



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

Morfología de algunas especies de *Acaulospora*

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

LAURA VERÓNICA HERNÁNDEZ CUEVAS

DIRECTOR DE TESIS: DOCTOR ARTURO ESTRADA TORRES

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

COMITÉ TUTOR: DOCTOR RONALD FERRERA CERRATO

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

DOCTOR JUAN FRANCISCO EFRAÍN DE LUNA GARCÍA

INSTITUTO DE ECOLOGÍA A.C.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La propagación de las esporas de *Acaulospora* y las observaciones sobre su ontogenia y germinación se efectuaron en el Laboratorio de Micorrizas del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala; la integración del documento final se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Genética y Ambiente, de la misma Universidad.

Se contó con apoyo para adquisición de materiales de laboratorio por parte del Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP), UNAM y con una beca para estudios de doctorado por parte del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP), la que fue reintegrada al fideicomiso PRODEP-UATX en su totalidad debido a la presentación extemporánea del examen de grado.

A la memoria de aquellos que fueron y estuvieron; para los que son y están...

¡Gracias!

CONTENIDO	PÁGINA
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes	5
Objetivos	23
Literatura citada en introducción y antecedentes	25
Ontogenetic development of spores in <i>Acaulospora mellea</i> and <i>A. longula</i> , and data about this process in <i>A. laevis</i> , <i>A. scrobiculata</i> and <i>A. spinosa</i>	32
Ontogénesis del escudo de germinación en cinco especies de <i>Acaulospora</i> (Glomeromycotina, Fungi)	49
Germination shields and hyphae in three arbuscular mycorrhizal fungi (Acaulosporaceae, Glomeromycotina)	63
Datos morfológicos en Glomeromycotina (Mucoromycota, Fungi): el género <i>Acaulospora</i>	78
Comentarios	103
Conclusiones	107
Literatura citada en comentarios	108

RESUMEN

El género *Acaulospora* (Glomeromycotina. Mucoromycota, Fungi), con 58 especies descritas incluye cerca del 20% de las especies de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) conocidas. Veintisiete de ellas están registradas de diversos ecosistemas y agroecosistemas distribuidos desde el norte hasta el sureste de México, haciéndolo un territorio excepcionalmente rico en especies de *Acaulospora* y a éste uno de los géneros mejor representados en el país. Para contribuir al conocimiento del género *Acaulospora* se obtuvieron datos sobre la ontogenia y la germinación de las esporas, y de sus características morfológicas distintivas. Ambos procesos se estudiaron en *A. bireticulata*, *A. laevis*, *A. longula*, *A. mellea*, *A. scrobiculata* y *A. spinosa*. Las características morfológicas de las esporas en *Acaulospora* se describen y discuten a partir de las observaciones realizadas en las especies estudiadas y de los datos bibliográficos existentes para el resto de las especies del género.

La secuencia de cambios morfológicos durante la esporogénesis en las especies estudiadas es lineal y conservada en el género. Las particularidades de cada especie se adquieren en diferentes momentos: i) en las especies ornamentadas la forma y el patrón de ornamentación en la pared de la espora aparecen en las primeras fases de desarrollo; ii) en las especies cuyos estratos muestran reacción al Melzer, ésta se presenta al término de la esporogénesis, cuando los estratos están completos y en el penúltimo de ellos se forman las excrecencias; iii) la última fase de maduración de las esporas comprende la producción de un escudo de germinación cuya morfología está asociada a las especies. La maduración del escudo incluye una fase de crecimiento primario de tipo orbicular o coclear, y una de crecimiento secundario en la que se forman compartimientos. En todos los casos la germinación es múltiple y las hifas ramificadas; en las hifas de germinación de *A. laevis* y de *A. spinosa* se producen estructuras globosas cuya función se desconoce. Muchos caracteres morfológicos se comparten entre un gran número de especies de *Acaulospora* por lo que no son reveladores taxonómicamente; aunque algunos caracteres de la ontogénesis de las esporas y de los procesos de germinación tienen potencial informativo, se desconocen para la mayoría de las especies del género.

PALABRAS CLAVE: Glomeromycotina, ontogenia, germinación, caracteres morfológicos.

ABSTRACT

With 58 described species, the *Acaulospora* genus (Glomeromycotina, Mucoromycota, Fungi) includes near 20% of known arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). From North to Southeast of Mexico, 27 species of *Acaulospora* had been recorded from ecosystems and agroecosystems, which makes this genus' richness exceptional in Mexico and one of the best represented. Data about the ontogenetic development of the spores and their germination were obtained in order to contribute to morphological characters knowledge of *Acaulospora* genus. Both biological processes were studied in *A. bireticulata*, *A. laevis*, *A. longula*, *A. mellea*, *A. scrobiculata* and *A. spinosa*. From the observations of studied species and extant data of the rest of the species in *Acaulospora* their morphological features are described and discussed.

On studied species the sporogenesis is retrieved as a conservative and lineal process evident from its sequence of morphological changes. At different times of the sporogenesis the species peculiarities are developed: i) at first stages of sporogenesis the form and pattern of ornamentation are developed; ii) Melzer's reaction is produced only when all strata are formed and one of the innermost shown its beaded ornamentation; iii) the production of one germination shield indicates the spores are fully mature. The germination shield matures in two stages, on the first one it grows following one orbicular or cochlear pattern, the shield is compartmentalized in the second one. The germination is multiple and the germination hyphae are branched in all the studied species. Some unknown function globose structures are produced by germination hyphae in *A. laevis* and *A. spinosa*. Most species of *Acaulospora* share many morphological characters which are not taxonomically informative. Some characters of spores ontogenesis and germination could be taxonomically useful but they are unknown for almost all the *Acaulospora* species.

KEYWORDS: Glomeromycotina, ontogeny, germination, morphological characters.

INTRODUCCIÓN

En la historia de la generación de conocimientos sobre los organismos se han recopilado datos de sus características y de sus particularidades biológicas cómo son, dónde se encuentran, cómo funcionan, qué elementos externos los favorecen o limitan, con quién y cómo se relacionan, entre otros. No obstante el gran impacto que estos conocimientos pueden tener para mantener a los organismos y a los ecosistemas, así como para manejarlos y conservarlos, la información dista de estar completa. Fungi, es el segundo grupo más diverso de organismos, con cerca de 2.2 a 3.8 millones de especies estimadas (Hawskworth y Lucking 2017), es uno de aquellos que presenta vacíos de conocimiento. Los hongos realizan funciones complejas y actúan como componentes de diversas asociaciones bióticas cuyas funciones son críticas para el desarrollo y el funcionamiento de los ecosistemas. Un grupo particular de ellos forman micorrizas, asociaciones mutualistas que contribuyen de manera significativa al desarrollo y crecimiento de las plantas, al de las comunidades vegetales, animales y microbianas y al de los suelos (Giovanetti 2000, Smith y Read 2008).

De entre los diferentes tipos de micorriza, la arbuscular se considera como cosmopolita por la gran diversidad y tipo de hábitats en los que se presenta y generalista por la gran variedad de grupos vegetales que la establecen (Opik *et al.* 2008). Los hongos que la forman se conocen como hongos micorrízicos arbusculares (HMA), uno de grupos microbianos más abundante e importante de la biota edáfica. Estos hongos, con cerca de 300 especies conocidas (Schüßler 2013), se asocian con el 90% de las familias de plantas vasculares y no vasculares (Wang y Qiu 2006). Su presencia en las plantas es considerada un carácter ancestral, señalándose que fueron determinantes para que las plantas colonizaran el medio terrestre al proveerles ventajas para resolver dos problemas, la desecación y la absorción de nutrimentos. Tanto o más importante es el papel que han desempeñado en la formación de los suelos como ambientes apropiados para la evolución de la vida (Leake y Read 2017). Existen evidencias fósiles de ancestros algales de las plantas de hace cerca de 460 millones de años que contienen estructuras hifoides de hongos ancestrales muy semejantes a las hifas intrarradicales no diferenciadas y diferenciadas que producen algunos grupos actuales de hongos micorrízicos, sin embargo, se ha propuesto que las primera evidencias fósiles de una interacción directa entre plantas y hongos datan de hace 407 millones de años (Strullu-Derrien *et al.* 2018).

En términos generales, la micorrízica arbuscular provee a las plantas de un buen desarrollo, de resistencia a condiciones ambientales adversas y contra agentes patógenos; contribuye a mantener la estructura y el funcionamiento de las comunidades vegetales, así como a formar y a estabilizar el suelo (Smith y Read 2008). No obstante, se ha demostrado que bajo ciertas circunstancias existen desbalances en el intercambio de nutrimentos del hongo hacia la planta, lo que ha llevado a proponer que los HMA no siempre se comportan como mutualistas (Johnson *et al.* 2006, Johnson 2010). Si bien es un hecho que los glomeromicetos son componentes importantes de la biota edáfica, los grupos que suelen predominar son *Glomus sensu lato* y *Acaulospora* (Carballar-Hernández *et al.* 2013, 2017); este último género destaca en México por la diversidad, frecuencia y abundancia con que se presenta en los suelos de distintos ecosistemas y agroecosistemas (Montaño *et al.* 2012, Varela *et al.* aceptado).

A la fecha se reconocen 58 especies de *Acaulospora* (56 registradas en www.indexfungorum.org, dos descritas durante el primer semestre del año 2018); 27 de ellas citadas de México (Varela *et al.* aceptado). Las dificultades que presenta su cultivo han llevado a que sólo diecisiete especies se mantengan de manera exitosa en colecciones científicas (INVAM 2018, IBEG 2016), lo que ha limitado el estudio de sus funciones y de procesos biológicos particulares como la ontogénesis esporal y la germinación de las esporas.

El proceso de formación de esporas se ha descrito con detalle para pocas especies de *Acaulospora* (Mosse 1970a,b, Trappe 1977, Berch 1985, Wu *et al.* 1995, Hernández-Cuevas 1997, Stürmer y Morton 1999, Dalpé y Declerk 2002, Muthukumar *et al.* 2005, Taylor *et al.* 2013) y la secuencia de germinación solamente para una (Hernández-Cuevas 1997). Estudios descriptivos sobre las estructuras especializadas para la germinación en *Acaulospora* existen sólo dos (Spain 1992, Hernández-Cuevas 1997). Este trabajo representa un esfuerzo orientado a generar datos sobre la morfología de algunas especies de *Acaulospora*, focalizado en la ontogenia y en la germinación de las esporas, dos procesos clave en la vida de cualquier HMA y particularmente trascendentes en este género, donde el establecimiento de la asociación micorrízica se da principalmente a partir de micelio producido por germinación (Gazey *et al.* 1993, Giovanetti 2000).

ANTECEDENTES

HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

SISTEMÁTICA

A principios del siglo pasado se reconocieron algunos miembros del grupo de los hongos micorrízicos arbusculares (Thaxter 1922, Butler 1939, Moreau, 1953), no obstante, fue hasta mediados de los años 70 cuando se revisó su clasificación (Gerdemann y Trappe 1974). En esta revisión se indicó que todos los géneros de hongos formadores de micorriza arbuscular y *Endogone* Link *ex.* Fries, formador de ectomicorriza, pertenecían al Orden Endogonales, Clase Zygomycetes, constituido por siete géneros: *Endogone*, *Gigaspora* Gerdemann & Trappe, *Acaulospora* Gerdemann & Trappe, *Glomus* Tul. & Tul., *Sclerocystis* Berk. & Broome, *Modicella* Kanouse y *Glaziella* Berk. (Gerdemann y Trappe 1974). Años después, *Modicella* fue transferido a Mortiriellaceae, Orden Mortiriellales, Clase Zygomycetes, mientras que *Glaziella* fue identificado como un hongo de la Clase Ascomycetes (Gibson *et al.* 1986). Durante ese periodo, se segregó a *Scutellospora* Walker & Sanders del género *Gigaspora*, con base en sus modos de germinación y en el arreglo de los estratos de la pared de las esporas: la formación de una estructura subcelular denominada escudo de germinación en *Scutellospora* y de una pared germinal en *Gigaspora* (Walker y Sanders 1986). Más tarde, se separó completamente a las especies de *Endogone* de las de los hongos formadores de micorriza arbuscular; *Endogone* se conservó en Endogonales, mientras que los HMA se segregaron en un orden nuevo, Glomales. Éste incluyó a dos subórdenes, Gigasporineae, familias, Acaulosporaceae, géneros *Acaulospora* y *Entrophospora* y Gigasporaceae, géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*, y Glomineae, Familia Glomaceae, géneros *Glomus* y *Sclerocystis* (Fig. 1) (Morton y Benny 1990). Casi una década después se segregó a los HMA de los Zygomycetes como clase Glomomycetes, Phylum Archemycota (Cavalier-Smith 1998). Más tarde, un estudio filogenético donde se analizaron los datos de la subunidad 18S del rDNA, separó a los HMA de Zygomycota como Phylum Glomeromycota (Fig. 2), definiéndose los órdenes, Archaeosporales, Paraglomerales, Diversisporales y Glomerales, con nueve familias, una de ellas monoespecífica y basada en *Geosiphon pyriformis* (Kütz.) F. Wettst., un hongo no formador de micorriza arbuscular (Fig. 3) (Schüßler *et al.* 2001) incluido hasta entonces en

Ascomycota (Cavalier-Smith 1998). El mismo Phylum y órdenes se conservaron al integrar datos morfológicos y moleculares en un análisis filogenético ulterior, aumentándose no obstante el número de familias a 13 y el de géneros a 25 (Fig. 4) (Redecker *et al.* 2013). En una de las propuestas más recientes de clasificación, para hongos cigomicetófilos, Spatafora *et al.* (2016), a partir del análisis filogenético a escala genómica, de 192 proteínas ortólogas, propusieron el cambio de Phylum Glomeromycota al Subphylum Glomeromycotina, Phylum Mucoromycotina (Fig. 5).

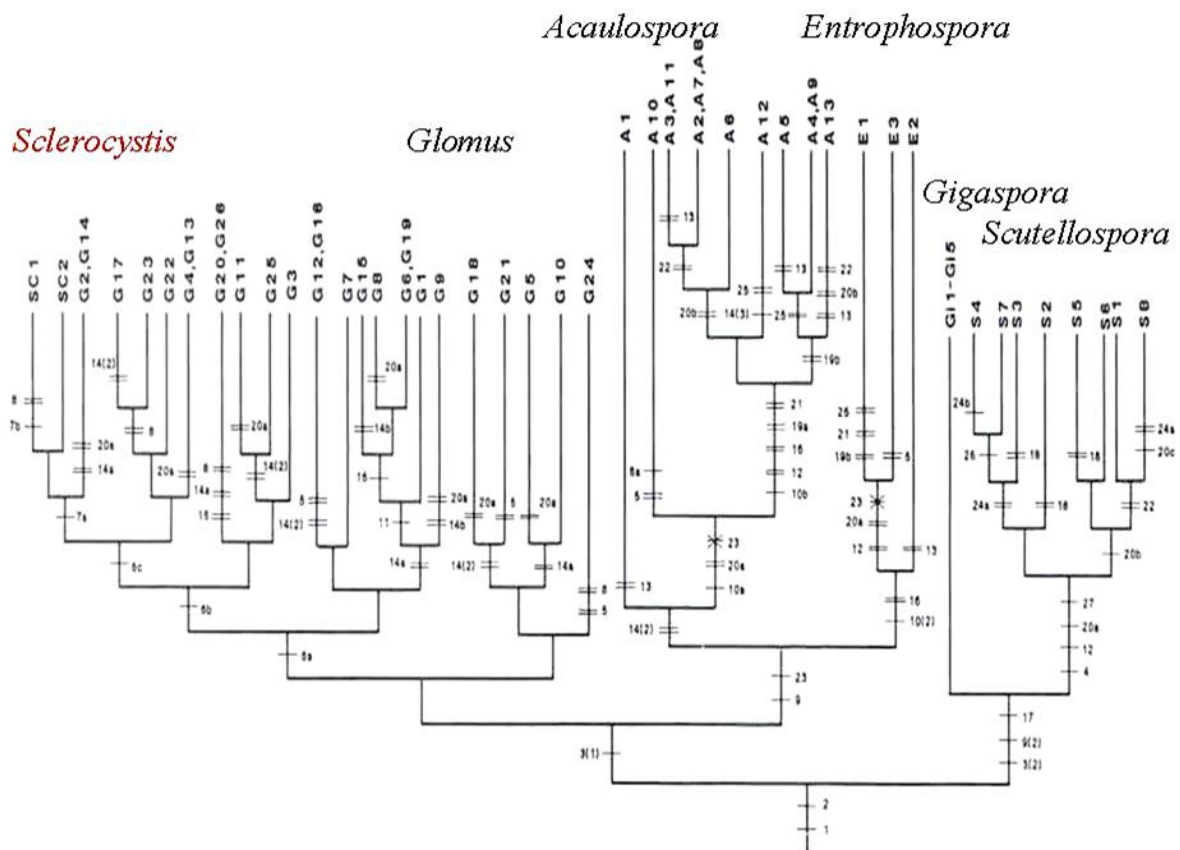


Figura 1. Relaciones filogenéticas propuestas para géneros de hongos micorrízicos arbusculares por Morton y Benny (1990).

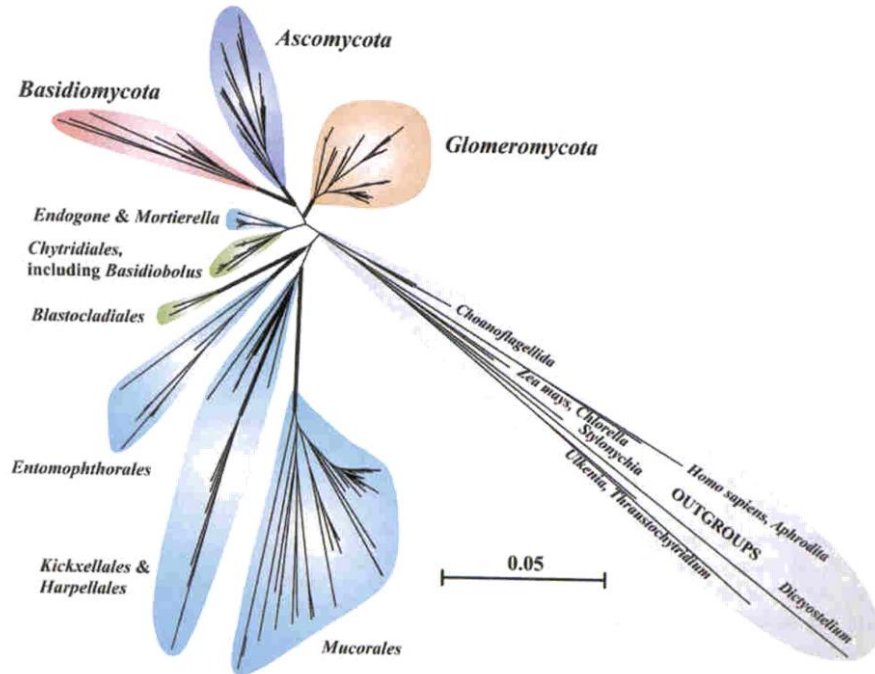


Figura 2. Relaciones filogenéticas propuestas para el Phylum Glomeromycota (HMA + *Geosiphon pyriforme*) por Schüßler *et al.* (2001).

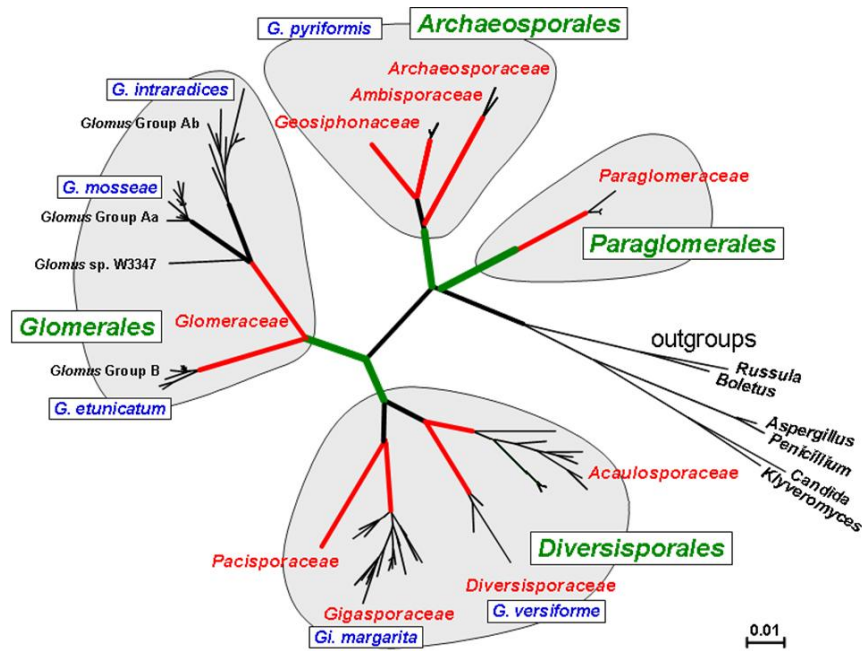


Figura 3. Relaciones filogenéticas de órdenes y familias propuestos dentro del Phylum Glomeromycota por Schüßler *et al.* (2001).

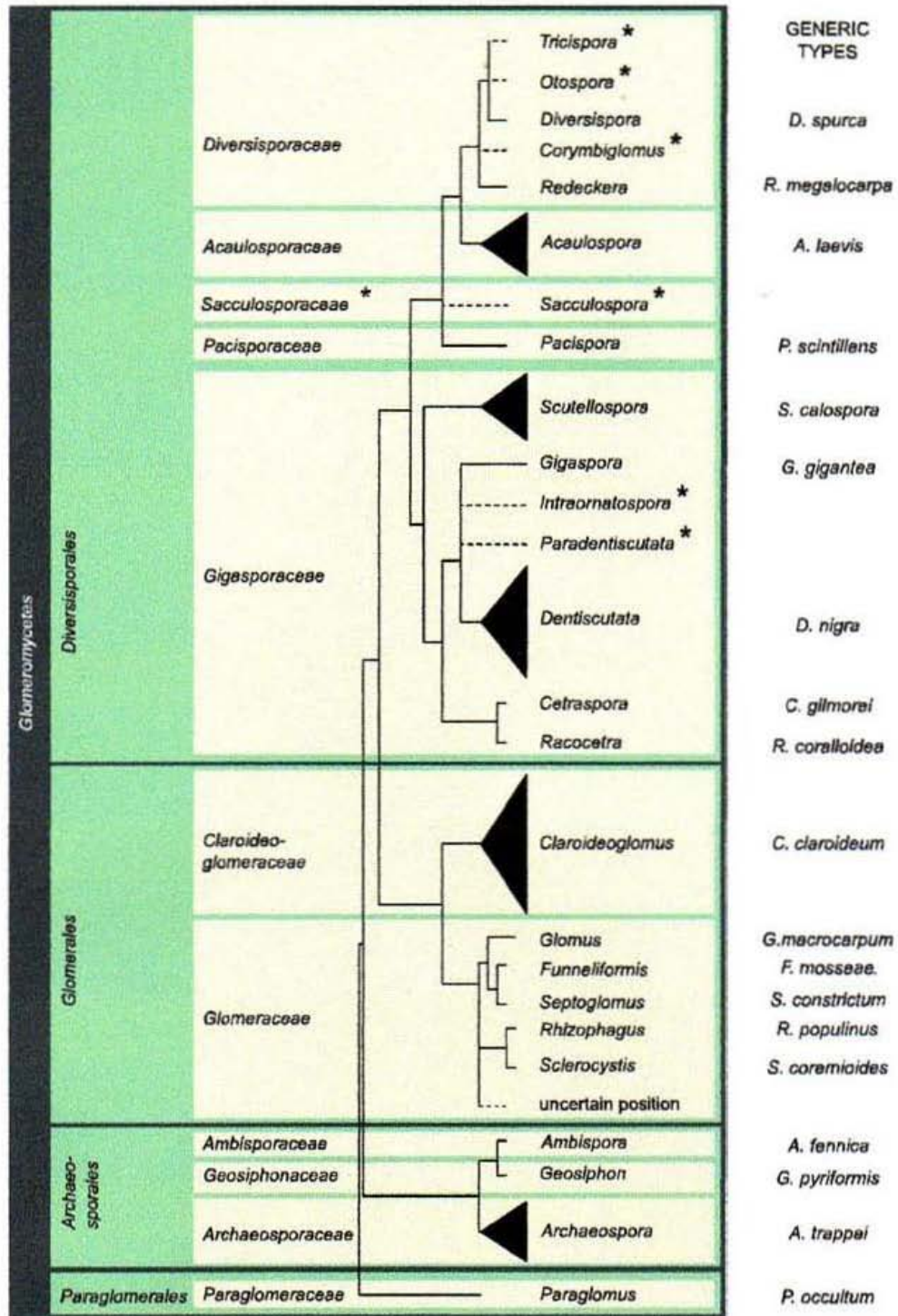


Figura 4. Relaciones filogenéticas dentro del Phylum Glomeromycota propuestas por Redecker *et al.* (2013). Los asteriscos representan familias y géneros cuya validez y relaciones se consideraron inciertas.

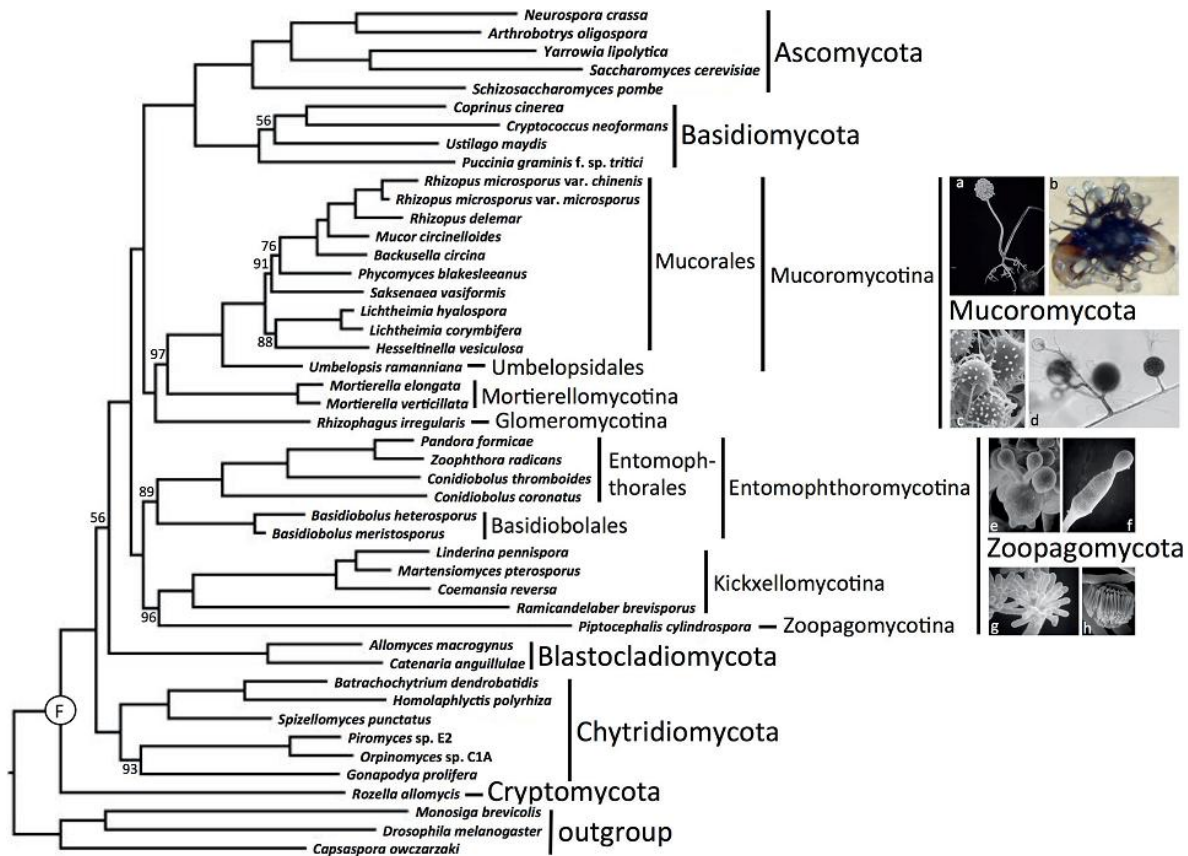


Figura 5. Relaciones filogenéticas de hongos cigomicetófilos en la que se propone el Subphylum Glomeromycotina por Spatafora *et al.* (2016).

Lo anterior muestra diferentes situaciones, la primera es que los hongos que forman micorriza arbuscular + *Geoshipon pyriforme* constituyen un grupo coherente que se mantiene bajo distintas aproximaciones de estudio; la segunda es que la posición filogenética de tal grupo (HMA + *G. pyriforme*) con respecto al resto de los hongos está mejor definida; y la tercera y más notoria es que el número de taxa en las diferentes jerarquías taxonómicas dentro de Glomeromycotina ha cambiado acelerada y drásticamente en las últimas dos décadas, y sigue haciéndolo, no sólo por el descubrimiento y descripción de taxa nuevos, sino porque continuamente se proponen segregaciones o integraciones entre familias, géneros y especies, así como cambios en las relaciones filogenéticas dentro del grupo.

En Glomeromycotina se reconocen cerca de 300 especies a nivel mundial (Schüßler 2013), año con año se describen especies nuevas de todo el mundo y existen fuertes sospechas de la existencia de especies crípticas. Tan sólo cuatro de ellas se describieron con especímenes procedentes de México (Varela y Trejo 2001). A nivel de especie, la clasificación de estos hongos se ha basado por completo en criterios morfológicos de las esporas: color, forma, tamaño, agregación (Morton 1988) y de sus características subcelulares: estratos o capas de la pared (arreglo, tipo, número, posición, ornamentación y reacción con el Reactivo del Melzer) (Rosendahl *et al.* 1994). Otras herramientas empleadas para reconocer especies o grupos de éstas son la ultraestructura de la pared de las esporas (Maia y Kimbrough 1993, Maia *et al.* 1994) y diferentes biomoléculas: ácidos grasos, secuencias de nucleótidos de regiones génicas particulares (Sen y Hepper 1986, Bentivenga y Morton 1996, Sancholle y Dalpe 1993, Walker *et al.* 2007, Blaszkowski *et al.* 2015) y aunque poco explorados y utilizados, los detalles de los procesos de germinación y de formación de esporas (Franke y Morton 1994, Giovanetti y Gianinazzi-Pearson 1994, Morton 1993, 1995, Trejo *et al.* 2015).

ONTOGENIA DE LAS ESPORAS

Los procesos ontogenéticos sugieren una jerarquía taxonómica y evolutiva (Gould 1977, Kluge y Strauss 1985, Kohn 1992). El valor filogenético y taxonómico de este tipo de estudios con HMA no se reconoció sino a partir de la década de 1990 (Morton 1990a,b, 1993, 1995, Morton y Benny 1990, Walker 1992, Franke y Morton 1994, Giovanetti y Gianninazzi-Pearson 1994, Stürmer y Morton 1997, 1999, Declerck *et al.* 2000), no obstante, su naturaleza biotrófica ha sido y sigue siendo la gran limitante para cultivarlos y por ende, ha frenado el estudio de procesos como la formación de esporas, la germinación y el crecimiento hifal en la mayoría de los géneros. No es sorprendente que la mayoría de trabajos en los que se ha abordado este aspecto se hayan realizado en especies de *Glomus sensu lato*, que suelen responder de manera favorable a la propagación, obteniéndose a la fecha más de 30 especies en cultivo monoespecífico (Chabot *et al.* 1992, Meier y Charvat 1992, Wu y Sylvia 1993, Stürmer y Morton 1997, Declerck *et al.* 2000, INVAM 2018).

En los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora sensu lato*, datos ontogenéticos condujeron al establecimiento de patrones de divergencia filogenética (Morton 1990a,b,

1995, Bentivenga y Morton 1996); en *Acaulospora* y en *Entrophospora* permitieron relacionar y comparar especies (Wu *et al.* 1995), redefinir su identidad como géneros (Kaonongbua y Morton 2010) y proponer la posible cualidad dimórfica de *Acaulospora* (Taylor *et al.* 2013).

GERMINACIÓN

Varias especies de HMA han germinado en medios sintéticos, pero, como sucede con los estudios de ontogenia, la mayoría pertenecen a *Glomus sensu lato* (Giovanetti 2000). En éste, la hifa de germinación emerge directamente a través de los estratos o aprovecha el sitio donde se ubica la hifa de origen, mecanismos ligados a grupos de especies con un significado evolutivo que define la divergencia de al menos dos linajes (Schüßler *et al.* 2001), reconocidos ahora como dos familias, Claroideoglomeraceae y Glomeraceae (Redecker *et al.* 2013). Dilucidar la forma de germinación permitió discriminar géneros de la Familia Gigasporaceae; *Gigaspora*, donde la hifa de germinación se produce a partir de un estrato interno con numerosas papilas (Maia *et al.* 1994) y un grupo de géneros donde la germinación se produce desde una estructura subcelular especializada, el escudo de germinación (Walker y Sanders 1986, Redecker *et al.* 2013).

El conocimiento acerca de los procesos y cambios morfológicos que tienen lugar durante la germinación en *Acaulospora* y *Entrophospora*, aunque limitado, condujo a inferencias acerca de las relaciones filogenéticas entre algunas de sus especies (Morton 1990a) y con respecto a otros taxa del grupo, como *Scutellospora sensu lato* (Morton 1990a,b, Redecker *et al.* 2013) y *Pacispora* (Oehl y Sieverding 2004). Fósiles de hace 400 millones de años (Dotzler *et al.* 2006, 2009) muestran estructuras completamente similares en morfología a las estructuras de germinación de HMA, lo que ha llevado a proponer que aparecieron muy temprano durante la evolución de Glomeromycotina y que representan una ventaja adaptativa para estos hongos.

EL GÉNERO *ACAULOSPORA*

SISTEMÁTICA Y TAXONOMÍA

Acaulospora Gerd. & Trappe emend. Kaonongbua, J.B. Morton & Bever

Basionym: *Acaulospora* Gerd. & Trappe, Mycol. Mem. 5:31. 1974.

Sinónimo: *Kuklospora* Oehl & Sieverd., J. Applied Bot. Food Quality 80:74. 2006.

Especie tipo: *Acaulospora laevis* Gerd. & Trappe, Mycol. Mem. 5:33. 1974.

Etimología: Del griego *A-*: sin o carente de; y del latín *caulos-*: apéndice o cola y *spora*: propágulo (Stearn, 1992).

A partir del surgimiento del género en el año 1974, los caracteres diagnósticos han aumentado o cambiado debido a la incorporación de descubrimientos nuevos. A continuación y con el propósito de mostrar de manera puntual y literal dichos cambios y adiciones de información, se proporcionan las descripciones más completas y que por ello se consideran con mayor significado taxonómico.

La primera es la diagnosis original del género, efectuada por Gerdemann y Trappe (1974): "Azigosporas producidas individualmente en el suelo, grandes, generalmente globosas o subglobosas, con contenidos aceitosos, nacen lateralmente en el estípite de una vesícula grande, terminal y de pared delgada. Vesícula de aproximadamente el mismo tamaño que la espora, con sus contenidos transferidos a la espora en su madurez. Paredes de la espora continuas excepto por un pequeño poro ocluido. Tubos germinales producidos directamente a través de las paredes cerca de la base de la espora. Forma endomicorrizas con vesículas lobuladas y arbusculos".

La segunda corresponde a la de INVAM (INVAM 2018), que es la colección donde se mantiene el mayor número de especies del género: "Esporas producidas individualmente en el suelo o en esporocarpos que pueden alcanzar varios centímetros de tamaño; esporas globosas, subglobosas, elipsoides o ampliamente fusiformes, con contenidos aceitosos; las esporas nacen lateralmente o intercaladamente sobre la hifa de sostén que termina en un sáculo esporógeno de pared relativamente delgada. El sáculo esporógeno puede tener hasta el doble de tamaño de las esporas y su contenido se transfiere a la espora en desarrollo.

Espora integrada esencialmente por dos paredes distintas y separables fácilmente una de la otra; al menos parte de la pared externa es continua con la pared de la hifa de sostén y puede ser pigmentada, laminada o compuesta de estratos distintos y ornamentados de varias formas; la pared interna está compuesta de uno o más estratos que usualmente son membranosos, hialinos y pueden ser laminados y ornamentados. El pedicelo de sostén de la espora está ocluido por parte del grupo más externo de estratos de la espora".

La tercera y última pertenece a Taylor *et al.* (2013), quienes sumaron a sus descubrimientos los criterios de Kaonongbua *et al.* (2010) para la enmendación del género: "Un sáculo esporífero se forma antes de la formación de las esporas, típicamente con una pared delgada relacionada con la de la espora. El sáculo puede formarse terminal o intercaladamente cerca de una punta hifal. Esporas formadas individualmente en el suelo en su mayoría y más raramente en las raíces o en esporocarpos. Las esporas se forman a un costado o dentro de la hifa de sostén del sáculo esporífero. Una única cicatriz se forma en las esporas que se producen lateralmente al cuello del sáculo y dos cicatrices indican un desarrollo intercalar dentro de la hifa de sostén del sáculo esporífero. Esporas globosas, subglobosas, elipsoides o ampliamente fusiformes, típicamente consisten de una pared de la espora con dos a tres capas y al menos una pared germinal bicapa sintetizada independientemente dentro de la espora (y consecutivamente en el caso de especies con dos paredes germinales). La capa más externa de la pared de la espora es continua con la pared del sáculo e hifa de sostén, mientras que las otras capas se sintetizan *de novo* por lo que se forman independientemente de los componentes del sáculo e hifa de sostén. La pared de la espora va de hialina a café o incluso negro, con una superficie que puede ser lisa o profusamente ornamentada. Las capas de la pared germinal próximas a la pared de la espora cuando están presentes son delgadas (<2 μm) y frecuentemente están fuertemente adheridas por lo que son difíciles de separar. Ninguna de estas capas reacciona con Melzer en las especies descritas hasta la fecha. La capa más externa de la pared germinal más interna típicamente está cubierta por finas excrecencias granulares (o almohadillas), mientras que la capa más interna reacciona con Melzer en colores rosa claro, café rojizo claro u oscuro, púrpura rojizo oscuro o no reacciona en absoluto, dependiendo de la especie. Una "orbe" de germinación (término con el cual Morton y Benny en 1990 llamarán

a la estructura de germinación) se forma entre las dos paredes germinales o entre la pared germinal y la pared de la espora cuando está presente sólo una pared germinal".

