



Universidad Nacional Autónoma de
México

003463
24

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

Facultad de Ciencias
División de Estudios de Posgrado

268777

Estudio morfoestructural de la pared de esporas, micelio externo e interno de un hongo endomicorrízico arbuscular, aislado de suelos calcimagnésicos, a nivel de microscopía óptica y electrónica de barrido y transmisión.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA:

ESPECIALIZACIÓN EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
APLICADA A LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

M. en C. José Eduardo González Quintero

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. SERGIO PALACIOS MAYORGA

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE: DR. GERARDO HEBERT VAZQUEZ NIN.
FACULTAD DE CIENCIAS, LAB. DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA UNAM.

VOCAL : M. en C. SERGIO PALACIOS MAYORGA.
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, DEPTO. DE EDAFOLOGÍA (MICROBIOLOGÍA DE SUELOS) UNAM.

SECRETARIO: DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRIA MARTINEZ.
FACULTAD DE CIENCIAS, LAB. DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA UNAM.

SUPLENTE: DRA. GUADALUPE TRINIDAD ZAVALA PADILLA.
FACULTAD DE CIENCIAS, LAB. DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA UNAM.

SUPLENTE M. en C. ADELA MARGARITA REYES SALAS.
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, LAB. DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA UNAM.

AGRADECIMIENTOS

HAGO PATENTE MI MÁS PROFUNDO AGRADECIMIENTO:

AL DR. DANTE J. MORÁN ZENTENO
DIRECTOR DEL INSTITUTO DE GEOLOGÍA DE LA UNAM.

AL ING. RODOLFO DEL ARENAL CAPETILLO
EXSECRETARIO ACADEMICO

AL M. en C. SERGIO PALACIOS MAYORGA, INVESTIGADOR DEL DEPARTAMENTO DE EDAFOLOGÍA DEL INSTITUTO DE GEOLOGÍA Y DIRECTOR DE ESTÁ TESIS, POR SUS INVALUABLES ENSEÑANZAS Y CONSEJOS; EXTRAORDINARIA Y ENTUSIASTA DEDICACIÓN EN LA DIRECCIÓN DE ESTE TRABAJO, QUE HAN MOTIVADO GRANDEMENTE MI FORMACIÓN Y SUPERACIÓN, NO SOLAMENTE EN EL ASPECTO ACADEMICO SINO TAMBIÉN EN EL HUMANO.

A LA M. en C. ADELA MARGARITA REYES SALAS POR SU ASESORIA EN EL PROCESAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.

A LA DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRIA POR SU ASESORIA, MOTIVACIÓN, CONSEJOS Y SUJERENCIAS A LO LARGO DE LOS TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE ESTA TESIS.

AL DR. GERARDO HEBERT VAZQUEZ NIN POR SUS EXCELENTES CLASES Y EXPERIENCIAS TRASMITIDAS.

A LA DRA. GUADALUPE TRINIDAD ZAVALA PADILLA POR SU ASESORIA EN EL MANEJO DE LOS MATERIALES BIOLÓGICOS, LA PREPARACIÓN Y SU PROCESAMIENTO, ASI COMO SU ASISTENCIA EN EL REVELADO E IMPRESIÓN DE LAS MICROIMAGENES.

AL BIOL. Y ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA MARCO ANTONIO JIMENEZ GONZÁLEZ POR SU ACERTADA ASESORIA Y CONSEJOS DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A LA BIOL. Y ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA ERENESTINA FLORES POR SU DEDICACION EN LA ASESORIA TÉCNICA.

EN GENERAL A TODO EL PERSONAL DEL LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS POR SU BUENA DISPOSICIÓN Y AYUDA PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

AL PAST. DE BIOL. RUBÉN ZAMORA ROJAS, POR SU VALIOSA AYUDA EN EL MANTENIMIENTO DEL EXPERIMENTO EN EL INVERNADERO.

AL ESTUDIANTE EN ING. ARMANDO VAZQUEZ MACHUCA POR SU ASESORAMIENTO EN EL ESCANEADO E IMPRECIÓN DE LAS MICROIMAGENES.

MAESTRA JULIA MENDOZA VEGA

AL LOS BIÓLOGOS. JOSÉ ANTONIO HERRERA GÓMEZ Y HOMER ALFREDO GAMBOA ROMERO; POR EL ASESORAMIENTO EN EL FOTOMICROSCOPIO PARA LA TOMA DE MICROFOTOGRAFÍAS ESTEREOSCÓPICAS Y ÓPTICAS.

EN GENERAL A TODO EL PERSONAL DEL LABORATORIO DE MICROCINE DE LA FACULTAD DE CIENCIAS POR SU BUENA DISPOSICIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A LOS MIEMBROS DEL H. JURADO POR SU TIEMPO Y DEDICACIÓN EN LA REVISIÓN DE ESTA TESIS, Y SUS VALIOSAS SUGERENCIAS.

A MIS PADRES Y HERMANOS

AL SR. JORGE GARCÍA ORTEGA.

A MIS MAESTROS, EN ESPECIAL, AL M. en C. SERGIO PALACIOS MAYORGA

PARA ALEJANDRA GARCÍA MENDOZA, MI AGRADECIMIENTO POR SU COMPAÑÍA, PACIENCIA, APOYO MORAL Y SENTIMENTAL EN LOS MOMENTOS MÁS DIFÍCILES DE MI VIDA.

CONTENIDO

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	5
III. OBJETIVOS.....	7
IV. MARCO TEÓRICO.....	8
1.0 La Endomicorriza Arbuscular.....	9
1.1 Morfología de la Colonización.....	10
1.1.2 Estructuras reproductivas.....	12
1.1.2.3 Historia.....	12
2.0 Clasificación.....	13
2.1 Taxonomía de los Hongos Micorrízicos arbusculares (HMA).....	13
2.1.2 Conceptos taxonómicos.....	15
2.1.2.3 Características de la pared de las esporas.....	16
2.1.2.3.4 Identificación de las esporas.....	16
3.0 Microscopía Electrónica de HMA.....	19
3.1 Microscopía Electrónica de Transmisión.....	19
a) colección de los especímenes	c) deshidratación
b) técnica de fijación	d) infiltración e inclusión
3.2 Microscopía Electrónica de Barrido.....	23
a) procedimiento de fijación	
b) técnica para la obtención de cortes	
c) deshidratación y secado en punto crítico	
d) montaje de especímenes	

3.3	Microscopía electrónica analítica.....	26
3.4	Aportaciones recientes de la microscopía electrónica (ME) en el estudio de la micorriza arbuscular (MA).....	27
V.0	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
5.1	Material Biológico Obtenido.....	32
5.1.2	Aislamiento de HMA.....	32
5.1.2.3	Cultivo monospórico de HMA.....	32
5.2	Preparación de las Esporas para su Estudio por Microscopía Electrónica.....	33
5.2.1	Transmisión.....	33
a)	<i>fijación</i>	
b)	<i>deshidratación</i>	
c)	<i>preinclusión</i>	
d)	<i>inclusión</i>	
e)	<i>corte y contraste</i>	
f)	<i>localización esquematizada de los cortes de la pared de las esporas</i>	
5.2.2	Barrido.....	35
a)	<i>fijación</i>	
b)	<i>deshidratación</i>	
c)	<i>secado a punto crítico</i>	
d)	<i>cubierta con carbón</i>	
e)	<i>cubierta con oro</i>	
f)	<i>observación</i>	
VI	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
1.0	Microscopía Estereoscópica y Óptica.....	38
1.1	observación de cortes.....	39
2.0	Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	42

3.0 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) . . .44

3.1 Capa Interna de la Pared de las Esporas de los Esporocarpos46

3.1.1 Corte transversal, oblicuo y longitudinal . .46

3.2 Capa Externa de la pared de las Esporas48

3.2.1 Corte transversal48

3.3 Capa Interna de la Pared de las Esporas51

3.3.1 Corte longitudinal51

3.3.2 Corte transversal52

3.3.3 Corte oblicuo tangencial53

3.3.4 Corte oblicuo55

3.4 Hifa Sustentora de la Espora68

3.4.1 Zona Superior del Embudo68

3.4.1.1 Corte transversal68

3.4.2 Zona Inferior del Embudo70

3.4.2.1 Corte transversal70

3.4.3 Zona Central del Embudo71

3.4.3.1 Corte oblicuo71

3.5 Micelio Externo74

3.5.1 Micelio Grueso74

3.5.1.2 Corte transversal74

3.5.1.2.3 Corte oblicuo77

3.5.2 Micelio Delgado79

3.5.2.1 Corte transversal79

3.5.2.1.2 Corte oblicuo79

1.2 La Colonización en la Raíz81

1.2.1 Microscopio óptico81

1.2.1.2 Corte transversal.....	86
3.6 Micelio Interno.....	88
3.6.1 Hifa Interna.....	88
3.6.1.2 corte transversal.....	88
3.6.2 Arbúsculos.....	91
3.6.2.1 corte transversal.....	91
3.6.2.1.2 corte longitudinal.....	91
VII CONCLUSIONES	93
VIII BIBLIOGRAFÍA	141

I.- RESUMEN.

La importancia de los hongos endomicorrízicos arbusculares (HMA), asociados simbióticamente con la mayoría de las plantas vasculares, y que forman en las raíces la llamada endomicorriza arbuscular (MA), radica en que está influye, positivamente, en aspectos fisiológicos importantes como son la absorción de agua y nutrimentos, y la resistencia al ataque de patógenos radicales, entre otros. Estos son algunos de los aspectos que permiten considerar a los HMA, como uno de los elementos más importantes para lograr una agricultura sustentable.

Los HMA presentan problemas en su taxonomía, particularmente en la posición sistemática de varias especies que requieren su esclarecimiento. Además, su alto grado de dificultad que significa su identificación, se relaciona con el reconocimiento del número y morfología de las capas que constituyen la pared de las esporas, base de su taxonomía.

Con el propósito de contribuir a la caracterización de estos microorganismos, se estudió la morfología estructural y ultraestructural de la pared de sus esporas, en diferentes orientaciones y, además, la pared de las hifas de ambos micelios, externo e interno. El material de estudio corresponde a un aislado monospórico procedente de suelos calcimagnésicos, de uso agrícola, de Miacatlán, Edo. de Morelos. Para su estudio se aplicaron: (1) técnicas para microscopía óptica, sobre esporas enteras con luz incidente y transmitida con aumentos de 40 y 50 X, en fragmentos de ellas ("squash") y en cortes finos (1-5 μ), en preparaciones montadas tanto con bálsamo de Canadá como con alcohol polivinílico en lactoglicerol. Se realizaron observaciones en campo claro y contraste de fases, con aumentos de 50, 300 y 1000 X; (2) para el examen de la superficie, ornamentación y estructura de las paredes e hifas, se empleó la microscopía electrónica de barrido (MEB) con aumentos de 1000, 1500, 2000 y 2500 X; y (3) la microscopía electrónica de transmisión (MET), para estudiar el número de capas y la orientación ultraestructural de las microfibrillas observadas

desde diferentes ángulos en cortes: longitudinales, transversales, oblicuos y tangencial-oblicuos, con aumentos desde 3,000 hasta 110,000 X.

Los resultados obtenidos indican que con la microscopía óptica y las técnicas de iluminación utilizadas, se logró la apreciación morfológicas de las esporas (turgencia, brillo, color y textura) así como el tipo y dimensiones de las hifas sustentoras y de las hifas de ambos micelios; características morfológicas propias del género *Glomus* especie *mosseae* de acuerdo con Mosse y Bowen, (1968); y Hall y Fish, (1979). Con el MEB, fue posible detectar la "esporósfera" (capa exterior de microorganismos que recubre la pared de la espora) y detallar la topografía de la pared de las esporas. Se destacaron, además, las características morfológicas, de la topografía, tamaño y tipo de unión de la hifa sustentora o de sujeción, y de las hifas que constituyen los esporocarpos en estadio de desarrollo temprano.

La técnica utilizada para el procesamiento de los HMA para la microscopía electrónica de barrido (MEB), fueron satisfactorios para la observación y caracterización de tres tipos de esporocarpos y sus dimensiones. Las características morfológicas observadas permitieron confirmar que los ejemplares estudiados pertenecen a la familia Glomaceae y género *Glomus* y, probablemente, a la especie *mosseae*, de acuerdo con Schenck y Pérez, (1990).

La observación de cortes con el microscopio electrónico de transmisión (MET), preparados con la técnica de la doble fijación con paraformaldehído y glutaraldehído, con una pos-fijación con tetróxido de osmio, y la inclusión en resina epóxica, mostró que la pared de la espora esta constituida por una capa externa de $< 1 \mu$ de espesor, muy densa a los electrones, con una cohesión débil, ya que puede separarse en 3 o 4 láminas por efectos mecánicos. Después de ésta, se apreció una capa interna de 3μ de grosor. Esta última, presentó diferentes características ultramorfológicas que dependieron de la orientación del corte (transversal, longitudinal u oblicuo).

Los cortes transversales y oblicuos, de la hifa de sujeción o sustentora (Hs) revalaron cambios en la organización

ultraestructural, de la parte superior a la base de ésta (puntos de contacto con la espora y la hifa del micelio externo, respectivamente). En la parte superior de la Hs se conservan las 4 subcapas, de la capa interna de la espora, pero con un arreglo ultraestructural distinto, observandose claramente las ultramicrofibrillas electrotransparentes a los electrones, embebidas en una matriz electrodensa. Es de gran importancia mencionar que, a partir de este punto, la capa interna presentó cavidades donde se alojan estructuras esféricas electrodensas, parecidas a bacterias.

e- En este nivel se observó el inicio de la espora.

Finalmente, el análisis de la comparación de la morfología ultraestructural de la pared de las hifas de los micelios externo e interno, sugiere la ocurrencia de cambios en la ultraestructura del hongo durante la colonización, si se considera la MA desde su origen, el punto inicial la espora es la mas compleja; su pared celular es gruesa, constituida basicamente por quitina integrada en microfibrillas electrotransparentes embebidas en un material electrodenso (la quitosana) y organizadas según diferentes modelos de tipo tridimensional. Las hifas del micelio externo tienen paredes menos gruesas con ultraestructura compleja, pero en menor grado que la espora, donde la quitina sigue siendo el componente fundamental. Una vez dentro de la raíz, las hifas intracelulares no ramificadas, (micelio interno) muestran una pared con estructura de tipo fibrilar laxa y mucho más delgada y, en los arbusculos (hifas muy ramificadas) la pared se adelgaza aún mas (50 nm) y se pierde la forma fibrilar para pasar a una amorfa. La ultraestructura de la pared muestra que el grado de complejidad, se relaciona con la función del componente micorrízico : esporas con la pared mas compleja, hifas del micelio interno no ramificadas y, con la menor complejidad, las hifas ramificadas de los arbusculos.

Los cortes oblicuos de las esporas mostraron el arreglo de la capa interna constituida por 4 subcapas, las dos centrales con sus ultramicrofibrillas electró-transparentes en un arreglo helicoidal arqueado (75,000 X). Este arreglo ultraestructural, pertenece al género *Glomus*. No obstante, el orden o arreglo de las subcapas, que

da una "huella dactilar o Finger Print" de la capa interna, mostró ser diferente a lo hasta ahora conocido en la literatura por lo que, probablemente, se trate de una nueva especie. Estas observaciones contribuyen al conocimiento de las especies del género *Glomus* con modelo helicoidal o arqueado. Este modelo ultraestructural de la pared de las esporas, es el que aleja al aislado fúngico, objeto de este estudio, de la especie *mosseae*.

Creo que el aislamiento de la especie nueva
 cubre 1 a 1 1/2 horas en el cultivo.

II.- INTRODUCCIÓN.

La clasificación de los hongos arbusculares dentro del orden Glomales (Morton y Benny, 1990) está basada, principalmente, en la estructura de la pared de las esporas en estado de dormancia observada con microscopía óptica. Este orden consiste de tres familias: Glomaceae, Acaulosporaceae y Gigasporaceae. La Glomaceae es la más grande e incluye los géneros *Glomus* y *Sclerocystis*. Estos géneros forman esporas asexuales grandes, con una estructura y modo de germinación simple (Mosse y Bowen, 1968; Hall y Fish, 1979; Mosse, 1980; Schenck, 1982; Berch y Koske, 1986; Morton, 1986; Walker, 1983 y 1986; Schenck y Pérez, 1987). No obstante, esta relativa simplicidad ofrece dificultades en la interpretación de las capas de la pared de las esporas, a nivel de microscopía de luz, ya que la interferencia óptica puede crear artefactos que pueden dar la apariencia de una pared laminar cuando, en realidad, no lo es (Walker, 1986). El grado de cohesión de la pared de las esporas y la extensión de cada una de ellas es muy difícil de discernir, debido a que la pared está constituida de capas o láminas, separables o no, muy difícil de observar con el microscopio óptico o de luz (Simon et al., 1993; y Millery Jeffries, 1994). Además, las características pueden depender, en gran medida, de la edad de la espóra, la tasa de desarrollo, las condiciones bajo las cuales las esporas fueron colocadas para su observación, la intensidad, el modo en que incide la luz sobre ellas así como, también, de la cantidad y calidad del medio de inclusión (Benjamin, 1979; Mosse, 1986; y Betivenga y Morton, 1993). El incremento en el poder resolutivo que se alcanza con el microscopio electrónico (1000 veces mayor que el microscopio óptico o de luz, ML) puede vencer estos problemas y revelar detalles ultraestructurales que son imposibles de obtener con las técnicas convencionales para el ML. (Gripiolo, 1984; y Mosse, 1986).

Glomus es considerado como un género polifilético (Walker, 1992) por lo que es necesario revisar, en detalle y a profundidad, sus conceptos taxonómicos. Los estudios ultraestructurales de especies

de *Glomus* realizadas por Bonfante-Fasolo y Vian; 1984, Gibson, 1985; Bonfante-Fasolo y Schubert, 1987; Yao, Pegler y Young, 1992, y Miller y Jefries, 1994, han tenido gran importancia en el conocimiento de la estructura de la pared de las esporas en este género (Schenck y Pérez, 1990; y Morton, 1990). Sin embargo, son necesarios mucho más estudios para comprender la complejidad de la arquitectura en detalle y del mural de la pared de este género. Por ejemplo, en varias especies, se ha observado un arreglo helicoidal de microfibrillas dentro de las láminas internas de la pared de la espora (Bonfante-Fasolo y Vian, 1984; Miller y Jeffries, 1994). En otras especies, este arreglo helicoidal no es evidente (Yao et al., 1992) lo que sugiere que la arquitectura de la pared difiere significativamente entre los géneros. (Mosse, 1986)

La microscopía electrónica, especialmente cuando se encuentra vinculada a estudios bioquímicos, puede resultar muy útil para mostrar las relaciones filogenéticas. (Reynold y Taylor, 1993; y Simon et al., 1993). A un nivel puramente estructural, se ha revelado una mayor complejidad estructural de la pared que la que se observa con microscopía óptica. Aunque, obviamente las paredes que, aparentemente, son factibles de estudiarse con microscopía óptica, tienen algunas contrapartes ultraestructurales que solo pueden ser resueltas tanto con microscopía electrónica de transmisión como con la de barrido. (Mosse, 1986; ; y Yao et al., 1992; y Palacios y Pérez, 1993).

Lo antes expuesto permite considerar el gran potencial que significa la microscopía electrónica, tanto de trasmisión como de barrido, no solo en la resolución de los problemas taxonómicos sino, además, para la investigación de las interrelaciones de estos hongos con las plantas y con otros microorganismos del suelo.

III OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la morfología, estructura, ultraestructura y topografía de las paredes tanto de las esporas como del micelio, externo e interno, con el propósito de tratar de profundizar en la caracterización del aislado monospórico de un hongo endomicorrízico arbuscular.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Caracterizar morfológicamente los componentes del aislado micorrízico, al natural y en preparaciones fijas, de ejemplares completos, fragmentados ("Squash") y en cortes, con microscopía óptica y diferentes técnicas de iluminación.
- 2) Desarrollar métodos de manipulación y selección del material de estudio (esporocarpos, esporas, micelio externo y raíces colonizadas) para su observación con las técnicas de microscopía estereoscópica, óptica, electrónica de barrido y transmisión.
- 3) Conseguir una fijación a nivel ultraestructural e inclusión en resinas de los diferentes componentes del hongo arbuscular sin o con el mínimo de modificaciones en la ultramorfología de las paredes.
- 4) Lograr obtener cortes ultrafinos de esporas e hifas, a diferentes ángulos de inclinación, que permitan el estudio ultraestructural de la pared de estos componentes con MET.
- 5) Ensayar las técnica de MEB, con el fin de tratar de contribuir al conocimiento morfoestructural de los propágulos de este hongo.

IV Marco Teórico.

De las interacciones que ocurren entre los componentes vivos en cualquier ecosistema destacan, tanto por su incidencia cuantitativa como por su importancia cualitativa, las denominadas simbiosis (Cooke, 1977). En muchos casos, las simbiosis tienen lugar entre organismos autótrofos y heterótrofos, dentro de las cuales los dos tipos de organismos implicados se benefician mutuamente, por lo que se les denominó **simbiosis mutualistas** (Harley, 1969; Cooke, 1977). Dentro de éstas, las establecidas entre las plantas superiores y ciertos integrantes de la microbiota del suelo, desempeñan una función clave, tanto en ecosistemas naturales como en los modificados por el hombre (Janos 1980 y 1988); ya que los microorganismos implicados desarrollan actividades que repercuten en la **nutrición** de las plantas, como por ejemplo en la **captación de los nutrientes** que se solubilizan y difunden lentamente en el suelo (Gianinazzi *et al.*, 1983; Palacios *et al.*, 1986 y 1987; Smith *et al.*, 1994; Marschner *et al.*, 1994). A cambio, los *microorganismos heterótrofos* asociados, reciben de la planta **substratos carbonados**, así como un **nicho ecológico**. (Azcón y Barea, 1980; Gianinazzi y Gianinazzi, 1983; Le Tacon, 1985).

Entre las simbiosis mutualistas, implicadas en esta última actividad, destaca la que ocurren entre las raíces de las plantas vasculares y ciertos hongos del suelo, conocida con el nombre de endomicorriza arbuscular. En esta asociación, el hongo y la raíz forman un nuevo órgano (la micorriza) con una morfología propia y una fisiología particular (Plenchette, 1982; Hayman, 1983; Janos, 1988; Marschner y Dell, 1994). Se sabe que las hifas del hongo se desarrollan en la raíz y emergen de ella desempeñando un papel importante en la absorción y traslocación de los iones fosfato hacia la planta, (Hayman, 1980 y 1983; Palacios *et al.*, 1986 y 1987; y Sylvia, 1992;) por lo que, en suelos con un contenido bajo de fósforo asimilable (como es frecuente en la mayoría de los suelos agrícolas) las **endomicorrizas** representan una contribución fundamental para la

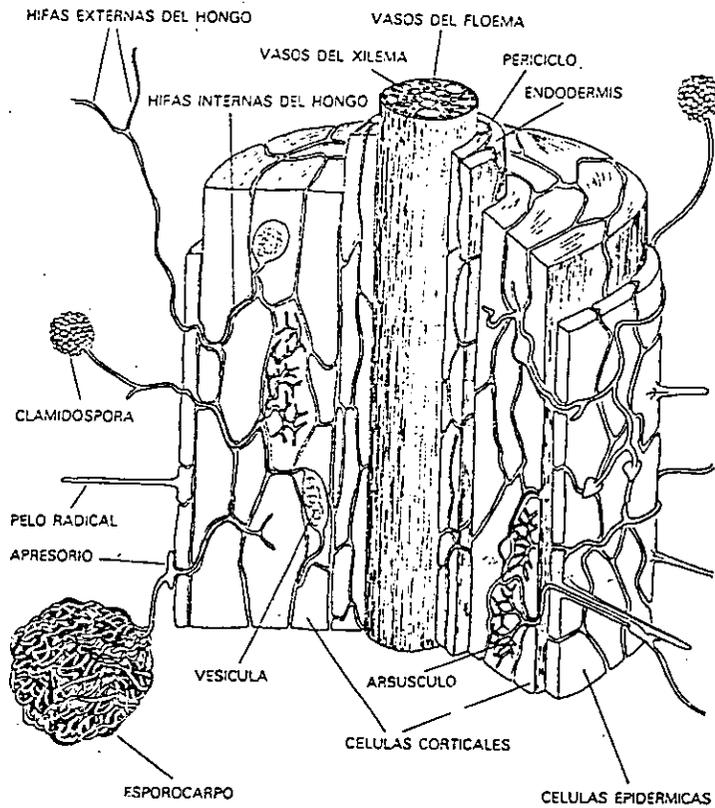
economía **nutricional de la planta**. (Azcón y Barea, 1980, Hayman, 1980 y 1983; Abbott y Robson, 1984; Graham, 1983; Pacovsky y Fuller, 1986; Manjunath y Habte, 1988; Marschner y Dell, 1994; y Smith et al., 1994).

Las *endomycorrizas* han sido tan importantes en el desarrollo de los vegetales superiores, que se han encontrado vestigios de ellas en plantas que existieron hace tres millones de años, (Azcón y Barea, 1980; Harley y Smith, 1983; y Le Tacon, 1985). Parece ser que tienen un origen común a partir del cual han coevolucionado. Kidston y Lang, al observar el famoso fósil de *Rhinia*, encontraron endomicorriza arbuscular. (Harley, 1969; Chaloner, 1970; Nicolson, 1975; Pyrozinski and Malloch, 1975).

1.0 La Endomicorriza Arbuscular (MA).

La MA tiene tres importantes componentes: (1) la raíz; (2) las estructuras del hongo en los espacios intercelulares y en el interior de las células de la raíz; y (3) un micelio externo en el suelo que sustenta esporas (fig. 1) (Azcón y Barea, 1980; Carling y Brown, 1982; Harley y Smith 1983; Le Tacon, 1985; Syeverding, 1991 y Sylvia, 1992).

Gerdemann (1971); Azcón y Barea (1980); y Le Tacon (1985); mencionan que los hongos endomicorrízicos arbusculares son constituyentes esenciales de la microbiota natural del suelo y, probablemente, colonicen mas tejido vegetal que cualquier otro tipo fungal (Trappe, 1987). Su abundancia y su influencia en la nutrición y crecimiento de las plantas es de gran trascendencia fisiológica y ecológica para el buen funcionamiento y estabilidad de las comunidades vegetales (Mosse, 1981; Hayman, 1983; Trappe, 1987; Janos, 1988; Sieverding, 1991; Abbott and Gazey, 1994; y Jeffries y Barea, 1994).



(Fig. 1) Esquema tomado de Azcon y Barea, 1980

1.1 Morfología de la colonización.

Las esporas, las hifas del hongo en el suelo (micelio externo) y los fragmentos de raíz colonizada con estructuras fungales constituyen el inóculo (propágulos), a través del cual los hongos pueden empezar la colonización de la raíz de una planta hospedera. (Mosse, 1953; Gedermann, 1968; Azcón y Barea, 1980; Harley y Smith, 1983; y Bowen, 1987).

Aunque los modelos de colonización varían, dependiendo de las especies de hongo y planta implicados, la colonización de la corteza radical por un hongo arbuscular transcurre, generalmente, de acuerdo

con el modelo de Harley y Smith (1983); Bonfante (1984); y González (1996) de la siguiente manera: durante la germinación de la espora el tubo de germinación que se forma y que presenta quimiotactismo positivo hacia las raíces el cual, al hacer contacto con la raíz, forma un apresorio en la superficie de la misma del cual emergen las hifas de penetración que se extienden y avanzan por entre las células de la epidermis, o a través de ellas, hacia la corteza de la raíz. En la zona más externa de ésta el hongo, frecuentemente, forma "ovillos" intracelulares (formaciones no ramificadas) que llenan el lumen de la célula. La hifa invasora alcanza la corteza media a través de los espacios intercelulares o por el paso de célula a célula para, posteriormente, ramificarse y crecer longitudinalmente, dilatando los espacios intercelulares (Scannerini y Bonfante, 1983; Abbott y Robson, 1984 b; y González 1996). Cuando el hongo ha alcanzado la corteza interna, continúa desarrollándose longitudinalmente y emite frecuentes ramificaciones laterales, algunas de las cuales penetran intracelularmente para dar lugar a los arbusculos mediante una ramificación dicotómica repetida. En un estadio posterior, se forman las vesículas. Éstas pueden ser intercaladas o terminales, e inter o intracelulares. El crecimiento del hongo fuera de la raíz y en el suelo de la rizosfera, constituye la estructura del hongo llamado micelio externo que se desarrolla paralelamente al desarrollo interno. En general, el micelio joven en las raíces no está septado y consiste de ramificaciones dicotómicas de hifas delgadas y otras gruesas de 1 a 5, y de 5 a 15 μ de diámetro, respectivamente. (Harley y Smith, 1983 ; y González, 1996).

En cuanto a la organización citológica del hongo, las hifas intercelulares poseen pequeños núcleos, mitocondrias y grandes vacuolas. Generalmente, contienen gránulos de polifosfatos, gotas de lípidos y glucógeno y, en algunos casos, "organelos semejantes a bacterias" de función aún no establecida. (Bonfante et al. , 1987).

1.1.2 Estructuras reproductivas.

Los HMA producen esporas resistentes, a partir del micelio externo. Éstas pueden formarse de la tercera a la cuarta semanas después de iniciada la colonización de la raíz pero, en algunas especies, pueden tardar en formarse hasta 6 meses. La esporulación del hongo es un proceso dinámico, ya que mientras algunas esporas se están formando, otras pueden estar germinando y colonizando otras raíces. Las esporas pueden sobrevivir por varios años en el suelo; en cambio, la capacidad colonizadora del micelio (separado de la planta hospedera o después de haber muerto ella) es de 2 a 4 semanas, aproximadamente. (Abbott y Robson, 1977 a, 1979, 1984 b; Tommerup, 1983, 1984 y 1985; Azcón, et al., 1986; Aguilar, et al., 1986; An y Hendrix, 1988; Sieverding, 1991; Abbott y Gazey, 1994).

1.1.2.3 Historia.

El interés por el estudio de la endomicorriza arbuscular ha crecido notablemente en las dos últimas décadas, lo que ha permitido un incremento de información en diversas disciplinas y tópicos como por ejemplo: en la Agricultura, Ecología, Evolución, y Taxonomía, entre otros. Siendo su papel, en este último, de gran importancia, pero el menos desarrollado por su alta complejidad. Estos hongos han sido observados durante los últimos 100 años, pero no ha sido sino hasta los últimos 10 años, cuando ha sido importante el avance en el conocimiento de su estructura y ultraestructura (Mosse, 1986).

Barbara Mosse (1953) en Inglaterra y Jim Gerdemann en Illinois (1955) descubrieron las esporas de estos hongos e iniciaron el desarrollo de las herramientas necesarias, en la biotecnología de recuperación, multiplicación y mantenimiento de estos hongos. Los resultados de esta biotecnología determinaron los numerosos beneficios que estos hongos dan a las plantas, y su valor potencial para la agricultura, la recuperación de la estabilidad y fertilidad

del suelo y el restablecimiento del equilibrio ecológico. Después de estos estudios empezaron a surgir numerosas especies nuevas en la literatura que apoyaban los resultados de estos autores, pero muchas de estas nuevas especies no tenían una clara identificación taxonómica. La Taxonomía de estos hongos empieza su desarrollo a partir de los últimos 25 años, Gerdermann y Trappe (1974) describieron 30 especies de hongos en el género que producía endomicorriza arbuscular (antes vesículo-arbuscular). Trappe (1982) en una clave sinóptica de los Endogonaceae (familia que, actualmente ha sido sustituida por tres) describió 77 especies y elimina al género *Endogone*. Posteriormente, Hall (1984) en su clave dicotómica enlistó 67 especies y, también, excluye a *Endogone*.

2.0 Clasificación.

2.1 Taxonomía de los Hongos Endomicorrízicos Arbusculares (HMA).

Innumerables estudios se han realizado (como ya se ha mencionado anteriormente) sobre la simbiosis endomicorrízica encaminados, principalmente, a los aspectos fisiológicos, dada la importancia que reviste su potencialidad como "fertilizantes biológicos". En cambio, son menos numerosos los trabajos que tratan sobre su taxonomía, quedando aún muchas dudas por esclarecer en cuanto a las relaciones e independencia específica de unas especies con otras. Desde 1809 Link, al describir el género *Endogone*, observó las estructuras intrarradicales de estos hongos, pero no supo el papel que estas desempeñaban ni como se formaban. En 1845, Tulasne y Tulasne describen el género *Glomus* y establecen dos especies *macrocarpus* y *microcarpus*. En 1885, Frank introduce el término "**micorriza**", definiéndolo como la asociación planta-hongo, y Thaxter, en 1922, fue el primero en realizar una monografía de la familia Endogonaceae, donde incluye *Endogone*, *Glaziella*, *Sclerocystis* y *Sphorocreas*. Pocos avances se tuvieron durante un período

considerable pero, desde que Gerdemann y Nicolson, en 1963, propusieron el método del tamizado y decantación en húmedo para la separación de esporas, se empezaron a tener grandes avances sobre la taxonomía. Mosse y Bowen, en 1968 publican una clave para la identificación taxonómica de esporas del tipo *Endogone*. En 1974 Gerdemann y Trappe, realizan la primera revisión de la Familia Endogonaceae, formadora de endomicorriza arbuscular, basándose en las características morfológicas y en la germinación. Estos autores presentaron los géneros: *Glomus*, *Endogone*, *Modicella* y *Sclerocystis*, y describen los géneros *Acaulospora* y *Gigaspora*, dando un total de 43 especies, ubicándolas en el orden Mucorales y en la clase de los Zygomycetes (Mosse, 1953; Gerdemann y Trappe, 1975). Ames y Schneider (1979) encontraron un nuevo género en la familia al que denominaron *Entrophospora*. En 1986, Walker y Sanders hacen la separación de los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*, basándose en las diferencias de la germinación de las esporas y en la presencia de un escudo en la pared de estas últimas. En 1987, Schenck y Pérez realizan una compilación y presentan seis géneros formadores de micorriza vesículo-arbuscular con un total de 122 especies. Posteriormente, en 1988, Berch resume la descripción de 125 especies y Morton de 126. Finalmente, en 1990, Morton y Benny proponen el nombre de endomicorriza arbuscular, considerando las 126 especies, ya que todas son capaces de formar arbusculos, y proponen el siguiente **arreglo taxonomico**:

- Orden: *Glomales* (Morton y Benny)
 - Suborden: *Glomineae* (Morton y Benny)
 - Familia: *Glomaceae* (Pirozynski y Dalpé)
 - Género: *Glomus* (Tulasne y Tulasne)
 - Género: *Sclerocystis* (Berkeley y Broomey Almeida y Schenck)
 - Familia: *Acaulosporaceae* (Morton y Benny)
 - Género: *Acaulospora* (Gerdemann y Trappe y Berch)
 - Género: *Entrophospora* (Ames y Schneider)
 - Suborden: *Gigasporineae* (Morton y Benny)
 - Familia: *Gigasporaceae* (Morton y Benny)
 - Género: *Gigaspora* (Gerdemann y Trappe y Walker y Sanders)
 - Género *Scutellospora* (Walker y Sanders)

La clasificación involucra el arreglo de organismos similares dentro de taxa (grupos taxonómicos) de acuerdo con las características relacionadas con el desarrollo (Ontogenia) y la evolución (Filogenia); Morton, (1990).

2.1.2 Conceptos taxonómicos.

Los conceptos usados en la taxonomía de los Glomales están basados en la morfología de las esporas la cual tiene una gran importancia para identificar las especies, como por ejemplo: el tamaño, forma, color, estructura basal (incluyendo modo de oclusión) ornamentación, y estructura de la pared o capas de la pared. El estudio de la estructura de la pared de los hongos ha sido muy importante en los últimos 15 años. Diferentes tipos de paredes han sido descritos en detalle (Berch y Koske, 1986; Morton, 1986; Walker, 1983 y 1986) encontrándose que el número de capas o láminas en las paredes y su posición tienen una gran significancia en la designación de la especie. El uso de la estructura de la pared ha incrementado su valor para la separación de taxas a niveles supra-específicos. Éstos son usados para estudios ontogénicos que ayudan en la determinación de la diferente naturaleza de las esporas dentro de los Glomales.

Algunos problemas taxonómicos relacionados con los Glomales, han sido recientemente revisados (Walker, 1992; Bentivenga y Morton, 1993). La incertidumbre acerca de cual o cuales estructuras deben ser consideradas como los caracteres taxonómicos mas importantes aún es un problema en la sistemática de los glomales. La introducción de caracteres moleculares ha sido útil pero las técnicas no han cambiado los conceptos taxonómicos actuales (Simon et al., 1993). No obstante, hay una evidencia clara del progreso que se ha alcanzado con las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tanto taxas inter como intraespecíficos, aparentemente, han sido identificadas a través del polimorfismo del ADN detectados con el uso de "primers" cortos y arbitrarios (Wyss y Bonfante, 1993).

2.1.2.3 Características de la pared de las esporas.

La carencia de conocimientos sobre la homología de las estructuras morfológicas es, particularmente, relevante para la identificación de las estructuras de la pared. La microscopía electrónica comparativa es útil para la evaluación de tales caracteres morfológicos. Se han observado diferencias en las estructuras de la pared entre unas especies que encajan o corresponden con la descripción de *Glomus intrarradices* (De Assateague Island, USA) y *G. geosporum* (de Kent, UK). Bajo el microscopio óptico, la pared pigmentada y laminada de *G. intrarradices*, se separa en varias capas de la pared cuando se quiebra o tritura (se han encontrado más de 5), mientras que la de *G. geosporum*, a menudo, no se separan o lo hace en solamente dos capas. Las dos paredes tienen, evidentemente, diferente estructura y pueden no representar estructuras homólogas. La microscopía electrónica de transmisión revela la estructura alternante de las capas electron-densas y electron-traslúcidas en la espora del tipo de *G. intrarradices*, pero solamente la capa electrón-traslúcida se ve en *G. geosporum*. La capa electrón-traslúcida consiste de microfibrillas arqueadas (Miller y Jeffrias, 1994), como se describió en *Glomus epigaeum* (Bonfante-Fasolo y Grippiolo, 1984). La capa electrón-densa no parece tener tal estructura organizada, y ésta puede reflejar la línea de fractura observada bajo el microscopio óptico. No obstante, se requieren más estudios estructurales para evaluar las homologías estructurales de la pared.

2.1.2.3.4 Identificación de las esporas.

El concepto usado en la taxonomía de los Glomales esta basado en la morfología de las esporas, con criterios que permiten delimitar la especie como son: tamaño, forma, color, estructura basal, modo de germinación, ornamentación, estructura y ultraestructura de la pared o número de capas (Rosendahl, et al., 1994).

(1) **Talla y forma.** Las esporas son, generalmente, esféricas u ovoides; su talla puede ser, en algunas especies, de 50 micrómetros o menos de diámetro; en *Glomus microcarpus* de 100 a 200 micrómetros o más; en *Glomus mosseae*, *Gigaspora calospora* y *Glomus caledonius* de 200 y hasta de 400 micrómetros en *Gigaspora margarita*, llegando a cerca de 1 mm en algunas especies de este género.

(2) **Color.** Este puede ser determinado bajo un microscopio de disección con luz incidente ya que, bajo luz transmitida, la densidad del contenido de algunas esporas es pálido, o no transparente, por ejemplo, la espora blanca de *Gigaspora margarita* puede parecer negra. Entre los colores más comunes están: el gris, amarillo pálido, amarillo pardo, rojo pardo, verde pardoso, negro, pardo, miel y ámbar.

(3) **La unión a la hifa.** Puede ser simple (como en *Glomus* y *Sclerocystis*), bulbosa (como en *Gigaspora*) o ausente (como en *Acaulospora*).

(4) **Estructura citoplasmática.** Hay dos categorías la reticulada (red de citoplasma que envuelve a vacuolas pequeñas) y la vacuolada (cuando el citoplasma contiene grandes vacuolas amarillas como en *G. mosseae* que, al final, se unen para formar una grande; Mosse y Bowen (1968 a).

(5) **Grosor de la pared y el número y tipos de capas presentes.** Generalmente, hay una capa fina exterior blanca, y una gruesa quitinosa en el interior de la pared de la espora; por ejemplo, *Glomus mosseae* y *Glomus fasciculatum*, tienen una pared simple (Walker, 1986). Los tipos reticulados, generalmente, tienen la pared delgada, blanca y membranosa, Gerdemann y Trappe (1974).

(6) **Modo de germinación.** En los tipos vacuolados, generalmente, se forma un tubo de germinación que emerge a través de la hifa principal. En el tipo reticular, se pueden formar diferentes tubos

de germinación que emergen a través del costado de la espora, Mosse y Bowen (1968).

(7) **Esporas secundarias.** Éstas son pequeñas, lisas o espinosas; se forman aisladas o en racimos, o arregladas en espiral consideradas, algunas veces, vesículas externas o células auxiliares.

