



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

Maestría en Ciencias Biológicas

DESCRIPCIÓN Y CULTIVO DE UNA NUEVA ESPECIE DE *Badhamia* (MYXOMYCETES) Y DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE SUS CARACTERES

T e s i s

que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

P r e s e n t a

Aline Velasco Ramírez

Director de Tesis

Dr. Arturo Estrada Torres

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre 2010



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

Maestría en Ciencias Biológicas

**DESCRIPCIÓN Y CULTIVO DE UNA NUEVA ESPECIE DE *Badhamia*
(MYXOMYCETES) Y DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE SUS
CARACTERES**

T e s i s

que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

P r e s e n t a

Aline Velasco Ramírez

Comité Tutorial

Dr. Arturo Estrada Torres

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

M. en C. Laura V. Hernández Cuevas

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre 2010

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Sistemática del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (C.I.C.B.) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, bajo la dirección del Dr. Arturo Estrada Torres, como parte del proyecto Estudios Sistemáticos con Myxomycetes financiado por el Fondo Sectorial para la Investigación Básica SEP-CONACyT.

Los estudios de microscopía electrónica se realizaron en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias bajo la asesoría de la Dra. Judith Márquez Guzmán y en el Laboratorio de Microscopia Electrónica de Barrido en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología con la supervisión de la Biol. Yolanda Ornelas, ambas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Para la estancia en la UNAM se contó con una Beca del Programa de Movilidad Estudiantil ECOES dentro de la convocatoria agosto-diciembre 2007.

Para la realización de estudios de Maestría se contó con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), registro número 209397, dentro de la convocatoria nacional agosto-septiembre 2006. La Maestría en Ciencias Biológicas se encuentra registrada actualmente en el Padrón Nacional de Posgrado (PNP) y su sede es en Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (C.T.B.C.), Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Independientemente de lo que haya ocurrido ayer y de lo que pueda pasar mañana, el AHORA es el punto en el que te encuentras: DISFRÚTALO!!

A mi hermosa princesa, Angel Karelyn, un regalo del cielo que llegó para colmar mi vida de amor, alegría y la esperanza de ser una mejor persona. Te amo profundamente.

AGRADECIMIENTOS

Sin el deseo de omitir a alguien quiero agradecer sinceramente a las siguientes personas:

Al Dr. Arturo Estrada Torres por ser mi director de tesis y un profesor que inspira seguir siempre hacia delante, pero ante todo por su amistad y cariño.

A la M. en C. Laura Hernández Cuevas por todo su apoyo, consejos y su increíble amistad.

Al Dr. Joaquín Cifuentes por sus valiosas aportaciones y su amable disponibilidad.

A las Dras. Judith Márquez y Clara Esquivel, así como a la Biol. Yolanda Ornelas por sus enseñanzas y todo el tiempo que me dedicaron en la realización de la estancia en la UNAM.

A las Dras. Mercedes Rodríguez y Mónica Montiel por sus acertados comentarios para mejorar la tesis.

A los investigadores y profesores Lupita Santiago, Gema Galindo, Adriana Montoya y Alejandro Kong, por su apoyo y por compartir sus conocimientos.

A mi papá y mi hermana que me brindaron una ayuda invaluable al cuidar a mi hija tiempo completo para que yo siguiera estudiando y durante el tiempo que me fui al D.F. Mil gracias.

A mi tía Rocío y mis primos Ana, Belén y Pedro por recibirme con mucho cariño y por compartir conmigo su casa, su espacio y su tiempo.

A mis tíos Jorge, Irma y Raúl por su apoyo, cariño y por estar siempre dispuestos para mi hija y para mí.

A mis compañeros de generación Leti, Vane y Fer por el apoyo que me brindaron; y de manera muy especial a Brenda y Claudia con quienes entable una amistad especial y compartimos tantos ratos locos y de singular diversión.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	01
2. ANTECEDENTES	03
2.1 Características generales	03
2.2 Ciclo de vida	04
2.3 Factores que influyen en su distribución	05
2.4 El género <i>Badhamia</i> : delimitación y problemas taxonómicos	07
2.5 Estabilidad de los caracteres morfológicos en Myxomycetes	08
2.6 Estudios de cultivo	09
2.7 Microscopia electrónica de transmisión y de barrido	13
3. PROBLEMA	16
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. PREGUNTAS	17
6. OBJETIVOS	18
6.1 Objetivo general	18
6.2 Objetivos particulares	18
7. METODOLOGÍA	18
7.1 Material biológico	18
7.2 Descripción macro y micro-morfológica de los especímenes	19
7.3 Cultivo de espora a espora	20

7.4 Procedimiento	21
7.5 Determinación de la estabilidad de los caracteres morfológicos	23
7.6 Microscopía electrónica de transmisión	23
7.7 Microscopía electrónica de barrido	26
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES	28
8.1 Caracteres morfológicos	28
8.2 Cultivo de espora a espora	31
8.3 Microscopía electrónica de transmisión	40
8.4 Microscopía electrónica de barrido	43
9. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE DE ESTUDIO	51
10. CONSIDERACIONES FINALES	55
11. CONCLUSIONES	57
12. RECOMENDACIONES	57
13. REFERENCIAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida	05
Figura 2. Cápsulas con LR-White	25
Figura 3. Cuchillas de vidrio	25
Figura 4. Ultra micrótomo	25
Figura 5. Cuchillas haciendo cortes	25
Figura 6. Rejillas de cobre preparadas con Fonvar	25
Figura 7. Material utilizado en la técnica uranilo-plomo	25
Figura 8. Esporocarpos en FAA	27
Figura 9. Muestras en microbarriles	27
Figura 10. Secadora Sandri 795	27
Figura 11. Montaje de esporocarpos	27
Figura 12. Ionizadora Geoli	27
Figura 13. Microscopio electrónico de barrido	27
Figura 14. Esporocarpo de <i>Badhamia</i> sp. TLXM-790	35
Figura 15. Esporas sobre placa de agar	35
Figura 16. Esporas libres de <i>B. melanospora</i>	35
Figura 17. Esporas agrupadas de <i>Badhamia</i> sp.	35
Figura 18. Germinación de esporas de <i>B. melanospora</i>	35
Figura 19. Mixamebas de <i>Badhamia</i> sp.	35
Figura 20. Células flageladas de <i>Badhamia</i> sp.	35

Figura 21. Células flageladas de <i>Badhamia</i> sp con flagelos	35
Figura 22. Mixamebas después de la reproducción asexual	35
Figura 23. Quistes de <i>B. melanospora</i>	35
Figura 24. Enjambres de <i>Badhamia</i> sp.	35
Figura 25. Plasmodio recién formado de <i>B. melanospora</i>	36
Figura 26. Plasmodio joven	36
Figura 27. Plasmodio joven con movimiento citoplásmico de <i>Badhamia</i> sp.	36
Figura 28. Plasmodio joven con frente de avance	36
Figura 29. Plasmodio maduro con frente de avance y venas	36
Figura 30. Plasmodio maduro con avena molida	36
Figura 31. Plasmodio maduro con venaciones	37
Figura 32. Plasmodio maduro ocupando el diámetro completo de la caja petri	37
Figura 33. Plasmodio formando agregaciones	37
Figura 34. Esporocarpos de <i>B. melanospora</i> sobre agar	37
Figura 35. Esporocarpo de <i>B. melanospora</i> madurando junto a plasmodio activo	37
Figura 36. Matraces de agar con abatelenguas	37
Figura 37. MET- Capa electrodensa de <i>B. capsulifera</i> 15000 X	42
Figura 38. MET- Unión entre pared esporal y espina de <i>B. capsulifera</i> 8000X	42
Figura 39. MET- Unión entre proyecciones de la ornamentación de <i>B. dubia</i> 8000X	42
Figura 40. MET- Proyección común a dos esporas de <i>B. dubia</i> 50000X	42
Figura 41. MET- Superficie espuesta de <i>Badhamia</i> sp. 20000 X	42
Figura 42. MET- Unión de tres esporas que comparten capa electrodensa 30000X	42

Figura 43. MEB- Estípites fusionados de <i>B. utricularis</i>	44
Figura 44. MEB- Esporoteca piriforme de <i>B. utricularis</i>	44
Figura 45. MEB- Esporoteca subglobosa de <i>Badhamia</i> sp.	44
Figura 46. MEB- Esporoteca obovada de <i>Badhamia</i> sp.	44
Figura 47. MEB- Esferas de carbonato de calcio del peridio de <i>B. utricularis</i>	45
Figura 48. MEB- Esferas de carbonato de calcio fusionadas de <i>B. utricularis</i>	45
Figura 49. MEB- Impresiones de las esporas en el peridio de <i>B. utricularis</i>	45
Figura 50. MEB- Doble capa del peridio y proyecciones en <i>Badhamia</i> sp.	45
Figura 51. MEB- Doble capa del peridio en <i>Badhamia</i> sp.	45
Figura 52. MEB- Proyecciones del peridio	45
Figura 53. MEB- Red abierta de capilicio de <i>B. capsulifera</i>	46
Figura 54. MEB- Filamentos del capilicio de <i>B. capsulifera</i>	46
Figura 55. MEB- Gránulos de carbonato de calcio de en capilicio de <i>B. utricularis</i>	46
Figura 56. MEB- Red de capilicio de <i>B. utricularis</i>	46
Figura 57. MEB- Gránulos de carbonato de calcio de <i>Badhamia</i> sp.	46
Figura 58. MEB. Red muy cerrada y filamentos finos de <i>Badhamia</i> sp.	46
Figura 59. MEB- Grupos de esporas de <i>B. capsulifera</i>	48
Figura 60. MEB- Esporas libres de <i>B. capsulifera</i>	48
Figura 61. MEB- Ápice de espinas en forma de roseta de <i>B. capsulifera</i>	48
Figura 62. MEB- Espora libre de <i>B. dubia</i>	48
Figura 63. MEB- Esporas agrupadas de <i>B. utricularis</i>	49
Figura 64. MEB- Protoplasto dentro de espora	49

Figura 65. MEB- Esporas libres de <i>B. utricularis</i>	49
Figura 66. MEB- Espinas capitadas en <i>B. utricularis</i>	49
Figura 67. MEB- Grupos de esporas fuertemente unidas de <i>Badhamia</i> sp.	50
Figura 68. MEB- Esporas con espinas formando costillas en <i>Badhamia</i> sp.	50
Figura 69. MEB- Ornamentación de esporas de <i>Badhamia</i> sp.	50
Figura 70. MEB- Ápices bifurcados en <i>Badhamia</i> sp.	50
Figura 71. Esporocarpos iridiscentes de <i>Badhamia</i> sp.	52
Figura 72. Dehiscencia apical de <i>Badhamia</i> sp.	52
Figura 73. Esporoteca, capilicio y esporas de <i>Badhamia</i> sp. en MEB	52
Figura 74. Peridio doble ornamentado de <i>Badhamia</i> sp. en MEB	52
Figura 75. Capilicio expuesto de <i>Badhamia</i> sp.	53
Figura 76. Filamentos del capilicio de en contraste interferencial de Nomarski	53
Figura 77. Red del capilicio de <i>Badhamia</i> sp.	53
Figura 78. Filamentos del capilicio con gránulos de carbonato de calcio	53
Figura 79. Grupo de esporas de <i>Badhamia</i> sp. en microscopía de campo claro	54
Figura 80. Grupo de esporas de <i>Badhamia</i> sp. en MEB	54
Figura 81. Pared de las esporas de <i>Badhamia</i> sp. en MET	54
Figura 82. Capa interna de la pared esporal de <i>Badhamia</i> sp. en MET	54

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Localidades y tipos de vegetación de los ejemplares considerados en el estudio	19
Cuadro 2. Medios de cultivo	20
Cuadro 3. Comparación de las estructuras de las cuatro especies	29
Cuadro 4. Comparación de las características en el desarrollo de <i>Badhamia</i> sp. y <i>B. melanospora</i>	39

RESUMEN.

Los Myxomycetes son organismos ubicados dentro del Reino Protista de los que se reconocen cerca de 1000 especies agrupadas morfológicamente en cinco órdenes, siendo el de los Physarales el más numeroso. A éste pertenece el género *Badhamia* que cuenta con 30 especies reconocidas, con esporas tanto agrupadas como libres y con un capilicio completamente calcificado.

En el género existen problemas en cuanto a la circunscripción de las especies, ya que muchas de ellas poseen características que se sobrelapan. Tal es el caso de un taxón recolectado en los bosques de *Alnus* y *Juniperus* en tres localidades diferentes de los estados de Hidalgo y Tlaxcala; éste presenta caracteres constantes que la asemejan con *Badhamia utricularis* como son el peridio iridiscente y membranáceo, las esporas agrupadas, las esporotecas ovoides, en racimos y con estípites membranáceos, pero con otras características que la diferencian de dicha especie como el capilicio que forma una red muy cerrada con filamentos delgados, las esporas fuertemente agrupadas con espinas muy grandes y los estípites muy delgados y largos.

Por lo anterior, se hace necesario implementar otras técnicas complementarias al análisis de los caracteres macro y micromorfológicos, que permitan dar evidencias adicionales sobre la identidad de esta especie. Particularmente, en este estudio se utilizaron: a) el cultivo de espора a espора, a través del cual se puede conocer el ciclo de vida de los organismos y las variaciones intra- e interespecíficas que se dan bajo condiciones de cultivo controlado y, b) el uso de microscopía electrónica de transmisión y de barrido, que permiten la observación de la ultraestructura de los organismos, facilitando la comparación con especies morfológicamente similares.

En el cultivo de espора a espора se pudo observar la germinación, la presencia de mixamebas y células flageladas, así como la formación y crecimiento de los plasmodios; registrándose los cambios en cada fase. También se hicieron preparaciones de esporocarpos de la especie en estudio, así como de especies similares como *Badhamia utricularis*, *B. capsulifera* y *B. dubia*. Con

este material, se obtuvieron 32 fotografías en el microscopio electrónico de transmisión y 143 en el de barrido. En éstas se observó la estructura de la unión de las esporas de las diferentes especies, hasta las estructuras de los esporocarpos y la ornamentación de las esporas.

Al comparar las estructuras de las cuatro especies, se llegó a la conclusión de que la especie bajo estudio representa un nuevo taxón, cuyos caracteres más sobresalientes son: *i)* las esporas fuertemente agrupadas, con una ornamentación con espinas que alcanzan hasta 2-2.5 μm de largo hacia la superficie expuesta y verrugas hacia los puntos de unión con las otras esporas, *ii)* un capilicio completamente calcificado con una red muy cerrada, y *iii)* una doble capa peridial. Se realizó la descripción completa de la especie y de los cambios que se presentaron durante su ciclo de vida.

1. INTRODUCCIÓN.

El conocimiento de la biodiversidad es un asunto de gran importancia para la conservación del planeta. En ese sentido, México se ubica en el cuarto lugar entre los países con mayor diversidad biológica, condición que lo coloca en un sitio ideal para estudios enfocados a conocer dicha diversidad (Flores-Villela y Gerez, 1994). Al respecto, algunos organismos han recibido mayor atención debido a que son fuente de alimento, medicamentos y proporcionan diversos servicios, pero existen otros de los cuales su conocimiento es aún pobre o casi nulo (Chacón y Guzmán, 1984). Grupos como plantas y vertebrados han sido relativamente bien estudiados (Toledo, 1988) y otros como los Myxomycetes, que son organismos adscritos al reino Protista (Stephenson, 1986, Olive, 1970), apenas han sido considerados en la exploración de nuestra riqueza biológica. La importancia de estos organismos radica en que: a) participan activamente en las cadenas tróficas del suelo, en donde se alimentan de grandes cantidades de bacterias, levaduras u otros hongos presentes en los ecosistemas terrestres, lo que los hace particularmente abundantes en zonas boscosas (Stephenson y Stempen, 1994); b) son bioindicadores, ya que en su mayoría son organismos sensibles a las condiciones ambientales así como a sus alteraciones y deterioro, por lo que en ambientes perturbados son escasos (Setälä y Nuorteva, 1989) y, c) son de utilidad en el campo de la investigación sobre el control de la mitosis y los procesos cancerígenos al servir de modelo de estudio en la división de núcleos (Collins, 1979).

Los mohos mucilaginosos, como también son llamados, presentan nutrición holozoica, con un ciclo de vida complejo, ya que en la primera fase de este ciclo son organismos unicelulares que forman células ameboflageladas, en la segunda, forman una masa mucilaginosa multinucleada y móvil llamada plasmodio y, la tercera es la fase propagativa en la que forman los esporóforos que contienen las esporas con las que se comenzará nuevamente el ciclo (Martín y Alexopoulos, 1969).

Existen cerca de 1000 especies descritas que se agrupan en cinco órdenes reconocidos: Echinosteliales, Liceales, Physarales, Stemonitales y Trichiales (Martín y cols., 1983). Aunque hay acuerdo en el reconocimiento de estos órdenes, existen numerosos problemas taxonómicos al interior de cada uno de ellos en niveles taxonómicos poco inclusivos, como

familias, géneros y especies, debido entre otros factores al descubrimiento de nuevas especies o a la reubicación de algunas taxa cuyos caracteres son reinterpretados al obtenerse mayor información con el uso de herramientas como el cultivo de espora a espora, la microscopía electrónica y la obtención de secuencias génicas.

Hasta ahora, la delimitación taxonómica de los Myxomycetes se ha hecho considerando las características morfológicas de sus estructuras reproductoras maduras (Blackwell y Alexopoulos, 1975), ya que se ha considerado muestran características relativamente constantes (Clark y cols., 2003). Sin embargo, las variaciones ambientales favorecen la formación de diferentes fenotipos que pueden conducir a la elaboración de descripciones poco precisas, que dificultan la circunscripción de las especies (Schnittler y Mitchel, 2000). Debido a esto, la descripción de nuevas especies debe basarse en una observación detallada de sus estructuras, un análisis crítico de sus caracteres distintivos a través de la comparación con las especies afines previamente descritas y la confirmación de la estabilidad de sus caracteres diagnósticos.

Una alternativa para resolver esta problemática es la de emplear cultivos de espora a espora para observar las variaciones intra- e inter-específicas, así como definir caracteres estables independientes de las condiciones de cultivo, que permitan delimitar con precisión la identidad de los organismos estudiados. Entre los caracteres que han mostrado dicha cualidad en algunas especies de Myxomycetes están el tamaño de las esporas y sus patrones de ornamentación (Keller y Schoknecht, 1989a).

Otras técnicas que ayudan a delimitar caracteres útiles para una definición más precisa de las especies son la microscopía electrónica de transmisión y la de barrido, mismas que permiten la observación del detalle de las estructuras del esporocarpio (Stephenson y Moreno, 2006).

De esta manera, mientras que el cultivo controlado de las especies permite el conocimiento del ciclo de vida y el análisis de la variación de los caracteres morfológicos bajo diferentes condiciones y a través de diferentes generaciones, la aplicación de técnicas microscópicas para la observación de los caracteres bajo microscopía de luz, así como el uso de

microscopía electrónica de transmisión y de barrido permitirán describir con mayor detalle dichas variaciones, dando evidencias sólidas para definir si una especie corresponde o no con las previamente descritas.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Características generales.

Los Myxomycetes son organismos eucariotas clasificados de acuerdo con Cavalier-Smith (1998) en el Reino Protozoa, Subreino Neozoa, Infrareino Sarcomastigota, Phylum Amoebozoa, Subphylum Conosa, Infraphylum Mycetozoa, Superclase Eumyxa, Clase Myxomycota, Subclase Myxogastria. Comprenden cinco órdenes: Liceales, Echinosteliales, Trichiales, Stemonitales y Physarales.

Estos organismos carecen de pared celular en las dos primeras fases de su ciclo de vida, son aerobios y la mayoría de las especies viven sobre materia orgánica en descomposición como madera, hojas, frutos y excrementos de animales, así como en suelos ricos en humus; su nutrición es holozoica y fagotrófica, por lo que ingieren otros organismos como bacterias y levaduras, las cuales engloban por medio de pseudópodos, que absorben directamente las sustancias que toman del medio (Cohen, 1941); por las características de las fases vegetativas o tróficas, los Myxomycetes recuerdan a los protozoarios, pero en las fases reproductivas se asemejan a los hongos, pues forman esporas con pared celular que en este caso están constituidas por polímeros de galactosamina (Chapman y cols., 1983). Desarrollan esporocarpos cuya morfología es particular para cada especie, siendo ésta la suma de muchos caracteres (Macbride y Martin, 1934). Estas estructuras generalmente corresponden con esporocarpos y son análogas a las fases esporulativas de muchos hongos verdaderos. No obstante, sus relaciones filogenéticas indican que no tienen parentesco directo con ellos y que su semejanza en apariencia se debe a una evolución convergente (Ing, 1994).

2.2 Ciclo de vida.

Los Myxomycetes son organismos acelulares y de vida libre durante las primeras fases de su existencia. Presentan tres etapas en su ciclo de vida, que comienza con la germinación de las esporas (Fig. 1), que al haber encontrado las condiciones favorables se hinchan y permiten la emergencia de células ameboides, que dependiendo del grado de humedad podrán ser mixamebas o células flageladas. Éstas se alimentan de protozoarios, esporas de hongos y bacterias. En esta etapa pueden presentar además reproducción asexual por fisión binaria (Alexopoulos, 1960) o pueden enquistarse si las condiciones no son favorables.