Originalmente descrito con dos especies, *A. laevis* Gerd. & Trappe y *A. elegans* Trappe & Gerd., disgregadas de *Endogone* en 1974 (Gerdemann y Trappe 1974), el número actual de especies es 58 (56 registradas en www.indexfungorum.org y dos descritas recientemente por Crossay *et al.* 2018). En el cuadro 1 se indican las especies listadas en <http://www.amf-phylogeny.com/> (Schüßler 2013) con las notas taxonómicas correspondientes. Esta página electrónica ofrece información académica actualizada sobre sistemática y taxonomía de glomeromicetos, razón por la que se incluye aquí. Las diez especies que no están incluidas en dicha lista son *A. terricola* Swarupa, Kunwar & Manohar (Rani *et al.* 2003), *A. soloidea* Vaing. & B.F. Rodrigues (Vaingankar y Rodrigues 2011), *A. verna* Błaszcz. (Błaszczowski 2012), *A. endographis* B.T. Goto (Goto *et al.* 2013), *A. herrerae* E. Furrázola, B.T. Goto, G.A. Silva, Sieverd. & Oehl (Furrázola *et al.* 2013), *A. reducta* Oehl, B.T. Goto & C.M.R. Pereira (Pereira *et al.* 2015), *A. papillosa* C.M.R. Pereira & Oehl (Pereira *et al.* 2016), *A. spinulifera* Oehl, V.M. Santos, J.S. Pontes & G.A. Silva (Souza de Pontes *et al.* 2017), *A. fragilissima* D. Redecker, Crossay & Cilia y *A. saccata* D. Redecker, Crossay & Cilia (Crossay *et al.* 2018). Veintisiete de las 58 especies del género, es decir, 46.5% de las conocidas han sido registradas de diferentes ambientes en México (Varela *et al.* aceptado), no obstante esta riqueza de especies, sólo tres, *Acaulospora scrobiculata* (Trappe 1977), *A. spinosa* (Walker y Trappe 1981) y *A. foveata* (Janos y Trappe 1982) se describieron con base en ejemplares mexicanos. En los cuadros 2A y 2B se muestran las especies de *Acaulospora* que se han reportado de las ecorregiones terrestres nivel I y nivel II que existen en México; en la figura 6 se señala la distribución del género en el país.

Cuadro 1. Especies de *Acaulospora* listadas en la página web "Arbuscular Mycorrhizal Fungi Phylogeny"; en la columna a la derecha se incluyen los basionimos, sinónimos y notas taxonómicas que aparecen en la misma (<http://www.amf-phylogeny.com/>). Las especies que se han encontrado en México se indican con un asterisco.

Especie	Basionimos, sinónimos y notas taxonómicas
<p>*<i>Acaulospora alpina</i> Oehl, Sýkorova & Sieverd.</p> <p><i>Acaulospora baetica</i> Palenz., Oehl, Azcón-Aguilar & G.A. Silva</p> <p><i>Acaulospora brasiliensis</i> (B.T. Goto, L.C. Maia & Oehl) C. Walker, M. Krüger & A. Schüßler</p>	<p>Evidencias morfológicas y moleculares basadas en materiales de campo</p> <p>Basionimo: <i>Ambispora brasiliensis</i> B.T. Goto, L.C. Maia & Oehl</p>
<p>*<i>Acaulospora cavernata</i> Blaszk.</p>	<p>Un cultivo, originalmente considerado como <i>Acaulospora scrobiculata</i> se estableció a partir de cinco esporas del Reino Unido y se registró como BEG 33. Todas las esporas parecían tener una ornamentación similar a la de <i>A. scrobiculata</i>, pero las esporas producidas ahora son predominantemente similares a las del tipo de <i>A. cavernata</i>. Debido a que el material tipo de <i>A. cavernata</i> no es adecuado para un análisis molecular la cepa BEG 33 se designó como un epitipo de la especie.</p>
<p><i>Acaulospora colliculosa</i> Kaonongbua, J.B. Morton & Bever</p>	<p>El análisis molecular está basado en especímenes autenticados tomados de campo. Cercanamente relacionada y similar en morfología esporal a <i>A. brasiliensis</i></p>
<p>*<i>Acaulospora colombiana</i> (Spain & N.C. Schenck) Kaonongbua, J.B. Morton & Bever</p>	<p>Basionimo: <i>Entrophospora colombiana</i> Spain & N.C. Schenck</p> <p>Sinónimo: <i>Kuklospora colombiana</i> Oehl & Sieverd.</p>
<p>*<i>Acaulospora delicata</i> C. Walker, C.M. Pfeiff. & Bloss</p> <p>*<i>Acaulospora dilatata</i> J.B. Morton</p> <p><i>Acaulospora entreriana</i> M.S. Velázquez & Cabello</p> <p>*<i>Acaulospora foveata</i> Trappe & Janos</p>	<p>La evidencia molecular se obtuvo de los cultivos CR315 y CR401A de INVAM. La descripción de la especie no ilustra la cantidad total de variación en la ornamentación del material tipo. La ornamentación ilustrada a partir del cultivo BR861 en el sitio web de INVAM no es enteramente consistente con la del material tipo de la especie. Al parecer la ornamentación es bastante variable.</p>
<p><i>Acaulospora ignota</i> Blaszk., Góralaska, Chwat. & Goto</p> <p>*<i>Acaulospora kentinensis</i> (C.G. Wu & Y.S. Liu) Kaonongbua, J.B. Morton & Bever</p>	<p>Basionimo: <i>Entrophospora kentinensis</i> C.G. Wu & Y.S. Liu</p> <p>Sinónimo: <i>Kuklospora kentinensis</i> Oehl & Sieverd.</p>
<p>*<i>Acaulospora koskei</i> Blaszk.</p> <p>*<i>Acaulospora lacunosa</i> J.B. Morton</p> <p>*<i>Acaulospora laevis</i> Gerd. & Trappe</p> <p>*<i>Acaulospora longula</i> Spain & N.C. Schenck</p> <p>*<i>Acaulospora mellea</i> Spain & N.C. Schenck</p> <p><i>Acaulospora minuta</i> Oehl, Tchabi, Hountondji, Palenz., I.C. Sánchez & G.A. Silva</p> <p>*<i>Acaulospora morrowiae</i> Spain & N.C. Schenck</p>	

<p><i>Acaulospora nivalis</i> Oehl, Palenz., I.C. Sánchez, G.A. Silva & Sieverd. *<i>Acaulospora paulinae</i> Blaszk.</p> <p><i>Acaulospora punctata</i> Oehl, Palenz., I.C. Sánchez, G.A. Silva, C. Castillo & Sieverd. <i>Acaulospora pustulata</i> Palenz., Oehl, Azcón-Aguilar & G.A. Silva *<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe <i>Acaulospora sieverdingii</i> Oehl, Sýkorová & Blaszk. *<i>Acaulospora spinosa</i> C. Walker & Trappe <i>Acaulospora spinosissima</i> Oehl., Palenz., I.C. Sánchez, Tchabi, Hount & G.A. Silva <i>Acaulospora tortuosa</i> Palenz., Oehl, Azcón-Aguilar & G.A. Silva <i>Acaulospora tuberculata</i> Janos & Trappe <i>Acaulospora viridis</i> Palenz., Oehl, Azcón-Aguilar & G.A. Silva *<i>Acaulospora bireticulata</i> F.M. Rothwel & Trappe</p> <p>*<i>Acaulospora capsicula</i> Blaszk.</p> <p>*<i>Acaulospora colossica</i> P.A. Schultz, Bever & J.B. Morton *<i>Acaulospora denticulata</i> Sieverd. & S. Toro *<i>Acaulospora elegans</i> Trappe & Gerd. *<i>Acaulospora excavata</i> Ingleby & C. Walker</p> <p><i>Acaulospora gedanensis</i> Blaszk. *<i>Acaulospora myriocarpa</i> Spain, Sieverd. & N.C. Schenck *<i>Acaulospora nicolsonii</i> C. Walker, L.E. Reed & F.E. Sanders</p> <p><i>Acaulospora polonica</i> Blaszk. *<i>Acaulospora rehmi</i> Sieverd. & S. Toro <i>Acaulospora rugosa</i> J.B. Morton *<i>Acaulospora splendida</i> Sieverd., Chaverri & I. Rojas</p> <p>*<i>Acaulospora sporocarpia</i> S.M. Berch</p>	<p>Compárese con <i>Acaulospora undulata</i>. Las descripciones de <i>A. paulinae</i> y <i>A. undulata</i> son muy similares. Una de las diferencias consideradas importantes para separar a ambas especies es que <i>A. undulata</i> no reacciona con Reactivo de Melzer. Sin embargo, esta reacción en los miembros de <i>Acaulospora</i> varía con la condición de los especímenes; Kaonongbua <i>et al.</i> (2010) (ver <i>A. colliculosa</i>) indicaron que la reacción a este reactivo en cualquier caso puede no representar una señal filogenética.</p> <p>Probablemente sinónimo de <i>A. elegans</i>, la que parece ser <i>A. bireticulata</i> cuando se usa microscopia de interferencia de Nomarski. Muchas similitudes con <i>A. laevis</i>, pero descrita con reacción al Melzer. Similar a <i>A. laevis</i>, descrita sin reacción al Melzer.</p> <p>Compárese con <i>A. bireticulata</i>. La ornamentación está formada por grandes cavidades, lo que hace sospechar que puede pertenecer a <i>A. scrobiculata</i>.</p> <p>Probablemente pertenezca a <i>Ambispora</i>, pero se mantiene en <i>Acaulospora</i> hasta obtener evidencia molecular o de otro tipo.</p> <p>Produce esporas acaulosporoides, pero no parece compartir las otras características de los miembros del género. No hay datos moleculares disponibles, por lo que es mantenida en este género.</p>
---	---

<i>Acaulospora taiwania</i> H.T. Hu	Muy improbable que se trate de una especie de <i>Acaulospora</i> . La ilustración de la especie es de muy pobre calidad y es imposible no concluir que puede tratarse de un hongo que no parece <i>Acaulospora</i> . El material tipo se reporta como perdido.
<i>Acaulospora thomii</i> Blaszk.	Se dice fundamentalmente diferente de otras especies en el género, se cree es un posible miembro de <i>Archaeospora</i> . Una consideración al respecto es la carencia de reacción al Melzer, pero esto no se desconoce entre las especies ornamentadas y pequeñas en <i>Acaulospora</i> .
<i>Acaulospora walkeri</i> Kramad. & Hedger	Sólo se conoce de material de campo, esta especie es cercana en morfología a otras especies del género con esporas pequeñas, lisas y amarillas.

Cuadro 2A. Especies de *Acaulospora* registradas en las ecorregiones terrestres mexicanas nivel I y nivel II. Las ecorregiones corresponden a las citadas en www.biodiversidad.gob.mx; el número dentro del paréntesis indica la fuente bibliográfica.

Ecorregiones nivel I	Desiertos de América del norte	Elevaciones semiáridas meridionales		Sierras templadas		
Ecorregiones nivel II	Desiertos cálidos (5)	Pie de monte de la Sierra Madre Occidental (1)	Altiplanicie mexicana (5,6,8)	Sistema Neovolcánico Transversal (4,5,9,7,10)	Sierra Madre del Sur (3,5)	Sierra Madre Centroamericana y Altos de Chiapas (2)
Especies	<i>A. delicata</i> <i>A. denticulata</i> <i>A. morrowiae</i> <i>A. sporocarpia</i>	<i>A. foveata</i>	<i>A. denticulata</i> <i>A. laevis</i> <i>A. spinosa</i>	<i>A. alpina</i> <i>A. bireticulata</i> <i>A. colombiana</i> <i>A. delicata</i> <i>A. denticulata</i> <i>A. foveata</i> <i>A. koskei</i> <i>A. lacunosa</i> <i>A. laevis</i> <i>A. mellea</i> <i>A. morrowiae</i> <i>A. rehmii</i> <i>A. scrobiculata</i> <i>A. spinosa</i> <i>A. splendida</i>	<i>A. colombiana</i> <i>A. denticulata</i> <i>A. morrowiae</i> <i>A. paulinae</i> <i>A. rehmii</i> <i>A. scrobiculata</i> <i>A. spinosa</i>	<i>A. bireticulata</i> <i>A. colombiana</i> <i>A. colossica</i> <i>A. delicata</i> <i>A. denticulata</i> <i>A. excavata</i> <i>A. foveata</i> <i>A. kentinensis</i> <i>A. lacunosa</i> <i>A. laevis</i> <i>A. mellea</i> <i>A. morrowiae</i> <i>A. rehmii</i> <i>A. scrobiculata</i> <i>A. spinosa</i>
Total	4	1	3	15	7	15

Fuentes bibliográficas: (1) Pimienta-Barrios *et al.* 2002, (2) Violi *et al.* 2008, (3) Carballar-Hernández *et al.* 2012, (4) González-Cortés *et al.* 2012, (5) Montaña *et al.* 2012, (6) Chimal-Sánchez *et al.* 2015, (7) Carballar-Hernández *et al.* 2017, (8) Monroy-Ata *et al.* 2017, (9) Sánchez-Lizárraga *et al.* 2017, (10) Varela *et al.* 2017.

Cuadro 2B. Especies de *Acaulospora* registradas de las ecorregiones terrestres mexicanas nivel I y nivel II Las ecorregiones corresponden a las citadas en www.biodiversidad.gob.mx; el número dentro del paréntesis indica la fuente bibliográfica.

Ecorregiones nivel I	Selvas cálido-secas				Selvas cálido-húmedas		
Ecorregiones nivel II	Planicie costera, lomeríos y cañones del occidente (2)	Planicie costera y lomeríos del Pacífico sur (2,5)	Depresiones intermontanas (15,16)	Planicie noroccidental de la Península de Yucatán (12,13)	Planicie costera y lomeríos húmedos del Golfo de México (1,2,3,4,6,7,9,10,11)	Planicie costera y lomeríos del Soconusco (17)	Sierra de Los Tuxtlas (1,8,14)
Especies	<i>A. delicata</i> <i>A. dilatata</i> <i>A. rehmii</i> <i>A. scrobiculata</i>	<i>A. delicata</i> <i>A. denticulata</i> <i>A. foveata</i> <i>A. laevis</i> <i>A. mellea</i> <i>A. morrowiae</i> <i>A. scrobiculata</i> <i>A. spinosa</i>	<i>A. alpina</i> <i>A. delicata</i> <i>A. denticulata</i> <i>A. excavata</i> <i>A. laevis</i> <i>A. mellea</i> <i>A. morrowiae</i> <i>A. rehmii</i> <i>A. scrobiculata</i> <i>A. spinosa</i>	<i>A. colombiana</i> <i>A. foveata</i> <i>A. kentinensis</i> <i>A. laevis</i> <i>A. morrowiae</i> <i>A. myriocarpa</i> <i>A. rehmii</i> <i>A. scrobiculata</i>	<i>A. bireticulata</i> <i>A. capsicula</i> <i>A. cavernata</i> <i>A. delicata</i> <i>A. dilatata</i> <i>A. elegans</i> <i>A. excavata</i> <i>A. foveata</i> <i>A. kentinensis</i> <i>A. laevis</i> <i>A. longula</i> <i>A. mellea</i> <i>A. morrowiae</i> <i>A. paulinae</i> <i>A. rehmii</i> <i>A. scrobiculata</i> <i>A. spinosa</i> <i>A. splendida</i>	<i>A. excavata</i> <i>A. foveata</i> <i>A. laevis</i> <i>A. rehmii</i> <i>A. scrobiculata</i> <i>A. spinosa</i>	<i>A. delicata</i> <i>A. denticulata</i> <i>A. excavata</i> <i>A. foveata</i> <i>A. mellea</i> <i>A. morrowiae</i> <i>A. rehmii</i> <i>A. scrobiculata</i> <i>A. spinosa</i>
Total	4	8	10	8	18	6	9

Fuentes bibliográficas: (1) Arias *et al.* 2011, (2) Montaña *et al.* 2012, (3) Pérez-Luna *et al.* 2012, (4) Osorio-Miranda *et al.* 2013, (5) Bautista-Cruz *et al.* 2014, (6) Lara-Pérez *et al.* 2014a, (7) Lara-Pérez *et al.* 2014b, (8) Rodríguez-Morelos *et al.* 2014, (9) Salgado *et al.* 2014, (10) Posada *et al.* 2016, (11) Álvarez-Sánchez *et al.* 2017, (12) Fabián *et al.* 2017, (13) Ramos-Zapata *et al.* 2017, (14) Retama-Ortíz *et al.* 2017, (15) Trinidad-Cruz *et al.* 2017, (16) Varela *et al.* 2017, (17) Bertolini *et al.* 2018.

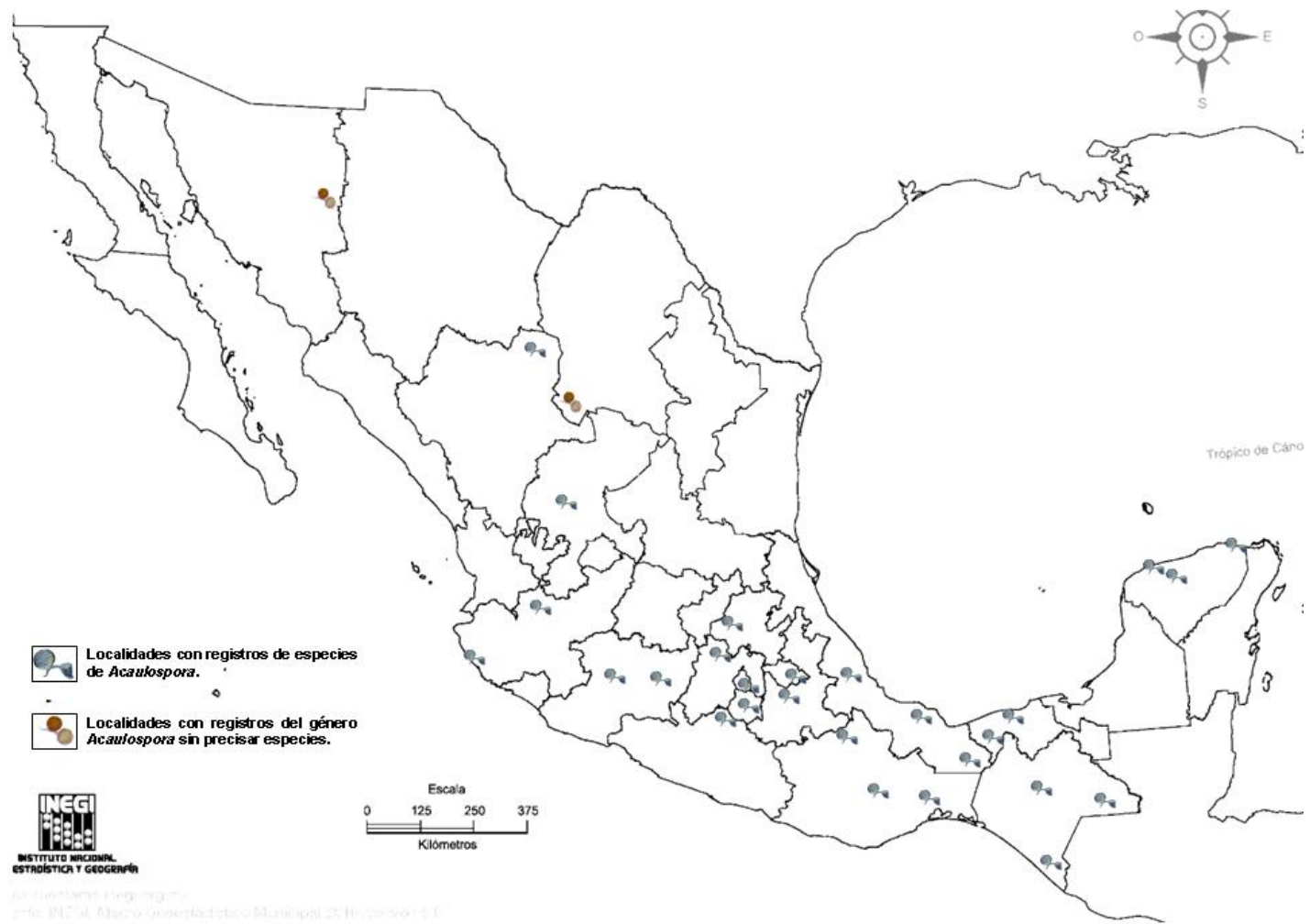


Figura 6. Distribución conocida de *Acaulospora* en México. La ubicación geográfica de cada localidad está basada en las referencias citadas en los cuadros 2A y 2B (●); los sitios en los que no se precisan especies (●) provienen de Ochoa-Meza *et al.* (2009) y Hernández-Zamudio *et al.* (2017) (mapa tomado de www.inegi.org.mx/).

PROPAGACIÓN

Si bien varias especies de *Acaulospora* descritas en los últimos años se obtuvieron en cultivo (Oehl *et al.* 2014, Palenzuela *et al.* 2015, Pereira *et al.* 2016), son solamente diecisiete las que se mantienen como cultivos monoespecíficos en las dos colecciones de glomeromicetos más importantes del mundo, INVAM en Estados Unidos (INVAM 2018) e IBG en Francia (IBEG 2016); en México, sólo dos especies forman parte de una colección registrada internacionalmente, la Colección de Microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CM-CNRG) (Arteaga-Garibay, Curador de la CM-CNRG, com. pers.) (Cuadro 3). En todos los casos los cultivos se mantienen bajo el sistema tradicional de cultivos-trampa en maceta.

Cuadro 3. Especies de *Acaulospora* mantenidas en cultivo en colecciones científicas. INVAM: International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Universidad de West Virginia, Estados Unidos; IBG: The International Bank of the Glomeromycota, INRA, Francia; CM-CNRG: Colección de Microorganismos-Centro Nacional de Recursos Genéticos, México.

Especie	Colección		
	INVAM	IBG	CM-CNRG
<i>A. cavernata</i>		+	
<i>A. colombiana</i>	+		
<i>A. delicata</i>	+		
<i>A. elegans</i>	+		
<i>A. foveata</i>	+		
<i>A. kentinensis</i>	+		
<i>A. koskei</i>	+		
<i>A. lacunosa</i>		+	
<i>A. laevis</i>		+	
<i>A. longula</i>		+	
<i>A. mellea</i>	+		
<i>A. morrowiae</i>	+		+
<i>A. paulinae</i>	+		
<i>A. scrobiculata</i>	+		
<i>A. spinosa</i>	+		+
<i>A. tuberculata</i>	+		
<i>Acaulospora</i> sp.	+		

ONTOGENIA Y GERMINACIÓN

En *Acaulospora* las esporas se forman a partir de un sáculo que crece y una vez que ha alcanzado su tamaño máximo, la espora surge lateralmente o en medio de la hifa; entonces,

el contenido del sáculo se transfiere gradualmente a la espora a medida que ésta madura (Kaonongbua *et al.* 2010). Cuando el sáculo se vacía, se colapsa y se desprende junto con los restos de la hifa, salvo en *A. splendida*, en la que es persistente (Sieverding *et al.* 1988). No obstante, en la actualidad se conocen dos especies, *A. fragilissima* y *A. saccata* en las que las esporas se forman a partir de hifas en las que no se producen sáculos, es decir, a partir de un proceso de formación de esporas de tipo glomoide (Crossay *et al.* 2018).

Aparentemente la única función del sáculo es de almacenamiento temporal de los nutrimentos que serán transferidos a la espora en formación. El análisis de los patrones de esporogénesis llevó a la reinterpretación de los caracteres morfológicos en el género y condujo a proponer algunas hipótesis de relación entre la Familia Acaulosporaceae y otros grupos de HMA (Stürmer y Morton 1999). Para *Acaulospora laevis* (Mosse 1970a,b, Stürmer y Morton 1999, Taylor *et al.* 2013), *A. kentinensis* (Wu *et al.* 1995), *A. scrobiculata* (Trappe 1977, Muthukumar *et al.* 2005), *A. sporocarpia* (Berch 1985), *A. rehmi* (Dalpé y Declerk 2002), *A. spinosa* (Hernández-Cuevas 1997, Stürmer y Morton 1999), *A. fragilissima* y *A. saccata* (Crossay *et al.* 2018) se han descrito detalles sobre la ontogenia de las esporas.

En un principio se consideró que las hifas de germinación en *Acaulospora* se generaban a través de los estratos, de manera similar a como lo hacen varias especies de *Glomus sensu lato*, sin embargo, hace algunas décadas se describió la existencia de "compartimientos" dentro de las esporas, de los que se originaban las hifas de germinación, que atravesaban los estratos externos de la pared esporal (Mosse 1970a,c). Estas estructuras se observaron nuevamente años más tarde (Morton 1990a,b, Morton y Benny 1990). No fue sino hasta el año 1992 que se hizo una descripción de la morfología de tales estructuras en *A. rehmi*, *A. scrobiculata*, *A. tuberculata* y *A. colombiana* (citada como *Entrophospora colombiana*) (Spain 1992). Más tarde se observó el mismo tipo de estructura en *A. dilatata* Morton, pero se interpretó como "formada por un enrollamiento hifal" dentro de las esporas (Blaszkowski 1994). Un poco después se describió la morfología de las estructuras de germinación en *A. bireticulata*, *A. laevis* y *A. spinosa* (Hernández-Cuevas 1997). La evidente escasez de conocimiento que existe acerca de los procesos de esporogénesis, de germinación y de la morfología detallada de las esporas en el género, condujeron al planteamiento de este trabajo y la definición de sus objetivos.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento morfológico-descriptivo de la esporogénesis y de la germinación en especies de hongos micorrízicos arbusculares del género *Acaulospora*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Describir los cambios morfológicos que ocurren durante la ontogénesis de las esporas de algunas especies seleccionadas de *Acaulospora*: *A. bireticulata*, *A. laevis*, *A. longula*, *A. mellea*, *A. scrobiculata* y *A. spinosa*.
2. Describir el proceso de germinación y las estructuras producidas durante el mismo en las especies seleccionadas de *Acaulospora*.
3. Describir los caracteres morfológicos presentes en el género *Acaulospora* incluyendo aquellos que corresponden a la ontogenia de las esporas y a su germinación.

Los procedimientos y los resultados se presentan en formato de artículos, dos de ellos en idioma inglés. Los dos primeros versan sobre la ontogenia, de las esporas y de las estructuras de germinación. En el tercero se describen las estructuras y las hifas de germinación. Los rasgos morfológicos del género *Acaulospora* se sumarizan y describen en el último. Con el propósito de facilitar al lector la identificación de las estructuras mencionadas en los capítulos siguientes, éstas se muestran en la figura 7.

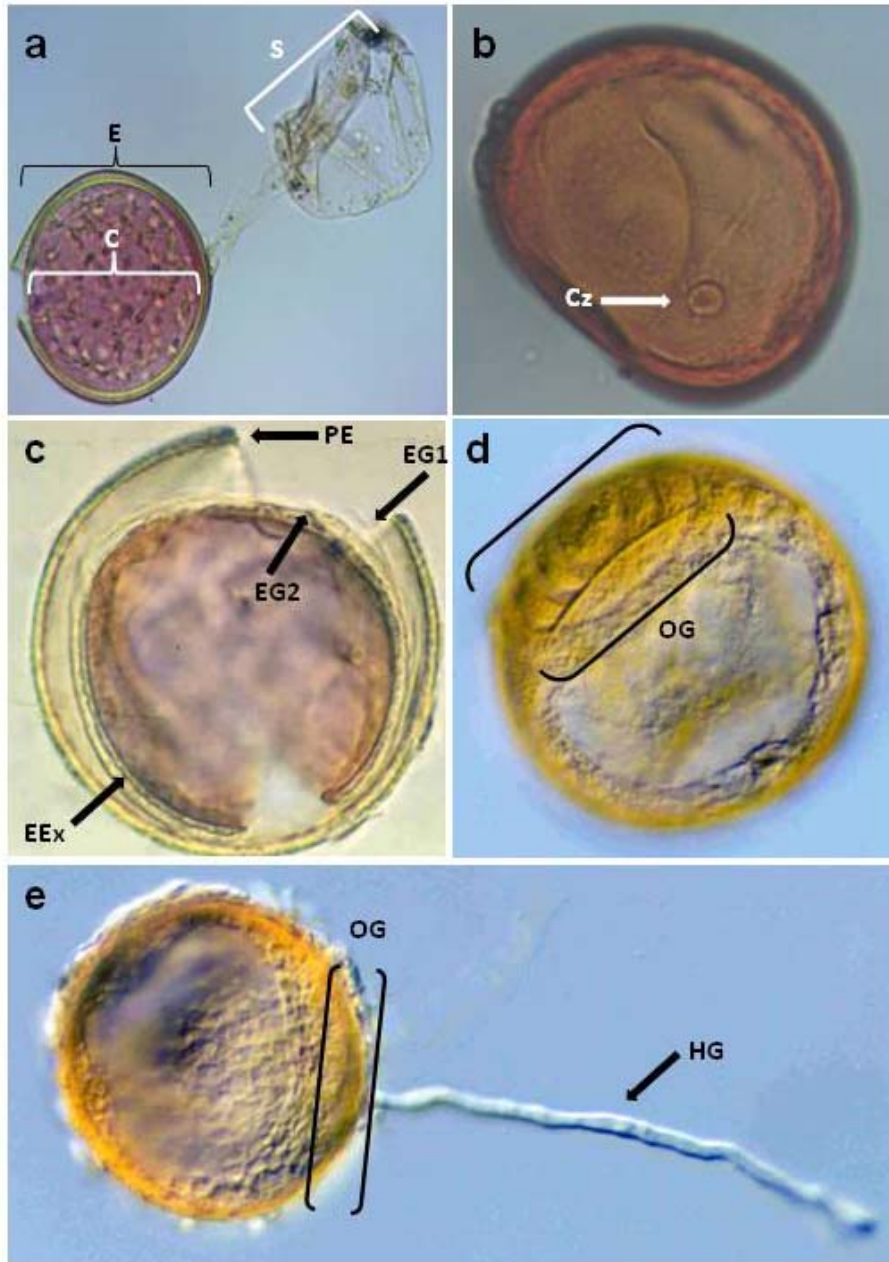


Figura 7. Estructuras en *Acaulospora*. a. Espora en proceso de maduración (E), citoplasma (C), sáculo esporífero (S). b. Cicatriz en la pared de la espora (Cz) dejada por el desprendimiento del sáculo esporífero. c. Espora madura mostrando la pared de la espora (PE, denotada como SW en los capítulos en inglés), los primeros estratos germinales, los más externos (EG1, denotados como GW1 en los capítulos en inglés), los estratos germinales más internos (EG2, denotados como GW2 en los capítulos en inglés) y el estrato ornamentado con excrescencias, el penúltimo de todos (EEx, denotado como "beaded" en los capítulos en inglés) (la espora se abrió aplicando presión ligera). d. Espora madura en la que se observa entre los corchetes un escudo de germinación (OG, denotado como germination shield en los capítulos en inglés). e. Espora germinada en la que se muestra entre corchetes la zona del escudo de germinación (OG) y una hifa de germinación (HG).

LITERATURA CITADA EN INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

- Álvarez-Sánchez J, Sánchez-Gallén I, Hernández-Cuevas L, Hernández-Oro L, Meli P. 2017. Diversidad, abundancia y variación estacional en la comunidad de hongos micorrizógenos arbusculares en la selva Lacandona, Chiapas, México. *Sci. Fung.* 45:37-51.
- Arias RM, Heredia-Abarca G, Sosa VJ, Fuentes-Ramírez LE. 2011. Diversity and abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores under different coffee production systems and in a tropical montane cloud forest patch in Veracruz, Mexico. *Agrof. Syst.* doi:10.1007/s10457-011-9414-3.
- Bautista-Cruz AA, Montaña NM, Camargo-Ricalde SL, Pacheco L. 2014. Hongos micorrizógenos arbusculares y nutrimentos del suelo asociados a cuatro especies de helechos en dos ecosistemas de Oaxaca, México. *Rev. Chapingo Serie Ciencias Forest. Amb.*:199- 212. doi:10.5154/r.rchscfa.2014.02.007
- Bentivenga SP, Morton JB. 1996. Congruence of fatty acid methyl ester profiles and morphological characters of arbuscular mycorrhizal fungi in Gigasporaceae. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93:5659-5662.
- Berch S. 1985. *Acaulospora sporocarpia*, a new, sporocarpic species, and emendation of the genus *Acaulospora* (Endogonaceae, Zygomycotina). *Mycotaxon* 23:409-418.
- Bertolini V, Montaña NM, Chimal-Sánchez E, Varela-Fregoso L, Gómez-Ruiz J, Martínez-Vázquez JM. 2018. Abundancia y riqueza de hongos micorrizógenos arbusculares en cafetales de Soconusco, Chiapas, México. *Rev. Biol. Trop.* 66(1):91-105.
- Blaszkowski J. 1994. Polish Glomales X. *Acaulospora dilatata* and *Scutellospora dipurpurascens*. *Mycorrhiza* 4:173-182.
- Blaszkowski J. 2012. The Glomeromycota. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków 1:7-297.
- Blaszkowski J, Chwat G, Gorálska A. 2015. *Acaulospora ignota* and *Claroideoglossum hanlinii*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) from Brazil and Cuba. *Mycol. Progress* 14:18. doi:10.1007/s11557-015-1042-2.
- Butler EJ. 1939. The occurrence and systematic position of the vesicular-arbuscular type of mycorrhizal fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 22:270-301.
- Carballar-Hernández S, Hernández-Cuevas LV, Montaña NM, Larsen J, Ferrera-Cerrato R, Taboada-Gaytan OR, Montiel-González AM, Alarcón A. 2017. Native communities of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Capsicum annum* L. respond to soil properties and agronomic management under field conditions. *Agric. Ecosyst. Environ.* 245:43-51.
- Carballar-Hernández S, Palma-Cruz FJ, Hernández-Cuevas LV, Robles-Pérez C. 2013. Arbuscular mycorrhizal potential and mycorrhizal fungi diversity dynamics under *Agave potatorum* Zucc. in Oaxaca, Mexico. *Ecol. Res.* doi:10.1007/s11284-012-1008-7.
- Cavalier-Smith T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rec.* 73:203-266.
- Chabot S, Bécard G, Piché Y. 1992. Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia* 84(3):315-321.
- Chimal-Sánchez E, García-Sánchez R, Hernández-Cuevas LV. 2015. Gran riqueza de hongos micorrizógenos arbusculares en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México. *Rev. Mex. Micol.* 41: 15-26.

- Crossay T, Cilia A, Cavaloc Y, Amir H, Redecker D. 2018. Four new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) associated with endemic plants from ultramafic soils of New Caledonia. *Mycol. Prog.* doi:10.1007/s11557-018-1386-5.
- Dalpé Y, Declerck S. 2002. Development of *Acaulospora rehmi* spore and hyphal swellings under root-organ culture. *Mycologia* 94:850-855.
- Declerck S, Cranenbrouck S, Dalpé Y, Séguin S, Grandmougin-Ferjani A, Fontaine J, Sancholle M. 2000. *Glomus proliferum* sp. nov.: A description based on morphological, biochemical, molecular and monoxenic cultivation data. *Mycologia* 92(6):1178-1187.
- Dotzler N, Krings M, Taylor TN, Agerer R. 2006. Germination shields in *Scutellospora* (Glomeromycota, Diversisporales, Gigasporaceae) from the 400 million-year-old Rhynie chert. *Mycol. Prog.* 5:178-184.
- Dotzler N, Walker C, Krings M, Hass H, Kerp H, Taylor TN, Agerer R. 2009. Acaulosporoid glomeromycotan spores with a germination shield from the 400-million-years-old Rhynie chert. *Mycol. Prog.* 8:9-18.
- Fabián D, Guadarrama P, Hernández-Cuevas L, Ramos-Zapata JA. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi in a coastal wetland in Yucatan, Mexico. *Bot. Sci.* 96(1):1-11.
- Franke M, Morton JB. 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.
- Furrazola E, Goto BT, Silva GA, Torres-Arias Y, Morais T, Pereira CE, Almeida FAC, Maia LC, Sieverding E, Oehl F. 2013. *Acaulospora herrerae*, a new pitted species in the Glomeromycetes from Cuba and Brazil. *Nova Hedw.* 97(3-4):401-413.
- Gazey C, Abbott LK, Robson AD. 1993. VA mycorrhizal spores from three species of *Acaulospora*: Germination, longevity and hyphal growth. *Mycol. Res.* 97(7):785-790.
- Gerdemann JH, Trappe JM. 1974. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycol. Memoir* 5: 1-76.
- Gibson JL, Kimbrough JK, Benny GL. 1986. Ultrastructural observations on Endogonaceae (Zygomycetes). II. *Glaziellales* ord. nov. and *Glaziella aurantiaca*. *Mycologia* 78:941-954.
- Giovanetti ML. 2000. Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. En: Kapulnik Y, Douds DD Jr. (Eds.). *Arbuscular mycorrhizas: Structure and function*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 47-68.
- Giovanetti ML, Gianinazzi-Pearson V. 1994. Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 98(7):705-715.
- González-Cortés JC, Vega-Fraga M, Varela-Fregoso L, Martíñez-Trujillo M, Carreón-Abud Y, Gavito ME. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities and land use change: the conversion of temperate forest to avocado plantations and maize fields in Central Mexico. *Fungal Ecol.* 5:16-23.
- Goto BT, Pereira CMR, Nobre CP, Zatorre NP, Covacevich F, Berbara RLL, Maia LC. 2013. *Acaulospora endographis* (Glomeromycetes), a new fungus with a complex spore wall. *Mycotaxon* 123:403-408.
- Gould SJ. 1977. *Ontogeny and phylogeny*. Belknap Press. Cambridge.
- Hawksworth DL, Lücking R. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiological Spectrum* 5(4). doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.

