

POLIBOTÁNICA Núm. 10:23-38, 1999

**USO DE ISOENZIMAS DE ENDO- $\beta$ -D-1,4-GLUCANASA Y VARIABLES FISIOLÓGICAS PARA LA DELIMITACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *SACCOBOLUS***

**Araceli M. Ramos  
Flavia Forchiassin  
María E. Ranalli**

*Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad de Buenos Aires,  
Ciudad Universitaria, C. P. 1428, Buenos Aires, Argentina.*

---

**RESUMEN**

Los objetivos del presente trabajo fueron establecer, a partir de ciertos caracteres de cultivo, de la producción y de los patrones electroforéticos de endo  $\beta$ -D-1,4 glucanasa, la delimitación de diez especies del género *Saccobolus*. Se utilizaron cepas monospóricas de diez especies del género. El fenograma obtenido a partir del análisis de agrupamientos (UPGMA) muestra dos grupos principales de especies, correspondientes a cada una de las dos secciones en las que se divide el género. Se observó una alta homogeneidad intraespecífica ya que no se observaron diferencias en los estados de los caracteres entre las cepas monospóricas de cada aislamiento geográfico y aun entre distintos aislamientos geográficos. El análisis del fenograma muestra un alto grado de asociación entre las especies, lo cual concuerda con las observaciones morfológicas y el comportamiento fisiológico del grupo donde las especies aparecen como un continuo. Los resultados de este trabajo avalan el uso de los patrones isoenzimáticos y las diferencias en los parámetros fisiológicos para la delimitación de las especies del género, que constituyen unidades taxonómicas independientes. Esta metodología es una herramienta adicional a la

taxonomía tradicional del género, que utiliza sólo caracteres morfológicos.

**Palabras Clave:** Ascomycetes, *Saccobolus*, isoenzimas, taxonomía fúngica, fenograma, endo  $\beta$ -D-1,4 glucanasa.

**ABSTRACT**

The aim of this work was to establish the delimitation of ten species of the genus *Saccobolus* on the base of cultural characters, production and electrophoretic pattern of endo  $\beta$ -D-1, 4 glucanase. Monosporic strains of ten species of the genus were used throughout. The phenogram obtained from the analysis of grouping (UPGMA) showed two groups of species, corresponding to the two sections of the genus. A high intraspecific homogeneity was observed, since there were not differences in the status of the characters among the monosporic strains of each geographical isolates, and not even among different geographical isolates. The analysis of phenograms showed a high degree of association among species, which correlates with morphological observations and physiological behavior of the taxa. The results of this research support the use of isozyme patterns as

well as the differences in physiological parameters for the delimitation of species in this genus. They show that the ten species studied are independent taxonomical entities. This methodology constitutes an additional tool to traditional taxonomy of the genus that uses only morphological characters.

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

## INTRODUCCIÓN

El género *Saccobolus* (Pezizales-Ascobolaceae) establecido por Boudier en (1869) se divide en dos secciones: la sección *Saccobolus* y la sección *Eriobolus*.

Se han estudiado numerosos aislamientos de diferentes especies del género pertenecientes a ambas secciones, y éstos han mostrado notables coincidencias en parámetros morfológicos, microscópicos, citológicos y de desarrollo, estableciéndose una variación continua de ciertos caracteres entre algunas de las especies, que dificultan su delimitación.

Las especies del género *Saccobolus* son hongos coprófilos de distribución cosmopolita. Los mecanismos de dispersión de los mismos sugieren una relación cíclica entre estiércol-hierba-tracto intestinal del herbívoro-estiércol. El estiércol producido por herbívoros es un sustrato natural de numerosas especies, si bien gran parte de la descomposición de la celulosa se lleva a cabo en el intestino de los herbívoros, una cantidad importante de ésta no es degradada y forma parte del estiércol (Lodha, 1974).

Los miembros de la familia Ascobolaceae, junto con otros hongos coprófilos, cumplen un rol importante en el reciclado de la materia

orgánica al biodegradar la celulosa presente en el estiércol de herbívoros (Wicklow *et al.*, 1980). Esa degradación depende de la capacidad de los hongos de producir un sistema enzimático extracelular capaz de hidrolizar la celulosa a productos solubles. Dicho sistema está constituido básicamente por tres grupos de enzimas: a) endoglucanasas (EC 3.2.1.4); b) exoglucanasas, representados por dos grupos de enzimas: celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) y glucohidrolasas (EC 3.2.1.74); c)  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21).

El análisis isoenzimático ha sido aplicado a diferentes niveles taxonómicos y frecuentemente se ha utilizado en la separación de las especies. Las diferencias en los patrones de endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa han sido usados para identificar especies de *Verticillium* (Carder, 1989) y *Aspergillus* (Sing *et al.*, 1996), y cepas de *Heterobasidion annosum* (Maijala *et al.*, 1995). Se ha demostrado su posible valor taxonómico en especies de la tribu Iodophaneae (Pardo *et al.*, 1997) y en otras especies dentro del género *Saccobolus* (Ramos y Forchiasin, 1995). A diferencia de lo que ocurre con las enzimas intracelulares, que requieren el procesamiento previo del micelio, la producción del sistema enzimático extracelular presenta la indudable ventaja de permitir la siembra directa del sobrenadante de cultivo en un gel de poliacrilamida, para el fraccionamiento electroforético de las enzimas presentes en el mismo y el posterior análisis comparativo de los patrones electroforéticos de las distintas especies.

Existen trabajos sobre el uso de patrones isoenzimáticos de otras enzimas extracelulares, tales como peroxidasa, fosfatasa ácida, pectinesterasa (Chang y Mills, 1992), lacasa (Wu *et al.*, 1995), enzimas amilolíticas (Kurzeja y Garber, 1973), hemicelulasas (Maijala *et al.*, *op. cit.*).