A través de un proceso de plasmogamia y posterior cariogamia, las mixamebas fusionadas se transforman en el cigoto que dividirá su núcleo por medio de un proceso de mitosis, formando una célula multinucleada que dará lugar a la segunda fase: la plasmodial o asimilativa. Ésta crece formando masas mucilaginosas móviles que también pueden presentar reproducción asexual por plasmotomía o fragmentación del plasmodio. Si las condiciones son adecuadas, el plasmodio madura para formar la tercera fase del ciclo o fase propagativa, constituida por los esporocarpos, estructuras reproductivas que contienen la masa de esporas cubiertas por una membrana simple o compleja (Martin y Alexopoulos, 1969), con lo que se comenzará el ciclo nuevamente. Si las condiciones ambientales no son favorables para el plasmodio, se formará un esclerocio o estructura de resistencia, que restituirá el plasmodio si el medio se torna nuevamente favorable (Lado y Pando, 1997). En la tercera fase que es la propagativa, se forman los esporocarpos.

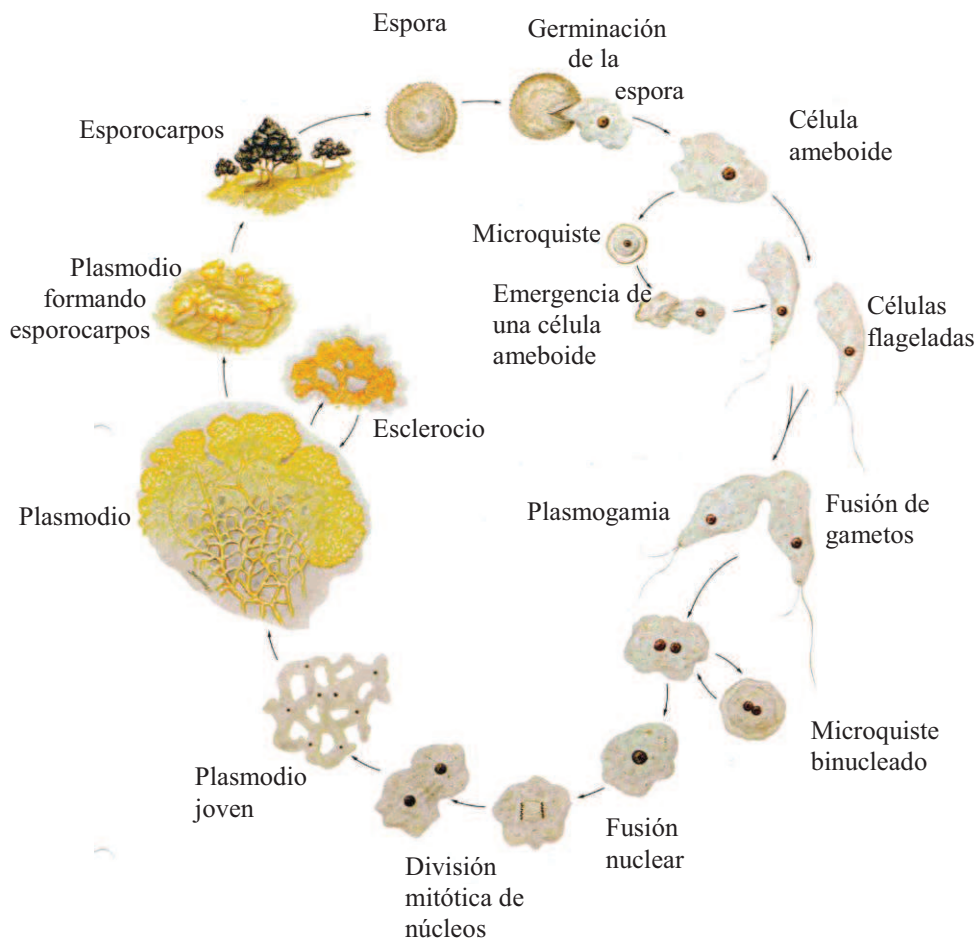


Fig. 1. Ciclo de vida (tomado de Carolina Biological Supply Company, 1979).

2.3 Factores que influyen en su distribución.

Los Myxomycetes son organismos que dependen de las condiciones ambientales para su dispersión y para poder así continuar con su ciclo de vida (Lakhanpal y Mukerjii, 1981). La humedad ambiental, así como la capacidad de retención de agua de los sustratos es primordial para la propagación de estos organismos, lo que depende a su vez del estado en que se encuentra la vegetación donde crecen, de que tan degradada se encuentra (Stephenson y cols. 1993).

El primer estudio ecológico en el que se trató de analizar el hábitat de los Myxomycetes fue el realizado por Lister en 1918 (Lister, 1925). Desde entonces se ha observado que las

fases plasmodial y de mixamebas requieren de materia vegetal en descomposición para su desarrollo, por lo que la presencia de sustratos orgánicos en los diferentes ecosistemas es de gran importancia para su desarrollo y distribución (Martin y Alexopoulos, 1969; Farr, 1976; Stephenson y Studlar, 1985).

La preferencia de algunos Myxomycetes por ciertos sustratos se debe a su capacidad para retener humedad; los Myxomycetes de biomasa elevada que generalmente forman etalios o pseudoetalios como *Tubifera* prefieren sustratos diferentes a los de esporocarpos sésiles o plasmodiocárpicos (García, 1981).

Los Myxomycetes se encuentran en diversos ecosistemas terrestres, desde ambientes húmedos hasta zonas desérticas (Evenson, 1961; Ramon, 1968; Blackwell y Gilbertson, 1981; 1984), tundra (Stephenson y Laursen, 1993) y en lugares pantanosos (Martin y cols. 1983); así como en una amplia variedad de hábitats; los hay corticícolas, lignícolas, fimícolas, folícolas, muscícolas y fungícolas. Todos estos ambientes presentan algo en común: el tejido en descomposición de plantas o animales que proveen un micro hábitat ideal para que los Myxomycetes se puedan establecer (Martin y Alexopoulos, 1976)

Existe un grupo muy peculiar de Myxomycetes que crece en zonas de nieve a los que se les llama quionófilos. Éstos requieren condiciones ambientales concretas, ya que los plasmodios se mantienen en esta fase durante el invierno o mientras el sustrato se conserva por debajo de la nieve. Al comenzar el deshielo es cuando comienza la fase de esporulación (García, 1986).

Por el contrario, los Myxomycetes de zonas áridas pueden permanecer durante largo tiempo esperando las condiciones de humedad necesarias para su reproducción; esto se ha probado al utilizar sustratos recolectados en campo, aparentemente infértiles, pero que al darles las condiciones necesarias en laboratorio producen plasmodios que esporulan normalmente (Blackwell y Gilbertson, 1984).

La verdadera actividad de los Myxomycetes está relacionada con su alimentación, es decir, la actividad de las células mixoflageladas, las mixamebas y el plasmodio, ya que al

alimentarse de las bacterias que están en el suelo controlan sus poblaciones evitando que lleguen a ser nocivas en ese microambiente; sin embargo, debido a los hábitos que presentan, los estudios con las fases vegetativas son escasos y sólo la fase esporocárpica es la que se ha utilizado para la determinación de las especies y para estudios ecológicos. Así, los Myxomycetes presentan una amplia distribución en la naturaleza y juegan un papel muy importante dentro de los ecosistemas terrestres (Herrera y Ulloa, 1990).

2.4 El género *Badhamia*: Delimitación y problemas taxonómicos.

De las casi 1000 especies de Myxomycetes descritas, aproximadamente 253 se adscriben al orden Physarales (Lado, 2001). Las especies ubicadas en este orden se caracterizan por presentar carbonato de calcio en alguna de sus estructuras, principalmente en peridio y capilicio, salvo en el género *Elaeomyxa*, en donde se presentan gúttulas cerosas en cualquiera de sus estructuras (Martín y cols., 1983).

Este orden se divide en tres familias: Physaraceae, Didymiaceae y Elaeomyxaceae. La primera se caracteriza por presentar un capilicio total o parcialmente calcáreo y carbonato de calcio en el peridio en forma de gránulos no cristalinos; en Didymiaceae el capilicio no es calcáreo y el carbonato de calcio es cristalino o granular; en Elaeomyxaceae no se presenta carbonato de calcio, encontrándose en su lugar gúttulas de apariencia cerosa (Aldrich y Daniel, 1982).

Para la familia Physaraceae se reconocen los géneros *Badhamia*, *Badhamiopsis*, *Craterium*, *Fuligo*, *Leocarpus*, *Physarella*, *Physarum*, *Protophysarum* y *Willkommlangea*. Algunos de estos géneros están bien delimitados, pero la circunscripción de otros parece ser poco clara (Águila, 2008). Éste es el caso del género *Badhamia*, el cual fue descrito por Berkeley en 1853 (citado por Carter y Nannenga-Bremekamp, 1972), incluyendo en él a un grupo de especies previamente ubicadas dentro del género *Physarum*, que diferían de las demás por tener esporas agrupadas y un capilicio en forma de una red tridimensional con túbulos completamente calcificados. Estas especies fueron *Physarum hyalinum* (ahora considerada sinónimo de *B. capsulifera*) y *Physarum utricularare* (sinónimo de *B. utricularis*). *Badhamia capsulifera* se constituyó como la especie tipo.

El concepto de *Badhamia* fue ampliado posteriormente por Rostafinski en 1874 (citado por Carter y Nannenga-Bremekamp, 1972) para incluir especies con esporas libres pero con un capilicio badhamioide, es decir, fuertemente calcificado, como en los casos de *B. affinis* y *B. panicea*. Así, en la actualidad se ha caracterizado a *Badhamia* por presentar un capilicio en forma de red formada por tubos completamente calcificados (badhamioide), aunque también pueden presentarse especies con un capilicio intermedio entre las formas badhamioide y fisaroide (es decir, no totalmente calcáreo) y en algunas otras especies existe toda una variación entre estos dos tipos de capilicio, razón por la cual la frontera que divide a los géneros *Badhamia* y *Physarum* ha sido frecuentemente cuestionada por autores como Farr (1961), Gottsberger (1971), Carter y Nannenga-Bremekamp (1972), Mitchell y Nannenga-Bremekamp (1976) y Johansen y cols. (2002).

Actualmente, se reconocen 30 especies en el género *Badhamia* (Lado, 2001). No obstante, los dos caracteres diagnósticos del género (esporas agrupadas y capilicio totalmente calcificado), muestran variaciones aún dentro de la misma especie, lo que ha contribuido a que existan límites poco claros en la circunscripción de algunos taxones. Tal es el caso de *B. utricularis*, en la que se han citado desde esporas formando grupos compactos, hasta fácilmente disgregables y con numerosas esporas libres (Martin y Alexopoulos, 1969; Farr, 1976).

2.5 Estabilidad de los caracteres morfológicos en Myxomycetes.

En general, los caracteres morfológicos del esporocarpio pueden presentar un alto grado de plasticidad. Macbride (1889) ya había señalado que en algunos ejemplares de *Physarum pusillum* el capilicio era fuertemente calcáreo (tipo badhamioide), mientras que en otros estaba constituido por bandas sin carbonato.

Smart (1938a) señaló que las esporas son de los pocos elementos que presentan mayor estabilidad, no obstante, en algunas especies también se ha observado variación en cuanto a su tamaño y ornamentación cuando se modifican las condiciones de cultivo.

Se conoce poco sobre los factores que afectan la morfología de las fases esporulativas, sin embargo, se ha observado que la humedad ambiental y de los sustratos influye fuertemente en el desarrollo normal de los esporocarpos; así, el grado de humedad puede afectar características de diferentes estructuras como la longitud del estípite, la forma del esporocarpo o la cantidad de carbonato que se deposita en el peridio (Keller y Schoknecht, 1989b).

En este sentido, Gray (1961) observó que las fructificaciones de *Ph. flavicomum* presentaron abundantes depósitos de carbonato de calcio en el peridio bajo condiciones de alta humedad, pero prácticamente carecían de este elemento en condiciones de sequía.

De manera similar, Buyck (1988) observó que tanto en el género *Diderma* como en *Didymium*, las condiciones micro-climáticas prevalecientes durante el tiempo de fructificación jugaban un papel importante para determinar la forma final de los esporocarpos, su número y la cantidad de limo que en ellos se depositaba. Así mismo, observó que el sol y el viento influyeron en el desarrollo de los esporocarpos de *D. hemisphaericum*, con lo que se pueden formar esporocarpos con un peridio firme y grueso en condiciones normales, o casi carente si las condiciones son adversas. También señaló que los plasmodios que se desarrollaban por debajo de la hojarasca, formaban cuerpos fructíferos con escaso limo que se destruye rápidamente y estípites a veces fusionados, que dejan en la base una costra de limo.

De esta forma, se evidencia que algunos caracteres de los esporocarpos de ciertas especies son más estables que otros bajo diferentes condiciones, mientras que los mismos caracteres pueden ser altamente variables en otras especies.

2.6 Estudios de cultivo:

a) En medios artificiales.

En los primeros estudios sobre el cultivo de estos organismos, se trataba de establecer el método óptimo para la germinación, así como identificar el medio más apropiado para su desarrollo, el tipo de alimento que requerían, el efecto de la temperatura y de otros

factores. Por ejemplo, Gilbert (1928, 1929) realizó un estudio de los factores que influyen en la germinación de las esporas, comparando los porcentajes de germinación entre distintas especies, con lo que concluyó que la capacidad de germinación varía marcadamente entre distintas familias. También Smart (1938a) mencionó que los porcentajes y tiempos de germinación de las esporas variaban según la especie y el medio en dónde éstas se encontraran.

En un estudio con *Fuligo septica*, *Enteridium rozaceum* y *Reticularia lycoperdon*, Smart (1938b) observó que las mixamebas en cultivo tienen una actividad normal entre los 27° y 34°C, pero entran en latencia por arriba de estos valores, con lo que corroboró que la temperatura es un factor que tiene gran influencia en la actividad protoplásmica y en la germinación de las esporas.

En lo que se refiere a la alimentación, Harris y Kalyanasundaram (1983) probaron seis diferentes especies y tres medios de cultivo y demostraron que el medio a base de avena fue en el que mejor se desarrollaron los plasmodios. La asociación entre Myxomycetes y bacterias no resultó específica entre especies, pero cabe resaltar que todas las bacterias aisladas en este estudio fueron Gram negativas (Harris y Kalyanasundaram, 1983).

Se ha observado además que los plasmodios pueden ser fagotróficos y osmotróficos, por lo que lo mejor para la nutrición de los Myxomycetes son las bacterias y los nutrientes que asimilan del medio (Sanjida y Kalyanasundaram, 1983). En laboratorio se han obtenido mejores resultados en medios nutritivos semilíquidos como el de leche de coco, lo que se relacionó con el tiempo en que los Myxomycetes se mantuvieron en etapa de mixamebas y plasmodios. Se concluyó que las esporas provenientes de un esporocarpo con más de tres meses de haber fructificado requieren necesariamente de un medio semilíquido (Kalyanasundaram y Venkataramani, 1974).

Otros de los procesos que se han podido observar gracias al cultivo de Myxomycetes en un medio artificial, es el desarrollo de los plasmodios y las diferencias que éstos pueden presentar; tal es el caso de los plasmodios de los Trichiales y los Stemonitales

(afanoplasmodios). De manera particular *Trichia arundinariae* presenta una transición de un afanoplasmodio a un faneroplasmodio (Rammeloo, 1976).

b) Cultivos de espora a espora.

Dado que los caracteres taxonómicos pueden variar considerablemente bajo diferentes condiciones ambientales, sustratos y áreas geográficas; los cultivos de espora a espora permiten observar tanto las variaciones intra-específicas, como las inter-específicas, lo que facilita la resolución de problemas taxonómicos a diferentes niveles.

Wollman y Alexopoulos (1964) lograron buenos resultados en el cultivo de tres especies que no pertenecen a los Physarales, obteniendo en cultivo de espora a espora el ciclo de vida completo de *Comatricha laxa*, *Perichaena depressa* y *Licea biforis* en un medio con harina de maíz, agar y un extracto de corteza de *Quercus fusiformis*, en el que se adicionaban además *Flavobacterium* o *Aereobacter aerogenes*.

El género *Perichaena* es un ejemplo en el que los cultivos de espora a espora se han utilizado para resolver problemas taxonómicos. *Perichaena depressa* y *P. quadrata* son especies morfológicamente similares, ocupan los mismos hábitats y ocasionalmente forman esporocarpos en los mismos sitios. Ambas especies fueron consideradas con-específicas durante mucho tiempo (Martin y Alexopoulos, 1969). Schoknecht y Keller (1977) validaron estos dos taxa a través del cultivo de espora a espora, con lo que observaron la estabilidad de algunos de sus caracteres microscópicos y otros que marcaban diferencias entre ambas especies como el hábito aplanado-depresado de *P. depressa*, y el agregado de *P. quadrata*. Además, *P. depressa* puede desarrollar esporocarpos blancos debido a la deposición de materia cristalina blanca (oxalato de calcio) y en *P. quadrata* nunca se presenta esta característica. Los cultivos se realizaron durante tres generaciones y estas características fueron estables de una generación a otra.

Keller y Schoknecht (1989c) realizaron cultivos de espora a espora de *Didymium annulisporum* y observaron que el tipo de sustrato tenía un marcado efecto sobre el contenido calcáreo de sus esporocarpos. Asimismo, observaron que el CaCO₃ fue más

escaso en los esporocarpos que se encontraban en la superficie del agar que en aquéllos desarrollados sobre sustratos naturales. También se presentaron variaciones en las dimensiones de los esporocarpos, dependiendo del medio, con la formación de plasmodiocarpos algunas veces o el predominio de formas esporocárpicas en otras ocasiones. Sin embargo, nunca se encontraron diferencias en el tamaño o en los patrones de ornamentación de las esporas, por lo que concluyeron que estos últimos caracteres se podían utilizar con confianza al ser caracteres taxonómicos estables en esta especie.

Clark y cols., (1990) realizaron diferentes pruebas de cultivos de espora a espora para determinar el medio óptimo para el desarrollo de *Stemonitis flavogenita* y observaron que su crecimiento fue diferente de acuerdo con el medio donde los esporocarpos se desarrollaron.

Muchas especies descritas recientemente se han cultivado mediante esta técnica. Entre ellas se pueden mencionar a *Didymium umbilicatum* (Wrigley de Basanta y cols. 2008), *D. infundibuliforme* (Wrigley de Basanta y cols. 2009) y *D. wildpretii* (Lado y cols. 2007). Wrigley de Basanta y Haskins (2008) han enfatizado la necesidad de obtener los cultivos de las especies tanto para su descripción, como para obtener material en colecciones de germoplasma que se utilice para estudios diversos en el futuro.

En el caso particular del género *Badhamia*, el cultivo también ha sido relevante en la resolución de algunos problemas taxonómicos. Por ejemplo, Keller y Schoknecht (1989a) transfirieron a *Physarum spinisporum* al género *Badhamia* argumentando que el capilicio poco calcáreo que tenían las colecciones en las que se basaron Eliasson y Lundqvist (1979 citado por Keller y Schoknecht, 1989a), se debía a que los esporocarpos se encontraban en un estado inmaduro. Sus conclusiones se basaron en cultivos de espora a espora y en observaciones de microscopía electrónica de barrido. En este trabajo, los autores pudieron identificar los caracteres que definen a *Ph. spinisporum*, obteniendo fructificaciones que crecieron sobre estiércol estéril de vaca y agar, en las que se pudo determinar el tamaño y ornamentación de las esporas, así como las características del capilicio, lo que los llevó a reubicarlo como *Badhamia spinospora* (Keller y Schoknecht, 1989a).

Con la técnica de cultivo de espora a espora también se definió que *Badhamia rhytidosperma* presenta caracteres similares a los de *B. spinospora*, pero que la ornamentación de sus esporas presenta crestas que forman una red sobre toda la superficie (Keller y Schoknecht, 1989b). Los autores observaron que el tamaño y ornamentación de las esporas se mantuvieron estables a través de varias generaciones, además de que las formas de la fructificaciones en cultivo eran igual que las encontradas en campo, aunque variaban un poco en cuanto a su tamaño.

Badhamia gracilis (antes *B. melanospora*) es una especie fácil de cultivar y de las que se tiene una descripción completa de su ciclo de vida con la obtención de esporas viables por lo que se ha utilizado con frecuencia para estandarizar la técnica de cultivo de espora a espora (Liu, 1990).

A pesar de ser una técnica bastante confiable, sólo el 10% de las especies conocidas de Myxomycetes se han logrado obtener en cultivos de espora a espora (Wrigley de Basanta y Haskins, 2008). De éstas, sólo 20 especies han producido estados ameboides, 16 de las cuales pertenecen al orden de los Physarales (Clark y cols., 1990). Para el caso de *Badhamia*, se han podido cultivar *Badhamia spinosporum*, *B. rhytidosperma* (Keller & Schoknecht, 1989 a; 1989 b) y *B. gracilis* (Clark y cols. 2003). No obstante, autores como Keller y Everhart (2008) recomiendan que antes de describir una especie nueva, debe de intentarse su cultivo, ya que se debe de considerar que el futuro de la Sistemática de Myxomycetes requiere un cambio en la taxonomía descriptiva con estudios de mayor profundidad que incluyan, entre otras cosas, el cultivo de los organismos (Keller y Everhart, 2008).

2.7 Microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

Mientras que el cultivo controlado de las especies permite el conocimiento del ciclo de vida y el análisis de la estabilidad de los caracteres morfológicos, bajo diferentes condiciones y a través de diferentes generaciones, el uso de la microscopía electrónica de transmisión y de barrido permiten observar y describir con mayor detalle dichos caracteres,

dando evidencias sólidas para definir si una especie corresponde o no con las especies previamente descritas.