- Hernández-Cuevas LV. 1997. Cambios morfológicos involucrados en la germinación y desarrollo de las esporas de algunas especies de *Acaulospora*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México DF.
- Hernández-Zamudio G, Sáenz-Mata J, Moreno-Reséndez A, Castañeda-Gaytán G, Ogaz A, Carballar-Hernández S, Hernández-Cuevas L. 2017. Dinámica de la diversidad temporal de los hongos micorrícicos arbusculares de *Larrea tridentata* (Sesse & Mocino ex DC) Coville en un ecosistema semiárido. *Rev. Arg. Microbiol.* doi.org/10.1016/j.ram.2017.07.007.
- IBEG. 2016. <http://i-beg.eu>. Consultada en abril de 2018.
- INVAM. 2018. <https://invam.wvu.edu>. Consultada en abril de 2018.
- Janos DP, Trappe J. 1982. Two new *Acaulospora* species from tropical America. *Mycotaxon* 15:515-522.
- Johnson NC. 2010. Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytol.* 185:631-647.
- Johnson NC, Hoeksema JD, Bever JD, Chaudhary VB, Gehring C, Klironomos J, Koide R, Miller RM, Moore J, Moutoglis P, Schwartz M, Simard S, Swenson W, Umbanhowar J, Wilson G, Zabinski C. 2006. From Lilliput to Brobdingnag: Extending models of mycorrhizal function across scales. *BioScience* 56(11):889-900.
- Kaonongbua W, Morton JB, Bever JP. 2010. Taxonomic revision transferring species in *Kuklospora* to *Acaulospora* (Glomeromycota) and a description of *Acaulospora colliculosa* sp. nov. from field collected spores. *Mycologia* 102(6):1497-1509.
- Kluge AJ, Strauss RE. 1985. Ontogeny and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16:247-268.
- Kohn LM. 1992. Developing new characters for fungal systematics: An experimental approach for determining the rank resolution. *Mycologia* 84:139-153.
- Lara-Pérez L, Noa-Carranza JC, Hernández-González S, Alarcón-Gutiérrez E, Sánchez-Velasquez LR, Zulueta-Rodríguez R, Lara-Capistrán L, Andrade-Torres A. 2014b. Diversity and colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in the tree fern *Alsophila firma* in rainy and dry season. *Symbiosis* 62: 143-150.
- Lara-Pérez LA, Noa-Carranza JC, Landa LAJ, Hernández-González S, Oros-Ortega I, Andrade TA. 2014a. Colonización y estructura de la comunidad de hongos micorrízicos arbusculares en *Alsophila firma* (Cyatheaceae) en bosque mesófilo de montaña en Veracruz, México. *Rev. Biol. Trop.* 62(4): 1609-1623.
- Leake JR, Read DJ. 2017. Mycorrhizal symbiosis and pedogenesis throughout Earth's history. En: Collins JN, Gehring C, Jansa J (Eds.). *Mycorrhizal mediation of soil. Fertility, structure and carbon storage.* Elsevier. Amsterdam: 9-33. doi.org/10.1016/B978-0-12-804312-7.00002-4.
- Maia LC, Kimbrough JW. 1993. Ultrastructural studies of spore walls of *Acaulospora morrowae* and *A. scrobiculata*. *Mycol. Res.* 97(9):1183-1189.
- Maia LC, Kimbrough JW, Benny GL. 1994. Ultrastructure of spore germination in *Gigaspora albida* (Glomales). *Mycologia* 86(3):343-349.
- Meier RR, Charvat I. 1992. Peridial development in *Glomus mosseae* (Glomaceae). *Ann. Bot.* 79:928-936.
- Monroy-Ata A, Peña-Becerril JC, García-Díaz M. 2017. Mycorrhizal symbiosis organization of dominante tree *Prosopis laevigata* (Mesquite) in a xeric shrub of Central Mexico. En: Pagano MC (Ed.). *Recent advances on mycorrhizal fungi, Fungal Biology.* Pringer International Publishing, Switzerland. p.p. 35-45. doi:10.1007/978-3-319-24355-9_4

- Montaño NM, Alarcón A, Camargo-Ricalde SL, Hernández-Cuevas LV, Álvarez-Sánchez J, González-Chávez MCA, Gavito M, Sánchez-Gallen I, Ramos-Zapata JA, Guadarrama P, Maldonado-Mendoza IE, Castillo S, García-Sánchez R, Trejo D, Ferrera-Cerrato R. 2012. Research on arbuscular mycorrhizae in Mexico: historical synthesis and future prospects. *Symbiosis* 57:111-116.
- Moreae F. 1953. Les champignons. II. Syst. Encyclop. Mycol. 23:941-2120.
- Morton JB. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature and identification. *Mycotaxon* 32:267-324.
- Morton JB. 1990a. Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia* 82:192-207.
- Morton JB. 1990b. Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): Their role in macro- and microevolutionary processes. *Mycotaxon* 37:493-515.
- Morton JB. 1993. Problems and solutions for the integration of Glomalean taxonomy, systematic biology, and the study of endomycorrhizal phenomena. *Mycorrhiza* 2:97-109.
- Morton JB. 1995. Taxonomic and phylogenetic divergence among five *Scutellospora* species (Glomales, Zygomycetes) based on comparative developmental sequences. *Mycologia* 87:127-137.
- Morton JB, Benny GL. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): New order, Glomales, two new suborders: Glomineae and Gigasporineae, and two new families: Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37:471-491.
- Mosse B. 1970a. Honey-coloured, sessile *Endogone* spores. I. Life story. *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.* 74:156-159.
- Muthukumar JT, Damodaran PN, Rajeshkannan V, Udaiyan K. 2005. Distribution, spore ontogeny and host reactions in *Acaulospora scrobiculata* (Diversisporales). *Nova Hedw.* 81(3-4):477-492.
- Ochoa-Meza A, Esqueda M, Fernández-Valle R, Herrera-Peraza R. 2009. Variación estacional de hongos micorrízicos arbusculares asociados con *Agave angustifolia* Haw. en la Sierra Sonorense, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 32(3):189-199.
- Oehl F, Sieverding E. 2004. *Pacispora*, a new arbuscular vesicular mycorrhizal fungal genus in the Glomeromycetes. *J. Appl. Bot.* 78:72-82.
- Oehl F, Tchabi A, Silva GA, Sánchez-Castro I, Palenzuela J, Monte JIP, Lawouin LE, Coyne D, Hountondji FCC. 2014. *Acaulospora spinosissima*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from the Southern Guinea Savanna in Benin. *Sydowia* 66(1):29-42.
- Öpik M, Saks U, Kennedy J, Danielle T. 2008. Global diversity patterns of arbuscular mycorrhizal fungi—community composition and links with functionality. En: Varma A (Ed.). *Mycorrhiza. State of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics*. 3a ed. Springer-Verlag. Berlin:89-113.

- Osorio-Miranda M, Castelán-Estrada M, Gómez-Leyva JF, Salgado-García S, Hernández-Cuevas L. 2013. Hongos micorrícicos arbusculares de suelos de sabana en Tabasco, México. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 16:171-182.
- Palenzuela J, Azcón-Aguilar C, Barea JM, Silva GA, Oehl F. 2015. *Acaulospora baetica*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species from two mountain ranges in Andalucía (Spain). *Nova Hedw.* 101(3-4):463-474.
- Pereira CMR, Goto BT, Sila DKA, Ferreira ACA, Souza FA, Silva GAS, Maia LC, Oehl F. 2015. *Acaulospora reducta* sp. nov. and *A. excavata* –two glomeromycotan fungi with pitted spores from Brazil. *Mycotaxon* 130(4):983-995.
- Pereira CMR, Maia LC, Sánchez-Castro I, Palenzuela J, Silva DKA, Sudova R, Kolarikova Z, Rydlova J, Ctvrtlikova M, Goto BT, Silva GA, Oehl F. 2016. *Acaulospora papillosa*, a new mycorrhizal fungus from NE Brazil, and *Acaulospora rugosa* from Norway. *Phytotaxa* 260(1):14-24.
- Pérez-Luna YC, Álvarez-Solís JD, Mendoza-Vega J, Át-Fernández JM, Gómez-Álvarez R, Cuevas L. 2012. Diversidad de hongos micorrícicos arbusculares en maíz con cultivo de cobertura y biofertilizantes en Chiapas, México. *Gay. Bot.* 69(1):46-56.
- Pimienta-Barrios E, Pimienta-Barrios E, Salas-Galván ME, Zañudo-Hernández J, Bobel PS. 2002. Growth and reproductive characteristics of the columnar cactus *Stenocereus queretaroensis* and their relationships with environmental factors and colonization by arbuscular mycorrhizae. *Tree Physiol.* 22:667-674.
- Posada H, Sánchez de Prager M, Heredia G. 2016. Effects of soil physical and chemical parameters, and farm management practices on arbuscular mycorrhizal fungi communities and diversities in coffee plantations in Colombia and Mexico. *Agroforest Systems.* doi:10.1007/s10457-016-0030-0.
- Ramos-Zapata JA, Guadarrama P, Hernández-Cuevas L, Salinas EL, Patrón A, Galindo-Flores G, Kong-Luz A, Santiago-Martínbez G, Juárez BR. 2017. Hongos micorrizógenos: organismos clave para la vegetación. En: Ramos-Zapata JA, Parra-Tabla V, Leirana-Alcocer J, González-Moreno A, Chiappa-Carrara X. (Eds.). *Ecología funcional de la Reserva de la Biosfera Ría Lagartos*. Secretaría de Investigación, Innovación y Desarrollo Tecnológico del Estado de Yucatán. Mérida. pp. 160-177.
- Rani SS, Kunwar IK, Manoharachary C. 2003. *Acaulospora terricola*. sp. nov. from India. *J. Mycol. Plant Path.* 33(1):146-147.
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer SL, Morton JB. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza.* doi:10.1007/s00572-013-0486-y.
- Retama-Ortiz Y, Ávila-bello CH, Alarcón A, Ferrera-Cerrato R. 2017. Effectiveness of native arbuscular mycorrhiza on the growth of four forest species from the Santa Martha Mountain, Veracruz (Mexico). *Forest Syst.* 15(1). doi.org/10.5424/fs/2017261-09636
- Rodríguez-Morelos V, Soto-Estrada A, Pérez-Moreno J, Franco-Ramírez A, Díaz-Rivera P. 2014. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the rhizosphere of seedlings and mature trees of *Swietenia macrophylla* (Magnoliophyta: Meliaceae) in Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. *Rev. Chilena Hist. Nat.* 87: 9.
- Rosendahl S, Dodd JC, Walker C. 1994. Taxonomy and phylogeny of the Glomales. En: Gianinazzi S, Schuepf H (Eds.). *Sustainable agriculture and natural ecosystems*. American Phytopathological Society. San Paul.

- Salgado GS, Castelán EM, Jiménez JR, Gómez LJF, Osorio MM. 2014. Diversidad de hongos micorrícicos arbusculares en suelos cultivados con caña de azúcar en la región de la Chontalpa, Tabasco. *Rev. Mex. Micol.* 40:7-16.
- Sánchez-Lizárraga AL, Dávila-Vázquez G, Contreras-Ramos SM, Hernández-Cuevas LV, Marino-Marmolejo EN. 2017. Identificación de hongos micorrícicos arbusculares en suelo agrícola irrigado con vinazas tequileras. *Biotec. Sustent.* 1:93-99.
- Sancholle M, Dalpé Y. 1993. Taxonomic relevance of fatty acids of arbuscular mycorrhizal fungi and related species. *Mycotaxon* 49:187-193.
- Schüßler A. 2013. <http://www.amf-phylogeny.com>. Consultada en abril de 2018.
- Schüßler A, Schwartzott A, Walker C. 2001. A new fungal Phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105(12):1413-1421.
- Sen R, Hepper CM. 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, Chaverri A, Rojas I. 1988. *Acaulospora splendida*, a new species in the Endogonaceae from Costa Rica. *Mycotaxon* 33:251-256.
- Smith FA, Grace EJ, Smith SE. 2009. More than a carbon economy: Nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 182(2). doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02753.x.
- Smith SE, Read D. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3a ed. Elsevier. Londres.
- Souza de Pontes J, Santos VM, Pereira CD, Silva GA, Maia LC, Oehl F. 2017. *Acaulospora spinulifera*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species from the Brazilian Cerrado and Atlantic rain forest. *Nova Hedw.* 105(1-2):219-229.
- Spain J. 1992. Patency of shields in water mounted spores of four species in Acaulosporaceae (Glomales). *Mycotaxon* 43:331-339.
- Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, Bonito G, Corradi N, Grigoriev I, Gryganskyi A, James TY, O'Donnell K, Roberson RW, Taylor TN, Uehling J, Vylgalys R, White MM. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108(5):1028-1046.
- Stearn WT. 1992. *Botanical latin*. Timber Press. Portland.
- Strullu-Derrien C, Selosse MA, Kendrick P, Martin FM. 2018. The origin and evolution of mycorrhizal symbiosis: from palaeomycology to phylogenomics. *New Phytologist*. doi:10.1111/nph.15076.
- Stürmer S, Morton JB. 1997. Developmental patterns defining morphological characters in spores of four species in *Glomus* (Glomales, Zygomycetes). *Mycologia* 89:72-81.
- Stürmer S, Morton JB. 1999. Taxonomic reinterpretation of morphological characters in Acaulosporaceae based on developmental patterns. *Mycologia* 91:849-857.
- Taylor A, Walker C, GD Bending. 2013. Dimorphic spore production in the genus *Acaulospora*. *Mycoscience*. doi:10.1016/j.myc.2013.03.001.
- Thaxter R. 1922. A revision of the Endogonaceae. *Proc. Amer. Acad. Arts Sci.* 57:291-351.

- Trappe JM. 1977. Three new Endogonaceae: *Glomus constrictus*, *Sclerocyttis clavisporea* and *Acaulospora scrobiculata*. Mycotaxon 6:359-366.
- Trejo D, Guzmán G, Lara L, Zulueta R, Palenzuela J, Sánchez-Castro I, Silva GA, Sieverding E, Oehl F. 2015. Morphology and phylogeny of *Acaulospora foveata* (Glomeromycetes) from Mexico. Sydowia 67:119-126.
- Trinidad-Cruz J, Quiñones-Aguilar EE, Hernández-Cuevas LV, López-Pérez L, Rincón-Enríquez G. 2017. Hongos micorrízicos arbusculares asociados a la rizosfera de *Agave cupreata* en regiones mezcaleras del estado de Michoacán, México. Sci. Fung. 45: 13-25.
- Vaingankar JD, Rodrigues BF. 2011. *Acaulospora soloidea*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from rhizosphere soils of *Murraya paniculata*. Mycotaxon 115:323-326.
- Varela L, Hernández-Cuevas LV, Chimal E, Montaña-Arias NM. Aceptado. Diversidad de hongos micorrizógenos arbusculares en México. Trillas, Colegio de Postgraduados, UNAM. Ciudad de México.
- Varela L, Mora-Velázquez A, Chávez-Hernández CG, Martínez-Bernal A, García-Sánchez R, Chimal-Sánchez E, Montaña NM. 2017. *Acaulospora alpina* y *Ambispora fennica*, dos registros nuevos de hongos micorrizógenos arbusculares para México. Rev. Mex. Biod. 88:496-501.
- Varela L, Trejo D. 2001. Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la diversidad del suelo en México. En: Fragoso C, Reyes-Castillo P (eds.). Acta Zoológica Mexicana. Diversidad, función y manejo de la biota edáfica en México. Número especial, México DF, pp. 39-51.
- Violi HA, Barrientos-Priego A, Wright SF, Escamila-Prado E, Morton JB. 2008. Disturbance changes arbuscular mycorrhizal fungal phenology and soil glomalin concentrations but not fungal spore composition in montane rainforest in Veracruz and Chiapas, Mexico. Forest Ecol. Manag. 254: 276-290.
- Walker C. 1992. Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales)- a possible way forward. Agronomie 12:887-897.
- Walker C, Sanders FE. 1986. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora gen. nov.* from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. Mycotaxon 27:169-182.
- Walker C, Trappe J. 1981. *Acaulospora spinosa sp. nov.*, with a key to the species of *Acaulospora*. Mycotaxon 12:515-521.
- Walker C, Vetsberg M, Demircik F, Stockinger H, Saito M, Sawaki H, Nishmura I, Schüßler A. 2007. Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales (Glomeromycota): *Ambispora fennica gen. sp. nov.*, *Ambisporaceae fam. nov.*, and emendation of Archaeospora and Archaeosporaceae. Mycol. Res. 111(2):137-153.
- Wang B, Qiu YL. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. Mycorrhiza 16:299-363.
- Wu CH, Liu YS, Hung LL. 1995. Spore development of *Entrophospora kentinensis* in an aeroponic system. Mycologia 87(5):582-587.
- Wu CH, Sylvia DM. 1993. Spore ontogeny of *Glomus globiferum*. Mycologia 85:317-322.

Ontogenetic development of spores in *Acaulospora mellea* and *A. longula*, and data about this process in *A. laevis*, *A. scrobiculata* and *A. spinosa*

Hernández-Cuevas, L.V.¹, A. Estrada-Torres², R. Ferrera-Cerrato³, E. de Luna⁴

¹Centro de Investigación en Genética y Ambiente, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Km 10.5 Autopista Texmelucan-Tlaxcala, Ixtacuixtla, 90 120, Tlaxcala, México; ²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Km 1.5 carretera federal Tlaxcala-Puebla, Tlaxcala 90000, Tlaxcala, México, México. ³Área de Microbiología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 carretera federal México-Texcoco, Montecillo, 56 230, Texcoco, Estado de México, México; ⁴Departamento de Morfometría, Instituto de Ecología, Km 2.5 carretera antigua Xalapa-Coatepec, 91 000, Xalapa, Veracruz, México.

Abstract: The ontogenetical development of the spores of *Acaulospora mellea*, and *A. longula* is described, some data about this process in *A. laevis*, *A. scrobiculata* and *A. spinosa* are given and comment. The process for all these species can be summarized in ten steps: 1. Formation and growth of saccules. 2. Formation of one internal layer, with numerous sublayers, both in the hypha and in the saccule. 3. Growth of the spores from a primordium near saccule, soonly ornamented in *A. scrobiculata* and *A. spinosa*. 4. Formation of additional inner flexible layers, and occlusion of the spore by the innermost stratum of layered wall, synthesized *de novo*. 5. Maturation of inner layers which become semirigid and then split. 6. Addition of two layers in an extra inner group. 7. Separation of the two last internal layers in two groups; the innermost layer acquires a dextrinoid reaction with Melzer's reagent, except in *A. laevis*. 8. Total of partial dissociation between spores and saccule. 9. Formation of the germination shield. 10. Maturation of the germination shield.

Key words: Glomeromycotina, Acaulosporaceae, sporogenesis, morphological maturation.

INTRODUCTION

In spite of the importance of ontogenetical processes for determining taxonomical and evolutionary ranks in many organisms (Kohn 1992), the phylogenetic and taxonomic value of this kind of information in arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) has been scarcely considered (Morton and Bentivenga 1994, Stürmer and Morton 1999, Kaonongbua et al.

2010). Early on the history of the knowledge of the ontogenetical process in Acaulosporaceae, it made possible the recognition of *Entrophospora* as a different genus from *Acaulospora* (Ames and Schneider 1979). The spores in both genera are produced from a saccule, in the former the spore is formed between the sporogenous hypha and the saccule, on which has been named "intercalar development", while in the last the spore is formed on the hypha, near the saccule, in "lateral development" (Wu et al. 1995). However, molecular evidences pointed out *Acaulospora* genus exhibits both kinds of spore development (Kaonongbua et al. 2010). Identification of AMF was originally based on gross morphological characteristics like form, color, size and type of groups of spores; some additional morphological criteria like disposition, structure and ornamentation of the layers of the are actually used in AMF taxonomy. Nowadays molecular techniques have given additional evidence for typification of AMF species in almost all genera, including *Acaulospora* (Oehl et al. 2014, Palenzuela et al. 2015, Pereira et al. 2015, Pereira et al. 2016), and for elucidate their phylogenetic relationships (Schüßler et al. 2001, Redecker et al. 2013). Although this kind of evidence is obtained from basic genetic resources, it only represents a part of all possible data that could be obtained from direct and careful observation of organisms. Morphological features of ontogenetical development of spores have been proposed as a complement of molecular evidence and taxonomically useful (Stürmer and Morton 1997, 1999, Kaonongbua et al. 2010). In *Acaulospora* on which there are only a few knew studies that offer descriptive data about the ontogeny of their spores (Mosse 1970a,b, Sieverding and Toro 1987, Muthukutmar et al. 2005, Stürmer and Morton 1999, Dalpé and Declerck 2002, Taylor et al. 2013, Crossey et al. 2018), is important to obtain all kind of information, such as ontogenetic to achieve a better understanding of the genus.

MATERIALS AND METHODS

Pure pot cultures of *Acaulospora laevis* Gerdemann & Trappe, *A. longula* Spain & N. C. Schenck, *A. mellea* Spain & Schenck, and *A. scrobiculata* Trappe were prepared using a sterilized soil (Malintzi Volcano, Ixtenco Municipality, State of Tlaxcala, Mexico) and vermiculite in a 1:1 (v:v) mixture. The substrata were sterilized by stem, twice, 1 hour each with 24 hours of repose between both. The soil was a sandy-clay crumb, pH 6.01 and 18.43

ppm of P available. Trap plants were *Trifolium repens* L. (clover) and *Medicago sativa* L. (lucerne) for all species but not for *A. longula*, which was propagated using lucerne, *Ipomoea batatas* L. (sweet potato), and *Lactuca sativa* L. (lettuce). Initial pure pot cultures of *Acaulospora laevis*, *A. mellea* and *A. scrobiculata* were obtained from Culture Collection of AMF of the Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico. Additional pure pot cultures were obtained from the International Bank of Glomeromycota (IBEG 2018), for *A. laevis* (BEG ID: 13) and *A. longula* (BEG ID: 8). Biological material of *A. spinosa* Walker & Trappe was obtained from an AMF mixed culture prepared with *Phaseolus vulgaris* L. (bean) soil sowed with *Zea mays* L. (corn) plus lucerne.

The biological material, sporogenous hyphae and spores of different stages of development, were observed each third day starting from tenth week after preparation of cultures. The extraction of saccules and spores was done by wet sieving and decanting (Gerdemann and Nicolson 1963) and centrifugation with sucrose gradient (20 and 60%) (Daniels and Skipper 1982). One part of the extracted material was observed on temporary slides with water (Spain 1990). All the other spores were observed on permanent slides with polyvinilic alcohol plus glycerin (PVLG) and polyvinilic alcohol plus glycerin plus Melzer reagent (PVLGM) (Koske and Tessier 1983). All observations were made with a photomicroscope with Nomarski's interference contrast (Nikon Optiphot-2 Plus –NIC-). Diagrams were prepared using a camera lucida coupled to microscope. Colours descriptions are based on Methuen colours charts (Kornerup and Wanscher 1989), identified in parentheses as (Mt). For *Acaulospora laevis*, *A. mellea*, and *A. longula* were revised five pure pot cultures, for *A. scrobiculata* four, and for *A. spinosa* only two. Due to availability of biological material, at least 200 spores at different stages of development were observed for *A. laevis*, *A. mellea*, and *A. scrobiculata*, and 500 for *A. longula* and *A. spinosa*.

To confirm the identity of species, and to compare observations, some voucher specimens from OSU Herbarium, hosted at the Oregon State University (former OSC) were also observed. Paratype of *Acaulospora laevis* (OSC 30 814), holotype of *A. longula* (OSC 46 715), isotype of *A. mellea* (OSC 41 494), and paratype of *A. spinosa* (OSC 40 078). Voucher specimens of all the studied species (spores mounted on permanent slides) were

lodged at the TLXM Herbarium, from Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico.

RESULTS

Acaulospora longula Spain & N.C. Schenck

Figure 1A-F.

At the beginning of sporogenesis is developed one terminal swollen saccule at the end of one sporogenous hypha. Its content is finely granular and homogeneous, yellowish white (Mt: 1A2) and continuous between the hypha and the saccule, mixed with some fluid highly refringent content. Saccule apical, globose, 80-110 μm in diameter, with two layers, the external one hyaline, gelatinous, up to 1.5 μm width, not firmly adherent to the internal one, which is 1.5 μm width, yellowish white (Mt: 1A2) to white (Mt: 1A1), with finely granular, homogeneous and hyaline content. The nursering hypha is separated from the rest of the mycelium by several intercalar walls, at this extreme is narrow, 8-10 μm wide, up to 12-16 μm in diameter at the neck of the saccule; it is common to observe some filiform, almost empty appendages, and frequently, one of these structures is present on the saccule, just at the opposite extreme of the nursering hypha, which posses two layers as the saccule. Spore on formation globose, with two layers at the beginning, both like a continuum from the wall of the saccule; the external layer is gelatinous, 1.5 μm width, the internal is formed by numerous sublayers, pale yellow (Mt: 1A3), highly flexible at the beginning, and semirigid later, 1-2 μm wide. Another internal membranous layer is added later, 0.5-1 μm , firmly adherent to the other two previously formed layers; another internal membranous layer is formed, but it is clearly separated from the others, 0.5 μm width; at this time the spore is occluded by the last stratum of the multilayered layer and the membranous layer from the hypha; two new membranous layers are formed, each of them 0.5-1 μm width. Excrecences like irregular warts are formed on five layer, they are not uniformly distributed over its surface, and can be easily separated under light pressure. Last layer reacts from greyish violet (Mt: 15B5), to deep violet (Mt: 15E8) with Melzer's reagent once the spore is fully formed. At the end, the second layer becomes completely rigid and slightly darker. Finally the content of the spores became granular and dense and concentrates near the scar.

Over the penultimate layer, the germination shield begins its formation which occasionally concludes with a few very faint intercalary walls inside, or without them.

Acaulospora mellea Spain & Schenck

Figure 2A-H.

Formation of one apical, globose saccule, 84-130 μm in diameter, at the apex of one sporogenous hypha, with a wall composed by one flexible layer lesser than 1 μm width, which at the opposite extreme separates and isolates its content from the rest of the hypha by a septum. Once the content of the hypha is isolated, the wall of the hypha and saccule forms an inner layer, flexible as the former, membranous in appearance, and firmly adherent to the external one, 1.5 μm width. At this time the content is yellowish white (Mt: 1A2), finely granular and homogeneous. Hypha cuneiform, with two layered wall as in the saccule, 11-15 μm in diameter at the neck of the saccule, 6-10 μm at the extreme, with one or two filiform appendages on it, emptied and separated from hyphal body by basal walls. Spore on formation globose, completely sessile, at the beginning of its formation with two layers, both of them continuous with those of the wall of the saccule: the outer gelatinous in appearance, 1 μm width, the inner with numerous sublayers, semirigid, 1-2 μm wide. The content is formed by many small globules, giving a reticulate appearance; the second layer of the wall becomes light yellow (Mt: 4A4). Other internal membranous layer is added later, 0.5 μm width, firmly adherent to the previously formed layers; then, another internal membranous layer is formed, clearly separated from the others, 0.5 μm width; the spore occlusion is formed at this time by the last one layer of multilayered layer; later, two new membranous layers are formed, each one of 1 μm width. Irregular and regular warted excrescences on layer five are formed, but they are not uniformly distributed over its surface. Last layer reacts from greyish magenta (Mt: 13C6) to deep magenta (Mt: 13D8) with Melzer once the spore is fully formed. At this time the second layer, which is formed by a group of sublayers becomes light orange (Mt: 5A5). While the spore increases its size, the content of the saccule flows to it, then the spore is occluded and the saccule collapses. At the end, the spores content acquires a reticulate appearance with large fluid globules, which fuse each other until form only some large ones. Almost all spores lost their hyphae and collapsed saccules, keeping just one scar occluded by one synthesized *de novo* layer

from the laminated layer. At this moment on the surface of the spore, only some patches remains of the firths layer. Finally, content of the spores became granular and dense and concentrates near the scar. At this zone the germination shield begins its formation, which concludes when it forms some intercalar walls inside.

Acaulospora laevis Gerdemann & Trappe

Figure 3A-D.

Observations about the sequence of events occurring during spore ontogenesis are in accordance with those of Mosse (1970a), and Stürmer and Morton (1999) whom previously described this biological phenomenon in this species. The spore in formation is occluded very early, once the third and fourth layers are added to the two firths. At the beginning, these two first layers form part of the saccule, and hypha layers which have two layers too, and were differentiated in one external gelatinous layer, and an inner multilayered layer and membranous layer from the hypha. At this zone sometimes is present a very short pedicel, 2-4 μm long. A feature invariably present on tips of saccules and on sporogenous hyphal body studied here was the presence of filiform appendages of unknown function, which at the beginning present a dense cytoplasmatic content, but later were emptied and isolated from saccule and hypha by basal septa. This kind of structures was noticed only by Mosse (1970a), and illustrated but not described by Gerdemann and Trappe (1974). One of the indicatives of the maturity of the spore is the presence of excrescences, which were named generically as "granular" by Stürmer and Morton (1999). Here, we found them as persistent oblong projections. The second indicative of the fully morphological development of the spore is the presence of one circular or slightly circular, without or with a few intercalar walls germination shield. This structure begins its formation with the aggregation of dense cytoplasmatic content toward one zone at the periphery of the spore, generally near the scar. Once the germination hyphae emerges out, on it could be produced some swollen structures.

Acaulospora scrobiculata Trappe

Figure 4A-I.

Observations about the sequence on events during spore ontogenesis are in general as Muthukumar et al. (2005) described. Some data found here were not described by those authors. The nursering hypha is separated from the rest of the mycelium by several intercalar walls, at this extreme is narrow, 6-8 μm wide, up to 34 μm in diameter at the neck of the saccule; it is frequent to observe some filiform, almost empty appendages; the nursering hypha posses two layers as the saccule. Excrecences like irregular warts on layer five of the spore are formed, they are not uniformly distributed over its surface, and can be easily separated under light pressure, in fact some of them remain stick to upper layer. Last layer reacts to purplish pink (Mt: 14A5) with Melzer's reagent once the excrecences over it have been formed. Finally, near the scar zone and over the penultimate layer, the germination shield begins its formation which concludes with a few very faint intercalar walls and a dextrinoid reaction, purplish pink (Mt: 14A3) with Melzer's reagent.

Acaulospora spinosa C. Walker & Trappe

Figure 5A-E.

Observations about the sequence on events during spore ontogenesis are as Stürmer and Morton (1999) previously described on this species. One constant and invariably feature observed on the biological material studied here for this and the other species, but not previously described, was the presence of two layers on saccule and hypha, the outermost very frail, membranous, and less 1 μm with. In fact, the spore in formation is occluded very early in the same way than the other species studied here, i.e. the occlusion is formed by the last layer of the multilayered layer and the membranous layer from the hyphae which have two layers as the saccule. Other feature was the presence of filiform appendages on saccule, hypha and at the tip of the developing spore, which become ornamented very early with the pattern characteristic of the species, although the ornamentation is very fine and smaller than in mature spores. As in the other species, the content of the spores became granular and dense and concentrates near the scar. At this zone and over the penultimate layer, the germination shield begins its formation which concludes with a lot of intercalar walls inside, giving it a very complex appearance. Figure 6 is a diagramatic representation of sporogenesis for all the studied species.

DISCUSSION

In all species, *Acaulospora laevis*, *A. longula*, *A. mellea*, *A. scrobiculata* and *A. spinosa*, as in *A. rehmi* Sieverding & Toro (Dalpé and Declerck 2002) the other species on which had been described the spore ontogeny, the layers of the spores are formed sequentially in a centripete pattern, i.e. from outside to inside. This situation previously had been reported for *A. laevis* and *A. spinosa* (Stürmer and Morton 1999), and *A. scrobiculata* (Muthukumar et al. 2005). Then, the innermost layer is the last one in formation, i.e. the youngest. In fact, once third and fourth layers are formed, all development of the spore is carried out inside it. Morton (1988, 1990) pointed out a similar way of layers formation in *Glomus sensu lato*, *Scutellospora sensu lato* and *Entrophospora*. One of the most evident changes during spore development is its change of appearance from semi-solid to fluid. Mosse (1970b) pointed out that this change indicates the spore preparation for two important processes: i) the beginning of the dormancy, in which the content become globular, because of characteristic reserve content, appearance very common in spores extracted from soil, and ii) pregermination stage in which the content become denser, and the spore reaches an active stage switching the proper processes for germination. Furthermore, once the spore is ready to form the germination shield, the content of the spore concentrates densely near the scar, the zone on which that structure will be produced.

Stürmer and Morton (1999) studied the spore formation process in *Acaulospora laevis*, *A. spinosa*, and Muthukumar et al. (2005) in *A. scrobiculata*. They registered one layer in the saccule. In all studied species the saccules invariably and constantly presented two layers, the innermost with a laminated appearance, although very flexible. Only Mosse (1970a) called attention on one internal layer in the hypha, like that we found here, which was remarked as continuous with the first internal layer of the spore. At this time for all species of *Acaulospora* described at the International Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM 2018) is pointed out only one layer in the saccule, with exception of *A. nicolsonii* Walker and *A. tuberculata* Janos & Trappe, with more layers on it, as has been pointed out previously by Morton (1988). However, the voucher specimens of *Acaulospora laevis* (OSC 30 814), *A. mellea* (OSC 41 494), and *A. spinosa* (OSC 40 078), have saccules with two layers. This particular situation leads to the question if this

feature is only present in some species, or it has been erroneously interpreted. This last one seems probably because the voucher specimens display both layers.

The filiform appendages on hyphae and saccules are another feature found in all studied species. Its function and origin are unknown. Moreover, the filiform appendix situated on the spores of *A. spinosa* could suggest an intercalary process of formation of spores, not fully developed. A similar condition was reported for *A. rehmi* from *in vitro* culture (Dalpé and Declerck 2002) and for *A. scrobiculata* (Muthukumar et al. 2005). These results support the recent molecular findings of Kaonongbua et al. (2010) who transferred from *Entrophospora* to *Acaulospora* two species, amplifying the diagnosis of the genus to include both ways of spores formation. An important similarity between the ontogeny of ornamented species such as *A. kentinensis* (Wu et al. 1995 as *Entrophospora kentinensis*), *A. scrobiculata* (Muthukumar et al. 2005 and data found here), and *A. spinosa*, is the early development of the ornamentation, soonly evident from the beginning of layers differentiation. Morton (1986) and Wu et al. (1995) observed that the external layer of the spore in *Entrophospora* is continuous with the hyphae since the beginning. This fact was corroborated with the observations in all the species included in this study. During the development of the spores of all them, the occlusion is produced by the last layer of the multilayered layer of the spore and one hyphal thin layer apparently synthesized *de novo* once the hypha and the saccule contents have been transferred to the spore.

On mature spores in all the species the formation of excrescences and the acquisition of reactivity to Melzer's reagent of the innermost layer sign the end of sporogenesis, which is in accordance to Stürmer and Morton (1999) and Muthukumar et al. (2005). The formation of swollen structures on germination hypha of *A. laevis* was previously noticed only one time (Taylor et al. 2013). One feature unique, not observed before for any species of Acaulosporaceae was the reactivity of the germination shield in *A. scrobiculata*, once it is fully mature, i.e. when it increased its size and morphological complexity.

CONCLUSIONS

Morphological data shown that sporogenesis in all *Acaulospora* species is a conservative process which exhibits similar modes of layers aggregation, acquisition of color and size, and formation of ornaments on spore surface and beaded layer. At the same time, there are

delicate variants among the species, such as the form of excrescences, the reaction of germination shield, and the formation of swollen structures on germination hypha. If these peculiarities are present on other species of *Acaulospora* or even in different isolates of the same species, is subject to exploration and study.

ACKNOWLEDGEMENTS

Dra. V. Gianinazzi-Pearson ex Curator of the Banque European of Glomales, nowadays Bank International of Glomeromycota for the gift of pure cultures. Dr. J. Spatafora, ex Curator of the Mycological Collection of the OSU Herbarium (former OSC), for the loan of specimens of *Acaulospora*.