Ciertas variables fisiológicas y la producción de endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa por los individuos pertenecientes al género *Saccobolus*, que es de esperar sea producida en forma sistemática debido a su hábitat característico, pueden ser utilizadas con criterio taxonómico como expresión de la forma miceliana. La adaptación al saprofitismo del micelio concierne a la taxonomía, porque la ubicación del organismo en una clasificación jerárquica, debe tener toda la información válida acerca de la totalidad del mismo. En general el uso taxonómico de las variables fisiológicas y los caracteres de cultivo de los hongos saprobios pretenden enriquecer la información sobre los mismos, ya que pueden ser una síntesis de lo concerniente a algunas de sus características micelianas (Rayner, 1994).

Con el objeto de establecer la delimitación de las especies del género como entidades independientes y entender sus relaciones y el grado de asociación entre las mismas, este trabajo presenta el análisis de las siguientes variables fisiológicas: **1**-Crecimiento óptimo en **GA**, **2**-Día de crecimiento óptimo en **GA**, **3**-Crecimiento óptimo en **CC**, **4**-Día de crecimiento óptimo en **CC**, **5**-Máxima producción de endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa en **CC**, **6**-Día de máxima producción de endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa en **CC** y los patrones isoenzimáticos de endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa de 46 cepas de diez especies del género, seis de ellas pertenecientes a la sección *Saccobolus* (*S. citrinus*, *S. longevisorus*, *S. platensis*, *S. saccoboloides*, *S. succineus* y *S. truncatus*) y cuatro a la sección *Eriobolus* (*S. depauperatus*, *S. infestans*, *S. pseudodepauperatus* y *S. verrucisporus*).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Organismos utilizados*

Se utilizaron cepas monospóricas obtenidas a partir de la germinación de esporas de aislamientos polispóricos. Las diferentes cepas fueron mantenidas rutinariamente en medio PF (papel de filtro-extracto de levadura) (Gamundi y Ranalli, 1964) a 5°C. La tabla 1 muestra la localidad, sustrato (estiércol), fecha de colección y número de cepa (BAFC, Buenos Aires, Facultad de Ciencias) de todos los aislamientos.

### *Medios y condiciones de cultivo*

Los medios de cultivo utilizados para crecimiento fueron: medio basal: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.5 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.6 g; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.4 mg; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0.09 mg; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.07 mg; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.02 mg; FeCl<sub>3</sub>, 1 mg; ZnCl<sub>2</sub>, 10 mg; Biotina 5 µg; hidrócloruro de tiamina, 0.1 mg; asparagina, 4 g; H<sub>2</sub>O destilada para aforar a 1,000 ml, más 15 g/l de glucosa (medio **GA**) y medio basal más 10 g/l de celulosa cristalina. (Medio **CC**). El medio **GA** es un muy buen medio de cultivo para el crecimiento de especies pertenecientes a la familia Ascobolaceae, el medio **CC** posee una fuente inductora (la celulosa cristalina) de las enzimas del complejo celulasas.

Matraces Erlenmeyer de 125 ml, que contenían 50 ml de medio de cultivo, se inocularon con discos de 5 mm de diámetro del borde de una colonia de 5 días de crecimiento en Bacto agar 2%. Los cultivos fueron incubados a 24° C, con luz y agitación continua a 125 rpm, durante 18 días en medio **GA** y durante 30 días en medio **CC**.

### *Crecimiento vegetativo*

De los cultivos en medio líquido con glucosa y con celulosa cristalina como fuente de carbono, se cosecharon los sólidos (micelio más celulosa cristalina) y los sobrenadantes de cada cultivo. Se realizaron curvas de crecimiento en medios **GA** y **CC** de los organismos detallados como cepas patrón en la tabla 1. La cosecha se realizó a lo largo de 18 días (los días 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15 y 18) para las curvas en medio **GA**, y a lo largo de 30 días (los días 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 21, 24, 27 y 30) para las de medio **CC**. Para el resto de las cepas de la tabla 1, se cosechó 3 días fijos alrededor del día de crecimiento óptimo, determinado previamente a partir de las curvas de crecimiento de las cepas patrón de cada especie. Se observó coincidencia en el día de crecimiento óptimo para todas las cepas de la misma especie. La totalidad de las experiencias se realizaron por duplicado.

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

### *Estimación del crecimiento*

#### *Peso seco del micelio*

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

### *Proteínas totales del micelio*

Para estimar el crecimiento en el medio **CC**, alícuotas de 50 mg de micelio molido y guardado a -20°C, fueron hidrolizados con OHNa 1N por 30 minutos a 100°C. Las muestras se centrifugaron por 20 minutos a 1,000 ´ g a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante que contiene las proteínas, las cuales se cuantificaron por el método de Bradford (1976), utilizando como estándar BSA (albúmina bovina sérica) 1 mg/ml en NaOH 1N. Los resultados se expresan como µg de proteínas de micelio/ml de medio de cultivo.

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

Se midió la actividad de endo-β-D-1,4-glucanasa en los medios libres de células de los cultivos con celulosa cristalina. Ésta se determinó por la medición de azúcares reductores, obtenidos por degradación de CMC (carboximetil celulosa) utilizada como sustrato, mediante el método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952; Nelson, 1944).

La mezcla de reacción contenía 400 µl de CMC-Na 0.5% disuelta en regulador acetato de sodio 0.1M (pH 4.8) más 100 µl del medio libre de células de cada cultivo. La mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos a 50°C.

### *Unidad de actividad*

Una unidad de actividad enzimática (UE) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para obtener azúcar reductor equivalente a 1 nmol de azúcar reductor/min expresado como equivalente de glucosa. La actividad enzimática fue expresada como UE/ml de cultivo.

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

#### *Fraccionamiento electroforético*

Se realizó el fraccionamiento electroforético de las proteínas del medio libre de células del cultivo con celulosa cristalina, que registró máxima actividad endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa de cada especie. Para ello se liofilizaron 50 ml del medio libre de células del cultivo con celulosa cristalina, hasta la obtención de un volumen final de 1 ml.

