



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

---

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Cultivo y caracterización de la morfogénesis de  
algunas especies del género *Cribraria*

**T e s i s**

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Biológicas

P r e s e n t a

**Marisol García Sastré**

Director de tesis

Dr. Arturo Estrada Torres

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre 2007



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Cultivo y caracterización de la morfogénesis de  
algunas especies del género *Cribraria*

**T e s i s**

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Biológicas

P r e s e n t a

**Marisol García Sastré**

Director de tesis

Dr. Arturo Estrada Torres

Comité Tutorial

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

M. en C. Laura V. Hernández Cuevas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Sistemática del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, bajo la dirección del Dr. Arturo Estrada Torres, y en la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de México (UNAM), bajo la asesoría de las Dras. Guadalupe Judith Márquez Guzmán y Clara Esquivel Huesca, como parte del proyecto Estudio Sistemático en Myxomycetes, financiado por CONACYT, SEP-2003-CO2-44621. Para el desarrollo del proyecto se contó con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con un número de registro 188586, en la convocatoria Nacional septiembre 2004 (PIFOP), para la realización de estudios de maestría en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. La maestría en Ciencias Biológicas está actualmente registrada en el Padrón Nacional de Posgrado (PNP).

COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E


Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que la **Biól. Agrop. Marisol García Sastré** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **“Cultivo y caracterización de la morfogénesis de algunas especies del género *Cribraria*”**

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
Tlaxcala, Tlax., a 10 de Diciembre de 2007

  
Dr. Arturo Estrada Torres

  
M. en C. Gema Lilia Galindo Flores

  
M. en C. Alejandro Kong Luz

  
Dra. Ma. Mercedes Rodríguez Palma

  
M. en C. Laura Verónica Hernández Cuevas

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme lograr mi segundo sueño más anhelado, muchas gracias Dios por la serenidad ante los tiempos difíciles, siempre te llevaré en mi mente y corazón.

Agradezco muy especialmente a mi director de tesis al Dr. Arturo Estrada Torres por todo el apoyo brindado y conocimiento compartido para la realización del trabajo. Gracias querido jefe por aguantarme tanto tiempo, gracias por motivarme a seguir superándome académicamente, nunca olvidaré sus consejos y mucho menos su amistad, lo quiero mucho.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán por todos los comentarios y sugerencias aportadas al presente trabajo, pero sobre todo por darme la oportunidad de conocerla y de trabajar en su laboratorio. Muchas gracias.

A la M. en C. Laura Hernández Cuevas por el gran apoyo brindado durante y fuera la maestría, por sus valiosas correcciones a la tesis y por su amistad incondicional.

A la Dra. Ma. Mercedes Rodríguez Palma por sus comentarios para el escrito del trabajo, por su disponibilidad y amistad sincera que siempre me ha brindado.

Al Dr. Luis Villarreal Ruíz por su amabilidad en aceptar formar parte de mi comité para mi examen, por sus sugerencias y observaciones para la realización de la tesis. Muchas gracias.

A la M en C. Gema Galindo Flores por aceptar formar parte de mi comité, por su apoyo y amistad brindada.

A la Dra. Clarita Esquivel Huesca por toda la paciencia otorgada durante la estancia en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas (UNAM), además por darme la oportunidad de conocerla y de enseñarme a valorar mi trabajo, la quiero mucho.

A la Dra. Guadalupe Santiago Martínez por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por apoyarme cuando más lo necesitaba, por escucharme y motivarme a no abandonar mis proyectos y por brindarme su gran amistad.

A la Dra. Adriana Montoya Esquivel y al M. en C. Alejandro Kong Luz por su valiosa amistad, por el apoyo brindado en el laboratorio y por la experiencia adquirida en campo.

Al profesor Francisco Varela por sus magníficas y amenas clases durante la maestría.

A mis cuates de generación: Myrna, Isela, Martha, Víctor, Jorge, Germán y Tlachi por su amistad y por todas las aventuras compartidas. Gracias banda porque todos son pura neta nunca los olvidaré.

A Jorge Canales Lazcano porque siempre me brindó un techo y atención durante mi estancia en México, gracias amigo.

A Rodrigo Flores Rivera por su valiosa amistad brindada y por el apoyo para la realización del trabajo.

A mi amiga incondicional Claudia Méndez Espinoza por estar en las buenas y en las malas, por aguantarme, escucharme, comprenderme y por tu sinceridad que ha sido la fortaleza para nuestra amistad. Te quiero mucho mi Claus.

A todos mis compañeros de laboratorio: Yola Nava, Pancho, Lolita, Mayra, Alex, Porfirio, Laurita, Oscar, don Juan, don Ale y Yola Morales por aquellos momentos gratos que hemos pasado.

A Victor Águila Flores mi amigo incondicional, gracias por aguantarme tres años más, eres una gran persona y espero que la distancia no borre los gratos momentos que hemos pasado juntos. Te quiero mucho.

## DEDICATORIA

A mis padres **Rodolfo García Pluma y Martina Sastré Flores** que siempre han estado en todo momento a mi lado cuidándome, por nunca desvanecerse ante mí y demostrarme que aunque los vientos soplen tan fuerte siempre existirá una oportunidad para lograr lo más querido. Por enseñarme que la fe y la voluntad son armas para ser un triunfador. Por esto y más los admiro, respeto y quiero.

A mis tres hermanos **Roberto, Efrén y Odilón** que son lo máximo, por no defraudarme y siempre brindarme su apoyo, amistad y comprensión. Los quiero mucho.

A mi cuñada **Rocío Hernández Rojas** por su paciencia y comprensión durante mis ataques de histeria.

A mis tres queridos sobrinos **Rodrigo, Oscar y Vanesa** porque en los momentos más difíciles me han brindado una hermosa sonrisa para limar mis presiones. Los quiero mucho mis niños.

## RESUMEN

El estudio del proceso de morfogénesis de los cuerpos reproductivos genera información importante y detallada para una circunscripción adecuada de las especies. El género *Cribraria* fue descrito por Persoon en 1794 e incluye especies de micomicetos que forman esporocarpos estipitados, con un peridio parcialmente evanescente que puede formar un cálculo y/o una red peridial con nodos irregulares sobre los cuales se presentan gránulos de oxalato cálcico. En la actualidad se reconocen aproximadamente 50 especies, la mayoría de ellas se desarrollan en bosques de zonas templadas, sobre madera de coníferas en diversos estados de degradación. Es un grupo en el cual ha surgido una amplia problemática en la separación de las especies, ya que sólo se han estudiado tres taxa, por lo tanto aún se desconocen fases de su desarrollo. Por ello, el objetivo del presente trabajo es caracterizar y comparar la morfogénesis de cinco especies del género *Cribraria* en cultivos en cámara húmeda y analizar a nivel estructural la presencia o cambios de almidones, proteínas, lípidos y polisacáridos de una especie a través de cortes incluidos en resina de las distintas fases de su desarrollo.

De las 305 cámaras húmedas que se montaron se obtuvieron seis especies de *Cribraria* y corresponden a: *Cribraria cancellata*, *C. lepida*, *C. microcarpa*, *C. violacea*, *Cribraria* sp. y *C. cf. vulgaris*, para esta última sólo se encontraron esporocarpos maduros, para las otras cinco especies el desarrollo morfogénético consistió en: a) concentración de la masa del protoplasma en primordios; b) elevación de la masa del protoplásmica por la formación del estípote; c) alargamiento del estípote; d) migración de gránulos para la formación de cálculo con red peridial, sólo red o costillas radiales. Las fases vegetativas sólo se observaron para *C. cancellata*, el plasmodio es reticulado y con corrientes protoplasmáticas bidireccionales, esta fase no fue observada para el resto de las especies.

De las observaciones realizadas para *Cribraria* sp. en cortes finos, no se encontraron evidencias de almidones. Los lípidos se observaron en las primeras etapas de su desarrollo alrededor de la membrana y en los esporocarpos semimaduros en el estípote. Las proteínas se observaron desde los primordios hasta los esporocarpos maduros. Los polisacáridos insolubles se observaron en el interior del primordio, pero su presencia fue mayor durante la formación de las esporas.



## ÍNDICE

	Pág.
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1. Ubicación filogenética y clasificación de los mixomicetos .....	3
2.2. El género <i>Cribraria</i> .....	7
2.3. Estudios sobre la morfogénesis de mixomicetos en cámara húmeda .....	8
2.4. Estudios sobre la morfogénesis del género <i>Cribraria</i> .....	11
2.5. Estudios químicos en mixomicetos.....	15
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	19
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	20
4.1. Objetivo general .....	20
4.2. Objetivos específicos .....	20
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	21
5.1. Fase de campo .....	21
5.2. Fase de laboratorio .....	21
5.2.1. Montaje de cámaras húmedas .....	21
5.2.2. Determinación y descripción de las especies obtenidas en cámaras húmedas .....	22
5.2.3. Cosecha de esporocarpos y análisis de su desarrollo morfogenético .....	22
5.2.4. Montaje de material biológico para realización de cortes en ultramicrotomo .....	23
5.2.5. Técnicas histoquímicas .....	24
<b>6. RESULTADOS</b> .....	27
6.1. Descripción de los esporocarpos maduros de las especies encontradas en los cultivos de cámaras húmedas .....	27
6.2. Desarrollo morfogenético de las especies de <i>Cribraria</i> en cámara húmeda.....	33
6.3. Cortes fijados en FAA y teñidos con azul de toluidina.....	46
6.3.1. <i>Cribraria cancellata</i> .....	46
6.3.2. <i>Cribraria</i> sp. ....	47
6.4. Observaciones en cortes sin teñir.....	48

6.5. Cortes fijados en glutaraldehído-paraformaldehído y pruebas histoquímicas de <i>Critidia</i> sp.....	53
6.5.1. Prueba de lugol .....	53
6.5.2. Prueba de rojo "O" de aceite .....	53
6.5.3. Prueba de polisacáridos insolubles .....	54
6.5.4. Prueba de proteínas .....	54
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	58
7.1. Fases somáticas: plasmodios .....	59
7.2. Morfogénesis de los esporocarpos .....	61
7.3. Pruebas histoquímicas .....	65
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	68
<b>9. PERSPECTIVAS</b> .....	69
<b>10. REFERENCIAS</b> .....	70

## L INTRODUCCIÓN

Las mixomicetos son organismos holozoicos cuyo complejo ciclo de vida va de esporas a células ameboflageladas, seguido por la formación de plasmodios y éstos por la formación de cuerpos reproductivos, en donde nuevamente se forman las esporas. Sus fases somáticas son masas protoplásmicas multinucleadas, frecuentemente reticuladas que se mueven activamente. Su modo holozoico de nutrición y su movilidad los asemejan a los animales, pero sus estructuras reproductivas y sus meiosporas son similares a los de los hongos. Esta combinación de características ha dificultado el entendimiento de sus relaciones con otros grupos de organismos, lo cual los ha hecho interesantes para estudios evolutivos y sistemáticos (Collins 1987).

La transformación morfológica del plasmodio para originar los cuerpos reproductivos, se ha considerado como uno de los procesos biológicos más intrigantes y poco comprendidos (Gray y Alexopoulos 1968). En ese sentido, el estudio del desarrollo y morfogénesis de diversas estructuras genera información importante que podría ayudar a responder preguntas sobre las relaciones filogenéticas entre grupos de organismos (Mabee 1993) y a dar evidencias más sólidas sobre la circunscripción de los diferentes grupos taxonómicos (Mishler y De Luna 1991).

Alexopoulos (1969) sugirió que la taxonomía descriptiva de los mixomicetos debe de ser complementada con evidencias experimentales y mencionó que en este grupo se debe dar mayor énfasis a los tipos de plasmodios y al desarrollo de los cuerpos reproductivos, ya que actualmente, estos caracteres son de importancia fundamental en su clasificación. Así, la secuencia de desarrollo de los esporocarpos ha conducido a la separación del orden Stemonitales en una subclase diferente, la Stemonitomicetidae (Ross 1973).

El estudio de la morfogénesis de los cuerpos reproductivos de diversas especies de mixomicetos se ha facilitado con la utilización de la técnica de espora a espora en medios semi-definidos (Keller y Eliasson 1992), pero en muchas especies, su análisis se ha llevado a cabo en cultivo en cámara húmeda (Goodwin 1961, Welden 1955), siendo esto especialmente relevante en aquellas especies que no pueden cultivarse bajo condiciones más controladas (Lado y cols. 1999).

En el caso particular del género *Cribraria*, no se ha logrado establecer el cultivo en medios semi-definidos de ninguna especie (Keller 1996), lo que ha limitado la descripción de sus ciclos de vida y procesos de morfogénesis de los esporocarpos. La información existente en este género se ha obtenido a partir de cultivos en cámara húmeda (Lado y cols. 1999) y hasta ahora no existen suficientes datos que permitan comparar el desarrollo entre diferentes especies y/o grupos de especies, y determinar si el análisis de este proceso genera información sobre caracteres adicionales taxonómicamente útiles en la circunscripción de las especies (Rodríguez-Palma 2003). Por lo anterior, los objetivos del presente trabajo son caracterizar la morfogénesis de cinco especies de *Cribraria*, así como de aportar información histoquímica y estructural sobre cortes finos de inclusiones en resinas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Ubicación filogenética y clasificación de los mixomicetos

Los mixomicetos al igual que los hongos, fueron incluidos originalmente en el reino *Plantae* (Martin 1949, 1960, Martin y Alexopoulos 1969, Alexopoulos 1973), pero se les ha relacionado también con los protozoarios, incluyéndolos en el reino *Animalia* (Bessey 1950, Olive 1970). Whittaker (1969) los consideró en el reino *Fungi*, en tanto Margulis (1974) y Whittaker y Margulis (1978) los incluyeron en el reino *Protista*, mientras que Cavalier-Smith (1981) los agrupó en el reino *Protozoa*. Leedale (1974), por su parte, propuso que estos organismos deberían de constituir su propio reino.

Olive (1975) consideró que los mixomicetos conforman un grupo monofilético junto con protostélidos y dictiostélidos, por presentar fases ameboides con pseudópodos filosos y crestas mitocondriales tubulares. No obstante, pocos estudios han abordado la ubicación de los mixomicetos desde un punto de vista cladístico.

Spiegel y cols. (1995) utilizaron secuencias de las sub-unidades pequeñas de ADN ribosomal para conocer las relaciones filogenéticas entre los tres grupos de Eumicetozoarios (mixomicetos, protostélidos y dictiostélidos). Para ello, utilizaron como unidades taxonómicas de interés a *Physarum polycephalum*, *Protostelium mesophyllum* y *Dictyostelium discoideum*. Sus resultados señalan que los tres grupos de estudio forman un grupo monofilético.

Baldwin y Doolittle (1997) realizaron un estudio filogenético utilizando secuencias de ADN ribosomal así como de las proteínas actina,  $\beta$ -tubulina y el factor de elongación  $1\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) de varios organismos. Sus resultados indican que los Micetozoa forman un grupo monofilético y sugieren que éstos son el grupo hermano del clado hongos-animales (Figura 1).

Basados en el desarrollo de las fases reproductoras y el tipo de plasmodio, autores como Ross (1975), Farr (1976) y Martin y cols. (1983) reconocieron tres subclases de mixomicetos: Ceratiomicetidae, Mixogastromicetidae y Stemonitomicetidae, y seis órdenes: Ceratiomixales, Liceales, Physarales, Echinosteliales, Trichiales y

Stemonitales, el primero perteneciente a la subclase Ceratiomicetidae, el último a la subclase Stemonitomicetidae y los restantes a la subclase Mixogastromicetidae (Martin y cols. 1983).

No obstante, la subclase Ceratiomicetidae es distinta de las otras dos subclases de mixomicetos, debido a que sus esporas se producen sobre los cuerpos reproductivos, es decir de manera exógena y no de forma endógena como sucede en Mixogastromicetidae y Stemonitomicetidae. Además, su ciclo de vida difiere en aspectos importantes como la ausencia del movimiento protoplasmático reversible en los plasmodios, característico de muchas especies endospóricas, y la presencia durante la germinación de las esporas de un protoplasto con cuatro núcleos que forma una fase alargada denominada "filamento", que no se observa en las especies endospóricas, por lo que Olive y Stoianovitch (1972) y Olive (1975) ubicaron a *Ceratiomyxa* dentro de los protostélidos. El arreglo ultraestructural del aparato basal del flagelo de este género difiere del encontrado en los otros órdenes de mixomicetos, y es más parecido al de algunos protostélidos, lo que apoya la segregación de Ceratiomixales del resto de los mixomicetos y su ubicación en la clase Protostelida (Spiegel 1990).

Fiore-D'Amico y cols. (2005) examinaron las relaciones filogenéticas entre los cinco órdenes de mixomicetos reconocidos por Olive (1975: Echinosteliales, Liceales, Trichiales, Physarales y Stemonitales), a través de caracteres moleculares como las subunidades cortas del ARN ribosomal y el factor de elongación 1- $\alpha$ . Los análisis combinados y separados demostraron que los mixomicetos se dividen en tres grupos. Un clado basal integrado por los Echinosteliales, que tiene esporas ligeramente pigmentadas o no pigmentadas. Un segundo grupo consistente de Liceales y Trichiales, más caracterizados por poseer esporas pigmentadas pero de colores pálidos; y un tercer grupo formado por Physarales y Stemonitales, ambos con esporas de color oscuro (Figura 2).

Ramírez-Ortega y cols. (2005) realizaron un análisis cladístico basado en caracteres morfológicos para conocer la posición filogenética de la familia Cribrariaceae, incluida en el orden de los Liceales. Utilizaron 57 especies representativas de mixomicetos y 60 caracteres morfológicos; además, usaron dos especies de dictiostélidos como grupo externo. En sus resultados obtuvieron cinco clados. El primero incluyó dos subclados,

uno que correspondió con los Physarales y el otro que incluyó a *Licea variabilis* (Liceales) y *Calomyxa metallica* (Trichiales). El segundo clado comprendió a la familia Cribariaceae y algunos miembros de los Trichiales. El tercer clado estuvo constituido por los Semonitales y los Echinosteliales. El cuarto se formó con los miembros de la familia Reticulariaceae y el quinto comprendió a los de la familia Liceaceae. Estos resultados sugieren que los Liceales son un grupo polifilético y que el grupo hermano de Cribariaceae podría ser el orden Trichiales.

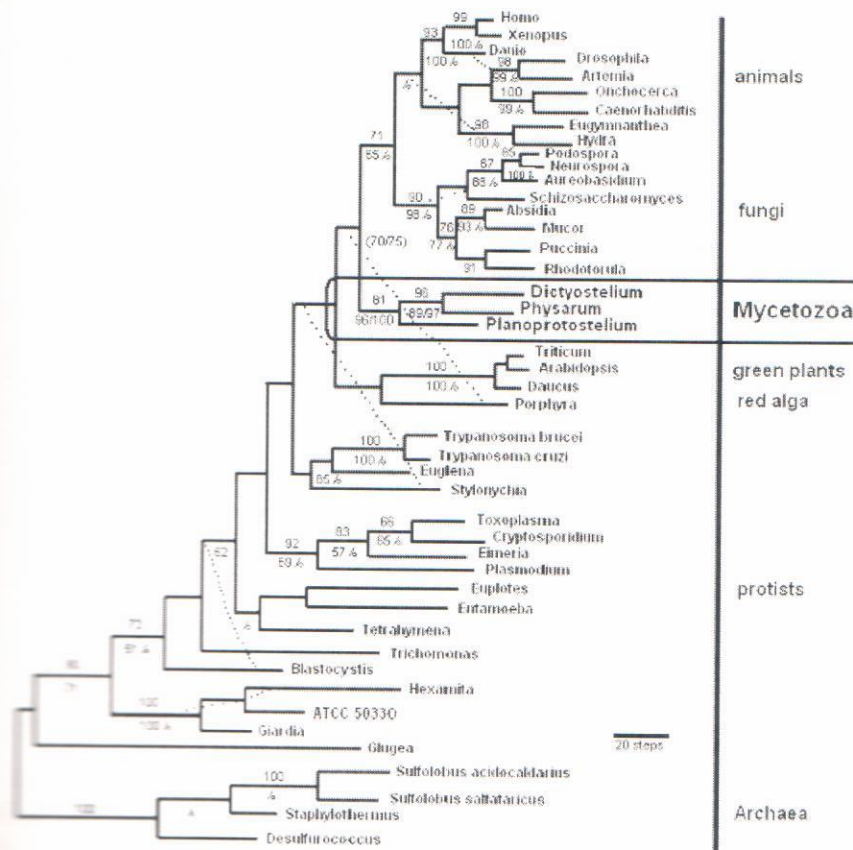


Figura 1. Análisis filogenético basado en diferentes secuencias de ARN ribosomal, actina,  $\beta$ -tubulina y el factor de elongación  $1\alpha$  (EF- $1\alpha$ ) de varios organismos, muestra a los Mycetozoa como un grupo monofilético y al clado hongos+animales como su grupo hermano (Baldauf y Doolittle 1997).

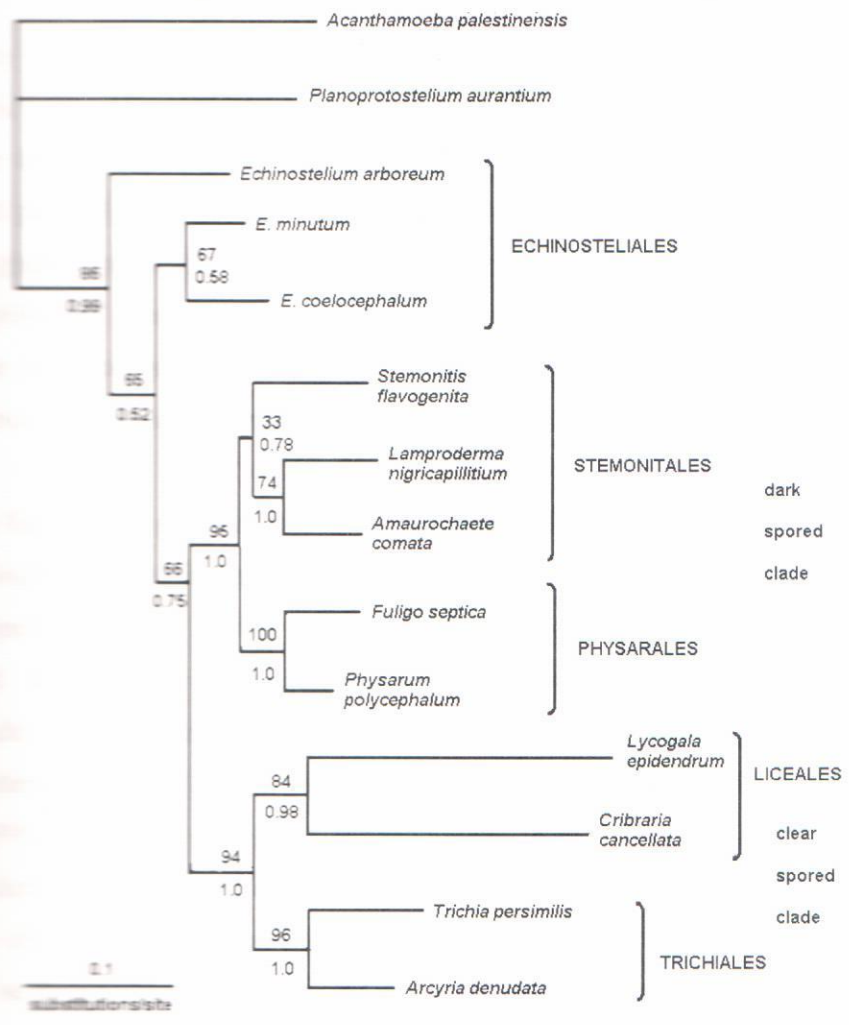


Figura 2. Análisis filogenético de los cinco órdenes de mixomicetos basado en secuencias de sub-unidades de ARN ribosomal y del factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), en el cual se forman tres clados. Los Echinosteliales forman el clado basal. Los otros clados están formados por Liceales-Trichiales y Physarales-Stemonitales (Fiore-Donno y cols. 2015).