REFERENCES

- Ames RN, Schneider RW (1979) *Entrophospora* a new genus in the Endogonaceae. Mycotaxon 8:347-352
- Crossay T, Cilia A, Cavaloc Y, Amir H, Redecker D (2018) Four new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) associated with endemic plants from ultramafic soils of New Caledonia. Mycol. Prog. doi:10.1007/s11557-018-1386-5
- Dalpe Y, Declerck S (2002) Development of *Acaulospora rehmsii* spore and hyphal swellings under root-organ culture. Mycologia 94: 850-855
- Daniels A, Skipper HD (1982) Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: Schenck N (ed.) Methods and principles of mycorrhizal research. American Phytopathological Society St. Paul, pp 29-36
- Gerdemann JH, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans Br Mycol Soc 46: 235-244
- Gerdemann JH, Trappe JM (1974) The Endogonaceae in the Pacific Northwest. Mycologia Memoir 5: 1-76
- IBEG (2018) <http://i-beg.eu>. Consultada en abril de 2018
- INVAM (2018) <https://invam.wvu.edu>. Consultada en abril de 2018
- Kaonongbua W, Morton JB, Bever JP (2010) Taxonomic revision transferring species in *Kuklospora* to *Acaulospora* (Glomeromycota) and a description of *Acaulospora colliculosa* sp. nov. from field collected spores. Mycologia 102(6):1497-1509
- Kohn LM (1992) Developing new characters for fungal systematics: an experimental approach for determining the rank of resolution. Mycologia 84: 139-153
- Kornerup A, Wanscher JH (1989) Methuen handbook of colour. 3th ed. Methuen, London.
- Koske RE, Tessier B (1983) A convenient, permanent slide mounting medium. Mycol Soc Amer Newlett 34(2): 59
- Morton J (1986) 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 (1988) Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature and identification. Mycotaxon 32: 267-324

- Morton J (1990) Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia* 82: 192-207
- Morton J, Bentivenga SP (1994) Developmental foundations for morphological diversity among endomycorrhizal fungi in Glomales (Zygomycetes). In: Varma A, Hoch E (eds) *Mycorrhizae: structure, function, molecular biology, and biotechnology*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- 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
- Muthukumar JT, Damodaran PN, Rajeshkannan V, Udaiyan K (2005) Distribution, spore ontogeny and host reactions in *Acaulospora scrobiculata* (Diversisporales). *Nova Hedwigia* 81(3-4):477-492
- Oehl F, Tchabi A, Silva GA, Sánchez-Castro I, Palenzuela J, Monte JJP, Lawouin LE, Coyne D, Hountondji FCC (2014) *Acaulospora spinosissima*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from the Southern Guinea Savanna in Benin. *Sydowia* 66(1):29-42
- Palenzuela J, Azcón-Aguilar C, Barea JM, Silva GA, Oehl F (2015) *Acaulospora baetica*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species from two mountain ranges in Andalucía (Spain). *Nova Hedwigia* 101(3-4):463-474
- Pereira CMR, Goto BT, Sila DKA, Ferreira ACA, Souza FA, Silva GAS, Maia LC, Oehl F (2015) *Acaulospora reducta* sp. nov. and *A. excavata* –two glomeromycotan fungi with pitted spores from Brazil. *Mycotaxon* 130(4):983-995
- Pereira CMR, Maia LC, Sánchez-Castro I, Palenzuela J, Silva DKA, Sudova R, Kolarikova Z, Rydlova J, Ctvrtlikova M, Goto BT, Silva GA, Oehl F (2016) *Acaulospora papillosa*, a new mycorrhizal fungus from NE Brazil, and *Acaulospora rugosa* from Norway. *Phytotaxa* 260(1):14-24
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer SL, Morton JB (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*. DOI 10.1007/s00572-013-0486-y
- Schüßler A, Schwartzott A, Walker C (2001) A new fungal Phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105(12): 1413-1421
- Sieverding E, Toro ST (1987) *Acaulospora denticulata* sp. nov. and *Acaulospora rehmi* sp. nov. (Endogonaceae) with ornamented spore walls. *Angew Botanik* 61: 217-223
- Spain J (1990) Arguments for diagnosis based on unaltered wall structures. *Mycotaxon* 38: 71-76
- Stürmer SL, Morton J (1997) Developmental patterns defining morphological characters in spores of four species in *Glomus* (Glomales, Zygomycetes). *Mycologia* 89: 72-81
- Stürmer SL, Morton J (1999) Taxonomic reinterpretation of morphological characters in Acaulosporaceae based on developmental patterns. *Mycologia* 91: 849-857
- Taylor A, Walker C, GD Bending (2013) Dimorphic spore production in the genus *Acaulospora*. *Mycoscience*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2013.03.001>
- Wu CH, Liu YS, Hung LL (1995) Spore development of *Entrophospora kentinensis* in an aeroponic system. *Mycologia* 87(5): 582-587

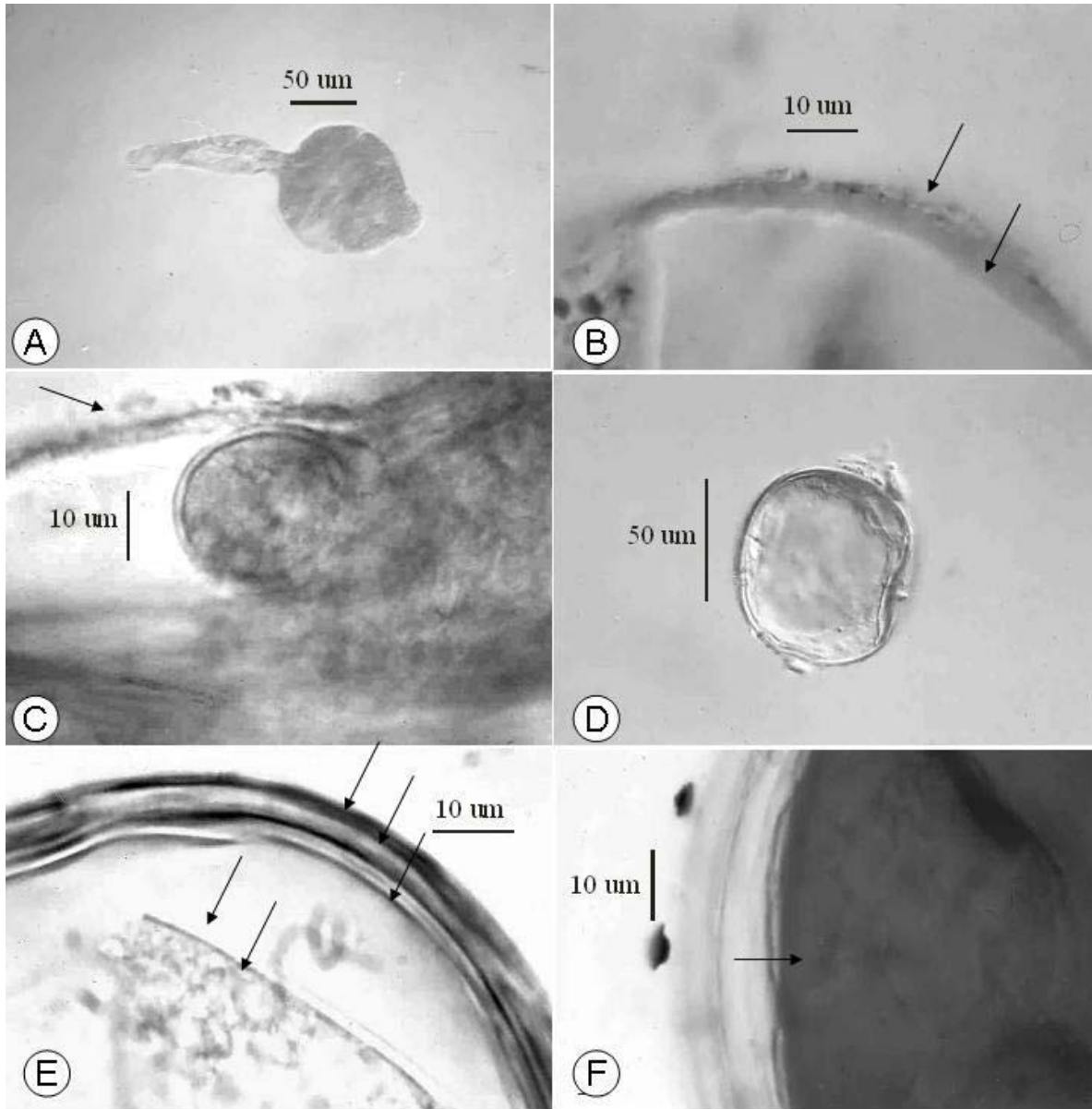


Fig. 1. *Acaulospora longula*. A. Saccule. B. Saccule's wall with an outermost gelatinous layer, and one innermost membranous layer. C. Filiform appendage (arrows) on sporogenous hypha, near very young spore. D. Young spore. E. Spore with three outermost layers, and two innermost membranous layers. F. Mature spore showing Melzer's reaction on innermost membranous layer (darker layer).

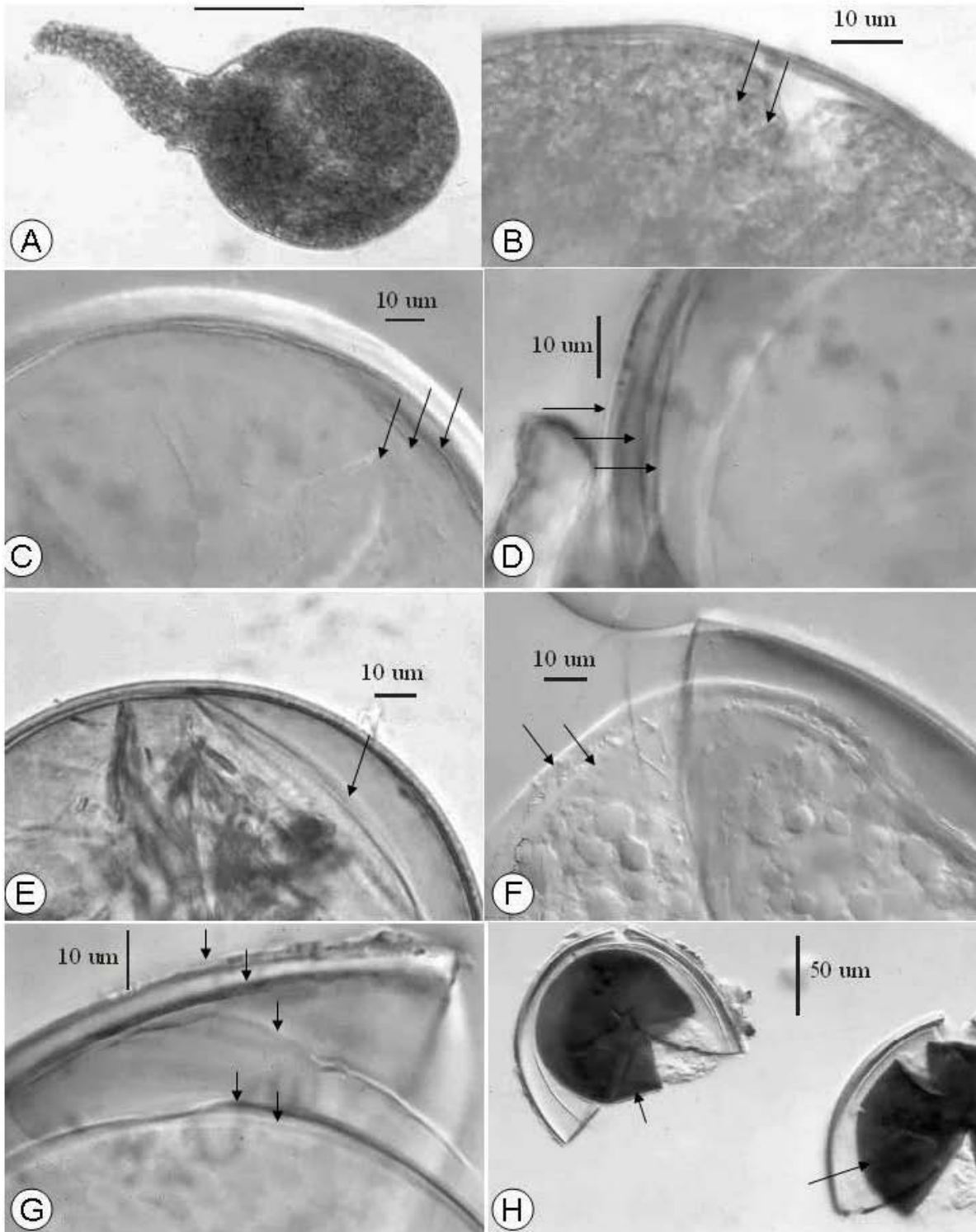


Fig. 2. *Acaulospora mellea*. A. Saccule. B. Saccule with two membranous layers. C-D. Spore wall with outermost gelatinous layer, middle multilayered layer, and innermost membranous layer. E. Addition of fourth inner layer. F. Addition of two innermost membranous layers. G. Mature spore with five wall layers. H. Mature spore showing Melzer's reaction on innermost layer (darker layer).

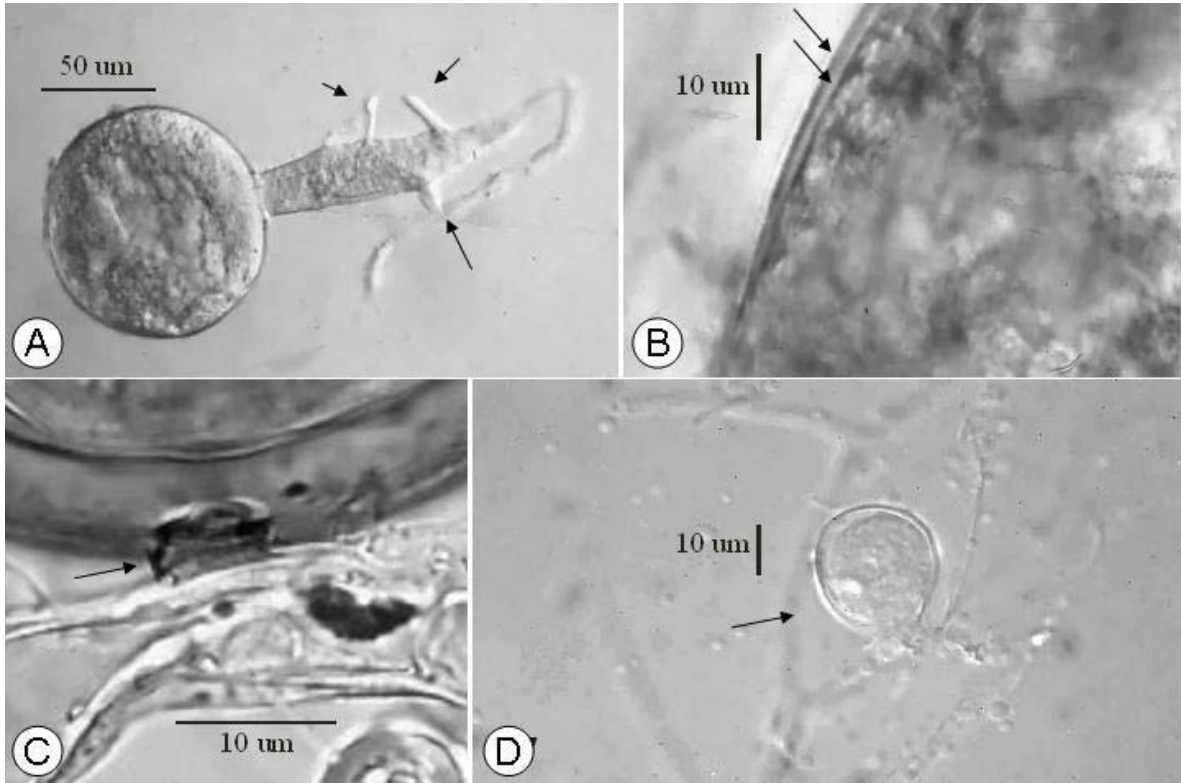


Fig. 3. *Acaulospora laevis*. A. Sporogenous hypha and saccule with filiform appendages. B. Saccule with two layers. C. Short pedicel on sporogenous hypha. D. Swollen structure on germination hypha.

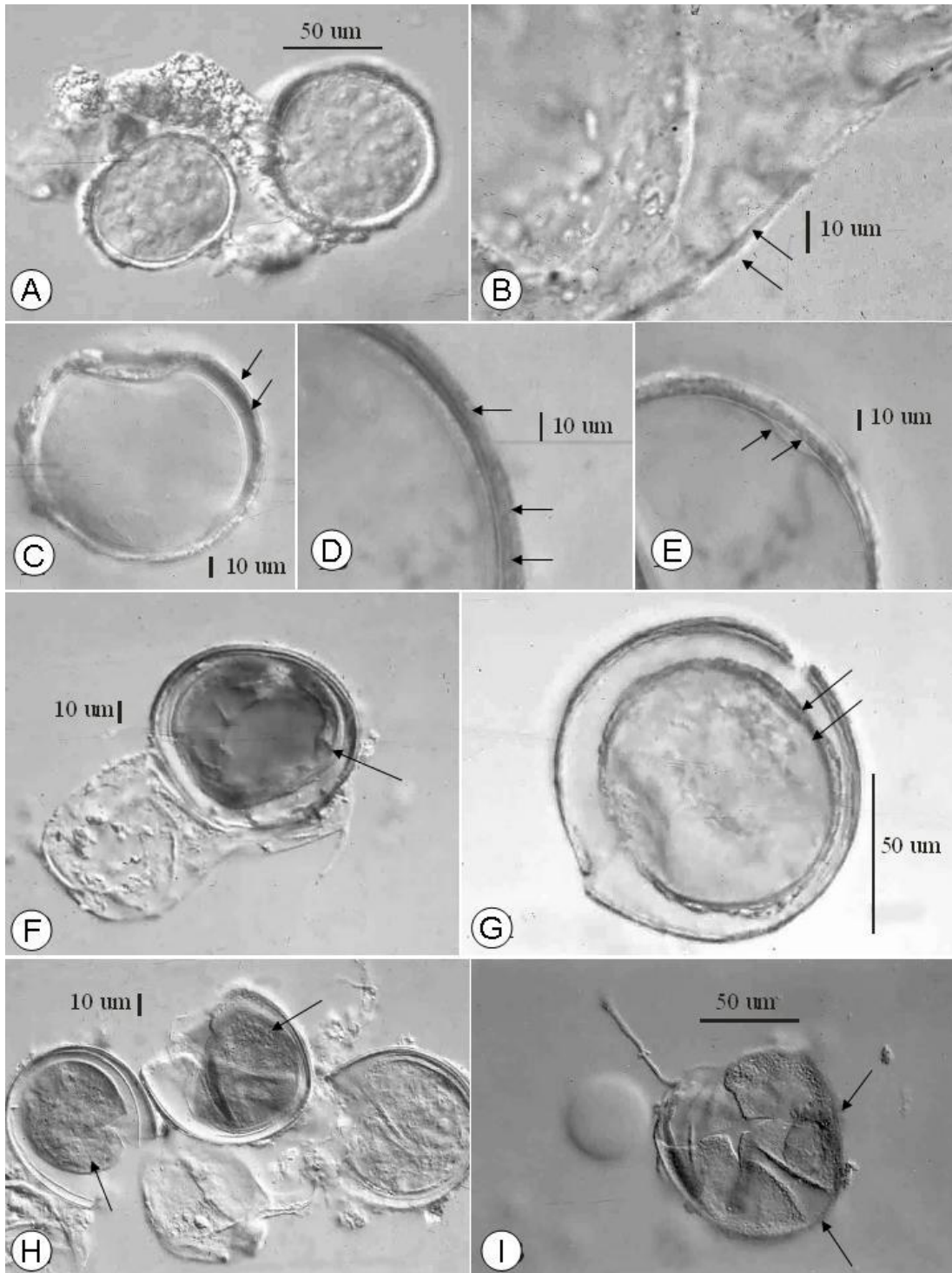


Fig. 4. *Acaulospora scrobiculata*. A. Saccule with an immature spore and some debris attached to them. B. Saccule with two layers. C. Immature spore with two layers. D. Slightly elliptical shallowed areoles on second layer in an immature spore. E. Addition of two inner layers. F. Addition of fifth innermost layer, clearly separated from the first. G. Addition of two innermost membranous layers. H. Mature spores showing Melzer's reaction (darker layers). I. Germination shield with a dextrinoid reaction to Melzer's reagent (darker area).

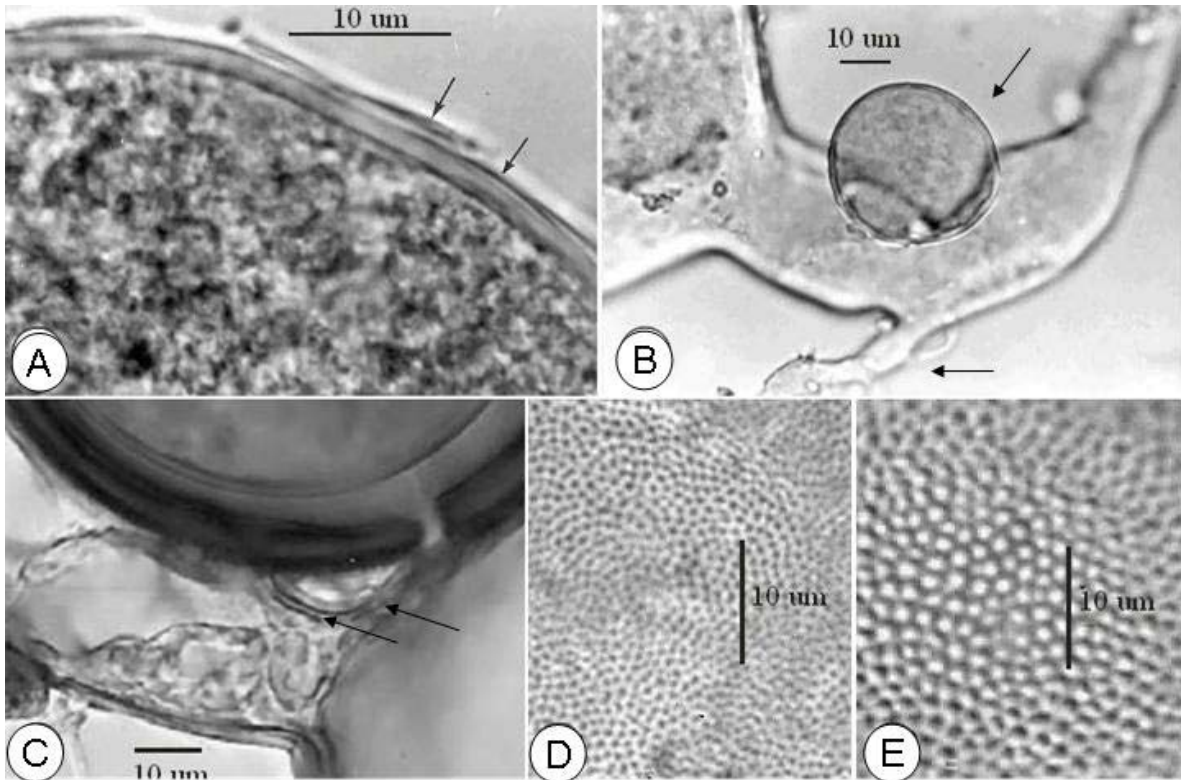


Fig. 5. *Acaulospora spinosa*. A. Saccule with two layers. B. Very immature spore on sporogenous hypha showing one filiform appendage. C. Two layers on sporogenous hypha. D. Frontal view of ornamentation on immature spores. E. Frontal view of ornamentation on mature spores.

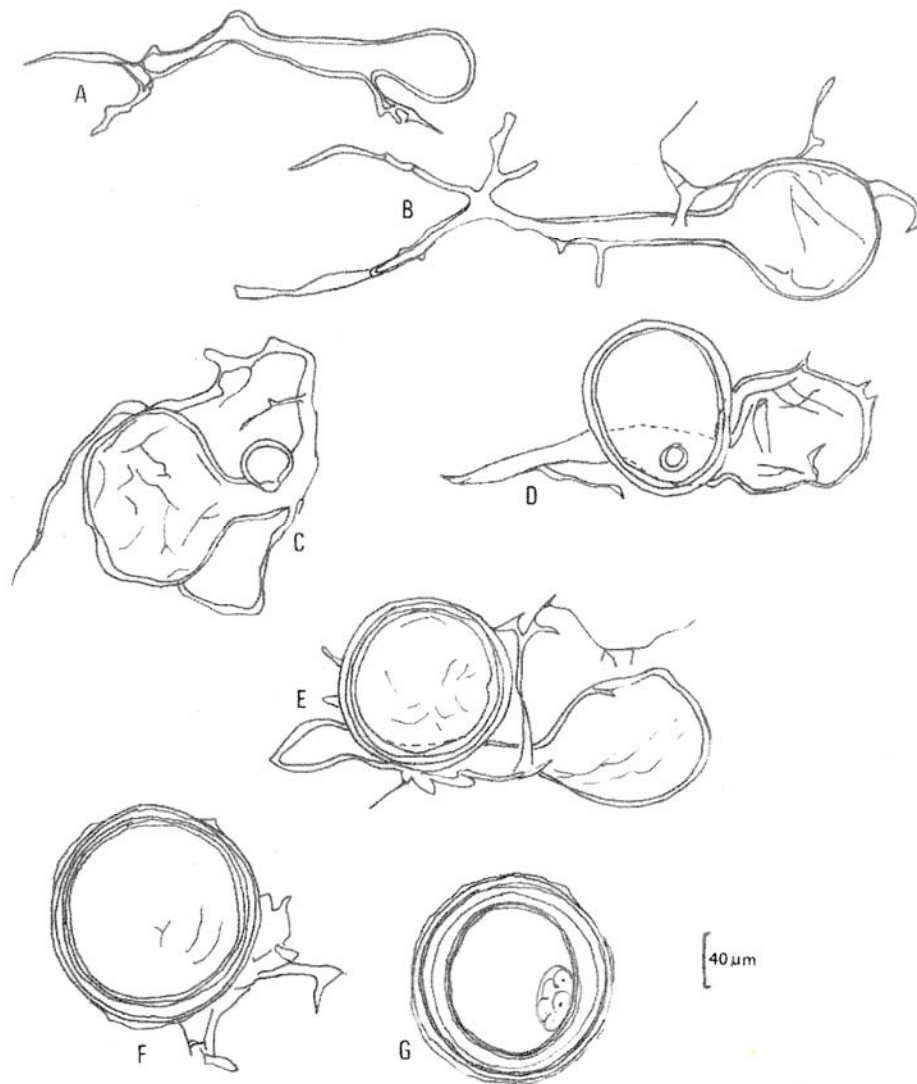


Fig. 6. Representation of spore ontogenesis in *Acaulospora spinosa*, which is similar in all the studied species. A. Very young sporogenous hypha. B. Sporogenous hypha and saccule with several filiform appendages. C. Primordium of spore on hyphal body. D. Growth of spore with differentiation of layers on spore wall. E. Occlusion of the spore and subsequent formation of innermost layers. F. Latter differentiation of inner layers on spore wall; only remains of sporogenous hypha and saccule on spore. G. Mature spore with all spore walls fully formed, germination shield present, and absence of sporogenous hyphae and saccule. A camera lucida coupled to microscope was used for drawings.

Ontogénesis del escudo de germinación en cinco especies de *Acaulospora* (Glomeromycotina, Fungi)

Hernández-Cuevas, L.V.¹, A. Estrada-Torres², R. Ferrera-Cerrato³, E. de Luna⁴

¹Centro de Investigación en Genética y Ambiente, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Km 10.5 Autopista Texmelucan-Tlaxcala, Ixtacuixtla, 90 120, Tlaxcala, México; ²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Km 1.5 carretera federal Tlaxcala-Puebla, Tlaxcala 90000, Tlaxcala, México, México. ³Área de Microbiología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 carretera federal México-Texcoco, Montecillo, 56 230, Texcoco, Estado de México, México; ⁴Departamento de Morfometría, Instituto de Ecología, Km 2.5 carretera antigua Xalapa-Coatepec, 91 000, Xalapa, Veracruz, México.

Resumen. A partir de cultivos en maceta se extrajeron esporas de cinco especies de hongos micorrizógenos arbusculares: *Acaulospora laevis*, *A. longula*, *A. mellea*, *A. scrobiculata* y *A. spinosa*. Las esporas se colocaron en placas de Phytigel®-agua para su germinación. Cada tercer día se extrajeron esporas para su revisión microscópica. Se describen los cambios morfológicos que ocurren durante la formación del escudo y las hifas de germinación en las especies. El crecimiento y maduración del escudo presentó crecimiento primario o crecimiento primario y secundario. Se describen dos variantes de crecimiento primario: coclear, en *A. longula*, *A. scrobiculata* y *A. spinosa*, y orbicular, en *A. laevis* y *A. mellea*. Se discuten las similitudes y diferencias de este proceso entre las especies estudiadas y los datos reportados en literatura.

Palabras clave: *Acaulospora laevis*, *Acaulospora mellea*, *Acaulospora longula*, *Acaulospora scrobiculata*, *Acaulospora spinosa*.

Abstract. Spores from pure pot cultures of arbuscular mycorrhizal fungi were obtained: *Acaulospora laevis*, *A. longula*, *A. mellea*, *A. scrobiculata* and *A. spinosa*. The spores were putted on Phytigel®-water plates for germination. Some spores were extracted every third for microscopic observation. The morphological changes during shield formation and germination of the studied species are described. Germination shields are produced by primary or primary and secondary grown. Two types of primary grown are recognized: cochlear, in *A. longula*, *A. scrobiculata* and *A. spinosa*, and orbicular, in *A. laevis* and *A.*

mellea. Similarities and differences about this process on studied species and reported data are discussed.

Keywords. *Acaulospora laevis*, *Acaulospora longula*, *Acaulospora mellea*, *Acaulospora scrobiculata*, *Acaulospora spinosa*.

Introducción

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) cuentan con propágulos para su dispersión, distribución y persistencia; éstos pueden ser fragmentos de micelio, de raíces colonizadas y esporas (Smith y Read 2008). Estas últimas se forman específicamente para asegurar su persistencia en el ambiente y por ende son los propágulos más importantes de los HMA. Las esporas son estructuras de resistencia, de dispersión (Sylvia, 1999) y almacenes importantes de la información genética en estos hongos (Giovanetti, 2000; Souza, 2015); su germinación, además de incrementar las posibilidades de colonizar hospederos nuevos, es crucial para especies donde los otros propágulos son ineficientes para el establecimiento de la asociación micorrízica arbuscular, como sucede con las de *Acaulospora* (Gazey et al., 1993; Giovanetti, 2000).

Sin duda la producción de esporas y su germinación son procesos biológicamente exitosos surgidos tempranamente en la historia evolutiva de los HMA (Dotzler et al., 2006, 2009). La dilucidación de los eventos que tienen lugar durante ambos eventos ayudaría a esclarecer las relaciones naturales entre los HMA, ya que la capacidad de germinación, el patrón que ésta sigue, así como la cantidad de micelio que producen las esporas son características que varían entre especies (Douds y Schenck 1991; Spain, 1992; Oehl et al. 2008) y en consecuencia podrían ser útiles para su reconocimiento taxonómico. Aunque el uso de técnicas moleculares ha producido avances muy importantes sobre la posición sistemática de estos organismos (Morton y Redecker, 2001; Schüßler et al., 2001; Spatafora et al., 2016), su empleo debe complementarse con las aproximaciones morfológicas tradicionales (Sieverding y Oehl, 2006; Oehl et al. 2008; Souza, 2015). Por ello, se hace necesario explorar en detalle los caracteres morfológicos en varios procesos vitales como el abordado en este estudio, la germinación de las esporas.

Materiales y métodos

Se obtuvieron esporas de *Acaulospora laevis* Gerd. & Trappe, *A. mellea* Spain & Schenck, *A. scrobiculata* Trappe y *A. spinosa* C. Walker & Trappe de cultivos monoespecíficos preparados con esporas extraídas de cultivos de la Colección de Cepas de Hongos Micorrízicos del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, así como de dos cultivos adicionales, uno de *A. laevis* (BEG ID: 13) y uno de *A. longula* Spain & N. C. Schenck (BEG ID: 8) del Banco Internacional de Glomeromycota (IBEG, 2018). Las esporas se extrajeron por tamizado húmedo y decantación (Gerdemann y Nicolson, 1963) y centrifugación con gradiente de sacarosa (20 y 60%) (Daniels y Skipper, 1982), se enjuagaron con abundante agua destilada estéril y se colocaron en viales con agua bidestilada estéril; se mantuvieron a 4 °C por cinco días para romper latencia (modificado de Gazey et al., 1993).

Las esporas se extrajeron del agua y se colocaron por 5 minutos en agua destilada estéril con una gota de Tween 20 (0.05%) para romper tensión superficial. Inmediatamente después se desinfectaron con cloramina T (2%) y una mezcla de gentamicina + estreptomina (100 y 200 ppm, respectivamente) de acuerdo con la propuesta de Bécard y Fortin (1990). Una vez desinfectadas se colocaron sobre la superficie de una placa de germinación. Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar vertical. Los ensayos se montaron en cajas de Petri de 6 cm de diámetro con Phytigel®-agua al 5% como soporte. Con base en la disponibilidad de esporas, para *Acaulospora laevis* y *A. mellea* se prepararon 30 placas para cada una, mientras que para *A. longula*, *A. scrobiculata* y *A. spinosa* fueron 60. Cada placa contuvo 10 esporas. Éstas se incubaron a 26 °C en obscuridad por 30 días. Para observar la pared y el contenido citoplásmico cada tercer día se extrajeron las esporas de las placas. De una de *Acaulospora laevis* y de *A. mellea*, y de dos para *A. longula*, *A. scrobiculata* y *A. spinosa*. Para documentar el estado de las esporas antes de la germinación, se revisaron 50 de cada especie, registrándose el aspecto de la pared y del contenido. Antes de extraer las esporas de cada placa, sobre cada una se vertió una gota de azul de tripano (0.05%) para evidenciar las hifas de germinación (Gazey et al., 1993).

Una parte de las esporas extraídas se colocó en preparaciones temporales con agua (Spain, 1992); la otra se colocó en preparaciones permanentes con alcohol polivinílico +

glicerina (PVLG) y alcohol polivinílico + glicerina + reactivo de Melzer (PVLGM) (Koske y Tessier, 1983). Las observaciones se realizaron en un microscopio con contraste de interferencia de Nomarski (Nikon Optiphot-2), con una cámara acoplada a él (Nikon). Los esquemas que ilustran los procesos de crecimiento de los orbes se realizaron con una cámara lúcida acoplada al microscopio. La designación de las distintas partes de la pared de las esporas sigue la propuesta del INVAM (INVAM, 2018): SW para la pared esporal o pared estructural de la espora, GW1 para los estratos germinales internos del primer grupo, GW2 para los estratos germinales internos del segundo grupo.

Para corroborar la identidad de las especies estudiadas se revisaron algunos especímenes del Herbario OSU (antes OSC) albergado por la Universidad de Oregon registrado: paratipo de *Acaulospora laevis* (OSC 30 814), isotipo de *A. mellea* (OSC 41 494), holotipo de *A. longula* (OSC 46 715) y paratipo de *A. spinosa* (OSC 40 078).

Resultados

Generalidades del proceso

En todas las especies el escudo de germinación se produce entre los grupos internos de pared, es decir los germinales: GW1 y GW2. Al principio se forma un poro de forma circular en el grupo más interno, GW2, que posee dos estratos membranosos; a través del poro comienza a fluir citoplasma que queda atrapado entre el citado grupo y el siguiente, GW1. El citoplasma que fluye del centro de la espora se mantiene y confina en el espacio circundante al poro gracias a la formación de una pared que lo envuelve y crece a partir de GW2. Frecuentemente el escudo se forma cerca de la cicatriz esporal dejada por la pérdida total de la hifa esporógena. Previo a la formación de la estructura, tanto las paredes estructurales (SW) como las germinales (GW1 y GW2) entran en un contacto muy estrecho en la zona donde se forma el escudo, donde también se acumula densamente el contenido esporal. Aunque la pared que delimita el escudo de germinación comienza a crecer a partir del centro de éste, de manera centrífuga, es posible distinguir dos patrones de crecimiento primario: a) orbicular, del latín *orbicularis* y éste de *orbis*, que quiere decir círculo o circular (Fig. 1A) y b) coclear, del latín *cochlearis* y éste de *cochlea*, que significa arrollado helicoidalmente (Fig. 1B-C) (Stearn, 1992; Font, 2000).

En el patrón coclear, desde las primeras etapas de su desarrollo, la pared crece formando una hélice con un número variable de espirales (Figs. 1B-C, 2B). Mientras que en el patrón orbicular, la estructura comienza a expandirse a manera de un plato circular o semicircular de dimensión variable (Figs. 1A, 2A).

El crecimiento secundario de los escudos de germinación incluye la formación de compartimientos por la formación centrípeta de paredes intercalares y plegamientos que segmentan al escudo en diferentes proporciones (Fig. 1A-C). Este crecimiento es simultáneo al crecimiento primario, esto quiere decir que a medida que el escudo de germinación crece, su zona marginal va plegándose, formándose así las paredes intercalares (Fig. 2A-B). En el patrón coclear los compartimientos pueden ser abiertos o cerrados (Figs. 1B-C, 2B), mientras que en el orbicular los compartimientos son siempre abiertos (Figs. 1A, 2A). Como resultado de estos eventos se producen escudos de germinación con diferente complejidad morfológica. Previo a la formación del escudo el citoplasma se vuelve denso y granular, lo que constituye una manifestación de la activación celular, éste se concentra en una zona cercana a la cicatriz donde se formará el escudo.

Particularidades del proceso en cada especie

Acaulospora laevis Gerdemann & Trappe

Figs. 1A, 2A, 3-5.

El escudo de germinación se produce a partir de un patrón de crecimiento orbicular; crece y madura sin que se altere su forma inicial circular, a veces ligeramente deformado lo que le da una apariencia semicircular o algo elíptica. El crecimiento secundario es ocasional, formándose paredes intercalares que nunca atraviesan el orbe de lado a lado, por lo que no se forman compartimientos cerrados. Las paredes intercalares raramente alcanzan el centro del escudo.