Entre los estudios que han utilizado la microscopía electrónica de transmisión se encuentra el de Yang (1970), quien seccionó esporas y plasmodios de *Reticularia lycoperdon* para estudiar y describir sus organelos. Las mitocondrias resultaron de particular interés por la claridad con la que aparecen en las fotografías, tanto en esporas como en plasmodios. Por su parte, Mims (1971) ha dado evidencias del contenido celular de las esporas de *Arcyria cinerea*, en las cuales se han podido observar ribosomas, mitocondrias, retículo endoplásmico y vacuolas, encontrando además polisacáridos y numerosas moléculas de lípidos, con la peculiaridad que pudo observar la ultraestructura de las diferentes etapas de la germinación de la spora y la emergencia de la mixameba o célula flagelada.

Para el caso de *Physarum ploycephalum* se examinaron en el microscopio electrónico de transmisión esporas en distintos estados de desarrollo. Se observó la ornamentación espinulosa, algunos organelos y una porción de los esporocarpos; siendo de particular interés las observaciones hechas a las esporas en distintos estados de mitosis celular (Randall y Lynch, 1974).

Demaree y Kowalski (1975) realizaron un estudio de microscopía electrónica de transmisión en especies con esporas agrupadas para determinar el mecanismo que las mantiene unidas. Las especies que se utilizaron fueron *Dianema corticatum*, *Trichia synsporum*, *Badhamia nitens*, *B. versicolor* y *Physarum bogoriense*, quedando claro que existen diferentes grados y mecanismos de unión entre las esporas. Hay las que prácticamente comparten la pared de las esporas, otras en las que parece existir una sustancia cementante que las mantiene unidas, unas más en las que la unión se da entre la pared de la spora y la ornamentación y finalmente las especies con esporas que se separan fácilmente ya que el punto de unión es entre las espigas de la ornamentación de esporas contiguas.

Gaither (1976) observó la ultra-estructura del pseudocapilicio y de las esporas de *Lycogala epidendrum* a través del microscopio electrónico de transmisión. Determinó que el

pseudocapilicio está formado por bandas que alternan con regiones no ornamentadas. Por su parte, Eliasson (1981) pudo corroborar con el microscopio electrónico de transmisión que existen notorias diferencias en el peridio de las fructificaciones maduras de especies de *Lycogala* y *Reticularia*. Asimismo, Gilert (1987) observó la morfología y ultra-estructura de *Licea variabilis* y *L. retiformis* y definió que presentan diferencias en el peridio, así como en la ornamentación y estructura interna de las esporas, con lo que demostró que correspondían con especies diferentes.

Keller y cols. (1988) determinaron las diferencias existentes entre *Cribraria minutissima* y *C. confusa* al observarlas en microscopía electrónica de barrido, con lo que se terminó la discusión de su posible con-especificidad. Con la ayuda del microscopio electrónico de barrido, también fue posible notar en el caso de *Trichia perichaenoides*, especie que se desarrolla sobre suculentas que habitan las Islas Canarias, España y México, algunos caracteres como las espirales espinosas de los elaterios del capilicio que la diferencian de *Perichaena corticolis*, especie con hábito muy similar (Mosquera y cols., 2000).

Los estudios de microscopía electrónica se han convertido en una herramienta muy útil en la descripción y ubicación de nuevas especies de Myxomycetes, como en el caso de *Cribraria fragilis* que presenta esporas con un arreglo de bandas longitudinales lisas, y *Diderma acanthosporum* que tiene una combinación única de caracteres como fructificaciones pseudoetaloides con esporocarpos estipitados y esporotecas depresas, peridio externo calcáreo y esporas con espinas bifurcadas muy largas (Estrada-Torres y cols., 2001).

Asimismo, *Calonema foliicola* fue descrita y considerada como una nueva especie por Estrada-Torres *et al.* (2003) pero su ubicación en el género *Calonema* fue apoyada por el uso de la electro microscopía, ya que sus características más relevantes fueron el capilicio ornamentado con un retículo con bandas que se arreglan espiralmente y un cálculo con un retículo irregular, de manera similar a lo encontrado en la especie tipo del género, *C. aureum*.

La microscopía electrónica, conjuntamente con el análisis de secuencias del ADN de *Schenella simplex*, un organismo descrito como un Myxomycete a principios del siglo XX, hicieron posible definir su correcta ubicación taxonómica dentro de los gasteromicetos (Estrada-Torres y cols., 2005).

En la descripción e ilustración de nuevas especies, la microscopía electrónica de barrido (MEB) se ha convertido en una herramienta indispensable, como en el caso de *Macbrideola herrerae* en la que se comentan sus diferencias con miembros de los géneros *Comatricha*, *Enerthenema*, *Macbrideola* y *Paradiacheopsis* (Lizárraga y cols., 2006), o en el de *Macbrideola lamprodermoides* en donde quedaron expuestas sus diferencias con respecto a *M. scintillans*, *M. cornea*, *M. oblonga* y *M. ovoidea* y con miembros de los géneros *Comatricha* y *Lamproderma* (Moreno y cols., 2006). Otros ejemplos más en los que se ha utilizado la MEB para resaltar caracteres diferenciales como la ornamentación de las esporas son *D. macquariense* (Stephenson y Moreno, 2006), *D. wildpretii* (Lado y cols., 2007), *Perichaena heterospinisporum* y *P. polygonospora* (Novozhilov y cols., 2008), *Cribraria tecta* (Van Hooff, 2009), *D. tehuacanense* y *P. stipata* (Estrada-Torres y cols., 2009), *Lamproderma magniretisporum* (Moreno y cols., 2009) y *P. calongei* (Lado y cols., 2009).

En el caso particular de *Badhamia*, Hatano y Keller (2008) realizaron un estudio con 14 diferentes especies del género, en las que examinaron con MEB tanto especies con esporas libres como especies de esporas agrupadas. Entre las especies estudiadas se encuentran *Badhamia affinis*, *B. folicola*, *B. gracilis*, *B. iowensis*, *B. lilacina*, *B. macrocarpa*, *B. obovata*, *B. panicea*, *B. rugulosa*, *B. capsulifera*, *B. crassipela*, *B. nitens*, *B. populina* y *B. utricularis*, de las que se hizo una descripción detallada de la ornamentación.

3. PROBLEMA.

Los Myxomycetes del estado de Tlaxcala han sido estudiados extensivamente desde 1988. Aunque estos estudios han aportado información sobre muchos nuevos registros para el país y para la entidad, también han existido problemas de ubicación de algunos taxones cuyos caracteres no permiten separarlos claramente de algunas especies previamente

descritas. Éste es el caso de una especie del género *Badhamia* con características constantes que la asemejaban mucho a *B. utricularis*, pero con diferencias tales como el tamaño de la ornamentación de las esporas, el capilicio formado por una red muy cerrada y delgados filamentos, que no coincidían con las descripciones existentes para dicho grupo. Esta especie fue recolectada nuevamente en el estado de Hidalgo, con lo que surgió la duda de si se trataba de una especie con diferencias en los esporocarpos producidas por las condiciones ambientales en las que se desarrolló o si sus características se mantienen constantes bajo diferentes ambientes y condiciones, separándola claramente de otros taxones previamente descritos.

4. JUSTIFICACIÓN.

La distinción de las especies de Myxomycetes se ha basado en los caracteres morfológicos de sus estructuras reproductoras, los cuales muchas veces son altamente variables. Por esta razón, la descripción de nuevas especies debe basarse en una observación detallada de sus características, un análisis crítico de sus rasgos distintivos a través de la comparación con las especies previamente descritas y la confirmación de la estabilidad de dichos rasgos.

El cultivo controlado de las especies permite el conocimiento del ciclo de vida y el análisis de sus peculiaridades morfológicas bajo diferentes condiciones y a través de diferentes generaciones; asimismo, para la observación morfológica de diferentes caracteres, el uso de la microscopía electrónica de transmisión y de barrido permiten la descripción con mayor detalle de dichos caracteres; ambas técnicas aportan entonces evidencias más sólidas para definir si una especie corresponde o no con las previamente descritas.

5. PREGUNTAS.

¿Los caracteres morfológicos de *Badhamia* sp. son estables y suficientemente diferentes de los de otras especies previamente descritas para justificar su descripción como una especie nueva?

¿El patrón de la ornamentación de las esporas de *Badhamia* sp. es diferente del que presentan otras especies con esporas agrupadas?

¿Los grupos de esporas de *Badhamia* sp. presentan las mismas características ultra estructurales que otras especies de *Badhamia* con esporas agrupadas?

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL.

Aportar información morfológica, ultra-estructural y de cultivo para la circunscripción taxonómica y descripción de una especie no descrita de *Badhamia*

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

*Comparar los caracteres morfológicos de *Badhamia* sp. con los de otras especies similares previamente descritas.

*Obtener el cultivo de *Badhamia* sp. y caracterizar el ciclo de vida de la especie en cuestión.

*Describir con base en el análisis de imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido el patrón de ornamentación de las esporas de *Badhamia* sp. y compararlo con el de especies afines.

*Describir la ultra-estructura de los sitios de cohesión en los grupos de esporas de *Badhamia* sp. y contrastarlos con los de especies afines.

7. METODOLOGÍA.

7.1 Material biológico.

Para el presente estudio, se consideraron todos los especímenes de *Badhamia* sp. procedentes de dos localidades diferentes del estado de Tlaxcala y del estado de Hidalgo; además de ejemplares de *B. capsulifera*, *B. dubia* y *B. melanospora* del Parque Nacional La Malinche Tlaxcala, todos depositados en el herbario TLXM del Centro de

Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (cuadro 1). Adicionalmente, se incluyeron dos colecciones de *B. utricularis* depositadas en Herbarios de Estados Unidos y Francia.

Especie	Localidad	Tipo de vegetación
<i>Badhamia capsulifera</i> (TLXM-974)	La Malinche	<i>Abies-Pinus</i>
<i>B. dubia</i> (JCD-30)	La Malinche	<i>Abies-Pinus</i>
<i>B. melanospora</i> (TLXM-2483)	La Malinche	<i>Abies-Pinus</i>
<i>Badhamia</i> sp. (TLXM-2218)	La Malinche	<i>Abies-Pinus</i>
<i>Badhamia</i> sp. (TLXM-735)	Hidalgo	<i>Alnus</i>
<i>Badhamia</i> sp. (TLXM-790)	Ixtacuixtla	<i>Juniperus</i>
<i>B. utricularis</i> (UTMC-744159)	EUA	
<i>B. utricularis</i> (M. Meyer-29767)	Francia	

Cuadro 1. Localidades y tipos de vegetación de los ejemplares considerados en el estudio.

La selección de las especies se basó en que éstas comparten algunos caracteres entre sí como las esporas agrupadas, lo que podría ayudar a evidenciar las diferencias entre la especie en cuestión y las previamente descritas.

B. melanospora se utilizó para estandarizar a técnica de cultivo de espора a espора.

7.2 Descripción macro y micro-morfológica de los especímenes.

La observación micro-morfológica de los organismos se realizó en un microscopio óptico de campo claro marca Zeiss modelo Axioscop2 Plus, con contraste interferencial de Normarski y acoplado con un equipo de digitalización de imágenes integrado por una cámara Olympus DP70 y una computadora con el software Image Pro-plus v. 4.5. Para ello, se montaron de uno a dos esporocarpos en un portaobjetos con el medio de montaje semipermanente Hoyer, separando las esporas y el capilicio del resto del esporocarpo y colocando cuidadosamente un cubreobjetos. Se obtuvieron fotografías de 4080 X 3072 píxeles de todas las estructuras de los esporocarpos, las cuales se utilizaron para hacer las mediciones correspondientes con la ayuda del mismo software. Para la descripción

macromorfológica se utilizó un estéreo-microscopio y las mediciones del esporocarpo se realizaron con un vernier. En ambos casos, las observaciones que se realizaron incluyeron a todas las estructuras del esporocarpo como son tipo de peridio, consistencia, color y tamaño del estípote, presencia de gránulos de calcio, forma y ornamentación del capilicio, color, tamaño y ornamentación de las esporas. El color se definió utilizando las tablas de colores Methuen (Kornerup y Wanscher, 1978) o Munsell (1991) o anotando la notación alfa-numérica correspondiente para cada caso.

7.3 Cultivo de espora a espora.

El cultivo de espora a espora y las observaciones de todo el proceso se realizaron en el Laboratorio de Sistemática del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Para estandarizar la técnica se trabajó primero con *B. melanospora*, especie en la que previamente se obtuvo el ciclo de vida completo en cultivo (Liu, 1990); una vez que se estandarizó el procedimiento, se inició el cultivo de *Badhamia* sp. El medio de cultivo y la fuente de alimento utilizado en cada etapa se muestran en el cuadro 2.

En los cultivos se realizaron filmaciones de las mixamebas, quistes y de los plasmodios en movimiento con el equipo de digitalización de imágenes previamente descrito, tomando 200 tomas consecutivas de 4080 X 3072 píxeles, para posteriormente utilizar el programa Windows Movie Maker para obtener los videos correspondientes.

Finalidad	Composición
Para germinación	Agar-agua 0.5% Agar-agua 0.5% con extracto acuoso de corteza de <i>Juniperus</i>
Para plasmodios	Agar harina de maíz ½
Fuentes de alimento adicional	<i>Escherichia coli</i> crecida sobre Difco Nutrient Broth Avena molida

Cuadro 2. Medios de cultivo (Wollman, 1966; Gray y Alexopoulos, 1968)

7.4 Procedimiento.

a) Siembra.

El procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar vertical; en condiciones estériles para evitar la contaminación. Inicialmente se colocaron de 3 a 4 esporocarpos de *B. melanospora* sobre un vidrio de reloj y con la ayuda de una aguja de disección, ambos esterilizados a 15 lb de presión por 15 min. Los esporocarpos se presionaron para esparcir las esporas. La siembra se hizo en cajas Petri de plástico de 5 x 1 cm y con medio de agar-agua al 0.5%, dejando la cantidad de esporas que se tomó con la punta de la aguja, las cuales se esparcieron en cuatro cuadrantes marcados sobre la placa de agar.

Por otro lado, se realizó la siembra de las esporas de *Badhamia* sp. siguiendo el procedimiento anterior, pero adicionando al agar una solución con extracto de corteza de *Juniperus* (Wollman, 1966) debido a que en los primeros intentos no se observó germinación de las esporas por lo que se tuvo que proporcionar un medio con un pH ácido y algunos metabolitos que las cortezas suministraron de forma natural. En ambos casos, las cajas se marcaron y sellaron con plástico adherente y se dejaron en un sitio donde recibían luz de manera indirecta. Se revisaron diariamente hasta comenzar a detectar cambios en las esporas. A partir de este punto, los cultivos de ambas especies (*Badhamia* sp. y *B. melanospora*) se comportaron de manera similar, con la obtención de la germinación, la proliferación de mixamebas por vías asexuales y la producción de plasmodios.

b) Germinación de las esporas.

La germinación ocurrió con la ruptura de la pared de la espora y la emergencia del protoplasto. La observación de estos eventos se realizó en el estéreo-microscopio, en el que las cajas Petri con los cultivos se colocaron invertidas, con la tapa hacia abajo y el agar hacia arriba, con lo que se obtuvo una mejor imagen en el microscopio además de que al estar en esta posición las gotas de agua condensada no se precipitaban sobre la placa de agar.

c) Obtención de mixamebas.

La observación de las mixamebas se realizó con las lentes de 40 y 100X del microscopio óptico. A partir de este momento se realizó la toma de fotografías y películas como se describió previamente. En cada cuadrante de la caja Petri se adicionó una gota de Difco Nutrient Broth que contenía *Escherichia coli* para la alimentación de las mixamebas.

d) Transferencia.

Bajo la campana de flujo laminar y con la ayuda de un estéreo-microscopio, se realizó la transferencia de mixamebas. Esto se realizó cortando con un bisturí estéril cuadros de agar de 1x1 cm que contenían las mixamebas para colocarlos en nuevas cajas petri de 10 x 1 cm con agar agua, colocando dos cuadros por caja y adicionando una gota de la suspensión de *Escherichia coli*. Se dejaron en un lugar donde no les daba la luz de manera directa para evitar que se desecara el medio y las mixamebas se enquistaran. Se realizaron tantas transferencias como hicieron falta para evitar la contaminación, hasta que comenzaron a formarse los plasmodios.

e) Obtención de plasmodios.

Los plasmodios se transfirieron a cajas nuevas con agar harina de maíz y se les adicionó nuevamente una suspensión de *Escherichia coli*, además de avena molida.

f) Esporulación.

En el caso de *B. melanospora*, cuando los plasmodios comenzaron a condensarse para formar los esporocarpos se implementaron algunas variantes a la técnica para tratar de que éstos no se diferenciaron directamente sobre el agar o en las paredes de la caja Petri. Para esto, se transfirieron algunos plasmodios a matraces Erlenmyer con agar y con un abatelenguas estéril o colocando algunas cortezas estériles de *Opuntia*, en espera de inducir la esporulación sobre estos sustratos.

Para el cultivo de espora a espora de cada especie, se hicieron tres ensayos con esporas de material procedente de la misma localidad pero de diferentes fechas de recolección. En cada caso, se hicieron al menos tres resiembras de mixamebas y plasmodios. Sólo en uno de los ensayos con *B. melanospora* se hizo una siembra adicional para obtener un nuevo ciclo a partir de los esporocarpos obtenidos durante el primer ciclo de cultivo.

7.5 Determinación de la estabilidad de los caracteres morfológicos.

La estabilidad de los caracteres de las especies estudiadas se intentó probar a través de la comparación de la morfología y tamaños de las diferentes estructuras de los esporocarpos procedentes de campo y de los obtenidos durante la primera y segunda fase de cultivo. Esto, por supuesto, sólo se pudo llevar a cabo con los cultivos de *B. melanospora*, ya que no se logró obtener la esporulación de *Badhamia* sp.

7.6 Microscopía electrónica de transmisión.

El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, siguiendo la técnica de González-Santander (1969). Las fotografías se tomaron en el Microscopio Electrónico de Transmisión de la misma dependencia de la UNAM.

Para realizar la comparación de las observaciones en microscopía electrónica de *Badhamia* sp. con especies afines, los taxones seleccionados fueron *B. dubia* (JDC-30), *B. capsulifera* (TLXM-974) tomadas del Herbario TLXM de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, y *B. utricularis* (UTMC: 744159) de Estados Unidos y (M. Meyer: 29767) de Francia.

Se realizó la inmersión de los esporocarpos en agar-agar, con la finalidad de retener las esporas en un medio semisólido. Posteriormente los esporocarpos se colocaron en cápsulas con LR-white que es una resina que sirve como medio de montaje y se dejaron durante 16 h para que solidificara (Fig.2). Se cortaron cuadros de 2x2 cm de placas de vidrio para después cortar transversalmente y obtener las cuchillas que se prepararon con cinta adhesiva y se sellaron con esmalte para uñas (Fig. 3).

Una vez que se tenían los bloques sólidos, se quitó una parte de la cápsula para comenzar con la exploración, que consistió en tallar con una navaja la resina formando un trapecio para dejar lo más expuesta posible el área en que se encontraba el esporocarpio. Todo esto se hizo en un ultra-micrótomo (Fig. 4). Una vez listo el bloque, se hicieron cortes finos que al flotar en el agua destilada se veían de color azul-verde-violeta (Fig. 5), se tomaban con el asa de siembra dejando la gota de agua en un portaobjetos y se fijaban con el calor de una parrilla eléctrica. Se observaron los cortes en el microscopio óptico y al tener indicio de las esporas se marcaron los bloques para comenzar con los cortes ultra-finos.

Para hacer los cortes se prepararon rejillas de cobre de 3 mm de diámetro con una capa de medio Fonvar en el que se introdujo un portaobjetos. Al secarse el medio, éste formaba una película que al despegarse quedaba flotando en agua. Las rejillas de cobre se colocaron sobre la película para que se adhiriera a su base (Fig. 6).

Se hicieron aproximadamente entre 15 y 20 cortes ultra-finos que se sacaban directamente con la rejilla preparada como se indicó antes. Los cortes tenían un grosor entre 65-90 nm cada uno y un color entre plateado y amarillo paja. Se contrastaron con la técnica de uranilo-plomo (Fig. 7) descrita por Graeme y Jarame (1976) y se colocaron en un porta-muestras para llevarlos al microscopio. Finalmente se realizó la exploración de las rejillas y se tomaron las fotografías.



Figs. 2-7 Metodología para elaborar preparaciones para microscopía electrónica de transmisión. **2.** Cápsulas con LR-White conteniendo los esporocarpos de las especies seleccionadas. **3.** Cuchillas de vidrio con cinta adhesiva selladas con esmalte para uñas. **4.** Ultra-micrótomo. **5.** Cuchillas haciendo cortes a los bloques. **6.** Rejillas de cobre preparadas con medio de Fonvar junto a una cápsula. **7.** Material utilizado en la técnica de uranilo-plomo para contraste de los cortes.

7.7 Microscopía electrónica de barrido.

La microscopía electrónica de barrido (MEB) se efectuó en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, de acuerdo con el procedimiento descrito por Lyon y Kramer (1977).

Los esporocarpos se fijaron en FAA (formol, ácido acético, alcohol) durante 5 días para posteriormente deshidratarlos en alcohol a diferentes concentraciones (al 30, 50, 70, 85 y 96%), dejándolos por una hora en cada concentración, para finalmente mantenerlos en alcohol absoluto por una semana. Esta técnica es necesaria debido a que el microscopio electrónico requiere la exposición del espécimen al vacío (Fig. 8).

Los esporocarpos se introdujeron en micro-barriles especiales (Fig. 9) para secarlos a punto crítico durante 40 min en una secadora Sandri 795, mediante el intercambio de CO₂ líquido (Fig. 10). Posteriormente se montaron en porta-muestras pegándolos sobre un adhesivo especial y cuidando que todas las estructuras quedaran expuestas para su posterior observación (Fig. 11).

