

Universidad de El Salvador
Facultad de Ciencias Naturales y Matemática
Escuela de Física



Trabajo de graduación
“Caracterización ópticas de micorrizas arbusculares”

Presentado por
Edwin Adverdi Pérez Ventura

Para optar al grado de
Licenciado en Física

Docentes directores
Carlos Ernesto Rudamas Flores

Beatriz Dreyer

Ciudad Universitaria, Diciembre de 2013

Aprobación de docentes directores:

Prof. Dr. Carlos Ernesto Rudamas Flores

Prof. Dra. Beatriz Dreyer

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RECTOR:

Ing. Mario Roberto Nieto Lovo

SECRETARIA GENERAL:

Dra. Ana Leticia Zavaleta de Amaya

FISCAL GENERAL:

Lic. Francisco Cruz Letona

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y
MATEMÁTICAS:

M. Sc. Martín Enrique Guerra Cáceres

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE FÍSICA:

M. Sc. Victor Laureano Cortez Lara

Ciudad Universitaria, Diciembre 2013

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo de Investigaciones Científicas de la Universidad de El Salvador (CIC-UES), con los proyectos:

- **05.31.** Espectroscopia óptica de absorción diferencial (DOAS) para la medición de la contaminación atmosférica en El Salvador.
- **06.18.** Estudio de caracterización de las micorrizas de la flora amenazada o en peligro de extinción de El Salvador y puesta a punto de protocolos de micorrización y micro-propagación para programas de revegetación con *Acrocomia mexicana* Kar. ex Mart. y *Brahea salvadorensis* H. Wendl. Ex Becc.
- **09.19.** Mejora del valor nutritivo de los alimentos de procedencia vegetal mediante micorrización controlada y evaluación de la respuesta micorrícica mediante técnicas de fotoluminiscencia para corregir deficiencias nutricionales en la población salvadoreña.
- **09.20.** Preparación y caracterización de nano-estructuras semiconductoras para aplicaciones fotovoltaicas en El Salvador

Se agradece al grupo de investigación del profesor Carlos Rudamas, en especial al Dr. Carlos Rudamas y al Br. Rafael Nolasco por la colaboración en la revisión y discusión de este trabajo. También, se le agradece al grupo de investigación de micorrizas de El Salvador principalmente a la Dra. Beatriz Dreyer, por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo y a la Lic. Claudia Rivera, por la ayuda constante en la toma de fotografías a esporas de hongos micorrícicos arbusculares; Dr. Salvador Miranda, ex-director del Centro de Investigaciones y Desarrollo en Salud (CENSALUD) por permitirnos utilizar las instalaciones y equipo necesario; al Dr. Rafael Gómez Escoto, ex-decano de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas; M. Sc. Victor Cortez, director de la Escuela de Física y M. Sc. Martín Guerra, decano actual de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas; por autorizar los permisos necesarios para ingresar a la Universidad de El Salvador en días no hábiles. También, se agradece a la Br. Alejandra Hernández por la elaboración de figuras y diagramas

de bloques para las técnicas experimentales, que se han utilizado en este trabajo; a la Lic. Delmy Hernández por facilitar el préstamo de equipo y materiales, en la Facultad de Química y Farmacia.

Índice general

Agradecimientos	I
Índice general	III
Índice de figuras	V
Índice de tablas	VIII
Resumen	IX
Introducción	XI
1. Fundamento teórico	1
1.1. Micorrizas arbusculares	1
1.2. Interacción de la radiación con la materia	5
1.2.1. Absorción	6
1.2.2. Fotoluminiscencia	8
1.3. Antecedentes y estado del conocimiento	9
2. Experimento	16
2.1. Preparación de muestras	16
2.1.1. Extracción de esporas	16
2.1.2. Extracción de glomalina	17
2.2. Técnicas experimentales	19
2.2.1. Espectroscopia de absorción	19

2.2.2. Fotoluminiscencia y micro-fotoluminiscencia	20
2.2.3. Espectrógrafos de absorción y luminiscencia	24
3. Resultados y discusión	26
3.1. Absorción, micro-fotoluminiscencia y fotoluminiscencia en esporas	26
3.1.1. Absorción en esporas de hongos MA	30
3.1.2. Micro-fotoluminiscencia y fotoluminiscencia en esporas de hongos MA	31
3.2. Absorción y fotoluminiscencia de glomalina	39
3.2.1. Glomalina fácilmente extraíble	39
3.2.2. Glomalina extraída con el método de Driver.	42
4. Conclusiones y recomendaciones	56
4.1. Conclusiones	56
4.2. Recomendaciones	57
Bibliografía	59
Anexos	63

Índice de figuras

1.1. Figura que representa una micorriza arbuscular y sus componentes	2
1.2. Interacción de la radiación (espectro visible) con la materia	6
1.3. Diagrama de Perrin-Jablonski	7
1.4. Sistema de dos niveles de energía	7
1.5. Espectros de emisión y excitación para una vesícula y quitina.	10
1.6. Fotografía de hifas y arbusculos de hongos micorrícicos arbusculares emitiendo.	11
1.7. Fotografías de emisión de hifas y arbusculos de hongos micorrícicos arbusculares.	12
1.8. Fotografía de emisión de coil, arbusculos y esporas de hongos micorrícicos arbusculares de la especie <i>Glomus intraradices</i>	13
1.9. Fotografía de emisión de coil, arbusculos y esporas de hongos micorrícicos arbusculares de la especie <i>Glomus mosseae</i>	14
1.10. Espectro de emisión de arbusculos de hongos micorrícicos arbusculares. . . .	14
2.1. Tamizado húmedo	17
2.2. Esquema de bloque del montaje experimental para medir espectros de absorción	19
2.3. Esquema de bloque del montaje experimental para medir espectros de fotolu- miniscencia	21
2.4. Espectro de transmisión del filtro U340	21
2.5. Espectro de transmisión del filtro BP35	22
2.6. Esquema de bloque del montaje experimental para medir espectros de Micro- fotoluminiscencia	22
2.7. Excitación y emisión del set de filtros del microscopio de epifluorescencia . .	23

2.8. Transmitancia de portaobjeto y cubreobjeto, donde se colocaron esporas para ser observadas en microscopios	24
2.9. Partes internas del espectrógrafo USB4000	24
2.10. Respuesta espectral del detector CCD Toshiba TCD130AP	25
3.1. Fotografía de esporas de la especie <i>Glomus caledonium</i>	27
3.2. Fotografía de espora de la especie <i>Glomus mosseae</i>	28
3.3. Fotografía de espora de la especie <i>Glomus intraradices</i>	29
3.4. Espectro de micro-fotoluminiscencia del citoplasma y pared celular de espora de especie desconocida	30
3.5. Espectro de absorción en esporas de hongos micorrícicos arbusculares	31
3.6. Espectro de micro-fotoluminiscencia en esporas de la especie <i>Glomus intraradices</i>	33
3.7. Simulación de banda gaussiana a un espectro de micro-fotoluminiscencia de esporas de la especie <i>Glomus intraradices</i>	34
3.8. Espectros de micro-fotoluminiscencia para varias especies de esporas	35
3.9. Espectros de fotoluminiscencia en esporas de la especie <i>Glomus caledonium</i> , excitando con diferentes longitud de onda	37
3.10. Comparación de fotoluminiscencia en esporas	39
3.11. Espectro de absorción y emisión para el extracto de glomalina fácilmente extraíble para raíces, suelo y esporas	41
3.12. Espectro de absorción y emisión de la glomalina. Glomalina extraída utilizando el protocolo de Driver.	43
3.13. Comparación de fotoluminiscencia de glomalina extraída de suelo utilizando los protocolos glomalina fácilmente extraíble y Driver.	45
3.14. Comparación de fotoluminiscencia de glomalina extraída de raíces utilizando los protocolos glomalina fácilmente extraíble y Driver.	46
3.15. Comparación de fotoluminiscencia de glomalina extraída de suelo y raíces utilizando el protocolo de Driver.	47
3.16. Comparación de fotoluminiscencia en las diferentes separaciones de glomalina extraída de raíces utilizando el protocolo de Driver.	48
3.17. Espectros normalizados de fotoluminiscencia en las diferentes separaciones de glomalina extraída de raíces utilizando el protocolo de Driver.	49

3.18. Comparación de fotoluminiscencia de glomalina extrída de esporas utilizando los protocolos de glomalina fácilmente extraíble y Driver.	50
3.19. Comparación de fotoluminiscencia de glomalina extrída de esporas y raíces utilizando el protocolo de Driver.	51
3.20. Comparación de fotoluminiscencia de esporas y glomalina extraída de esporas de hongos MA	52
3.21. Deconvolución gaussiana a fotoluminiscencia de esporas de hongos micorrícios arbusculares	53
3.22. Deconvolución gaussiana a fotoluminiscencia de glomalina extraída de esporas de hongos micorrícios arbusculares con el protocolo de glomalina fácilmente extraíble	54
3.23. Espectro de absorción de esporas y glomalina extraída de esporas de la especie <i>Glomus intraradices</i>	55
4.1. Espectro de emisión de la lámpara de deuterio	63
4.2. Espectro de emisión de la fuente de luz de mercurio	64
4.3. Absorbancia de la extracción de glomalina extraída de esporas de cuatro especie utilizando el protocolo de Driver.	65
4.4. Microfotoluminiscencia de esporas de la especie <i>Glomus caledonium</i> excitando con dos longitudes de onda	66

Índice de tablas

1.1. Tipos de luminiscencia	8
1.2. Máximos de emisión vesícula, arbusculos y esporas de hongos micorrícicos arbusculares.	15
3.1. Máximos de emisión para la glomalina fácilmente extraíble	42
3.2. Máximos de emisión para la glomalina extraída con el protocolo de Driver .	44

Resumen

El objetivo del presente estudio fue caracterizar la absorción y emisión de esporas de cinco especies de hongos micorrícicos arbusculares (MA), las especies estudiadas fueron *Glomus intraradices*, *G. mosseae*, *G. caledonium*, *Scutellospora cerradensis* y una especie desconocida nativa de El Salvador. Además, se caracterizó específicamente la glomalina, una glicoproteína constituyente del citoplasma y de la pared celular de los hongos MA. La glomalina, fue extraída de esporas de las cinco especies estudiadas, raíces y suelo.

Los métodos utilizados para las extracciones de muestras fueron: para esporas de hongos MA se utilizó suelo de la rizosfera de una planta (para esporas de especie desconocida), para las esporas de especie ya identificadas se utilizaron inóculos puros donde fueron propagadas las especies de hongo conocidas; luego se modificó el método propuesto por J. W. Gerdemann y T. H. Nicolson en el año de 1963 que consiste en decantación y tamizado húmedo para extraer esporas de hongos MA, la modificación consistió en no hacer centrifugar en sacarosa el material tamizado. Para la extracción de glomalina se utilizaron dos protocolos, el primero de ellos fue el de extracción de glomalina fácilmente extraíble propuesto por Wright, S. y F. Upadhyaya en el año de 1996; el segundo fue el protocolo propuesto por Driver et al. en el año 2005.

Los resultados muestran que todas las especies de hongos MA estudiadas en este trabajo de investigación, tienen la misma absorción y emisión, por lo tanto no se puede diferenciar entre una especie y otra de hongos MA con la emisión o absorción de ellos. Por otra parte, los espectros de absorción y emisión de la glomalina, son muy similares a los de esporas de hongos MA.

En los resultados obtenidos, se puede concluir que la glomalina es uno de los componentes responsables en la emisión de esporas de hongos MA. No se descarta que otros componentes que estén tanto en la pared celular como en el citoplasma también contribuyan. Para futuras investigaciones sería necesario estudiar otros componentes presentes en la pared celular y el

citoplasma, como la quitina y glucanos. Se podría estudiar con extractos o simulando espectros de absorción y luminiscencia, para observar si hay algún aporte en la luminiscencia de hongos MA. Además, de realizar un estudio más profundo a la glomalina.

Introducción

Esta investigación tiene como objetivo caracterizar la fuente o las posibles fuentes de emisión de hongos micorrícicos arbusculares (MA). La palabra micorriza significa hongo-raíz y se usa para definir la asociación simbiótica formada entre algunos hongos y las raíces de las plantas [1, 2]. Los tipos de micorrizas que más se han estudiado a nivel mundial son las ectomicorrizas y las micorrizas arbusculares (MA) [2]. Estas últimas se establecen entre hongos de la división *Glomeromycota* y la mayoría de las especies vegetales [1].

Algunos de los beneficios de los hongos MA es la utilización como biofertilizantes, bioprotectores y biorremediadores [2–7]. Por otra parte, la introducción de hongos MA en los suelos de cultivos agrícolas y forestales, mejora el crecimiento y la tolerancia de las plantas frente a problemas de salinidad y sequía [2]. A pesar de las numerosas ventajas que presentan los hongos MA, en El Salvador no se han realizado estudios sobre ellos, a pesar que hay estudios donde se reporta que cuarenta municipios de El Salvador están amenazados por desertificación [8]. Los hongos MA podrían ayudar a frenar la erosión y contribuir a la estructura del suelo [2].

En la actualidad para detectar hongos MA se utilizan métodos invasivos, como tinciones que luego de teñir el material no se puede seguir utilizando para otros fines [9]. Pero, sin embargo, existen características de los hongos MA que podrían ser aprovechadas para una detección no invasiva e *in situ*, como por ejemplo las propiedades ópticas de sus componentes. Se sabe que las estructuras de hongos MA emiten luz, pero el origen de la emisión todavía está en discusión [10–15]. La caracterización de la emisión, podría utilizarse en un futuro en sensores ópticos para detectar hongos MA y medir niveles de micorrización *in situ*.

En este proyecto de graduación se estudiaron la absorción y luminiscencia de esporas de hongos MA utilizando espectroscopia óptica, intentando dilucidar el origen de la emisión. Además, como objetivo general se planteó caracterizar el origen de la emisión de estructuras de hongos MA utilizando técnicas de espectroscopia óptica para su posible aplicación en la

determinación de niveles de micorrización en plantas. También, se plantearon objetivos específicos que eran optimizar la técnica de espectroscopia de absorción, fotoluminiscencia y microfotoluminiscencia en el laboratorio de espectroscopia óptica de la Escuela de Física de la Universidad de El Salvador; medir espectros de absorción y emisión de estructuras MA; medir espectros de absorción y emisión de los componentes de los hongos MA y susceptibles de ser medidos con técnicas de espectroscopia óptica. Para ello se procedió a la observación y caracterización de estructuras enteras. Además, se extrajo glomalina, ya que las estructuras micorrícicas poseen dicho componente [16].

Los resultados obtenidos en esta investigación contribuirán a la discusión sobre el origen de la emisión de estructuras micorrícicas arbusculares. Las cinco especies estudiadas presentan una similitud en los espectros de absorción y emisión. Además, se observa emisión en partes del hongo donde aún no había sido reportada.

