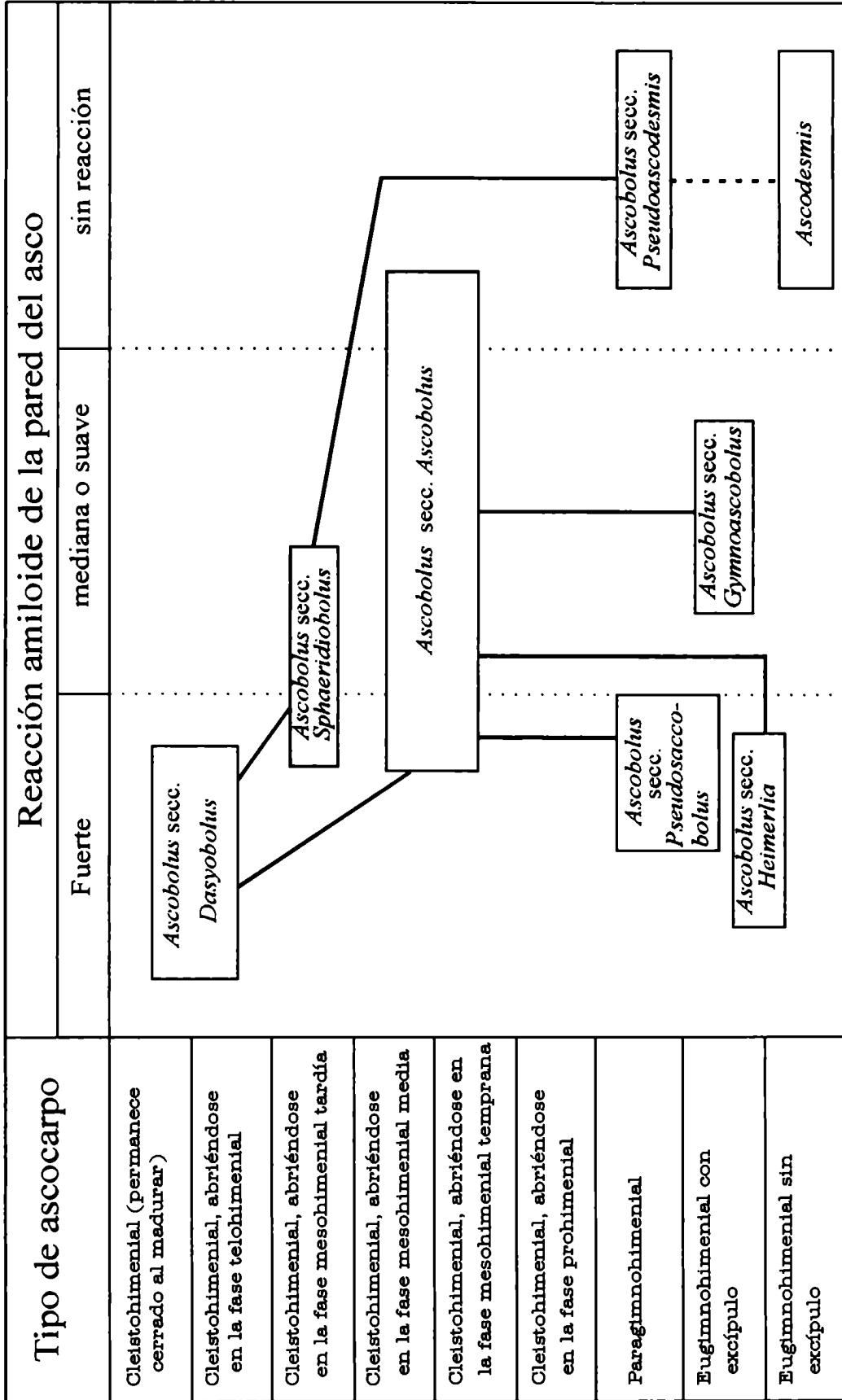
Teniendo en cuenta estas consideraciones, y la respuesta de la pared del asco cuando se trata con Melzer, las siete secciones en que se encuentra dividido el género *Ascobolus* pueden caracterizarse según el **diagrama 3. 1** (van Brummelen, 1972, modificado).

3. 2. 3. Apotecio

Luego de inocular los pares compatibles de cada especie en estiércol tindalizado, aparecen los primordios agrupados (gregarios) o solitarios y después de 8 – 10 días generalmente, los apotecios alcanzan su madurez.

Aunque el color de los apotecios es bastante uniforme, podemos diferenciar una leve variación entre las dos secciones: verde amarillento en la sección *Ascobolus* y verde claro en la sección *Dasyobolus* siendo *A. stictoideus* una excepción ya que

Diagrama 3. 1. Caracterización de las secciones del género *Ascobolus*



presenta primordios globosos, hialinos cuando se inician y apotecios ocráceos al madurar, con deposición de abundante pigmento intercelular en el excípulo.

Las dos secciones del género aquí consideradas se diferencian tanto por el tipo de desarrollo del apotecio, como ya se ha indicado, cuanto por el tamaño del ascocarpo, de los ascos y de las ascosporas.

En la sección *Dasyobolus* encontramos los apotecios de menor diámetro con los ascos de mayor tamaño y en la sección *Ascobolus* los apotecios de mayor diámetro con los ascos más pequeños (tabla 3. 1) (pág. 54).

3. 2. 4. Ascosporas

Los ascos se caracterizan por un extraordinario incremento de su volumen principalmente durante la última fase de su maduración, luego de la cual sobresalen de la superficie del himenio.

Son típicamente claviformes en la sección *Dasyobolus* y cilíndrico – claviformes en la sección *Ascobolus*. En general los de mayor tamaño, tanto en largo como en ancho, corresponden a la sección *Dasyobolus* aunque existen superposiciones que si consideráramos sólo este carácter no nos permitirían delimitar las secciones con total claridad (tabla 3. 1) (pág. 54).

3. 2. 5. Ascosporas

Este género se caracteriza por presentar ascosporas libres en el asco, nunca agrupadas formando un paquete como en el género *Saccobolus*. Son elipsoidales con ornamentaciones en forma de verrugas o relativamente lisas con grietas, más o menos conspicuas.

En la sección *Dasyobolus* encontramos *A. stictoideus*, *A. ferrugineus* y *A. mancus* las únicas especies que presentan su episporio con verrugas, las restantes de la sección y la sección *Ascobolus* presentan mayor o menor cantidad de grietas.

Con respecto al tamaño, las más pequeñas tanto en largo como en ancho pertenecen a la sección *Ascobolus* (*A. michaudii*, *A. bahiensis*, *A. gamundii* y *A. crenulatus*) mientras que las de mayor tamaño corresponden a la sección *Dasyobolus* (*A. immersus*, *A. bistisii*, *A. amoemus* y *A. stictoideus*). Las restantes especies (*A. furfuraceus*, *A. biguttulatus*, *A. ferrugineus* y *A. mancus*) forman un

grupo intermedio que no nos permite delimitar las secciones, si consideráramos esta característica solamente (**tabla 3. 1**) (pág. 54).

3. 2. 6. Germinación de ascosporas en AA

Las ascosporas expulsadas por los ascos maduros y recogidas en AA no germinaron espontáneamente, lo que hizo suponer que presentaban algún tipo de dormición.

La dormancia en esporas de hongos puede ser de dos tipos (Sussman, 1965): a) dormancia exógena: cuando el desarrollo está diferido debido a condiciones físicas o químicas desfavorables del medio y b) dormancia constitutiva: cuando el desarrollo se pospone debido a una propiedad innata del estado de dormición, tal como la existencia de una barrera a la penetración de nutrientes o agua, un bloqueo metabólico o bien la existencia de una autoinhibición.

La permeabilidad de la pared de la espora al agua, se logró por el efecto de álcalis u otros agentes activadores sobre la superficie de la espora.

El tratamiento inductor por acción de soluciones alcalinas se efectuó con HONa en concentraciones inferiores al 1%. La concentración de la solución a emplearse dependió del espesor de la pared de la ascospora; el tiempo del tratamiento con álcali fue variado y osciló entre 2 y 60 minutos, al cabo de los cuales se neutralizó con una solución diluida de ClH. Se volcó el líquido y se incubó a 37°C, por un período que varió entre 24 hs. a varios días. Posteriormente se observaron las ascosporas diariamente y si el porcentaje de germinación osciló entre 40-50% al cabo de 24-48 hs., se consideró efectivo el tratamiento.

3. 2. 7. Cultivo en PF

Este medio de cultivo semisintético agarizado resultó el más adecuado para las Ascoboláceas debido a la producción en él de abundantes fructificaciones normales. Todas las especies de *Ascobolus* estudiadas presentaron un crecimiento rápido alcanzando el borde de la caja entre el 3er. y 4to. día, al principio con escaso desarrollo aéreo, pero muy abundante a partir del 4to. y 5to. día, sobre todo en especies formadoras de oídios.

Las fructificaciones comienzan a formarse como proyecciones laterales a partir de hifas vegetativas de trayecto tortuoso que ligan y entrelazan hifas más gruesas de recorrido recto, que crecen radialmente.

Los primordios de los apotecios aparecen entre el 3er. y 9o. día y en las especies hemiangiocárpicas, el himenio queda expuesto cuando los ascos aún no han diferenciado sus ascosporas. Completada la maduración de las ascosporas, éstas son liberadas entre el 7mo. y 13er. día.

En las especies angiocárpicas, el himenio queda expuesto cuando las ascosporas han completado su madurez y la liberación de las mismas ocurre entre el 7mo. y 14to. día.

En las especies homotálicas, los apotecios maduros los encontramos distribuidos uniformemente en toda la caja. En las heterotálicas se formaron primero en la línea media al ponerse en contacto ambos micelios compatibles. Posteriormente observamos las especies con cepas con tendencia a ser fuertemente femeninas, en cuyo caso los apotecios se formaron sobre una de las cepas (Bistis y Raper, 1963) y especies que no presentaron esta característica y por lo tanto las fructificaciones están distribuidas uniformemente en toda la caja.

3. 2. 8. Oídios

Los oídios se forman por fragmentación del micelio aéreo y en las especies que los presentan funcionan como agentes espermatizantes. En las restantes el pasaje de los núcleos ocurre por contacto gametangial.

3. 2. 9. Construcción de la matriz básica de datos

La **tabla 3. 1** muestra la matriz básica de datos construida con los caracteres morfológicos y de cultivo. Las doce especies del género constituyeron las unidades taxonómicas operativas (OTU) y el total de caracteres fue de 23.

Tabla 3. 1. Matriz básica de datos morfológicos y de cultivo

Carácter		bah	gam	big	fur	mich	cren	fer	amo	man	bis	imm	stic
Sexualidad		2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1
Des. apotecio		1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
Distr. ap. sus.		3	1	2	3	2	1	2	3	3	2	2	2
Apotecio	color	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3
	diám. mín (μm)	1600	1000	1300	500	700	300	480	250	150	560	500	350
	diám. máx (μm)	3600	2800	3500	5000	2500	1800	600	600	400	960	1000	600
Asco	largo mín (μm)	190	100	156	180	180	125	240	170	230	370	490	150
	largo máx (μm)	268	130	175	250	280	150	310	300	320	480	720	400
	ancho mín (μm)	24	14	20	24	22	13	19	35	29	64	100	39
	ancho máx (μm)	31	16	22	30	26	15	24	40	32	80	130	55
Ascospora	largo mín (μm)	17	14	20,6	19	17	9,5	25	29	19	50	58	27
	largo máx (μm)	21,5	16,3	24	28	22	15	27	38	23	60	71	31
	ancho mín (μm)	9	6,5	9,6	10	9,5	6	13	14	10	30	28	16
	ancho máx (μm)	11	7,8	10,6	14	12	8	14	18	12	36	36	18
Germ. ascosp.	% de NaOH	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2
	tiempo tratam.	3	3	3	3	3	1	2	3	3	3	3	3
	tiempo incubac.	1	1	2	2	1	1	2	1	2	1	1	1
Cultvo en PF	apar.pr.1er. día	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1
	apar. pr. últ. día	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1
	distr. apotecios	2	3	2	2	2	1	2	2	2	3	3	1
	lib. ascsp.1er día	1	1	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1
	lib. ascsp. últ. día	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
Oídios		1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2

3. 3. Cruzamientos

Los cruzamientos interespecíficos se efectuaron con el fin de determinar la existencia de barreras genéticas que impidieran o no el cruzamiento entre sí de especies morfológicamente afines; poder determinar a través de reacciones de incompatibilidad sexual, el grado de afinidad entre las especies estudiadas; corroborar en cada uno de los casos, la existencia de un mecanismo hormonal que rige la diferenciación ascogonial y la posterior plasmogamia con el oídio activado y/o el micelio compatible.

Dentro de cada sección existen especies bien diferenciadas (las especies homotáticas) y especies muy afines con yuxtaposiciones en los valores de medición de ascosporas, similitudes en su ornamentación y en el comportamiento de los cultivos en PF.

3. 3. 1. Sección *Ascobolus*

Al considerar las especies heterotáticas de esta sección, *A. michaudii* y *A. bahiensis* son especies muy parecidas entre sí por el tamaño de sus ascosporas pero se diferencian por la ornamentación de las mismas.

A. bahiensis, *A. gamundii*, *A. biguttulatus* y *A. furfuraceus* producen esporas con características particulares en cada caso pero también parecidas entre sí.

Dado que el proceso sexual en todas ellas es aparentemente similar presentando un manifiesto heterotalismo fisiológico, se inter cruzaron para tratar de obtener híbridos interespecíficos.

3. 3. 1. 1. Cruzamientos intraespecíficos

Salvo en *A. gamundii*, donde las cepas A_g y a_g no mostraron una tendencia a comportarse como más fuertemente femenina o masculina, en las restantes especies, la cepa a , invariablemente, produjo mayor cantidad de ascogonios y en consecuencia, más fructificaciones maduras cuando fue utilizada como micelio base (figura 3. 1).

Cruzamientos intraespecíficos

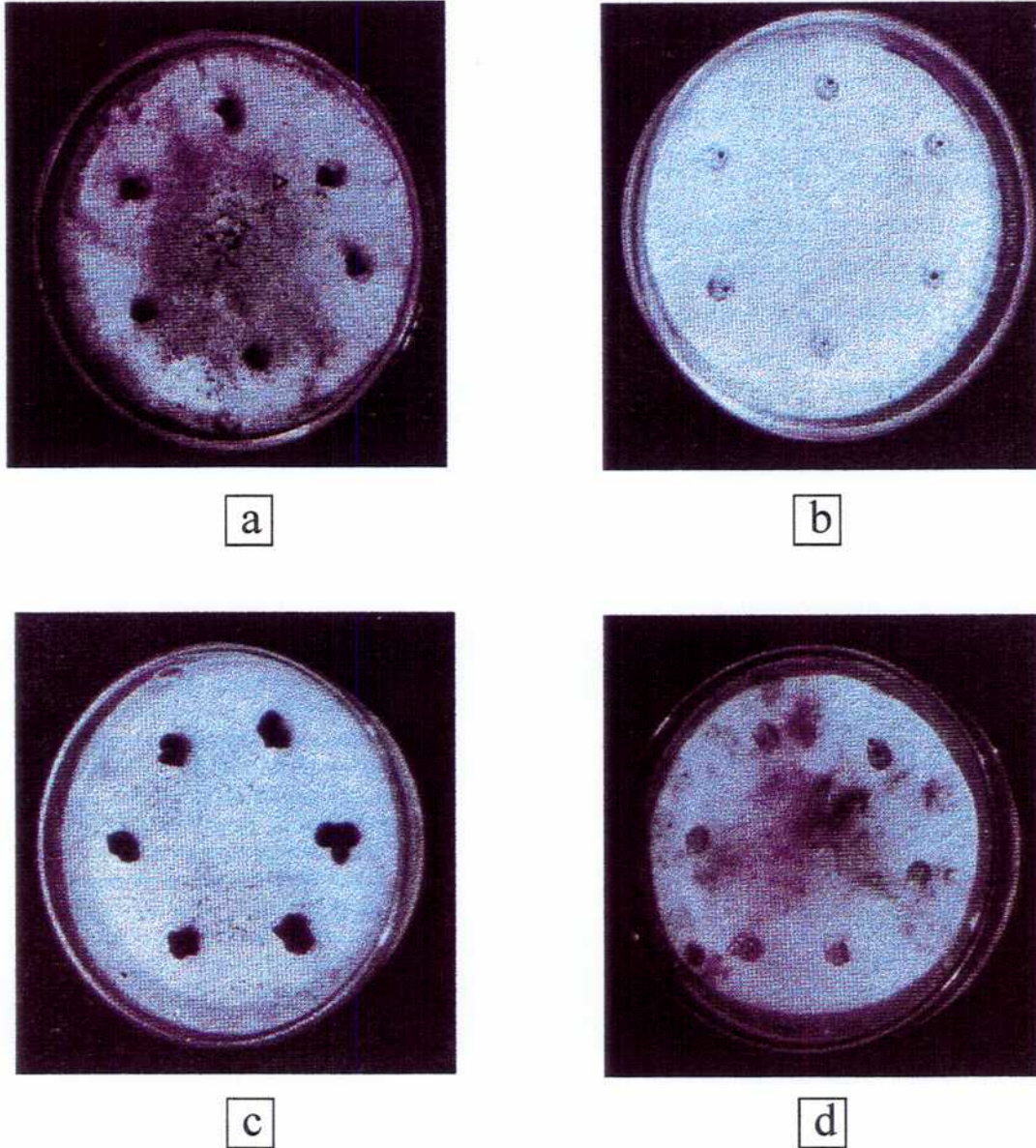


Figura 3-1. a: cruzamiento intraespecífico de *A. furfuraceus*. Cepa base a_f x oidios A_f . La flecha indica la presencia de primordios abortivos producidos abundantemente por la cepa a_f fuertemente femenina. b: cruzamiento intraespecífico de *A. furfuraceus*. Cepa base A_f x oidios a_f . Nótese la ausencia completa de primordios abortivos en la cepa A_f y las escasas fructificaciones producidas sobre los bloques de agar. c: cruzamientos intraespecífico de *A. biguttulatus*. Cepa base a_{bi} x oidios A_{bi} ; d: cruzamiento intraespecífico de *A. biguttulatus*. Cepa base A_{bi} x a_{bi} .

3. 3. 1. 2. Cruzamientos interespecíficos

Si bien todas las especies intercruzadas (tabla 2. 3; págs. 24-25), reaccionaron positivamente cuando *A* fue enfrentada con *a*, diferenciando ascogonios en respuesta al oídio activado, pudimos distinguir ligeras variaciones en las reacciones de incompatibilidad, que nos permiten separar arbitrariamente a las especies cruzadas en dos grupos:

- a) Especies en las que se induce la formación de ascogonios y primordios, llegando en su desarrollo hasta la formación de hifas ascógenas.
- b) Especies en las que se induce la formación de ascogonios y primordios que abortan rápidamente, sin llegar a producir hifas ascógenas.

En el primer grupo ubicamos los intercruzamientos de:

Ascobolus furfuraceus x *A. gamundii*

A. furfuraceus x *A. biguttulatus*

A. gamundii x *A. biguttulatus*

Si bien en estos cruzamientos, se obtuvieron primordios que llegaron a formar hifas ascógenas, únicamente en *A. furfuraceus* x *A. gamundii* los primordios alcanzaron a diferenciar un excípulo que es morfológicamente semejante al de *A. furfuraceus* y en los que, el crecimiento apical de las paráfisis y la formación intercalar de hifas ascógenas es suficiente como para permitir la apertura de la “fructificación” por ruptura del techo.

En el segundo grupo se encuentran los intercruzamientos de:

A. furfuraceus x *A. bahiensis*

A. gamundii x *A. bahiensis*

A. biguttulatus x *A. bahiensis*

En estos tres casos, los primordios alcanzaron a formar una cubierta con hifas envolventes dispuestas laxamente, pero que no formaron un verdadero excípulo.

3. 3. 2. Sección *Dasyobolus*

En las especies heterotálicas de esta sección *A. ferrugineus* se diferenció de las restantes ya que si bien el techo de la fructificación persiste en la mayoría de los apotecios cuando las ascosporas ya están pigmentadas y es roto cuando emergen los ascos maduros, en algunos casos, y debido a la presión que ejercen sobre él las

paráfisis y la abundante cantidad de mucílago en que están incluidas, puede romperse tempranamente, produciéndose un cambio en la forma del apotecio que de piriforme pasa a pulvinado, debido al notable aumento del volumen de los ascos y a la expansión lateral de las paráfisis.

Las restantes cuatro especies podemos asociarlas en dos grupos, *A. mancus* con *A. amoemus* y *A. bistisii* con *A. immersus*, por semejanzas macro y micromorfológicas.

3. 3. 2. 1. Cruzamientos intraespecíficos

En *A. bistisii*, los cruzamientos intraespecíficos $A_b \times a_b$ y $a_b \times A_b$ produjeron fructificaciones maduras que expulsaron normalmente sus ascosporas. Sin embargo, las fructificaciones fueron numerosas cuando se usó como cepa base A_b , mientras que con a_b como base, la diferenciación de ascogonios y producción de apotecios en respuesta a la presencia de oídios activados fue notoriamente menor. Este comportamiento estuvo acompañado por una exuberante producción de oídios por la cepa a_b mientras que en A_b , los oídios fueron escasos.

Un comportamiento similar en cuanto a la formación de ascogonios en presencia de la cepa compatible ocurrió en los cruzamientos intraespecíficos de *A. immersus*, *A. mancus* y *A. amoemus*. La cepa a utilizada como base, produjo escasas fructificaciones alrededor del taco con micelio A , mientras que en el cruzamiento recíproco las fructificaciones fueron abundantes.

3. 3. 2. 2. Cruzamientos interespecíficos

Si bien los oídios de *A. bistisii* fueron incapaces de germinar en presencia del micelio base de *A. immersus*, e incluso se hincharon, tomando el aspecto característico de un oídio activado, no indujeron, en todas las combinaciones ensayadas, la formación de ascogonios en *A. immersus*. Del mismo modo, las hifas de *A. immersus* no provocaron respuesta positiva en el micelio base de *A. bistisii*, el cual creció profusamente y formó, sobre toda la cepa A_i , numerosos oídios, aún sobre el taco del inóculo (tabla 2. 2; pág. 23).

En los intercruzamientos *A. mancus* x *A. amoemus* en todas las posibilidades no se observó ninguna reacción sexual y en todos los casos hubo una abundante producción de micelio.

Discusión

Se han realizado numerosos trabajos sobre cruzamientos interespecíficos en hongos, con resultados diversos (Emerson y Wilson, 1954; Savage et al., 1968; Udagawa y Takada, 1985; Takada y Udagawa, 1985; Takada et al., 1986; Stockdale, 1968; Traquiar, 1986). En algunos casos, los resultados han permitido sugerir hipótesis acerca de la similitud de las sustancias hormonales involucradas en los procesos sexuales (Stockdale, 1968). En otros casos, la obtención de híbridos estériles o incapaces de continuar normalmente su ciclo biológico permitió establecer, la identidad taxonómica de especies relacionadas pero indudablemente distintas y reproductivamente aisladas (Federici, 1982).

Traquiar (1986), utilizando aislamientos de *Coprinus phaeosporus* y *C. psychromorbidus* obtuvo evidencias concluyentes para el reconocimiento de estas dos especies como entidades taxonómicas distintas, a pesar de su afinidad manifiesta en los rasgos morfológicos utilizados habitualmente para distinguirlos.

La existencia de mecanismos hormonales involucrados en la reproducción sexual, ha sido demostrada en forma concluyente en diferentes grupos de hongos. Los trabajos de Ko (1978, 1980), Yu et al. (1981), Ko y Kunimoto (1981), en *Phytophthora*, permitieron demostrar la producción de sustancias hormonales difusibles que juegan un papel fundamental en el proceso sexual en especies de este género.

Bistis y Georgopoulos (1979), trabajando con *Nectria haematococca var. cucurbitae*, pusieron en evidencia la existencia de sustancias difusibles que coordinan el comportamiento sexual de este ascomicete heterotálico. Bistis (1981, 1983) demostró en *Neurospora crassa* la existencia de una sustancia difusible, específica para la atracción del tricogino hacia el elemento fertilizante y cuya producción es una expresión indudable del rol que juegan los alelos determinantes de la incompatibilidad sexual en este hongo.

Los alelos que controlan la incompatibilidad sexual en euascomicetes heterotálicos pueden hacerlo de diferentes formas; no obstante pueden establecerse en general dos factores fundamentales (Bistis, 1965).

1) Tal como ocurre en *Ascobolus stercorarius* ninguno de los estados de la reproducción sexual son constitutivos, sino por el contrario, parecen ser

inducibles, es decir, ellos son consecuencia de una interacción fisiológica entre células o núcleos de compatibilidad opuesta (Bistis, 1956, 1957; Bistis y Raper, 1963; Bistis y Olive, 1968).

- 2) En otros casos, los primeros estados en la diferenciación de las células o estructuras sexuales son constitutivas, es decir, ocurren en ausencia de interacciones entre micelios de compatibilidad opuesta (Drayton, 1932).

Las especies estudiadas presentan un evidente heterotalismo bipolar regulado por un par de genes (MAT A y MAT a) y estarían comprendidos dentro del patrón 1. En todos los casos, las cepas monospóricas son hermafroditas, pero con una marcada tendencia a ser fuertemente femeninas o masculinas en confrontaciones compatibles. Esto es coincidente con lo observado por Bistis y Raper (1963), Bistis y Olive (1968) en *A. stercorarius* y Paden y Linton, (1976) en *A. sacchariferus*.

Este comportamiento nos induce a pensar que si bien los genes, por sí, no son determinantes del sexo, condicionan en la cepa un comportamiento sexual preferencial en las combinaciones compatibles.