(8) **Esporocarpos.** Son formados por algunas especies. En *Glomus mosseae* alcanzan dimensiones menores a 1 mm de diámetro, con una pared externa formada por hifas entretrejidas y flojas, encerrando de 3 a 12 clamidosporas irregularmente arregladas. En algunas regiones templadas y/o tropicales pueden llegar a medir hasta 1 cm o más de diámetro, y pueden contener hasta 100 esporas embebidas en una matriz. En *Sclerocystis rubiformis*, los esporocarpos son pequeños (de alrededor de 300 a 500 micrómetros), carentes de pared exterior, sus esporas están arregladas a manera de un fruto de frambuesa.

Distinguishing the Genera

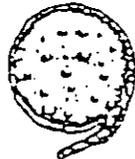
G L O M U S

CHLAMYDOSPORES

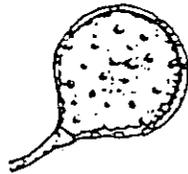
Hyphal Attachments



straight

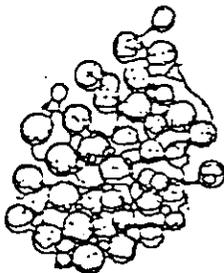


recurved

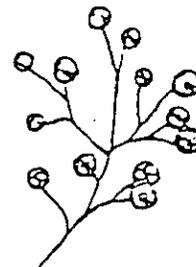


funnel

SPOROCARP



AUXILIARY CELLS



Esquema tomado de Sckenck y Pérez, (1991)

3.0 Microscopía Electrónica de HMA.

La aplicación de la microscopía electrónica en el estudio de estos microorganismos se ha incrementando en los últimos 15 años, particularmente para la descripción y estudio de numerosas especies. Más recientemente, la MET ha sido empleada para la identificación de ciertos constituyentes químicos presentes en esta asociación. El mayor reto en microscopía electrónica, es la preservación inicial de las características ultraestructurales de este sistema viviente, y la retención de éstas a través de la secuencia de los preparativos, muy particulares, que se requieren para la investigación microscópica de estos microorganismos. La siguiente discusión provee un panorama general de los factores principales involucrados en la preparación de especímenes endomicorrízicos, para microscopía electrónica de transmisión (MET), microscopía electrónica de barrido (MEB) y ciertos procedimientos analíticos empleados para estudios a nivel ultraestructural.

3.1 Microscopía Electrónica de Transmisión.

Las micorrizas se encuentran colocadas, entre las entidades biológicas más difíciles en la preparación completa para MET. El tejido del huésped es altamente vacuolado, y la presión osmótica es crítica y muy sensible en todos los componentes del hongo, cuyo citoplasma es denso y pueden estar agregadas en tejidos compactos, o localizados dentro de las vacuolas de la célula huésped. Para lograr una preservación óptima de ambos organismos, puede requerir un verdadero compromiso en el establecimiento de un apropiado preparativo del procedimiento, e igualmente requiere de pruebas de extremo cuidado en cada fase del protocolo. No obstante, todos los procedimientos básicos empleados para el estudio de las micorrizas son similares a los usados para otros materiales biológicos (Glauver, 1975; y Hayat, 1970) como son: recolección de la muestra, fijación, deshidratación, e inclusión; sin embargo, la metodología deberá

adecuarse a los objetivos específicos de cada estudio.

a) Preservación del espécimen. - El paso inicial es la preservación del citoplasma, lo más parecido a su estado viviente, de manera que se garantice el mínimo de daños y cambios en la estructura dentro de la raíz tanto en el interior de ésta como en el hongo a nivel ultraestructural evitando, tanto como sea posible, la autólisis. Las raíces pueden ser lavadas con agua a 0° C, desde el inicio de su preparación ya que, a éstas, se les debe eliminar completamente las partículas del sustrato original donde se encontraban, para evitar interferencias cuando se proceda a la ultramicrotomía. Después del lavado, las raíces son colocadas inmediatamente en el fijador y cortadas en fragmentos pequeños que no excedan un milímetro. El uso de fragmentos pequeños permite una más rápida difusión, tanto de los fijadores como de los deshidratadores, cuando la micorriza es muy compacta y dura.

b) Técnicas de Fijación. - La fijación es el paso más importante en el protocolo para los estudios por MET. La calidad de la fijación es influenciada grandemente por numerosos factores como: el tipo, concentración, pH, y temperatura del fijador usado, y la molaridad del buffer. Estas variables pueden ser definidas experimentalmente hasta conseguir el procedimiento de fijación óptimo para toda la micorriza. En muchos estudios de micorrizas se emplea el glutaraldehído, en concentraciones de 1-6% en un buffer de fosfato o cacodilato que puede variar de 0.05 a 0.1M a pH 6.8 a 7.4, como fijación inicial (Scannerini y Bonfante, 1979; Bonfante y Pearson, 1979; Dexheimer, Gianinazzi y Pearson 1979; Nylund, 1980; Peterson, Mueller y Englander, 1980; Strullu y Gourret, 1981; y Sward, 1981). La fijación generalmente se realiza a 4°C, durante un período de 1 a 4 hrs y es seguida de una pos-fijación durante 1 a 4 hrs, también a 4°C, adicionando OsO₄ en concentraciones de 1 a 2% al mismo buffer usado en el aldehído.

Es muy difícil lograr la penetración de los fijadores en las raíces micorrizadas. Además, debido a que muchas de las estructuras de interés, se encuentran en la parte profunda del tejido radical, tanto la tasa de penetración del fijador como el tiempo y estabilización del citoplasma son muy importantes para la selección del fijador inicial que será usado. Así por ejemplo, el glutaraldehído estabiliza rápidamente el citoplasma, pero este fijador penetra lentamente en el tejido, incrementando la posibilidad de que se presente una alteración ultraestructural antes de que el fijador estabilice el tejido. El glutaraldehído ha sido usado efectivamente en combinación con otros aldehídos, como por ejemplo el formaldehído y la acroleína, que penetran el tejido más rápidamente (Debaud, Pepin y Bruchet, 1981; y Sward, 1981). El objetivo de combinar los fijadores aldehídicos es el de adquirir una estabilización parcial pero rápida de los componentes citoplasmáticos, que se logra con el formaldehído o la acroleína, y una fijación completa con el glutaraldehído. Los resultados de la fijación con formaldehído-glutaraldehído son buenos; siempre y cuando el formaldehído sea preparado con paraformaldehído antes de ser usado. Además de la combinación de aldehídos, la mezcla de glutaraldehído-OsO₄ ha sido usada como fijador inicial para la micorriza (Carling, White y Brown, 1977; y Holley y Peterson, 1979). Simultáneamente, la fijación con glutaraldehído-OsO₄, seguida por una pos-fijación con OsO₄ (Carling, White y Brown, 1977) ha dado una excelente preservación de las micorrizas en soya; sin embargo, con las micorrizas de otras plantas no se ha corrido con la misma suerte, por lo que se requiere de mayor experimentación.

c) Deshidratación.- Consiste en la eliminación del agua rápidamente con la mínima extracción de componentes citoplasmáticos. Las acetonas y los alcoholes pueden ser usados para este propósito, sin embargo, son más recomendables las acetonas debido a que causan menos contracción y, son miscibles con las resinas epóxicas usadas

para la inclusión.

d) Infiltración e Inclusión.- Se han usado muchos medios diferentes para la inclusión de raíces micorrizadas y esporas en resinas, entre otros, están los siguientes: Durcopan, Epon (Epikote) 812, mezcla de Epon-Araldita, Vestopal y el Spurr's. La micorriza es muy difícil de infiltrar completamente con resinas, por esta razón, la fórmula deberá usarse con componentes de bajo peso molecular y viscosidad. Una de las más recomendables es la Spurr's (Spurr, 1969) por sus buenos resultados, debido a que es una resina de baja viscosidad y muy buena infiltración. No obstante, hay dos problemas con el "medio Spurr's" que merecen ser considerados: (1) se pueden tener problemas con el seccionado, a menos que se tomen las precauciones adecuadas para proteger la resina no polimerizada de la humedad atmosférica y de exposiciones prolongadas en las soluciones de uranilo y plomo, a diferencia de otros medios de inclusión que se utilizan para alcanzar una intensidad de contraste comparable; y (2) la infiltración de las resinas puede mejorarse usando un vacío moderado o, preferiblemente, con exposiciones más prolongadas en cada mezcla de solvente-resina, rotando las muestras de manera lenta (1-2 rpm), pero continuamente durante la secuencia de infiltración. Para la infiltración de las esporas de hongos endomicorrízicos arbusculares, ha sido necesario perforar la pared de éstas con una microaguja (Mosse, 1986) o tratarlas con hipoclorito de sodio antes de fijarlas (Sward, 1981). No obstante, estas estructuras de resistencia son muy difíciles de infiltrar, inclusive con la resina "Spurr's".

3.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

El microscopio de barrido, por su gran poder de aumento y enorme resolución, es de gran utilidad para estudiar la morfología de superficies, por lo que puede ser de gran aplicación, para el estudio de la naturaleza y morfología de las estructuras, externas e internas, de la **micorriza arbuscular (MA)**. El primer requisito para lograr una alta calidad en un estudio con el MEB, es haber logrado una muy buena preservación de los ejemplares. Muchas de las consideraciones discutidas en relación con el MET, también se aplican a la preparación para el MEB. Sin embargo, la preparación de los ejemplares para el MEB difiere en varios aspectos con relación a los procedimientos para MET. Generalmente, los ejemplares para estudio en el MEB son más grandes y, por consiguiente, requieren más tiempo de exposición en la solución fijadora y deshidratadora. Los ejemplares preparados sin una previa infiltración, en un medio de soporte, para ser examinados en el microscopio, deberán estar absolutamente secos para lograr una alta calidad de imagen. Por esta razón, el agua que contienen las muestras fijadas debe ser extraída, es decir, los ejemplares deben ser sometidos a deshidratación por un procedimiento llamado punto crítico que previene alteraciones morfológicas. En adición a lo anterior, los ejemplares deberán ser cubiertos con un material eléctricamente conductor antes de ser examinados al microscopio (Brown y Brotzman, 1979; Postek et al., 1980; Goldstein et al., 1981; y Palacios y Pérez, 1993).

a) Procedimientos de Fijación. - Los mismos fijadores usados para el MET son, también, empleados para la preparación de las muestras para los estudios con el MEB. Sin embargo, los períodos de fijación se extienden por varias horas o varios días con el propósito de obtener la máxima estabilización de las muestras. Los ejemplares pueden ser fijados con aldehídos solamente (Seviour et al., 1978; y Debaud et al., 1981), o pueden ser, también, pos-fijados con OsO_4 (Bonfante-Fasolo y Person, 1979; Holley y Peterson, 1979; y Strullu,

1979). El uso de los fijadores aldehídicos, particularmente formaldehído o acroleína con glutaraldehído, son preferidos para las muestras seccionadas y para observar la estructura interna. La extensión de una pos-fijación (de 12 a 48 hrs a 4°C) en muchos casos, es necesaria para la preparación, en vista de que sustancialmente endurece el ejemplar haciéndolo menos susceptible a los artificios durante el secado y, simultaneamente, incrementa su conductibilidad eléctrica (Murphy, 1978; y Brown y Brotzman, 1979).

b) Técnica para la obtención de cortes. - El examen interno de las estructuras micorrízicas, puede lograrse en especímenes fijados y cortados con una hoja de navaja de afeitar filosa, antes de su deshidratación o de que hayan sido colocados en alguna de las soluciones deshidratadoras. Las muestras fijadas en OsO₄, son más estables para el seccionamiento manual, en vista de que las estructuras de la MA son razonablemente más duras, por lo que pueden ser seccionadas con menor riesgo a la trituración o distorsión que el tejido huésped (raíz). Los materiales fijados con aldehídos son, a menudo, enteramente blandos pero pueden ser seccionados con buen resultado usando un microtomo de congelación (Rose, Dyke y Davey, 1981). También pueden ser fracturados en frío en etanol absoluto o acetona, después de que han sido deshidratados. Los arbuscúlos de la micorriza pueden ser expuestos para su observación en el MEB, aplicando el tratamiento para muestras seccionadas y usando los reactivos que remueven el citoplasma del huésped (Kinder y Brown, 1975; y King, Schubert y Brown, 1981).

c) Deshidratación y secado a punto crítico. - La mayor parte de los estudios de la asociación micorrízica por MEB, han sido realizados con muestras que han sido secadas a punto crítico. Este procedimiento de secado evita los efectos del estrés por tensión superficial, que se asocian con otros métodos de secado que producen alteraciones estructurales en la morfología de la superficie. La

deshidratación debe efectuarse perfectamente bien en toda la estructura, antes del secado a punto crítico; ésta puede realizarse con etanol o acetona de manera similar a como se usa para MET, en este caso, se sugiere aplicar concentraciones crecientes de etanol (de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96 y 100%) durante un período de 30 a 40 minutos de intervalo en cada cambio. Para minimizar los daños de la deshidratación se recomienda nunca dejar secar las muestras entre cambio y cambio, y realizar 2 a 3 lavados con la próxima solución de la secuencia. Una vez deshidratado el espécimen, debe colocarse en la cámara de secado de punto crítico debiendo estar inmerso, bajo presión, en CO₂ líquido u otro freon. El CO₂ líquido es el mas frecuentemente usado debido a que este es mas económico, fácilmente disponible y misible en acetona o etanol. Antiguamente, en vez de estos deshidratantes se usaba acetato de amilo antes de exponerlo al CO₂ líquido. Ahora se sabe que se logra una mejor preparación, es ausencia del acetato de amilo.

d) **Montaje de especímenes para MEB.**

Para fijar muestras o realizar el montaje de especímenes, generalmente, se recomiendan adhesivos líquidos conductores de la electricidad. Sin embargo, las muestras secadas absorben los solventes utilizados con estos adhesivos, los cuales distorcionan las muestras en forma directamente proporcional a su grado de secamiento. Se ha encontrado que la cinta adhesiva protegida con papel de estaño (la cual se puede obtener de los proveedores de materiales para MEYB) es un medio mas satisfactorio para sostener especímenes secos en las montaduras respectivas. La cinta adhesiva, que tiene un papel protector sobre la parte adherente, se corta en trozos no mayores que 1.5 veces del diámetro de la montura utilizada. Los extremos de la cinta se doblan hacia atrás, junto con el papel protector, de manera que la cara adhesiva de la cinta quede expuesta hacia arriba. Se desprende el papel de estaño en los extremos que fueron doblados y se fija la cinta firmemente en el lugar correspondiente de la

Mo's.
Taci
1900
Sais
cas. lo yab
obtener P y T
críticas.
(1200 psi y 39-41°C)

montura del espécimen. Se despega el papel protector del resto de la cinta y se coloca la muestra sobre la superficie adhesiva expuesta empleando, para ello, una aguja fina o unas pinzas apropiadas. Haciendo caso omiso de la técnica empleada, las muestras para MEB se cubren con una película delgada de carbón y/o un metal (pesado) a fin de proporcionar una conductividad eléctrica uniforme en todas partes de la superficie de la muestra. La mayoría de los microscopistas de barrido, en la actualidad, emplean técnicas de recubrimiento por rociado (o recubrimiento salpicado) con oro o aleaciones de oro para lograr este objetivo.

pu
S
ligo
como
es
mejor
que
la
palabra pesada

3.3 Microscopía electrónica analítica.

La microscopía electrónica analítica es una disciplina muy amplia, incluye todas las técnicas que proveen información relativa a la composición química y función celular; va más allá de la estructura subcelular, ya que estos estudios difieren de la descripción convencional. Estas técnicas son empleadas en procedimientos experimentales; cada una es designada para obtener una pequeña porción de la información relativa al espécimen. En consecuencia, un requerimiento del procedimiento analítico, es tener un control apropiado del espécimen examinado que garantice, que los resultados obtenidos con ese procedimiento sean confiables o seguros. Para cada objetivo a estudiar en el espécimen, es muy importante una adecuada preparación para lograr su preservación completa y la observación de la ultraestructura; este es un requerimiento ineludible de estos procedimientos para cualquier objetivo analítico. La aplicación de ciertas técnicas analíticas, para el estudio de las micorrizas significa un gran compromiso, ya la mayoría de los procedimientos fueron desarrollados para estudios muy específicos en tejidos de animales, por lo que no son aplicables para las micorrizas, si antes no se realizan las modificaciones pertinentes. Para seleccionar cualquier procedimiento analítico aplicable al estudio de las micorrizas, se deben consultar los métodos más recientes utilizados

para plantas. Estos métodos pueden encontrarse dentro de las áreas de la ultrahistoquímica, citoquímica enzimática y microanálisis de rayos-X.

3.4 Aportaciones recientes de la microscopía electrónica (ME) en el estudio de la micorriza arbuscular (MA).

Las micorrizas son un sistema muy complejo, formado por células pertenecientes a dos diferentes organismos eucariontes que se comunican y mantienen un continuo cambio bidireccional de nutrimentos (Harley, 1989). Desde los años ochentas, el estudio de la ultraestructura ha tenido un buen desarrollo experimental, enfocado al conocimiento de la compleja organización de las micorrizas, analizando la estructura celular de los dos simbioses (planta-hongo) así como el contacto de superficies (Scannerini y Bonfante, 1983). La ultraestructura ha proporcionado grandes detalles de información sobre las interacciones de célula a célula, y ha tenido gran importancia también para la clasificación de los HMA, sobre la base de sus rasgos morfológicos e, igualmente, ha ofrecido las primeras claves para el entendimiento del funcionamiento de la micorriza (intercambio planta-hongo) particularmente en la transferencia del fósforo, donde se sugiere que esta ocurre a nivel arbuscular, sobre la base de observaciones ultraestructurales. Para mediados de los ochentas, solamente los estudios ultraestructurales parecen haber sido superados por otras herramientas de investigación más poderosas tales como las que provienen de la biología molecular. Sin embargo, la introducción de criotécnicas y técnicas afines produjo un gran avance en el campo de la microscopía electrónica, creando un puente entre la morfología molecular y las observaciones bioquímicas. Estas técnicas fueron rápidamente aplicadas en el campo de las micorrizas, obteniéndose resultados nuevos sustanciales (Hall y Hawes, 1991).

Para el estudio de la MA, es muy importante la preservación de las células colonizadas del huésped, llenas de hifas intracelulares, en

forma enrollada o ramificada, que forman los arbusculos, y también de las hifas intercelulares presentes en el tejido radical del huésped. En esta asociación, las hifas intracelulares son rodeadas por el plasmalema del huésped (Gianinazzi, Gianinazzi y Smith, 1991; Bonfante et al., 1991 y Bonfante y Scannerini, 1992). No obstante, la preservación de las membranas del huésped y de los organelos del hongo es, a menudo, muy crítica en este tipo de preparaciones (Schenck, 1991; Hoch, 1991 y Robards, 1991). Las observaciones sobre la morfología son, aún, más limitadas en la organización de la pared. Constantemente, en la descripción del citoplasma se incluye un contenido rico en glóbulos lipídicos y vacuolas que contienen cuerpos electro densos (Bonfantw, 1978; Gianinazzi et al., 1981; Scanennerini y Bonfante, 1982; Bonfante y Vian, 1984; Mosse, 1986; y Miller y Jeffries, 1994). Los microanálisis de rayos X, muestran también que estos granos son ricos en fosfatos (White y Brown, 1979; Strullu et al., 1981; y Turnau et al., 1993). Los núcleos, mitocondrias, y sistemas membranosos no son, frecuentemente, muy bien preservados.

El desarrollo de criotécnicas basadas sobre criofijación y sobre preparación de microscopía electrónica por sustitución en frío, tienen una gran importancia en el estudio citológico, desde que Hoch (1991) declaró que su organización celular se mantiene en un estado muy similar a aquel inmediatamente anterior al congelado. Las criotécnicas se basan en el uso de un criogen para enfriar las muestras de los especímenes (-90°C) dentro de un medio líquido donde ha sido sustituida toda el agua de la célula por otro medio, que puede contener otro fijador químico, como puede ser el tetróxido de osmio en acetona (Hoch, 1991). Las muestras son infiltradas, a temperatura ambiente o a una más baja temperatura con resinas y polímeros. Estas técnicas han proporcionado información nueva sobre la citología del hongo y la planta (Hoch, 1991; y Robards, 1991). Las investigaciones más importantes en los últimos años han sido sobre los fijadores físicos en los procedimientos de sustitución en frío; en donde las muestras son colocadas en un sostén e, inmediatamente, enfriados a una alta presión (2000 bars a -180°C)

Mendgen et al., (1991). Siguiendo este procedimiento, las membranas así como la preservación de los organelos frágiles, como son los cuerpos de Golgi, son particularmente bien preservados, tanto de las células del hongo como de la planta (Welter et al., 1988). Estas técnicas han proporcionado información sustancial nueva. No obstante, la preservación de algunos especímenes no ha sido homogénea (Bonfante, 1994). Por ejemplo, el tubo de germinación de la espora de *Gigaspora margarita* contiene un citoplasma rico, con dos áreas que desempeñan diferente papel y que son identificables: la primera es rica en núcleos y en mitosis (Becard y Pfeffer, 1993), con un buen sistema de membranas que consisten de un retículo endoplásmico rugoso, con túbulos "ballon-like" equivalentes al aparato de Golgi, produciendo vesículas con un contenido electro denso; y la segunda área que puede ser descrita como un compartimiento de almacenaje, que contiene: i) gotas lipídicas limitadas por una semi-membrana; ii) cuerpos parecidos a proteínas dentro de vacuolas especializadas; y iii) acumulación de glucógeno.

Estas observaciones indican el intenso metabolismo que ocurre durante la germinación de las esporas (Bianciotto y Bonfante, 1993). El desarrollo de la estructura simbiótica principal del micelio germinativo está bajo el control del hongo y por los factores que afectan a la planta (Giovannetti et al., 1993). El uso de criotécnicas ha revelado información nueva en esta fase: como la riqueza del hongo en organelos, en los que se incluyen diminutas mitocondrias; el desarrollo de sistemas membranosos, elementos del citoesqueleto, y vacuolas ricas en contenidos granulares (Orlovich y Ashford, 1993). Mucha información reciente se ha obtenido también sobre la parte del huésped, como por ejemplo: los cuerpos de Golgi que se han observado rodeando las ramificaciones del hongo, asociados con ribosomas y membranas; los núcleos con cromatina dispersa que tienen una posición central (Berta et al., 1990; y Balestrini et al., 1992); la membrana interfase que es lisa y rodea estrechamente las ramificaciones de los arbusculos. Las criotécnicas han ofrecido evidencias convincentes de esta área como un espacio verdadero de, aproximadamente, 50-80 nm en grosor (Bonfante y Perotto, 1992; y

Bonfante, 1994). El desarrollo de técnicas afines basadas sobre la especificidad de uniones no covalentes entre moléculas como son: antígeno-anticuerpo; lectina-azúcar, y enzima-sustrato, han proporcionado información sobre la naturaleza de los componentes en la interfase. La estructura molecular identificada en la pared del hongo y dentro de la interfase el material de un número de plantas huéspedes (dico y monocotiledóneas) incluye polisacáridos, proteínas y glicoproteínas. La quitina es un componente constante del esqueleto de la pared del hongo, así como también lo es en las ramas más finas del arbúsculo. No obstante, las β 1-3 glucanas solamente se presentan en los HMA de los géneros *Glomus* y *Acaulospora*, ya que en *Gigaspora* y *Scutellospora*, no se presentan (Lambais y Medhy, 1993; y Gianinazzi-Pearson et al., 1994). Por otro lado, las pectinas, celulosa, hemicelulosa e hidroxiproteína-rica en glicoproteínas (HRGP) constantemente se presentan en el material interfásico.

V.0 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material Biológico Obtenido.

Las esporas utilizadas fueron obtenidas de un suelo calcimagnésico agrícola clasificado como *Phaeozem cacarico* (González, 1996; y Gama, 1997) de la localidad de Miacatlán, Edo de Morelos. El aislado se obtuvo en el Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la UNAM, utilizando como planta hospedera pasto "Rhodes grass" *Chloris gayana*, variedad "pioner".

5.1.2 Aislamiento de HMA.

El aislamiento del HMA se realizó utilizando el método de separación por tamizado en húmedo y decantado de Gederman y Nicolson (1963); y por centrifugación en gradiente de sacarosa de Daniels y Skipper, (1982). Una muestra homogénea de las esporas obtenidas fue tratada con bromuro de tetrazolio, para cuantificar su viabilidad de acuerdo a la técnica de An y Hendrix (1988). Posteriormente, las esporas viables fueron seleccionadas por sus características morfológicas, de acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente por microscopía óptica, utilizando un microscopio estereoscópico marca olimpus. Para la producción de inóculo, se utilizaron esporas viables y el método de Schenck (1982). Se inocularon plántulas hospederas obtenidas a partir de semillas desinfectadas previamente con hipoclorito de calcio Sieverding (1983).

5.1.2.3 Cultivos monospóricos de HMA.

El desarrollo del cultivo monospórico se llevó a cabo en condiciones asépticas en invernadero, utilizando como soporte suelo de la localidad combinado con arena sílica (1:1), ambos esterilizados. Para incrementar el efecto del hospedero sobre la esporulación del hongo se aplicó solución nutritiva Long Ashton con 1 ppm de fosfato, 1 vez por semana, y regando con agua de la llave

esterilizada cada tercer día, durante 4 meses, con un fotoperíodo de 10 hrs luz. Posteriormente, se realizaron las pruebas de aclareo y tinción por el método de Sieverding (1991) para seleccionar y corroborar el cultivo monospórico (Schenck, 1988 y González, 1996). El cultivo monospórico seleccionado alcanzó un porcentaje de colonización de 55%, con un contenido de 170 esporas por gramo de suelo seco, con una viabilidad del 55% (An y Hendrix, 1988). La extracción de las esporas de este cultivo se realizó con base a la metodología antes indicada.

5.2 Preparación de las Esporas para su Estudio por Microscopía Electrónica.

5.2.1 Transmisión.

a) Fijación.- El material (constituido por raíces colonizadas, micelio y esporas) fue sometido a una doble fijación con paraformaldehído y glutaraldehído (Mollenhaver-Totten, 1971) al 4 y 2.5%, respectivamente, en buffer de fosfato de sodio 0.16 N durante 3 hrs, sellando el ependor con parafil y a temperatura ambiente bajo la campana. Posteriormente, se lavó y cambió 3 y 2 veces, durante 2 y 5 min, respectivamente, y se realizó la posfijación con tetróxido de osmio al 1% durante 12 hrs, a 4°C (Palade, 1952) .

b) Deshidratación.- Se llevó a cabo sometiendo el material a diluciones de alcohol etílico (de 10 en 10, desde 30 hasta 90 y 95%) 10 minutos en cada dilución. El material se dejó en etanol al 70% a 4°C durante 12 hrs. En los alcoholes 80, 90 y 95%, se hicieron dos cambios y tres en el absoluto de 15 y 20 minutos, respectivamente, con lavados de 1 min. entre una dilución y la siguiente.

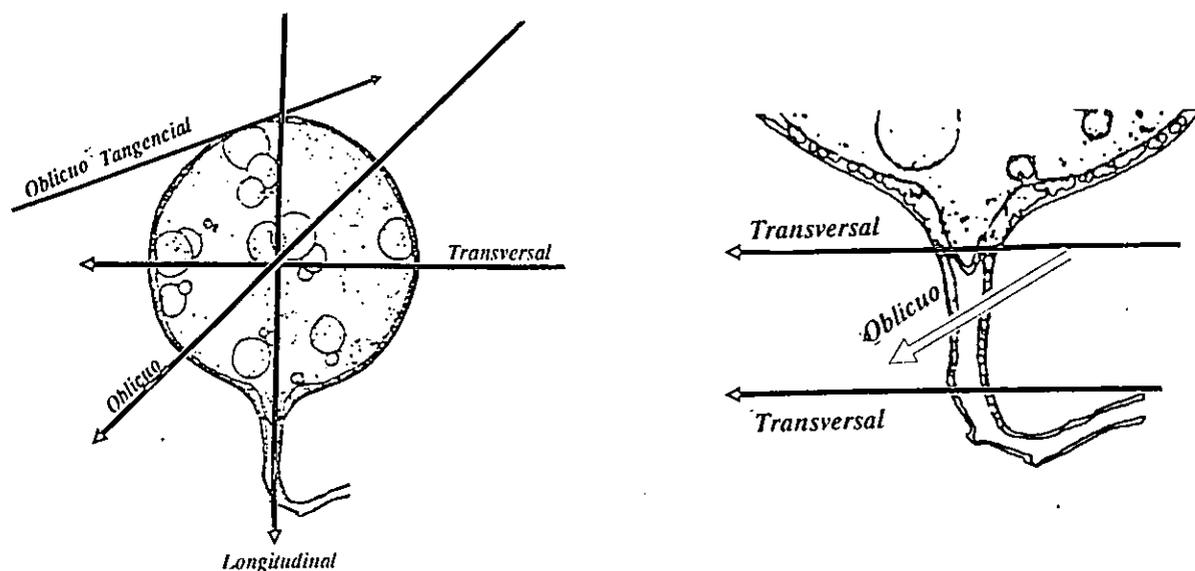
c) Preinclusión.- Después del último cambio de etanol absoluto, se hicieron 2 cambios de óxido de propileno de 20 min c/u, y se

dejaron en una mezcla de óxido de propileno y epon en relación 2:1, a 4°C durante 12 hrs. Posteriormente, bajo la campana, se destaparon y se dejaron 1 hr. Después, se realizaron dos cambios 1:1 y 1:2, de óxido de propileno y epon, respectivamente, durante 1 hr, cada uno.

d) Inclusión.- En epon (DDSA, NMA y DMP; Luft, 1961), se colocó en los moldes para inclusión para, posteriormente, depositar las esporas, micelio y raíces colonizadas, por el hongo arbuscular objeto de este estudio, utilizando agujas entomológicas. La operación se llevó a cabo bajo el microscopio estereoscópico, dándole una diferente orientación al material y, finalmente, se polimerizó a 60°C durante 24 hrs.

e) Corte y contraste.- Los cortes finos (de 1 μ) y ultrafino (de 50-100 nm gris-plata) se realizaron con un microtomo para microscopía electrónica de transmisión MT1 (manual) y MT2 (automático), respectivamente. Los primeros fueron utilizados para microscopía óptica sobre porta objetos y contrastando con azul de toluidina 1%; y los últimos fueron utilizados para microscopía electrónica de transmisión colocándolos en rejillas Cu/Rh de 100 mallas con membrana de "formvar" y contrastando con acetato de uranilo al 3% (Watson, 1958) y citrato de plomo al 0.3% (Reynolds, 1963), durante 10 y 5 min., respectivamente.

f) Localización esquematizada de los cortes de la pared de las esporas e hifas de sujeción o sustentora.



Esquema de *Glomus mosseae* tomado de Sckenck y Pérez, (1991)

5.2.2 Barrido.

a) **Fijación.**- Las esporas y el micelio fueron fijados en FAA (formol, ácido acético y alcohol en proporción 1:1:1, durante 1 hr.

b) **Deshidratación.**- Se realizó en alcoholes de diferente graduación iniciando con alcohol al 30% y terminando en etanol absoluto, dos cambios de 10 min c/u en cada alcohol. Posteriormente, se efectuaron dos cambios de etanol absoluto-acetona (1:1) y dos de acetona de 20 min. c/u.

c) **Secado a punto crítico (P.C.).**- El material biológico, después

del último cambio en acetona, se depositó en un pequeño fragmento de cubreobjetos; éste se envolvió en papel seda y se colocó en la cámara secadora con suficiente acetona, de manera que quedara embebido en ella. Se cerró la cámara y se llenó con CO₂ líquido, manteniendo la temperatura a 0°C. Se realizaron varios lavados con CO₂ y se ajustó a la temperatura y presión crítica del CO₂, que corresponde a 31 °C y 1073 lb/pulg², respectivamente. Estas condiciones se mantuvieron durante 10 min. Posteriormente, las esporas y el micelio se colocaron en un portamuestras para MEB y se cubrieron con carbón y oro, para protegerlas y hacerlas eléctricamente conductoras.

d) Recubrimiento con carbón. - Los portamuestras con el material biológico fueron cubiertos con carbón en una evaporadora (JEOL JEE-4B/4C) aplicando una corriente de 30 mA durante un minuto.

e) Recubrimiento con oro. - Las muestras cubiertas con carbón fueron colocadas en una esparcidora fina (ion sputter JEOL JFC-1100). El cubrimiento con oro se realizó a un voltaje de 1200 V, durante 6 min.

f) Observación en el MEB. - Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-35 C, operado con las siguientes condiciones de trabajo: un voltaje de aceleración de 25 KV y una distancia de trabajo de 15 mm.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.0 Microscopía Estereoscópica y Óptica.

Las esporas aisladas fueron seleccionadas de un cultivo monospórico, con un control de calidad de 85 - 90%, de acuerdo con los resultados obtenidos con el microscopio estereoscópico y óptico (Figs. 1 a 9). Las observaciones realizadas por Dalpes y Palacios (1994), indicaron que se trata de un cultivo de *Glomus mosse*. Las observaciones permitieron, además, estimar que las esporas con las que se trabajó en esta primera etapa tuvieron, aproximadamente, una madurez correspondiente, en el ciclo biológico de los HMA, al inicio de la fase meseta (desarrollo temprano de la esporulación del hongo).

La forma de las esporas fue globosa, el color varió del amarillo al ambar; su carácter translúcido permitió observar el contenido lipídico en forma de glóbulos cristalinos. Sin embargo, algunas de las características morfológicas, cambian dependiendo del ángulo y tipo de iluminación, preparación y montaje (semi o permanente), como se pudo observar en las Figuras 1-9. Sin embargo, en las Figuras 7 y 8 se corrobora la uniformidad morfológica de las esporas. Estos resultados coinciden con lo mencionado por Mosse (1970) en lo que respecta a las aberraciones ópticas, que crean artificios y que conducen a errores en la identificación. Walker (1986) menciona que es muy difícil poder discernir la morfología de la pared con microscopía estereoscópica solamente y que, con el óptico las observaciones, en la mayoría de las veces, solo permiten definir una pared gruesa de consistencia compacta, que puede ir acompañada de una capa externa hialina llamada evanescente en los glomales (Figs. 2, 7 y 8), tal y como lo refieren Mosse y Bowen (1968); Trape (1982); y Schenck y Pérez (1987 y 1991).

Las esporas cuyo color varió del amarillo claro al amarillo fuerte, presentaron diámetros de 130 a 150 μ y, las que variaron del amarillo al ambar de 150 a 170. Respecto al tamaño de las esporas, estos resultados coinciden con lo observado por Bethlenfalvay et al. (1982), quien indica que la esporulación se inicia con el principio

de la fase meseta la cual se presenta, aproximadamente, entre 10 a 15 días antes de la floración, observándose esporas de 100 a 150 μ de diámetro. Tommerup (1983 y 1985) considera que el desarrollo de las esporas es disparejo, ya que se forman unas antes que otras, siendo las primeras mas claras y brillosas; como también fué observado por Mosse (1981). Además, Harley y Smith (1983) mencionan, de igual manera, que las esporas mas jóvenes tienen colores mas claros y brillosos y que, conforme avanza la edad se tornan mas oscuras y menos brillosas.

1.1 Observación de Cortes.

Los cortes permitieron observar la hifa de sujeción la cual resultó ser recta en las esporas cuyo diámetro fue de 130 a 150 μ y, en forma de embudo, en aquellas con diámetro de 150 a 170 μ (Figs. 10 - 12). A partir de la hifa de sujeción, se desarrolla la espora incrementándose la acumulación de gotas lipídicas. Tanto en el microscopio óptico (M Op.), como en el microscopio electrónico de transmisión (MET) solamente se observó la huella de las gotas lipídicas, debido a que su extracción se llevó a cabo con los solventes orgánicos que se utilizaron para el procesamiento de las esporas. No obstante, las huellas de las gotas que en este caso fueron de diferentes diámetros, y caracterizadas por una vacuolación mucho mas intensa en las esporas de menor tamaño que en las esporas más grandes aunque, en éstas, las vacuolas fueron mucho más grandes (Figs. 10 y 11). Estas observaciones coinciden con las descripciones de Mosse (1970). La pared en ambas esporas fue homogénea y compacta, con un grosor de 3 μ . Aún en contraste de fase no fue posible observar la capa externa llamada evanescente (Fig. 11). En las hifas de sujeción, el diámetro fluctuó de 10 a 14 μ en el punto de unión entre ésta y la espora. Las observaciones antes indicadas son muy parecidas a las realizadas por Miller y Jefries (1994) especialmente en los siguientes aspectos: (a) el diámetro de las esporas; (b) la forma y el contenido lipídico; y (c) la forma de la

hifa de sujeción. Todas las características antes mencionadas son acordes, también, a lo publicado por Schenck y Pérez (1990) para *Glomus mosse*, pero no coincide con Miller y Jefries en: (1) la madurez de la espora; (2) el grosor de la pared; (3) la técnica del procesamiento de la muestra; y (4) la especie. Ambos trabajos se realizaron con el género *Glomus* pero con diferente especie, por lo que es de gran importancia, hacer resaltar lo útil que puede ser conocer, a lo largo del ciclo biológico de la planta huésped, las diferentes etapas del de desarrollo micorrízico, para no confundir dos especies del mismo género debido a que, frecuentemente, las características que pueden ayudar en la diferenciación son muy ambiguas, al nivel de resolución de la microscopía óptica como por ejemplo: el color, contenido lipídico, la forma de la hifa de sujeción y el grosor de la pared. Estas características pueden variar según sea la intensidad y el tipo de luz, la técnica de preparación del espécimen, el tipo de inclusión, la calibración de los instrumentos, y el grado de apreciación del observador. Lo anterior puede conducir a errores en la identificación de especies, inter-especies o subespecies del mismo género.

Es importante hacer resaltar la escasa bibliografía que existe sobre trabajos realizados en cortes de esporas de HMA, con enfoque al estudio de la pared. En estos trabajos, por rutina, se preparan de 20 a 30 esporas, tanto enteras como en "squash", en porta objetos para observarse en M.Op (Figs. 7 y 8). Este tipo de trabajos demuestran la importancia de la preparación de cortes finos, para determinar el control de calidad del inóculo, el grado de madurez del material fúngico según, el tipo de técnica utilizada en el procesamiento, y la exacta calibración de los instrumentos.

En el presente trabajo, la observación de las preparaciones de esporas, tanto enteras como en "squash", se realizó en el microscopio óptico. También se llevó acabo la observación de cortes finos (1 - 5 μ), en los cuales se tomó en cuenta la orientación para obtener cortes longitudinales (Figs. 10-12), transversales (Fig. 13), y oblicuos (Fig. 14) observándose, en los tres casos, una pared

compacta y homogénea.

En cuanto al micelio externo, se pudo observar que, en cortes transversales, las hifas variaron de redondas a ovaladas de, aproximadamente, 1 y 5 μ de diámetro, con una pared homogénea observable en cortes transversales (Figs. 10 - 14), y longitudinales (Figs. 13, 15 y 16), tanto en campo claro como en contraste de fases. Con éste último, parece observarse además, en las hifas de mayor diámetro, una capa interna y otra externa; ésta última se observó desgastada o rota. En cuanto a este punto, la bibliografía es muy escasa.

2.0 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Con el MEB fue posible detectar la esporósfera (capa exterior de microorganismos que cubren la pared de la spora) y observar algunas características topográficas de la pared. En una spora fracturada se observaron las dos capas (interna y externa) de la pared; esta última constituida por la esporósfera, restos de materia orgánica, con un grosor, aproximado, de 0.5μ , y la interna con una mayor electrodensidad y mucho más gruesa (3μ) e igualmente lisa. Se destacaron, además, las características morfológicas, la topografía, tamaño y modo de unión de la hifa de sujeción o sustentora, y de las hifas que constituyen los esporocarpos en estadio de desarrollo temprano y que sustentan las esporas jóvenes. El deterioro que se observa en la superficie (fracturamiento y exfoliación) se debió, probablemente a un exceso de exposición, no obstante este efecto permitió apreciar las capas (Figs. 20, 22 y 23). La técnica utilizada para el procesamiento, de los HMA para la MEB permitió, además, la observación y caracterización de tres tipos de esporocarpos: (1) esporocarpos que contienen, aproximadamente, entre 70 y 80 esporas, éstas últimas con un diámetro entre 30 y 50μ , embebidas en una maraña de hifas gruesas (4μ) y delgadas (1), de aspecto laxo (figs. 18 y 19), con dimensiones de 500 a 1000μ ; (2) esporocarpos constituidos de hifas gruesas (6μ) y delgadas (2μ) con 10 a 15 esporas, que van surgiendo alternadamente, en ramificaciones a partir de las hifas apicales formando un esporocarpo en forma de racimo de uvas, con las esporas más pequeñas (1μ) en la base y las más grandes (30μ) en la punta (fig. 17). Con dimensiones de 100 a 300μ ; y (3) hifas apicales gruesas (5μ) con esporas, cuyo diámetro es de 130 a 170μ , con las hifas sustentoras en forma de embudo (fig. 17). Las características morfológicas observadas permitieron confirmar que los ejemplares estudiados pertenecen a la familia *Glomaceae*, género *Glomus* y, probablemente, a la especie *mosseae*, de acuerdo con Schenck y Pérez, (1990).