## 2.2 El género *Cribraria*

El género *Cribraria* incluye especies de mixomicetos que forman esporocarpos estipitados, generalmente de forma globosa, con un peridio parcialmente evanescente que puede dejar restos en la base en forma de un cálculo y en el resto costillas radiales o una red peridial con nodos irregulares. Las esporas son generalmente verrucosas, aunque algunas especies presentan esporas con ornamentación en forma de retículos. No existe capilicio ni pseudocapilicio y entre las esporas y sobre la superficie de la red peridial se presentan gránulos de oxalato cálcico que frecuentemente son denominados como gránulos dictidinos (Martin y Alexopoulos 1969, Nannenga-Bremekamp 1991).

El género fue descrito por Persoon en 1794 (Martin y Alexopoulos 1969) y junto con el género *Lindbladia*, conforma la familia Cribrariaceae del orden Liceales. Desde su circunscripción original, se han descrito una gran cantidad de especies, pero en la actualidad se reconocen aproximadamente 50 (Lado 2001), incluyendo aquellas consideradas como pertenecientes al género *Dictydium* por diversos autores estadounidenses (Martin y Alexopoulos 1969, Farr 1976, Martin y cols. 1983, Keller y Brian 1999). La mayoría de las especies se desarrollan en bosques de zonas templadas, sobre madera de coníferas en diversos estados de degradación (Martin y Alexopoulos 1969), no obstante, unas cuantas son folícolas y recientemente se han descrito un par de ellas que se desarrollan sobre restos de cactáceas en zonas áridas (Lado y cols. 1999, Estada-Torres y cols. 2001).

Tanto Alexopoulos y Sáenz (1975) como Eliasson (1977) han señalado que la taxonomía del género *Cribraria* es muy problemática y requiere de una revisión crítica, debido a que sólo pocas especies están bien definidas y el resto son altamente variables, por lo que los caracteres de muchas especies se traslapan. No obstante, se siguen describiendo nuevas especies basadas solamente en unos cuantos especímenes y sin una revisión crítica de la variación morfológica intraespecífica que puedan mostrar (Zhou y Li, 1982; Neuhert y cols. 1993). Esta situación se complica por el hecho de que todos los intentos para lograr su cultivo en laboratorio han fallado (Collins, 1979), logrando cuando mucho la obtención de plasmodios (McManus 1966) o zigotos (Lado y cols. 1999), lo que ha hecho imposible el estudio de la estabilidad de los caracteres

morfológicos de los esporocarpos y de la validación de los caracteres usados en la separación de las especies.

### 2.3 Estudios sobre la morfogénesis de mixomicetos en cámaras húmedas

Ross (1960) estudió el desarrollo esporangial de *Lamproderma arcyrionema*. En su trabajo describió para esta especie plasmodios de color blanco lechoso como pequeños parches cubriendo el sustrato. Una hora después observó montículos amorfos que posteriormente formaron primordios esporangiales de forma esférica. Dos horas después el primordio se elevó por arriba del sustrato sobre un estípite, el cual se alargó y ramificó en el ápice. Los primeros cuerpos reproductivos inmaduros se encontraron después de siete horas. Posterior a las ocho horas, se observaron cambios en la coloración de los cuerpos reproductivos, mismos que fueron de un rosa pálido a un color oscuro y de éste a un rojizo marrón.

Goodwin (1961) describió el desarrollo de tres especies del género *Comatricha* (*Comatricha nigra*, *C. fimbriata* y *C. elegans*) en cultivos de cámara húmeda y empleando como sustrato cortezas de *Ulmus americana*. Observó que en las tres especies el hipotalo se forma por debajo de la masa protoplásmica. También observó la formación del estípite, el cual conforme se alarga muestra estriaciones hacia el ápice. Después de la formación del estípite se origina la columela y el capilicio por medio de secreciones intraplasmáticas del esporocarpo. Simultáneamente se forma el peridio y cuando el capilicio madura, el protoplasma se divide para dar origen a las futuras esporas.

Ross (1973) señaló que existen dos tipos de desarrollo de los esporocarpos, el mixogastroide y el estemonitoide, argumento que utilizó para separar a los Stemonitales del resto de la subclase Mixogastromicetidae. En el tipo mixogastroide (subhipotático), el plasmodio (Figura 3a) forma un hipotalo supraplasmodial (Figura 3b). El plasmodio empieza a formar montículos, cada montículo se alarga en una estructura columnar (Figura 3c), formando el estípite por donde migra todo el protoplasma hacia el ápice (Figura 3d). El ápice se expande y el estípite se constriñe (Figura 3e). Se forma el capilicio y las esporas, en tanto la capa peridial queda continua con el estípite y el hipotalo (Figura 3f).

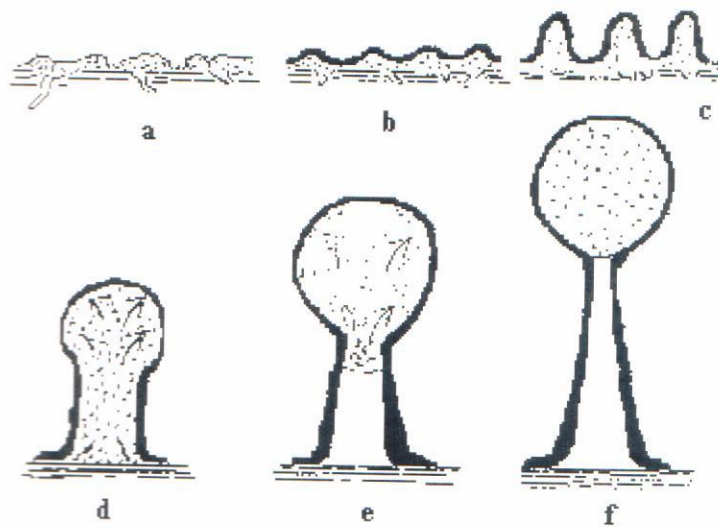


Figura 3. Tipo de desarrollo mixogastroide o subhipotático. Plasmodio (a), hipotalo supraplasmodial (b), formación de montículos columnares (c), formación de estípite y migración de protoplasma (d), expansión de ápice y constricción de estípite (e), formación de esporas y capilicio (f) capa peridial continua con estípite e hipotalo (tomado de Ross 1973).

En el tipo de desarrollo estemonitoide (epihipotático), el plasmodio (Figura 4a) forma el hignalo sobre el sustrato (Figura 4b) y se concentra en una o más masas casi esféricas, las que empiezan a depositar un estípite en el hipotalo (Figura 4c). El estípite se empieza a alargar y el protoplasma empieza a migrar de forma lenta y continua hacia arriba (Figura 4d y e). El protoplasma rodea la punta del estípite y secreta una pared delgada (Figura 4f). En el interior del protoplasma se forman los filamentos del capilicio que se extienden de la columela hacia la superficie; finalmente se forman y maduran las esporas (Ross 1973).

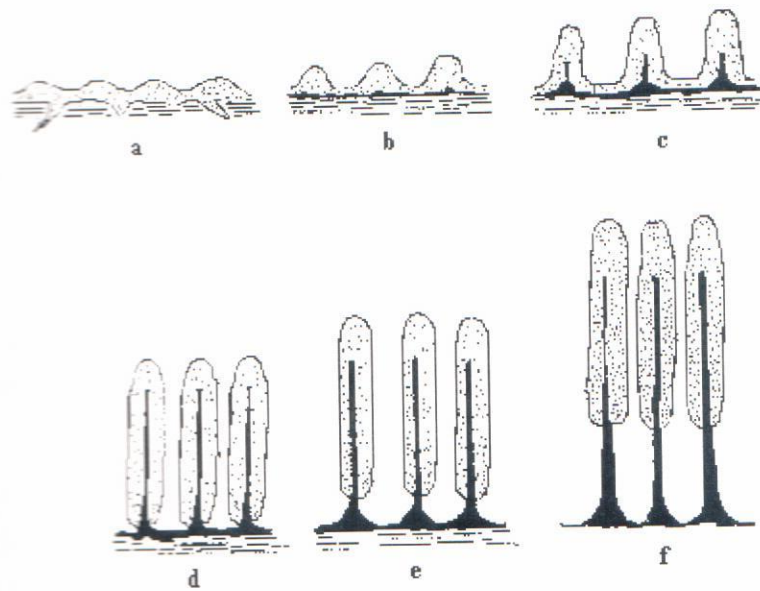


Figura 4. Tipo de desarrollo estemonitoide o epihipotático. Plasmodio (a), formación de un hipotalo sobre el sustrato (b), depositación de estípites (c), alargamiento de estípites (d), migración del protoplasma (e), el protoplasma forma una pared; formación de capillio y esporas (f) (tomado de Ross 1973).

Castro y Mukerji (1976) estudiaron el desarrollo de los cuerpos reproductivos de tres especies de mixomicetos. *Licea scyphoides*, *Clastoderma debaryanum* y *Mucronaria cornea*. Las dos primeras presentaron el tipo de desarrollo subhipotático, mientras que la última lo tuvo de tipo epihipotático. En *L. scyphoides*, el plasmodio tarda entre siete y ocho horas para dar origen a los cuerpos reproductores. Para *C. debaryanum*, el plasmodio aparece sobre el sustrato como pequeñas gotitas, cada plasmodio joven es similar a los de *L. scyphoides* pero en este caso son esféricos o subsféricos y se multiplican con la producción de grupos de dos a cinco plasmodios. El protoplasma del plasmodio es altamente granular y cada plasmodio da origen a un sólo cuerpo reproductor. En *M. cornea* se observaron afanoplasmodios después de casi siete días de incubación de las cámaras húmedas; los plasmodios migraron hacia el papel filtro y se multiplicaron rápidamente formando un retículo con venas, las cuales no están bien diferenciadas pero muestran corrientes protoplásmicas reversibles.

Lakhanpal y Sood (1981) describieron el desarrollo de *Echinostelium cribrarioides* en cámaras húmedas. Observaron que el protoplasmodio aparece sobre el sustrato como gotitas gelatinosas y cada plasmodio produce un solo cuerpo reproductivo. El desarrollo esporangial en esta especie es similar al de *Clastoderma minutum* y *C. debaryanum*. El primordio es transparente y granular, y se eleva gradualmente sobre el estípite. Éste último aparece inicialmente en el primordio como un área triangular el cual se alarga llevando al primordio en el ápice del estípite. El tipo de desarrollo de esta especie se definió como subhipotálico.

#### 2.4 Estudios sobre la morfogénesis del género *Cribraria*

McManus (1964) observó los plasmodios de *Cribraria violacea* en cultivos en cámaras húmedas, los cuales son microscópicos y producen un solo esporangio sobre cada plasmodio. Aunque estos plasmodios se asemejan a los protoplasmodios, difieren de ellos porque producen una red de venas con corrientes protoplásmicas. Esta autora describió también el desarrollo morfogenético de los esporocarpos de esta especie, señalando que la masa protoplásmica esporógena se encuentra en el ápice del estípite y cambia su coloración de negro a blanco lechoso y posteriormente se oscurece gradualmente a color rosado y finalmente al color violeta característico de las fructificaciones maduras.

McManus (1966) transfirió plasmodios de *Cribraria violacea* previamente obtenidos en cultivos de cámara húmeda a cultivos en agar. Observó que los plasmodios más jóvenes se comportan como una gran ameba y presentan una gran vacuola contráctil. Los plasmodios de esta especie tienen movimientos característicos no observados en ningún otro tipo de plasmodio, ya que no hay los movimientos intermitentes y azarosos característicos de los protoplasmodios, sino que se observan corrientes rítmicas que a diferencia de los faneroplasmodios sólo son unidireccionales.

Nannenga-Bremekamp (1991) ilustró el proceso de morfogénesis de los esporocarpos en *Cribraria aurantiaca*. El plasmodio agregado se fragmenta en pequeñas porciones (Figura 5a). Éstas se agregan formando grupos de primordios esféricos (Figura 5b), en los que posteriormente se inicia la formación del hipotalo y el estípite (Figura 5c). El estípite comienza a alargarse llevando en su ápice una masa globular protoplásmica (Figura 5d). Finalmente, el estípite alcanza su longitud final y los nodos y el cálculo se diferencian completamente (Figura 5e). Nannenga-Bremekamp (1991) señaló que el desarrollo de esta especie es de tipo mixogastroide.

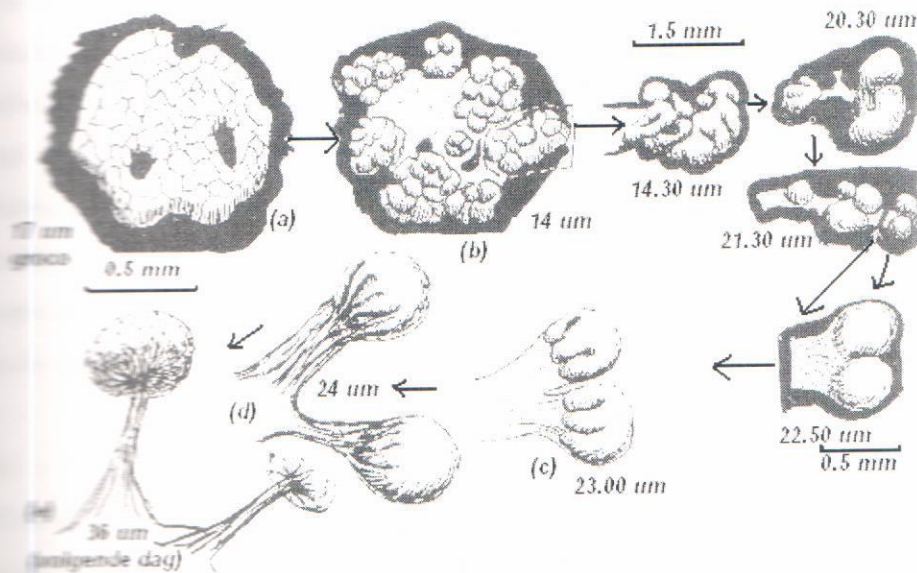


Figura 5. Proceso de morfogénesis de *Cribraria aurantiaca*. Plasmodio agregado y fragmentado (a), formación de primordios y cuatro ampliaciones de ellos (b), formación de hipotalo y estípite (c), alargamiento de estípite (d), esporocarpo maduro (e) (tomado de Nannenga-Bremekamp 1991).

McHugh y Reid (1996) mencionaron que el plasmodio de *Cribraria argillacea* emerge del sustrato como una masa gelatinosa que se fragmenta en burbujas redondeadas de 0.2-0.3 mm de diámetro, y se encuentran rodeadas por una membrana simple. Señalaron que el material que conforma la pared es llevado a la periferia por vacuolas y que conforme el peridio se engrosa llegan a hacerse aparentes unos cuerpos redondeados en el que darán origen a los gránulos dictidinos característicos del cuerpo reproductivo maduro. Estos autores afirmaron que los gránulos no se originan en el peridio, si no que son formados por vacuolas que se acumulan ahí, o a partir de estructuras encerradas en ellas (McHugh y Reid 1996). Conforme los gránulos se desarrollan, material adicional es adquirido a partir del colapsamiento de algunas vacuolas, de tal forma que aparece el patrón de grupos de gránulos ligados por costillas. Una vez que el peridio se forma, el esporocarpio se agranda hasta 0.5-1.0 mm de diámetro. Proponen que el proceso de calcificación del peridio lo vuelve impermeable, deteniendo la evaporación superficial de tal forma que el esporocarpio inmerso en agua se hincha. El estiramiento de las regiones superiores del peridio lo rompe entre las costillas, dando origen a la red superficial característica del género. La segmentación de las esporas ocurre entonces y la esporoteca se vuelve ocre. El secado subsecuente permite la liberación de las esporas a través de los intersticios de la red.

Ueda y cols. (1999) describieron detalladamente el desarrollo morfogénico de *Cribraria zomatispora* en cultivo en cámaras húmedas. El proceso inicia con la agregación de plasmodios maduros sobre el sustrato formando manchas protoplásmicas irregulares de color púrpura negrozco. Observaron que el protoplasma se encuentra limitado por una capa exterior y contiene gránulos dictidinos púrpuras homogéneamente distribuidos que le dan el color al plasmodio. Los plasmodios se concentran formando masas hemisféricas que posteriormente llegan a ser esféricas.

Durante las fases tempranas de desarrollo una membrana hialina cubre la superficie de los esporocarpos jóvenes. El hipotalo y el estípite empiezan a diferenciarse en la parte basal. Cuando el estípite se está formando, la masa del protoplasma globular disminuye progresivamente en volumen y llega a ser más pálida. Cuando el estípite termina su alargamiento se observa aún una capa exterior que delimita el contenido de la esporoteca. La distribución de los gránulos dictidinos en el interior de la esporoteca es homogénea, pero menos densa que en el plasmodio maduro. Una vez que el estípite se

ha firmado, la esporoteca comienza su maduración. Los gránulos comienzan a emigrar hacia la periferia, concentrándose en la base y en áreas aisladas dentro de la capa exterior para dar origen al cálculo y a fragmentos peridiales. La formación de las esporas comienza con la diferenciación de pequeñas vesículas que generalmente tienen protoplasma granular y una gota hialina de apariencia lípidica. La masa de esporas se oscurece conforme madura hasta llegar al característico color violeta de las esporas de la especie, con su cingulo más pálido. Cuando la morfogénesis ha finalizado, el peridio permanece sólo en el cálculo y como fragmentos aislados sobre la superficie (Lado y cols. 1999).

Más recientemente, Estrada-Torres y cols. (2002) realizaron un estudio sobre la morfogénesis de los esporocarpos de un taxa encontrado sobre *Agave salmiana*, tentativamente identificado como *Cribraria* aff. *fragilis*, de la cual se distinguía por la presencia de un cálculo discoidal en lugar del típico cálculo profundo descrito originalmente en *Cribraria fragilis* (Estrada-Torres y cols. 2001). Estos dos taxa, junto con *C. zonatispora*, son atípicos por la ausencia de una red peridial en la esporoteca. En *C. aff. fragilis* se observaron protoplasmodios ameboides no reticulados y con movimientos activos, lo cual no logró percibirse en *C. zonatispora*. En ambas especies, el desarrollo es de tipo mixogastroide. El proceso de diferenciación de los esporocarpos incluyó las siguientes etapas: i) concentración de la masa protoplásmica del plasmodio; ii) alargamiento del estipite; iii) concentración del protoplasma violeta en la parte superior del estipite; iv) migración de los gránulos protoplásmicos hacia la periferia de la esporoteca formando el cálculo en la base y nodos aislados sobre la superficie de la misma; v) formación de las esporas y vi) fragmentación del peridio. En ninguno de los casos se pudieron evidenciar conexiones entre los nodos con el cálculo.

Las tres especies cuyo proceso de desarrollo de los esporocarpos está mejor estudiado comparten ciertas características como el color y el tamaño pequeño de los esporocarpos, además las tres poseen plasmodios microscópicos de color violeta que dan origen a un sólo esporocarpo, a diferencia de otras especies del género, en las cuales se ha sugerido que el plasmodio puede originar múltiples esporocarpos (Nannenga-Bremkamp 1941, McHugh y Reid 1996).



La escasa información conocida hasta ahora sobre el desarrollo de los esporocarpos de las especies de *Cribraria* parece indicar que el proceso general es muy similar, aunque en el caso de *Cribraria violacea* se ha descrito un plasmodio con venaciones reticuladas (McManus 1964), las esporotecas maduras están constreñidas en el cálculo y presentan conexiones filamentosas entre los nodos (Lado y cols. 1999). En el caso de *Cribraria zonatispora* y *C. aff. fragilis*, la principal diferencia parece estar dada por el área que cubren los nodos sobre la esporoteca (Estrada-Torres y cols. 2002). No obstante, falta todavía información para comparar el proceso morfogénico en las tres especies, ya que por ejemplo, se desconocen los plasmodios de *C. zonatispora*. Asimismo, queda por resolver si *Cribraria fragilis* y el taxa recolectado sobre *Agave salmiana* son con-específicos y sólo representan variaciones extremas de la misma especie y si las características de los plasmodios y el desarrollo morfogénico de los cuerpos reproductivos de estas especies de *Cribraria* son compartidas con otros taxones del género, preguntas que sólo serán resueltas a través del cultivo en cámaras húmedas y el estudio detallado de su desarrollo morfogénico.

## 2.5 Estudios químicos en mixomicetos

Poca información existe sobre la composición química de plasmodios y estructuras reproductivas en mixomicetos, y mucho menos todavía sobre los cambios en concentración y/o composición química de diferentes compuestos durante el proceso de morfogénesis de los cuerpos reproductivos, aunque indudablemente una gran cantidad de componentes celulares y moleculares cambian durante este proceso.

Daniel (1966 citado en Gray y Alexopoulos 1968) notó que los contenidos de ARN, ADN y proteínas disminuyen cuando *Physarum polycephalum* crece sobre un medio con sales inorgánicas, pero los niveles de ARN se mantenían cuando los cultivos eran incubados con niacina.

Zelán y Ward (1963a, 1963b citados en Gray y Alexopoulos 1968) encontraron diferencias en los perfiles de proteínas antes y después de que los plasmodios iniciarán el proceso de esporulación. Los perfiles proteínicos cambiaron aún antes de que hubiera evidencias visibles de la morfogénesis. Particularmente, dichos autores reportaron hasta

80% de decremento de la actividad  $\alpha$ -amilasa después del inicio de la esporulación, llegando a ser indetectable conforme los cambios morfológicos llegaron a ser evidentes.