Si bien el proceso sexual en sus estadios iniciales es inducible, en *A. bistisii*, *A. biguttulatus* y *A. bahiensis*, al envejecer los micelios de las cepas monospóricas fuertemente femeninas, se producen abundantes primordios abortivos que contienen un ascogonio rodeado por una cubierta laxa de hifas envolventes muy poco organizadas. Como fuera sugerido por Ranalli y Gamundí (1975), en *A. biguttulatus*, es posible que estos primordios sean el resultado de uniones ilegítimas entre ascogonios inducidos por los propios oídios, que a su vez se activan por la acumulación en el medio, al envejecer el micelio, de la hormona desencadenante del proceso sexual.

Como fuera comprobado por Bistis y Raper (1963) en *A. stercorarius*, los oídios no germinan en presencia de su propio micelio o bien en presencia del micelio compatible, en cuyo caso, son activados y condicionados para actuar como elemento espermatizante. La inhibición de la germinación puede deberse a la producción de autoinhibidores por parte del micelio establecido. En los inter cruzamientos realizados, los oídios se comportaron de manera similar a la encontrada en *A. stercorarius*. Sin embargo, oídios de *A. bahiensis* utilizados en enfrentamientos *A x A* y *a x a* con *A. furfuraceus*, *A. gamundii* y *A. biguttulatus*, germinaron abundantemente sobre el micelio base. Este comportamiento podría

indicar una diferencia fisiológica a nivel del micelio, de tal forma que el oídio no reconoce como propio al inhibidor producido por el micelio base, lo cual afirmaría la diferencia entre las especies.

Cuando se inter cruzaron *A. immersus* x *A. bistisii*, las experiencias se realizaron cruzando micelio x micelio, micelio x taquito + oídio y micelio x taquito con micelio. En ningún caso hubo respuesta sexual que condujera a la formación de primordios o a la diferenciación de ascogonios. Sin embargo, los oídios de *A. bistisii* no germinaron en presencia del micelio de *A. immersus*, mientras que sí lo hicieron abundantemente sobre agar agua. Es decir, que si bien no fueron capaces de ser activados e inducir la diferenciación de ascogonios en *A. immersus*, éste inhibió su germinación, paso necesario que los condiciona para actuar como elementos fertilizantes, aunque el proceso se bloqueó en esta etapa, confirmando el aislamiento reproductivo entre ambas especies.

De los inter cruzamientos entre las otras especies de *Ascobolus*, en todos los casos obtuvimos respuestas de reconocimiento entre los pares *A* x *a*, pero en ningún caso este reconocimiento se tradujo en la obtención de fructificaciones fértiles. El inter cruzamiento entre *A. furfuraceus* y *A. gamundii* fue el único que dio “fructificaciones híbridas” que llegaron a la etapa de apertura del apotecio, con formación de paráfisis e hifas ascógenas. Sin embargo estos “apotecios” resultaron finalmente estériles, ante la imposibilidad posterior de producirse cariogamia entre los núcleos del dicarion, que llegan a aparearse, pero no se fusionan.

3. 4. Cinética de crecimiento del micelio

Se realizaron las curvas de crecimiento de las doce especies estudiadas y en las heterotálicas se compararon las dos cepas sexualmente compatibles utilizando peso seco como medida de estimación de crecimiento y delimitación de las fases de las curvas.

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

Al realizar las curvas de crecimiento de las especies heterotálicas en medio GA se observó que en *A. biguttulatus* existe una marcada diferencia en el crecimiento entre ambas cepas compatibles, siendo mayor el de la cepa 6. En las

demás especies, el comportamiento entre las dos cepas compatibles no presenta diferencias entre sí o son leves (**figuras 3. 2 a 3. 7**).

Asimismo, la cepa 5 de *A. biguttulatus* (**fig 3. 3**) presenta un período *lag* más prolongado que la cepa 6. En las especies restantes los períodos *lag* de cada par de cepas son similares entre sí, pero observamos que en *A. ferrugineus* (**fig. 3. 5**) es mucho más prolongado que en las restantes, siendo *A. furfuraceus* la que muestra el período *lag* más corto (**fig. 3. 3**).

Al considerar la fase exponencial, vemos que las curvas de crecimiento de las dos cepas de *A. furfuraceus*, (**fig. 3. 3**) *A. michaudii* (**fig. 3. 4**) y de la cepa 6 de *A. biguttulatus* (**fig. 3. 3**) tienen mayor pendiente, alcanzando el pico máximo antes que las demás.

Después de alcanzar el máximo crecimiento, *A. ferrugineus* (**3. 5**), *A. furfuraceus* (**fig. 3. 3**), *A. biguttulatus* (**fig. 3. 3**) y *A. amoemus* (**fig. 3. 5**) entran en una fase estacionaria corta que lleva a un decaimiento abrupto en el peso seco, mientras que en *A. mancus* (**fig. 3. 6**), *A. bahiensis* (**fig. 3. 2**), *A. bistisii* (**fig. 3. 6**), *A. immersus* (**fig. 3. 7**), *A. michaudii* (**fig. 3. 4**) y *A. gamundii* (**fig. 3. 2**) la fase estacionaria es más larga y el decaimiento mucho más gradual.

Las especies homotálicas, *A. cremulatus* (**fig. 3. 4**) y *A. stictoideus* (**fig. 3. 7**) presentan curvas de crecimiento muy semejantes entre sí con un período *lag* y una fase estacionaria prolongados.

En cuanto a la morfología de las colonias, se observó que éstas desarrollan en masas esféricas con una zona marginal de activo crecimiento alrededor del micelio más viejo crecido sobre el inóculo. Estas colonias varían en forma y/o textura como consecuencia de la ramificación en cada especie.

Las doce especies estudiadas presentan, en consecuencia, un patrón de crecimiento “globoso”. Sólo en *A. furfuraceus* el micelio marginal se extendió formando “agujas” rodeando la masa central compacta. En *A. mancus* ambas cepas presentaron una intensa coloración, uniforme en la cepa (+) y heterogénea en la cepa (-), como consecuencia de la acumulación de pigmento intercelular.

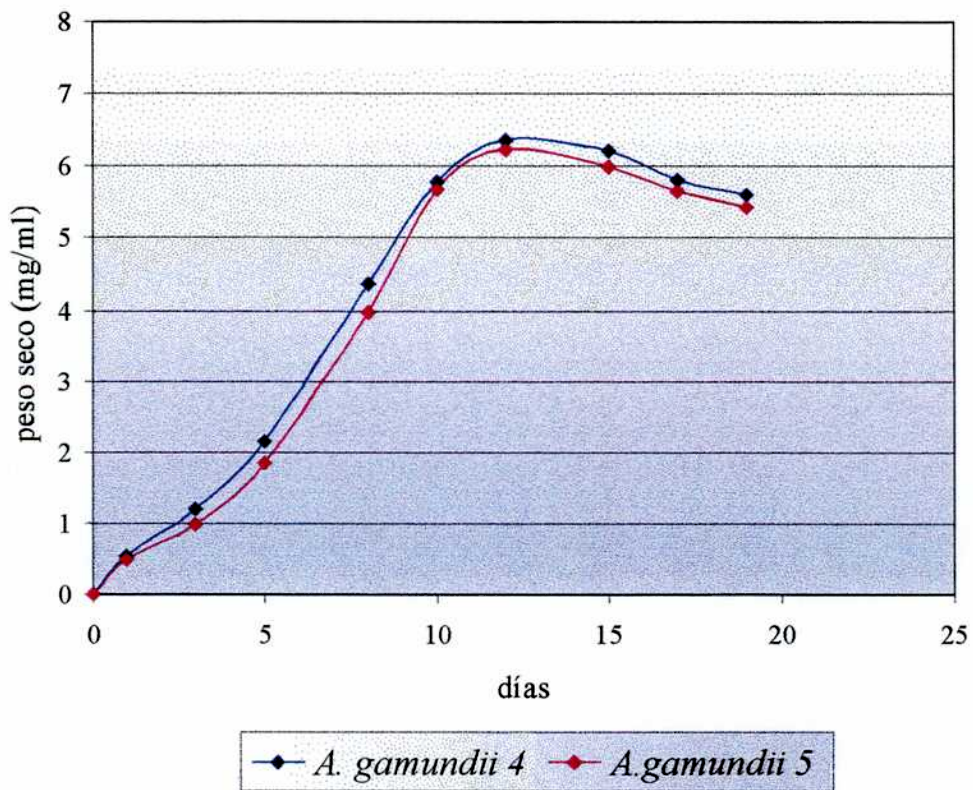
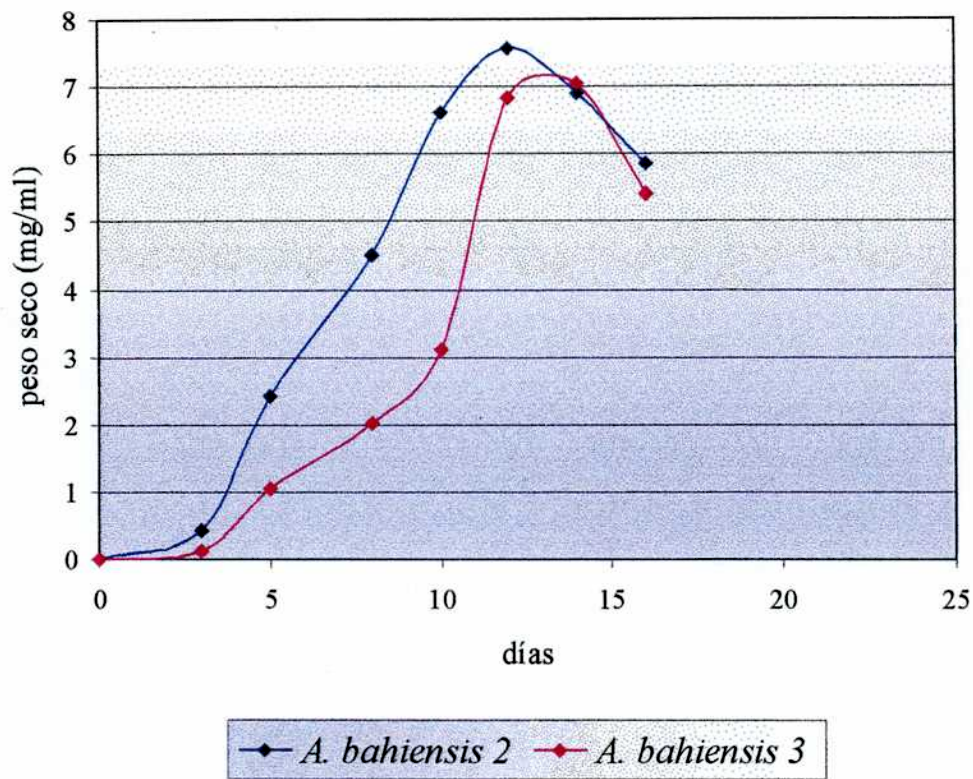


Figura 3. 2: Curva de crecimiento en medio de cultivo líquido

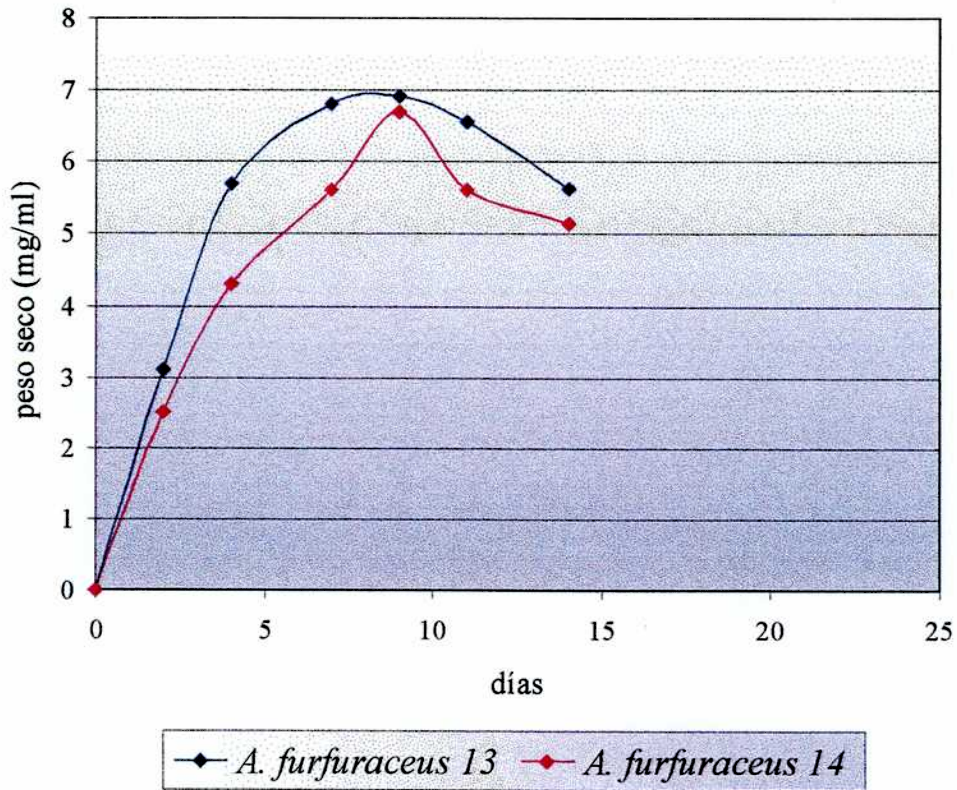
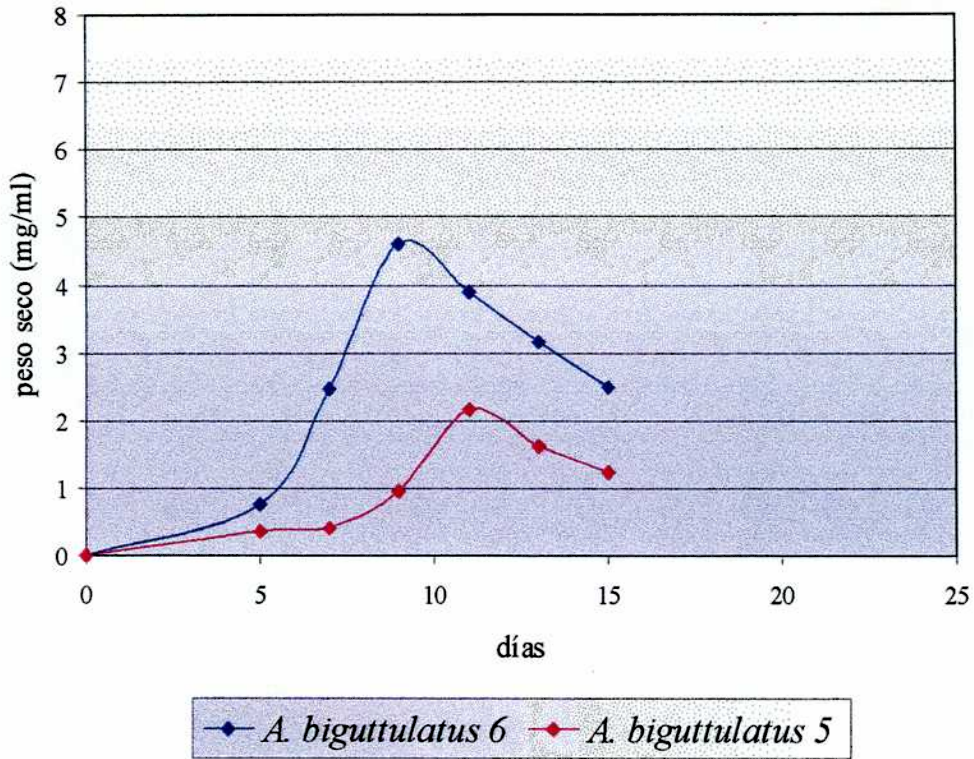


Figura 3. 3: Curva de crecimiento en medio de cultivo líquido

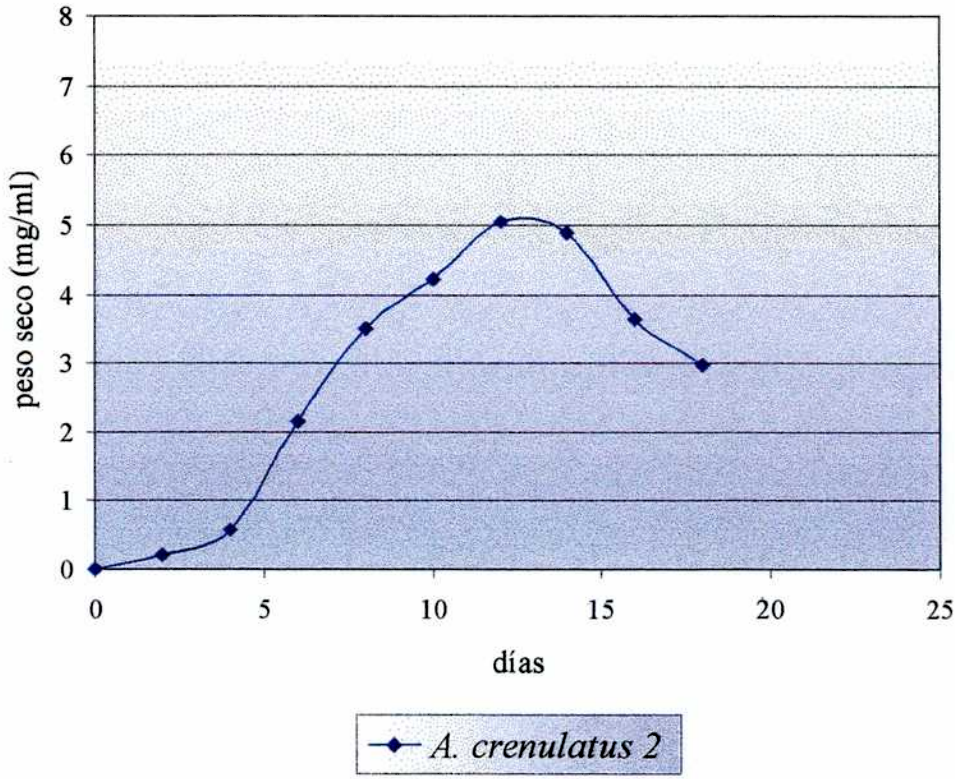
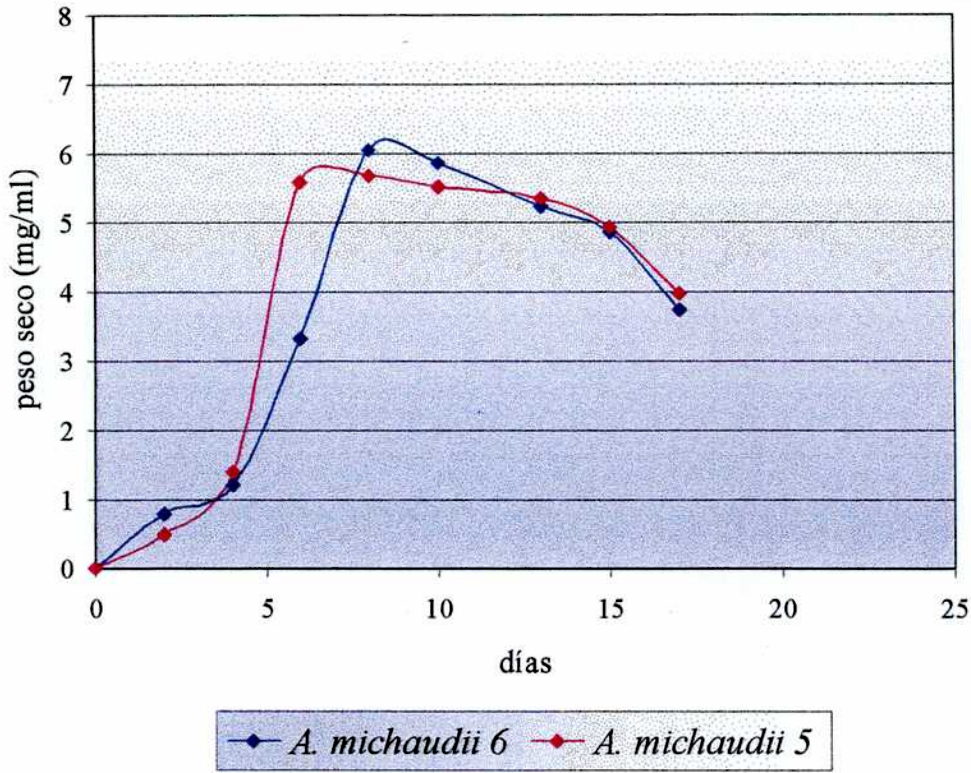


Figura 3. 4: Curva de crecimiento en medio de cultivo líquido

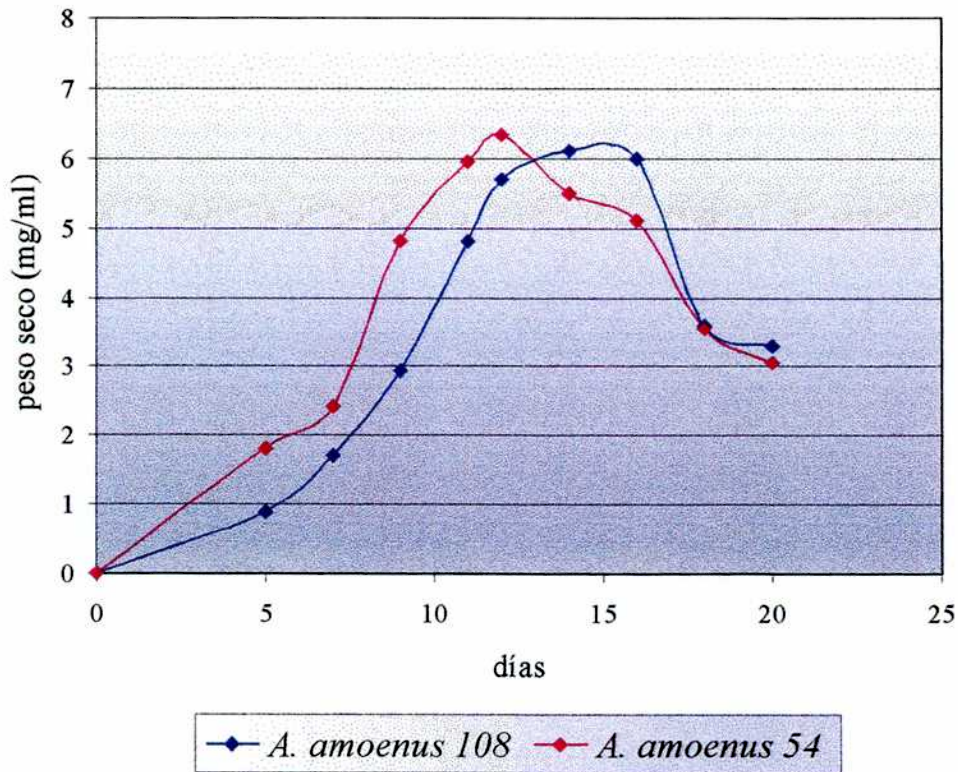
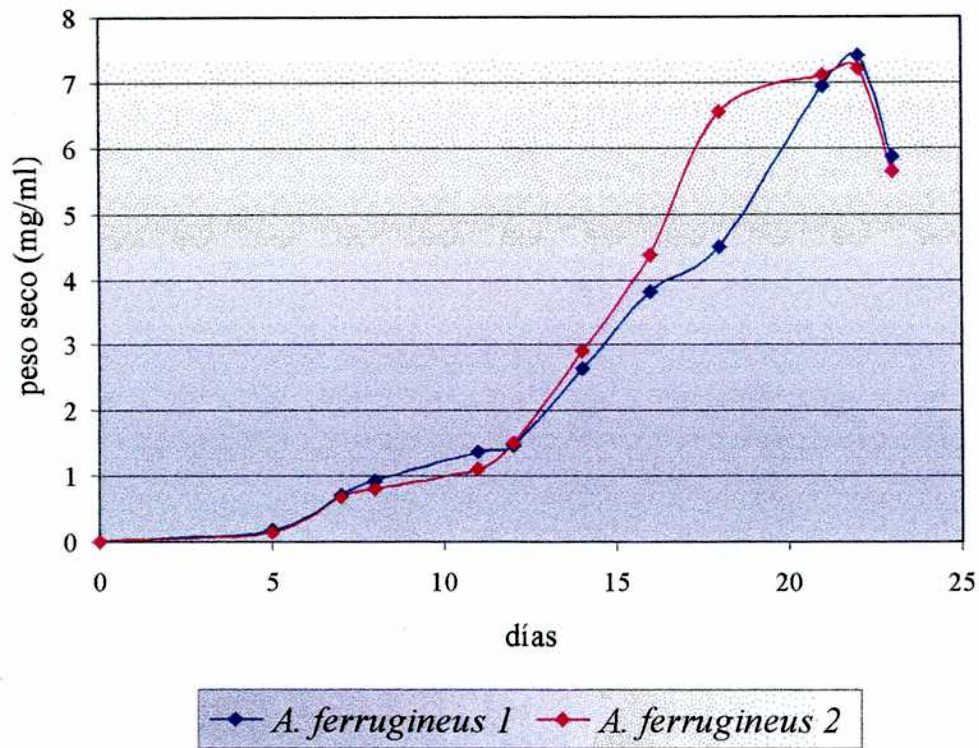