Los resultados obtenidos con el MEB, además, revelaron tres características generales muy importantes en las siguientes

estructuras: (1) aspectos morfológicos del micelio externo, topografía y diámetro; (2) localización del nacimiento de las esporas en el micelio externo, su topografía y dimensiones; y (3) el análisis topográfico de la espora madre temprana, sus paredes y la hifa de sujeción con gran aumento, claridad y profundidad (Figs. 17-23).

(1) **Micelio Externo.** Las observaciones revelaron una superficie sinuosa que contiene materia orgánica adherida, a intervalos, a todo lo largo de las hifas, abundante en algunas partes, que asocia a 2 ó 3 hifas formando paquetes gruesos de cordones hifales (Fig. 18). Por otra parte, se pudieron observar, por lo menos, dos diámetros de hifas de 1 y 5 μ (Figs. 17-19).

(2) **Nacimiento de las esporas.** Se localizó en la parte apical de las hifas con diámetros de 5 μ ; la parte basal o punto de unión con las esporas alcanzó 7 μ ; tanto la parte basal de la espora como el punto de unión se encontraron rodeadas de materia orgánica (Figs. 17 y 18). Resultó diferenciable la forma de los esporocarpos, es decir, de las estructuras que se relacionan con el nacimiento de las esporas, observándose tres agregados diferentes: (a) esporocarpos laxos que contienen de 50 a 80 esporas de 30 μ de diámetro (Fig. 19); (b) esporocarpos desnudos conteniendo de 15 a 20 esporas con el mismo diámetro que las anteriores; y (c) esporas aisladas con un diámetro de 170 μ (Fig. 17). Estas últimas, por su estado de madurez, contienen ya todas las características de la espora madre temprana. Estos resultados coinciden con lo mencionado por Schenck y Pérez, 1990; y Brown y King *In*: Schenck (1991), en lo que respecta a: (1) el nacimiento de las esporas en hifas terminales; (2) a las esporas que se encuentran en esporocarpos (como es frecuente en *Glomus*); y (3) a las esporas individuales o que, raramente, forman grupos de dos o tres.

Finalmente, (3) **El análisis topográfico de las esporas madres tempranas.** Se observó que éstas alcanzan un diámetro hasta de 170 μ ; son completamente esféricas, con una capa externa incompleta y,

por debajo de ésta, una capa interna, las dos lisas (Fig. 20) y, en ambas, se observó materia orgánica distribuida y adherida a la superficie. Sobresale la capa microbiana formada, principalmente, por bacterias del tipo bacilo (Figs. 21 y 22). Por otro lado, se pudo observar muy bien la forma de embudo de la hifa de sujeción o sustentadora, con un diámetro basal, aproximadamente, de 20μ (diámetro que casi corresponde al de las esporas contenidas en los esporocarpos); también, se encontró materia orgánica adherida y bacterias (Fig. 23). Por último, el grosor de la pared que en estas esporas fue de 3μ (Fig. 21). Estos resultados, comparados con los obtenidos por Yao et al. (1992) revelan la importancia del estudio de los esporocarpos del género *Glomus* para la separación de las especies. Al respecto, se puede citar como ejemplo de la formación de esporocarpos compactos, con clamidosporas alrededor de una hifa terminal o "Glebal", de paredes de 6μ de grosor, el de *Glomus fuegianum*. Sin embargo, se requieren estudios más profundos de estos hongos con MEB, ya que no hay información suficiente.

3.0 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

Los resultados obtenidos con el procesamiento de las primeras muestras (Cuadro 1 del apéndice) denotaron una insuficiente fijación, deshidratación e inclusión. Ésto se reflejó en la dificultad para fijar e incluir adecuadamente a las esporas madres juveniles de estos hongos debido, probablemente, a la naturaleza de su estructura, ultraestructura y grosor de su pared (3μ). El mismo problema se detectó al procesar el micelio externo y las raíces micorrizadas debido, probablemente también a la naturaleza de materiales, en este último caso, quizá, aún mas complejos que la spora misma. Ya que en la raíz, además de la pared de ésta se encuentra, también, la pared del hongo, así como una gran cantidad de vacuolas llenas de aire, que forman parte de la compleja morfología interna de la estructura simbiótica, que no permiten una fácil penetración y, menos aún, la infiltración, . No obstante, para resolver esta problemática se

modificó la técnica mencionada en el Cuadro 1 aumentando, durante la fijación, los tiempos al doble y bajo presión de 10 libras a 40 °C.

Sin embargo, se observó daño en las raíces y el desprendimiento de la mayoría de las esporas de la hifa de sujeción. La problemática de estos materiales durante su procesamiento para el MET también fue mencionada por Mosse (1970). Esta autora resolvió el problema mediante la perforación de la pared de las esporas con una microaguja. Sin embargo, en este trabajo no se pudo realizar debido a la dificultad para la obtención de dicha aguja. Carling et al. (1976) hace incapie en los trabajos de Spurr (1969) y los de Frank, Krien y Brown Jr. (1969). Sin embargo, estos autores, aunque no resuelven la problemática de la fijación e infiltración de las esporas sí mejoran el tratamiento del material micorrizado para MET y estandarizan el uso del buffer de cacodilatos y la resina Spurr's. Sin embargo, en este trabajo no se pudo conseguir el buffer y la resina. Swar (1980), propone sumergir las esporas en hipoclorito de sodio 0.5% durante 20 segundos antes de la fijación, para lograr una satisfactoria infiltración. No obstante, en el presente trabajo, este tratamiento no dió resultado. Sin embargo, las modificaciones hechas a la técnica para la fijación e infiltración (Cuadro 2 del apéndice) resolvieron los siguientes problemas: (1) difusión e infiltración del fijador; (2) conservación o recuperación de un mayor número de esporas; (3) la eliminación de la mayor parte de los residuos del substrato; y (4) se mejoró notablemente la conservación de todas las estructuras, obteniéndose excelentes resultados tanto con el micelio externo como con las esporas, y buenos resultados con las raíces micorrizadas. Ya que en, los tres casos, se logró una mucho mejor fijación, deshidratación, infiltración, inclusión y polimerización, obteniéndose buenos bloques. Estos logros fueron corroborados con los resultados del tallado de la pirámide trunca, así como con la calidad de los cortes obtenidos con el microtomo (MT) 1 y 2, manual y automático, para cortes finos y ultrafinos, respectivamente. No obstante, los cortes fueron muy difíciles de obtener, ya que la pared de las esporas es muy dura; por esta razón solamente fue posible obtener 3 cortes buenos con el mismo filo cortante de la cuchilla,

antes de que aparecieran las mellas y, consecuentemente, se desgarraran los cortes. Debido a esta problemática, para la realización de estos cortes, se aconseja la utilización de una cuchilla de diamante, como lo proponen Mosse (1970 a, b y c y 1987); Carling et al., (1977); White y Brown (1979); Sward (1980 a, b, y c); Gianinazzi-Pearson et al., (1981); Bonfante-Fasolo y Vian (1984); Bonfante-Fasolo (1986); Yao et al., (1992); y Miller y Jeffries (1994). Cabe mencionar que todos estos autores, además de seguir casi la misma metodología, utilizaron buffer de cacodilato, resina Spurr's, y cuchilla de diamante.

Sin embargo, en el presente trabajo, la utilización de cuchilla de vidrio, buffer de fosfato y resina epon 812, dió resultados muy buenos, ya que se consiguieron cortes longitudinales, transversales y oblicuos de esporas, micelio externo y raíces colonizadas (de color dorado, dorado-gris y gris claro).

3.1 Capa Interna de la Pared de las Esporas de los Esporocarpos.

3.1.1 Corte transversal, oblicuo y longitudinal.

Estos cortes presentaron un color que varió entre dorado y plateado, lo que significa un grosor entre 80-100 nm, observándose, en el MET, más electro-densas las partes más gruesas. Los cortes mostraron esporas de forma; esférica, ovoide y piriforme, con un diámetro de 30 a 50 μ , y una pared con un grosor de 500 a 800 nm. La capa interna, se observó como una estructura de aspecto granular homogénea, embebida en un material amorfo electrodenso (Figs. 24-26). Estas características fueron observables con aumentos de 10,000 hasta 50,000 X; las fibras electro-transparentes que constituyen la quitina no fueron evidentes, y la parte interna de la pared aparece compacta. El hecho de haber trabajado con 10 muestras procedentes de diferentes esporas, permitió verificar las características antes mencionadas. Sin embargo, debido a los costos del material fotográfico no se pudo

tomar una serie de todos los cortes a diferentes aumentos, obteniéndose solamente los dos aumentos más representativos. Los **cortes oblicuos** obtenidos de estas esporas, fueron de color amarillo oro, es decir, con un grosor de 100 a 150 nm debido, probablemente, a que fueron los primeros cortes de este material. El grosor de la capa interna presentó 1μ , observándose compacta y muy electrodensa (Fig. 27). No obstante, en cortes mejor realizados y de color de dorado a plateado y, por lo tanto, de un grosor de 80 a 100 nm, se pudieron observar con aumentos de 15,000 a 30,000 X, las ultramicrofibrillas electrotransparentes a los electrones, embebidas en un material electrodensamente amorfo. Y finalmente, los **cortes longitudinales**, obtenidos de la pared de 10 ejemplares de clamidosporas, resultaron notablemente mejores que los transversales y oblicuos, ya que en estos cortes el color varió de plateado a gris, lo que significó un grosor de 50 a 80 nm. En estos cortes y a bajos aumentos, desde 3,000 hasta 10,000 X, fue posible observar una diferencia morfo-ultraestructural, con respecto a los cortes transversales y oblicuos anteriormente descritos (Fig. 29).

A un aumento de 3000 x, se aprecia un arreglo alveolar, notándose la parte central electro-transparente y la periférica electrodensa (Fig. 29). Estos resultados coinciden con lo mencionado por Mosse, (1986), en lo referente a que, en la capa interna, la quitina es electrotransparente a los electrones y que esta tiene la apariencia de ultramicrofibrillas las cuales se encuentran embebidas en la quitosana que tiene características electrodensas, la cual constituye la matriz. Por otra parte, el interior de las esporas se observó saturado de glóbulos lipídicos, electrodensos en la periferia, con diámetros que van desde 0.2 a 5μ , estando las más grandes distribuidas hacia el centro de la espora. Estos glóbulos lipídicos, solo impregnaron su huella; ya que los lípidos fueron extraídos por los solventes orgánicos con los que se procesó este material. Estos primeros resultados revelaron que la doble fijación, la inclusión en resina epóxica, así como los cortes, con cuchilla de vidrio permitieron observar los; esporocarpos y algunas características de las esporas como: (1) su diámetro de 40 a 50μ , y su forma de

esférica a piriforme; (2) el grosor de su pared de 700 a 800 nm y, en algunos casos 1000 nm; (3) la hifa de sujeción en forma de embudo; (4) el contenido lipídico en el interior de la espora; (5) la presencia de las ultramicrofibrillas electrotransparentes a los electrones (quitina) y la matriz electrodensa (quitosana); (6) el cambio de aspecto o apariencia en el orden de las microfibrillas de acuerdo a la inclinación del corte; (i) transversal con aspecto granular; (ii) oblicuo aspecto de una red muy fina de ultramicrofibrillas electrótransparentes embebidas en una matriz electrodensa y amorfa; y, finalmente, (iii) longitudinal con aspecto alveolar. Esto último nos revelo la importancia de la inclinación del corte. Este tipo de ultraestructura ha sido, igualmente, observado por Bonfante-Fasolo y Schubert, (1986) quienes lo describieron en *Glomus clarum* y *Glomus caledonium*. Sin embargo, ellos lo describieron para esporas madres y no para esporocarpos. Son quizá, estos los primeros cortes realizados en esporocarpos ya que, hasta el momento, no hay referencias bibliográficas sobre este aspecto. No obstante, desde el punto de vista cualitativo, la semejanza con la pared de *Glomus clarum* y *G caledonium*, así como *Glomus mosseae*, es extraordinaria. Por lo tanto, lo observado con el microscopio de luz, con el MEB, y con el MET, apoyan la hipótesis acerca de que el ejemplar aquí estudiado pertenece al género *Glomus*, con tendencias a la especie *mosseae*.

3.2 Capa Externa de la Pared de las Esporas.

3.2.1 Corte transversal.

Se pudo observar que las esporas en su pared poseen una capa externa electrodensa, la cual está constituida por láminas finas, completamente adherida a la capa interna (Fig. 24-26) En este caso, la capa externa se observó homogénea y completa con el MET; en tanto que en el MEB se observó incompleta. Estas dos observaciones, podrían indicar que la pared externa corresponde a la capa evanescente ya que

parece descamarse superficialmente, o bien que las capas superficiales son más fácilmente desprendibles, como se observa en la Fig. 24. Una explicación a estas observaciones puede ser que, conforme crece la espora, la capa evanescente se expanda y las partes basales se renuevan; es decir, que las superficiales son las más viejas y, por lo tanto, se van separando; no obstante, esta descamación puede, también, deberse al efecto del procesamiento y manipulación. Sobre este aspecto, la información bibliográfica es muy escasa, tanto a nivel nacional como internacional. No obstante, en una publicación especializada en taxonomía (Walker, 1983), se considera que la capa evanescente rodea a una pared laminar en las especies pertenecientes al género *Glomus*. El progresivo rompimiento de la capa evanescente y el engrosamiento de la pared laminar, han sido observados haciendo referencia a diagramas hechos utilizando microscopía óptica (Mosse, 1970). Sin embargo, en este y otros trabajos sobre el estudio estructural de la pared por MET, no se hace mención a la capa evanescente (Sward, 1980; y Miller y Jaffeies, 1994). No obstante, Bonfante-Fasolo y Vian (1984) mencionan que la capa externa, con un grosor irregular, a menudo muestra signos de lisis causados por bacterias, y que la textura es fibrilar, con un arreglo en orden paralelo. Por otra parte, Yao et al., (1992) indican que las clamidosporas de *Glomus fuegianum* presentan una pared con 3 capas, y que la capa evanescente está, algunas veces, ausente de las secciones; esto se correlaciona con las discontinuidades naturales de esta capa exterior observadas en el MEB. Sobre este particular, son muy importantes los estudios de la capa evanescente en cuanto a: (1) presencia o ausencia en todos los géneros; (2) origen y desarrollo; y (3) composición química y arreglo ultraestructural; debido a que la información es muy escasa aún cuando es de valor taxonómico. Quizá la falta de información se deba a: (1) que no todas las especies la presentan; y si la presentan, ésta puede desaparecer o modificarse durante su desarrollo o ciclo; (2) son pocas las esporas estudiadas, de diferentes géneros, especies y todas en estado de dormancia, es decir maduras. Sin embargo, la taxonomía hecha con microscopio óptico se basa en la presencia o

ausencia de la capa evanescente para su identificación taxonómica a nivel de género (Hall y Fish, 1970 y 1983; Koske y Walker, 1985; Morton, 1986 y 1988; Walker, 1982, 1983, 1986 y 1992; Morton y Benny, 1990; y Schenck y Pérez, 1990). En este trabajo, las observaciones de la pared, en cortes transversales, longitudinales y oblicuos de varias esporas, permitió obtener más información.

El corte longitudinal, como aparece en las Figs. 27-29, corroboró lo observado en los cortes transversales, pero con mucha mayor claridad (75,000 X), y en los cortes oblicuos a 100,000 X, se observaron bacterias de forma de ovoides a esférica, con paredes gruesas, intercaladas entre la capa evanescente que envuelve a las esporas, la cual es de grosor irregular (Fig. 33). Estos resultados, coinciden con el único trabajo publicado sobre la ultraestructura de la arquitectura de la pared en 7 especies del género *Glomus* sp., de Bonfante-Fasolo y Schubert (1986). Estos autores mencionan que la arquitectura completa de la pared de la spora tiene un valor importante en el diagnóstico para la identificación de una especie dentro de un género. La descripción ultraestructural, hasta ahora, se ha hecho en muy pocas especies. Las siete especies de *Glomus*, mostraron varios rasgos distintivos de la arquitectura de la pared. Con base en esta información se confirma que la configuración de la pared es un buen criterio taxonómico. Muchos rasgos, sin embargo, fueron compartidos por todas las esporas. Los resultados obtenidos de este trabajo coinciden con los autores antes mencionados, en: (a) la presencia de la capa evanescente; (b) la consistencia electrodensa y la organización laminar; y (c) la presencia de bacterias. No obstante, los cortes transversales de este trabajo se acercan más a la descripción para *Glomus occultum* y los cortes longitudinales, son mucho más parecidos a los descritos en *Glomus caledonium*. Los oblicuos coinciden en parte con los de *Glomus macrocarpum* y *Glomus clarum*. Esto nos indica que la necesidad de contar con más estudios que cubran no solo la morfología sino, también, la composición y distribución química de sus componentes en la ultraestructura. Estos estudios permitirían dilucidar si la capa evanescente es igual en todas las especies del género *Glomus*, o si hay un rasgo que las

pueda diferenciar, ya sea permanente o que se presente solamente en alguna etapa de su desarrollo. En este sentido, sería importante obtener imágenes por crio-fractura y sustitución de estas capas, y análisis de las superficies, por inmunolocalización de glucoproteínas superficiales específicas. La autorradiografía sería, también, una técnica importante para la detección de los sitios de síntesis de la pared y, además, para encontrar una correlación de esta pared en las tres familias de hongos arbusculares. El valor taxonómico de estos estudios se relacionaría con la evolución de las zigósporas a clamidósporas asexuales y, probablemente, permitiría explicar la presencia y las diferencias de esta capa en los diferentes taxones. Es ya conocido el hecho de que la capa evanescente, entre las familias, es fácil de reconocer, pero no dentro de cada familia. Así, las esporas de la familia Acaulosporaceae presentan, por lo regular, ornamentaciones en la capa evanescente, y en los géneros de la familia Gigasporaceae que presentan la capa evanescente, ésta se distingue por ser generalmente muy olgada.

3.3 Capa Interna de la Pared de las Esporas.

3.3.1 Corte longitudinal.

Estas esporas presentaron un diámetro de 130 a 150 μ , la hifa de sujeción o sustentadora tiene forma de embudo, lo que propicia que la forma de la espora tienda a ser piriforme. Su pared se observó constituida por dos capas, una externa muy electrodensa, con un grosor, aproximado de 0.5 μ , y otra interna con un grosor de 2 a 2.5 μ ésta última reveló una conformación alveolar de las ultramicrofibrillas electrotransparentes. Las observaciones con aumentos de 65,000 X, permitieron reconocer de manera clara la conformación alveolar, la cual es mayor hacia la parte mas interna de la pared que, también, es más electro-transparente; en tanto que, hacia la parte exterior, el arreglo alveolar es menos marcado y la pared es más electrodensa. Por otro lado, la parte más profunda de

la capa interna de la pared, parece estar separada del contenido interno por una lámina basal muy delgada y electrotransparente (Fig. 30). Además, se pudo observar claramente la capa externa o evanescente, con su disposición laminar, que puede estar constituida de 4 a 5 subcapas. Es de gran importancia señalar, desde el punto de vista cualitativo, el extraordinario parecido de los cortes longitudinales de la capa interna, del esporacarpio y la espora madre, ya que ambos presentaron un arreglo morfo-ultraestructural de forma alveolar. Esto último nos indica, probablemente, que ambas esporas están constituidas por los mismos elementos, con igual arreglo ultraestructural. Esto último puede deberse a que ambas estructuras proceden de la misma unidad formadora de propágulos, donde el mismo hongo produce los mismos patrones de organización en estructuras homólogas. En cuanto a la morfología externa, se puede apreciar que el parecido de ambas, esporas es extraordinariamente igual, variando solo el tamaño, como se observa en la micrografía 19. Por otra parte, estos resultados corroboran que la técnica utilizada para el procesamiento de estas esporas fue adecuado, ya que permitió observar elementos ultraestructurales muy importantes de manera muy clara y sin producir daños en la micromorfología de la pared.

3.3.2 Corte transversal.

Con este ángulo de inclinación, la capa externa de la pared de la espora se observó compacta y muy electrodensa con un grosor de 0.3μ ; en tanto que la capa interna presentó un grosor de 2 a 2.5μ . No obstante, lo más importante fue el aspecto ultramorfológico, el cual pierde la forma alveolar, antes descrita, y en su lugar se torna homogénea, observándose muy claramente las ultramicrofibrillas electrotransparentes de manera muy fina, atravesadas unas con otras, formando una red que forma el esqueleto, de la capa interna, que se encuentra embebido en una matriz electrodensa, poco abundante y amorfa. Esta ultramorfología se puede observar con aumentos de 40,000 a 80,000 X (Fig 31).

La orientación de los cortes puede permitir observar cambios morfo-ultraestructurales que podrían ser de gran utilidad para determinar un patrón morfo-estructural, huella específica o "Finger print". En este caso, se trataría de una conformación ultraestructural interna de la pared ya que su arquitectura, en los cortes transversales, es diferente a la que se aprecia en los cortes longitudinales ya que, como se mostró en los primeros, es de tipo alveolar y, además, son mucho más evidentes las ultramicrofibrillas electro-transparentes y, en los segundos, es compacta y homogénea (Figs. 30 y 31). Es necesario resaltar que 8 esporas mostraron la misma huella o "Finger print" en la arquitectura de ambas capas, externa e interna. Es, también, de importancia mencionar que, entre el primer grupo de esporas (corte longitudinal) y el segundo (corte transversal), se apreciaron diferencias en cuanto a su talla. En las primeras se tuvo un diámetro promedio de 140μ , y en el segundo grupo de 150 ; pero, en ambos casos, el grosor de la pared fue similar (2.5μ), aunque fue más uniforme en el segundo. Por otro lado, cuando el corte longitudinal varía en su orientación, la apariencia alveolar se modifica, debido a que las microfibrillas electro-transparentes se tornan más visibles (Figs. 30 y 31).

3.2.3 Corte oblicuo tangencial.

La obtención de estos cortes implicó un alto grado de dificultad en todos los aspectos como son: la orientación e inclinación, el tallado de la pieza de inclusión en forma de pirámide, el montaje e inclinación en el ultramicrotomo. El número máximo de muestras que se puede obtener del casquete de la pared de la espora es de 5. En este caso, casi se logró obtener tapetes completos de la capa interna de la espora a todo lo largo y ancho de ésta (Fig. 32). En el ángulo superior derecho de la parte externa de la capa interna de la espora, se observaron fragmentos de la capa externa o evanescente, la cual es muy electro-densa y de constitución fibrilar como, también, se puede apreciar en la Fig. 33. La apariencia laminar no es muy clara,

pero sí las microfibrillas electro-densas que forman la capa externa de la pared. Por otra parte, parece ser que, con este ángulo de corte, la capa evanescente es más fácilmente desprendible ya que, en 15 cortes de buena calidad obtenidos de diferentes esporas, ésta se observa solo a intervalos y en todos, las microfibrillas electro-densas aparecen muy claras (Figs. 32 y 33).

El ángulo de inclinación del corte, permitió apreciar, a lo largo y ancho de la superficie de la pared, cuatro arquitecturas diferentes (Fig. 32). Para ubicar las zonas de la spora usaremos la dirección de las manecillas del reloj, de tal manera que el contenido de la capa interna (localizado de las 12 a las 3) mostró una apariencia totalmente fibrilar, donde las ultramicrofibrillas electro-transparentes se encuentran en gran abundancia, con diferentes grosores y longitudes, y con apariencia enmarañada. En ésta sobresalen dos zonas: (a) una externa donde las ultramicrofibrillas electro-transparentes se observan más finas formando una red; y (b) otra interna caracterizada por presentar ultramicrofibrillas electro-transparentes, de mayor calibre, en disposición longitudinal y, aparentemente, en la misma dirección, aunque conforme nos acercamos a las 3 (considerando el reloj) éstas se observan en disposición paralela. Por otro lado, el material amorfo electro-denso se observó en mucho menor proporción (Fig. 32). De la zona que cubre las manecillas del reloj de las 3 a las 6 se observa la capa evanescente similar a la anterior. Sin embargo, en la capa interna se puede distinguir una zona externa y una interna en las que no se aprecian claramente las ultramicrofibrillas electro-transparentes. En lo que respecta a la zona de las 6 a las 9 (según el reloj), la capa evanescente está prácticamente ausente; la capa interna parece estar constituida de tres subcapas: una externa de aspecto granular y con el menor grosor (0.3μ); una central menos electro-densa y, finalmente, una interna más electro-densa y con ultramicrofibrillas electro-transparentes mucho más visibles, y en la parte más interna, se delinea una zona más electro-densa; estas dos últimas subcapas aparecen del mismo grosor (0.6μ). De las 9 a las 12, se pudieron

observar fragmentos de la capa evanescente, pero no así la estructura fibrilar. La capa interna parece estar constituida por 3 subcapas diferentes, con un contenido de un material amorfo compacto, en el que no se observaron las ultramicrofibrillas electro-transparentes, como se observaron en su contraparte (Fig. 32). Estos resultados se apreciaron en 7 cortes de 9 de diferentes esporas (Fig. 32). En la mayoría de los cortes el color obtenido fue gris claro, es decir, de aproximadamente 50 a 70 nm, obteniéndose una excelente resolución para las ultramicrofibrillas electro-densas, en forma de espículas, presentes en la capa evanescente, y las muy importantes ultramicrofibrillas electro-transparentes muy bien definidas que constituyen, principalmente, el esqueleto de la capa interna. Estos resultados coinciden con lo mencionado por Pearlmutter y Lembi, (1978), citado por Mosse (1986), en lo referente a que la quitina es electro-transparente y se encuentra embebida en la quitosana electro-densa que forma la matriz. Este tipo de ultraestructura igualmente ha sido observado por Bonfante-Fasolo y Vian (1984) en *Glomus epigaeum*; por Bonfante-Fasolo y Schubert (1986) quienes lo describieron, también, en *Glomus clarum* y *Glomus caledonium* y, más recientemente, por Miller y Jefries (1994) en *Glomus geosporum*. Estos primeros resultados revelan la fuerte homología existente entre varias especies, dentro de un mismo género. No obstante, probablemente, se podrían reconocer diferencias entre éstas, como por ejemplo: en el grosor de la pared, y en el contenido, cantidad y distribución de quitina, quitosana, celulosa y taninos, entre otros de sus constituyentes.

3.3.4 Corte oblicuo.

Para estos cortes se utilizaron esporas colectadas a los 45 días después de iniciada la esporulación es decir, 15 días más de desarrollo que las anteriores. Aún cuando el diámetro de las esporas fluctuó de 170 a 200 μ , únicamente fueron seleccionadas las de menor diámetro, para mantener la escala del diámetro lo más

uniformemente posible entre todas las muestras trabajadas, es decir, entre 150 y 170 μ . En las observaciones de estos cortes, a 30000 X, la capa interna aparece constituida por 4 láminas, las cuales mostraron un parecido con lo observado en la figura 32 (9-12 del reloj) .

A 70,000 X se pudo observar, con gran detalle, todas las características mas sobresalientes de la capa interna de la pared de la espora. La capa externa o evanescente mostró diámetros de 1 a 1.5 μ , con estructuras ovoides parecidas a bacterias, que se encuentran incluídas en ésta. Se pudieron observar, además, en ciertas regiones de la parte basal, filamentos laminares muy electro densos; aunque la mayoría tienen aspecto granular y menos electrodenso (Fig. 34; ángulo superior). La capa interna, mostró 4 subcapas o láminas, con características ultramorfológicas muy bien diferenciadas, con respecto al arreglo de las ultramicrofibrillas electro-transparentes, que constituyen el esqueleto de la capa interna y crean la laminación.

La primera subcapa o lámina es la más externa, y tiene un grosor aproximadamente de 800 nm y es menos electrodensa que la parte interna. Las ultramicrofibrillas electro-transparentes se observaron en posiciones longitudinal y radial, formando una red muy fina, embebida en una matriz electro-densa y escasa. También se pudieron observar, en el centro de esta subcapa, paquetes de ultramicrofibrillas electro-transparentes dispuestos en forma longitudinal y paralelos, donde la matriz es tanto más abundante como visible; esta zona es diferente en sus extremos (Figs. 34-36). Lo antes observado nos indica como la conformación de esta subcapa va cambiando, desde la parte más externa hasta la más interna. Sin embargo, ésta se distingue totalmente de la siguiente subcapa.

La segunda subcapa presentó un grosor aproximado de 450 nm., donde las microfibrillas electro-transparentes, se observaron en disposición de semi-arqueada a arqueada.

La **tercera subcapa**, con un grosor aproximado de 900 nm, las microfibrillas están dispuestas en forma arqueada, siendo los extremos de sus arcos más electro-densos y las partes apicales o curvadas electro-transparentes, donde se definen muy bien las ultramicrofibrillas de, aproximadamente, 15 nm.

La **cuarta y última subcapa** está separada de la tercera, por una gran cantidad de microfibrillas dispuestas paralela y longitudinalmente, observándose una zona fuertemente electrodensa, que permite ver claramente las microfibrillas. Después de esta zona lineal electrodensa, la cuarta subcapa o lámina se observa similar a la primera aún en el grosor (800 nm). Considerando las cuatro subcapas, el grosor total de la pared fue, aproximadamente, de 3 μ (Figs. 34-36). Resumiendo, la capa interna está costituida por 4 subcapas, tanto la externa como la interna, presentaron las microfibrillas en forma de una fina red y dos centrales, con disposición helicoidal, siendo la primera la más angosta y menos arqueada. Estos resultados coinciden, en gran parte, con lo descrito por Miller y Jeffries (1994) en *Glomus geosporum*. Estos autores mencionan que, en secciones oblicuas de la capa interna de la pared de la espora observadas a bajos aumentos (10,000 a 20,000 X), presenta una apariencia laminar. Conforme se incrementa el aumento, la laminación se torna más clara, con láminas poco mas o menos de la misma anchura, casi uniformes, en las cuales se observan claramente las bandas electrodensas. Conforme el aumento fue incrementándose, entre las subcapas o láminas aparecen ultramicrofibrillas arregladas de acuerdo a un modelo arqueado. La apariencia arqueada fue mejor observada a 60 000 X. Todas las características señaladas por Miller y Jefries (1994) coinciden con las observaciones realizadas en el presente trabajo. Sin embargo, no coinciden en tres rasgos fundamentales: (1) en el número de láminas, menor en este trabajo; (2) en el arreglo arqueado de las microfibrillas en *G. geosporum*; y (3) en el grosor de las subcapas que se desvanecen hacia la parte interna de la pared en forma decreciente. Las capas o láminas más externas (de 800 nm) sobrepasan a las internas (de 70 nm), la zona

arqueada cubre el 80% del total del grosor de la pared y el 20% restante, mostró mayor electrodensidad y carece del modelo arqueado. Es muy importante mencionar, que estas dos últimas características ultraestructurales, observables a más 50 000 y menos de 100 000 X, permitieron diferenciar las esporas de este trabajo de las de *Glomus geosporum*. No obstante, estos resultados confirman, nuevamente, que el género de estas esporas es *Glomus*.

Esto último, a su vez, es reforzado por dos trabajos a nivel ultraestructural de gran importancia : (1) Mosse (1970), quien define las características ultraestructurales de la pared en la familia *Acaulosporaceae*, que carece del modelo arqueado de las microfibrillas; y (2) Sward (1981), quien hace un análisis ultraestructural de la pared de *Gigaspora margarita*, incluyéndola en la familia *Gigasporaceae*, en la que sobresale la presencia de una capa o lámina membranosa y en donde la disposición en forma arqueada de las microfibrillas no existe.

Además, son de importancia relevante los trabajos de Bonfante-Fasolo y Vian (1984); Bonfante-Fasolo y Grippiolo (1984); Bonfante-Fasolo y Schubert (1986); Mosse (1986); Yao, Pegler y Young (1992); y Miller y Jeffries (1994) sobre la diferenciación de varias características compatibles, entre ellas, las más relevantes son la de la forma arqueada, modelo arqueado o helicoidal, presente en los géneros de la familia *Glomaceae*. En el presente estudio, la capa interna de las esporas mostraron dos subcapas en medio de la capa interna, de conformación arqueada, lo que confirma que el género es *Glomus* (figs. 34-36). Dentro de éste último, hay solo 12 especies estudiadas a nivel ultraestructural, de las 126 identificadas hasta la fecha, de las cuales, la mitad presentó el modelo arqueado. Los trabajos más importantes, en cuanto a número de especies estudiadas, son el de Bonfante-Fasolo y Schubert (1986) con 7 especies de *Glomus*, y el de Mosse (1986) con dos géneros por familia. En cuanto a las características muy específicas destacan por su importancia, los de Bonfante-Fasolo y Vian (1984); Bonfante-Fasolo y Grippiolo (1984); y Miller y Jeffries (1994), en estos últimos se hace una descripción

muy detallada del modelo arqueado; (Figs 34-36) también encontrado en este trabajo. Bonfante-Fasolo y Vian describen, en *Glomus epigaeum*, una capa interna constituida por microfibrillas electro-transparentes, dispuestas en forma arqueada e incluidas en un material amorfo electro-denso, a modo de matriz, siendo la presencia de las microfibrillas arqueadas mucho más notoria en la parte más externa, dispuestas en 4 o 5 capas de 350 nm de grosor cada una, las cuales abarcan casi la mitad del grosor total de la capa interna de la pared de las esporas. La otra parte está constituida por un número de subcapas que varían de, 15 a 20, también de forma arqueada. Esta ultraestructura de microfibrillas arqueadas se va desvaneciendo hacia la parte más interna de la pared. Los resultados del presente trabajo, comparándolos, con *Glomus epigaeum*, permiten diferenciar ambas especies a nivel ultraestructural, utilizando siempre aumentos mayores a 50,000 X. De igual manera, Bonfante-Fasolo y Schubert, describen la forma arqueada de *Glomus macrocarpum* y *Glomus caledonium*, entre siete especies diferentes de este mismo género.

Para *G. macrocarpum* mencionan que, a bajo aumento (menos de 20,000 X) la capa interna se observa laminada u organizada en subcapas de diferente electrodensidad la cual, a menores aumentos, se observa gruesa y compacta pero, a mayores aumentos, se reconoce la típica estructura helicoidal constituida de 10 a 14 capas de 800 nm de grosor. Este modelo, que se encuentra embebido en un material electrodenso que sirve de matriz, es observable solo en cortes oblicuos debido a que las microfibrillas, electro-transparentes dispuestas paralelamente, al rotar la espora 180° se tornan arqueadas. En *Glomus caledonium*, la capa interna contiene subcapas o láminas típicamente constituidas por fibras electro-transparentes con disposición paralela. En la mayor parte de la capa interna de la pared, las microfibrillas aparecen organizadas en paquetes de arcos, bien definidos en la zona intermedia, con un ancho de 300 nm, con los arcos de menor tamaño dispuestos a los lados. Por lo que a *G. macrocarpum* y a *G. caledonium* se refiere, también se pueden diferenciar, a nivel ultraestructural, en las esporas aquí

estudiadas, además, se vuelven a ratificar las diferencias con aumentos de menos 20 000 y más 50 000 X. Por lo tanto, estos resultados indican que existen realmente diferencias en la organización del arreglo arqueado de la capa interna de las esporas; lo que puede ser de gran valor taxonómico para la identificación y/o diferenciación de las especies. Lo antes expuesto, se apoya en algunos de los autores ya antes indicados (Bonfante-Fasolo, Schubert y Grippiolo, 1985; Bonfante-Fasolo y Schubert, 1986; Y Mosse, 1986).

El análisis ultraestructural de la arquitectura fina de los componentes de la pared, permitió obtener nuevos conceptos y terminologías usadas, ahora, como un conocimiento nuevo.

De este modo, las observaciones de las unidades fibrilares electro-transparentes, embebidas en una matriz amorfa electrodensa, pudieron mostrar un orden continuo, de acuerdo a la posición, obteniéndose paredes unitarias. Alternativamente, la posición de las fibrillas origina una textura arqueada, debido a que las subcapas regularmente son rotadas a través de un orden fibrilar y a lo largo de pequeños ángulos, con respecto a las subcapas previas (Nevolle y Levy, 1984; Bonfante-Fasolo y Vian, 1984; y Miller y Jeffries, 1994). Este tipo de organización es responsable de la "laminación" de la capa interna de la pared, así como de la apariencia arqueada de las unidades fibrilares, del número y del ancho de éstas, lo que depende del ángulo de inclinación de los cortes oblicuos (Mosse, 1986; y Miller y Jeffries, 1994). Todos los autores antes mencionados concuerdan con los resultados aquí descritos, confirmándose que la pared constituye, actualmente, un verdadero y estable criterio taxonómico, para la identificación de esporas de HMA, ya que todos los ejemplares hasta hoy estudiados, a nivel ultraestructural, muestran diferencias en la arquitectura de la pared, lo que sugiere un diferente ritmo de la depositación fibrilar durante la morfogénesis de la espora. Lo antes expuesto justificó que, en el presente trabajo, se analizaran también las paredes del hongo a nivel ultraestructural, lo cual será descrito posteriormente.

Al analizar los resultados obtenidos en este trabajo se verá que, de acuerdo a la diferente orientación de los cortes, podemos encontrar una correlación entre ellos, que indica la organización interna de la estructura fina que conforma la pared. De tal manera que, en estos casos, sería de gran valor el análisis de la pared de la espora en tercera dimensión, mediante cortes seriados y la construcción de hologramas computarizados. Hay dos trabajos muy importantes que hacen énfasis en este aspecto y, en muchos de sus resultados, coinciden con los resultados de este trabajo. El más relevante, por tratarse del primer tipo en su género, fue escrito por Neville y Levy (1984) y, diez años después, el de Miller y Jeffries (1994) también único en su género, y que incluye de gran manera este tema. El primer trabajo originó una gran controversia porque, en éste, también se describe el modelo arqueado; la gran diferencia es que es descrito para el alga *Nitella opaca*, donde Neville y Levy mencionan la ultraestructura de la pared celular de esta alga indicando una organización de "montones o pilas" de microfibrillas de celulosa en disposición helicoidal o arqueada, incluidas en una matriz electrodensa. Estos autores mencionan que una helicoide es un múltiplo de capas sobre puestas "plywood" constituidas por capas de microfibrillas paralelas. En éstas hay un cambio progresivo en la dirección de capa a capa, de acuerdo a la inclinación, obteniéndose un modelo arqueado en secciones oblicuas. Lo mencionado por estos autores coincide, en gran medida, con la descripción de los modelos obtenidos de acuerdo con la inclinación, con la cual se crea un efecto visual en el que las microfibrillas adoptan un modelo arqueado. Sin embargo, hay dos aspectos importantes por considerar en los trabajos de estos autores: (1) el modelo helicoidal o arqueado es descrito para esta alga; y (2) los constituyentes químicos ultraestructurales, deben de ser muy diferentes, según sea la pared celular del alga o la de una espora de un hongo (que es una estructura de resistencia). No obstante, las imágenes mostradas en ambos trabajos, al compararlas en las diferentes inclinaciones, coinciden notablemente en su aspecto sub-arquitectónico, y describen el primer modelo helicoidal en un holograma computarizado, que

muestra a fondo el efecto de la forma arqueada. Haciendo referencia a esto, Miller y Jeffries (1994) realizan algo parecido a los autores anteriores, pero con *Glomus geosporum*, obteniendo resultados extraordinariamente similares, tanto en las imágenes del modelo arqueado o helicoidal como en el modelo computarizado.

Dentro de estos resultados, es extraordinariamente sorprendente la recopilación bibliográfica a la que hacen mención Neville y Levy (1984), respecto a las especies de diferente taxa que poseen en su pared el modelo arqueado de microfibrillas orientadas helicoidalmente y que incluyen, cuando menos, 60 géneros de diferentes grupos como son: Chlorophyceae, Phacophyceae, Charophyta, Briophyta, Shenopsida, Filicopsida, Spermatophyta, Gynospermas, y Angiospermas (tanto mono como dicotiledoneas), siendo en estos dos últimos mucho más difundido.

Mosse (1986) menciona que la estructura helicoidal, también se encuentra en algunos crustáceos y artrópodos. La misma autora concluye sobre el aspecto arqueado en las esporas de los HMA, que cada capa mostró el modelo característico de las microfibrillas en forma arqueada y laminar, los cuales son artefactos producidos cuando una estructura helicoidal continua (espiral), es seccionada tangencialmente. Dos arcos corresponden a una hélice o espiral completa. Modelos similares han sido observados en las fibrillas de celulosa de la pared de los tricomas de las raíces. Tales modelos, también, se encuentran en células del hipocotilo y en la cutícula de insectos, constituida por fibrillas de quitina.