Tamock y cols. (1981) encontraron que los perfiles de proteínas de las fases ameboides y plasmodiales de *Physarum polycephalum* difieren tanto en composición como en concentraciones de componentes particulares. Así, el 26% de las proteínas fueron específicas a una fase o a la otra, en tanto se encontraron diferencias sustanciales en las tasas de síntesis en algunas de las proteínas comunes a amebas y plasmodios, sugiriendo que en la transición ameba-plasmodio, los cambios morfológicos y fisiológicos son acompañados por ajustes en las proporciones relativas de muchas proteínas comunes a ambas fases del ciclo de vida.

Los cambios en la cantidad de polisacáridos y posiblemente en tipos de polisacárido también ocurren durante la morfogénesis. Daniel (1964 citado en Gray y Alexopoulos 1968) observó que cuando *Physarum polycephalum* fue cultivado en la oscuridad, un polisacárido tipo glucógeno era acumulado, pero cuando se transfería a un medio con niacina-sal- $\text{CaCO}_3$  e incubado por cinco días en la oscuridad la cantidad de polisacáridos disminuía en un 90%. Sin embargo, cuando el plasmodio fue iluminado por cuatro horas, los polisacáridos volvieron a incrementarse de dos a tres veces. Cuando se omitió la niacina del medio, la síntesis de polisacáridos fue inhibida.

Así como tanto las proteínas como los polisacáridos son utilizados para el mantenimiento del plasmodio cuando éste es privado de nutrimentos e iluminación. No obstante, Daniel (1964 citado en Gray y Alexopoulos 1968) mencionó que durante estos períodos los polisacáridos son usados preferentemente sobre las proteínas.

Goodman y Rusch (1969 citados en Charvat y cols. 1973) aislaron partículas de glucógeno del plasmodio de *Physarum polycephalum* y observaron una disminución de estas durante la formación de los esclerocios, estructuras de resistencia que forma el plasmodio cuando es expuesto a condiciones adversas.

Chen y Rusch (1969 citados en Charvat y cols. 1973) indicaron que los gránulos de glucógeno disminuyen durante los periodos tempranos de formación de los esclerocios y sugirieron que la disminución del glucógeno puede indicar que este recurso es usado como energía durante la conversión de estructuras de resistencia.

Simon y Henney (1970) estudiaron las cubiertas mucilaginosas extracelulares de los plasmodios de tres especies de *Physarum*, encontrando que están formadas por glicoproteínas, cuya fracción de carbohidratos es un polímero de la galactosa. McCormick y cols. (1970a) encontraron que los plasmodios de *Physarum polycephalum* cultivados en un medio bajo en nutrientes producen una gran cantidad de mucílago extracelular durante el proceso de formación de esclerocios. Este mucílago fue analizado químicamente y se demostró que consiste de un polímero sulfatado de la galactosa que contiene trazas de ramnosa en una proporción de estos azúcares mayor de 50:1 de galactosa por unidad de ramnosa.

La naturaleza química de las paredes de las esporas ha sido un tópico de gran controversia. A través de pruebas microquímicas, Boic (1925 citado en Gray y Alexopoulos 1968) y Goodwin (1961) concluyeron que el material base de la pared esporal es celulosa, aunque más tarde Schuster (1964 citado en Gray y Alexopoulos 1968) señaló que la cubierta esporal consiste de dos capas, una exterior delgada que podría contener quitina y una interior más gruesa compuesta por celulosa. En un trabajo posterior, McCormick y cols. (1970b) realizaron un análisis químico detallado de las paredes purificadas de esclerocios y esporas de *Physarum polycephalum*, encontrando que ambas estructuras estaban constituidas en más del 80% por un raro polímero  $\beta$ 1-4 de galactosamina como el único carbohidrato presente, además de un 2% de proteínas, fosfatos (9.8% en la pared de esclerocios y 1.4% en la de las esporas) y, en el caso de las paredes esporales, aproximadamente 15% de melanina. En este estudio, se descartó definitivamente la presencia de quitina, quitosano o celulosa en las paredes de las esporas de esta especie de *Physarum*, sugiriendo que la presencia de un polímero de la galactosamina coloca a los mixomicetos como un grupo taxonómico único (McCormick y cols. 1970b). En un estudio químico de las paredes purificadas de las esporas de *Fraxig septica*, Chapman y cols. (1983) confirmaron la presencia de un polímero de la galactosamina como el principal carbohidrato constituyente de las cubiertas esporales de los mixomicetos. Estos autores estimaron en un 61.6% el contenido de galactosamina en

la pared de la espora de *Fuligo septica*, con bajos contenidos de glucosa (0.12%) y galactosa (0.56%), además de proteínas (12.0%), lípidos (16.7%), melanina (7.1%), hidratos (0.4%), sílice (0.36%), calcio (0.66%), azufre (0.08%), manganeso (0.08%) y sodio (0.02%) (Chapman y cols. 1983).

El conocimiento de la composición química de las estructuras reproductivas de los mixomicetos es aún poco conocida. Cihlar (1916 citado en Alexopoulos 1969) reportó la presencia de quitina en el capilicio de *Stemonitis fusca* y Wettstein (1921 citado en Gray y Alexopoulos 1968) encontró celulosa en las membranas de *Comatricha* y *Stemonitis*. Ulrich (1943 citado en Gray y Alexopoulos 1968) mencionó que se han reportado protidos tipo queratina en el capilicio de los mixomicetos, pero Locquin (1947, 1948, citado en Gray y Alexopoulos 1968) señaló que el capilicio de *Hemitichia repulis* está constituido principalmente de quitina. Goodwin (1961) reportó la presencia de celulosa en estípites y capilicio en tres especies de *Comatricha* utilizando pruebas microquímicas, pero no encontró evidencia alguna de este polímero en el peridio ni en el hiptalio, ni tampoco de la presencia de quitina en alguna estructura del cuerpo reproductivo. Asimismo mostró que en el capilicio, la celulosa se deposita de forma secundaria posteriormente a que un esqueleto no celulósico se ha formado, encontrando que las pruebas histoquímicas son positivas en las partes más viejas de los filamentos, pero negativas en la parte periférica de la red.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios de cultivo y descripción de la morfogénesis de los cuerpos reproductivos son herramientas que generan información detallada y valiosa cuya utilidad como fuente de evidencia taxonómica o filogenética ha sido completamente demostrada (Keller y Eliasson 1992). permiten la evaluación y reinterpretación de los caracteres morfológicos y aportan información relevante para una circunscripción más objetiva de las especies (Keller y Schoknecht 1989, Keller y Eliasson 1992) o categorías taxonómicas de mayor rango (Ross 1973). No obstante, en géneros como *Cribraria* en donde la circunscripción de las especies ha resultado problemática, existe poca información sobre la morfogénesis de los cuerpos reproductivos, ya que sólo se ha realizado un estudio detallado para *Cribraria zonatispora*, mientras que para *C. violacea* sólo se han observado los plasmodios y el desarrollo de los esporocarpos ha sido descrito de manera general, y para *C. aff. fragilis* no se han observado las fases vegetativas. Por ello, los estudios sobre la morfogénesis de las fases reproductivas permitirán obtener información potencialmente útil en la circunscripción taxonómica de las especies o en las posibles interpretaciones sobre las relaciones filogenéticas o estrategias adaptativas de los representantes del género. Asimismo, el estudio de algunos componentes químicos durante las distintas fases de desarrollo de los esporocarpos podría generar información relevante sobre los cambios fisiológicos y/o estructurales que se van manifestando durante el desarrollo de las estructuras de reproducción.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Caracterizar la morfogénesis de cinco especies del género *Cribraria* en cultivos en cámara húmeda.

### 4.2 Objetivos específicos

I. Comparar el desarrollo morfogenético de los esporocarpos de cinco especies del género *Cribraria* en cultivos en cámara húmeda.

II. Analizar la estructura de una especie de *Cribraria* a través de cortes finos de inclusiones en resinas de las distintas fases de desarrollo de los esporocarpos

III. Detectar a través de pruebas histoquímicas la presencia y, en su caso, los cambios en los patrones de distribución de almidón, proteínas, polisacáridos y lípidos durante las diferentes fases de desarrollo de los cuerpos reproductivos de una especie de *Cribraria*.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Fase de campo

Se realizaron nueve salidas al campo a zonas áridas y bosques de coníferas. Se recolectó un total de cuatro muestras de lianas, 10 de cortezas de árboles vivos, 28 de restos de *Agave* y 65 de madera de coníferas, con el objeto de buscar especies de *Cribraria* comúnmente encontradas en estos sustratos en cultivo de cámara húmeda como *C. rosacea*, *C. fragilis*, *C. zonatispora*, *C. lepida*, *C. minutissima* y *C. confusa*; por lo que el muestreo de los sustratos fue de manera dirigida. Por otra parte, cuando se encontraron otras especies en campo no reportadas en cultivo de cámara húmeda, se recolectó el sustrato y se llevó al laboratorio para intentar cultivarlas y así tener mayor variedad de especies. El material recolectado se guardó en bolsas de papel y después se transportó al laboratorio en donde fue secado al aire para eliminar el exceso de humedad. Luego se almacenó a temperatura ambiente hasta su montaje en cámaras húmedas.

### 5.2 Fase de laboratorio

#### 5.2.1 Montaje de cámaras húmedas

Para la búsqueda de especies del género *Cribraria*, se llevó a cabo el montaje de la técnica de la cámara húmeda con el material previamente recolectado en campo. Se colocaron los sustratos dentro de cajas petri de plástico (90 X 15 mm) sobre un disco de papel filtro. Posteriormente se hidrataron con agua destilada hasta punto de saturación durante 24 h y al siguiente día se retiró el excedente de agua con la ayuda de una pipeta, dejando incubar a temperatura ambiente. Se montaron dos cámaras para lianas, 40 para cortezas de árboles vivos, 119 para *Agave* y 144 para madera, con un total de 305 cámaras húmedas montadas. Éstas se revisaron cada tercer día y todos los esporocarpos encontrados fueron cosechados y herborizados o fijados en Hoyer.

## 5.2.2 Determinación y descripción de las especies obtenidas en cámara húmeda

La observación y descripción de los esporocarpos maduros se realizó a través de un estereomicroscopio marca Nikon modelo SMZ-2T y microscopía de campo claro y de contraste interferencial de Nomarski con un equipo Zeiss modelo Axioscop-Plus 2. Para la medición de las distintas estructuras de los esporocarpos (esporas, estípite, esporoteca y calículo) y la determinación de su color, se tomaron fotografías con una cámara digital marca Olympus DP70, acoplado a un equipo de microscopía de campo claro, a través del sistema de digitalización de imágenes Image Pro-Plus versión 4.5, a 4080 X 3072 píxeles y una intensidad de luz de 9. Las mediciones se hicieron a través de la calibración del propio sistema de digitalización de imágenes con un micrómetro para cada uno de los objetivos utilizados (20X, 40X y 100X), dependiendo del tamaño de la estructura a medir. Las mediciones de las estructuras de mayores dimensiones (como los esporocarpos de *C. cancellata*), se realizó con la ayuda del estereomicroscopio y un ocular micrométrico. La determinación del color se basó en las tablas de colores de Wansell (1975) y Methuen (Kornerup y Wanscher 1989) aunque la coloración obtenida es una aproximación del color real ya que las observaciones se realizaron sobre las fotografías tomadas. La descripción del color sigue entonces la notación alfa-numérica de las tablas arriba mencionadas. Para la determinación de las especies de *Cribraria* se siguieron las claves y se compararon las observaciones con las descripciones de Martin y Nannenga-Bremekamp (1969), Nannenga-Bremekamp (1991), Neubert y cols. (1993), Lado y Bouda (1997) y Mitchell (2000).

## 5.2.3 Cosecha de esporocarpos y análisis de su desarrollo morfogénico

En cuanto se detectaron las especies de interés, las cámaras húmedas se revisaron diariamente para extraer los esporocarpos en diferentes estados de desarrollo, los cuales fueron montados en medio de Hoyer o fijados en FAA. Para seguir el desarrollo morfogénico para cada especie se hicieron preparaciones semipermanentes con medio de Hoyer. Se realizó un total de 214 preparaciones: 28 para *Cribraria cancellata*, 28 para *C. violacea*, 56 para *C. lepida*, 32 para *C. microcarpa*, 16 para *C. cf. vulgaris* y 54 para *Cribraria* sp.



Las observaciones, toma de fotografías, mediciones y determinaciones de color de las distintas fases de desarrollo de las especies de *Cribraria* analizadas en el estudio, se realizaron de la misma forma como se describió en el apartado 5.2.2. La caracterización del proceso morfogenético se hizo para cinco especies: *Cribraria cancellata*, *C. lepida*, *C. maculata*, *C. violacea* y *Cribraria* sp.

#### 5.2.4 Montaje de material biológico para realización de cortes en ultramicrotomo

Parte del material de *Cribraria cancellata* y *Cribraria* sp. fijado en FAA, se clasificó de la siguiente manera de acuerdo con su estado de desarrollo:

- 20 = Primordios
- 22 = Inicio del desarrollo del estípite
- 25 = Alargamiento del estípite
- 28 = Alargamiento total del estípite
- 30 = Diferenciación de cálculo y red peridial
- 32 = Formación de las esporas

El material fijado, se incluyó en resina LRWhite marca sigma bajo el siguiente método: cada muestra se le realizaron seis enjuagues con agua destilada de cinco a seis minutos (el número de enjuagues puede variar de acuerdo con el tiempo de fijación de las muestras). Después, se realizó la deshidratación con cambios de alcoholes graduales de 30%, 50%, 70%, 85% y 96%, de 15 a 20 minutos cada uno y tres cambios de etanol absoluto por 20 minutos cada uno. Posteriormente, se realizó la pre-inclusión lenta en resinas graduales con cambios de resinas al 25%, 50% y 75% disueltas en etanol absoluto por 1-3 horas cada uno. Por último, se incluyó en resina pura haciendo tres cambios de una hora cada uno e inmediatamente el material se colocó en cápsulas de gelatina durante 24 horas a 60° C para su polimerización (Serrano, 2003; modificado por Sagivell-Huesca, comunicación personal). Después de haber realizado la inclusión se realizaron cortes finos de 1.0 a 1.7  $\mu\text{m}$ , con un ultramicrotomo marca Leica ultracut R, en las instalaciones del Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias UNAM, México.

Los cortes obtenidos se pasaron a cubreobjetos y se fijaron con calor en una estufa eléctrica. Posteriormente fueron teñidos con azul de toluidina al 0.5 %, colocando una gota sobre cada corte, fijando nuevamente con calor durante 30 s y enjuagando con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Las observaciones fueron realizadas con microscopía de campo claro y contraste interferencial de Nomarski, con un microscopio marca Zeiss modelo Axioscop-Plus. Las imágenes de los cortes observados fueron captadas con una cámara digital marca Olympus DP70 y el sistema de digitalización de imágenes Image Pro-Plus versión 4.5.

### 2.2.5 Técnicas histoquímicas

Una vez estandarizada la técnica para la obtención de cortes en el ultramicrotomo, se procedió a cosechar más esporocarpos de *Cribraria* sp. en diferentes fases de desarrollo, según el montaje de nuevas cámaras húmedas. Este material se clasificó de la misma manera que el fijado en FAA, pero esta vez se fijó en glutaraldehído-paraformaldehído con el objeto de poder aplicar diferentes técnicas histoquímicas no factibles de realizar con el material fijado en FAA. Posteriormente, se realizó la inclusión en resina JBWite con el mismo procedimiento que el utilizado para el material fijado en FAA.

Con el material incluido se realizaron cortes finos de 1.0 a 1.75  $\mu\text{m}$ , con un ultramicrotomo marca Leica ultracut R. A los cortes obtenidos, se les aplicaron cuatro pruebas histoquímicas con la finalidad de conocer la presencia y/o distribución de carbohidratos, lípidos, proteínas y polisacáridos durante las distintas fases de desarrollo de los esporocarpos. Las técnicas histoquímicas aplicadas se describen a continuación:

**Prueba de lugol.** Para observar presencia de almidón, si hay presencia de éste deben observarse gránulos de almidón de color morados o negros (López y cols. 2005).

**Procedimiento:**

- (1) Húmedar con agua
- (2) Aplicar lugol durante 5 minutos
- (3) Observar en la misma solución, evitando que la preparación se seque.

**Prueba de rojo "O" de aceite.** Para la detección de reservas lipídicas, cutina y suberina. Las reservas lipídicas se observan de color naranja o rojizo (López y cols. 2005). Procedimiento:

1. Hidratar los cortes con alcohol al 50%
2. Aplicar gotas de Rojo "O" de aceite durante 25 minutos
3. Enjuagar los cortes con alcohol al 50%
4. Enjuagar con alcohol al 30%
5. Enjuagar con agua destilada

**Prueba para proteínas con APS** (ácido peryódico-reactivo de Schiff, para polisacáridos insolubles). La presencia de proteínas se detecta con una coloración azul, mientras los polisacáridos insolubles se observan de color magenta o púrpura (López y cols. 2005; modificado por Esquivel-Huesca, comunicación personal). Procedimiento:

1. Hidratar los cortes con agua destilada
2. Aplicar algunas gotas de ácido peryódico durante 30 minutos
3. Enjuagar los cortes con agua corriente (de la llave)
4. Aplicar algunas gotas del reactivo de Schiff durante 10 minutos
5. Enjuagar con agua corriente
6. Aplicar algunas gotas de azul negro de Naftol 1% con alcohol al 50% durante 30 minutos sin dejar secar la preparación
7. Enjuagar con agua destilada

**Nota:** Los enjuagues con alcoholes se realizan muy rápido ya que si se dejan mucho tiempo los cortes pueden desprenderse.

Las observaciones y toma de fotografías de las pruebas histoquímicas aplicadas se realizaron con un microscopio Provis AX70 marca Olympus con un programa de digitalización Qcapture. Para tomar las fotografías de las pruebas de proteínas y polisacáridos insolubles se adicionaron a los cortes teñidos de dos a tres gotas de resina sintética al 60% en xilol (medio de montaje para microscopía) y después se colocó sobre ellos un cubreobjetos de 24 X 50 mm. Para la prueba Rojo "O" de aceite, se adicionaron de una a dos gotas de glicerina sobre el corte, posteriormente se colocó un cubreobjetos de 24 X 50 mm. Para esta prueba se recomienda realizar este

procedimiento unas horas antes de tomar las fotografías, ya que los cortes se decoloran en poco tiempo por la presencia del solvente del medio de montaje. La obtención de cortes y las pruebas histoquímicas se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias UNAM, México.

## RESULTADOS

Se montaron en total 305 cámaras húmedas. Sólo en 35 (11.5 % del total de cámaras montadas) se encontraron esporocarpos de diversas especies de *Cribraria* en distintas fases de maduración.

### Descripción de los esporocarpos maduros de las especies encontradas en los cultivos de cámaras húmedas

*Cribraria cancellata* (Batsch) Nann.-Bremek.

Esporocarpos densamente agrupados en extensas colonias, estipitados, generalmente sencillos, a veces erectos, de 2.1 a 4.8 mm de altura total. Esporoteca subglobosa o ovada, de 0.2 a 0.5 mm de diámetro, de color pálido rojizo (Munsell: 10R5/4) cuando contiene la masa de esporas; profundamente umbilicada hacia el ápice del estípite. Himenio membranáceo, continuo a toda la colonia de esporocarpos, negruzco (Munsell: 10R2.5/1). Estípite cilindriforme y retorcido en el ápice, estriado longitudinalmente, de 1.0 a 4.0 mm de altura, generalmente de color rojizo muy oscuro (Munsell: 10R2.5/2) a negro oscuro (Methuen: 12F7), delgado y amarillo naranja (Methuen: 4B8) en el ápice. Himenio simple, parcialmente fugaz, representado por un conjunto de costillas dispuestas desde la base hasta el ápice de la esporoteca; costillas isodiamétricas, con filamentos transversales cortos y finos conectándolas entre sí, los filamentos ocasionalmente forman en el ápice una red irregular, la cual cubre 1/4 de la esporoteca, de color rojizo oscuro (Munsell: 10R3/3). Sin columela ni capilicio. Esporas libres, subglobosas, ligeramente verrugosas, de 5.1 a 5.2  $\mu\text{m}$  de diámetro, de color amarillo naranja (Methuen: 4B8) por la luz transmitida. Gránulos cálcicos concentrados en las costillas verticales, de 1.3 a 2.0  $\mu\text{m}$  de diámetro, de color pálido rojizo (Munsell: 10R5/4).

**Material Revisado:** MÉXICO. CHIAPAS: Mpio. La Trinitaria, Laguna de Humboldt, 16° 06' 35" N, 91° 32' 15" W, 1520 m s.n.m., bosque mesófilo de montaña, sobre madera de *Pinus*, sustrato recolectado en Oct. 20, 2004, cosechado en Nov. 15, 2005, M. García-Sastré 321; ibídem, Jun. 21, 2005, M. García-Sastré 333; Jun. 20, 2005, M. García-Sastré 334; Jul. 18, 2005, M. García-Sastré 339; Abr. 16, 2007, M. García-Sastré 347.

*Colomeria legrida* Meylan.

Esporocarpus estipitados, en grupo y en ocasiones solitarios, erectos, de 0.3 a 0.6 mm de altura total. Esporoteca subglobosa o prolata, de 0.1 a 0.2 mm de diámetro, de color violeta oscuro (Methuen: 16F7). Hipotalo individual, negruzco (Munsell: 5YR2.5/1). Estípite recto, cilindríforme, de 0.2 a 0.4 mm de altura, de negruzco (Munsell: 5YR2.5/1) a rojizo marrón oscuro (Munsell: 5YR2.5/2) o violeta oscuro (Methuen: 18F7), más delgado hacia el ápice. Peridio simple, de color violeta oscuro (Methuen: 18F7), parcialmente fugaz, permanece como un cálculo en la base de la esporoteca y como una red en la parte superior; cálculo membranáceo, con finas estrías radiales, de color violeta oscuro (Methuen: 18F7); red con nodos hemisféricos, sin extremos filiformes libres. Esporas libres, de color violeta intenso (Methuen: 18B7) en masa, violeta pálido por luz transmitida (Methuen: 17B7), subglobosas, de 5.9 a 6.3  $\mu$ m de diámetro, finamente verruculosas. Gránulos cálcicos muy concentrados en el borde superior del cálculo, en los nodos de la red peridial y en la superficie del estípite, de 0.9 a 1.9  $\mu$ m de diámetro, de color violeta intenso (Methuen: 18B7).