Figura 3. 5: Curva de crecimiento en medio de cultivo líquido

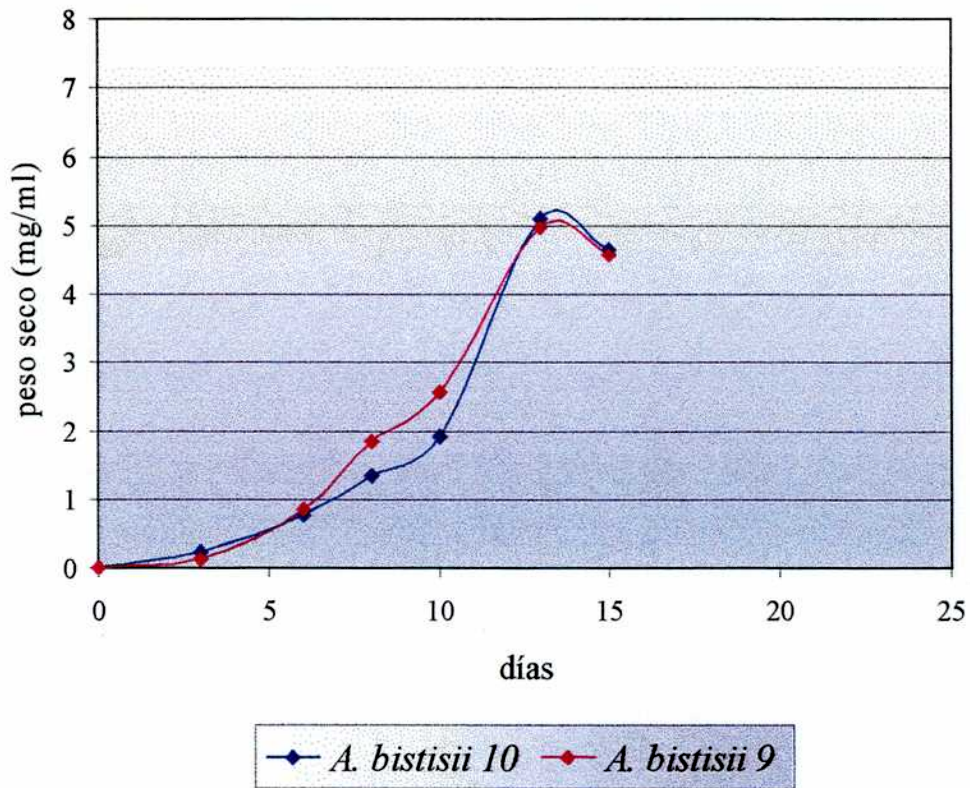
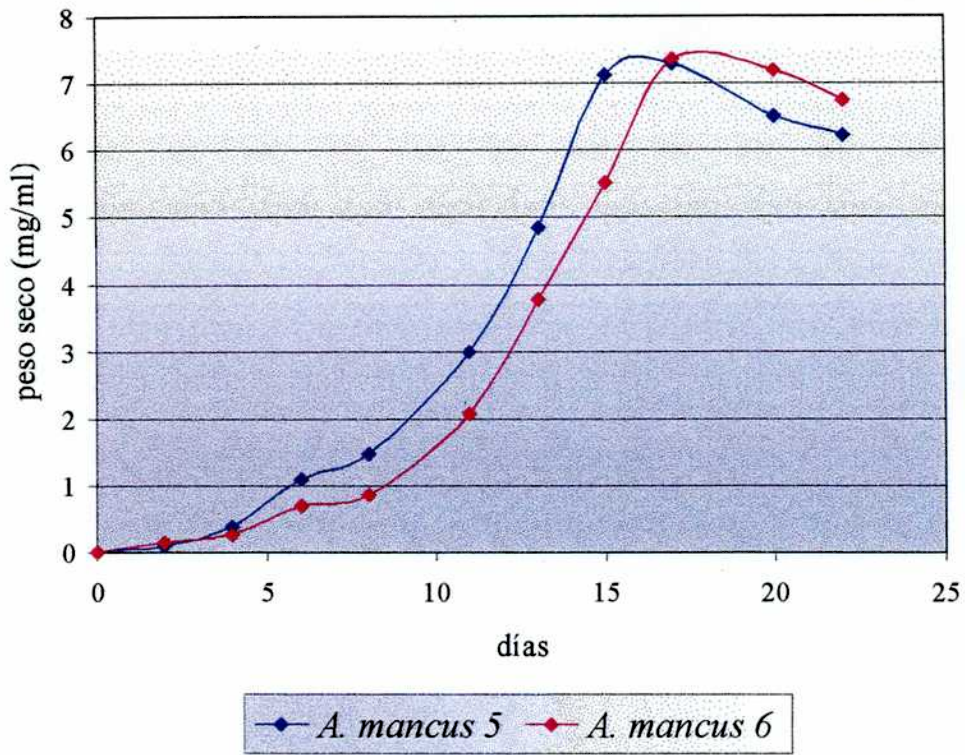


Figura 3. 6: Curva de crecimiento en medio de cultivo líquido

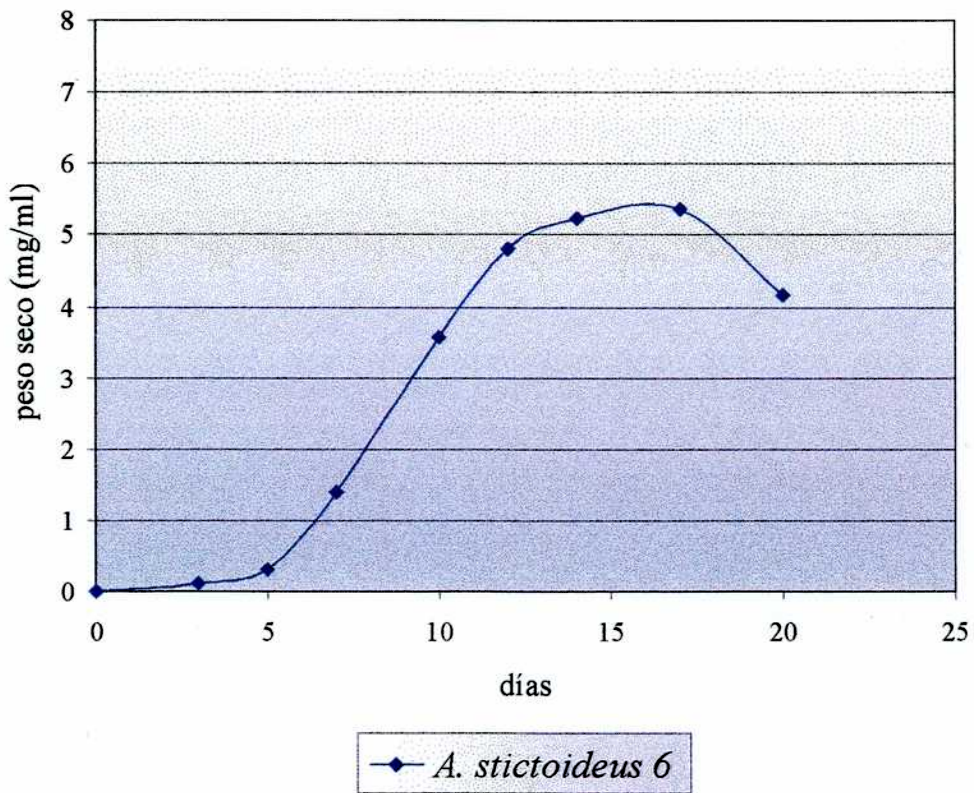
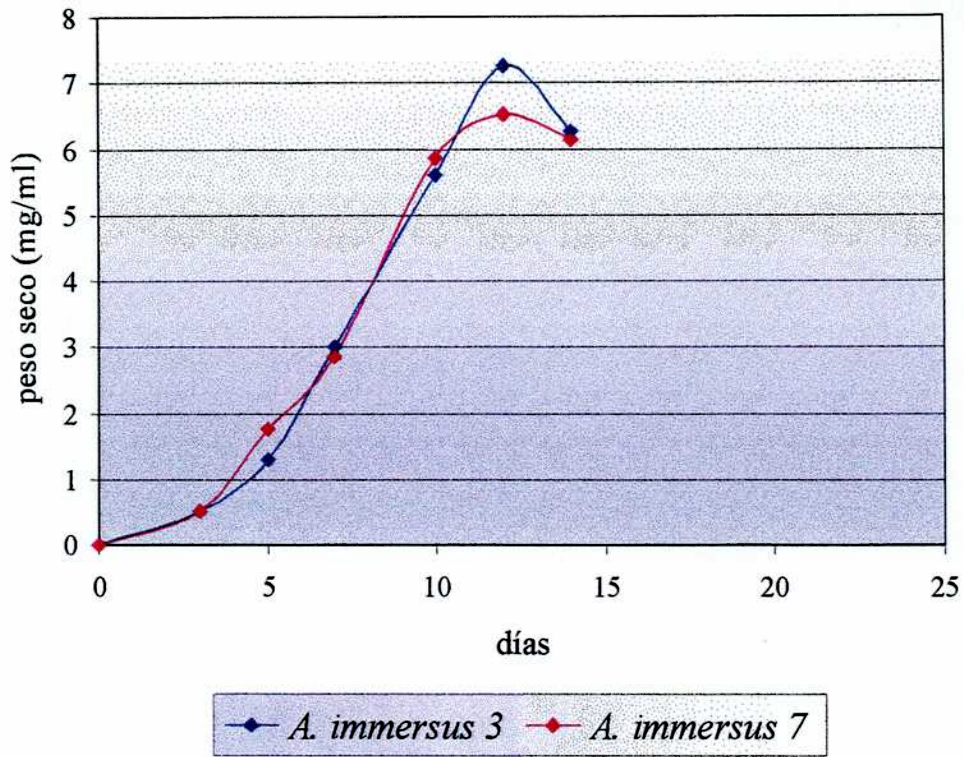


Figura 3. 7: Curva de crecimiento en medio de cultivo líquido

Discusión

El crecimiento es un fenómeno complejo que involucra cambios morfológicos, moleculares y celulares, que dependen del organismo y de las condiciones experimentales. El estudio de organismos filamentosos en cultivo líquido presenta algunas dificultades prácticas, tales como la presencia de heterogeneidad dentro de la biomasa, la cual puede deberse a la fijación y crecimiento del organismo sobre las paredes del recipiente de cultivo, o bien a la formación de “pellets”. Estos son masas esféricas o elipsoidales de hifas con estructura variable, entrelazadas laxamente a densamente empaquetadas (Wittler et al., 1986). Yanagita y Kogane (1963), proponen la existencia de cuatro regiones en el “pellet”, la más externa con hifas viables, que rodean a una capa de hifas con signos de autólisis. En “pellets” huecos, existiría una tercera capa, con hifas de paredes irregulares, mientras que el centro contiene micelio no reconocible.

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

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

- 1) En *A. biguttulatus*, la notable diferencia en el crecimiento entre ambas cepas compatibles 6(+) y 5(-) puede estar relacionada con la mayor capacidad de la cepa 6(+) para producir oídios, lo que determina una profusa ramificación del micelio. La ramificación y la división celular crean nuevos puntos de crecimiento, resultando en un incremento exponencial del mismo. En las restantes especies, la cantidad de biomasa estimada como mg de peso seco por ml de medio de cultivo, es similar en ambas cepas compatibles (+) y (-).

- 2) *A. furfuraceus*, a diferencia de las otras especies, presenta una fase *lag* casi inexistente, lo que hace presumir que el inóculo está preparado fisiológicamente y posee las enzimas necesarias para sostener desde el comienzo del cultivo, un crecimiento exponencial.
- 3) En *A. bahiensis*, *A. ferrugineus*, *A. furfuraceus*, *A. bistisii*, *A. immersus*, *A. michaudii* y *A. gamundii* las dos cepas compatibles alcanzan el máximo crecimiento el mismo día, mientras que en *A. mancus*, *A. amoemus* y *A. biguttulatus* lo hacen con uno o dos días de diferencia lo que podría interpretarse como una pequeña diferencia en la batería enzimática disponible, o bien distinta actividad.
- 4) Si consideramos la duración de la etapa de crecimiento exponencial, podemos diferenciar tres grupos: a) período más extendido, en *A. ferrugineus* que alcanza la fase estacionaria alrededor del día 22 de la inoculación; b) Intermedios, en *A. amoemus*, *A. mancus*, *A. bahiensis*, *A. bistisii*, *A. immersus*, *A. gamundii*, *A. cremulatus* y *A. stictoideus*; c) corto, en *A. furfuraceus*, *A. michaudii* y *A. biguttulatus*. Estas diferencias en la velocidad específica de crecimiento podrían deberse a que los nutrientes pueden ser metabolizados a diferentes velocidades controlando de esta manera su disponibilidad para la síntesis de macromoléculas.
- 5) La declinación de la velocidad de crecimiento es causada por el envejecimiento del medio, el consumo exhaustivo de los nutrientes que se tornan limitantes, así como también, por la acumulación de productos de deshecho. Al alcanzar el máximo crecimiento, *A. ferrugineus*, *A. furfuraceus*, *A. biguttulatus* y *A. amoemus* entran en una fase estacionaria muy corta, que lleva a una disminución brusca del peso seco, entrando rápidamente en la fase de muerte, acompañada por la autólisis del micelio. En *A. mancus*, *A. bahiensis*, *A. bistisii*, *A. immersus*, *A. michaudii*, *A. gamundii*, *A. stictoideus* y *A. cremulatus* la fase estacionaria es más larga y el decaimiento es gradual.

3. 5. Sistemas isoenzimáticos analizados

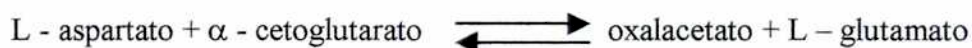
Los sistemas isoenzimáticos que presentaron buena resolución para todos los aislamientos fueron: aspartato aminotransferasa, (AAT), esterasa (EST), fosfatasa ácida (ACP), glutamato dehidrogenasa (GDH), isocitrato dehidrogenasa (IDH) y superóxido dismutasa (SOD). Se encontraron un total de 41 electromorfos.

Las especies de *Ascobolus* presentan alta homogeneidad intraespecífica, ya que no se observan diferencias entre cepas monospóricas de cada especie como así tampoco en las muestras mixtas. Sólo en ACP y EST se encontraron diferencias entre algunos aislamientos de la misma especie.

Las **figuras 3. 8 a 3. 16** muestran los zimogramas con los electromorfos característicos para cada sistema.

3. 5. 1. Aspartato aminotransferasa

Las enzimas de este sistema intervienen en las transaminaciones citoplasmáticas y también en el metabolismo mitocondrial de aminoácidos. Se encuentran en bacterias, protozoarios, hongos, plantas, invertebrados y vertebrados. Catalizan la siguiente reacción (Manchenko, 1994), según los pasos esquematizados en **2. 6. 7. 1** (pag. 36).



La aspartato aminotransferasa, **figura 3. 8** presenta 8 electromorfos. Encontramos electromorfos característicos para cada especie y electromorfos comunes a más de una especie.

Pertenece al primer grupo: *A. crenulatus* que presenta el patrón **A** con una banda de Rf 20; *A. ferrugineus* que presenta el patrón **C** con dos bandas una de Rf 28 y otra de Rf 34; *A. furfuraceus*, el patrón **D** con dos bandas, una común con *A. ferrugineus*, la Rf 28 y otra de Rf 36; *A. biguttulatus* el patrón **E** con dos bandas, una de Rf 34 común a *A. ferrugineus* y otra de Rf 38; *A. bistisii* presenta el patrón **F** con una sola banda de Rf 36 común a *A. furfuraceus*.

Pertenece al segundo grupo: *A. michaudii*, *A. immersus* y *A. strictoideus* que presentan el patrón **B** con una sola banda de Rf 28 común a *A. ferrugineus* y *A. furfuraceus*; *A. bahiensis* y *A. gamundii*, el patrón **G** con una sola banda de Rf 38

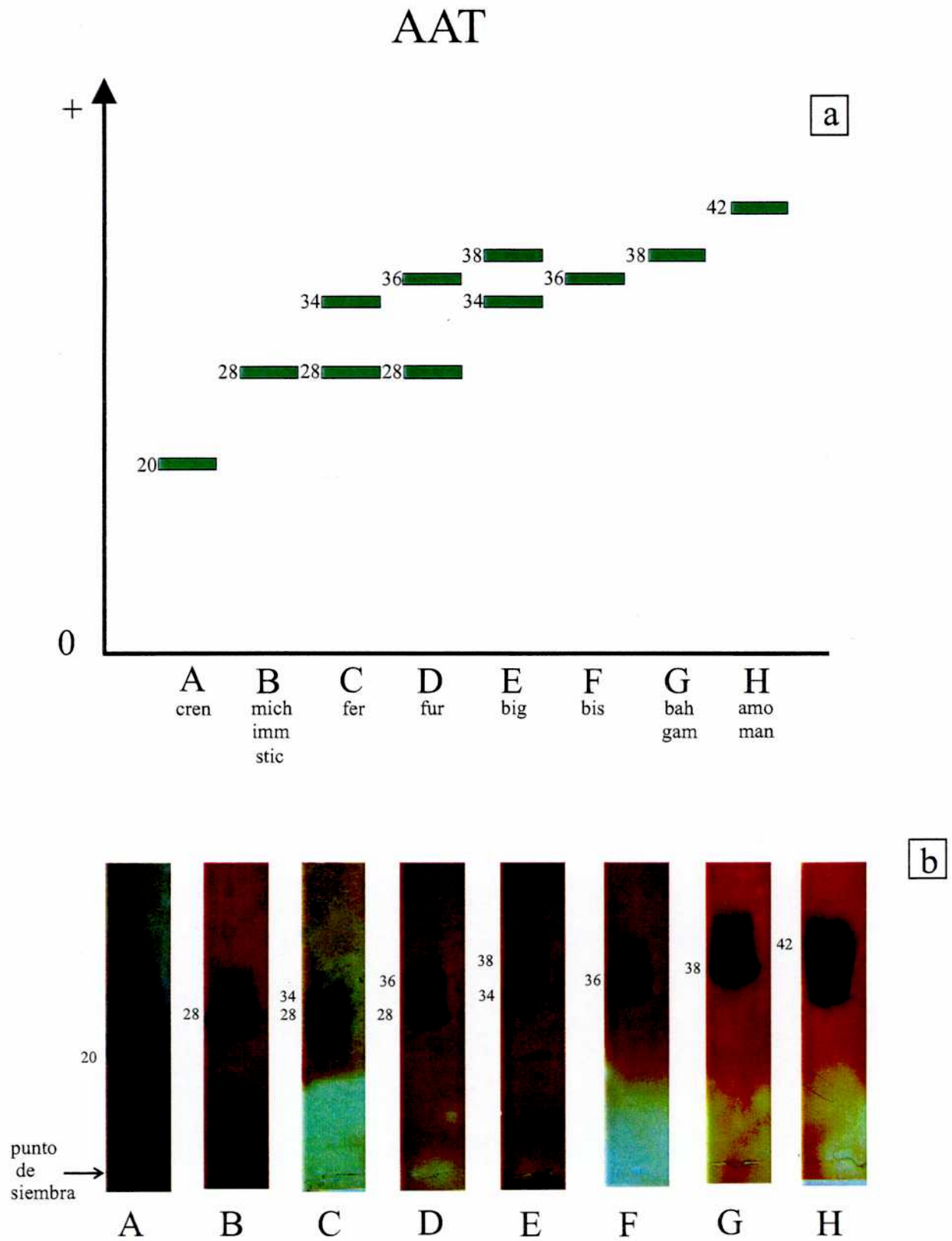


Figura 3 - 8: Sistema isoenzimático aspartato aminotransferasa; a: diagrama de los electromorfos (A - H); b: zimogramas. Los números indican los Rf.

común a *A. biguttulatus*; *A. amoemus* y *A. mancus*, el patrón **H** con una sola banda de Rf 42.

3. 5. 2. Esterasa

Las esterases conforman un complejo enzimático del metabolismo intermedio que catalizan la hidrólisis de uniones éster. Están presentes en bacterias, protozoarios, hongos, plantas, invertebrados y vertebrados.

Catalizan la formación de aniones carboxílicos según los pasos esquematizados en 2. 6. 7. 2 (pag. 37).

Este sistema exhibió la mayor variación isoenzimática. Las **figuras 3. 9 a 3. 11** muestran trece patrones dos de los cuales corresponden a *A. gamundii* que fue la única especie que mostró una pequeña variación en una de las siembras mixtas.

Los patrones **A a G** correspondieron a las especies de la sección *Ascobolus*: *A. bahiensis*, *A. biguttulatus*, *A. furfuraceus*, *A. michaudii* y *A. cremulatus* sin variaciones intraespecíficas y en *A. gamundii* aparecieron dos bandas de Rf 26 y 28 comunes al patrón **A** en la muestra mixta (1 + 7).

Las bandas de Rf 13, 16, 19 y 48 son exclusivas de la sección *Ascobolus*. La banda de Rf 13 aparece en los patrones **C, E, F y G** que corresponden a *A. furfuraceus*, *A. cremulatus* y *A. gamundii*; la banda de Rf 16 está presente en todas salvo en *A. michaudii*; la banda de Rf 19 la encontramos en *A. bahiensis*, *A. furfuraceus* y *A. gamundii* y la banda de Rf 48 aparece sólo en *A. michaudii*.

Las bandas de Rf 40, 45 y 50 son exclusivas de la sección *Dasyobolus* y se encuentran en los patrones **K, L e I** que corresponden a *A. bistisii*, *A. immersus* y *A. amoemus* respectivamente.

La banda de Rf 21 apareció en los patrones **A, C, F, G y H** que corresponden a *A. bahiensis*, *A. furfuraceus*, *A. gamundii*, *A. gamundii* (1+7) y *A. ferrugineus*; la banda de Rf 26 se encontró en los electromorfos **A, G e I** pertenecientes a *A. bahiensis*, *A. gamundii* (1+7) y *A. amoemus*.

La banda de Rf 28 apareció en los electromorfos **A, B, G, K y L** que corresponden a *A. bahiensis*, *A. biguttulatus*, *A. gamundii* (1+7), *A. bistisii* y *A. immersus* respectivamente; la banda de Rf 30 se encontró en los patrones **B, I y L** pertenecientes a *A. biguttulatus*, *A. amoemus* y *A. immersus*.

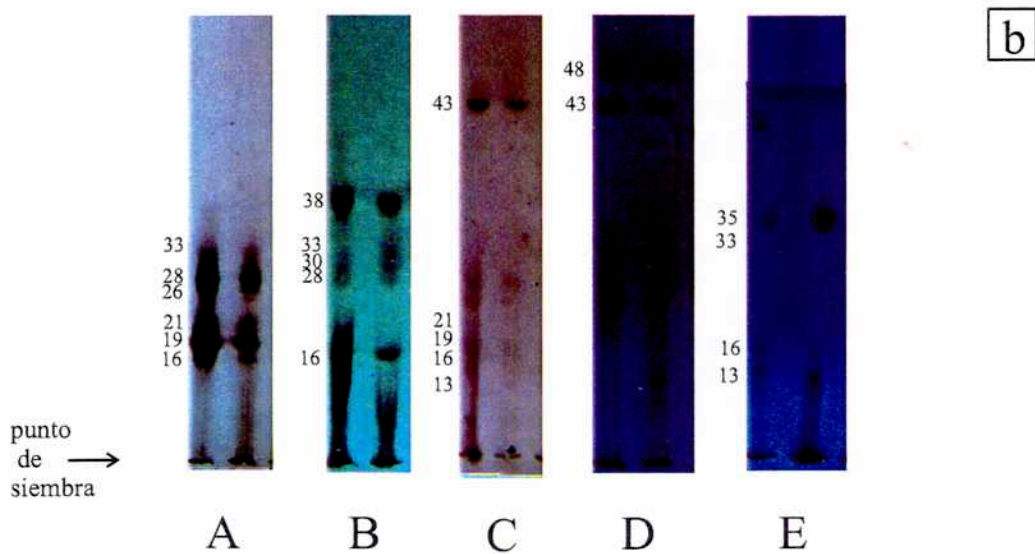
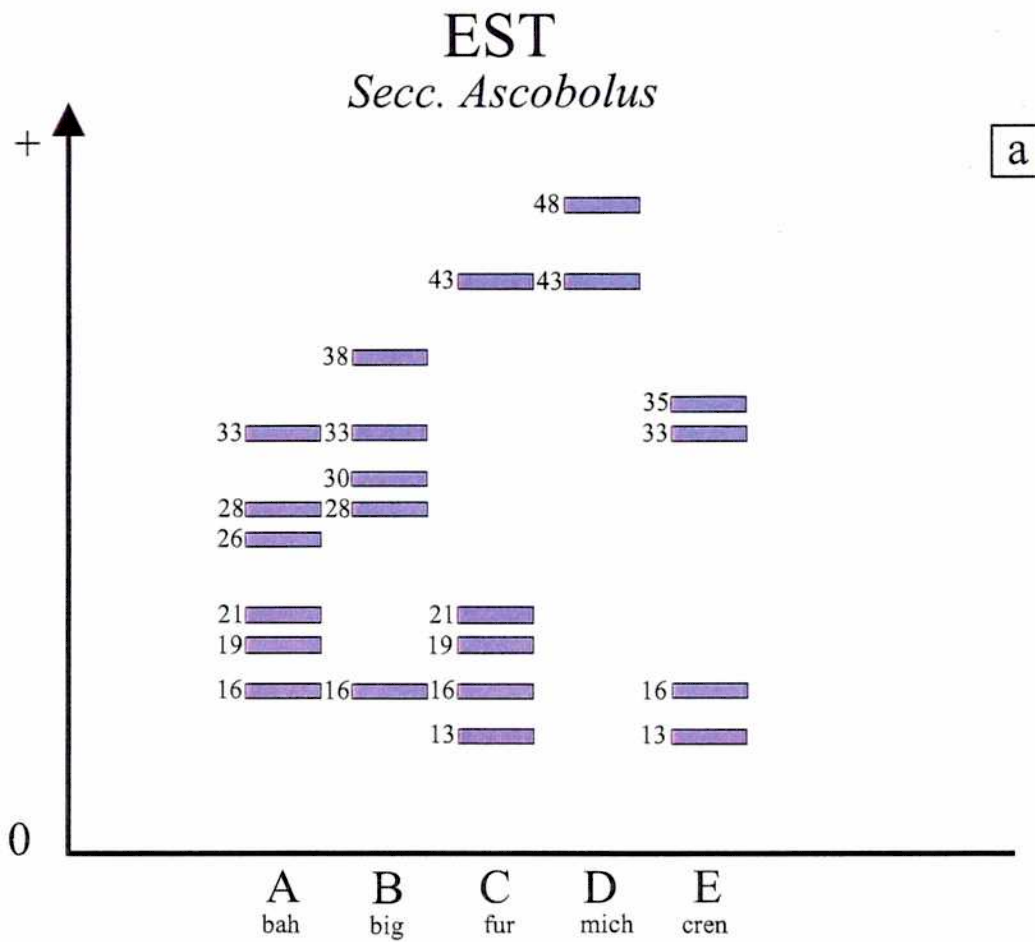


Figura 3 - 9: Sistema isoenzimático esterasa, *Sec. Ascobolus*; a: diagrama de los electromorfos (A - E); b: zimogramas. Los números indican los Rf.