Bonfante-Fasolo y Schubert (1986) mencionan que el modelo arqueado depende de la orientación del corte y de la inclinación de la observación, y que este modelo ya había sido descrito por primera vez en el esqueleto de un cangrejo (Bouligard, 1965). Posteriormente, en la oospora de *Chara vulgaris*, una alga Charophyta, descrito por Baynes (1972); en Bryophytas en la parte del meristemo de *Rhacopilum tomentosum*, (Schnepppe et al., 1978); en la epidermis, cortex e hipocotilo de plantas dicotiledóneas (Roland, 1981; Reis, 1981;

Takeda y Shibaoka, 1981); y en monocotiledóneas en la pared de la epidermis, parénquima del tallo, coleoptilo; fibras del esclerénquima, pelos de raíz, y base de las hojas del colénquima, (Pendland, 1979; Parmeswaran y Liese, 1980 y 1981; Satiat-Jeunemaitre, 1981; Juniper et al., 1981; y Ploymaekers, 1980 y 1982). El modelo arqueado de las fibras es solamente un artefacto como coinciden Nivelles y Levy, 1984; Bonfante-Fasolo y Schubert, 1986; Mosse, 1986; y Miller y Jeffries, 1994. Este último autor, enfatiza que este tipo de organización está ampliamente extendido en la naturaleza. Sin embargo, lo peculiar y sobresaliente de estos resultados es que el modelo arqueado o helicoidal, entre todos los hongos hasta ahora estudiados a nivel ultraestructural, solo está presente en los HMA el cual solo ha sido referido a la pared de las esporas. Dentro de los, aproximadamente, 20 tipos de paredes de esporas pertenecientes a las diferentes especies analizadas (de las cuales 12 pertenecen a *Glomus*) por lo menos la mitad de estas últimas más la de este trabajo, presentaron el típico modelo helicoidal o arqueado propuesto por Neville y Levy (1984); Bonfante-Fasolo y Vian (1984); Bonfante-Fasolo y Schubert (1986); y Miller y Jeffries (1994). Además, debido a que la organización o distribución de los arcos en el interior de la pared de todas las especies de HMA fueron diferentes, podemos decir que cada especie tiene su propia huella o "Finger print", que permitiría diferenciarlos entre ellos, y que se basaría en el arreglo de las microfibrillas electro-transparentes las cuales tienen su poder de resolución en aumentos > a 50,000 X; y en cortes ultrafinos (50-80 nm) con inclinación oblicua, preferentemente.

Estos resultados demuestran la gran complejidad de la pared de las esporas, la cual puede ser definida, claramente, por grande aumentos en cortes con diferentes ángulos de inclinación. La información obtenida en este trabajo reúne un cúmulo de experiencia que puede ser útil para la diferenciación taxonómica. Los resultados obtenidos de la morfología de *Glomus mosse*, con el microscopio estereoscópico, óptico y con el de barrido utilizando aumentos de: 50, 800 y 10 000

X, respectivamente, coinciden con las descripciones de esta especie hechas por otros autores (Gerdemann y Trappe, 1974; Walker, 1983; Schenck y Pérez, 1990; Morton y Benny, 1990; Brown y King *IN*: Schenck, 1992; y Morton y Betivenga, 1994). De igual manera, las observaciones realizadas en los cortes transversales y, en parte, los longitudinales con el MET, y a bajo aumento (< 20 000 X) coinciden con las características ultramorfológicas obtenidas por Bonfante-Fasolo, Schubert y Crippiolo, 1985; Bonfante-Fasolo y Schubert, 1986; y Mosse, 1986 para *Glomus mosse*. Estos autores mencionan que, en esta especie, la pared está constituida por una capa externa delgada y otra interna, compacta, con un grosor de 2-7 μ (Gedermann y Trappe, 1974). Las observaciones ultraestructurales mostraron dos paredes diferentes; una exterior, poco electrodensa, de grosor variable y con un contenido bacterino que le causa lisis. La capa interna contiene abundantes fibras electro-transparentes ordenadas y embebidas en un material electrodenso. No se observan capas o láminas y, mucho menos, la forma arqueada, ya que ésta tiene una apariencia homogénea. Sin embargo, en el presente trabajo, los cortes ultrafinos (50-80 nm), oblicuos y con aumentos de 70 000 y 90 000 X, permitieron observar 4 láminas o subcapas de las cuales las dos centrales poseen el modelo arqueado. Esto indica que la espora estudiada en el presente trabajo no pertenece a la especie *mosse* y que, además, este tipo de arreglo arquitectónico de la estructura fina no ha sido descrito hasta el momento. Al comparar con las especies que presentaron el modelo arqueado, en la mayoría de los casos, la laminación helicoidal se observa mejor en la parte externa de la capa interna. Sin embargo, en este caso, fue central por lo que podríamos estar hablando de una nueva especie de *Glomus* perteneciente a las que presentan el efecto del arreglo helicoidal en los cortes oblicuos, como son: *G. epigaeum*; *G. geosporum*; *G. versiforme*; *G. macrocarpum*; y *G. caledonium*, a diferencia de las que no lo presentan como son: *G. mosse*; *G. fasciculatum*; *G. constrictum*; *G. occultum*; *G. fuegianum*; y *G. clarum*. Con base en lo anterior podríamos considerar una subdivisión del género *Glomus* es decir: las especies que contienen el modelo arqueado y las que no lo presentan. Esto permitiría

separar estas dos líneas con un verdadero valor taxonómico y, probablemente, con repercusiones evolutivas (Walker, 1982; 1983; 1986; y 1992; Morton, 1990; Morton y Benny, 1990; Walker y Trappe, 1993; Rosendahl, 1996 ; y Chambers et al., 1996). Este hallazgo podría ser tan importante como el que significó, para la familia Gigasporaceae el que, al estudiar las paredes de estas esporas, se encontraran la existencia de una estructura en forma de escudo, en algunas de sus especies. De tal manera que, las que lo presentaron constituyeron un nuevo género llamado *Scutellospora*, y las carentes de ella el género *Gigaspora* (Walker y Sanders, 1986). Ahora parece ser que *Gigaspora* podría separarse nuevamente, ya que estudios ultraestructurales realizados por Sward (1981 a,b y c); y Walker y Sanders (1986) sobre la pared de estas esporas, a través de su ciclo biológico, muestran una nueva característica relativa a las modificaciones producidas en la estructura fina de la pared durante la germinación. Estos autores mencionan que hay dos tipos de germinación observados en las esporas del género *Gigaspora* Gerd & Trappe; uno representado por *Gigaspora gigantea* (Nicol & Gerd) Gerd & Trappe, en ésta, el tubo de germinación emerge directamente a través de la pared de la espora; el otro tipo esta representado por *Gigaspora calospora* (Nicol & Gerd) Gerd & Trappe. En ésta, se forma una estructura especializada por donde emerge el tubo de germinación, antes de pasar a través de la pared. Este tipo de germinación ha sido descrito como una compartamentación, (Koske, Miller y Walker, 1982; Walker y Sander, 1986; y Sward, 1986). Al respecto, semejantes compartimientos han sido estudiados por Mosse, 1970 solo que, en observaciones de esporas pertenecientes al tipo sesil color miel "Honey-coloured sessile" hoy clasificada como *Acaulospora laevis*, perteneciente a la familia Acaulosporaceae. En esta última, también el análisis por MET está aportando más elementos que permitan tener nuevos conceptos taxonómicos en los Glomales. Así, el modelo arqueado o helicoidal presente en la pared de la mayoría de las especies del género *Glomus*, hasta hoy estudiadas, podrían separar a éste, en dos grupos o crear un nuevo género, (como el caso de *Gigaspora* y *Scutellospora*) con su especie holotipo ya que,

aproximadamente, el 50% de las especies estudiadas presentaron este modelo. Al respecto, Morton (1990) menciona la ontogenia de las esporas en la familia Glomaceae; según sus estudios más recientes. En especies con una estructura laminar en la capa interna, las esporas se forman por la expansión de la punta del esporoforo "the sporophore tip" y con el gradual engrosamiento y la madurez. La pared no reacciona con el reactivo de Melzer's. Consecuentemente, más trabajos son necesarios para aclarar la secuencia ontogénica dentro de las especies del género *Glomus*, con una mayor diversidad en estructuras en las paredes. Walker (1992) Indica que *Glomus* debe ser considerado como un género polifilético, por lo que es necesaria su revisión.

Los estudios ultraestructurales de varias especies de *Glomus* realizados por: Bonfante-Fasolo y Vian, (1984); Bonfante-Fasolo y Schubert, (1987); Yao et al., (1992); y Miller y Jeffries, (1994), tienen una gran importancia en el entendimiento de la estructura de la pared de la espora en este género, pero se requieren muchos más estudios para completar la apariencia del mural arquitectónico en detalle. Por ejemplo, en muchas especies un arreglo helicoidal de microfibrillas dentro de las láminas de la capa interna, han sido demostradas y, en otras especies, este modelo helicoidal no es evidente (Mosse, 1986; Bonfante-Fasolo y Schubert, 1986). Esto nos sugiere que la arquitectura de la pared difiere dentro del género. En este caso, los resultados obtenidos con el microscopio estereoscópico, óptico y MEB, y los obtenidos por la Dra. Dalpe, dieron un 80% de seguridad de que las esporas analizadas en el presente estudio pertenecen a *Glomus mosse*; sin embargo, el 20% restante corresponde a la información obtenida con el Microscopio electrónico de transmisión que indica que las esporas sí pertenecen al género *Glomus*, pero no a la especie *mosse*. Esto ratifica la importancia del análisis de la pared con MET, para la taxonomía y todas sus implicaciones (reproducción, desarrollo, adaptación, especiación, distribución, ecología, biogeografía, coevolución, biología molecular, etc). Lo antes expuesto nos hace recapacitar

en lo mucho que falta por investigar de estos hongos, sobresaliendo, entre otros aspectos, su taxonomía la cual tiene aún puntos confusos que requieren ser aclarados (Koske y Walker, 1985; Walker, 1982, 1983, 1986 y 1992; Morton, 1986, 1990; Morton y Benny, 1990; Walker y Trappe, 1993; Rosendahl, 1996; y Chambers, 1996). No obstante, actualmente los grupos taxonómicos son reconocidos y ordenados por características morfológicas estables y discretas (Morton y Betivenga, 1994).

Las características morfológicas del micelio y de las esporas de los glomaceos, contienen suficiente información para jerarquizar el orden de las especies en un árbol filogenético (Morton, 1990) y definir grupos taxonómicos (Morton y Benny, 1990). La diversidad puede estar confinada a nivel subcelular en la organización, dentro de una variación discreta y expresada en la pared de la espora, reconocida entre todas las 150 especies (Morton, 1988; Schenck y Pérez, 1990). Las familias y los géneros, dentro de los glomales, difieren en la estructura con las que fueron originadas las esporas, al igual que el arreglo de estas últimas como, probablemente, sus micelios y el tipo de colonización. (Morton, 1988; Bonfante-Fasolo y Schubert, 1986; Mosse, 1986; Morton y Benny, 1990).

Las esporas de todos los Glomales, se desarrollan en dos fases: (1) la espora se expande completamente con una diferenciación a nivel subcelular; y (2) la síntesis de 1, 2 ó mas paredes internas, flexibles, de origen independiente de la pared, pueden ser reconocidas e interpretadas. Las características de las estructuras dentro de la espora incluyen diferentes elementos estructurales nuevos, que se han ido incluyendo en la terminología de las características con valor taxonómico (Walker, 1983, 1986, 1992; Bonfante-Fasolo, Schubert y Crippiolo, 1985; Bonfante-Fasolo y Schubert, 1986; Mosse, 1986; Morton, 1988; Yao et al., 1992; Miller y Jeffries, 1994). La teoría de que la ontogenia recapitula a la filogenia, se cumple sólo cuando nuevas características son agregadas para términos adicionales (Gould, 1977). Cuando los períodos en

diferentes taxas son considerados homólogos, pueden ser arreglados jerárquicamente por análisis cladístico (Wiley, 1981). La nueva nomenclatura basada en las aportaciones de las observaciones de la pared con el MET, refuerzan todos estos puntos o conceptos mencionados anteriormente, pudiéndose adicionar una casi ilimitable experimentación que se puede realizar con este maravilloso instrumento científico, con el que se ha podido lograr la identificación química cualitativa y cuantitativa; como ha sido propuesto por Bonfante-Fasolo y Grippiolo (1984) en su "Cytochemical and Biochemical Observations on the Cell Wall of the Spore of *Glomus epigaeum*", donde identificaron las fibras de quitina, polisacáridos, proteínas, esporopolenina y melanina dentro del modelo arqueado, como, también, trabajos con isoenzimas (Chambers et al., 1996), y mas recientemente, la variación dentro de los hongos endomicorrízicos arbusculares, al ser examinados usando la amplificación de porciones de los genes ribosomales y, subsecuentemente, el análisis de la secuencia que ha proporcionado una gran información sobre un número de taxas (Bruns, Fogel y Taylor, 1990; White, Bruns, Lee y Taylor, 1990; Gardes y Bruns, 1993; Simon, Lalonde y Bruns, 1992; Simon, Levesque y Lalonde, 1992) . De esta manera, se demuestra una vez mas la gran utilidad del MET, para la investigación de estos organismos, desde nivel ultraestructural hasta el molecular, para conocer la arquitectura fina, tanto de la pared de las esporas como del micelio y, de este último, de la manera como se describe a continuación.

3.4 Hifa Sustentora de la Espora.

3.4.1 Zona Superior del Embudo.

3.4.1.1 corte transversal.

Las observaciones realizadas en estos cortes, permitieron conocer la ultramorfología interna de las paredes que constituyen la parte apical y basal de la llamada "hifa sustentora en embudo". Esta estructura es de gran importancia taxonómica, particularmente para

la identificación de los géneros de los hongos arbusculares. No obstante, los estudios a nivel ultraestructural son muy escasos. La realización y obtención del seccionamiento de las estructuras, en cortes ultrafinos es una tarea ardua y difícil, debido a: (1) la orientación de la estructura en el ultramicrotomo; y (2) la dificultad para la obtención de cortes seriados debido a lo siguiente: (a) el tamaño muy pequeño de las estructuras y la dificultad para observarlas; y (b) la obtención de buenos cortes seriados (de gris a gris claro) ya que, estas son muy duras.

Los cortes obtenidos variaron del color dorado a plateado, siendo los últimos los más numerosos, por lo que se podría decir que el grosor fluctuó entre 80 y 60 nm. La parte de esta estructura que hace contacto con la espora, es la parte más ancha del embudo, y tiene una forma que varía de redonda a ovalada, como una rosca o dona, con un diámetro, aproximadamente, de 14μ , y con una pared de un grosor que varía de 2.5 a 3μ (Fig. 37). Se pudo observar la capa evanescente, aunque solo a intervalos, como en los casos anteriores. La pared se observó laminada a 3 000 X, haciéndose notorias y claras 4 subcapas a 15 000 X. Las cuales señalan en la pared una zona interna constituida por 3 subcapas o láminas de, aproximadamente, 0.7μ cada una; lo que da 2μ en total, y otra externa de 1 micra, aproximadamente. Las láminas o subcapas de la zona externa se diferencian notablemente, por ser más compactas y electro-densas; en tanto que en las láminas de la zona interna, se distinguen las ultramicrofibrillas las cuales son electro-transparentes (Fig. 37).

Los resultados obtenidos revelaron información nueva e importante sobre la ultramorfología interna de la pared de la estructura llamada "*hifa sustentora en forma de embudo*", encontrándose que, desde un punto de vista cualitativo, esta estructura y la espora están constituidas del mismo material. En ella se observan las cuatro láminas o subcapas que constituyen la capa interna de la pared de la espora. Por lo que podemos decir que el micelio externo se inicia, en este caso, en la hifa sustentora, presentando casi las mismas características arquitectónicas de las esporas o estructura de

resistencia. Esta característica refleja su función de estructura sustentadora o sujetadora de la espora en desarrollo; ya que de su resistencia depende la sustentación de la espora aún en contra de procesos mecánicos o de fractura. Por otra parte, el contenido citoplasmático se observó granular y adosado a la periferia de la parte interna de la pared. El centro está totalmente ocupado por vacuolas vacías que, probablemente, contenían gotas lipídicas las cuales, quizá, fueron extraídas por los solventes durante el procesamiento para su posterior observación (Fig. 37).

3.4.2 Zona Inferior del Embudo.

3.4.2.1 Corte transversal.

Los resultados revelaron una estructura circular de, aproximadamente, 7μ de diámetro, con una pared de 1.5 a 2μ de grosor, cuyas características químicas son similares, desde un punto de vista cualitativo. Además, el arreglo ultramorfológico proporciona información importante. A $3\ 000 \times$ no se observa la capa evanescente; la pared se presenta laminada. A $15\ 000$ se observa con claridad, que la pared presenta una zona externa y una interna; la externa es multi-laminada, en tanto que la interna es compacta. En 7 cortes de diferentes esporas no se observó la capa evanescente (Fig. 38).

Si comparamos los componentes ultramorfológicos observados en la parte superior de la pared de la hifa de sujeción con los de la inferior, (la cual tiene forma de embudo como es característico en el género *Glomus*), se distinguen aspectos muy importantes como son: (a) la ultra-morfología de la zona interna en ambas paredes la cual es totalmente diferente; (b) el grosor de las paredes que es muy diferentes, ya que la parte superior de la estructura, en forma de "embudo", es dos veces más gruesa que su parte inferior; (c) la morfología de las ultramicrofibrillas electro-transparentes se

observa diferente; en la parte superior, su morfoestructura se aprecia a todo lo ancho de la pared, en tanto que en la parte inferior es poco visible debido a que el material es muy compacto; y (d) el área citoplasmática en la cual se aprecian diferencias siendo mucho mayor en la parte inferior (Figs. 37 y 38; parte superior e inferior de la estructura, respectivamente). Estos resultados denotan un cambio ultra-morfológico a lo largo de la estructura de sostén, lo que denota, claramente, el inicio del micelio externo a partir de la parte inferior de la estructura en forma de embudo. Este cambio puede corresponder a dos características muy importantes: (1) el hecho de que la parte superior de esta estructura sea el material más resistente de todos los materiales hasta el momento cortados; (2) el paso del citoplasma es mucho más angosto en esta parte, observándose mucho más vacuolado; y (3) las características ultramorfológicas de ambas partes de la estructura, denotan una función fisiológica diferente, particularmente, entre la estructura de una morfología de alta resistencia de la parte superior y la del inicio del cuerpo hifal externo, con función de transporte (Figs. 37 y 38).

3.4.3 Zona Central del Embudo.

3.4.3.1 Corte Oblicuo.

La ultraestructura morfológica de la pared de la parte media o central de la estructura de sujeción de la espora (en 5 cortes obtenidos de 9 muestras) mostraron, a bajo aumento, (3000-8000 X) una estructura redonda u ovoide en forma de rosca que, por el efecto del corte oblicuo, se observó ovalada, de aproximadamente 6 a 7 μ , constituida por la capa evanescente y una pared con un grosor aproximado de 1.5 a 2 μ , compacta en la que no se observan las ultramicrofibrillas electro-transparentes. A 40 000 X las observaciones en la pared permitieron distinguir dos zonas: (1) una externa, donde se definen muy claramente las ultramicrofibrillas

electro-transparentes; y (2) otra interna multilaminada (Fig. 39). A 110 000 X, se observaron características muy importantes, ya que la zona externa de la pared se encontró constituida a su vez por 4 subcapas, multilaminadas, muy finas, entre las cuales se encuentran embebidas las ultramicrofibrillas electro-transparentes, las cuales son muy abundantes y finas por lo que, esta zona, se observó compacta y homogénea a aumentos intermedios (de 20,000 a 50,000 X) pero, a mayor aumento, (de 100,000 a 150,000) se denotan o delínean claramente, 4 subcapas o láminas (Fig. 40). Estas capas, miden de ancho cada una de ellas, de la externa a la interna, aproximadamente: 200; 250; 400; y 200 nm, respectivamente, obteniéndose un diámetro total, de la zona externa de la pared de, aproximadamente, 1 μ (Fig. 40). Por otra parte, la zona interna, está constituida por 6 subcapas cada una de ellas multilaminada, pero con muy distinta electronegatividad, e intercaladas densas con claras, cuya anchura de la externa a la mas interna es, aproximadamente, de 250; 50; 150; 50; 150; y 200 nm, respectivamente. El diámetro total de la zona interna de la pared fue, aproximadamente, de 1 micra es decir, que ambas zonas, externa e interna, son del mismo diámetro; sin embargo, la ultra-morfología es totalmente diferente y forman una pared de, aproximadamente, 2 μ de grosor (Fig. 40). Las características ultramorfológicas llaman mucho la atención en varios aspectos: (a) las capas laminadas, son gruesas y muy electro densas, intercaladas con láminas finas electro-transparentes; (b) conforme la laminación tiende hacia la parte interna, las subcapas electro densas disminuyen; y (c) la subcapa más externa y la más interna, son totalmente diferentes, ya que esta última no presenta laminación electro-densa y, por tanto, tiene muy poca electro-densidad, en comparación con la subcapa externa la cual está totalmente multilaminada y con una muy fuerte electrodensidad (Fig. 40). Si se analiza el total de la imagen de la pared, se observan dos aspectos importantes: (1) en la zona externa de la pared, llaman la atención los espacios o huecos donde se encuentran situadas unas estructuras cuya forma varía de redonda a ovoide, parecidas a bacterias (Figs. 39-41); y (2) la ultramorfología total recuerda las características

arquitectónicas de la capa interna de la pared de las esporas de otras especies de *Glomus* (*G. intraradices* in: Rosendahl, J.C. et al., 1994), las cuales tienen gran semejanza con la Figura 40, donde se observa la hifa de sujeción. Este hecho puede ser de suma importancia en la taxonomía de los Glomaceae, ya que estas características o apreciaciones podrían contribuir con información nueva, debido a la similitud de estas dos estructuras diferentes, pero homólogas porque ambas son de resistencia y, filogenéticamente, pudiera reconocer alguna conexión entre las diferentes especies de *Glomus*. La hifa sustentora o de sujeción, además de su anatomía, (la cual, de por sí, separa los géneros) su ultraestructura podría diferenciar las especies contribuyendo a su identificación. Esta estructura, a nivel óptico, proporciona una gran cantidad de información ya que, a este nivel, se ha estudiado mucho su taxonomía pero, a nivel ultramorfológico la información es mucho muy escasa. De los 13 artículos existentes sobre ultramorfología de la pared de las esporas de los Glomaceae, solo uno tiene información al respecto y ésta es escueta. Por otra parte, a la altura de la estructura de embudo, en el área citoplasmática, llama la atención la presencia de estructuras esféricas electro-densas de difícil identificación, pero muy interesantes debido a su gran abundancia (las cuales aparecieron en 5 cortes de 7 muestras diferentes, Fig. 41). Respecto a esto último, Miller y Jeffries (1994), mencionan que, en sección longitudinal, atravesando la hifa de sujeción de la espora, observaron bacterias en el lumen de la hifa de sujeción, empaquetadas junto con el contenido celular. Por otro lado, en el presente trabajo se observó un septo continuo con una capa electro-densa en el lado interno de la pared interna. La separación de las bacterias del contenido de la espora es visible. A pesar de que éstas son la única información obtenida de esta estructura, es de gran importancia en los dos aspectos mencionados: (1) que, en ambos trabajos, se observó la presencia de bacterias libres y en paquetadas tanto en el contenido celular como en el interior de la pared; y (2) que en la estructura de sujeción de *G. geosporum*, se presentó un tabique de separación; en tanto que en la de este trabajo no lo hay o está en

desarrollo, probablemente debido a la temprana edad de la espora (1 mes) en comparación con la edad de una espora madura (4 meses).

3.5 Micelio Externo.

3.5.1 Micelio Grueso.

3.5.1.2 Corte transversal.

El corte transversal del micelio externo, en este caso representado por dos tipos de hifas que constituyen el cuerpo del hongo fuera de la raíz, fue de 1μ de diámetro o sean las llamadas "hifas delgadas"; y de 5μ las que constituyen el grueso del cuerpo llamadas "hifas gruesas". Estas últimas, que forman el "tallo" del hongo mostraron, a 10 000 X, una pared constituida por una cubierta delgada muy electrodensa y, por debajo de ésta, la pared mucho menos electrodensa que la anterior, pero mucho mas gruesa. A 20 000 X, la pared, se observa más electro-densa, partiendo de la parte externa hacia el centro; y de aquí a la parte más interna se observó menos electrodensa. A 40 000 X se observan, con una gran claridad, la cubierta y la pared; la cubierta exterior es de, aproximadamente, 0.1μ , constituida de varias microfibrillas finas electro-densas, apiladas y muy compactas (Fig. 42). Esta capa exterior parece tener similitud con la capa evanescente de la espora, pero es mucho más delgada, fina y frágil ya que, aunque se observa rodeando toda la pared, solo se conservaron muy pocos fragmentos en todos los 15 cortes obtenidos de diferentes hifas de 5μ de diámetro. La pared, con un grosor de 1 micra, está constituida en su interior por 6 subcapas de diferente grosor siendo, de la externa a la interna de, aproximadamente: 80, 130, 170, 120, 270 y 230 nm de ancho, respectivamente (Fig. 42). A 80,000 X en la pared de la hifa, se observaron, perfectamente, las 6 subcapas o láminas que la forman (Fig. 43). Las tres subcapas o láminas externas son difíciles de diferenciar entre ellas, sin embargo, hay partes en las que se observaron delimitadas por líneas mas electrodensas, que permiten

diferenciarlas. En tanto que las subcapas internas 4, 5 y 6, se delínean perfectamente y se muestran menos electrodensas. Al respecto, es importante hacer resaltar que en la pared total se observan dos zonas: (1) la primera integrada por las tres primeras subcapas, que constituyen la parte externa, las cuales son más electro-densas que las tres que constituyen la zona interna; y (2) tanto la parte interna como la externa se constituyen de tres subcapas o láminas dispuestas en orden creciente por su grosor. Estas características nos permitieron diferenciar las dos zonas, la parte externa y la interna. El interior de las láminas está constituido por microfibrillas electro-transparentes dispuestas en varias direcciones y entrecruzadas unas con otras, a manera de una red, que constituyen el esqueleto filamentosos embebido en un material electro-denso que es la matriz. Estos materiales ultraestructurales son muy parecidos a los observados en el interior de la capa interna de las paredes de sus esporas. Sin embargo, en este caso, la pared de la hifa parece mostrarse más compleja debido a: (1) la capa externa que es mucho más fina y muy fácilmente desprendible o frágil, en comparación a la homóloga evanescente de la espora; (2) la pared de la hifa que presentó 6 subcapas en tanto que la espora 4; y (3) el hecho de que en la pared de la hifa se haya delimitado una zona externa y una interna por su diferente electrodensidad, aún cuando ambas zonas hayan presentado el mismo grosor (1 micra).

Por otra parte, si correlacionamos ambas paredes, es decir, la de la espora y la de la hifa, podríamos mencionar que: (1) los cortes transversales de las esporas, observados desde 5,000 a 15,000 X son muy parecidos a los cortes de la pared de la hifa observada con aumentos de 15,000 a 30,000 X; ya que ambas estructuras presentaron una capa externa electro-densa constituida de ultramicrofibrillas dispuestas paralelamente, y formando láminas finas fácilmente desprendibles; las paredes se observaron gruesas y compactas, constituidas por microfibrillas electrotransparentes dispuestas en forma de una red dentro de una matriz electrodensa, de un material amorfo; y (2) si comparamos los cortes tangenciales y los oblicuos

de las esporas, con aumentos de 20,000 a 30,000 X, con los transversales de las hifas, pero con aumentos de 40,000 a 80,000 X, podemos observar en ambos: (a) una disposición laminar o subcapas en el interior (4 en la espora y 6 en la hifa); (b) zonas electrodensas (3 en la pared de la espora y 3 y 2 en la hifa) ; y (c) las microfibrillas electro transparentes y densas que son de una apariencia muy semejante (compárese Fig. 32; 9-11 según las manecillas del reloj, y la de la hifa, Fig. 43). De esta comparación se puede concluir que desde un punto de vista cualitativo, no hay diferencia en cuanto a su composición y arreglo ultramorfológico. Estos primeros resultados indican, que las hifas de 5 μ constituyen el tronco principal del hongo externo y son las que dan origen y soporte a las esporas. El que no haya grandes diferencias puede deberse a que esta estructura da origen a la pared de la espora y a que el tiempo transcurrido a partir de que se inicia la expansión de la hifa para formar la espora y el inicio del desarrollo de la misma, es tan solo de 1 mes. Por lo que, ambas, comparten muchas características. No obstante, tanto, el modelo arqueado en la capa interna de la pared de las esporas, como el de la laminación de las hifas son exclusivos, y su contenido es diferente existiendo, en la espora, una alta concentración de gotas lipídicas en el citoplasma y el de la hifa con aspecto totalmente vacuolado y con el citoplasma replegado en la periferia. En este caso, se distinguen dos estructuras de forma esférica u ovoide, parecidas a bacterias de 1 a 1.5 μ de diámetro, con una pared electrodensa y con un contenido cuya apariencia varía de granular a reticular electro-densa (Figs. 42 y 43). Al respecto, Bonfante-Fasolo (1984) menciona que, en la organización citológica del hongo, las hifas poseen pequeños núcleos, mitocondrias y grandes vacuolas. Usualmente contienen, también, gránulos de polifosfatos, gotículas de lípidos y glucógeno y, en algunos casos, orgánulos semejantes a bacterias, con función aún no establecida. Bonfante-Fasolo (1987 y 1988) indica que la estructura de la pared del hongo es de apariencia fibrilar siendo, en la mayoría de los casos, semejante a las estructuras de las esporas, por lo que su ontogénesis, tendría importancia como carácter taxonómico.

Nicolson, (1975) y Walker (1987), mencionan que el estudio de la pared de las esporas de los HMA, a nivel de microscopía electrónica, debe de tener una gran importancia taxonómica.

3.5.1.2.3 Corte Oblicuo.

Estos cortes, fueron obtenidos del micelio externo en una zona alejada de las esporas y de las partes apicales de las hifas (sitio donde se forman las esporas). Estas hifas que se encuentran entre la raíz y las esporas, presentaron el mismo diámetro (5μ) y las características morfológicas externas antes mencionadas. Los cortes fueron difíciles de obtener por el grado de dificultad en la inclinación, y por la dureza del material; sin embargo, debido a su tamaño pequeño fue más fácil que las esporas y que la hifa de sujeción. De los 11 cortes obtenidos de 7 diferentes muestras, 8 fueron de un color que varió del dorado al plateado (60-150 nm) y 3 del plateado al gris (50-90 nm).

Las observaciones de estos cortes, a 40 000 X, permitieron detectar restos de la capa evanescente, igual a los descritos anteriormente, y la pared multilaminada y compacta. A 60,000 X, se observaron varios rasgos, uno de ellos es la ultramorfología y distribución de las microfibrillas electro-transparentes que se observan en diferentes disposiciones, desde la parte más externa a la más interna de la pared (Fig. 44; lado derecho). Por otra parte, se pudo observar, claramente, que la pared está constituida por 3 subcapas multilaminadas las cuales, de la más externa a la más interna, son de, aproximadamente: 800; 800; y 500 nm, respectivamente; lo que dió un grosor de, aproximadamente, 2μ , y reflejó el ángulo de inclinación, ya que esta pared es realmente la mitad (1 micra). Sin embargo, esta inclinación permitió una mayor extensión del corte y, por tanto, una mayor área de observación (Fig. 44; lado izquierdo). En relación a esto último, en esta misma Fig. 44 (suponiendo las manecillas del reloj) en la Fotomicrografía, de las 3 a 6, en la capa más externa, se observaron tres disposiciones

o arreglos de las ultramicrofibrillas electro-transparentes, de las cuales se distinguen, aproximadamente, 3 láminas muy tenues (Fig. 44; de 7-8 en el reloj). En la segunda subcapa (o intermedia) de la pared, las ultramicrofibrillas electro-transparentes son mucho más abundantes y grandes, con tres disposiciones que delínean tenuemente 3 láminas (Fig. 44; situadas según el reloj de 7-9). Y en la tercera capa (o la más interna) las microfibrillas electro-transparentes se observan, enmarañadas situadas, según el reloj de 3 a 6, y de 6 a 10, y delineando 4 láminas tenuemente (Fig. 44). En la parte interna, se observó una línea muy electro-densa seguida de una electro-transparente y la última, electro-densa pero mucho más delgada y, finalmente, el citoplasma (Fig. 44). Otro aspecto que llamó mucho la atención fue la presencia de bacterias, de forma esférica a ovoide de, aproximadamente, 0.5μ con pared gruesa y electro-densa, localizadas en cavidades o cavernas en las que se alojan dos o tres bacterias; cuando el grosor del corte no las alcanza, en su lugar, aparecen las cavidades vacías (Fig. 44).

Por otra parte, si analizamos las Fotomicrografías 43 y 44, correspondientes al micelio externo grueso o "tronco", podemos observar que la zona externa de la hifa, cercana a las esporas (Fig. 43) es la correspondiente a la primera capa externa (de la hifa central (Fig. 44), donde se observaron tres disposiciones diferentes de las microfibrillas (de 3 a 6 en el "reloj"; Fig. 44) y su posterior delineamiento tenue (7 a 8; Fig. 44). La capa central y la más interna, 800 y 500 nm, respectivamente (Fig. 44), corresponde a la zona interna de la Fig. 43. Es decir, que ambas estructuras son congruentes y permiten observar el modelo arquitectónico, a diferente ángulo, lo que aporta una mayor información para el reconocimiento del "Finger print" o "huella digital" del murograma de la pared del micelio externo. De esta manera, podemos explicar que la fina y tenue laminación de la zona externa (Fig. 43) es debido al tamaño más fino de las microfibrillas electro-transparentes, con tres distintas orientaciones (Fig. 44). La zona interna es mucho más visible (Fig. 43) debido a que las microfibrillas se observan de mayor calibre que

las anteriores (Fig. 44); observándose, perfectamente, 2 subcapas laminadas y distinguiéndose tenuemente de 3 a 4 láminas.

3.5.2 Micelio Delgado.

3.5.2.1 Corte transversal.

Estos cortes pertenecen al cuerpo hifal externo llamado, en el presente trabajo "**hifas delgadas**", cuyo diámetro y grosor de la pared son de, aproximadamente, 2 y 0.5 μ , respectivamente. En la pared se observó la capa evanescente, similar a la mencionada anteriormente, la pared se observó dividida por una línea electro-transparente que delimita la pared en, zona externa y zona interna; en esta última se observaron muy claramente las microfibrillas electro-transparentes (Figs. 45 y 46). Aparentemente, la ultramorfología de la pared de estas hifas delgadas es menos complicada y su pared es mas delgada, que las anteriores (5 μ); sin embargo, guardan una gran similitud (Figs. 42-44 y 45-46) lo que indica una continuidad ultraestructural con sus pequeñas variantes, de acuerdo al punto de localización del cuerpo del micelio externo (espora, hifa de sujeción, hifa gruesa y delgada).

3.5.2.1.2 Corte oblicuo.

Se observó claramente, la capa evanescente y la pared finamente multilaminada (ver cortes seriados Fig. 47 A y B), con este ángulo de corte, no se observó la línea divisoria antes mencionada. Sin embargo, se observaron perfectamente las microfibrillas a todo lo ancho de la pared y, por otro lado, llaman la atención las estructuras esféricas electro densas, no identificadas (Figs. 45 y 46). En la pared, a 180,000 X, se pudieron observar espacios cavernosos o cavidades, que contienen estructuras esféricas,

electrodensas de 300 a 600 nm (Fig. 48). Estas recuerdan, a las estructuras encontradas también en cortes oblicuos del micelio externo grueso (Fig. 44), por lo que pudiera existir alguna correlación, entre ambas estructuras y el tipo de bacterias que se albergan en su ultraestructura (Figs. 44 y 48). En cuanto a su función y actividad fisiológica, no hay suficiente información sobre la morfología de la ultraestructura del micelio externo, debido a que la mayoría de los estudios durante los últimos 15 años, han sido enfocados a la estructura y ultra estructura de las esporas. Los trabajos, sobre el micelio son aún muy pocos por lo que falta mucha información al respecto. Sin embargo, en el presente trabajo queda, de manera preeliminar, descrita la ultramorfología de las hifas principales del micelio externo, en la parte apical, desde el inicio del desarrollo hasta la completa formación de la espora como una estructura nueva de resistencia; en este caso, se trató de esporas tempranas (1 mes); la hifa de sujeción o sustentora; y el cuerpo en sí (5 meses). De esta manera, se puede mencionar que la información obtenida, además de ser nueva en muchos aspectos, como lo relativo a la pared y el crecimiento hifal, pretende contribuir al conocimiento del estudio de la estructura de las paredes hifales particularmente en las características que pueden ser rasgos específicos, con atributos para resolver los problemas taxonómicos, así como en los procesos asociados al crecimiento. La información publicada sobre la ultraestructura de las hifas sustentoras y micelio externo es muy escasa. Asimismo, son muy pocos los artículos sobre el estudio de esporas de *Glomus* estudiadas a través de diferentes tipos de cortes. Es por lo tanto necesario realizar estudios que incrementen la información sobre la ultraestructura y su crecimiento que permitan aclarar, por lo menos, los 5 puntos importantes que a continuación se indican:

- (1) la arquitectura estructural y ultraestructural de las paredes y su composición.
- (2) la naturaleza química de los componentes de la pared, su

arquitectura molecular y sus relaciones químicas.

- (3) los procesos biosintéticos relacionados con la síntesis y el transporte de precursores, la transferencia de los metabolitos y su sitio final de incorporación.
- (4) la regulación e integración de los procesos relacionados con la diferenciación de las paredes.
- (5) variaciones de los aspectos antes mencionados en función del genotipo, condiciones del medioambiente y edad.

1.2 La Colonización en la Raíz.

1.2.1 microscopía óptica.

La parte del hongo arbuscular que se desarrolla dentro de la raíz, llamado micelio interno, está constituido por tres estructuras que son: (a) el cuerpo hifal del hongo con forma filamentosa y no tabicado, cuya función es la difusión y transporte de los nutrimentos; (b) las vesículas, que pueden no estar presentes, que se forman de la división dicotómica de una hifa la cual se dilata y adquiere una forma globosa; éstas tienen función de almacenamiento de nutrimentos para el hongo, las cuales, en algunas especies, pueden llegar a transformarse en esporas internas; y (c) los arbúsculos que se forman en el interior de las células radicales a partir de una hifa la que, por medio de múltiples y finas divisiones dicotómicas en el interior de la célula huésped, da origen a una estructura arboriforme, la cual lleva a cabo la función de intercambio de nutrimentos entre el hongo y la planta. Estas estructuras (descritas por Abbott y Robson, 1984; y estudiadas por: Buwalda et al., 1984; Cooper, 1984; Bonfante-Fasolo, 1984 y 1987; Bonfante-Fasolo y Fontana, 1985; Amijee, Stribley y Tinker, 1986; Lackie et al., 1987;

entre otros autores) pudieron ser observadas con gran claridad, después de aplicar la técnica de aclareo y tinción a la raíces colonizadas (Figs. 49-52).

Aunque durante el desarrollo de la MA tienen lugar una serie de cambios anatómicos y citológicos en la raíz, la expresión morfológica de éstos, normalmente, no se detecta a simple vista. Quizá por ello, la simbiosis ha sido ignorada en estudios sobre fisiología de la planta cuando, realmente, forma parte de la misma y el micotrofismo es, para el vegetal, la forma habitual de adquisición de nutrimentos minerales.

Los dos simbioses conviven, biotróficamente de forma persistente, mostrando un nivel de compatibilidad fisiológica y morfológica extraordinaria. El hongo solo coloniza la epidermis y el parénquima cortical de la raíz con estructuras primarias, sin penetrar en la endodermis ni en el cilindro vascular. Ello indica un control específico del biotrofismo (Figs. 51 A,B,C y 52).

Como resultado de la integración morfológica del hongo y la raíz, se desarrolla un componente importante del sistema de adquisición de nutrimentos por la planta; una parte lo constituye la fase extrarradical de la MA, consistente en una red tridimensional de hifas que coloniza el suelo en torno a la raíz, el llamado micelio externo (ya estudiado anteriormente), y la fase intrarradical o micelio intramatricial, al que se enfoca el siguiente estudio, y que consiste en hifas intercelulares e intracelulares, que pueden estar ramificadas o no, vesículas y arbusculos. Estas dos últimas estructuras dieron origen al nombre anteriormente utilizado de MVA (vesículo-arbuscular) ya que, actualmente, únicamente se considera micorriza arbuscular (MA) por ser éste, el carácter más constante (Figs. 49-52).

La fase intrarradical o micelio interno, se desarrolla a partir de la colonización de la raíz después de que el tubo de germinación de una espora o cualquier otro propágulo viable del hongo MA forma

un "apresorio" y penetra (Figs. 49 A-C).