**Materiales Revisados:** MÉXICO. PUEBLA: Mpio. Zapotitlán Salinas, Plan de Fierro, 18° 14' 30" N, 97° 34' 19" W, 1685 m s.n.m., matorral espinoso, sobre restos de *Agave*, material recolectado en Sept. 28, 2004, cosechado en Oct. 14, 2004, M. García-Sastré 265 y 266; *ibidem*, Oct. 19, 2004, M. García-Sastré 268, 269, 270 y 271; Nov. 18, 2004, M. García-Sastré 276, 277, 278 y 279; Nov. 23, 2004, M. García-Sastré 280; Dic. 01, 2004, M. García-Sastré 282 y 283; Dic. 07, 2004, M. García-Sastré 287 y 289; Dic. 08, 2004, M. García-Sastré 291 y 293; Dic. 20, 2004, M. García-Sastré 298; Dic. 23, 2004, M. García-Sastré 299 y 303; Dic. 28, 2004, M. García-Sastré 304, 307 y 308; Dic. 02, 2005, M. García-Sastré 313 y 314; Feb. 15, 2005, M. García-Sastré 318; Mar. 05, 2005, M. García-Sastré 323.

*Clavaria micriscarpa* (Schrad.) Pers.

Esporotecas agrupados, ligeramente inclinados, de 0.9 a 3.4 mm de altura. Esporoteca conglobosa, de 0.1 a 0.3 mm de diámetro, de color amarillo naranja (Methuen: 4B8), con manchas oscuras dadas por los nodos que constituyen la red peridial. Hipotalo inconspicuo. Estipite cilíndrico, curvado, estriado longitudinalmente, de 0.8 a 3.1 mm de altura, de color pardo rojizo oscuro (Munsell: 10R3/3) a pardo oliva (Methuen: 1077), más delgado hacia el ápice. Peridio simple, parcialmente fugaz, de color amarillo naranja (Methuen: 4B8), permaneciendo en la base como un cálculo discoidal diminuto y como una red regular en el resto: la malla es poligonal, los nodos de la red son redondeados y sin extremos filiformes libres. Esporas libres, de color amarillo (Methuen: 286) por la luz transmitida, subglobosas, de 5 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro, tenuemente verrucosas. Gránulos cálcicos presentes en los nodos que constituyen a la red peridial, de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, de color amarillo (Methuen: 3B6).

**Materiales Revisados:** MÉXICO. CHIAPAS: Mpio. La Trinitaria, Laguna de Montaña, 16° 06' 35" N, 91° 32' 15" W, 1520 m s.n.m., bosque mesófilo de montaña, sobre madera de *Pinus*, sustrato recolectado en Oct. 20, 2004, cosechado en Nov. 01, 2004, M. García-Sastré 274 y 275; ibídem, Dic. 01, 2004, M. García-Sastré 281 y 286; Dic. 08, 2004, M. García-Sastré 290; Dic. 20, 2004, M. García-Sastré 294 y 299; Ene. 01, 2005, M. García-Sastré 310 y 311; Feb. 10, 2005, M. García-Sastré 315; Ene. 15, 2005, M. García-Sastré 317; Mar. 08, 2005, M. García-Sastré 320; Mar. 15, 2005, M. García-Sastré 322; Mar. 18, 2005, M. García-Sastré 324 y 325; Jul. 12, 2005, M. García-Sastré 335 y 336; Jul. 18, 2005, M. García-Sastré 338; Ago. 23, 2005, M. García-Sastré 341. Laguna Perol, 16° 06' 51" N y 91° 40' 19" W, 1510 m s.n.m., bosque mesófilo de montaña, sobre madera, sustrato recolectado en Oct. 23, 2004, cosechado en Dic. 01, 2004, M. García-Sastré 284; ibídem, Dic. 07, 2004, M. García-Sastré 288; Dic. 20, 2004, M. García-Sastré 296; Dic. 28, 2004, M. García-Sastré 305 y 306; Ene. 01, 2005, M. García-Sastré 309.

*Clavaria rufiflora* Rex.

Esporocarpios agrupados o dispersos, estipitados, erectos o ligeramente inclinados, de 10 a 18 mm de altura total. Esporoteca subglobosa a subcilíndrica de 0.2 a 0.3 mm de diámetro, de color violeta oscuro (Methuen: 16F7) a púrpura oscuro (Methuen: 14F5). Hongo individual, discoidal, membranáceo. Estípite erecto, cilíndrico, de 0.3 a 0.5 cm de altura, estriado longitudinalmente, de color rojo oscuro (Munsell: 10R3/3), a negro (Munsell: 5YR2.5/1), en algunos esporocarpios más delgado hacia el ápice. Peridio simple, de color violeta oscuro (Methuen: 15F7), parcialmente fugaz, rompiéndose en la mitad de la esporoteca formando un cálculo membranáceo, con líneas estrías radiales y como una red laxa en el resto, con nodos planos, anchos e irregulares, sin extremos filiformes libres. Esporas libres, de color violeta intenso (Methuen: 18B7) en masa, violeta pálido (Methuen: 17B7) por la luz transmitida, angostas, de 5.7 a 6.0  $\mu\text{m}$  en diámetro, densa y tenuemente verrugosas. Gránulos calcáreos muy concentrados en el borde superior del cálculo y en los nodos de la red peridial, asimismo, el estípite se encuentra cubierto de gránulos calcáreos, de 1.2 a 1.9  $\mu\text{m}$  de diámetro, de color violeta oscuro (Methuen: 16F7).

**Materiales Revisados:** MÉXICO. QUERÉTARO: Mpio. Pinal de Amoles, Cascada de Chaves; 21° 09' 52" N y 99° 33' 30" W, 1330 m s.n.m., bosque de galería, sobre troncos de *Pinus*, sustrato recolectado en Sept. 23, 2004, cosechado en Oct. 14, 2004, M. García-Sastré 265; ibidem. Oct. 19, 2004, M. García-Sastré 267; Nov. 10, 2004, M. García-Sastré 272 y 273; Dic. 08, 2004, M. García-Sastré 292; Dic. 23, 2004, M. García-Sastré 302; Ene. 12, 2005, M. García-Sastré 312; Feb. 10, 2005, M. García-Sastré 316; Mar. 08, 2005, M. García-Sastré 319.



*Cribraria cf. vulgaris* Schrad.

Esporocarpos estípitados, solitarios o agrupados, ligeramente inclinados en el ápice, de 0.6 a 3.3 mm de altura total. Esporoteca subglobosa o prolata de 0.1 a 0.3 mm de diámetro, de color marrón (Methuen: 7D7) a rojizo marrón (Munsell: 2.5YR5/4). Hemitrofo discoidal, individual, de color amarillo rojizo (Munsell: 7.5YR6/8). Estípites rectos, más ancho en la base, estriado longitudinalmente, relleno de materia orgánica en el interior, de 0.7 a 2.8 mm de diámetro, de color rojizo oscuro (Munsell: 10R3/3) a negro (Munsell: 5YR2.5/1). Peridio simple, amarillo (Methuen: 36B), en forma de callosidad que cubre 1/3 de la base inferior de la esporoteca, con margen entero y una red reticular con nodos irregulares y engrosados, con 2 a 4 extremos libres, de color amarillo oscuro (Methuen: 4B8) a rojizo pálido (Munsell: 10R6/3). Al microscopio las esporas son globosas, finamente verrugosas, de 6.8 a 6.9  $\mu\text{m}$  de diámetro, amarillas (Methuen: 36B). Gónculos cálcicos de 1.1 a 1.8  $\mu\text{m}$  de diámetro, de color amarillo (Methuen: 36B).

Observaciones: Durante la identificación taxonómica de esta especie se encontró una variación de la altura total de los esporocarpos ya que en las descripciones de Vainanga-Bremekamp (1991), Lado y Pando (1997) es de 0.6 a 1.8 mm, mientras que los especímenes encontrados llegan a medir hasta 3.3 mm de altura total, además los nodos son engrosados y no planos como se menciona en la descripción, por tales motivos se dejó como *Cribraria cf. vulgaris*.

Materiales Revisados: MÉXICO. QUERÉTARO: Mpio. Pinal de Amoles, Cascada de Chaveja, 21° 04' 52" N y 99° 33' 30" W, 1330 m s.n.m., bosque de galería, sobre troncos de *Pinus*, sustrato recolectado en Sept. 23, 2004, cosechado en Jul. 18, 2005, M. García-Sastré 337; ibídem. Agos. 23, 2005, M. García-Sastré 340.

*Uromyces*

Coniosporas estipitadas, erectos, solitarios o agrupados, de 0.4 a 0.5 mm de altura  
con esporotecas subglobosas, de 0.1 a 0.15 mm de diámetro, de color amarillo naranja  
(Methuen: 4B8) a naranja brillante. Hipotalo inconspicuo, individual, de color naranja  
rojo (Methuen: 6A3). Estipite estriado, más delgado en el ápice, de amarillo rojizo  
(Methuen: 5F58) a marrón (Methuen: 6E7), de 0.3 a 0.4 mm de diámetro. Peridio  
simple, de color amarillo naranja (Methuen: 4B8), en forma de un cálculo que cubre  
la parte de la base de la esporoteca, de color amarillo naranja (Methuen: 4B8), en el  
interior en forma de red, con nodos alargados, planos, sin filamentos libres. Esporas  
globosas con verrugas, de 7.3 a 7.7  $\mu\text{m}$  de diámetro, de color amarillo (Methuen: 3 B6)  
con verrugas amarillentas. Gránulos cálcicos de 1.6 a 2.4  $\mu\text{m}$  de diámetro, de color amarillo  
(Methuen: 3B6), presentes en el interior del cálculo, en nodos y dentro del estipite.

Observaciones: Las características de esta especie no correspondieron con ninguna de  
las descripciones utilizadas para la determinación de las especies; debido a que presenta  
un cálculo amplio que cubre la tercera parte de la esporoteca y una red peridial formada  
por nodos gruesos y finos lo cual no permitió acercarla a alguna especie, por lo tanto,  
solo se menciona hasta género.

Material Revisado: MÉXICO. TLAXCALA: Mpio. Huamantla, Parque Nacional La  
Venezuela, Cafetal Central, 19° 14' 23.8" N, 98° 00' 35.03" W, 3384 m s.n.m., bosque  
de abies sobre madera de *Abies*, sustrato recolectado en Abr. 01, 2005, cosechado en  
Abr. 21, 2005, M. García-Sastre 327; ibidem, May. 11, 2005, M. García-Sastré 330 y  
331.

## Desarrollo morfológico de las especies de *Cribraria* en cámara húmeda

### *Cribraria cancellata*

Se observaron plasmodios laxamente reticulados, con apariencia de “encaje” (Figura 6), sin frente de avance, ni margen o filamentos posteriores diferenciados. Venaciones de 7 a 10  $\mu$ m de grosor, de color violeta grisáceo oscuro (Methuen: 15D4-5), con segmentos poco ramificados, de ápice abrupto y entonces con los extremos redondeados (Figura 7), formando mallas isodiamétricas, con citoplasma densamente granular, con corrientes bidireccionales rítmicas pero sin una diferenciación conspicua entre las capas interna y externa típicas de los faneroplasmodios. Los plasmodios se mantuvieron activos hasta por 15 días. Posteriormente, el plasmodio se concentró y se fragmentó para originar múltiples primordios hemisféricos, con citoplasma granular de color violeta grisáceo oscuro (Methuen: 15D4-5), los cuales se mantienen en este estado hasta por cuatro horas, durante todo este tiempo la masa del citoplasma mantuvo la misma coloración. Después de este tiempo se observó como la masa del citoplasma comenzó a elevarse del sustrato por la formación del estípite. Sólo pasaron tres horas para que el estípite alcanzara su altura total, en esta etapa aún no se observó la formación de costillas radiales en la esporoteca y la coloración de los esporocarpos inmaduros durante todo este tiempo nunca cambió. Los esporocarpos se diferenciaron generalmente durante el transcurso de la noche, madurando todos los primordios sincrónicamente, originando los grupos de esporocarpos típicos de la especie. No obstante, el tamaño de los cuerpos reproductivos no permitió hacer observaciones detalladas sobre la morfogénesis de los esporocarpos en microscopía de campo claro.

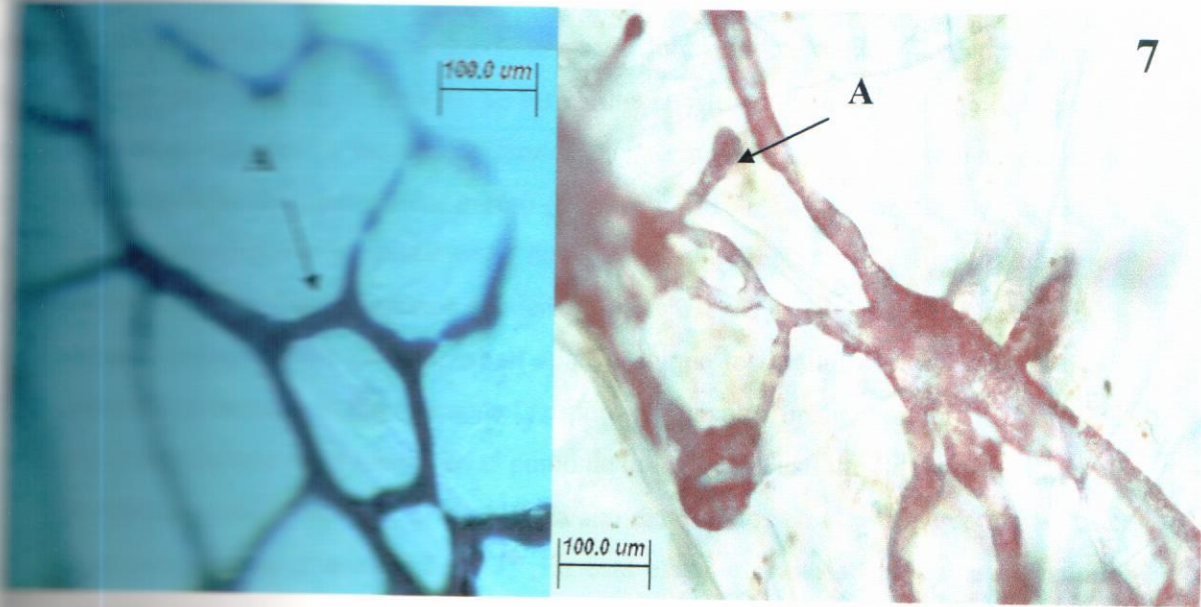
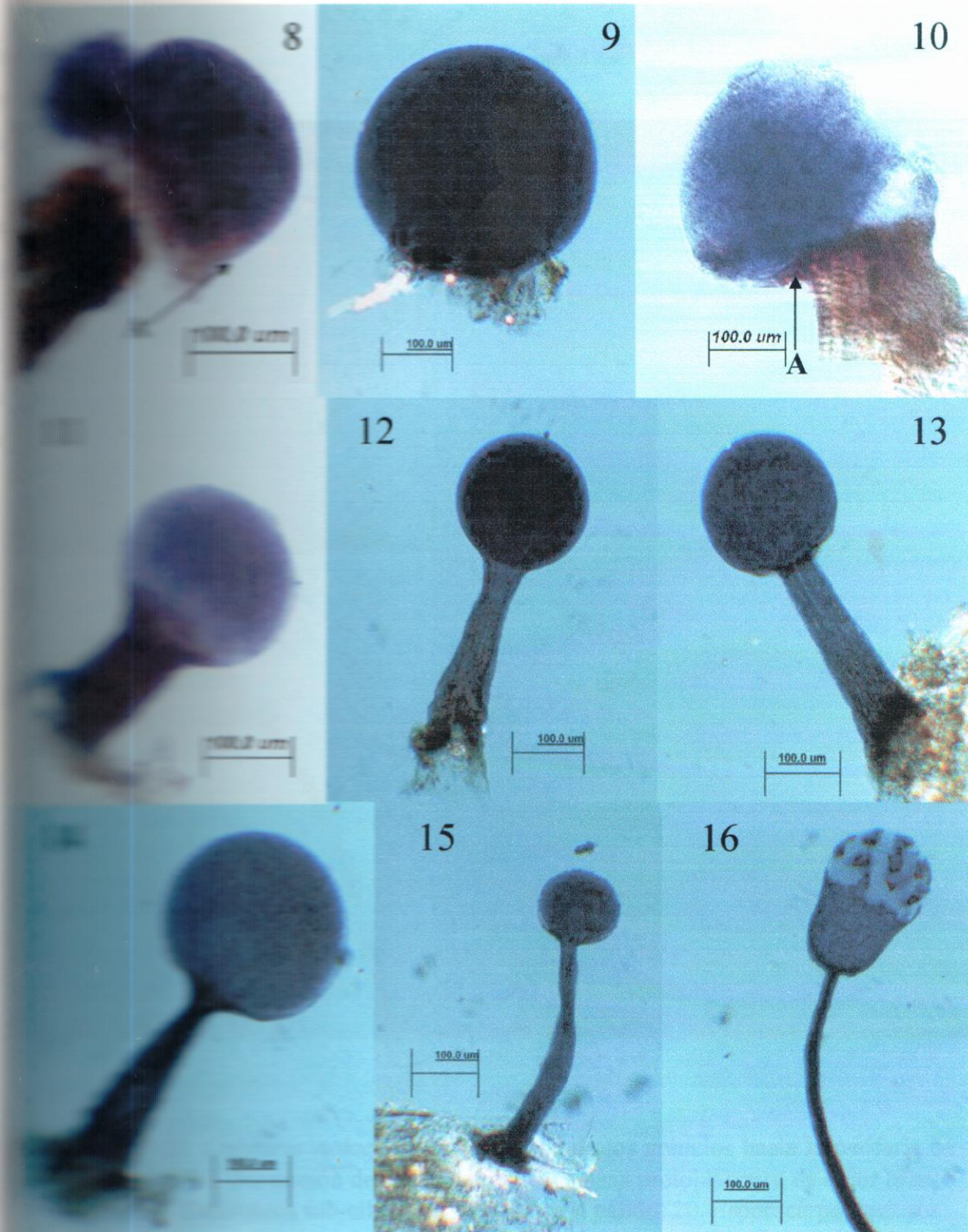


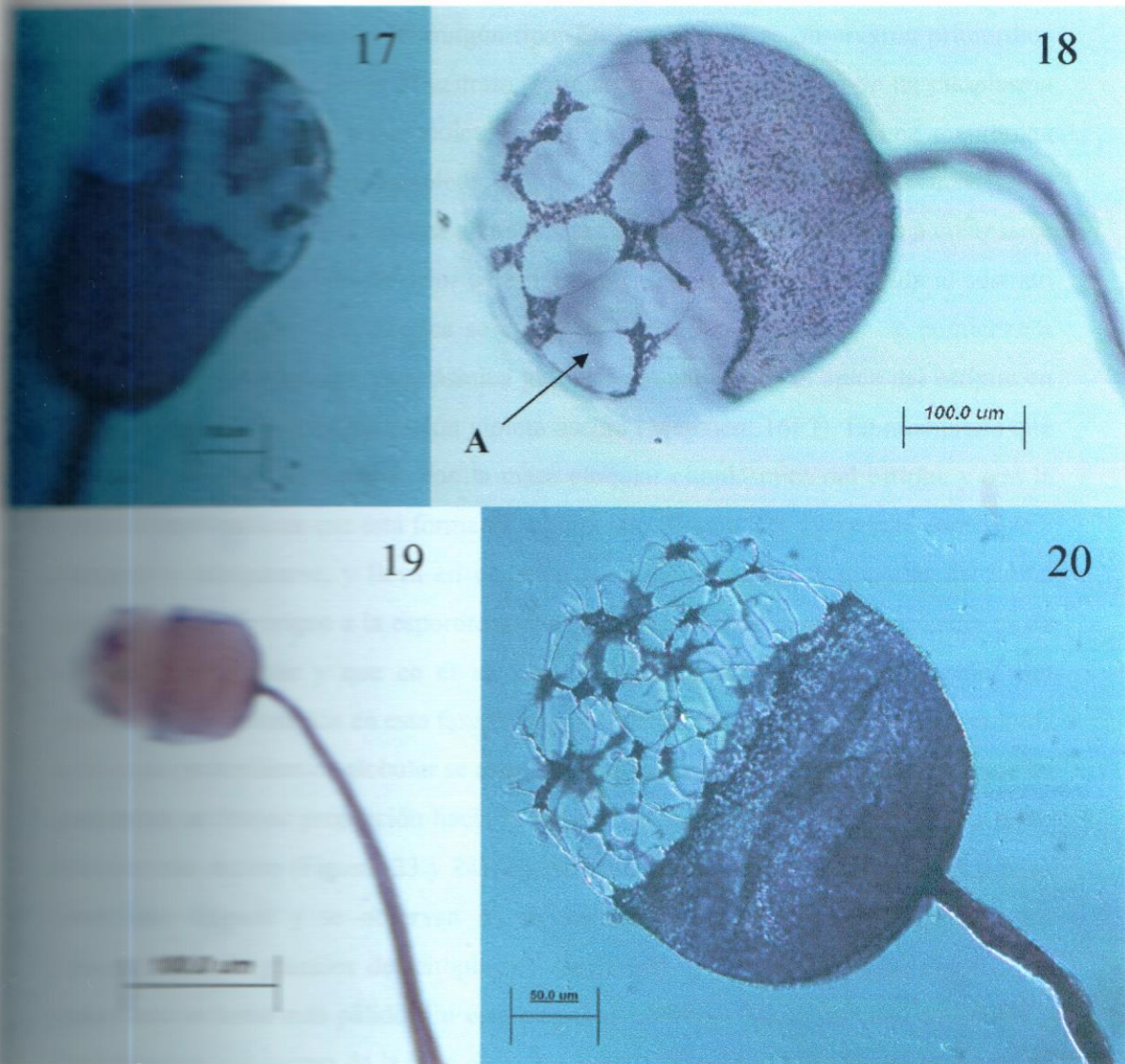
Figura 6-7. *Critharia cancellata*. 6. Plasmodio A) forma reticulada. 7. Plasmodio con ramificaciones redondeadas.