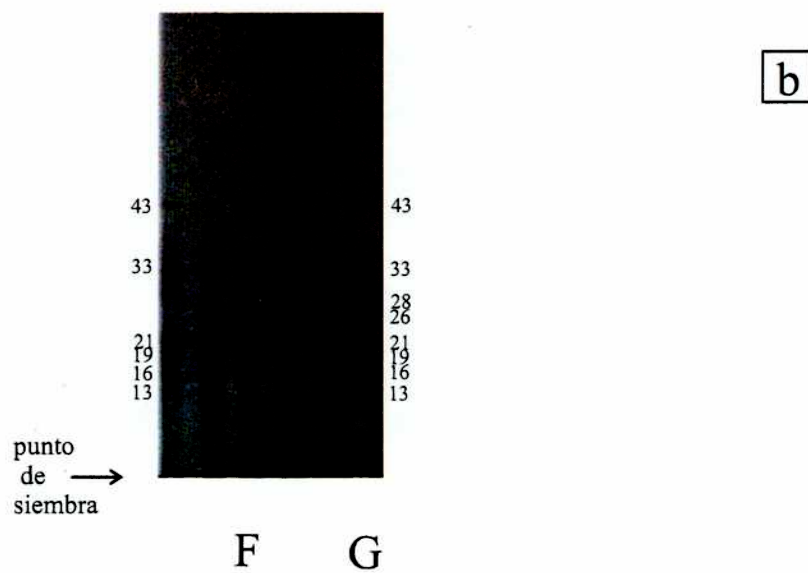
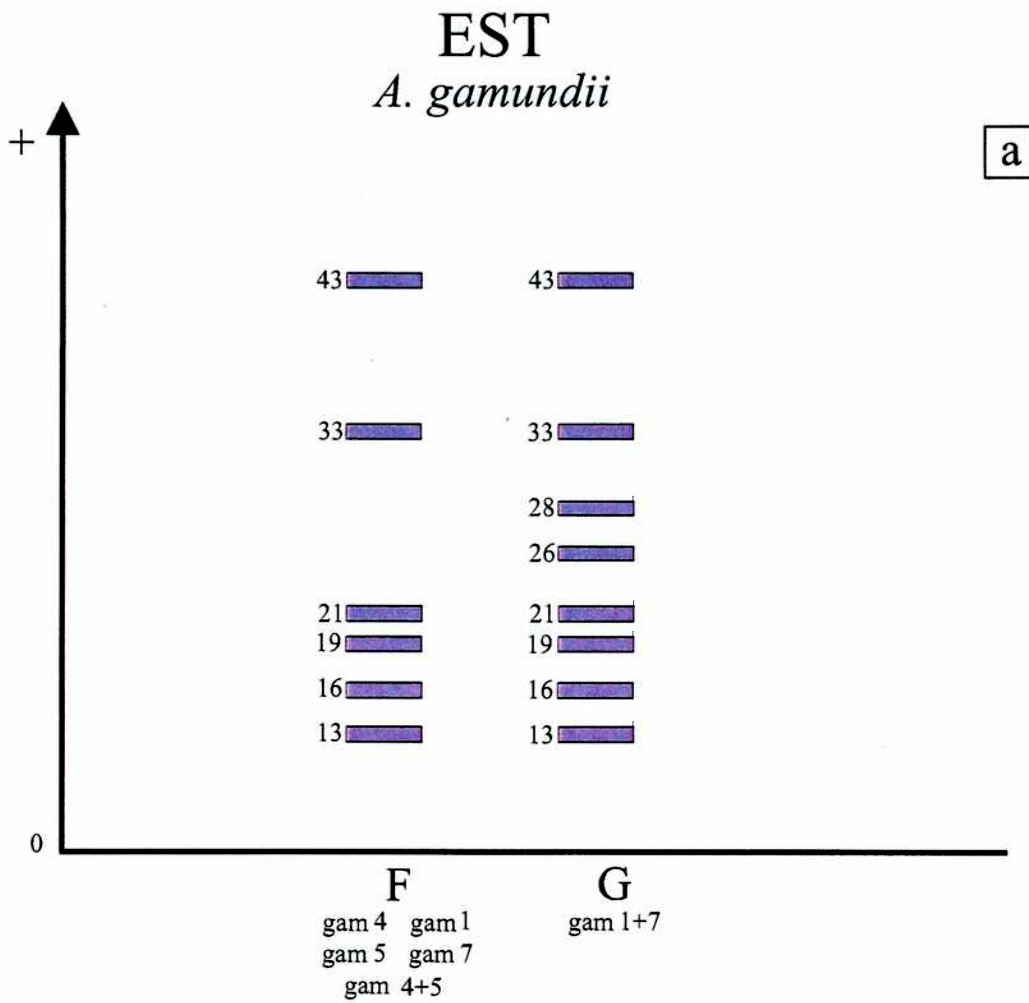


Figura 3-10: Sistema isoenzimático esterasa en *A. gamundii*; a: diagrama de los electromorfos (F y G); b: zimogramas. Los números indican los Rf.

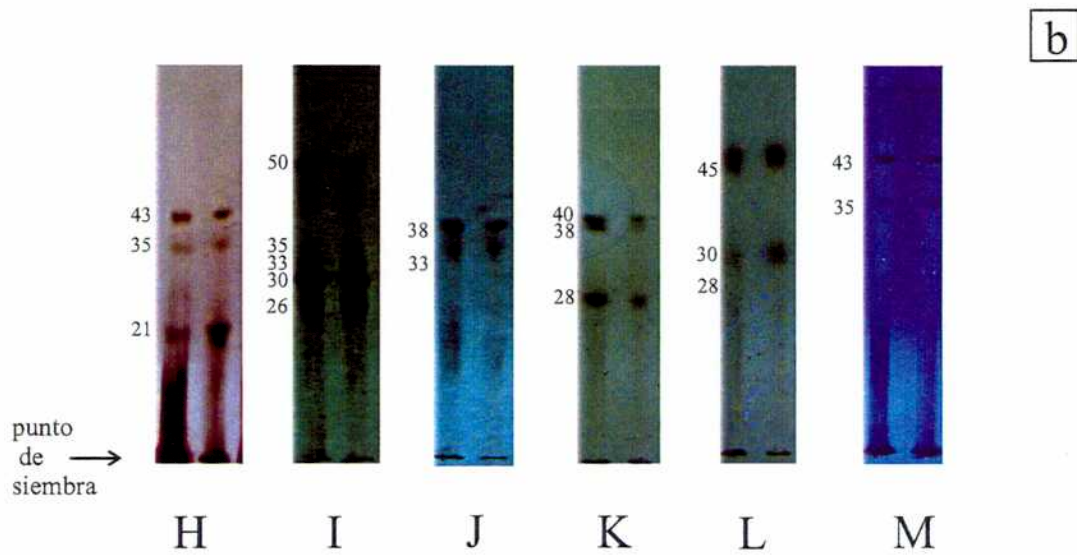
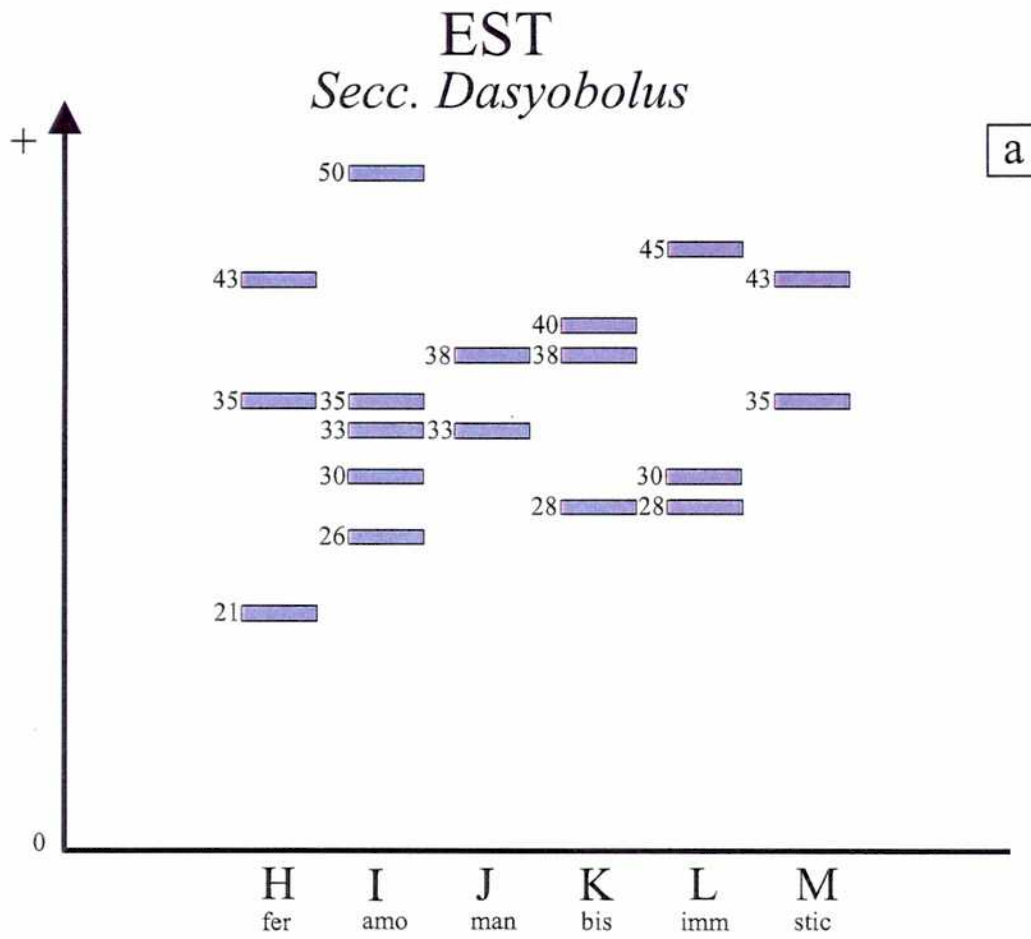


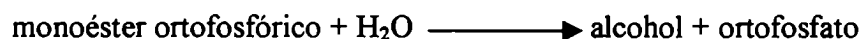
Figura 3-11: Sistema isoenzimático esterasa Sec. *Dasyobolus*; a: diagrama de los electromorfos (H - M); b: zimogramas. Los números indican los Rf.

La banda de Rf 33 es la que está presente en un mayor número de especies *A. bahiensis*, *A. biguttulatus*, *A. cremulatus*, *A. gamundii*, *A. gamundii* (1+7), *A. amoemus* y *A. mancus* que corresponden a los electromorfos **A**, **B**, **E**, **F**, **G**, **I** y **J**; la banda de Rf 35 aparece sólo en una especie de la sección *Ascobolus*, *A. cremulatus* (electromorfos **E**) y en los patrones **H**, **I** y **M** de la sección *Dasyobolus*, *A. ferrugineus*, *A. amoemus* y *A. stictoideus*.

La banda de Rf 38 también aparece sólo en una especie de la sección *Ascobolus*, *A. biguttulatus* (electromorfo **B**) y en *A. mancus* y *A. bistisii* de la sección *Dasyobolus* (electromorfos **J** y **K**); la banda de Rf 43 se encontró en los electromorfos **C**, **D**, **F**, **G**, **H** y **M** que corresponden a *A. furfuraceus*, *A. michaudii*, *A. gamundii*, *A. gamundii* (1+7), *A. ferrugineus* y *A. stictoideus* respectivamente.

3. 5. 3. Fosfatasa ácida

Las fosfatasas son enzimas no regulatorias del metabolismo intermedio y están presentes en bacterias, hongos, algas verdes, plantas, protozoarios, invertebrados y vertebrados. Catalizan la hidrólisis de ésteres fosfato según la siguiente reacción esquematizada en 2. 6. 7. 3 (pag. 38):



En este sistema encontramos variaciones dentro de las cepas de *A. ferrugineus* (figura 3. 13).

La figura 3. 12 muestra 6 patrones de bandas para las restantes 11 especies. Los electromorfos **A**, **D**, **E** y **F** mostraron una sola banda cada uno con Rf 22, 26, 28 y 30 correspondientes a *A. cremulatus*, *A. bahiensis*, *A. stictoideus* y *A. amoemus* respectivamente. *A. gamundii*, *A. biguttulatus*, *A. furfuraceus*, *A. michaudii* y *A. bistisii* mostraron el patrón **C** con una sola banda de Rf 23.

El patrón **B** con dos bandas de Rf 22 común al electromorfo **A** y Rf 30 se encontró en *A. mancus* y *A. immersus*.

En *A. ferrugineus* (fig. 3. 13) encontramos que la cepa 2(-) y las muestras mixtas 1+2 y 9+8 mostraron el electromorfo **F** como en *A. amoemus*; la cepa 9(+) el patrón **G** con dos bandas, una de Rf 23 común con el electromorfo **C** y la otra con Rf 30 común con el electromorfo **F** y las cepas 1(+) y 8(-) presentan el patrón **H** con dos bandas de Rf 30 común al electromorfo **F** y Rf 33 exclusivo de estas cepas.

ACP

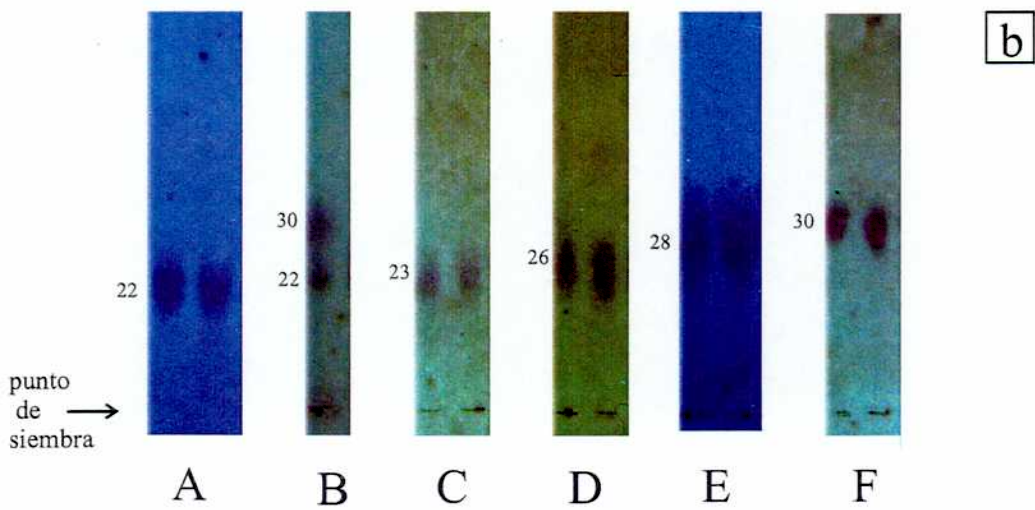
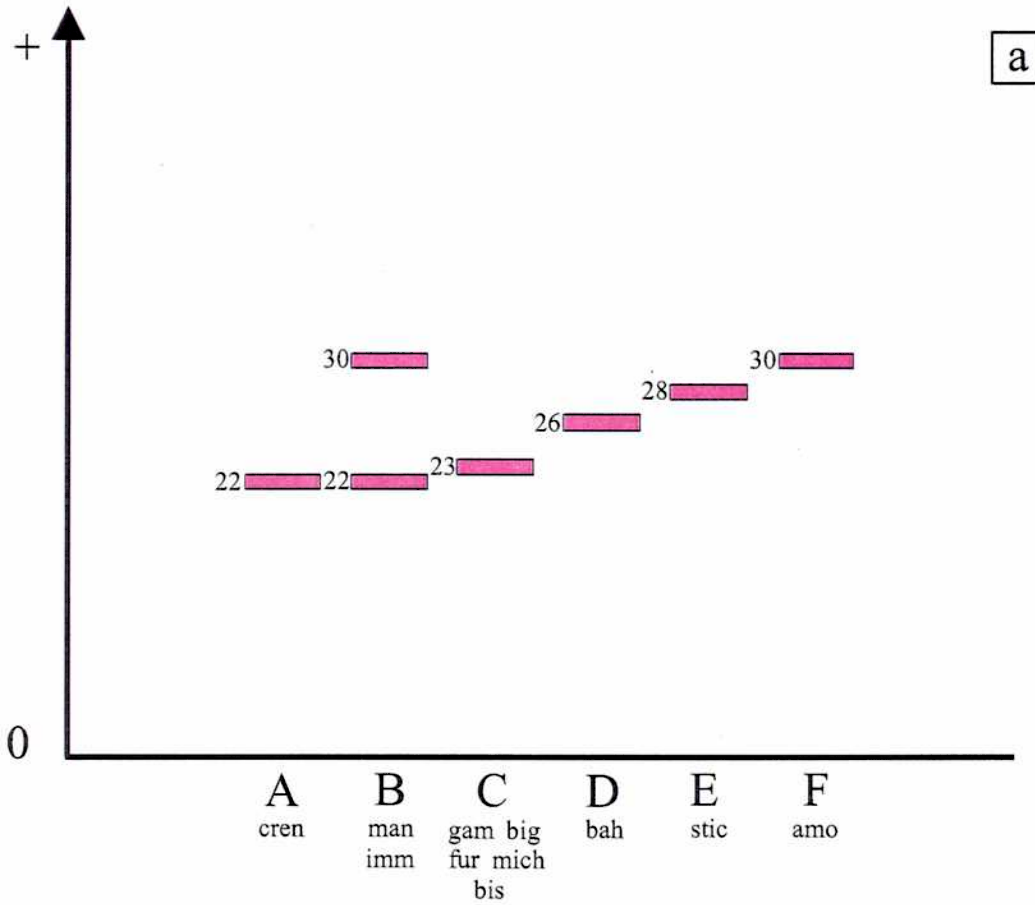


Figura 3-12: Sistema isoenzimático fosfatasa ácida; a: diagrama de los electromorfos (A - F); b: zimogramas. Los números indican los Rf.

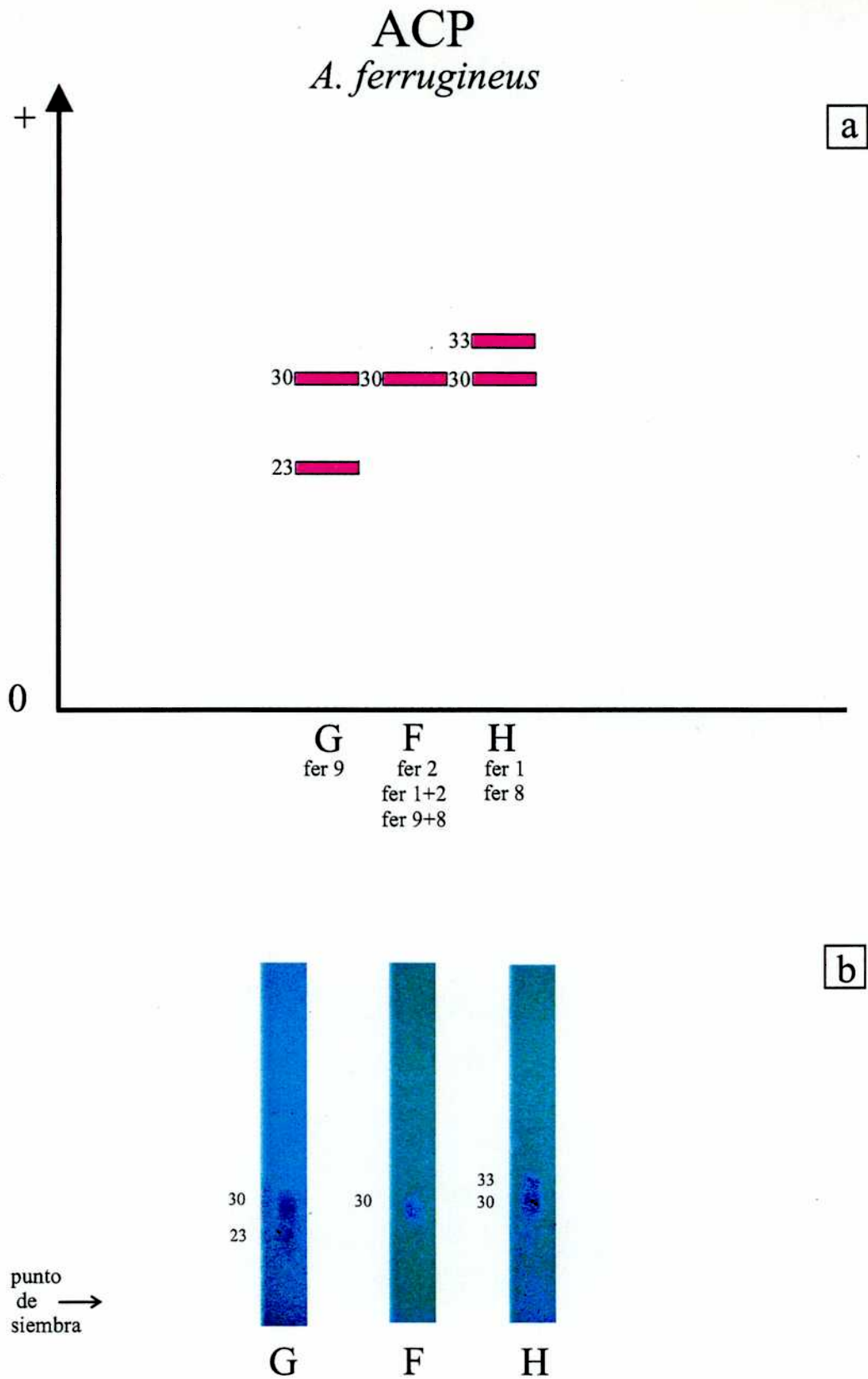
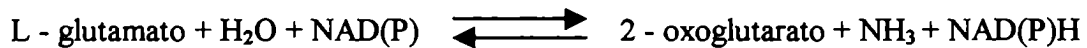


Figura 3-13: Sistema isoenzimático fosfatasa ácida en *A. ferrugineus*; a: diagrama de los electromorfos (F - H); b: zimogramas. Los números indican los Rf.

3. 5. 4. Glutamato dehidrogenasa

Las dehidrogenasas producen NADH o NADPH que a su vez, en la reacción identificatoria reducen la sal de tetrazolio (NBT) que es un excelente aceptor de electrones. La reducción de la sal de tetrazolio produce el formazán, un precipitado intensamente coloreado insoluble en agua.

Las enzimas de este sistema se encuentran en bacterias, algas, hongos, plantas, protozoarios, invertebrados y vertebrados. Catalizan la siguiente reacción (Manchenko, 1994) según los pasos esquematizados en 2. 6. 7. 4 (pag.39):

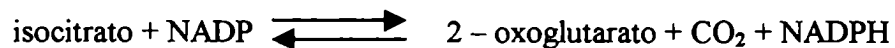


En este sistema encontramos sólo dos electromorfos, **A** y **B**, figura 3. 14. El patrón **B** con una sola banda de Rf 22 corresponde a *A. bahiensis* mientras que las restantes especies *A. gamundii*, *A. biguttulatus*, *A. furfuraceus*, *A. michaudii*, *A. crenulatus*, *A. ferrugineus*, *A. amoenus*, *A. mancus*, *A. bistisii*, *A. immersus* y *A. stictoideus* mostraron el patrón **A** con una sola banda de Rf 20.

3. 5. 5. Isocitrato dehidrogenasa

Esta es 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 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, 1981). Está presente en hongos, plantas, invertebrados y vertebrados. La isocitrato NADP dependiente está presente en bacterias, hongos, plantas, protozoarios, invertebrados y vertebrados.

Catalizan la siguiente reacción según los pasos esquematizados en 2. 6. 7. 5 (pag. 40):



Al igual que la glutamato dehidrogenasa reduce la sal de tetrazolio y produce un precipitado coloreado, el formazán.