La electroforesis en geles de poliacrilamida 9%, fue realizada en placas verticales, en condiciones desnaturizantes (SDS), (Andrews, 1986) utilizando el sistema descrito por Shaw y Koen (1968) y Laemmli (1970). Se disolvieron las muestras liofilizadas en solución reguladora de muestra (Tris 1.5% - HCl 1N 12% (v/v), pH = 6.8, + azul bromofenol al 1% + 40  $\mu$ l de glicerol al 20% v/v).

Se sembraron 20  $\mu$ l de muestra preparada, conteniendo 30 UE de endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa.

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

#### *Detección de las bandas de actividad*

Luego de la corrida, el gel se lavó con solución reguladora que contenía ácido cítrico 12.3 mM- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH = 6.3, para eliminar el SDS. Se depositó el gel de poliacrilamida sobre un gel de agar al 2% que contenía CMC al 0.1%, preparado con solución reguladora de ácido cítrico-  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , incubando ambos a 50°C, por 60 minutos. Posteriormente el gel de agar con CMC se sumergió en una solución de Rojo Congo al 0.1% y se eliminó el exceso de colorante con una solución de NaCl 1N. Las bandas de actividad enzimática se visualizaron como bandas claras (Béguin, 1983; Coughlan, 1988). La movilidad electroforética para cada banda se obtuvo a través de la medición de la distancia desde el pozo hasta la parte media de cada una de las bandas. Los Rf se calcularon a través del cociente dado entre la distancia recorrida por cada banda y la distancia recorrida por el azul bromofenol.

#### *Técnicas numéricas*

##### *Matriz básica de datos*

Los caracteres usados fueron obtenidos a partir de los estudios realizados en el material que se detalla en la tabla 1.

Se construyó la matriz básica de datos, para todos los aislamientos monospóricos, codificando 0 y 1 (0 = ausencia, 1 = presencia) para la evidencia de la actividad enzimática, y los datos cuantitativos, que correspondieron a las variables fisiológicas, fueron considerados como valores promedio.

##### *Análisis de agrupamientos*

A partir de la matriz básica de datos se calculó el coeficiente de similitud de Gower (Sneath y Sokal, 1973) para cada par posible de OTU. La matriz resultante fue analizada por el método

de medias no ponderadas (UPGMA) (Sneath y Sokal, *op. cit.*), el análisis se realizó con el programa Multivariate Statistical Package (MVSP) (Kovack, 1993). La distorsión producida en el análisis de agrupamiento se calculó aplicando el coeficiente de correlación cofenética ( $r$ ) (Sokal y Rohlf, 1962), utilizando el programa NTSYS-PC (Rolf, 1993).

## RESULTADOS

La figura 1 muestra los diagramas con los diez electromorfos para endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa. Cada especie mostró un patrón de bandas isoenzimático característico, (patrones A a J). No se observaron diferencias entre las cepas monospóricas de cada aislamiento geográfico, y fueron escasas y sólo cuantitativas entre los distintos aislamientos geográficos de la misma especie. No se observaron diferencias en el patrón de bandas de los dos aislamientos geográficos de *S. infestans*, que mostró considerables diferencias para las variables de crecimiento y actividad enzimática. El patrón de bandas de degradación de CMC por la endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa, mostró la existencia de varias isoenzimas características de cada especie.

En el patrón de los aislamientos de *S. pseudodepauperatus* (figura 1, I) se registraron 11 bandas isoenzimáticas, 9 en los patrones de *S. citrinus* y *S. infestans*, (figura 1, A y H); 8 en el de *S. depauperatus* y *S. verrucisporus* (figura 1, G y J); 7 en los de *S. platensis* (figura 1, C), 5 en *S. longevissporus* y en *S. succineus*, (figura 1, B y E); 4 en *S. saccoboloides*, (figura 1, D ) y 2 en *S. truncatus* (figura 1, F). Se encontraron bandas comunes a varias especies dentro de cada una de las secciones, observándose en general mayor coincidencia entre las especies pertenecientes a la misma sección. En la sección *Saccobolus*, *S. citrinus* y *S. platensis* mostraron dos bandas en común de Rf 24 y Rf 49, la banda de Rf 49 estuvo

presente en otras dos especies de la sección, *S. longevissporus* y *S. succineus*. La banda de Rf 80 apareció en cuatro especies de la sección, *S. platensis*, *S. longevissporus*, *S. saccoboloides* y *S. succineus*, la banda de Rf 88 en *S. platensis*, *S. saccoboloides* y *S. succineus* y la banda de Rf 75 en *S. citrinus*, *S. longevissporus* y *S. truncatus*. *S. citrinus* y *S. succineus* mostraron, además de la banda de Rf 49, otras dos bandas comunes la de Rf 37 y la de Rf 43. En la sección *Eriobolus*, la banda de Rf 15 se encontró presente en tres especies: *S. depauperatus*, *S. pseudodepauperatus* y *S. verrucisporus*. La banda de Rf 41 estuvo presente en las cuatro especies de la sección, las de Rf 47 y 62 en *S. infestans* y *S. pseudodepauperatus*, las de Rf 50 y 59 en *S. depauperatus* y *S. verrucisporus*, la de Rf 76 en *S. depauperatus* y *S. infestans*, la de Rf 83 en *S. depauperatus*, *S. verrucisporus* y en *S. citrinus* de la sección *Saccobolus*, la de Rf 84 en *S. infestans* y *S. pseudodepauperatus*, la de Rf 92 en *S. depauperatus*, *S. infestans*, *S. pseudodepauperatus* y en *S. citrinus* de la sección *Saccobolus* y la de Rf 98 estuvo presente en *S. pseudodepauperatus* y *S. verrucisporus* de la sección *Eriobolus* y en *S. platensis* de la otra sección.