En esta especie no se observaron plasmodios de ningún tipo. En las primeras fases de la ontogenia de los esporocarpos de esta especie se observó la presencia de primordios vegetativos formados por la agregación de un citoplasma densamente granular de color blanco rosado (Methuen: 16F7), cubiertos completamente por una membrana hialina (Figura 8). Posteriormente, los primordios toman una forma esférica. El citoplasma comienza a condensarse y la membrana que los envuelve se colapsa como una película que se adhiere al sustrato, dando origen al futuro hipotalo que mantendrá unido al esporocarpo con el sustrato (Figura 9). Se forma una constricción en la base que comienza a separar el estípote. La masa citoplásmica que formará la futura esporoteca toma una forma globular de color violeta oscuro (Methuen: 16F7). La membrana que cubre a la esporoteca mantiene su continuidad hacia el estípote (Figura 10). El estípote es de naturaleza multicelular y conforme comienza a alargarse, se va adelgazando, acarreado a la masa citoplásmica globular en su ápice. Aunque los gránulos citoplásmicos están distribuidos en todo el citoplasma de la esporoteca, se nota una mayor concentración de ellos hacia la base de la misma, en el punto de unión con el estípote (Figura 11). Parte de los gránulos encontrados en el citoplasma son depositados en el estípote conforme éste se prolonga (Figuras 12 y 13). En esta etapa, se nota además que el estípote presenta constricciones longitudinales (Figura 13). A la vez que el estípote se alarga y se adelgaza, la masa citoplásmica globular va disminuyendo su volumen (Figuras 14 y 15). Cuando el estípote alcanza su longitud final, la masa citoplásmica ha disminuido considerablemente de tamaño (Figuras 15 y 16). La membrana que lo cubre en la base se ha colapsado totalmente para formar parte del hipotalo. Los gránulos del citoplasma comienzan a dirigirse hacia la base y periferia de la futura esporoteca, haciendo que la masa citoplásmica se vaya tornando de un color más pálido. En etapas posteriores, los gránulos se depositan en la membrana peridial, formando parte del cálculo y los nodos de la red peridial. Éstos adquieren un color violeta oscuro (Methuen: 16F7), mientras la masa citoplásmica se ha tornado de un color blanco violáceo (Methuen: 18A2) (Figuras 17 y 18). En esta fase, muchos de los esporocarpos han cambiado la forma de la masa citoplásmica globular a las formas sub-cilíndricas u obpiriformes características de las esporotecas de la especie. Antes de la formación de las esporas, todavía puede verse la membrana peridial íntegra y se han formado ya los filamentos de la red peridial que unen los nodos entre sí y con el cálculo. En esta fase, el citoplasma de la

esporoteca es prácticamente hialino (Figura 18). La masa citoplásmica se torna de color rosado pálido (Methuen: 12A3) (Figura 19). Conforme se forman las esporas, éstas se van pigmentando, dando a la esporoteca nuevamente un color violeta oscuro (Methuen: 167). Las fises maduras constan de los esporocarpos típicos de la especie, formados por un anillo profundo color violeta oscuro, que abarca de dos a tres quintas partes de la anchura basal de la esporoteca, con margen regular y red peridial con nodos planos e irregulares y unidos por filamentos finos (Figura 20). Los esporocarpos de *Cribraria* *sp.* se desarrollan distribuidos dispersamente sobre el sustrato y en el mismo sitio se pueden encontrar cuerpos reproductores en diferentes fases de maduración, desde primordios hasta esporocarpos con las esporas completamente desarrolladas.



Figuras 8-16. *Citraria violacea*. 8. Primordio hemisférico, A) membrana hialina que  
 cubrelo. 9. Primordio esférico, A) restos protoplásmicos en la base que formaran al  
 estípite. 10. Formación del estípite, A) membrana continua de esporoteca-estípite. 11.  
 Elevación de la masa citoplásmica. 12. Alargamiento del estípite. 13. Migración de  
 citoplasma a través del estípite. 14. Constricción del ápice del estípite. 15. Longitud total  
 del estípite. 16. Masa de la esporoteca de color blanco lechoso.



Figs. 17-20. *Critharia violacea*. 17. Migración de los gránulos hacia la periferia de la esporoteca. 18. Formación de la red peridial, A) masa protoplásmica de color blanco. 19. Esporoteca sub-cilíndrica de color rosa pálido. 20. Esporocarpo maduro.



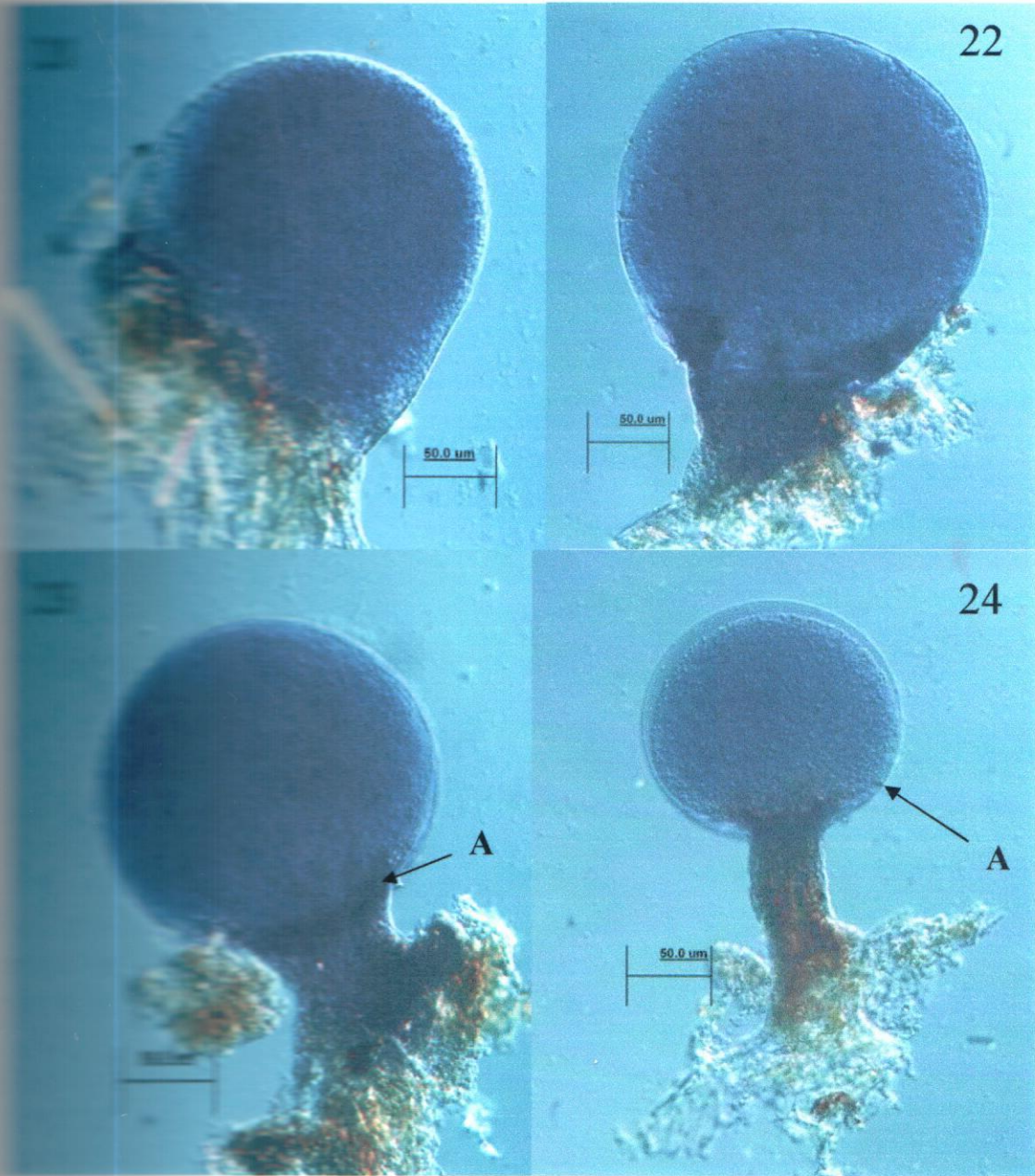
### *Chromolaena lepidota*

No se observaron plasmodios de ningún tipo. En esta especie se observaron primordios *amibóticos*, dispersos sobre el sustrato, formados por la agregación de un citoplasma *homogeneamente granular*, de color violeta oscuro (Methuen: 16F7) y con una membrana *delgada* que los cubre por completo (Figura 21). Los primordios toman una forma *globular* cuyo citoplasma comienza a condensarse. La membrana comienza a colapsarse *para formar una película fina* de color café púrpura (Methuen: 15F4) adherida al sustrato (Figura 22). La masa citoplásmica se *constríe por la base*, en donde se comienza a *formar el estípite*. La masa citoplásmica globular se sostiene en el ápice del estípite en *formación* y mantiene su coloración violeta oscuro (Methuen: 16F7). La membrana que *cubre al primordio* es continua con la masa globular citoplásmica del estípite y con la *delgada membranácea* que está formando el hipotalo (Figura 22). El estípite comienza a *alargarse y adelgazarse*, y lleva en el ápice la masa citoplásmica granular de forma *globular que dará origen a la esporoteca*. Se observa que el estípite en formación es de *naturaleza no celular* y que en él se van depositando algunos de los gránulos del *citoplasma*. Su coloración en esta fase es negro violáceo (Methuen: 16F7). Los gránulos de la *masa protoplásmica globular* se encuentran dispersos en toda la esporoteca, pero se *concentran en mayor proporción* hacia la base de la misma, en donde forman un disco *de color más oscuro* (Figuras 23 y 24). El estípite continúa *alargándose a la vez que se torna más delgado* y se observan en su superficie estriaciones longitudinales. La *concentración de gránulos del citoplasma* disminuye, lo que hace que el color de la *esporoteca* se torne más pálido. En esta etapa, se observan líneas radiales de gránulos *amibóticos que surgen de la base de la esporoteca* (Figura 25). En etapas más tardías el *estípite ha alcanzado su longitud final* y la masa citoplásmica ha disminuido su *cantidad*. La masa del citoplasma se ha tornado blanquecina por la ausencia de gránulos *amibóticos*, los cuales se han depositado en la membrana peridial para formar parte del *calículo* y los nodos de la red peridial, que para entonces se encuentran *completamente definidos* (Figura 26). En etapas más avanzadas la masa citoplásmica se *convierte en fina* (Figura 27). En las etapas maduras, se observan los esporocarpos de color *violeta* (Methuen: 16F7) típicos de la especie, con un calículo que abarca un tercio *interior de la esporoteca*, con un margen entero y una red peridial con nodos *aproximados, esteliformes* conectados entre sí y con el calículo por filamentos finos

Figura 28. Los esporocarpos de *C. lepida* se encuentran dispersos sobre el sustrato y en un cultivo es posible observar esporocarpos en diferentes fases de desarrollo.

#### *Cibicides micropora*

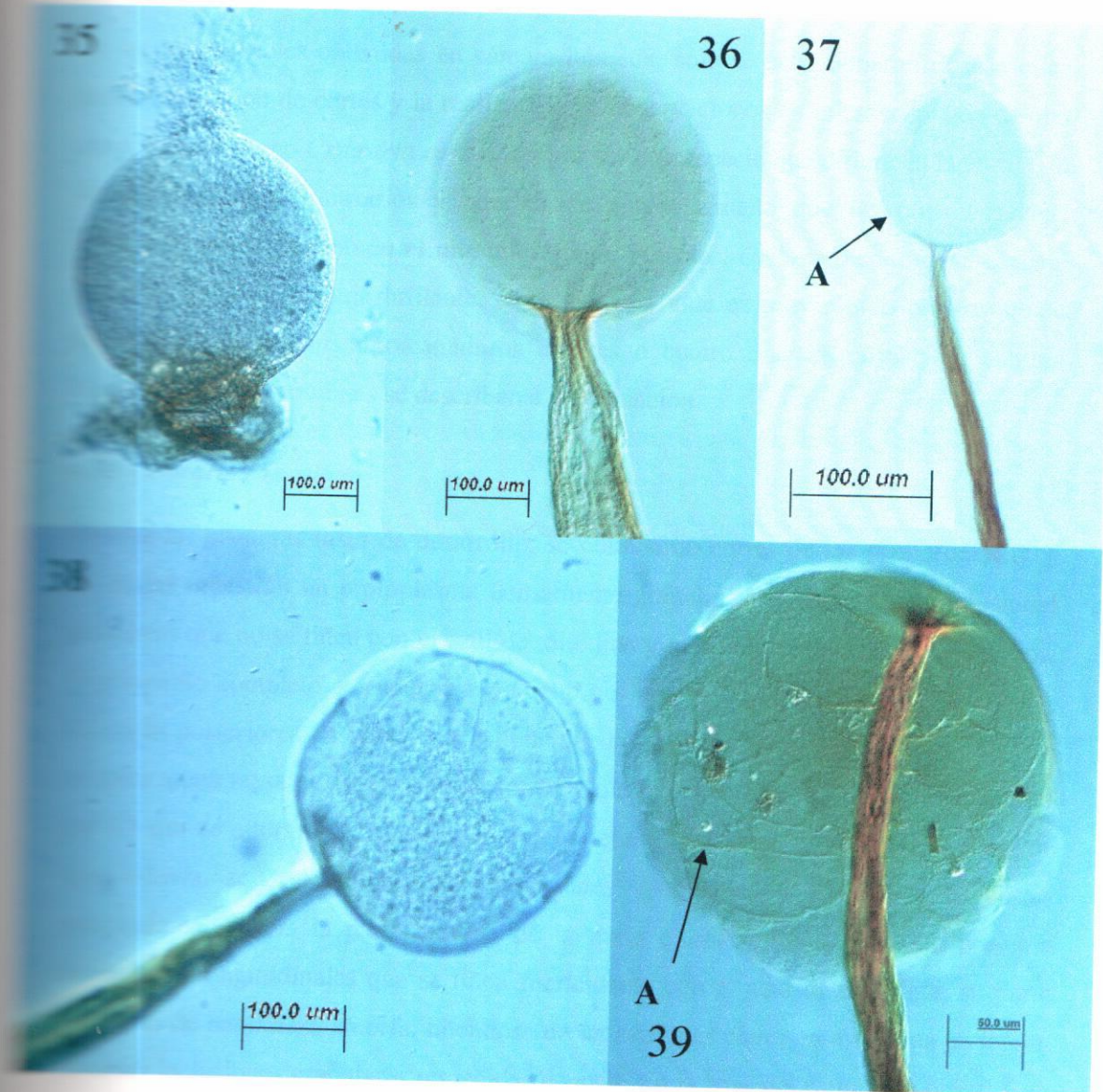
No se observaron plasmodios de ningún tipo. Las primeras fases observadas estuvieron representadas por pequeños primordios hemisféricos constituidos por la agregación de una masa citoplásmica densamente granular, con los gránulos de color negro (Munsell: 10YR2.5/1) (Figura 29), cubiertos completamente por una membrana hialina. Posteriormente, los primordios toman una forma esférica; en la base, la masa citoplásmica comienza a formar una constricción (Figura 30). La base constreñida comienza a originar el estípite y la masa granular se compacta, provocando que el color del citoplasma se vea más intenso (Figura 31). En esta fase, todavía se observa continuidad entre el citoplasma de la futura esporoteca y la del recién formado estípite. La membrana que cubre a la esporoteca mantiene su continuidad hacia el estípite. El estípite comienza a alargarse, acarreado a la masa protoplásmica en su ápice. Los gránulos del citoplasma comienzan a concentrarse hacia la base de la futura esporoteca, provocando que la masa citoplásmica se torne de un color más claro (Figura 32). El estípite sigue alargándose, al tiempo que va adelgazándose y perdiendo su contenido citoplásmico. Conforme el estípite va alcanzando su longitud final, la membrana que lo cubre se va colapsando para unirlo firmemente al sustrato y dar origen al hipotalo. Posteriormente a la maduración de los esporocarpos, se observa una masa de esporas fuertemente compactada de color amarillo naranja (Methuen: 4B8) (Figura 33). Finalmente, se observan los esporocarpos maduros típicos de la especie, formados por un pequeño disco basal y una red peridial con filamentos finos formando una malla irregular y más pequeños y engrosados de color oscuro (Figura 34). En la misma muestra tomada se encontraron esporocarpos distribuidos en forma dispersa y en diferentes fases de maduración, desde primordios hasta cuerpos reproductivos maduros.



Figuras 21-24. *Cribraria lepida*. 21. Primordio hemisférico, A) membrana que lo cubre. 22. Primordio esférico. 23. Elevación de la masa ciliada, A) concentración de gránulos. 24. Alargamiento del estípito, A) citoplasma abundantemente granular.

*Cribraria* sp.

En los cultivos en cámara húmeda de *Cribraria* sp. no se detectaron plasmodios. Las primeras fases de desarrollo observadas en esta especie consisten de primordios de forma esférica, con un citoplasma de color naranja (Methuen: 5B7) y densamente granular, con gránulos oscuros, casi negros. La base de la masa protoplásmica ha comenzado a condensarse y constreñirse, dejando una película membranosa de color café rojizo (Methuen: 8F6) que la adhiere al sustrato y que formará posteriormente el cálculo (Figura 35). El estípite comienza a alargarse, llevando a la masa del citoplasma granular en el ápice. Esta estructura es de naturaleza no celular, presenta estriaciones longitudinales, es de color café rojizo y en ella se van depositando gránulos citoplásmicos conforme se va formando; en su ápice se presenta una estructura discoidal de la misma naturaleza que sostiene a la masa citoplásmica globular (Figura 36). Cuando el estípite alcanza su longitud total, la esporoteca ha disminuido notablemente su tamaño y su coloración comienza a tornarse lechosa y más pálida (Figura 37). En etapas posteriores, el estípite se ha alargado completamente y el cálculo se ha diferenciado cubriendo tres cuartas partes de la base de la esporoteca. Los nodos y filamentos de la red peridial también se encuentran completamente diferenciados. La mayor parte de los gránulos citoplásmicos se han depositado en el cálculo y en los nodos ya formados (Figura 38). En fases más maduras, el cálculo y la red peridial se tornan de color anaranjado (Methuen: 5B7), distinguiéndose fácilmente del resto de la membrana peridial, la cual aún persiste envolviendo a la masa globular citoplásmica. El estípite ha adquirido una coloración café rojizo más oscura (Figura 39). Los esporocarpos maduros son de color anaranjado, con un cálculo profundo que cubre de la mitad a dos terceras partes de la porción basal de la esporoteca, con margen entero y red peridial formada fundamentalmente por filamentos que constituyen una malla de luz muy abierta y nodos aislados e isodiamétricos escasos. También en esta especie los esporocarpos se desarrollan en forma dispersa sobre el sustrato y es posible encontrar primordios y cuerpos reproductivos en diferentes fases de maduración en el mismo cultivo.



Figuras 35-39. *Cribraria* sp. 35. Primordio esférico. 36. Alargamiento del estípite. 37. Alargamiento total del estípite, A) Disminución del tamaño de la esporoteca. 38. Esporocarpo inmaduro con red y cálculo bien definidos. 39. Esporocarpo semimaduro, A) nodos finos que conectan a la red peridial.

### 6.3 Cortes fijados en FAA y teñidos con azul de toluidina.

De las seis especies obtenidas en cámara húmeda, sólo se seleccionaron dos de ellas para la obtención de cortes y la realización de observaciones en microscopía de campo claro. Se seleccionó *Cribraria cancellata* por ser una especie que difiere en cuanto a la formación de los primordios y por ser de mayor tamaño que las otras especies, facilitando así su manejo en el ultramicrotomo. Por otro, *Cribraria* sp. es una especie pequeña, de color naranja brillante, cuyo ciclo de vida es muy rápido por lo que se pueden obtener esporocarpos maduros en tres o cuatro días de cultivo de cámara húmeda. Las observaciones se describen a continuación.

#### 6.3.1 *Cribraria cancellata*

Durante las primeras fases de desarrollo, se obtuvieron cortes de los primordios (D1), los cuales muestran un protoplasma densamente granular, con abundantes inclusiones globulares que no se tiñen con el azul de toluidina y más homogéneo hacia la periferia. El primordio completo se encuentra envuelto por una membrana continua (Figura 40). En etapas posteriores, se observa el estípite que comienza a formarse (D2), elevando en su ápice a una masa de citoplasma de forma prolada y diámetro de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro por 0.3  $\mu\text{m}$  de altura que se tiñe íntensamente con el colorante (Figura 41), a pesar de que todavía se logran observar inclusiones globulares no teñidas, dispuestas principalmente hacia la parte externa de la masa citoplásmica. El estípite presenta estrías longitudinales que se tiñen fuertemente con el azul de toluidina; su parte interna es de naturaleza amorfa, tiñéndose de un azul más claro; en esta zona se logran observar inclusiones granulares no teñidas de azul. En la base del estípite se observa un ensanchamiento que ancla al estípite con el sustrato; hacia los extremos, dicha estructura forma una fina película que representa al hipotalo (Figura 42). En etapas más avanzadas (D3), se observa que el estípite continúa su alargamiento, a la vez que se va adelgazando. La masa citoplásmica densamente granular va disminuyendo gradualmente su tamaño, teniendo en esta fase diámetros hasta de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se sigue notando la continuidad de la membrana de la esporoteca joven con el estípite (Figura 42). Durante la maduración de los esporocarpos (D6), se observa la masa de esporas encerrada en una fina membrana de grosor irregular que en los engrosamientos se tiñe íntensamente de azul y en algunos de ellos presenta incrustaciones globulares. En la base de la esporoteca, en la unión con el estípite, se forma un disco. En el punto

donde inicia el disco basal, la membrana que cubre la esporoteca se divide en dos membranas, una interna que delimita la base de la esporoteca del contenido del estípite y otra externa que se continúa con la membrana que recubre al estípite (Figura 43). Tanto el interior del disco, como el del estípite son de naturaleza amorfa y se tiñen homogéneamente de azul.

