



00345

3
24.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**" CAMBIOS MORFOLOGICOS INVOLUCRADOS EN
LA GERMINACION Y DESARROLLO DE LAS
ESPORAS DE ALGUNAS ESPECIES DE
ACAULOSPORA "**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA VEGETAL)**

**P R E S E N T A :
LAURA VERONICA HERNANDEZ CUEVAS**

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARTURO ESTRADA TORRES

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA, DENTRO DEL PROYECTO CONACyT 4758, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ARTURO ESTRADA TORRES Y CON APOYO DE BECA CONACyT No. 86208, PARA LA REALIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE MAESTRÍA.

CON TODO MI AMOR, A LA MEMORIA DE MI MAMÁ:

DOÑA ELPIDIA

A MI FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

Esperando no omitir a alguien, deseo expresar mi gratitud a las siguientes personas:

Al Dr. Arturo Estrada Torres, por todo el apoyo y confianza que siempre me ha brindado, por impulsar mi superación personal y profesional, por ser mi amigo.

A los miembros del comité tutorial: M. en C. Lucía Y. Varela Fregoso y M. en C. Margarita Villegas Ríos, ya que durante mi paso por la maestría y fuera de ella me apoyaron y orientaron de la mejor manera posible. Por sus palabras de aliento en momentos difíciles de mi vida.

Al resto de los miembros del sinodo: Dr. Ronald Ferrera Cerrato, del Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados, Montecillo; Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez, M. en C. Guadalupe Vidal Gaona y M. en C. Sigfrido Sierra Galván, de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M., por sus valiosas y atinadas sugerencias para mejorar este trabajo.

A la Biol. Adriana Montoya Esquivel, quien me auxilió durante el procesamiento de los datos para realizar el análisis fenético utilizando el programa NTSYS.

A mis invaluable amigos: Enrique, Gema, Juan, Lupita, Paco, Pavi, Roberto y Yola.

A mis compañeros de trabajo en el Laboratorio de Micología.

A los Q.B.P. René Grada Yautenzi, Secretario de Investigación y Méd. Cir. Luis A. Angulo Montejo, Coordinador del C.I.C.B., Universidad Autónoma de Tlaxcala.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Hongos micorrizicos arbusculares	4
2.1.1. Importancia y distribución en la naturaleza	4
2.1.2. Taxonomía	4
2.1.3. Valor taxonómico de las características ontogenéticas y de germinación de las esporas en Glomales	5
2.1.3.1. Ontogenia	7
2.1.3.2. Germinación	8
2.2. El género <i>Acaulospora</i>	9
2.2.1. Descripción taxonómica	9
2.2.2. Ontogenia y mecanismos de germinación	9
2.2.3. Factores que afectan la germinación	10
III. OBJETIVOS	11
IV. METODOLOGÍA	11
4.1. Macetas de propagación	11
4.2. Aislamiento y selección de las especies	12
4.3. Cultivos puros	13
4.4. Ontogenia	14
4.5. Germinación	14
4.6. Observaciones	17
4.7. Elaboración de descripciones	17
4.8. Análisis Fenético	17
4.9. Obtención del registro gráfico	17
V. RESULTADOS	20
5.1. <i>Acaulospora hirticollata</i>	20
5.1.1. Descripción de la especie	20
5.1.2. Germinación	23
5.2. <i>Acaulospora larvis</i>	24
5.2.1. Descripción de la especie	24
5.2.2. Germinación	25
5.3. <i>Acaulospora spinosa</i>	29
5.3.1. Descripción de la especie	29
5.3.2. Germinación	30
5.3.3. Ontogenia	31
VI. DISCUSIÓN	40
6.1. Metodología	40
6.2. Especies	41
6.3. Germinación	45
6.3.1. Cámaras	45
6.3.2. Hifas	48
6.4. Ontogenia	49
6.5. Relaciones taxonómicas de la familia Acaulosporaceae: posible significado de las observaciones realizadas en este estudio	51
VII. CONCLUSIONES	63

Continuación...

VIII. LITERATURA CITADA
APÉNDICE I. EJEMPLARES ESTUDIADOS
APÉNDICE II. DATOS PARA EL ANÁLISIS FENÉTICO

Pág.
65
74
75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1-8.	<i>Acanthopora bireticulata</i>	
1.	Ornamentación y grupos de estratos	21
2.	Vista superficial de la cámara de germinación	21
3.	Detalle de los lóbulos y márgenes engrosados	21
4.	Vista transversal de la cámara de germinación con la orilla adelgazada	21
5.	Compartimientos y pared intercalares en vista transversal	21
6.	Emergencia de la hifa de germinación	21
7.	Hifa de germinación con una primera ramificación de aproximadamente 180° y la segunda de menos de 90°	21
8.	Inicio de la formación de una rama sobre la hifa	21
9.	Cámaras de germinación de <i>Acanthopora laevis</i> . A. Vista lateral. B-C. Vista frontal. D. Vista lateral de una cámara en formación	26
10-18.	<i>Acanthopora laevis</i>	
10.	Espora madura mostrando dos grupos de estratos	27
11.	Cámara de germinación en vista lateral mostrando dos hendiduras y el poro de germinación en el grupo externo de estratos	27
12.	Cámara de germinación en corte transversal mostrando los compartimientos y paredes intercalares	27
13.	Aspecto granuloso de una cámara en vista lateral, mostrando la orilla y las excrescencias del penúltimo estrato	27
14.	Detalle de los poros de germinación en el grupo externo de estratos	27
15.	Dos hifas de germinación ramificadas en un ángulo de 180°	27
16.	Ramificación múltiple sobre las hifas de germinación	27
17.	Estructura bulbosa sobre la hifa de germinación	
18.	Detalle de la estructura bulbosa	27
19.	Desarrollo secuencial de las cámaras de germinación en <i>Acanthopora spinosa</i>	31
20-28.	<i>Acanthopora spinosa</i>	
20.	Espora madura mostrando tres grupo de estratos.	33
21.	Cámara de germinación en los primeros estados de formación	33
22.	Cámara de germinación madura, multilobulada	33
23.	Espora abierta en la que se observa la cámara en el grupo interno de estratos	33
24.	Vista superficial de la cámara en la que se observan las excrescencias del estrato que se encuentra por debajo de ella	33
25.	Márgenes de la cámara engrosados y con un aspecto de sobreposición	33
26.	Vista transversal de la cámara mostrando numerosos compartimientos	33
27.	Vista transversal de la cámara mostrando la separación de los estratos más allá de la cámara	33
28.	Hifa de germinación emergiendo a partir de uno de los compartimientos de la cámara, atravesando el grupo externo de estratos.	33
29.	Ontogénesis de las esporas de <i>Acanthopora spinosa</i> . A. Primordio de sáculo. B. Sáculo desarrollado. C. Primordio de una espora sobre la hifa. D. Espora en formación. E. Desarrollo de paredes. F-G. Esporas maduras	35
30-40.	Desarrollo ontogénico en <i>Acanthopora spinosa</i>	
30.	Sáculo con algunos apéndices filiformes	37
31.	Protuberancia sobre la hifa al inicio de la formación de la espora	37
32.	Estrato externo membranoso y grueso en hifa y sáculo	37
33.	Espora muy joven	37

Continuación...

Figura		Pág.
34.	Estrato externo membranoso muy grueso en hifa, continuo con el estrato externo membranoso delgado de una espora joven y estrato interno membranoso en espora	37
35.	Detalle de la ornamentación en una espora muy joven	37
36.	Arreglo de la ornamentación en una espora madura	37
37.	Espora en maduración con sólo tres estratos: membranoso-evanescente externo, laminado ornamentado y membranoso más interno	37
38.	Espora más madura mostrando dos estratos membranosos en el grupo interno, con el penúltimo estrato aún sin excrecencias	37
39.	Punto de unión de espora e hifa oculto por el estrato laminado de la espora y el estrato membranosos interno de la hifa	37
40.	Espora completamente madura mostrando los tres grupos de estratos y la reacción con Melzer en el estrato más interno	37
41.	Secuencia de formación de estratos en <i>Acaulospora spinosa</i>	40
42.	Morfología conocida de las cámaras de germinación en algunas especies de <i>Acaulospora</i> y <i>Entrophospora</i> : A. <i>E. colombiana</i> B. A. <i>rehmii</i> C. A. <i>acrobiculata</i> D. A. <i>tuberculata</i> E. A. <i>dilatata</i> F. A. <i>bireticulata</i> G. A. <i>laevis</i> H. A. <i>spinosa</i>	43
43.	Diagrama de formación del escudo de germinación en <i>Scutellospora</i>	46
44.	Cambios en el contenido citoplásmico durante el desarrollo de <i>Acaulospora laevis</i>	50
45.	Secuencia de formación de estratos y ubicación del escudo de germinación en <i>Scutellospora</i>	53
46.	Sección para Acaulosporaceae del cladograma propuesto por Morton (1990a) para Glomales	54
47.	Fenograma de Acaulosporaceae construido por el método UPGMA, utilizando Distancia Manhattan	55
48.	Fenograma de Acaulosporaceae construido por el método UPGMA, utilizando el Índice de Similitud de Rogers & Tanimoto	56
49.	Secuencia de formación de estratos y ubicación de la cámara de germinación en <i>Acaulospora</i>	61

INDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1.	Relación de especies trabajadas	16
2.	Caracteres considerados y su codificación para el análisis fenético	19

RESUMEN

Los hongos micorrízicos arbusculares son uno de los componentes más importantes de la biota edáfica y su correcta identificación taxonómica es fundamental para poder explorar sus beneficios potenciales. Aunque actualmente se han implementado numerosas técnicas de carácter molecular que permiten reconocer con mayor precisión a especies o grupos de especies, su utilización es aún muy limitada, por lo que la descripción morfológica de algunas de las características biológicas intrínsecas de los organismos, como son la ontogenia y germinación de las esporas se ha convertido en una herramienta de considerable valor taxonómico y filogenético, además de que proporciona información básica para el conocimiento de la biología de estos organismos.

Con el propósito de generar nuevos conocimientos que amplíen esta tarea descriptiva, se propuso como objetivo principal de este estudio conocer los cambios morfológicos involucrados en la germinación y desarrollo de las esporas de algunos hongos micorrízicos arbusculares del género *Acaulospora*.

Se trabajó con tres especies del género *Acaulospora*: *A. bireticulata*, *A. laevis* y *A. spinosa*, aisladas de suelos del estado de Tlaxcala. Se hizo el seguimiento de los cambios morfológicos que tienen lugar durante el desarrollo de las esporas de *A. spinosa*, los cuales se pueden resumir en ocho pasos: 1. Formación de sáculos y crecimiento de los mismos. 2. Formación de un estrato interno en hifa y sáculo, siendo en este último laminado, amarillo pálido (ML). 3. Crecimiento de la espora a partir de una protuberancia producida cerca del sáculo, con dos estratos, de los cuales el interno se ornamenta tempranamente (ML₂). 4. Formación de dos estratos internos semiflexibles (ML₂MM); el contenido de la espora se ocluye por la lámina más interna del estrato laminado. 5. Maduración de los estratos internos, los cuales se vuelven semirrígidos; los estratos se separan en dos grupos {A(ML₂U) B(U)}. 6. Formación de dos estratos más en el grupo interno, ambos membranosos {A(ML₂U) B(UMM)}. 7. Separación de los estratos del grupo interno en dos grupos más {A(ML₂U) B(U) C(M₂M)}; en el penúltimo estrato se definen las excrescencias que lo ornamentan y aparece la reacción al Melzer en el último estrato. 8. Escisión total o parcial de las esporas de las hifas de origen. Este proceso de formación de esporas coincide de manera general con los datos reportados sobre estos eventos para otras especies del género en las que se ha descrito este suceso: *A. laevis*, *A. sporocarpia* y *A. scrobiculata*.

Se realizaron observaciones sobre las estructuras formadas durante la primera fase de germinación en las tres especies, encontrándose diferencias entre ellas. Mientras que las cámaras de germinación en *Acaulospora laevis* son pequeñas y de apariencia sencilla, en *A. bireticulata* y *A. spinosa* son de dos a tres veces más grandes que en *A. laevis* y su morfología es mucho más compleja. Las formas de estas estructuras difieren además de las reportadas previamente para las otras especies del género en las que se han descrito: *Acaulospora dilatata*, *A. rehmsii*, *A. scrobiculata* y *A. tuberculata*, aunque las de la última especie son muy similares a las de *A. spinosa*.

En *Acaulospora laevis* se observó la presencia de estructuras pequeñas, globosas a elípticas y pediceladas sobre las hifas producidas durante la germinación. Estructuras similares sólo habían sido reportadas para cuatro especies de la familia Acaulosporaceae: *A. appendicula*, *A. sporocarpia*, *A. thomii* y *Entrophospora schenkii*. Aunque se ha postulado que dichas estructuras pueden servir como propágulos para la dispersión de las especies en las que se han encontrado, su función real se desconoce.

L I N T R O D U C C I Ó N

Las plantas terrestres son altamente dependientes de la intensa actividad biológica que ocurre en torno a su sistema radicular. Dicha actividad es producto de los microorganismos que habitan en la rizósfera, los cuales son capaces de establecer interacciones de tipo saprofítico, parasítico y mutualista con las raíces (Hackseylo, 1972). En el último caso se encuentran los hongos micorrizicos arbusculares (HMA), que son simbioses mutualistas obligados de una gran cantidad de plantas sobre las que ejercen diversos efectos benéficos (Sieverding, 1991).

Los HMA, al igual que todos los organismos, forman propágulos para su dispersión, distribución y persistencia, éstos pueden ser: fragmentos de micelio, raíces colonizadas y esporas (Hetrick, 1986; Brundett, 1991). Las esporas se han considerado como los propágulos más importantes de los HMA, ya que son estructuras de resistencia muy persistentes (Hetrick, 1986; Gazey *et al.*, 1993), además de que en algunos casos la colonización de nuevas plantas hospederas por HMA sólo puede establecerse a partir de esta clase de propágulos (Gazey *et al.*, 1993). Por otra parte, las esporas son indispensables como fuente de inóculo inicial para la obtención de cultivos puros de especies particulares. Su capacidad y patrón de germinación, así como la cantidad de micelio que pueden producir son características que tienen un alto grado de variación entre especies (Hepper y Smith, 1976; Tomnerup, 1983a).

Originalmente, la clasificación de este grupo de hongos se basó en algunas características morfológicas simples, como son la forma, color, tamaño y tipo de agrupación de las esporas (Gerdemann y Trappe, 1974; Trappe, 1982); en la actualidad, se han sumado otros criterios morfológicos más específicos, siendo los más ampliamente utilizados el arreglo, estructura y ornamentación de los estratos de la pared de las esporas (Morton, 1988). Sin embargo, esto ha ocasionado que existan distinciones ambiguas entre especies morfológicamente similares y que los sistemas naturales de clasificación basados en estos criterios sean aún incompletos (Morton, 1991), por lo que recientemente se han implementado técnicas de carácter molecular que ofrecen evidencias adicionales para la clasificación de estos organismos (Jabaji-Hare, 1988; Giovannetti *et al.*, 1991; Sancholle y Dalpé, 1993). No obstante, su alto costo limita su utilización, por lo que se ha propuesto el empleo de otros caracteres morfológicos como son los detalles de la germinación y ontogenia de las esporas (Morton, 1988, 1990a,b; Morton y Benny, 1990; Morton *et al.*, 1994; Giovannetti *et al.*, 1991) como otra alternativa ante dichas limitaciones o un complemento de las evidencias de carácter molecular.

Lo anterior es importante ya que sólo a través del certero conocimiento de la identidad de las especies de HMA que habitan en sitios particulares, de las relaciones que existen entre ellas, así como de sus procesos fisiológicos es que podrán desarrollarse estrategias adecuadas para su manejo (Bowen, 1987; Abbott y Robson, 1981). Considerando la importancia de generar conocimientos acerca de lo que ocurre durante el desarrollo y la germinación de las esporas de grupos particulares de HMA, se realizó este estudio, como una aproximación para el entendimiento de estos procesos y el reconocimiento de su valor como caracteres morfológicos que puedan ser utilizados taxonómicamente.

II. ANTECEDENTES

2.1. Hongos micorrízicos arbusculares

2.1.1. Importancia y distribución en la naturaleza

Los hongos micorrízicos arbusculares son un grupo particular de hongos que habitan los suelos y se encuentran asociados con más del 90% de las plantas que existen en la Tierra (Malloch *et al.*, 1980; Honrubia *et al.*, 1992). Este grupo de organismos es particularmente importante ya que se ha establecido con certeza que mediante su asociación mutualista con las plantas, éstas reciben múltiples beneficios como son una mejor absorción de minerales, entre los que destaca el fósforo por ser uno de los elementos limitantes más importantes para el desarrollo de las plantas, aunque también pueden proveer a la planta de otros elementos como Zn, Mg, K, Ca, etc. (Janos, 1987); asimismo, los HMA mejoran la adquisición de agua; proporcionan a las plantas resistencia a condiciones ambientales adversas como son la salinidad, altas temperaturas y sequía; favorecen la producción de hormonas vegetales y confieren resistencia contra microorganismos patógenos. A cambio, los hongos reciben azúcares y aminoácidos para su crecimiento (Sieverding, 1991).

Las asociaciones micorrízicas son factores determinantes en la diversidad de los ecosistemas, ya que probablemente pueden modificar la estructura y funcionamiento de las comunidades vegetales de manera compleja e impredecible (Grime *et al.*, 1987 *vide* Giovannetti y Gianinazzi-Pearson, 1994; Read, 1990). Se ha propuesto que cualquier cambio en la población micorrizógena puede tener consecuencias sobre la composición de las comunidades vegetales (sobrevivencia, competencia y riqueza florística), modificando la biología de los ecosistemas naturales (Miller y Allen, 1992; Molina *et al.*, 1992).

En general, se ha considerado que los HMA son organismos de distribución cosmopolita y que un gran porcentaje de las plantas que presentan este tipo de micorriza no pueden desarrollarse sin su simbionte fúngico (Sieverding, 1987).

Estos hongos se han encontrado en regiones templadas, tropicales y árticas (Mosse, 1981), pastizales (Crush, 1973; Khan, 1974), dunas (Koske, 1975; Koske y Walker, 1986), desiertos (Rose, 1981), matorrales, ambientes pantanosos (Mejstrik, 1972; Brundett, 1991), e incluso se han descubierto asociados con plantas acuáticas (Sandergaard y Laegaard, 1977; Bagyaraj *et al.*, 1979; Stenlund y Charvat, 1994) y epifitas (Rabatin *et al.*, 1990; Janos, 1993; Michelsen, 1993).

2.1.2. Taxonomía

No obstante que en la primera mitad del siglo ya se habían reconocido algunos miembros de los HMA (Thaxter, 1922; Butler, 1939; Moreau, 1953), no fue sino hasta 1974 cuando Gerdemann y Trappe hicieron una revisión de la clasificación de estos hongos. Al principio se había considerado que todas las especies de hongos que forman micorriza arbuscular pertenecían al orden Endogonales de la clase Zygomycetes, junto con *Endogone*, género que forma un tipo diferente de micorriza, reconociéndose así siete géneros: *Endogone* Link *ex* Fries, *Gigaspora* Gerdemann & Trappe, *Acaulospora* Gerdemann & Trappe, *Glomus* Tul. & Tul., *Sclerocystis* Berk. & Broome, *Modicella* Kanouse y *Glaziella* Berk. (Gerdemann y Trappe, 1974). En años posteriores *Modicella* fue transferida a Mortieriaceae (Trappe y Morton, 1988 *vide* Schenck, 1984), mientras que *Glaziella* fue identificado como un ascomiceto (Gibson *et al.*, 1986). Ese mismo año Walker y Sanders (1986) segregaron al género *Scutellospora* de *Gigaspora*. Más tarde, Morton y Benny (1990) separaron a los hongos formadores de ectomicorriza, con el género *Endogone*, de los HMA, agrupando a estos últimos en un nuevo orden: Glomales, con dos subórdenes: Glomineae, que incluye a las familias Glomaceae y Acaulosporaceae, con los géneros *Glomus* y *Sclerocystis* en la primera y *Acaulospora* Gerdemann & Trappe *emend* Berch y *Entrophospora* Ames & Schn. en la segunda, y Gigasporineae, familia Gigasporaceae, con los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* Walker & Sanders. De tal manera, hoy en día sólo se reconocen seis géneros de este tipo de hongos y su clasificación actual de acuerdo con Morton y Benny (1990) es la siguiente:

Reino: Fungi
División: Zygomycotina
Clase: Zygomycetes
Orden: Glomales
Suborden: Glomineae
Familia: Glomaceae
Géneros: *Glomus*
Sclerocystis
Familia: Acaulosporaceae
Géneros: *Acaulospora*
Entrophospora
Suborden: Gigasporineae
Familia: Gigasporaceae
Géneros: *Gigaspora*
Scutellospora

Hasta 1990 se habían reconocido 152 especies de hongos micorrizicos arbusculares a nivel mundial, cuatro de las cuales fueron descritas de México (Schenck y Pérez, 1990). No obstante, estos hongos posiblemente son componentes comunes de la biota edáfica y la exploración de muchos sitios, aumenta día con día el número de especies nuevas de HMA que son descritas (Walker, 1989; Blaszkowski, 1989, 1991, 1992, 1995; Bentivenga y Hetrick, 1991; Dalpé *et al.*, 1992; Cabello *et al.*, 1994; Ingleby *et al.*, 1994; Koske y Gemma, 1995; Wu y Liu, 1995).