El hongo, al establecer contacto con la raíz, expresa un mecanismo de reconocimiento mediante el ensanchamiento apical de la hifa que tocó la superficie de la raíz, formando un punto de entrada llamado "apresorio" a partir del cual se origina la hifa de penetración (Figs. 49 A y B). Al respecto, Harley y Smith (1983) mencionan que esta hifa puede pasar por los espacios intercelulares; lo normal es que penetre la pared de las células epidérmicas o la de los pelos radicales (Bonfante-Fasolo, 1984). Se sabe que el sitio de penetración debe ser fisiológicamente activo. Concretamente, el hongo no penetra por heridas ni zonas en las cuales la raíz este dañada (Hayman, 1983). Los mecanismos de penetración del hongo en la raíz no están aún definidos. Se ha sugerido que puede tratarse de un proceso meramente mecánico, mediante la presión ejercida por la hifa de penetración. Sin embargo, la participación de enzimas producidas por el hongo durante el proceso de penetración no puede ser descartada; aún cuando este hecho no se haya puesto de manifiesto. Debido a que la producción debe ser muy baja, por la limitada capacidad saprofítica del hongo existen dificultades para detectarlas (Harley y Smith, 1983). Sin embargo, también, hay que tener en cuenta que, cuando se tratan paredes celulares con dosis bajas de enzimas hidrolíticas, se produce un incremento considerable en la porosidad de las mismas sin dañar su estructura (Baron-Epel et al., 1988), Figs. 49 A-C,. La hifa de penetración se extiende, avanza por entre las células de la epidermis o a través de ellas, hacia la corteza de la raíz. En la zona mas externa de ésta el hongo, frecuentemente, forma "ovillos" intracelulares (de hifas no ramificadas), que llenan el lumen de la célula (Fig. 49 D). Tanto en este caso como en los demás tipos de colonización intracelular, el plasmalema de la célula colonizada no es perforado por el hongo, sino que se invagina en torno a él, dando lugar al desarrollo de interfases (Harley y Smith, 1983; Bowen, 1987; Schenk, 1991; y Sieverding, 1991). La hifa colonizadora alcanza la corteza media a través de los espacios intercelulares o por paso de célula a célula y, una vez allí, se ramifica y crece longitudinalmente dilatando los

espacios intercelulares (Figs. 49 E y F). Bonfante-Fasolo (1984) menciona que estas hifas, usualmente llevan asociados restos de la laminilla media, lo cual sugiere la participación de un mecanismo enzimático en la penetración del hongo.

Cuando el hongo alcanza la corteza interna continúa desarrollándose longitudinalmente y emite, con frecuencia, ramificaciones laterales, algunas de las cuales penetran intracelularmente para dar lugar a los arbúsculos o vesículas (Figs. 49 E, F y 50 A-D). Buwalda, Stribley y Tinker (1984) mencionan que las vesículas pueden ser intercalares o terminales e inter o intracelulares, contienen gran cantidad de glóbulos lipídicos y son órganos de reserva (Harley y Smith, 1983; y Bowen, 1984). En este trabajo, se pudo observar el inicio de la formación de las vesículas a los 45 días después del inicio de la colonización la cual ocurrió, aproximadamente, a los 15 días posteriores a la emergencia del huésped (Fig. 49 F). Estas estructuras se observaron como glomérulos de, 5 y 12 μ de diámetro, a manera de salientes laterales del hongo, con un diámetro de 3 a 5 μ , y divisiones dicotómicas a intervalos irregulares. Las vesículas en desarrollo se observaron, cualitativamente, en el interior de la célula huésped (Fig. 49 F). Después de 40 días de desarrollo, alcanzaron entre 30 y 40 μ de diámetro; paralelamente, se inicia el desarrollo de las esporas en el micelio externo (de 15 a 20 días antes del inicio de la floración del huésped) observándose un efecto de hipertrofia en la pared del huésped. La presión que ejerce el crecimiento de la vesícula en el "interior" de la célula huésped, sobre sus paredes, se observó en campo claro y contraste de fases, respectivamente (Figs. 50 A y B) siendo más notorio en el primer caso, donde se observó la pared más dilatada y curvada perdiendo la forma rectangular y adoptando una semi ovoide a esférica, es decir: adquiere la forma de la vesícula. Por otra parte, el contraste de fases nos permitió observar dos aspectos importantes: (1) el contenido de pequeñas vacuolas, esferas o glóbulos lipídicos, en el interior de la vesícula; y (2) el contorno de la pared compacta y homogénea de las vesículas.

A los 90 días de desarrollo, es decir 30 días más, las vesículas

adquieren una forma totalmente esférica y sus diámetros uniformes de, aproximadamente de 40 μ , es decir, mantiene el mismo diámetro pero su contenido es mucho mayor, desde el punto de vista cualitativo. Asimismo, el número de estas vesículas es más abundante, ya que se encuentran colonizando la raíz del huésped en un 50%, y están distribuidas en forma de espiral en torno al eje vascular del huésped (Figs. 50 C y D y 51 A-C).

Paralelamente, las esporas en el micelio externo, que ya tienen un mes de desarrollo, alcanzan un diámetro aproximado de 150 a 170 μ , es decir, tres veces más grande que las vesículas del micelio interno. Sin embargo, si comparamos las morfologías de ambas, las esporas (figs 1-9) con las vesículas (figs 50 A-D y 51 A-C) se podrá observar una gran similitud, desde un punto de vista cualitativo. No obstante, sería de gran interés un estudio minucioso y cuantitativo. Es de importancia, en este sentido, proponer un estudio sobre los grados de similitud y/o diferencias entre estructuras análogas y homólogas, refiriéndonos al micelio interno y externo y a la génesis de las vesículas y de las esporas.

Los resultados obtenidos sobre el desarrollo del micelio interno coincidieron, en gran parte, con muchos otros modelos de colonización (Mosse, 1980; Harley y Smith, 1983; Bowen, 1984; Schenck, 1990; Sieverding, 1991; y González, 1996), en cuanto a lo siguiente: (1) el tubo de germinación; (2) formación del apresorio; (3) hifas de penetración; (4) extensión del hongo; (5) formación de ovillos; (6) desarrollo de arbúsculos; (7) vesículas; (8) crecimiento paralelo del micelio externo y (9) formación de esporas. En cuanto a la sincronía del desarrollo del ciclo biológico, desde el punto de vista histomorfológico, en las tres fases: *lag*, *exponencial* y *meseta*, coincide con los trabajos de Bethlenfalvay et al. (1982 a y b); Hayman (1982); Smith (1988); y Giovannetti, Avio y Salutini (1990), respecto a la esporulación que se desarrolla paralelamente a la floración (Bethlenfalvay et al., 1982 a y b; y Sieverding, 1991). Al respecto, Gogala (1991) menciona que las investigaciones sobre el papel de las hormonas en el desarrollo y funcionamiento de las

micorrizas conduce a plantear dos interrogantes: (1) la determinación de su papel en el metabolismo, crecimiento y desarrollo del hongo micorrízico heterotrófico, y (2) la determinación de su función en la morfología de la raíz, en el crecimiento de la planta entera y su relación con los cambios internos causados en el metabolismo de la planta hospedera. Las hormonas influyen en el transporte de agua, iones, carbohidratos, entre otros. Pero los niveles hormonales son influenciados por estos factores así como por otros organismos del suelo, su actividad metabólica y, también, por factores medio-ambientales como son luz y temperatura (Allen, Moore y Christensen, 1980). De esta manera, podemos mencionar que, en cuanto al desarrollo de la colonización, se ha avanzado mucho en los últimos 20 años, pero aún falta mucho por estudiar. Asimismo, el reconocimiento de modelos o patrones de colonización quizá ayuden también, a la identificación de los HA.

1.2.1.2 Corte transversal.

La observación de la raíz colonizada permitió reconocer la distribución de los diferentes componentes estructurales del micelio intrarradical. Los cortes muestran el xilema y floema que forman el cilindro vascular y, en la periferia, el pericambium que está debajo de la endodermis. Toda esta zona se observó sin colonización, al igual que la corteza interna, en tanto que la corteza media y externa se mostró colonizada por tres tipos de estructuras fúngicas diferentes: (a) micelio interno no ramificado, ramificación principal del hongo; (b) vesículas, reservorio energético; y (c) micelio interno ramificado con función de intercambio de nutrientes (arbusculos). Todas estas estructuras (con función específica) se encuentran rodeadas por el plasmalema de la planta hospedera (Fig. 52).

La morfología estructural de la pared de las tres estructuras internas es diferente, como lo son sus funciones; el micelio interno

no ramificado, que forma el cuerpo del hongo con forma cilíndrica de, aproximadamente, 5μ de diámetro, mostró dos tipos de paredes; una compacta, homogénea con una fuerte tinción y otra con una zona interna con pliegues bien definidos u ondulaciones, poco teñida, rodeada por una zona externa menos gruesa y fuertemente teñida. Llamaron la atención las hifas en forma constreñida, con apariencia de ocho, lo que podría indicar dos aspectos: (1) que la parte angosta se encuentra situada entre la pared de dos células radicales; y (2) que la hifa se esté dividiendo dicotómicamente (Fig. 52). Por otro lado, observaciones cuidadosas sobre este último punto nos permitieron distinguir, de 3 a 4 morfologías diferentes: (1) las constreñidas con una pared homogénea; (2) individuales con pared gruesa y homogénea; (3) individuales con pliegues gruesos en la parte interna y (4) pequeños anillos muy juntos unos de otros con paredes muy delgadas que podrían ser las hifas de los arbuscúlos (Fig. 52). Las vesículas ocupan tanto la parte de la corteza media como externa, son esféricas de, aproximadamente, 40μ con una pared compacta, homogénea, y con un grosor de 1.5 a 2μ . Además, se pudo observar en las vesículas vacías (es decir que perdieron todo su contenido lipídico durante el procesamiento) que tienen una membrana interna flexible. Al respecto, este material fue muy difícil de tratar en cada uno de los pasos del procesamiento para MET. Por tal motivo, muchos de los primeros cortes obtenidos no presentaron completas todas las paredes de las células huésped, así como el plasmalema. No obstante, al comparar estos resultados con los trabajos de Scannerini y Bonfante-Fasolo, (1982); Bonfante-Fasolo, (1984 y 1987); Bonfante-Fasolo y Fontana, (1985) coinciden, en gran parte, en este último aspecto y con la mayoría de la morfología de la estructuras del hongo; con excepción de los pliegues observados en este trabajo. Estas consideraciones dan una idea de lo complejo que puede ser un estudio de esta naturaleza, que permita realizar comparaciones morfoestructurales. Falta mucho por estudiar para tener un orden de secuencia y la sistematización morfoestructural que permita un mejor entendimiento de la relación morfo-fisiológica de la micorriza arbuscular, la cual es el grupo más complejo dentro de

las micorrizas, debido a la fase interna de su micelio intramatricial, al mismo tiempo conectado con la fase extramatricial.

3.6 Micelio Interno.

3.6.1 Hifas internas.

3.6.1.2 Corte transversal.

Las hifas internas observadas (por el MET), se localizaron en la parte central de la corteza de la raíz de la planta hospedera. Los cortes de color del dorado al plateado (de 60 a 90 nm) permitieron observar aspectos importantes que no pudieron apreciarse, a nivel óptico (1000 X) ya que a 50,000 X las hifas internas no ramificadas presentaron un diámetro, aproximado, de 3.5μ , esféricas con un grosor de pared, aproximadamente de 0.5μ ; ésta y el citoplasma aparentan tener la misma electro-densidad al grado de confundirse observándose una continuidad (Fig. 53). Su citoplasma mostró, algunas veces, organelos (núcleos y mitocondrias) pero, más a menudo, resaltaron glóbulos pequeños muy electrodensos distribuidos en todo el citoplasma, siendo prominentemente grandes las áreas vacuoladas (Fig. 53).

La colonización profunda por las hifas de *Glomus* sp, ocurrió cuando éstas lograron penetrar a la raíz del huésped por entre las células epidérmicas y se desarrollaron en toda la corteza dentro de los espacios intercelulares. Grupos de hifas fueron encontrados, frecuentemente, entre las células causando una importante dilatación de los espacios intercelulares. Estos resultados coinciden con los de Kinder y Brown, (1976); Cox, Sanders Tinker y Wild, (1976); Bonfante, (1978); Nemeč, (1980), y Gianinazzi, Morandi y Dexheimer, (1981) en lo que respecta a: (i) la colonización; (ii) el diámetro de las hifas de 2 a 4μ ; (iii) la carencia de la capa exterior evanescente; (iv) en su lugar, la existencia de una interfase electro-transparente, rodeada del plasmalema del huésped; (v) el

grosor de la pared del hongo de 0.1 a 0.5 μ ; (vi) una pared homogénea, compacta, con microfibrillas electro-transparentes embebidas en una matriz electro-densa y amorfa; (vii) abundantes partículas de glucógeno en el citoplasma del hongo; (viii) presencia de microorganismos parecidos a bacterias en el interior de algunas esporas; (ix) grandes áreas vacuoladas y, (x) en la electro-densidad del citoplasma. Los resultados aquí descritos, a nivel ultraestructural, sobre la organización citológica del endófito son similares a muchos otros resultados obtenidos con otras plantas como cebolla (Cox y Sanders, 1974) y tabaco (Kaspari, 1975). La mayoría de los rasgos de los hongos arbusculares aseptados son realmente muy comunes en todos estos tipos de asociación. Muchas áreas dotadas con organelos, usualmente, alternan con grandes áreas vacuoladas; a menudo, contienen glóbulos densos, posiblemente, de polifosfato; de igual manera, la presencia de bacterias es, también, similar.

Por otra parte, si comparamos la imagen que nos da el microscopio óptico con la del microscopio electrónico de transmisión (Figs. 52 y 53; respectivamente), podremos observar aspectos muy importantes: en el primer caso, parecen observarse diferentes morfologías en lo que pudiera ser la zona interna de la pared del hongo. Sin embargo, el MET permite reconocer y delimitar al citoplasma el cual aparece replegado hacia la periferia de la pared interna, debido a la gran vacuolación central; el MET permite delimitar perfectamente, también a las mitocondrias, estructuras parecidas a bacterias, los gránulos de glucógeno, y la apariencia general del citoplasma granular y electro-denso (Fig. 53).

Si comparamos los cortes del micelio externo (Figs. de la 10 a la 16) con los del interno (Fig. 52) encontraremos una gran semejanza de la estructura a nivel de microscopía óptica, por lo que diríamos que, ambos micelios, son iguales anatómica o estructuralmente. Sin embargo, el MET nos reveló entre ambos, una ultramorfología diferente, con cambios profundos que reflejan una adaptación ultramorfofisiológica (Figs 42 - 44 y 53); por ejemplo: (a) el micelio

externo tiene una pared dos veces más gruesa que la del interno (la cual es de 3 μ), con una organización mas complicada ya que se observan de 5 a 6 capas multilaminadas en las que se distingue la zona externa de la interna y la capa evanescente en la parte exterior; esta arquitectura corresponde a una estructura de resistencia, probablemente, debido a que está en contacto con el "suelo"; y (b) el micelio interno con un diámetro menor y una pared de la mitad del grosor que la del externo, y sin un arreglo multilaminar complejo sino, más bien, con una textura amorfa, carente de la capa externa evanescente; por lo que su morfología se relaciona con una estructura de difusión, debido a que está en el interior de la raíz "nicho ecológico", es decir, se encuentra en un medio más estable. Y, por otro lado, el aspecto citológico el cual, en ambos, es distinto (figs. 42 externo y 53 interno). En el micelio interno se infiere una gran actividad "metabólica" debido a las grandes áreas vacuoladas, la presencia de mitocondrias, gránulos de glucógeno y un citoplasma denso. Estos resultados coincide con lo mencionado por Bonfante-Fasolo (1987 y 1988). Si se considera la MA desde su origen, el primer punto a describir sería la espora, cuya pared celular, relativamente gruesa (de 5 a 15 μ), posee un elevado contenido en quitina, casi un tercio de su biomasa, mientras que solamente una pequeña fracción son aminoazúcares en forma no acetilada. La quitina en las esporas está integrada en fibrillas organizadas, según los diferentes modelos de tipo tridimensional (Bonfante-Fasolo y Schubert, 1987). Cuando las esporas germinan, las hifas que se originan tienen paredes gruesas con estructura compleja, donde la quitina sigue siendo el componente fundamental. Una vez que las hifas intracelulares están dentro de la raíz, sus paredes se tornan mucho más delgadas y, en las hifas ramificadas de los arbusculos, las paredes son aún mucho más delgadas y menos complejas.

3.6.2 Arbúsculos.

3.6.2.1 Corte transversal.

Debido al corte, los arbúsculos se observaron como pequeños anillos de 1 a 1.5 μ de diámetro, muy cercanos entre sí, con separaciones de, 100 a 300 nm. En la pared, que tiene un grosor de 100 a 150 nm, se observan con gran claridad las ultramicrofibrillas electrotransparentes. Las características citoplasmáticas son muy parecidas a las antes descritas; no obstante, hay una mayor vacuolación y presencia de mitocondrias (Fig. 54).

3.6.2.1.2 Corte longitudinal.

Las observaciones de las ramas de los arbúsculos (de aproximadamente 500 nm de diámetro) a 80,000 X indicaron que el citoplasma se encuentra totalmente vacuolado; probablemente, debido a una alta actividad metabólica y a la pared extremadamente delgada (aproximadamente de 62 nm); estas características se relacionan con una actividad de difusión o permeabilidad (Fig. 56), y coinciden con las descritas por Bonfante-Fasolo, (1987 y 1988); Bonfante-Fasolo y Schubert, (1987); Bonfante-Fasolo, Marzachi y Testa, (1986), cuya información ha sido revisada a profundidad. Estos autores mencionan que las hifas intracelulares tienen una pared similar al micelio extramatricial pero, estructuralmente, mucho más sencilla, ya que la pared de las ramas más finas de los arbúsculos se hacen mucho más delgadas (50 nm) conforme penetran más en la raíz, perdiendo su estructura fibrilar para pasar a ser amorfa. Por otra parte, Bonfante-Fasolo, (1988 y 1994) mencionan que en las paredes de los arbúsculos no se detectan cadenas de quitina, pero sí de oligómeros de N-acetilglucosamina, precursores de la quitina. Esta información obtenida utilizando técnicas de afinidad ultraestructural (Bonfante-Fasolo, Vian y Testa, 1986), sugiere que, probablemente, en las paredes de las ramas más finas del arbúsculo no ocurre la

polimerización de la quitina . Por otro lado, Grandmaison, Benhamou, Furlan y Visser, (1988) confirman la simplificación estructural del hongo, en lo relacionado al descenso en la formación de quitina, cuando ésta pasa de un medio de preservación y resistencia mecánica (espora) a otro relacionado con procesos de transferencia de nutrimentos (arbúsculo). Bonfante-fasolo, Berta y Fusconi, (1987) dicen que las ramas del arbúsculo son, de hecho, las estructuras apicales del hongo, mientras que otras hifas intracelulares no ramificadas y las intercelulares pueden considerarse la parte basal del mismo. Por ello, en lo referente a la polimerización de la quitina, podría interpretarse como problema de tiempo para la llegada de la información desde la "base" al "ápice" del hongo, como ocurre en el caso de hongos en vida libre, Bonfante-Fasolo, (1987) y Lackii, Garrioca, Peterson y Bowley, (1987). Estos autores agregan que hay evidencias de que el hospedero afecta a la morfogénesis del hongo; en el caso de las micorrizas. Concretamente, sugieren que la planta podría modular la producción de enzimas tales como la quitinasa. Finalmente, Bonfante-Fasolo (1987) indican que esta enzima, cuando es producida por hongos, controla el crecimiento y la ramificación de los mismos mientras que, producida por la planta, puede controlar el ataque de hongos patógenos, puesto que se ha demostrado la presencia de quitinasa tanto de origen fúngico como vegetal. En la MA parece lógico asociar su presencia a los fenómenos de ramificación y pérdida de estructura fibrilar característica del arbúsculo. Por lo tanto, los cambios en la estructura y arquitectura de la pared del hongo, el desarrollo de interfases y la redistribución de las actividades enzimáticas tienen su máxima expresión en el arbúsculo. Tales cambios están relacionados con el intercambio de nutrimentos entre ambos simbiosis, y son una consecuencia de las relaciones celulares a elevado nivel de compatibilidad e integración de la fisiología que se establecen entre ambos organismos. Sin embargo, Gianinazzi y Gianninazzi, (1978), manifiestan al respecto que, tanto el "disparo" de la formación de arbúsculos como la diferenciación del micelio según el tipo de tejido colonizado, indican fenómenos de reconocimiento cuyas bases moleculares se ignoran. Diez años

después, Panu y Bonfante-Fasolo (1988) mencionan que cada vez se presentan más evidencias, generalmente indirectas, de que en los fenómenos de reconocimiento hongo-célula hospedera, están implicadas actividades enzimáticas y "señales" moleculares que regulan dichos procesos, de los cuales se posee aún muy pocas evidencias experimentales directas.

VII Conclusiones.

(1) Las observaciones con las técnicas de microscopía de luz, permitieron la caracterización morfológica de los componentes de la endomicorriza arbuscular, tanto en condiciones naturales como en preparaciones permanentes. Esta misma metodología fue adecuada para evaluar la pureza del aislado del HMA y el control de su calidad y viabilidad.

(2) La MEB, fue muy útil para revelar, con detalle, la morfología y textura de la superficie de las esporas y esporocarpos, así como la morfología de las hifas sustentadoras. Fue especialmente importante observar, en esporas fracturadas, las capas que integran su pared. No obstante, las imágenes obtenidas no permiten caracterizar la especie de los ejemplares.

(3) Para el estudio anatómico de las esporas, se logró obtener cortes finos y ultrafinos de estos propágulos, utilizando cuchillas de cristal. La revelación de este hecho radica en que, en la literatura, se considera que el corte de estructuras quitinosas como son las esporas, es posible solamente con cuchillas de diamante.

(4) La observación de cortes ultrafinos a diferentes ángulos de inclinación, permitió apreciar la organización ultraestructural de las microfibrillas electrotransparentes, lograndose obtener la arquitectura completa del armazón quitinoso de la capa interna de la

pared de las esporas.

(5) Con el estudio anatómico con MET, fue posible detectar un modelo arqueado en la organización de las ultramicrofibrillas, diferente a los hasta ahora indicados en la literatura para *Glomus mosseae*. Este hallazgo, logrado con aumentos > 50.000 y < 110.000 X en cortes oblicuos, nos da una "huella dactilar o finger print" diferente a lo esperado para esta especie de *Glomus*.

(6) Se encontraron diferencias profundas en la ultraestructura y grosor de la pared de las hifas de los micelios interno y externo, acordes con la función de cada uno de ellos. Las hifas del micelio interno poseen una pared más delgada, con una ultraestructura fibrilar laxa la cual, a nivel de los arbusculos (hifas muy ramificadas), se adelgazan notablemente y se transforman de fibrilar a amorfa. Por otra parte, las hifas del micelio externo muestran una pared considerablemente mas gruesa, con una ultraestructura más compleja, parecida a la de las esporas, aunque con un menor grado de complejidad, donde la quitina es, también, el componente fundamental, integrada en microfibrillas electrotransparentes, incluidas en una matriz electrodensa (la quitosana) y organizadas en modelos tridimensionales.

(7) La morfología ultraestructural del micelio externo, puede ser de gran valor taxonómico. Ya que las hifas, además de procesarse y cortarse mucho más facilmente, presentaron conformaciones o arquitecturas muy bien definidas e identificables, en cuanto al número de subcapas presentes y el tipo de laminación dentro de las subcapas.

Esporas de *Glomus sp.* con un mes de desarrollo (presentaron un diámetro entre 150 a 170 μ) crecidas en suelos calcimagnésicos, a partir de *Chloris gayana*, "Rhodes grass" planta hospedera altamente micotrófica, bajo condiciones de invernadero.

Fig. 1. Raíces micorrizadas por *Glomus sp.* (R) en las que se observan los conjuntos de los esporocarpos de color blanco traslúcidos (Es) y las esporas de color amarillo brillante (E). (Fotomicrografía estereoscópica, 20 X; campo oscuro y luz incidente).

Fig. 2. Se puede observar en la pared de la espora la capa externa llamada evanescente (Ce), y el grosor de la capa interna de la pared (Ci), así como la superficie de la espora ciliar (Fotomicrografía óptica, 300 X; campo claro con luz polarizada, montadas en alcohol polivinílico en lactoglicero en relación 1:3).

Fig. 3. Se observan claramente las hifas (H) que forman el micelio externo (Me), el citoplasma presenta vacuolación, y las paredes del micelio de un color pardo se delimitan muy bien. En tanto que la espora se observa de color pardo oscuro translúcido (E) y, a través de ella, se distingue el contenido interno formado de muchas gotitas de lípidos (L). (Fotomicrografía óptica, 40 X; campo claro y montadas en alcohol polivinílico, previamente fijadas en FAA).

Fig. 4. Se observa la hifa de sujeción (Hs), con características cristalinas y refringentes, con forma que varía de embudo a recta. La espora es de color amarillo (E) y con un contenido interno saturado por glóbulos lipídicos (pero con poca diferenciación de sus contornos) observables tenuamente en la periferia (Fotomicrografía estereoscópica, 40 X; campo oscuro y luz reflejada, fijadas en FAA).

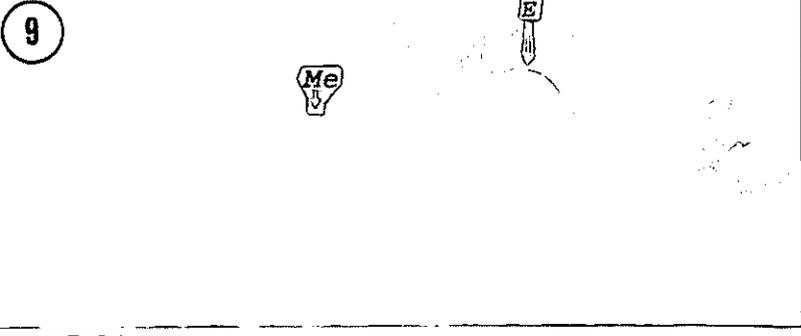
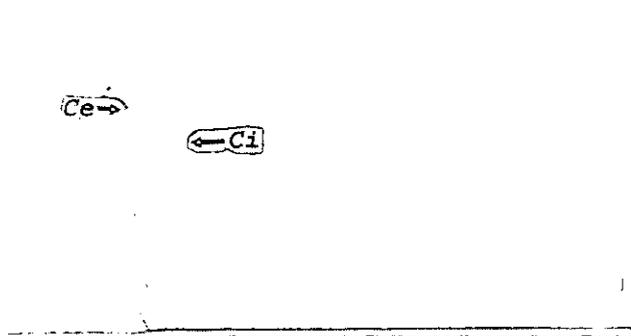
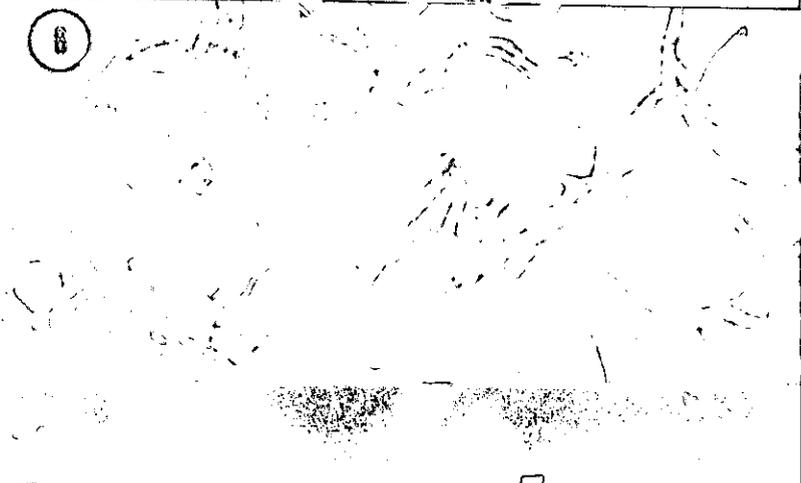
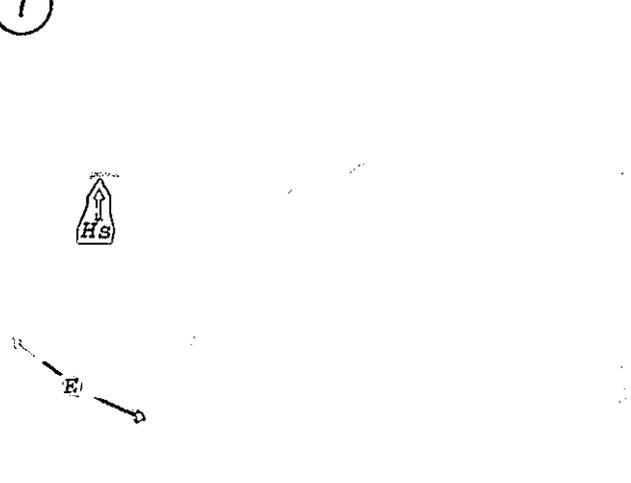
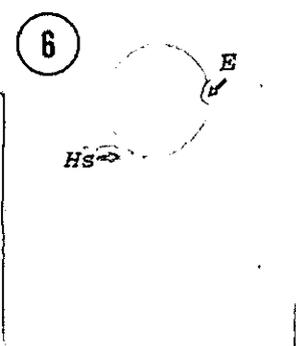
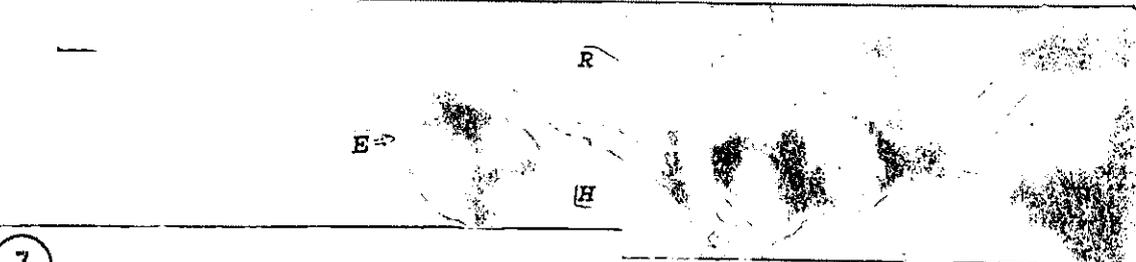
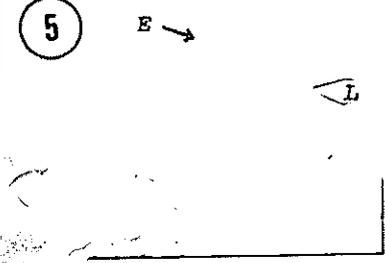
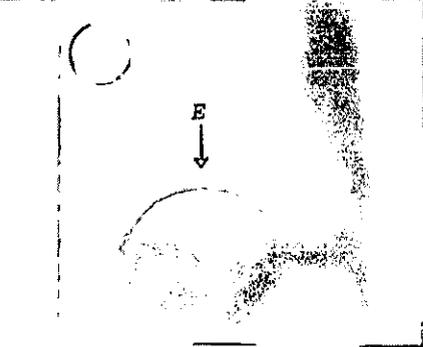
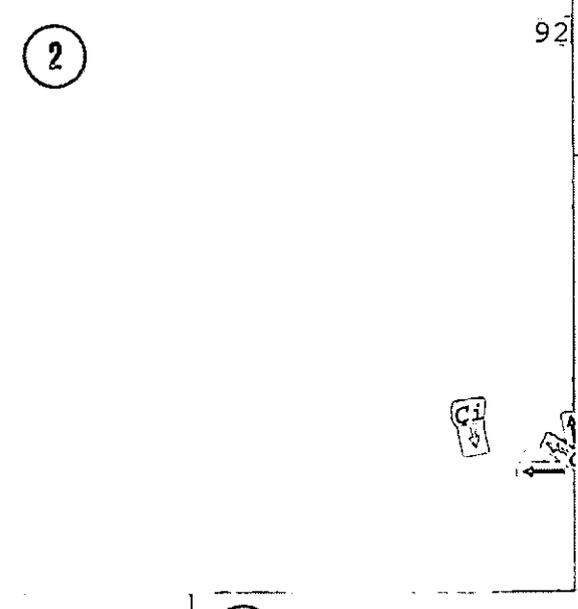
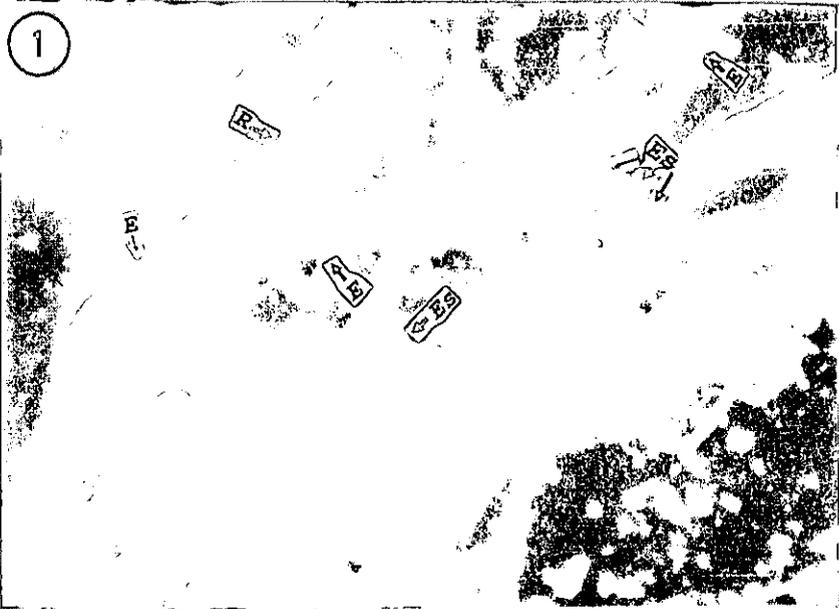
Fig. 5. Se observan los glóbulos lipídicos (L) muy claramente en el interior de la espora (E). Ésta última de color amarillo rojizo debido a la prueba del bromuro de tetrazolio. (Fotomicrografía óptica, 40 X; campo claro, con reacción previamente al bromuro de tetrazolio durante 75 hrs; 40% viables y montadas en agua).

Fig. 6. La hifa sujetadora (Hs) resalta con gran claridad, entre ésta y la espora hay un tabique de color café oscuro. La superficie de la espora se torna de café pardo a oro brillante (Fotomicrografía estereoscópica, 40 X; campo claro y luz reflejada, fijadas en FAA).

Fig. 7. En el ángulo superior izquierdo, se observa claramente la hifa de sujeción en forma de embudo (Hs). En tanto que, del lado derecho, se aprecia perfectamente la pared de la espora, la cual esta constituida por la capa evanescente (Ce) cuya característica es translúcida, y por debajo de ésta, se observa la capa interna (Ci) compacta y aparentemente dividida en zona externa e interna de color marrón, y, en el citoplasma, se aprecia la huella de los glóbulos lipídicos (Fotomicrografía óptica, 1000 X; campo claro, montadas en lactofenol con glicerina en relación 2:1).

Fig. 8. "Squash" de 30 ejemplares de esporas que muestran la homogeneidad del cultivo monospórico de *Glomus* sp. en el que se perdió el contenido interno, por el tratamiento, pero a cambio de esto se delínean claramente el grosor de las paredes del hongo (Fotomicrografía óptica, 50 X; campo claro, montadas en lactoglicerol).

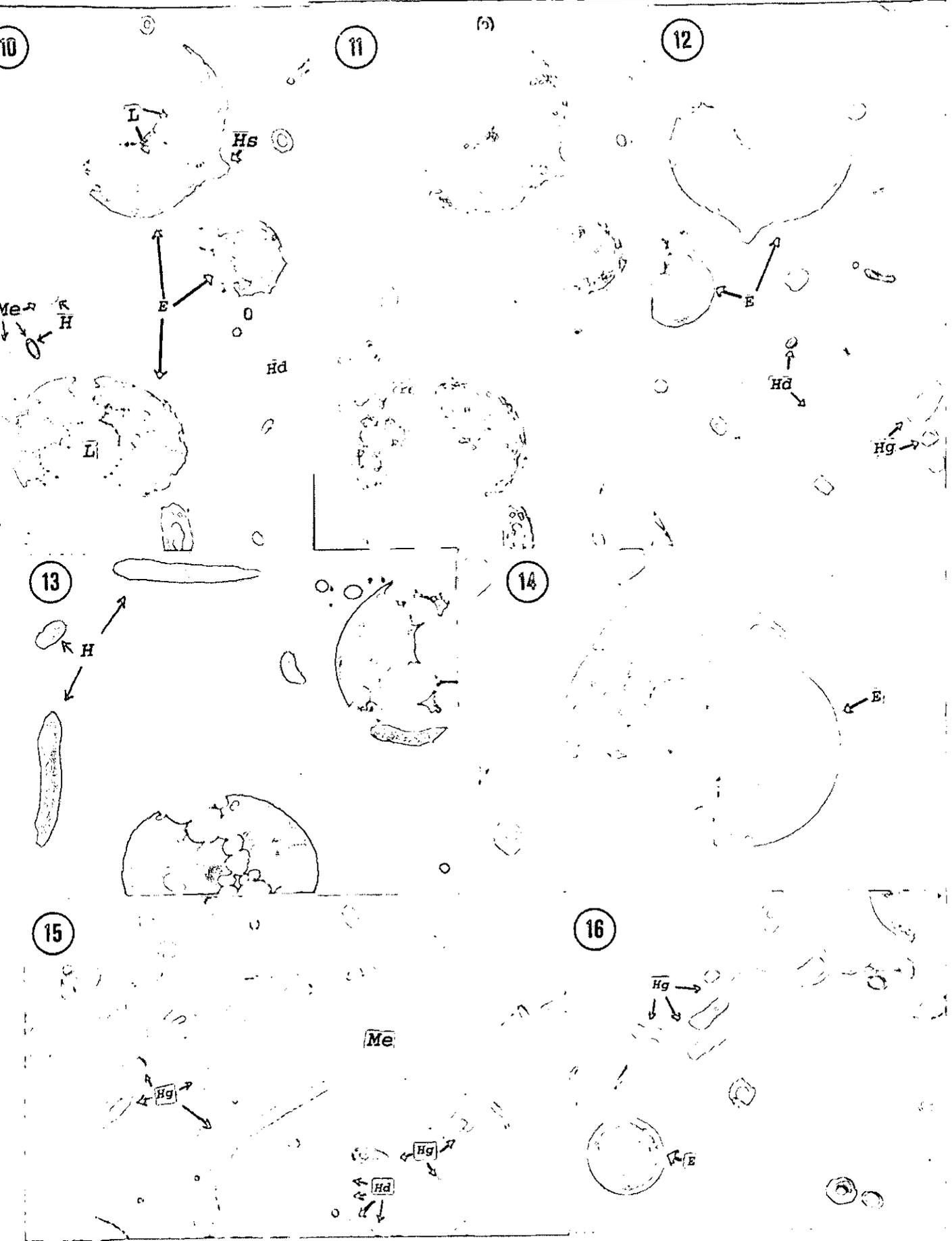
Fig. 9. Se observa el micelio externo (Me) ramificado dicotomicamente cuyas características se mostraron turgentes, cristalinas y refringentes en la periferia. La espora se observa amarilla y opaca (Fotomicrografía estereoscópica, 50 X; campo oscuro y luz reflejada, fijadas en FAA).



Cortes de la pared de esporas de *Glomus sp.* observadas con el microscópio óptico.

Figs. 10-12. Cortes longitudinales que permiten observar el contorno globoso de las esporas (E). La hifa de sujeción (Hs) se observa recta en las esporas cuyo diámetro fue de 130 a 150 μ y, en forma de embudo, en las de 150 a 170 μ . Las hifas de sujeción, fluctúan de 10 a 14 μ , de diámetro, en el punto de unión entre ésta y la espora. A partir de la hifa de sujeción, se desarrolla la espora incrementándose la acumulación de gotas lipídicas (L) en el interior de la espora. No obstante, solo se observa la huella de las gotas lipídicas, debido a que su extracción se llevó a cabo con solventes orgánicos. Sin embargo, se aprecian gotas de diferentes diámetros y una vacuolación mucho mas intensa en las esporas de menor tamaño. La pared en ambas esporas se observa homogénea y compacta, con un grosor de 3 μ . Aún en contraste de fase no fue posible observar la capa externa llamada evanescente. **Fig. 13, y 14.** Corte transversal y oblicuo; respectivamente. En los tres tipos de corte se observa, una pared compacta y homogénea. (Fotomicrografía óptica, 150 X; campo claro, Fig. 10 contraste de fases; de ejemplares procesados para MET; tinción azul de toluidina 5%).

Fig. 15 y 16. Cortes transversales del micelio externo (Me), en el que se observa el contorno de las hifas que varía de redondo a ovalado, con diámetro de 1 (Hd) y 5 μ (Hg), constituido por, una, dos y hasta tres capas, siendo la interna ondulada y la externa algunas veces se observa desgastada y/o rota (Fotomicrografía óptica, 150 X en campo claro, Fig. 15 contraste de fases; de ejemplares procesados para MET; tinción azul de toluidina 5%)



Observación de la topografía de la pared de esporas de *Glomus* sp. con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Fig. 17. Características topográficas del micelio externo (Me) constituido por: (a) hifas apicales (Ha) con esporas recién formadas (Erf) que forman un esporocarpo (Es). La espora madre (Em), permite observar el rápido crecimiento de la espora madre, comparada con las recién formadas en el esporocarpo cuya diferencia es de 30 días; en la superficie de la pared de la espora se observa la capa bacteriana (Cb); (b) hifa de sujeción o sustentora en forma de embudo (Hs); y finalmente (c) hifas gruesas (Hg de 5 μ) y delgadas (Hd de 2 μ) con divisiones dicotómicas, las hifas pueden llegar a formar cordones hifales (CrH) pegados por su mucílago a la materia orgánica (Mo). (Micrografía Electrónica de barrido, 300 X; de ejemplares procesados para MEB recubiertas con oro).