Este trabajo está dividido en cuatro capítulos y contiene las partes que estipula el “Normativo de trabajos de graduación de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática”. En el primer capítulo se presenta la teoría necesaria en esta investigación. A continuación, en el segundo capítulo, se describe todo sobre los montajes experimentales y las técnicas de extracción de algunos componentes de las esporas de hongo MA; el tercer capítulo muestra los principales resultados que se obtuvieron en esta investigación y para terminar, en el cuarto capítulo, se presentan las conclusiones y recomendaciones para investigaciones futuras. Todos los capítulos antes mencionados fueron elaborados como lo sugiere Sampieri et al. 1997 en su libro de “Metodología de la investigación” [17].

Capítulo 1

Fundamento teórico

En el presente capítulo se muestra la teoría básica sobre micorrizas arbusculares, donde se detallan algunos componentes presentes en hongos, como quitina, glucanos y glomalina. Posteriormente, se describe la interacción de la radiación con la materia, detallando los fenómenos de absorción y fotoluminiscencia. Para terminar, se resumen los antecedentes previos a la ejecución de este trabajo de investigación.

1.1. Micorrizas arbusculares

La palabra micorriza es de origen griego y se utiliza para referirse a la asociación simbiótica entre hongos (*mycos*) y raíces (*rhizos*) de plantas [1].

En la actualidad se conocen siete tipos de micorrizas: Micorrizas arbusculares, ectomicorrizas, ectendomicorrizas, arbutoides, monotropoides, ericoides y orquidioides [1]. Los tipos de micorrizas que más se han estudiado a nivel mundial son las ectomicorrizas y las micorrizas arbusculares (MA) [1, 2, 18]. Las MA constituyen la relación simbiótica más extendida sobre la Tierra, formadas entre hongos de la división *Glomeromycota* y la mayoría de plantas [1, 18]. En esta relación, se produce transporte de nutrientes, beneficiando a ambos simbios. La planta le transfiere productos fotosintéticos al hongo a cambio de la adquisición de compuestos minerales del suelo, a través del micelio [2].

Las MA se forman en una variedad de plantas hospedadoras y tienen cuatro componentes importantes: la raíz, las estructuras de hongos dentro y entre las células de la raíz (hifa intrarradical), un micelio extrarradical en el suelo y la interfaz [1, 18]. Las estructuras más

comunes que poseen las MA son esporas, coils, arbuscúlos y vesículas (véase figura 1.1).

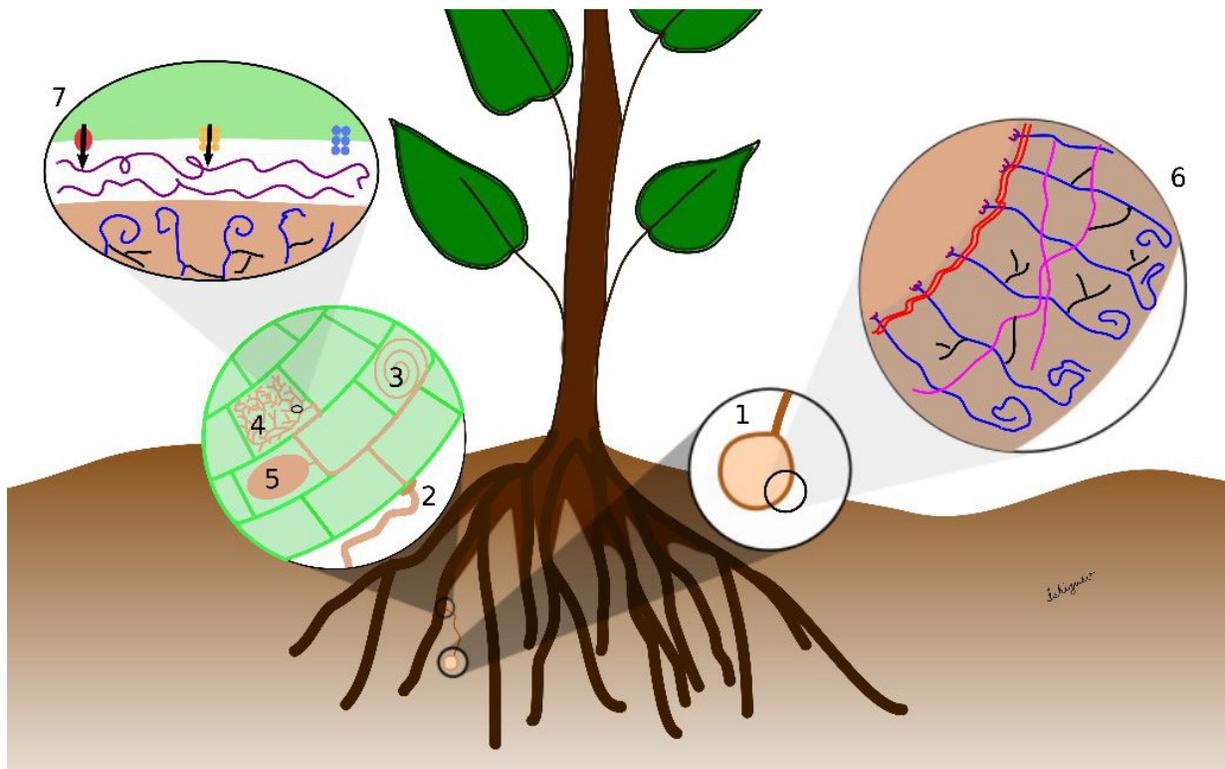


Figura 1.1: Representación de una planta y sus raíces, que muestra las estructuras formadas por hongos micorrícicos arbusculares (MA). Se muestran algunos componentes presentes en hongos MA. 1, espora; 2, apresorio; 3, coil o hifa tirabuzón; 4, arbuscúlo; 5, vesícula; 6, componentes de la pared celular del hongo, violeta anclas amarradas a la membrana plasmática, rojo quitina, azul proteínas, negro oligosacáridos enlazados con N y O, magenta $\beta(1,3)$ glucano; 7, interfaz de la pared celular del hongo con la pared celular vegetal, violeta $\beta(1,4)$ glucano, rojo ATPasa, amarillo transporte de glucosa, azul claro transporte de agua. Figura elaborada por Alejandra Hernández.

La formación de MA implica una serie de pasos que parten del reconocimiento de la raíz por el hongo (diálogo molecular hong-raíz), formación de un apresorio para la penetración en las células epidérmicas; después de la penetración a la raíz la hifa se desarrolla en el cortex radical para la formación de arbuscúlos, vesícula y coils (véase figura 1.1). Las esporas formadas por hongos MA, dependiendo de la especie pueden tener un diámetro entre $30 \mu m$ - $500 \mu m$ [1]. Estas estructuras se caracterizan por el almacenamiento de lípidos y algunos hidratos de carbono. Las paredes celulares son gruesas conteniendo quitina y en algunos casos poseen $\beta(1,3)$ glucano (véase figura 1.1). Cuando las esporas germinan, hay crecimiento de hifas extraradicales [1].

Para el desarrollo de las estructuras internas, la hifa extraradical debe entrar en contacto con la raíz en la superficie de la rizodermis, esto es llamado apresorio (véase figura 1.1). Las hifas intrarradicales son capaces de formar otras estructuras de hongos dentro de la raíz [18]. Por ejemplo, en la micorriza tipo-*Arum*, la hifa penetra a través de las paredes de las células corticales y se ramifica en repetidas ocasiones formando arbusculos [1, 18, 19]. En el tipo-*Paris* se desarrollan pequeñas ramificaciones laterales formando coils o arbusculos [18]. Las hifas intrarradicales también pueden formar vesículas intracelulares o intercelulares [1, 18, 19].

Los arbusculos se caracterizan por las ramificaciones que presentan intracelularmente (véase figura 1.1), las ramificaciones de los arbusculos son envueltas por una membrana periarbuscular [18]. A través de esta superficie entre la membrana periarbuscular y la pared celular del hongo denominada interfaz, se produce el mayor intercambio de nutrientes [18]. Cada arbusculo formado en una raíz tiene una vida corta, por lo que, es posible que los nutrientes también sean liberados en el momento que se degrade el arbusculo [18].

Las vesículas (véase figura 1.1) son estructuras de almacenamiento de grandes cantidades de lípidos y pueden actuar como propágulos para el hongo [18]. No todos los géneros forman vesículas, por ejemplo *Gigaspora* y *Scutellospora* no forman vesículas [1, 18]. La formación de vesículas generalmente sigue a la de los arbusculos [18]. El desarrollo de la vesícula consiste en el ensanchamiento de una hifa seguida por la modificación en el citoplasma y la pared celular del hongo [18].

Los géneros de *Gigaspora* y *Scutellospora*, forman células auxiliares en el micelio extrarradical [18]. Las células auxiliares almacenan grandes cantidades de lípidos y son multinucleadas [18].

El micelio extrarradical de MA, como las de otros tipos de micorrizas, ha sido muy difícil de estudiar debido a la heterogeneidad del suelo y la localización de la hifa formando la red del micelio [18]. El micelio extraradical tiene varias funciones, la más importante es la captación y transferencia de nutrientes minerales como el fósforo de la solución del suelo a las raíces [18].

Los componentes presentes en hongos MA, pueden ser localizadas en la pared celular del hongo, citoplasma y en la interfaz entre la pared celular del hongo y la membrana periarbuscular [20–22].

Componentes de la pared celular e interfaz de los hongos MA

En general, la pared celular de los hongos MA es una estructura con gran plasticidad, que le da forma al hongo, controla la permeabilidad y lo protege de los cambios osmóticos [20]. La mayor parte de la pared celular está compuesta por glucanos, quitina y glucoproteínas [20,21] (véase figura 1.1).

El glucano es el polisacárido estructural más importante de la pared celular y representa entre 50 % a 60 % del peso seco de esta estructura [20,21]. El $\beta(1,3)$ glucano es el componente estructural más importante de la pared, al que se unen covalentemente otros componentes de estas estructuras [20].

La quitina es un polisacárido compuesto de unidades de N-acetilglucosamina y representa entre el 1 % a 2 % del peso del hongo [20,21]. Éstas están unidas entre sí con enlaces $\beta(1,4)$, de la misma forma que las unidades de glucosa componen la celulosa [21]. El contenido en quitina de la pared celular del hongo varía según la fase morfológica del hongo [20].

En la pared celular las proteínas representan el 30 – 50 % del peso [20–22]. La mayoría de las proteínas están asociadas a carbohidratos por enlaces de *O* o *N*, formando glicoproteínas [20]. En la pared celular las proteínas tienen diversas funciones, interviniendo en los procesos de adhesión y protegiendo a la célula de sustancias extrañas [20]. Una supuesta glicoproteína hidrofóbica producida por hongos MA es la glomalina [23]. Esta proteína primeramente se estudió en suelos donde se encontraron altas concentraciones, pero se ha publicado que también se encuentra como componente en la pared celular y citoplasma de hongos MA [24,25]. La estructura bioquímica de la glomalina se está empezando a estudiar [25–27].

La glomalina es una glicoproteína insoluble, que en un principio se suponía que era producida por hifas de hongos MA [27]. En la actualidad se sabe que la glomalina la producen los hongos MA [16]. Se ha reportado que la glomalina está presente tanto en el citoplasma como en la pared celular de los hongos MA [16]. La glomalina fue identificada por primera vez en el departamento de agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture: UDSA) [23,27]. La glomalina es cuantificada del suelo como: glomalina relacionada con proteínas del suelo (glomalin-related soil protein: GRSP) [28]. Además, se supone que la glomalina puede actuar como un pegamento con propiedades hidrófobas para evitar la erosión en suelos [28]. Por otra parte, se ha reportado que la glomalina esta fuertemente unida a las hifas de hongos MA [24]. Los protocolos más usados para la extracción de glomalina,

consisten en autoclavar suelo en citrato de sodio [23, 29]. Posteriormente de la extracción, se realiza un ensayo de proteínas de Bradford o inmunoabsorbente ligado a enzima (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) [23, 29].

Otros componentes químicos presentes en raíces micorrizadas

En la interfaz de la pared celular con la pared vegetal es donde se produce el intercambio de nutrientes entre el hongo y la raíz [22]. Comparados los componentes existentes en las hifas extraradicales con las intraradicales, componentes que están presentes por el lado del hongo son quitina, $\beta(1, 3)$ glucano y glicoproteínas [22].

En la interfaz (hongo-raíz) podemos mencionar que se encuentra $\beta(1, 4)$ glucano y se lleva a cabo el transporte de glucosa, también el transporte de agua (véase figura 1.1) [22].

Muchas plantas forman una coloración amarilla en las raíces, cuando éstas son colonizadas por hongos MA [30]. La coloración amarilla es conocida como pigmento amarillo [30, 31]. Por otra parte, se ha reportado que el pigmento amarillo contiene el apocarotenoide llamado micorradicina (un acíclico C_{14} polieno) y blumenol (un C_{13} diglucósido ciclhexenona) [32]. El pigmento amarillo es soluble en compuestos polares como el metanol [30, 32]. Además, el pigmento amarillo es visible como pequeñas gotas cerca de los arbusculos, entre 3 a 4 semanas después de la colonización [31]. Durante el desarrollo de la planta, el pigmento amarillo se extiende por todas las células de la corteza (con excepción de la exodermis) y la endodermis, mientras que las otras partes permanecen sin pigmentación [31].

1.2. Interacción de la radiación con la materia

Cuando las ondas electromagnéticas inciden sobre un sistema molecular, pueden manifestarse los fenómenos de absorción, fotoluminiscencia y dispersión (véase figura 1.2).

La absorción o absorbancia es la relación entre la intensidad de luz incidente (I_0) con la intensidad de luz transmitida (I), la fotoluminiscencia es la emisión de luz cuando hay una recombinación en los estados electrónicos y la dispersión que puede ser de tres tipos, Mie, Rayleigh y Raman. La dispersión Mie surge cuando la longitud de onda dispersada es aproximadamente igual al diámetro de las moléculas ($\lambda' \approx D$), Rayleigh cuando la longitud de onda dispersada es mucho mayor que el diámetro de las moléculas ($\lambda' \gg D$) y por último la dispersión Raman que son las longitudes de ondas dispersadas es igual que la incidente ($\lambda' = D$).

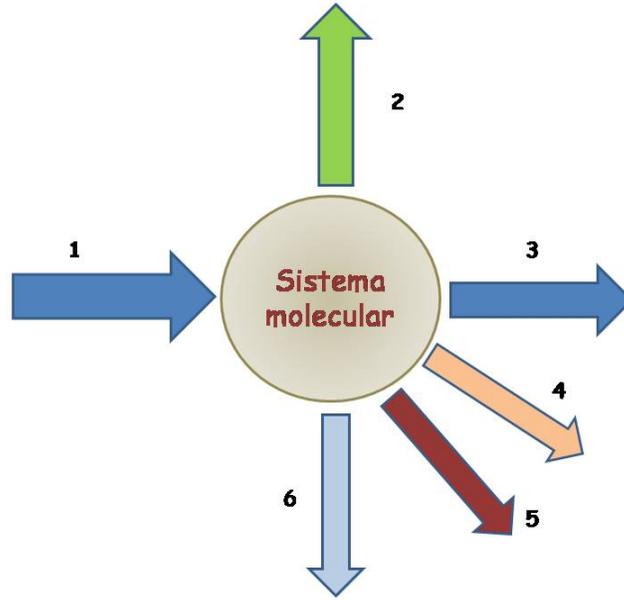


Figura 1.2: Interacción de la radiación con la materia. **1** Luz incidente I_0 y λ_0 , **2** Fotoluminiscencia $\lambda > \lambda_0$, **3** luz Transmitida I , **4** dispersión Mie $\lambda' \approx D$, **5** dispersión Rayleigh $\lambda' \gg D$, **6** dispersión Raman $\lambda' = D$. D : Molécula/diámetro de partículas.