Como en el caso de la mayoría de los organismos, la clasificación de estos hongos se encuentra basada casi por completo en criterios morfológicos de las esporas y esporocarpos: color, forma y tamaño (Morton, 1988), así como en las características de las estratos: tipo, número, posición, ornamentación y reacción ante ciertos agentes químicos (Rosendahl *et al.*, 1994). No obstante, se han propuesto otras herramientas para definir especies o grupos de especies, como son la morfología de las estructuras intrarradiculares: arbuscúlos, vesículas y micelio (Abbott y Robson, 1979; Morton, 1985); los detalles en procesos como la germinación y ontogenia de las esporas (Giovannetti *et al.*, 1991; Giovannetti y Gianinazzi-Pearson, 1994), así como la utilización de caracteres moleculares (Sen y Hepper, 1986; Hepper *et al.*, 1988; Bentivenga y Morton, 1993; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1993; Sancholle y Dalpé, 1993) y ultraestructurales (Maia y Kimbrough, 1993; Maia

et al., 1994). Sin embargo, el valor taxonómico de los cuatro últimos criterios ha sido poco explorado y utilizado (Franke y Morton, 1994; Giovannetti y Gianinazzi-Pearson, 1994; Morton, 1993, 1995).

2.1.3. Valor taxonómico de las características ontogénicas y de germinación de las esporas en Glomales

2.1.3.1. Ontogenia

A pesar de que se ha establecido con bastante claridad la importancia de conocer con detalle los procesos ontogénicos de muchos organismos, debido a que sugieren una jerarquía taxonómica y evolutiva (Gould, 1977; Kluge y Strauss, 1985; Kohn, 1992), no fue sino hasta hace algunos años que se reconoció el valor filogenético y taxonómico de este tipo de estudios con hongos micorrízicos arbusculares (Morton, 1990a,b, 1993; Morton *et al.*, 1990, 1992, 1994; Morton y Benny, 1990; Walker, 1992; Morton y Bentivenga, 1994; Giovannetti *et al.*, 1991; Giovannetti y Gianinazzi-Pearson, 1994).

Así, el proceso de formación de esporas es una de las principales características que permitió a Morton y Benny (1990) hacer una re-evaluación de la clasificación de los HMA, como se anotó anteriormente.

Intragenéricamente, el conocimiento de los procesos ontogénicos ha permitido separar con claridad a *Acaulospora* de *Entrophospora* (Ames y Schneider, 1979), así como relacionar y hacer comparaciones entre especies de ambos géneros (Wu *et al.*, 1995). Recientemente se demostró de manera concluyente la separación de *Sclerocystis* de *Glomus*, a la vez que permitió ampliar la descripción del primer género y proponer una hipótesis evolutiva para el mismo (Wu, 1993). Es importante resaltar que el género más estudiado desde este punto de vista ha sido *Glomus* (Daniels y Duff, 1978; Coley *et al.*, 1978; Louis y Lim, 1988; Giovannetti *et al.*, 1991; Chabot *et al.*, 1992; Meier y Charvat, 1992; Wu y Sylva, 1993), el que posee el mayor número de especies en la naturaleza y en el cual se ubican el mayor número de especies de Glomales que han sido obtenidas en cultivos puros.

En el caso de los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*, este tipo de datos ha permitido establecer patrones de divergencia filogenética (Morton 1990a,b, 1995; Morton y Benny, 1990; Morton *et al.*, 1990; Morton y Bentivenga, 1994; Franke y Morton, 1990, 1994; Bentivenga y Morton, 1995).

2.1.3.2. Germinación

Aunque se ha logrado la germinación en medios sintéticos de muchas especies de HMA, como en el caso de los estudios de ontogenia, la mayoría de ellos analizan especies del género *Glomus* (Daniels y Graham, 1976; Trappe y Maser, 1976; Daniels y Trappe, 1980; Graham, 1982; Daniels, 1984), en donde la hifa de germinación emerge directamente a través de los estratos o aprovechando los restos de la hifa de sostén, procesos que parecen ser particulares de grupos de especies y que podrían tener un significado evolutivo para definir diferentes linajes infraespecíficos (Morton y Henny, 1990). Asimismo, se ha observado que la velocidad y frecuencia con que ocurre la germinación, además de estar afectadas por diversos factores como temperatura, pH, humedad, exudados radiculares, especies vegetales involucradas, etc., pueden ser variables entre especies (Hepper y Smith, 1976; Green *et al.*, 1976; Tommerup, 1983b; Hepper, 1984; Siqueira *et al.*, 1982, 1985; El-Atrach *et al.*, 1989; Douds y Schenck, 1991) y en consecuencia, servir de herramienta para su reconocimiento taxonómico. Para el otro género de Glomaceae, *Sclerocystis*, sólo se ha indicado que la germinación se produce a través de los estratos de pared (Gerdemann y Trappe, 1974).

En el caso de otros taxa, el mecanismo de germinación ha permitido hacer distinciones genericas, como sucede con *Gigaspora* y *Scutellospora*, ya que mientras que en el primero la germinación se produce a partir de un estrato membranoso interno sintetizado para tal fin (Koske, 1981) con un arreglo ultraestructural particular (Maia *et al.*, 1994), en *Scutellospora* la hifa de germinación se origina desde una estructura especializada preformada para dicho proceso (Walker y Sanders, 1986). Maia *et al.* (1994) sugirieron que el proceso de germinación en estos géneros podría indicar una transición evolutiva entre sus especies.

En contraste, el conocimiento acerca de los procesos y cambios morfológicos que tienen lugar durante dicho evento en taxa como *Acanthospora* y *Entrophospora* (Mosse, 1970a,c; Hepper, 1984; Spain, 1992; Gazez *et al.*, 1993; Blaszkowski, 1994), aunque limitado, ha permitido hacer inferencias acerca de la relación filogenética entre algunas de sus especies (Morton, 1990a; Morton *et al.*, 1990) y con respecto a otros taxa del orden, como *Scutellospora*, en donde se producen estructuras análogas (Morton, 1990a,b).

2.2. El género *Acaulospora*

2.2.1. Descripción taxonómica

Acaulospora Gerdemann & Trappe

Gerdemann J.W. & J.M. Trappe, 1974. *Mycologia Memoir* 5:1-76.

Esporas producidas individualmente en el suelo, grandes, generalmente globosas o subglobosas, con contenidos aceitosos, producidas lateralmente en el estípite de una vesícula grande, terminal, de pared delgada. Vesícula aproximadamente del mismo tamaño de la espora, con sus contenidos transferidos a la espora en la madurez. Estratos de la pared de la espora continuos, excepto por un pequeño poro ocluido. Tubos germinales producidos directamente a través de los estratos, cerca de la base de la espora. Formando endomicorriza con vesículas lobuladas y arbusculos (Schenck y Pérez, 1988).

Cuando se publicó la tercera edición del "Manual para la identificación de hongos micorrizicos VA" (Schenck y Pérez, 1990), se habían descrito 22 especies para este género, a partir de entonces sólo se han descrito unas cuantas especies más (Błaszczkowski, 1988a, 1989; Kamadibrata y Hedger, 1990; Inglehy *et al.*, 1994), de tal manera que actualmente se conocen aproximadamente 26 especies.

2.2.2. Ontogenia y mecanismos de germinación

En el género *Acaulospora* las esporas se forman a partir de una gran vesícula que se produce apicalmente sobre una hifa terminal, la cual es amplia y en forma de embudo y con contenido denso. Esta vesícula crece y una vez que ha alcanzado su tamaño máximo, la espora gema lateralmente sobre la hifa; entonces, el contenido de la vesícula se transfiere gradualmente a la espora, a medida que ésta madura (Schenck y Pérez, 1988). Cuando la vesícula se vacía se colapsa y desprende junto con los restos de la hifa, salvo en algunas especies en las que es persistente como en *A. splendida* Sieverding, Chaverri & Rojas (Sieverding *et al.*, 1988).

Aunque aparentemente la única función de la vesícula es el almacenaje temporal de los alimentos que serán transferidos a la espora en formación, se ha postulado la probabilidad de que su papel sea muy similar al de las vesículas (células auxiliares) mucho más pequeñas producidas por las especies de *Gigaspora* y *Scutellospora*, sin embargo,

también para estas estructuras se ha propuesto una función de almacenaje (Gerdemann y Trappe, 1974; Morton, 1988).

En un principio se consideró que las especies de *Acaulospora* generaban las hifas de germinación a través de los estratos, de manera similar a como lo hacen varias de las especies de *Glomus*, sin embargo, Mosse (1970a,c) describió "compartimientos" dentro de las esporas, a partir de los cuales se producían los tubos de germinación. Se declaró que esos "compartimientos" se forman por la separación de los estratos membranosos de la espora: "dos membranas se separan de una tercera más interna que éstas y se amplían dejando un espacio entre sí, entonces, se deposita nuevo material de pared sobre las membranas separadas, formándose estratos radiales que dividen a los compartimientos grandes en pequeños" (Mosse 1970a,c). A partir de éstos últimos se producen una o varias hifas de germinación, las cuales salen al exterior atravesando los estratos externos. Este mismo tipo de estructuras fueron observadas por Morton y Benny (1990) y Morton (1990a,b) quienes señalaron que son estructuras efímeras; por Spain (1992) quien las describió morfológicamente para tres especies del género y para *Entrophospora colombiana* Spain & Schenck y por Blaszowski (1994) quien indicó que eran producidas por enrollamientos hifales.

2.2.3. Factores que afectan la germinación

Existen muchos factores que pueden causar efectos directos e indirectos sobre algunos de los procesos básicos del ciclo de vida de los Glomales, como es el caso de la germinación. En el género *Acaulospora*, uno de los factores limitantes para que se lleve a cabo dicho evento es la latencia, la cual se ha encontrado que es intrínseca y variable para algunas especies del género, que no son capaces de germinar, sino hasta después de que ha transcurrido cierto periodo de tiempo, mismo que puede durar desde unas cuantas semanas, hasta varios meses (Tommerup, 1983a; Douds y Schenck, 1991; Gazey *et al.*, 1993). En algunos casos, dicha latencia puede romperse mediante agentes físicos (Gazey *et al.*, 1993) y/o químicos (Tommerup y Kidby, 1980; Hepper, 1984).

Se ha encontrado que el pH (Hepper, 1984), el potencial hídrico (Tommerup, 1984), la temperatura (Tommerup, 1983b) y la radiación (Tommerup y Kidby, 1980) pueden afectar la germinación, ya que al parecer las especies exhiben para todos ellos diferentes intervalos de tolerancia, así como niveles óptimos de respuesta.

Asimismo, se ha observado que la germinación y el crecimiento hifal posterior están fuertemente relacionados con el tamaño de las esporas y negativamente afectados por los disturbios físicos producidos en el suelo por el uso de diversas prácticas agrícolas (Gazey *et al.*, 1992, 1993).

III. OBJETIVOS

GENERAL

Conocer los cambios morfológicos involucrados en la germinación y desarrollo de las esporas de algunos hongos micorrizicos arbusculares del género *Acaulospora*.

PARTICULARES

- Aislar y propagar tres especies de hongos micorrizicos arbusculares del género *Acaulospora*.
- Obtener la germinación en cultivo axénico de dichas especies.
- Hacer un seguimiento de los cambios morfológicos involucrados en los procesos de germinación y desarrollo de las esporas de las especies propagadas.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Macetas de propagación

De acuerdo con Luna-Zendejas *et al.* (1994) y Estrada-Torres *et al.* (1992) en los suelos rizosféricos de algunas leguminosas y frutales que se cultivan en las laderas del Volcán La Malintzi, se encuentran presentes varias especies del género *Acaulospora*. Por lo anterior y con el objeto de obtener una buena cantidad de esporas de varias especies de dicho género, se decidió preparar macetas de propagación con suelos de leguminosas de tal sitio ya que mediante este procedimiento se pretendía incrementar el número de estos propágulos y a partir de ahí realizar el montaje de cultivos monoespecíficos cuyas esporas servirían para los estudios propuestos.

Se prepararon seis macetas de propagación de 2 kg de capacidad, utilizando como sustratos suelos rizosféricos de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol), *Vicia faba* L. (haba) y *Pyrus malus* L. (manzano) (dos macetas por suelo), tamizados con una malla de 2 mm, a los cuales se les adicionó arena estéril en proporción 1:1 (v:v). La arena fue esterilizada sometiéndola a calor húmedo por espacio de 1 hr, dos veces, con un intervalo de 24 hrs entre una y otra vez y un periodo final de aireación de 48 hrs. Las macetas fueron desinfectadas previamente con hipoclorito de sodio al 30%.

Una vez preparadas las macetas, se regaron a capacidad de campo y se les colocaron las plantas trampa. En el caso de los suelos de frijol y manzano se pusieron semillas de *Medicago sativa* L. (alfalfa) y cormos de *Allium cepa* L. (cebolla), estos últimos sin raíces y desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio al 5%. A las macetas elaboradas con suelo de haba sólo se les colocaron semillas de *Zea mays* L. (maíz).

Estas macetas se mantuvieron en condiciones de invernadero por seis meses, durante los cuales se regaron a capacidad de campo con agua destilada, de acuerdo con sus necesidades de humedad. Transcurrido el tiempo indicado, las plantas fueron cortadas a la altura del suelo y éste se guardó en bolsas de polietileno a 4°C hasta su revisión.

Las esporas obtenidas a través de este procedimiento fueron utilizadas para la preparación de cultivos puros.

4.2. Aislamiento y selección de las especies

Debido a que el reconocimiento de las diferentes especies de HMA sólo puede hacerse por medio de las esporas, fue necesario separar éstas del material edáfico. Se tomaron muestras de las macetas de propagación y se procesaron mediante la técnica de tamizado húmedo y decantación (Gerdeman y Nicolson, 1963) y centrifugación en gradiente de sacarosa (20 y 60%, p/v) (Daniels y Skipper, 1982). Hecho lo anterior, las esporas fueron separadas con ayuda de un estereomicroscopio. De esta mezcla de esporas, se decidió trabajar con las especies de *Acanthospora* que pudieran diferenciarse a nivel de estereomicroscopio y presentaron el mayor número de esporas, siendo estas *A. biresiculata*, *A. laevis*, *A. spinosa*, *A. splendida*, *A. aff. scrobiculata*, *Acanthospora* sp₁ y *Acanthospora* sp₂. Posteriormente se trabajó sólo con las tres especies que se propagaron mejor.

4.3. Cultivos puros

Este tipo de cultivos tienen como objetivo la propagación de una sola especie de HMA, lo cual necesariamente debe hacerse a partir de esporas ya que son las estructuras que permiten el reconocimiento de las especies. Para preparar estos cultivos se utilizaron tubos de PVC de 3 cm de diámetro y 12 de profundidad, así como vasos de plástico de 250 g de capacidad, los cuales se desinfectaron superficialmente de la misma forma que las macetas. Como sustratos se emplearon suelos rizosféricos de *Pyrus malus* (manzano) y frijol (de la zona de La Malintzi) esterilizados con calor húmedo como en el caso de la arena y ya listos se colocaron en los contenedores.

Los contenedores así preparados fueron humedecidos completamente con agua destilada y se les hicieron orificios de aproximadamente 5 mm de diámetro y 10 de profundidad, en donde se colocaron directamente las semillas y cornos de las plantas trampa: *Trifolium repens* L. (trébol), alfalfa + cebolla, alfalfa + maíz y alfalfa + *Shorghum vulgare* L. (sorgo), utilizando como inóculo esporas de *Acaulospora bireniculata*, *A. laevis*, *A. spinosa*, *A. splendida*, *A. aff. scrobiculata* y *Acaulospora* sp, en el suelo de frijol, mientras que en el suelo de manzano se usaron alfalfa, alfalfa + cebolla, alfalfa + maíz y alfalfa + sorgo y como inóculo esporas de *A. laevis*, *Acaulospora* sp, y *Acaulospora* sp₂. Para cada especie de *Acaulospora* se prepararon tres contenedores por cada mezcla de plantas trampa, es decir, 72 cultivos con suelo de frijol y 36 con suelo de manzano, 108 en total. Se inocularon de 25 a 50 esporas por contenedor, las cuales fueron colocadas directamente por pipeteo en el orificio central de los contenedores, antes de la colocación de las semillas y/o cornos.

Los cultivos puros se mantuvieron en condiciones de invernadero por espacio de cuatro meses, regándose como las macetas de propagación. En este caso, a partir de la quinta semana de preparación se hizo una revisión semanal de los cultivos, con el objeto de obtener el material en diferentes estados de desarrollo.

De estos cultivos, sólo se logró la propagación de *Acaulospora laevis* en un contenedor con alfalfa y de *A. spinosa* en uno con trébol. En el cultivo de *A. laevis* se encontraron las esporas completamente desarrolladas, mientras que en *A. spinosa* el material se presentó en diferentes estados de desarrollo.

Por otra parte, ya que no se obtuvo la propagación de ninguna otra especie, los ensayos de germinación se hicieron con esporas extraídas de macetas de propagación,

utilizándose para ello únicamente las especies más abundantes: *Acaulospora bireticulata*, *A. spinosa*, *A. aff. scrobiculata* y *Acaulospora* sp. Debido a que se obtuvo un cultivo puro de *A. laevis*, esta fue la otra especie en la que se analizó la germinación. No obstante, ya que en el cultivo y las macetas de propagación existían bajos números de esporas, fue necesario obtener más de estas de un suelo rizosférico de *Pisum sativum* L. (alverjón), también de la región de La Malintzi, en el cual se sabía de la existencia de un elevado número de esporas de esta especie.

Una vez separadas las esporas de cada especie, éstas se colocaron en tubos de ensaye de 2 ml de capacidad con agua destilada estéril y se mantuvieron a una temperatura de 4° C por diez días, con la finalidad de romper latencia (Tommerup, 1983a, Gazey *et al.*, 1993).

4.4. Ontogenia

La única especie que logró propagarse y encontrarse en diferentes estados de desarrollo fue *Acaulospora spinosa*, por lo que es la que se trabajó para las observaciones de ontogenia de las esporas.

El material se separó mediante tamizado humedo, decantación y centrifugación con gradiente de sacarosa. Una parte del material obtenido se observó mediante preparaciones temporales elaboradas con agua, la otra parte fue montada en preparaciones permanentes usando como medios de montaje alcohol polivinílico + glicerina (PVLG) y/o alcohol polivinílico + glicerina + Melzer (Koske y Tessier, 1983).

Se realizaron 22 observaciones con agua y 74 con medio de montaje, es decir, 96 en total.

4.5. Germinación

Se prepararon quince placas de germinación por especie durante cada ensayo, montándose un total de seis ensayos de germinación por especie, es decir 18 ensayos y 270 placas en total (tabla 1). Los primeros ensayos de germinación (dos por especie) se montaron de acuerdo con la técnica propuesta por Gazey *et al.* (1993), para lo cual se colocó una mezcla de arena y vermiculita estériles en una proporción 1:1 (v:v), humedecida con agua destilada dentro de cajas petri de 10 cm de diámetro y 3 de altura. Sobre dicha mezcla se colocaron emparedados de filtro milipore (0.22 μ m) de aproximadamente 10 mm por lado; las cajas así preparadas fueron esterilizadas a 15 lb de presión por 30 minutos.

Una vez listos los dispositivos de germinación, se extrajeron las esporas de los tubos de ensaye y se sometieron a un tratamiento de desinfección superficial (modificado de Aguilar, 1993) antes de su colocación en las placas. Dicho tratamiento consistió en los siguientes pasos:

1. Enjuagar las esporas con agua destilada estéril durante 5 min.
2. Adicionarles una gota de Tween 80 para romper tensión superficial. Se dejaron así por 15 min.
3. Lavar tres veces con agua destilada estéril. Cinco minutos por vez.
4. Las esporas ya lavadas se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por espacio de 20 min.
5. Concluido este tiempo se lavaron nuevamente tres veces con agua destilada estéril, cinco minutos cada vez.

Una vez listas las esporas, se procedió a colocarlas en los emparedados con ayuda de un estereomicroscopio, pinzas de relojero, pincel de cerdas finas y agujas de disección. Todas estas labores se realizaron en condiciones de esterilidad.

Las placas de germinación así preparadas se mantuvieron en obscuridad a 28°C y se extrajeron las esporas de una placa cada tercer día con el propósito de hacer el seguimiento de los cambios ocurridos en las esporas.

Debido a que se presentaron altos niveles de contaminación por hongos en los dispositivos preparados con arena y vermiculita se decidió montar los otros cuatro ensayos de germinación para cada especie en cajas petri de 5 cm de diámetro, utilizando como soporte de las esporas agar-agua 10 g/l esterilizado a 15 lb de presión por 15 min. Las esporas se sometieron al proceso de desinfección ya indicado y una vez listas se pusieron directamente sobre la capa de agar con ayuda de un pincel de cerdas finas. Listas las placas se mantuvieron en obscuridad a 28°C como en el caso anterior.

Tabla 1. Relación de especies trabajadas, indicando los soportes, número de ensayos y cantidades de esporas utilizadas en cada caso.

ESPECIE	SOPORTE	# ENSAYOS	# ESPORAS POR ENSAYO	# TOTAL DE ESPORAS
<i>A. bires.</i>	Arena	2	200	400
<i>A. bires.</i>	Agar	4	100	400
TOTAL.				800
<i>A. laevis</i>	Arena	2	210	420
<i>A. laevis</i>	Agar	4	225	900
TOTAL.				1320
<i>A. spinosa</i>	Arena	2	525	1050
<i>A. spinosa</i>	Agar	4	225	900
TOTAL.				1950

4.6. Observaciones

Se extrajeron las esporas de una placa de germinación por especie cada tercer día. Con el objeto de conocer las características de las esporas antes de la germinación, una parte de éstas se observaron antes de montar los ensayos. En todos los casos se colocó sobre las esporas una gota de azul de tripano al 0.05% para evidenciar la presencia de hifas de germinación (Gazey *et al.*, 1993). Una parte de las esporas extraídas durante cada observación se montó inmediatamente en preparaciones temporales con agua (Spain, 1990) y la otra se utilizó para elaborar preparaciones permanentes con PVLG y/o PVLG+Melzer (Koske y Tessier, 1983). Todas las observaciones se realizaron utilizando un fotomicroscopio con contraste interferencial de Nomarski (Nikon optiphot-2).