El material así preparado se cubrió de oro en una ionizadora Geoli, con el objeto de obtener una buena refracción de los haces de los electrones del microscopio (Fig. 12) que son enviados desde un cañón para que un detector registre la cantidad de electrones reflejados de la muestra cubierta de oro.

Se realizó la exploración de las muestras para la toma de las fotografías en un MEB (Fig.13).



Figs. 8-13 Metodología para preparación de muestras para observación en microscopía electrónica de barrido (MEB). **8.** Esporocarpos fijados en FAA. **9.** Colocación de las muestras en los micro-barriles. **10.** Secadora Sandri 795 para secado a punto crítico. **11.** Montaje de los esporocarpos en el porta-muestras. **12.** Ionizadora Geoli para metalizar las muestras con oro. **13.** Observación en el microscopio electrónico de barrido.

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1 Caracteres morfológicos

Los caracteres morfológicos son todos los rasgos observables de los organismos. Su importancia radica en que si son hereditarios son la base de la descripción de los seres vivos. En el caso de los Myxomycetes, los caracteres morfológicos observables en su ciclo de vida son intermedios entre protozoos (en las primeras dos etapas de vida como mixamebas y plasmodios) y hongos; ya que en su fase esporulativa, formarán estructuras particulares para cada una de las especies que conforman este grupo. Particularmente para el género *Badhamia* algunos de sus caracteres distintivos son las esporas oscuras y el capilicio completamente calcificado.

Se considera que hay estabilidad de caracteres cuando los rasgos que observamos en los seres vivos se mantienen constantes a través de las generaciones sin que cambien al estar influenciados por factores externos; tiene gran significado biológico y taxonómico ya que gracias a estos caracteres se pueden separar las especies y hacer una descripción de las mismas.

En este trabajo se revisaron 20 ejemplares de las cuatro especies estudiadas: ocho de *Badhamia* sp., con material de Tlaxcala procedente de un bosque de *Abies-Pinus* y de un bosque de *Juniperus*, y del estado de Hidalgo recolectado en un bosque de *Alnus*; cinco de *B. capsulifera* y cinco de *B. dubia* de Tlaxcala encontradas en un bosque de *Abies-Pinus*. Todas estas muestras se encuentran depositadas en el Herbario TLXM de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Adicionalmente, se incluyeron dos especímenes de *B. utricularis* provenientes de los herbarios de Estados Unidos (UTMC: 744159) y de Francia (M. Meyer: 29767).

	<i>Badhamia</i> sp.	<i>B. capsulifera</i>	<i>B. dubia</i>	<i>B. utricularis</i>
Esporoteca	Subglobosas a obovoides	Obovoides	Subglobosas	Obovoides a piriformes
Agrupación de los esporocarpos	Racimos de 3-6	Racimos de 3-4	Solitarios o en racimos de 3-6	Racimos de 4-8
Peridio	Membranoso, con dos capas, iridiscente	Membranoso, con una capa, ocasionalmente iridiscente	Membranoso, con una capa, ocasionalmente iridiscente	Membranoso, con una capa, frecuentemente iridiscente
Estípite	Membranáceo, acanalado, delgado, a veces fusionado con otros estípites, de amarillo a blanco	Membranáceo, acanalado ancho, aplanado, corto, a veces fusionado con otros estípites, de amarillo a blanco	Membranáceo, acanalado, más o menos ancho, aplanado A veces fusionado con otros estípites, blanco	Membranáceo, delgado, aplanado, a veces fusionado con otros estípites, amarillo pajarojizo
Capilicio	Badhamioide, formando una red de malla cerrada, con filamentos finos, blanco	Calcificado en algunas partes, formando una red abierta en la base y cerrada hacia el ápice, con filamentos finos, blanco	Badhamioide, formando una red cerrada en el centro y abierta hacia la periferia, con filamentos gruesos, blanco	Badhamioide, formando una red muy abierta, con filamentos gruesos y delgados, de amarillo a blanco
Esporas	Café rojizo, en grupos de 4-16, con espinas grandes y verrugas. Ornamentación de 2-2.5 μm de altura	Café oscuro, libres o en grupos de 4-20, espinosas. Ornamentación de < 1.5 μm de altura	Café rojizo, libres o en grupos de 6-8, verrucosas. Ornamentación de < 1.5 μm de altura	Café violáceo, libres o en grupos de 4-16. Ornamentación < 1.5 μm de altura

Cuadro 3. Comparación de las estructuras de las cuatro especies de *Badhamia*. Observaciones hechas con el estéreo-microscopio y el microscopio de campo claro.

De las observaciones macroscópicas podemos resaltar que las cuatro especies maduran formando racimos de entre tres y ocho esporocarpos, pueden presentarse de ovoides a subglobosos y en casi todos los casos presentan peridios iridiscentes formados por una capa, salvo en el caso de *Badhamia* sp. que presenta dos; los estípites son membranáceos y pueden llegar a fusionarse; el estípite de *Badhamia* sp. es frágil y muy delgado, de color amarillo, en tanto en *B. dubia* y *B. capsulifera* es ancho y va de amarillo a blanco, mientras que en *B. utricularis* es aplanado y de color amarillo-paja a rojizo (Cuadro 3).

En los cuatro casos, el capilicio es badhamioide, pero las variaciones se presentan en el grosor de las bandas y en la abertura de malla. *Badhamia* sp. presenta una red de malla muy cerrada, mientras que *B. capsulifera* tiene una red muy abierta en la base y cerrada hacia el ápice, *B. dubia* lo presenta con malla cerrada en el centro y abierta hacia la periferia y *B. utricularis* tiene mallas muy abiertas (Cuadro 3).

En todas las especies las esporas son agrupadas: *Badhamia* sp. tiene grupos de 4-16, *B. capsulifera* de 4-20, *B. dubia* de 6-8 y *B. utricularis* de 4-16, pero en las tres últimas especies pueden presentarse también esporas libres. En *Badhamia* sp. nunca se observaron esporas libres, su color es café rojizo (Ml:7.5YR6/4) y la ornamentación está formada por espinas largas, hasta de 2.5 μm y verrugas hacia los puntos de unión de las esporas, a diferencia de las otras especies, en las que se presentan espinas o verrugas, pero nunca mayores de 1.5 μm .

En conclusión, las características morfológicas que separan a los especímenes de Tlaxcala e Hidalgo de *B. capsulifera*, *B. dubia* y *B. utricularis* son el peridio formado por dos capas, el capilicio formado por filamentos finos que integran una red completamente calcificada de malla muy fina y las esporas fuertemente agregadas, con una ornamentación de espinas muy largas que llegan a alcanzar una altura de hasta 2.5 μm .

8.2 Cultivo de espora a espora.

Siembra.

Se esparcieron las esporas extraídas del esporocarpo (Fig. 14) sobre la placa de agar-agua al 50% en cuatro cuadrantes (Fig. 15); la técnica funcionó sin problema para *B. melanospora* que tiene esporas libres (Fig. 16), pero al realizarla con las esporas agrupadas de *Badhamia* sp. (Fig. 17) no se observó ningún cambio que indicara que las esporas se encontraban en proceso de germinación. Por lo anterior, después de algunos intentos para inducir la germinación de las esporas, el agar-agua se adicionó con un extracto de corteza de *Juniperus* que se dejó reposar 48 h, de acuerdo con la propuesta de Wollman (1966), con la finalidad de proporcionar condiciones lo más similares posibles al pH que hay en el hábitat de campo de la especie de interés. Con la nueva formulación del medio, las esporas de *Badhamia* sp. germinaron sin problema.

Germinación y obtención de mixamebas.

La germinación comenzó con el hinchamiento de prácticamente todas las esporas sembradas. Las esporas de *B. melanospora* permanecieron así hasta los cuatro ó cinco días posteriores a la siembra. Se observó que la capa externa de las esporas se abrió por la mitad, no en un corte lineal sino más bien ligeramente curvado siguiendo los pliegues de la ornamentación. Por esta abertura emerge el protoplasto (Fig. 18). Se notó una esfera hialina con movimientos en el interior que indican una gran actividad citoplásmica. Las mixamebas en movimiento pueden observarse claramente entre siete y 10 días después de su emergencia.

La germinación de las esporas de *Badhamia* sp. fue más rápida que las de *B. melanospora*, ya que la emergencia de las mixamebas se dio entre los dos y tres días después de la siembra. Las esporas se abrieron sin que se separaran los grupos con una dehiscencia en forma de línea recta en la parte expuesta de las esporas (Fig. 19).

Las mixamebas se mantuvieron durante dos ó tres días con gran actividad alrededor de las paredes vacías de las esporas y sólo después de este tiempo comenzaron a distanciarse del

sitio de germinación. Probablemente, las mixamebas se alimentaban de las bacterias asociadas a la superficie externa de la pared esporal.

Entre los cinco y ocho días posteriores a la germinación, se observó la presencia de células flageladas en los cultivos de *Badhamia* sp., las cuales presentaban gran actividad y movimiento de sus dos flagelos (Figs. 20 y 21). El desplazamiento era tan rápido que no fue posible realizar su filmación y sólo se obtuvieron algunas evidencias fotográficas de la presencia de dichas células. Conforme se desecó el medio, las células flageladas revirtieron a su forma de mixamebas y finalmente se formaron microquistes.

Alimentación y transferencia.

Pasados tres ó cuatro días después de que emergieron las mixamebas, a los cultivos de ambas especies, *B. melanospora* y *Badhamia* sp., se les adicionó una gota de *Escherichia coli* como fuente de alimento, con lo que se favoreció el crecimiento de la población a través de la reproducción asexual de las mixamebas (Fig. 22). Con el incremento de la población fue necesario hacer transferencias a nuevas cajas con agar-agua. Esto se realizó al cortar pequeños trozos de 1x1 cm del agar en el que se encontraban las mixamebas y colocarlos sobre el nuevo medio, agregando *Escherichia coli* y sellando nuevamente las cajas. Las poblaciones seguían creciendo hasta llegar a ocupar toda la caja nuevamente, por lo que fue necesario hacer nuevas transferencias a cajas con medio nuevo.

Enquistamiento de las mixamebas.

Debido tal vez a la desecación del medio o a la falta de alimento, las mixamebas formaron quistes en algunos cultivos (Fig. 23). En el interior de los quistes, se continuó observando movimientos citoplásmicos. Este estado fue reversible ya que al fraccionar el medio y traspasarlo a nuevo medio adicionado con *E. coli* las mixamebas aparecieron nuevamente.

Formación de enjambres-plasmodios.

En *B. melanospora* fue posible mantener la etapa de mixamebas entre dos y tres semanas, tiempo en el que comenzaron a formarse enjambres celulares (Fig. 24), que son grandes cantidades de mixamebas unidas entre sí. Después se formaron los cigotos que dieron lugar a los plasmodios jóvenes (Fig. 25).

Para *Badhamia* sp., los enjambres comenzaron a formarse tres semanas después de haber emergido las mixamebas. Los plasmodios ya se podían observar entre tres y cuatro días después (Fig. 26), presentando movimiento citoplásmico evidente aún en plasmodios muy jóvenes (Figs. 27 y 28).

No todas las mixamebas formaron enjambres, ya que algunas coexistían con los plasmodios ya formados e incluso eran ingeridos por ellos.

Plasmodios maduros.

Los plasmodios de *B.melanospora* se desarrollaban rápidamente, recorriendo la mayor parte de la caja Petri y alimentándose de bacterias, mixamebas y microquistes. En esta etapa fue necesario transferir los plasmodios constantemente a nuevas cajas ya que van modificando la superficie del agar. Si los plasmodios no eran traspasados a medio nuevo, se fragmentaban o se esclerotizaban, pero al transferirlos se recuperaban y seguían su crecimiento (Fig. 29).

Los plasmodios que alcanzaban un tamaño entre 3 y 5 mm aproximadamente, fueron traspasados a cajas con medio de harina de maíz añadiendo además una suspensión de *Escherichia coli* y avena molida para que se alimentaran. En estas condiciones, se observó un rápido crecimiento de los plasmodios de *B. melanospora*, que tomaron una coloración amarillo fuerte (Fig. 30) y que llegaron a ocupar toda la superficie del agar, por lo que para traspasarlos a nuevas cajas se tenían que fragmentar. Cada fragmento por separado presentó un rápido crecimiento y se mantuvo en etapa plasmodial durante dos ó tres semanas (Figs. 31 a 33).

Fase esporulativa.

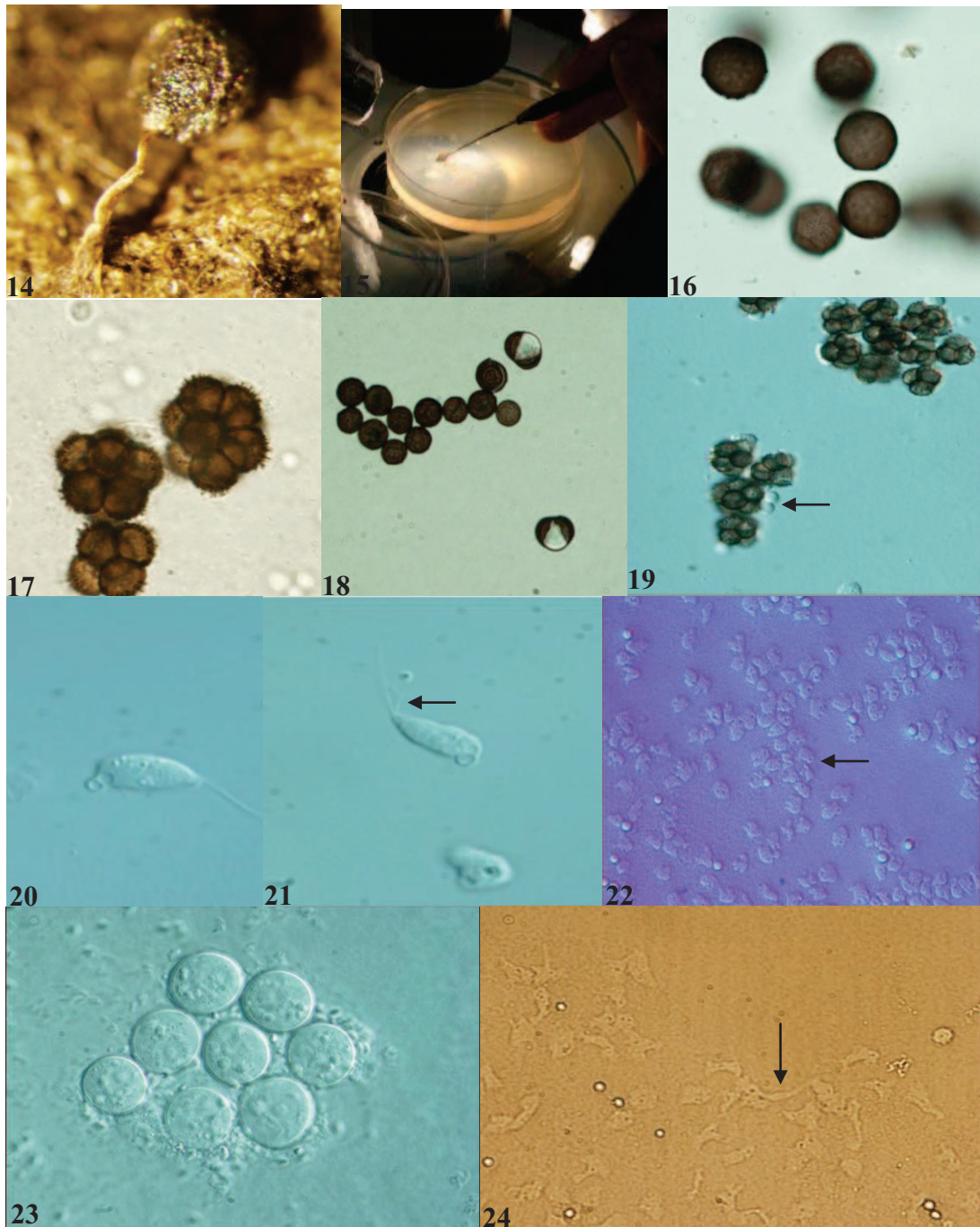
La formación de esporocarpos no fue precedida por la agregación del plasmodio de *B. melanospora*, si no que éstos aparecieron dispersos a lo largo de la huella que iba dejando el plasmodio (Fig. 34). Los plasmodios no detuvieron su actividad durante esta fase, por lo que se observaron simultáneamente plasmodios en movimiento y esporocarpos en proceso de maduración (Fig.35).

Los esporocarpos que se desarrollaron directamente sobre el agar no llegaron a secarse y madurar completamente, en tanto las que se encontraban sobre las paredes de las cajas si maduraron adecuadamente, por lo que ahí se detectaron las colonias más grandes. Los esporocarpos se cosecharon y se colocaron en pequeñas cajas de cartón.

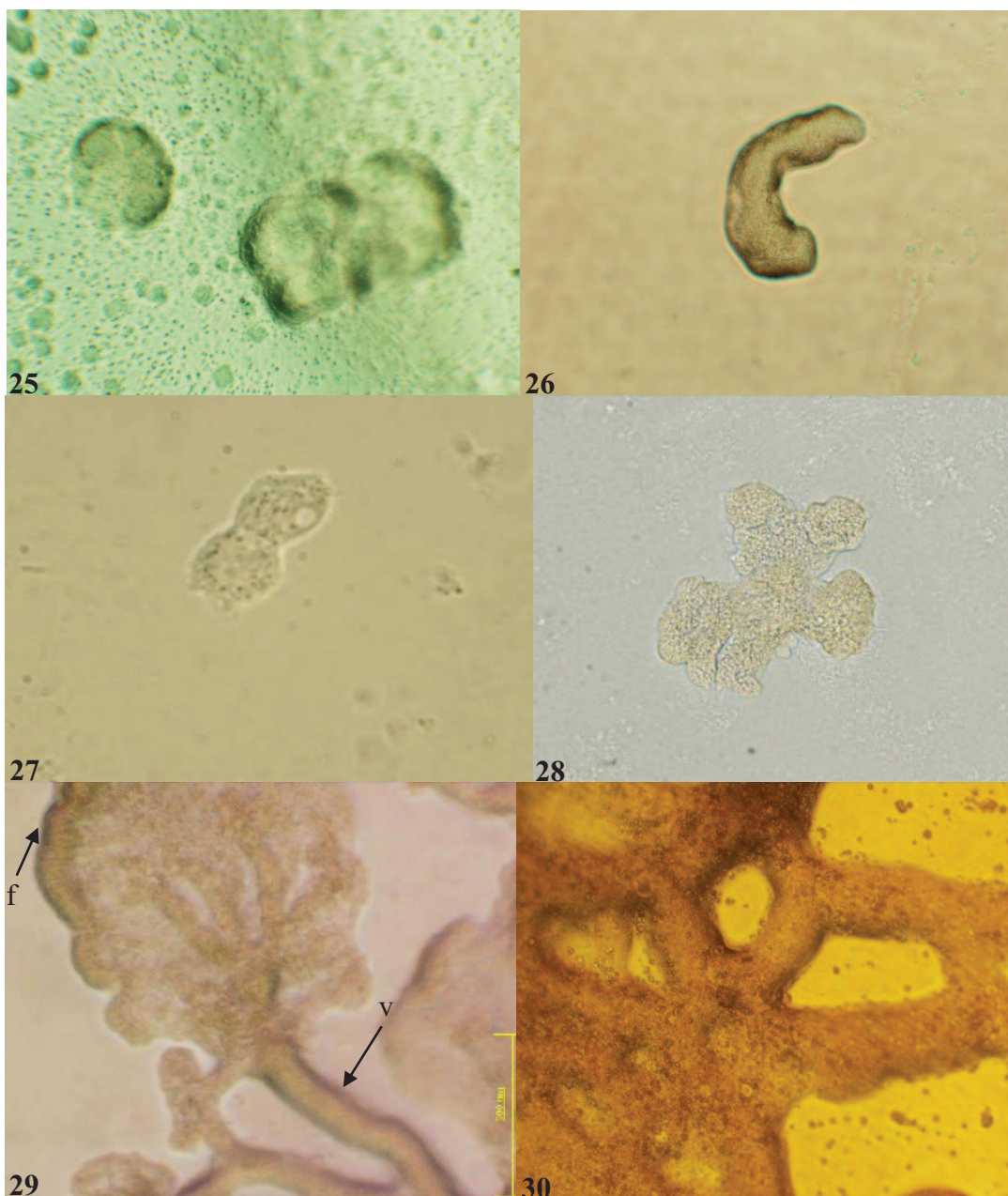
Se repitió nuevamente el cultivo con esporas provenientes de esporocarpos maduros obtenidos en el primer ciclo de cultivo, con el objeto de obtener una segunda generación de *B. melanospora*. Los resultados obtenidos fueron semejantes a los de la primera generación con algunas variantes, por ejemplo, las esporas germinaron más rápido, tal vez porque los esporocarpos estaban recientemente fructificados. Las mixamebas se mantuvieron activas el mismo tiempo que en la primera generación, pero la formación de enjambres se observó sólo por un tiempo muy corto. Los plasmodios se mantuvieron activos mientras se transfirieran a medio fresco con alimento.

Para inducir la esporulación, se implementó una variante en la técnica con la preparación de veinte matraces Erlenmyer con agar harina de maíz y la colocación de un abatelenguas de madera estéril (Fig. 36). Otro sistema adicional consistió en esterilizar y colocar cortezas de *Opuntia* sobre el medio. En ambos sistemas se traspasaron plasmodios de *Badhamia* sp. de entre 3 y 5 cm, pero sólo algunos de ellos subieron por lo sustratos ahí colocados.