Acaulospora mellea Spain & Schenck

Figs. 6-7.

Como en *Acaulospora laevis*, el escudo de germinación se produce a partir de un patrón de crecimiento orbicular; crece y madura sin que se altere su forma inicial circular. El

crecimiento secundario es escaso o nulo por lo que no se forman compartimientos cerrados. Las paredes intercalares nunca alcanzan el centro del escudo.

Acaulospora longula Spain & Schenck

Figs. 1B, 2B, 8, 9.

El escudo de germinación se produce a partir de un proceso de crecimiento primario coclear, con dos a tres espirales en los orbes maduros. El crecimiento secundario es escaso; el margen de los escudo es muy homogéneo, con pliegues muy cortos escasos.

Acaulospora scrobiculata Trappe

Figs. 10, 11.

El escudo de germinación se forma por un proceso de crecimiento primario de tipo coclear, con dos a tres espirales cuando maduros; como parte del crecimiento secundario en su margen se forman pliegues cortos y largos, que dan lugar a paredes intercalares que van de la periferia hacia el centro del escudo. El escudo se tiñe fuertemente con azul de tripano y reacciona al Melzer cambiando de hialino a colores rosa o magenta, lo cual se hace evidente sólo hasta que éste ha alcanzado su madurez, es decir, cuando tiene la capacidad de producir hifas de germinación. Ocasionalmente pueden observarse dos escudos de germinación por espora.

Acaulospora spinosa Walker & Trappe

Figs. 1C, 12-14.

El escudo de germinación se forma por un proceso de crecimiento primario de tipo coclear. A medida que el escudo madura, la pared espiralada continúa su crecimiento hacia los extremos, mientras que en su interior, como parte del crecimiento secundario van formándose pliegues cortos y largos que forman compartimientos abiertos y cerrados. Al término de su desarrollo, el escudo de germinación presenta una morfología muy compleja, constituida por una hélice de hasta cuatro espirales, con numerosos compartimientos. En escudos maduros esta morfología puede parecer corresponder a un patrón diferente del coclear, no obstante, éste se define en los primeros estadios de formación.

Discusión

Mosse (1970a,b) fue quien notó primero la presencia de estructuras peculiares durante la germinación en una especie de *Acaulospora* (citada como "honey-coloured *Endogone*") y aunque no le dió nombre, refirió claramente que tenía "compartimientos", los que mostró en corte transversal. Más tarde, Morton y Benny (1990) observaron nuevamente estructuras como las referidas por Mosse (1970a), a las que llamaron "orbes". Spain (1992) describió las estructuras de germinación para *Acaulospora rehmi* Sieverdin & Toro, *A. scrobiculata*, *A. tuberculata* Janos & Trappe y *A. colombiana* (Spain & Schenck) Kaonongbua, Morton & Bever (citada como *Entrophospora*) y les llamó escudos, como en el género *Scutellospora*. La enmendación del género *Acaulospora*, que condujo al cambio de *E. colombiana* a *A. colombiana* (Kaonongbua et al., 2010) lleva a considerar la posibilidad de que en *Entrophospora* no se formen escudos de germinación, no obstante, esto está sujeto a corroboración. El patrón de desarrollo de los escudos de germinación sigue dos patrones, uno en el cual la estructura comienza como un poro u "hoyo circular", como le llamó Spain (1992) y continua creciendo de la misma forma hasta alcanzar su madurez, lo cual se ha denominado aquí como patrón orbicular (Figs. 1A, 2A). En el segundo patrón, aún cuando la estructura inicia su formación a partir de un poro circular, se desarrolla en forma coclear siguiendo una espiral que puede mantenerse hasta que la estructura madura (1B-C, 2B). Adicional al crecimiento primario en cualquiera de sus dos variantes, puede presentarse o no crecimiento secundario.

Las especies cuyos escudos de germinación presentaron un patrón de crecimiento primario de tipo orbicular fueron *Acaulospora laevis* y *A. mellea*, ambas carentes de ornamentación en la pared estructural y con composición y estructura de paredes similares; no obstante, mientras que en *A. laevis* puede haber o no crecimiento secundario, en *A. mellea* no hay crecimiento secundario o se presenta muy esporádicamente. En el resto de las especies, los escudos se produjeron por un crecimiento primario de tipo coclear, con crecimiento secundario escaso en *A. longula* y *A. scrobiculata*, a abundante y complejo en *A. spinosa*.

En tanto que en *Acaulospora laevis* y en *A. mellea* el cambio morfológico más evidente en los escudos fue la nula o escasa segmentación producida por crecimiento secundario, en *A. longula* y en *A. scrobiculata* destaca el aumento en el número de espirales

presentes en estado maduro, dos a tres en *A. longula* y tres en *A. scrobiculata*. Las observaciones de *A. scrobiculata* concuerdan por completo con las reportadas por Spain (1992) para los escudos maduros de la misma especie, salvo que en el material estudiado aquí, éstos se tiñen fuertemente con azul de tripano y reaccionan al Melzer (Fig. 11). Tal característica es única no sólo entre las especies estudiadas, sino entre los HMA que forman estructuras de germinación. Estas cualidades son indicativas de una composición química peculiar en el escudo de germinación de esta especie.

En contraste, *Acaulospora spinosa* fue la que mostró los cambios más drásticos. Sus escudos en un primer estadio son simples y muy similares a los mostrados por Spain (1992) para *A. rehmi* y por Blaszkowski (1994) para *A. dilatata* Morton. En un estadio posterior, los escudos se asemejan a los mostrados por Spain (1992) para *A. tuberculata*. Es interesante resaltar que no existen diferencias morfológicas notables entre los escudos de germinación de *A. spinosa* y de *A. tuberculata*, situación que aunada al gran parecido morfológico entre ambas (ornamentación de la pared esporal y número y arreglo de las paredes internas), sugieren la posibilidad de que sean conespecíficas. No obstante, para corroborar tal situación es necesario obtener más evidencias morfológicas y moleculares de ambas especies.

Al comparar la secuencia de formación de los escudos de germinación en *Acaulospora* y las descripciones sobre la producción de escudos de germinación en *Scutellospora sensu lato* se encuentra algo muy interesante. Mientras que el proceso en *Acaulospora* se da a través de crecimiento primario y secundario y en el secundario hay al menos dos posibles vías de formación, los datos reportados para *Scutellospora* indican que la estructura se forma por un crecimiento de tipo lobular que da lugar a la formación de compartimientos abiertos, a partir de configuraciones en forma de "U" y "Y" en la zona submarginal del escudo, en especies con escudos morfológicamente sencillos (Fig. 2C) (Walker y Sanders, 1986). Con estas evidencias sería claro que existe divergencia en el proceso de formación de las estructuras de germinación entre ambos géneros, no obstante, cuando se describió a *Scutellospora biornata* Spain, Sieverdin & Toro, especie con un escudo de germinación morfológicamente complejo, se indicó que las primeras fases de desarrollo de la estructura correspondían con lo propuesto por Walker y Sanders (1986), sin embargo, el proceso de formación de lóbulos es completamente incierto (Spain et al.,

1989). Más aún, cuando se describió a *S. projecturata* Kramadibrata & Walker se indicó que sus escudos de germinación son completamente diferentes de los encontrados en el resto de las especies de este género, ya que tienen forma de espiral (Kramadibrata et al., 2000), muy semejante a la encontrada para algunas de las especies estudiadas aquí, aunque se desconoce por completo su proceso de formación. En *Scutellospora* la morfología de los escudos de germinación maduros fue uno de los criterios usados para segregar diferentes géneros (Oehl et al., 2008), algunos de ellos validados en una revisión posterior, resaltando con ello la improtancia taxonómica de la estructura (Redecker et al., 2013).

Conclusiones

Es claro que existen brechas en el conocimiento sobre los procesos de formación de estructuras de germinación en HMA y que conocer su ontogenia en todas las especies que las forman contribuiría a dilucidar las relaciones filogenéticas en estos hongos. De particular interés sería efectuar estudios para dilucidar qué tipo de polisacáridos conforman el escudo de germinación en *A. scrobiculata*, cuyas propiedades son únicas en Acaulosporaceae. Asimismo, es deseable obtener información ultraestructural para definir con mayor claridad el origen y arreglo de los estratos de pared que forman la estructura de germinación.

Agradecimientos

A la Dra. Vivienne Gianinazzi-Pearson ex curadora del Banco Internacional de Glomeromycota (antes Banco Europeo de Glomales) por la donación de cultivos puros de *Acaulospora*. Al Dr. Joseph Spataphora, ex curador de la sección de micología del herbario OSU (antes OSC) por el préstamo de materiales de herbario de *Acaulospora*.

Literatura citada

Bécard, G. y J. A. Fortin. 1990. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* 112:79-83

Blaszkowski, J. 1994. Polish Glomales X. *Acaulospora dilatata* and *Scutellospora dipurpurascens*. *Mycorrhiza* 4:173-182.

Daniels, A. y H. D. Skipper. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. *In* *Methods and principles of mycorrhizal research*, Schenck, N. (ed.). American Phytopathological Society. St. Paul. p. 29-36.

- Dotzler, N., M. Krings, T. N. Taylor y R. Agerer. 2006. Germination shields in *Scutellospora* (Glomeromycota, Diversisporales, Gigasporaceae) from the 400 millio-year-old Rhynie chert. *Mycological Progress* 5:178-184.
- Dotzler, N., C. Walker, M. Krings, H. Hass, H. Kerp, T. N. Taylor y R. Agerer. 2009. Acaulosporoid glomeromycotan spores with a germination shield from the 400-million-years-old Rhynie chert. *Mycological Progress* 8:9-18.
- Douds, D. D. y N. Schenck. 1991. Germination and hyphal growth of VAM fungi during and after storage in soil at 5 matric potential. *Soil Biology and Biochemistry* 23:177-183.
- Font, Q. P. 2000. Diccionario de botánica. Ediciones Península. Barcelona. 1244 p.
- Gazey, C., L. K. Abbott y A. D. Robson. 1993. VA mycorrhizal spores from three species of *Acaulospora*: germination, longevity and hyphal growth. *Mycological Research* 97:785-790.
- Gerdemann, J. H. y T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46:235-244.
- Giovanetti, M. L. 2000. Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. En: Kapulnik Y, IBEG. 2018. <http://i-beg.eu>. Consultada en abril de 2018.
- INVAM. 2018. <https://invam.wvu.edu>. Consultada en abril de 2018.
- Kaonongbua, W., J. B. Morton y J. P. Bever JP. 2010. Taxonomic revision transferring species in *Kuklospora* to *Acaulospora* (Glomeromycota) and a description of *Acaulospora colliculosa* sp. nov. from field collected spores. *Mycologia* 102(6):1497-1509.
- Koske, R. E. y B. Tessier. 1983. A convenient, permanent slide mounting medium. *Mycological Society American Newsletter* 34(2):59.
- Kramadibrata, K., C. Walker, D. Schwartzotts y A. Schüßler. 2000. A new species of *Scutellospora* with a coiled germination shield. *Annals of Botany* 86:21-27.
- Morton, J. y G. L. Benny. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): new order, Glomales, two new suborders: Glomineae and Gigasporinae, and two new families: Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37:471-491.
- Morton, J. y D. Redecker. 2001. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae, and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93:181-195.
- Mosse, B. 1970a. Honey-coloured, sessile *Endogone* spores. I. Life history. *Archives of Microbiology* 70:167-175.

- Mosse, B. 1970b. Honey-coloured, sessile *Endogone* spores. III. Wall structure. Archives of Microbiology 74:146-159.
- Oehl, F., F. A. de Souza y E. Sieverding. 2008. Revision of *Scutellospora* and description of five new genera and three new families in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes. Mycotaxon 106:311-360.
- Redecker, D., A. Schüßler, H. Stockinger, S. L. Stürmer y J. B. Morton. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). Mycorrhiza. DOI 10.1007/s00572-013-0486-y.
- Schüßler, A., A. Schwartzott y C. Walker. 2001. A new fungal Phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. Mycological Research 104(12):1413-1421.
- Sieverding, E, y F. Oehl. 2006. Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. Journal of Applied Botany and Food Quality 80:69-81.
- Smith, S.E. y D. Read. 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3a ed. Academic Press, Nueva York, Nueva York. 787 p.
- Souza T. 2015. Hadbook of arbuscular mycorrhizal fungi. Springer. Heidelberg.150 p.
- Spain, J. L. 1992. Patency of shields in water mounted spores of four species in Acaulosporaceae (Glomales). Mycotaxon 43:331-339.
- Spain, J. L., E. Sieverding y S. T. Toro. 1989. *Scutellospora biornata*: a new species in the Endogonaceae from the Llanos Orientales of Colombia. Mycotaxon 35:219-227.
- Spatafora, J. W., Y. Chang, G. L. Benny, K. Lazarus, M. E. Smith, M. L. Berbee, G. Bonito, N. Corradi, I. Grigoriev, A. Grygranskyii, T. Y. James, K. O'Donell, R. W. Roberson, T. N.
- Stearn, W. T. 1992. Botanical latin. 4a ed. Timber Press. Portland. 546 p.
- Sylvia, D. M. 1999. Mycorrhizal symbiosis. In Principles and applications of soil microbiology.
- 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.

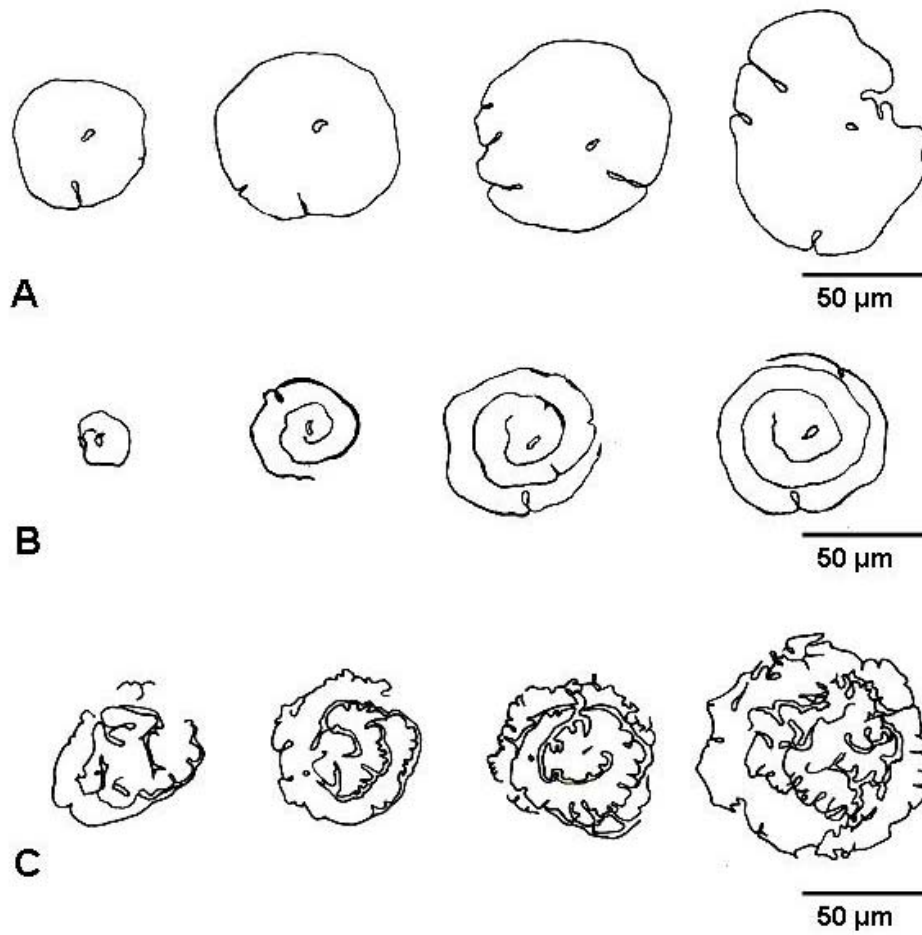


Fig. 1. Representación de la secuencia morfológica del desarrollo del escudo de germinación. A. *Acaulospora laevis*. B. *Acaulospora longula*. C. *Acaulospora spinosa*. Las ilustraciones se elaboraron con una cámara lúcida acoplada al microscopio.

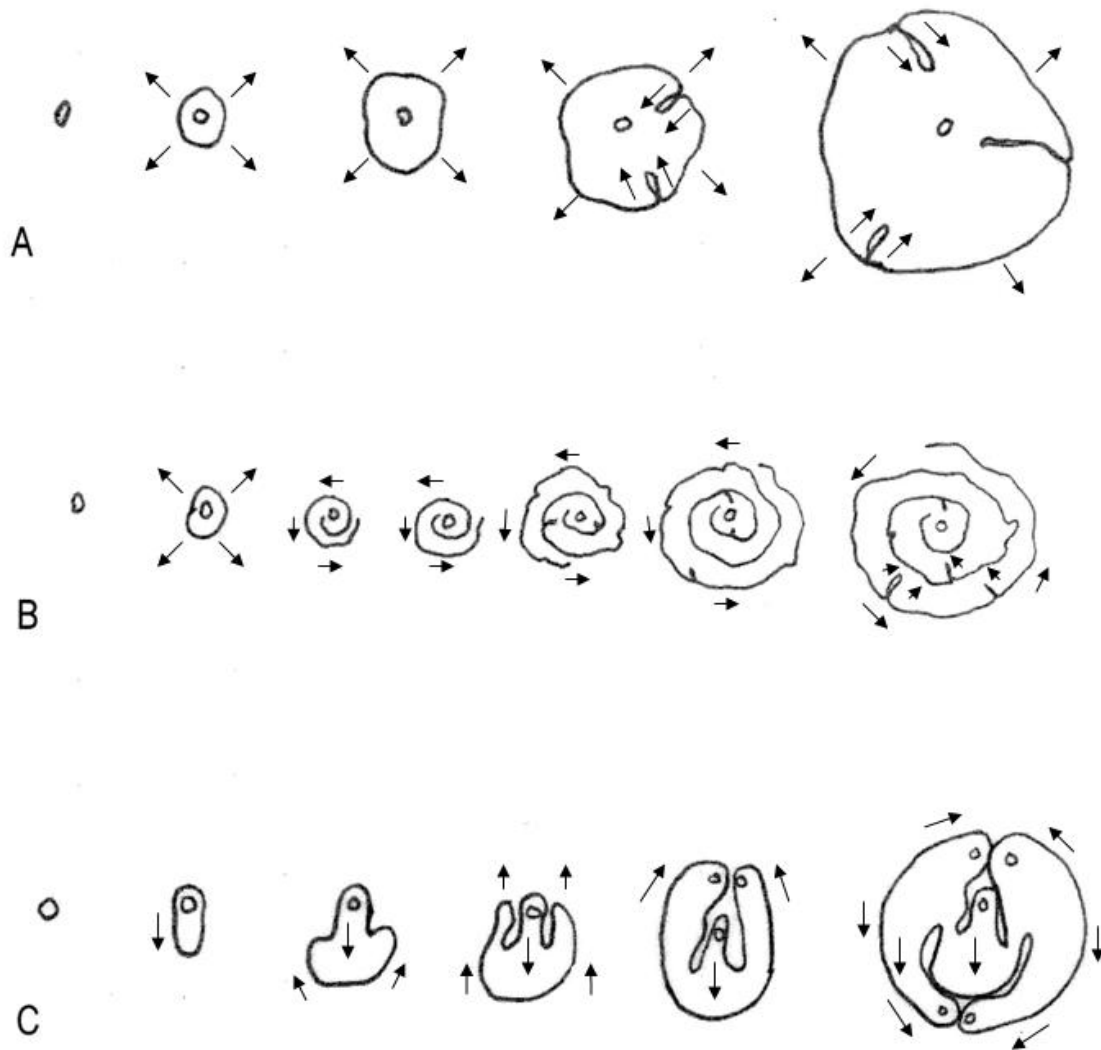
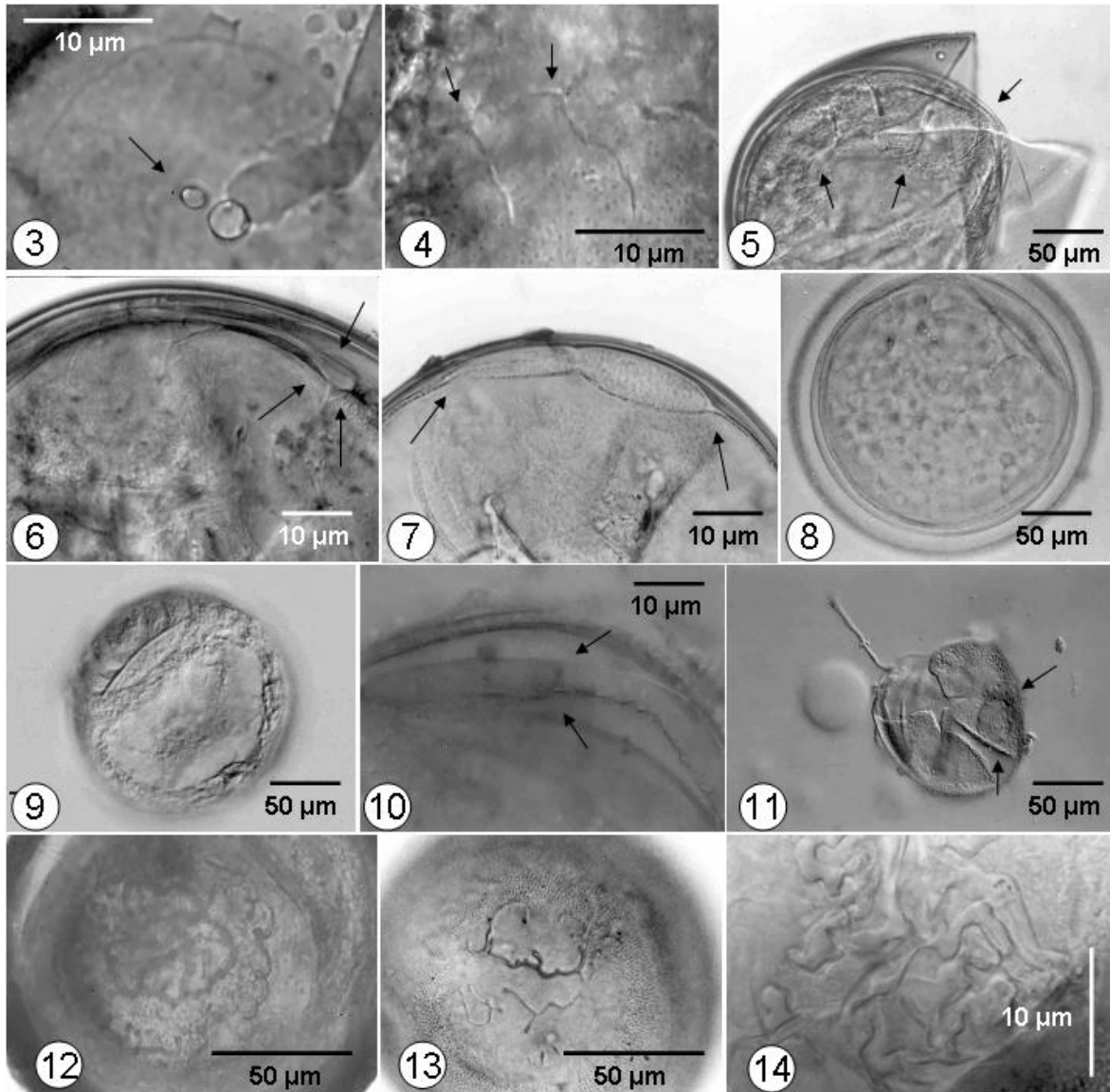


Fig. 2. Representación del proceso de formación de los escudos de germinación en *Acaulospora* y en *Scutellospora*. A. Proceso orbicular presente en *A. laevis* y *A. mellea*. B. Proceso coclear en *A. longula*, *A. scrobiculata* y *A. spinosa*. C. Proceso lobular en *Scutellospora* (la imagen para este género fue tomada de Walker y Sanders, 1986). Las flechas muestran la dirección del flujo de citoplasma y de formación de las paredes intercalares. Las ilustraciones se elaboraron con una cámara lúcida acoplada al microscopio.



Figs. 3-14. Escudos de germinación en las especies de *Acaulospora*. 3. Escudo orbicular en *A. laevis* con un poro interno y una hifa de germinación. 4. Vista frontal del escudo de *A. laevis* con dos paredes intercalares. 5. Vista transversal del escudo de *A. laevis* con dos paredes intercalares largas. 6. Vista transversal de una espora de *A. mellea* mostrando el poro en el grupo más interno de estratos de pared y el flujo de citoplasma al espacio por encima de él. 7. Escudo en *A. mellea*, ubicado entre los dos grupos internos de pared (GW1, GW2). 8. Espora de *A. longula* mostrando la acumulación de citoplasma en el sitio donde se formará el escudo. 9. Espora de *A. longula* mostrando la acumulación de citoplasma y el escudo coclear. 10. Escudo de germinación en *A. scrobiculata* mostrando la reacción al Melzer. 11. Espora de *A. scrobiculata* mostrando el escudo teñido con Melzer y una hifa de germinación. 12. Vista frontal de un escudo coclear con crecimiento secundario en *A. spinosa*. 13. Vista frontal de una sección del escudo de germinación de *A. spinosa* mostrando paredes intercalares que forman compartimientos abiertos. 14. Vista frontal del escudo de *A. spinosa* sin el grupo externo de pared de la espora, mostrando las paredes intercalares que forman una morfología compleja.

Germination shields and hyphae in three arbuscular mycorrhizal fungi (Acaulosporaceae, Glomeromycotina)

^ALaura V. Hernández-Cuevas, ^BArturo Estrada-Torres, ^CRonald Ferrera-Cerrato and ^DJ.F. Efraín de Luna García

^ACentro de Investigación en Genética y Ambiente, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Km 10.5 Autopista Texmelucan-Tlaxcala, Ixtacuixtla, 90 120, Tlaxcala, México; ^BCentro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Km 1.5 carretera federal Tlaxcala-Puebla, Tlaxcala 90000, Tlaxcala, México, México. ^CÁrea de Microbiología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 carretera federal México-Texcoco, Montecillo, 56 230, Texcoco, Estado de México, México; ^DDepartamento de Morfometría, Instituto de Ecología, Km 2.5 carretera antigua Xalapa-Coatepec, 91 000, Xalapa, Veracruz, México.

Abstract. In this paper we describe the morphology of germination shields and hyphae in three species of arbuscular mycorrhizal fungi: *Acaulospora bireticulata*, *A. laevis* and *A. spinosa*, from spores obtained from propagation pots and pure pot cultures. The germination shield in all three species look like a circular to semi-circular inverted saucer, but while in *A. laevis* it is slightly segmented at its periphery, in *A. bireticulata* and *A. spinosa* it is completely segmented. Germination hyphae show particular branching patterns for each species. Small hyphal swellings on short branches of germination hyphae were observed on *A. laevis*. The role of these structures is discussed.

Keywords: *Acaulospora bireticulata*, *Acaulospora laevis*, *Acaulospora spinosa*, hyphal branching, spore dimorphism.

Introduction

Spore germination is one of the most important events during life history of many organisms, such as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (Glomeromycotina) (Giovannetti 2000). The AMF have several survival and dispersal mechanism, such as spread through root fragments with vesicles (Giovannetti 2000). However, it has been proposed the germination of spores is crucial to achieve mycorrhizal symbiosis in some species of these fungi, such as Acaulosporaceae (Tommerup and Abbott 1981, Tommerup 1983, Gazey et al. 1993). AMF exhibit several mechanism of germination. In *Glomus* and allied genera the

germination hyphae frequently emerges through the remains of the sporogenous hyphae (Daniels 1984, Giovannetti 2000, Redecker et al. 2013), or directly through the spore wall (Miranda and Harris 1994, Redecker et al. 2013). In *Gigaspora* the hypha originates from a germination layer with an area highly warted from which it emerges directly through the wall, while in *Scutellospora*, *Acaulospora*, *Archaeospora*, *Ambispora*, *Entrophospora* and *Pacispora* from Diversisporales Order the germination hypha is produced from a special structure called shield (Walker and Sanders 1986, Spain 1992, Hafeel 2004, Dalpé and Declerck 2010, INVAM 2018). In all these genera the germination process seems to be linked to groups of species and to have an evolutionary significance (Redecker et al. 2013), which could be supported by the analysis of molecular and morphological data. Nevertheless, until now there are very few studies about the morphology of germination structures in AMF, and *Acaulospora* genus is one of this.

In one of the first ones TEM studies of the cell wall structure of the AMF, on "honey coloured spores" now recognized as *Acaulospora laevis*, compartments inside the spores from which germination hyphae arise were shown (Mosse 1970a). The formation of those structures was described in this way: "at this time splits occur in the spore wall, and cytoplasm accumulates within them. New wall material is laid down as a lining within the split wall and new radial walls are also formed, creating a series of peripheral compartments with normal cytoplasm and several nuclei" (Mosse 1970a). Similar compartments were also observed and called "orbs" by Morton and Benny (1990) in crusehd spores of *A. delicata*. Spain (1992) described the germination structures of *A. colombiana* (cited as *Entrophospora colombiana*), *A. rehmii*, *A. scrobiculata* and *A. tuberculata*, from water mounted spores with and without structural wall, and named as germination shields. Later Blaszkowski (1994) observed "hyphal twisters" inside the spores of *A. dilatata* which he linked to germination, without more attention. Nowadays the germination shield is one important feature for the recognition of *Acaulospora* genus (Kaonongbua et al. 2010, Redecker et al. 2013, INVAM 2018). Its presence is pointed out in all modern taxonomical descriptions of *Acaulospora* species, however, the morphology of this structure is almost unknown. To solve this lack of information about the germination structures in *Acaulospora* genus more studies must be done. This study is one of they, it

was focused on the description of germination shields and hyphae in three species of this genus.

Materials and methods

Spores of *Acaulospora bireticulata*, *A. laevis* and *A. spinosa* were isolated from pure pot cultures and propagation pots from the Arbuscular Mycorrhizal Fungi Collection of The Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico. Spores were extracted from substrata by wet sieving and decanting (Gerdemann and Nicolson 1963), followed by centrifugation with sucrose gradient (20 and 60%, w:v) (Daniels and Skipper 1982). They were maintained at 4 °C for five days in sterile distilled water to overcome dormancy. Six essays of germination were carried out for each species. Two of them were done on Petri dishes with a 1:1 mixture of wet sand and vermiculite sterilized (1.3 kg/cm² pressure for 30 minutes); on the mixture were putted ten 10X10 mm Millipore filter paper sandwiches. Each sandwich contained five spores, so 50 spores were included on every dish. The other four essays consisted of Petri dishes with agar water (5%) as support. Ten plates were prepared for each species, for *A. bireticulata* were placed 10 spores per plate, while for *A. laevis* and *A. spinosa* were placed 12. The spores were removed from water and placed in sterile distilled water with a drop of Tween 80 for five minutes to break surface tension, then, they were superficially disinfected with sodium hypochlorite (1%) for 20 minutes (modified from Tommerup and Kidby 1980), and washed three times with sterile distilled water (Daniels and Graham 1976), and placed inside the Millipore sandwiches or directly on the agar surface. All the procedures were carried out under aseptic conditions in a vertical laminar flow chamber. Plates were kept in darkness at 26 °C up to 34 days. Spores from one plate of each essay were removed every third day to observe their content, wall layers and germination structures. Prior of germination essays, fifty spores of each species were observed in order to register the morphological appearance of both, the wall and the cytoplasm.

Germinating hyphae on Millipore filters and on agar were stained using a drop of Trypan blue (0.05%) before they were removed for microscopic observations (Gazey et al. 1993). Some spores were mounted in water (Spain 1992), the remainder were mounted on permanent slides with PVLG and PVLG + Melzer's reagent (Koske and Tessier 1983). All

observations were made using a photomicroscope with Nomarski Interference Contrast (Nikon Optiphot-2 Plus). Germination structures, i.e. shields and hyphae were measured with an optic micrometer. The size of the structures indicates the most frequent values, with the extreme lower and higher sizes in parenthesis. Terminology for naming walls follows INVAM (2018). Six hundred, 680 and 980 spores from all the essays were observed for *A. bireticulata*, *A. laevis* and *A. spinosa*, respectively. Germination percentages per each species were obtained by total frequency after all essays were done.

The identity of species was confirmed using voucher specimens from Oregon State University Herbarium, registered as OSU (former OSC): *A. bireticulata* (voucher specimen: OSC 39 477), *A. laevis* (voucher specimen: OSC 30 814, paratype), and *A. spinosa* (voucher specimen: OSC 40 078, isotype). The nomenclature of the studied species is in accordance to www.indexfungorum.org. Voucher specimens were lodged at the herbarium TLXM, housed by the Universidad Autónoma de Tlaxcala, specimens are indicated as HC for Hernández-Cuevas collector.

Results

Acaulospora bireticulata F. M. Rothwell & Trappe

Figures 1-4.

Shield hyaline, oval to elliptic in outline, 26-44 X 74.5-120 μm ; multisegmented; convex in transverse view, 5.5-0 μm wide at the center, 1-1.5 μm at the edge; up to four compartments could be seen in transverse view. Shield's wall, 1.5-2.5 μm thick at the center, 0.5-1 μm beyond. Each shield has 6-10 germination pores, 1.5-2 μm in diameter. The shield is formed in between the innermost layer of the germination wall 1 (GW1) and the beaded layer of the germination wall 2 (GW2).

The germination hypha emerges from the shield through a pore in the spore wall. As many as four hyphae with rounded apices arise simultaneously, 2-3 μm in diameter near the spore, 3-4 μm beyond. Hyphal wall up to 0.5 μm thick. The branches are simple, di- or trichotomous. In around 30% of the germinated spores, the hyphae branches immediately after their emergence from the spore, so close as 3 μm , while in the rest the first branch is produced at 20 μm or more from the spore. In approximately 10% of the hyphae produced,

up to six branches along one hypha may be formed, Hyphal content is uniformly granular, hyaline, and stains strongly with Trypan blue; 12% of the spores germinated.

Acaulospora laevis Gerd. & Trappe

Figures 5-11.

Shield hyaline, circular to semi-circular, 42-113 μm diameter, to oval (39-) 52 X 98 (-200) μm , with 2-5 faint segments or without them. Segments when present are similar in form and size. Shield convex in transverse view, 6-11 μm wide at the center, 1.5-3 μm at the edge; four to six compartments could be seen in transverse view. Shield's wall not thickened or slightly, 1-1.5 μm . Each shield has (1-) 2-4 germination pores, (1.5-) 2-3 (-4) μm in diameter. The shield is formed in between the innermost layer of GW1 and the beaded layer of GW2.

Germinating hypha emerges from the shield through a pore in the spore wall. Each shield produces one to four hyphae, (3-) 6-6.5 (-8) μm in diameter at the base, narrowing to (3-) 4.5-5 (-6) μm along it, thickness up to 8-9 μm at the rounded apex, occasionally irregularly septate. Hyphal walls 1-1.5 μm thick. The branches are dichotomous or simple. On twice experiments were formed up to 17 branches along one hypha. In 80% of the observed hyphae, they divide in two branches with 180° angle in between. The branches are produced very near to the spores, 3-4 μm in distance, occasionally far away, >50. Hyphal content uniform, granular, hyaline and stains strongly with Trypan blue. Occasionally, on short branches of the hyphae one or two hyaline globose hyphal swellings, 26 μm in diameter, or ellipsoid 14 X 26 μm , with a 0.5 μm thick single wall, supported by a cylindrical hypha, 4 μm in diameter and up to 15 μm long are formed; 40% of the spores germinated.

Acaulospora spinosa C. Walker & Trappe

Figures 12-17.

Shield hyaline, circular, 92-117 μm in diameter, to semicircular or ellipsoid, (41-) 84-113 X (49-) 51-86 (-107) μm ; multi-segmented with a very intricate appearance. Segments at the edge and in the center are irregular in form, separate from each other by short walls with broad margins. Shield convex in transverse view, 4-9 μm wide at the center, 1.5-2.5 μm at

the edge; six to eight compartments could be seen in transverse view, with a wall 1.5 μm thick. Each shield has 2-6 germination pores, 1.5-4 μm in diameter, located at the periphery. The shield is formed in between the innermost layer of GW1 and the beaded layer of GW2.

Germinating hyphae emerge from the shield through pores in the spore wall. Each shield produces simultaneously two to four hyphae, (4-) 5-6 (-8.5) μm wide at the base, narrowing to 3-4 (-5) μm at the rounded apex. Hyphal wall up to 1 μm thick. The branches are simple, di- or trichotomous, being most frequent the first ones. The branching is produced near to the spore, with the first branch at 4-15 (-17) μm from it. In a 5% of the hyphae produced, up to seven branches formed along one hypha may be produced. Hyphal content uniform, granular, and stains strongly with Trypan blue; 43% of the spores germinated.

In all the three species it is possible to see a change in the content of the spores from globular appearance, due to the presence of large lipid droplets inside, to uniformly granular, concentrating toward a pole when the spore is ready for germination, site where the shield will be formed. In fact, the shield put in touch all the walls when the germination tube emerges from inside, penetrating all the spore walls. Then, the spore wall (SW) and the inner walls GW1 and GW2 are visible separately only beyond the shield zone.