La tabla 2 muestra los valores de crecimiento óptimo, máxima actividad endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa y los días de ocurrencia de los mismos para todos los aislamientos geográficos de las diez especies. No se observaron diferencias importantes en los valores de las variables analizadas para las distintas cepas monospóricas de un mismo aislamiento geográfico de una determinada especie. Excepto para *S. infestans*, tampoco fueron relevantes las diferencias entre los distintos aislamientos geográficos de la misma especie. En la matriz básica de datos el total de caracteres fue de 38, representado cada uno por una banda de actividad de endo- $\beta$ -D-1,4-

glucanasa y por los valores de: **1**-Crecimiento óptimo en **GA**, **2**-Día de crecimiento óptimo en **GA**, **3**-Crecimiento óptimo en **CC**, **4**-Día de crecimiento óptimo en **CC**, **5**-Máxima producción de endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa en **CC**, **6**-Día de máxima producción de endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa en **CC**.

#### *Análisis de agrupamientos*

EL fenograma obtenido a partir del análisis de agrupamientos (UPGMA), figura 2, muestra que las dos secciones en las que se divide el género quedan claramente diferenciadas en dos grupos de especies. Cada uno de esos grupos abarca todos los aislamientos geográficos de las especies previamente incluidas dentro de cada sección. El primero, que incluye los aislamientos de las especies de la sección *Eriobolus*, muestra dos subgrupos, Uno formado por *S. depauperatus* y *S. verrucisporus* y el segundo representado por *S. infestans* y *S. pseudodepauperatus*. El grupo que incluye los aislamientos de las especies de la sección *Saccobolus* muestra un núcleo formado por cinco especies *S. longevisporus*, *S. saccoboloides*, *S. truncatus*, *S. platensis* y *S. succineus* y uno aislado del resto formado por las cepas de los aislamientos de *S. citrinus*. Los dos grupos, que corresponden a ambas secciones, están asociados entre sí con un índice de similitud del 56%. Excepto para *S. infestans* que mostró una clara separación entre las cepas de las dos poblaciones consideradas, el resto de las especies mostró escasas diferencias entre las cepas de distintas poblaciones de una misma especie, con índices de similitud cercanos al 100%, lo que indica fenotipos casi idénticos. El coeficiente de correlación cofenético fue de 0.932 indicando una escasa distorsión en el agrupamiento.

## DISCUSIÓN

Las especies del género *Saccobolus* presentaron homogeneidad intraespecífica, ya que se observaron escasas diferencias, con respecto a las variables de crecimiento y actividad enzimática entre las cepas monospóricas de cada aislamiento geográfico y fueron escasas entre los distintos aislamientos geográficos de la misma especie. En cuanto a las isoenzimas, solamente hubo leves diferencias cuantitativas, no así cualitativas, presentando cada especie un patrón isoenzimático característico. La elección de los sistemas enzimáticos es importante para el análisis, ya que distintos tipos de enzimas exhiben diferentes grados de variabilidad debido a la intensidad de la presión de selección, y muchos estudios que sólo utilizan enzimas que detectan muy altos niveles de variación intraespecíficas, son incapaces de distinguir o diferenciar especies (Johnson, 1974; Racine y Langley, 1980).

Este trabajo confirma que la conservada enzima endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa de las especies del género *Saccobolus*, que presenta patrones de bandas que son invariables entre los aislamientos de la misma especie, puede ser utilizada para la delimitación de las mismas. La utilización de variables fisiológicas para el análisis agregó nuevos caracteres para la delimitación, detectando diferencias en los valores de dichos variables a nivel de especie.

Los resultados del análisis en las diez especies del género muestran dos grupos principales de especies que corresponden cada uno a las dos secciones en las que se divide el género: la sección *Saccobolus*, constituida por *S. citrinus*, *S. longevisporus*, *S. platensis*, *S. saccoboloides*, *S. succineus* y *S. truncatus*, y la

sección *Eriobolus*, constituida por: *S. depauperatus*, *S. infestans*, *S. pseudodepauperatus* y *S. verrucisporus*.

Los resultados obtenidos permitieron además dilucidar algunas cuestiones:

Corroboraron la inclusión de *S. saccoboloides* dentro del género *Saccobolus*. Esta especie descrita por Dodge y Seaver (1946) fue primero incluida en el género *Ascobolus*, debido a que generalmente, al alcanzar la madurez, las ascosporas permanecen casi libres entre sí dentro del saco o formando un paquete muy laxo. Sin embargo, el epíteto específico aludió a su semejanza con *Saccobolus*, a donde finalmente fue transferido. Evidentemente el carácter de ascosporas libres, por sí solo, no es suficiente para separar ambos géneros.

Mostraron a *S. truncatus* y *S. platensis* como dos especies diferentes. Estas especies, que aparecen claramente diferenciadas como dos distintas en el fenograma, mostraban dudas acerca de su clara delimitación desde el punto de vista morfológico. Las mismas se separan entre sí, fundamentalmente por el tamaño del paquete de ascosporas. En *S. truncatus*, al madurar las ascosporas, el paquete se comprime resultando acortado con respecto al paquete de *S. platensis*. Esto no ocurre en todos los casos, de modo que en la población se encuentran paquetes de distintos tamaños, planteando la duda sobre la posibilidad de diferenciarlas como dos especies.

Constataron la acertada ubicación de *S. infestans* en la sección *Eriobolus*. Esta especie, caracterizada típicamente por la disposición de las ascosporas en el paquete, fue ubicada tentativamente por van Brummelen (1967) en la sección *Eriobolus*, a pesar de presentar paráfisis pigmentadas, en contraposición con el resto de las especies de dicha sección.