La isocitrato dehidrogenasa, figura 3. 15 presenta cinco electromorfos (**A** – **E**) cada uno con dos bandas. El electromorfo **A** con las bandas de Rf 27 y 29 común al electromorfo **C** corresponde a *A. ferrugineus*, *A. mancus*, *A. bistisii*; el patrón **B** con las bandas de Rf 28 y 30 común a los electromorfos **D** y **E** es exclusivo de *A.*

GDH

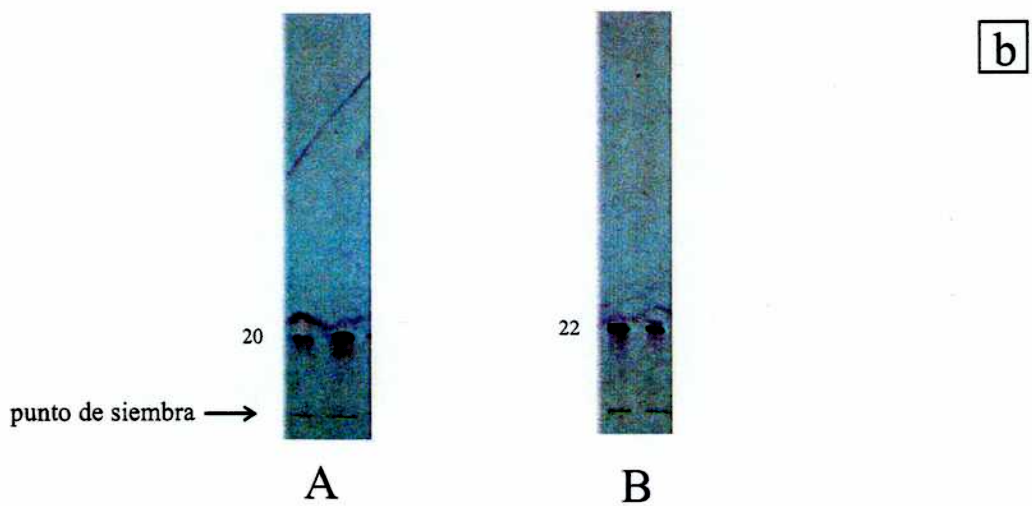
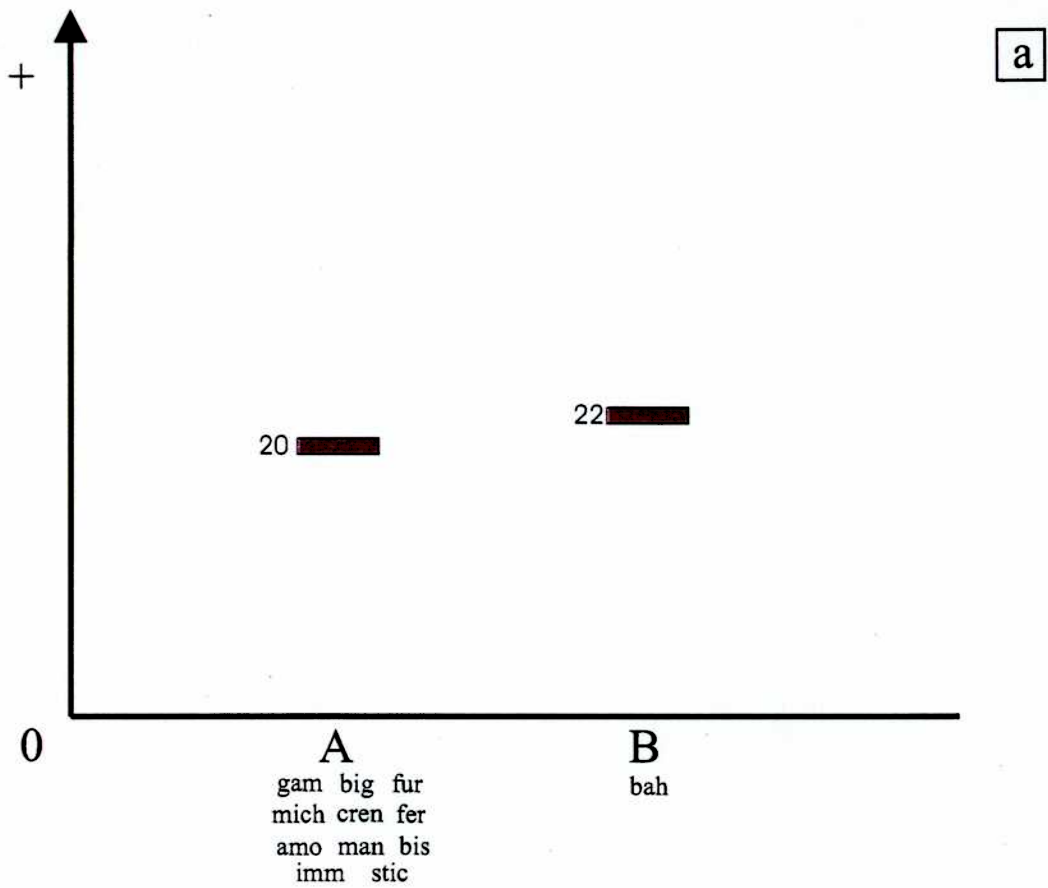


Figura 3-14: Sistema isoenzimático glutamato dehidrogenasa; a: diagrama de los electromorfos (**A** y **B**); b: zimogramas. Los números indican los Rf.

IDH

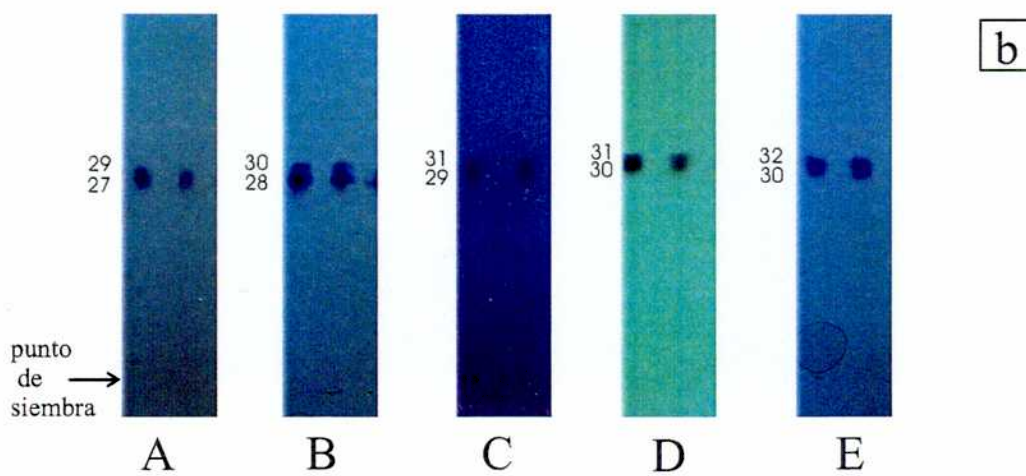
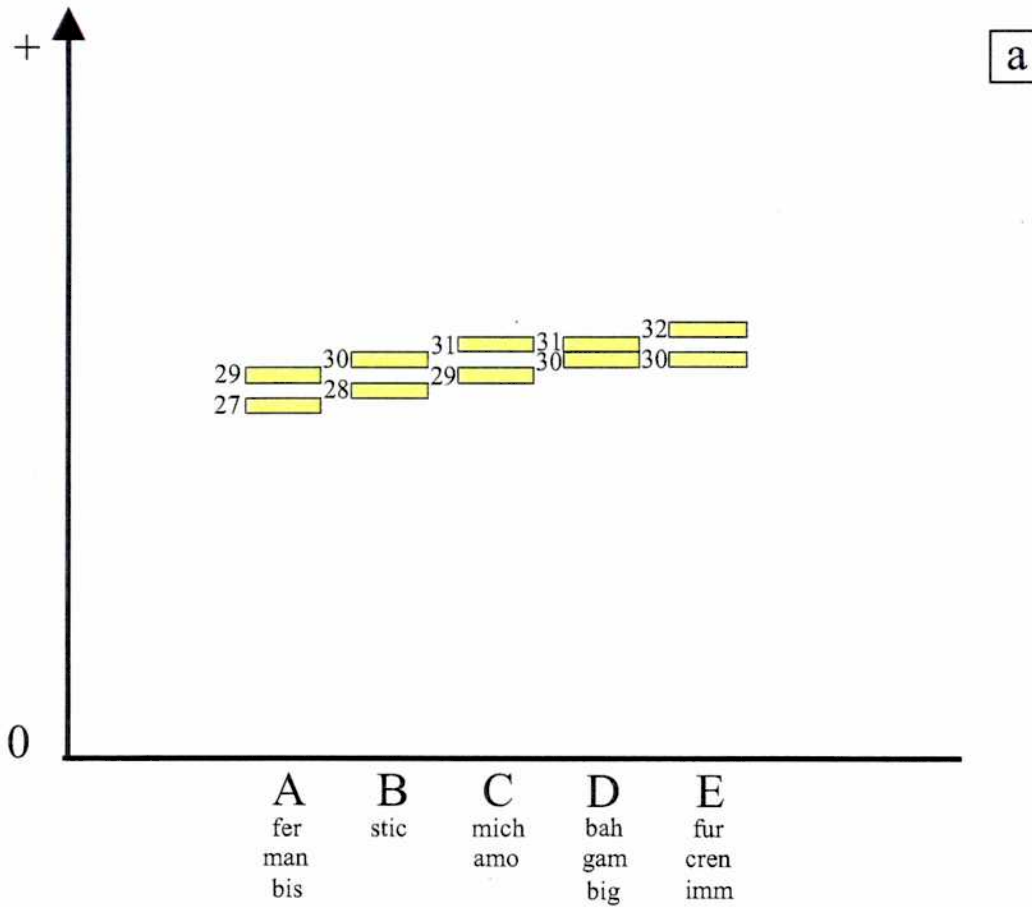
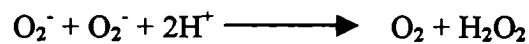


Figura 3-15: Sistema isoenzimático isocitrato dehidrogenasa; a: diagrama de los electromorfos (A - E); b: zimogramas. Los números indican los Rf.

stictoideus; el electromorfo **C** con las bandas de Rf 29 común al electromorfo **A** y Rf 31 común al **D** correspondió a *A. michaudii* y *A. amoenus*; el patrón **D** con las bandas de Rf 30 común al electromorfo **B** y Rf 31 común al **C** apareció en *A. bahiensis*, *A. gamundii* y *A. biguttulatus*; el patrón **E** con las bandas de Rf 30 común al **D** y al **B** y la banda de Rf 32 correspondió a *A. furfuraceus*, *A. cremulatus* y *A. immersus*.

3. 5. 6. Superóxido dismutasa

Esta enzima es la que convierte al superóxido en peróxido de hidrógeno y en oxígeno molecular, el peróxido de hidrógeno se descompone luego por acción de la catalasa en los peroxisomas. Se encuentra en dos formas, una en el citosol y otra en la mitocondria (Lehninger, 1981). Está presente en bacterias, hongos, plantas, protozoarios, invertebrados y vertebrados. Catalizan la siguiente reacción (Manchenko, 1994), según los pasos esquematizados en 2. 6. 7. 6 (pag. 41).



La **figura 3. 16** muestra cinco patrones de bandeo (**A – E**) de las cuales el patrón **B** es el único que presenta una sola banda de Rf 30, común al patrón **C**, y aparece en todas las especies de la sección *Ascobolus* y en *A. ferrugineus* de la sección *Dasyobolus*. El patrón **A** con las bandas de Rf 24 y 28 corresponde a *A. stictoideus*; el electromorfo **C** con dos bandas una de Rf 30 común a **B** y otra de Rf 42 común a **D** apareció en *A. amoenus*; el patrón **D** con dos bandas una de Rf 34 común al **E** y otra de Rf 42 común al **C** correspondió a *A. mancus* y *A. immersus*; el electromorfo **E** con dos bandas una de Rf 34 común al **D** y otra de Rf 50 correspondió a *A. bistisii*.

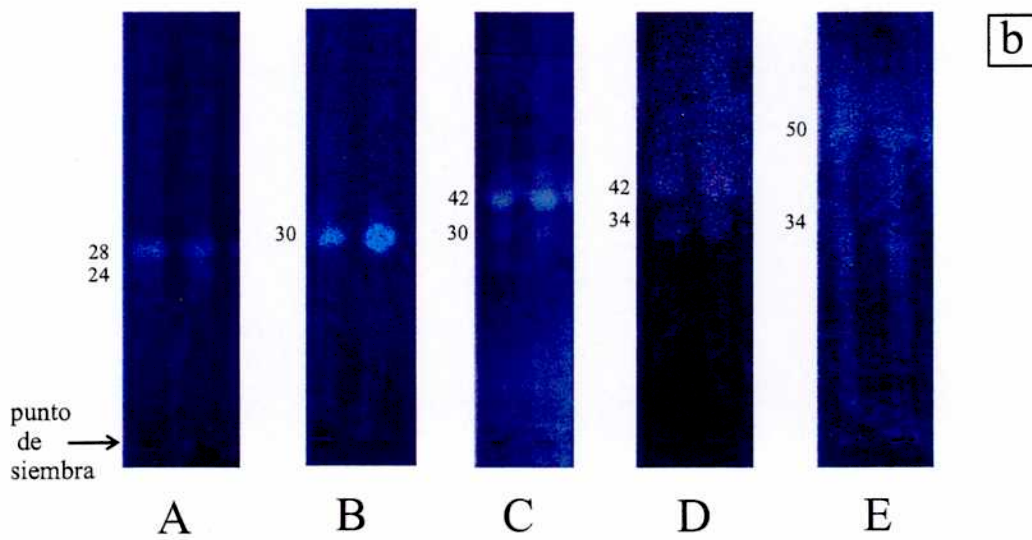
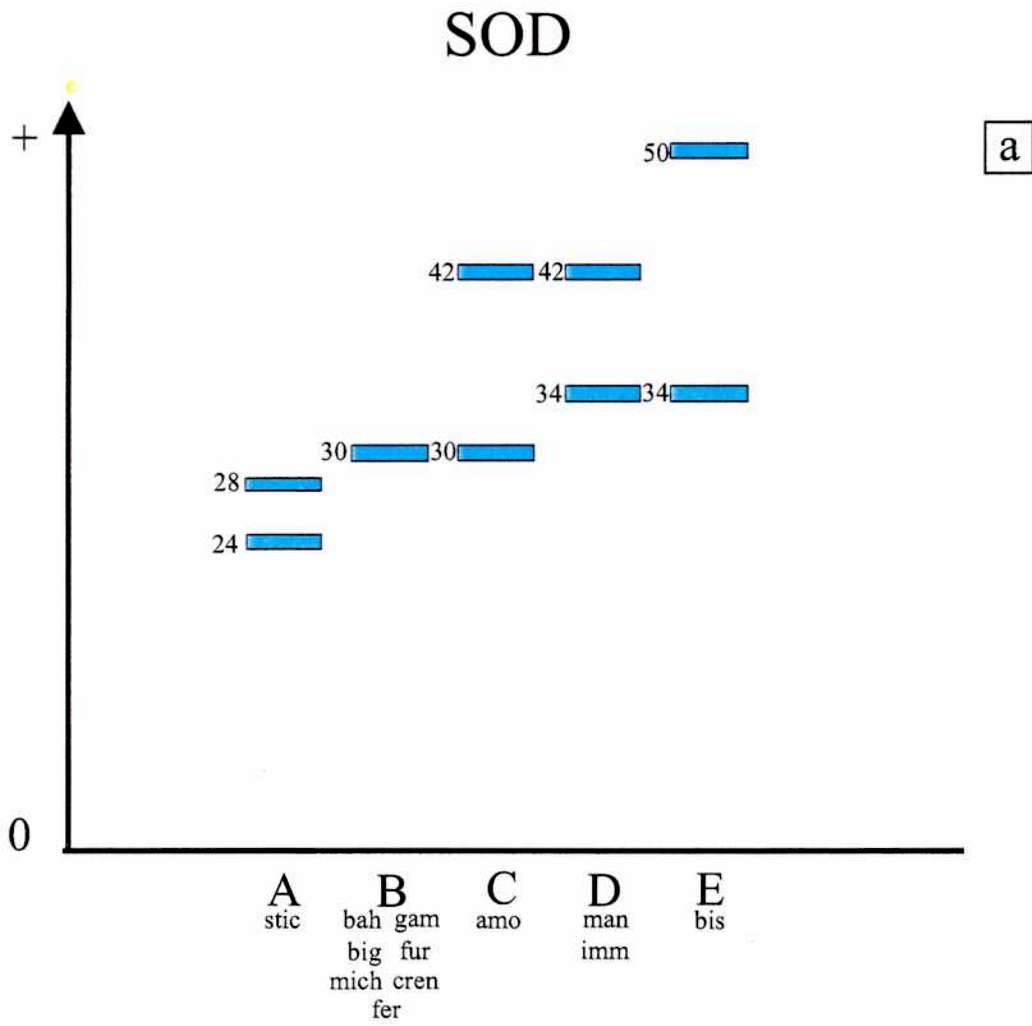


Figura 3 - 16: Sistema isoenzimático superóxido dismutasa; a: diagrama de los electromorfos (A - E); b: zimogramas. Los números indican los Rf.

3. 6. Construcción de la matriz básica de datos

La matriz básica de datos se obtuvo a partir del registro del estado de cada uno de los caracteres en cada unidad taxonómica operativa (OTU).

Dentro de las 69 muestras analizadas correspondientes a las 12 especies del género *Ascobolus* que se consignan en la **tabla 2. 5** (pág. 29), sólo se encontraron diferencias en los estados de los caracteres entre las distintas cepas en *A. gamundii* (muestra mixta 1+7) para EST 26 y EST 28 y en *A. ferrugineus* cepa 9 para ACP 23 y cepa 1 y 8 para ACP 33. En las restantes especies no se observaron diferencias. Esto determinó que las 69 muestras constituyeran las unidades taxonómicas operativas (OTU).

Cada uno de los 41 caracteres usados representa una banda de actividad enzimática de los seis sistemas estudiados. Los estados posibles de cada carácter se codificaron como presencia 1 ó ausencia 0 para las 69 muestras analizadas.

La **tabla 3. 2** muestra la matriz básica de datos obtenida con los 69 OTU y 41 caracteres.

3. 7. Electromorfos de los seis sistemas isoenzimáticos presentes en cada muestra

Los electromorfos presentes en todos los sistemas isoenzimáticos analizados de todas las muestras se pueden resumir en la **tabla 3. 3**. De los seis sistemas solamente la glutamato dehidrogenasa muestra una sola banda para todas las muestras, lo que concordaría con el hecho de que *Ascobolus* es un organismo haploide de un locus por enzima. Rodrigues et al. (1995) relacionan la haploidía de *Xylaria cubensis* con la aparición de una sola banda en el patrón del sistema malato dehidrogenasa. *Colletotrichum gloeosporioides*, parásito de plantas en Malasia, también presenta una sola banda en el sistema glutamato dehidrogenasa (Kanapathipillai, 1995).

La presencia de más de una banda en algunas muestras en los demás sistemas marca la existencia de duplicación génica o la formación de enzimas secundarias (Harris y Hopkinson, 1976; Micales et al., 1992).

Tabla 3. 3. Electromorfos de los sistemas enzimáticos presentes en cada muestra

SISTEMAS ENZIMATICOS							
SIGLA	POLARIDAD	AAT	ACP	EST	GDH	IDH	SOD
bah 2	+	G	D	A	B	D	B
bah 16	+	G	D	A	B	D	B
bah 3		G	D	A	B	D	B
bah 15-		G	D	A	B	D	B
bah 2+3	mixta	G	D	A	B	D	B
bah 16+15	mixta	G	D	A	B	D	B
gam 4	+	G	C	F	A	D	B
gam 1	+	G	C	F	A	D	B
gam 5		G	C	F	A	D	B
gam 7		G	C	F	A	D	B
gam 4+5	mixta	G	C	F	A	D	B
gam 1+7	mixta	G	C	G	A	D	B
big 3	+	E	C	B	A	D	B
big 6	+	E	C	B	A	D	B
big 4		E	C	B	A	D	B
big 5		E	C	B	A	D	B
big 3+4	mixta	E	C	B	A	D	B
big 6+5	mixta	E	C	B	A	D	B
fur 13	+	D	C	C	A	E	B
fur 14		D	C	C	A	E	B
fur 20		D	C	C	A	E	B
fur 13+14	mixta	D	C	C	A	E	B
fur 19+20	mixta	D	C	C	A	E	B
mich 6	+	B	C	D	A	C	B
mich 15	+	B	C	D	A	C	B
mich 5		B	C	D	A	C	B

Tabla 3. 3. Electromorfos de los sistemas enzimáticos presentes en cada muestra
(continuación)

SISTEMAS ENZIMATICOS							
SIGLA	POLARIDAD	AAT	ACP	EST	GDH	IDH	SOD
mich 3	-	B	C	D	A	C	B
mich 6+5	mixta	B	C	D	A	C	B
mich 15+3	mixta	B	C	D	A	C	B
cren 1	homo	A	A	E	A	E	B
cren 2	homo	A	A	E	A	E	B
cren 3	homo	A	A	E	A	E	B
cren 4	homo	A	A	E	A	E	B
fer 1	+	C	C	H	A	A	B
fer 9	+	C	A	H	A	A	B
fer 2		C	G	H	A	A	B
fer 8		C	C	H	A	A	B
fer 1+2	mixta	C	G	H	A	A	B
fer 9+8	mixta	C	G	H	A	A	B
amo 55	+	H	F	I	A	C	C
amo 108	+	H	F	I	A	C	C
amo 54		H	F	I	A	C	C
amo 107		H	F	I	A	C	C
amo 55+54	mixta	H	F	I	A	C	C
amo108+107	mixta	H	F	I	A	C	C
amo 108+54	mixta	H	F	I	A	C	C
amo 55+107	mixta	H	F	I	A	C	C
man 4	+	H	B	J	A	A	D
man 5	+	H	B	J	A	A	D
man 3		H	B	J	A	A	D
man 6		H	B	J	A	A	D

Tabla 3. 3. Electromorfos de los sistemas enzimáticos presentes en cada muestra
(continuación)

SISTEMAS ENZIMATICOS							
SIGLA	POLARIDAD	AAT	ACP	EST	GDH	IDH	SOD
man 4+3	mixta	H	B	J	A	A	D
man 5+6	mixta	H	B	J	A	A	D
bis 8	+	F	C	K	A	A	E
bis 10	+	F	C	K	A	A	E
bis 7		F	C	K	A	A	E
bis 9		F	C	K	A	A	E
bis 8+7	mixta	F	C	K	A	A	E
bis 10+9	mixta	F	C	K	A	A	E
imm 3	+	B	B	L	A	E	D
imm 9	+	B	B	L	A	E	D
imm 7		B	B	L	A	E	D
imm 10		B	B	L	A	E	D
imm 3+7	mixta	B	B	L	A	E	D
imm 9+10	mixta	B	B	L	A	E	D
stic 4	homo	B	E	M	A	B	A
stic 5	homo	B	E	M	A	B	A
stic 6	homo	B	E	M	A	B	A
stic 7	homo	B	E	M	A	B	A

3. 8. Técnicas numéricas

De los diferentes coeficientes de similitud aplicados: Gower (1966), Sorensen (1948) y Jaccard (1908), se eligió el primero ya que permite el procesamiento de matrices que contengan datos binarios para la matriz básica de datos isoenzimático y binarios, multiestado y cuantitativos para la matriz básica de datos morfológicos.

3. 7. 1. Matriz básica de datos morfológicos

Se reunieron en la Matriz Básica de Datos 12 OTUs correspondientes a cada una de las especies estudiadas. De los 23 caracteres, 9 son considerados como binarios, 4 como multiestado y 10 como cuantitativos.

La matriz resultante se analizó 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 0,92615 indicando una escasa distorsión entre la matriz de similitud y el fenograma obtenido avalando la utilización del coeficiente de Gower.

De la aplicación del coeficiente de similitud de Gower, y posterior UPGMA, se obtuvo el dendrograma de la **figura 3. 17**.

El fenograma muestra dos grupos principales de especies ligados entre sí con un índice de similitud de 53%. El primer grupo corresponde a la sección *Ascobolus* más *A. stictoideus* de la otra sección y el segundo a cinco especies de la sección *Dasyobolus*.

En el primer grupo encontramos el subgrupo formado por *A. bahiensis*, *A. gamundii*, *A. michaudii*, *A. furfuraceus* y *A. biguttulatus* ligados con un índice de similitud de 62% al núcleo formado por *A. cremulatus* y *A. stictoideus*.

El subgrupo *A. bahiensis*, *A. gamundii*, *A. michaudii* y *A. furfuraceus* forma un conjunto ligado al OTU *A. biguttulatus* con un índice de similitud de alrededor del 75%. En el conjunto encontramos el subconjunto *A. gamundii*, *A. michaudii* y *A. furfuraceus* ligado al OTU *A. bahiensis* con un índice de 80% y el subconjunto incluye el núcleo *A. gamundii* y *A. michaudii* unido al OTU *A. furfuraceus* con un índice de 85%. Finalmente el OTU *A. gamundii* y el OTU *A. michaudii* están asociados con un índice de alrededor de 90%.