Discussion

Shield of germination. The germination shields of *Acaulospora laevis* are morphologically simple, while those of *A. bireticulata* and *A. spinosa* are complex. The shields of *A. spinosa* are always multi-segmented, with a complex morphology. Spain (1992) described the germination structures of four species of *Acaulospora*, ranging from simple spirals in *A. colombiana*, *A. rehmi* and *A. scrobiculata* to complex structures in *A. tuberculata*. The morphology of the shield of this last one species is similar to that found for *A. spinosa*. The spores of these two species exhibit curiously similar morphology, which has conducted to proposal of them as conspecific, however both are considered as valid species. Particularly interesting is the simple morphology found in *A. laevis* shields, which shows very few segments on its more complex forms, but never a spiral or complex multi-segmented shield. Spain (1992) pointed out the morphology of the germination structure could be

constant for each species, which seems to be true for the taxa described in this study. One constant feature of the shields in all the studied *Acaulospora* is the thickening margins of the segments, almost inconspicuous for *A. laevis*, much more evident at the center of the shield and larger shields of *A. bireticulata* and *A. spinosa*. This probably results from the thickening of intercalate walls.

Spain (1992) suggested that germination shields are formed by the cytoplasmic flow inside the spore through a hole produced in the inner wall layers, such as happens in *Scutellospora* and allied genera (Walker and Sanders 1986). In an ultrastructural study, Mosse (1970a) pointed out that the compartments of *A. laevis* were built by a cytoplasmic accumulation produced in between the wall layers after they become split and separated, and also by the synthesis of new wall material, which forms the cover and intercalate walls of the orb (Mosse 1970b). Results of this study, and the morphology of the shields observed by Spain (1992) support this idea, however, this situation will be conclusive until the morphology and ultrastructure of shields in all the species of *Acaulospora* be known.

Morton and Benny (1990) proposed the shields as ephemeral structures, visible only after germination, when the spore is empty. Spain (1992) indicated that the use of PVLG as mountant was deleterious for orbs because they are very frail structures. The descriptions of this author were based on spores mounted in water, usually after removing the external wall layers. The observations of this study were done on spores mounted in water, PVLG, and PVLG + Melzer's reagent, and shown not difficult to seeing them in both plain and transverse views. In fact, the shields were best observed in such mountants, even years later. Large shields of *Acaulospora spinosa* are noticed from medium magnification (20X) and those of *A. laevis* and *A. bireticulata* from semi-high magnification (40X). In fact, these shields must be observed at higher magnification due to the simplicity of the shields in one case (*A. laevis*), and the colour and double ornamentation on spore surface in the other (*A. bireticulata*) which obstruct the structure beneath it. The previously reported difficulties to observe the shields could be the result of their position or degree of maturity, which make them seem completely translucent and small at the beginning of their formation.

These data suggest that morphology of shields could be used as an additional feature for taxa identification and complementary evidence to improve the phylogenetic relationships found until now among genera that produce germination structures. This idea

was originally pointed out by Simon et al. (1993) and Simon (1996), reincorporated and emphasized by Schüßler et al. (2001), used along with molecular data for Oehl et al. (2008) for the proposal of new genera segregated from *Scutellospora*, the first genus on which were found and described germination structures, and recently reanalyzed for Redecker et al. (2013) for the recognition or rejection of proposed genera. Undoubtedly, the germination structures contain evolutionary information, exhibited on different morphologies, however, in *Acaulospora* and other genera with shields, this could not be corroborated until their morphology and ontogeny will be describe in a higher number of species. Furthermore, once the data will be obtained, two basic problems of phylogenetic analysis must be overcome. First, must be distinguished all classes of phylogenetic changes in ontogeny (Mabee 2000), and second, all the selected data must be submitted to homology tests (Kitching et al. 1998). Both actions are crucial due the misinterpretation of ontogenetic data or the selection of not homologous characters could lead to erroneous conclusions.

Germination hyphae and hyphal growth. All the studied species produce several germination hyphae. However, this condition was more frequent in *Acaulospora laevis*. In this species Mosse (1970a), Tommerup and Kidby (1980) and Gazey et al. (1993) reported the production of several germination hyphae for each spore. Tommerup and Kidby (1980) found up to five. Although the hyphae produced by the three species branching repeatedly, the frequency of branching pattern seems to be particular for each one (Figs 1-3). The hypha frequently bifurcates immediately after its emergence from the spore in *Acaulospora laevis*, with the branches running away in opposite directions, forming a $\approx 180^\circ$ angle, and also produce trichotomous branches. In *Acaulospora bireticulata* and *A. spinosa* the simple branching pattern is more frequent than the dichotomous, and the branches formed are generally perpendicular to the principal axis, i.e. they form a $\approx 90^\circ$ angle. This last branching pattern has been noticed only for *Scutellospora gregaria* (Bianciotto et al. 1989).

Despite the significance and ecological implications of the knowledge about hyphal growth patterns they are been mostly studied in Glomeraceae and Gigasporaceae AMF (Giovannetti et al. 1993, Bago et al. 2004, Akiyama et al. 2005, Nagahashi and Douds 2011), and barely on Acaulosporaceae (Gazey et al. 1993). The particular branching patterns of each species hyphae could represent different strategies to improve the

exploration of substrata and to achieve a maximum use of them to find host roots (Giovannetti 2000, Hart and Reader 2002), this could be true for the species of *Acaulospora* studied here, which shown different patterns of branching, and even of hyphae produced. On some branches of the germination hyphae of *A. laevis*, some globose or ellipsoid hyphal swellings were found. Similar structures in Acaulosporaceae were previously reported for *A. sporocarpia* (Berch 1985), *A. thomii* (Blaszkowski 1988) and *A. rehmi* (Dalpé and Declerck 2002). These last authors proposed the structures (produced on *in vitro* culture) as evidence of functionality of the symbiotic association like energy storages to support sporulation. Recently this kind of structures were found in *A. cavernata*, *A. delicata*, *A. laevis* and *A. spinosa* (Taylor et al. 2013), mainly on germination hyphae, proposing them as glomoid spores and the genus as dimorphic. However, the authors pointed out the lack of evidence about their capacity to germinate or to accomplish any other function. In contrast in *A. fragilissima* and *A. saccata*, two new species, the spores are produced without a saccule's differentiation, i.e. as glomoid spores (Crossay et al. 2018). This evidence suggest the polimorphic character of *Acaulospora* genus, however, to support this hypotheses it should know if those structures are formed by more or all the species of *Acaulospora* and how they function in order to explore their relationships with another fungal structures and processes.

Conclusions

Germination shields in *Acaulospora* species exhibit different morphologies, from simple in *A. laevis*, to complex in *A. bireticulata* and *A. spinosa*. All the species produce simultaneously several hyphae of germination, branching early and profusely after their emergence. This could be a fungal strategy to find suitable hosts. The production of globose swellings on hyphae of germination is a phenomenon that should be studied to discover their functions, and to dilucidate clearly the spore polimorphism in *Acaulospora*.

Aknowledgements

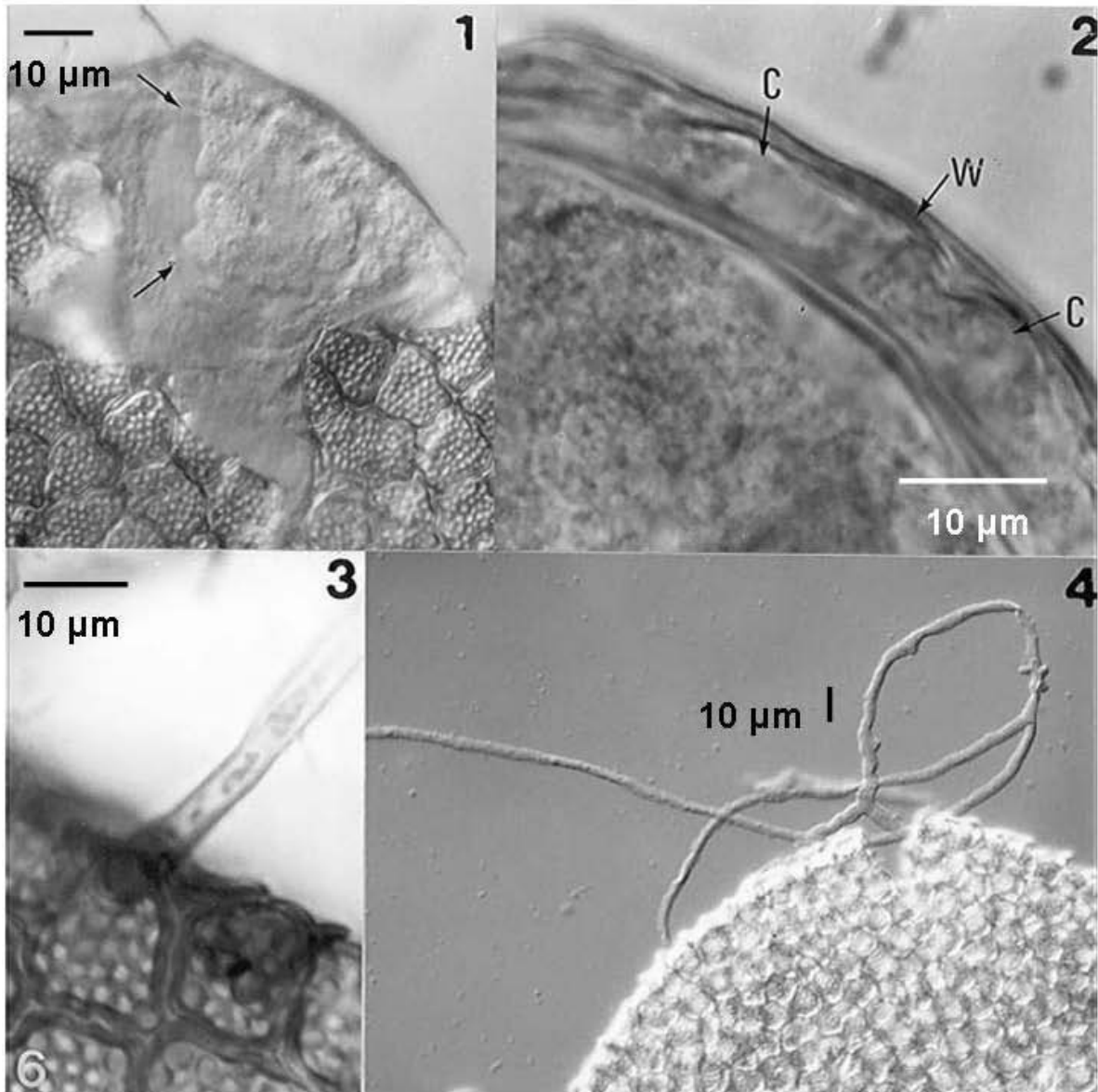
Dr. J. Spataphora ex Curator of Mycological Section of OSU Herbarium (former OSC) for the loan of voucher specimens. Mr. David Mitchell and Dr. Rodham E. Tulloss help to improve the language.

References

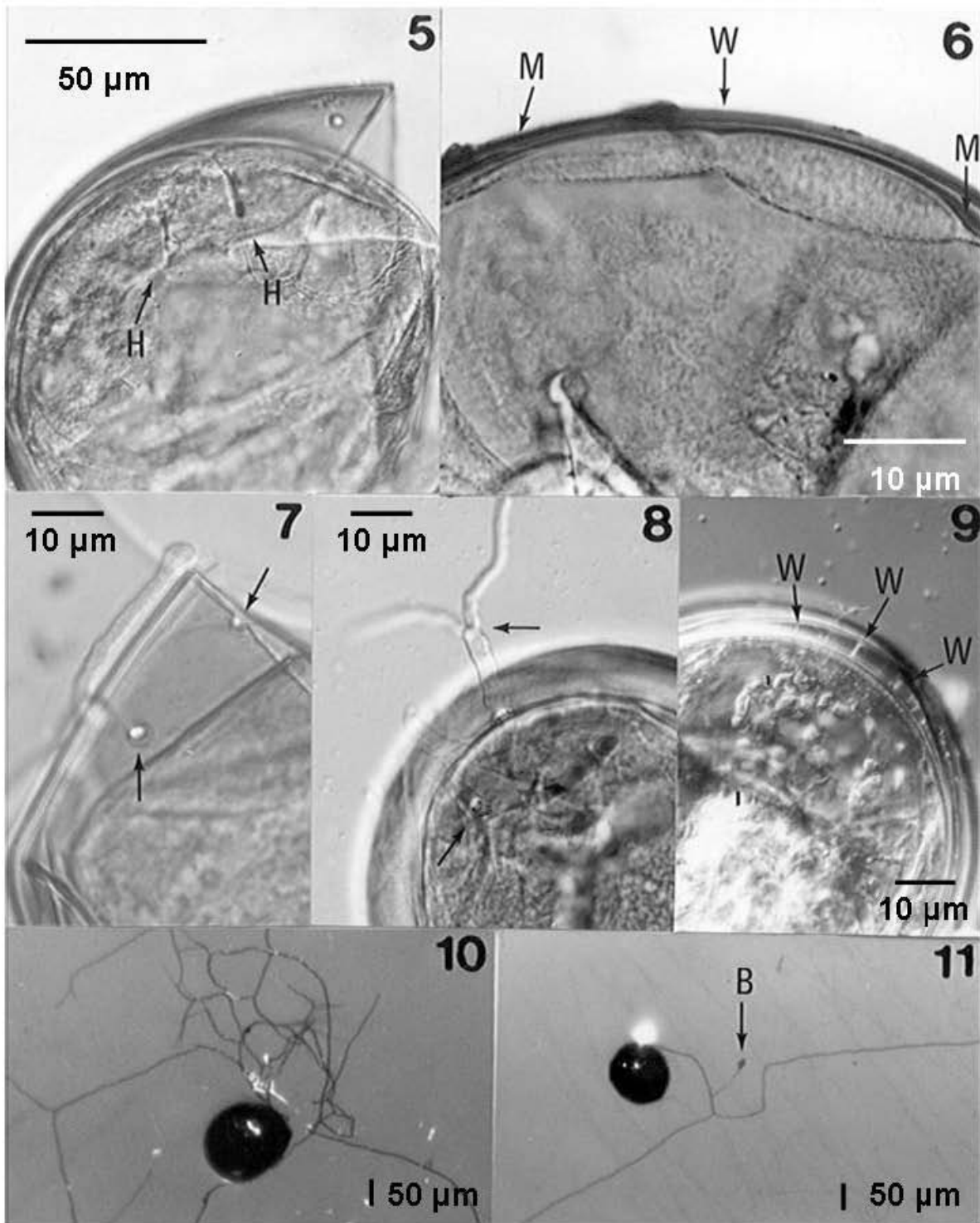
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature Letters* 435: 824-827.
- Bago B, Cano C, Azcón-Aguilar C, Samson J, Coughlan AP, Piché Y. 2004. Differential morphogenesis of the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus grown monoxenically on spatially heterogeneous culture media. *Mycologia* 96(3): 452-462.
- Berch S. 1985. *Acaulospora sporocarpia*, a new, sporocarpic species, and emendation of the genus *Acaulospora* (Endogonaceae, Zygomycotina). *Mycotaxon* 23: 409-418.
- Bianciotto V, Palazzo D, Bonfante-Fasolo P. 1989. Germination process and hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Allionia* 29: 17-24.
- Blaszkowski J. 1988. Four new species of the Endogonaceae (Zygomycotina) from Poland. *Karstenia* 27: 37-42.
- Blaszkowski J. 1994. Polish Glomales X. *Acaulospora dilatata* and *Scutellospora dipurpurascens*. *Mycorrhiza* 4:173-182.
- Crossay T, Cilia A, Cavaloc Y, Amir H, Redecker D. 2018. Four new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) associated with endemic plants from ultramafic soils of New Caledonia. *Micol. Prog.* doi:10.1007/s11557-018-1386-5.
- Dalpe Y, Declerck S. 2002. Development of *Acaulospora rehmii* spore and hyphal swellings under root-organ culture. *Mycologia* 94(5): 850-855.
- Daniels A. 1984. Spore germination *in vitro* culture of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: Ferguson JJ (Ed.). *Applications of mycorrhizal fungi in crop production*. University of Florida. Gainesville.
- Daniels A, Skipper HD. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: *Methods and principles of mycorrhizal research*, Schenck, N. (ed.). American Phytopathological Society. St. Paul: 29-36.
- Daniels A, Graham SO. 1976. Effects of nutrition and soils extracts on germination of *Glomus mosseae* spores. *Mycologia* 68: 108.
- Gazey C, Abbott LK, Robson AD. 1993. VA mycorrhizal spores from three species of *Acaulospora*: germination, longevity and hyphal growth. *Mycological Research* 97: 785-790.
- Gerdemann JH, Nicolson TH. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235-244.
- Giovanetti ML. 2000. Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. In: Kapulnik Y, Douds DD Jr. (Eds.). *Arbuscular mycorrhizas: Structure and function*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 47-68.
- Giovanetti M, Sbrana C, Avio L, Citernesi AS, Logi C. 1993. Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytol.* 125: 587-593.
- Hafeel KM. 2004. Spore ontogeny of the arbuscular mycorrhizal fungus *Archaeospora trappei* (Ames & Linderman) Morton & Redecker (Archaeosporaceae). *Mycorrhiza* 14: 213-219.
- Hart MM, Reader RJ. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol. Trust* 153(2): 335-344. doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00312.x.

- INVAM. 2018. <https://invam.wvu.edu>.
- Kaonongbua W, Morton JB, Bever JP. 2010. Taxonomic revision transferring species in *Kuklospora* to *Acaulospora* (Glomeromycota) and a description of *Acaulospora colliculosa* sp. nov. from field collected spores. *Mycologia* 102(6): 1497-1509.
- Kitching IJ, Forey PL, Humphries CJ, Williams DM. 1998. *Cladistics*. Oxford University Press, Oxford.
- Koske RE, Tessier B. 1983. A convenient, permanent slide mounting medium. *Mycological Society American Newsletter* 34(2): 59.
- Mabee P. 2000. The usefulness of ontogeny in interpreting morphological characters. In: Wiens JJ (Ed.). *Phylogenetical analysis of morphological data*. Smithsonian Institution Press. Washington.
- Miranda JCC, Harris PJ. 1994. Effects of soil phosphorus on spore germination and hyphal growth for arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 128: 103-108.
- Morton J, Benny GL. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): New order, Glomales, two new suborders: Glomineae and Gigasporineae, and two new families: Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491.
- Mosse B. 1970a. Honey-coloured, sessile *Endogone* spores. I. Life story. *Arch. Mikrobiol.* 70:167-175.
- Mosse B. 1970b. Honey-coloured, sessile *Endogone* spores. III. Wall structure. *Arch. Mikrobiol.* 74:156-159.
- Nagahashi G, Douds DD Jr. 2011. The effects of hydroxy fatty acids on the hyphal branching or germinated spores of AM fungi. *Fungal Biology* 115: 351-358.
- Oehl F, Souza FA, Sieverding E. 2008. Revision of *Scutellospora* and description of five new genera and three new families in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes. *Mycotaxon* 106:311-360.
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer SL, Morton JB. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*. DOI 10.1007/s00572-013-0486-y.
- Spain JL. 1992. Patency of shields in water mounted spores of four species in Acaulosporaceae (Glomales). *Mycotaxon* 43: 331-339.
- Schüßler A, Schwartzott A, Walker C. 2001. A new fungal Phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105(12): 1413-1421.
- Simon L. 1996. Phylogeny of the Glomales: deciphering the past to understand the present. *New Phytol.* 133: 95-101.
- Simon L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular plants. *Nature* 363: 67-69.
- Taylor A, Walker C, Bending GD. 2013. Dimorphic spore production in the genus *Acaulospora*. *Mycoscience*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2013.03.001>.
- Tommerup IC. 1983. Temperature relations of spore germination and hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82: 193-202.
- Tommerup IC, Abbott L. 1981. Long term survival and renewed growth of VA mycorrhizal hyphae after root death. *Soil Biol. Biochem.* 13: 431-433.

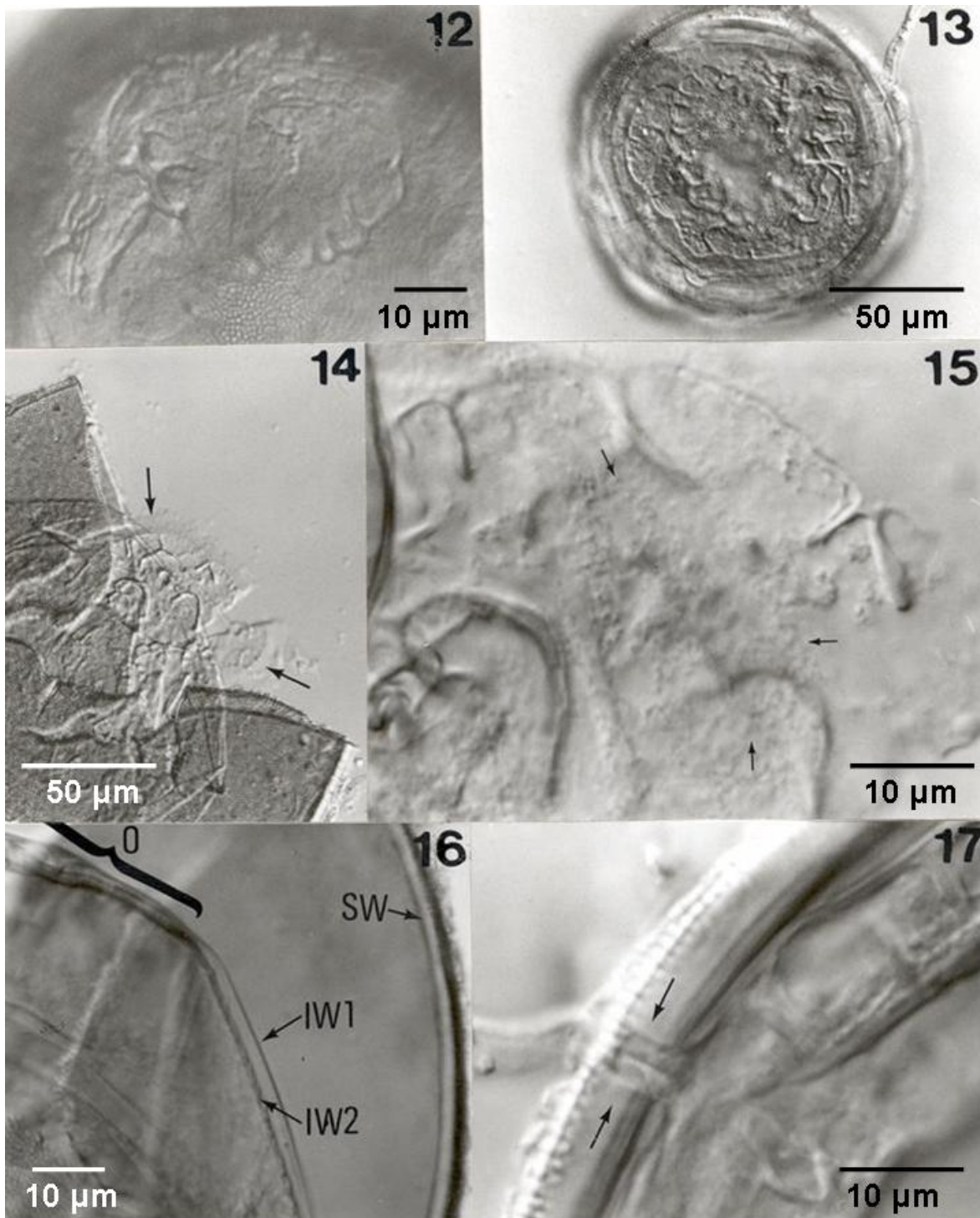
- Tommerup IC, Kidby DK. 1980. Production of aseptic spores of vesicular-arbuscular endophytes and their viability after chemical and physical stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 39(6): 1111-1119.
- Walker C, Sanders FE. 1986. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* *gen. nov.* from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. *Mycotaxon* 27: 169-182.



Figs. 1-4. *Acaulospora bireticulata*. 1. Germination shield in surface view (NIC 500X, specimen HC 2419). 2. Compartments (C) an intercalary wall (W) in transversal view (NIC 1250X, water). 3. Emergence of the germination hypha (NIC 1250X, water). 4. Germination hypha branching (NIC 125X, water).



Figs. 5-11. *Acaulospora laevis*. 5. Germination shield in transversal view showing two intercalate walls (F) (NIC 250X, HC 2407). 6. Germination shield in transversal view showing the margins (M), one intercalate wall (W), and the excrescences of the beaded layer. 7. Germination pores in the outermost layers group (NIC 500X, specimen HC 2437). 8. Germination hyphae branching (NIC 250X, specimen HC 2437). 9. Germination shield in transversal view showing the compartments (C) and intercalate walls (W) (NIC 250X, specimen HC 2393). 10. Multiple branching on germination hyphae (34X). 11. Bulbous structure (B) on germination hypha (38X, agar).



Figs. 12-17. *Acaulospora spinosa*. 12. Germination shield in an initial stage of formation (NIC 500X, specimen HC 2370). 13. Mature germination shield with one germination hypha (NIC 250X, specimen HC 2387). 14. Open spore showing the shield in the innermost layers group (NIC 250X, specimen HC 2401). 15. Shield in surface view showing the excrecences of the layer under it (NIC 1250X, specimen HC 2401). 16. Spore in transversal view showing the spore wall (SP), the germination walls (IW1, IW2), and the shield zone (O) (NIC 500X, specimen HC 2405). 17. Germination hyphae coming out through external layers from one compartment (NIC 1250X, specimen HC 2392).

Datos morfológicos en Glomeromycotina (Mucoromycota, Fungi): el género *Acaulospora*

L. Hernández-Cuevas¹, A. Estrada-Torres², R. Ferrera-Cerrato³ y E. de Luna⁴

¹Centro de Investigación en Genética y Ambiente, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Km 10.5 Autopista Texmelucan-Tlaxcala, Ixtacuixtla, 90 120, Tlaxcala, México; ²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Km 1.5 carretera federal Tlaxcala-Puebla, Tlaxcala 90000, Tlaxcala, México, México. ³Área de Microbiología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 carretera federal México-Texcoco, Montecillo, 56 230, Texcoco, Estado de México, México; ⁴Departamento de Morfometría, Instituto de Ecología, Km 2.5 carretera antigua Xalapa-Coatepec, 91 000, Xalapa, Veracruz, México.

Resumen: Los glomeromicetos son habitantes comunes del suelo, donde establecen un mutualismo obligado con las raíces de un gran número de plantas silvestres y cultivadas. Por mucho tiempo se asumió que eran simbiosistas generalistas, ahora se sabe que distintos géneros y especies se asocian diferencialmente con las especies vegetales, provocando en ellas respuestas variables, de ahí la importancia de conocer su identidad. No obstante que existen distintos procedimientos de análisis molecular para identificar a estos hongos, el método tradicional, que sigue vigente, comprende la observación de las características morfológicas de las esporas. Para contribuir a mejorar y a ampliar los conocimientos sobre dichas características en glomeromicetos se seleccionó al género *Acaulospora*, uno de los más abundantes y frecuentes en diversos ambientes y plantas no cultivadas y cultivadas en México. La revisión directa de esporas de diferentes especies del género y de las descripciones que aparecen en literatura especializada condujo a la selección y descripción de 25 caracteres morfológicos, algunos correspondientes a la ontogénesis esporal y a la germinación.

Palabras clave: Glomeromicetos, morfología, escudos, hifas, pared.

Introducción

Los hongos son uno de los grupos más diverso de organismos sobre la Tierra (Hawksworth y Lücking 2017), resultado de una historia evolutiva única y compleja que comienza a revelarse gracias a numerosas investigaciones en las que el análisis de caracteres de todo tipo ha esclarecido distintos problemas taxonómicos. Los estudios sistemáticos en hongos

se han dirigido con gran determinación hacia su reconstrucción filogenética y aunque se han generado importantes contribuciones al respecto, éstas se enfocaron primero al estudio de grandes grupos (Jones *et al.* 2001, Baldauf *et al.* 2013) y hasta hace no mucho comenzaron a abordarse las relaciones filogenéticas al interior de diferentes phyla, bajo nuevos enfoques y herramientas de estudio (Hibbett *et al.* 2007, Spatafora *et al.* 2016). En estos niveles taxonómicos existen problemas de clasificación, cuya resolución incidiría favorablemente en aspectos como la exploración, la explotación y la conservación de los recursos biológicos. Así sucede en los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y en géneros particulares de éstos, como *Acaulospora*. Estos hongos son componentes clave de los ecosistemas; su presencia e identidad influyen de forma determinante en el establecimiento, el mantenimiento y la composición de las comunidades vegetales y en la microbiota de los suelos en los que habitan. No obstante, su filogenia y relaciones en el reino *Fungi* apenas comienzan a dilucidarse con mayor claridad (Schüßler *et al.* 2001, Hibbett *et al.* 2007, Redecker *et al.* 2013, Spatafora *et al.* 2016). De las cerca de 300 especies de HMA reconocidas hasta ahora (Schüßler 2013), 58 corresponden a *Acaulospora* (www.indexfungorum.org, Crossay *et al.* 2018); su clasificación se ha basado primordialmente en las características morfológicas de las esporas: forma, color, tamaño, tipo de agrupación, así como cantidad, arreglo, consistencia y reacción al Melzer de los estratos de la pared esporal. Esto ha ocasionado que existan distinciones ambiguas entre especies morfológicamente similares y que las relaciones entre las especies del grupo sean aún inciertas.

Aunque las esporas son los elementos microscópicos en los cuales la sistemática ha mostrado gran interés cuando se proponen relaciones entre grupos a diferentes niveles taxonómicos (Kühner 1976, Oehl *et al.* 2011), el número de caracteres esporales considerados en las descripciones es relativamente bajo. No obstante, su observación e interpretación detalladas y precisas, pueden ser de gran valor para definir y entender su homología (Schuh 2000). Más aún, la descripción comparativa de diferentes propiedades de las esporas, así como de procesos vitales críticos, como la ontogenia y la germinación, podrían revelar caracteres nuevos potencialmente útiles para resolver problemas taxonómicos a niveles jerárquicos poco inclusivos (Villegas 2000).

Bajo estas premisas, este trabajo se enfocó en la revisión de los caracteres morfológicos usados tradicionalmente en la determinación taxonómica de glomeromicetos, particularmente en *Acaulospora*, familia Acaulosporaceae, orden Diversisporales, así como en la búsqueda de caracteres morfológicos adicionales y no convencionales, sin pretender ser un instrumento para la determinación taxonómica de las especies del género.

Métodos

Los caracteres morfológicos se exploraron en 57 de las 58 especies de *Acaulospora* reconocidas hasta la fecha (Schüßler 2013, Crossay *et al.* 2018, www.indexfungorum.org). La observación se realizó en esporas obtenidas de cultivos monoespecíficos o mixtos de la colección de HMA del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, a saber, *Acaulospora bireticulata*, *A. morrowiae*, *A. scrobiculata*, *A. spinosa* y *A. laevis*, de esta última y de *A. longula* se obtuvieron cultivos procedentes del Banco Internacional de Glomeromycota (IBEG 2018), registradas como BEG ID: 8 y BEG ID: 13, respectivamente (IBEG 2018). Se revisaron especímenes de *A. bireticulata* (OSC 39477), de *A. laevis* (OSC 30814, paratipo) y de *A. spinosa* (OSC 40078, isotipo) del herbario OSU (antes OSC).

Los datos de las especies que no se observaron de manera directa se obtuvieron de las descripciones disponibles en medios físicos y electrónicos; los datos sobre *A. taiwania* se obtuvieron de manera indirecta de los artículos en los que se les menciona para contrastar o comparar a otras especies; *A. verna* se excluyó de este estudio ya que no se obtuvo información sobre ella. La lista de especies se muestra en el cuadro 1. Se consideraron los caracteres en los que se ha basado la taxonomía tradicional y los datos morfológicos conocidos sobre la ontogénesis esporal y las estructuras de germinación. No obstante que no se efectuó un análisis filogenético con los caracteres, su selección se guió bajo los criterios filogenéticos de homología: similitud, conjunción y congruencia (de Luna y Mishler 1996, Kitching *et al.* 1998) como una aproximación para delimitarlos como homólogos. Los nombres de las especies y sus autores se citan de acuerdo con el Index Fungorum (www.indexfungorum.org) y las descripciones más recientes (Crossay *et al.* 2018).

Resultados

Se proporciona una descripción de las categorías, que corresponden a las estructuras fúngicas, salvo en el caso de la reactividad al Melzer; de los caracteres y de las variaciones de cada uno. Sólo se consideraron los caracteres que muestran alguna variación. En cada caso se anotan las especies que los presentan. En las figuras 1 a 34 se muestran algunos de los caracteres descritos en este estudio.

Cuadro 1. Especies incluidas en el género *Acaulospora* hasta el primer semestre del año 2018. En la segunda columna se indican las fuentes bibliográficas consultadas. Los superíndices señalan las especies en las que fue posible observar esporas: ¹ De macetas de cultivo. ² De especímenes de herbario.

Espece	Fuente de la información
<i>Acaulospora alpina</i> Oehl, Sýkorova & Sieverd.	Oehl <i>et al.</i> (2006)
<i>A. baetica</i> Palenz., Oehl, Azcón-Aguilar & G.A. Silva	Palenzuela <i>et al.</i> (2015)
^{1,2} <i>A. bireticulata</i> F.M: Rothwell & Trappe	Rothwell y Trappe (1979), Blaszkowski (1989b, 1997, 2003), Estrada-Torres <i>et al.</i> (1992), Hernández-Cuevas (1997), INVAM (2018)
<i>A. brasiliensis</i> (B.T. Goto, L.C. Maia & Oehl) C. Walker, M. Krüger & A. Schüßler	Krüger <i>et al.</i> (2011)
<i>A. capsicula</i> Blaszkowski	Blaszkowski (1990b, 2003)
<i>A. cavernata</i> Blaszkowski	Blaszkowski (1989a, 2003)
<i>A. colliculosa</i> Kaonongbua, J.B. Morton & Bever	Kaonongbua <i>et al.</i> (2010)
<i>A. colombiana</i> (Spain & N.C. Schenck) Kaonongbua, J.B. Morton & Bever	Schenck <i>et al.</i> (1984), Sieverding y Toro (1986), Spain (1992), Blaszkowski (2003), Kaonongbua <i>et al.</i> (2010)
<i>A. colossica</i> P.A. Shultz, Bever & J.B. Morton	Schultz <i>et al.</i> (1999)
<i>A. delicata</i> C. Walker, C.M. Pfeiff. & Bloss ²	Walker <i>et al.</i> (1986), Estrada-Torres <i>et al.</i> (1992), INVAM (2018)
² <i>A. denticulata</i> Sieverd. & S. Toro	Sieverding y Toro (1987), INVAM (2018)
<i>A. dilatata</i> J.B. Morton ²	Morton (1986a), Blaszkowski (1994)
<i>A. elegans</i> Trappe & Gerd.	Gerdemann y Trappe (1974), INVAM (2018)
<i>A. endographis</i> B.T. Goto	Goto <i>et al.</i> (2013)
<i>A. entreriana</i> M.S. Velázquez & Cabello	Velázquez <i>et al.</i> (2008)

<i>A. excavata</i> Ingleby & C. Walker	Ingleby <i>et al.</i> (1994), Pérez-Luna <i>et al.</i> (2016)
² <i>A. foveata</i> Trappe & Janos	Janos y Trappe (1982), Schenck <i>et al.</i> (1984), INVAM (2018)
<i>A. fragilissima</i> D. Redecker, Crossay & Cilia	Crossay <i>et al.</i> (2018)
<i>A. gedanensis</i> Blaszk.	Blaszkowski (1988, 2003)
<i>A. herrerae</i> E. Furrázola, B.T. Goto, G.A. Silva, Sieverd. & Oehl	Furrázola <i>et al.</i> (2013)
<i>A. ignota</i> Blaszk., Góralska, Chwat. & Goto	Blaszkowski <i>et al.</i> (2015)
<i>A. kentinensis</i> C.G. Wu & Y.S. Liu ex Kaonongbua, J.B. Morton & Bever	Wu <i>et al.</i> (1995), Blaszkowski (2003), Kaonongbua <i>et al.</i> (2010)
<i>A. koskei</i> Blaszk.	Blaszkowski (1995, 2003), Schultz <i>et al.</i> (1999), INVAM (2018)
² <i>A. lacunosa</i> J.B. Morton	Morton (1986a,b), Blaszkowski (2003), INVAM (2018)
^{1,2} <i>A. laevis</i> Gerd. & Trappe	Mosse (1970a,b,c), Gerdemann y Trappe (1974), Estrada-Torres <i>et al.</i> (1992), Gazey <i>et al.</i> (1993), Hernández-Cuevas (1997), Stürmer y Morton (1999), Hernández-Cuevas <i>et al.</i> (2003), INVAM (2018)
^{1,2} <i>A. longula</i> Spain & N.C. Schenck	Schenck <i>et al.</i> (1984)
^{1,2} <i>A. mellea</i> Spain & N.C. Schenck	Morton (1986b), Schenck <i>et al.</i> (1984), Estrada-Torres <i>et al.</i> (1992), Schultz <i>et al.</i> (1999), Blaszkowski (2003), Hernández-Cuevas <i>et al.</i> (2003), INVAM (2018)
<i>A. minuta</i> Oehl, Tchabi, Hountondji, Palenz., I.C. Sánchez & G.A. Silva	Oehl <i>et al.</i> (2012a)
^{1,2} <i>A. morrowiae</i> Spain & N.C. Schenck	Morton (1986a), Blaszkowski (2003), INVAM (2018)
<i>A. myriocarpa</i> Spain, Sieverding & N.C. Schenck	Schenck <i>et al.</i> (1986), Blaszkowski (2003), INVAM (2018)
<i>A. nicolsonii</i> C. Walker, L.E. Reed & F.E. Sanders	Walker <i>et al.</i> (1984)
<i>A. nivalis</i> Oehl, Palenz., I.C. Sánchez, G.A. Silva & Sieverd.	Oehl <i>et al.</i> (2012b)
<i>A. papillosa</i> C.M.R. Pereira & Oehl	Pereira <i>et al.</i> (2016)
<i>A. paulinae</i> Blaszk.	Blaszkowski (1988, 2003)
<i>A. polonica</i> Blaszk.	Blaszkowski (1988, 2003)

<i>A. punctata</i> Oehl, Palenz., I.C. Sánchez, G.A. Silva, C. Castillo & Sieverd.	Oehl <i>et al.</i> (2011)
<i>A. pustulata</i> Palenz., Oehl, Azcón-Aguilar & G.A. Silva	Palenzuela <i>et al.</i> (2013)
<i>A. reducta</i> Oehl, B.T. Goto & C.M.R. Pereira	Pereira <i>et al.</i> (2015)
<i>A. rehmii</i> Sieverd. & S. Toro ²	Sieverding y Toro (1987), Spain (1992), Dalpé y Declerck (2002), Blaszkowski (2003), Hernández-Cuevas <i>et al.</i> (2003), INVAM (2018)
<i>A. rugosa</i> J.B. Morton	Blaszkowski (1990a), INVAM (2018)
<i>A. saccata</i> D. Redecker, Crossay & Cilia	Crossay <i>et al.</i> (2018)
^{1,2} <i>A. scrobiculata</i> Trappe	Trappe (1977), Spain (1992), Gazey <i>et al.</i> (1993), Blaszkowski (2003), Hernández-Cuevas <i>et al.</i> (2003), INVAM (2018)
<i>A. sieverdingii</i> Oehl, Sýkorová & Blaszk.	Oehl <i>et al.</i> (2012c)
^{1,2} <i>A. spinosa</i> C. Walker & Trappe	Walker y Trappe (1981), Stürmer y Morton (1999), Hernández-Cuevas (1997), Hernández-Cuevas <i>et al.</i> (2003), INVAM (2018)
<i>A. soloidea</i> Vaing. & B.F. Rodrigues	Vaingankar y Rodrigues (2011)
<i>A. spinosissima</i> Oehl., Palenz., I.C. Sánchez, Tchabi, Hount & G.A. Silva	Oehl <i>et al.</i> (2014)
<i>A. spinulifera</i> Oehl, V.M. Santos, J.S. Pontes & G.A. Silva	Souza <i>et al.</i> (2017)
<i>A. splendida</i> Sieverd., Chaverri & I. Rojas ²	Sieverding <i>et al.</i> (1988), Blaszkowski (2003)
<i>A. sporocarpia</i> Berch	Berch (1985)
<i>A. taiwania</i>	Citada por Oehl <i>et al.</i> (2014)
<i>A. terricola</i>	Swarupa <i>et al.</i> (2003)
<i>A. thomii</i> Blaszk.	Blaszkowski (1988, 2003)
<i>A. tortuosa</i> Palenz., Oehl, Azcón-Aguilar & G.A. Silva	Palenzuela <i>et al.</i> (2013)
² <i>A. tuberculata</i> Janos & Trappe	Janos y Trappe (1982), Spain (1992), INVAM (2018)
<i>A. viridis</i> Palenz., Oehl, Azcón-Aguilar & G.A. Silva	Palenzuela <i>et al.</i> (2014)
<i>A. walkeri</i> Kramad. & Hedger	Kramadibrata y Hedger (1990)

Categorías, caracteres y sus variantes

Hifas esporógenas

Son aquellas que dan origen a las esporas, en glomeromicetos son estrictamente asexuales, se producen fuera o dentro de las raíces, de manera individual en diferentes secciones del micelio, o agrupadas. Todas las especies de *Acaulospora* conocidas hasta ahora forman esporas a partir de hifas esporógenas diferenciadas en forma de cuñas, hinchadas como globos (sáculos) en su extremo más amplio, con excepción de *Acaulospora fragilissima* y *A. saccata* en las que las esporas se forman a partir de una hifa esporógena sin diferenciación de sáculos, al menos en cultivo *in vitro* (Crossay *et al.* 2018).