La observación de coincidencias en caracteres morfológicos, microscópicos, citológicos y de desarrollo, en el estudio de numerosos aislamientos y cultivos provenientes de ascosporas de diferentes especies del género *Saccobolus* planteaba dudas acerca de la delimitación clara de las mismas. Muchos de los caracteres morfológicos utilizados para la clasificación, mostraban superposiciones que dificultaban la determinación de las especies. Los resultados de este trabajo avalan el uso de los patrones isoenzimáticos y las diferencias en las variables fisiológicas para la delimitación de las especies del género. Los mismos indican que las diez especies estudiadas constituyen unidades taxonómicas independientes, avalando lo establecido, para alguna de ellas a partir del análisis de los patrones morfológicos, y fisiológicos previamente estudiados. (Ranalli y Gamundi, 1975; Ranalli y Forchiassin, 1976; Mouso y Ranalli, 1986; Ranalli y Gonzalez Castelain, 1991; Ranalli *et al.*, 1991; Ranalli y Mercuri, 1995). Esta metodología constituye una herramienta adicional a la taxonomía tradicional del género, que utiliza sólo caracteres morfológicos.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por SECYT-UBA (EX134) y PID-CONICET 3341/92.



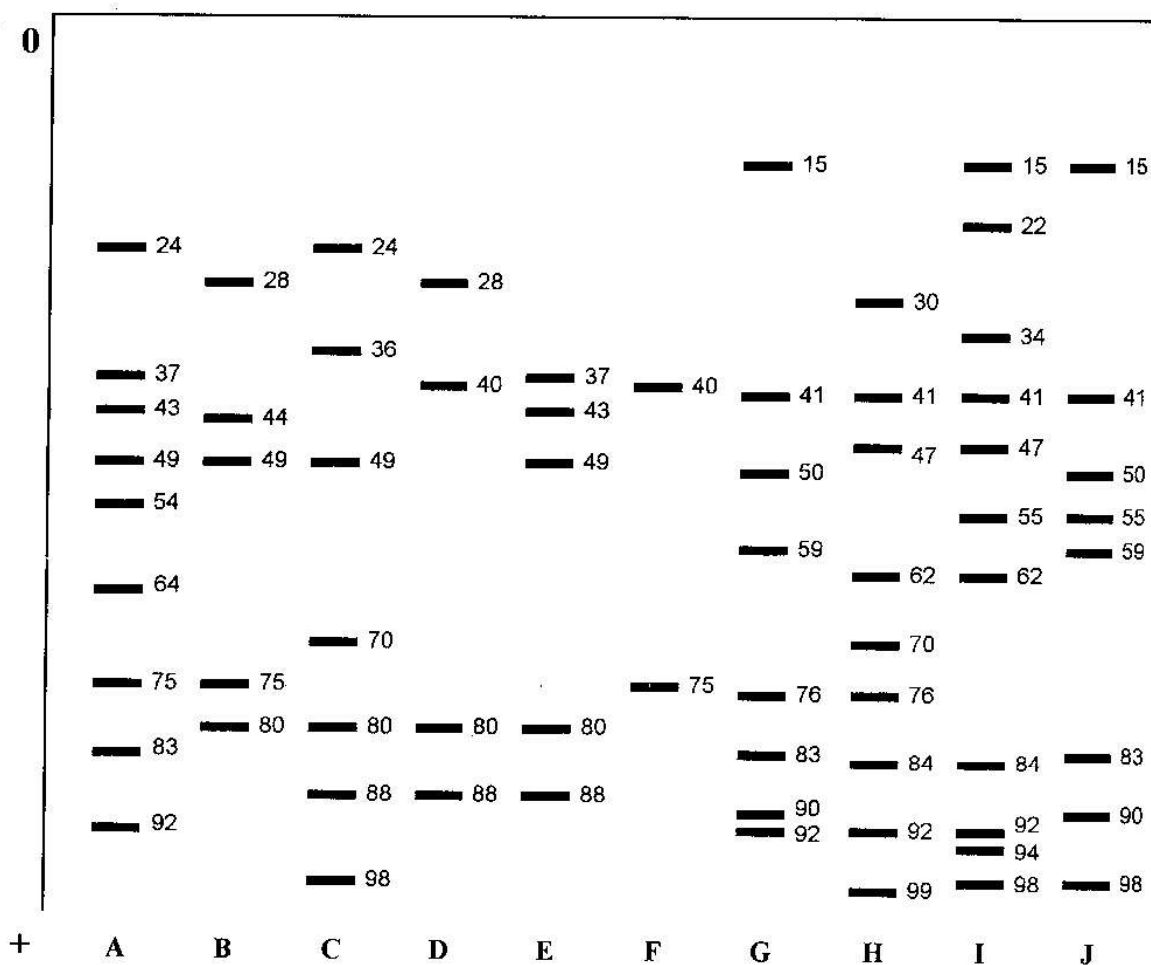
## LITERATURA CITADA

- Andrews, A. T. 1986. Electrophoresis. Theory, techniques and biochemical and clinical applications. En: Peacocke AR, Harrington WF (Eds.). Monographs on Physical Biochemistry Clarendon Press, Oxford. 452 pp.
- Beguin, P. 1983. Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using Congo Red-Stained agar replicas. *Anal. Biochem.* 131:333-336.
- Boudier, E. 1869. Mémoire sur les Ascobolés. *Ann. Sci. Nat. Bot. Ser.* 10:191-268.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brummelen, J. van. 1967. A world monograph of the genera *Ascobolus* and *Saccobolus* (Ascomycetes, pezizales). *Persoonia* (Suppl) 1: 1-260.
- Carder, J. H. 1989. Distinctions between cellulase isoenzyme patterns of five plant-pathogenic *Verticillium* species. *Mycol. Res.* 92: 297-301.
- 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.
- Coughlan, M. P. 1988. Staining techniques for the detection of the individual components of cellulolytic enzyme systems. *Meth. Enzymol.* 160:135-144.
- Dodge, B. O. y F. J. Seaver. 1946. Species of *Ascobolus* for genetic study. *Mycologia* 38: 639-651.
- Gamundi, I. J. y M. E. Ranalli. 1964. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina I. *Nova Hedwigia* 7: 517-533.
- Johnson, G. B. 1974. Enzyme polymorphism and metabolism. *Science* 184:28-37.
- Kovack, W. L. 1993. MVSP-A multivariate statistical package for IBM-PCs, versión 2.1.
- Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, UK.
- Kurzeja, K. C. y E. D. Garber. 1973. A genetic study of electrophoretically variant extracellular amyolytic enzymes of wild-type strains of *Aspergillus nidulans*. *Can. J. Genet. Cytol.* 15:275-287.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227: 680-685.
- Lodha, B. C. 1974. Decomposition of digested litter. En: Dickinson C.H., Pugh G.F.H.(Eds.), *Biology of plant litter decomposition*, Acad. Press, New York.
- Majjala, P., M. Raudaskoski y L. Viikari. 1995. Hemicellulolytic enzymes in P- strains and S- strains of *Heterobasidion annosum*. *Microbiology* 141: 743-750.
- Mouso de Cachi, N. y M. E. Ranalli. 1986. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina XI Citología y desarrollo de *Saccobolus platensis*. *Physis*, secc. C, 44: 83-91
- Nelson N. J. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biochem.* 153: 375-380.