4.7. Elaboración de descripciones

Se prepararon descripciones detalladas de cada una de las especies, con base en el formato utilizado por Estrada-Torres *et al.* (1992), así como de la forma de germinación de las esporas, incluyéndose los detalles de las cámaras de germinación e hifas. En lo que respecta a ontogenia se detalló el proceso de formación de las esporas de *Acaulospora spinosa*.

Para la elaboración de descripciones se incluyen dimensiones, las cuales fueron obtenidas con ayuda de un vernier en el caso del estereomicroscopio o bien con una lente micrométrica acoplada al microscopio. La descripción de los colores se encuentra basada en las obras de Methuen (Komerup y Wanschler, 1989) y Munsell (U.S. Department of Agriculture, 1989), y se identifica bajo las abreviaciones (Mn:) y (Ml:) respectivamente.

4.8. Análisis Fenético

Éste fue realizado para estimar la similitud morfológica existente entre las especies trabajadas con respecto a otras especies de la familia Acaulosporaceae, considerando únicamente a aquellas que fueron tomadas en cuenta por Morton (1990a) para la realización del análisis cladístico de Glomales: *Acaulospora appendicula* Spain, *A. delicata* Walker, *A. denticulata* Sieverding & Toro, *A. dilatata* Morton, *A. lacunosa* Morton, *A. larvis* Gerdemann & Trappe, *A. longula* Spain & Schenck, *A. mellea* Spain & Schenck, *A. morrowiae* Spain & Schenck, *A. myriocarpa* Spain, *A. rehunii* Sieverding & Toro, *A. rugosa* Morton, *A. spinosa* Walker & Trappe, *Entrophospora colombiana*, *E. infrequens* (Hall) Ames & Schneider y *E. schenckii* Sieverding & Toro, así como otras especies de

Acanthospora no consideradas por Morton, pero de las cuales se conocen actualmente las cámaras de germinación u otras estructuras, las especies son: *A. bireticulata* Rothwell & Trappe, *A. scrobiculata* Trappe, *A. sporocarpia* Berch, *A. thomii* Blaszkowski y *A. tuberculata* Junos & Trappe, 21 especies en total. En la tabla 2 se enlistan los caracteres utilizados, así como su codificación, algunos de los cuales fueron analizados por Morton (1990a). Debido a que la morfología de las cámaras de germinación y la presencia de estructuras bulbosas sobre las hifas se desconocen para más del 50% de las especies, estos caracteres fueron descartados del análisis formal y sólo se discute su presencia de acuerdo con el arreglo obtenido para las especies mediante el análisis fenético. Tomando en cuenta que los caracteres a analizar son de doble estado (presencia-ausencia) y multiestado, la similitud entre las especies se obtuvo tanto a través de un coeficiente de distancia (Distancia Manhattan), como uno de correlación (Rogers y Tanimoto) (Crisi y López, 1983). Con estos datos se contruyeron los fenogramas mediante el proceso UPGMA (media aritmética no ponderada, por sus siglas en inglés). Asimismo, se obtuvieron los índices de correlación (r). Estos análisis fueron realizados mediante el programa de software NTSYS-pc, versión 1.80 (Rohlf, 1994).

4.9. Obtención del registro gráfico

Se tomaron diapositivas y fotografías en blanco y negro de las estructuras producidas durante la germinación de las especies, así como de la secuencia de formación de esporas. Las siglas (CIN) en las leyendas de las fotografías, indican que éstas fueron tomadas con contraste de interferencia de Nomarski. Con ayuda de una cámara clara integrada al microscopio se elaboraron esquemas de los procesos estudiados. Para la confirmación de las especies, se revisaron los tipos de *Acanthospora bireticulata* y *A. laevis*, así como el paratipo de *A. spinosa* y para comparación de los resultados obtenidos se tomaron como punto de referencia los esquemas de ontogenia, cámaras de germinación y secuencia de formación de estratos realizados con anterioridad para otras especies de *Acanthospora* (Mosse 1970b; Gerdemann y Trappe, 1974; Morton *et al.*, 1990; Spain, 1992; Blaszkowski, 1994) y *Scutelliospora* (Walker y Sanders, 1986; Morton, 1995).

El material de referencia (esporas montadas en preparaciones permanentes con PVLG y/o PVLG+Melzer) se encuentra depositado en el Herbario TLXM, del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (C.I.C.B.) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (U.A.T.).

Tabla 2. Caracteres considerados y su codificación para los análisis fenéticos, utilizando Distancia Manhattan y el índice de asociación de Rogers y Tanimoto.

CARÁCTER	EDO. DE CARÁCTER	COD.
Areglo de las espigas	Individualizadas	0
	En agregados flojos	1
	En espicocarpus	2
Desarrollo de la espiga	Lateralmente al sáculo	0
	En el cuello del sáculo	1
Podicelo sosteniendo a la espiga	Ausente	0
	Presente	1
No. de grupos de estratos	Uno	0
	Dos o más	1
Estrato superficial	Liso	0
	Ornamentado finamente	1
	Ornamentado marcadamente	2
Estrato evanescente	Uno	0
	Dos	1
Estratos internos semirrigidos	Cero	0
	Uno	1
	Dos	2
Estratos internos membranosos	Cero	0
	Uno	1
	Dos	2
	Tres	3
Ornamentación en un estrato interno membranoso	Ausencia	0
	Presencia	1
Reacción del estrato más interno con Melzer	Ausencia	0
	Presencia	1
Estrato más interno de tipo amorfó	Ausencia	0
	Presencia	1
Estrato coriáceo unido al amorfó	Ausencia	0
	Presencia	1

V. RESULTADOS

5.1. *Acaulospora bireticulata* Rothwell & Trappe
Rothwell, F.M. & J.M. Trappe, 1979. Mycotaxon 8:471-475.

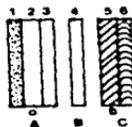
5.1.1. Descripción de la especie

Fig. 1.

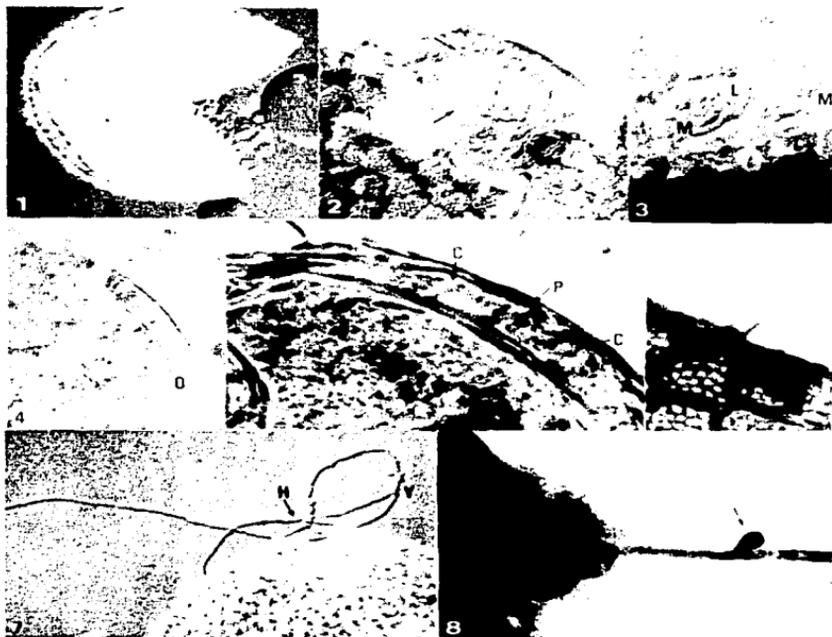
Esporas formadas individualmente en el suelo, de color café olivo claro (MI: 2.5Y 5/4) a olivo (MI: 5Y 5/4) con la edad, globosas a subglobosas, de (104-) 132-152 (-180) μm de diámetro. Pared de la espora formado por seis estratos en tres grupos (A, B y C). Grupo A formado por tres estratos (1, 2 y 3); estrato 1: evanescente, amarillo pálido (Mn: 1A3), de 1-3 μm ; estrato 2: unitario, amarillo olivo (MI: 5Y 6/6), de 1-1.5 (-3) μm , ornamentado con proyecciones de ápice redondeado, de hasta 0.5 μm en la base y 1-3 μm de altura, estas proyecciones se encuentran dentro de un retículo formado por bandas de 1 - 1.5 μm de grosor y (4-) 5 (-9) μm de altura; estrato 3: unitario, hialino, de 0.5 - 1 μm , firmemente adherido al estrato 2. Grupo B formado por un estrato (4); estrato 4: hialino, unitario, de 1-1.5 μm . Grupo C integrado por dos estratos (5 y 6); estrato 5: membranoso, hialino, de 1-1.5 (-3) μm , ornamentado con excrescencias en su superficie externa; estrato 6: amorfo, hialino, de color magenta grisáceo (Mn: 13B6) al observarse en reactivo de Melzer, de 1-1.5 (-2) μm . Contenido denso, granuloso-globular.

MURÓNIMO: A(EU₃U) B(U) C(M₆A)

MUROGRAMA:



Sáculo esporífero hialino, globoso, de = 45 μm de diámetro, con restos de materia orgánica adheridos. Distancia entre el sáculo esporífero y la espora de = 37.5 μm .



Figs. 1-8, *Acanthospora bireticulata*. 1. Ornamentación y grupos de estratos (CIN 250X, agua). 2. Vista superficial de la cámara de germinación (CIN 500X, PVLG). 3. Detalle de los lóbulos (L) y márgenes engrosados (M) (CIN 1250X, agua). 4. Vista transversal de la cámara de germinación con la orilla adelgazada (O) (CIN 250X, agua). 5. Compartimientos (C) y pared intercalar (P) en vista transversal (CIN 1250X, agua). 6. Emergencia de la hifa de germinación (CIN 1250X, agua). 7. Hifa de germinación con una primera ramificación de aproximadamente 180° (H) y la segunda de 90° (Y) (CIN 125X, agua). 8. Inicio de la formación de una rama sobre la hifa (CIN 500X, agua).

5.1.2. Germinación

Contenido y estratos

Al observarse en agua, el contenido de la espora es de apariencia granular, generalmente muy denso y formando una especie de coágulos, algunas veces mezclado con un poco de contenido fluido y refringente. Sin embargo, en reactivo de Melzer el contenido siempre se observó de apariencia fluida. No existen cambios en el arreglo de los estratos, salvo un estrecho contacto entre ellos en la zona de la cámara, lo cual ocasiona que dicha zona se observe más oscura, aún a nivel de estereomicroscopio.

Cámaras de germinación

Figs. 2-5 y 42F.

Cámara de germinación completamente hialina, más o menos circular en contorno, de aproximadamente 26-44 μm de ancho X 74.5-120 μm de largo (mitad visible), ocupando aproximadamente 1/3 de la superficie total de la espora, multilobulada; lóbulos muy evidentes con los márgenes engrosados (fig. 3); márgenes de 1.5-2.5 μm en la parte central, a 0.5-1 μm hacia la orilla; hasta 10 poros de germinación por cámara, de 1.5-2 μm de diámetro. En vista transversal la cámara es convexa, de 5.5-9 μm en la parte central a 1-1.5 μm hacia la orilla, con cuatro compartimientos (figs 4 y 5).

La cámara se encuentra localizada entre los estratos 4 (unitario, grupo B) y 5 (membranoso, grupo C) de la espora. Dicha estructura se forma por un espacio producido entre ambos estratos y la síntesis de nuevo material de estrato, a partir del estrato 4 (unitario), el cual forma estratos transversales de hasta 1 μm de grosor, que dividen a la cámara en compartimientos (fig. 5), dentro de cada uno de los cuales se puede observar contenido granular fino. Superficialmente tiene un aspecto rugoso, el cual se debe a que su transparencia permite apreciar con toda claridad las excrescencias del estrato interno, las cuales se van desvaneciendo hasta casi desaparecer hacia la orilla.

Hifas

Figs. 6-8.

Hifas de germinación producidas a partir de las cámaras de germinación (grupo más interno de estratos), donde comienzan a formarse y de ahí emergen al exterior de la espora atravesando el grupo externo de estratos (fig. 6), pudiendo producirse hasta cuatro hifas a la vez. Estas estructuras son de apariencia irregular, con un grosor que oscila entre 2-3 μm en el punto de salida de la espora y 3-4 μm en el resto, alcanzando una longitud de hasta 100 μm a los 24 días, con ápice redondeado; estrato de la hifa de 0.5 μm . Las hifas pueden

llegar a ramificarse inmediatamente al salir de la espóra, aunque es más frecuente que la primera ramificación se produzca a una distancia de 20 μm (figs. 7 y 8), formando ángulos de 60 a 90°, pudiendo observarse hasta seis ramificaciones a lo largo de una sola hifa. Dichas ramificaciones van de di- a tricotómicas, siendo más numerosas las del primer tipo. Contenido granular fino y homogéneo, hialino, tiñéndose fuertemente con azul de tripano.

Los porcentajes de germinación fueron del 3 al 12.5 %.

5.2. *Acanlospora laevis* Gerd. & Trappe

Gerdemann, J.W. & J.M. Trappe, 1974. Mycol. Memoir 5:76

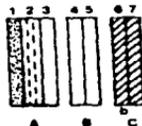
5.2.1. Descripción de la especie

Fig. 10.

Esporas formadas individualmente en el suelo, anaranjadas (Mn: 6A8) a color naranja rojizo (Mn: 7A8), globosas a subglobosas, de 129-221 μm de diámetro, con la superficie brillante y lisa. Pared de la espóra constituido por 7 estratos en tres grupos (A, B y C) (fig 10). Grupo A formado por tres estratos (1, 2 y 3); estrato 1: evanescente, amarillo pastel (Mn: 3A4 a 2A4) a amarillo claro (Mn: 4A5) cuando maduras, continuo con el estrato del sáculo, de 1.5-3 μm ; estrato 2: laminado, amarillo claro (Mn: 4A5 a 4A6) cuando las esporas son jóvenes, amarillo naranja (Mn: 4A8) a color naranja parduzco (Mn: 7A7) cuando son maduras, de 1.5-3 (-5.5) μm ; estrato 3: unitario, hialino, de 0.5-1 μm . Grupo B formado por dos estratos (4 y 5) fuertemente adheridos, siendo ambos unitarios y hialinos, de 0.5-1 μm cada uno. Grupo C compuesto por 2 estratos (6 y 7); estrato 6: membranoso, hialino, de 1-2 (-3) μm , ornamentado con excrescencias en su superficie externa; estrato 7: membranoso, hialino, hasta 0.5 μm . Contenido de la espóra más o menos denso, de apariencia reticulada (Estrada-Torres *et al.*, 1992).

MURÓNIMO: A(ELU) B(UU) C(M,M).

MUROGRAMA:



Sáculo esporífero hialino cuando joven, de color naranja cuando maduro (Mn: 5A7), al colapsarse, deja restos adheridos a la espora, subgloboso, de $88 \times 98 \mu\text{m}$, con pared de $0.5\text{-}1 \mu\text{m}$. Distancia del sáculo esporífero a la espora hasta de $78 \mu\text{m}$; diámetro de la hifa en el punto de unión con la espora hasta de $8 \mu\text{m}$, pared de la hifa de $0.5 \mu\text{m}$.

5.2.2. Germinación

Contenido y estratos

Al inicio de los ensayos de germinación todas las esporas presentaron contenido fluido, de apariencia globular, muy turgentes. Se observó un cambio en la consistencia del contenido a medida que transcurría el tiempo de los ensayos, el cual consistió en un paso del estado fluido a un estado denso, granular. Sin embargo, este cambio no fue constante, ni evidente para todas las esporas. No se detectaron cambios en los estratos.

Cámaras de germinación

Figs. 9A-D, 11-14 y 42G.

Cámaras hialinas, de apariencia circular (fig. 9B) a semicircular (fig. 9C), de $(39\text{-})52 \times 98 \text{ (-}200) \mu\text{m}$ ó $42\text{-}113 \mu\text{m}$ de diámetro, ocupando de $1/4$ o menos hasta $2/4$ de la superficie total de la espora, con 2 (5) lóbulos de forma y tamaño similares, separados entre sí por una hendidura de hasta $17 \mu\text{m}$ cuando se trata de dos a tres lóbulos y más corta cuando son más de tres (figs. 9A y 11); margen no engrosado o ligeramente engrosado, de $1\text{-}1.5 \mu\text{m}$; con 1-2 (3) poros de germinación, de $(1.5\text{-})2\text{-}3 \text{ (-}4) \mu\text{m}$ de diámetro (fig. 14). En vista transversal la cámara es convexa, de $6\text{-}11 \mu\text{m}$ en la parte central a $1.5\text{-}3 \mu\text{m}$ hacia la orilla, con cuatro a seis compartimientos (figs. 12).

Las cámaras de germinación se localizan generalmente muy cerca de la cicatriz dejada por la pérdida de la hifa de sostén y se forman a partir de una separación de los estratos 5 (unitario) y 6 (membranoso, ornamentado con excrescencias) de los grupos más internos de estratos y la síntesis de estratos intercalares de hasta $1.5 \mu\text{m}$. Dentro de cada uno de los compartimientos formados se puede observar contenido granular fino y homogéneo (fig. 13). Superficialmente, las cámaras tienen un aspecto granuloso fino y denso, al parecer producto de las excrescencias del estrato ornamentado de abajo, pero más cerrado que en éste.

Hifas

Figs. 15-18.

Hifas de germinación originadas desde el interior de la espora, a partir de las cámaras de germinación que se localizan en el grupo más interno de estratos, atravesando

el grupo externo por un poro de $2 \mu\text{m}$ de diámetro (fig. 14), produciéndose de una a cuatro hifas por espora, aunque es más frecuente observar cuatro.

Las hifas tienen un aspecto regular, de (3-) 6-6.5 (-8) μm de diámetro en la base a (3-) 4-5.5 (-6) μm en el resto, hasta 8-9 μm en el ápice, el cual siempre es redondeado; longitud variable, de 300 μm al día 33, hasta 3 500 μm al día 17; pared de 1-1.5 μm , ocasionalmente con algunos septos repartidos a intervalos irregulares. Una sola hifa puede ramificarse desde tres, hasta 17 veces (fig. 16), aunque en general la primera ramificación se origina inmediatamente al salir de la espora formando un ángulo de 180° (fig. 15), o menos frecuentemente a una distancia de 3 - 85 μm y entonces los ángulos formados son de 90° o menos. Las ramificaciones van de di- a tricotómicas. El contenido de las hifas es granular, uniforme y se tiñe fuertemente con azul de tripano. Ocasionalmente, sobre las hifas se producen una o dos estructuras parecidas a pequeñas vesículas, globosas, de 26 μm de diámetro, a elípticas, de $26 \times 14 \mu\text{m}$, con pared de 0.5 μm (figs. 17 y 18), sostenidas por un pedicelo de 4 μm de diámetro y hasta 15 μm de longitud, con el mismo tipo de contenido que las hifas.

Los porcentajes de germinación fueron del 10 al 40 %.

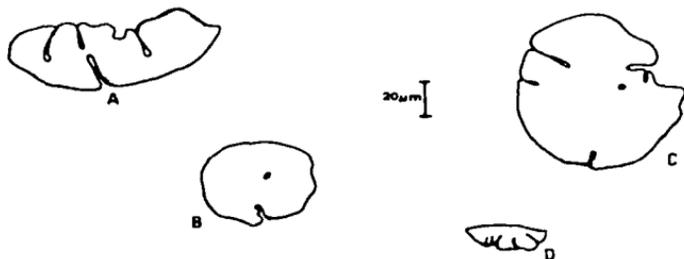
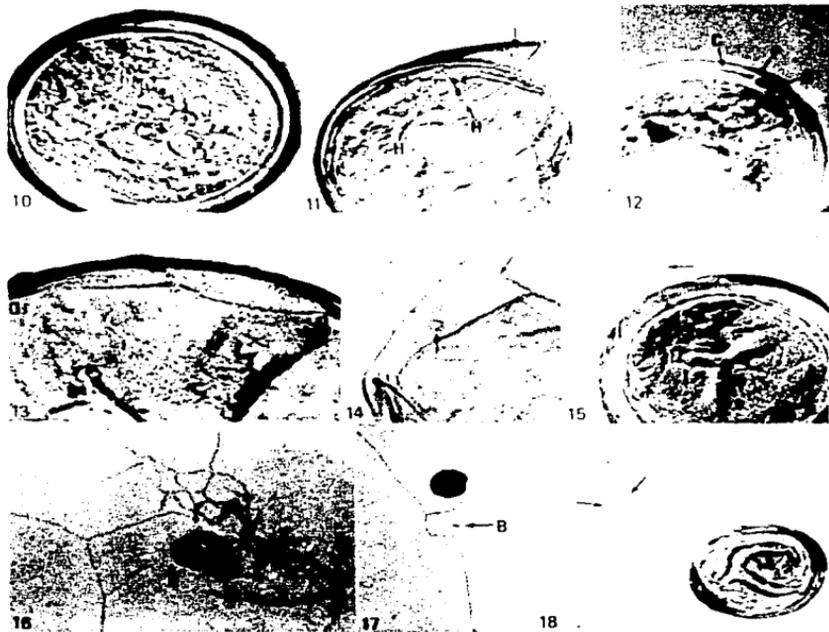


Fig. 9. Cámaras de germinación de *Acanthospora laevis*. A. Vista lateral. B-C. Vista frontal. D. Vista lateral de una cámara en formación.