En este trabajo se estudiará la absorción y la fotoluminiscencia, el principio físico de estos fenómenos se describen a continuación. La dispersión, podría retomarse en futuros trabajos por la cantidad de muestra que se necesita utilizar.

1.2.1. Absorción

La absorción y la emisión pueden describirse con un modelo semiclásico [33]. En el tratamiento semiclásico los niveles de energía de las moléculas son obtenidos por la solución de la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo [33].

$$\hat{H}\psi_n = E_n\psi_n \quad (1.1)$$

Donde la radiación electromagnética (luz) es tratada clásicamente. Para poderse imaginar el fenómeno, se hace incidir luz sobre un sistema molecular, éste podría absorber ciertas longitudes de onda (véase figura 1.2) necesaria para pasar de un estado electrónico de menor energía a uno mayor (transición electrónica). Cabe mencionar, que entre los estados electrónicos hay estados vibracionales y rotacionales (véase figura 1.3) [35].

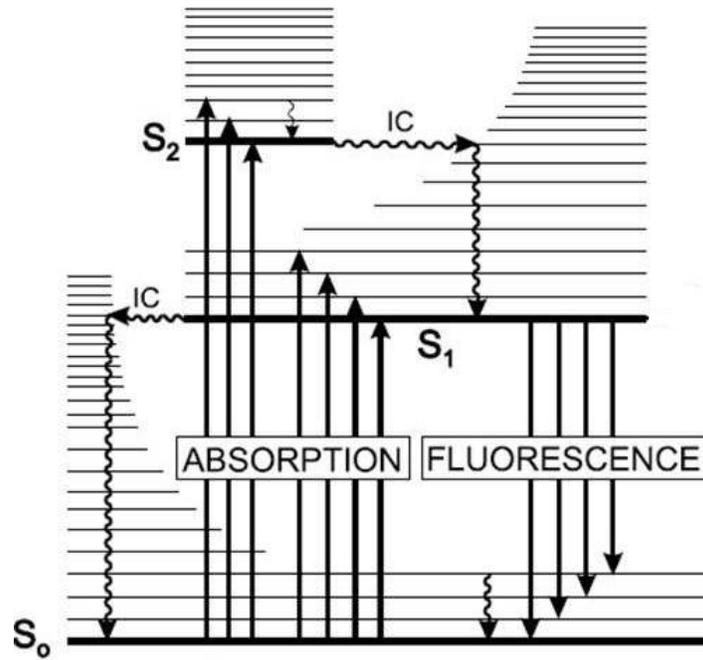


Figura 1.3: Diagrama de Perrin-Jablonski, S_0 ; S_1 ; S_2 :estados electrónicos singlet, IC: conversión interna. Las líneas menos intensas que están entre los estados electrónicos representan estados vibracionales, entre los estados vibracionales hay estados rotacionales. Figura tomada de [35]

Para que el fenómeno de la absorción tenga lugar, la radiación electromagnética tiene que cumplir con la condición de Bohr $E_1 - E_0 = h\nu_{10}$ [33,34].

Una transición electrónica consiste en el "salto" de un electrón, de una molécula que se encuentra, en el estado electrónico E_0 , a otro estado electrónico E_1 ($E_0 < E_1$). Esto lo hace mediante la absorción de fotones (véase figura 1.4).

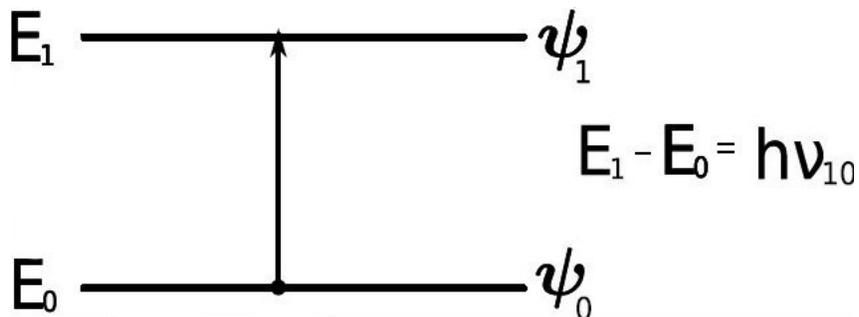


Figura 1.4: Sistema de dos niveles de energía

El fenómeno de absorción puede ser explicado claramente con la ley de Beer-Lambert, que

se enuncia como la eficiencia de la absorción de luz a una longitud de onda λ por un medio absorbente, es caracterizado por la *absorbancia* $A(\lambda)$ o la *transmitancia* $T(\lambda)$ [34,36–38] definido matemáticamente como:

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} \quad (1.2)$$

$$T(\lambda) = \frac{I}{I_0} \quad (1.3)$$

donde I_0 e I son las intensidades de la luz incidente y transmitida, respectivamente [38]. La ley de Beer-Lambert expresada matemáticamente es:

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon(\lambda)lc \quad (1.4)$$

donde $\varepsilon(\lambda)$ es el coeficiente de absorción molar o coeficiente de extinción (sus unidades son $Lmol^{-1}cm^{-1}$), c es la concentración ($molL^{-1}$) de la especie absorbente, l es la longitud que recorre la luz en el material absorbente.

1.2.2. Fotoluminiscencia

Luminiscencia es el proceso de emisión de luz que acompaña a la recombinación espontánea de una molécula, desde el estado excitado hasta un nivel de menor energía [39]. Existen distintas formas de clasificar la luminiscencia y todo depende del modo en el cual se excite el sistema [35,39,40]. En la tabla 1.1 se resumen varios tipos de luminiscencia.

Tabla 1.1: Tipos de luminiscencia [35]

Fenómeno	Modo de excitación
Fotoluminiscencia	Absorción de luz (fotones)
Radioluminiscencia	Radiación ionizante (rayos X, alfa, gamma y beta)
Catodoluminiscencia	Rayos catódicos (haz de electrones)
Electroluminiscencia	Campo eléctrico
Termoluminiscencia	Calefacción después de un almacenamiento de energía
Quimioluminiscencia	Procesos químicos (ejemplo, la oxidación)
Bioluminiscencia	Procesos bioquímicos
Triboluminiscencia	Fricción y fuerzas electrostáticas
Sonoluminiscencia	Ultrasonidos

En este trabajo utilizaremos el primero de los tipos de luminiscencia, debido a que nuestro

modo de excitación será con luz. La fotoluminiscencia (PL, por sus siglas en inglés de Photoluminescence) es un fenómeno que se da por la absorción de luz [35, 40] y después de un tiempo (orden entre $10^{-10}s - 10^{-7}s$) hay una emisión de energía que es debida a la recombinación, de los electrones excitados [35, 39]. Dentro del fenómeno de la fotoluminiscencia se abarcan los fenómenos que se conocen como fluorescencia y fosforescencia. La fotoluminiscencia puede explicarse con el diagrama de Perrin-Jablonski (vease figura 1.3) [35].

La conversión interna (IC, por sus siglas en inglés Internal Conversion) es una transición no radiativa (sin emisión de luz) entre dos estados electrónicos [35]. Fluorescencia es la emisión de fotones que acompaña la recombinación de $S_1 - S_0$. Además, hay relajaciones entre los estados vibracionales y rotacionales [34]. También, existe una transición poco probable que se conoce como fosforescencia que se da cuando hay un cruce entre sistemas, en la cual se origina una recombinación de un estado triplet a un singlet [35].

Hay muchos parámetro físicos y químicos que afectan al hacer medidas de fotoluminiscencia [35]. Algunos de ellos son: Polaridad, pH, presión, temperatura y potencial eléctrico.

1.3. Antecedentes y estado del conocimiento

La emisión de luz de estructuras de hongos MA ha sido estudiada por varios investigadores en los últimos años. Aunque, la fuente de emisión esta en discusión, debido a que no se sabe cuales podrían ser los responsables principales de dicha emisión. La discusión de algunos resultados se resumen a continuación.

En una primera discusión donde se estudio de métodos alternativos para evaluar raíces micorrizadas se observó que los arbúsculos en los segmentos de raíces investigadas fluorescen cuando se excitan bajo luz azul [10]. En dicha investigación, los tipos de plantas investigadas fueron Navajita azul (*Bouteloua gracilis*) y fresa (*Fragaria vesca*), inoculadas con *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatus*, *Gigaspora rosea*, *Gigaespora margarita* y *Acaulospora spinosa* [10]. En los resultados que obtuvieron, las vesículas, esporas e hifas no mostraron ningún tipo de fotoluminiscencia aún cuando se aumentó la intensidad de la luz incidente. Sin embargo, los arbúsculos emitieron luz después de tres semanas que fueron almacenados a 5 °C. Después de teñir y lavar los segmentos de raíz no se observó ninguna emisión. Debido a que estos dos procesos remueven el plasmalema, es por ello que el origen de la emisión se la atribuyen al plasmalema [10].

En otra publicación, se observó autofluorescencia de hifas, vesículas intercelulares y arbusculos, en secciones transversales y longitudinales de raíces, así como en células corticales. La producción de inóculos la realizaron en cultivos de (*Allium porrum*) [11]. La emisión se observó para tres diferentes rangos de longitudes de onda (ultravioleta 330 - 385 nm, violeta 385 - 425 nm, y verde 420 - 490 nm, 500 - 550 nm) [11]. Estos resultados se obtuvieron antes y después de la tinción. En base a comparaciones con espectros de emisión de vesículas y de quitina, mencionan que la quitina es la responsable de ésta (véase figura 1.5).

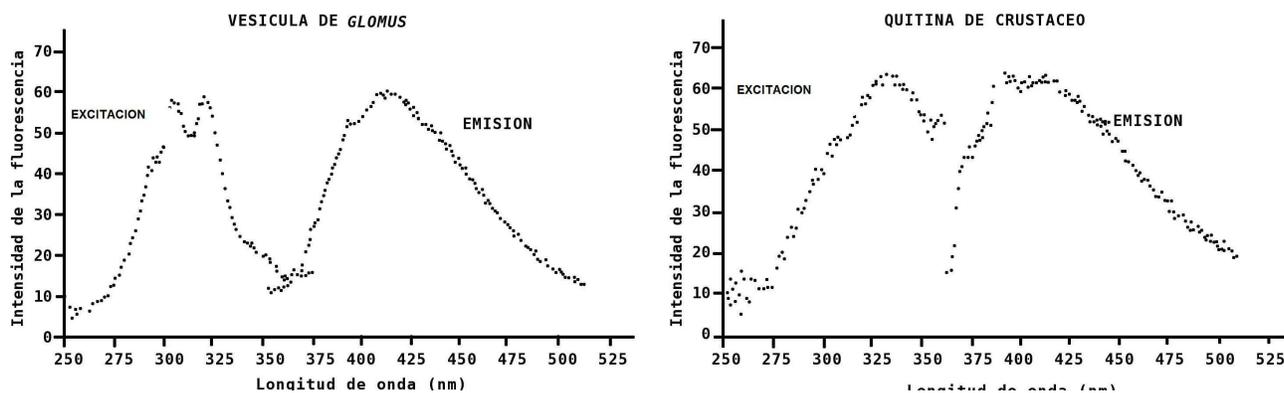


Figura 1.5: A la izquierda espectro de emisión de vesícula de MA y a la derecha quitina. Figura tomada y modificada de [11]

En la figura 1.5 se observa que ambos espectros son similares, pero la presencia de dos máximos distintos en el espectro de excitación de las vesículas podrían estar relacionados con otros componentes de la pared celular del hongo [11].

También, se han realizado otros estudios de autofluorescencia en estructuras micorrícicas en secciones de raíces de *Nicotiana tabacum* inoculadas con *Glomus mosseae* [12]. Donde hicieron una tinción con un fluorocromo, el fluorocromo que utilizaron fue el Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidy (CFDA). Las hifas de MA no presentaron emisión cuando estaban vivas (antes de la tinción) y sí cuando estaban muertas (después de la tinción) (véase figura 1.6).

En secciones de raíz observando con microscopio de luz (ML) y epifluorescencia (MF) y con un filtro de excitación pasa banda de 450-495 nm, mostraron que los arbusculos agrupados autofluorescen (metabólicamente inactivos), mientras que los arbusculos altamente ramificados no autofluorescen (metabólicamente activos). En la discusión que hacen el origen de la emisión la atribuyen a compuestos fenólicos [12].