- Pardo, A. G., Sívori, A. S. y M. E. Ranalli 1997. Comparative study of cellulolytic enzyme zymograms of species of *Thecotheus* and *Iodophanus* (Pezizales-Ascomycetes). *Mycotaxon* 63:269-286.
- 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. y F. Forchiassin. 1995. Producción de endoglucanasa en cuatro especies del género *Saccobolus*. *Rev. Arg. Microbiol.* 28: 55-62.
- Ranalli, M. E. y F. Forchiassin. 1976. Estudio sistemático y biológico de las Ascobolacéas de Argentina VII. Desarrollo y Citología de *Saccobolus citrinus*. *Bol. Soc. Arg. de Bot.* 17: 262-279.
- Ranalli, M. E. y I. J. Gamundi. 1975. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina VI. Morfología y desarrollo de *Saccobolusseudodepauperatus* sp. nov. Citología del asco. *Nova Hedwigia* 26: 737-763.
- Ranalli, M. E. y R. J. González Castelain. 1991. Estudio sistemático y biológico de las Ascobolaceas de Argentina XIII. Una nueva especie de *Saccobolus* (Ascomycetes-Pezizales) *Physis* 49: 11-17.
- Ranalli, M. E. , R. J. González Castelain y F. Forchiassin. 1991. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina XIV. Desarrollo del apotecio y del sistema ascógeno de *Saccoboluslongevisporu*. *Physis* 49: 51-59.
- Ranalli, M. E. y O. A. Mercuri. 1995. Taxonomy of some Argentine species of *Saccobolus*. *Mycotaxon* 54: 325-327.
- Rayner, A. D. M. 1994. Evolutionary processes affecting adaptation to saprotrophic life styles in Ascomycete population. En: D. L. Hawksworth, (ed.). *Ascomycete systematics. Problems and Perspectives in the Nineties*, NATO ASI series, Plenum Press, New York. 453 pp.
- Rolf, J. F. 1993. NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.8 Exeter Software Applied Biostatistics Inc., N.Y.
- Shaw, C. R. y A. L. Koen. 1968. Zone electrophoresis of enzymes. En: Smith, I. (ed.). *Chromatography and electrophoresis*, 2<sup>nd</sup> ed., Interscience publishers, New York.
- Sing, S., J. K. Brar, D. K. Sandhu y A. Kaur. 1996. Isozyme polymorphism of cellulases in *Aspergillus terreus*. *J. Basic Microbiol.* 36: 289-296.
- Sneath, P. H. y R. R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman & Co, San Francisco, USA.
- Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11: 33-40.
- Somogyi, M. J. 1952. Notes on sugar determination. *Biol. Chem.* 159: 19-23.

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.

Wu, Q., K. W. Hughes y R. H. Petersen. 1995. A reevaluation of taxa of *Clavicornia* subg. *Ramosa* based on morphology, compatibility, and laccase electrophoretic patterns. *Sydowia* 47: 89-124.



A: *S. citrinus*  
 B: *S. longevisporus*  
 C: *S. platensis*  
 D: *S. saccoboloides*  
 E: *S. succineus*

F: *S. Truncatus*  
 G: *S. depauperatus*  
 H: *S. infestans*  
 I: *S. pseudodepauperatus*  
 J: *S. verrucisporus*

Fig. 1. Diagrama de electromorfos A a J de endo-β-D-1,4 glucanasa, identificados en cada especie.