### 6.3.2 *Cribraria* sp.

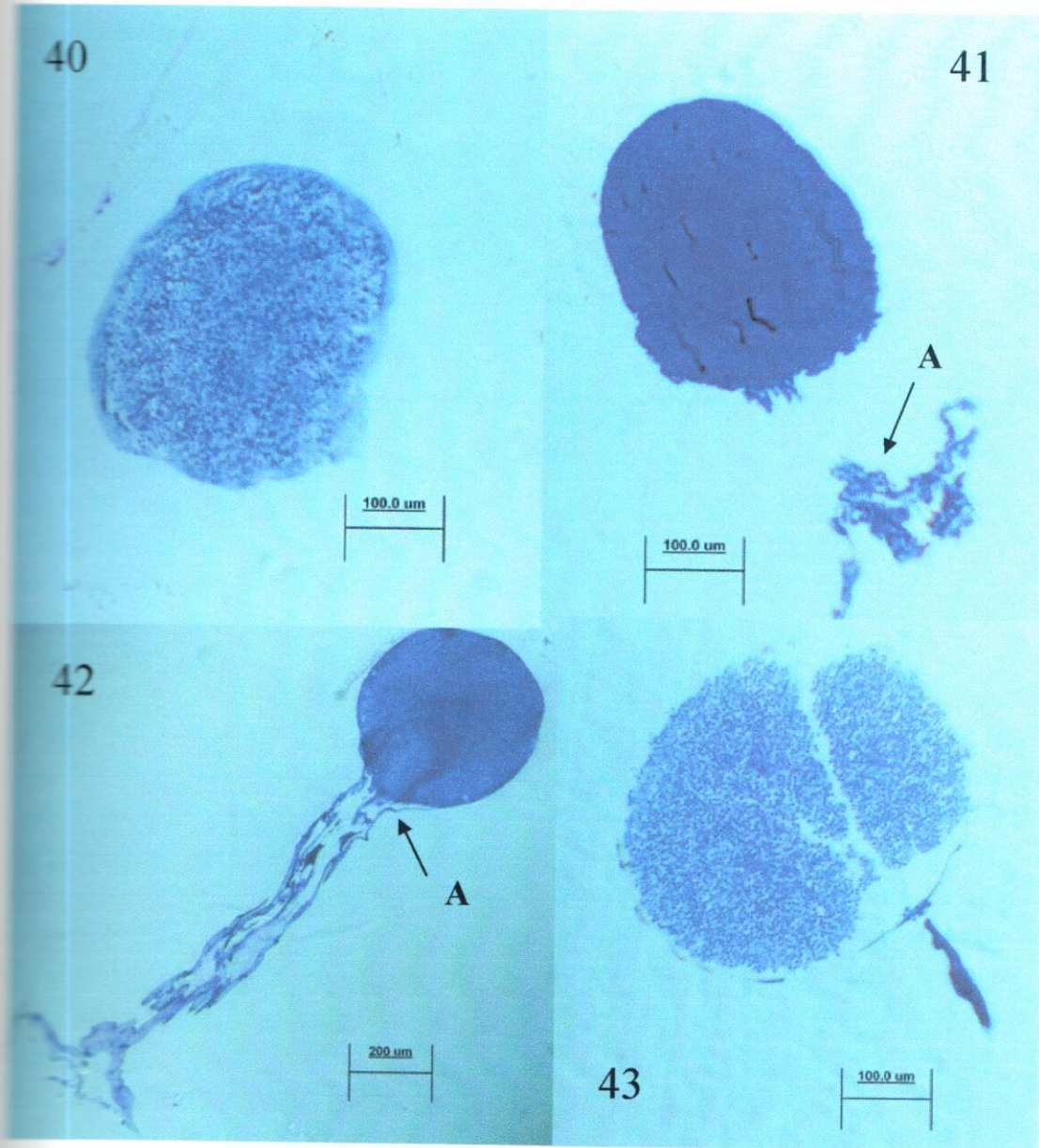
También en esta especie se obtuvieron cortes de los primordios (D1). Éstos, presentan forma esférica, con diámetros de 0.25  $\mu\text{m}$  de diámetro y un protoplasma densamente granular, con abundantes inclusiones globulares que no se tiñen con el azul de toluidina; también se observan inclusiones fuertemente teñidas de azul. Se observa una membrana continua que envuelve completamente al primordio (Figura 44). La base del primordio comienza a constreñirse, dándole al primordio una apariencia obpiriforme. Los contenidos citoplásmicos son similares a los de la fase anterior y la membrana mantiene su continuidad (Figura 45). En la zona de la constricción se inicia la formación del estípite depositándose material homogéneo que toma una coloración pálida con azul de toluidina. La base de esta estructura toma la forma de un gancho que lo ancla al sustrato (Figura 46). El estípite se alarga rápidamente (D3), llevando en su ápice la masa citoplásmica de forma globular que posteriormente dará origen a la esporoteca. El contenido protoplásmico mantiene la misma apariencia que en las fases anteriores, pero el volumen de la masa citoplásmica va disminuyendo gradualmente (Figura 47). El estípite tiene en esta etapa un diámetro de 0.05  $\mu\text{m}$  de diámetro y su interior tiene una apariencia amorfa. Se observan en él numerosas inclusiones granulares que no se tiñen con el azul de toluidina. El estípite continúa su alargamiento y va adelgazándose gradualmente conforme se desarrolla. En la base se observan claramente los restos de una membrana que adhiere al estípite con el sustrato, resultado del colapsamiento de la estructura en forma de gancho arriba descrita. Esta película membranácea representa al hipotalo y muestra una clara continuidad con la membrana externa del estípite (Figura 48). En las fases prácticamente maduras (D6), se observan las esporas claramente delimitadas. El citoplasma de éstas se tiñe de azul, pero se observan también inclusiones vacuolares abundantes que no toman el colorante. Todavía se aprecia una membrana continua envolviendo por completo a la masa de esporas. Ésta presenta incrustaciones granulares no teñidas con el azul de toluidina, aunque en la parte superior de la

esporoteca se notan algunas zonas de la membrana sin tales incrustaciones. En la parte basal de la esporoteca, se presenta un disco ligeramente más engrosado, que se tiñe intensamente de azul y que es continuo con el estípite. En esta porción, no se observan las incrustaciones granulares antes descritas. El estípite tiene un contenido homogéneo y se tiñe intensamente de azul (Figura 49).

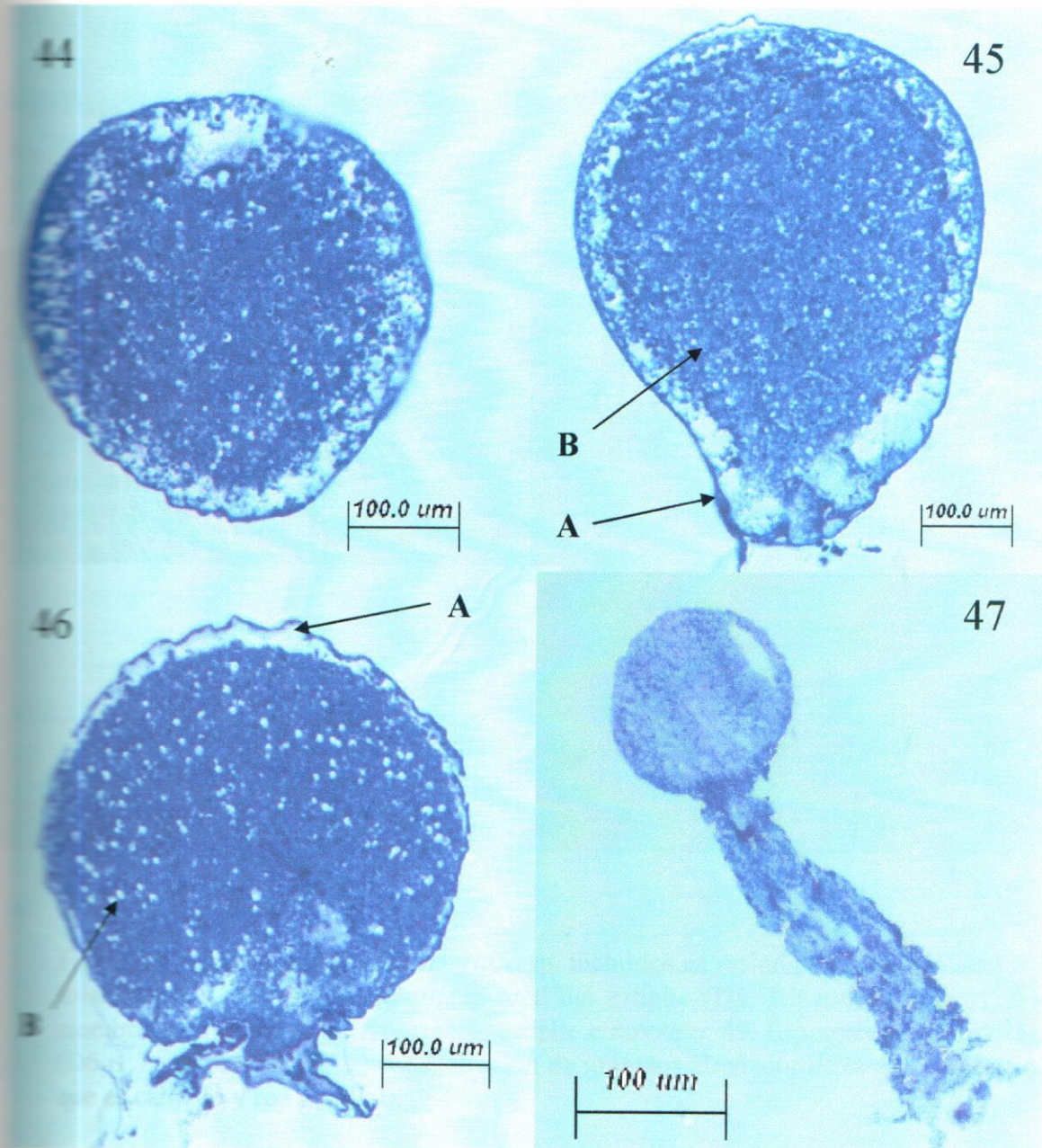
#### **6.4 Observaciones en cortes sin teñir**

Estas observaciones se realizaron sólo para *Cribraria* sp. los cortes en donde se llevaron a cabo las observaciones se incluyeron en glutaraldehído-paraformaldehído. Los cortes sólo son de la fase (D6), en ellos se logró observar en el estípite la acumulación de gránulos en la parte externa del estípite, sin embargo durante el desarrollo morfológico el transporte del material granular es en el interior del estípite en cual no se detectó presencia de gránulos (Figura 50). También se observó que el hipotalo realmente es la estructura que une al esporocarpo con el sustrato, además se observó una continuidad entre el hipotalo y estípite, así como la acumulación de gránulos en el hipotalo (Figura 51), dicha continuidad concuerda con lo mencionado para el tipo de desarrollo mixogastoide (Ross 1973). En la esporoteca se observó la acumulación de gránulos en el cálculo, se observó como los gránulos están formando una "cadena" que envuelve a la membrana que la rodea (Figura 52). Finalmente se observó un corte con la masa de esporas las cuales son verrugosas (Figura 53).

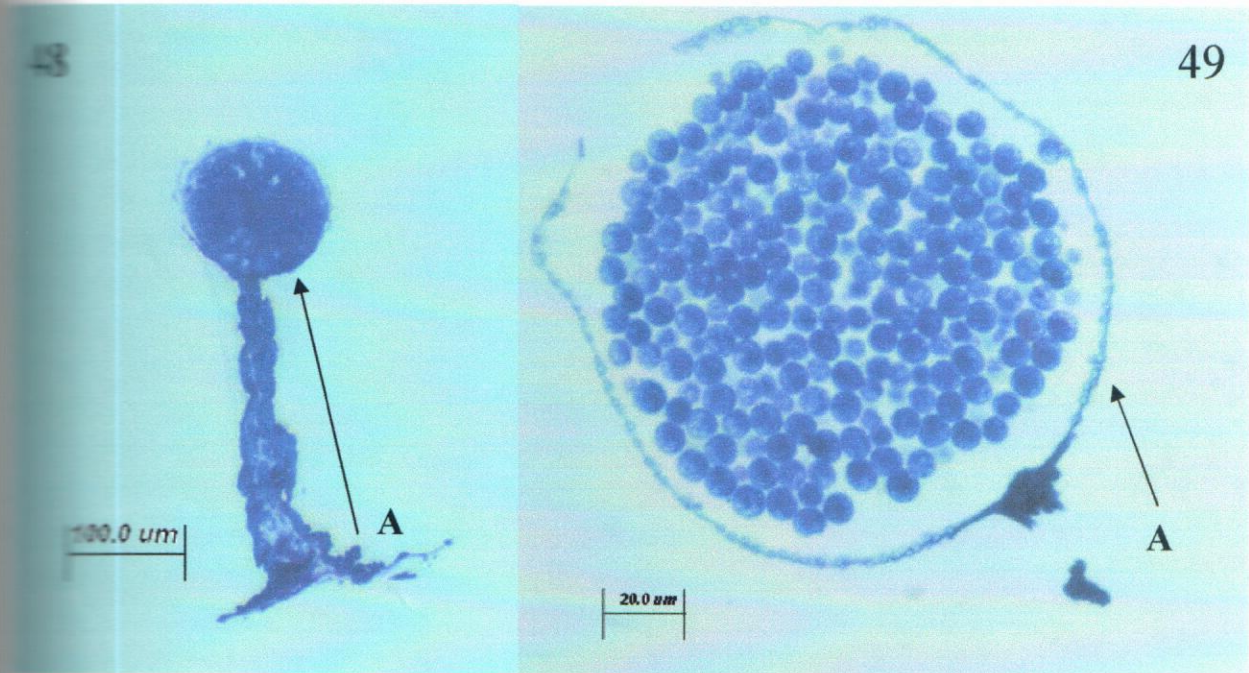




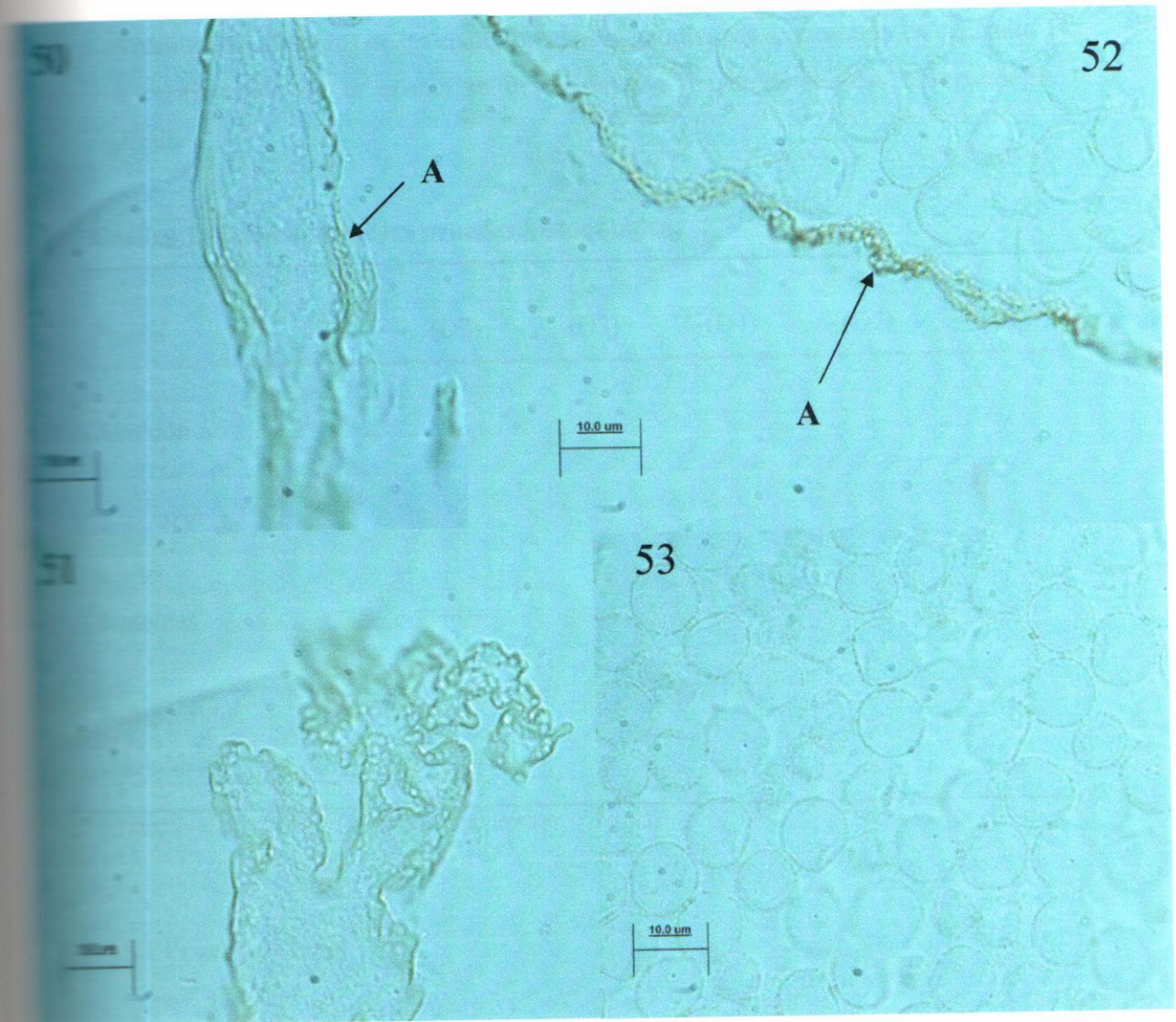
Figuras 40-43. Cortes finos de *Cribraria cancellata* incluidos en resina y teñidos con azul de toluidina al 0.5%. 40. Corte de un primordio hemisférico (D1, 1 µm de grosor). 41. Inicio del desarrollo del estípite (D2, 1.5 µm de grosor), A) continuidad entre estípite y hipotalo. 42. Alargamiento del estípite (D3, 1.5 µm de grosor), A) continuidad estípite y esporoteca. 43. Esporoteca con esporas (D6, 1.5 µm de grosor).



Figuras 44-47. Cortes finos de *Cribraria* sp. incluidos en resina y teñidos con azul de toluidina al 0.5%. 44. Primordio esférico (D1, 1  $\mu\text{m}$  de grosor). 45. Primordio esférico (D1, 1  $\mu\text{m}$  de grosor), A) inicio de la elevación de la masa protoplásmica a través de una constricción en la base del primordio, B) concentración de la masa granular en el centro del primordio. 46. Comienzo del desarrollo del estípite y hipotalo (D2, 1.2  $\mu\text{m}$  de grosor), A) diferenciación entre la membrana que cubre al primordio y el material granular, B) inclusiones blancas en el materia granular. 47. Alargamiento de estípite y disminución del tamaño de la esporoteca (D3, 1.5  $\mu\text{m}$  de grosor).



Figuras 48-49. Cortes finos de *Cribraria* sp. incluidos en resina y teñidos con azul de toluidina al 0.5%. 48. Alargamiento total del estípite (D4, 1.5  $\mu\text{m}$  de grosor), A) membrana continua entre esporoteca, estípite e hipotalo. 49. Esporoteca con esporas (D6, 1.7  $\mu\text{m}$  de grosor), A) concentración de gránulos alrededor de la esporoteca (lo que es cálculo y red peridial).



Figuras 50-53. Cortes sin teñir de *Cribraria* sp. 50. Estípite (D6, 1.5 µm de grosor), A) gránulos acumulados en la capa externa del estípite. 51. Hipotalo, (D6, 1.5 µm de grosor). 52. Esporoteca (D6, 1.5 µm de grosor), A) concentración de gránulos en cálculo. 53. Esporas (D6, 1.5 µm de grosor).

## 6.5 Cortes fijados con glutaraldehído-paraformaldehído y pruebas histoquímicas en *Cribraria* sp.

Los resultados obtenidos de las cuatro pruebas histoquímicas se muestran en el cuadro 1 y a continuación de la misma se describen con mayor detalle las observaciones realizadas.

**Cuadro 1. Resultados de las pruebas histoquímicas**

Prueba	(D1)	(D2)	(D3)	(D4)	(D5)	(D6)
Almidón	-	-	-	-	-	-
Rojo "O" de aceite	-	+	+	+	-	+
Proteínas	+	+++	+++	+	+	+
Polisacáridos insolubles	+	+++	+++	+	-	+

(-) negativo, (+) positivo, (+++) color más intenso

### 6.5.1 Prueba de lugol

Esta prueba se realizó para las seis fases de desarrollo de *Cribraria* sp. El resultado de dicha prueba fue negativa, es decir, en ninguna fase de desarrollo se observó un color morado o negro que indicara la presencia de almidón. Así, podemos mencionar que esta especie de *Cribraria* parece no tener reservas de almidón.

### 6.5.2 Prueba de rojo "O" de aceite

La coloración naranja-rojiza permite reconocer la presencia de compuestos lipídicos. Durante las primeras fases de desarrollo (D1) se observó la coloración roja en la membrana que cubre al primordio (Figura 54). Sin embargo, dentro de la masa

protoplasmática la coloración indicativa de lípidos no fue tan evidente. Conforme los esporocarpos van madurando se observa una capa lipídica en la membrana que rodea el estípite evidenciado por la prueba positiva para rojo de aceite. Cuando ya se han formado las esporas, se logró percibir como cada una de ellas se encuentra rodeada por una cubierta lipídica. Desafortunadamente, al momento de colocar la resina en los cortes para poder tomar fotografías el color desapareció, por lo que las preparaciones quedaron transparentes y no se logró fotografiar la reacción positiva característica de la presencia de lípidos. En esta misma fase de desarrollo se logró observar que la parte apical del estípite también se tiñe de color rojo (Figura 55).

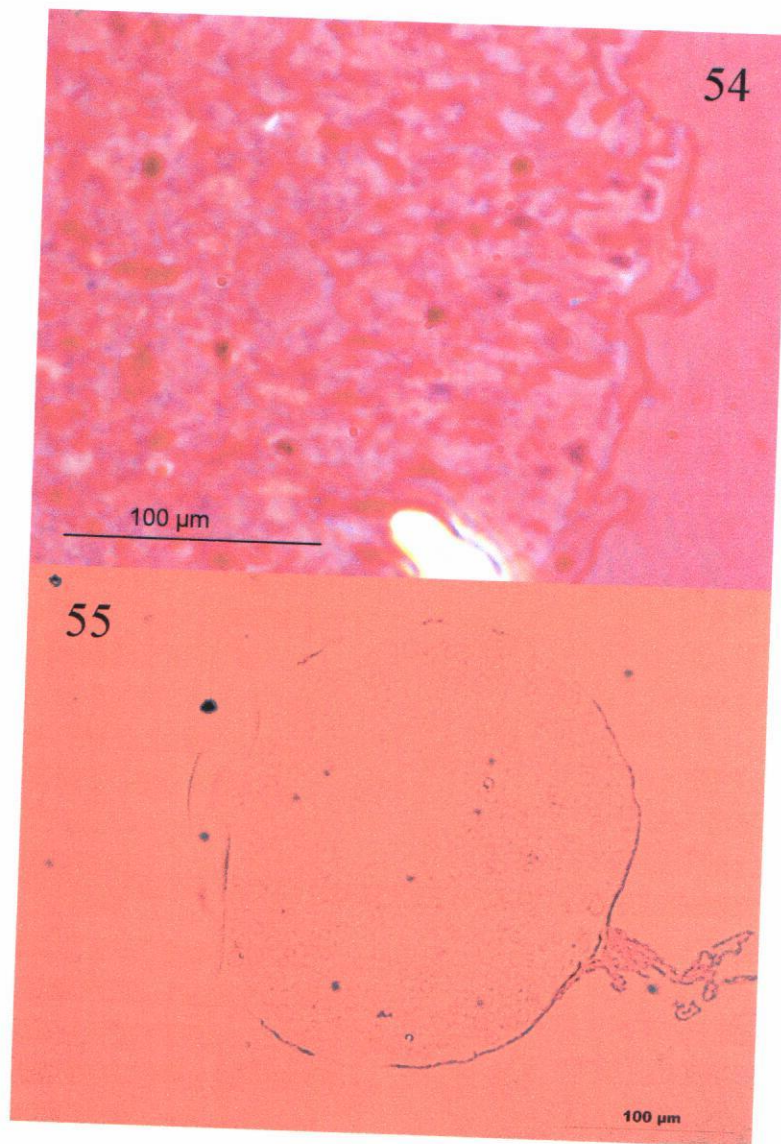
### 6.5.3 Polisacáridos insolubles

Desde las primeras fases de desarrollo de los esporocarpos de *Cribraria* sp. (D1) se observó una tinción de color rosa distribuida en el citoplasma del primordio, indicando la presencia de polisacáridos insolubles (Figura 56). La coloración rosada más intensa durante las fases de alargamiento del estípite (D3 y D4), es indicativa del incremento de polisacáridos insolubles en el citoplasma de la masa globular que dará origen a la esporoteca. La cantidad de polisacáridos insolubles en el citoplasma disminuye cuando el esporocarpo ha alcanzado su tamaño final (D4), llegando a ser no detectable durante la diferenciación del cálculo y la red peridial (D5), e incrementándose nuevamente durante la formación de las esporas (D6) (Figura 60), aunque en este caso su presencia fue más notoria en la parte interna del estípite.