- Posición de la espora con respecto a las hifas esporógenas diferenciadas. Se refiere al sitio de la hifa esporógena donde se formarán las esporas: 1. Lateral. Las esporas se forman en un costado de la hifa cuneiforme; se les conoce como esporas "acaulosporoides", nombre derivado de *Acaulospora*; todas las especies con excepción de las que forman esporas entrofosporoides. 2. Intercalar. Las esporas se forman entre en el extremos angosto y el extremo amplio diferenciado como sáculo; se les conoce como "entrofosporoides", nombre derivado de *Entrophospora*; especies: *A. colliculosa*, *A. colombiana* y *A. kentinensis*.

- Forma de crecimiento de las esporas con respecto a las hifas esporógenas: 1. Sésil. En esta condición las esporas crecen directamente sobre el cuerpo de la hifa; todas las especies salvo las señaladas en el punto siguiente. 2. Pedunculado o pedicelado. En éste las esporas crecen sobre una rama llamada pedicelo que crece del cuerpo de la hifa esporógena. Las especies que presentan un pedicelo largo y visible son *A. endographis*, *A. myriocarpa* y *A. sporocarpia*; en *A. collosica*, *A. herrerae*, *A. laevis* y *A. nicolsonii* se presenta un pedicelo muy corto que suele pasar desapercibido.

- Número de estratos o capas en la pared de la hifa esporógena, incluido el sáculo. 1. Un estrato; todas las especies con excepción de las señaladas en el punto siguiente. 2. Dos estratos. *Acaulospora bireticulata*, *A. endographis*, *A. excavata*, *A. kentinensis*, *A. laevis*, *A. longula*, *A. mellea*, *A. morrowiae*, *A. nicolsonii*, *A. pustulata*, *A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *A. splendida*, *A. tuberculata* y *A. viridis* presentan dos estratos. En *Acaulospora fragilissima* y *A. saccata* no se indica.

Esporas

Son unidades unicelulares y asexuales de propagación, de dispersión y de resistencia; se producen como resultado de una diferenciación morfológica, fisiológica y bioquímica de las hifas, presentan de cientos a miles de núcleos.

- Forma de la base de la espora: 1. Obtusa. En esta condición la base de la espora, que es el sitio de contacto entre ella y la hifa esporógena no se alarga. 2. Ahusada. Se refiere a un alargamiento obcónico de la base de la espora. *Acaulospora myriocarpa* es la única especie del género donde las esporas tienen una base ahusada.

- Agrupación de las esporas: 1. Libres. Se encuentran individualizadas en la matriz edáfica o dentro de las raíces. 2. Agrupadas. En este caso las esporas se forman a partir de hifas esporógenas congregadas que se mantienen unidas entre sí y producen esporas con el mismo arreglo. *Acaulospora myriocarpia*, *A. sporocarpia* y *A. taiwania* son las que producen esporas en grupos, en el resto de las especies las esporas se forman individualmente.

Pared de las esporas

Esta estructura, que es la cubierta de las esporas, posee propiedades físicas y químicas que mantienen aislado y protegido al citoplasma que contiene la información necesaria para producir un individuo nuevo. En glomeromicetos la pared esporal es compleja por el número y arreglo estructural de sus componentes, capas o estratos en grupos, y por otros atributos; se reconocen dos tipos de pared en las esporas, las estructurales denominadas paredes de la espora, que están en contacto con el medio físico, y las internas conocidas como germinales. Con excepción de *Glomus coremioides*, donde el estrato más joven es el más externo, en el resto de los glomeromicetos donde se ha estudiado este fenómeno, la adición de paredes y de estratos en ellas sigue un patrón basipeto, es decir, el más joven es el más interno.

- Número de paredes germinales. Son aquellas a partir de las cuales se produce la germinación: 1. Una. Detectada en *Acaulospora alpina*, *A. myriocarpa*, *A. sporocarpia* y *A. walkeri*. 2. Dos. Presentes en todas las especies, con excepción de las que poseen una o tres. 3. Tres. *Acaulospora endographis*, *A. entreriana*, *A. minuta* y *A. splendida* son las especies que presentan esta condición.

- Ornamentación de la pared de la espora. Se refiere a una alteración de la superficie en uno de los estratos externos de la pared de la espora, generalmente el menos flexible, distinguida como un grabado en forma de relieves o de depresiones en su superficie expuesta: Las especies que no presentan ornamentación son *Acaulospora capsicula*, *A. colombiana*, *A. colossica*, *A. delicata*, *A. dilatata*, *A. endographis*, *A. entreriana*, *A. fragilissima*, *A. gedanensis*, *A. koskei*, *A. laevis*, *A. longula*, *A. mellea*, *A. morrowiae*, *A. myriocarpa*, *A. nicolsonii*, *A. polonica*, *A. saccata*, *A. splendida*, *A. sporocarpia*, *A. thomii*, *A. viridis* y *A. walkeri*; el resto de las especies muestran ornamentación.

- Ornamentación en forma de arrugas. Se refiere a pliegues bajos sobre la superficie de la espora que le dan una apariencia rugosa, en *Acaulospora dilatata* y *A. rugosa*.

- Ornamentación en forma de proyecciones papiliformes. Éstos son prominencias globosas de base angosta y ápice redondeado, en *Acaulospora papilosa* y *A. pustulata*.

- Ornamentación en forma de proyecciones verrucosos. Son prominencias de base y cuerpo ancho, hemisféricas, en *Acaulospora brasiliensis*, *A. colliculosa*, *A. elegans* y *A. ignota*.

- Ornamentación en forma de proyecciones coniformes. Son prominencias de base ancha y ápice agudo o sub-agudo, más conocidos como espinas, en *Acaulospora spinosa*, *A. soloidea*, *A. spinosissima* y *A. spinulifera*.

- Ornamentación en forma de proyecciones creniformes. Las prominencias consideradas en esta categoría son bajas y multicrestadas, en *Acaulospora reducta*.

- Ornamentación en forma de proyecciones cilindriformes. Son prominencias altas, de base y ápice isodiamétricos, en *Acaulospora bireticulata*, *A. soloidea* y *A. tuberculata*.

- Ornamentación en forma de proyecciones anilladas. En este caso las prominencias tienen forma de anillos, en *Acaulospora denticulata*, *A. bireticulata*, *A. elegans* y *A. reducta*.

- Ornamentación en forma de proyecciones sinuosas. La única especie que posee este tipo de ornamentación es *A. tortuosa*.

- Ornamentación en forma de depresiones punteadas. Éstas se forman como huecos muy pequeños, evidentes a grandes magnificaciones, en *Acaulospora alpina*, *A. baetica*, *A. herrerae*, *A. kentinensis*, *A. ignota*, *A. minuta*, *A. nivalis*, *A. paulinae*, *A. punctata*, *A. sieverdingii* y *A. taiwania*.

- Ornamentación en forma de depresiones areoladas. Son huecos prominentes, generalmente con un borde más o menos evidente, evidentes a bajas magnificaciones, en *Acaulospora cavernata*, *A. excavata*, *A. foveata*, *A. lacunosa* y *A. scrobiculata*.

- Ornamentación en forma de depresiones dendriformes. Éstas se reconocen por formar canales largos, sinuosos y anastomosados entre sí, notados a bajas magnificaciones, en *Acaulospora herrerae* y *A. rehmi*.

Paredes germinales

Son las paredes más internas de las esporas y por lo tanto las que forman la primera barrera del citoplasma. En términos generales son más flexibles que las paredes de la spora y carentes de color. Se les denomina germinales porque experimentan cambios asociados con dicho fenómeno.

- Ornamentación en paredes germinales. Como en la pared de la spora, este carácter se refiere a un cambio en el relieve de la superficie en los estratos internos o germinales. Las únicas especies que no presentan este carácter son *Acaulospora brasiliensis*, *A. cavernata*, *A. colliculosa*, *A. gedanensis*, *A. koskei*, *A. nicolsoni*, *A. myriocarpa*, *A. polonica*, *A. soloidea* y *A. splendida*.

- Proyecciones en las paredes germinales: 1. De forma oblonga. Presente sólo en *Acaulospora laevis*. 2. De forma cónica. Presente en *A. entrepiana*. 3. De forma irregular. En el resto de las especies del género, con excepción de las señaladas previamente.

Estructuras e hifas de germinación

La germinación representa el inicio del desarrollo de un nuevo individuo, comprende la formación de una o varias hifas, que en glomeromicetos deben crecer hasta hallar raíces receptoras de su asociado vegetal; su crecimiento está limitado a los recursos que pueden obtener del citoplasma contenido en las esporas. En *Acaulospora* las hifas de germinación se producen desde una estructura especializada llamada escudo. Las especies que se indican en los caracteres correspondientes son las únicas en las que se conoce la morfología de los escudos, en el resto de las especies del género se desconocen.

- Forma de los escudos de germinación: 1. Orbicular o en forma de disco, en *Acaulospora laevis* y *A. mellea*. 2. Coclear o en forma de hélice, en *A. bireticulata*, *A. colombiana*, *A. morrowiae*, *A. longula*, *A. rehmi*, *A. scrobiculata* y *A. spinosa*.

- Paredes intercalares radiales en el escudo de germinación, en *A. bireticulata*, *A. laevis*, *A. mellea* y *A. spinosa*.

- Paredes intercalares helicoidales en el escudo de germinación, en *A. bireticulata*, *A. colombiana*, *A. longula*, *A. scrobiculata* y *A. spinosa*.

- Producción de estructuras esféricas o subsféricas de tipo glomoide en las hifas de germinación, se han encontrado en *A. sporocarpia*, *A. thomii*, *A. rehmi*, *A. delicata*, *A. laevis* y *A. spinosa*.

- Producción de estructuras hemisféricas intercalares en las hifas de germinación, en *A. fragilissima* y *A. saccata*.

Reactividad al Melzer

Indica un cambio de coloración en uno o más estratos de la pared de la espora y/o de las paredes germinales, producido por el contacto de éstas con un reactivo que contiene yodo. La reacción puede ser de tipo dextrinoide o pseudoamiloide, es decir, se produce un color que va de rosa a púrpura (Moreno *et al.*, 1986). Este cambio señala diferencias en la composición química de los estratos de pared.

- En estratos de las paredes germinales. Con excepción de estas especies *A. brasiliensis*, *A. colliculosa*, *A. delicata*, *A. fragilissima*, *A. gedanensis*, *A. myriocarpa*, *A. nicolsonii*, *A. polonica*, *A. soloidea*, *A. tortuosa* y *A. walkeri*, el resto presentan una reacción que va de color rosa pálido a púrpura intenso.

- En el escudo de germinación. De entre las especies en las que se conoce el escudo de germinación, sólo en *Acaulospora scrobiculata* reacciona de color púrpura.

Discusión

Los glomeromicetos se han considerado como fenotípicamente sencillos debido a que la suma total de sus propiedades estructurales y funcionales presenta una “aparente” escasa variación. En estos hongos es posible reconocer las hifas que son cenocíticas y que al

modificarse forman unas cuantas estructuras morfofisiológicas bien diferenciadas: apresorios, arbúsculos, vesículas, células auxiliares, esporas y sistemas de absorción ramificados (BAS) (Bago *et al.*, 1998a,b). Esta es una de las razones del por qué los sistemas de clasificación y la taxonomía a nivel genérico e infragenérico se hayan sustentado en las características de las esporas y aunque en la actualidad existan muchas aproximaciones basadas en datos moleculares, el uso de caracteres morfológicos sigue vigente. La revaloración de los datos morfológicos debería evitar simplificar las observaciones, como se buscó en este caso, toda vez que la tendencia ha sido generalizarlas.

La falta de precisión en las observaciones y la forma de interpretación de los datos han creado confusiones y un manejo limitado de la información. Un ejemplo de ello es el caso de la forma de las esporas, ya que uno de los términos introducidos aquí para las esporas del grupo es el de esporas con base ahusada, término que se refiere a que la espora posee una proyección corta en uno de sus extremos. Aún cuando es claro que en algunas especies de glomeromicetos se presenta tal situación, el caso más evidente al respecto es el de *Funneliformis mosseae* (Gerdemann y Trappe 1974, Dodd *et al.* 1996) del cual siempre se ha asentado que se caracteriza por su “hifa de sostén infundibuliforme”, cuando lo que se observa como infundíbulo es la base esporal ahusada, situación presente sólo en *A. myriocarpa*.

Uno de los aspectos morfológicos relevantes en *Acaulospora* es la ornamentación de los estratos en la pared estructural y en paredes internas, que podría ser clave en la delimitación de grupos discretos. Esta cualidad se evidencia como importante en el género si se considera la proporción de especies que la presentan (32/58, 55%). Por ejemplo, los detalles más finos en las depresiones de la pared de la espora permite discriminar entre sí a especies como *A. alpina*, *A. cavernata* y *A. scrobiculata*. Otro ejemplo es el de *A. bireticulata*, *A. elegans* y *A. reducta* que presentan simultáneamente dos tipos de ornamentación y no sólo un tipo complejo; la variación en uno de ambos está ligado a cada una de dichas especies (Pereira *et al.* 2015). Otro caso es el de *A. laevis* una de las especies con pared estructural lisa, que se ha propuesto como posible conespecífica de *A. capsicula*, de *A. collosica* y de *A. koskei*, en *A. laevis*, sin embargo, las excrecencias del estrato interno tienen una forma oblonga particular diferente de la registrada para las otras especies, como

en *A. entreriana* donde se presentan dientes (Velázquez *et al.* 2008). De acuerdo con la propuesta de Kaonongbua *et al.* (2010) *Entrophospora colombiana* y *E. kentinensis* se transfirieron a *Acaulospora*, como resultado de un análisis filogenético basado en caracteres moleculares; en ambas especies uno de los estratos germinales tiene excrescencias, mientras que las especies que se mantuvieron en *Entrophospora* no las presentan (Blaszkowski 1998, 2003, INVAM 2018), al igual que especies nuevas descritas para este género (Palenzuela *et al.* 2010). Otro detalle interesante en *A. colombiana*, es que forma escudos de germinación espiralados (Spain 1992), como los encontrados en otras especies de *Acaulospora* (Hernández-Cuevas *et al.* 2018a).

La reactividad al Melzer se encuentra íntimamente asociada con estratos y estructuras particulares de las esporas, como las de germinación, caso concreto el de *A. scrobiculata* en la que los escudos cambian de hialino a colores rosa o magenta, situación que además de evidenciarlas con toda claridad, diferencia a esta especie del resto de las del género. La intensidad de la reacción en los estratos está ligada al estado de maduración de la espora como se ha señalado repetidamente, dicho de otra forma, las reacciones menos intensas se presentan en estratos jóvenes.

Por otra parte, se han ignorado procesos vitales que muestran contener información morfológica sobresaliente como la ontogenésis esporal y la germinación. Las diferencias en la adición de paredes esporales internas, su consistencia, la presencia de ornamentaciones y su reactividad ante agentes químicos como el Melzer y el azul de tripano son indicadores de formas de desarrollo particulares para especies o grupos de especies. Sobre este aspecto, resalta la producción de estructuras globosas por varias especies del género, *A. sporocarpia*, *A. thomii*, *A. rehmi*, *A. delicata*, *A. laevis* y *A. spinosa* (Berch 1985, Blaszkowski 1994, Taylor *et al.* 2013, Hernández-Cuevas *et al.* 2018b), lo que ha llevado a proponerlas como "esporas glomoides" (Taylor *et al.* 2013). Aunque esta propuesta fue corroborada para *A. fragilissima* y *A. saccata* en donde las esporas en sus primeros estadios de formación tienen apariencia glomoides y no hay diferenciación de sáculos (Crossay *et al.* 2018), en el resto de las especies donde se han detectado su papel como esporas es aún incierto.

La morfología de los escudos de germinación, aunque limitadamente debido a la escasez de datos al respecto, muestra características que parecen estar ligadas a especies o

al menos a grupos de especies; en especies de esporas no ornamentadas los escudos son no segmentados o poco segmentados, mientras que especies de esporas ornamentadas son segmentados o espiralados (Hernández-Cuevas *et al.* 2018a,b).

Sin duda es necesario continuar y ampliar la revisión de caracteres morfológicos y explorar la esporogénesis en *Acaulospora* ya que de acuerdo con los datos que existen hasta el momento se establece como un fenómeno sumamente complejo del que falta aún mucha información. Por ejemplo, cabe señalar el caso de *Otophora*, género monoespecífico propuesto por Palenzuela *et al.* (2008) para una especie que comparte por completo los caracteres de *Acaulospora*, salvo por dos, i) la presencia de un estípote corto persistente en la base de la espora, en cuya forma de aurícula se basó el nombre del género, carácter más frecuente de lo que se piensa ya que se presenta en especies como *A. laevis* (Hernández-Cuevas *et al.* 2018c), y ii) la ausencia de excrecencias en estratos internos, no obstante éstas se forman en los últimos estadios de maduración (Hernández-Cuevas *et al.* 2018c), además de que la ausencia de tales excrecencias está reportada para varias especies de *Acaulospora* (*A. brasiliensis*, *A. cavernata*, *A. colliculosa*, *A. gedanensis*, *A. koskei*, *A. nicolsoni*, *A. myriocarpa*, *A. polonica*, *A. soloidea* y *A. splendida*). Estas razones llevan a considerar la posibilidad de que se trate de una especie de *Acaulospora* no completamente madura; no obstante, éste y otros casos deben estudiarse con atención.

Conclusiones

Es claro que aún falta mucho por hacer en el campo de la morfología, sobretodo en aspectos tan problemáticos y olvidados como la ontogenia esporal y las estructuras de germinación, los cuales se desconocen en más del 80% de las especies de *Acaulospora*. Estructuras y caracteres a los que se les ha prestado mayor atención pero que aún contienen información que necesita ser explorada son la pared de las esporas, sus componentes y detalles anatómicos.

Las estructuras globosas formadas en las hifas de germinación en especies de *Acaulospora*, diferenciadas como esporas llevan a la definición de tres mecanismos de esporogénesis en el género, lo que conduce a definir al género como polimórfico: acaulosporoide, entrofosporoide y glomoide.

Los datos que existen hasta el momento sobre la ornamentación y los escudos de germinación parecen ligar ambos, es decir, especies con pared de la espora lisa forman escudos simples, especies con pared de la espora ornamentada forman escudos complejos. No obstante, esta situación como la de otros caracteres morfológicos descritos en este estudio, deben sujetarse a diferentes métodos de análisis e incorporar información nueva a medida que vaya generándose. No menos importante es realizar estudios de evidencia total que analicen todos los datos morfológicos y moleculares disponibles en éste y en otros géneros de Glomeromycotina.

Literatura citada

- Bago B., Azcón-Aguilar C., Goulet A. y Piché Y. (1998a). Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 139: 375-388.
- Bago B., Azcón-Aguilar C. y Piché Y. (1998b) Architecture and development dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia* 90: 52-62.
- Baldauf S., Romeralo M. y Carr M. (2013). The evolutionaty origins of animals and fungi. En: Trueba G. y Montúfar C. (Eds.). *Evolution from the Galapagos. Social and ecological interactions in the Galapagos Islands 2*. Springer Svience+Business Media. Nueva York: 73-106.
- Berch S. (1985). *Acaulospora sporocarpia*, a new, sporocarpic species, and emendation of the genus *Acaulospora* (Endogonaceae, Zygomycotina). *Mycotaxon* 23: 409-418.
- Blaszkowski J. (1988). Four new species of the Endogonaceae (Zygomycotina) from Poland. *Karstenia* 27: 37-42.
- Blaszkowski J. (1989a). *Acaulospora cavernata* (Endogonales)-a new species from Poland with pitted spores. *Cryptogamic Botanic* 1: 204-207.
- Blaszkowski J. (1989b). Polish Endogonaceae. I. *Acaulospora bireticulata*, *Entrophospora infrequens*, *Glomus caledonium*, and *Scutellospora pellucida*. *Karstenia* 29: 1-10.
- Blaszkowski J. (1990a). Polish Endogonaceae. II. *Acaulospora rugosa*, *Glomus aggregatum*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum* and *Glomus occultum*. *Karstenia* 30: 1-13.
- Blaszkowski J. (1990b). Polish Endogonaceae. VII. *Acaulospora capsicula* sp. nov. *Mycologia* 82: 794-798.
- Blaszkowski J. (1994). Polish Glomales X. *Acaulospora dilatata* and *Scutellospora dipurpurascens*. *Mycorrhiza* 4:173-182.
- Blaszkowski J. (1995). *Acaulospora koskei*, a new species in Glomales from Poland. *Mycologiacl Research* 99: 237-240.
- Blaszkowski J. (1997). Notes on *Acaulospora bireticulata* (Glomales, Zygomycetes) found in Poland. *Mycotaxon* 61: 193-204.

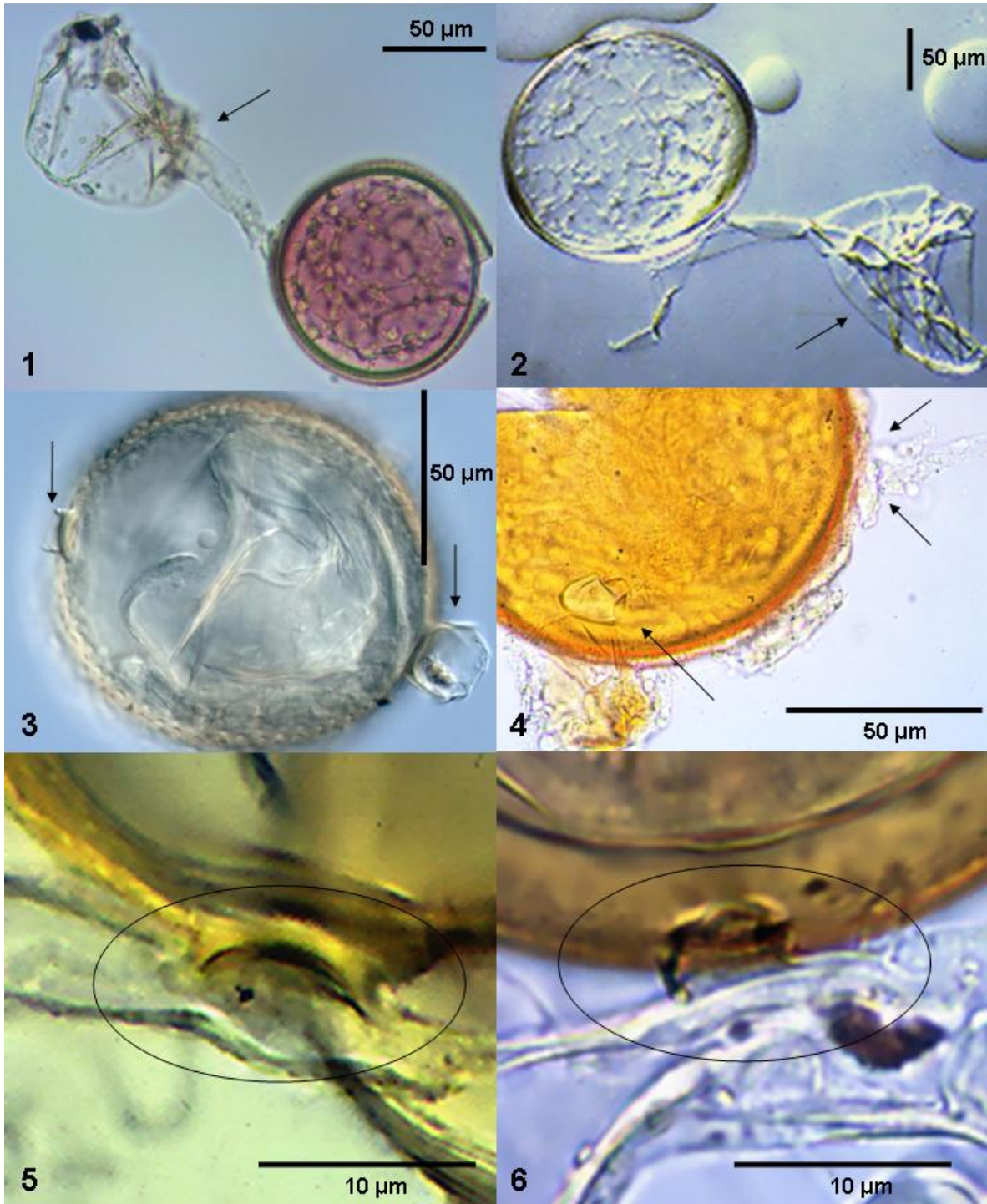
- Blaszkowski J. (1998). *Entrophospora baltica* sp. nov. and *Glomus fuegianum*, two species in the Glomales from Poland. Mycotaxon 63: 165-184.
- Blaszkowski J. (2003). <http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/>. Consultada en abril de 2018.
- Blaszkowski J., Chwat G. y Gorálska A. (2015). *Acaulospora ignota* and *Claroideoglomus hanlinii*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) from Brazil and Cuba. Mycol. Progress 14:18. DOI 10.1007/s11557-015-1042-2.
- Crossay T, Cilia A, Cavaloc Y, Amir H, Redecker D. 2018. Four new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) associated with endemic plants from ultramafic soils of New Caledonia. Mycol. Prog. doi:10.1007/s11557-018-1386-5.
- Dalpé Y. y Declerck S (2002). Development of *Acaulospora rehmsii* spore and hyphal swellings under root-organ culture. Mycologia 94(5): 850-855.
- de Luna E. y Mishler B.D. (1996). El concepto de homología y la selección de caracteres taxonómicos. Boletín de la Sociedad Botánica de México 59: 131-146.
- Dodd J.C., Rosendahl S., Giovannetti M., Broome A., Lanfranco L. y Walker C. (1996) Inter- and intraspecific variation within the morphologically-similar arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Glomus coronatum*. New Phytologist 133: 113-122.
- Estrada-Torres A., Varela L., Hernández-Cuevas L. y Gavito M.E. (1992). Algunos hongos micorrízicos arbusculares del estado de Tlaxcala, México. Rev. Mex. Mic. 8: 85 - 110.
- Furrazola E., Goto B.T., Silva G.A., Torres-Arias Y., Morais T., Pereira C.E., Almeida F.A.C., Maia L.C., Sieverding E. y Oehl F. (2013). *Acaulospora herrerae*, a new pitted species in the Glomeromycetes from Cuba and Brazil. Nova Hedwigia 97(3-4):401-413.
- Gazey C., Abbott L.K. y Robson A.D. (1993). VA mycorrhizal spores from three species of *Acaulospora*: germination, longevity and hyphal growth. Mycological Research 97: 785-790.
- Gerdemann J.H. y Trappe J.M. (1974). The Endogonaceae in the Pacific Northwest. Mycological Memoir 5: 1-76.
- Goto BT, Pereira CMR, Nobre CP, Zatorre NP, Covacevich F, Berbara RLL, Maia LC. (2013). *Acaulospora endographis* (Glomeromycetes), a new fungus with a complex spore wall. Mycotaxon 123:403-408.
- Hawksworth DL, Lücking R. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. Microbiological Spectrum 5(4). doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.
- Hernández-Cuevas L. (1997). Cambios morfológicos involucrados en la germinación y desarrollo de las esporas en algunas especies de *Acaulospora*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- Hernández-Cuevas L., Castillo A.S., Guadarrama C.P., Martínez O.Y., Romero R.M.A. y Sánchez G.I. (2003). Hongos micorrizógenos arbusculares del Pedregal de San Ángel. Las Prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- Hernández-Cuevas L., Estrada-Torres A., Ferrera-Cerrato R. y de Luna G.E. (2018a). Ontogénesis del orbe de germinación en cinco especies de *Acaulospora* (Glomeromycotina, Fungi). En: Morfología de algunas

- especies de *Acaulospora*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Hernández-Cuevas L., Estrada-Torres A., Ferrera-Cerrato R. y de Luna G.E. (2018b). Germination orbs and hyphae in three arbuscular mycorrhizal fungi (Acaulosporaceae, Glomeromycotina). En: Morfología de algunas especies de *Acaulospora*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Hernández-Cuevas L., Estrada-Torres A., Ferrera-Cerrato R. y de Luna G.E. (2018c). Ontogenetic development of spores in *Acaulospora mellea* and *A. longula*, and data about this process in *A. laevis*, *A. scrobiculata* and *A. spinosa*. En: Morfología de algunas especies de *Acaulospora*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Hibbet D.S., Binder M., Bischoff J., Backwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E., Huhndorf S., James T., Kirk P.M., Lücking R., Thorsten Lumbsch H., Lutzoni F., Matheny P.B., McLaughlin D.J., Powell M.J., Redhead S., Schoch C.L., Spatafora J.W., Stalpers J.A., Vilgalys R., Aime C.M., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny G.L., Castlebury L.A., Crous P.W., Dai Y.C., Gams W., Geiser D.M., Griffith W., Gueidan C., Hawksworth D.L., Hetsmark G., Hosaka K., Humber R.A., Hyde K.D., Ironside J.E., Koljalg U., Kutzman C.P., Larsson K.-H., Lichtwardt R., Longcore J., Miadlikowska J., Miller A., Moncalvo J.-M., Mozley-Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Rogers J.D., Roux C., Ryvarden L., Sampaio J.P., Schüssler A., Sugiyama J., Thorn R.G., Tibell L., Untereiner W.A., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White M.M., Winka K., Yao Y.-J. y Zhang N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research* 111(5): 509-547.
- IBEG (2018) <http://i-beg.eu>. Consultada en abril de 2018
- Ingleby K., Walker C. y Mason P.A. (1994). *Acaulospora excavata* sp. nov.- An endomycorrhizal fungus from Cote D' Ivoire. *Mycotaxon* 50: 99-105.
- INVAM (2018). <https://invam.wvu.edu>. Consultada en abril de 2018.
- Janos D.P. y Trappe J. (1982). Two new *Acaulospora* species from tropical America. *Mycotaxon* 15: 515-522.
- Jones M., Forn I., Gadelha C., Egan M., Bass D., Massana R. y Rhichards T.A. (2011). Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature Letter* DOI:10.1038/nature09984.
- Kaonongbua W., Morton J.B. y Bever J.P. 2010. Taxonomic revision transferring species in *Kuklospora* to *Acaulospora* (Glomeromycota) and a description of *Acaulospora colliculosa* sp. nov. from field collected spores. *Mycologia* 102(6): 1497-1509.
- Kitching I.J., Forey P.L., Humphries C.J. y Williams D.M. (1998). *Cladistics*. Oxford University Press, Oxford.
- Kramadibrata K. y Hedger J.N. (1990). A new species of *Acaulospora* associated with cocoa in Java and Bali (Indonesia). *Mycotaxon* 37: 73-77.
- Krüger M., Walker C. y Schübler A. (2011). *Acaulospora brasiliensis* comb. nov. and *Acaulospora alpina* (Glomeromycota) from upland Scotland: morfphology, molecular phylogeny and DNA-based detection in roots. *Mycorrhiza* 21(6): 577-587.