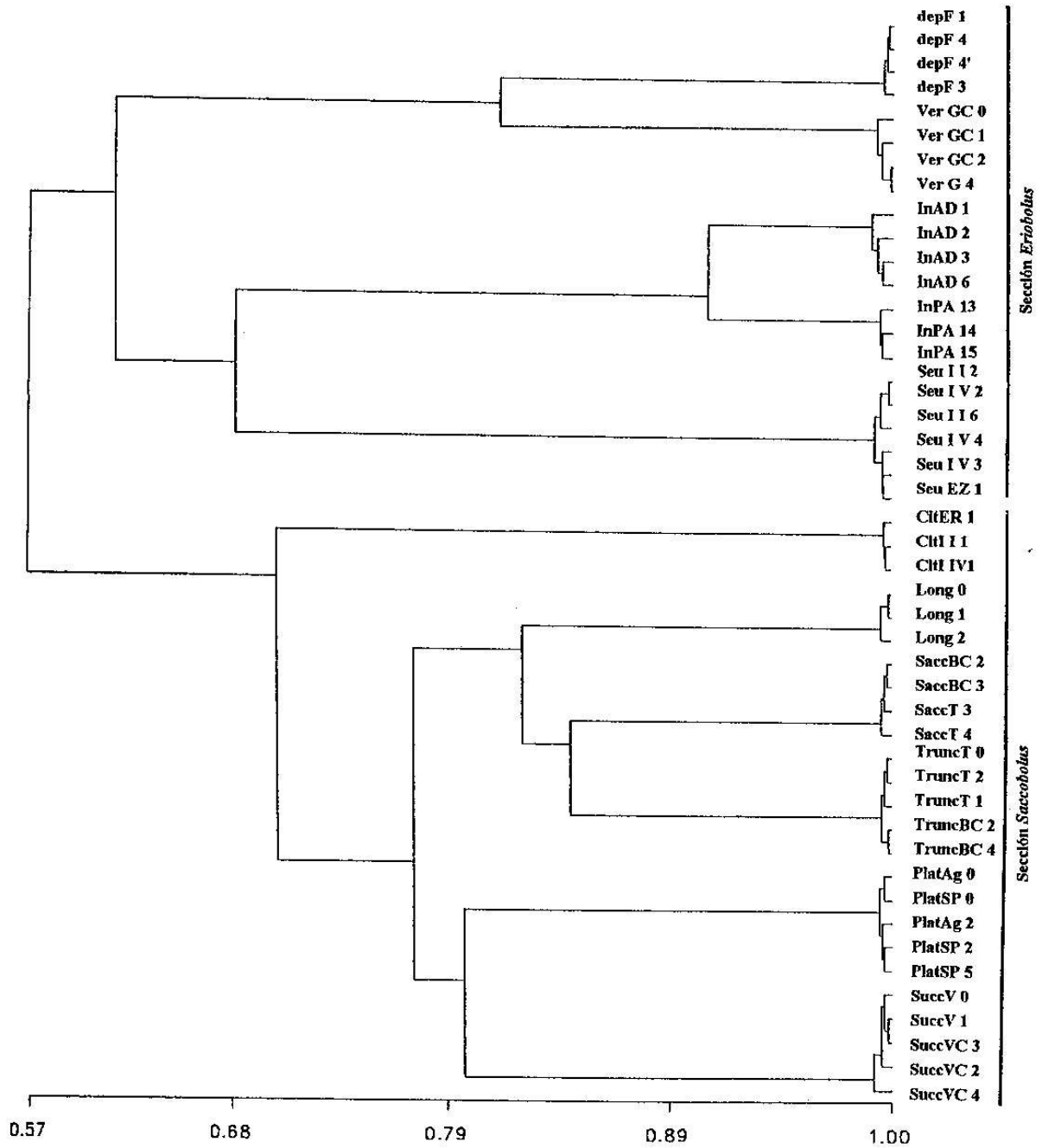


Fig. 2. Fenograma obtenido a partir de los datos fisiológicos y patrones de endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa. Análisis de agrupamientos realizado por el método de medias no ponderadas (UPGMA).

**Tabla 1.** Listado de sepas utilizadas para el análisis de las variables de crecimiento, producción de endo-B-D-1,4-glucanasa, y patrones isoenzimáticos de la misma.

SIGLA	CEPAS	LOCALIDAD	SUSTRATO	FECHA	BAFC #
Sección <i>Saccobolus</i>					
* CitER 1	<i>S. citrinus</i> ER	Guauguaychú, PER, Arg	Estiércol de vaca	Ene-88	2838
CitII 1	<i>S. citrinus</i> I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	Ago-94	2826
CitIII 1	<i>S. citrinus</i> I IV	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	Ago-94	2825
* Long 0	<i>S. longevisorus</i> PD	Puerto Descado, PSC, Arg	Estiércol de vaca	Nov-83	2847
Long 1	<i>S. longevisorus</i> PD	Puerto Descado, PSC, Arg	Estiércol de vaca	Nov-83	2848
Long 2	<i>S. longevisorus</i> PD	Puerto Descado, PSC, Arg	Estiércol de vaca	Nov-83	2849
PlatAg 0	<i>S. platensis</i> AG	Agronomía, BA, Arg	Estiércol de vaca	Jul-92	2852
PlatAg 2	<i>S. platensis</i> AG	Agronomía, BA, Arg	Estiércol de vaca	Jul-92	2853
* PlatSP 0	<i>S. platensis</i> SP	San Pedro, PBA, Arg	Estiércol de vaca	May-91	2861
PlatSP 2	<i>S. platensis</i> SP	San Pedro, PBA, Arg	Estiércol de vaca	May-91	2863
PlatSP 5	<i>S. platensis</i> SP	San Pedro, PBA, Arg	Estiércol de vaca	May-91	2865
SaccBC 2	<i>S. saccoboloides</i> BC	Villa La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	Ene-87	2596
* SaccBC 3	<i>S. saccoboloides</i> BC	Villa La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	Ene-87	2866
SaccT 3	<i>S. saccoboloides</i> TAFI	Tafí del Valle, PT, Arg	Estiércol de vaca	Sep-88	2822
SaccT 4	<i>S. saccoboloides</i> TAFI	Tafí del Valle, PT, Arg	Estiércol de vaca	Sep-88	2870
* SuccV 0	<i>S. succineus</i> ER	Guauguaychú, PER, Arg	Estiércol de vaca	Abr-89	2882
SuccV 1	<i>S. succineus</i> ER	Guauguaychú, PER, Arg	Estiércol de vaca	Abr-89	2883
SuccVC 2	<i>S. succineus</i> VC	Villa Clara, PER, Arg	Estiércol de vaca	Abr-89	2805
SuccVC 3	<i>S. succineus</i> VC	Villa Clara, PER, Arg	Estiércol de vaca	Abr-89	2808
SuccVC 4	<i>S. succineus</i> VC	Villa Clara, PER, Arg	Estiércol de vaca	Abr-89	2809
* TruncBC 2	<i>S. truncatus</i> BC	Villa La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	Ene-87	2595
TruncBC 4	<i>S. truncatus</i> BC	Villa La Angostura, PRN, Arg	Estiércol de vaca	Ene-87	2888
TruncT 0	<i>S. truncatus</i> T	Tandil, PBA, Arg	Estiércol de caballo	Ene-92	2821
TruncT 1	<i>S. truncatus</i> T	Tandil, PBA, Arg	Estiércol de caballo	Ene-92	2891
TruncT 2	<i>S. truncatus</i> T	Tandil, PBA, Arg	Estiércol de caballo	Ene-92	2892
* DepF 1	<i>S. depauperatus</i> FAC	Ciud. Universitaria, BA, Arg	Estiércol de caballo	Sep-94	2895
DepF 3	<i>S. depauperatus</i> FAC	Ciud. Universitaria, BA, Arg	Estiércol de caballo	Sep-94	2896
DepF 4	<i>S. depauperatus</i> FAC	Ciud. Universitaria, BA, Arg	Estiércol de caballo	Sep-94	2897
DepF 4'	<i>S. depauperatus</i> FAC	Ciud. Universitaria, BA, Arg	Estiércol de caballo	Sep-94	2898
* In AD 1	<i>S. infestans</i> AD	Adrogué, PBA, Arg.	Estiércol de caballo	Mar-91	2831
In AD 2	<i>S. infestans</i> AD	Adrogué, PBA, Arg.	Estiércol de caballo	Mar-91	2899
In AD 3	<i>S. infestans</i> AD	Adrogué, PBA, Arg.	Estiércol de caballo	Mar-91	2900
In AD 6	<i>S. infestans</i> AD	Adrogué, PBA, Arg.	Estiércol de caballo	Mar-91	2903
* In PA 13	<i>S. infestans</i> PA	Porto Alegre, Brasil	Estiércol de vaca	May-91	2832
In PA 14	<i>S. infestans</i> PA	Porto Alegre, Brasil	Estiércol de vaca	May-91	2909
In PA 15	<i>S. infestans</i> PA	Porto Alegre, Brasil	Estiércol de vaca	May-91	2910