### 6.5.4 Proteínas

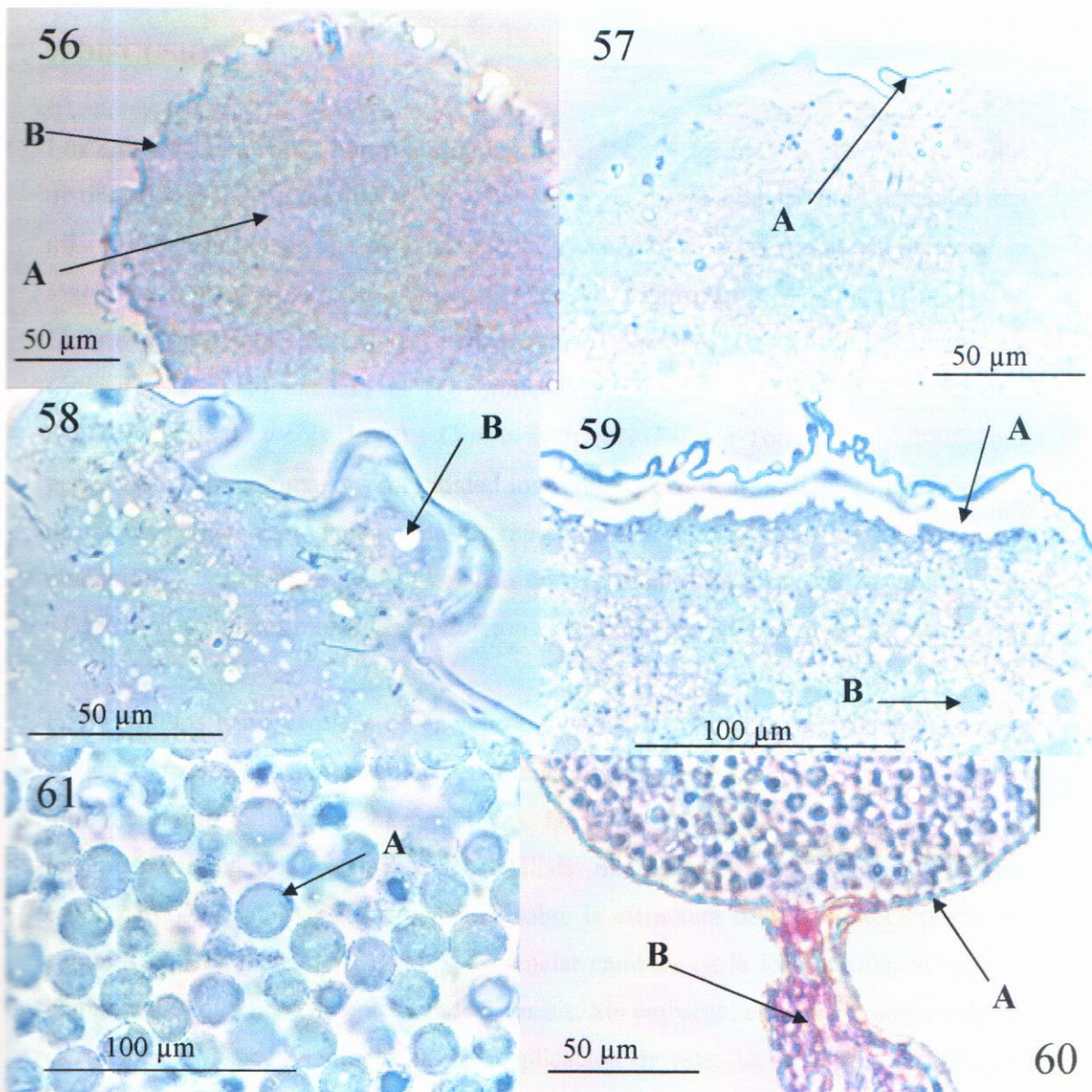
La presencia de proteínas es detectada por una coloración azul en la prueba histoquímica utilizada. En este caso, también se detectaron proteínas a lo largo de todas las fases de desarrollo de los esporocarpos de *Cribraria* sp. En los primordios (D1) (Figura 56), las proteínas se evidencian fundamentalmente en la membrana que los rodea. La coloración azul se intensifica durante las fases de formación y alargamiento del estípite (D2, D3 y D4) (Figuras 57, 58 y 59) para hacerse menos notoria cuando esta estructura ha alcanzado su longitud máxima (D4) y se está formando el cálculo y la red peridial (D5) (Figura 60). Nuevamente, la presencia de proteínas en estas etapas fue más evidente en la membrana que rodea a la esporoteca y que se continúa con el estípite,

aunque durante las etapas previas a la esporulación también se observaron unas inclusiones globulares, teñidas uniformemente de azul. Durante la formación de las esporas (D6) (Figura 61), se observa que la membrana que cubre a la esporoteca y al estípito presenta una coloración azul evidenciando la presencia de proteínas. En esta fase, el cálculo está perfectamente diferenciado y la membrana que cubre a la base de la esporoteca, también adquiere una coloración uniformemente azul. Las cubiertas que rodean a cada spora individual muestran también una intensa coloración azul, es decir, contienen una cantidad detectable de proteínas, como lo sugiere la técnica utilizada.



Figuras 54-55. Cortes finos de *Cribraria* sp. Prueba histoquímica rojo "O" de aceite. 54. Primordio (D1, 1.5 µm de grosor), A) periferia de la membrana teñida de rojo. 55. Esporoteca con esporas (D1, 1.5 µm de grosor), A) tinción más intensa en el ápice del estípite.





Figuras 56-61. Cortes finos de *Cribraria* sp. Prueba histoquímica para proteínas con APS (ácido peryódico-reactivo de schiff). 56. Primordio (D1, 1.3  $\mu\text{m}$  de grosor), A) presencia de polisacáridos insolubles (color rosa) en el citoplasma, B) presencia de proteínas (color azul) en la membrana del primordio. 57 y 58. Alargamiento del estípite (D1, 1.3  $\mu\text{m}$  de grosor), A) proteínas alrededor de la membrana, B) inclusiones blancas en la masa granular. 59. Alargamiento total del estípite (D1, 1.3  $\mu\text{m}$  de grosor), A) diferenciación entre el citoplasma y la membrana que lo cubre, B) inclusiones azuladas en la masa protoplásmica. 60. Esporocarpio con esporas (D1, 1.3  $\mu\text{m}$  de grosor), A) proteínas en la periferia de la esporoteca, B) mayor concentración de polisacáridos insolubles en el estípite. 61. Esporas (D1, 1.3  $\mu\text{m}$  de grosor), A) presencia de proteínas en la membrana de cada espora.

## 7. DISCUSIÓN

Los cultivos en cámaras húmedas son herramientas que facilitan la observación de las distintas fases del desarrollo morfogénico, permitiendo obtener una secuencia del mismo, además de ser una técnica sencilla y económica. A través de esta técnica se logró observar el desarrollo ontogénico de los esporocarpos de cinco especies de *Cribraria*, las cuales son: *Cribraria cancellata*, *C. lepida*, *C. microcarpa*, *C. violacea* y *Cribraria* sp. Esto, aunado al conocimiento previo que se tenía sobre *Cribraria zonatispora* (Lado y cols. 1999) y *Cribraria fragilis* (Estrada-Torres y cols. 2002), nos permite conocer con mayor profundidad los cambios que ocurren durante la formación de las estructuras reproductoras de los representantes de este género. No obstante, la obtención de resultados mediante el uso de esta técnica es aleatorio, ya que sólo el 11.5% de las cámaras montadas produjeron alguna especie del género de interés.

Estos cultivos permitieron la obtención de material en diferentes etapas de desarrollo haciendo factible su procesamiento para un análisis más fino empleando cortes en ultramicrotomo y tinciones histoquímicas. Dichas técnicas permitieron corroborar la información obtenida a través del análisis microscópico del desarrollo de los esporocarpos, detallar las observaciones sobre la estructura de los esporocarpos y los cambios morfológicos detectados, y evidenciar cambios en la localización de algunos componentes químicos durante la morfogénesis. Sin embargo, el pequeño tamaño de las estructuras y la poca experiencia en la aplicación de estas técnicas en mixomicetos, dificultó notablemente la obtención de resultados, debido principalmente a las siguientes causas:

- a) Las estructuras se perdían frecuentemente durante los cambios en las diferentes soluciones para la deshidratación.
- b) Las estructuras eran difíciles de orientar durante su inclusión en las resinas, por lo que repetidamente los cortes no se obtenían completos, dificultando su observación e interpretación.
- c) Las navajas del ultramicrotomo rasgaban las delicadas estructuras.

- d) Los cortes obtenidos se doblaban o rompían durante el proceso de montaje.
- e) Los cortes se perdían con frecuencia durante la aplicación del alcohol absoluto o el proceso de tinción.
- f) La tinción se desvanecía rápidamente al aplicar los medios de montaje durante la toma de fotografías.

### 7.1 Fases somáticas: plasmodios

Con relación a las fases plasmodiales de las especies analizadas, sólo se observaron plasmodios en *Cribraria cancellata*. Alexopoulos (1960) describió los tres tipos de plasmodios que actualmente se conocen en mixomicetos: protoplasmodios, afanoplasmodios y faneroplasmodios. Reconoció, asimismo, la presencia de un cuarto tipo con características intermedias entre los afanoplasmodios y los faneroplasmodios. El mismo autor, enfatizó la correlación existente entre el tipo plasmodial y la posición taxonómica (Alexopoulos, 1969) e incluso en la actualidad se ha visto la importancia que este carácter tiene como marcador filogenético (Fiore-Donno y cols. 2005), encontrándose bajo la clasificación actual (Hawksworth y cols. 1995) que los protoplasmodios son característicos de los Echinosteliales, los afanoplasmodios se encuentran en los Stemonitales, los faneroplasmodios son típicos de los Physarales, y el tipo intermedio descrito por Alexopoulos (1960) se observa en el orden Trichiales (Fiore-Donno y cols. 2005).

Poco se sabe de los plasmodios de las especies pertenecientes al orden Liceales. Alexopoulos (1969) listó varias especies de *Licea* entre los taxa en los que se han observado protoplasmodios en cultivo en agar o sobre sustratos naturales en cámara húmeda. Señaló además, basado en observaciones de campo, que algunos Liceales probablemente presenten faneroplasmodios. Yang (1970) describió el ciclo de vida de *Reticularia lycoperdon* de espora a espora en cultivo de agar. Mencionó que los plasmodios eran amarillos, delgados e irregulares, que presentaban corrientes citoplásmicas ocasionales y que estaban formados por una fina red de venaciones. No

obstante, no describió con detalle las características del plasmodio ni señaló a que tipo plasmodial correspondía.

En el caso particular del género *Cribraria*, ya desde 1887, De Bary (citado en Gray y Alexopoulos 1968) señaló la presencia de grandes gránulos cafés en los plasmodios coloreados de algunas especies, pero no dio más detalles sobre su morfología. McManus (1964, 1966) describió los plasmodios más pequeños de *C. violacea* como grandes amebas, con una parte anterior y una posterior bien definidas, con una vacuola contráctil y flujo protoplásmico unidireccional, pero los de mayor tamaño conformados por una red de venas y algunas veces con forma de abánico; consideró que estos plasmodios no correspondían con los típicos protoplasmodios, ya que sus corrientes no son aleatorias sino rítmicas. Nannenga-Bremekamp (1991) mencionó las coloraciones de los plasmodios de varias especies de *Cribraria*, entre ellas *C. cancellata*, *C. mirabilis*, *C. argillacea*, *C. rufa*, *C. aurantiaca*, *C. persoonii*, *C. tenella*, *C. microcarpa*, *C. pachydicton*, *C. vulgaris* y *C. violacea*, pero en ningún caso dio detalles de su tamaño o morfología. Lado y cols. (1999) señalaron que los plasmodios maduros de *C. zonatispora* se observan como masas irregulares aplanadas con abundantes gránulos citoplásmicos de color púrpura que le confieren su coloración característica. En el caso de *Cribraria fragilis*, Estrada-Torres y cols. (2002) mencionaron que los plasmodios juveniles eran hialinos; con algunas inclusiones granulares de color violeta y del tipo protoplasmodio, y que conforme el plasmodio se desarrollaba las inclusiones granulares se incrementaban, dándole al protoplasma plasmodial una coloración violeta oscuro.

El plasmodio de *C. cancellata* observado en el presente estudio está formado por venaciones que forman un fino retículo, con citoplasma densamente granular, de color café púrpura oscuro, sin un frente de avance ni un margen bien definidos, sin aparente diferenciación entre citoplasma interno y externo, pero con corrientes bi-direccionales rítmicas presentes. Difiere de los protoplasmodios porque éstos no son reticulados y no tienen corrientes bi-direccionales, de los afanoplasmodios porque ellos son hialinos y prácticamente invisibles aún en formas maduras, y de los faneroplasmodios porque éstos presentan margen y frente de avance diferenciados (Gray y Alexopoulos 1968); en ese sentido, son más bien parecidos a los plasmodios característicos de los Trichiales, los cuales sólo forman frente de avance en los estados más desarrollados. Tampoco coincide con los plasmodios descritos para *C. violacea* o *C. zonatispora*, los cuales son

microscópicos y, al menos en el segundo caso, no forman una red de venaciones. En este sentido, las observaciones realizadas en *Cribraria cancellata* dan evidencia de que en el género podrían existir al menos tres tipos de plasmodios: i) los descritos en *C. zonatispora*, los cuales son masas protoplásmicas irregulares no reticuladas (Lado y cols. 1999); ii) los de *C. violacea*, que son microscópicos, reticulados y con corrientes uni-direccionales (McManus 1966); y iii) los reportados en este estudio para *C. cancellata*, que son visibles a simple vista, formados por finas venaciones que forman una red y con corrientes citoplásmicas reversibles.

Los plasmodios de *C. lepida*, *C. microcarpa* y *Cribraria* sp. no pudieron ser detectados en el presente estudio. Como advirtieron Martin y Alexopoulos (1969), los hábitos de los plasmodios de un numeroso grupo de mixomicetos que incluye a las *Cribrarias* son poco conocidos y probablemente el plasmodio nunca aparezca sobre la superficie del sustrato, sino que los primordios de lo que serán los esporocarpos emergen como gotillas de protoplasma y proceden a madurar individual pero frecuentemente en grandes grupos. Es posible entonces que ésta sea la razón por la cual los plasmodios de las tres especies arriba mencionadas no pudieron ser observados. Por su pequeño tamaño, hábito disperso, y por el hecho de encontrar con frecuencia esporocarpos en diferentes etapas de desarrollo en el mismo cultivo es posible que los estados plasmodiales de *C. lepida*, *C. microcarpa* y *Cribraria* sp sean más similares a aquéllos encontrados en *C. zonatispora* o *C. violacea*, que a los desarrollados por *C. cancellata*. Estudios más detallados que incluyan el aislamiento de estas especies en cultivo en agar podrán corroborar esta hipótesis.

## 7.2 Morfogénesis de los esporocarpos

Con relación al desarrollo morfogenético de los esporocarpos, todas las especies de *Cribraria* estudiadas comparten el tipo de desarrollo mixogastroide o subhipotálico (Ross 1973). En éste, el hipotalo es continuo con la membrana que cubre al estípite y la esporoteca (Alexopoulos 1969; Ross 1973), tal y como se muestra en las figuras 45 y 46 de *Cribraria* sp. En este tipo de desarrollo, también se ha definido que el estípite se forma por el engrosamiento del hipotalo sobre la parte basal del primordio de la esporoteca. En *Cribraria* sp. puede notarse claramente como el contenido citoplásmico de la esporoteca está separado del estípite por una membrana (Figura 36), coincidiendo

con lo descrito por Alexopoulos (1969) y Ross (1973). Collins (1979) mencionó que el color del plasmodio se correlaciona algunas veces con la coloración del estípite o de alguna otra estructura de los esporocarpos. En este sentido, se ha mencionado que en *Physarum polycephalum*, la mayoría de los gránulos de pigmento son dejados en el estípite junto con otros depósitos y restos del protoplasto (Guttes y cols. 1961 citado en Olive 1975), lo que claramente se evidencia en *Cribraria* por la presencia de los gránulos citoplásmicos que van quedando atrapados en el estípite conforme éste se alarga (Figuras 13, 14 y 24). Adicionalmente, la coloración del cálculo y la red peridial de las especies de *Cribraria* revisadas también se correlaciona fuertemente con el color del plasmodio o de los primordios, cuando el primero no fue observado.

Las cinco especies de *Cribraria* estudiadas presentan un desarrollo mixogastroide. Este tipo de desarrollo ha sido ampliamente documentado para diversas especies de mixomicetos y es compartido por Physarales, Trichiales y aún por las formas más simples de mixomicetos como los Echinosteliales (Gray y Alexopoulos 1968, Alexopoulos 1969), tales como *Echinostelium lunatum* (Olive 1975). Aunque hay menos estudios sobre la morfogénesis de los esporocarpos en Liceales (p.e. Lakhanpal y Mukerji 1976), la continuidad de la membrana que envuelve a los esporocarpos sugiere un desarrollo mixogastroide en este orden, particularmente en especies de *Cribraria* como *C. minutissima* (Ross 1973). Nannenga-Bremekamp (1991) mencionó un desarrollo mixogastroide para *Cribraria aurantiaca* y Lado y cols. (1999) y Estrada-Torres y cols. (2002) lo confirmaron para *C. zonatispora* y *C. aff. fragilis*, respectivamente.

Las cinco especies estudiadas comparten también las siguientes etapas de desarrollo: a) concentración de la masa protoplásmica del plasmodio y formación de primordios hemisféricos; b) constricción de los primordios en la base para iniciar la formación del cálculo; c) formación y alargamiento del estípite; d) elevación de una masa protoplásmica globular en el ápice del estípite; e) diferenciación del cálculo, cuando éste existe, y/o la red peridial; f) formación de las esporas; g) maduración del esporocarpo. Estas mismas fases fueron ilustradas por Nannenga-Bremekamp (1991) para *C. aurantiaca* y descritas para *C. violacea* por McManus (1966), *C. zonatispora* por Lado y cols. (1999) y *C. aff. fragilis* por Estrada-Torres y cols. (2002), con lo que se concluye que todo el género presenta básicamente el mismo proceso de formación de

esporocarpos. Adicionalmente, en *C. lepida*, *C. microcarpa*, *C. violacea* y *Cribraria* sp., se observa como los gránulos protoplásmicos detectados en el primordio van quedando retenidos en el material que forma el estípito conforme éste se va alargando. Los gránulos protoplásmicos que permanecen en la cabezuela globular protoplásmica que dará origen a la esporoteca, inician una emigración hacia la periferia, concentrándose en la base y en áreas aisladas de la superficie, formando los gránulos característicos de los cálculos y redes peridiales del género. Estas observaciones confirman los datos presentados por Lado y cols. (1999) para *C. zonatispora* y por Estrada-Torres y cols. (2002) para *C. aff fragilis*. Lamentablemente, esta información no pudo ser corroborada para el caso de *C. cancellata*, ya que por el tamaño de los esporocarpos, no se pudieron hacer observaciones en microscopía de campo claro sin destruir las delicadas estructuras. Los cortes obtenidos en *Cribraria* sp. muestran claramente como estos gránulos quedan integrados en la estructura de cálculo, nodos de la red peridial y estípites.

McHugh y Reid (1996) propuso que los gránulos "dictidinos" de las estructuras peridiales eran formadas a partir de vacuolas acumuladas en el peridio o de algunas estructuras encerradas en dichas vacuolas, lo que implicaría un origen de los gránulos diferente del encontrado para las especies aquí estudiadas, ya que en estas es evidente que los gránulos se encuentran presentes desde que se forman los primordios y probablemente desde que se desarrollan los plasmodios, como se ha descrito para *C. violacea* (McManus 1964, 1966), *C. zonatispora* (Lado y cols. 1999) y *C. fragilis* (Estrada-Torres y cols. 2002). Además, la presencia de grandes gránulos protoplásmicos también es evidente en los plasmodios de *C. cancellata* y ha sido notoria para otras especies del género desde tiempos de De Bary (1887 citado en Alexopoulos y Gray 1968). Al menos tres nombres diferentes han sido asignados a los gránulos presentes en las estructuras reproductoras de las Cribrariaceae; dictidinos, cálcicos y protoplásmicos (Lado y Pando 1997). El primer nombre se refiere a la naturaleza química de los gránulos ya que se pensaba estaban formados por una sustancia llamada dictidina, Schoknecht (1975) dio evidencia de que los gránulos de algunas especies de *Cribraria* estaban formados básicamente de oxalato de calcio, lo que haría impropio nombrarlos "dictidinos", siendo entonces más conveniente designarlos como "cálcicos". No obstante, este nombre no los distinguiría de los gránulos presentes en Physarales, que aunque también contienen calcio, en este caso se encuentra presente como carbonato.

Dada la evidencia de que los gránulos de los cuerpos reproductores de los Cribrariaceae son depositados desde las fases plasmodiales y se encuentran definidos ya desde la formación de los primordios, en este estudio sugerimos que la mejor designación para estos gránulos es la de "protoplásmicos".

Además de los tipos de plasmodio previamente discutidos, la principal diferencia encontrada entre especies de *Cribraria* es la formación de un solo esporocarpo a partir de pequeños plasmodios microscópicos o de numerosos esporocarpos a partir de un plasmodio de mayores dimensiones, fácilmente observable a simple vista. En el primer caso, esto se ha confirmado para *C. violacea* (McManus 1964; 1966) y *C. zonatispora* (Lado y cols. 1999), pero también ocurre en *C. aff. fragilis* (Estrada-Torres comunicación personal). La formación de numerosos esporocarpos a partir de un gran plasmodio fue ilustrada por Nannenga-Bremekamp (1991) para *C. aurantiaca* y ha sido corroborada para *C. cancellata* en el presente estudio. En este último caso, la formación y maduración de todos los esporocarpos es sincrónica.