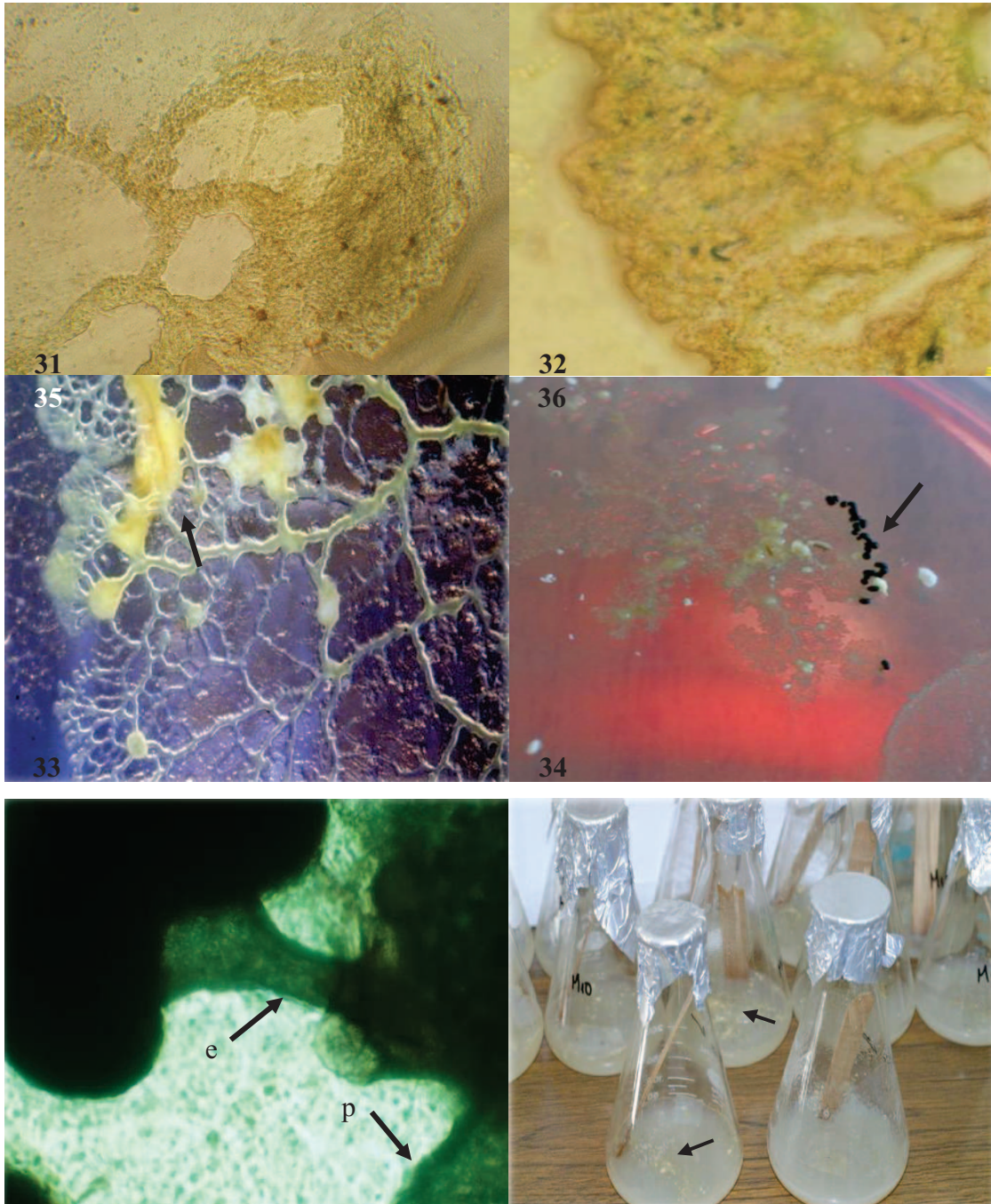
Los plasmodios de *Badhamia* sp se esclerotizaron y no se pudieron recuperar a pesar de varios intentos, por lo que para esta especie no se logró la obtención de esporocarpos.



Figs.14-24. **14.** Esporocarpio de *Badhamia* sp. (TLXM-790). **15.** Esporas esparcidas en una placa de agar con una aguja de disección **16.** Esporas libres de *Badhamia melanospora*. **17.** Esporas agrupadas de *Badhamia* sp. **18.** Germinación de las esporas de *Badhamia melanospora*. **19.** Mixamebas de *Badhamia* sp. justo después de la germinación. **20.** Célula flagelada de *Badhamia* sp. **21.** Célula flagelada de *Badhamia* sp. mostrando su par de flagelos **22.** Mixamebas después de la reproducción asexual. **23.** Enquistamiento de las mixamebas de *B. melanospora*. **24.** Formación de enjambres de mixamebas en *Badhamia* sp.



Figs. 25-30. **25.** Plasmodio recién formado de *Badhamia melanospora*. **26.** Plasmodio joven de *B. melanospora* **27.** Plasmodio joven con movimiento citoplásmico de *Badhamia* sp. (TLXM-735). **28.** Plasmodio joven que comienza a tener frente de avance *Badhamia* sp. (TLXM-735). **29.** Plasmodio maduro mostrando venas (v) y frente de avance (f) de *B. melanospora*. **30.** Plasmodio maduro en agar harina de maíz y avena molida mostrando una coloración mas intensa que los que crecen sin este medio de *B. melanospora*.

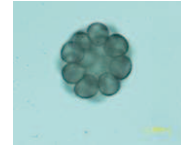
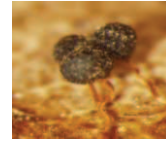
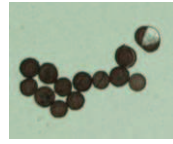
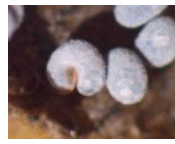


Figs. 31-36 **31.** Plasmodio maduro con venaciones y frente de avance de *Badhamia* sp. TLXM-735. **32.** Plasmodio que ocupa el diámetro completo de la caja petri de *Badhamia melanospora*. **33.** Plasmodio de *Badhamia melanospora* formando agregaciones. **34.** Esporocarpos de *Badhamia melanospora* sobre agar. **35.** Esporocarpio de *Badhamia melanospora* madurando sobre el agar (e) junto a plasmodio activo (p). **36.** Matraces con agar y abatelenguas con algunos esporocarpos de *Badhamia melanospora* madurando en las paredes de vidrio.

En el cuadro 4 se sintetiza la información obtenida de *Badhamia* sp. (TLXM-735) y *B. melanospora*, tanto del material procedente del campo como de las observaciones de los cultivos en laboratorio. Para ambas especies se obtuvo información de la germinación, la proliferación de las mixamebas, la formación de enjambres de mixamebas y la formación de los plasmodios en cultivo en agar.

En el caso de *Badhamia* sp. se obtuvo un porcentaje de germinación del 98% de las esporas. Adicionalmente a las fases del ciclo arriba señaladas, en esta especie se observaron también células flageladas. Los plasmodios presentaron un crecimiento moderado, pero finalmente se esclerotizaron y no fue posible recuperarlos a pesar de resembrarlos en repetidas ocasiones.

El porcentaje de germinación de *B. melanospora* es prácticamente del 100%. En esta especie se registraron también la germinación de las esporas, la obtención de mixamebas, la formación de enjambres, el desarrollo de las fases plasmodiales y la formación de microquistes y esclerocios. Para esta especie se obtuvo el ciclo completo durante dos generaciones de cultivo y se observó la formación de esporocarpos maduros, con lo que se corroboró la formación de esporas viables en el cultivo en agar. No se presentaron variaciones en las diferentes fases del ciclo de vida en las dos generaciones observadas en cultivo. Sin embargo, las dimensiones de las esporotecas, estípites y esporas de los esporocarpos obtenidos en cultivo presentaron diferencias con respecto a los procedentes del campo, siendo menores en el caso de esporotecas (0.2-0.4 mm vs. 0.4-0.5 mm) y estípites (0.1-0.2 mm vs. 0.4-0.5 mm) y mayores en el de las esporas (13.7-15.9 μm vs. 12.9-13.7 μm). La forma de las esporotecas y esporas, así como los patrones de ornamentación de las últimas son similares tanto en el material de campo como en el obtenido en las dos fases de cultivo, lo que indica que éstos son caracteres más estables que las dimensiones de dichas estructuras. Cabe señalar, que a pesar de las diferencias encontradas entre el material de campo y el obtenido en cultivo en agar, las medidas de sus esporas entran dentro de los intervalos reportados por Martin y Alexopoulos (1969) para *B. melanospora* (citada como *B. gracilis*). Lamentablemente, comparaciones similares no pudieron realizarse para *Badhamia* sp. al no obtenerse la formación de esporocarpos en cultivo.



	<i>B. melanospora</i>		<i>Badhamia sp.</i>	
	CAMPO	CULTIVO AA y AHM	CAMPO	CULTIVO AA ext
Tiempo de germinación		7-9 días		2-3 días
Mecanismo de germinación		A través de una fisura curvada en la superficie esporal		A través de una fisura en la superficie esporal
Proliferación de las mixamebas		2-3 semanas		1-2 semanas
Células flageladas		No observadas		Presentes, con 2 flagelos evidentes
Formación de enjambre		3-4 días		3 días
Desarrollo de los plasmodios		2-4 semanas*		2 semanas
Color de los plasmodios		Amarillo intenso		Amarillo paja
Esporocarpos:				
Altura (mm)	0.8-0.9	0.4-0.8	0.9-1.7	No obtenidos
Forma	Reniforme, libres	Reniforme, libres	Subglobosa a obovoides, en racimos	No obtenidos
Color	Blanco	Blanco	Iridiscente	No obtenidos
Tamaño del estípite mm	0.4-0.5	0.1-0.2	0.5-0.8	No obtenidos
Tamaño de las esporotecas	0.4-0.5	0.2-0.4	0.4-0.7	No obtenidos
Capilicio	Calcificado	Calcificado	Calcificado	No obtenidos
Forma de las esporas	Poliédrica	Poliédrica	Subglobosa	No obtenidos
Color de las esporas	Pardo oscuro	Pardo oscuro	Café rojizo	No obtenidos
Ornamentación	Verrucosa	Verrucosa	Espinosa	No obtenidos
Tamaño μm	12.9-13.7	13.7-15.9	7.8-10.8x9.5-11.3	
% germinación		100%		98%

Cuadro 4. Comparación de las características presentadas durante el desarrollo de *Badhamia melanospora* y *Badhamia sp.* en el cultivo de espóra a espóra.

*Se pueden mantener por tiempo indefinido si se siguen resembrando a cajas nuevas y siguen con alimento. AA- agar agua; AHM- agar harina de maíz; AA ext-agar agua con extracto acuoso de corteza de *Juniperus*.

8.3 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Se obtuvieron fotografías de *Badhamia capsulifera*, *B. dubia* y *Badhamia* sp., ya que no fue posible trabajar con las esporas de *B. utricularis* debido a que en el momento en que se prepararon los ejemplares para observación en el MET aún no se contaba con el préstamo del material de Estados Unidos y Francia.

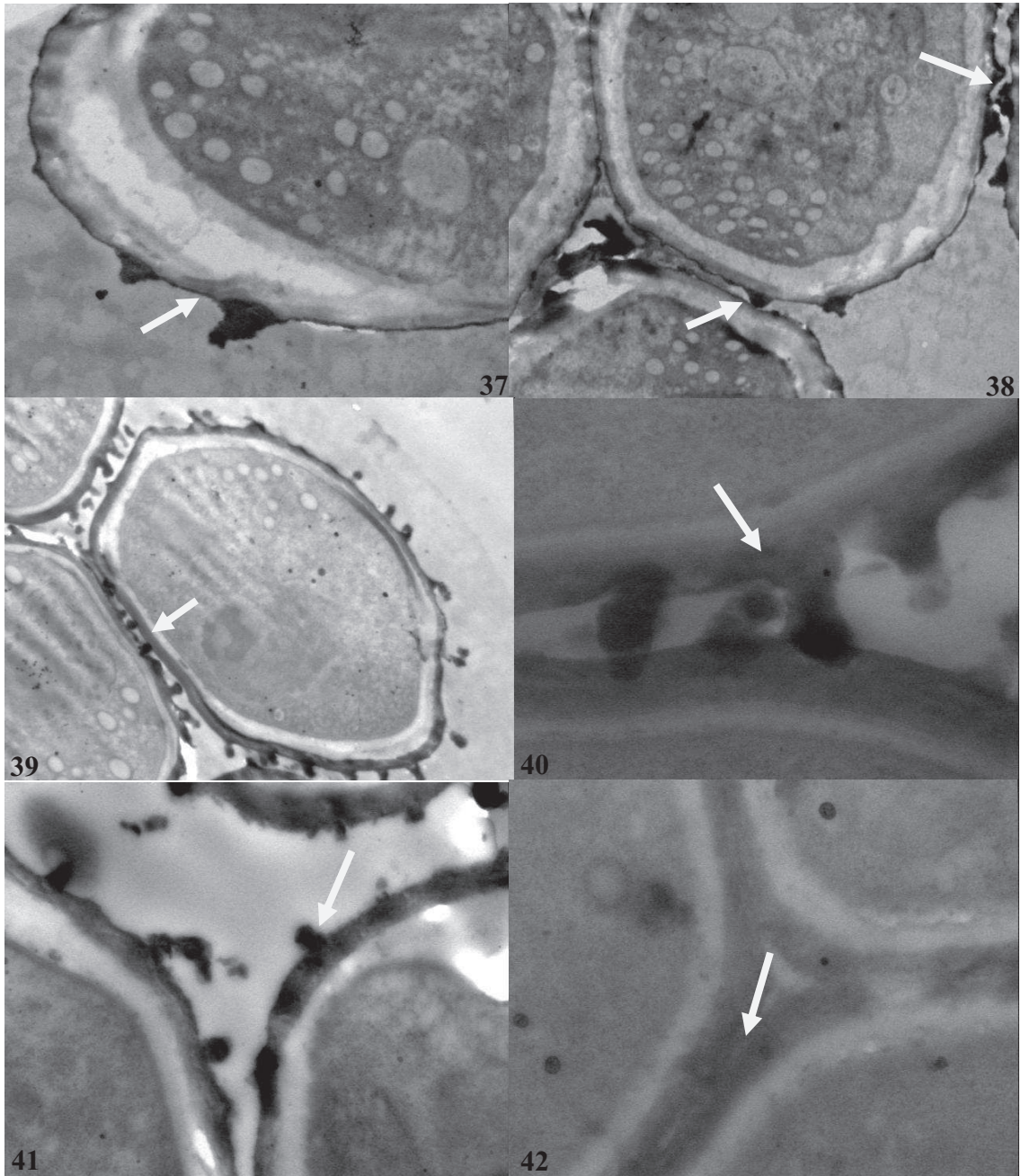
En las esporas de las tres especies se observan algunos organelos, gúttulas y vacuolas. En la pared esporal, se distinguen dos capas en las tres especies, una capa clara y una electrodensa de la que se originan las espinas de la ornamentación esporal (Fig.37-42). Ambas capas varían en cuanto a su grosor para cada especie.

La superficie de la espora de *B. capsulifera* es discontinua, la mayor parte lisa y con espinas aisladas que son muy anchas en la base y afiladas hacia la punta (Fig. 37). La capa electrodensa es muy fina. La unión entre esporas adyacentes se establece entre la pared de una espora y la ornamentación de la espora contigua, hasta acoplarse finalmente entre sí como estructuras complementarias (Fig. 38). Este tipo de unión explica porque los grandes grupos de esporas encontrados en este espécimen se disgregan fácilmente, mostrando gran cantidad de esporas libres. Demaree y Kowalski (1975) reportaron este mecanismo de unión de las esporas para *B. versicolor*, señalando que “las esporas están unidas a través de los ápices de las espínulas de una espora que generalmente se encuentran embebidos en ligeras depresiones de la pared de la espora adyacente , acoplándose de tal manera que embonan perfectamente entre sí.

Las esporas de *B. dubia* presentan una capa electrodensa más gruesa (Fig. 39), con proyecciones de forma casi cilíndrica, más anchas en la base. Las esporas libres tienen proyecciones capitadas, en tanto las que están unidas lo hacen a través de las proyecciones de la ornamentación (Figs. 39 y 40), las cuales pueden incluso fragmentarse al separarse las esporas, mostrando una unión débil. Este tipo de unión de las esporas, también ya había sido previamente descrito para *Physarum bogoriense* por Demaree y Kowalski (1975), quienes señalaron que sus esporas están unidas sólo por medio de los ápices de la ornamentación esporal.

Las esporas de *Badhamia* sp. presentan dos capas, la más externa electrodensa y formando proyecciones en forma de espinas con bases muy anchas en las partes expuestas (Fig.41) y prácticamente fusionada con la de las esporas adyacentes en los sitios de unión, haciéndolas indistinguibles (Fig. 42). Este tipo de unión, que involucra la fusión de las paredes esporales adyacentes, debe de ser la causa de la gran cohesión de los grupos de esporas en esta especie. Demaree y Kowalski (1975) encontraron este tipo de unión de las esporas en *Badhamia nitens*, de la cual mencionaron que las esporas adyacentes presentan una pared exterior contigua sobre una gran área de unión, con una línea de contacto claramente discernible pero con las paredes esporales completamente fusionadas entre sí.

El grado de unión entre las esporas ha sido frecuentemente utilizado para diferenciar a las especies de *Badhamia* de esporas agrupadas, ya que se ha mencionado que hay especies con grupos de esporas fuertemente agregadas y otras en las que las esporas se separan fácilmente (Martin y Alexopoulos, 1969). Aunque esto se usa frecuentemente en las claves de identificación para la separación de las especies, los mecanismos que explican el grado de cohesión de las esporas son frecuentemente ignorados como caracteres de relevancia taxonómica. La evidencia presentada en este estudio y la previamente aportada por Demaree y Kowalski (1975) indican que este carácter es distintivo de cada especie y avala la utilidad del grado de cohesión de las esporas como un carácter taxonómico en el género *Badhamia*.



Figs. 37-42. **37.** Capa electrodensa que da lugar a las espinas de *B. capsulifera* (15000 X). **38.** Unión entre la pared de una espora y la espina de la espora adyacente en *Badhamia capsulifera* (8000 X). **39.** Unión entre proyecciones de la ornamentación de esporas adyacentes de *B. dubia*. (8000 X). **40.** Proyección común a dos esporas de *B. dubia* (50000 X). **41.** Superficie expuesta de las esporas con la capa electrodensa de la que surgen las espinas (20000 X). **42.** Unión entre tres esporas de *Badhamia* sp. que comparten la capa electrodensa (30000 X).

8.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

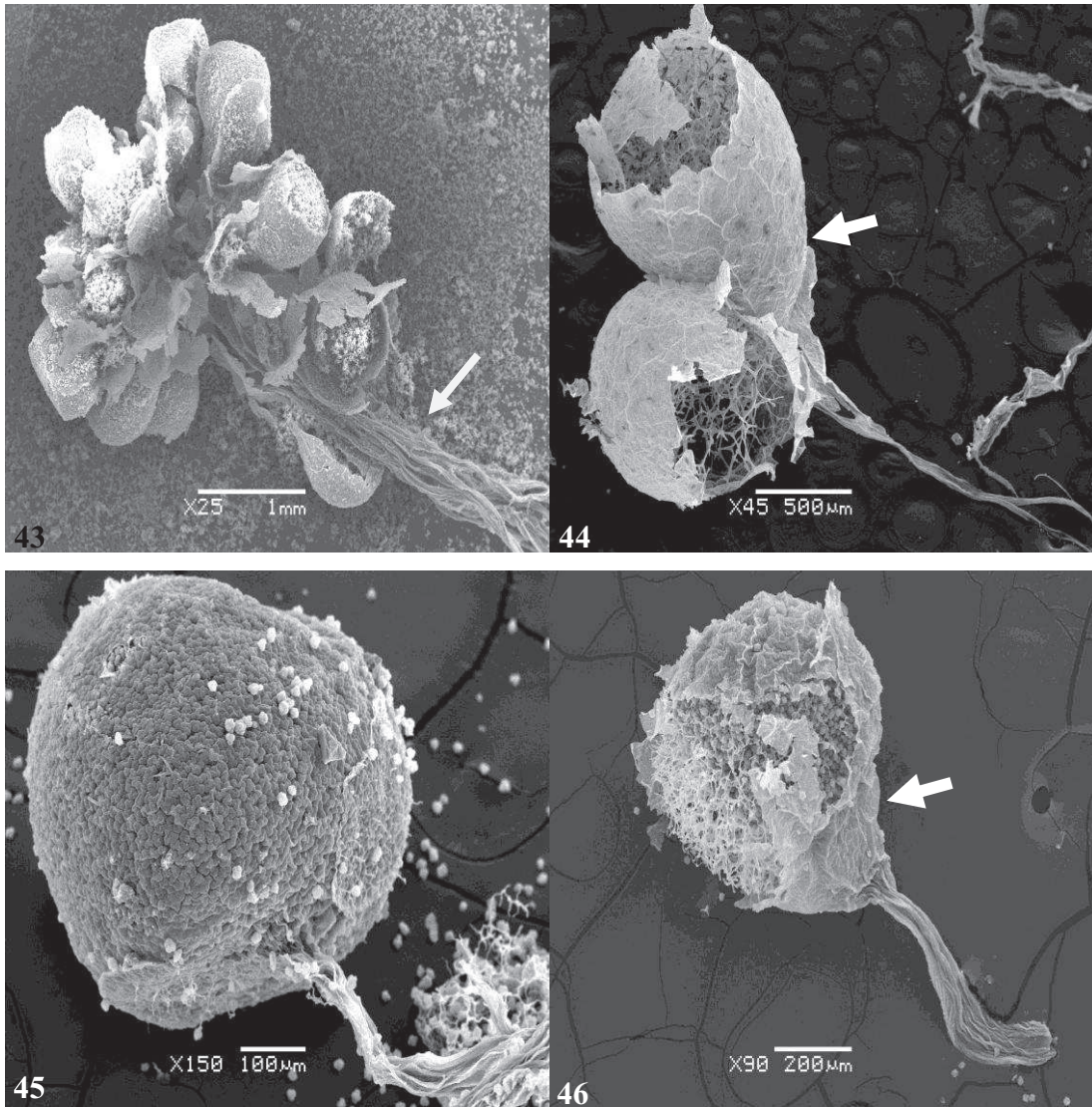
Para esta fase del estudio, se procesaron esporocarpos de *Badhamia capsulifera* y *B.dubia* de Tlaxcala, *B.utricularis* de Estados Unidos y Francia, y *Badhamia* sp. de Tlaxcala e Hidalgo. Se observaron todas las estructuras como esporoteca, estípite, peridio, capilicio y esporas, salvo en *B. capsulifera* y *B.dubia* cuyos esporocarpos de estaban muy deteriorados, por lo que no se consiguieron buenas imágenes para las esporotecas y el peridio y por lo tanto sólo se obtuvieron fotografías del capilicio y de las esporas.