\*Cepas de patrón

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

Tabla 1. Continuación.

SIGLA	CEPAS	LOCALIDAD	SUSTRATO	FECHA	BAFC #
<i>Sección Eriobolus</i>					
Seu I I 2	<i>S.seudodepauperatus</i> I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	Ago-94	2913
Seu I I 6	<i>S.seudodepauperatus</i> I I	Campana, PBA, Arg	Estiércol de vaca	Ago-94	2916
* Seu I V 2	<i>S.seudodepauperatus</i> I V	Campana, PBA, Arg	Estiércol de caballo	Ago-94	2828
Seu I V 3	<i>S.seudodepauperatus</i> I V	Campana, PBA, Arg	Estiércol de caballo	Ago-94	2919
Seu I V 4	<i>S.seudodepauperatus</i> I V	Campana, PBA, Arg	Estiércol de caballo	Ago-94	2920
Seu EZ 1	<i>S.seudodepauperatus</i> EZ	Ezeiza, PBA, Arg	Estiércol de caballo	Jun-91	2829
* Ver GC 0	<i>S.verrucisporus</i> GC	Gob. Castro, PBA, Arg	Estiércol de caballo	Jun-83	2823
Ver GC 1	<i>S.verrucisporus</i> GC	Gob. Castro, PBA, Arg	Estiércol de caballo	Jun-83	2926
Ver G 2	<i>S.verrucisporus</i> G	Gualeguaychú, PER, Arg	Estiércol de vaca	Abr-89	2932
Ver G 4	<i>S.verrucisporus</i> G	Gualeguaychú, PER, Arg	Estiércol de vaca	Abr-89	2934

**Tabla 2.** Datos de crecimiento en cultivos con glucosa y con celulosa cristalina, producción de endo  $\beta$ -D-1,4-glucanasa.

CEPA	Crecimiento óptimo en CC, Proteínas de micelio (ug/ml.)	Máxima producción de endo $\beta$ -D-1,4 glucanasa (UE/ml) en CC	Día de crecimiento óptimo en CC	Día de máxima producción de endo $\beta$ -D-1,4 glucanasa	Crecimiento óptimo en GA (mg de micelio)	Crecimiento óptimo en GA
CitER 1	270	60	9	10	274	8
CitI IV1	265	58	9	10	270	8
CitI I 1	250	67	9	10	274	8
Long 0	190	60	12	12	350	10
Long 1	187	62	12	12	350	10
Long 2	180	58	12	12	320	10
PlatAg 0	260	56	10	10	330	8
PlatAg 2	250	42	10	10	346	8
PlatSP 0	240	52	10	10	336	8
PlatSP 2	230	47	10	10	360	8
PlatSP 5	220	46	10	10	340	8
SaccBC 2	390	146	10	10	426	8
SaccBC 3	370	150	10	10	437	8
SaccT 3	385	142	10	10	430	8
SaccT 4	380	135	10	10	422	8
SuccV 0	210	80	10	11	430	9
SuccV 1	220	70	10	11	425	9
SuccVC 2	200	60	10	11	432	9
SuccVC 3	210	68	10	11	426	9
SuccVC 4	190	65	10	11	380	10
TruncBC	290	70	10	12	410	10
TruncBC	276	68	10	12	395	10
TruncT 0	280	58	10	12	387	10
TruncT 1	286	66	10	12	415	10
TruncT 2	285	60	10	12	390	10
depF 1	200	80	12	12	210	12
depF 3	208	76	12	12	198	12
depF 4	195	83	12	12	215	12
depF 4'	205	90	12	12	211	12
InAD 1	250	130	8	8	380	8
InAD 2	270	108	8	8	394	8
InAD 3	230	90	8	8	386	8
InAD 6	260	95	8	8	378	8
InPA 13	115	84	12	13	420	13
InPA 14	120	70	12	13	408	13
InPA 15	130	78	12	13	390	13
Seu I I 2	320	148	7	8	368	7
Seu I I 6	309	138	7	8	360	7
Seu I V 2	330	150	7	8	370	7
Seu I V 3	298	130	7	8	373	7
Seu I V 4	304	124	7	8	350	7
Seu EZ 1	290	120	7	8	365	7
Ver GC 0	325	106	7	8	200	7
Ver GC 1	350	88	7	8	196	7
Ver GC 2	308	96	7	8	210	7
Ver G 4	304	94	7	8	212	7