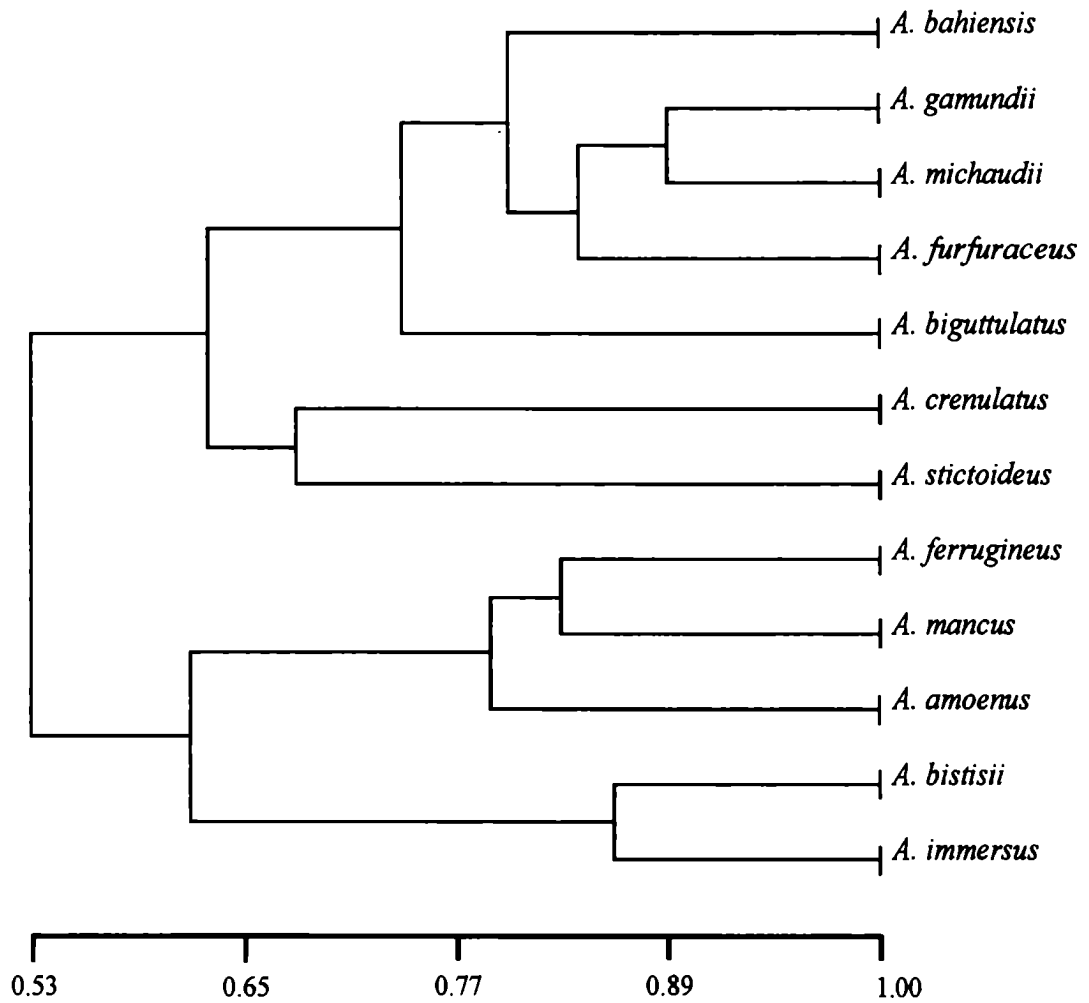


Figura 3. 17. Fenograma obtenido a partir de los datos morfológicos. Análisis de agrupamientos realizado por el método de medias no ponderadas (UPGMA).

En el segundo grupo encontramos un subgrupo formado por *A. ferrugineus*, *A. mancus* y *A. amoenus* ligado al núcleo *A. bistisii* y *A. immersus* con un índice de similitud de 62%.

En el subgrupo el núcleo *A. ferrugineus* y *A. mancus* está asociado al OTU *A. amoenus* con un índice de 79%. El núcleo *A. ferrugineus* y *A. mancus* está ligado con un índice de 83% y el núcleo *A. bistisii* y *A. immersus* con 86%.

3. 7. 2. Matriz básica de datos isoenzimáticos

Las 69 muestras analizadas de las doce especies del género *Ascobolus* con su polaridad consignadas en la **tabla 2. 5** (pág. 29) constituyeron las unidades taxonómicas operativas (OTU).

A partir de los 69 OTUs x 41 caracteres que se detallan en la **tabla 3. 2.** (pág. 86) se obtuvo la matriz básica de datos.

Se aplicó el coeficiente de similitud de Gower y la matriz resultante se analizó 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 0,94581.

El fenograma (**figura 3. 18**) obtenido a partir del análisis de agrupamientos muestra dos grupos principales de especies ligados entre sí con un índice de similitud superior al 60%. El primer grupo corresponde a cinco especies de la sección *Ascobolus* y está formado por dos subgrupos ligados entre sí con un índice de similitud de 72%.

En el primer subgrupo encontramos dos conjuntos que incluyen uno de ellos a *A. bahiensis* con las cepas 2, 16, 3, 15 y las muestras mixtas 2 + 3 y 16 + 15 y el otro a *A. biguttulatus* con las cepas 3, 6, 4, 5 y las muestras mixtas 3 + 4 y 6 + 5 ligadas con un índice de similitud de 75%.

El segundo subgrupo incluye dos conjuntos: uno formado por *A. gamundii* y *A. furfuraceus* y otro por *A. crenulatus* con las cepas 1, 2, 3 y 4 ligados con un índice de similitud de alrededor de 75%.

En el primer conjunto se observa el subconjunto formado por *A. gamundii* cepas 4, 1, 5, 7 y muestra mixta 4 + 5 ligado a la OTU *A. gamundii* 1 + 7 con un índice de similitud de 95%.

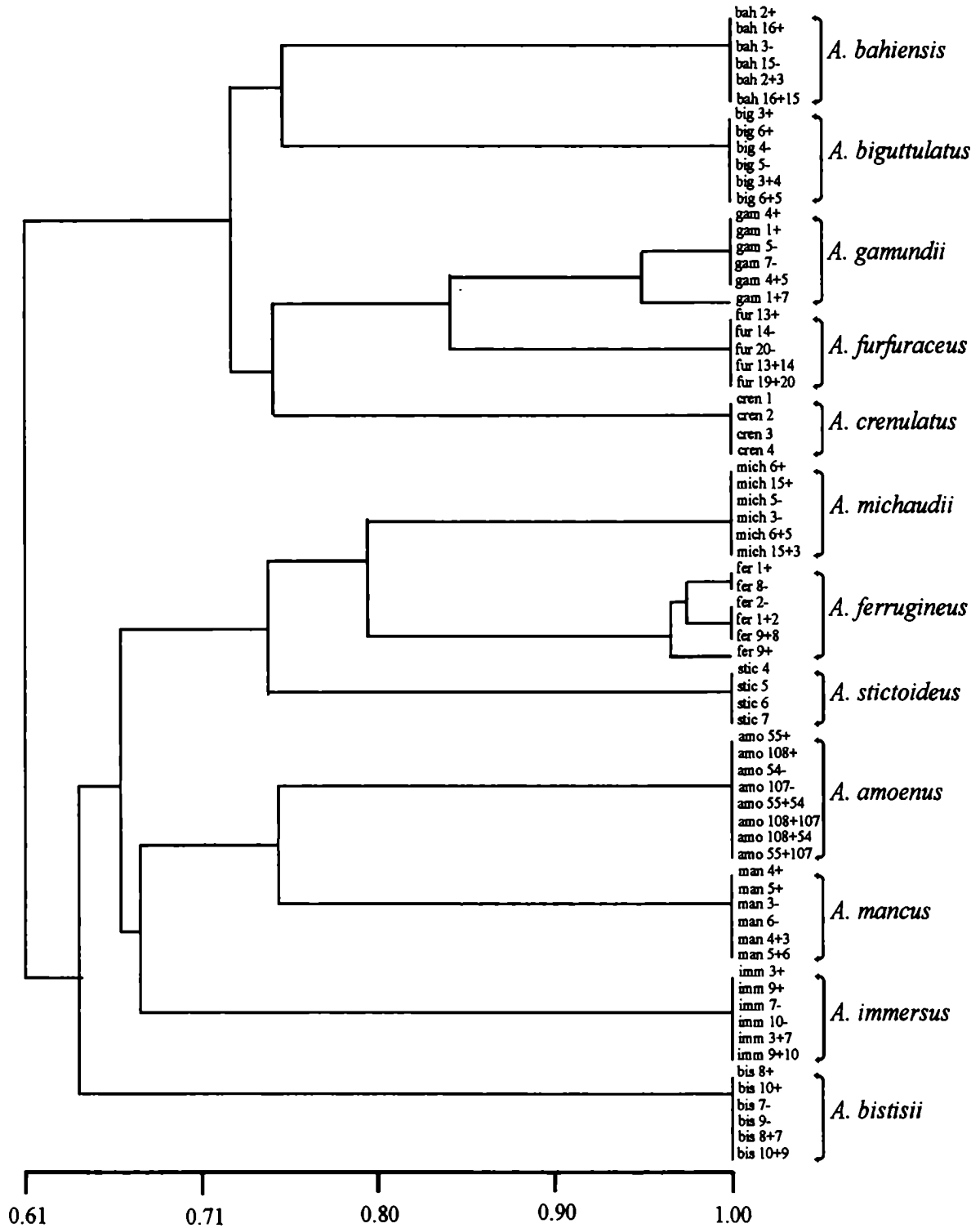


Figura 3. 18. Fenograma obtenido a partir de los datos isoenzimáticos. Análisis de agrupamientos realizado por el método de medias no ponderadas (UPGMA).

El segundo grupo corresponde a todas las especies de la sección *Dasybolus* y a *A. michaudii* de la sección *Ascobolus* y está formado por un amplio subgrupo y otro menor formado por las cepas 8, 10, 7 y 9 de *A. bistisii* y las muestras mixtas 8 + 7 y 10 + 9 de la misma especie ligados con un índice de similitud de aproximadamente 63%.

En el primer subgrupo encontramos dos conjuntos ligados con un índice de alrededor de 65% y formado por *A. michaudii*, *A. ferrugineus* y *A. stictoides* el primero y *A. amoemus*, *A. mancus* y *A. immersus* el segundo. El primer conjunto abarca el subconjunto formado por las cepas 4, 5, 6 y 7 de *A. stictoides* ligado al otro subconjunto con un índice de similitud de 75% y el subconjunto formado por *A. michaudii* con las cepas 6, 15, 5, 3 y las muestras mixtas 6 + 5 y 15 + 3 y *A. ferrugineus* con un núcleo formado por las cepas 1 y 8 ligadas a la cepa 2 y muestras mixtas 1 + 2 y 9 + 8 y la OTU *A. ferrugineus* cepa 9, ligadas con un índice superior al 95%.

El conjunto formado por *A. amoemus*, *A. mancus* y *A. immersus* muestra dos subconjuntos: *A. immersus* con las cepas 3, 9, 7, 10 y muestras mixtas 3 + 7 y 9 + 10 ligado a *A. amoemus* y *A. mancus* con un índice cercano al 65%. Todas las cepas y muestras mixtas de *A. amoemus* están ligadas a todas las muestras de *A. mancus* con un índice del 75%

Como se observa en el fenograma, no hay variación intraespecífica, ni entre las cepas monospóricas ni en las muestras mixtas a excepción de *A. gamundii* muestra mixta 1 + 7 y *A. ferrugineus* donde *A. ferrugineus* cepa 9 queda representada como un OTU aislado mientras *A. ferrugineus* cepas 1 y 6 forman un núcleo y *A. ferrugineus* cepa 2 y muestras mixtas 1 + 2 y 9 + 8 forman un subconjunto.

Discusión

El análisis de los 6 sistemas isoenzimáticos demuestra la existencia de 4 sistemas monomórficos (AAT, GDH, IDH y SOD) y 2 sistemas polimórficos (ACP y EST). En los primeros no existen variaciones dentro de las cepas de una misma especie ni en las muestras mixtas, mientras que en esterasas, *A. gamundii* muestra mixta 1 + 7 presenta un patrón diferente a las demás cepas y muestras mixtas de la

misma especie. ACP es otro sistema polimórfico donde para la misma especie existen 3 patrones de bandas.

Huss et al. (1996) trabajando con seis poblaciones compatibles (mating population) de *Giberella fujikoro* (*Fusarium* sec. *Liseola*), A a F, sugieren que esterasa y fosfatasa ácida son suficientemente variables dentro de una población compatible para ser usados en el análisis intraespecífico de una población. El polimorfismo en esterasa y fosfatasa ácida dentro de la población compatible A y D de *G. fujikoro* observado por Kathariou (1981) no es el mismo observado por Huss et al. (1996) probablemente debido a los diferentes buffers utilizados.

Los sistemas fosfatasa ácida y esterasa también se han utilizado en el análisis intraespecífico en aislamientos de *Beauveria brongniartii*, parásito con diferentes grados de virulencia sobre las larvas del abejorro en Europa (Reineke y Zebita, 1996) y en el estudio de la variabilidad fenotípica y genotípica en *Aspergillus fumigatus* (Rinyu et al., 1995).

El género *Saccobolus*, especie coprófila de la misma familia mostró en esterases el único sistema que evidenció diferencias en el patrón de bandas entre algunos aislamientos geográficos de la misma especie (Ramos, 1998).

La predominancia de enzimas monomórficas y una clara distribución de electromorfos entre las especies sugiere que el análisis isoenzimático es una buena herramienta taxonómica dentro del género *Tremella* (Hanson, 1991).

Existen numerosos trabajos que demuestran la existencia de sistemas enzimáticos polimórficos: *Rhizoctonia solani* presenta mayor polimorfismo en diaforasa seguido de esterasa y malato dehidrogenasa (Laroche, 1992); *Cochliobolus carbonum* en aspartato aminotransferasa, esterasa, glucosa fosfato isomerasa, leucinaminopeptidasa y manitol dehidrogenasa (Simcox, 1992); *Leptosphaeria maculans* (Gall, 1995) presenta polimorfismo en aspartato aminotransferasa, esterasa, glucosa 6-fosfato dehidrogenasa y shikimato dehidrogenasa y no en fosfatasa ácida, malato dehidrogenasa y fosfoglutamato isomerasa; *Mucor piriformis* (Vágvölgyi, 1996) en esterasa y glucosa 6-fosfato dehidrogenasa.

En *Pleurotus ostreatus* (May y Royse, 1988) y en *Agaricus campestris* (May y Royse, 1982) se encontró una gran variabilidad intraespecífica en numerosos sistemas isoenzimáticos pero sólo se utilizaron aquellos que revelaron poca o ninguna variación intraespecífica. Cuando esa variación se superpone con la

variación interespecífica, reduce la eficiencia de la metodología para separar especies, por lo tanto, sugieren elegir marcadores isoenzimáticos con variabilidad intraespecífica limitada cuando se quiere estudiar la variabilidad interespecífica.

Maghrabi y Kish (1985 a, 1985 b, 1986 y 1987) en *Ascosphaerales* sostienen que la similitud intraespecífica (mating types dentro de una especie) fue mayor que la similitud isoenzimática interespecífica. Esta variación intraespecífica fue observada con esterasa, hexoquinasa, leucinaminopeptidasa y fosfoglucomutasa en las cepas (+), (-) y (+-) de *Ascosphaera apis* y *A. asterophora*. Estos datos quedan confirmados al aplicar los índices de identidad genética (I) y de distancia genética (D) de Nei a *A. apis* con las especies *A. poliperda* y *A. aggregata* ambos homotáticos y a *A. asterophora* con *A. atra* y *A. major* también homotáticas. En el sistema isoenzimático fosfatasa ácida en *A. asterophora* encuentra el mismo patrón para las cepas (+), (-) y (+-); en *A. apis*, las cepas (+) y (+-) presentan el mismo patrón diferente a la cepa (-). En *A. ferrugineus* se observa el mismo comportamiento mientras que en las restantes especies todas las muestras para una misma especie presentan el mismo patrón de bandeo.

En *Phytophthora infestans* (Mosa, 1993) existe una asociación entre la compatibilidad sexual y los patrones de glucosa fosfato isomerasa, peptidasa y enzima málica. En todos los aislamientos de *Mucor piriformis* provenientes del mismo huésped, los patrones de malato dehidrogenasa, glucosa 6-fosfato dehidrogenasa y esterasa varían entre las cepas (+), (-) y neutras.

Harrington et al. (1996) en el complejo *Ceratocystis coerulescens* dicen que el grado de variación intraespecífica puede ser el reflejo del sistema de compatibilidad sexual. Las especies heterotáticas tuvieron mayor variación isoenzimática que las homotáticas quizás debido a un cambio en el mecanismo de compatibilidad. *Chalara australis*, especie que se reproduce asexualmente no muestra variación en los electromorfos.

Este bajo nivel de polimorfismo también se encuentra en otros hongos que se reproducen asexualmente como *Leptographium* (Zambino y Harrington, 1989, 1992).

Barr et al. (1996) consideran el análisis isoenzimático en *Pythium ultimum* y especies relacionadas como método efectivo para identificar aislamientos asexuales que son imposibles de reconocer morfológicamente.

En especies de *Phytophthora* (Oudemans y Coffey, 1991, a y b) demostraron que la diversidad intraespecífica fue baja mientras que la interespecífica fue mayor. Como fuera sugerido por Old et al. (1984, 1988) encuentran distintos patrones isoenzimáticos en las dos cepas compatibles del sistema isocitrato dehidrogenasa.

El nivel de variabilidad está directamente relacionado con la reproducción sexual. Burdon et al. (1981, 1983) encontraron que en *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* no había variabilidad isoenzimática cuando se mantenían asexualmente. Igual comportamiento se observó en *Phakopsora pachyrhizi* (Bonde et al., 1988) y *Puccinia striiformis* (Newton et al., 1985) patógenos que no se reproducen sexualmente.

La poca variabilidad intraespecífica permitió utilizar las diferencias interespecíficas y separar las especies entre sí. Otros autores también utilizan los sistemas isoenzimáticos que presentan baja o nula variabilidad dentro de la especie (Vágvölgyi, 1996; Oudemans y Coffey, 1991 a y b; May y Royce, 1988).

Las especies homotálicas coprófilas surgen como una adaptación al sustrato isla que determina su aislamiento reproductivo dificultándose en el caso de las heterotálicas la unión con el micelio compatible (Wicklów, 1981). El mantenimiento de la reproducción sexual permite la dispersión de las ascosporas a través del mecanismo de descarga de las mismas. Los individuos homotálicos haploides producen descendencia clonal, en cambio los heterotálicos, vía recombinación producen descendencia variable (Rayner, 1990).

Los hongos coprófilos están sometidos 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.

Las especies que crecen en condiciones ambientales relativamente uniformes muestran según Newton (1985, 1987) baja variabilidad isoenzimática. En un ambiente heterogéneo, en cambio, existirían formas alternativas de la enzima (Johnson, 1974).

Los componentes celulares utilizados como parámetros son influenciados, en muchos casos, por la composición y el pH de los medios de cultivo, la temperatura de incubación, así como por el tipo y edad fisiológica del cultivo. Es por esta razón

que Chang y Mills (1992) trabajando con *Psilocybe subaeruginosa* sugieren que los cultivos se encuentren en estados fisiológicos equivalentes.

Hsiau (1997) encontró que aunque las características de cultivo de dos especies de *Ceratocystiopsis* son similares, las velocidades de crecimiento difieren.

Una alta diversidad en la población de *Histoplasma capsulatum* (Hamrich et al., 1986) se debió a condiciones experimentales diversas, en cambio en el complejo *Lyophyllum descastes* (Moncalvo y Clemençon, 1994), excepto para esterasas, las demás enzimas testeadas (fenoloxidasas y β -glucosidasas) dan idénticos patrones cuando se cultivan 14, 28 ó 42 días.

Por todas estas razones debe procurarse estandarizar las condiciones culturales para realizar comparaciones válidas entre los individuos.

Con tal fin se encaró el estudio de la cinética del crecimiento de las doce especies de *Ascobolus* estudiadas. Varios estudios nutricionales y fisiológicos se han realizado en especies del género *Ascobolus*: *A. immersus* (Yu Sun, 1964), *A. cremulatus* (Galvagno, 1976), *A. furfuraceus* (Lima y Mercuri, 1984), *A. furfuraceus* (Mercuri y Lima, 1985), *A. furfuraceus* (Mercuri, 1996 a, b, c y d), *A. furfuraceus* (Mercuri et al., 1983), *A. biguttulatus* (Pardo y Forchiassin, 1993). En *A. biguttulatus* se estudió el crecimiento vegetativo en distintas concentraciones de glucosa, asparagina y vitaminas (Cinto et al., 1977, 1978) sugiriéndose un medio de cultivo sintético adecuado para su crecimiento. Estos estudios sirvieron como base para estandarizar las condiciones de cultivo.

En las 10 especies heterotálicas, al cultivar las cepas (+) junto a las cepas (-) se esperaba encontrar una interacción entre ambas a nivel hormonal que se manifestara en algunos de los sistemas analizados. Dado que las fructificaciones sólo aparecen en medios sólidos como respuesta a esa interacción hormonal, no se encontraron grandes diferencias en las muestras mixtas ya sea por tratarse de un medio de cultivo líquido o bien, que los sistemas isoenzimáticos analizados no estuvieran involucrados en este proceso sexual. Sólo se encontraron diferencias en la muestra mixta *A. gamundii* (1 + 7) para esterasas y *A. ferrugineus* muestras mixtas (1 + 2 y 9 + 8) para fosfatasa ácida.

A partir del estiércol de vaca de Gualeguaychú (Pcia. de Entre Ríos) colocado en cámara húmeda se aisló lo que se supuso en principio un mutante natural de *A. amoemus* ya que al observar sus ascos al microscopio se comprobó la

presencia de 8 ascosporas de las cuales cuatro respondían a las características normales de *A. amoenus*, mientras que las otras cuatro presentaban un aspecto completamente distinto. No solamente en cuanto a la forma, que a pesar de mantenerse dentro de las características generales, era menos aguzada en los polos sino en cuanto al exosporio dispuesto como una capa delgada formando crestas elevadas y profundas depresiones (Dokmetzian et al., 1995).

Aislado el mutante se comprobó que esta mutación no afecta ni incluye a los factores de compatibilidad sexual que segregan normalmente y que permiten la obtención de los homocigotas salvaje y mutante. Las cepas 55(+) y 54 (-) son los pares compatibles del homocigota salvaje y las cepas 108(+) y 107(-) los del homocigota mutante.

Para corroborar la existencia de algún tipo de interacción entre las cepas del mutante y del híbrido, se cultivaron las muestras mixtas del homocigota salvaje (55 + 54), del homocigota mutante (108 + 107) y los heterocigotas (108 + 54 y 107 + 55). En ninguno de los sistemas isoenzimáticos estudiados hubo diferencias en los patrones de bandas de estas 8 muestras (4 cepas individuales y 4 muestras mixtas) probablemente debido a que ellos no estuvieron involucrados con la deposición del exosporio o por tratarse de un cultivo líquido, en el que no se obtuvieron fructificaciones.

A. gamundii y *A. furfuraceus* están relacionadas con un índice de similitud parecido tanto en el fenograma morfológico cuanto en el fenograma isoenzimático, de alrededor del 85%. Aunque en *A. gamundii* las ascosporas son más pequeñas, la cercanía de estas especies queda certificada por el cruzamiento interespecífico ya que es el único caso donde se llega a la formación de hifas ascógenas y posterior apertura de la “fructificación” híbrida y como sugiere Raper (1959) “el grado de correspondencia de las hormonas sexuales entre diferentes especies puede indicar relaciones bioquímicas y filogenéticas”. Hsiau y Harrington (1997) obtienen peritecios híbridos al cruzar las cepas de compatibilidad opuesta de *Ceratocystiopsis brevicomi* con *C. ranaculosus*, pero estos peritecios producen pocas ascosporas. Sin embargo existen variaciones en los electromorfos de los sistemas utilizados que permiten separar ambas especies.

A. bahiensis y *A. biguttulatus* están relacionados con un índice muy similar (75%) tanto en el fenograma isoenzimático cuanto en el morfológico. Los datos

cuantitativos son semejantes pero existe cierta variación en los datos de cultivo que aleja a *A. biguttulatus* de *A. bahiensis* y acerca a este último al conjunto *A. gamundii*, *A. michaudii* y *A. furfuraceus* (80%) aunque en los cruzamientos de *A. bahiensis* con *A. biguttulatus*, *A. furfuraceus* y *A. gamundii* se forman ascogonios y primordios que abortan sin llegar a formar hifas ascógenas. Si bien la producción de oídios es abundante en todas estas especies, el aspecto del micelio aéreo en vista superficial no es el mismo. En *A. bahiensis*, las hifas aéreas emergen en puntos localizados de la colonia, muy próximos entre sí, y se ramifican profusamente, tomando un aspecto arborescente característico.

A. gamundii y *A. michaudii* presentan el mayor índice de similitud en el fenograma morfológico (89%) pero en el fenograma isoenzimático *A. michaudii* se agrupa con las especies de la sección *Dasyobolus*. El índice de similitud con *A. gamundii* en el fenograma isoenzimático es de 75% y con *A. ferrugineus* es aproximadamente 80%. Al analizar los patrones de banda vemos que *A. michaudii* presenta el mismo patrón del sistema aspartato aminotransferasa que *A. immersus* y *A. stictoideus*; de isocitrato dehidrogenasa que *A. amoemus*, todos de la sección *Dasyobolus*. El electromorfo de fosfatasa ácida es el mismo de *A. gamundii*, *A. biguttulatus*, *A. furfuraceus* de la sección *Ascobolus*; y *A. bistisii* y una banda de *A. ferrugineus* (Rf 23) de la sección *Dasyobolus*. El sistema superóxido dismutasa presenta un patrón común a todas las especies de la sección *Ascobolus*; y a *A. ferrugineus* y una banda (Rf 30) de *A. amoemus* de la sección *Dasyobolus*.

Esta diferencia entre los índices de similitud de los fenogramas morfológico e isoenzimático puede deberse a que se está trabajando con la fase reproductiva en el fenograma morfológico y la fase somática en el isoenzimático y ambas fases están sometidas a distintas presiones de selección.

La fase reproductiva está directamente relacionada con la fase somática por los aportes de nutrientes del micelio por lo tanto las interacciones entre ellas son elementos claves de la sistemática.

Como en 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 gran diversidad en forma pero menor plasticidad fenotípica que la fase somática.

En *A. amoenus* y *A. mancus* ambos índices son similares (75%). Estas dos especies se diferencian entre sí por el tamaño de las ascosporas. Al realizar los cruzamientos interespecíficos en todas las combinaciones posibles no hubo ningún tipo de respuesta sexual y el micelio creció profusamente en todos los casos.