Badhamia utricularis mostró esporocarpos con estípites fusionados, formando racimos de más de 20 esporocarpos, unidos de tal forma que fue imposible separarlos sin que llegaran a romperse (Fig. 43). Presenta esporotecas que van de obovadas a piriformes y los estípites son muy largos (Fig.44). Los esporocarpos de *Badhamia* sp. presentan esporotecas subglobosas (Fig.45) y crecen en colonias formando racimos pero con estípites no fusionados, sólo unidos en la base y largos, membranosos, muy delgados, flácidos y en algunos casos aplanados (Fig. 46).

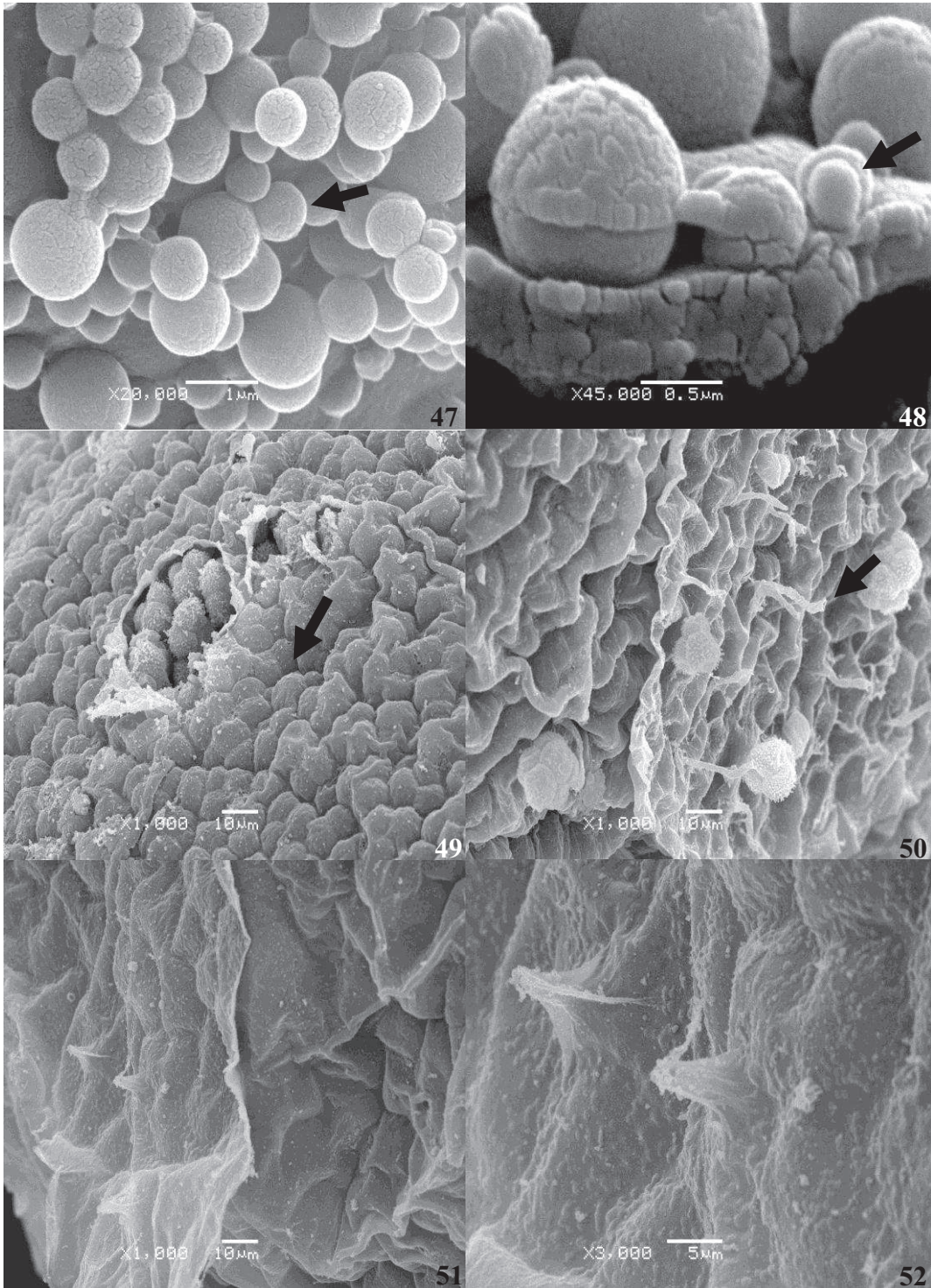
El peridio de *B. utricularis* está cubierto por esferas de carbonato de calcio (Figs. 47 y 48), carácter que resultó distintivo con respecto a las otras especies, en especial con la de estudio. Por su parte, *Badhamia* sp. posee un peridio que muestra las impresiones de las esporas que contiene (Fig. 49) en el que no se observan las esferas de carbonato encontradas en *B. utricularis*. Se observó también una doble capa en el peridio (Figs. 50 y 51) y proyecciones en la superficie en forma de pequeños filamentos puntiagudos (Fig. 52), caracteres constantes en los ejemplares provenientes de dos localidades distintas y al menos el último no previamente reportado para otras especies de *Badhamia*.

Con relación al capilicio, *B.capsulifera* muestra una red muy abierta con acumulaciones de gránulos de carbonato de calcio en forma de filamentos irregulares de grosor variable, a veces expandidos en los puntos de unión (Fig. 53) y frecuentemente con gránulos poco cohesionados formando filamentos muy finos (Fig. 54). *B. utricularis* presenta también filamentos irregulares, frecuentemente expandidos y formados por pequeños gránulos de carbonato de calcio (Fig. 55) pero con la superficie frecuentemente muy irregular (Fig. 56).

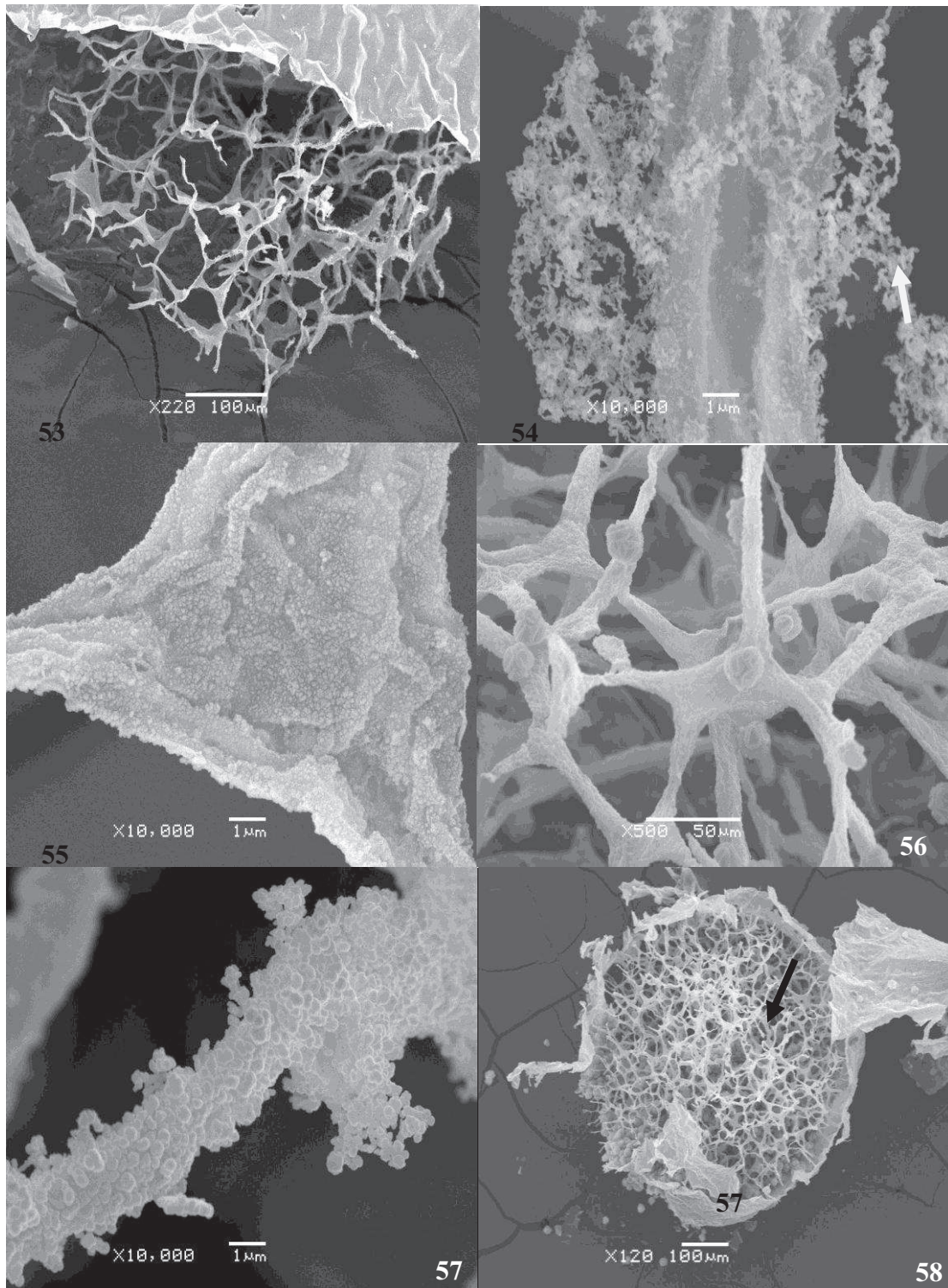
En *Badhamia* sp. se observan proyecciones formadas con una gran acumulación del mismo carbonato de calcio (Fig. 57), y filamentos finos de grosor más homogéneo, además de una red muy cerrada (Fig. 58).



Figs. 43-46. **43.** Estípites fusionados de *B. utricularis* (UTCM-744159). **44.** Esporoteca piriforme de *B. utricularis* (M.Meyer-29767). **45.** Esporoteca subglobosa de *Badhamia* sp. (TLXM-2218). **46.** Esporoteca obovada de *Badhamia* sp. (TLXM-790).



Figs. 47-52. **47.** Esferas de carbonato de calcio que forman parte del peridio de *B. utricularis* (UTCM-744159). **48.** Esferas de calcio que se fusionan en el peridio de *B. utricularis* (M. Meyer-29767). **49.** Impresiones de las esporas en el peridio de *Badhamia* sp. (TLXM-2218). **50.** Doble capa del peridio y proyecciones en *Badhamia* sp. (TLXM-2218). **51.** Doble capa del peridio de *Badhamia* sp. (TLXM-790). **52.** Proyecciones del peridio de *Badhamia* sp. (TLXM- 790).



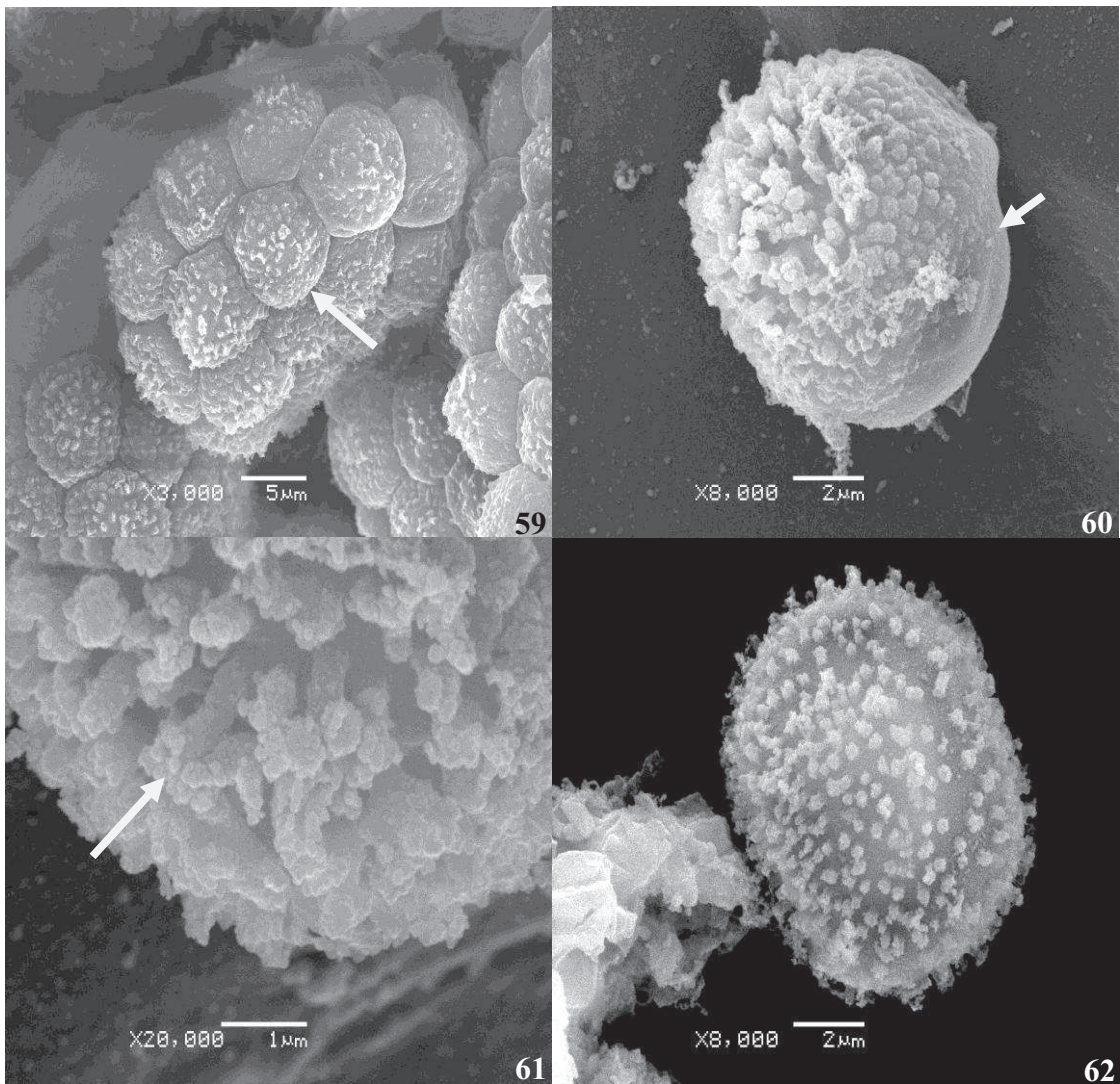
Figs. 53-58. **53.** Red abierta de *Badhamia capsulifera* (TLXM-974). **54.** Filamentos de *Badhamia capsulifera* (TLXM-974). **55.** Gránulos de carbonato de calcio formando los filamentos de *Badhamia utricularis* (UTMC-744159). **56.** Red de capilicio de *B. utricularis* (M. Meyer-29767). **57.** Gránulos de carbonato de calcio en grandes agregaciones de *Badhamia* sp. (TLXM-790). **58.** Red muy cerrada con filamentos muy finos en *Badhamia* sp. (TLXM-790).

Con relación a la MEB de las esporas, las cuatro especies poseen esporas agrupadas, sin embargo, el grado de unión es diferente para cada especie. *Badhamia capsulifera* presenta grupos muy grandes de hasta 20 esporas, que sólo se pudieron observar en el interior de la esporoteca (Fig. 59) ya que las esporas se separan fácilmente; se encontraron abundantes esporas libres con una superficie prácticamente lisa en la parte por donde estaban unidas con las esporas adyacentes (Fig. 60), pero con proyecciones en forma de espinas en la superficie expuesta. Los ápices de las espinas, que corresponden con las zonas de unión entre esporas adyacentes, terminan en forma de roseta (Fig. 61).

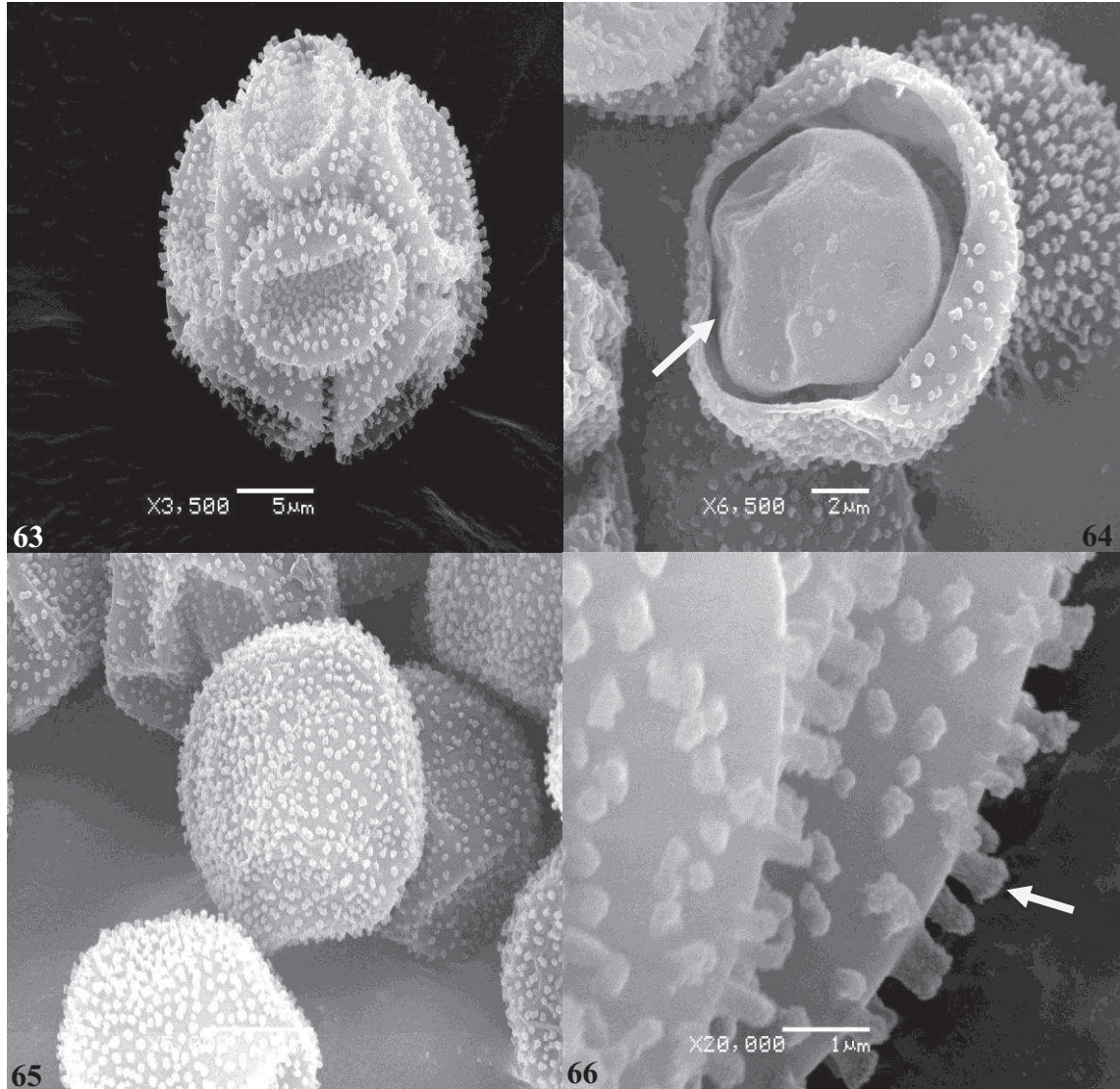
En *B. dubia* se encontraron esporas libres con una ornamentación formada por proyecciones columnares distribuidas uniformemente en toda la superficie (Fig. 62) con los ápices frecuentemente expandidos en los puntos en los que se encontraban unidas con la ornamentación de la spora adyacente. En vista lateral, estas proyecciones son capitadas, lo que corresponde con el tipo de unión que se observó en el MET, ya que las esporas están unidas a través de las proyecciones y al separarse se rompen tomando la forma capitada.

B. utricularis presentó esporas tanto libres como en grupos, éstos últimos formados por 10-12 esporas (Fig. 63). La ornamentación está formada por proyecciones columnares distribuidas uniformemente sobre la superficie esporal (Figs. 64 y 65), las cuales son frecuentemente capitadas (Fig. 66).