Figs. 10-18. *Acaulospora laevis*. 10. Espora madura mostrando dos grupos de estratos (CIN 250X, HC 2386). 11. Cámara de germinación en vista lateral mostrando dos hendiduras (H) y el poro de germinación en el grupo externo de estratos (CIN 250X, HC 2407). 12. Cámara de germinación en corte transversal mostrando los compartimientos (C) y paredes intercalares (P) (CIN 250X, HC 2393). 13. Aspecto granuloso de una cámara en vista lateral, mostrando la orilla (O) y las excrescencias del penúltimo estrato (CIN 500X, agua). 14. Detalle de los poros de germinación en el grupo externo de estratos (CIN 500X, HC 2437). 15. Dos hifas de germinación ramificadas en un ángulo de 180° (CIN 250X, HC 2437). 16. Ramificación múltiple sobre las hifas de germinación (34X, agar). 17. Estructura bulbosa sobre la hifa de germinación (B) (38X, agar). 18. Detalle de la estructura bulbosa (CIN 125X, HC 2412).

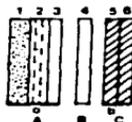
5.3. *Acumiaspora spinosa* Walker & Trappe
Walker, C. & J.M. Trappe, 1981. Mycotaxon 12:515-521.

5.3.1. Descripción de la especie
Fig. 20.

Esporas formadas individualmente en el suelo, amarillo olivo (MI: 2.5Y 6/6) a color café olivo claro (MI: 2.5Y 5/4) cuando maduras, globosas, de (118-) 142-168 (-200) μm de diámetro. Conjunto de estratos de la pared de la espora formado por seis estratos en tres grupos (A, B y C) (fig. 20). Grupo A formado por tres estratos (1, 2 y 3); estrato 1: evanescente, hialino a blanco amarillento pálido (Mn: 2A2), de 2-3 (-4) μm ; estrato 2: laminado, amarillo olivo (MI: 5Y 6/6), de (3-) 4-5 (-6) μm , ornamentado con proyecciones en forma de espinas de ápice redondeado, de (0.5-) 1 (-3) μm en la base y 0.5-2 μm en el ápice; estrato 3: unitario, hialino, fuertemente adhiriendo al estrato anterior, de 0.5-1 μm . Grupo B formado por un estrato (4); estrato 4: unitario, hialino, de 0.5-1 μm . Grupo C integrado por dos estratos (5 y 6); estrato 5: membranoso, ornamentado con excrescencias en su superficie externa, hialino, de (0.5-) 1 μm ; estrato 6: membranoso, hialino, que se torna rojo violáceo (Mn: 14C7) al reaccionar con Melzer, de 0.5-1 μm de grosor. Contenido de la espora de apariencia granular a granular-globular.

MURÓNIMO: A (E₁U) B(U) C(M₁M)

MUROGRAMA:



Sáculo esporífero amarillo pálido (Mn: 3A3), globoso a subgloboso, de (78-) 120-134 (-160) μm de diámetro, con restos de materia orgánica adheridos; pared formada por dos estratos membranosos de 4-5 μm de grosor total. Distancia entre el sáculo esporífero y la espora de 20-64 (-116) μm ; diámetro de la hifa en el punto de unión con la espora de (9-) 24-26 (-36) μm ; pared de la hifa hasta 3 μm .

5.3.2. Germinación

Contenido y estratos

Las esporas recién extraídas presentan contenido de apariencia fluida, lipídica, formando numerosos glóbulos, generalmente grandes. A medida que transcurrió el tiempo del ensayo fue posible denotar que en muchas esporas (casi el 100%) se presentó un contenido muy denso, de apariencia granular. El único cambio evidente en los estratos es un estrecho contacto entre ellos en la zona de localización de la cámara, sin embargo, más allá de la cámara, los estratos de pared conservan su individualidad (fig. 27). No existe aumento en su grosor, ni cambios en su coloración o textura.

Cámaras de germinación

Figs. 19A y D, 21-27 y 42H.

Cámaras de germinación hialinas, de apariencia semicircular (fig. 19D), de (41-) 84-113 μm X (49-) 51-86 (-107), a circular en contorno, de 92-117 μm de diámetro, formando al inicio del desarrollo espirales simples (figs. 19A y 21), ocupando de 1/2 a 1/3 de la superficie total de la espora; multilobulada, lo cual le da una apariencia muy elaborada (figs. 19D, 22 y 24); lóbulos tanto en la orilla, como en la parte central, irregulares y separados entre sí por hendiduras cortas, de márgenes engrosados (fig. 25); márgenes de 1-2 (-2.5) μm en la parte central, a 1-2 μm en la orilla; con dos a seis poros de germinación, localizados principalmente hacia la parte periférica de la cámara, de 1.5-4 μm de diámetro. En corte transversal la cámara es convexa, de 4-9 μm en su parte central y 1.5-2.5 μm en la orilla, con seis a ocho compartimentos por cámara, con estratos de 1.5 μm (fig. 26).

Las cámaras se producen por una separación de los estratos 4 (unitario, grupo B) y 5 (membranoso, ornamentado con excresencias, grupo C) (fig. 23); a partir del estrato 4 se sintetiza nuevo material de estrato para dividir a la cámara en compartimentos. Superficialmente, la cámara parece estar formada por dos placas superpuestas entre sí, al parecer por lo intrincado de los lóbulos que la forman (fig. 25), no obstante, es factible distinguir con claridad la ornamentación del estrato que se encuentra por debajo de ella, así como su contenido que es granular fino y homogéneo (fig. 24).

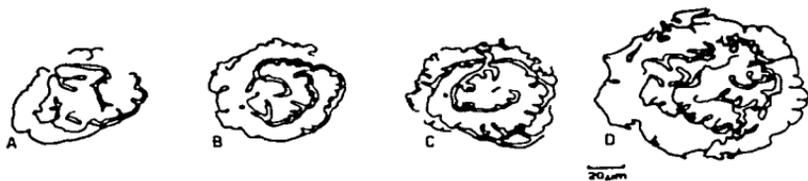


Fig. 19. Desarrollo secuencial de las cámaras de germinación en *Acaulospora spinosa*.

Hifas

Fig. 28.

Hifas derivadas a partir de las cámaras de germinación que se localizan entre los grupos más internos de estratos, emergiendo por un poro de $2\ \mu\text{m}$ de diámetro, producido en el grupo externo de estratos (fig. 28), hasta cuatro hifas producidas por espora al mismo tiempo; hifas de aspecto uniforme, de $(4-)\ 5-6\ (-8.5)\ \mu\text{m}$ de diámetro en la base y $3-4\ (-5)$ en el resto, de ápices redondeados, con una longitud de hasta $2\ 500\ \mu\text{m}$ a los 10 días, con la pared de $1\ \mu\text{m}$. Las hifas se ramifican di- a tricotómicamente dos o tres veces cerca de la espora, a una distancia de $4-15\ (-68)\ \mu\text{m}$, pero nunca inmediatamente al emerger de la pared, frecuentemente en ángulos de menos de 90° . Contenido granular fino y homogéneo, tinéndose fuertemente con azul de tripano.

Los porcentajes de germinación fueron del 2 al 43 %.

5.3.3. Ontogenia

Figs. 29-41.

1. Formación de un sáculo terminal en una hifa (figs. 29A y 30). El contenido es granular fino y homogéneo, blanquecino y continuo entre hifa y sáculo, mezclado con un poco de contenido fluido altamente refringente (fig. 31), ambos cubiertos por una membrana muy frágil, de menos de $0.5\ \mu\text{m}$ de grosor. Esta hifa se encuentra separada del resto del micelio por uno o dos septos repartidos irregularmente en el extremo opuesto a la zona de

formación del sáculo, región en que la hifa es angosta y tiene forma de cuña, con una longitud de hasta 400 μm a partir del cuello del sáculo, el cual tiene un diámetro de 21-30.5 μm . A lo largo de la hifa es común observar varios apéndices filiformes, casi sin contenido, los que a veces se encuentran ramificados, ocasionalmente pueden llegar a observarse este tipo de estructuras en el extremo opuesto del sáculo, las cuales se encuentran separadas de éste por un septo (fig. 29B).

2. El sáculo comienza a crecer y a adquirir una forma subglobosa (figs. 29A, B y 30), de 113 X 126 μm , observándose continuidad de la pared membranosa de la hifa hacia el sáculo, esta pared mide menos de 0.5 μm y es altamente refringente. Durante esta etapa de crecimiento, la pared de la hifa comienza a engrosarse hasta 1 μm por abajo del cuello del sáculo, mientras que en el sáculo se desarrolla un estrato interno, el cual está formado por dos a tres láminas muy flexibles, de 1-2 μm , de color amarillo muy pálido (fig. 32). En la parte final de la hifa se forman nuevos septos que van aislando el contenido hacia la zona del sáculo. Estos estratos se evidencian con mayor claridad con reactivo de Melzer, ya que en agua dan la apariencia de ser un solo estrato muy grueso.

3. Cerca del cuello del sáculo, a una distancia de 135-270 μm comienza a formarse una espora subglobosa, de 36 x 34 μm , completamente sécil (figs. 29C, 31 y 33). A nivel del punto de unión entre hifa y espora el cuello mide 17-29 (-41) μm de diámetro. Se presentan dos estratos, uno externo hialino, frágil, de 0.5-1 μm y uno interno laminado de 2-3 μm (figs. 34 y 41A), con algunas evidencias de la ornamentación característica de la especie.

4. A medida que la espora aumenta su volumen, el contenido del sáculo pasa a ésta, quedando vacío, lo mismo que los restos de la hifa (fig. 29D). La ornamentación comienza a definirse y presentar el patrón característico de la especie, sin embargo, es más baja y el arreglo de las proyecciones es más irregular y menos cerrado que en esporas maduras (figs. 35 y 36), no distinguible en corte óptico, la pared se torna de color amarillo pálido. La espora alcanza un tamaño de 102 X 127 μm (fig. 29E). Se observan cuatro estratos: evanescente hialino, de hasta 1.5 μm ; laminado (tres láminas) amarillo pálido, de hasta 3 μm ; y dos membranosos hialinos de 0.5-1 μm cada uno, plegados (figs. 37 y 41B). En general el aspecto de los estratos externos es más rígido y el contenido va adquiriendo una apariencia reticulada, con numerosos glóbulos pequeños.

5. Los tercero y cuarto estratos que tenían una apariencia membranosa, comienzan a adquirir un aspecto semirrígido, el último de los estratos se vuelve ligeramente amarillento. Los estratos se separan en dos grupos: A(EL_u) B(U) (fig. 41C).



Figs. 20-28. *Acaulospora spinosa*. 20. Espora madura mostrando tres grupos de estratos (CIN 250X, HC 2366). 21. Cámara de germinación en los primeros estados de formación (CIN 500X, HC 2370). 22. Cámara de germinación madura, multilobulada (CIN 250X, HC 2387). 23. Espora abierta en la que se observa la cámara en el grupo interno de estratos (CIN 250X, HC 2401). 24. Vista superficial de la cámara en la que se observan las excrescencias del estrato que se encuentra por debajo de ella (CIN 1250XC, HC 2401). 25. Márgenes de la cámara engrosados y con un aspecto de sobreposición (S) (CIN 1250X, HC 2405). 26. Vista transversal de la cámara mostrando varios compartimientos (C) N 500X, HC 2405). 27. Vista transversal de la cámara donde se aprecian dos grupos de estratos más allá de la cámara (CIN 1250X, HC 2405). 28. Hifa de germinación emergiendo a partir de uno de los compartimientos de la cámara, atravesando el grupo externo de estratos (CIN 1250X, HC 2392).

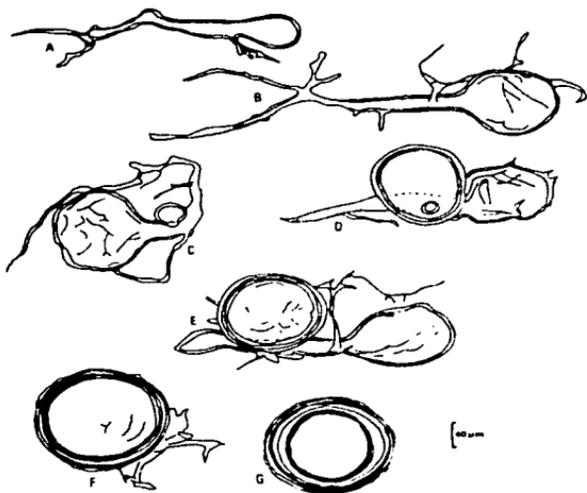
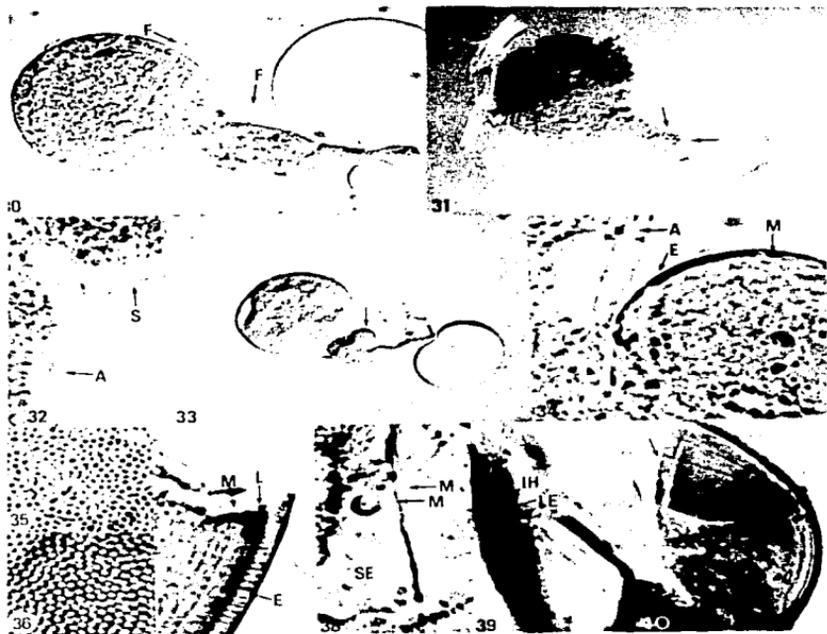


Fig. 29. Ontogenia de las esporas de *Acanthospora spinosa*. A. Primordio de sáculo. B. Sáculo desarrollado. C. Primordio de una espora sobre la hifa. D. Espora en formación. E. Desarrollo de estratos. F-G. Esporas maduras.



Figs. 30-40. *Acaulospora spinosa*. 30. Sáculo con algunos apéndices filiformes (F) (CIN 250X, HC 2380A). 31. Protuberancia sobre la hifa al inicio de la formación de la espora (CIN 125X, HC 2380). 32. Estrato externo membranoso y grueso en hifa (A) y sáculo (S) (CIN 1250X, HC 2380). 33. Espora muy joven (CIN 125X, HC 2380A). 34. Estrato externo membranoso muy grueso en hifa (A), continuo con el estrato externo membranoso delgado de una espora joven (E) y estrato interno membranoso en espora (M) (CIN 1250X, HC 2380A). 35. Detalle de la ornamentación en una espora muy joven (CIN 1250X, HC 2374). 36. Arreglo de la ornamentación en una espora madura (CIN 1250X, HC 2373). 37. Espora en maduración con sólo 3 estratos: membranoso-evanescente externo (E), laminado ornamentado (L) y membranoso más interno (M) (CIN 1250 X, HC 2374). 38. Espora más madura mostrando dos estratos membranosos en el grupo interno, con el penúltimo estrato aún sin excrecencias (SE) (CIN 1250X, HC 2374). 39. Punto de unión de espora e hifa ocluido por el estrato laminado de la espora (LE) y el estrato membranoso interno de la hifa (IH) (CIN 1250X, HC 2377). 40. Espora completamente madura mostrando los tres grupos de estratos y la reacción al Melzer en el estrato más interno (R) (CIN 250X, HC 2377).

6. Por abajo del cuarto estrato (grupo B), se presentan dos estratos más, ambos membranosos, hialinos, el primero de 0.5-1 (-2) μm , el segundo de menos de 0.5 μm , de tal manera que ahora los grupos de estratos son: A(EL₄U) B(UMM) (fig. 41D). El último estrato reacciona de color café púrpura con reactivo de Melzer. La ornamentación de las esporas se desarrolla más (fig. 36) y se observa completamente embebida en el estrato más externo, como en una gelatina, este estrato continúa siendo una extensión del estrato externo del sáculo e hifa de sostén (fig. 39).

7. El estrato 4 que se observaba semirrígido se separa de los dos estratos membranosos internos, de tal manera que se forman el grupo de estratos B, con un solo estrato, el 4, y el grupo de estratos C, con los dos membranosos (fig. 41E). En este último grupo de estratos, sobre el estrato 5 aparecen pequeñas excrescencias que le dan un aspecto granuloso. Para este momento el contenido de la espora se encuentra completamente separado de la hifa de sostén por la lámina más interna del estrato laminado y el estrato más externo proyectado desde el sáculo e hifa (fig. 39). A medida que la espora madura, el contenido cambia su aspecto granular fino y homogéneo, por un aspecto granular mezclado con glóbulos fluidos pequeños.

8. En esporas completamente maduras los estratos se separan más frecuentemente en tres grupos: A: membranosos (evanescente), laminado (ornamentado con proyecciones) y unitario; B: semirrígido (unitario); C: membranosos (ornamentado con excrescencias) y membranosos (figs. 40 y 41E), aunque en ocasiones pueden observarse esporas con los estratos separados únicamente en dos grupos: A: evanescente, laminado y unitario; B: unitario, membranosos y membranosos (fig. 41D). En este último estrato la reacción al Melzer es variable, desde un color café púrpura, hasta magenta, en algunas esporas no se observó reacción. A partir de este momento el contenido de las esporas adquiere un aspecto reticulado abierto por la presencia de enormes glóbulos fluidos, los cuales pueden llegar a fundirse hasta formar uno solo. La mayoría de las esporas pierden los restos de hifa y sáculo (fig. 29F, G), quedando una cicatriz ocluida por la última lámina del estrato laminado, libre de ornamentación y por el estrato membranosos interno de la hifa de sostén (fig. 39). Asimismo, sólo quedan restos del estrato evanescente en algunas partes de la espora.

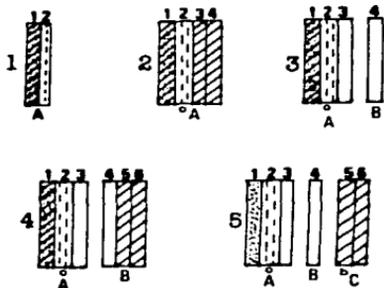


Fig. 41. Secuencia de formación de estratos en *Acanthospora spinosa*.

VI. DISCUSIÓN

6.1. Metodología

Schenck (1984) resaltó que contar con fuentes de inóculo es una de las principales necesidades de los investigadores involucrados en el estudio de los HMA, no obstante, el carácter simbiótico obligado de estos hongos, que sólo crecen asociados con las raíces de una planta hospedera, han restringido el establecimiento y mantenimiento de sus cultivos, ya que se requiere de personal especializado y de mucho tiempo y espacio.

Además de lo anterior, aun cuando se disponga del tiempo y espacio necesarios para la preparación de muchas macetas o contenedores donde propagar a estos organismos, todavía queda el problema de los sustratos y plantas trampa que deben usarse para obtener mejores resultados, ya que se ha observado que las especies de HMA responden diferencialmente hacia diversas plantas hospederas y/o sustratos (Sreenivasa y Bagyaraj,

1988a,b; Strubble y Skipper, 1988; Schenck y Pérez, 1990). Por otro lado, algunas características ambientales como luminosidad, potencial hídrico, pH del sustrato, temperatura, el origen mismo del aislamiento (Sieverding, 1991), así como el tipo de inóculo empleado (Gazey *et al.*, 1993) pueden ejercer efectos directos en la propagación de algunas especies.

Es común encontrarse con dos problemas adicionales, el primero de ellos es que cuando se ha logrado la propagación de algunas especies a nivel de macetas de propagación, es decir, donde se encuentra una mezcla de especies, cuando ésta se pasa a la etapa de cultivo puro (monoespecífico) no se logra la propagación de la especie de interés; en segundo lugar, es frecuente que se consiga obtener un cultivo puro pero con un bajo número de esporas, que su repropagación falle, o bien que durante las repropagaciones decaiga el número de esporas que son producidas (Schenck, 1984; Morton, 1991).

Éstas son algunas de las razones que han ocasionado la falta de datos acerca de la ontogenia de las esporas de especies particulares, perteneciendo la mayor cantidad de información sobre dichos procesos a taxa del género *Glomus*, en el cual se ha tenido mayor éxito en la producción de cultivos monoespecíficos (Schenck, 1984). Sin embargo, no es ésta la situación para otros géneros, como sucede con *Acaulospora*, un género bastante difícil de obtener en cultivo puro (Gazey *et al.*, 1993). Con las observaciones realizadas aquí sobre el desarrollo de las esporas en *A. spinosa*, hasta este momento sólo se ha descrito el proceso de formación de esporas para cuatro de las 26 especies descritas del género, es decir, aproximadamente el 15%.