Fig. 18. Parte apical de la hifa "gruesa" con forma de embudo (Hs) de la que se forman o se originan las esporas (Erf), estas últimas presentan paredes lisas y, además se observa una gran zona del micelio externo en la que se puede apreciar tanto las hifas de 5 (Hg) como las de 2 μ (Hd) de diámetro. (Micrografía Electrónica de barrido, 1000 X; de ejemplares procesados para MEB recubiertas con oro).

Fig. 19. Esporocarpo (Es) constituidos por, aproximadamente, 80 esporas recién formadas, de 40 μ de diámetro, con la hifa de sujeción en forma de embudo (Hs); este último y la forma de la espora son igual a la de la espora madre. (Micrografía Electrónica de barrido, 450 X; ejemplares procesados para MEB recubiertas con oro).

Fig. 20. Espora madre, totalmente esférica, mostrando la capa evanescente externa (Ce) y la capa interna (Ci) por debajo de ella (Micrografía Electrónica de barrido, 500 X; ejemplares procesados

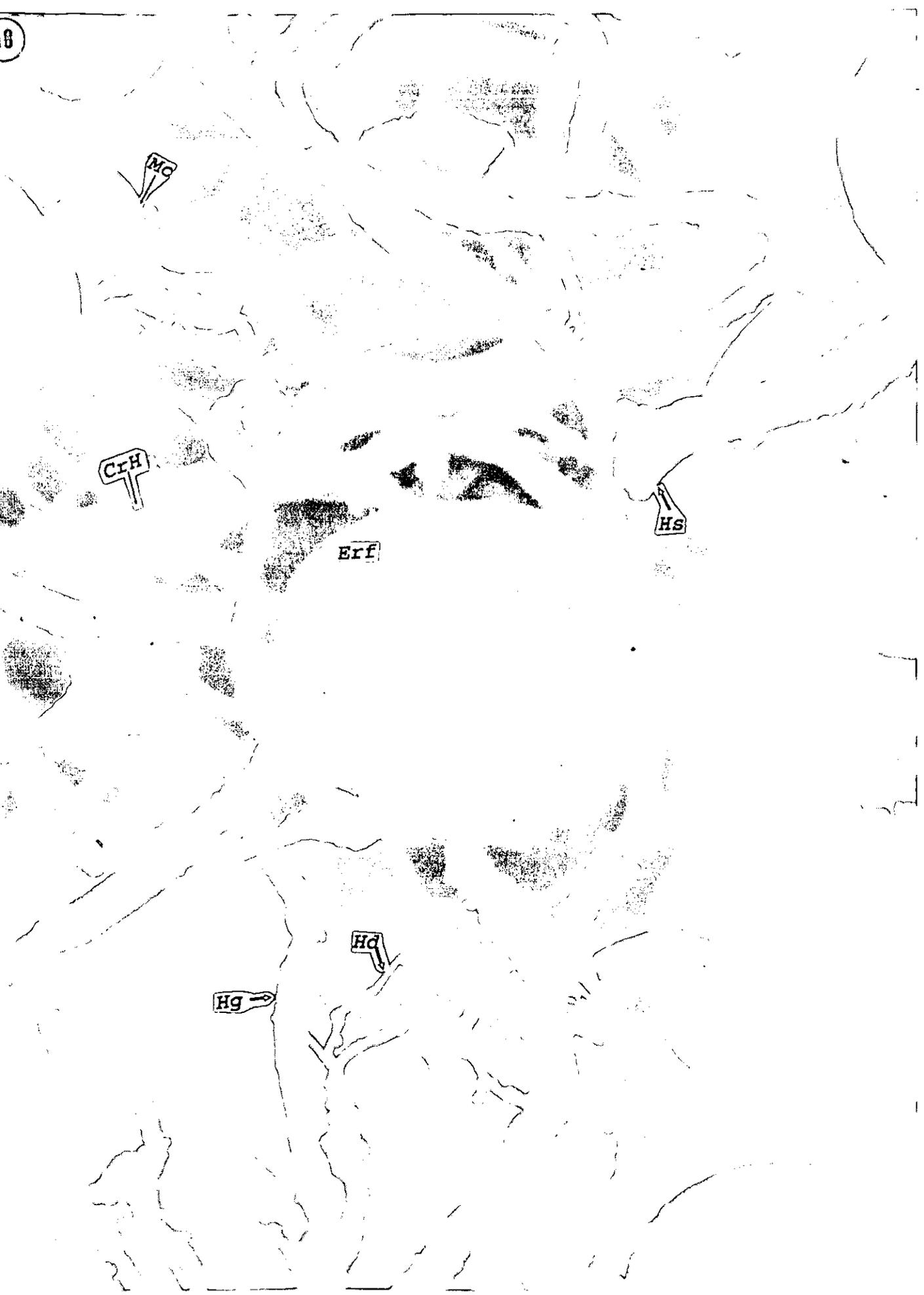
para MEB recubiertas con oro).

Fig. 21. Se observa la pared de la espora (en su grosor total) la cual contiene una capa microbiana (Cb). (Micrografía Electrónica de barrido 1000 X; ejemplares procesados para MEB recubiertas con oro).

Fig. 22 y 23. Características topográficas de la pared de la espora. Se observan la capa externa (Ce), la cual se muestra incompleta o con grandes grietas y, por debajo de ésta, la capa interna (Ci) de la pared de la espora en la que se observan pequeñas grietas y un menor contenido de materia orgánica adosada a ella, así como también la población micobiana es menor que en la capa externa o evanescente.

Fig. 23. Hifa sustentora o sujetadora de la espora en forma de embudo (Hs); la parte ancha y la delgada son de 20 y 15 μ de diámetro, respectivamente. (Micrografía Electrónica de barrido, 2000 y 1500 X; respectivamente, de ejemplares procesados para MEB recubiertas con oro).





MC

ClH

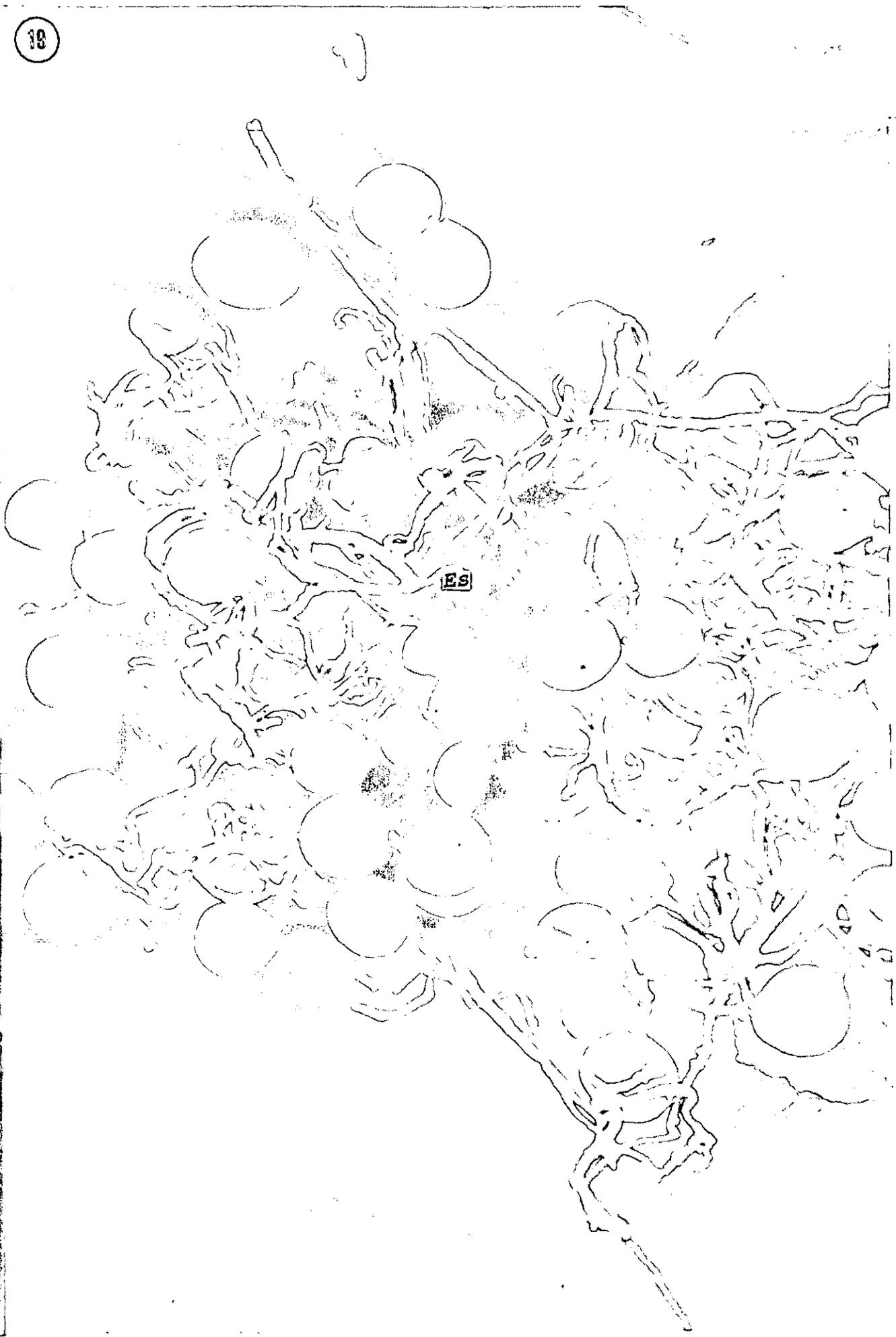
Erf

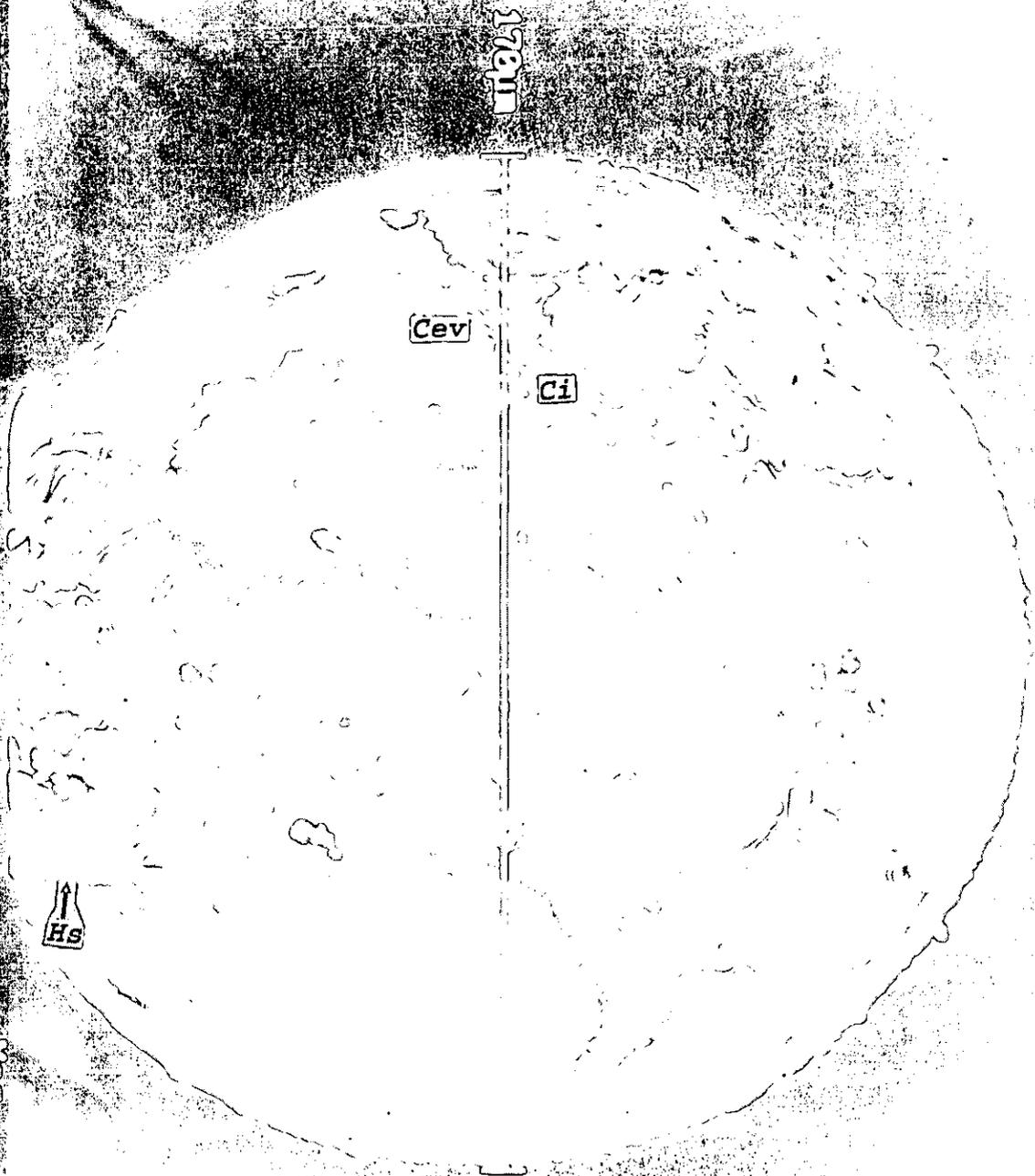
Hs

Hg

Hq

EHT=20.00 kV MAG= 250 X
WD= 31.00 μm I Probe= 1.3 nA Detector= OBSD
19um H





EHT=20.00 KV

WD= 31 m

I Probe= 1.5 mA
I HM=0.1 N.A.H

MAG= 400 X

Detector= Q830

101

28

CB

EMF-23.03 KV

311

UD=

31

1

Probe=

1.5 MA

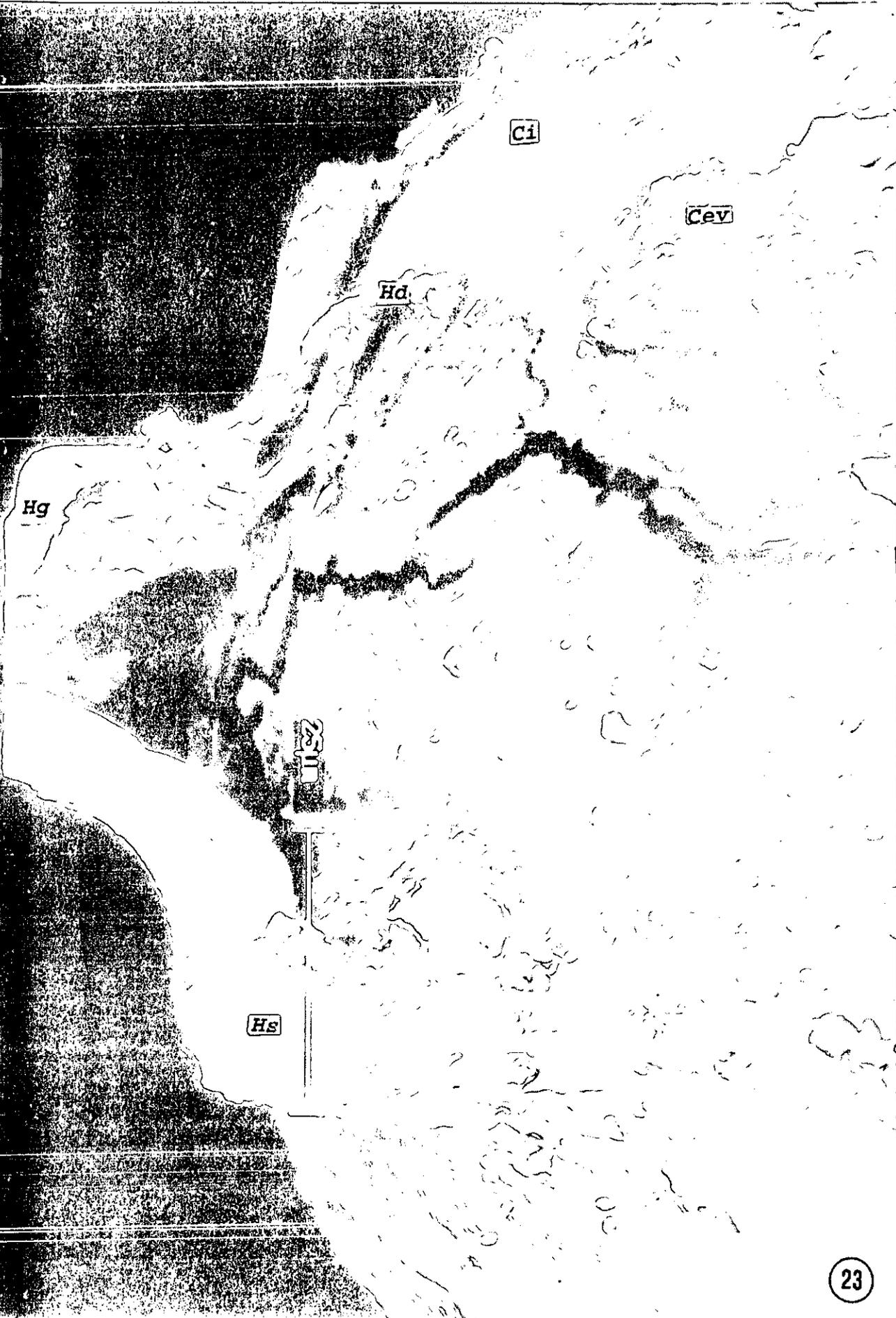
Mag= 1.00 K X

Detector= QBS10

211
EHT = 20.00 kV
WD = 31 mm
1 Probe = 1.5 mA
Mag = 2.50 k X
Detector = ORSN

Ci
Cev

EHT=20.03 KV
 HD= 31 m
 I.Probe= 1.5 mA
 MAG= 1.00 K X
 2um H
 I.I.H.-U.N.A.M.
 Detector= QBSD

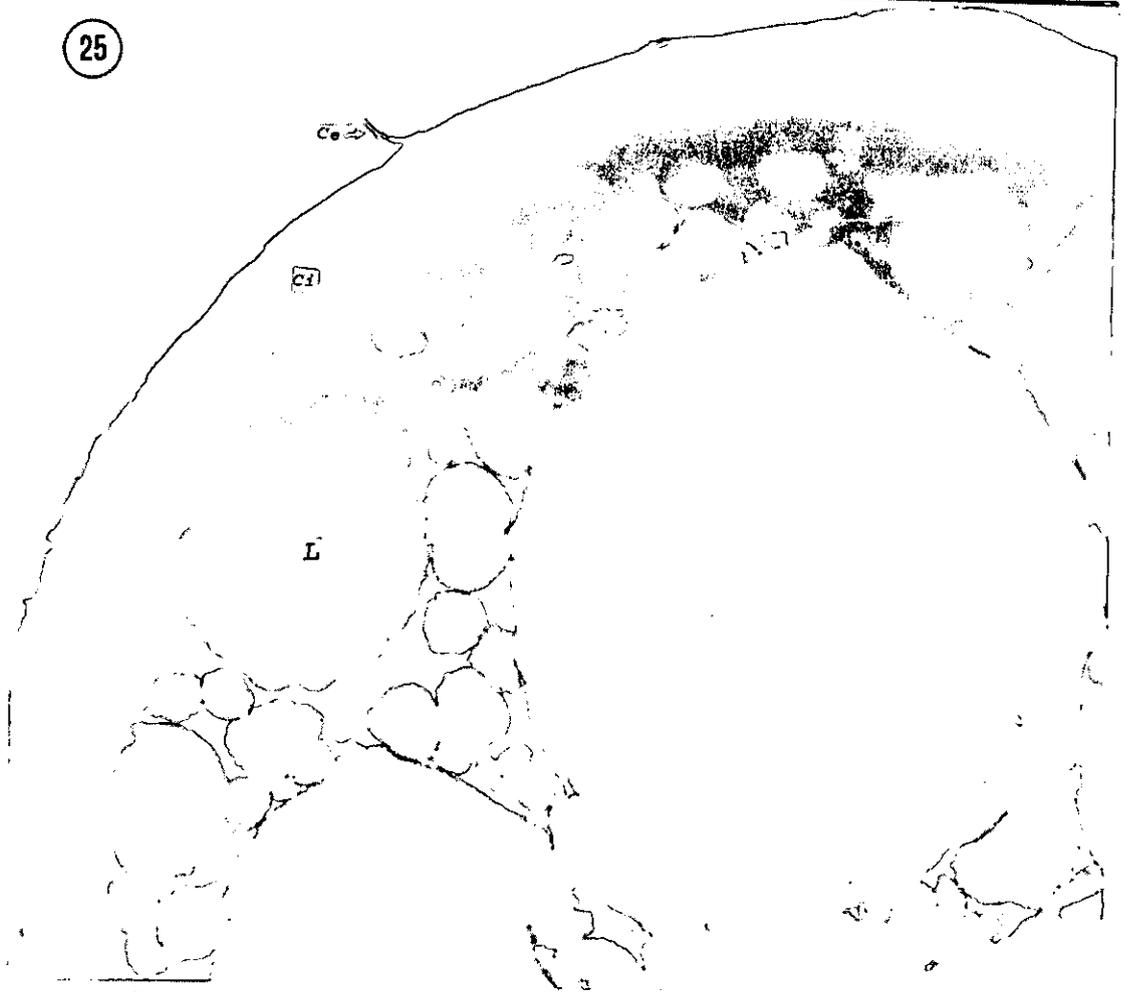
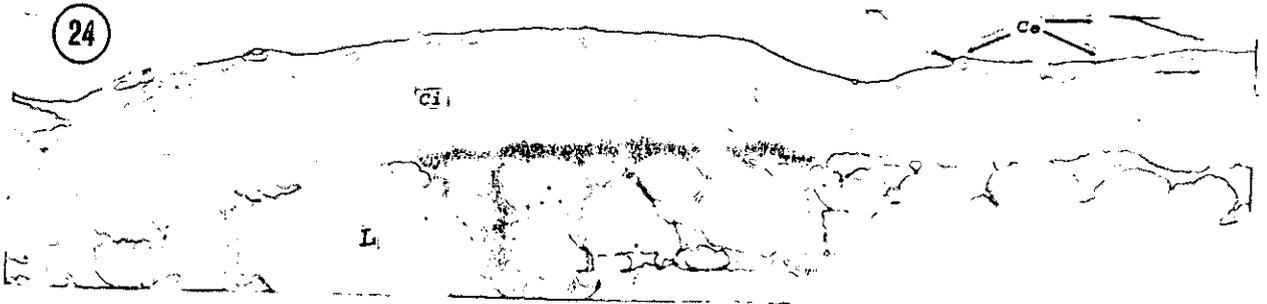


Cortes de la pared de las esporas del esporocarpo de *Glomus* sp. observadas con Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

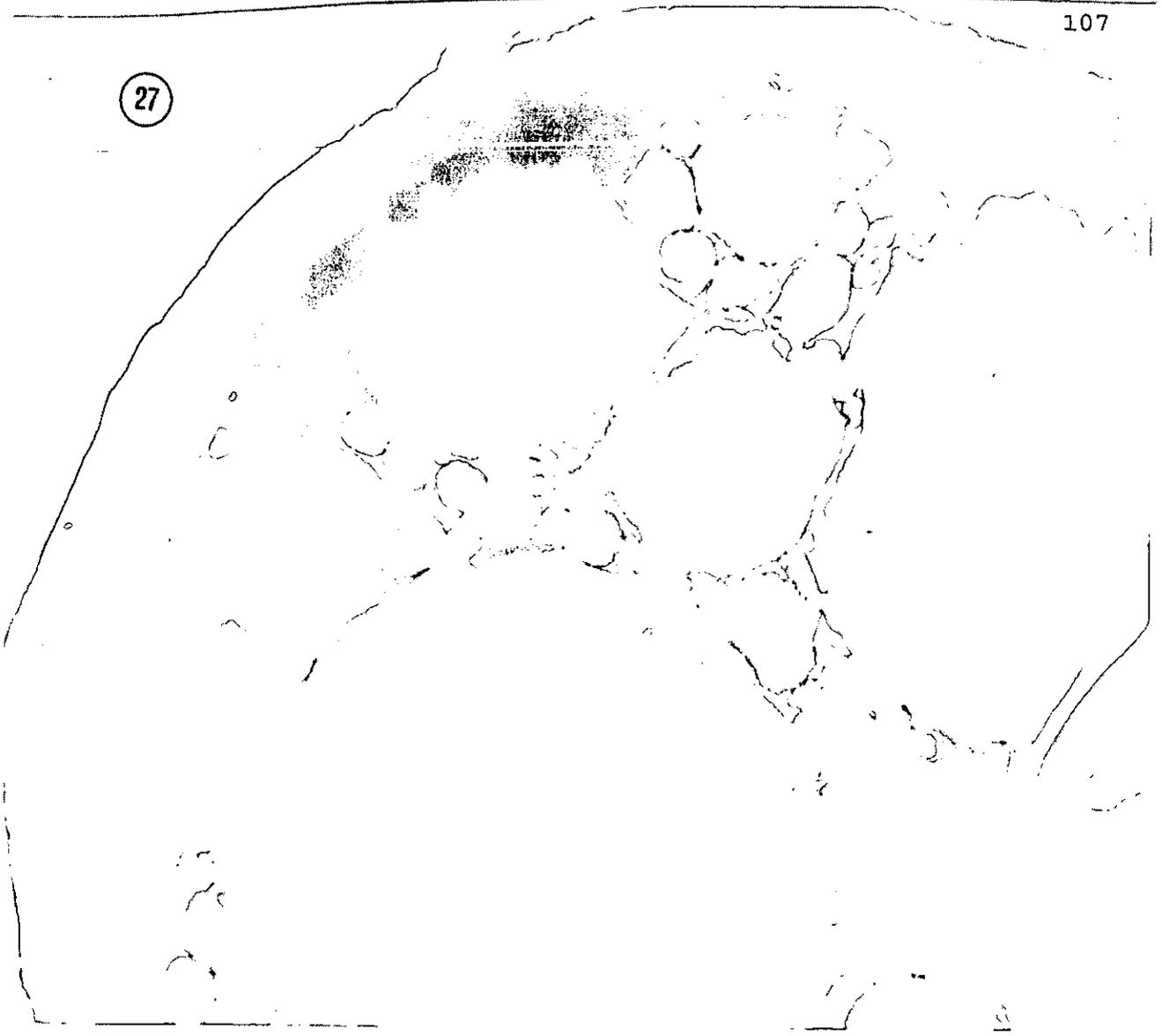
Figs. de la 24 a la 26. Corte transversal de las esporas donde se observan remanentes de la capa externa (Ce) y el grosor no homogéneo así como la arquitectura compacta de la capa interna de su pared (Ci); el contenido interno rico en glóbulos lipídicos (L) y el citoplasma electro-denso (C). (Micrografía Electrónica de Transmisión, 10,000; 16,800; y 16,800 X, respectivamente; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).

Figs. 27 y 28 . Corte oblicuo se observa la capa interna de la pared muy compacta y electrodensa. Siendo poco visibles las ultramicrofibrillas electrotransparentes (quitina), y el interior de la espora se observa claramente las huellas de los lípidos. (Micrografía Electrónica de Transmisión, 17,000; y 26,000 X, respectivamente; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).

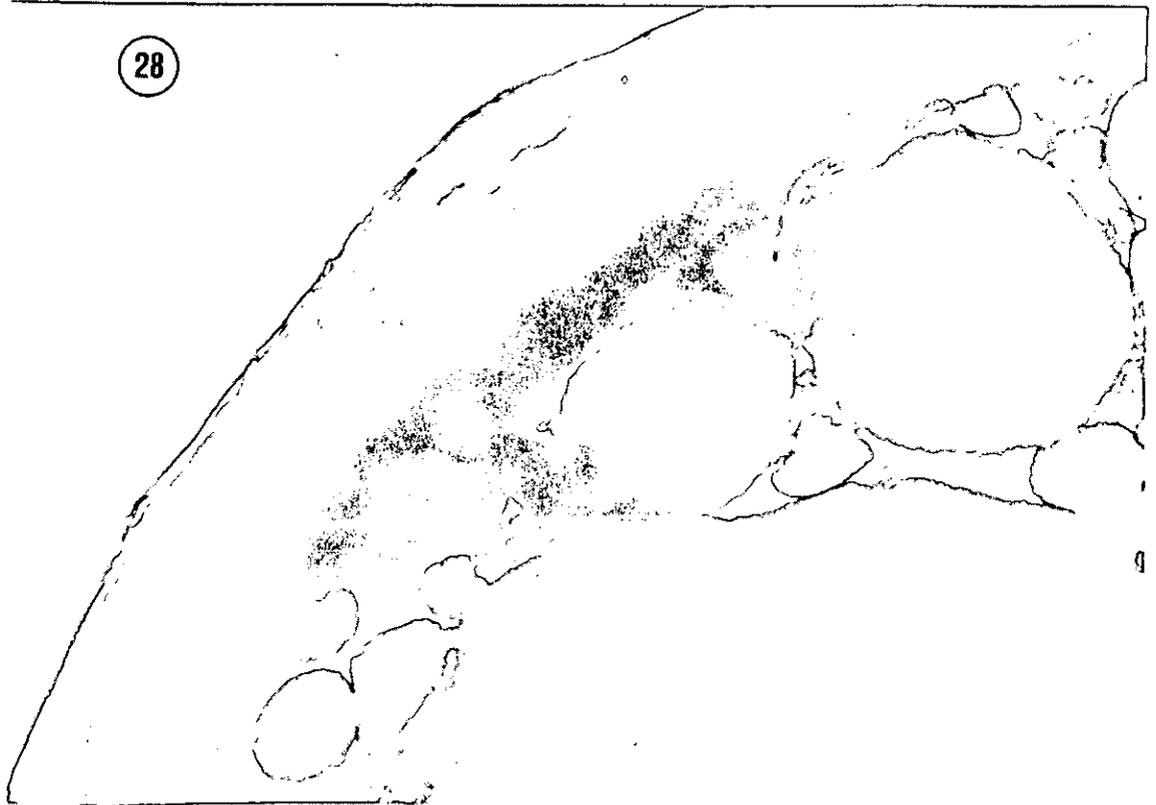
Fig. 29. Corte longitudinal, la capa interna presenta un aspecto alveolado de las ultramicrofibrillas electrotransparentes. (Micrografía Electrónica de Transmisión, 17,000 X, respectivamente; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).



27



28



Cortes de la pared de la espora de *Glomus* sp. observadas con Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

Fig. 30. Corte longitudinal, se observa la capa evanescente (Ce) constituida por varias capas electrodensas y la capa interna (Ci) con una apariencia arquitectónica alveolar, formada por el arreglo de las ultramicrofibrillas electro-transparentes (Micf) que constituyen el esqueleto de la pared. (Micrografía Electrónica de Transmisión, 35,000 X; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).

Fig. 31. Con este ángulo de inclinación, la capa externa de la pared de la espora se observó compacta y muy electrodensa con un grosor de 0.3μ ; en tanto que la capa interna presentó un grosor de 2 a 2.5μ . No obstante, lo más importante fue el aspecto ultramorfológico, el cual pierde la forma alveolar, antes descrita, y en su lugar se torna homogénea, observándose muy claramente las ultramicrofibrillas electrotransparentes de manera muy fina, atravesadas unas con otras, formando una red que forma el esqueleto, de la capa interna, que se encuentra embebido en una matriz electrodensa, poco abundante y amorfa. (Micrografía Electrónica de Transmisión, 80,000 X; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).

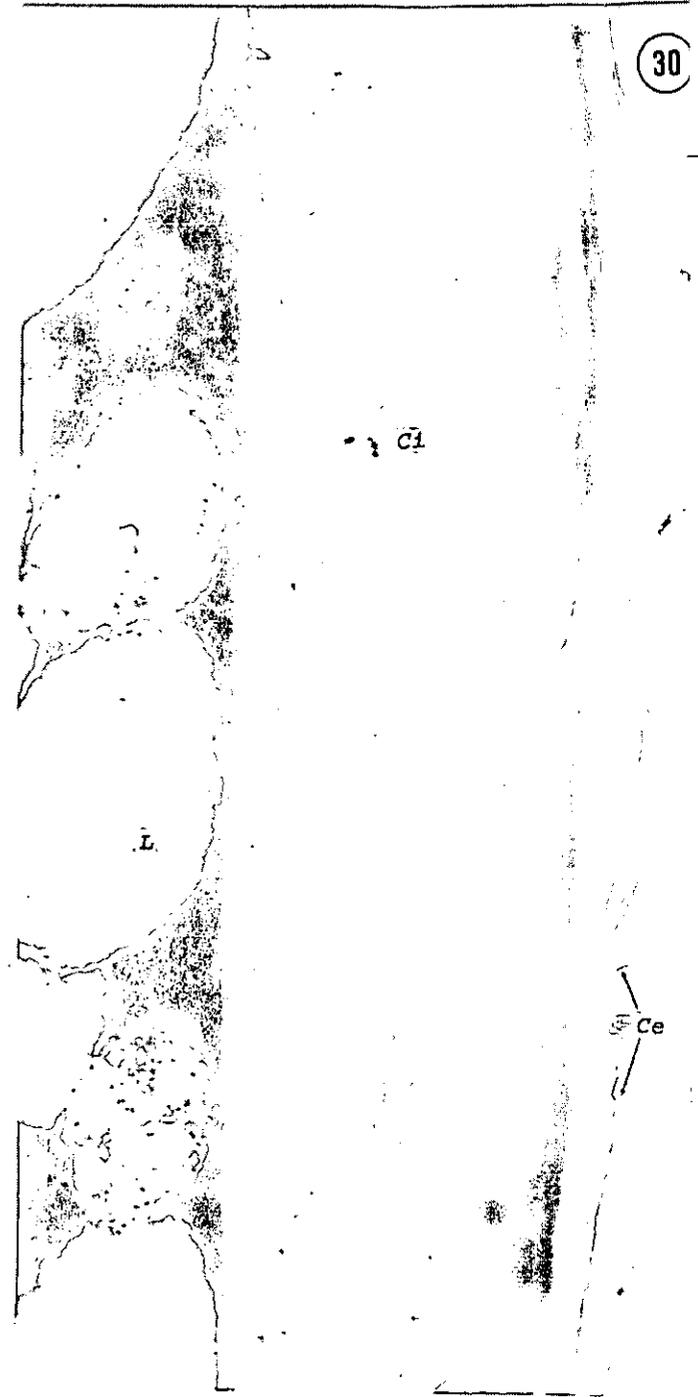
Fig. 32. Corte oblicuo tangencial del casquete superior de la pared de la espora. En el ángulo superior derecho de la parte externa de la espora, se observan fragmentos de la capa evanescente (Ce), muy electro-densa y de constitución fibrilar. De la capa interna (Ci), se observan cuatro arquitecturas diferentes. Para ubicar las zonas de la espora usaremos la dirección de las manecillas del reloj, de tal manera que el contenido de la capa interna (localizado de las 12 a las 3) mostró una apariencia totalmente fibrilar, donde las ultramicrofibrillas electro-transparentes se encuentran en gran abundancia, con diferentes grosores y longitudes, y con apariencia enmarañada. En ésta sobresalen dos zonas diferenciables: (a) una

externa donde las ultramicrofibrillas electro-transparentes se observan más pequeñas formando una red fina; y (b) otra interna caracterizada por presentar ultramicrofibrillas electro-transparentes, de mayor calibre, en disposición longitudinal y, aparentemente, en la misma dirección. En lo que respecta a la zona de las 6 a las 9 (según el reloj), la capa evanescente está prácticamente ausente; la capa interna parecería estar constituida de tres subcapas, la externa se observó granular y delgada (0.3μ) una central menos electrodensa y del doble de grueso que la primera y, finalmente, una interna con un grosor de 0.6μ más electrodensa y con ultramicrofibrillas electro-transparentes mucho más visibles. En tanto que de las 9 a las 11, se puede observar fragmentos de la capa evanescente (Ce). La capa interna (Ci) parece estar constituida por 3 subcapas diferentes, con un contenido de un material amorfo compacto, en el que no se observa las ultramicrofibrillas electro-transparentes, como se observaron en su contraparte (Micrografía Electrónica de Transmisión, 30,000 X; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).

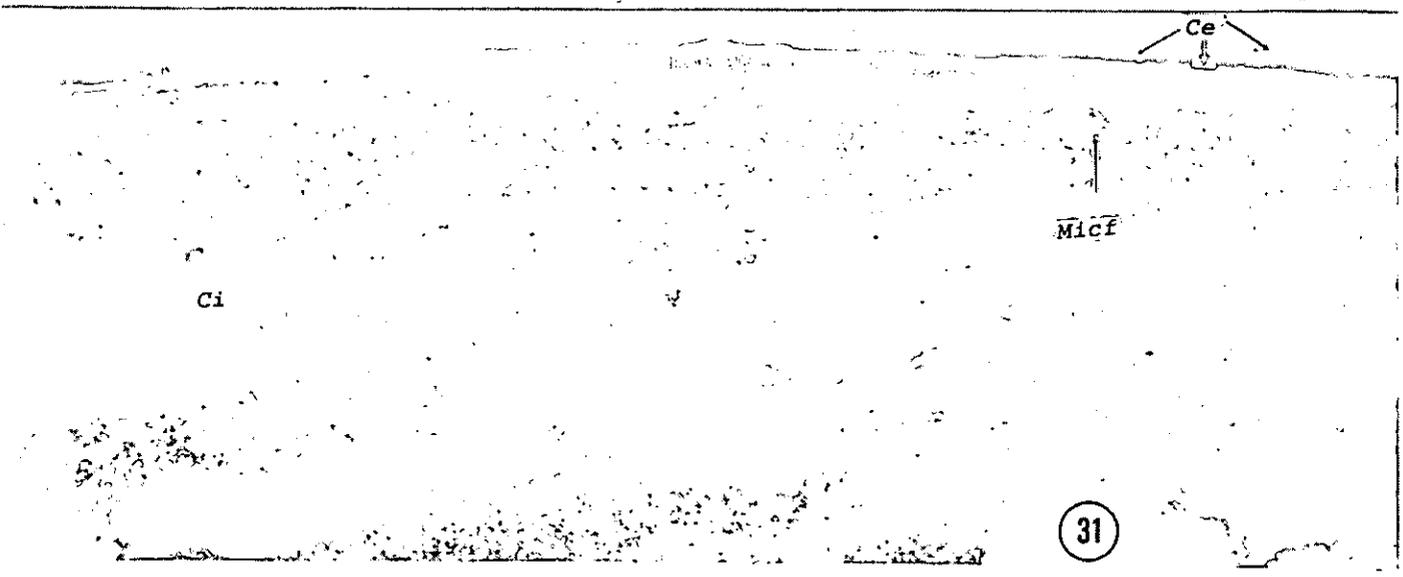
Fig. 33. Se observan, en detalle, las fibrillas electro densas de la capa evanescente (Ce) con forma de espículas y, por debajo de ésta, las ultramicrofibrillas electro-transparentes (Micf; de quitina) que constituyen el esqueleto de la pared. (Micrografía Electrónica de Transmisión, 50,000 X; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).



29



30

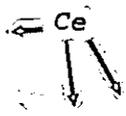


31

32



33



Ci

Cortes oblicuos de la pared de la espora observados en el MET.

Fig. de la 34 a la 36. Se observa la capa evanescente (Ce) con grosor que varió de 1 a 1.5 μ , aparecen las estructuras ovoides parecidas a bacterias (b), que se encuentran incluidas en ésta. Se pudieron observar dos características: (1) en ciertas regiones de la parte basal, se observan los filamentos laminares muy electro densos; y (2) en la mayor parte, se observó de aspecto granular y menos electrodensa (Fig. 34; ángulo superior). La capa interna (Ci), muestra 4 subcapas, con características ultramorfológicas muy bien diferenciadas, respecto al arreglo de las ultramicrofibrillas electro-transparentes (Mcf) que constituyen el esqueleto de la capa interna de la pared crean la laminación.

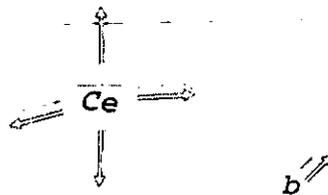
La primera subcapa o lámina es la más externa, y tiene un grosor aproximadamente de 800 nm y es menos electrodensa que la parte interna. Las ultramicrofibrillas electro-transparentes (Mcf) se observaron en posiciones longitudinal y radial, formando una red muy fina, embebida en una matriz electro-densa y escasa. También se pudieron observar, en el centro de esta subcapa, paquetes de ultramicrofibrillas electro-transparentes dispuestos en forma longitudinal y paralelos, donde la matriz es tanto más abundante como visible; esta zona es diferente en sus extremos (Figs. 34-36). Lo antes observado nos indica como la conformación de esta subcapa va cambiando, desde la parte más externa hasta la más interna. Sin embargo, ésta se distingue totalmente de la siguiente subcapa.

La segunda subcapa presentó un grosor aproximado de 450 nm., donde las microfibrillas electro-transparentes (Mcf), se observaron en disposición de semi-arqueada a arqueada (SbcA).

La tercera subcapa, con un grosor aproximado de 900 nm, las microfibrillas (Mcf) están dispuestas en forma arqueada (SbcA), siendo los extremos de sus arcos más electro-densos y las partes apicales o curvadas electro-transparentes, donde se definen muy bien las ultramicrofibrillas de, aproximadamente, 15 nm.