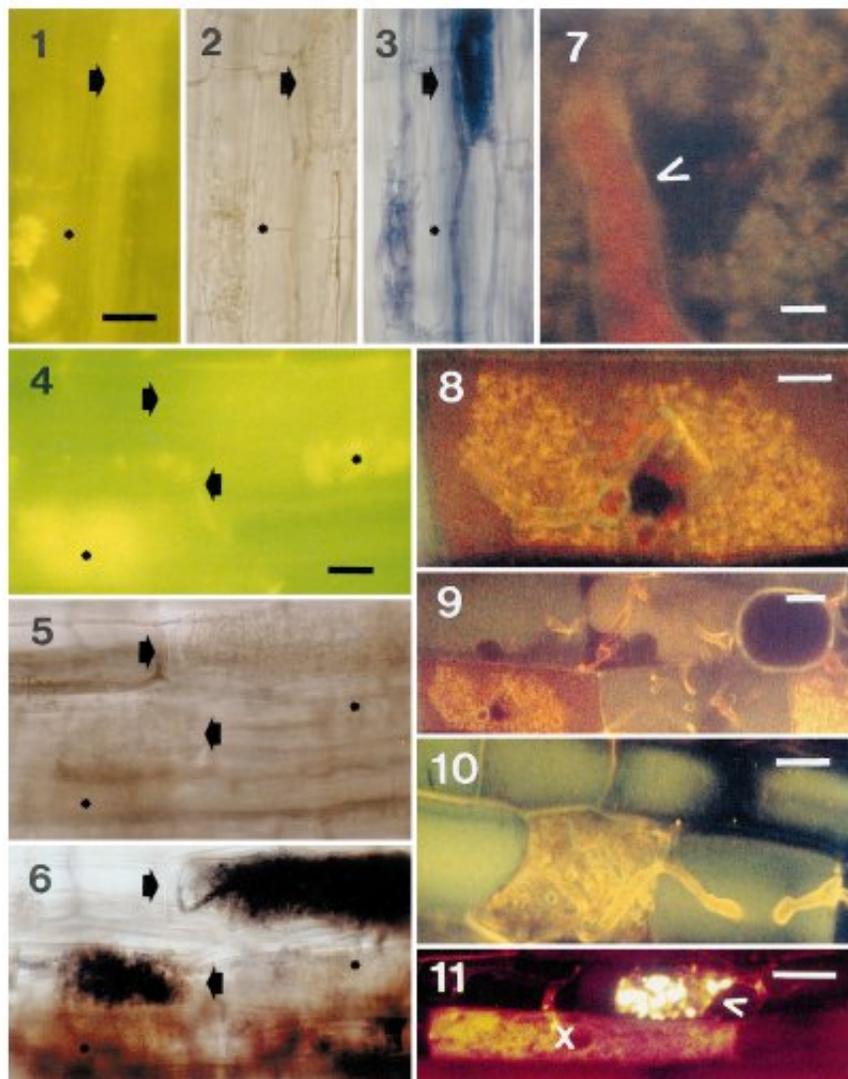


Figura 1.6: **Subfig. 1-3.** Escala $40 \mu m$ (misma estructura). Subfig. 1. Antes de la tinción, emisión en la célula de la raíz (izquierda de asterisco) (MF). Subfig. 2. Vista con ML se observan hifas y estructuras que pueden ser agrupadas (izquierda de asterisco). En una célula vecina (flecha) una estructura granular fina es visible y no emite luz. Subfig. 3. Hifas en la célula de la raíz (izquierda de asteriscos) emiten luz están teñidas con azul tripán. En la célula vecina (flecha) una serie totalmente desarrollada de arbusculos está muy manchada. **Subfig. 4-6.** Escala 20μ . Subfig. 4. Emisión se indican con un asterisco (MF). Subfig. 5. Estructuras granulares son visible en la vecindad de las células de las estructuras fluorescentes (flecha) (ML). Subfig. 6. Después de la tinción estructuras granulares que se observan en la subfigura 5 se pueden identificar claramente como arbusculos metabólicamente activo. La emisión en la subfig. 4 no se mancha con SDH. **Subfig. 7-11.** Subfig. 7-10. Fluorocromo cSNARF (5(6)-carboxy-seminaphthorhodafuor) (longitud de onda $590 nm$). Subfig. 7. Tronco de un arbusculo (punta de flecha) emisión rojiza cSNARF. Escala $3 \mu m$. Subfig. 8. Emisión rojiza cSNARF de arbusculos. Escala $10 \mu m$. Subfig. 9. Célula de la raíz arbusculada (más emisión rojiza) y de células de las raíces no arbusculadas (emisión amarillenta). Escala $20 \mu m$. Subfig. 10. Arbusculo conectado a una hifa con una luz rojiza fluorescente. Células vecinas sin arbusculos emiten luz verde. Escala $20 \mu m$. Subfig. 11. Fluorocromo CFDA (5(6)-carboxyfluorescein diacetate). La sonda se divide en la célula vegetal y se convierte en CF (5(6)-carboxy-fluorescein) (Longitud de onda $488 nm$). CF se acumula en una celda (X). Escala $30 \mu m$. Figura tomada de [12].

En un estudio posterior se mostró que las estructuras intrarradicales como hifas, vesículas y arbuscúlos de especies de palmeras *Brahea armata*, *Chamaerops humilis*, *Phoenix canariensis* y *Phoenix dactylifera*, inoculadas con *G. mosseae*, emiten luz bajo la excitación de luz azul (véase figuras 1.7 y 1.8) [13,14].

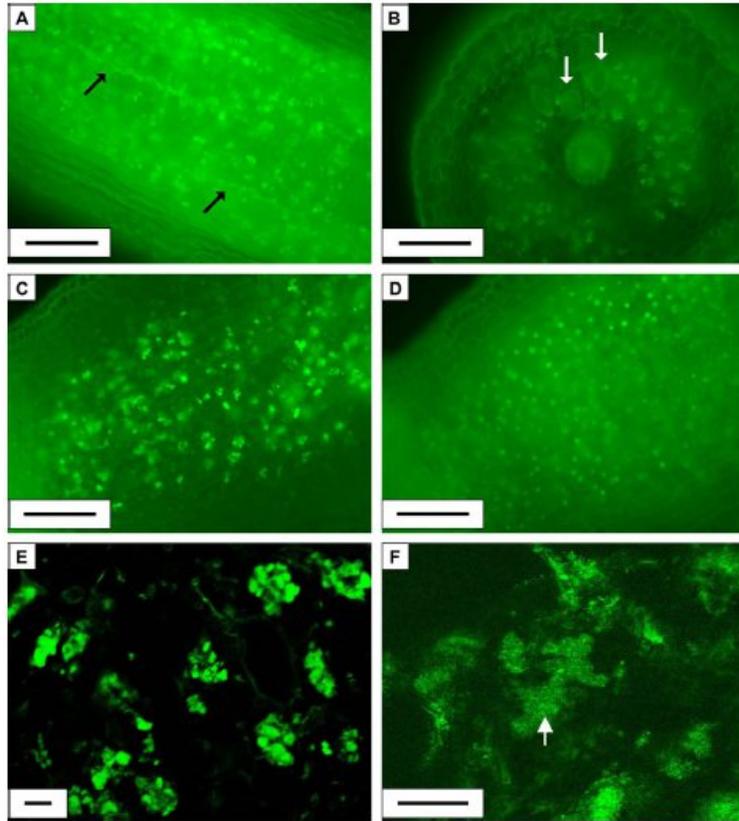


Figura 1.7: Emisión de estructuras de hongos MA. Azul/verde (excitación/emisión). (A-D) MP, (E-F) microscopio confocal. (A) sección longitudinal de raíz de *Chamaerops humilis* muestra numerosos arbuscúlos e hifas emitiendo, la fuente de la emisión se encuentra en la pared celular del hongo (flechas). (B) sección transversal de raíz de *Phoenix canariensis*, almacenados en etanol muestran arbuscúlos y vesículas emitiendo (flechas). (C) Sección longitudinal de tercer orden de *P. canariensis* en agua (pH 7) muestra numerosos arbuscúlos y algunas gotas de pigmento emitiendo. (D) En la misma sección como en (C) pero tratados con hidróxido de amonio (pH 10) las gotas de pigmento muestran mayor intensidad de emisión que los arbuscúlos. (E) Imagen confocal de emisión de arbuscúlos, objetivo $\times 20$. (F) Imagen confocal de la emisión de arbuscúlos, objetivo $\times 60$. Escala $100 \mu\text{m}$ (A-D); $14.5 \mu\text{m}$ (F). Figura tomada de [13].

No se observa emisión cuando las estructuras son excitadas con luz ultravioleta (UV) (véase figura 1.8) [13,14]. Coils (véase figura 1.8) y arbuscúlos (véase figura 1.8) aislados de las raíces de *Phoenix dactylifera* emiten en el rango del color verde y en algunos arbuscúlos observaron emisión de luz roja (véase figura 1.8D) [13].

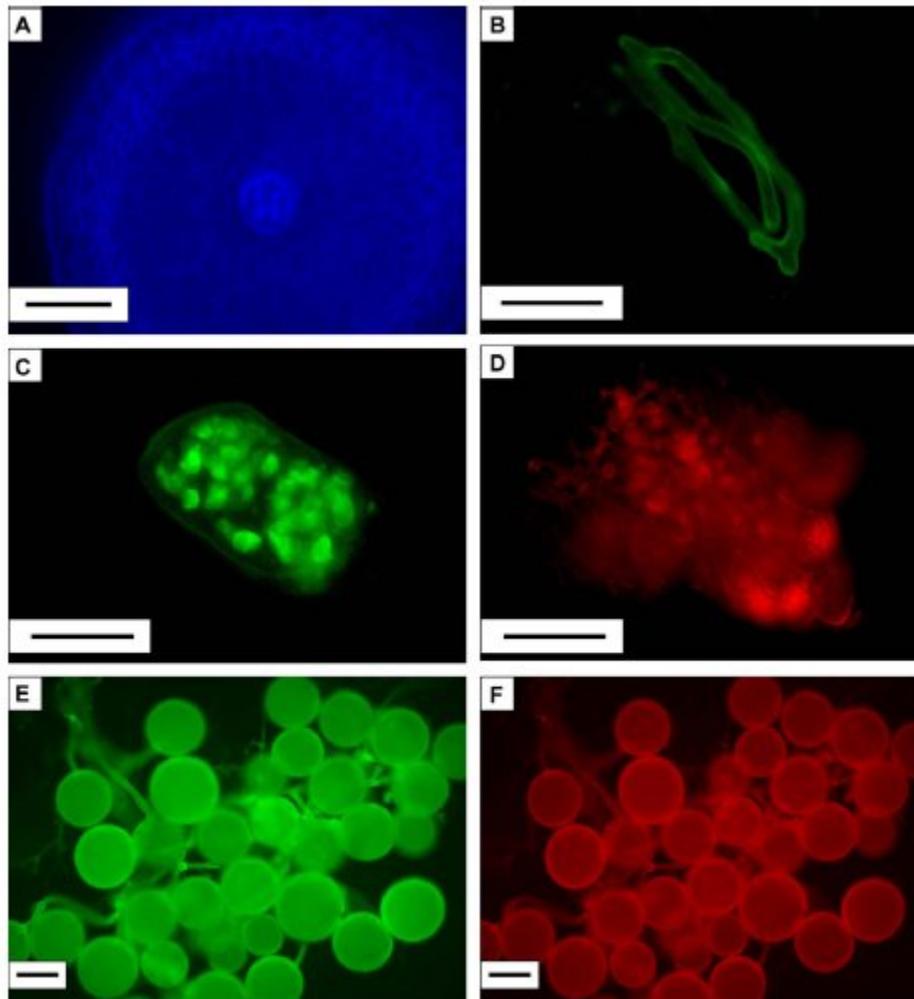


Figura 1.8: Imagen tomada con el microscopio de epifluorescencia. (A) UV/azul (excitación/emisión). (B-C, E) Azul/verde (excitación/emisión). (D, F) Verde/rojo (excitación/emisión). (A) Sección transversal de *Phoenix canariensis*, almacenados en etanol como en la figura 1B, no se observa emisión en las estructuras de hongos MA. (B) Coil aislado. (C) Arbúsculo aislado. (D) Resto del tejido de raíz obtenidos durante el proceso de aislamiento de las estructuras de hongos, mostrando emisión roja en arbúsculos. (E-F) Esporas de *Glomus intraradices* excitada con luz azul (E) o con luz verde (F). Escala $100\mu\text{m}$ (A, E-F); $20\mu\text{m}$ (B-D). Figura tomada de [13]

En las raíces enteras que estudiaron de la especie *Medicago sativa*, ellos observaron que los arbúsculos emiten, pero la emisión de vesículas e hifas no se puede observar debido a la gran intensidad que presentan los arbúsculos y el tejido de la planta debido a que las raíces poseen otros componentes que emiten luz (véase figura 1.9) [13].

Las esporas de *Glomus intraradices* también muestran emisión verde y roja cuando son excitadas con luz azul y verde, respectivamente (véase figura 1.7) [13].

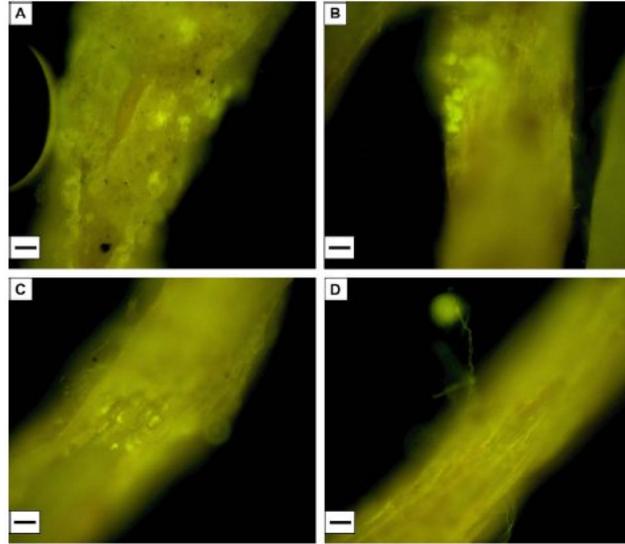


Figura 1.9: Raíces enteras de *Medicago sativa* observadas con microscopio de epifluorescencia. Azul/verde (excitación/emisión). (A-C) Arbúsculos emitiendo. (D) Espora de *G. mosseae* e hifas extraradicales muestran emisión. Para todas las imágenes, escala 10 μm : Figura tomada de [13].

También, se muestra el espectro de emisión de arbúsculos (véase figura 1.10).

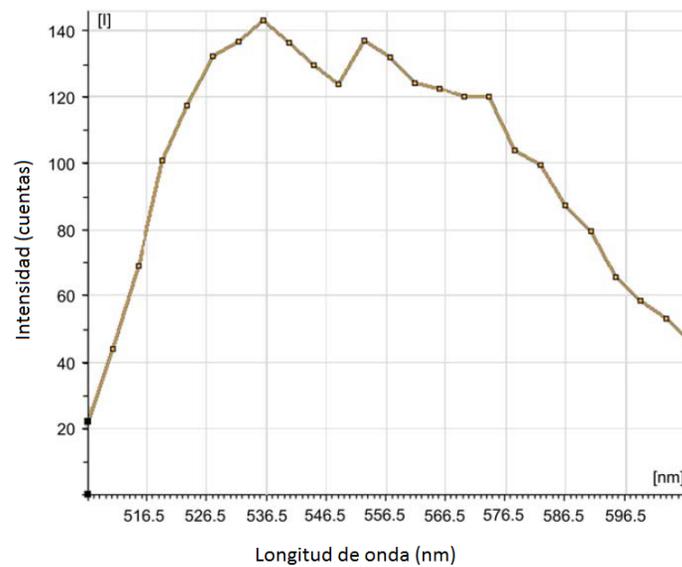


Figura 1.10: Espectro de emisión de arbúsculos. Dos máximos de emisión son observados en 534.7 nm y 552.5 nm . El escaneo con el microscopio confocal se hace cada 5 nm . Figura tomada de [13]

Además, se reportaron máximos de emisión para las otras estructuras micorrícicas observadas (véase tabla 1.2).

Tabla 1.2: Emisión máxima para diferentes estructuras MA [13]

Estructuras MA	Emisión máxima (nm)		
	1	2	3
Vesículas	515-529	572-600	
Arbúsculos	526-536	550-576	
Esporas	503-527	559-608	655-680

Las muestras las midieron usando el $\lambda - scan$ del microscopio confocal de escaneo láser. Las longitudes de onda de excitación fueron $488nm$ para arbúsculos, vesículas y dos máximos para esporas, $543nm$ para el tercer máximo de esporas [13]. En la discusión que ellos hacen, el origen de la emisión es asociada a la pared celular del hongo [13].