En cuanto a los estudios sobre germinación, además de la limitante que representa la poca disponibilidad de material biológico, existen antecedentes acerca de una alta variabilidad en los porcentajes de germinación obtenidos con especies del género *Acaulospora*, así como de sus periodos de latencia, lo cual podría ser indicativo de una diferencia en la edad fisiológica de las esporas (Tommerup 1983a; Gazey *et al.*, 1993), así como de la falta de datos experimentales que permitan proporcionar las mejores condiciones para su germinación.

6.2. Especies

En las descripciones originales de *Acaulospora bireticulata* (Rothwell y Trappe, 1979) y *A. spinosa* (Walker y Trappe, 1981), sólo se indicó la existencia de tres estratos, cada uno de $\pm 1 \mu\text{m}$; en el caso de la última especie se señaló que los dos internos eran membranosos; estos mismos estratos han sido considerados y reportados subsecuentemente

por otros autores (Schenck y Pérez, 1988; Berch, 1988; Hlaskowski, 1988b). No obstante, Morton y Benny (1990) proporcionaron un murograma donde se indicó la existencia de seis estratos en tres grupos para *A. spinosa*. Más tarde, Varela y Estrada-Torres (com. pers.) observaron la existencia de seis estratos reunidos en tres grupos, con tres, uno y dos estratos respectivamente en *A. bireticulata*. Asimismo, se revisaron los ejemplares tipo de ambas especies, encontrándose seis estratos arreglados en tres grupos en *A. spinosa*, en tanto que en *A. bireticulata* no fue posible hacer buenas observaciones de los estratos debido a que las pocas esporas contenidas en el espécimen se encontraban montadas en laminillas o estaban muy estropeadas, razón por la cual no se pudieron identificar con claridad los estratos que contenían; en esta especie la ornamentación tan característica es la que permite definir con claridad su identidad, aunque sería recomendable realizar una redescrición de la especie basada en ejemplares procedentes de la localidad tipo.

En las descripciones originales de muchas especies de este género, se consideraba como un solo estrato a lo que en realidad corresponde con un grupo de estratos, el cual puede estar integrado por uno o más estratos. De esta manera, casi en todas estas descripciones se han pasado por alto tres estratos, el más externo que generalmente es evanescente, un estrato unitario muy delgado que se encuentra firmemente adherido al ornamentado, y uno de los estratos membranosos más internos; el primero probablemente debido a que se pierde con facilidad y no está presente en todas las esporas maduras, mientras que los dos últimos son difíciles de observar. En algunas especies de *Acanthospora*, sin embargo, el último de dichos estratos, puede distinguirse con facilidad del otro estrato membranoso del grupo al cual se encuentra completamente unido, cuando las esporas se observan con reactivo de Melzer, ya que en este se produce una reacción dextrinoide, tal como sucede en *A. bireticulata* y *A. spinosa*.

Aunque en el caso de *Acanthospora laevis* sucedió algo similar en las primeras descripciones, Mosse (1970c) describió la ultraestructura de su pared, señalando la existencia de seis capas arregladas en dos grupos, cada uno de ellos integrado por tres estratos. Además, indicó que entre las capas 3 y 4 se presentaba lo que denominó "una membrana tripartita", sin reconocerla como una capa estructural, sino sólo como un enlace entre las capas internas y externas de la pared. Años más tarde, Estrada-Torres *et al.* (1992) realizaron una redescrición de la especie donde se incluyeron todos los estratos que se observaron en el material aquí estudiado.

Es importante recordar que los medios de montaje utilizados durante años para la observación de las esporas de los hongos micorrizicos arbusculares pudieron dificultar la observación precisa de la composición y estructura de los estratos de muchas especies,

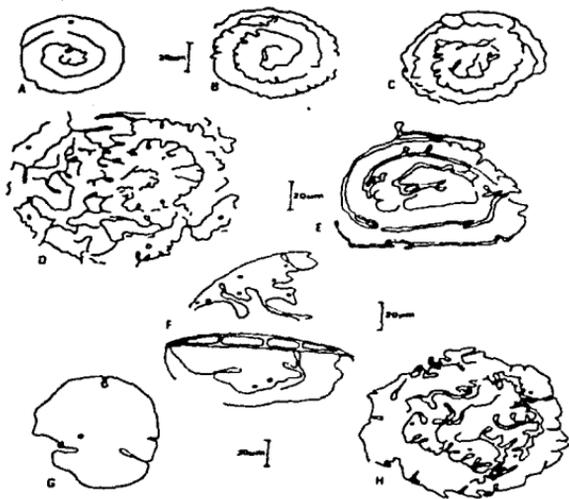


Fig. 42. Morfología conocida de las cámaras de germinación en algunas especies de *Acanthospora* y *Entrophospora*. A. *E. colombiana*. B. *A. rehmsii*. C. *A. acrobiculata*. D. *A. tuberculata* (tomadas de Spain, 1992). E. *A. dilatata* (tomada de Blaszkowski, 1994). F. *A. bireticulata*. G. *A. laevis*. H. *A. spinosa*.

como se ha reportado para *Acaulospora dilatata* Morton y *A. rugosa* Morton (Morton, 1986a).

6.3. Germinación

6.3.1. Cámaras

Mientras que en *Acaulospora laevis* las cámaras de germinación son morfológicamente simples y pequeñas en comparación con el tamaño de las esporas (1/4) (fig. 42G), en *A. bireticulata* y *A. spinosa* son más grandes (1/4 - 3/4) y complejas (fig. 42F y H). En *Acaulospora spinosa* las cámaras son siempre multilobuladas, muy sencillas al principio y aumentando en complejidad conforme se van desarrollando (fig. 19A-D), morfología sólo observada previamente para *A. tuberculata* por Spain (1992). Esta autora, describió las cámaras de germinación producidas por la citada especie así como para *A. rehmsii* Sieverding & Toro, *A. scrobiculata* y *Entrophospora colombiana*, las cuales van desde espirales simples a estructuras multilobuladas complejas (fig. 42A-D). Blaszkowski (1994) describió las estructuras de germinación de *Acaulospora dilatata* como circulares o algo elípticas (fig. 42E). Spain (1992) apuntó que la morfología de las cámaras es constante para cada especie, situación que fue corroborada para las especies aquí estudiadas.

Ontogénicamente, la morfología de las cámaras de germinación de *Acaulospora spinosa* se modifica y aumenta en complejidad conforme maduran (fig. 19A-D), de tal manera que en etapas tempranas de su formación, ésta es simple y muy similar a la reportada para *A. rehmsii* y *A. dilatata* (figs. 19A y B y 42B y E), en esporas con cámaras un poco más maduras, adquiere el aspecto general de las cámaras observadas para *A. scrobiculata* (figs. 19C y 42C) hasta finalmente alcanzar una complejidad morfológica como la reportada para *A. tuberculata* (figs 19D y 42D y H). Aunque no fue posible observar etapas aún más juveniles de formación de las cámaras, es posible que en este estado estas estructuras sean muy similares a las de *A. laevis*, donde son morfológicamente muy sencillas, frágiles y pequeñas y en consecuencia difíciles de apreciar. Estos datos sugieren la posibilidad de que la secuencia de formación de cámaras sea un marcador filogenético, como sucede con la ontogenia de los organismos (Kluge y Strauss, 1985; Morton 1990a). Sin embargo, este hecho no podrá corroborarse sino hasta que se conozca la ontogenia de dicha estructura en mayor número de especies del género.

Dos características constantes en los tres taxa estudiados son, por un lado, un engrosamiento en los márgenes de los lóbulos, poco patente para *Acaulospora laevis*, pero más evidente hacia el centro de las cámaras y en las cámaras de mayor tamaño de *A. bireticulata* y *A. spinosa*. Cabe señalar que hasta ahora no se había hecho mención de esta

característica para ninguna de las especies estudiadas por Spain (1992). No obstante, Blaszkowski (1994) describió las cámaras de germinación de *A. dilatata* señalando que su forma era producto del enrollamiento de una hifa llena con material granular fino, y sugirió que el origen de dicha hifa estaba en el centro de la cámara y su final hacia el extremo en donde se amplía. Esta interpretación podría corresponder con el margen engrosado de las cámaras que observó y no propiamente con una hifa (fig. 42E). La segunda característica es que en la zona de ubicación de la cámara las estratos entran en un contacto estrecho, de tal manera que sólo es posible distinguir dos grupos de estratos y no tres, condición que persiste aún en esporas rotas, donde los tres grupos de estratos son visibles sólo más allá de la cámara (fig. 27).

En *Entrophospora colombiana* las cámaras de germinación, que son como espirales simples, son más sencillas que las descritas por Blaszkowski (1994) para *Acaulospora dilatata*, especie con una composición de estratos idéntica (Morton y Benny, 1990).

Walker y Sanders (1986) describieron el proceso de formación de los escudos de germinación para el género *Scutellospora*, señalando que dicha estructura se originaba por el paso del contenido citoplasmático de la espora a través de una apertura producida en el grupo interno de estratos, hacia el espacio entre éste y el siguiente grupo (fig. 43). De igual manera, Spain (1992) encontró que las cámaras de germinación en las especies de Acaulosporaceae que estudió se formaban por el paso de citoplasma a través de una apertura como se describió para *Scutellospora*.



Fig. 43. Diagrama de formación del escudo de germinación en *Scutellospora* (tomado de Walker y Sanders, 1986).

Mosse (1970c) señaló que en el caso de *Acaulospora laevis* los compartimientos eran producto de una acumulación citoplasmática entre los estratos después de que éstos se separaban y por la síntesis de nuevo material de pared. Aunque tal autora no indicó en ningún momento la existencia de algún poro o apertura como el comentado por Spain

(1992), sí señaló que dentro de los compartimientos existía contenido granular fino y homogéneo como el observado en las especies estudiadas. Considerando que las cámaras de germinación se producen entre los dos grupos internos de estratos y que el contenido citoplasmático se encuentra limitado por el grupo más interno, la existencia de un canal que permita el flujo desde el interior es un proceso lógico de captura de contenido citoplasmático por la estructura en formación, ya que en dicho contenido se encuentran las enzimas endógenas indispensables para la síntesis del nuevo material de pared requerido en la construcción de una estructura como ésta (Bartnicki-García, 1968), lo cual sugiere además que el grupo más interno de estratos es un sitio muy activo, donde probablemente se lleva a cabo intercambio de materiales con el citoplasma, situación propuesta previamente por Mosse (1970b) para el quinto estrato que observó en *A. laevis* y que corresponde al estrato ornamentado con excrescencias. En este sentido, Bartnicki-García (1968) puntualizó que la producción *de novo* de un estrato previo al proceso de germinación es característica de los Zygomycetes.

Después de las primeras observaciones de las estructuras producidas durante la germinación en *Acaulospora* (Mosse 1970a,c; Morton, 1988, 1990a; Morton y Benny, 1990), todas ellas realizadas en vista transversal, se ha propuesto que éstas son efímeras, visibles únicamente después de que la espora ha germinado, y siempre y cuando los estratos entre los que se localizan se mantengan unidos. Spain (1992) fue la primera en proporcionar imágenes detalladas de las cámaras de germinación de tres especies del género y concluyó que las observaciones anteriores fracasaron debido al uso de PVLG como medio de montaje, el cual indicó puede ser deletéreo para las cámaras; las descripciones hechas por dicha autora se basaron en esporas montadas con agua y eliminando el grupo externo de estratos. No obstante, las observaciones realizadas en este trabajo se hicieron tanto en esporas montadas en agua, como en material montado en PVLG y/o PVLG+Melzer, donde las cámaras de germinación pueden observarse con toda claridad, tanto en vista frontal, como transversal, llegando incluso a definirse con mayor claridad en este medio de montaje, que en agua.

Tomando como base lo anterior, la incapacidad para distinguir estas estructuras puede deberse a diversas razones, tales como que las esporas seleccionadas no la presenten, que se coloquen en una posición inadecuada, que el grupo externo de estratos tenga una ornamentación muy elaborada, o bien a la fragilidad de las mismas estructuras, la cual podría ser variable entre especies.

6.3.2. Hifas

En este trabajo se encontró que los porcentajes de germinación son variables entre especies y aún dentro de una sola especie, de tal manera que los más bajos se presentaron en *Acaulospora bireticulata*, siendo del 3 al 12.5%, mientras que para *A. laevis* y *A. spinosa* alcanzaron alrededor del 40%. No obstante, en estudios previos de germinación con *A. laevis* se han reportado porcentajes de germinación de 0 a 70% (Hepper, 1984), 50 - 91% (Gazey et al., 1993), o hasta de 91% (Tommerup, 1984). Gazey et al., (1993) ya habían observado la variación de los porcentajes de germinación entre especies e indicaron que ésta es producto de diversos factores, siendo uno de los más importantes la latencia intrínseca de las esporas, que en el caso de *A. laevis* se ha reportado hasta de ocho meses (Tommerup, 1983a) y que se desconoce para el caso de la mayoría de las especies del género.

En las tres especies fue posible observar la producción de varias hifas de germinación al mismo tiempo (hasta cuatro), no obstante, esta condición fue más común para *Acaulospora laevis*. Aunque Morton (1990a) especificó que en este género "no hay evidencia de tubos germinales pateados", Mosse (1970a), Tommerup y Kidby (1980) y Gazey et al. (1993) ya habían reportado la producción de varias hifas de germinación por una sola espora, hasta cinco en *A. laevis* (Tommerup y Kidby, 1980), situación que parece ser bastante común para las especies aquí estudiadas.

Aunque las hifas producidas por los tres taxa se ramifican repetidamente, la distancia de la espora a la cual tiene lugar la ramificación, así como el ángulo que se produce por ésta parecen ser particulares en cada una de las especies, ya que mientras que en *Acaulospora bireticulata* y *A. spinosa* generalmente la primera ramificación se produce cerca de la espora (3 - 4 μm), formando ángulos de 90° o menos, en el caso de *A. laevis* dicha ramificación se origina habitualmente de manera inmediata al emerger de la espora (0 μm), dando lugar a un ángulo de 180° entre ambas ramas (fig. 15). En ninguno de los trabajos previos en los que se ha estudiado la germinación de algunas especies de *Acaulospora* se ha descrito la morfología de las hifas producidas.

Tommerup (1983a, 1984) reportó porcentajes de germinación muy altos (77 - 91%) y bajos (10-15 %) para *Acaulospora laevis*, dependientes de la edad de las esporas. En esta especie, se ha indicado que el largo periodo de latencia que presentan sus esporas, puede evitar que muchas de ellas germinen durante las épocas desfavorables (Tommerup y Abbott, 1981). Esta situación podría presentarse en muchas especies del género, en cuyos casos, la producción de varias hifas de germinación de numerosa y rápida ramificación y crecimiento podría compensar el largo periodo de latencia que presentan y el corto periodo de

sobrevivencia que se ha observado para las hifas de algunas especies del género, como *A. laevis* (Jasper *et al.*, 1993). Así, en esta especie se ha reportado la capacidad de producir hifas de hasta 11 cm de longitud (Jakobsen *et al.*, 1981), mientras que la germinación múltiple puede reducir la vulnerabilidad de las esporas hacia otros organismos del suelo, especialmente de los micófitos, además de favorecer la probabilidad de contacto entre las hifas y las raíces de nuevos hospederos (Griffin, 1972; Koske, 1981). No obstante, es necesario realizar más trabajos de germinación bajo diferentes condiciones que permitan conocer la posible variabilidad morfológica de las hifas y así corroborar las observaciones obtenidas con este estudio e inferir con certeza sus implicaciones taxonómicas y ecológicas.

Sobre algunas de las hifas producidas por *Acaulospora laevis* se detectaron unas estructuras globosas o elípticas, pediceladas, las cuales habían sido reportadas con anterioridad para otras tres especies del género como *Acaulospora appendicula* Spain, Sieverding & Schenck (Schenck *et al.*, 1984), *A. sporocarpia* (Herch, 1985) y *A. thomii* (Blaszowski, 1988a), y para *Entrophospora schenckii* Sieverding & Toro (Sieverding y Toro, 1987). En estos casos, se ha propuesto que dichas estructuras, a las cuales se les ha llamado "vesículas", pueden funcionar como propágulos (Schenck y Pérez, 1990), como en el caso de *Glomus monosporum* Gerd. & Trappe, donde se ha comprobado que estructuras parecidas son precursoras de los apresorios que inician la colonización de nuevos hospederos (San Antonio, 1990); por otra parte, se ha sugerido que la existencia de estas estructuras puede relacionar filogenéticamente a ambos géneros (Schenck *et al.*, 1984) ya que sería un carácter ancestral. Su presencia en *A. laevis* podría ser un indicativo más de su posición ancestral entre las especies de Acaulosporaceae consideradas como ancestrales, como son *A. appendicula* y *Entrophospora schenckii* (fig. 46) (Morton, 1990a).

6.4. Ontogenia

En *Acaulospora spinosa*, como en otras especies del género en que se ha descrito la ontogenia de las esporas [*A. laevis* (Mosse, 1970a), *A. scrobiculata* (Trappe, 1977) y *A. sporocarpia* (Herch, 1985)], los estratos de las esporas se forman de afuera hacia adentro, es decir, el estrato más joven es el más interno. Morton (1988, 1989, 1990a) indicó este mismo proceso de formación de estratos para los géneros *Glomus*, *Scutellospora* y *Entrophospora*, pero es el caso contrario de lo que sucede para *Sclerocyttis clavisporea* Trappe y *S. taiwanensis* Wu & Chen, en las que se ha reportado que el último estrato que se forma es el más externo (Wu, 1993).

Uno de los cambios más evidentes durante el desarrollo de las esporas es la apariencia del contenido, el cual pasa de un estado semi-sólido a líquido. Mosse (1970b)

señaló que los cambios en el contenido citoplasmático se deben a la preparación de las esporas para dos procesos importantes: primero, la entrada a un estado de latencia, durante el cual el contenido adquiere una apariencia globular (contenido de reserva) (fig. 44), que es como generalmente se observa una espora extraída del suelo, y luego este contenido se va haciendo más denso, cuando la espora entra nuevamente a un estado activo, el cual sería el caso de la pregerminación (fig. 44). En los ensayos de germinación, sin embargo, esta situación no fue constante para *Acaulospora bireticulata* y *A. laevis*, pero sí para *A. spinosa*, inclusive a nivel de los diferentes estados de la ontogenia de las esporas.

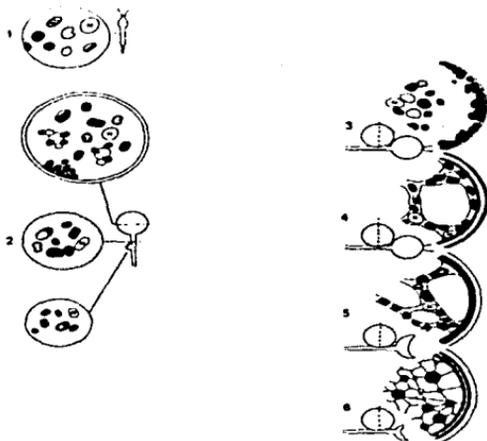


Fig. 44. Cambios en el contenido citoplasmático durante el desarrollo de *Acaulospora laevis* (tomado de Mossé, 1970b).

Mosse (1970c) indicó el mismo proceso de formación para las esporas de *Acaulospora laevis*, sin mencionar el número de estratos en el sáculo. No obstante, en *A. spinosa* fue muy evidente y constante la formación de un estrato interno, que aunque de apariencia laminada es muy flexible; sin embargo, dicha autora denotó la existencia de un estrato interno a nivel de la hifa, mismo que señaló es continuo con el primer estrato interno de la espora. Morton (1988) mencionó la existencia de un solo estrato en el sáculo de la mayoría de los taxa en Acaulosporaceae, con excepción de *A. appendicula* y *A. nicolsonii* Walker, donde los sáculos tienen estratos más complejos. De igual manera, cuando se revisaron los especímenes tipo de *A. hirticulata* (OSC 39477) y *A. spinosa* (OSC 40078) fue posible observar en ambos casos sáculos con una pared integrada por dos estratos. No obstante, se desconoce la estructura real de la pared en los sáculos de la mayoría de las especies de *Acaulospora*. Actualmente, sólo para *Entrophospora lentinesis* se ha indicado la formación precoz de un estrato interno en las esporas en desarrollo, este mismo estrato puede apreciarse en el sáculo a nivel fotográfico, aún cuando no se especificó su presencia (Wu *et al.*, 1995). La segunda semejanza notable entre la ontogenia de esta especie y *A. spinosa*, es el desarrollo temprano de la ornamentación característica de la especie, la cual se evidencia casi desde que comienzan a diferenciarse los estratos.

Otra característica de la formación de estratos, es la reactividad al Melzer en el estrato más interno. Morton (1986a) y Morton y Bentivenga (1994) señalaron que la aparición de reactividad indica que la diferenciación de dicho estrato ha llegado a su término.

6.5. Relaciones taxonómicas de la familia Acaulosporaceae: análisis fenético y posible significado de las observaciones realizadas en este estudio

En los géneros *Acaulospora* y *Entrophospora* las esporas se forman a partir de un sáculo terminal al que se le ha llamado "célula madre" (Mosse 1970a,c), "vesícula" (Gerdemann y Trappe, 1974), "término hifal" (Schenck *et al.*, 1984) y "sáculo esporífero" (Walker *et al.*, 1984) y las esporas se han clasificado como zigosporas ya que el sáculo esporífero parece un proceso gametangial abortado (Gerdemann y Trappe, 1974), aunque no existe evidencia contundente de su origen o función. Gibson (1985 *vide* Morton, 1988) y Walker (1987, 1988) sugirieron que las esporas formadas en estos géneros podrían ser producto de esporangios monospóricos formados sobre o dentro de la hifa unida al sáculo esporífero. Por otro lado, debido a que algunas especies de *Acaulospora*, como *A. appendicula*, *A. nicolsonii* y *A. sporocarpia* forman sus esporas sobre un pedicelo que se ramifica desde la hifa que soporta al sáculo esporífero, se ha propuesto que éste sea una vesícula fértil modificada, la cual sostiene a la espora lateral o internamente, con el pedicelo

reducido o eliminado en la mayoría de las especies de *Acaulospora*, como en el caso de los denticulos a los que se unen los esporangiolos de las vesículas fértiles de las especies de *Cunninghamella* y *Mycotypha*, otros géneros del orden Zygomycetes (Khan y Talbot, 1975; Alexopoulos y Mims, 1979; Benjamin, 1979). No obstante, Morton (1988) puntualizó que los detalles del origen y la morfología de la región del pedicelo en *Acaulospora* aún no se han descrito con claridad o se desconocen.