La cuarta y última subcapa está separada de la tercera, por una gran cantidad de microfibrillas dispuestas paralela y longitudinalmente, observándose una zona fuertemente electrodensa, que permite ver claramente las microfibrillas. Después de esta zona lineal electrodensa, la cuarta subcapa o lámina se observa similar a la primera aún en el grosor (800 nm). Considerando las cuatro subcapas, el grosor total de la pared fue de 3 μ . (Micrografía Electrónica de Transmisión, 70,000; 87,000; y 90,000 X, respectivamente; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).

34



1

MicP

2

Scā

MicP

3

Scā

4

①

②

③

④

33

Cortes de la pared de la hifa de sujeción (Hs) observados en el MET.

Fig. 37. Corte transversal de la zona superior del embudo, esta estructura, hace contacto con la espora, y corresponde a la parte más ancha del embudo, con forma de una rosca o dona y diámetro de 14μ ; el grosor de la pared varía de 2.5 a 3μ . Se pueden observar remanentes de la capa externa o evanescente (Ce). En la capa interna (Ci) se observan 4 subcapas. El contenido citoplasmático (C) se observó granular y adosado a la periferia de la parte interna de la pared. El centro está totalmente ocupado por vacuolas vacías que, probablemente, contenían gotas lipídicas las cuales, quizá, fueron extraídas por los solventes durante el procesamiento para su posterior observación. (Micrografía Electrónica de Transmisión a $15,000 X$; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).

Fig. 38. Corte transversal de la zona inferior del embudo. Se observa como una estructura circular de, aproximadamente, 7μ de diámetro, con una pared de 1.5 a 2μ de grosor. En la pared se distingue una zona externa (Ze) y una interna (Zi); la externa es multi-laminada, en tanto que la interna es compacta. (Micrografía Electrónica de Transmisión, $15,000 X$; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).

Fig. 39. Corte Oblicuo de la parte central del embudo. Se observa de forma ovalada de aproximadamente 6 a 7μ . En la parte externa se localiza la capa evanescente (Ce). La capa interna (Ci), con un grosor aproximado de 1.5 a 2μ , y de aspecto, compacto donde se observan tenuemente las ultramicrofibrillas electro-transparentes (Micf; de quitina). Se presenta un marcado cambio en el área total del citoplasma, comparando con las Figuras 37 y 38 ya que, en este caso es, aproximadamente, de 3.5 a 4μ , es decir, casi el triple que

la parte superior de la estructura (Fig. 37) y uno y medio más que la parte inferior (Fig 38). A 40 000 X las observaciones permitieron distinguir dos zonas en la capa interna: (a) una externa (Z_e), donde se definen, muy claramente, las ultramicrofibrillas electro-transparentes; y (b) otra interna (Z_i) multilaminada (Micrografía Electrónica de Transmisión, 40,000 X; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).

Fig. 40. Corte Oblicuo de la parte central del embudo. Se observan algunas características importantes, ya que la zona externa de la capa interna se encontró constituida por 4 subcapas a su vez, multilaminadas, muy finas, entre las cuales se encuentran embebidas las ultramicrofibrillas electro-transparentes, muy abundantes y finas por lo que, esta zona, se observó compacta y homogénea. Éstas capas, tienen un grosor, cada una de ellas, de la externa a la interna aproximadamente de: 200; 250; 400; y 200 nm, respectivamente, obteniéndose un grosor total, en la zona externa (Z_e) de, aproximadamente, 1 μ . La zona interna (Z_i) está constituida por 6 subcapas cada una de ellas multilaminada, pero con muy distinta electronegatividad, e intercaladas densas con claras, cuyo grosor, de la externa a la mas interna es, aproximadamente, de: 250; 50; 150; 50; 150; y 200 nm, respectivamente. El diámetro total de la zona interna fue, aproximadamente de 1 micra, es decir, que ambas zonas, externa e interna, son del mismo grosor; sin embargo, la ultra-morfología es totalmente diferente y forman una pared de, aproximadamente, 2 μ de grosor (Micrografía Electrónica de Transmisión a 110,000 X; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).

37



38




cvb

zi

ze

ci


ce

39

Ci

C

ze

zi

ci

o

o

o

o

o

o

o

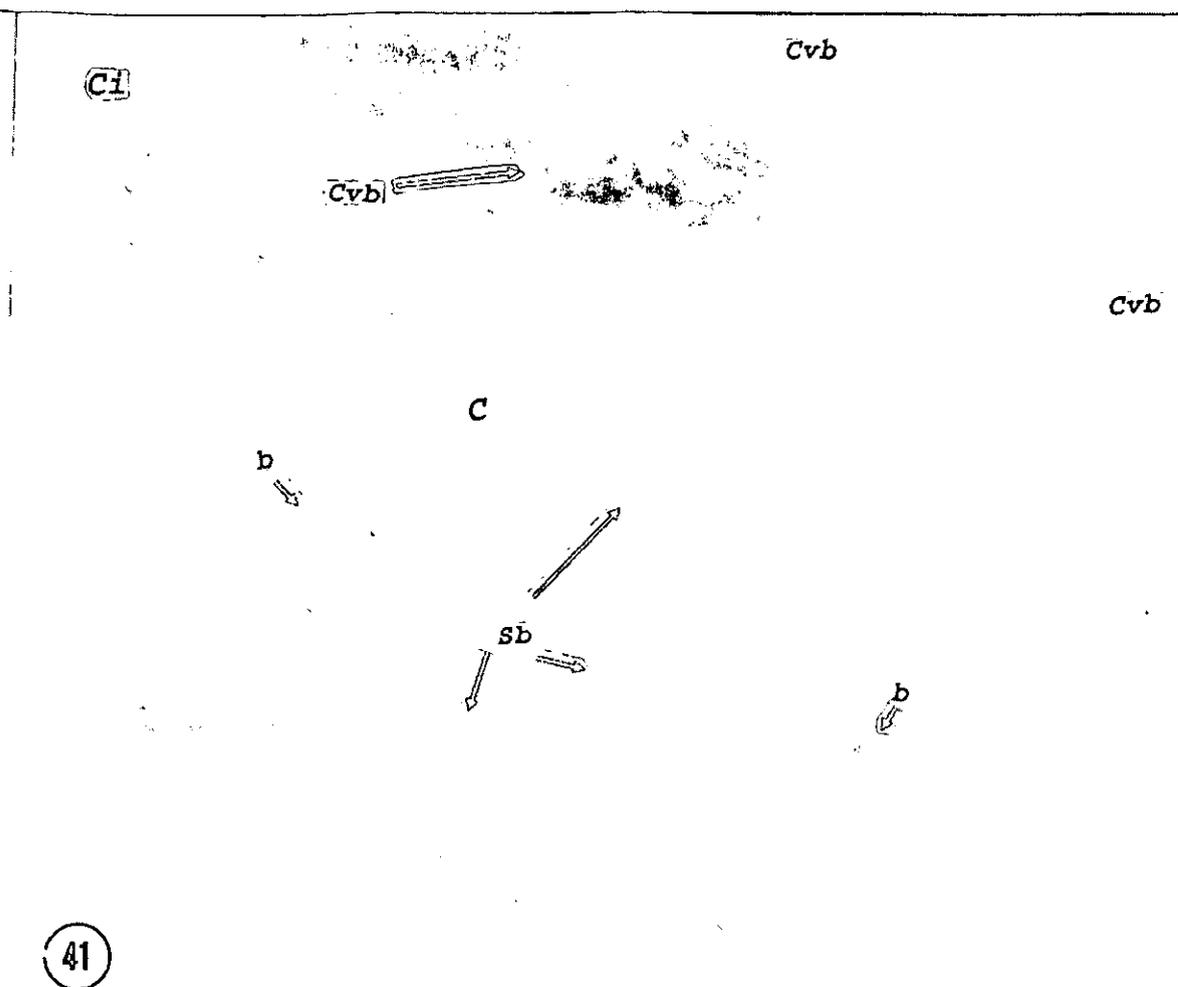
o

o

o

o

o



41

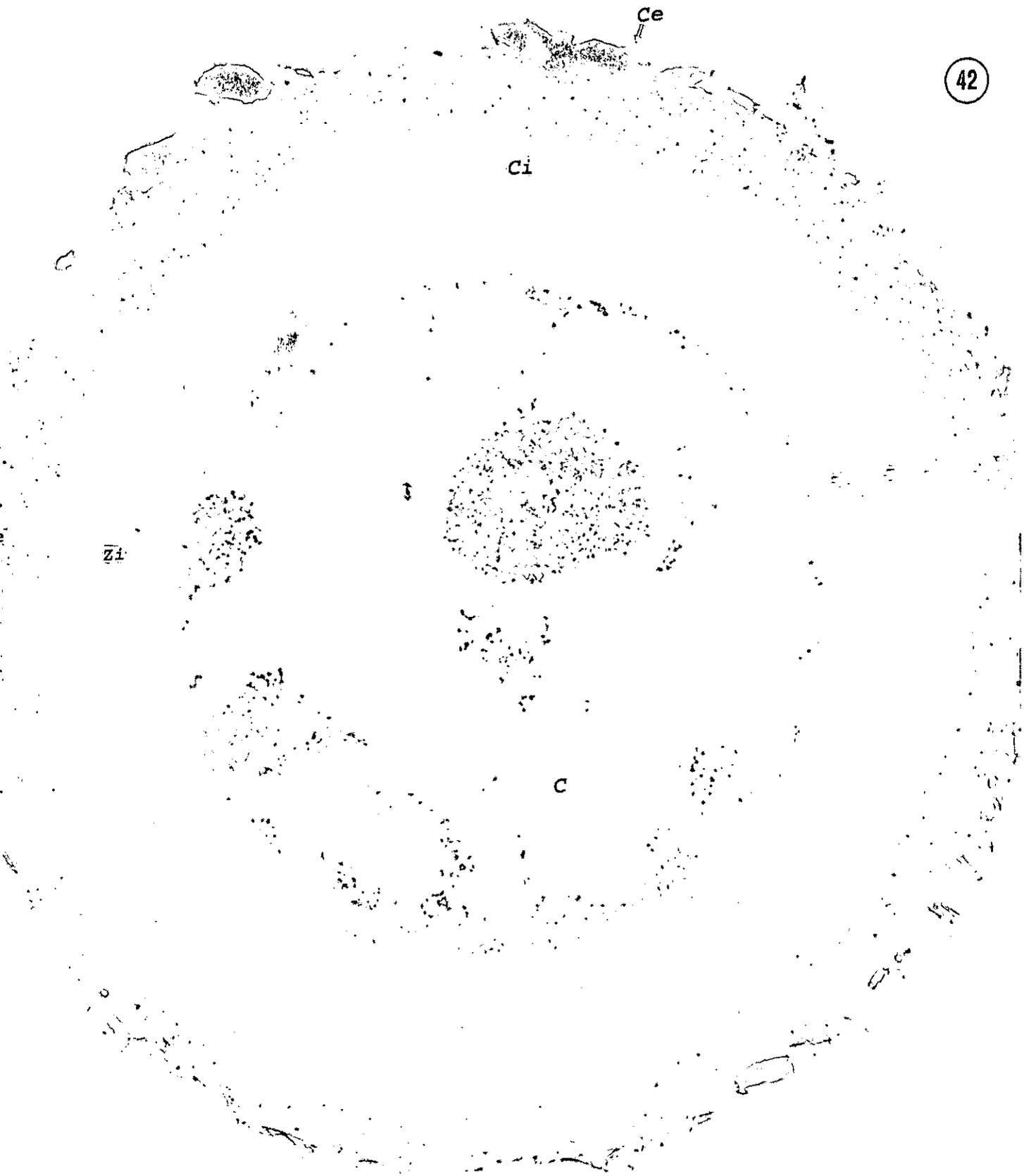
g. 41. Se observan estructuras parecidas a bacterias aisladas y paquetadas distribuidas en el citoplasma de la parte central del budo. (Microfotografía electrónica de Transmisión 100,000 X; de emplaques procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y anilo 5%).

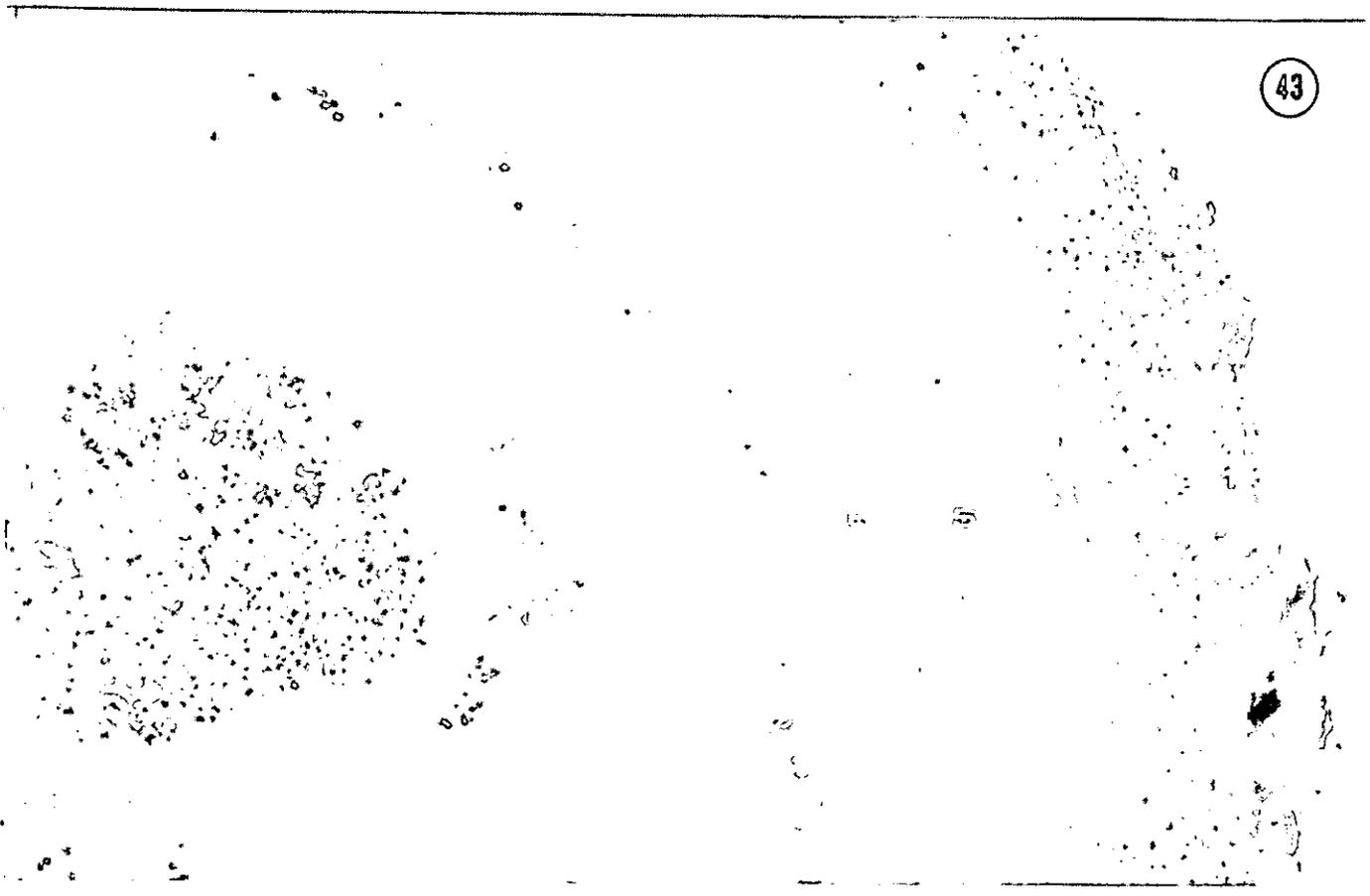
Cortes del Micelio Externo grueso observados por MET.

Fig. 42. Corte transversal de la pared de la hifa. Se observan la cubierta y la pared; la cubierta exterior (Ce) es de, aproximadamente, 0.1μ , constituida de microfibrillas finas electro-densas, apiladas y muy compactas. Esta capa exterior parece tener similitud con la capa evanescente de la espora, pero es mucho más delgada, fina y frágil. La pared interna (Ci), con un grosor de 1μ , está constituida en su interior por 6 subcapas de diferente grosor siendo, de la externa a la interna de, aproximadamente: 80, 130, 170, 120, 270 y 230 nm de ancho, respectivamente. En el citoplasma (C) se pueden observar unas estructuras con formas ovoides de, aproximadamente, de 1 a 1.5μ de diámetro parecidas a bacterias. **Fig. 43.** Se observaran las 6 subcapas o láminas que la forman. Las tres láminas externas son difíciles de diferenciar entre ellas, sin embargo, hay partes en las que se observaron delimitadas por líneas más electro-densas, que permiten diferenciarlas. Las subcapas internas; 4, 5 y 6, se delinean perfectamente y se muestran menos electro-densas. En la pared total se observan dos zonas: (1) las tres primeras subcapas, que constituyen la parte externa, son más electro-densas que las tres que constituyen la pared interna; y (2) tanto la parte interna como la externa se constituyen de tres subcapas o láminas dispuestas en orden creciente por su grosor. El interior de las láminas está constituido por microfibrillas electro-transparentes dispuestas en varias direcciones y entrecruzadas unas con otras, a manera de una red, que constituyen el esqueleto filamentoso embebido en un material electro-denso que es la matriz (Micrografía Electrónica de Transmisión, 40,000 y 80,000 X respectivamente; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).

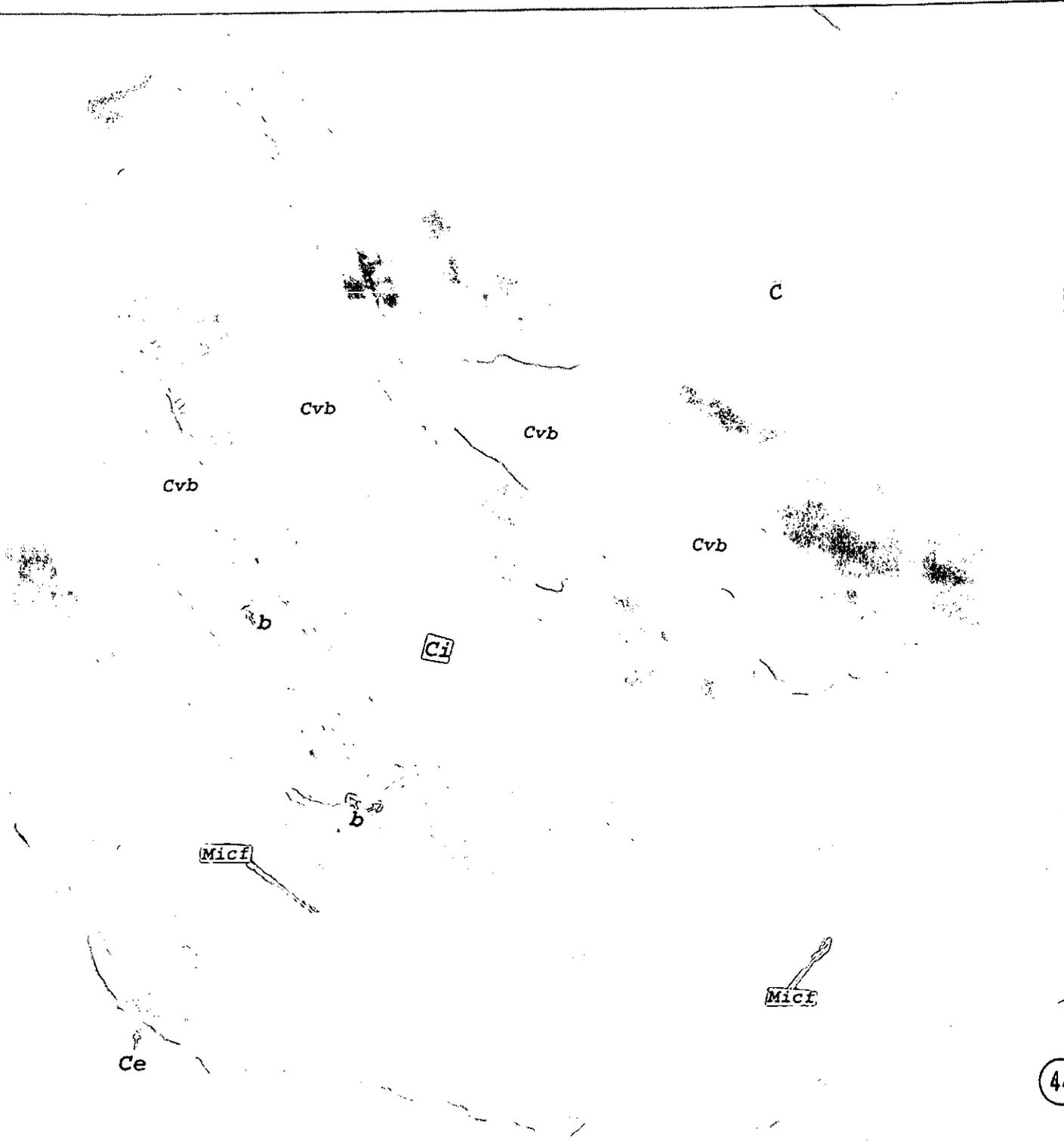
Fig. 44. Corte oblicuo donde destaca la laminación junto con las cavidades que contienen bacterias (Cvb) e, igualmente, se pueden observar las bacterias (b) y las ultramicrofibrillas electro-transparentes (Micf). (Micrografía Electrónica de Transmisión a 60,000 X; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).

42





43

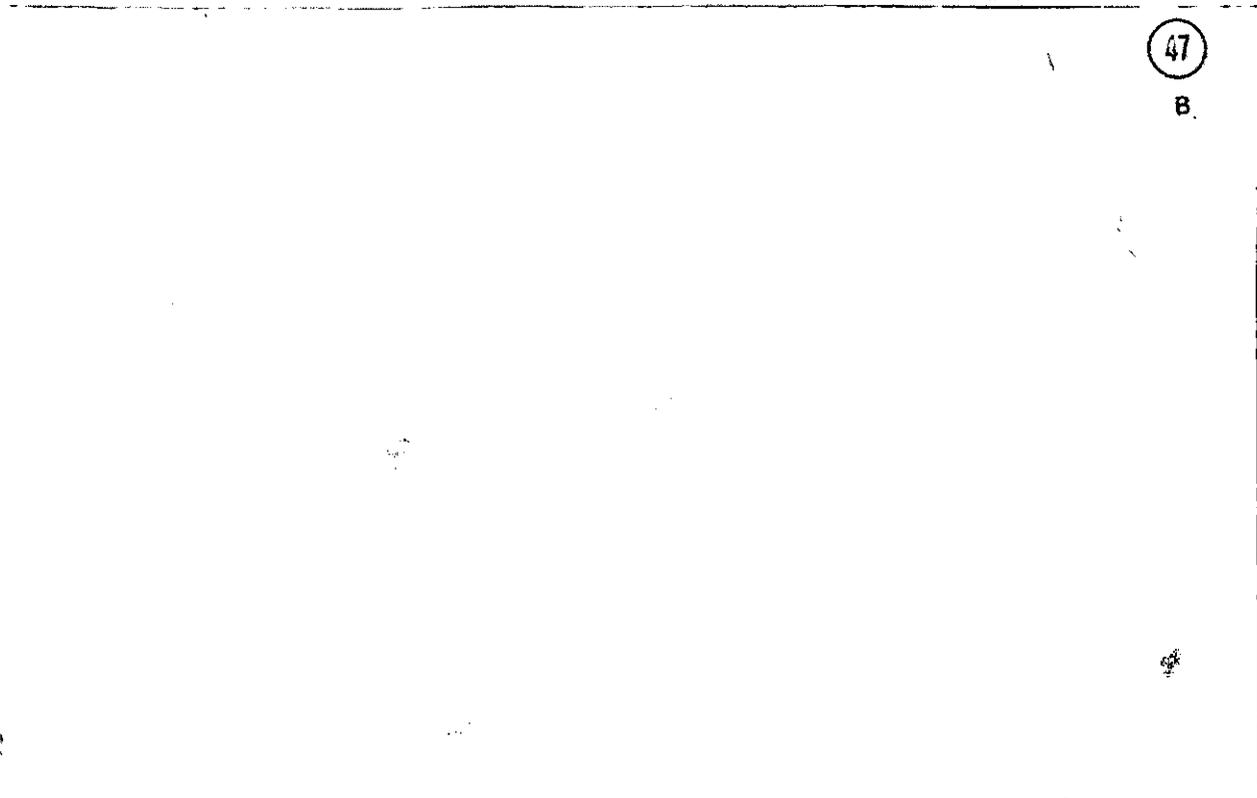
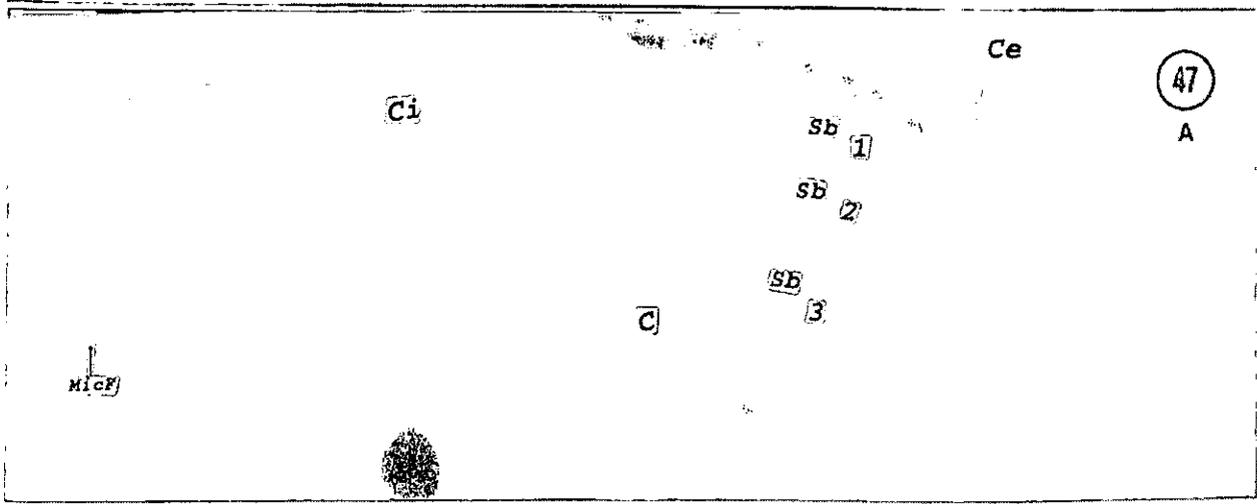
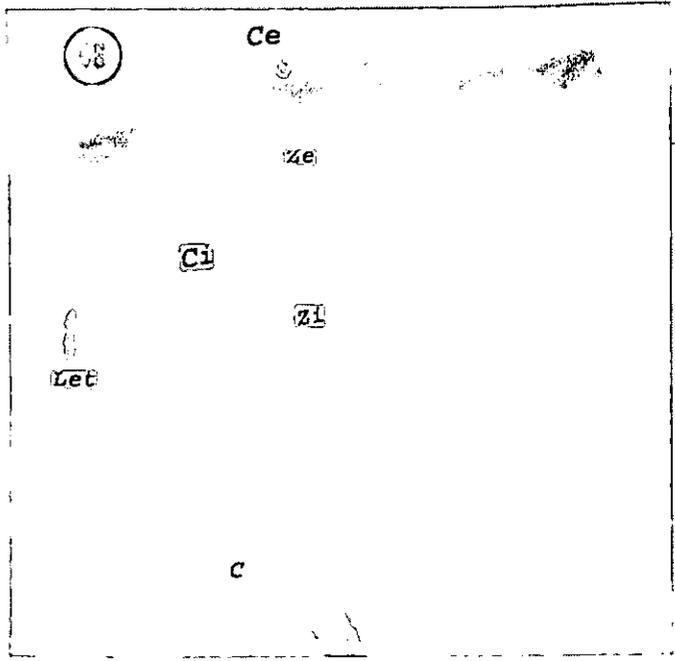
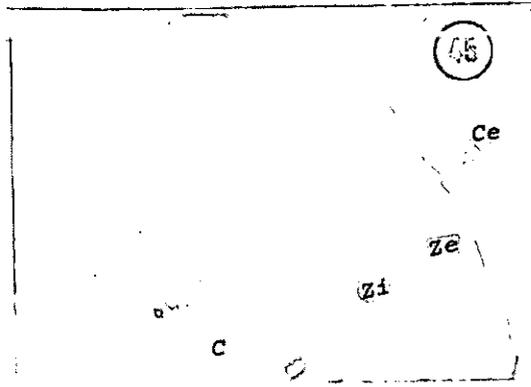


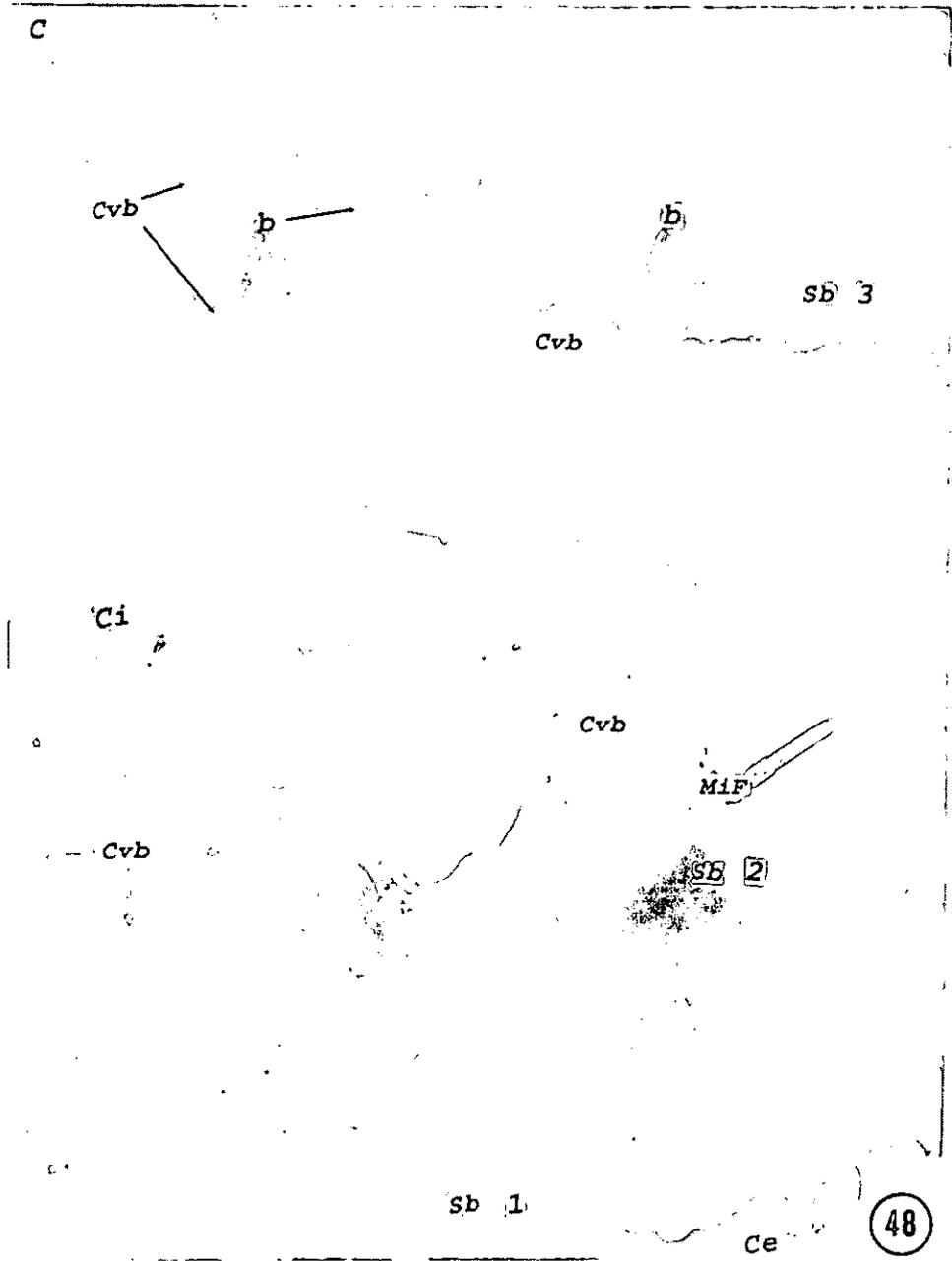
Cortes del Micelio Externo delgado observados por MET.

Fig. 45 y 46. Corte transversal que muestra el diámetro de la hifa y el grosor de la pared de, aproximadamente, 2 y 0.5 μ , respectivamente. En la pared se observa la capa externa (Ce) y la pared se observa dividida por una línea electro-transparente que delimita la pared en, zona externa (Ze) y zona interna (Zi); en esta última se observan las microfibrillas electro-transparentes. (Micrografía Electrónica de Transmisión, 45,000 y 110,000 X, respectivamente; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).

Fig. 47 A y B. Corte Oblicuo se observa la capa externa (Ce) y la pared finamente multilaminada, con este ángulo de corte no se observó la línea divisoria antes mencionada, pero se observan tenuemente tres subcapas y las microfibrillas electro-transparentes. (Micrografía Electrónica de Transmisión, 120,000 X, respectivamente; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).

Fig. 48. En la pared se observan tres subcapas con espacios cavernosos o cavidades (Cvb), que contienen estructuras esféricas, electrodensas de 300 a 600 nm parecidas a bacterias. (Micrografía Electrónica de Transmisión, 180,000 X; de ejemplares procesados para MET y contrastados con plomo 0.3% y uranilo 5%).





Observaciones de Microscopía óptica de la colonización interna de la raíz huésped.

Fig. 49 A. Extensión del tubo germinativo (Tg), en el que se observa el contacto con la superficie de la raíz y la formación del apresorio (Ap). (Fotomicrografía óptica, 350 X; tinción con azul de tripán).

Fig. 49 B. Se observa la hifa de penetración (Hp) y el inicio de la extensión por la parte externa de la corteza de la raíz (Fotomicrografía óptica, 300 X; tinción con azul de tripán).

Fig. 49 C. Desarrollo simultáneo del micelio interno (Mi) y externo (Me) en la raíz (Fotomicrografía óptica, 250 X; tinción con azul de tripán).

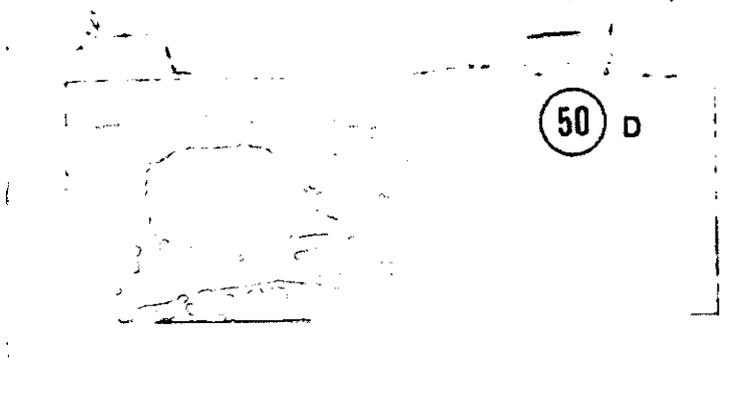
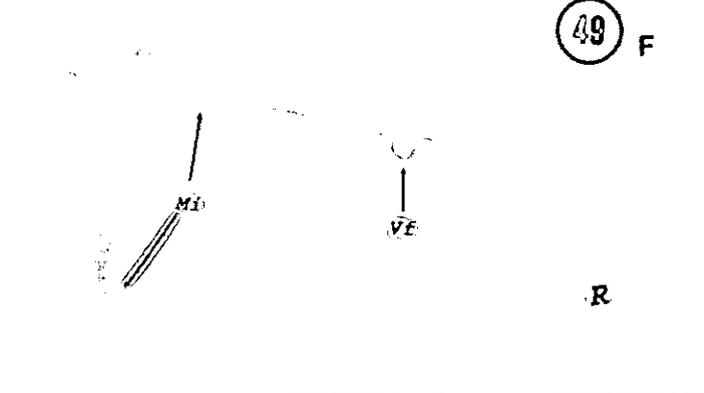
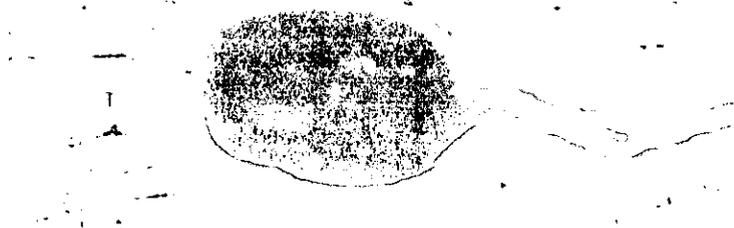
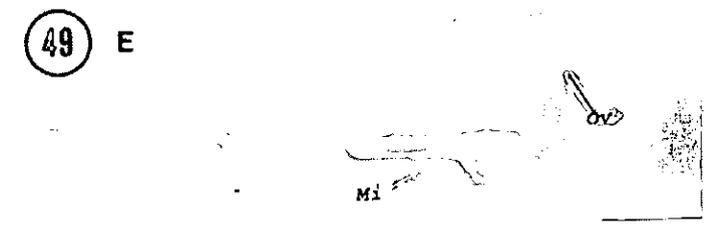
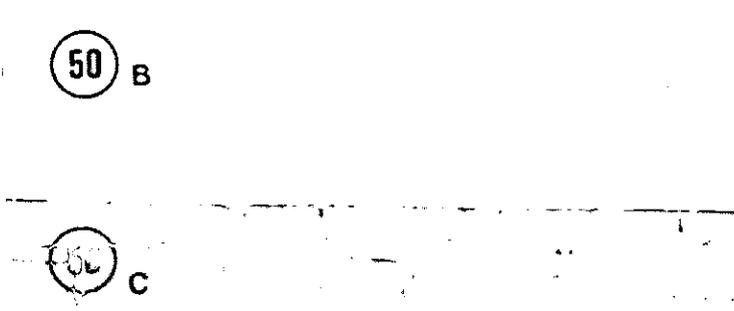
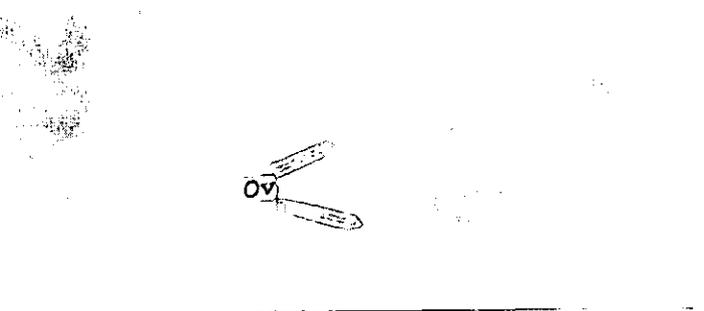
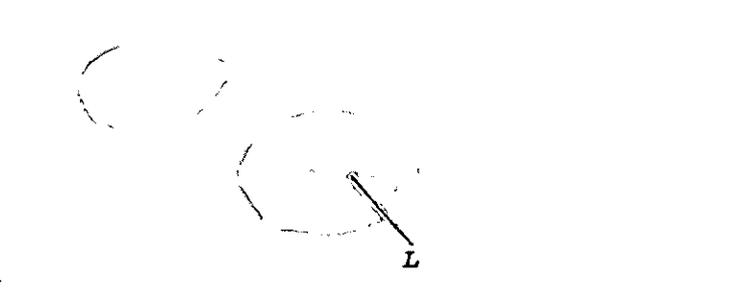
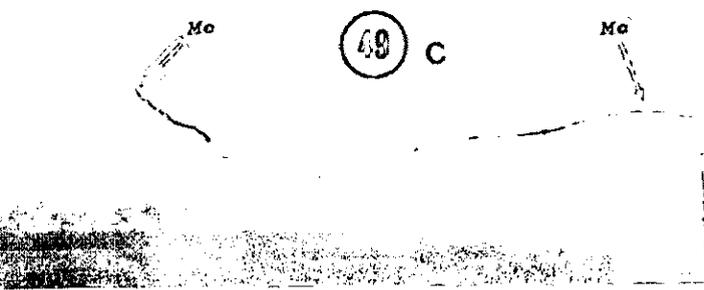
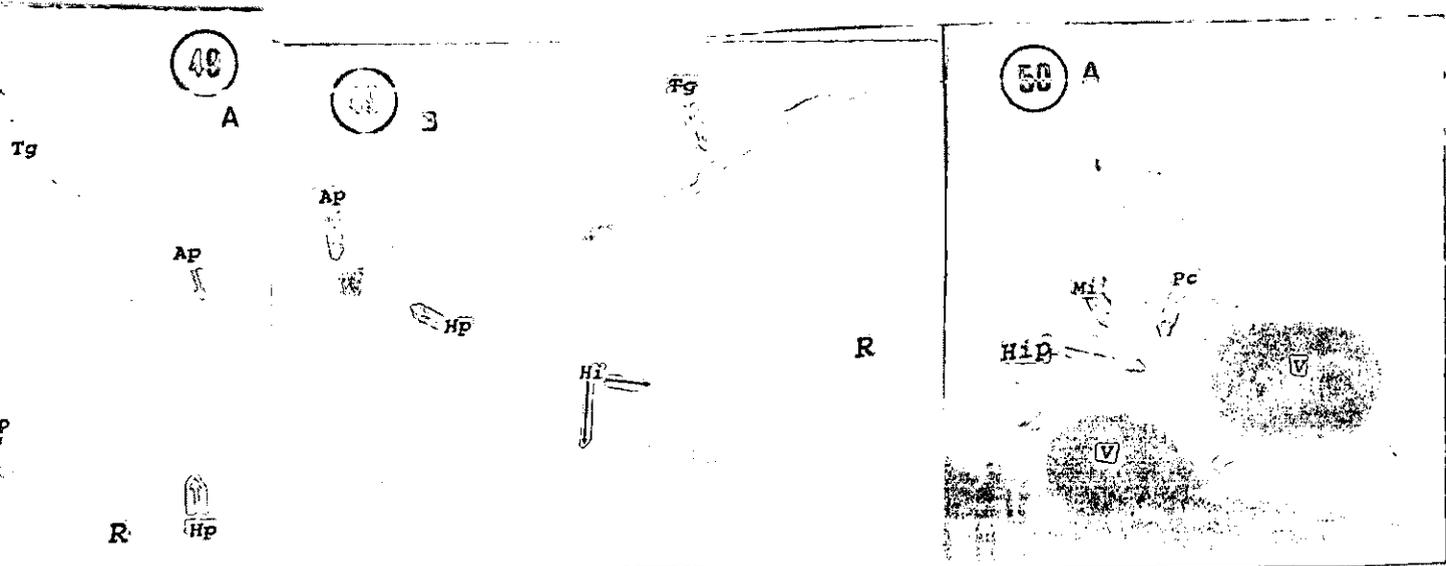
Fig. 49 D. Detalle del desarrollo inicial del micelio interno. Se observan los ovillos contorneados (Ov). (Fotomicrografía óptica, 270 X; tinción con azul de tripán).