Como se puede observar, las diferentes contribuciones al conocimiento divergen con el o los posibles responsables de la emisión de hongos MA. Como se pudo observar antes, la emisión se la atribuyen a diferentes factores, algunos de ellos no necesariamente un componente del hongo como lo menciona Vierheilig et al. [12]. Por otra parte, hay reportes donde se observa glomalina tanto en la pared celular como en el citoplasma de hongos MA, según un estudio realizado por M. Rillig et al. [16]. Pero, no hay reportes en este momento si hay emisión en glomalina, pero si se llegase a comprobar, contradice a lo reportado por Dreyer et al. que solo la pared celular de los hongos MA emiten luz. Cabe mencionar, que no se descarta la contribución a la emisión que puede tener la quitina como lo menciono Jabaji-Hare et al. [11].

Capítulo 2

Experimento

En el siguiente capítulo se mencionan los métodos con los que se extrajeron las muestras. Las muestras utilizadas fueron esporas de hongos MA, extraídas por una parte de material recolectado dentro del campus de la Universidad de El Salvador. Se recolectaron raíces junto al suelo rizosférico de diferentes árboles. Por otro lado, se contó con inóculos puros de *Scutellopora cerradensis* proporcionado por el Dr. Allen del Smithsonian Tropical Research Institute (STRI) de Panamá; *Glomus intraradices*, *G. mosseae*, *G. caledonium* proporcionados por la Dra. Asunción Morte y el Dr. Mario Honrubia de la Universidad de Murcia, España; estos fueron propagados en asociación con *Sorghum bicolor* en el Centro de Investigaciones Científicas y Desarrollo en Salud (CENSALUD), Universidad de El Salvador. También, se hicieron extractos de glomalina utilizando dos protocolos de extracción.

Todas las muestras se estudiaron directamente y otras se sometieron a diferentes protocolos de extracción de sus componentes.

A continuación, se describen los protocolos, las técnicas experimentales y la especificación de algunos equipos de medición que se utilizaron en este trabajo de investigación.

2.1. Preparación de muestras

2.1.1. Extracción de esporas

Las esporas de hongos MA se aislaron mediante el método modificado de tamizado húmedo y decantación propuesto por Gerdemann y Nicolson (véase figura 2.1) [41]. El procedimiento se describe a continuación:

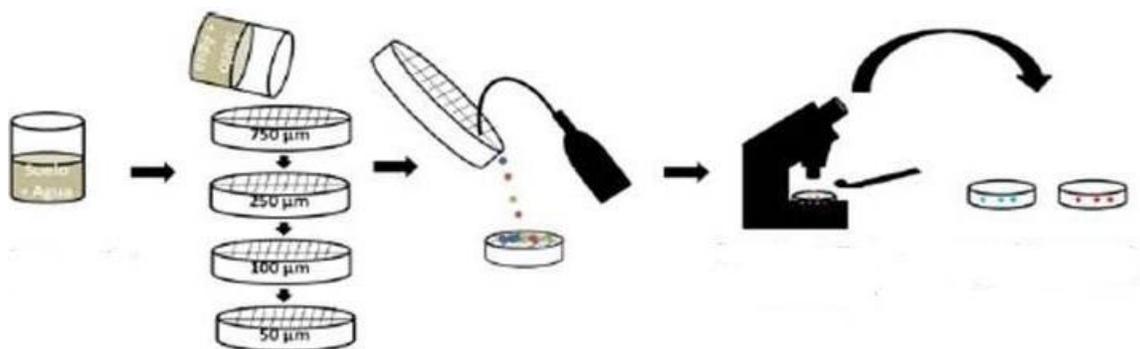


Figura 2.1: Dibujo esquemático de la técnica de tamizado húmedo [9]

1. Se pesaron en una balanza analítica 100 g de muestra suelo-raíces secada al aire y se introdujeron en un vaso de precipitado y se añadió 1000 ml de agua potable.
2. Se dejaron durante 10 minutos en suspensión la mezcla raíces-suelo y agua, luego se mezcla con una varilla durante 30 s aproximadamente.
3. Después de 10 s, para permitir posarse a las partículas del suelo más pesadas, la suspensión se decanta poco a poco sobre una serie de tamices (con una apertura de malla de 250, 125 y 53 μm). En el tamiz de 250 μm de luz de malla se encontrarán las raíces, en el de 125 μm , los esporocarpos y esporas grandes, en el último esporas de diferentes tamaños.
4. Los extractos que quedan en los dos últimos tamices se lavan con ayuda de una botella plástica con agua.
5. Usando un Estereomicroscopio se observan las esporas extraídas y se separan con un capilar o pinzas de relojero en diferentes microtubos.

En total se extrajeron alrededor de 3000 esporas por especie.

2.1.2. Extracción de glomalina

Para la extracción de glomalina se utilizarán dos protocolos. Estos son el de glomalina fácilmente extraíble propuesto por Wright y Upadhyaya (1996), que fue utilizado por primera vez para la extracción de glomalina de suelo [23]. El otro protocolo es el propuesto por Driver et al., (2005) [24]. Estos autores demostraron que la glomalina está fuertemente unida a las paredes celulares de los hongos MA y antepusieron unos pasos al protocolo de extracción de

glomalina propuesto por Wright y Upadhyaya, para extraer las sustancias ligeramente unidas a la pared celular. Ambos protocolos se describen a continuación:

Protocolo de extracción de glomalina fácilmente extraíble

Uno de los protocolos de extracción de glomalina propuesto por Wright y Upadhyaya en el año de 1996. Extrae glomalina de manera agresiva. A dicho protocolo también se le conoce como extracción de glomalina fácilmente extraíble [23]. Los pasos de la extracción se describen a continuación:

1. Se añadieron 8 ml de citrato de sodio 20 mM (pH 7) a 1 gr de suelo.
2. Se autoclavaron a 121 ° C durante 30 min, junto con el citrato de sodio la glomalina que se encuentra fuertemente unida al suelo, se logra por la solubilidad que tiene la glomalina con el citrato de sodio a altas temperaturas.
3. Luego se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos. Se toma el sobrenadante que contiene la fracción de glomalina.

Protocolo de extracción de glomalina de Driver

Este es un protocolo de extracción de glomalina de manera más fina que el anterior, ya que con el protocolo anterior se extraen, aparte de la glomalina, otros compuestos de la pared celular. Con este protocolo se logra separar la glomalina que se encuentra fuertemente unida a la pared celular de hongos MA [24]. Los pasos de este protocolo son los siguientes:

1. Las muestras de suelo, raíces micorrizadas y esporas de MA se mezclaron con dodecil-sulfato sódico (SDS) al 2% (p/v) caliente.
2. Se homogeneizaron y se colocaron en tubos a 100 ° C durante 5 min, para liberar el material orgánico.
3. Luego se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min para obtener el sobrenadante conteniendo las proteínas solubles. Éste se reserva y el sedimento con la pared celular, se lava con agua estéril.
4. Al sedimento se le añadió hidróxido de sodio (NaOH) al 1M y se incubó a 65 °C durante 30 min, para liberar el material alcalino soluble.
5. Se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. y se reservó el sobrenadante.

6. El sedimento se lavó con tampón Tris-HCl al 10 mM (pH 7.5), para mantener el pH.
7. Posteriormente se mezcló con citrato de sodio al 50 mM (pH 8.0), para extraer las proteínas que están fuertemente unidas a la pared celular.
8. Se autoclavó por 30 min. a 121 ° C, para liberar la fracción de glomalina.
9. Para terminar, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. Se reservó el sobrenadante, conteniendo el extracto de glomalina.

2.2. Técnicas experimentales

Las técnicas experimentales que fueron utilizadas son algunas técnicas de espectroscopia óptica, específicamente espectroscopia de absorción ó absorbancia, fotoluminiscencia (PL) y micro-fotoluminiscencia (Micro-PL). Dichas técnicas experimentales son descritas a continuación.

2.2.1. Espectroscopia de absorción

Para poder medir espectros de absorción, fue necesario utilizar un montaje experimental como se muestra en la figura 2.2.

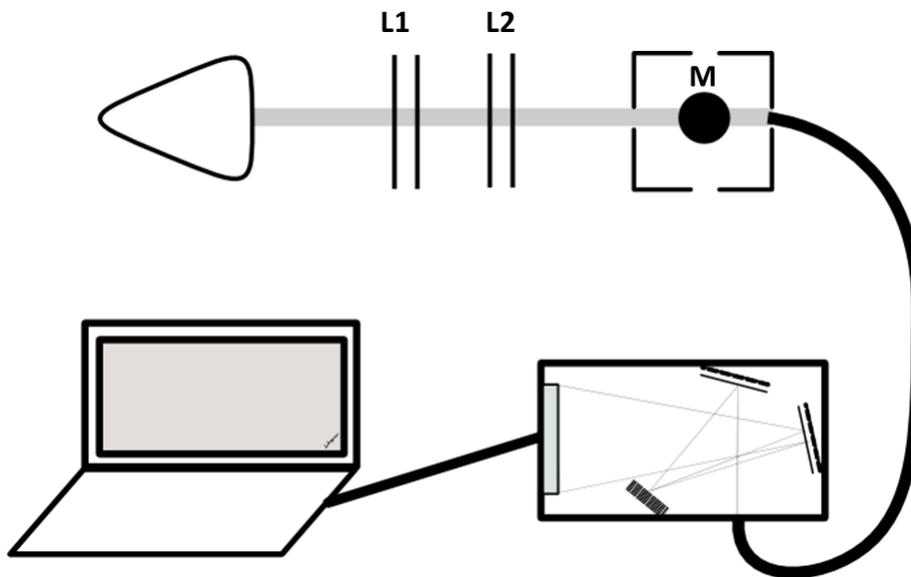


Figura 2.2: Esquema de montaje experimental de espectroscopia de absorción. L1 y L2: Lentes, M: Muestra.

Para elaborar el montaje experimental de espectroscopia de absorción se siguieron los siguientes pasos:

1. Se ubicó una lámpara de espectro continuo [42]. Las fuentes de luz que tienen un espectro continuo y que se utilizaron fueron deuterio (véase espectro en la figura 4.1) y tungsteno, con el fin de obtener las absorciones en el ultravioleta y visible.
2. A continuación, se hizo un arreglo de lentes convergentes de cuarzo, para llevar la mayor cantidad de luz a un punto donde se colocó la muestra (las muestras fueron colocadas en cubetas de cuarzo y las cubetas fueron puestas en un porta cubetas). Se utilizaron lentes y cubetas de cuarzo porque transmiten longitudes de onda del ultravioleta.
3. La luz que se transmitió por la cubeta se hizo pasar por una fibra óptica, la fibra óptica deja transmitir las longitudes de onda del ultravioleta y visible. Además, la fibra óptica se puede acoplar fácilmente en la plataforma o porta cubetas. También, se acopla de igual manera al espectrógrafo.
4. Después de la fibra óptica, la luz pasó por un espectrógrafo que tiene una configuración de Czerny-Turner cruzado [42] y tienen un detector CCD (charge-coupled device) de 3648 pixel que pasa a un convertidor analógico-digital, luego pasa la señal a una computadora por medio de un conector USB. Donde posteriormente se pueden manipular los espectros con algunos programas como origin para window, qtiplot o labplot para linux.

También, se midió absorción en porta objetos, haciendo un acople en el microscopio óptico, donde se ubicó una fibra óptica en la parte superior del tubo del microscopio para coleccionar la señal. Además, en algunas medidas se acoplo la lámpara de deuterio para medir la absorción en el ultravioleta. Algunos de los pasos antes mencionados también son validos para fotoluminiscencia y micro-fotoluminiscencia.

2.2.2. Fotoluminiscencia y micro-fotoluminiscencia

Para medir fotoluminiscencia (PL) y micro-fotoluminiscencia (Micro-PL) fue necesario excitar con ciertas longitudes de onda al sistema molecular que se estudio. El montaje experimental que se elaboró para medir PL es similar al montaje experimental de absorción, con la diferencia que para la PL se necesita una lámpara de espectro de emisión discreto y la colección de luz es a un ángulo que permita captar toda la emisión posible (normalmente es 90° del haz incidente aunque la emisión se da en los 360 sr) para evitar coleccionar otra señal que no sea la emisión de la muestra (véase figura 2.3).

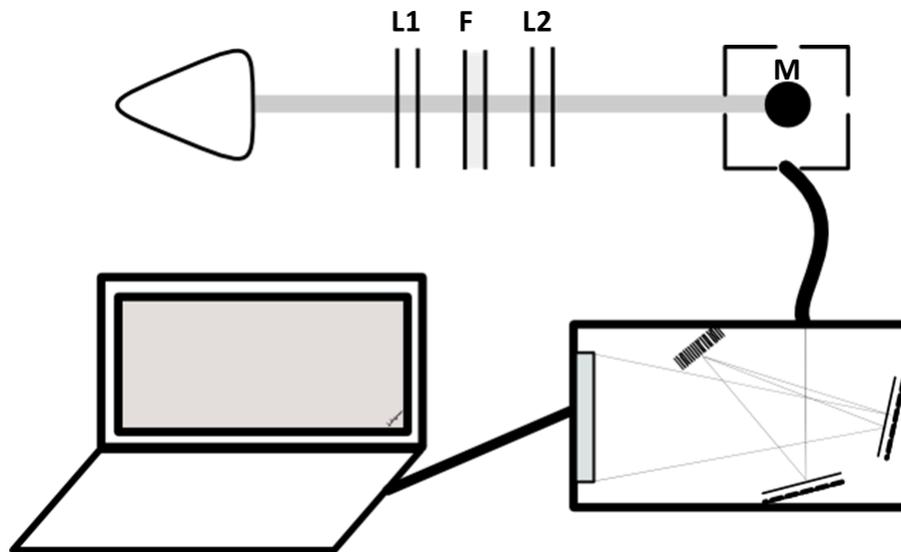


Figura 2.3: Esquema de montaje experimental de fotoluminiscencia. L1 y L2: Lentes, F: Filtro, M: Muestra.

La fuente de luz que se recomienda utilizar y fue utilizada en la presente investigación es una lámpara de mercurio (véase espectro de la fuente de luz de mercurio en figura 4.2). Se usaron sus líneas espectrales de más baja longitud de onda (líneas que se encuentran entre $320 \text{ nm} - 365 \text{ nm}$). Para obtener las líneas espectrales se utilizaron filtros pasa bandas que dejan pasar las líneas espectrales deseadas, el filtro que se utilizó en esta investigación es el U340 y el BP35 (Band Pass Filter 350 nm) (véase figuras 2.4 y 2.5).