Berch (1986) acuñó el término "vesícula esporógena" para describir "el hinchamiento hifal dentro del cual se desarrolla la espóra" en *Acaulospora*, pero no proporcionó evidencias acerca de un estrato externo continuo con la hifa de sostén encerrando a la espóra. No obstante, Morton (1988) señaló que en *Entrophospora* el estrato externo de la espóra sí es continuo con el de la hifa en su inicio, condición corroborada por Wu *et al.* (1995) para *E. lewinensis*, además de que en *A. spinosa* se confirma en este trabajo la continuidad entre la pared de hifa y siculo con el estrato más externo de la espóra. Durante el desarrollo de las esporas de *A. spinosa* se observó que la oclusión del poro entre hifa y espóra se produce por el estrato laminado externo de la espóra, así como por una pared delgada, al parecer extensión de la hifa, la cual debe sintetizarse *de novo* una vez que el contenido del siculo e hifa se ha transferido a la espóra en formación. Sin embargo, para confirmar los datos aquí reportados y discernir con mayor claridad su origen, es necesario realizar más observaciones sobre la ontogenia de las esporas en otras especies de la familia Acaulosporaceae, así como emplear otras herramientas para su observación, como la microscopía electrónica de transmisión.

En las especies de *Acaulospora* y *Entrophospora* hasta ahora estudiadas, las cámaras de germinación son muy similares, y pueden llegar a ser morfológicamente parecidas a los escudos de germinación producidos por algunas especies de *Scutellospora*, lo que podría sugerir una gran relación taxonómica y evolutiva entre los tres géneros, como alguna vez se indicó debido a la existencia de una capa con un arreglo perpendicular de fibrillas, en donde se separan los dos grupos internos de estratos en especies tanto de *Acaulospora* como de *Scutellospora* (Mosse, 1970c; Old *et al.*, 1973; Maia y Kimbrough, 1993). Tal relación es improbable ya que la estructura de germinación en Acaulosporaceae se forma entre un estrato interno semirrígido (unitario) y un estrato membranoso ornamentado con excrescencias (fig. 49), mientras que en *Scutellospora* se forma entre un estrato coriáceo y uno membranoso no ornamentado (fig. 45) (Walker y Sanders, 1986; Morton, 1988; 1995; Morton y Bentivenga, 1994). Asimismo, Gianinazzi *et al.* (1993) han encontrado evidencias moleculares que separan ambos taxa por completo.

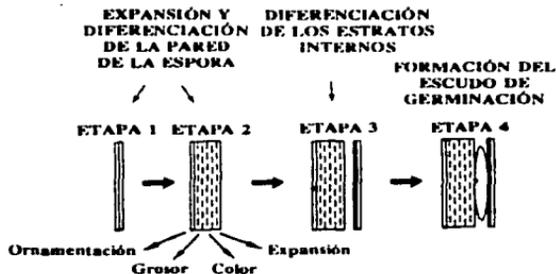


Fig. 45. Secuencia de formación de estratos y ubicación del escudo de germinación en *Scutellospora* (tomado de Morton, 1995).

Morton (1990a) realizó un análisis filogenético de los Glomales, en el que sólo se incluyeron las especies de Acaulosporaceae en las que hasta ese momento se había corroborado por completo la formación de micorriza arbuscular: *A. appendicula*, *A. denticulata*, *A. dilatata*, *A. lacunosa*, *A. laevis*, *A. longula*, *A. mellea*, *A. morrowiae*, *A. myriocarpa*, *A. rehmlii*, *A. rugosa*, *A. spinosa*, *Entrophospora colombiana*, *E. infrequens* y *Entrophospora schenckii*, tomándose en cuenta principalmente la estructura de la pared y la ontogenia. De acuerdo con dicho esquema, una rama del cladograma está integrada por *A. denticulata*, *A. rehmlii*, *A. delicata*, *A. longula* y *A. mellea*, mientras que la otra se forma por *A. lacunosa*, *A. dilatata* y *A. morrowae* (fig. 46) originándose la separación de ambas ramas por la presencia de dos estratos internos semirrigidos en el grupo de *A. lacunosa* (Morton, 1990a). Aquí, *A. appendicula* y *A. myriocarpa* se separan completamente de este clado (fig. 46) por presentar caracteres considerados ancestrales, como son el arreglo de las esporas en esporocarpos laxos, la existencia de pedicelos sosteniendo a las esporas y

paredes muy simples. Por otra parte, las especies de *Entrophospora* se disgregan del otro género gracias a que sus esporas se desarrollan en el cuello del sáculo (Morton, 1990a). Algunas de las especies no consideradas en este análisis y en las que actualmente se ha comprobado la formación de micorriza arbuscular son *A. bireticulata*, *A. scrobiculata*, *A. thomii* y *A. tuberculata*.

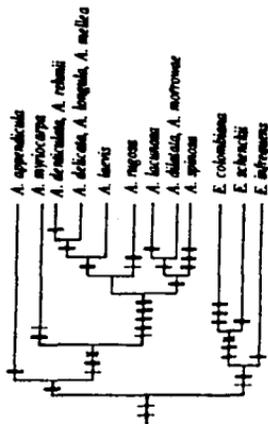


Fig. 46. Sección para Acaulosporaceae del cladograma propuesto por Morton (1990a) para Glomales.

Considerando que actualmente no se cuenta con suficientes datos de las especies de Acaulosporaceae aquí enlistadas, no es posible realizar un nuevo análisis filogenético que las incluya. Por esta razón, sólo se propuso estimar el parecido morfológico entre las especies de esta familia. Debido a que el tipo de datos obtenidos con este trabajo se desconocen para la mayoría de las especies (más del 50%), no fue posible incluirlos en el análisis fenético,

razón por lo cual sólo se trató de establecer una posible correlación entre ellos. Para el análisis se aplicaron un coeficiente de distancia (Distancia Manhattan) y uno de asociación (Rogers y Tanimoto), los cuales utilizan caracteres cualitativos multi- y doble estado (tabla 2, apéndice II).

Mediante los análisis de similitud se obtuvieron los fenogramas para Distancia Manhattan (DM) con un índice de correlación de 0.83, y para Rogers y Tanimoto (RT) de 0.84. El método de agrupamiento utilizado fue el de la media aritmética no ponderada (UPGMA por sus siglas en inglés). En ambos fenogramas se formaron dos grandes grupos, uno de ellos con dos subgrupos (figs. 47 y 48).

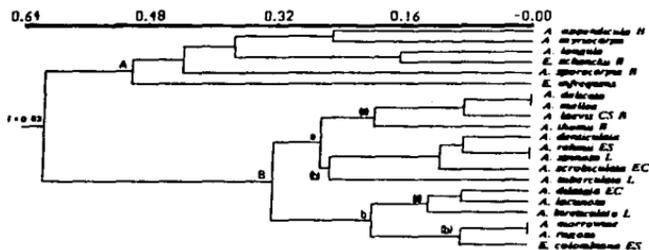


Fig. 47. Fenograma de Acaulosporaceae obtenido por el método UPGMA, utilizando Distancia Manhattan. En el extremo derecho se indican los tipos de cámaras que presentan algunas de las especies analizadas: CS (circular a semicircular), ES (espiral simple), EC (espiral compleja) y L (laberintiforme), así como la existencia de estructuras bulbosas sobre las hifas (B). El índice de correlación (r) se indica en el margen izquierdo.

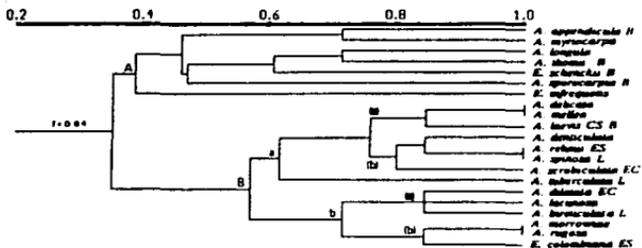


Fig. 48. Fenograma de Acaulosporaceae obtenido por el método UPGMA, utilizando el Índice de asociación de Rogers y Tanimoto. En el margen derecho se indican los tipos de cámaras y estructuras bulbosas con la simbología de la figura anterior. El índice de correlación (r) se indica en el margen izquierdo.

En el primer grupo (figs. 47A y 48A) quedaron incluidas *Acaulospora appendiculata* y *A. myriocarpa*, las cuales comparten la presencia de un pedicelo sobre el cual se desarrollan sus esporas, así como una composición de estratos de pared muy sencilla, presentándose cuatro estratos en la primera (Schenck *et al.*, 1984) y tres en la segunda (Schenck *et al.*, 1986). En el fenograma construido a través de Distancia Manhattan, las siguientes especies que se adicionan son *Acaulospora longula* y *Entrophospora schenckii*, mientras que con Rogers y Tanimoto *A. thomii* se integra entre éstas. Con Distancia Manhattan *A. thomii* quedó dentro del otro grupo (fig. 47B). El grupo compuesto por *A. longula* y *E. schenckii* (DM) se explica porque ambas poseen un estrato membranoso

interno y el estrato superficial es liso. La inserción de *A. thomii* aplicando el otro índice (RT), se justifica porque ésta, al igual que *A. longula* es lisa, tiene estratos internos semirrigidos y no presenta reacción con Melzer en los estratos membranosos, a pesar de tener tres de éstos (Hlaskowskii, 1988a) y no uno como las otras especies (tabla 2).

Las dos ramas siguientes en el primer grupo se constituyen por una sola especie cada uno: *Acaulospora sporocarpia* y *Entrophospora infrequens* (figs. 47A y 48A), especies que tienen una estructura de pared muy sencilla, integrada por tres estratos únicamente, pero, la primera especie se distingue de las otras especies del género por ser de las pocas que forman esporocarpos (Berch, 1985), mientras que la segunda se diferencia de todas las especies de Acaulosporaceae porque sólo en ella se presentan dos estratos externos evanescentes (Ames y Schneider, 1979).

En el segundo grupo (figs. 47H y 48H) se encuentran el mayor número de especies de Acaulosporaceae, en las cuales hay una composición de estratos compleja. Dentro de este grupo se separan dos subgrupos (figs. 47Ba,b y 48Ba,b). En estos subgrupos a su vez, se pueden observar por un lado las especies que no tienen ornamentación en el estrato superficial [figs. 47Ba(a) y 48Ba(a)] y las que si la tienen [figs. 47Ba(b) y 48Ba(b)]. No obstante, mediante el índice de Rogers y Tanimoto, que otorga mayor importancia a las diferencias (Crisci y López-Armengol, 1983), es posible separar a *Acaulospora tuberculata* de entre las especies con el estrato superficial ornamentado, ya que dicha especie posee un estrato coriáceo unido a uno amorfo. Aquí, *Acaulospora delicata* y *A. mellea* en el grupo de las especies lisas y *A. rehmsii* y *A. spinosa* en el de las ornamentadas, alcanzaron una similitud del 100%. En estos pares de especies, la composición de estratos es básicamente la misma.

El último subgrupo (figs. 47Bb y 48Bb) se caracteriza por presentar especies con un arreglo complejo de estratos, entre los que se incluyen estratos de tipo semirrigido y amorfo, así como estratos superficiales lisos y ornamentados. Las especies se arreglan en dos ramas del fenograma [figs. 47Bb(a) y 48Bb(a)], el primero constituido por *Acaulospora dilatata*, *A. lacunosa* y *A. bireticulata*, y que se distingue del otro formado por *A. morrowae*, *A. rugosa* y *E. colombiana* [figs. 47Bb(b) y 48Bb(b)], porque mientras que en el primero existen dos estratos internos semirrigidos, en el segundo sólo hay uno de éstos. *A. morrowae* y *A. rugosa* presentaron una similitud del 100% con ambos índices.

Mediante estos análisis se observa la separación de las especies de Acaulosporaceae en grupos más o menos claramente definidos, los cuales se distinguen principalmente por la complejidad y tipo de sus estratos, presencia de ornamentaciones y reacción con Melzer en los estratos internos. Es interesante resaltar que los grupos integrados exhibieron

básicamente la misma topología al aplicar tanto un índice de distancia, como uno de asociación, difiriendo solamente en la posición de algunas especies dentro de los grupos. Sin embargo, Crisci y López-Armengol (1983) indicaron que el orden de las unidades taxonómicas operacionales (OTU por sus siglas en inglés) dentro de los grupos, que en este caso corresponden a las especies, no es muy importante, ya que los ejes pueden rotar en cualquier dirección, sin alterar sus patrones de relación. Asimismo, los altos valores de correlación, que en ambos casos son cercanos a 1 (0.83 con Distancia Manhattan y 0.84 con Rogers y Tanimoto) indican un buen ajuste de los datos y similitud morfológica (Rohlf, 1994). Aunque dicha similitud no necesariamente indica relaciones filogenéticas, en algunos casos puede ofrecer indicios de su posible parentesco, como lo muestran estos resultados.

Lo anterior se ve apoyado al comparar los fenogramas obtenidos en este estudio con la propuesta filogenética de Morton (1990a) para Acaulosporaceae, donde es posible apreciar algunas coincidencias: en primer lugar, la separación de *Acaulospora appendicula*, *A. myriocarpa* y *Entrophospora infrequens* del resto de las especies, presentando los valores más bajos de similitud (figs. 47A y 48A); de acuerdo con dicho autor, estas especies son las menos avanzadas de la familia (fig. 46), mostrando caracteres ancestrales, tales como los pedicelos, arreglo de las esporas en esporocarpas y paredes sencillas. Es importante resaltar que en los análisis fenéticos otra especie que se separó del resto y tuvo uno de los valores más bajos de similitud fue *A. sporocarpia*, que aunque no fue considerada por Morton (Morton, 1990a), manifiesta también los caracteres ancestrales citados arriba. En segundo lugar están *A. delicata* y *A. mellea* que tuvieron una similitud del 100%, así como *A. dilatata* y *A. lacunosa* que se unieron con un valor de aproximadamente 85% y que son especies que presentan el mismo nivel evolutivo en diferentes clados (fig. 46), siendo más avanzadas las dos primeras (Morton, 1990a).

No obstante las congruencias obtenidas a través de esta comparación y los altos valores de correlación, fue posible denotar dos situaciones particulares. Por un lado, la separación de las tres especies del género *Entrophospora* y su integración con especies de *Acaulospora* en grupos diferentes; por el otro, la formación de tres pares de especies que alcanzaron una similitud del 100%. Si bien ambos casos se explican con base en la estructura de sus paredes, existen diferencias morfológicas muy obvias entre dichas especies. Así, *Entrophospora* es un género que produce sus esporas de una manera diferente a como lo hacen las especies de *Acaulospora* (Arnes y Schneider, 1979) y las especies de *Acaulospora* que se asociaron al 100% presentan entre sí diferencias en coloración, tamaño y ornamentación. Estos tres caracteres, así como el grosor y color de la pared y estratos, se han excluido cuando se han analizado las relaciones taxonómicas y filogenéticas en este

grupo de hongos, ya que se han considerado como altamente variables, siendo difícil establecer estados de carácter discretos (Morton, 1988, 1990a; Morton y Benny, 1990). Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que hasta la fecha no existen estudios de estadísticos esporicos como los efectuados con macromicetos en donde se ha probado su importancia para la separación de especies (Breitenbach y Krázhn, 1991) y su utilidad en estudios de taxonomía numérica (Wolfe, 1984; Mueller, 1985). En otro sentido, a pesar de que el número y tipos de estratos sí se han analizado en estos trabajos, aún hay serios problemas de interpretación del número y tipos de estratos que se presentan en la pared (Morton y Benny, 1990), por lo que no es poco frecuente que se omitan estratos o se especifiquen mal en las descripciones de muchas especies.

Otras características que se han excluido en este tipo de análisis son las estructuras de germinación (cámaras e hifas), tal como sucedió en el análisis filogenético de Glomales, donde Morton (1990a) anotó que la germinación en Acaulosporaceae se producía a partir de un estrato interno papilado, aún cuando dos décadas atrás (Mosse, 1970a,c) y en el mismo año de 1990 (Morton y Benny, 1990) ya se había detectado que algunas especies de *Acaulospora* germinaban a través de una estructura especializada. Al señalar en los fenogramas el tipo de cámara que presentan las especies de Acaulosporaceae en las que hasta ahora se conoce (sin considerarlas para el análisis formal), se puede observar que estas estructuras sólo se han descrito en las especies de Acaulosporaceae que se encuentran formando el grupo más grande de los fenogramas (fig. 47B y 48B), los cuales se caracterizan por presentar estratos complejos. A pesar de esto, el tipo de morfología de las cámaras no se encuentra restringido a grupos particulares, intercalándose cámaras muy simples con cámaras complejas dentro de los mismos subgrupos [fig. 47Ba(b),Bb(a) y 48Ba(b),Bb(a)]. A causa de que estas estructuras se desconocen en la mayoría de las especies, no fue posible incluir este carácter en el análisis fenético, aún cuando dicha estructura parece tener patrones morfológicos definidos para cada taxon, los cuales podrían ser indicativos de su parentesco. Lo mismo sucede con la morfología de las hifas de germinación, en donde se presentan estructuras bulbosas como las observadas en *A. laevis*, las cuales se han descrito en cuatro especies más: *A. appendicula*, *A. sporocarpia*, *A. thomii* y *E. schenckii*. A diferencia de lo que pasa con las cámaras de germinación, las estructuras bulbosas se han detectado en especies en las que no se han descrito cámaras, con excepción de *A. laevis*, la cual posee sin embargo, las cámaras de germinación con la morfología más simple.

Tomando como base lo antes expuesto, es evidente la necesidad de contar con más datos que permitan expresar con mayor fidelidad las afinidades y estructura taxonómica que existen entre las especies. No obstante, los Glomales son en general un grupo problemático,

ya que han sido poco o mal estudiados desde varios puntos de vista, lo cual impide establecer la importancia de varios caracteres, limitando en consecuencia su utilización en estudios de taxonomía numérica.

Así pues, es posible que los resultados de los análisis fenéticos realizados en este estudio, al igual que el cladístico llevado a cabo por Morton (Morton, 1990a), se modifiquen una vez que se definan con claridad los estratos de la pared y se conozca la morfología de las cámaras e hifas de germinación en todas las especies. Para ello será necesario checar los ejemplares tipo de las especies, revisar especímenes procedentes de varias localidades, así como hacer estudios de germinación para poder incluir estos caracteres en análisis fenéticos y cladísticos que posibiliten una nueva evaluación del parecido morfológico y filogenético que existe entre las especies de Acaulosporaceae.

Morton *et al.* (1990b) propusieron la secuencia de formación de estratos del género *Acaulospora*, dividiéndola en dos líneas evolutivas, la que aquí se describe, es aquella en donde se encuentran incluidas las especies estudiadas: 1. Formación de los estratos externos que integran el grupo A y que puede ser como sigue: evanescente y laminado (fig. 49a); evanescente, membranoso y laminado (fig. 49b); evanescente y unitario (fig. 49c); evanescente, membranoso y unitario (fig. 49d), o evanescente, unitario y unitario (fig. 49e). 2. Formación del grupo de estratos B con la adición de un estrato coriáceo (fig. 49f); a partir de ahí, a dicho estrato puede adicionarse otro coriáceo (fig. 49g); el estrato coriáceo se transforma a unitario (vía 1) (fig. 49h) y a éste se le adiciona otro unitario (vía 2) (fig. 49i), o al estrato coriáceo original se le adiciona uno unitario primero (vía 3) (fig. 49j) y otro unitario después (vía 4) (fig. 49k). 3. Formación del grupo de estratos C, con la adición de dos estratos membranosos a los de la vía 1 (fig. 49l-m); vía 2 (fig. 49n), o vía 3 (fig. 49o); o bien, dos estratos membranosos, el más interno de los cuales se transforma a amorfo, se adicionan a los de la vía 1 ó 2 (fig. 49p-q).

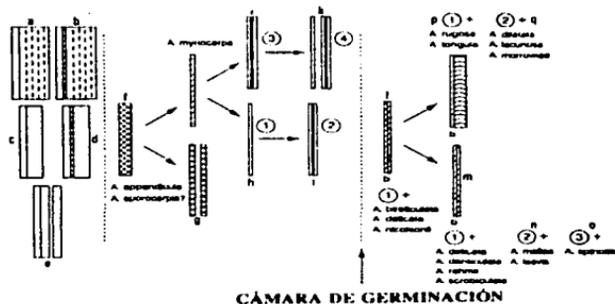


Fig. 49. Secuencia de formación de estratos y ubicación de la cámara de germinación en *Acamulospora* (tomado de Monon *et al.*, 1990).