Posiblemente otras especies pequeñas como *C. lepida*, *C. microcarpa* y *Cribraria* sp., en las que se observan esporocarpos en diferentes fases de desarrollo en el mismo cultivo en cámara húmeda, sigan el mismo patrón que el observado para *C. violacea*, *C. zonatispora* y *C. fragilis*. Por otro lado, especies con grupos de cuerpos reproductivos extensivos, tales como *C. ferruginea*, *C. piriformis*, *C. rufa* y otras más, posiblemente se desarrollan de plasmodios similares a los encontrados en *C. cancellata*. El significado filogenético de esta diferencia no podrá ser evaluado hasta no contar con información de mayor número de especies, pero por el momento parece tener más relación con su microhábitat que con sus relaciones filogenéticas. Así, especies corticícolas, como *C. violacea* y *C. microcarpa*; o suculentícolas, como *C. fragilis* y *C. zonatispora*, formarían plasmodios pequeños que dan origen a una solo esporocarpo, relacionado esto con ciclos de vida en que una rápida fructificación les confiere ventajas sobre otras especies, ante la baja humedad encontrada en sus microhábitats o la extrema aridez de los ambientes que habitan.



### 7.3 Pruebas histoquímicas

Pocos estudios se han realizado para dilucidar la presencia y distribución de los componentes químicos de plasmodios y cuerpos reproductivos en diferentes estados de desarrollo. En el presente estudio, se dan evidencias de ausencia de almidón en el protoplasma de primordios y cabezuelas granulares o de esporas de *Cribraria* sp., lo cual no es sorprendente pues esta sustancia de reserva no ha sido previamente encontrada en ningún mixomiceto ya que la prueba de lugol es específica para la detección de almidones polímeros de la glucosa en enlaces glicosídicos  $\alpha(1-4)$  (Bohinski 1991). La presencia de glucógeno, sustancia de reserva presente en los plasmodios de *Physarum polycephalum* Goodman y Rusch (1969 citados en Charvat y cols. 1973), no podría ser evidenciada por esta vía, requiriéndose así pruebas adicionales para corroborarse presencia en el protoplasma de *Cribraria*.

En el caso de rojo "O" de aceite para detección de lípidos, éstos se evidenciaron claramente en la membrana que recubre primordios y estípites de los cuerpos reproductivos en formación, pero fueron menos claros en el protoplasma. No parece extraña la presencia de lípidos en las membranas o vainas que recubren a los primordios o cuerpos reproductivos en desarrollo, ya que estas cubiertas deben de incluir a la membrana plasmática la cual está conformada fundamentalmente por fosfolípidos y proteínas (Bohinski 1991). La presencia de lípidos también había sido previamente reportada por Yang (1970) en los plasmodios de *Reticularia lycoperdon* en la forma de gotitas de lípidicas, por lo que tampoco sería difícil su presencia en el protoplasma de los primordios de *Cribraria* recién formados. Hasta donde se tiene conocimiento, la presencia de lípidos no había sido previamente reportada en los estípites de ninguna especie de mixomiceto.

Diversos polisacáridos han sido mostrados como componentes de inclusiones protoplásmicas Goodman y Rusch (1969 citados en Charvat y cols. 1973) y vainas mucilaginosas de los plasmodios McCormick y cols. (1970a), paredes de esporas Chapman y cols. (1983) o cubiertas de estructuras de resistencia (McCormick y cols. 1970b), o bien estípites y capilicios de los cuerpos reproductivos (Goodwin 1961) de algunas especies de mixomicetos.

En el presente estudio, los polisacáridos insolubles fueron detectados en el protoplasma de primordios y masas globulares que originaran la esporoteca, notándose a la vez cambios en la intensidad de la coloración, lo cual podría indicar también cambios en sus concentraciones McCormick y cols. (1970a) han detectado disminución en las concentraciones de glucógeno durante el proceso de esporulación, lo cual explicaría los cambios arriba mencionados en el protoplasma de los primordios, ya que este podría ser el principal polisacárido presente como sustancia de reserva de los plasmodios Daniel (1964 citado en Gray y Alexopoulos 1968) y podría estar utilizándose en la síntesis de nuevos componentes asociados con la formación de estructuras reproductoras y esporas. Su disminución a bajas concentraciones podría indicar que este polisacárido ha sido consumido hasta hacerlo no detectable, pero su presencia nuevamente durante la formación de las esporas sugiere que es sintetizado otra vez para ser almacenado como sustancia de reserva en las esporas.

En el caso del estípite, Goodwin (1961) ha sugerido que en *Comatricha* se deposita una matriz no celulósica antes de que la celulosa sea depositada en estípite y capilicio. Aunque no existe evidencia de qué tipo de polisacárido está presente en el estípite de *Cribraria* sp., el mecanismo propuesto por Goodwin (1961) podría ser el mismo en esta especie, depositándose los polisacáridos sólo hasta que se ha formado una matriz que no contiene polisacáridos, razón por la que la presencia de estos compuestos es detectada sólo hasta que el cuerpo reproductor ha alcanzado su madurez. Es difícil explicar porque no se detectaron polisacáridos en la pared de las esporas o en la cubiertas que cubren los primordios, ya que (McCormick y cols. 1970a, 1970b) y (Chapman y cols. 1983) han demostrado la presencia de polímeros de la galactosamina en estas estructuras. La aplicación simultánea de las pruebas para detectar polisacáridos y proteínas pudo disminuir la sensibilidad de las pruebas, haciéndola confusa en aquellas estructuras en que ambos compuestos están presentes, como es el caso de la pared esporal.

Con relación a las proteínas, la prueba histoquímica utilizada permitió su detección en las membranas que envuelven los primordios y los cuerpos reproductivos, lo cual parece lógico ya que tanto las vainas mucilaginosas Simon y Henney (1970), como las membranas celulares contienen una fracción proteica, en el primer caso en la forma de glicoproteína Simon y Henney (1970).

La presencia de proteínas en el protoplasma de la esporoteca en desarrollo también era de esperarse, ya que el protoplasma contiene una alta proporción de proteínas Zeldin y Ward (1963a, 1963b citados en Gray y Alexopoulos 1968). Misma situación parece darse en el caso de las cubiertas de las esporas, ya que aunque se ha reportado un bajo contenido de proteínas en la pared de la spora (McCormick y cols. 1970b), ésta se encuentra adyacente a la membrana celular de la misma, lo cual podría intensificar la reacción en este sitio.

## 8. CONCLUSIONES

El desarrollo morfogenético de las cinco especies de *Cribraria* (*C. cancellata*, *C. lepida*, *C. microcarpa*, *C. violacea* y *Cribraria* sp.) estudiadas en el presente trabajo es de tipo mixogastroide observado también en *Cribraria zonatispora* y *C. aff. fragilis*. El proceso de desarrollo es muy similar en todas las especies, con primordios hemisféricos, que toman después una forma esférica, alargamiento posterior del estípite elevando la masa protoplásmica que origina a la esporoteca; en cuanto el estípite alcanzó su longitud total, la masa protoplásmica cambio de coloración, encontrándose ya en esta etapa tanto la red peridial como el cálculo (en especies que presentan tales estructuras); finalmente se forman las esporas. Para *C. lepida*, *C. microcarpa*, *C. violacea* y *Cribraria* sp., los primordios observados fueron microscópicos e individuales y cada uno dio origen a un cuerpo reproductivo; a diferencia de lo anterior, el plasmodio de *C. cancellata* fue macroscópico, de apariencia reticulada y a partir de cada plasmodio se originaron muchos primordios que maduraron de manera sincrónica. De esta forma, la principal diferencia entre las especies de este género es el tipo de fase plasmodial presente y no el patrón de su morfogénesis.

Durante las observaciones de la estructura de *Cribraria* sp., se logró concluir que esta especie no contiene reservas de almidón. Los lípidos se observaron en la membrana que recubre a los primordios y en etapas más avanzadas se detectaron también en el estípite. Los polisacáridos insolubles se observaron en el protoplasma de los primordios y en las masas globulares que dan origen a la esporoteca, pero su presencia fue más evidente durante la formación de las esporas. Las proteínas se detectaron tanto en las membranas que envuelven los primordios como en los cuerpos reproductivos.

## 9. PERSPECTIVAS

Recomendaciones para continuar con el estudio de la morfogénesis del género *Cribraria*:

1. Realizar cultivos en agar como alternativa complementaria para corroborar las observaciones previas en cultivo de cámara húmeda, y poder llevar a cabo observaciones más detalladas del proceso de morfogénesis.
2. Explorar la inclusión y corte de especies de mayores dimensiones que faciliten el manejo y permitan confirmar las observaciones que se tienen hasta el momento.
3. Llevar a cabo observaciones en microscopía electrónica de transferencia para la realización de descripciones a nivel ultraestructural de las diferentes fases de desarrollo de los cuerpos reproductivos.
4. Manejar por separado las distintas pruebas histoquímicas para la detección de proteínas y polisacáridos insolubles con el objeto de una mejor interpretación de las observaciones.
5. Utilizar pruebas específicas para cada compuesto químico de interés (p.e., para glucógeno, celulosa, quitina, polímeros de galactosamina, etc.), con el objetivo de conocer en forma más precisa la composición química de las diferentes estructuras de los cuerpos reproductivos de los mixomicetos.
6. Realizar el manejo y toma de fotografías de los cortes teñidos de forma inmediato, ya que las preparaciones son temporales y se pueden perder las evidencias sobre la composición y ubicación de compuestos específicos.

## 10. REFERENCIAS

- Alexopoulos CJ.1960. Gross morphology of the plasmodium and its possible significance in the relationships among myxomycetes. *Mycol.* 52: 1-20.
- Alexopoulos CJ.1969. The experimental approach to the taxonomy of Myxomycetes. *Mycol.* 61: 219-239.
- Alexopoulos CJ. 1973. Myxomycota. Myxomycetes. In: Ainsworth GC, Sussman AS, Sparrow FK (eds.) *The Fungi IVB*. Academic Press, Nueva York. 39-60.
- Alexopoulos CJ y Sáenz JAR. 1975. The Myxomycetes of Costa Rica. *Mycotaxon* 11: 223-271.
- Baldauf SL y Doolittle WF.1977. Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proc Natl Acad Sc USA* 94: 12007-12012.
- Bary A.1887. Comparative morphology and biology of the fungi, Mycetozoa and bacteria. in Gray WD y Alexopoulos CJ. 1968. *Biology of the Myxomycetes*. Ronald Press, Nueva York.
- Bessey EA.1950. *Morphology and taxonomy of fungi*. Blakiston, Filadelfia.
- Boic D.1925. Uber den chemischen Character der Peridie, de Kapillitiums und der Sporenmembranen bei Myxomyzetten. in Gray WD, Alexopoulos CJ. 1968. *Biology of the Myxomycetes*. Ronald Press, Nueva York.
- Bohinski RC. 1991. *Bioquímica*. Editado por Addison-Wesley Iberoamericana, S.A.
- Cavalier-Smith T. 1981. Eucaryote Kingdoms: Seven or nine? *BioSystems* 14: 461-481.
- Chapman CP, Nelson RK y Orlowski M. 1983. Chemical Composition of the Spore of the Acellular Slime mold *Fuligo septica*. *Experimental Mycol.* 7: 57-65.
- Chet I y Rusch HP. 1969. Induction of spherule formation in *Physarum polycephalum*. in Charvat I, Ross KI y Cronshaw J. 1973. *Ultrastructure of the Plasmodial Slime Mold Perichaena vermicularis*. *Protoplasma* 78: 1-19.
- Cihlar C. 1916. Mikrokemijaska istrazivan johitin ublinskim membranama. in Gray WD, Alexopoulos CJ. 1968. *Biology of the Myxomycetes*. Ronald Press, Nueva York.
- Collins O NR.1979. Myxomycete biosystematics: Some advance developments and future research opportunities. *Bot. Rev. (Lancaster)*. 48: 145-202.
- Collins O NR.1987. Reproductive biology and speciation in Myxomycetes. In: Rayner ADM, Brasier CM, Moore D (eds.). *Evolutionary Biology of the fungi*. Cambridge University Press, Cambridge. 271-284.

- Daniel JW.1964. Photo induced polysaccharide precursor of a myxomycete spore pigment. in Gray WD, Alexopoulos CJ. 1968. Biology of the Myxomycetes. Ronald Press, Nueva York.
- Daniel JW.1966. The ligh-dependent reaction inducing sporulation of the myxomycete, *Physarum polycephalum*. in Gray WD, Alexopoulos CJ. 1968. Biology of the Myxomycetes. Ronald Press, Nueva York.
- Eliasson UH.1977. Racent advances in the taxonomy of myxomycetes. Bot. Not. 130: 483-492.
- Estrada-Torres A, Lado C, Rodríguez-Palma M.2001.Two new species of Myxomycetes from a tropical deciduous forest from México. Mycol. 93: 744-750.
- Estrada-Torres A, Márquez J, Esquivel C, Ramírez-Ortega M y Lado C.2002. Morphogenesis of the sporocarps of *Cribraria fragilis*. IV International Congress on Systematics and Ecology of Myxomycetes. August 4-9. Bruselas Belgium. pp. 29.
- Farr ML.1976. Myxomycetes. Flora Neotropica 16. New York Botanical Garden, Nueva York.
- Fiore-Donno AM, Berney C, Pawlowski J y Baldauf SL. 2005. Higher-order Phylogeny of Myxomycetes Based on Elongation Factor 1-A and Small Subunit rRNA Gene Sequences.V International Congress on Systematics and Ecology of Myxomycetes. August 8-13. Tlaxcala, Tlax. México. pp. 32.
- Gray WD y Alexopoulos CJ. 1968. Biology of the Myxomycetes. Ronald Press, Nueva York.
- Goodman EM y Rusch HP. 1969. Glycogen in *Physarum polycephalum*. in Charvat I, Ross KI y Cronshaw J. 1973. Ultrastructure of the Plasmodial Slime Mold *Perichaena vermicularis*. Protoplasma 78: 1-19.
- Goodwin CD. 1961. Morphogenesis of Sporangium of *Comatricha*. Amer. Jour. of Bot. 48: 148-154.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC y Pegler DN. 1995. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 8a. ed. University Press Cambridge, UK.
- Keller HW. 1996. Biosystematics of myxomycetes: A futuristic view. In: Abstracts of the Second International Congress on the Systematics and Ecology of Myxomycetes. RJBm, Madrid, Spain.
- Keller HW y Braun KL. 1999. Myxomycetes of Ohio: Their Systematics, Biology, and use teaching. Ohio Biological Survey, Ohio.

- Keller HW y Eliasson UH. 1992. Taxonomic evaluation of *Perichaena depressa* and *P. quadrata* based on controlled cultivation, with additional observations on the genus. *Mycol. Res.* 96: 1097.
- Keller HW y Schoknecht JD. 1989. Life cycle of a new annulate-spored species of *Didymium*. *Mycol.* 248-264.
- Kornerup A, Wanscher JH. 1989. *Mathuen handbook of color*. Third edition.
- Lado C, Mosquera J y Beltrán-Tejera E. 1999. *Cribraria zonatispora*, development of a new myxomycete with unique spore. *Mycol.* 91: 157-165.
- Lakhanpal TN y Mukerji KG. 1976. Experimental Studies on India Myxomycetes I. Sporangial Development in *Licea scyphoides*, *Clastoderma debaryanum* and *Macbrideola cornea*. *Trans. Mycol. Soc. Japan.* 17: 106-120.
- Lakhanpal TN y Sood R. 1981. Experimental Studies on Indian Myxomycetes III Sporangial Development in *Echinostelium cribrarioides*. *Trans. Mycol. Soc. Japan.* 22: 149-152.
- Leedale GF. 1974. How many are the Kingdoms of organisms? *Taxon* 23: 261-270.
- Locquin M. 1947. Structure du capillitium d'*Hemitrichia serpula*. in Gray WD, Alexopoulos CJ. 1968. *Biology of the Myxomycetes*. Ronald Press, Nueva York.
- Locquin M. 1948. Structure du capillitium de *Margarita matallica*. in Gray WD, Alexopoulos CJ. 1968. *Biology of the Myxomycetes*. Ronald Press, Nueva York.
- López CML, Márquez GJ y Murguía SG. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Laboratorio de desarrollo en plantas, departamento de Biología Comparada. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Mabee PM. 1993. Phylogenetic interpretation of ontogenetic change: Sorting out the actual and artefactual in an empirical case study of centrarchid fishes. *Zoological Journal of the Linnean Society* 107: 175-291.
- Margulis L. 1974. Five-Kingdom classification and the origin and evolution of cells. *Evo. Biol* 7:45-78.
- Martin GW. 1949. Fungi. Myxomycetes. *N Am Fl* 1:1-151.
- Martin GW. 1960. The systematic position of the Myxomycetes. *Mycol.* 52: 119-129.
- Martin GW y Alexopoulos CJ. 1969. *The Myxomycetes*. University of Iowa Press, Iowa.



- Martin GW, Alexopoulos CJ y Farr ML. 1983. The genera of Myxomycetes. University of Iowa Press, Iowa.
- McCormick J J, Blomquist JC y Rusch HP. 1970a. Isolation and Characterization of an Extracellular Polysaccharide from *Physarum polycephalum*. Jour. of Bact. 104 (3): 1110-1118.
- McCormick J J, Blomquist JC y Rusch HP. 1970b. Isolation and Characterization of a Galactosamine Wall from Spore and Spherules of *Physarum polycephalum*. Journal of Bacteriology 104 (3): 1119-1125.
- McHugh R y Reid C. 1996. Sporangial development in the myxomycete *Cribraria argillacea*. In: Lado C, Hernández JC, eds. Second International Congress on the Systematics and Ecology of Myxomycetes. Abstract Volume. Madrid: Real Jardín Botánico. 43-44.
- McManus SMA. 1964. The Plasmodia of the Myxomycetes *Licea biforis* and *Cribraria violacea*. Mycol. 56: 237-239.
- McManus SMA. 1966. Cultivation on agar and study of the plasmodia of *Licea biforis*, *Licea variabilis* and *Cribraria violacea*. Mycol. 58: 479-483.
- Mishler DB y De Luna E. 1991. The Use of Ontogenetic Data in Phylogenetic Analyses of Mosses. Advances in Bryology 4: 121-167.
- Mitchel DW. 200. Sinkey. Synoptic Keys to myxomycetes. CD-ROM. Walton Cottage, Upper hartfiel, East Sussex.
- Munsell. 1975. Munsell soil color charts. Macbeth division of Kollmorgen corporation. 2441 North calvert street. Baltimore, Maryland 21218.
- Nannenga-Bremekamp NE. 1991. A guide to temperate Myxomycetes. Biopress, Bristol.
- Neubert, H., W. Nowotny, y K. Baumann. 1993. Die Myxomyceten Deutschland und des angren-zenden Alpenraumes unter besonderer Berücksichtigung Österreichs. Band 1 Ceratiomyxales, Echinosteliales, Liceales, Trichiales. Karlheinz Baumann Verlag, Gomaringen.
- Olive LS. 1970. The Mycetozoa: A revised classification. Bot. Rev. 36: 59-89.
- Olive LS, Stoianovitch C. 1972. Protosporangio: a new genus of protostelid. J. Proz. 19: 563-571.
- Olive LS. 1975. *The Mycetozoans*. Academic Press. New York. San Francisco London.

- Ramírez-Ortega JM, Estrada-Torres A y De Luna E. 2005. A cladistic analysis of the systematic position of Cribrariaceae among Myxomycetes using morphological characters. V International Congress on Systematics and Ecology of Myxomycetes. August 8-13. Tlaxcala, Tlax. México. pp.79.
- Rodríguez-Palma M. 2003. Estudio Monográfico de los Myxomycetes del estado de Tlaxcala. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D. F.
- Ross IK. 1960. Sporangial Development in *Lamproderma arcyronema*. Mycol. 52: 621-627.
- Ross IK. 1973. The Stemonitomycetidae, a new subclass of Myxomycetes. Mycol. 65: 477-485.
- Schoknecht JD. 1975. SEM and X-ray microanalysis of calcareous deposits in Myxomycete fructification Trans. Amer. Microscop. Soc. 94: 216-223.
- Schuster F. 1964. Electrón microscope observations on spore formation in the trae slime mold *Didymium nigripes*. in Gray WD, Alexopoulos CJ. 1968. Biology of the Myxomycetes. Ronald Press, Nueva York.
- Serrano AJJ. 2003. La ultraestructura del cotiledón de *Cicer arietinum* (Garbanzo), después del remojo en agua alotropizada y solución salina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D. F.
- Simon HL y Henney HR. 1970. Chemical Composition of slime from three species of Myxomycetes. Febs Letters North-Holland Publishing Company-Amsterdam 7(1): 80-82.
- Spiegel FW. 1990. Phylum plasmodial slime molds class Protostelida. in Margulis, L.; J.V. Corliss, M. Melkonian, D.J. Chapman. 1990. Handbook of protoctista. The structure, cultivation, habitats and lide histories of the Eucaryota microorganisms and their descendants exclusive of animals, plants and fungi. Tome II. Jones y Bartlett Publishers. Boston.
- Spiegel FW, Lee SB y Rusk SA. 1995. Eumycetozoans and molecular systematics. Can J Bot 73: 738-746.
- Turnock G, Morris RS y Dee J. 1981. A comparison of the Proteins of the Amoebal and Plasmodial Phases of the Slime Mould, *Physarum polycephalum*. Eur. J. Biochem. 115: 533-538.
- Ulrich R. 1943. Les constituents de la membrane chez les champignons. in Gray WD, Alexopoulos CJ. 1968. Biology of the Myxomycetes. Ronald Press, Nueva York.

- Welden L. 1955. Capillitial development in the myxomycetes *Badhamia gracilis* and *Didymium iridis*. Mycol. 47: 714-728.
- Wettstein F. 1921. Das Vorkommen von Chitin und seine Verwertung als systematisch-phylogenetisches Merkmal in Pflanzenreich. in Gray WD, Alexopoulos CJ. 1968. Biology of the Myxomycetes. Ronald Press, Nueva York.
- Whittaker RH. 1969. New concepts of Kingdoms of organisms. Science 163: 150-158.
- Whittaker RH, Margulis L. 1978. Protist classification and the Kingdoms of organisms. BioSystems 10: 3-18.
- Yang BY. 1970. Ultrastructure of Spores and plasmodium of *Reticularia lycoperdon*. Taiwania 15 (2): 211-215.
- Zeldin MH y Ward JM. 1963a. Acrylamide electrophoresis and protein pattern during morphogenesis in a slime mold. in Gray WD, Alexopoulos CJ. 1968. Biology of the Myxomycetes. Ronald Press, Nueva York.
- Zeldin MH y Ward JM. 1963b. Protein changes during photo-induced morphogenesis in *Physarum polycephalum*. in Gray WD, Alexopoulos CJ. 1968. Biology of the Myxomycetes. Ronald Press, Nueva York.
- Zhou Z, Li Y. 1983. A new myxomycete *Cribraria enodis*. Act. Micologica Sinica 2 (1): 38-40.