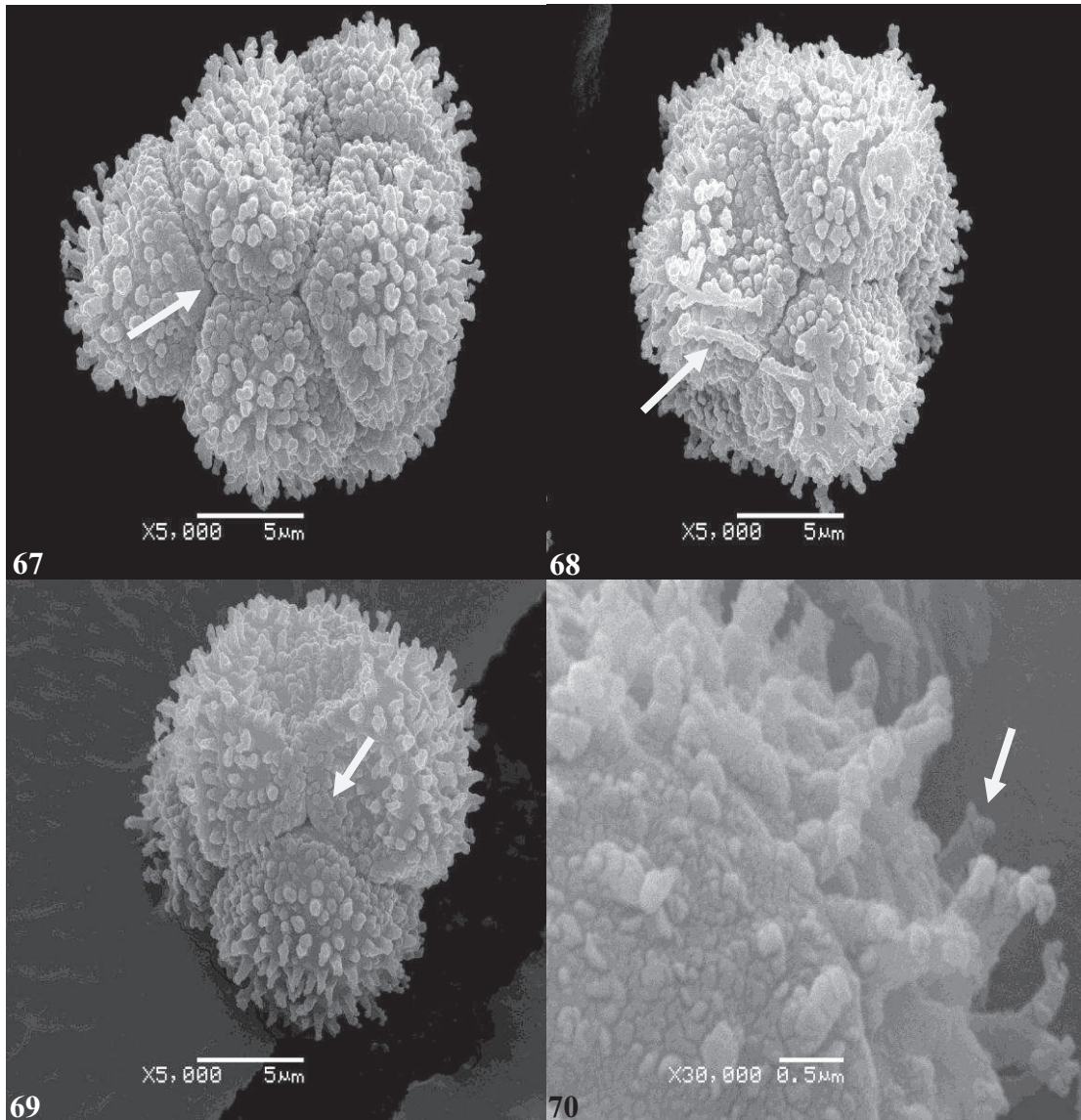
Badhamia sp. presenta grupos de 8-10 esporas fuertemente unidas (Fig. 67). Presentan proyecciones cónicas en forma de espinas muy gruesas sobre la superficie expuesta, las cuales llegan a fusionarse entre sí formando costillas (Fig. 68). Conforme se acercan al punto de unión entre dos esporas, la ornamentación forma una densa capa de verrugas (Fig. 69). En vista lateral, las espinas presentan los ápices bifurcados (Fig. 70).



Figs. 59-62. **59.** Grupos de esporas de *Badhamia capsulifera* (TLXM-974). **60.** Esporas libres que muestran una ornamentación que va de proyecciones espinosas en la superficie expuesta a prácticamente lisas en la superficie de contacto con las esporas contiguas (TLXM-974). **61.** Ápices de las espinas en forma de roseta (TLXM-974). **62.** Espora libre de *B.dubia* con ornamentación distribuida uniformemente y formada por proyecciones columnares capitadas (JDC-30).



Figs. 63-66. **63.** Esporas agrupadas de *Badhamia utricularis* (UTMC-744159). **64.** Protoplasto dentro de la espora (UTMC-744159). **65.** Esporas libres de *Badhamia utricularis* (UTMC-744159). **66.** Espinas capitadas uniformemente distribuidas (UTMC-744159).



Figs. 67-70. **67.** Grupos de esporas fuertemente unidas de *Badhamia* sp. (TLXM-735). **68.** Esporas con espinas unidas formando costillas (TLXM-735). **69.** Ornamentación formada por verrugas hacia el sitio de unión de las esporas (TLXM-735). **70.** Ápices bifurcados de las espinas (TLXM-735).

9. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE DE ESTUDIO

Badhamia sp.

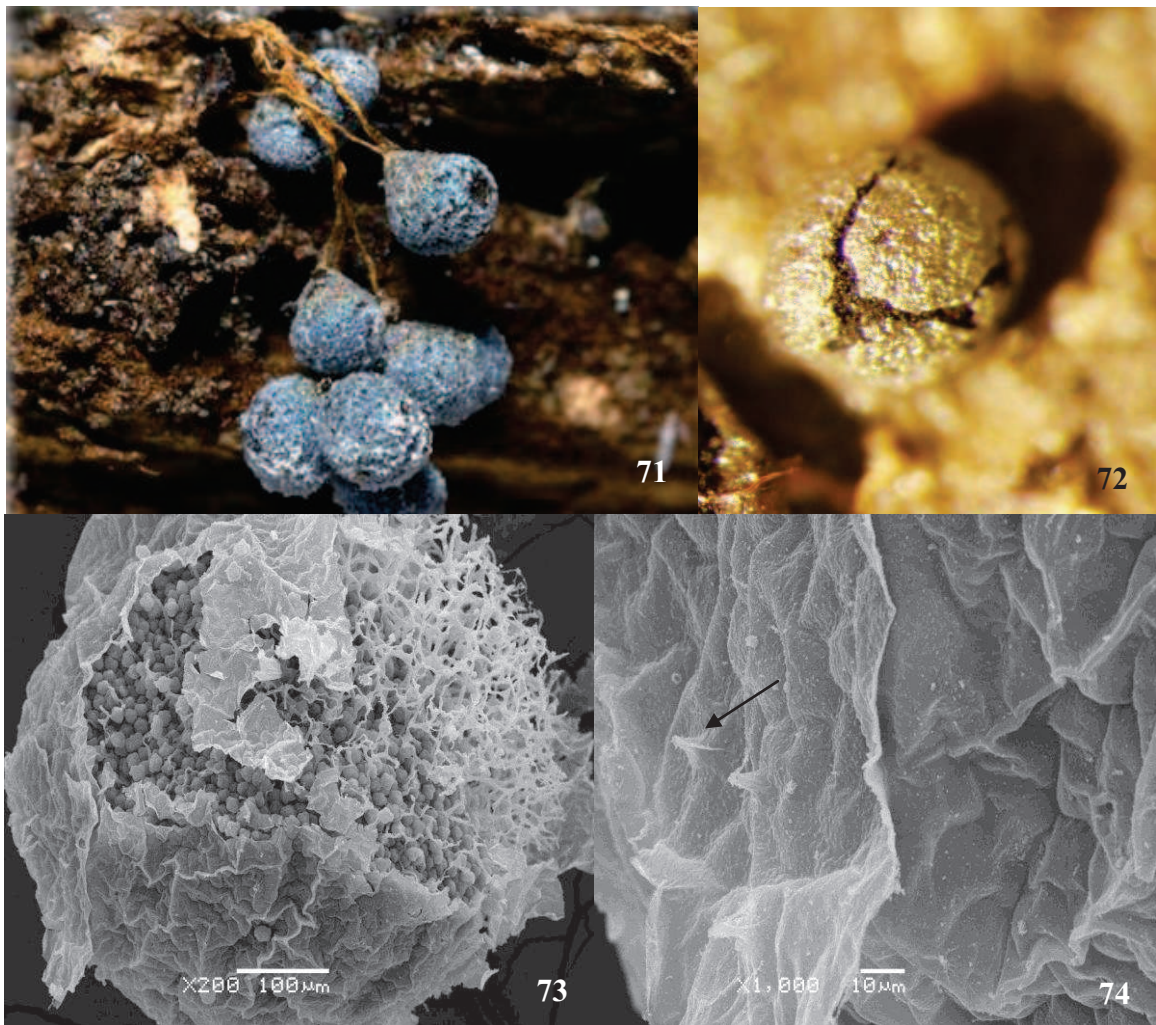
Fase esporulativa formada por esporocarpos estipitados, gregarios, de color amarillo pastel (Mn: 3A4). Esporocarpos subelípticos, obovados o subglobosos (Fig.71), globosos en vista apical (Figs. 72 y 73), de 0.5-0.8 mm de diámetro, y hasta 1.9 mm de altura total. Peridio aparentemente simple, formado por dos capas fuertemente adosadas difíciles de diferenciar pero claramente discernibles en microscopía electrónica (Fig.74) membranoso, blanquecino cuando está calcificado a transluciente cuando presenta poco carbonato de calcio, marcado con las impresiones de las esporas, iridiscente, con tonos de color rojo púrpura (Mn: 14A7), azul (Mn: 17B7) y amarillo cromo (Mn: 3A8). En MEB, la capa externa presenta unas proyecciones en forma de filamentos o espinas cónicas. Dehiscencia apical, irregular (Figs. 72 y 73). Estípites membranáceos, delgados, translucientes, a veces ligeramente aplanados y comunes a varios esporocarpos, largos, débiles, de color amarillo (MI: 5YR8/8). Hipotalo membranoso, hialino, poco conspicuo. Capilicio badhamioide, completamente calcificado (Fig. 75), formado por filamentos calcáreos (Fig. 76), formando una red tridimensional con mallas cerradas (Fig. 77), filamentos finos formados por agregaciones de gránulos de carbonato de calcio claramente visibles en MEB, con la superficie muy irregular debido a que presentan proyecciones de gránulos de carbonato de calcio (Fig.78) y con escasas expansiones en las uniones, de blanco a amarillo pastel (Mn: 3A4). Esporas de color negro (MI: 7.5YR2.5/0) por la luz reflejada, de color café rojizo (MI: 7.5YR6/4) por luz transmitida, agrupadas, los grupos muy compactos de 4–16 (-19) esporas (Fig. 79), fuertemente adheridos, ovoides de (9.5-) 9.8 (-11.3) μm x (7.8-) 10.8 μm de diám., ornamentadas con grandes espinas de (1.5-) 2.0 - 2.5 (-3.0) μm de longitud en la superficie expuesta, que se van haciendo más bajas hacia los puntos de unión con otras esporas. En MEB (Fig. 80), la ornamentación está constituida por espinas prominentes con ápices bifurcados, a veces fusionadas entre sí formando costillas, hacia los puntos de unión con otras esporas, la ornamentación se va haciendo más baja para formar verrugas densamente distribuidas sobre la superficie expuesta. En MET, la pared esporal está constituida por dos capas, la más externa gruesa, electrodensa y dando origen a

la ornamentación esporal, la más interna clara (Fig. 81), la capa electrodensa se comparte entre esporas adyacentes en sus puntos de unión de las superficies no expuestas (Fig. 82).

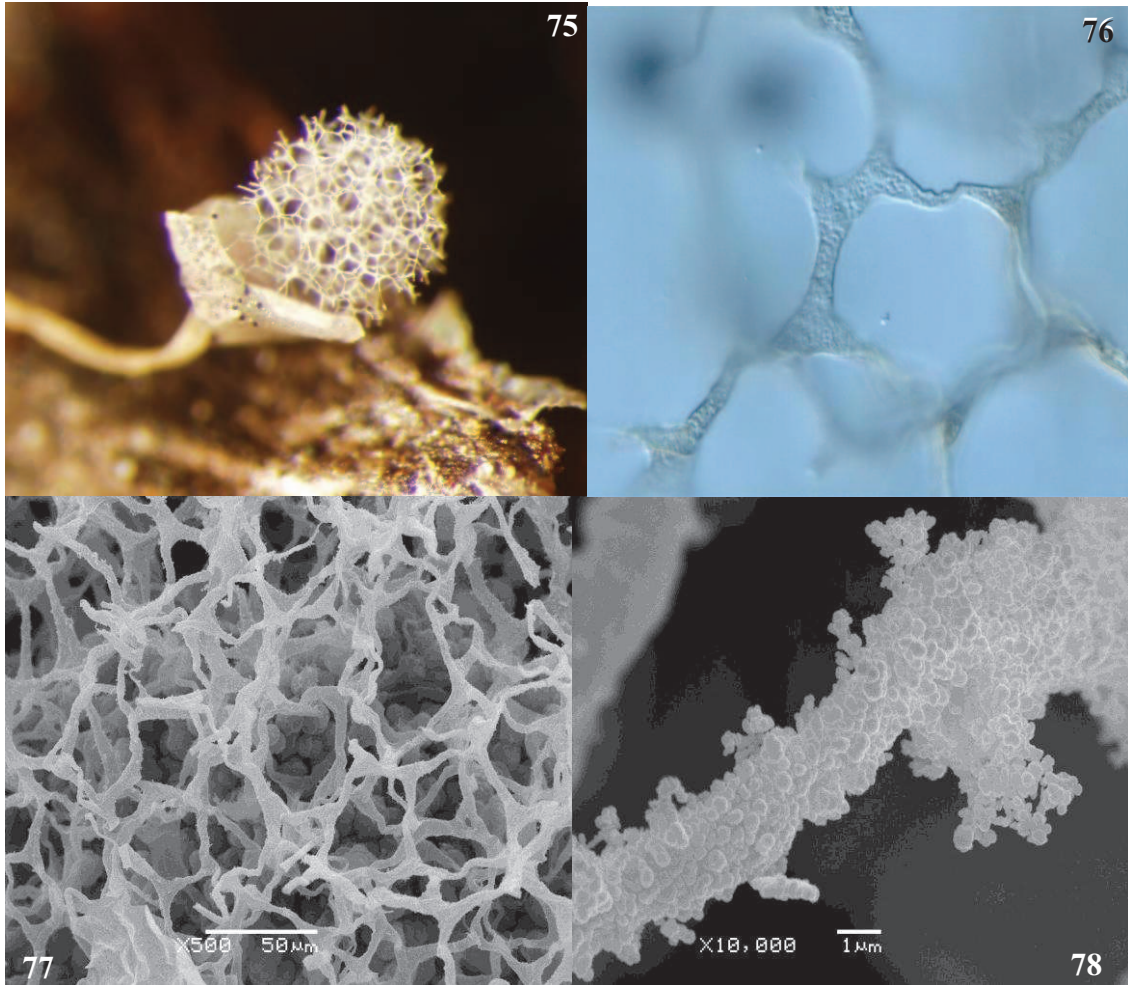
HÁBITAT: sobre hojarasca y madera en descomposición en bosques de *Pinus-Abies*, *Juniperus* y *Alnus*.

Localidades: Ixtacuixtla, Tlaxcala; Parque Nacional La Malinche en el Estado de Tlaxcala y Zacualtipan, Hidalgo.

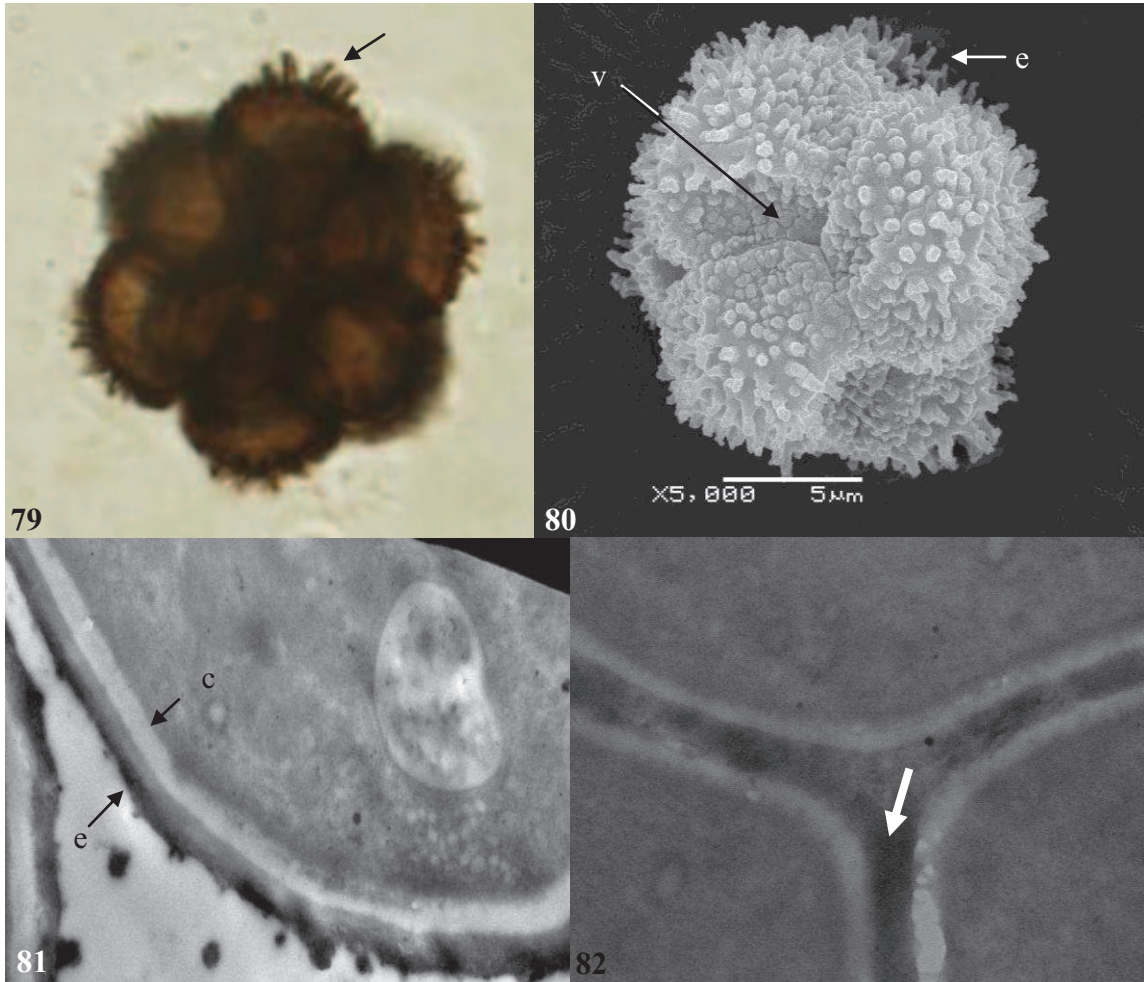
Material estudiado: TLXM-2218, TLXM-2219, TLXM-733, TLXM-34, TLXM-735, TLXM-736, TLXM-737, TLXM-789, TLXM-790



Figs. 71-74. *Badhamia* sp TLXM-790. **71.** Esporocarpos estipitados con peridio iridiscente. **72.** Dehiscencia apical de los esporocarpos. **73.** Esporoteca con capilicio, esporas y el peridio vistos al MEB. **74.** Superficie del peridio visto al MEB, con la doble capa del peridio ornamentada con proyecciones en forma de espinas de la capa peridial externa.



Figs. 75-78. **75.** Esporocarpo de *Badhamia* sp. en el que se observa el capilicio expuesto (TLXM-790). **76.** Filamentos calcáreos del capilicio en contraste interferencial de Nomarski (TLXM-790). **77.** Red capilicial formada por bandas finas y mallas muy cerradas (TLXM-790). **78.** Filamentos constituidos por gránulos de carbonato de calcio (TLXM-790).



Figs. 79-82. **79.** Grupo de esporas en microscopía de campo claro, con la prominente ornamentación espinosa de la superficie expuesta (TLXM-790). **80.** Grupo de esporas mostrando la ornamentación de la pared, MEB, (v) verrugas, (e) espinas (TLXM-790). **81.** Pared de las esporas de *Badhamia* sp., mostrando las dos capas en MET, (e) electrodensa, (c) clara (TLXM-790). **82.** Capa interna de la pared esporal compartida entre esporas adyacentes, MET (TLXM-790).

10. CONSIDERACIONES FINALES

Como ya se ha demostrado con anterioridad, existe una seria problemática en la circunscripción de especies de Myxomycetes, sobre todo en algunos géneros como *Badhamia* por los caracteres de especies similares morfológicamente muchas veces se sobrelapan y es difícil evaluar si las variaciones que se encuentran son derivados de cambios ambientales y otros factores que modifican su desarrollo, o están determinados genéticamente y son estables desde el punto de vista taxonómico. Debido a esto, se ha recomendado que antes de describir una especie aparentemente nueva, se deben considerar varios aspectos:

- a) Que los ejemplares proporcionen evidencia suficiente de que los caracteres que los distinguen son constantes entre todos los especímenes revisados, pero con diferencias con respecto a otras especies previamente descritas.
- b) Que se cuente con material de distintas localidades y de diferentes fechas de recolección.
- c) Que se utilicen técnicas como el cultivo de espora a espora para identificar los caracteres que se mantienen estables a través de las generaciones, además de considerar los cambios que se dan durante el desarrollo de la especie.
- d) Que se utilicen herramientas como la microscopía electrónica de transmisión y la de barrido que nos permite observar con mayor detalle las estructuras de los organismos y, en su caso, confirmar las diferencias entre taxones muy similares.
- e) Que se realicen, de ser posible, estudios moleculares que proporcionen mayor información sobre la especie.