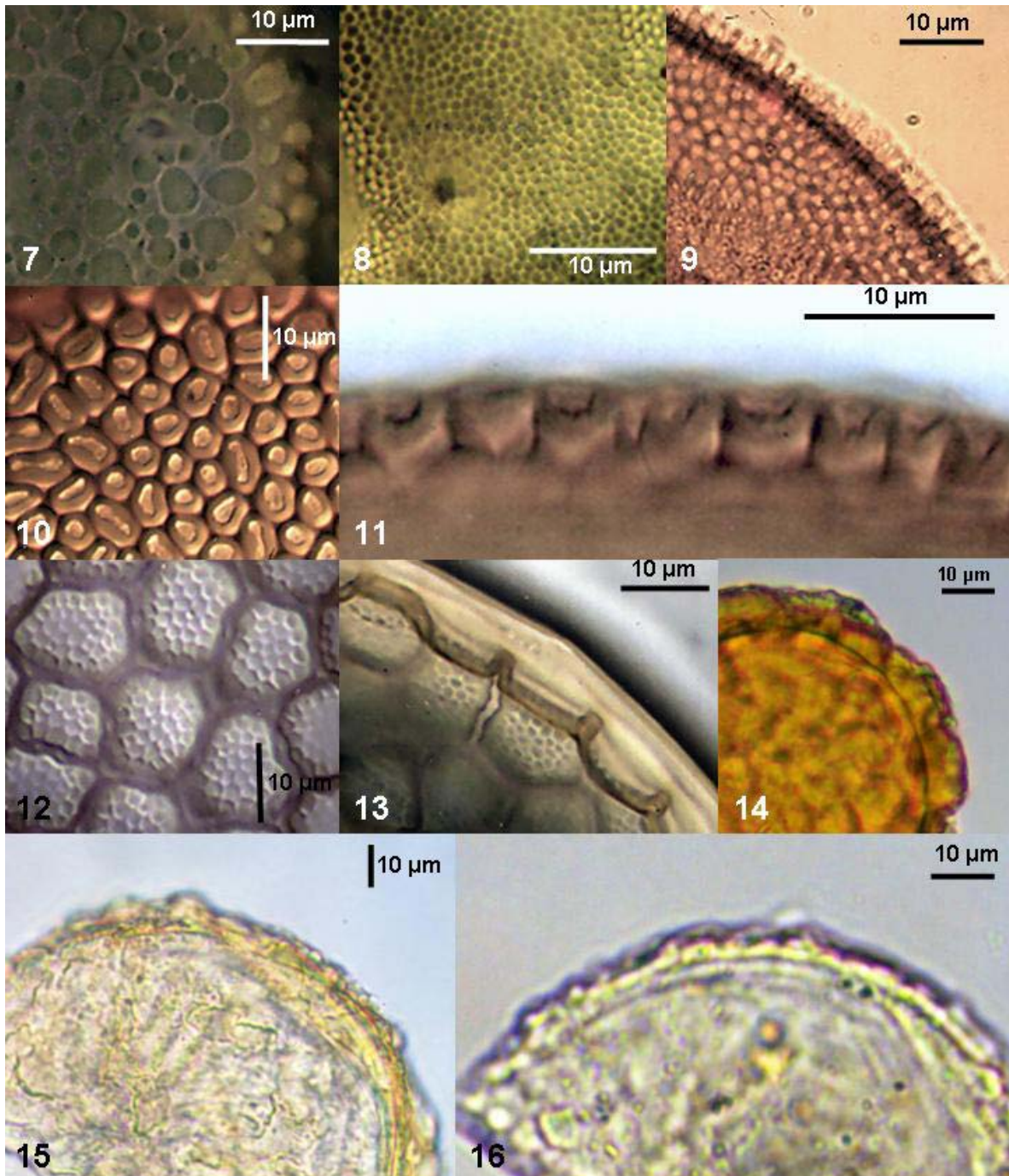
- Kühner R. (1976). La notion d'espece chez les champignons superieurs. Bulletin of the Society of Linneus Lyon 45(19): 19-48.
- Moreno G., García J.L. y Zugaza A. (1986). La guía de Incafo de los hongos de la Península Ibérica. I. Incafo, S.A., Madrid.
- Morton J. (1986a). Three new species of *Acaulospora* (Endogonaceae) from high aluminium, low pH soils in West Virginia. Mycologia 78: 641-648.
- Morton J. (1986b). Effects of mountants and fixatives on wall structure and Melzer's reaction in spores of two *Acaulospora* species (Endogonaceae). Mycologia 78: 787-794.
- Mosse B. (1970a). Honey-coloured, sessile *Endogone* spores. I. Life story. 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. 74:156-159.
- Oehl F., Sýkorova Z., Redecker D., Wiemken A. y Sieverding E. (2006). *Acaulospora alpina*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species characteristic for high mountainous and alpine regions of the Swiss Alps. Mycologia 98(2): 286-294.
- Oehl F., Silva G.A., Palenzuela J., Sánchez-Castro I., Castillo C. y Sieverding E. (2011). *Acaulospora punctata*, a new fungal species in the Glomeromycetes from mountainous altitudes of the Swiss Alps and Chilean Andes. Nova Hedwigia 93(3-4): 353-362.
- Oehl F., Palenzuela J., Sanchez-Castro I, Hountondji F., Tchabi A., Lawouin L. y Silva G.A. (2012a). *Acaulospora minuta*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species from sub-Saharan savannas of West Africa. Journal of Applied Botany and Food Quality 84(2): 213-218.
- Oehl F., Palenzuela J., Sánchez-Castro I, Kuss P., Sieverding E y Silva G.A. (2012b). *Acaulospora nivalis*, a new fungus in the Glomeromycetes, characteristic for high alpine and nival altitudes of the Swiss Alps. Nova Hedwigia 95(1-2): 105-122.
- Oehl F., Sieverding E., Palenzuela J. e Ineichen K., Sila GA. (2011). Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. IMA fungus 2(2): 191-199.
- Oehl F., Sýkorova Z., Blaszkowski J., Sánchez-Castro I., Coyne D., Tchabi A., Lawouin L., Hountondji F.C. y Silva G.A. (2012c). *Acaulospora sieverdingii*, an ecologically diverse new fungus in the Glomeromycota, described from lowland temperate Europe and tropical West Africa. Journal of Applied Botany and Food Quality 84: 47-53.
- Oehl F., Tchabi A., Silva G.A., Sánchez-Castro I., Palenzuela J., Monte J.I.P., Lawouin L.E., Coyne D. y Hountondji F.C.C. (2014). *Acaulospora spinosissima*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from the Southern Guinea Savanna in Benin. Sydowia 66(1): 29-42.
- Palenzuela J., Barea J.M., Ferrol N., Azcón-Aguilar C. y Oehl F. (2010). *Entrophospora nevadensis*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from Sierra Nevada National Park (southeastern Spain). Mycologia 102(3): 624-632.

- Palenzuela J., Ferrol N., Boller T., Azcón-Aguilar C. y Oehl F. (2008). *Otospora bareai*, a new fungal species in the Glomeromycetes from a dolomitic shrub land in Sierra de Baza National Park (Granada, Spain). *Mycologia* 100(2): 296-305.
- Palenzuela J., Azcón-Aguilar C., Barea J.M., Silva G.A. y Oehl F. (2013). *Acaulospora pustulata* and *Acaulospora tortuosa*, two new species in the Glomeromycota from Sierra Nevada National Park (Southern Spain). *Nova Hedwigia* 97(3-4): 305-319.
- Palenzuela J., Azcón-Aguilar C., Barea J.M., Silva G.A. y Oehl F. (2014). *Acaulospora viridis*, a new species in the Glomeromycetes from two mountain ranges in Andalucía (Spain). *Nova Hedwigia* 99(1-2): 71-82.
- Palenzuela J., Azcón-Aguilar C., Barea J.M., Silva G.A. y Oehl F. (2015). *Acaulospora baetica*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species from two mountain ranges in Andalucía (Spain). *Nova Hedwigia* 101(3-4): 463-474.
- Pereira C.M.R., Goto B.T., Sila D.K.A., Ferreira A.C.A., Souza F.A., Silva G.A.S., Maia L.C. y Oehl F. (2015). *Acaulospora reducta* sp. nov. and *A. excavata* –two glomeromycotan fungi with pitted spores from Brazil. *Mycotaxon* 130(4): 983-995.
- Pereira C.M.R., Maia L.C., Sánchez-Castro I., Palenzuela J., Silva D.K.A., Sudova R., Kolarikova Z., Rydlova J., Ctvrtlikova M., Goto B.T., Silva G.A. y Oehl F. (2016). *Acaulospora papillosa*, a new mycorrhizal fungus from NE Brazil, and *Acaulospora rugosa* from Norway. *Phytotaxa* 260(1): 14-24.
- Pérez-Luna Y, Álvarez-Solís D, Hernández-Cuevas L, Sánchez-Roque Y. (2016). *Acaulospora excavata* (Glomeromycota) in agricultural soils of Chiapas, México. *International Journal of Advance Agricultural Research* 4: 6-9.
- Redecker, D., A. Schüßler, H. Stockinger, S. L. Stürmer y J. B. Morton. (2013). An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*. DOI 10.1007/s00572-013-0486-y.
- Rothwell F.M. y Trappe J. (1979). *Acaulospora bireticulata* sp. nov. *Mycotaxon* 8: 471-475.
- Schenck N.C., Spain J.L. y Sieverding E. (1986). A new sporocarpic species of *Acaulospora* (Endogonaceae). *Mycotaxon* 25: 111-117.
- Schenck N.C., Spain J.L., Sieverding E. y Howeler R.H. (1984). Several new and unreported vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Colombia. *Mycologia* 76: 685-699.
- Schüßler A., Schwartzott A. y Walker C. (2001). A new fungal Phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105(12): 1413-1421.
- Schüßler A. (2013). <http://www.amf-phylogeny.com>. Consultada en abril de 2018.
- Schuh R.T. (2000). *Biological systematics*. Cornell University Press, Cornell.
- Schultz P.A., Bever J.D. y Morton J. (1999). *Acaulospora colossica* sp. nov. From an old field in North Carolina and morphological comparisons with similar species, *A. laevis* and *A. koskei*. *Mycologia* 91: 676-683.
- Sieverding E., Chaverri A. y Rojas I. (1988). *Acaulospora splendida*, a new species in the Endogonaceae from Costa Rica. *Mycotaxon* 33: 251-256.

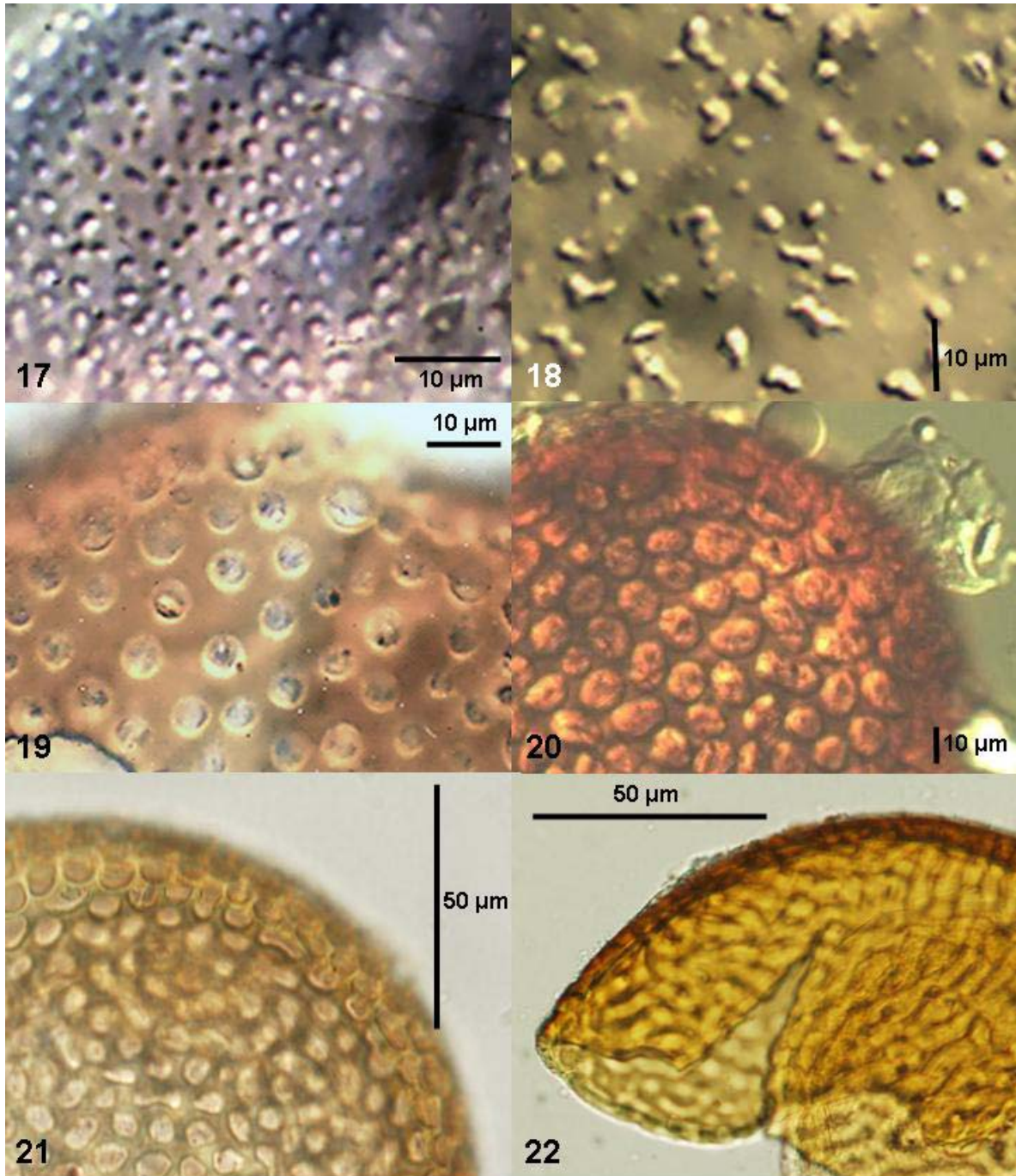
- Sieverding E. y Toro S.T. (1986). The genus *Entrophospora* in Colombia. Mycorrhizae, physiology and genetics. INRA. Dijon: 621-627.
- Sieverding E. y Toro S.T. (1987). *Acaulospora denticulata* sp. nov. and *Acaulospora rehmi* sp. nov. (Endogonaceae) with ornamented spore walls. *Angew Botanik* 61: 217-223.
- Souza de Pontes J., Santos V.M., Pereira C.D., Silva G.A., Maia L.C. y Oehl F. (2017). *Acaulospora spinulifera*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species from the Brazilian Cerrado and Atlantic rain forest. *Nova Hedwigia* 105(1-2): 219-229.
- Spain J.L. (1992). Patency of shields in water mounted spores of four species in Acaulosporaceae (Glomales). *Mycotaxon* 43: 331-339.
- Spatafora J.W., Chang Y., Benny G.L., Lazarus K., Smith M.E., Berbee M.L., Bonito G., Corradi N., Grigoriev I., Gryganskyi A., James T.Y., O'Donnell K., Roberson R.W., Taylor T.N., Uehling J., Vylgalys R. y White M.M. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108(5):1028-1046.
- Stürmer S.L. y Morton J. (1999). Taxonomic reinterpretation of morphological characters in Acaulosporaceae based on developmental patterns. *Mycologia* 91: 849-857.
- Swarupa R.S., Kunwar I.K. y Manoharachary C. (2003). *Acaulospora terricola* sp. nov. from India. *J. Mycol. Pl. Pathol.* 33(1): 146-147.
- Taylor A., Walker C., Bending G. (2013). Dimorphic spore production in the genus *Acaulospora*. *Mycoscience*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2013.03.001>.
- Trappe J. (1977) Three new Endogonaceae: *Glomus constrictus*, *Sclerocystis clavisporea*, and *Acaulospora scrobiculata*. *Mycotaxon* 6: 359-366.
- Gerdemann JH, Trappe JM. 1974. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycol. Memoir* 5: 1-76.
- Vaingankar J.D. y Rodrigues B.F. (2011). *Acaulospora soloidea*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from rhizosphere soils of *Murraya paniculata*. *Mycotaxon* 115: 323-326.
- Velázquez M.S., Cabello M., Irrazabal G. y Godeas A. (2008). Acaulosporaceae from El Palmar National Park, Entre Rios, Argentina. *Mycotaxon* 103: 171-187.
- Villegas R.H.M. (2000). Análisis taxonómico de la familia Gomphaceae (Fungi: Basidiomycetes). Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- Walker C., Pfeifer C.M. y Bloss H.E. (1986). *Acaulospora delicata* sp. nov. an endomycorrhizal fungus from Arizona. *Mycotaxon* 25: 621-628.
- Walker C., Reed L.E. y Sanders F.E. (1984). *Acaulospora nicolsonii*, a new endogonaceous species from Great Britain. *Transactions of the British Mycological Society* 83: 360-364.
- Walker C. y Trappe J. (1981) *Acaulospora spinosa* sp. nov. with a key to the species of *Acaulospora*. *Mycotaxon* 12: 515-521.
- Wu C.-G., Liu Y.S. y Hung L.L. (1995). Spore development of *Entrophospora kentinensis* in an aeroponic system. *Mycologia* 87(5): 582-587.



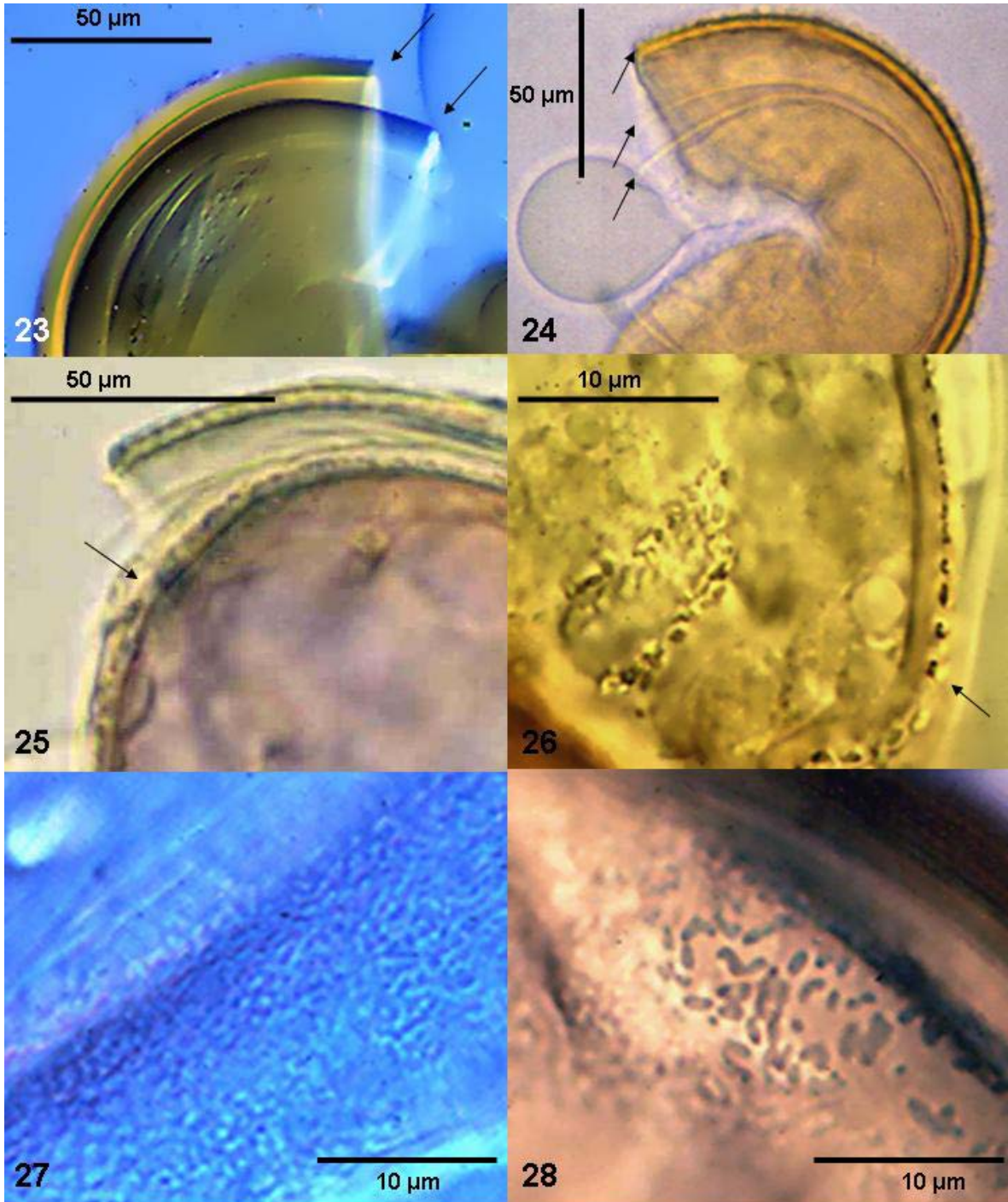
Figuras 1-6. 1. 1-2. Formación de esporas acaulosporoides, las flechas indican el sáculo. 3-4. Esporas entosporoides, las flechas indican los restos del sáculo en un extremo de la spora y los restos de la hifa cuneiforme hacia el otro. 5. Espora sésil sobre el cuerpo de la hifa cuneiforme (círculo). 6. Espora sobre un pedicelo corto sobre el cuerpo de la hifa (círculo).



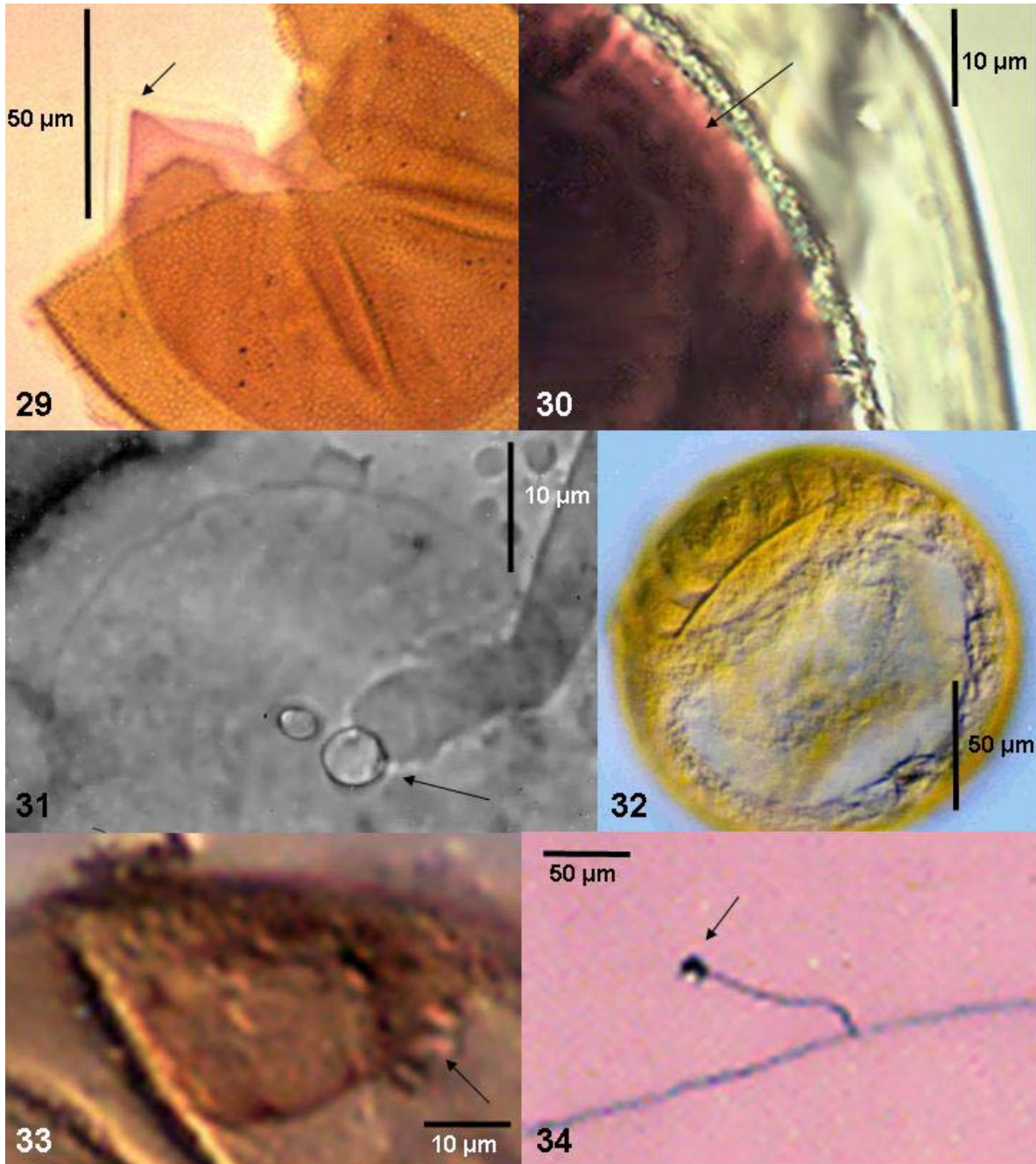
Figs. 7-16. Ornamentaciones en forma de relieves en la pared esporal. 7. Verrugas. 8. Espinas en vista frontal. 9. Columnas en vista lateral. 10. Anillos en vista frontal. 11. Anillos en vista lateral. 12. Anillos amplios con columnas bajas en su interior en vista frontal. 13. Anillos amplios con columnas bajas en su interior en vista lateral. 14. Crestas en vista lateral. 15. Proyecciones sinuosas en vista frontal. 16. Papilas en vista lateral.



Figs. 17-22. Ornamentaciones en forma de depresiones en la pared esporal. 17. Depresiones punteadas distribuidas uniformemente en vista frontal. 18. Depresiones punteadas distribuidas no uniformemente en vista frontal. 19-21. Depresiones areoladas en vista frontal. 22. Depresiones dendriformes en vista frontal.



Figs. 23-28. 23. Espora con dos grupos de pared (flechas). 24. Espora con tres grupos de pared (flechas). 25. Estrato ornamentado con excrescencias en vista lateral (flecha). 26. Excrescencias sobre el penúltimo estrato, vista lateral (flecha) 27. Ornamentación formada por excrescencias irregulares en una de las paredes internas, vista frontal. 28. Ornamentación formada por excrescencias oblongas en una de las paredes internas, vista frontal.



Figs. 29-34- 29-30. Reacción con Melzer en una de las paredes internas (flechas). 31. Escudo de forma orbicular, con un poro del que emerge la hifa de germinación (flecha). 32. Escudo de forma coclear en vista lateral. 33. Escudo con reacción púrpura claro (flecha). 34. Estructura globosa producida sobre una hifa de germinación en *Acaulospora* (teñida con azul de tripano).

COMENTARIOS

Aún cuando los HMA son en general de difícil propagación y por ende el material biológico del que se dispone es escaso, los datos sobre el género *Acaulospora* muestran que la obtención de cultivos es muy problemática. En las colecciones de HMA importantes a nivel mundial existen tan sólo 17 cepas de *Acaulospora* en el sistema tradicional en el que se emplean plantas trampa y sustratos sólidos, 13 en INVAM (INVAM 2018) y cuatro en IBEG (IBEG 2016); únicamente dos de estas especies se han aislado a partir de esporas de suelos mexicanos y se mantienen en la Colección de Microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos. En sistemas de propagación sofisticados, como el de cultivo en raíces transformadas, aunque se obtuvo a *A. rehmi* (Dalpé y Declerck 2002), el cultivo no logró ser mantenido en la colección de cultivos *in vitro* GINCO (GINCO 2018) y es hasta este año que se reportan dos especies del género en dicho sistema, *A. fragilissima* y *A. saccata*, que de hecho se describen como especies nuevas (Crossay et al. 2018). Aún cuando se ha asentado en innumerables ocasiones que los HMA son inespecíficos en su asociación hacia ciertos hospederos, los resultados encontrados aquí al evaluar el efecto de diferentes plantas sobre la propagación, muestran que efectivamente no hay especificidad en el establecimiento de la micorriza, pero sí una respuesta diferencial en la propagación. Es evidente que el primer obstáculo a vencer en el grupo es obtener material biológico para realizar observaciones en número suficiente y con el detalle necesario.

Entre los hechos que resaltan al reconsiderar la importancia de los datos morfológicos en HMA, está la simplicidad con la que se han asociado, toda vez que la tendencia ha sido generalizar las observaciones y dar por hecho que lo que es cierto para un taxon de un grupo, lo es para los otros taxa del mismo grupo, p. e., las especies de un género. Además de las generalizaciones, otros errores han sido la falta de precisión en las observaciones y la forma de interpretación de los datos. Un ejemplo claro es el caso de la forma de las esporas; uno de los términos introducidos aquí para las esporas del grupo es el de esporas con “bases ahusadas”, para indicar que la espora posee una proyección corta en uno de sus extremos y que es claro que se presenta de manera invariable en algunas especies del grupo. Otro ejemplo lo constituye la forma de la zona de contacto entre la hifa esporógena y la espora, la que se ha asociado con procesos de formación de esporas

denominados como glomoide (a partir de una hifa “simple”), acaulosporoide (a partir de un sáculo) y gigasporoide (a partir de un bulbo), cuando en realidad las esporas se forman a partir de hifas no diferenciadas (cilíndricas) o hifas diferenciadas en distinto grado y forma, como bulbos o sáculos. Asimismo, la precisión en la descripción de la ornamentación de los estratos en la pared estructural o pared de la espora y en las paredes internas o germinales, el cual podría ser clave en la delimitación de grupos discretos. En *Acaulospora laevis*, el estrato interno que presenta excrescencias no tiene un tipo cualquiera de excrescencias, sino que éstas poseen una forma elipsoide particular diferente de la de otras especies del género.

En cuestión de reactividad citoquímica, la reacción al Melzer se encuentra íntimamente asociada con la madurez de las esporas y de estructuras particulares en las mismas, como las de germinación. En *Acaulospora scrobiculata* el escudo de germinación cambia de hialina a rosa o magenta con Melzer y se tiñe intensamente con Azul de Tripiano, situación que en primer lugar la evidencia con toda claridad del resto de los componentes de la espora, y en segundo la diferencia del resto de las especies del género. Como parte de los criterios para determinar la maduración completa de las esporas debería adicionarse la formación de estructuras particulares, como las de germinación, las que se desarrollan en diferentes fases y como parte de mecanismos distintos de acuerdo con el grupo en que se presenten, caso concreto el de *A. scrobiculata* donde el escudo de germinación reacciona ante dos compuestos químicos.

En lo que respecta propiamente a la germinación en las especies de *Acaulospora* estudiadas en este trabajo el proceso es “segmentativo”, es decir, la estructura crece y se divide en secciones por el plegamiento marginal de la pared principal, que da lugar a la formación de paredes intercalares. Aunque es evidente que estos datos pueden tener un valor importante, mientras que en *Scutellospora sensu lato* se han usado repetidamente para hacer inferencias filogenéticas (Franke y Morton 1990, 1994, Morton 1995), en *Acaulospora* estas aproximaciones son escasas (Kaonongbua *et al.* 2010).

Es indudable que la expresión de la morfología de los organismos está sujeta a variables intrínsecas y ambientales, y que su estudio está sujeto a todas las limitaciones impuestas por la naturaleza humana, desde la disponibilidad de material biológico, la carencia de tecnología que permita o facilite las observaciones, la forma de aproximarse a ellas e interpretarlas, hasta la posición filosófica-conceptual acerca de que su uso es

obsoleto y no informativo; sin embargo, también es claro que aún existen muchos rasgos morfológicos que no han sido explorados y que pueden ser informativos. A esto se suma la posibilidad de utilizar técnicas o procedimientos nuevos que permitan conocer y definir con mayor precisión las variaciones en la información, como la morfometría, lo que incrementa las posibilidades de explotación de los caracteres morfológicos.

En Glomeromycotina algunos datos morfológicos que han reafirmado las últimas propuestas clasificatorias basadas en datos moleculares se refieren por ejemplo a los mecanismos de germinación en el Glomerales, los que vistos en detalle separan de manera clara a las especies del género en dos grupos: aquéllas en las que la hifa de germinación emerge a través de la base de la espora en sólo un evento germinativo, Familia Glomeraceae, y otras en las que la hifa de germinación atraviesa la pared esporal y puede presentar varios eventos germinativos simultáneos, Familia Claroideoglomeraceae (Redecker *et al.* 2013). En Acaulosporaceae, buena parte de las evidencias morfológicas sustentan la segregación de especies en géneros nuevos, tal como sucedió con las especies transferidas a *Archaeospora* y a *Ambispora*, que presentan dimorfismo esporal y por ende comparten caracteres con dos grupos de Glomerales, formas simples tipo *Glomus* por un lado y formas complejas tipo *Acaulospora* por el otro. No obstante, observaciones recientes (Taylor *et al.* 2013) y parte de los resultados de este estudio muestran que este fenómeno también se presenta en *Acaulospora*, donde muy recientemente se confirmó la formación de esporas de tipo glomoide (Crossay *et al.* 2018), por lo que será necesario determinar cuál es su significado y cuáles serán las consecuencias en términos de relaciones filogenéticas entre éste y otros glomeromicetos.

Para muchos investigadores resulta obvio que pueden existir grandes ventajas al usar caracteres moleculares en vez de morfológicos para determinar la identidad de las especies, bajo la premisa de que los primeros constituyen evidencia precisa y de primera mano acerca de la variación y de la conectividad de la información, y que además los datos morfológicos son el resultado del control genético. Visto así, la evidencia molecular incluiría implícitamente a la morfológica, sin embargo, el panorama es aún poco claro en este sentido. Además, las herramientas que permiten realizar exploraciones moleculares son en su mayoría poco accesibles debido a su alto costo y a que se requieren condiciones apropiadas que resguarden el material genético de los especímenes que se deseen analizar.

Esta situación es crítica en el caso de los HMA. Debería tenderse al uso de “evidencia total” y considerar toda la información disponible, ya que un tipo de información complementa y fortalece a la otra. Esto traería como consecuencia panoramas más completos y congruentes acerca de las relaciones entre organismos, como lo mostraron Redecker *et al.* (2013).

Para concluir se destacan los siguientes eventos relacionados con la historia de la circunscripción y las propuestas de clasificación sobre *Acaulospora* basadas en datos morfológicos y moleculares:

1. El género se describió a partir de datos morfológicos de las esporas y de su proceso de formación, disgregándose de *Endogone* (Orden Endogonales, División Zygomycota) (Gerdemann y Trappe 1974).
2. En uno de los primeros estudios filogenético de los HMA, realizado con datos morfológicos, se reconoció a *Acaulospora* y a *Entrophospora* como su pariente más cercano y se propuso a la Familia Acaulosporaceae integrada por ambos (Orden Glomales, Clase Zygomycota) (Morton 1990).
3. En el primer análisis filogenético basado en la región 18S del rDNA, se mantuvo al género y a la familia Acaulosporaceae (Orden Diversisporales, Phylum Glomeromycota) (Schüßler *et al.* 2001).
4. En una revisión taxonómica con datos morfológicos y moleculares del género éste se enmendó, transfiriéndose a él todas las especies del género *Kuklospora* (erigido por la segregación de algunas especies de *Entrophospora* y luego no reconocido) (Orden Diversisporales, Phylum Glomeromycota) (Kaonongbua *et al.* 2010)
5. Más recientemente, en una propuesta de clasificación de los HMA que conjuntó las evidencias morfológicas y moleculares conocidas hasta aquel momento, se conservó al género *Acaulospora* y a la Familia Acaulosporaceae (Orden Diversisporales, Phylum Glomeromycota) (Redecker *et al.* 2013)
6. Se propuso a *Acaulospora* como género dimórfico en el que se producen estructuras globosas de tipo glomoide, sin confirmar su función (Taylor *et al.* 2013), situación corroborada en tres de las especies estudiadas en este trabajo, *A. morrowiae*, *A. laevis* y *A. spinosa*. La producción de esporas de tipo glomoide se ha confirmado sólo para dos especies *A. fragilissima* y *A. saccata* (Crossay *et al.* 2018).

7. En la propuesta más reciente de clasificación de hongos zigomicetófilos, que incluyó a los HMA no se tomaron acciones con respecto a familias y géneros, por lo que se mantienen *Acaulospora* y Acaulosporaceae, Subphylum Glomeromycotina, Phylum Mucoromycotina (Spatafora *et al.* 2016).

CONCLUSIONES

La secuencia de cambios morfológicos que tienen lugar durante la formación de esporas en *A. bireticulata*, *A. laevis*, *A. mellea*, *A. morrowiae*, *A. scrobiculata* y *A. spinosa*, indican que el proceso es lineal y conservado en el género.

Los escudos de germinación en las especies estudiadas aquí se desarrollan en dos fases, una de crecimiento primario con dos variantes: crecimiento primario orbicular y crecimiento primario coclear, relacionadas cada una con grupos de especies particulares; la fase de crecimiento secundario tiene que ver con la compartimentalización de los escudos y en consecuencia, con una mayor complejidad morfológica.

La pared del escudo de germinación de *A. scrobiculata* debe poseer una composición química peculiar única en Glomeromycotina ya que presenta reactividad/afinidad a dos agentes químicos empleados para estudiar a los HMA (Melzer y Azul de tripano).

A las variantes morfológicas subesporales de las especies previamente reconocidas, como la ornamentación y la reactividad al Melzer en los estratos de pared, se suman el tipo de excrecencias, la morfología y reactividad de los escudos de germinación y la formación de lo que podrían ser esporas dimórficas.

Una gran cantidad de caracteres morfológicos son no informativos, ya que se comparten entre un gran número de taxa; sin embargo, existe una serie de caracteres ontogenéticos esporales y de los procesos de germinación cuyo potencial informativo puede ser muy alto, no obstante, se desconocen en una gran cantidad de taxa del grupo.

Las cifras indican que existe poca información en el género *Acaulospora*: 28% de las especies en cultivos ingresados en colecciones científicas, 12% de ellas cuentan con estudios sobre la germinación y 10% sobre la ontogenia de las esporas.

LITERATURA CITADA EN COMENTARIOS

- Crossay T, Cilia A, Cavaloc Y, Amir H, Redecker D. 2018. Four new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) associated with endemic plants from ultramafic soils of New Caledonia. *Mycol. Prog.* doi:10.1007/s11557-018-1386-5.
- Dalpé Y, Declerck S. 2002. Development of *Acaulospora rehmi* spore and hyphal swellings under root-organ culture. *Mycologia* 94:850-855.
- Franke M, Morton JB. 1990. Phylogenetic relationships among two species of *Scutellispora* based on comparative ontogeny. En: Allen MF, Williams SE (Eds.). 8th North American Conference on Mycorrhizae: Innovation and hierarchical integration. University of Wyoming y San Diego State University, Jackson Hole.
- Franke M, Morton JB. 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.
- Gerdemann JH, Trappe JM. 1974. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycol. Memoir* 5: 1-76.
- GINCO. 2018. <http://www.mycorrhiza.be/ginco-bel/>.
- IBEG. 2018. <http://i-beg.eu>. Consultada en abril de 2018.
- INVAM. 2018. <https://invam.wvu.edu>. Consultada en abril de 2018.
- Kaonongbua W, Morton JB, Bever JP. 2010. Taxonomic revision transferring species in *Kuklospora* to *Acaulospora* (Glomeromycota) and a description of *Acaulospora colliculosa* sp. nov. from field collected spores. *Mycologia* 102(6):1497-1509.
- Morton JB. 1990. Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia* 82:192-207.
- Morton JB. 1995. Taxonomic and phylogenetic divergence among five *Scutellospora* species (Glomales, Zygomycetes) based on comparative developmental sequences. *Mycologia* 87:127-137.
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer SL, Morton JB. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*. DOI 10.1007/s00572-013-0486-y.
- Schüßler A, Schwartzott A, Walker C. 2001. A new fungal Phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105(12):1413-1421.
- Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, Bonito G, Corradi N, Grigoriev I, Gryganskyi A, James TY, O'Donnell K, Roberson RW, Taylor TN, Uehling J, Vylgalys R, White MM. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108(5):1028-1046.
- Taylor A, Walker C, GD Bending. 2013. Dimorphic spore production in the genus *Acaulospora*. *Mycoscience*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2013.03.001>.