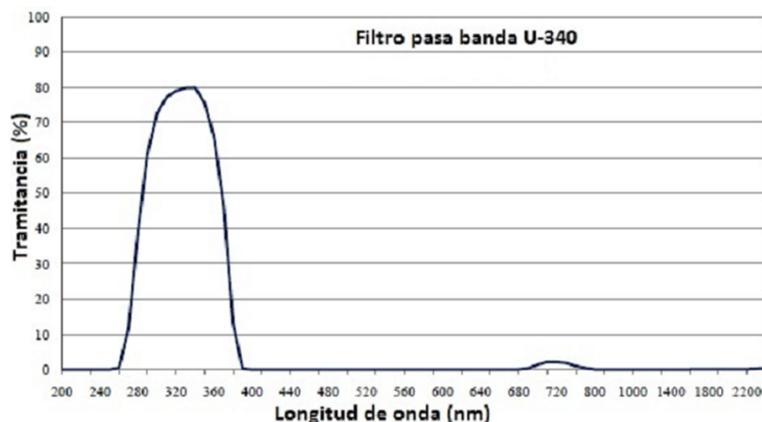


Figura 2.4: Espectro de transmisión del filtro U340. Figura tomada de [43]

El fenómeno de Micro-PL, es el mismo que PL, con la diferencia que se utiliza un microscopio

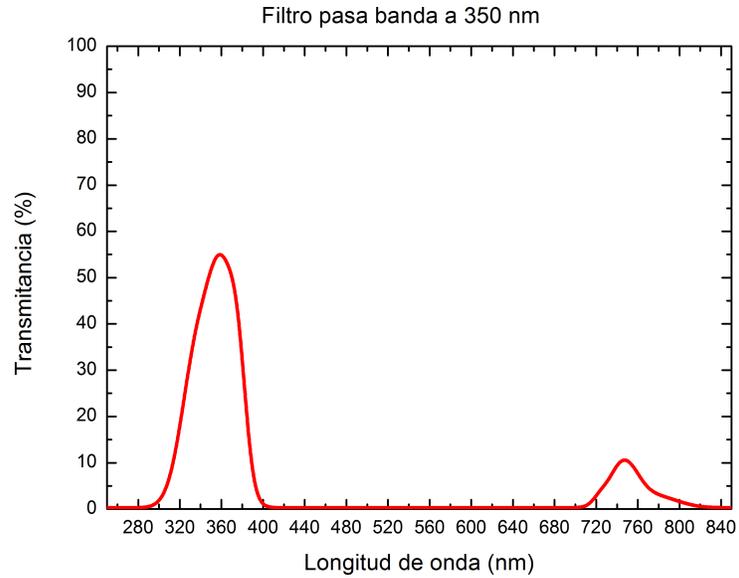


Figura 2.5: Espectro de transmisión del filtro BP35.

que permita observar y medir la emisión de la muestra, unos de los microscopios que puede ser utilizado para ello, son los microscopios de epifluorescencia. La emisión se colecta haciendo un arreglo provisional, retirando la cámara fotográfica y sustituyendola por un arreglo donde se ubica una fibra óptica, que se conecta a un espectrógrafo (véase figura 2.6).

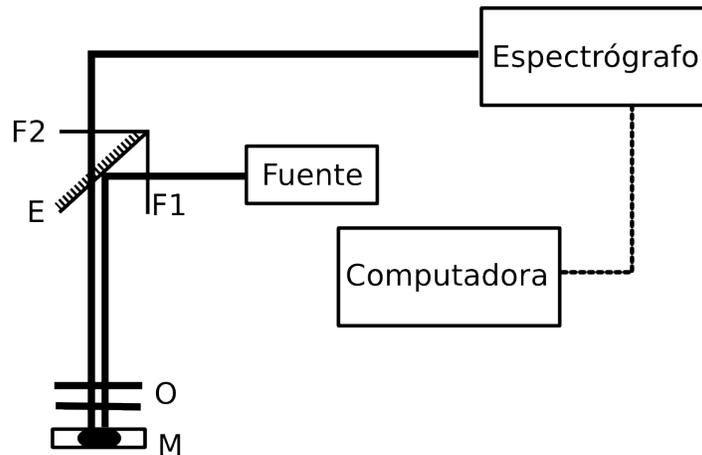


Figura 2.6: Esquema de montaje experimental de Micro-PL. F1 y F2: Filtros de excitación y emisión, respectivamente; E: Espejo dicróico; O: Objetivos; M: Muestra. Figura elaborada por Alejandra Hernández.

Para medir Micro-PL, se usó un microscopio de epifluorescencia de la marca CETI modelo Topic T (véase hoja de especificaciones en anexos) [44], que posee un arreglo adecuado para

excitar las muestras. Tiene una combinación de filtros, para la excitación en luz azul se excita con un filtro pasa banda que transmite longitudes de ondas que están alrededor de los 310 - 480 nm . Para la emisión, hay un filtro paso alto que tiene una transmisión alrededor de los 500 - 780 nm . Para la excitación en luz verde, tiene un filtro pasa banda que transmite longitudes de onda alrededor de 535 - 560 nm y un filtro paso alto para la emisión que se encuentra en el rango de los 500 - 780 nm . Además, tiene una lámpara de alta presión de mercurio a 50 W . También, el microscopio tiene un espejo dicróico por cada set de filtros. El set de filtros de una manera afecta la medida, porque la combinación filtro de excitación - espejo dicróico - filtro de emisión, podrían delimitar las longitudes de onda de interés. La excitación y la transmitancia del set de filtros se muestran en la figura 2.7.

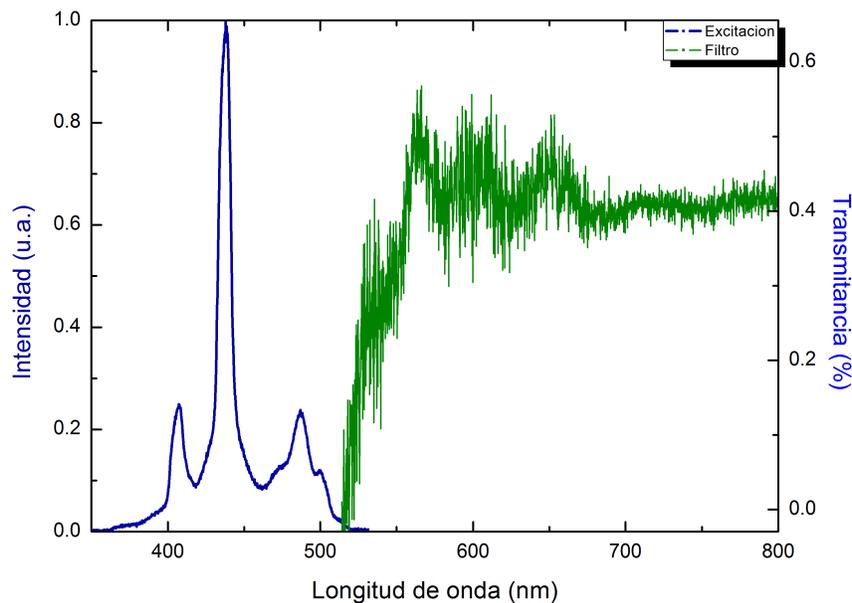


Figura 2.7: Excitación y emisión del set de filtros de excitación en azul del microscopio de epifluorescencia. Azul excitación, verde transmitancia del set de filtros. Espectros tomados por Rafael Nolasco.

En la figura 2.7, se puede observar la excitación en línea continua azul y el espectro de transmitancia para el set de filtros, la transmitancia del filtro de emisión afecta las medidas de Micro-fotoluminiscencia, debido a que su transmitancia empieza alrededor de los 520 nm . También, el portaobjeto y cubreobjeto donde se colocan las esporas de hongos MA, tienen una transmitancia que empieza alrededor de longitudes de onda mayores a 300 nm (véase figura 2.8)



Figura 2.8: Transmitancia de portaobjeto y cubreobjeto. Figura tomada de [45].

2.2.3. Espectrógrafos de absorción y luminiscencia

Espectrógrafo de absorción

Para tomar las medidas de absorción y algunas de fotoluminiscencia se utilizó, el espectrógrafo USB4000-UV-VIS de la firma Ocean Optics (véase figura 2.9 y hoja de especificaciones en anexos). La configuración de dicho espectrógrafo es de Czerny-Turner [42].

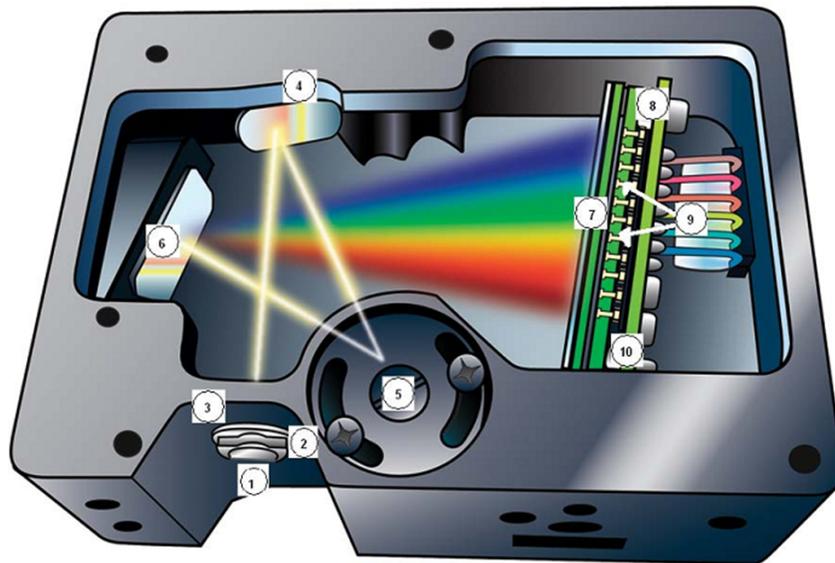


Figura 2.9: Espectrógrafo USB4000-UV-VIS; 1. Conector a la fibra óptica, 2. Corte de entrada, 3. Filtro, 4. y 6. Espejos colimadores, 5. Rejilla de difracción, 7. Lente detectora, 8. Detector CCD, 9. Convertidor analógico digital, 10. Detector de mejoramiento. Figura tomada de [46]

El espectrógrafo, tiene una red de difracción plana de mayor eficiencia alrededor de los 300

nm , tiene una apertura de $25 \mu m$ y una resolución espectral alrededor de los $1.5 nm$ [46]. Tiene una CCD (Charge Coupled Device) lineal (Toshiba TCD1304AP de silicio) de 3648 pixeles [46]. La CCD tiene una respuesta espectral que va desde los 400 nm a 800 nm aproximadamente (véase figura 2.10).

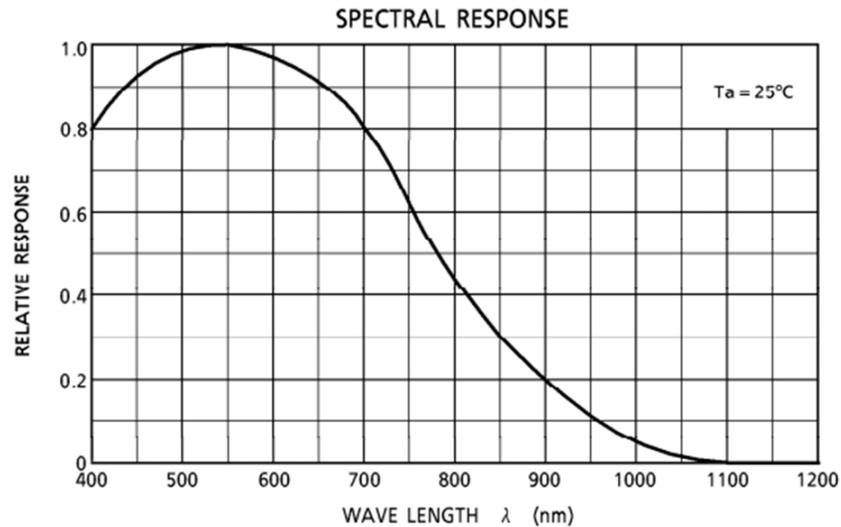


Figura 2.10: Respuesta espectral del detector CCD Toshiba TCD1304AP. Figura tomada de [47].

Espectrógrafo de luminiscencia

Para tomar algunas medidas de emisión se utilizó el espectrógrafo USB4000-FL-395 también de la firma Ocean Optics, con la configuración de Czerny-Turner (véase hoja de especificaciones en anexos). Tiene una red de difracción plana de mayor eficiencia alrededor de $500 nm$, densidad de ranuras de $600 mm^{-1}$ con una eficiencia mayor al 30 % entre 350 y $850 nm$. Además, posee una apertura de $200 \mu m$ y una resolución óptica alrededor de los $10.0 nm$. Tiene incorporada una fuente de luz que tiene un rango espectral alrededor de $380 - 410 nm$. También tiene un detector CCD Toshiba TCD1304AP de silicio lineal [48].

También, se hicieron medidas de fotoluminiscencia en el grupo de investigación del Professor Werner Mäntele del Institut Für Biophysik de la Universidad de Frankfurt, Alemania [49], gracias a la colaboración con el Dr. Miguel Pleitez, del mismo instituto. Para ello se utilizó el equipo de medida LS 55 [50]. Para medir espectros de absorción y fotoluminiscencia.

Capítulo 3

Resultados y discusión

En este capítulo se presentan fotografías de esporas de hongos micorrícicos arbusculares (MA), donde se observa claramente que las esporas emiten cuando son excitadas con luz azul ($\sim \lambda_{exc} = 435 \text{ nm}$). Además, se presentan resultados de espectroscopia de absorción, fotoluminiscencia (PL) y micro-fotoluminiscencia (Micro-PL) obtenidos para esporas de hongos MA y extractos de glomalina. Al final se hacen comparaciones de los distintos espectros de PL obtenidos con esporas y glomalina, para observar la contribución que tiene la glomalina en la PL de esporas de hongos MA.

3.1. Absorción, micro-fotoluminiscencia y fotoluminiscencia en esporas

Los resultados para esporas de hongos MA de cinco especies diferentes mostraron fotoluminiscencia, bajo la excitación de luz azul ($\sim \lambda_{exc} = 435 \text{ nm}$). Además, se ha observado luminiscencia en hifas extraradicales (véase figura 3.1). Por motivos de espacio sólo se muestran fotografías de luminiscencia de algunas especies. En la figura 3.1, se observan fotografías tomadas a esporas de la especie *Glomus caledonium*, a la izquierda es una fotografía tomada a siete esporas utilizando la luz visible del microscopio de epifluorescencia, en la misma fotografía se puede observar unas ramificaciones que salen de las esporas, estas son hifas extraradicales y también, son señaladas dos esporas mediante flechas rojas, las esporas señaladas se discutirán más adelante. En la fotografía de la derecha, son las mismas siete esporas que se muestran en la fotografía de la izquierda, con la diferencia que fue tomada utilizando el mismo microscopio que se usó para tomar las fotografías de la izquierda, con la diferencia que se excitó alrededor de los 435 nm.



Figura 3.1: Esporas de la especie *Glomus caledonium*. Izquierda fotografía tomada en un microscopio óptico, derecha fotografía tomada en un microscopio de epifluorescencia. Se observa emisión en hifas extraradicales y esporas. Las esporas señaladas con flechas roja, muestran mayor intensidad y esto podría ser por la mayor incidencia de fotones en esa región debido al enfoque. Escala $\sim 150 \mu\text{m}$. $\sim \lambda_{exc} = 435 \text{ nm}$

Como se observa en la fotografía de la derecha hay emisión de esporas e hifas extraradicales, otras especies observadas muestran también emisión tanto en esporas e hifas.