Fig. 49 E. Desarrollo inicial de la colonización del hongo arbuscular *Glomus* sp. después de dos meses de la germinación de la planta huésped, donde se observa perfectamente el micelio interno (Mi) y ovillos (Ov). (Fotomicrografía óptica, 200 X; tinción con azul de tripán).

Fig. 49 F. El micelio interno (Mi) con ramificaciones dicotómicas y el inicio de la formación de las vesículas (Vf). Después de tres meses de la germinación de la planta huésped. (Fotomicrografía óptica, 220 X; tinción con azul de tripán).

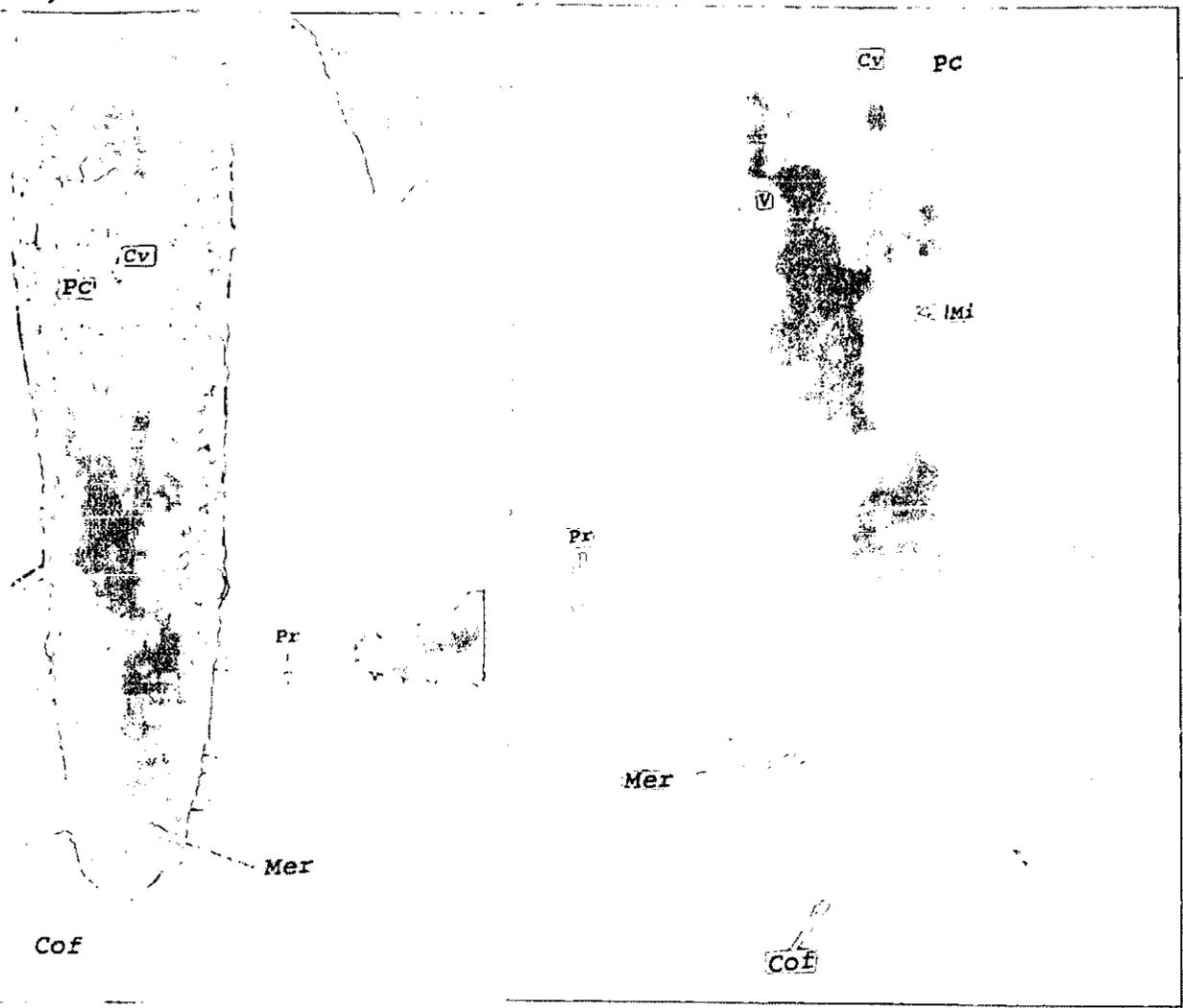
Figs. 50 A-D. Vesículas con un mes de desarrollo. En la primera figura se observa el micelio interno (Mi) y la hipertrofia de la pared celular del huésped (Pc), causada por la vesícula del hongo en crecimiento, y en la segunda figura se observa el contenido de la vesícula (Fotomicrografía óptica, 200 X campo claro y contraste de fases, respectivamente; tinción con azul de tripán).

Figs. 51 A-C. Se observa el inicio de la llamada "*fase meseta*" que corresponde, aproximadamente, el 50% de colonización de la raíz y al primer mes de la esporulación del hongo. Después de cinco meses de la germinación de la planta huésped. Observe el micelio interno (Mi) constituido por vesículas (V) dispuestas en forma de espiral al cilindro vascular (Cv). (Fotomicrografía óptica, 180, 200 y 250 X, respectivamente; tinción con azul de tripán).



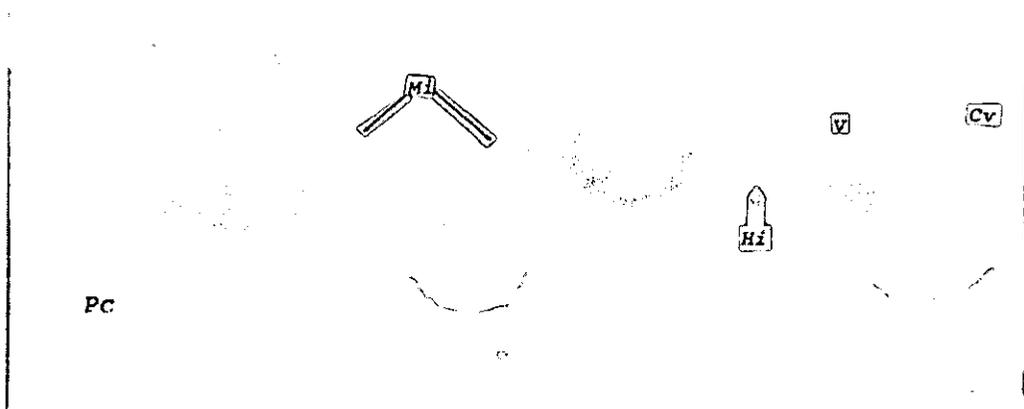
51

A



51

C



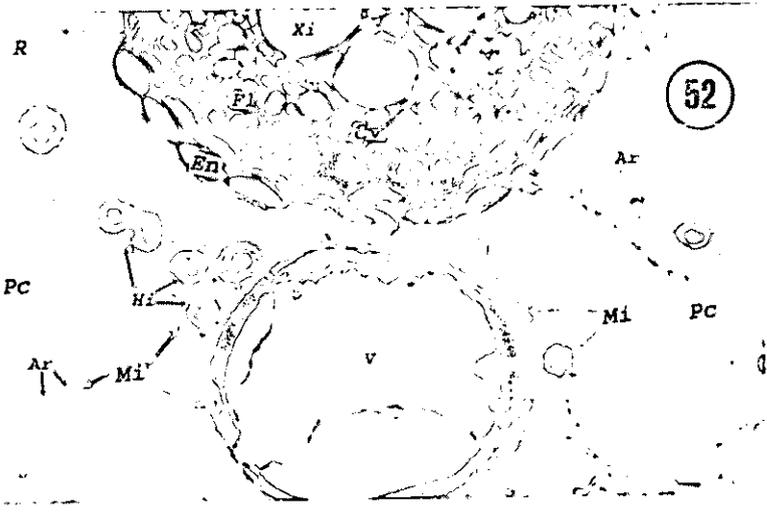
Cortes transversales de la raíz colonizada y observada con Microscopía óptica y electrónica de transmisión.

Fig. 52. Se observa al centro el cilindro vascular (Cv) constituido por el Xilema (Xi) y Floema (Fl), en la periferia la endodermis (En) y por fuera de ésta el parénquima cortical colonizado por el micelio interno del hongo formado por hifas intra e intercelulares (Hi), vesículas (V), y arbuscúlos (Ar). (Fotomicrografía óptica, 500 X; de ejemplares procesados para MET; tinción azul de tolouidina 5%).

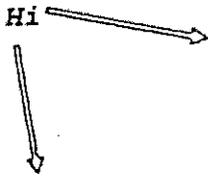
Fig. 53. Se observa una de las hifas intercelulares (Hi) de forma circular cuyo diámetro es de 3.5μ , con un grosor de pared de 0.5μ ; ésta y el citoplasma aparentan tener la misma electro-densidad al grado de confundirse observándose una continuidad. Su citoplasma muestra núcleos (Ncl) y mitocondrias (M) pero, más a menudo, resaltan glóbulos pequeños muy electrodensos (Ged) distribuidos en todo el citoplasma (C), siendo prominentemente grandes las áreas vacuoladas (Vc). (Micrografía Electrónica de Transmisión, 50,000 X; de ejemplares procesados para MET; contrastadas con plomo 0.3% y uranilo 5%).

Figs. 54. Se observa el corte transversal de las ramas de un arbuscúlo (Ar), los cuales aparecen como pequeños anillos de 1 a 1.5μ de diámetro, muy cercanos entre si, con separaciones de, 100 a 300 nm. En la pared (P), que tiene un grosor de 100 a 150 nm, se observan con gran claridad las ultramicrofibrillas electrotransparentes (Mcf). Las características citoplasmáticas (C) son muy parecidas a las antes descritas; no obstante, hay una mayor vacuolación (Vc) y presencia de mitocondrias (M). (Micrografía Electrónica de Transmisión, 85,000 X; de ejemplares procesados para MET; contrastadas con plomo 0.3% y uranilo 5%).

Fig. 55. Se observa un corte longitudinal de la rama principal del arbúsculo (Ar), cuyo diámetro es de 500 nm, que muestran un citoplasma (C) totalmente vacuolado (Vc) y una pared (P) extremadamente delgada de 62 nm en la que se observan claramente las ultramicrofibrillas electro-transparentes (Mcf), extremadamente finas y laxas. Estas características se relacionan con una actividad de difusión o permeabilidad, probablemente, debido a una alta actividad metabólica (Micrografía Electrónica de Transmisión, 80,000 X; de ejemplares procesados para MET; contrastadas con plomo 0.3% y uranilo 5%).



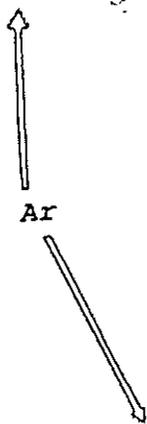
133



53



54



55

Ar

Micf

P

Vc



BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, L.K. and Robson, A.D. (1977): The distribution and abundance of vesicular arbuscular endophytes in some Western Australian soil, *Australian Journal of Botany*, 25: 515-522.
- Abbott, L.K. and Robson, A.D. (1977): Growth stimulation of subterranean clover with vesicular-arbuscular mycorrhizas, *Australian Journal of Agricultural Research*, 28: 639-649.
- Abbott, L.K. and Robson, A.D. (1979): A quantitative study of the spores and anatomy of mycorrhizas formed by species of *Glomus*, with reference to its Taxonomy, *Australian Journal of Botany*, 27: 363-375.
- Abbott, L.K. and Robson, A.D. (1984): The effect of mycorrhizas on plant growth, IN: **Mycorrhizae**. Powell, C. Ll., and Bagyaraj., D.J. (eds), CrC Press, Boca Raton, Florida, . pp 113-130.
- Abbott, L.K. and Gazey. (1994): An ecological view of the formation of micorrhizas, *Plant and Soil*, 159: 69-78.
- Aguilar, C.A.; Rodriguez, R.D. and Barea, J.M. (1986): Efect of soil micro-organisms on spore germination and growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*, *Transactions of the British Mycological Society*, 86 (2) pp 337-340.
- Ames, R.N. and Schneider, R.W. (1979): *Entrophospora*, a new genus in the Endogoneaceae, *Micotaxon*, 8: 347-352.
- An, Z. Q. and Hendrix, J.W. (1988): Determining viability of endogonaceous spores with a vital stain, *Mycologia*, 80: 259-261.

Azcón-Aguilar, C.; Díaz-Rodríguez, R.M. y Barea, J.M. (1986): Effect of soil microorganisms on spore germination and growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*, *transactions of the British Mycological Society*, 86: 337-340.

Azcón, G.A. y Barea, J.M. (1980): Micorrizas. *Investigación y ciencia*, pp 8-16. Barcelona España.

Balestrini, R.; Berta, G. and Bonfante, P. (1992): The plant nucleus in mycorrhizal roots: positional and structural modifications, *Biology of the Cell* 75: 235-243.

Becard, G. and Pfeffer, P.E. (1993): Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development, *Protoplasma* 174: 62-68.

Berbee, M.L. and Taylor, J.W. (1993): Ascomycete Relationships: Dating the origin of asexual lineages with 18S ribosomal RNA gene sequence data, *IN: The Fungal holomorph* (Edited by D.R. Reynolds and J.W. Taylor): Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. CAB International, pp 67-78.

Berch, S.M. (1988): Copilation of the Endogonaceae, *Mycologue Publications*. Canada.

Berch, S.M. and Koske, R.E. (1986): *Glomus pansihalos*, a new species in the *Endogonaceae*, *Zygomycetes*, *Mycologia* 78: 832-836.

Berta, G.; Sgorbati, S.; Soler, V.; Fusconi, A.; Trotta, A.; Citterio, A.; Bottone, M.G.; Sparvoli, E. and Scannerini, S. (1990): Variation in Chromatin structure in host nuclei of vesicular-arbuscular mycorrhiza, *New Phytol*, 114: 199-205.

Benjamin, R.K. (1979): Zygomycetes and their spores IN: The Whole Fungus Vol. 2 (Edited by B. Kendrick) National Museums of Canada, Ottawa. pp 573-621.

Betivenga, S.P. and Morton, J.B. (1993): Systematics of glomalean endomycorrhizal fungi: current views and future directions IN: Mycorrhizae and Plant Health (Edited by F. Pflieger and R.L. Linderman) APS Press St Paul, MN.

Bianciotto, V. and Bonfante, P (1993): Evidence of DNA replication in an arbuscular mycorrhizal fungus in the absence of the host plant, *Protoplasma* 176: 100-107.

Bonfante-Fasolo, P. (1984): Anatomy and morphology of VA mycorrhizae, pp. 5-34. IN: **VA Mycorrhiza** (Edited by Powell, C.Ll., and Bagyaraj, D.J.) CRC Press, Boca Raton, Florida.

Bonfante-Fasolo, P. (1987a): Some ultrastructural features of the vesicular-arbuscular mycorrhiza in the grapevine, *Vitis* 17: 386-395.

Bonfante-Fasolo, P. (1987b): Vesicular-arbuscular mycorrhizae: Fungus-Plant interactions at the cellular level, *Symbiosis*, 3: 249-268.

Bonfante-Fasolo, P. (1994): Alteration of host surface by mycorrhizal fungi IN: O Petrini and Marois (eds): Alteration of host walls by fungi APS Press.

Bonfante-Fasolo, P.; Berta, G. and Fusconi, A. (1987): Distribution of nuclei in a VAM fungus during its symbiotic phase, *Transaction of the British Mycologist Society*, 88: 263-266.

Bonfante-Fasolo, P.; Dexheimer, J.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V.; and Scannerini, S. (1981): Cytochemical modifications in the host-fungus interface during intracellular interactions in

vesicular-arbuscular mycorrhizae, *Plant Sci Letters*, 22: 13-21.

Bonfante-Fasolo, P and Fontana, A. (1985): VAM fungi in *Ginkgo biloba* roots: Their interaction at cellular level, *Symbiosis*, 1: 53-67.

Bonfante-Fasolo, P. and Gianinazzi-Pearson, V. (1979): Ultrastructural aspects of endomycorrhiza in the Ericaceae. I. Naturally infected hair roots of *Calluna vulgaris* L. Hull. *New Phytol*, 83: 739-744

Bonfante-Fasolo, P. and Gianinazzi-Pearson, V. (1986): Wall and plasmalemma modifications in mycorrhizal symbiosis, pp 65-73 IN: **Physiological and Genetical Aspect of Micorrhizae** (Edited by Gianinazzi-Pearson, V., and Gianinazzi, S), INRA Paris.

Bonfante-Fasolo, P and Grippiolo, R. (1984): Cytochemical and biochemical observations on the cell wall of the spore of *Glomus epigaeum*, *Protoplasma* 123: 140-151.

Bonfante-Fasolo, P.; Marzachi, C. and Testa, B. (1986): Structural modification of the fungal wall before and during VAM symbiosis, *Australian Journal of Botany*, 65: 539-546.

Bonfante-Fasolo, P. and Schubert, A. (1987): Spore wall architecture of *Glomus* spp., *Canadian Journal of Botany*, 65: 539-546.

Bonfante-Fasolo, P. and Vian, B. (1984): Wall texture in the spore of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Protoplasma* 120: 51-60.

Bonfante-Fasolo, P.; Vian, B. and Testa, B. (1986): Ultrastructural localization of chitin in cell wall of a fungal spore, *Biological Cellular*, 57: 265-270.

Bonfante-Fasolo, P.; Vian, B and Faccio, A (1988): Texture of cell wall in VAM leeks, 2nd European Symposium on Mycorrhizae, Praga, pp

14-15.

Bonfante-Fasolo, P.; Vian, B.; Perotto, S.; Faccio, A.; and Knox, J.P. (1990): Cellulose and pectin localization in roots of mycorrhizal *allium porrum*: labelling continuity between host cell wall and interfacial material, *Planta*, 180: 537-547.

Bowen, G.D. (1987): The biology and physiology of infection and its development, 27-57. IN: **Ecophysiology of Mycorrhizal plant** (Edited by Safir, G.R.) CRC Press, Boca Raton.

Brown, M.F. and Brotzman, H.G. (1979): Phytopathogenic fungi: a scanning electron stereoscopic survey, Extension Division, University of Missouri, Columbia. 355 pp.

Bruns, T.D.; White, T.J. and Taylor, J. W. (1991): Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Sys.* 22: 525-564.

Bucholtz, F. (1912): Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Endogone* Link. *Beih. zum Botan. Centr. Abt.* 29: 147-225.

Carling, D.E. and Brown, M.F. (1982): Anatomy and Physiology of Vesicular-Arbuscular and Nonmycorrhizal Roots, *Phytopatology* 72, No 8.

Carling, D.E.; White, J.A. and Brown, M.F. (1977): The influence of fixation procedure on the ultrastructure of the host endophyte interface of vesicular-arbuscular mycorrhizae, *Canadian Journal Botany*, 55:48-51.

Chambers, S.M.; Dodd, J.C.; Fitter, A.H.; Walker, C. and Young, J.P.W. (1994): Molecular Taxonomy of *Glomus mosseae*, pp22-24 IN **Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development**, European Commission Report, EUR 16728 EN

- Chaloner, W.G. (1970): The rise and fall of the first land plants, *Biological Reviews*, 45: 353-377.
- Cooke, R. (1977): **The biology of symbiotic fungi**. Wiley, J. and Sons, New York.
- Cox, G. and Sanders, F.E. (1974): Ultrastructure of the host fungus interface in a vesicular-arbuscular mycorrhiza, *New Phytol.* 73: 901-912.
- Cox, G. and Tinker, P.B. (1976): Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. I. The arbuscule and the phosphorus transfer: a quantitative ultrastructural study, *New Phytol.* 77: 371-381.
- Debaud, J.C.; Pepin, R. and Bruchet, G. (1981): Etude des ectomycorhizas de *Dryas octopetala*. Obtention de synthèses mycorrhiziennes et de carpophores d' *Hebeloma alpinum* et *H. marginatum*, *Canadian Journal of Botany*, 59:1014-1020.
- Debaud, J.C.; Pepin, R. and Bruchet, G. (1981): Ultrastructure des ectomycorhizas synthétique a *Hebeloma alpinum* et *H. marginatum* de *Dryas octopetala* , *Canadian Journal of Botany*, 59:2160-2166.
- Dexheimer, J.; Gianinazzi, S. and Gianinazzi-Pearson, V. (1979): Ultrastructural Cytochemistry of the host-fungus interface in the endomycorrhizal association *Glomus mosseae*/*Allium cepa*, *Z pflanzen physiol*, 92: 191-206.
- Garriock, M.L.; Peterson, R.L. and Ackerley, C.A. (1989): Early stages in colonization of *Allium porrum* (leek) roots by the VAM fungus *Glomus versiforme*, *New Phytol.* 112: 85-94.
- Gerdemann, J.W. (1955): Wound-healing of hyphae in a phycomycetous mycorrhizal fungus, *Mycologia*, 47: 916-918.

Gerdermann, J.W. (1968): Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annual Review of Phytopathology*, 6: 397-418.

Gerdermann, J.W. (1971): Fungi that form the vesicular-arbuscular type of endomycorrhiza, pp 9-18 *IN: Mycorrhiza* (Edited by Hacsckaylo, E.) Misc. Publs, U.S. Dep. Agric., N., 1189, 255 p.

Gerdermann, J.W. (1975): Vesicular-arbuscular mycorrhizae, pp 575-595. *IN: The Development and Funtion of Roots: 3rd Cabot Symposium, Harvard Forest* (Edited by J.G. Torrey and D.T. Clarkson) Academic Press, London.

Gerdermann, J.W. and Nicolson, T.H. (1963): Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet-sieving and decating, *Transactions of the British Mycological Society*, 46: 235-244.

Gerdermann, J.W. and Trappe, J.M. (1974): The Endogonaceae in the Pacific Northwest, *Mycologia Memoir*, No 5: 1-76.

Gerdermann, J.W. and Trappe, J.M. (1975): Taxonomy of the endogonaceae. pp 35-51. *IN: Endomycorrhizas* (Edited by F.E. Sanders, B. Mosse and P.B. Tinker), Academic Press, London.

Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S. (1983): The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, *Plant and Soil*, 71: 197-209.

Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S. (1986): The physiology of improved phosphate nutrition in mycorrhizal plant. *IN: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Paris INRA pp. 101-109.

Gianinazzi-Pearson, V.; Gianinazzi, S. and Dexheimer, J. (1979): Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Ultrastructural localization of acid and alkaline phosphatasein onion roots infected by *Glomus mosseae* (Nicol. Gerd.)

New Phytologist, 82: 127-132.

Gianinazzi-Pearson, V.; Lemoine, M.C.; Arnould, C. and Morton, J.B. (1994): Localization of $\beta(1-3)$ glucans in spore and hyphal walls of fungi in the Glomales: taxonomic and phylogenetic implications, *Mycologia*: 178: 348-359.

Gianinazzi-Pearson; Morandi, D.; Dexheimer, J. and Gianinazzi S. (1981): Ultrastructural and ultracytochemical features of a *Glomus Tenuis* mycorrhiza, *New Phytol*, 88: 633-639.

Giovanetti, M.; Avio, L.; Sbrana, C. Citernesi, A.S. (1993): Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol & Gerd) Gerd & Trappe, *New Phytol*, 123: 115-122

Glauert, A.M. (1975): Fixation, Dehydration and embedding of biological specimens. North Holland Publishing Co., Amsterdam and New York. 207 pp.

Goldstein, J.I.; Newbury, D.E.; Echlin, P.; Joy, D.C.; Fiori, C. and Lifshin, E. (1981): Pages 534-539 IN: Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. Plenum Press, New York and London, 673 pp.

González, Q. E (1996): "Estudio del Desarrollo Micorrízico Arbuscular, en tres Agroecosistemas Subtropicales con Suelos Calcimagnésicos, a través del Ciclo Biológico de "*Chloris gayana*" Tesis de Posgrado de la Facultad de Ciencias UNAM.

Graham, R.D. (1983): Effects of nutrient stress on susceptibility of plants to disease with particular reference to the trace elements, *Advances in Botanical Research*, 10: 221-276.

- Hall, I.R. and Fish, B.J. (1979): A key to the Endogonaceae, *Transactions of the British Mycological Society*, 73: 261-270.
- Hall, J.L. and Hawes, C. (1991): *Electron Microscopy of plant cell*. Academic Press, London, New York.
- Harley, J.L. (1969): **The biology of mycorrhiza**, 2nd ed., Leonard Hill, London.
- Harley, J.L. (1989): The significance of mycorrhiza, *Mycol Res*, 92: 92-129.
- Harley, J.L. and Smith, S.E. (1983): **Mycorrhizal Symbiosis**. Academic Press, London.
- Hayat, M.A. (1970): Principles and techniques of electron microscopy: biological applications. Vol. I. Van Nostrand Reinhold Co., New York. 412 pp.
- Hayman, D.S. (1980): Mycorrhizae and production of crop. *Nature*, 287: 487-488.
- Hayman, D.S. (1983): The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis, *Canadian Journal of Botany*, 61:944-963.
- Hoch, H.C. (1991): Preparation of cell ultrastructure by freeze substitution IN: **Electron Microscopy of Plant Pathogens** (Edited by K. Mendgen; and D.E. Lesemann) Springer Verlag, Berlin, pp 1-16.
- Holley, J.D. and Peterson, R.L. (1979): Development of a vesicular-arbuscular mycorrhiza in bean roots, *Canadian Journal of Botany*, 57: 1960-1978.
- Janos, D.P. (1980): Vesicular-arbuscular mycorrhizae affects lowland tropical rain forest plant growth, *Ecology*, 61: 151- E

Janos, D.P. (1988): Mycorrhiza application in tropical forestry: are temperate-zone approaches appropriate *IN: **Trees and Mycorrhiza*** (Eduted Forest Research Institute) Malaysia, Kuala Lumpur.

Jeffries, P and Barea, J.M. (1994): Biogeochemical cycling and arbuscular mycorrhizal in the sustainability of plant-soil systems. pp 101-115. *IN: **Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*** (Edited by Gianinazzi, S. and Schuepp) Birkhauser Verlag Basel/Switzerland.

Kaspari, H. (1973): Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Feinstruktur der endotrophen Tabakmykorrhiza. *Arch. Microbiol.* 92: 201-207.

~~(1)~~ ~~(2)~~ ~~(3)~~ ~~(1(4))~~ ~~(5)~~

Phytopathology

65: 74-76

Kinden, D.A. and Brown, M.F. (1976): Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. IV. Host-endophyte interactions during arbuscular deterioration, *Canadian Journal of Microbiology*, 22:64-75.

King, E.J.; Schubert, T.S. and Brown, M.F. (1981): Techniques for developmental studies of VA mycorrhizae. p 46 IN: Program and Abstracts, Fifth North American Conference on Mycorrhizae. University Laval, Quebec. 83 pp.

Le Tacon, F. (1985): Las micorrizas: una cooperación entre plantas y hongos, *Mundo científico*, 49: 776-784.

Lutz, R.W. and Sjolund, R.D. (1973): *Monotropa uniflora*: ultrastructural details of its mycorrhizal habit. *American Journal of Botany* 60: 339-345.

- Marschner, H. and Dell, B. (1994): Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis, *Plant and Soil*, 159: 89-102.
- Manjunath, A. and Habte, M. (1988): Development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and the uptake of immobile nutrients in *Leucaena leucocephala*, *Plant and Soil*, 106:97-103.
- Mendgen, K.; Welter, K; Scheffold, F. and Knauf-Beiter, G. (1991): High pressure freezing of rust infected plant leaves *IN: Electron Microscopy of Plant Pathogens* (Edited by K. Mendgen; and D.E. Lesemann) Springer Verlag, Berlin, pp 31-42.
- Miller, A.S. and Jeffries, P. (1994): Ultrastructural observations and computer model of the helicoidal appearance of the spore wall of *Glomus geosporum*, *Mycol Res* 98: 307- 321.
- Moreau, F. (1953): Les Champignons. Tome II. Systematique. *Encycl. Mycol*, 23: 941-2120.
- Morton, J.B. (1986): Three new species of *Acaulospora* (*Endogonaceae*) from high aluminium, low pH soil in West Virginia, *Mycologia* 78: 641-648.
- Morton, J.B. (1988): Taxonomy of V.A. mycorrhizal fungi :classification nomenclature and identification, *Mycotaxon*, 276-324.
- Morton, J.B. (1990): Species and clones of mycorrhizal fungi (Glomales Zygomycetes): their role in macro- and microevolutionary processes, *Mycotaxon* 37: 493-515.
- Morton, J.B. and Benny, G.L. (1990): Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, Two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families Acalosporaceae, and Gigasporeceae, with an emendation of Glomaceae,

Mycotaxon, 37: 471-491.

Morton, J.B and Betivenga (1994): Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes) and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups, *Plant and Soil*, 159: 47-59.

Mosse, B. (1953): Fructifications of an *Endogone* species causing endotrophic mycorrhiza on fruit plants, *Annales Botany* (London), 20: 349-362.

Mosse, B. (1970a): Honey-coloured, sessile *Endogone* spores. I. life history. *Mikrobiol.*, 70: 167-175.

Mosse, B. (1970b): Honey-coloured, sessile *Endogone* spores. II. Changes in Fine Structure during Spore Development *Mikrobiol*, 74: 129-145.

Mosse, B. (1970c): Honey-coloured, sessile *Endogone* spores. III. Wall Structure, *Mikrobiol*, 74: 146-159.

Mose, B. (1981): Vesicular-arbuscular mycorrhiza research for tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawai, pp 5-82

Mosse, B. (1986): Ultrastructure of the spore wall in some VA mycorrhizal fungi. IN: **Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae** (Proceeding of the 1st European Symposium on Mycorrhizae (Edited by V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi), pp 614-619. INRA publications: Dijon, France.

Mosse, B. and Bowen, G.D. (1968a): A key to the recognition of some *Endogone* spore type, *Transactions of the British Mycological Society*, 51: 469-483.

Mosse, B. and Bowen, G.D. (1968b): The distribution of *Endogone* spores in some Australian and New Zealand soil, and in an experimental field soil at Rothamsted, *Transactions of the British Mycological Society*, 51: 485-492.

Murphy, J.A. (1978): Non-coating techniques to render biological specimens conductive. 175-193 p IN: SEM/1978/II, SEM Inc. AMF O'Hare, IL: 1134 pp.

Neville, A. C. and Levy, S. (1984): Helicoidal orientation of cellulose microfibrils in *Nitella opaca*

ultraestructure and computed theoretical effects of strain reorientation during wall growth, *Planta* 162: 370-384.

Nicolson, T.H. (1967): Vesicular-arbuscular mycorrhiza a universal plant symbiosis, *Sci progr. Oxf*, 55: 561-581.

Nicolson, T.H. (1975): Evolution of vesicular-arbuscular mycorrhizas, pp 25-34, IN: **Endomicorrhizas**. (Edite by F.E. Sanders; B. Mosse and P.B. Tinker) Academic Press, LONDON.

Niewdorp, P.J. (1972): Some observations with light and electron microscope on the endotrophic mycorrhiza of orchids. *Acta. Bot. Neerl*, 21: 128-144.

Nylund, J.E. (1980): Symplastic continuity during Hartig net formation in Norway spruce ectomycorrhizae. *New Phytol*, 86: 373-378.

Palacios, M.S.; Chapa, S.C. y Shimada, M.K. (1986): Incremento en el crecimiento y en la absorción de fósforo en cebolla (*Allium cepa* L.), como respuesta a la micorriza V-A, en un suelo de origen volcánico, *Revista Latinoamericana de microbiología*, 29: 303-311.

Palacios, M.S.; Shimada, M.K. y Chapa, S.C. (1987): Efecto de la inoculación de dos variedades de cebolla (*Allium cepa* L.), c o n

cuatro hongos endomicorrízicos, en s... muy deficientes en fósforo, *Revista Latinoamericana de microbiología*, 29:329-336.

Palacios, M.S. and Pérez S.E. (1993): Endotrophic Mycorrhiza in *Lacandonia schismatica*, Lacandoniaceae, a New Saprophytic Angiospermae Family, *Revista Latinoamericana de microbiología*, 35: 65-69.

Palacios, M.S.; Jaime, M.A.; Urbano, S.; Cuenca, A.; Shimada M.K. (1994): Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth of *Allium cepa* L. under field conditions, in a Rendzic Leptosol, 15 th World Congress of Soil Science, Acapulco, México; Vol 4b pp 34-35.

Pacovsky, R.S. and Fuller, G. (1986): Development of two endomicorrhizal symbioses on soybean and comparison with phosphorus fertilization, *Plant and Soil*, 95: 361-377.

Pepin, R. and Boumendil, J. (1982): Préservation de l'ultrastructure du sclérote de *Sclerotinia tuberosa* (Champignon discomycete). Un modèle pour la préparation des échantillons imperméables et hétérogènes. *Cytologia* 47: 812-819.

Peterson, T. A.; Mueller, W.C. and Englander, L. (1980): Anatomy and ultrastructure of a *Rhododendron* root-fungus association. *Canadian Journal of Botany* 58: 2421-2433.

Plenchette, C. (1982): Recherches sur les Endomycorrhizas a vésicules et arbuscules. Influence de la plante hôte du champignon et du phosphore sur l'expression de la symbiose Endomycorrhizienne. These Doct. Québec.

Postek, M.T.; Howard, K. S.; Jhonson, A.H. and McMichael, K.L. (1980): Scanning electron microscopy. A student's handbook. Ladd Research Industries, Inc. Burlington, VT. 305 pp.

Pyrozinski, K.A. and Malloch, D.W. (1975): The origin of land plants: a matter of mycotrophy, *Biosystems*, 6: 153-164.

Robards, A.W. (1991): Rapid-freezing Methods and their application IN: **Electron Microscopy of Plant Cell** (Edited by J.L. Hall and C. Hawes) Academic Press, London pp 257-312.

Rosendahl, S. (1994): A Practical Approach to the species Concept in the Glomales pp 15-18 IN: **Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development**, European Commission Report, EUR 16728 EN

Sánchez, B; Nava, S. y Palacios M.S. (1988): Respuesta de la cebada (*Hordeum sativum* L.) a la micorriza VA, en suelos de ^{Ab} de la sierra del Ajusco, Edo. de México Contribución a la Edafología Mexicana, Inst. de Geol., UNAM pp 105-119.

Scannerini, S. and Bonfante-Fasolo, P. (1979): Ultraestructural cytochemical demonstration of polysaccharides and proteins within the host-arbuscule interfacial matrix in an endomicorrhiza. *New Phytol* 83: 87-94.

Scannerini, S. and Bonfante-Fasolo, P. (1983): Comparative ultraestructural analysis of mycorrhizal associations, *Canadian Journal of Botany*, 61: 917-943.

Schenck, N.C. (1982): Methods and Principles of Mycorrhizal Research, The American Phytopathological Society, st. Paul, Minnesota, USA pp 244.

Schenck, N.C. and Pérez, Y. (1987): A manual for identification of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. INVA. University o f Florida. Gainesville, FL.

Schenck, N.C. and Pérez, Y. (1990): A manual for identification of

vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: 3rd Ed. Synergistic Publ. Gainesville, Florida.

Sieverding, E. (1991): Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems (eds) Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH.

Simon, L.; Bousquet, J.; Levevesque, R.C. and Lalonde, M. (1993): Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants, *Nature* 363: 67-69

Smith, S.E.; Pearson, V.G.; Koide, R. and Cairney, W.G. (1994): structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis, *Plant and Soil*, 159: 103-113.

Spurr, A.R. (1969): A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastructural. Res.* 26: 31-43.

Strullu, D.J.; Gourret, J.P. and Fourcy, A. (1981): Ultrastructure and electron-probe microanalysis of the metachromatic vacuolar granules occurring in *Taxus mycorrhiza*, *New Phytol*, 87: 537-547.

Sward, R.J. (1981): The structure of the spore of *Gigaspora margarita*. I. The dormant spore, *New Phytol* 87: 761-768.

Sylvia, D.M. (1992): Quantification of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, IN: **Methodos in Microbiology**, Vol 24 (Edited by J.R. Norris; D.J. Read and A.K. Varma) pp 53-65.

Taxter, R. (1922): A revision of the Endogoneaceae. *Proceeding American Academy of Arts and Sciences*, 57: 291-351.

Tester, M; Smith, S.E. and Smith, F.A. (1987): The phenomenon of "nonmycorrhizal" plants. *Canadian Journal of Botany*, 65:419-431.

Tommerup, I.C. (1983): Spore dormancy in vesicular-arbuscular

mycorrhizal fungi, *Transactions of the British Mycological Society*, 81: 37-45.

Tommerup, I.C. (1984): Development of infection by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in *Brassica napus* L. and *Trifolium subterranean* L. *New Phytologist*, 98: 487-495.

Tommerup, I.C. (1985): Inhibition of spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil, *Transactions of the British Mycological Society*, 82: 267-278.

Tommerup, I. (1991): The vesicular arbuscular mycorrhizas, *Adv. Plant Pathology* 6: 81-91.

Trappe, J.M. (1987): Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint, pp 5-25, IN: **Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants** (Edited by Safir, G.R.) CRC Press, Boca Raton.

Turnau, K.; Kottke, I and Oberwinkler, F. (1993): *Paxillus involutus*-*Pinus sylvestris* Mycorrhizae from heavily polluted forest. I. Element localization using Energy Loss Spectroscopy and Imaging, *Botanica Acta* 106: 213-219.

Walker, C. (1983): Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall characteristics in the species descriptions, *Mycotaxon*, 18: 443-455.

Walker, C. (1986): Taxonomic concepts in the Endogonaceae II. A fifth morphological wall type in Endogonaceous spores, *Mycotaxon*, 25: 95-99.

Walker, C. (1992): Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (*Glomales*)- a possible way forward, *Agronomie* 12: 877-897.

Walker, C. and Sanders, F.E. (1986): Taxonomic concepts in the Endogonaceae III. The separation of *Scutellospora* gen. Nov. *Gigaspora* Gerd & Trappe, *Mycotaxon*, 27: 169-182.

Walker, C. and Trappe, J.M. (1993): Names and epithets in the *Glomales* and *Endogonales*, *Mycol. Res.* 97: 339-344.

Warmbrodt, R.D. and Fritz, E. (1981): Embedding plant tissue with plastic using high pressure: a new method for light and electron microscopy. *Stain Tech*, 56: 299-305.

Welter, K.; Muller, M. and Mendgen, K. (1988): The hyphae of *Uromyces appendiculatus* within the leaf tissue after High Pressure Freezing and Freeze Substitution, *Protoplasma* 147: 91-99.

Williams, S.E.; Wollum, A.G. and Aldon, E.F. (1974): Growth of *atriplex canescens* (Pursh) Nutt. improved by formation of vesicular-arbuscular mycorrhizae, *Soil Science Society of America Proceeding*, 38: 962-965.

Wyss, P. and Bonfante, P. (1993): Amplification of genomic DNA of arbuscular-mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers, *Mycol. Res.* 97: 1351-1357.

Yao, Y.J.; Pegler, D.N. and Young, T.W.K. (1992): Ultrastructure of *Glomus fuegianum*, *The Mycologist* 6: 132-137.