Considerando las descripciones actuales de algunas especies del género, los taxa más similares a dos de las especies estudiadas: *Acamulospora bireticulata* y *A. spinosa*, son *A. denticulata*, *A. scrobiculata*, *A. rehmii* y *A. tuberculata*, todas ellas con uno de los estratos externos ornamentado y su secuencia de formación de estratos más internos por la vía 1. Mientras que el taxon más parecido a *A. laevis* es *A. mellea*, ambas con formación de estratos internos por la vía 2. No obstante, de acuerdo con esta propuesta, en *A. spinosa* la secuencia de formación de estratos sigue la vía tres, de tal manera que su composición final de estratos sería: A(EL) B(MU) (M₃M), lo cual no corresponde con la estructura de estratos presente en esta especie, ni con el desarrollo ontogénico de los estratos que se observó en este trabajo. De igual manera, los murónimos de *A. bireticulata* y *A. laevis* no corresponden del todo con las secuencias sugeridas en dicho esquema, ya que en la primera el estrato más interno es amorfo, mientras que la segunda presenta siete estratos y no seis. Como se anotó en la discusión de las especies (punto 6.2), en muchas descripciones de éstas se han pasado

por alto algunos estratos difíciles de observar, lo cual parece ser el caso de lo que ocurrió cuando se propuso la secuenciación de estratos desglosada con anterioridad. Sin embargo, esto no quiere decir que las interpretaciones realizadas por tales autores sean erróneas, pero sí que presentan algunas limitaciones que no podrán superarse hasta que se realicen un mayor número de estudios detallados acerca de la morfología de la pared de las esporas y sus procesos de formación.

VII. CONCLUSIONES

En *Acaulospora bireticulata*, *A. laevis* y *A. spinosa* las hifas producidas durante la germinación siguen patrones morfológicos específicos de ramificación, los cuales son más constantes en el caso de *A. laevis*.

La producción de varias hifas de germinación es un proceso común en las especies de *Acaulospora* donde se ha observado este fenómeno, incluyendo las aquí estudiadas. En estas últimas, dichas hifas son de crecimiento y ramificación rápidos. Estas características podrían constituir una estrategia que permita a los HMA de este género explorar en un corto tiempo mayor volumen de suelo para la colonización de nuevos hospederos, incrementándose las posibilidades de sobrevivencia de ambos participantes de la asociación. Por otra parte, la germinación múltiple compensa los largos periodos de latencia que presentan las esporas, además de que les permite amortiguar los efectos producidos por agentes parásitos o micófitos.

Como ya se había observado en estudios previos, los porcentajes de germinación son altamente variables entre los diferentes especies de *Acaulospora*.

Las estructuras de germinación (cámaras) en *Acaulospora bireticulata*, *A. laevis* y *A. spinosa*, no son, como se había propuesto, estructuras efímeras que sólo puedan observarse en esporas que han germinado y que luego desaparecen, ya que se forman durante la etapa de pregerminación por la síntesis de nuevo material de pared para formar compartimientos. La síntesis de tal material se debe a la captura de contenido citoplásmico por la estructura en formación, así como a la intensa actividad que tiene lugar en el penúltimo estrato.

La consistencia de las cámaras de germinación varía de acuerdo con la especie, ya que mientras que para *Acaulospora laevis* son muy frágiles, para *A. bireticulata* y *A. spinosa* son más resistentes.

El PVLG no es un medio de montaje inadecuado para la observación de las cámaras de germinación como se había pensado, ya que la dificultad previa para observar estas estructuras se debe a las características propias de las mismas.

Las cámaras de germinación son estructuras que cambian su morfología de acuerdo con su estado de desarrollo, por lo que la observación de unas cuantas cámaras (una serie incompleta de desarrollo) puede dar una falsa imagen de su morfología, si no se toma en cuenta su madurez.

Ya que la morfología de las estructuras de germinación parece ser intrínseca para algunas especies, es necesario conocer la morfología de estas estructuras en otras especies del género. Debido a ello, es importante realizar las observaciones de las series completas de desarrollo de las cámaras, ya que pueden ser indicadores ontogénicos de la relación filogenética que puede existir entre las especies.

El proceso de formación de esporas en *Acaulospora spinosa* es similar al reportado previamente para otras especies del género, así como para las especies de *Entrophospora*, el otro género de la familia Acaulosporaceae. En ambos casos siempre se inicia con la formación de dos estratos desde nivel del sáculo, de los cuales, el más externo dará lugar a un estrato evanescente, que es característico de las especies de ambos géneros de la familia y que sin embargo, como lo había anotado Morton (1990a), sólo en pocos casos ha sido tomado en cuenta. Esta secuencia concluye con la formación de un estrato interno, el cual adquiere reactividad al Melzer una vez que ha madurado.

La ornamentación de uno de los estratos externos se forma muy temprano, al inicio del desarrollo de la espora, tanto en *Acaulospora spinosa*, como en *Entrophospora lentiginosa*, por lo que ésta podría ser una característica propia de las especies con estratos externos ornamentados en la familia Acaulosporaceae.

Aunque los datos acerca de las estructuras de germinación y el desarrollo de las esporas que se obtuvieron con este trabajo para las especies de *Acaulospora* permiten hacer inferencias sobre la direccionalidad de dichos procesos, y en consecuencia de su similitud con otros taxa, sólo mediante la observación completa de estos eventos en otras especies del género se podrá corroborar la información recopilada, para incluirla en análisis cladísticos y fenéticos que permitan hacer inferencias más precisas de las relaciones taxonómicas y evolutivas que puedan existir entre ellas.

Es necesario mejorar las técnicas de obtención de material biológico con HMA, ya que ésta es una de las grandes limitantes para la realización de estudios específicos como el presentado aquí sobre germinación y desarrollo ontogénico de las esporas.

LITERATURA CITADA

- ABBOTT, L.K. y A.D. Robson, 1979. A quantitative study of spores and anatomy of mycorrhizas formed by a species of *Glomus*, with reference to its anatomy. *Aust. J. Bot.* 27:363-375.
- ABBOTT, L.K. y A.D. Robson, 1981. Infectivity and effectiveness of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: effect of inoculum type. *Aust. J. Agric. Res.* 32:631-639.
- AGUILAR, M., 1993. La inoculación como una alternativa para la conservación de esporas de hongos micorrizicos vesículo-arbusculares (MVA). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- ALEXOPOULOS, C.J. y C.W. Mims, 1979. *Introductory Mycology*. 3a. ed. Wiley & Sons, Nueva York.
- AMES, R.N. y R.W. Schneider, 1979. *Entrophospora* a new genus in the Endogonaceae. *Mycotaxon* 8:347-352.
- BAGYARAJ, D.J., A. Manjunath y R.B. Paul, 1979. Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in some tropical aquatic plants. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 72:164-167.
- BARTNICKI-GARCÍA, S., 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* 22:87-108.
- BENJAMIN, R.K., 1979. Zygomycete and their spores. In: Kendrick, B. (ed.). *The whole fungus* II. National Museums of Canada, Ottawa.
- BENTIVENGA, S.P. y B.A.D. Hetrick, 1991. *Glomus mortoni* sp. nov., a previously undescribed species in the Glomaceae isolated from the tallgrass prairie in Kansas. *Mycotaxon* 42:9-15.
- BENTIVENGA, S.P. y J. Morton, 1993. Stability and heritability of fatty acid methyl ester profiles of glomalean endomycorrhizal fungi. In: Peterson, L. y M. Schellde (eds.). 9th North American Conference on Mycorrhizae. University of Guelph, Guelph.
- BENTIVENGA, S.P. y J. Morton, 1995. A monograph of the genus *Glomus*, incorporating developmental patterns of morphological characters. *Mycologia* 87(5):719-731.
- BERCH, S.M., 1985. *Acanthospora sporocarpia*, a new, sporocarpic species, and emendation of the genus *Acanthospora* (Endogonaceae, Zygomycotina). *Mycotaxon* 23:409-418.
- BERCH, S.M., 1986. Endogonaceae: Taxonomy, specificity, fossil record, phylogeny. *Front. Appl. Microbiol.* 2:161-188.
- BERCH, S.M., 1988. *Compilation of the Endogonaceae*. Department of Soil Science, University of British Columbia, Vancouver.
- BLASZKOWSKI, J., 1988a. Four new species of the Endogonaceae (Zygomycotina) from Poland. *Karst.* 27:37-42.
- BLASZKOWSKI, J., 1988b. Three new vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Poland. *Bull. Acad. Pol. Sci.* 36:271-275.
- BLASZKOWSKI, J., 1989. *Acanthospora cavernata* (Endogonales) - a new species from Poland with pitted spores. *Cryp. Bot.* 1:204-207.
- BLASZKOWSKI, J., 1991. Polish Glomales. VIII. *Scutellispora nodosa* - a new species with knobby spores. *Mycologia* 83:537-542.

- BLASZKOWSKI, J., 1992. *Scutellospora armeniaca*, a new species in Glomales (Zygomycetes) from Poland. *Mycologia* 84(6):939-944.
- BLASZKOWSKI, J., 1994. Polish Glomales X. *Acaulospora dilatata* and *Scutellospora dipurpuraceus* Mycorrhiza 4:173-182.
- BLASZKOWSKI, J., 1995. *Glomus corymbiforme*, a new species in Glomales from Poland. *Mycologia* 87(5):732-737.
- BOWEN, G.D., 1987. The biology and physiology of infection and its development. In: Safir, G.R. (ed.) *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. CRC Press, Boca Raton.
- BREITENBACH, J. y F. Kräzhu, 1991. *Fungi of Switzerland. A contribution to knowledge of the fungal flora of Switzerland* 3. Edition Mykologia Lucerne, Lucerna.
- BRUNETT, M., 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. *Adv. Ecol. Res.* 21:171-313.
- BUTLER, E.J., 1939. The occurrence and systematic position of the vesicular-arbuscular type of mycorrhizal fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 22:274-301.
- CABELLO, M., L. Gaspar y R. Pollero, 1994. *Glomus antarcticum* sp. nov., a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus from Antarctica. *Mycotaxon* 51:123-128.
- CHABOT, S., G. Bécard y Y. Piché, 1992. Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia* 84(3):315-321.
- COLEY, S.C., K.L. Baker, G.R. Hooper y G.R. Safir, 1978. Spore wall development on the endomycorrhizal fungi *Glomus fasciculatus* and *Glomus mosseae* and a possible association with an ameoboid species. *Abstr. Proc. Am. Phytopathol. Soc.* 12:392.
- CRISCI, J. V. y M.F. López-Armengol, 1983. *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica*. Secretaría General de la Organización de Estados Americanos, Washington, D.C.
- CRUSH, J.R., 1973. Significance of endomycorrhizas in tussock grassland in Otago. *New Zealand J. Bot.* 11:645-660.
- DALPÉ, Y., R.E. Koike y L.L. Teus, 1992. *Glomus lamellatum* sp. nov. A new Glomaceae associated with beach grass. *Mycotaxon* 43:289-294.
- DANIELS, A., 1984. Spore germination *in vitro* culture of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: Ferguson, J.J. (ed.). *Applications of mycorrhizal fungi in crop production*. University of Florida, Gainesville.
- DANIELS, A. y D.M. Duff, 1978. Variation in germination and spore morphology among four isolates of *Glomus mosseae*. *Mycologia* 70:1261-1267.
- DANIELS, A. y S.O. Graham, 1976. Effects of nutrition and soil extracts on germination of *Glomus mosseae* spores. *Mycologia* 68:108.
- DANIELS, A. y H.D. Skipper, 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: Scheck, N. (ed.) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. American Phytopathological Society, San Paul.
- DANIELS, A. y J.M. Trappe, 1980. Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus epigaeus*. *Mycologia* 72:457.

- DOUDS, D.D. y N.C. Schenck, 1991. Germination and hyphal growth of VAM fungi during and after storage in soil at 5 matric potential. *Soil Biol. Biochem.* 23:177-183.
- EL-ATRACH, F., H. Vierheilig y J.A. Ocampo, 1989. Influence of non-host plants on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of host plants and on spore germination. *Soil Biol. Biochem.* 2(1):161-163.
- ESTRADA-TORRES, A., L. Varela, L. Hernandez-Cuevas y M.E. Gavito, 1992. Algunos hongos micorrizicos arbusculares del estado de Tlaxcala, México. *Rev. Mex. Mic.* 8:85-110.
- FRANKE, M. y J. Morton, 1990. Phylogenetic relationships among two *Scutellospora* species based on comparative ontogeny. In: Allen, M.F. y S.E. William (eds.) 8th North American Conference on Mycorrhizae: Innovation and Hierarchical Integration University of Wyoming-San Diego State University, Jackson Hole.
- FRANKE, M. y J. Morton, 1994. Ontogenetic comparisons of arbuscular mycorrhizal fungi *Scutellospora heterogama* and *Scutellospora pellucida*: revision of taxonomic concepts, species descriptions, and phylogenetic hypotheses. *Can. J. Bot.* 72:122-134.
- GAZEY, C., L.K. Abbott y A.D. Robson, 1992. The rate of development of mycorrhizas affects the onset of sporulation and production of external hyphae by two species of *Acaulospora*. *Mycol. Res.* 96(8): 643-650.
- GAZEY, C., L.K. Abbott y A.D. Robson, 1993. VA mycorrhizal spores from three species of *Acaulospora*: germination, longevity and hyphal growth. *Mycol. Res.* 97:785-790.
- GERDEMANN, J.H. y T.H. Nicolson, 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46:235-244.
- GERDEMANN, J.H. y J.M. Trappe, 1974. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycol. Mem.* 5:1-76.
- GIANINAZZI-PEARSON, V., A. Gollotte, M.-C. Lemoine y C. Arnould, 1993. β 1,3 glucans in walls of the Glomales: Taxonomic implications. In: Peterson, L. y M. Scheldt (eds.) 9th North American Conference on Mycorrhizae. University of Guelph, Guelph.
- GIBSON, J.L., J.K. Kimbrough y G.L. Benny, 1986. Ultrastructural observations on Endogonaceae (Zygomycetes). II. Glaziellales *ord. nov.* and Glaziellaceae *fam. nov.*: New taxa based upon light and electron microscopic observations of *Glaziella aurantica*. *Mycologia* 78:941-954.
- GIOVANNETTI, M., L. Avio y L. Salutini, 1991. Morphological, cytochemical, and ontogenetic characteristics of a new species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Can. J. Bot.* 69:161-167.
- GIOVANNETTI, M. y V. Gianinazzi-Pearson, 1994. Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 98(7):705-715.
- GOULD, S.J., 1977. *Ontogeny and phylogeny*. Belknap Press, Cambridge.
- GRAHAM, J.H., 1982. Effects of citrus root exudates on germination of chlamidospores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus epigaeum*. *Mycologia* 74:831.
- GREEN, N.E., S.O. Graham y N.C. Schenck, 1976. The influence of pH on the germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. *Mycologia* 68:929-934.
- GRIFFIN, D.M., 1972. *Ecology of soil fungi*. Syracuse University Press, Nueva York.

- HACKSCAYLO, E., 1972. Mycorrhizae: The ultimate in reciprocal parasitism? *Biol. Sci.* **22**:577-583.
- HEPPER, C.M., 1984. Regulation of spore germination of the vesicular-arbuscular fungus *Acaulospora laevis* by soil pH. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **83**:154-156.
- HEPPER, C.M., R. Sen, C. Azcón-Aguilar y C. Grace, 1988. Variation in certain isozymes among different geographic isolates of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus clarum*, *Glomus monosporum* and *Glomus mosserae*. *Soil Biol. Biochem.* **20**:51-59.
- HEPPER, C.M. y G.A., Smith, 1976. Observations on the germination of *Endogone* spores. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **66**:189-194.
- HETRICK, B.A., 1986. Ecology of VA mycorrhizal fungi. *In*: Powell, C.LI y J. Bagyaraj (eds.). *VA Mycorrhiza*. CRC Press, Boca Raton.
- HONRUBIA, M., P. Torres, G. Díaz y A. Cano, 1992. *Manual para micorrizar plantas en viveros forestales*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Murcia.
- INGLEBY, K., C. Walker y P.A. Mason, 1994. *Acaulospora excavata* sp. nov. an endomycorrhizal fungus from Côte d'Ivoire. *Mycotaxon* **50**:99-106.
- JABAJI-HARE, S., 1988. Lipids and fatty acids profiles of some vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: contribution to taxonomy. *Mycologia* **80**:622-629.
- JAKOBSEN, I., L.F. Abbott y A.D. Robson, 1981. Infectivity and effectiveness of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. Spread of hyphae and phosphorous inflow into roots. *Mycologia* **85**:976-987.
- JANOS, D.P., 1987. Roles of mycorrhizae in nutrient cycling and retention in tropical soils and organic matter. *Intecol. Bull.* **14**:41-44.
- JANOS, D.P., 1993. Vesicular-arbuscular mycorrhizae of epiphytes. *Mycorrhiza* **4**(1):1-4.
- JANOS, D.P. y J.M. Trappe, 1982. Two new *Acaulospora* species from tropical America. *Mycotaxon* **15**:515-522.
- JASPER, D.A., L.K. Abbott y A.D. Robson, 1993. The survival of infective hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in dry soil: an interaction with sporulation. *New Phytol.* **124**(3):473-480.
- KAMADIBRATA, K. y J.N. Hedger, 1990. A new species of *Acaulospora* associated with cocoa in Java and Bali (Indonesia). *Mycotaxon* **37**:73-77.
- KHAN, A.G., 1974. The occurrence of mycorrhizas in halophytes, hydrophytes, and xerophytes of *Endogone* spores in adjacent soil. *J. Gen. Microbiol.* **81**:7-14.
- KHAN, S.R. y P.H.B. Talbot, 1975. Monosporous sporangia in *Mycotypha* and *Cunninghamella*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **65**:29-39.
- KLUGE, A.J. y R.E. Strauss, 1985. Ontogeny and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **16**:247-268.
- KOHN, L.M., 1992. Developing new characters for fungal systematics: an experimental approach for determining the rank of resolution. *Mycologia* **84**:139-153.
- KORNERUP, A. y J.H. Wanscher, 1989. *Methuen handbook of colour*. 3rd ed., Methuen, Londres.
- KOSKE, R.E., 1975. *Endogone* spores in Australian sand dunes. *Can. J. Bot.* **53**:668-672.

- KOSKE, R.E., 1981. *Gigaspora gigantea*: observations on spore germination of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycologia* 78:288-300.
- KOSKE, R.E. y J.N. Gemma, 1995. *Scutellospora hawaiiensis*: A new species of arbuscular mycorrhizal fungus from Hawaii. *Mycologia* 87(5):678-683.
- KOSKE, R.E. y B. Tessier, 1983. A convenient, permanent slide mounting medium. *Mycol. Soc. Amer. Newslett.* 34(2):59
- KOSKE, R.E. y C. Walker, 1986. Species of *Scutellospora* (Endogonaceae) with smooth-walled spores from maritime sand dunes: two new species and a redescription of the spores of *Scutellospora pellicida* and *Scutellospora calospora*. *Mycotaxon* 27:219-235.
- LUNA-ZENDEJAS, H., L. Varela y A. Estrada-Torres, 1994. Estudio de los hongos micorrizicos arbusculares asociados a leguminosas en la rotación de cultivos de maíz. In: Universidad Autónoma de Tlaxcala, FIRA y SARH (eds.) *Memoria. I^o Encuentro estatal de ciencia y tecnología del sector agropecuario y forestal de Tlaxcala*. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala.
- LOUIS, I. y G. Lim, 1988. Observations on *in vitro* sporulation of *Glomus clarum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 91:698-699.
- MAIA, L.C. y J.W. Kimbrough, 1993. Ultrastructural studies of spore walls of *Acaulospora morrowiae* and *A. scrobiculata*. *Mycol. Res.* 97(19):1183-1189.
- MAIA, L.C., J.W. Kimbrough y G.L. Benny, 1994. Ultrastructure of spore germination in *Gigaspora albida* (Glomales). *Mycologia* 86(3):
- MALLOCH, D.W., K.A. Prozynski y P.H. Raven, 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A review). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77:2113-2118.
- MEIER, R.R. y I. Charvat, 1992. Peridial development in *Glomus mosseae* (Glomaceae). *Ann. Bot.* 79:928-936.
- MEJSTRIK, V.K., 1972. Vesicular-arbuscular mycorrhizas of the species of a *Molinietum coerulescens* L. I. Association: the ecology. *New Phytol.* 71:883-890.
- MICHELSSEN, A., 1993. The mycorrhizal status of vascular epiphytes in Bale Mountains National Park, Ethiopia. *Mycorrhiza* 4(1):11-16.
- MILLER, S.L. y E.B. Allen, 1992. Mycorrhizae, nutrient translocation, and interactions between plants. In: Allen, M.F. (ed.) *Mycorrhizal functioning*. Chapman & Hall, Nueva York.
- MOLINA, R., H. Massicotte y J.M. Trappe, 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen, M.F. (ed.) *Mycorrhizal functioning*. Chapman & Hall, Nueva York.
- MOREAU, F., 1953. Les Champignons. II. Systematique. *Encycl. Mycol.* 23:941-2120.
- MORTON, J., 1985. Variation in mycorrhizal and spore morphology of *Glomus occultum* and *Glomus diaphanum* as influenced by plant host and soil environment. *Mycologia* 77:192-204.
- MORTON, J., 1986a. Effects of mountants and fixatives on wall structure and Melzer's reaction in spores of two *Acaulospora* species (Endogonaceae). *Mycologia* 78(5):787-794.