En casi todas las esporas mostradas en la figura 3.1 se observa mayor intensidad en la emisión en la pared celular y esto está en acuerdo con lo que publicó Dreyer et al., (2006) [13]. Este resultado, apoya a que se ha observado emisión en esporas, no como lo mencionaron Ames et al., (1982) que descartaron la emisión de éstas [10]. La emisión en hifas fue observada también por Dreyer et al., (2006) y Jabaji-Hare et al., (1984) [11, 13]. Por otra parte, las esporas señaladas con flechas rojas (véase figura 3.1) muestran una mayor intensidad, esto podría ser por el enfoque que se hace sobre las esporas, ya que podría estar incidiendo una mayor cantidad de luz sobre la región señalada, por eso se observa con mayor intensidad con respecto a las otras esporas. También, se observa una espora como si estuviese rota y solo muestra emisión en la pared celular, esto podría ser, porque la espora no está lo suficientemente estallada para que el citoplasma salga en su totalidad.

Las esporas de la especie *Glomus mosseae* muestran diferencias en el color de emisión de las esporas más jóvenes mostrando mayor intensidad en la pared celular (véase figura 3.2). Igual que en la figura 3.1, a la izquierda fotografía tomada en el microscopio de epifluorescencia en función de microscopio óptico, derecha función del microscopio en fluorescencia.

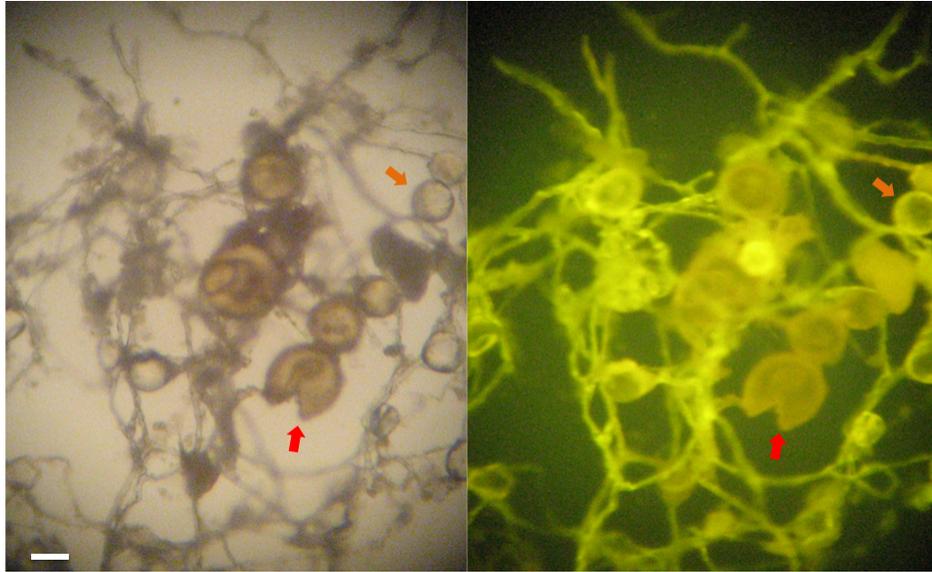


Figura 3.2: Esporas de la especie *Glomus mosseae*. Izquierda fotografía tomada en un microscopio óptico, derecha fotografía tomada en un microscopio de epifluorescencia. Se observa emisión en hifas extrarradicales, esporas jóvenes y esporas maduras. La flecha color naranja señalan una espora joven, las esporas jóvenes muestran emisión similar; flecha color rojo señalan una espora madura, las otras esporas maduras se observan con la misma emisión, se observa la espora rota pero no se observa que haya salido el citoplasma. Escala $\sim 150 \mu\text{m}$. $\sim \lambda_{exc} = 435 \text{ nm}$

Las esporas maduras muestran diferente emisión, se observa como si hubiera un corrimiento a mayores longitudes de ondas. Dreyer et. al., (2006), reportaron que las esporas metabólicamente inactivas muestran emisión en rojo. Cabe la posibilidad que las esporas maduras ya estén metabólicamente inactivas y que por eso muestren diferente emisión en comparación con las esporas jóvenes. En la figura 3.2 muestra que las esporas jóvenes tienen diferente emisión. La espora señalada con una flecha roja está rota, pero la parte del citoplasma no se observó que haya salido. La flecha sirve para identificar las esporas maduras que muestren una emisión similar. Las hifas de esporas jóvenes muestran una emisión similar. La espora señalada con flecha color naranja, es una espora joven, las demás esporas jóvenes se pueden identificar por tener una emisión similar.

Para poder confirmar si la emisión proviene únicamente de la pared celular del hongo se trató de observar el citoplasma. Para ello se sometieron algunas esporas a presión para romper la pared celular y poder observar el contenido del citoplasma. La presión tiene que ser lo suficientemente fuerte para que también se rompa la membrana celular, ya que de lo contrario no se expondría el contenido citoplasmático, como se puede apreciar en las figuras 3.1 y 3.2. Se logró observar que el citoplasma emite luz (véase figura 3.3).

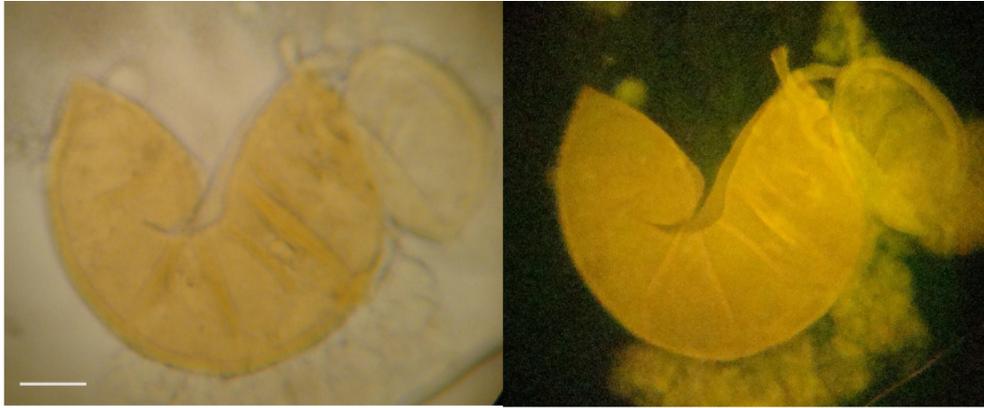


Figura 3.3: Esporas de la especie *Glomus intraradices*. Izquierda fotografía tomada en un microscopio óptico, derecha fotografía tomada en un microscopio de epifluorescencia. Se observa emisión tanto en el citoplasma como en la pared celular del hongo. Escala $\sim 150 \mu\text{m}$. $\sim \lambda_{exc} = 435 \text{ nm}$

En la figura 3.3, se puede observar una espora de la especie *Glomus intraradices*, a la izquierda está la fotografía tomada con el microscopio óptico y a la derecha fotografía tomada con el microscopio de epifluorescencia. La espora está rota debido a la presión que se le ejerció para observar el citoplasma. Se puede observar que no sólo la pared celular emite como lo menciona Dreyer et al., (2006) [13]. Por ello, se podría decir que la fuente de emisión no está localizada solo en la pared celular como lo menciona Dreyer et al., (2006) [13]. Esto ya había sido demostrado anteriormente para la especie *Gigaespora gigantea* por Séjalon-Delmas et al., 1998 [51]. Debido a que es evidente que tanto la pared celular como el citoplasma contribuyen a la emisión de esporas de hongos MA, el o los componentes que contribuyen con la emisión de hongos MA debe estar situado tanto en el citoplasma como en la pared celular. Uno de los componentes que se ha reportado que está presente tanto en el citoplasma como en la pared celular de hongos MA es la glomalina [16].

Cabe mencionar, que para todas las especies estudiadas en este trabajo de hongos MA se estallaron para observar si había emisión en el citoplasma, y en todas se observó la emisión tanto del citoplasma como en la pared celular.

Para caracterizar la emisión de la pared celular y el citoplasma se tomaron espectros en ambas partes, enfocando sobre ellas en el microscopio de epifluorescencia (véase figura 3.4).

La figura 3.4 se observa claramente la emisión del citoplasma y la pared celular; además, el espectro de micro-PL que se encuentra en el centro es muy similar, la única diferencia es la intensidad, aunque se reconoce que probablemente el sistema utilizado no permite discernir

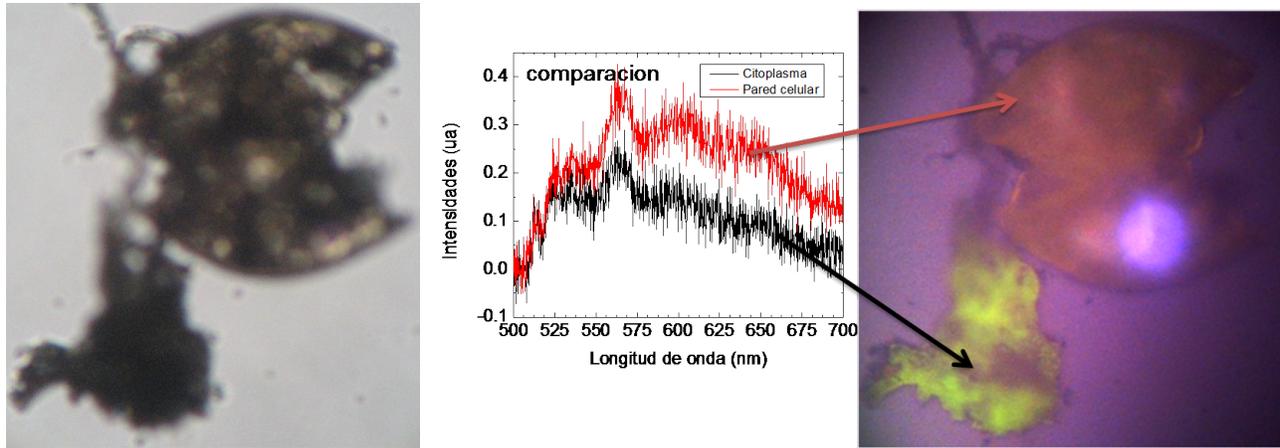


Figura 3.4: Espectro de emisión de espora de especie desconocida. A la izquierda; fotografía tomada con microscopio óptico de una espora rota. Al centro en color negro el espectro de emisión enfocando en la pared celular, rojo emisión enfocando sobre el citoplasma; las bandas de emisión utilizando la técnica de micro-fotoluminiscencia (micro-PL) se hizo utilizando el espectrógrafo UV-VIS USB4000. A la derecha; fotografía con micorsocopio de epifluorescencia de la espora que se le midió el espectro de emisión. $\sim \lambda_{exc} = 435 \text{ nm}$.

claramente entre ambas partes.

3.1.1. Absorción en esporas de hongos MA

En la revisión bibliográfica que se realizó durante la investigación no se encontraron reportes de espectros de absorción en esporas. En el presente trabajo se midieron espectros de absorción para las esporas de especies de hongos MA estudiadas (véase figura 3.5).

Los espectros mostrados en la figura 3.5, fueron tomados haciendo una acople en el microscopio óptico, donde se incorporó una lámpara de deuterio, para lograr obtener la absorción de las esporas en el ultravioleta. Debido a que la fuente de luz que viene incorporada en el microscopio óptico es de tungsteno.

Se observa una parte ruidosa en los espectros que se muestran alrededor de los 340 nm . La parte ruidosa podría ser por la transmisión que poseen los porta y cubre objeto (véase figura 2.8) donde se ubicaron las esporas. También, se muestran dos espectros para la especie de *Glomus intraradices*, la diferencia de ambas muestras es el lugar de donde fueron propagadas. Para el espectro de la línea continua negra, según datos proporcionados por la Universidad de Murcia de España, son esporas que fueron propagadas en el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria en Cabrils, España [52]; para la línea continua azul, las esporas fueron propagadas en la estación experimental del Zaidín, Granada, España [53]. Pese a que las especies fueron propagadas en distinto lugar, la absorción se podría ver que no cambia.

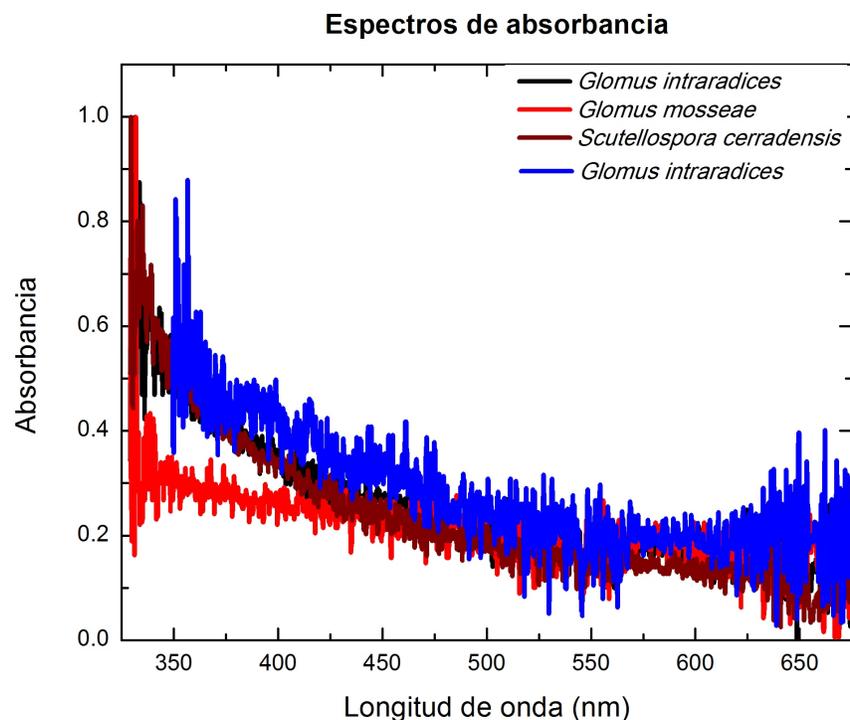


Figura 3.5: Espectro de absorción en esporas. Línea continua azul y negra, especie *Glomus intraradices*; línea continua roja, especie *G. mosseae*; línea continua café, especie *Scutellospora cerradensis*. Espectros tomados utilizando el espectrógrafo UV-VIS USB4000.

En los espectros de absorción mostrados, es evidente que las esporas de MA podrían absorber en el ultravioleta. Además, para los espectros de las tres especies medidas muestran la misma tendencia en la absorción, esto podría ser porque el o los causantes de la absorción es o son los mismos, independientemente de la especies de hongos MA que fueron estudiadas en este trabajo.