A. bistisii y *A. immersus* están relacionados con un índice de similitud de 87% en el fenograma morfológico y de 60% en el isoenzimático. Morfológicamente ambas especies son muy semejantes y se diferencian fundamentalmente, por la presencia de oídios en *A. bistisii*. Esta cercanía queda comprobada en el cruzamiento interespecífico donde los oídios de *A. bistisii* no germinan en presencia del micelio de *A. immersus* pero se hinchan tomando el aspecto característico de un oídio activado aunque no inducen la formación de ascogonios. En el fenograma isoenzimático *A. bistisii* aparece claramente diferenciado del grupo que incluye al resto de las especies de la sección. Probablemente esto esté relacionado con el hecho de ser el único que forma oídios.

A. cremulatus y *A. stictoideus*, las dos especies homotálicas consideradas en este estudio están ubicadas tradicionalmente en la sección *Ascobolus* y en la sección *Dasyobolus* respectivamente. Sin embargo, en el fenograma morfológico *A. stictoideus* está agrupado con *A. cremulatus* y ambos con las restantes especies de la sección *Ascobolus* con un índice de similitud bajo (62%).

Esta relación cercana de *A. cremulatus* y *A. stictoideus* ubicándose ambos en la sección *Ascobolus*, en principio no parece correcta. Ambos son homotálicos, por lo que se destacan del resto de las especies que abarca este estudio. Sin embargo, difieren con respecto al tipo de desarrollo de la fructificación, ambos son cleistohimenciales, pero en *A. cremulatus* el himenio es expuesto en la fase mesohimencial, mientras que en *A. stictoideus*, en la fase telohimencial.

Sin embargo, hemos visto en cultivos de *A. albidus* (Ranalli y Cinto, 1972), que si bien esta especie responde en términos generales al patrón de desarrollo que permite ubicarlo en la sección *Ascobolus* (cleistohimencial, abriéndose en la fase mesohimencial), en muchos casos se producen fructificaciones con sólo unos pocos ascos maduros ya que la exposición del himenio se retarda y eventualmente lo hace, en la fase telohimencial. Ambos tipos de desarrollo coexisten en el mismo cultivo y bajo las mismas condiciones medioambientales. Estas fructificaciones determinarían

la ubicación de *A. albidus* en la sección *Dasyobolus*, en lugar de la sección *Ascobolus* donde se ubica normalmente.

Tanto *A. albidus* cuanto *A. stictoideus* cuando son mantenidos en oscuridad completa producen fructificaciones con desarrollo cleistohiménial, totalmente sumergidos en el medio, con ascos que no son expuestos en ningún momento y que al completar la maduración fueron delicuescentes. Las ascosporas producidas en estos “cleistotecios” no depositan el exosporio, son hialinos, de tamaño normal y muy abundantes, pudiéndose observar por transparencia, que llenan por completo la cavidad central del “cleistotecio” maduro.

Los “cleistotecios” obtenidos no diferenciaron paráfisis y en la parte central se encontraron ascosporas maduras, incoloras, libres dentro de la fructificación, pero ordenadas en hileras, lo que hace evidente que los ascos estaban ordenados constituyendo el himenio. La ausencia absoluta de paráfisis y el carácter delicuescente de los ascos son las causas por las cuales las fructificaciones obtenidas en oscuridad no se abren, siendo entonces la luz, un factor que juega un papel muy importante en la diferenciación de dichas estructuras.

Van Brummelen (1972) considera que la ontogenia del ascocarpo puede ser un carácter importante en la clasificación de la familia Ascobolaceae, pero que no deben establecerse generalizaciones sobre el estudio de uno o pocos taxones.

Por otra parte, y observando la respuesta de este carácter ante variaciones medioambientales, debe tenerse en cuenta muy especialmente, las condiciones en las cuales se hacen las observaciones.

Debemos tener en cuenta que en la naturaleza existe un continuo, lo que en algunos casos lleva a la superposición de algunos caracteres utilizados en la clasificación.

CONCLUSIONES

4. Conclusiones

Dadas las superposiciones observadas en las características morfológicas de las especies y en las respuestas a las condiciones de cultivo, se decidió analizar comparativamente, los sistemas isoenzimáticos que permitieran delimitar precisamente, a las especies estudiadas. Con tal fin, fue necesario realizar el estudio del crecimiento en cultivo en medio líquido, observando su comportamiento a través de las fases de la curva, lo que nos permitió:

- 1) Asegurarnos que el micelio que utilizamos para el análisis isoenzimático, estuviera, al cosecharlo, en la misma fase de la curva en todos los casos. Dadas las condiciones controladas y perfectamente definidas empleadas en los cultivos, las muestras de micelio de las distintas especies procesadas, se encontraban en estados fisiológicos comparables.
- 2) Observar que los resultados obtenidos, demostraron variación entre las especies, que difirieron entre sí en la extensión relativa de las fases de las curvas. Considerando la etapa de crecimiento exponencial, pudimos diferenciar tres grupos.

Podemos concluir, que la cinética del crecimiento en *Ascobolus* muestra marcadas diferencias entre las especies estudiadas, lo que lo distingue netamente del género *Saccobolus*, en el que las curvas de crecimiento son similares en las distintas especies, sin fase estacionaria y con una disminución abrupta del peso seco al comenzar la autólisis (Ramos, 1998).

De los resultados de los cruzamientos interespecíficos podemos concluir, tal como lo sugiriera Raper (1959), "que el grado de correspondencia de las hormonas sexuales entre diferentes especies puede indicar relaciones bioquímicas y filogenéticas". *A. furfuraceus* y *A. gamundii* están aparentemente más relacionadas entre sí que con las otras especies de *Ascobolus* estudiadas. Inclusive, de las características morfológicas diferenciales entre ambas especies, las ascosporas son un rasgo característico con morfología muy semejante, pero, en *A. gamundii* son mucho más pequeñas, lo que quizás indique una relación de ploidía con *A. furfuraceus*.

El análisis de los seis sistemas isoenzimáticos demostró la existencia de cuatro sistemas monomórficos (aspartato aminotransferasa, glutamato dehidrogenasa, isocitrato dehidrogenasa y superóxido dismutasa) y dos sistemas polimórficos (esterasa y fosfatasa ácida).

La variación en los patrones de esterasa y fosfatasa ácida también fue observada en hongos por numerosos autores, Huss et al. (1996), Kathariou (1981), Reineke y Zebita (1996), Vágvölgyi (1996), entre otros. La baja variabilidad intraespecífica permitió utilizar las diferencias interespecíficas y separar las especies entre sí.

Tal como sugieren Harrington et al. (1996), también aquí, la variación intraespecífica se encontró en algunas de las especies heterotálicas y esto podría estar relacionado con la compatibilidad sexual.

En *Saccharomyces cerevisiae* y *S. pombe*, ambos idiomorfos están presentes en la misma célula haploide, (Kües y Casselton, 1992), pero no en el mismo locus y no se expresan al mismo tiempo. En este caso, se han determinado tres loci para compatibilidad sexual (mating type), dos contienen copias de cada idiomorfo y sólo se expresa el idiomorfo en el locus MAT.

Las células haploides pueden cambiar su “mating type”, reemplazando el idiomorfo en el locus MAT con una copia del otro idiomorfo. Esta potencialidad para cambiar la compatibilidad sexual, podría significar que todos los genes que determinan funciones celulares específicas, tales como los genes para feromonas y sus receptores, pueden estar presentes en todas las células.

Esta conversión de compatibilidad sexual ha sido observada en ascomicetes filamentosos (Perkins, 1987). Algunas especies homotálicas de *Neurospora* y *Sordaria* contienen ambos idiomorfos en el mismo núcleo haploide y probablemente se expresen ambos. Metzzenberg y Glass (1990) han formulado una pregunta interesante: ¿las especies homotálicas con ambos idiomorfos han dado origen a las especies heterotálicas en las cuales los idiomorfos se han separado o las homotálicas se han originado de las heterotálicas por adquisición de ambos idiomorfos?

Existe un alto grado de asociación entre las especies cuando se analizan ambos fenogramas, esto coincide con el continuo que existe en los caracteres morfológicos debido a la yuxtaposición encontrada en algunos caracteres analizados sobre todo los cuantitativos. La presencia de bandas comunes en algunas especies

en algunos de los sistemas analizados puede estar relacionado con esta superposición de parámetros morfológicos.

Las diferencias en los índices de similitud de los fenogramas morfológico e isoenzimático probablemente se deba a que se trabajó con la fase reproductiva en el fenograma morfológico y la fase somática en el isoenzimático y estas diferencias se vieron reflejadas en los diferentes agrupamientos dentro de las dos secciones.

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). En este estudio no se calculó la congruencia taxonómica entre la clasificación morfológica y la isoenzimática debido a que para dicho análisis es necesario comparar el mismo número de OTUs. Para poder realizarlo deberíamos elegir para cada especie un sólo OTU en el análisis isoenzimático. Esto sería posible si no hubiera ninguna diferencia intraespecífica, pero como ya se ha demostrado, existen ciertas variaciones en los sistemas esterasa y fosfatasa ácida, lo que imposibilitó la elección de un solo OTU por especie.

Cuando se desee determinar la variabilidad intraespecífica en el género será necesario el análisis de un alto número de sistemas isoenzimáticos. Sin embargo, aún utilizando muchos sistemas, es probable que el problema no sea resuelto ya que el análisis isoenzimático sólo detecta diferencias significativas en la estructura de las enzimas. La electroforesis de isoenzimas sólo detecta alrededor de un 30% de todas las sustituciones aminoacídicas, por lo tanto la variación encontrada por este método subestima el nivel real de variación (Nei y Chakraborty, 1973).

Será necesario entonces utilizar otros métodos o técnicas moleculares como RAPD (Random amplified polymorphic DNA) y RFLP (Restriction fragment length polymorphism), que detectan muy pequeños cambios en el genoma de un organismo y aportan información sobre diferencias genotípicas entre los aislamientos de cada especie.

BIBLIOGRAFIA

5. Bibliografía

- Abbott, L. K. y A. A. Holland.** 1975. Electrophoretic patterns of soluble proteins and isoenzymes of *Gaeumannomyces graminis*. *Aust. J. Bot.*, **23**: 1-12.
- Ainsworth, G. C.** 1961. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. Ed. 5, I-VIII, 1-547, 14 plts. Kew.
- Alfenas, A. C., R. Jeng y M. Hubbes.** 1984. Isoenzyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. *Can. J. Bot.*, **62**: 1756-1762.
- Backhouse, D., H. J. Willetts y P. Adam.** 1984. Electrophoretic studies of *Botrytis* species. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **82**: 625-630.
- Baptist, J. N. y C. P. Kurtzman.** 1976. Comparative enzyme patterns in *Cryptococcus laurenti* and its taxonomic varieties. *Mycologia*, **68**: 1195-1203.
- Barr, D. J. S., S. I. Warwick y N. L. Desaulniers.** 1996. Isozyme variation, morphology, and growth response to temperature in *Pythium ultimum*. *Can. J. Bot.*, **74**: 753-761.
- Beckman, L. y F. M. Johnson.** 1964. Esterase variation in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, **51**: 51-212.
- Bellemère, A., M. C. Malherbe, H. Chacun y L. M. Meléndez-Howell.** 1990. L'étude ultrastructurale des asques et des ascospores de l'*Urnula helvelloides* Donadini, Berthet et Astier et les concepts d'asque suboperculé et de *Sarcosomataceae*. *Cryptogamie, Mycologie*, **11**: 203-238.

- Bent, K. J.** 1967. Electrophoresis of proteins of 3 *Penicillium* species on acrylamide gels. *J. Gen. Microbiol.*, **49**: 195-200.
- Bergquist, R. R. y A. J. Pryor.** 1984. Virulence and isozyme differences for establishing racial identity in rusts of maize. *Plant. Dis.*, **68**: 281-183.
- Berkeley, M. J. y C. E. Broome.** 1865. Notices of British fungi. *Annals and Magazine of Natural History*, ser. III, **15**: 444-452.
- Bielenin, A., S. N. Jeffers, W. F. Wilcox y A. L. Jones.** 1988. Separation by protein electrophoresis of six species of *Phytophthora* associates with deciduous fruit crops. *Phytopathology*, **78**: 1402-1408.
- Bistis, G. N.** 1956. Sexuality in *Ascobolus stercorarius* I. Morphology of the ascogonium; plasmogamy; evidence for a sexual hormonal mechanism. *Amer. J. Bot.*, **43**: 389-394.
- . 1957. Sexuality in *Ascobolus stercorarius* II. Preliminary experiments on various aspects of the sexual process. *Amer. J. Bot.*, **44**: 436-443.
- . 1965. The function of the mating type locus in filamentous Ascomycetes. Pp. 25-31. En: *Incompatibility in fungi*. Eds. K. Esser and J. R. Raper. Springer Verlag. Berlin.
- . 1981. Chemotropic interactions between trichogynes and conidia of opposite mating type in *Neurospora crassa*. *Mycologia*, **73**: 959-975.
- . 1983. Evidence for diffusible, mating type specific trichogyne attractants in *Neurospora crassa*. *Experimental Mycology*, **7**: 292-295.
- . 1998. Physiological heterothallism and sexuality in Euascomycetes: a partial history. *Fungal Genetics and Biol.*, **23**: 213-222.

- Bistis, G. N. y S. G. Georgopoulos.** 1979. Some aspects of sexual reproduction in *Nectria haematococca* var. *cucurbitae*. *Mycologia*, **71**: 127-143.
- Bistis, G. N. y L. S. Olive.** 1968. Induction of antheridia in *Ascobolus stercorarius*. *Amer. J. Bot.*, **55**: 629-634.
- Bistis, G. N. y J. Raper.** 1963. Heterothallism and sexuality in *Ascobolus stercorarius*. *Amer. J. Bot.*, **50**: 880-891.
- Blaich, R. y K. Esser.** 1975. Function of enzymes in wood destroying fungi. II. Multiple forms of laccase in white rot fungi. *Arch. Microbiol.*, **103**: 271-277.
- Blakeslee, A. F.** 1904 a. Zygosporangium formation: A sexual process. *Science N. Y.*, **19**: 864-866.
- 1904 b. Sexual reproduction in the Mucorineae. *Proc. Am. Acad. Arts. Sci.* **40**: 205-319.
- Boisselier-Dubayle, M. C.** 1983. Taxonomic significance of enzyme polymorphism among isolates of *Pleurotus* (Basidiomycetes) from umbellifers. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **81**: 121-127.
- Bonde, M. R., G. L. Peterson, W. M. Dowler y B. May.** 1984. Isozyme analysis to differentiate species of *Peronosclerospora* causing downy mildews of maize. *Phytopathology*, **74**: 1278-1283.
- **G. L. Peterson y W. M. Dowler.** 1988. A comparison of isozyme of *Phakopsora pachyrhizi* from the eastern hemisphere and the new world. *Phytopathology*, **78**: 1491-1494.
- Bonner, R. D. y C. N. Fergus.** 1959. The fungus flora of cattle feeds. *Mycologia*, **51**: 855-863.

- Bosland, P. W. y P. H. Willams.** 1987. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility and geographic origin. *Can. J. Bot.*, **65**: 2067-2073.
- Boudier, J. L. E.** 1869. Mémoire sur les Ascobolées. In *Annls. Sci. Nat (Bot)* V, **10**: 191-268.
- Boudier, J. L. E.** 1885. Nouvelle classification naturelle des Discomycètes charnus connus généralement sous le nom de Pézizés. In *Bull. Soc. mycol. Fr.*, **I**: 91-120.
- Brewer, G. R. y S. H. Sing.** 1970. An introduction to isozyme technique. Academic Press. N. Y., U.S.A. 186 pp.
- Brummelen, J. van.** 1967. A world monograph of the genera *Ascobolus* and *Saccobolus* (Ascomycetes, Pezizales). *Persoonia (Suppl.)* **I**: 1-260.
- . 1972. Ascocarp ontogeny and a natural classification of the Ascobolaceae. *Persoonia*, **6**: 389-394.
- . 1974. Light and electron microscopic studies of the ascus top in *Ascozomus woolhopensis*. *Persoonia*, **8**: 23-32.
- . 1975. Light and electron microscopic studies of the ascus top in *Sarcoscypha coccinea*. *Persoonia*, **8**: 259-271.
- . 1978. The operculate ascus and allied forms. *Persoonia*, **10**: 113-128.
- . 1986. Ultrastructure of the ascus top and the ascospore wall in *Fimaria* and *Pseudombrophila* (Pezizales, Ascomycotina). *Persoonia*, **13**: 213-230.
- . 1987. Ultrastructure of the ascus and the ascospores in *Pseudoascozomus* (Pezizales, Ascomycotina). *Persoonia*, **13**: 369-377.

- . 1989 a. Ultrastructure of the ascospore wall in *Eleutherascus* and *Ascodesmis* (Ascomycotina). *Persoonia*, **14**: 1-17.
- . 1989 b. Ultrastructural comparison of different types of ascospore ornamentation in *Eleutherascus tuberculatus* (Pezizales, Ascomycotina). *Studies in Mycology, Baarn*, **31**: 41-48.
- . 1993. Ultrastructure of the ascus and the ascospore wall in *Scutellinia* (Pezizales, Ascomycotina). *Persoonia*, **15**: 129-148.
- Burdon, J. J. y D. R. Marshall.** 1981. Isozyme variation between species and forma speciales of the genus *Puccinia*. *Can. J. Bot.*, **59**: 2628-2634.
- , **D. R. Marshall y N. H. Luig.** 1981. Isozyme analysis indicates that a virulent cereal rust pathogen is a somatic hybrid. *Nature*, **293**: 565-566.
- , **N. H. Luig y D. R. Marshall.** 1983. Isozyme uniformity and virulence variation in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and *P. recondita* f. sp. *tritici* in Australia. *Aus. J. Biol. Sci.*, **36**: 403-410.
- , **D. R. Marshall, N. H. Luig y D. J. S. Gow.** 1982. Isozyme studies on the origin and evolution of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Australia. *Aust. J. Biol. Sci.*, **35**: 231-238.
- y **A. P. Roelfs.** 1985 a. Isozyme and virulence variation in asexually reproducing populations of *Puccinia graminis* and *P. recondita* on wheat. *Phytopathology*, **75**: 907-913.
- . 1985 b. The effect of sexual and asexual reproduction on the isozyme structure of populations of *Puccinia graminis*. *Phytopathology*, **75**: 1068-1073.

- Cabral, D., M. J. Cafaro, B. Saidman, M. Lugo, P. V. Reddy y J. F. White.** 1999. Evidence supporting the occurrence of a new species of endophyte in some South American grasses. *Mycologia*, **91**: 315-325.
- Carroll, G. C.** 1967. The fine structure of ascus septum in *Ascodesmis sphaerospora* and *Saccobolus kerverni*. *Mycologia*, **59**: 527-532.
- Chang, L. O., A. M. Srb y F. C. Steward.** 1962. Electrophoretic separations of the soluble proteins of *Neurospora*. *Nature*, **193**: 756-759.
- Chang, Y. S. y A. K. Mills.** 1992. Re-examination of *Psilocybe subaeruginosa* and related species with comparative morphology, isozymes and mating compatibility studies. *Mycol. Res.*, **96**: 429-441.
- Chrambach, A. y D. Rodbard.** 1971. Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science*, **172**: 440-451.
- Cinto, R. O., M. A. Galvagno, F. Forchiassin y M. E. Ranalli.** 1977. Estudio de la relación entre las concentraciones de biotina, tiamina, d-glucosa, L(-) asparagina y el crecimiento vegetativo de *Ascobolus biguttulatus* (Fungi, Ascomycetes), usando Técnicas de Superficie de Respuesta I. *Physis, Secc. C*, **37**: 282-302.
- . 1979. Estudio de la relación entre las concentraciones de biotina, tiamina, d-glucosa, L(-) asparagina y el crecimiento vegetativo de *Ascobolus biguttulatus* (Fungi, Ascomycetes), usando Técnicas de Superficie de Respuesta II. *Physis, Secc. C*, **38**: 7-32.
- . 1986. Relación entre las concentraciones de cinc, hierro y cobre y el crecimiento vegetativo de *Ascobolus furfuraceus* (Fungi, Ascomycetes). *Physis, Secc. C*, **44**: 7-18.

- Clare, B. G.** 1963. Starch gel electrophoresis of proteins from species *Phytophthora*. *Nature*, **200**: 803-804.
- Coemans, E.** 1862. Spicilége mycologique I. Notice sur les *Ascobolus* de la flore belge. *Bull. Soc. Bot. Belg.*, **1**: 76-91.
- Cooke, M. C.** 1864. The genus *Ascobolus*, with descriptions of the British species, *J. of Botany, London*, **2**: 147-154.
- Corner, E. J. H.** 1929 a. Studies in the morphology of Discomycetes I. The marginal growth of apothecia. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, **14**: 263-274.
- . 1929 b. Studies in the morphology of Discomycetes II. The structure and development of the ascocarp. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, **14**: 275-291.
- Couch, J. N.** 1926. Heterothallism in *Dyctyuchus*, a genus of the water moulds. *Ann. Bot. Lond.*, **40**: 849-881.
- Crisci, J. V. y M. F. López Armengol.** 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D. C. Monografía 26, 132 pp.
- Crouan, P. L. y H. M. Crouan.** 1857. Note sur quelques *Ascobolus* nouveaux et sur une espèce nouvelle de *Vibrissea*. *Ann. des Sci. Nat. Botanique*, sér. IV, **7**: 173-178.
- Cruickshank, R. H. y J. I. Pitt.** 1987. Identification of species in *Penicillium* subgenus *penicillium* by enzyme electrophoresis. *Mycologia*, **79**: 614-620.
- Curry, K. J. y J. W. Kimbrough.** 1983. Septal structures in apothecial tissues of the *Pezizaceae* (Pezizales, Ascomycetes), *Mycologia*, **75**: 781-794.

- De Notaris, G.** 1864. Proposte di alcune rettificazione al profilo dei Discomyceti. Com. Soc. Crittog. Ital., **1**: 357-388.
- De Simone, S., D. A. Dokmetzian y M. E. Ranalli.** 1997. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina XVII. Crecimiento y desarrollo de *Ascobolus mancus*. Bol. Soc. Arg. Bot., **32**: 153-161.
- Dennis, R. W. G.** 1968. British Ascomycetes. Lehre Verlag Von J. Cramer. 455 pp.
- Dessauer, H. C., C. J. Cole y M. S. Hafner.** 1984. Collection and storage of tissues in Molecular Systematics. D. M. Hillis & C. Moritz Eds. Sinauer Assoc. Inc. MA. USA. 588 pp.
- Dodge, B. O.** 1920. the life history of *Ascobolus magnificus* origin of the ascocarp from two strains. Mycologia, **12**: 115-134.
- . 1945. Further remarks on mycogenetic terminology. Mycologia, **37**: 629-635.
- Dokmetzian, D. A. y M. E. Ranalli.** 1991 (1994). Ensayos de incompatibilidad e hibridación en especies de *Ascobolus*. Physis (BA), Secc. C, **49**: 37-44
- . 1992 (1995). Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina XV. Dos nuevas especies de *Ascobolus* (Ascomycetes, Pezizales). Physis, Secc. C, **50**: 1-10.
- . 1999. Crecimiento de especies del género *Ascobolus* (Pezizales, Ascomycetes). Rev. Arg. Microbiol., **30**: 195-199.
- . **S. De Simone y M. E. Ranalli.** 1995. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina XVI. Un mutante natural de *Ascobolus amoemus*. Bol. Soc. Arg. Bot., **30**: 231-239.

- Drayton, F. L.** 1932. the sexual function of the microconidia in certain Discomycetes. *Mycologia*, **24**: 345-348.
- Emerson, R y C. M. Wilson.** 1954. Interspecific hybrids and the cytogenetics and cytotaxonomy of *Euallomyces*. *Mycologia*, **56**: 393-433.
- Erselius, L. J. y C. de Vellavielle.** 1984. Variation in protein profiles of *Phytophthora*. Comparison of six species. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **83**: 463-472.
- Faris, M. A., F. E. Sabo y Y. Cloutier.** 1986. Intraspecific variation in gel electrophoresis patterns of soluble mycelial proteins of *Phytophthora megasperma* isolated from alfalfa. *Can. J. Bot.*, **64**: 262-265.
- Federici, B.** 1982. Invariability of interspecific hybrids in the *Coelomomyces dodgei* complex. *Mycologia*, **74**: 555-562.
- Forchiassin, F.** 1988. Cytological studies in *A. albidus*. *Nova Hedwigia*, **46**: 231-238.
- Franke, R. G., R. W. Balek y I. Valentin.** 1968. Taxonomic significance of isozyme patterns of some Myxomycetes, order Physarales produced with starch gel electrophoresis. *Mycologia*, **60**: 331-339.
- Franke, R. G y J. A. Berry.** 1972. Taxonomic application of isozyme patterns produced with disc electrophoresis of some Myxomycetes, order Physarales. *Mycologia*, **64**: 830-840.
- Fuckel, K. W. G. L.** 1866. Ueber rheinische *Ascobolus* Arten, *Hedwigia*, **5**: 1-5.
- Gall, C., M. H. Balesdent, I. Desthieux, P. Robin y T. Rouxel.** 1995. Polymorphism of Tox super (o) *Leptosphaeria maculans* isolates as revealed by soluble protein and isozyme electrophoresis. *Mycol. Res.*, **29**: 221-229.