En este estudio, se pudo definir la circunscripción taxonómica de la especie de interés a través de algunos de los cinco puntos propuestos. Se tienen suficientes colecciones de tres localidades distintas de dos estados de la República, en diferentes fechas de recolección, en

sustratos diferentes y procedentes de ambientes distintos. Estos ejemplares poseen, de manera constante, una combinación única de caracteres que la diferencian de otras especies previamente descritas.

Las observaciones con microscopía de campo claro realizadas con anterioridad indicaban que los especímenes correspondían con una nueva especie de *Badhamia*, hecho que fue confirmado a través de la información obtenida por medio de la microscopía electrónica, ya que se pudo constatar la presencia de estructuras que la diferencian de especies similares morfológicamente como *B. capsulifera* y *B. utricularis*. Estas características son el peridio iridiscente formado por una doble capa, con proyecciones sobre la superficie de la capa externa, el capilicio completamente calcificado formado por filamentos muy finos y con una malla muy cerrada, los grupos de esporas fuertemente unidos y la ornamentación de las esporas formada por largas espinas bifurcadas en el ápice en las superficies expuestas y verrugas hacia los puntos de unión con las otras esporas.

El cultivo de espora a espora es una técnica que permite comprobar si los caracteres diferenciales de una especie se mantienen estables a través de las generaciones. En nuestro caso, se obtuvo el ciclo completo de *B. melanospora*, confirmando la estabilidad de algunos de los caracteres de las esporas como su arreglo, color y ornamentación, pero definiendo también que otros caracteres, el tamaño de las esporas y los esporocarpos, varían dependiendo de las condiciones ambientales. Para la especie de *Badhamia* en estudio se pudo obtener en cultivo sólo parte del ciclo, resaltando que es la primera ocasión en la que se logra observar la germinación, formación de mixamebas, células flageladas, enjambres de mixamebas y plasmodios de una especie de *Badhamia* con esporas agrupadas (Haskins y cols. 2008), lo que podría aportar materiales biológicos para estudios posteriores de ultraestructura, fisiología, genética y biología molecular de estas fases del ciclo de vida. Lamentablemente, no se logró inducir la formación de esporocarpos de *Badhamia* sp. en el cultivo, lo que impidió verificar que caracteres se mantenían estables a lo largo de las generaciones.

11. CONCLUSIONES

Con la información recopilada en este trabajo, se puede concluir que el material de estudio constituye una nueva especie, ya que existen diferencias importantes que la separan de especies similares. La combinación de caracteres que hacen única a la especie aquí estudiada son los siguientes:

- Esporocarpos con estípites membranáceos, amarillos y con esporotecas poco calcificadas, iridiscentes.
- Peridio constituido de por dos capas fuertemente adheridas, claramente diferenciables en MEB.
- Presencia de proyecciones filamentosas o en forma de pequeñas espinas sobre la superficie de la capa peridial externa.
- Capilicio formado por una red de filamentos muy finos y con una malla muy cerrada.
- Grupos de esporas fuertemente unidos que comparten la pared esporal interna
- Ornamentación de las esporas formada por verrugas y espinas con ápices bifurcados y que llega a alcanzar hasta 2.5 μm de altura.

De acuerdo con esto, *Badhamia* sp. se distingue de *B. utricularis* y *B. versicolor* por sus grupos de esporas fácilmente separables, cuyo mecanismo de unión no implica la fusión de sus paredes. De *B. nitens* y *B. crasipella* se diferencia por que estas especies tienen peridio y capilicio completamente amarillo. *B. papaveracea* posee estípites de color oscuro, en tanto *B. dubia* tiene esporocarpos sésiles. *B. populina*, por su parte, tiene peridios fuertemente calcificados, mientras *B. capsulifera* se distingue por tener un capilicio con malla muy abierta, esporas con ornamentación formada por espinas menores a 0.4 μm de altura y nunca bifurcadas y peridio no ornamentado formado por una sola capa.

12. RECOMENDACIONES

- Se sugiere probar nuevos medios o condiciones de cultivo para tratar de obtener el ciclo de vida completo de *Badhamia* sp., así como repetir nuevamente el

procedimiento de cultivo *in vitro* probado en este estudio con el objeto de tratar de inducir la esporulación de los especie.

- Tratar de confirmar la estabilidad de los caracteres de la especie estudiada a través de la comparación de los caracteres de esporocarpos de diferentes generaciones, así como de la comparación de material de campo y de cultivo.
- Cultivar especies afines tales como *B. capsulifera*, *B. crasipella*, *B. dubia*, *B. nitens*, *B. papaveracea*, *B. populina*, *B. utricularis* y *B. versicolor* para comparar las diferentes fases de sus ciclos de vida con los de la especie aquí estudiada.
- Realizar estudios de la caracterización de la ultraestructura de otras fases del cultivo de vida, como mixamebas, células flageladas y plasmodios, para obtener mayor información sobre caracteres potencialmente útiles desde el punto de vista taxonómico.
- Realizar estudios de MEB y de MET de otras especies de *Badhamia* de esporas agrupadas no contempladas en el presente estudio (*B. crasipella*, *B. papaveracea*, *B. populina* y *B. versicolor*, entre otras)
- Obtener secuencias génicas de las unidades ribosomales como la 18S o los ITS, que aporten información sobre la variación genética y circunscripción de las especies, así como de su posición filogenética.

13. REFERENCIAS

Águila, V. 2008. **Análisis filogenético del género *Badhamia sensu Berkeley (Physarales, Myxomycetes) con base en caracteres morfológicos***. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala.

Aldrich , H.C y J.W. Daniel, 1982. **Cell biology of Physarum and Didymium**. Vol. I. Academic Press. New York-London.

Alexopoulos, C.J., 1960. Gross morphology of the plasmodium and its possible significance in the relationships among myxomyces. **Mycologia** **52**:1-20.

Biological Supply Company 1979. 2700 York Road, Burlington, NC

Blackwell, M. y C.J. Alexopoulos, 1975. Taxonomic studies in the Myxomycetes IV. *Protophysarum phloiogenum*, a new genus and species of Physaraceae. **Mycologia** **11**:139-149.

Blackwell, M, y R.L. Gilbertson, 1984. Distribution and sporulation phenology of Myxomycetes in the Sonoran Desert of Arizona. **Microbial Ecol.****10**: 369-377.

Braun, K.L. 1971. Spore germination time in *Fuligo septica*. **J. Sc** **71**: 304-309.

Buyck, B. 1988. The genus *Diderma* Persoon (Myxomycetes) in Belgium. **Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.** **52**: 165-209.

Carter, S. y N.E. Nannenga-Bremekamp, 1972. A new species of *Physarum* (Myxomycetes), with a note on the delimitation of the genera *Physarum* and *Badhamia*. **Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. C.** **75**: 326-330.

Cavalier-Smith, T. 1998. A revised six-kingdom of life. **Biol. Rev.** **73**: 203-266.

- Chacón, S. y G. Guzmán, 1984. Nuevas observaciones sobre los hongos, líquenes y myxomycetos de Chiapas. **Bol. Soc. Mex. Micol.** **19**: 245-252.
- Chapman, C.P., Nelson, R. K. y Orłowski, M. 1983. Chemical composition of the spore case of the acellular slime mold *Fuligo septica*. **Exp. Mycol.** **7**: 57-65.
- Clark, J., Donald, B. y Fu-Sen-Hu, 1990. Growth of the Myxomycetes *Stemonitis flavogenita* on a defined minimal medium. **Mycologia** **82**: 385-386.
- Clark, J., Haskins, E y Stephenson, S. 2003. Biosystematics of the myxomycete *Badhamia gracilis*. **Mycología** **95**:104-108.
- Cohen, A.L. 1941. Nutrition of the Myxomycetes. II Relations between plasmodia, bacteria and substrate in two-membered culture. **Bot. Gaz.** **103**: 205-223.
- Collins, R.O., 1979. Myxomycete Biosystematics: Some recent advances, developments and future research oportunities. **Bot. Rev.** **45**:145-201.
- Demaree, R. y D. Kowalski, 1975. Fine structure ok five species of Myxomycetes with clustered spores. **J. Protozool.** **22**: 85-88.
- Eliasson, U. 1981. Ultrastructure of peridium and spores in *Lycogala* and *Reticularia*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** **77**: 243-249.
- Estrada-Torres, A., C. Lado y M. Rodríguez-Palma. 2001. Two new species of Myxomycetes from a tropical deciduous forest of Mexico. **Mycologia** **93**: 744-750.
- Estrada-Torres, A., J.M. Ramírez-Ortega y C. Lado, 2003. *Calonema folicola* a new myxomyete from Mexico. **Mycologia** **95**: 354-359.

- Estrada-Torres, A., T. Gaither, D. Miller, C. Lado y H. Keller. 2005. The myxomycete genus *Schenella*: Morphological and DNA sequence evidence for synonymy with the gasteromycete genus *Pyrenogaster*. **Mycologia** **97**:139-149.
- Estrada-Torres, A., D. Wrigley de Basanta, E. Conde y C. Lado. 2009. Myxomycetes associated with dryland ecosystems of the Tehuacán-Cuicatlán Valley Biosphere Reserve, Mexico. **Fungal Diversity** **36**: 17-56.
- Evenson, A. E. 1961. A preliminary report of the Myxomycetes of southern Arizona. **Mycologia** **53**:136-144.
- Farr, M.L. 1961. *Badhamia decipens* reinstated in *Physarum*. **Brittonia** **13**: 339-345.
- Farr, M. L., 1976. **The Myxomycetes. In: Flora Neotropica.** Monografía No. 16. The New York Botanical Garden. Nueva York.
- Flores-Villela, O. y P. Gerez. 1994. **Biodiversidad y conservación en México: Vertebrados, vegetación y uso del suelo.** Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad-Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF.
- Gaither, W.T., 1976. Ultraestructura of the pseudocapillitium and spores of the Myxomycete *Lycogala epidendron*, Liceales. **Amer. J. Bot.** **63**: 705-709.
- García, E. 1981. **Aportación al conocimiento de los hongos del SE de España. Myxomycetes de la provincia de Albacete.** Universidad de Murcia Ciencias 37: 264-268.
- García, E. 1986. Myxomycetes quinófilos. **Collect. Bot.** **16**: 251-253.
- Gilbert, F. 1928. Factors influencing the germination of Myxomycetous spores. **Amer. J. Bot.** **16**: 280-286.

- Gilbert, F. 1928. Spore germination in the Myxomycetes: A comparative study of spore germination by families. **Amer. J. Bot.** **16**: 421-432.
- Gilert, E. 1987. Morphology and ultrastructure of the plasmodiocarpous species *Licea variabilis* and *L. retiformis* (Myxomycetes). **Nord. J. Bot.** **7**: 569-575.
- González-Santander, R. 1969. **Técnicas de Microscopía Electrónica en Biología**. Aguilar SA, Madrid.
- Gottsberger, G. 1971. Myxomyceten auf Bromeliaceen. **Nova Hedwigia** **22**: 489-501.
- Graeme, P.B. y P.M. Jerome. 1976. **Botanical microtechnique and citochemistry**. The Iowa State University Press. Ames, Iowa.
- Gray, W.D. y C.J. Alexopoulos, 1968. **The Biology of Myxomycetes**. Ronald Press. Nueva York.
- Harris, S. y I. Kalyanasundaram, 1983. The role of bacteria in the nutrition of myxomycete plasmodia on agar media. **Kavaka** **11**: 47-52.
- Haskins, E.F. y D. Wrigley de Basanta, 2008. Methods of agar culture of Myxomycetes: an overview. **Rev. Mex. Micol.** **27**: 1-7.
- Hatano, T y H. Keller. 2008. Spore ornamentation of selected *Badhamia* species using a scanning electron microscopy. **Bull. Shitennoji Univ.** **47**: 113-122
- Herrera, T. y M. Ulloa, 1990. **El reino de los hongos. Micología básica y aplicada**. UNAM-Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Ing, B 1994. The Phytosociology of Myxomycetes. **New Phytol.** **126**: 175-202.
- Ing, B. 1999. **The Myxomycetes of Britain and Ireland. An identification handbook**. Richmond Pub. Co. Ltd, Slough, UK.

Johansen S, K. Haugli, DH. Coucheron, J. Clark y EF. Haskins, 2002. Phylogeny of Myxomycetes based on combined nuclear SSU rDNA and LSU rDNA sequence data. **IV International Congress on Systematics and Ecology of Myxomycetes**. Bruselas, Bélgica. pp 44.

Kalyanasundaram, I. y R. Venkataramani, 1974. Media for the cultivation of Myxomycetes. **J. Indian Bot. Soc.** **5**: 201-205.

Keller, H.W. y K.L. Braun. **Myxomycetes of Ohio: Their systematic, biology and use in teaching**. Ohio Biological Survey, College of Biological Sciences, The Ohio State University, Columbus, OH.

Keller, H.W, U. Eliasson, K.L. Braun y M.J. Buben-Zurey. 1988. Corticolous Myxomycetes X: Ultrastructure and taxonomic status of *Cribraria minutissima* and *C. confusa*. **Mycologia** **80**:536-545

Keller,H. y J.D. Schoknecht, 1989a. Spore to spore culture of *Physarum spinisporum* and its transfer to *Badhamia*. **Mycologia** **81**: 631-636.

Keller,H. y J.D. Schoknecht, 1989b. Spore to spore cultivation of a new wrinkled-reticulate-spored *Badhamia*. **Mycologia** **81**: 783-789.

Keller, H. 1989c. Life cycle of a new annulate-spored species of *Didymium*. **Mycologia** **81**:248-265.

Keller, H. y S. Everhart, 2008. Myxomycetes species concepts, monotypic genera, the fossil record, and additional examples of good taxonomic practice. **Rev. Mex. Micol.** **27**: 9-19.

Kornerup, A. y J.H. Wanscher. 1978. **Methuen Handbook of Colour**. Methuen, Londres.

Lado, C y F. Pando, 1997. Myxomycetes. Ceratiomyxales, Echinosteliales, Liceales, Trichiales. Flora Micológica Ibérica Vol. 2. Real Jardín Botánico y J. Cramer. Madrid.

Lado, C. 2001. **Nomenmyx. A nomenclatural taxabase of Myxomycetes.** Cuadernos de Trabajo de Flora Micológica Ibérica 16. Consejo Superior de Investigaciones Cientificas Real Jardín Botánico, FARESO. Madrid.

Lado, C., J. Mosquera, A. Estrada-Torres y D. Wrigley de Basanta. 2007. Description and cultura of a new succulenticolous *Didymium* (Myxomycetes). **Micología 99:** 602-605.

Lado, C., D. Wrigley de Basanta, A. Estrada-Torres, E. Garcia, M. Aguilar y J.C. Hernández. 2009. Description of a new species of *Perichaena* (Myxomycetes) from arid areas of Argentina. **An. Jard. Bot. Madrid. 66:** 1- 6.

Lakhanpal, T.N. y K. J. Mukerjii, 1981. **Taxonomy of the Indian Myxomycetes.** Cramer, Vaduz.

Lister, A. 1925. **A monograph of the Mycetozoa.** British Museum. 3a. Ed. Londres.

Liu, Chin-Hui, 1990. Myxomycetes of Taiwan VI. *Badhamia gracilis*. **Taiwania 35:** 57-63.

Lizárraga, M, G. Moreno y C. Illana. 2006. *Macbrideola herrerae sp.nov.* a new Myxomycete from México. **Bol. Soc. Micol. Madrid 30:** 265-269.

Lyon, F. y Ch. Kramer, 1977. Preparing Myxomycete spores for SEM. **Mycologia 69:** 1045-1047.

Macbride T.H. 1889. **The North American slime-moulds. Being a list of all species of Myxomycetes hitherto described from North America, including Central America.** MacMillan Company. Nueva York.

Macbride, T.H. y G.W. Martin. 1934. **The Myxomycetes. A descriptive list of the know species with special reference to those occurring in North America.** The MacMillan Company. Nueva York.

Martin, G.W, y C.J. Alexopoulos,1969. **The Myxomycetes.** University of Iowa Academic Press, Iowa City

Martin, C.W., C.J. Alexopoulos y M.L. Farr, 1983. **The genera of Myxomycetes.** University of Iowa Academic Press, Iowa City.

Mims,W. 1971. An ultrastructural study of spore germination in the myxomycete *Arcyria cinerea*. **Mycologia** **63**: 586-601.

Mitchel, D.W. y N.E. Nannenga-Bremekamp, 1976. Myxomycetes collected in France and preserved in our private collections. **Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. Ser. C.** **79**: 381-392.

Moreno, G., M. Lizárraga y C. Illana. 2006. *Macbrideola lamprodermoides* sp. nov. a new Myxomycete from Mexico. **Bol. Soc. Micol. Madrid** **30**: 255-258.

Moreno, G., C. Rojas, S. Stephenson y H. Singer. 2009. A new species of *Lamproderma* (Myxomycetes) from Costa Rica. **Micol. Progress.**

Mosquera, J., C. Lado, A. Estrada- Torres y E. Beltran. 2000. *Trichia perichaenoides*, a new Myxomycete associated with decaying succulent plants. **Mycotaxon** **75**: 319-328.

Munsell, 1991. **Munsell Soil Color Chart.** Kollmorgen Corp., Baltimore.

Nannenga-Bremmekamp, N.E., 1991. **A guide to temperate Myxomycetes.** Biopress. Bristol.

- Novozhilov, Y., I. Zamlyanskaya, M. Schinttler y S. Stephenson. 2008. Two new species of *Perichaena* (Myxomycetes) from arid areas of Russia and Kazakhstan. **Mycología 100**: 810-812.
- Olive, L.S. 1970. The Mycetozoa: a revised classification. **Bot. Rev.** **36**: 59-89.
- Rammeloo, J. 1976. Notes concerning the morphology of some Myxomycete plasmodia cultured *in vitro*. **Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.** **109**: 195-206.
- Ramon, E. 1968. Myxomycetes of Israel. **Israel J. Bot.** **17**: 207-211.
- Randall, L.P. y D.L. Linch. 1974. Spore ultrastructural of the Myxomycete *Physarum polycephalum*. **Amer. J. Bot.** **61**: 513-524.
- Sanjida, H y I. Kalyanasundaram. 1983. The role of bacteria in the nutrition of Myxomycete plasmodia on agar media. **Kavaka 11**: 47-52.
- Schoknecht, J.D. y H. W. Keller. 1977. Peridial composition of white fructifications in the Trichiales (*Perichaena-Dianema*). **Canad. J. Bot.** **55**: 1807-1819.
- Setälä, A. y P. Nuorteva, 1989. High metal contents found in *Fulgio septica* (L) Wiggers and some others slime molds (Myxomycetes). **Karstenia 29**: 37-44.
- Smart, R.1938a. The reactions of the swarm-cells of Myxomyetes to Nutrient Materials. **Mycologia 30**: 254-264.
- Smart, R. 1938b. The reactions of Myxomycetes swarm-cells to temperature. **Amer. J. Bot.** 679-682.
- Stephenson, S.L. y S.M. Studlar. 1985. Myxomycetes fruiting upon bryophytes: coincidence or preference?. **J. Bryol.** **13**:549-562.

Stephenson, S.L., 1986. Myxomycetes associated with snowbanks in the northern Rocky Mountains. **West Virg. Acad.Sc. 58:** 16.

Stephenson, S.L., I.Kalyansundaram y T.N. Lakhanpal, 1993. A comparative biogeographical study of myxomycetes in the mid-Appalachians of eastern North America and two regions of India. **J.Biogeog. 20:** 645-657.

Stephenson, S.L. y A. Laursen. 1993. A preliminary report on the distribution and ecology of Myxomycetes in Alaskan tundra. *En: Arctic and Alpine Mycology 3.* **Biblioth. Mycolog. 150:** 251-257.

Stephenson, S. L. y Stemplen, 1994. **Myxomycetes: a Handbook of Slime Molds.** Timber Press, Portland, Oregon. 183 pp.

Stephenson, S.L. y G. Moreno. 2006. A new species of *Didymium* (Myxomycetes) from subantarctic Macquarie Island. **Mycol. Progress 5:** 255-258.

Toledo, V.M., 1988. La riqueza biológica de México. **Ciencia y Desarrollo 14:**17-30.

Van Hooff, J.M.P. 2009. *Cribraria tecta*, a new Myxomycete from Vietnam. **Biol. Soc. Micol. Madrid 33:** 129-133.

Wollman, C y C. Alexopoulos.1964. Spore to spore cultivation in Agar Culture of three Myxomycetes: *Comatricha laxa*, *Perichaena depressa* and *Licea biforis*. **The Southwestern Naturalist 9:** 160-165.

Wollman, C. 1966. **Laboratory culture of selected species of Myxomycetes with special reference to the gross morphology of their plasmodia.** Ph. D. Thesis. University of Texas.

Wollman, C., 1967. The plasmodium of the myxomycete *Licea biforis* in agar culture. **Mycologia 59:** 423-430.

Wrigley de Basanta y Haskins, 2008. Morphology and life cycle of a new species of *Didymium* (Myxomycetes) from arid areas of Mexico. **Mycologia** **100** (6): 921-929.

Yang, B. 1970. Ultrastructure of spores and plasmodium of *Reticularia lycoperdon*. **Mycologia** **15** (2): 211-215.