- MORTON, J., 1986b. Three new species of *Acaulospora* (Endogonaceae) from high aluminum, low pH soils in West Virginia. *Mycologia* 78:641-648.
- MORTON, J., 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature and identification. *Mycotaxon* 32:267-324
- MORTON, J., 1989. Mycorrhizal fungi slide set. Morphological characters important in identifying endomycorrhizal fungi in the Zygomycetes. Audio-visual-electronic publication No.2. West Virginia Agricultural-Forestry Experiment Station, Morgantown.
- MORTON, J., 1990a. Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia* 82:192-207
- MORTON, J., 1990b. Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): Their role in macro- and microevolutionary processes. *Mycotaxon* 37:493-515
- MORTON, J., 1991. Information on pot culture development. *INVAM Newsletter* 1(2):1-8.
- MORTON, J., 1993. Problems and solutions for the integration of Glomalean taxonomy, systematic biology, and the study of endomycorrhizal phenomena. *Mycorrhiza* 2:97-109.
- MORTON, J., 1995. Taxonomic and phylogenetic divergence among five *Scutellospora* species (Glomales, Zygomycetes) based on comparative developmental sequences. *Mycologia* 87:127-137.
- MORTON, J. y G.L. Benny, 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): new order, Glomales, two new suborders: Glominae and Gigasporinae, and two new families: Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37:471-491.
- MORTON, J. y S.P. Bentivenga, 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.
- MORTON, J., M. Franke y S.P. Bentivenga, 1994. Developmental foundations for morphological diversity among endomycorrhizal fungi in Glomales (Zygomycetes). In: Varma, A. y B. Hoch (eds.). *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology, and biotechnology*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- MORTON, J., M. Franke y G. Cloud, 1990. *Advanced systemics workshop on V.A. mycorrhizal fungi*. University of Wyoming-University of Nebraska, Jackson Hole.
- MORTON, J., M. Franke y G. Cloud, 1992. The nature of fungal species in Glomales (Zygomycetes). In: Read, D.J., D.H. Lewis, A. Fitter y I. Alexander (eds.). *Mycorrhizas in ecosystems*. CAB, University of Arizona Press, Tucson.
- MOSSE, B., 1970a. Honey-coloured, sessile *Endogone* spores. I. Life History. *Arch. Mikrobiol.* 70:167-175.
- MOSSE, B., 1970b. Honey-coloured, sessile *Endogone* spores: II. Changes in fine structure during spore development. *Arch. Mikrobiol.* 74:129-145.
- MOSSE, B., 1970c. Honey-coloured, sessile *Endogone* spores. III. Wall structure. *Arch. Mikrobiol.* 74:146-159.

- MOSSE, B., 1981. Vesicular-arbuscular mycorrhizae: research for tropical agriculture and human resources. University of Hawaii, Hawaii.
- MUELLER, G.M., 1985. Numerical taxonomy analyses on *Laccaria* (Agaricales). *Mycologia* 77(1):121-129.
- OLD, K.M., T.H. Nicolson y J.P. Redhead, 1973. A new species of mycorrhizal *Endogone* from Nigeria with a distinctive spore wall. *New Phytol.* 72:817-823.
- PÉREZ, Y. y N.C. Schenck, 1990. A unique code for each species of VA mycorrhizal fungi. *Mycologia* 82(2):256-260.
- RABATIN, S.C., H.R. Stinner, D.H. Stinner y M. Paoletti, 1990. VAM fungi. Particularly *Glomus tenuis* in Tropical bromeliad epiphyte. Impact on biogeochemical cycling. In: Allen, M.F. y S.E. Williams (eds.). **8th North American Conference on Mycorrhizae: Innovation and Hierarchical Integration**. University of Wyoming-San Diego State University, Jackson Hole.
- READ, D.J., 1990. Mycorrhizas in ecosystems: Nature's response to the 'Law of the minimum'. In: Hawksworth, D.L. (ed.). **Frontiers in Mycology**. CAB International, Wallingford.
- ROHLF, F.J., 1994. **NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. Versión 1.80, Exeter Software, Nueva York.
- ROSE, S.L., 1981. Vesicular-arbuscular endomycorrhizal associations of some desert plants of Baja California. *Can. J. Bot.* 59:1056-1060.
- ROSENDAHL, S., J.C. Dodd y C. Walker, 1994. Taxonomy and phylogeny of the Glomales. In: Gianinazzi, S. y H. Schuepf (eds.). **Sustainable agriculture and natural ecosystems**. American Phytopathological Society, San Paul.
- ROTHWELL, F.M. y J.M. Trappe, 1979. *Acanthospora hirsuticulata* sp. nov. *Mycotaxon* 8:471-475.
- SAN ANTONIO, J.P., 1990. The possible relationship of spore-like structures on the mycelium of *Glomus monosporum* to formation of appressoria. *Mycologia* 82(2):268-269.
- SANCHOLLE, M. y Y. Dalpé, 1993. Taxonomic relevance of fatty acids of arbuscular mycorrhizal fungi and related species. *Mycotaxon* 49:187-193.
- SANDERGAARD, L. y S. Laegaard, 1977. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in some aquatic vascular plants. *Nature* 268:232-233.
- SCHENCK, N., 1984. Culture collections of VA mycorrhizal fungi. In: Ferguson, J. (ed.). **Applications of Mycorrhizal Fungi in Crop Production**. University of Florida, Gainesville.
- SCHENCK, N. y Y. Pérez, 1988. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**. INVAM, Gainesville.
- SCHENCK, N. y Y. Pérez, 1990. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**. 3^a ed., INVAM, Gainesville.
- SCHENCK, N.C., J.L. Spain, E. Sieverding y R.H. Howeler, 1984. Several new and unreported vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Colombia. *Mycologia* 76:685-699.

- SCHENCK, N.C., J.L. Spain y E. Sieverding, 1986. A new sporocarpic species of *Acaulospora* (Endogonaceae). *Mycotaxon* 25:111-117.
- SEN, R. y C.M. Hepper, 1986. Characterization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) by selective enzyme staining following polyacrylamide gel electrophoresis. *Soil Biol. Biochem.* 18:29-34.
- SIEVERDING, E., 1987. VA mycorrhizae in soils cultivation in tropical America. In Int. Soc. Soil Science (ed.). *Transaction of the XII Congress of International Society of Soil Science*. VI. Hamburgo.
- SIEVERDING, E., 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Technische Zusammenarbeit (GTZ), Eschborn
- SIEVERDING, E., A. Chaverri y I. Rojas, 1988. *Acaulospora splendida*, a new species in the Endogonaceae from Costa Rica. *Mycotaxon* 33:251-256.
- SIEVERDING, E. y S. Toro, 1987. *Entrophospora arhenkii*: a new species in the Endogonaceae from Colombia. *Mycotaxon* 28(1):209-214.
- SIQUEIRA, J.O., D.H. Hubbell y N.C. Schenck, 1982. Spore germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. *Mycologia* 74:952-959
- SIQUEIRA, J.O., D.M. Sylvia, J. Gibson y D.H. Hubbell, 1985. Spores, germination, and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Can. J. Microbiol.* 31:965-972.
- SPAIN, J., 1990. Arguments for diagnoses based on unaltered wall structures. *Mycotaxon* 38: 71-76.
- SPAIN, J., 1992. Patency of shields in water mounted spores of four species in Acaulosporaceae (Glomales). *Mycotaxon* 43:331-339
- SREENIVASA, M.N. y D.J. Bagyaraj, 1988a. *Chloris gayana* (Rhodes grass), a better host for the mass production of *Glomus fasciculatum* inoculum. *Plant and Soil* 106:289-290
- SREENIVASA, M.N. y D.J. Bagyaraj, 1988b. Selection of a suitable substrate for mass multiplication of *Glomus fasciculatum*. *Plant and Soil* 109:125-127.
- STENLUND, D.L., y I. D. Charvat, 1994. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in floating wetland mat communities dominated by *Thypha*. *Mycorrhiza* 4(3):131-137
- STRUBLE, J.E. y H.D. Skipper, 1988. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spore production as influenced by plant species. *Plant and Soil* 109:277-280.
- THAXTER, R., 1922. A revision of the Endogonaceae. *Proc. Amer. Acad. Arts Sci.* 57:291-351.
- TOMMERUP, I.C., 1983a. Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 81:37-45.
- TOMMERUP, I.C., 1983b. Temperature relations of spore germination and hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82:381-387.
- TOMMERUP, I.C., 1984. Effect of soil water potential on spore germination by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 83(2):193-202.
- TOMMERUP, I.C. y L.K. Abbot, 1981. Long term survival and renewed growth of VA mycorrhizal hyphae after root death. *Soil Biol. Biochem.* 13:431-433.

- TOMMERUP, I.C. y D. K. Kidby, 1980. Production of aseptic spores of vesicular-arbuscular endophytes and their viability after chemical and physical stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 39(6):1111-1119.
- TRAPPE, J.M., 1977. Three new Endogonaceae: *Glomus constrictus*, *Sclerocystis clavispora* and *Acanthospora scrobiculata*. *Mycotaxon* 6:359-366.
- TRAPPE, J.M., 1982. Synoptic keys of the genera and species of Zygomycetous mycorrhizal fungi. *Phytopath.* 72:1102-1108.
- TRAPPE, J.M., 1987. Phylogenetic and ecological aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: Safir, G.R. (ed.). *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. CRC Press, Boca Raton.
- TRAPPE, J.M. y C. Maser, 1976. Germination of spores of *Glomus macrocarpum* (Endogonaceae) after passage through a rodent digestive tract. *Mycologia* 68:433.
- U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1989. *Munsell soil charts*. Kollmorgen, Baltimore.
- WALKER, C., 1987. Current concepts in the taxonomy of the Endogonaceae. In: Sylvia, D.M., L. Hung y J.H. Graham (eds.). *Mycorrhizae in the next decade, practical applications and research priorities*. IFAS, University of Florida, Gainesville.
- WALKER, C., 1988. Formation and dispersal of propagules of endogonaceous fungi. In: Pegg, G. y P. Ayers (eds.). *Fungal infection of plants*. Cambridge University Press, Cambridge.
- WALKER, C., 1989. *Scutellospora aculeata* sp. nov., a newly described endomycorrhizal fungus from Brazil. *Mycotaxon* 35:357-361.
- WALKER, C., 1992. Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales) - a possible way forward. *Agronomie* 12:887-897.
- WALKER, C., L.E. Reed y F.E. Sanders, 1984. *Acanthospora nicolsonii*, a new Endogonaceous species from Great Britain. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 83:360-364.
- WALKER, C. y F.E. Sanders, 1986. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* gen. nov. from *Gigaspora* Gerd & Trappe. *Mycotaxon* 27:169-182.
- WALKER, C. y J.M. Trappe, 1981. *Acanthospora spinosa* sp. nov. with a key to the species of *Acanthospora*. *Mycotaxon* 22:515-521.
- WOLFE, C.B., Jr., 1984. A numerical taxonomy analysis of the tribe Iaehineae (Doletaceae). *Mycologia* 76:140-147.
- WU, C.-H., 1993. Glomales of Taiwan: III. A comparative study of spore ontogeny in *Sclerocystis* (Glomaceae, Glomales). *Mycotaxon* 47:25-39.
- WU, C.-H. y Y.-S. Liu, 1995. Glomales of Taiwan: V. *Glomus chimonohambusae* and *Entrophospora lentiniensis*, spp. nov. *Mycotaxon* 53:283-294.
- WU, C.-H., Y.-S. Liu y L.L. Hung, 1995. Spore development of *Entrophospora lentiniensis* in an aeroponic system. *Mycologia* 87(5):582-587.
- WU, C.-H. y D.M. Sylvia, 1993. Spore ontogeny of *Glomus globiferum*. *Mycologia* 85:317-322.

APÉNDICE I. MATERIALES ESTUDIADOS

Acanthospora hirticulata Rothwell & Trappe

Germinación

TLAXCALA, La Malintzi, Mpio. Ixtenco. Maceta de propagación preparada con suelo rizosférico de frijol y cebolla-alfalfa como plantas trampa, HC* 2418, HC 2419, HC 2421, HC 2422, HC 2423, HC 2426, HC 2427, HC 2428, HC 2430, HC 2433, HC 2436, HC 2439, HC 2442, HC 2445, HC 2447, HC 2450, HC 2455, HC 2456

Ejemplar tipo:

ESTADOS UNIDOS, KENTUCKY, Condado de Marshall, Vivero Dom, asociada con raíces de *Saxum/rus albidum*, F. Rothwell SP169. Registro OSC 39 477.

Acanthospora laevis Gerdelmann & Trappe

Germinación

TLAXCALA, La Malintzi, Mpio. Ixtenco. Suelo rizosférico de alverjón, HC 2371, HC 2372, HC 2381, HC 2384, HC 2386, HC 2388, HC 2390, HC 2393, HC 2394, HC 2397, HC 2398, HC 2400, HC 2403, HC 2404, HC 2407, HC 2408, HC 2410, HC 2412, HC 2414. Resembra de cultivo puro con número de registro 0001TLX01(1), montado con esporas de suelo rizosférico de manzano y alfalfa como planta trampa, HC 2432, HC 2435, HC 2438, HC 2441, HC 2444, HC 2446, HC 2449, HC 2452

Acanthospora spinosa Walker & Trappe

Germinación

TLAXCALA, La Malintzi, Mpio. Ixtenco. Maceta de propagación preparada con suelo rizosférico de frijol y maíz como planta trampa, HC 2339, HC 2340, HC 2341, HC 2342, HC 2343, HC 2344, HC 2345, HC 2346, HC 2347, HC 2348. Maceta de propagación montada con suelo rizosférico de haba y maíz como planta trampa, HC 2349, HC 2350, HC 2351, HC 2352, HC 2353, HC 2354, HC 2355, HC 2356, HC 2357, HC 2358, HC 2359, HC 2360, HC 2361, HC 2362, HC 2363, HC 2364, HC 2365, HC 2366, HC 2367, HC 2368, HC 2369, HC 2370, HC 2382, HC 2383, HC 2385, HC 2387, HC 2389, HC 2391, HC 2392, HC 2395, HC 2396, HC 2399, HC 2401, HC 2402, HC 2405, HC 2406, HC 2409, HC 2411, HC 2413.

Ejemplar isotipo:

MEXICO, VERACRUZ, Mpio. de San Andrés, Estación Biológica Los Tuxtlas U.N.A.M., en suelo abajo de pastos y hierbas a un lado del camino, 9/7/96, J. Trappe 3596. Registro OSC 40 078.

Ontogenia

TLAXCALA, La Malintzi, Mpio. Ixtenco. Cultivo puro montado con esporas de suelo rizosférico de frijol y trébol como planta trampa, HC 2373, HC 2374, HC 2375, HC 2376, HC 2377, HC 2378, HC 2379, HC 2380, HC 2415, HC 2416, HC 2417.

* Las iniciales del recolector se abreviaron por razones de espacio y corresponden a: Hernández-Cuevas, Laura V.

APÉNDICE II. DATOS PARA EL ANÁLISIS FENÉTICO

Matriz básica de datos

ESPECIES*	CARACTERES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AAPD	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
ADLC	0	0	0	1	0	0	1	2	1	1	0	0
ADTC	0	0	0	1	2	0	1	2	1	1	1	0
ADLT	0	0	0	1	0	0	2	1	1	1	1	0
ALCN	0	0	0	1	1	0	2	1	1	1	1	0
ALVS	0	0	0	1	0	0	2	2	1	1	0	0
ALGL	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
AMLL	0	0	0	1	0	0	1	2	1	1	0	0
AMRW	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
AMYC	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AMRH	0	0	0	1	2	0	1	2	1	1	0	0
ARGS	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
ASPN	0	0	0	1	2	0	1	2	1	1	0	0
ABRT	0	0	0	1	2	0	2	1	1	1	1	0
ASCB	0	0	0	1	2	0	2	2	1	1	0	0
ASPC	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
ATHM	1	0	0	1	0	0	1	3	1	0	0	0
ATBC	0	0	0	1	1	0	2	2	1	1	0	1
ECLB	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
EIFO	0	1	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0
ESHK	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0

* Los nombres de las especies de Acaulosporaceae se abreviaron de acuerdo con la propuesta de Pérez y Schenck (1990).

Matriz de distancia (Distancia Manhattan)

" SIMINT: input=A:DOCE, coeff=MANHAT, direction=Cole
 type=2, size=21 by 21, nc=none

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.000											
2	0.750	0.000										
3	0.667	0.250	0.000									
4	0.833	0.250	0.333	0.000								
5	0.750	0.333	0.250	0.083	0.000							
6	0.833	0.083	0.333	0.167	0.250	0.000						
7	0.500	0.250	0.500	0.333	0.417	0.333	0.000					
8	0.750	0.000	0.250	0.250	0.333	0.083	0.250	0.000				
9	0.750	0.167	0.250	0.083	0.167	0.250	0.250	0.167	0.000			
10	0.250	0.500	0.750	0.583	0.667	0.583	0.250	0.500	0.500	0.000		
11	0.583	0.167	0.083	0.417	0.333	0.250	0.417	0.167	0.333	0.667	0.000	
12	0.750	0.167	0.250	0.083	0.167	0.250	0.250	0.167	0.000	0.500	0.333	0.000
13	0.583	0.167	0.083	0.417	0.333	0.250	0.417	0.167	0.333	0.667	0.000	0.333
14	0.667	0.417	0.167	0.167	0.083	0.333	0.500	0.417	0.250	0.750	0.250	0.250
15	0.667	0.250	0.167	0.333	0.250	0.167	0.500	0.250	0.417	0.750	0.083	0.417
16	0.417	0.667	0.750	0.750	0.667	0.750	0.417	0.667	0.667	0.500	0.667	0.667
17	0.750	0.167	0.417	0.417	0.500	0.250	0.250	0.167	0.333	0.500	0.333	0.333
18	0.833	0.250	0.333	0.333	0.250	0.167	0.500	0.250	0.417	0.750	0.250	0.417
19	0.833	0.250	0.333	0.167	0.250	0.333	0.333	0.250	0.083	0.583	0.417	0.083
20	0.333	0.750	0.667	0.833	0.750	0.833	0.500	0.750	0.750	0.583	0.583	0.750
21	0.500	0.417	0.667	0.500	0.583	0.500	0.167	0.417	0.417	0.250	0.583	0.417

	13	14	15	16	17	18	19	20	21
13	0.000								
14	0.250	0.000							
15	0.083	0.167	0.000						
16	0.667	0.750	0.750	0.000					
17	0.333	0.583	0.417	0.667	0.000				
18	0.250	0.333	0.167	0.750	0.417	0.000			
19	0.417	0.333	0.500	0.750	0.417	0.500	0.000		
20	0.583	0.667	0.667	0.583	0.750	0.833	0.667	0.000	
21	0.583	0.667	0.667	0.417	0.417	0.667	0.333	0.500	0.000

Análisis de correlación

N=21
 Media X=0.42063 SSx=10.05225
 Media Y=0.42063 SSy=6.93957

Prueba de asociación
 Matriz de correlación r=0.83087
 (=Mantel normalizado, estadístico z)
 Prueba de t-Mantel t=6.834
 Z < obs. Z p=1.0000

Matriz de similitud (Rogers & Tanimoto)

* SIMQUAL: input=A:DOCE, coeff=RT, By Coils
type=3, size=21 by 21, nc=none

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1.000											
2	0.263	1.000										
3	0.263	0.714	1.000									
4	0.200	0.600	0.600	1.000								
5	0.200	0.500	0.600	0.846	1.000							
6	0.263	0.846	0.600	0.714	0.600	1.000						
7	0.412	0.600	0.412	0.500	0.412	0.500	1.000					
8	0.263	1.000	0.714	0.600	0.500	0.846	0.600	1.000				
9	0.200	0.714	0.714	0.846	0.714	0.600	0.600	0.714	1.000			
10	0.714	0.333	0.200	0.333	0.263	0.333	0.600	0.333	0.333	1.000		
11	0.333	0.846	0.846	0.500	0.500	0.714	0.500	0.846	0.600	0.263	1.000	
12	0.200	0.714	0.714	0.846	0.714	0.600	0.600	0.714	1.000	0.333	0.600	1.000
13	0.333	0.846	0.846	0.500	0.500	0.714	0.500	0.846	0.600	0.263	1.000	0.600
14	0.263	0.500	0.714	0.846	0.846	0.600	0.412	0.500	0.714	0.263	0.600	0.714
15	0.333	0.714	0.714	0.600	0.600	0.846	0.412	0.714	0.500	0.263	0.846	0.500
16	0.500	0.333	0.263	0.263	0.333	0.333	0.500	0.333	0.263	0.412	0.333	0.263
17	0.333	0.714	0.500	0.500	0.412	0.600	0.714	0.714	0.600	0.412	0.600	0.600
18	0.200	0.600	0.500	0.500	0.600	0.714	0.333	0.600	0.412	0.200	0.600	0.412
19	0.143	0.600	0.600	0.714	0.600	0.500	0.500	0.600	0.846	0.263	0.500	0.846
20	0.500	0.263	0.263	0.143	0.143	0.200	0.412	0.263	0.200	0.333	0.333	0.200
21	0.412	0.412	0.263	0.412	0.333	0.412	0.714	0.412	0.412	0.600	0.333	0.412

	13	14	15	16	17	18	19	20	21
13	1.000								
14	0.600	1.000							
15	0.846	0.714	1.000						
16	0.333	0.263	0.333	1.000					
17	0.600	0.412	0.500	0.412	1.000				
18	0.600	0.500	0.714	0.333	0.412	1.000			
19	0.500	0.600	0.412	0.200	0.500	0.333	1.000		
20	0.333	0.200	0.263	0.333	0.333	0.143	0.263	1.000	
21	0.333	0.333	0.333	0.333	0.500	0.500	0.263	0.412	1.000

Análisis de correlación

N=21

Media X=0.50012 SSx=8.46528

Media Y=0.50012 SSy=6.03342

Prueba de asociación

Matriz de correlación r=0.84423

(=Mantel normalizado, estadístico z)

Prueba de t-Mantel t=7.375

Z < obs. Z p=1.0000