- Galvagno, M. A.** 1976. Ensayos de nutrición en *Ascobolus crenulatus* P. Karst. (Fungi, Ascomycetes). Bol. Soc. Arg. Bot. XVII: 95-118.
- Gamundí, I. J. y M. E. Ranalli.** 1963. Apothecial development of *Ascobolus stercorarius*. Trans. Brit. Myc. Soc., 46: 393-400.
- . 1964. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina I. Nova Hedwigia VII: 517-533.
- . 1966. . Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina II. Nova Hedwigia X: 339-366.
- Gessner, R. V., M. A. Romano y R. W. Schultz.** 1987. Allelic variation and segregation in *Morchella deliciosa* and *M. esculenta*. Mycologia, 79: 683-687.
- Gordon, M., X. Huang, S. Pentoney y R. Zare.** 1988. Capillary electrophoresis. Science 242: 224-228.
- Gottlieb, A. M.** 1997. Estudio sistemático de las especies sudamericanas del género *Ganoderma* (Aphyllophorales). Un enfoque multidisciplinario. Tesis para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires. 158 pp.
- Gower, J. C.** 1966. Some Distance Properties of Latent Root and Vector Methods Used in Multivariate Analysis. Biometrika, 53: 325.
- Gwynne – Vaughan, H. C. I.** 1928. Sex and nutrition in the Fungi. Rep. Br. Ass. 185-199.
- y **H. S. Williamson.** 1932. The cytology and development of *Ascobolus magnificus*. Ann. Bot. Lond., 16: 653-670.

- Hamrick, J. L., R. W. Lichtwardt y C. W. Lan.** 1986. Levels of isozyme variation within and among *Histoplasma capsulatum* localities. Trans. of the Kansas Acad. of Sci. **89**: 49-56.
- Hansen, H. N. y W. C. Snyder.** 1943. The dual phenomenon and sex in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. Am. J. Bot., **30**: 419-422.
- Hanson, L. C. y K. Wells.** 1991. Compatibility and population structure of three species of *Tremella* (Heterobasidiomycetes). Mycologia, **83**: 273-287.
- Harrington, T. C., J. P. Steimel, M. J. Wingfield y G. A. Kile.** 1996. Isozyme variation and species delimitation in the *Ceratocystis coerulescens* complex. Mycologia, **88**: 104-113.
- Harris, H. y D. A. Hopkinson.** 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Hepper, C. M., R. Sen, C. Azcon-Aguilar y C. Grace.** 1988. Variation in certain isozymes amongst different geographical isolates of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus clarum*, *G. monosporum* and *G. mosseae*. Soil Biol. Biochem., **20**: 51-59.
- Ho, I. y J. M. Trappe.** 1987. Enzymes and growth substances of *Rhizopogon* species in relation to mycorrhizal host and infrageneric taxonomy. Mycologia, **79**: 553-558.
- Hodges, C. S., A. C. Alfenas y F. A. Ferreira.** 1986. The conspecificity of *Cryphonectria cubensis* and *Endothia eugeniae*. Mycologia, **78**: 343-350.
- Hsiau, P. T. W. y T. C. Harrington.** 1997. *Ceratocystiopsis brevicomi* sp. nov., a mycangial fungus from *Dendroctonus brevicomis* (Coleoptera: Scolytidae). Mycologia, **89**: 661-669.

- Hung, C. Y.** 1977. Ultrastructural studies of ascospore liberation in *Pyronema domesticum*. Can. J. of Bot., **55**: 2544-2549.
- Hunter, R. L. y C. L. Markert.** 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science, **125**: 1294-1295.
- Hunter, R. L. y M. S. Burstone.** 1960. The zymogram as a tool for the characterization of enzyme substrate specificity. J. Histochem. Cytochem., **8**: 58-62.
- Huss, M. J., C. L. Campbell, D. B. Jennings y J. F. Leslie.** 1996. isozyme variation among biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex (*Fusarium* Section *Liseola*). Appl. and Env. Microbiol., **62**: 3750-3756.
- Itavaara, M.** 1988. Identification of Shiitake strains and some other Basidiomycetes protein profile, esterase and acid phosphatase zymograms as an aid in Taxonomy. Trans. Br. Myc. Soc., **91**: 693-712.
- International Union of Biochemistry Nomenclature Committee.** 1984. Enzyme Nomenclature. Academic Press, New York.
- Jaccard, P.** 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat., **44**: 223-270.
- Jackson, B. D.** 1949. A glossary of botanic terms with their derivation and accent, I-XIII, 1-481. Revised 4th. edition, London.
- Janczewski, E. De.** 1871. Morphologische Untersuchungen über *Ascobolus furfuraceus*. Bot. Ztg., **29**: 256-262; bis 271-178. Pl. 4.
- Johnson, G. B.** 1974. Enzyme polymorphism and metabolism. Science, **184**: 28-37.

- Kanopathipillai, V. S.** 1995. Preliminary studies of isozyme patterns of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from hosts plants in Malaysia. *Pertanika J. of Trop. Agricul. Sci.*, **18**: 135-139.
- Karsten, P. A.** 1861. Synopsis Pezizarum et Ascobolorum Fenniae. Öfversigt af i Finland funna arter af svampsläktena *Peziza* och *Ascobolus*. I-III, J. C. Frenckell & Son, Helsingfors.
- . 1870. Monographia Ascobolorum Fenniae. Notiser ur Sällskapets pro Fauna et Flora Fennica Förhandlingar, **11**: 197-210.
- Kathariou, S.** 1981. Gene pool organization in *Fusarium moniliforme*. Ph. D. dissertation. University of California, Berkeley.
- Kerrigan, R. W. y I. K. Ross.** 1988. Extracellular laccases: biochemical markers for *Agaricus* systematics. *Mycologia*, **80**: 689-695.
- Kimbrough, J. W. y G. L. Benny.** 1978. The fine structure of ascus development in *Lasiobolus monoascus* (Pezizales). *Can. J. of Bot.*, **56**: 862-872.
- y **J. K. Curry.** 1985. Septal ultrastructure in the Ascobolaceae (Pezizales, discomycetes). *Mycologia*, **77**: 219-229.
- King, J. L. y T. Ohta.** 1975. Polyallelic mutational equilibria. *Genetic*, **79**: 131-144.
- Ko, W. H.** 1978. Heterothallic *Phytophthora*: evidence for hormonal regulation of sexual reproduction. *J. Gen. Microb.*, **107**: 15-18.
- . 1980. Hormonal regulation of sexual reproduction in *Phytophthora*. *J. Gen. Microb.*, **116**: 459-463.

- y **R. K. Kunitomo**. 1981. Hormone production and reception among different isolates of *Phytophthora parasitica* and *P. palmivora*. *Mycologia*, **73**: 440-444.
- Kovach, W. L.** 1993. MVSP – A multivariate statistical package for IBM-PCs. version 2. 1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, UK.
- Kües, U. y L. A. Casselton**. 1992. Fungal mating type genes – regulators of sexual development. *Mycol. Res.*, **96**: 993-1006.
- Kurzeja, K. C. y E. D. Garber**. 1973. A genetic study of electrophoretically variant extracellular amylolytic enzymes of wild-type strains of *Aspergillus nidulans*. *Can. J. Genet. Cytol.*, **15**: 275-287.
- Laroche, J. P., S. H. Jabaji – Hare y P. M. Charest**. 1992. Differentiation of two anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by isozyme analysis. *Phytopathology*, **82**: 1387-1393.
- Latorre, B. A., G. F. Perez, W. F. Wilcox y R. Torres**. 1995. Comparative protein electrophoretic and isoenzymic patterns of *Phytophthora cryptogea* isolates from Chilean kiwifruit and North American deciduous fruits. *Plant. Dis.*, **79**: 703-708.
- Lehninger, A. L.** 1981. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2da. Ed. Ediciones Omega, Barcelona. 1117 pp.
- Levin, L., A. S. Sívori y A. G. Pardo**. 1996. Actividad celulolítica de hongos coprófilos. *Rev. Arg. Microbiol.*, **28**: 132-138.
- Lima, C. E. y O. A. Mercuri**. 1984. Ensayos de nutrición en *Ascobolus furfuraceus*. Fuentes de nitrógeno. *Rev. Arg. Microbiol.*, **16**: 177-186.

- Maghrabi, H. A. y L. P. Kish.** 1985 (a). Isozyme characterization of Ascosphaerales associated with bees. I. *Ascosphaera apis*, *A. proliperda* and *A. aggregata*. *Mycologia*, **77**: 358-365.
- . 1985 (b). Isozyme characterization of Ascosphaerales associated with bees. II. *Ascosphaera major*, *A. atra* and *A. asterophora*. *Mycologia*, **77**: 366-372.
- . 1986. Isozyme characterization of Ascosphaerales associated with bees. III. *Bettisia alvei*. *Mycologia*, **78**: 676-677.
- . 1987. Isozyme characterization of Ascosphaerales associated with bees. IV. Analyses. *Mycologia*, **79**: 519-523.
- Magnelli, P. E., A. M. Ramos y F. Forchiassin.** 1996. Factors influencing cellulase production by *Saccobolus saccoboloides*. *Mycologia*, **88**: 249-255.
- Magnelli, P. E. y F. Forchiassin.** 1999. Regulation of the cellulase complex production by *Saccobolus saccoboloides*: induction and repression by carbohydrates. *Mycologia* **91**: 359-364.
- Manchenko, P.** 1994. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 341 pp.
- Markert, C. L.** 1975. Biology of isozymes. En C. L. Markert (ed.), *Isozymes*, 1-9. Academic Press, New York.
- May, B. y D. J. Royse.** 1982. Genetic variation and joint segregation of biochemical loci in the common meadow mushroom *Agaricus campestris*. *Biochem. Genet.*, **20**: 1165-1173.
- . 1988. Interspecific allozyme variation within the fungal genus *Pleurotus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **90**: 29-36.

- Mercuri, O. A.** 1996 (a). Efecto del ión bicarbonato sobre la degradación de celulosa por *Ascobolus furfuraceus*. Bol. Soc. Arg. Bot., **31**: 221-224.
- , 1996 (b). Cinética de crecimiento y degradación de celulosa por *Ascobolus furfuraceus* empleando nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. Bol. Soc. Arg. Bot., **31**: 173-176.
- , 1996 (c). Efecto de cationes metálicos sobre la degradación de celulosa cristalina por *Ascobolus furfuraceus*. Physis (BA) Secc. C, **51**: 31-39.
- , 1996 (d). Efecto de las condiciones de cultivo sobre la degradación de celulosa cristalina por *Ascobolus furfuraceus*. Physis (BA), Secc. C, **51**: 1-6.
- , **J. F. Groisman y R. M. Lederkremer.** 1983. Cinética de incorporación de glucosa y variación morfológica del micelio de *Ascobolus furfuraceus*. Rev. Arg. Microbiol., **15**: 177-180.
- y **C. E. Lima.** 1985. Morfología del micelio de *Ascobolus furfuraceus*, con distintas fuentes de nitrógeno. Rev. Arg. Microbiol., **17**: 1-4.
- y **L. A. Diorio.** 1995. Evaluación de la capacidad celulolítica de *Ascobolus furfuraceus*. Rev. Arg. Microbiol., **27**: 71-79.
- Metzenberg, R. L. y N. L. Glass.** 1990. Mating type and mating strategies in *Neurospora*. BioEssays, **12**: 53-59.
- Meyer, J. A. y J. L. Renard.** 1969. protein and esterase pattern of two formae speciales of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology, **59**: 1409-1411.
- Micales, J. A., R. J. Stipes y M. R. Bonde.** 1987. On the conspecificity of *Endothia eugeniae* and *Cryphonectria cubensis*. Mycologia, **79**: 707-720.

- , **M. R. Bonde y G. L. Peterson.** 1988. Isozyme analysis and aminopeptidase assays of the genus *Peronosclerospora*. *Phytopathology*, **78**: 1396-1402.
- . 1992. Isozyme analysis in fungal taxonomy and molecular genetics. En: *Handbook of Applied Mycology*. Arora, D. K. (eds.) Vol. **4**: 57-79.
- Moncalvo, J. M. y H. Cléménçon.** 1994. Enzymic studies as an aid to the taxonomy of the *Lyophyllum decastes* complex. *Mycol. Res.*, **98**: 375-383.
- Morrison, D. J., A. J. Thomson, D. Chu, F. G. Peet y T.S. Sahota.** 1985. Isozyme patterns of *Armillaria* intersterility groups occurring in British Columbia. *Can. J. Microbiol.*, **31**: 651-653.
- Mosa, A. A., K. Kobayashi, A. Ogoshi, M. Kato y N. Sato.** 1993. Isozyme polymorphism and segregation in isolates of *Phytophthora infestans* from Japan. *Plant Pathol.*, **42**: 26-34.
- Murphy, R. W., D. G. Sites, D. G. Buth y C. H. Haufler.** 1990. Protein I. Isozyme electrophoresis. En: *Molecular systematics*. D. M. Hillis and C. Moritz. Eds. Sinauer Assoc. Inc. MA. USA. 588 pp.
- Nakasone, K. K. y J. A. Micales.** 1988. *Scytinostroma galactinum* species complex in the United States. *Mycologia*, **80**: 546-559.
- Neate, S. M., R. H. Cruickshank y R. D. Rovira.** 1988. Pectic enzyme pattern of *Rhizoctonia solani* isolates from agricultural soils in south Australia. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **90**: 37-42.
- Nei, M. y R. Chakraborty.** 1973. Genetic distance and electrophoretic identity of proteins between taxa. *J. Molec. Evol.*, **2**: 323-328.

- Newman, P.** 1985. Variation amongst isozymes of *Rhynchosporium secalis*. *Plant. Pathol.*, **34**: 329-337.
- 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.
- , **C. E. Caten y R. Johnson.** 1985. Variation for isozymes and double-stranded RNA among isolates of *Puccinia striiformis* and two other cereal rusts. *Plant Pathol.*, **34**: 235-247.
- , **C. E. Caten y R. Johnson.** 1985. Variation for isozymes and double-stranded RNA among isolates of *Puccinia striiformis* and two other cereal rusts. *Plant. Pathol.*, **34**: 235-247.
- Old, K. M., G. F. Moran y J. C. Bell.** 1984. Isozyme variability among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Australia and Papua New Guinea. *Can. Jour. of Bot.*, **62**: 2016-2022.
- , **M. J. Dudzinsky y J. C. Bell.** 1988. Isozyme variability in field populations of *Phytophthora cinnamomi* in Australia. *Aus. J. of Bot.*, **36**: 355-360.
- Ornstein, L. y B. J. Davis.** 1959. Disc electrophoresis. *Distillation Products Industries. Division of Eatsman Kodak Co.*
- Otrosina, W. J. y F. W. Cobbs.** 1987. Analysis of allozymes of three distinct variants of *Verticicladiella wagneri* in western North America. *Phytopathology*, **77**: 1360-1363.
- Oudemans, P. y M. D. Coffey.** 1991 a. Isozyme comparison within and among worldwide sources of three morphologically distinct species of *Phytophthora*. *Myc. Res.*, **95**: 19-30.

- . 1991 b. A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis. *Mycol. Res.*, **95**: 1023-1046.
- Paden, J. W. y M. A. S. Linton.** 1976. Apothecial development and sexuality in *Ascobolus sacchariferus*. *Can. J. Bot.*, **54**: 1784-1792.
- Pardo, A. G. y F. Forchiassin.** 1993 (a). Effect of light and nutrition on fruiting of *Ascobolus biguttulatus*. *Current Microbiol.*, **27**: 69-72.
- . 1993 (b). Estudios nutricionales en *Ascobolus biguttulatus*. Crecimiento vegetativo. *Bol. Soc. Arg. Bot.*, **29**: 233-239.
- Perkins, D. D.** 1987. Mating type switching in filamentous ascomycetes. *Genetis*, **115**: 384-392.
- Poulik, M. D.** 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, **180**: 1447-1479.
- Racine, R. R. y C. H. Langley.** 1980. Genetic heterozygosity in a natural population of *Mus musculus* assessed using two-dimensional electrophoresis. *Nature*, **283**: 855-857.
- Ramos, A. M.** 1998. Estudios quimiotaxonómicos en especies del género *Saccobolus* (Ascobolaceae, Pezizales). Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires. 142 pp.
- Ranalli, M. E. y R. O. Cinto.** 1972. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. IV. *Bol. Soc. Arg. Bot.*, **14**: 285-304.
- e **I. J. Gamundí.** 1975. *Ascobolus biguttulatus* sp. nov. (Ascomycetes, Pezizales). Estudios de cultivo y citología. *Physis, Secc. C*, **34**: 1-15.

- y **F. Forchiassin**. 1979. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. VII. *Ascobolus ferrugineus* sp. nov. Estudios de cultivo y citología. Physis, Secc. C, **38**: 43-55.
- . **F. Forchiassin y O. A. Mercuri**. 1981. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina. IX. Morfología y desarrollo de *Ascobolus bistisii* utilizando el Microscopio Electrónico de Barrido. Physis, Secc. C, **39**: 75-82.
- Raper, J. R.** 1959. Sexual versatility and evolutionary processes in fungi. Mycologia, **51**: 107-124.
- Raymond, S. y L. Weintraub**. 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.
- . 1994. Evolutionary processes affecting adaptation to saprotrophic life styles in ascomycete population. En: Ascomycete systematics. Problems and Perspectives in the Nineties. (Ed. D. L. Hawksworth), NATO ASI Series, Plenum Press, New York. 453 pp.
- Reineke, A. y C. P. W. Zebita**. 1996. Protein and isozyme patterns among isolates of *Beauveria brongniartii* with different virulence to European cockchafer larvae (*Melolontha melolontha*). Jour. of Appl. Entomology, **120**: 307-315.
- Rinyu, E., J. Varga y L. Ferenczy**. 1995. Phenotypic and genotypic analysis of variability in *Aspergillus fumigatus*. J. of Clin. Microb., **33**: 2567-2575.

- Rodrigues, K. F., O. Petrini y A. Leuchtman.** 1995. Variability among isolates of *Xylaria cubensis* as determined by isozyme analysis and somatic incompatibility tests. *Mycologia*, **87**: 592-596.
- Rohlf, J. F.** 1993. NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.8 Exeter Software Applied Biostatistics Inc., N. Y.
- Royce, D. J. y B. May.** 1982. Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens*. *Mycologia*, **75**: 1030-1035.
- Saidman, B. O.** 1985. Estudio de la variación alozímica en el género *Prosopis*. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 231 pp.
- Samuelson, D. A.** 1975. The apical apparatus of the suboperculate ascus. *Can. J. of Bot.*, **53**: 2660-2679.
- . 1978 a. Asci of the *Pezizales*. I. The apical apparatus of iodine-positive species. *Can. J. of Bot.*, **56**: 1860-1875.
- . 1978 b. Asci of the *Pezizales*. II. The apical apparatus of representatives in the *Otidea-Aleuria* complex. *Can. J. of Bot.*, **56**: 1876-1904.
- . 1978 c. Asci of the *Pezizales*. III. The apical apparatus of eugymnohymenial representatives. *Amer. J. of Bot.*, **65**: 748-758.
- . 1978 d. Asci of the *Pezizales*. VI. The apical apparatus of *Morchella esculenta*, *Helvella crispa* and *Rhizina undulata*. General discussion. *Can. J. of Bot.*, **56**: 3069-3082.
- , **G. L. Benny y J. W. Kimbrough.** 1980. Asci of the *Pezizales*. VII. The apical apparatus of *Galiella rufa* and *Sarcosoma globosum*: reevaluation of the suboperculate ascus. *Can. J. of Bot.*, **58**: 1235-1243.

- y J. W. Kimbrough. 1978. Asci of the *Pezizales*. V. The apical apparatus of *Trichobolus zukalii*. *Mycologia*, **70**: 1191-1200.
- Savage, E. J., C. W. Clayton, J. H. Hunter, J. A. Brenneman, C. Laviola y M. E. Gallegly. 1968. Homothallism, heterothallism and interspecific hybridization in the genus *Phytophthora*. *Phytopathology*, **58**: 1004-1021.
- Scala, F., G. Cristinzio, F. Marziano y C. Noviello. 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., M. H. Smith, S. Y. Yang, W. E. Johnson y J. B. Gentry. 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.
- Sibley, C. G. 1962. The comparative morphology of protein molecules as data for clasification. *Syst. Zool.*, **11**: 108-118.
- Simcox, K. D., D. Nickrent y W. L. Pedersen. 1992. Comparison of isozyme polymorphism in races of *Cochliobolus carbonum*. *Phytopathology*, **82** (6): 621-624.
- Singer, R. 1949. The Agaricales in modern taxonomy. *Lillo*, **22**: 5-832.

- Sívori, A. S., O. A. Mercuri y F. Forchiassin.** 1996. Cinética de producción de xilanasas y celulasas por *Ascobolus gamundii*. Rev. Arg. Microbiol., **28**: 9-15.
- . 1997. Producción de celulasas por tres especies de *Ascobolus*. 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.
- y **M. D. Poulik.** 1956. Two dimensional electrophoresis of proteins. Nature **177**: 1033.
- Sneath, P. H. y R. R. Sokal.** 1973. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. W. H. Freeman & Co., San Francisco, USA. 573 pp.
- Snell, W. H. y E. A. Dick.** 1957. A glossary of mycology, I-XXI, 1-171. 15 pls. Cambridge (Mass.).
- Sokal, R. R. y F. J. Rohlf.** 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. Taxon, **11**: 33-40.
- Soltis, D. E., C. H. Haufler, D. C. Darrow y G. J. Gastony.** 1983. Starch gel electrophoresis of Ferns. A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. Am. Fern J., **73**: 9-27.
- 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.

- Spieth, P. T.** 1975. Population genetics of allozyme variation in *Neurospora intermedia*. *Genetics*, **80**: 785-805.
- Stipes, R. J.** 1970. Comparative mycelial protein and enzyme patterns in four species of *Ceratocystis*. *Mycologia*, **62**: 987-995.
- , **G. H. E. Mert and R. D. Brown.** 1982. Differentiation of *Endothia gyrosa* and *E. parasitica* by disc electrophoresis of intramycelial enzymes and proteins. *Mycologia*, **74**: 138-141.
- Stockdale, P.** 1968. Sexual stimulation between *Arthroderma simii* Stockd., Mackenzie and Austwick and related species. *Sabouraudia*, **6**: 176-181.
- Surve-Iyer, R. S., G. C. Adams, A. F. Iezzoni y A. L. Jones.** 1995. Isozyme detection and variation in *Leucostoma species* from *Prunus* and *Malus*. *Mycologia*, **87**: 471-482.
- Sussman, A. S.** 1965. Physiology of dormancy and germination in the propagules of cryptogamic plants. En *Encyclopaedia of Plant Physiology* (Ed. A. Lang), **15**: 933-1025.
- Sweetingham, M. W., R. H. Cruikshank y D. H. Wong.** 1986. Pectic zymograms and taxonomy and pathogenicity of the Ceratobasidiaceae. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **86**: 305-311.
- Takada, M. y S. Udagawa.** 1985. A new species of heterothallic *Neosartorya*. *Mycotaxon*, **24**: 395-402.
- , **S. Udagawa y K. Norizuki.** 1986. Isolation of *Neosartorya tennelliae* and interspecific pairings between *N. tennelliae*, *N. spathulata* and *Aspergillus fumigatus*. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, **27**: 415-423.

- Tiselius, A.** 1937. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans. Farady Soc.*, **33**: 524-531.
- Torp, J. y B. Andersen.** 1982. Two-dimensional electrophoresis of proteins from culture of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiol. Plant Pathol.*, **21**: 151-160.
- Traquiar, J. A.** 1986. Mating incompatibility and cultural distinctions between *Coprinus phaeosporus* and *C. psychromorbidus*. *Can. J. Bot.*, **65**: 928-930.
- Udagawa, S. y M. Takada.** 1985. Contribution of our knowledge of *Aspergillus* teleomorphs: some taxonomic problems. En *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Edited by R. A. Samson and J. I. Pitt, Plenum Pub. Co. 429-435 pp.
- Vágvölgyi, C., T. Papp, Z. Palágyi y T. J. Michailides.** 1996. Isozyme variation among isolates of *Mucor piriformis*. *Mycologia*, **88**: 602-607.
- Vallejos, C. E.** 1983. Enzyme activity staining. En *Isozymes in Plant genetics and Breeding*. 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. y N. F. Weeden.** 1989. Visualization and interpretation of plants isozymes. En: D. E. Soltis and P. S. Soltis (eds.). *Isozyme in Plant biology*, Cap. 1: 5-45.
- Whitehouse, H. L. K.** 1949. Heterothallism and sex in the fungi. *Biol. Rev.*, **24**: 411-447.

- 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. 47-76 pp.
- Wicklow, D. T., R. W. Detroy y S. Adams.** 1980. Differential modification of the lignin and cellulose components in wheat straw by fungal colonists of ruminant dung: ecological implications. *Mycologia*, **72**: 1065-1076.
- Wittler, R., H. Baumgartl, D. W. Lubbers y K. Schugerl.** 1986. Investigations of oxygen transfer into *Penicillium chrysogenum* pellets by microprobe measurement. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**: 1024-1026.
- Wong, A. L. y H. J. Willets.** 1973. Electrophoretic studies of soluble protein and enzymes of *Sclerotinia* species. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **61**: 167-178.
- . 1975. Electrophoretic studies of Australasian, North American and European isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* and related species. *J. Gen. Microbiol.*, **90**: 355-359.
- Yanagita, T. y F. Kogane.** 1963. Cytochemical and physiological differentiation of mould pellets. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **9**: 171-187.
- Yu, J. Y., H. S. Chang y W. H. Ko.** 1981. Factors affecting the induction of sexual reproduction in *Phytophthora parasitica* by *P. colocasiae*. *J. Gen. Microb.*, **123**: 249-252.
- Yu-Sun, Ch. C.** 1964. Nutritional studies of *Ascobolus immersus*. *Am. J. Bot.*, **51**: 231-237.
- Zambino, P. J. y T. C. Harrington.** 1989. Isozyme variation within and among host-specialized varieties of *Leptographium wagneri*. *Mycologia*, **81**: 122-133.

- , 1992. Correspondence of isozyme characterization with morphology in the asexual genus *Leptographium* and taxonomic implications. *Mycologia*, **84**: 12-25.

Proszowski

Proszowski