3.1.2. Micro-fotoluminiscencia y fotoluminiscencia en esporas de hongos MA

En la figura 3.4 ya se había mostrado un espectro de micro-fotoluminiscencia (Micro-PL) excitado alrededor de los 435 nm para esporas de una especie desconocida, nativa de El Salvador. Ambos espectros (citoplasma y pared celular) como se había mencionado están cortados alrededor de los 520 nm, debido a la transmitancia del filtro de emisión con los que fueron medidos (véase figura 2.7).

También para otras especies se han observado modulaciones que podrían ser por la óptica del equipo. Para verificar si en realidad las modulaciones son originadas por la óptica del equipo, se hicieron pruebas midiendo raíces y papel y las modulaciones siempre aparecieron, es por ello que las modulaciones se asocian a la óptica del equipo.

Se hicieron medidas de micro-PL para otras esporas de MA. Además, se trató de corregir las modulaciones que aparecían en los espectros mostrados en la figura 3.4, para las medidas de otras especies de hongos MA.

En la figura 3.6 se muestran diferentes espectros, arriba (línea continua azul) se muestra el espectro de la lámpara de mercurio (Hg) que tiene instalada el microscopio de epifluorescencia, el espectro ha sido cortado alrededor de los 520 nm por ello no se puede observar las líneas de mercurio que se encuentran abajo de dicho rango. Además, ese rango permite verificar si la emisión de la lámpara de mercurio afecta las medidas de Micro-PL que se han realizado. En el siguiente espectro (línea continua verde), se muestra la transmitancia del filtro de emisión que tiene uno de los juegos de filtros del microscopio de epifluorescencia y que fue utilizado para realizar las medidas de Micro-PL. El espectro que sigue (línea continua roja) es la emisión de esporas de la especie *G. intraradices*. Ese espectro se obtiene cuando se excitan las esporas a una longitud de onda alrededor de los 435 nm (excitación en azul en el microscopio de epifluorescencia), en el espectro se observan los máximos que están alrededor de: 525 nm , 540 nm , 680 nm y 710 nm . Se puede observar que los primeros tres máximos coinciden con los máximos del espectro de transmitancia, pero el máximo que está alrededor de los 710 nm no coincide con ninguno de los máximos del espectro de transmitancia. Sin embargo, ese máximo no se consideró, porque siempre se obtuvo aun poniendo otros elementos, como papel y el máximo siempre apareció igual para raíces, así que no se cree que sea un máximo que tenga alguna contribución para la Micro-PL en esporas de hongos MA. En el último espectro (línea continua negra), se puede observar el espectro de Micro-PL ya corregido como se observa el espectro de arriba (línea continua roja) presenta unos máximos que coinciden con ciertos máximos del espectro de transmisión del filtro de emisión, para tratar de eliminar esos máximos el espectro de línea continua roja se dividió por la transmisión del filtro de emisión, dando como espectro resultante el espectro de Micro-PL que se muestra abajo (línea continua negra); en el espectro resultante se observa que casi se logra eliminar los máximos asociados al filtro de emisión, como se mencionó antes el máximo que está alrededor de los 710 nm no se pudo eliminar, ese máximo no se considera como se mencionó anteriormente; además, en el espectro resultante se observa como si fuese el ala de una banda de emisión, cuyo máximo no se pudo medir debido a la transmitancia del filtro de emisión.

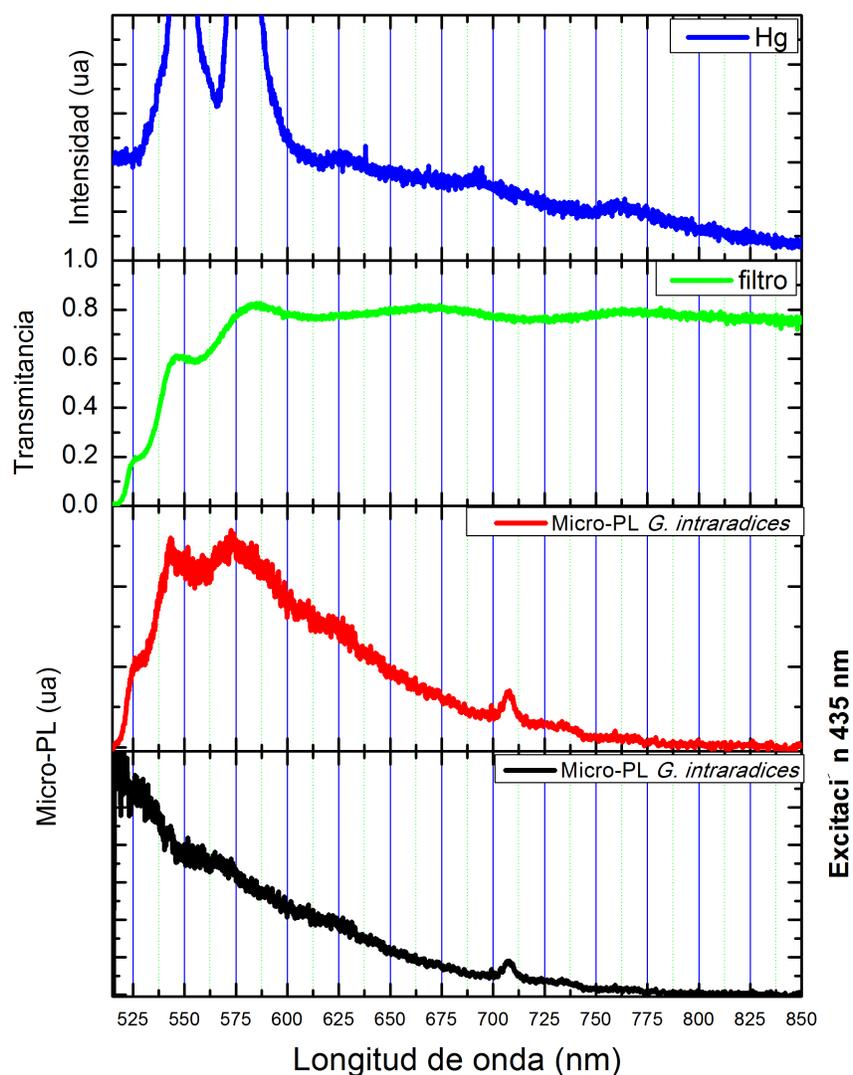
Micro-PL de esporas de la especie *Glomus intraradices*

Figura 3.6: Espectro de micro-fotoluminiscencia en esporas de la especie *Glomus intraradices*. Línea continua azul, espectro de emisión de la lámpara de mercurio; línea continua verde, espectro de transmisión del filtro de emisión; línea continua roja, Micro-PL en esporas sin corrección; línea continua negra, Micro-PL corregida por el filtro de emisión. $\sim \lambda_{exc} = 435 \text{ nm}$.

El espectro resultante de Micro-PL que se mostró en la figura 3.6, haciendo la consideración que se menciono antes que parecía ser el ala de una banda, se le hizo una simulación de una banda gaussiana, con la finalidad de encontrar de manera teórica por donde estaría el máximo de emisión de las esporas.

En la figura 3.7 se muestra la simulación de una banda gaussiana (línea continua roja), la

simulación se hizo utilizando el programa OriginLab 8, para obtener la banda que coincidiera con el espectro de Micro-PL (línea continua gris), para la simulación fue necesario cambiar el máximo (centro de la banda) y el ancho total a la altura media (FWHM: Full Width at Half Maximum, en inglés) de la banda; el resultado de la simulación tiene un máximo alrededor de los 470 nm y un FWHM de 250 nm .

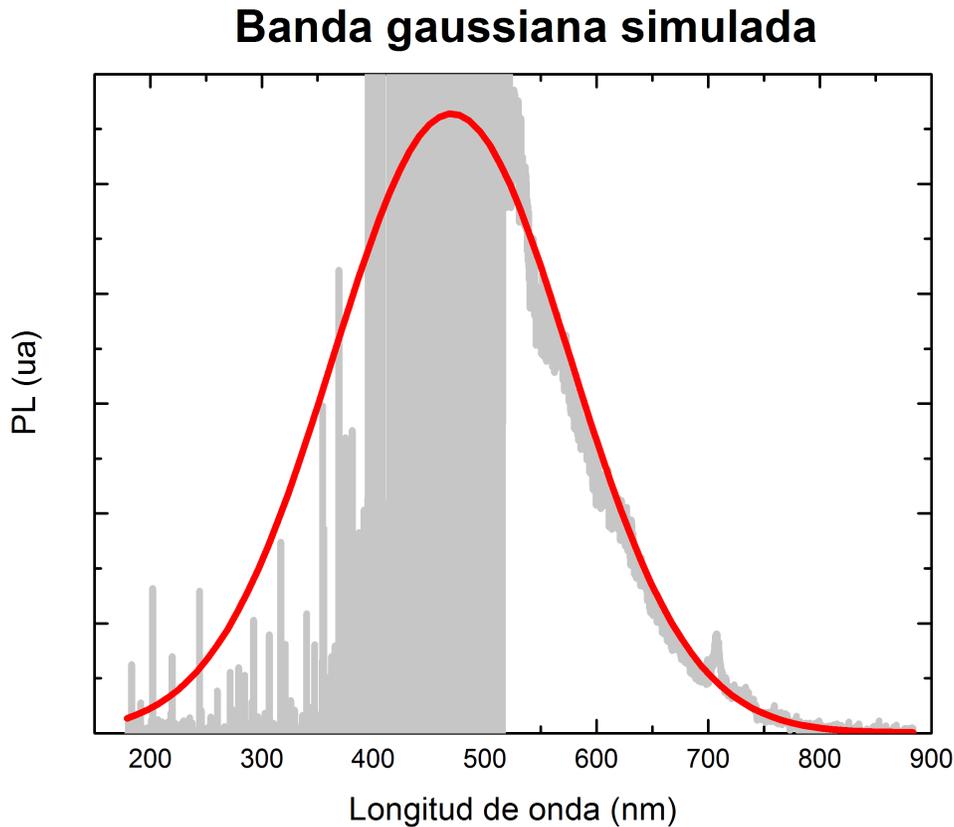


Figura 3.7: Espectro de micro-fotoluminiscencia en esporas de la especie *Glomus intraradices*. Línea continua gris, Micro-PL ya corregida por el filtro de emisión; línea continua roja, Simulación de una banda gaussiana.

La simulación de la banda gaussiana, podría ser una posible tendencia del espectro de Micro-PL para esporas. Si se compara el resultado obtenido con los que reportaron Jabaji-Hare et al. (1984) [11], ellos reportan que la quitina es la responsable de la emisión de hongos MA y el espectro que muestran para vesículas de *Glomus* esta comprendido desde los 350 nm a 500 nm (véase figura 1.5), obtuvieron un máximo alrededor de los 413 nm , ese máximo podría estar comprendido dentro de la simulación de la banda gaussiana, pero el espectro experimental mostrado en la figura 3.7 (línea continua gris) no coincide con lo reportado por Jabaji-Hare et al. (1984) [11].

Según los resultados, es posible que no solo la quitina sea la responsable de la emisión de hongos MA. Por otra parte, resultados reportados por Dreyer et al. (2006) [13], muestran un espectro de emisión para arbusculos (véase figura 1.10), en dicho espectro la emisión está comprendida entre los 500 nm y 650 nm, el espectro que ellos reportan si coincide con los obtenidos en este documento, pese a que ellos reportaron que la fuente de emisión podría estar en la pared celular del hongo, en este trabajo se reporta que también el citoplasma emite, por lo tanto la emisión como se había mencionado antes no solo se le asocia a la pared celular ni al citoplasma, si no que aun componente que puede estar tanto en la pared celular como en el citoplasma de hongos MA. Más adelante se discutirá los resultados obtenidos en este trabajo con los reportados por Dreyer et al. (2006) [13].

Para todas las especies estudiadas, la Micro-PL es similar, siempre se observa como si fuese el ala de una banda (véase figura 3.8).

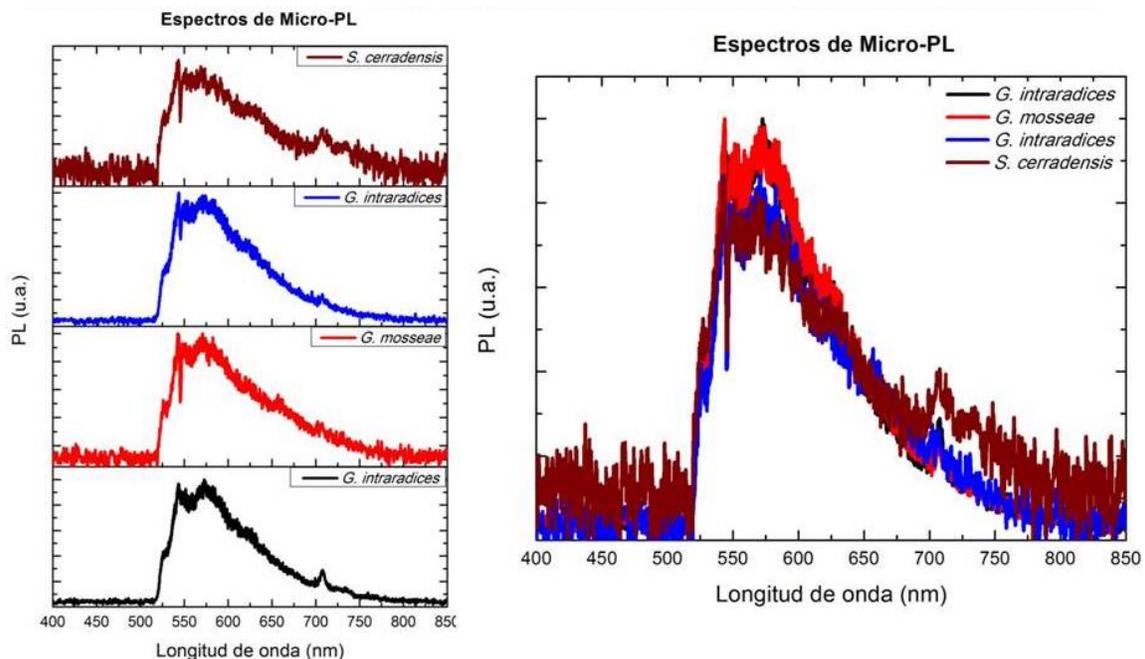


Figura 3.8: Espectro de micro-fotoluminiscencia en esporas de varias especies. Línea continua azul y negra, especie *Glomus intraradices*; línea continua roja, especie *G. mosseae*; línea continua café, especie *G. cerradensis*. $\sim \lambda_{exc} = 435$ nm.

En la figura 3.8, a la izquierda se muestran los espectros de Micro-PL de esporas de diferentes especies, la línea continua café es el espectro de Micro-PL que se obtuvo de las esporas de la especie *Scutellospora cerradensis*, abajo se muestra con línea continua azul es el espectro de Micro-PL para esporas de la especie *G. intraradices*, línea continua roja es el espectro de

Micro-PL para esporas de la especie *G. mosseae*, abajo en línea continua negra es el espectro de Micro-PL para esporas de la especie *G. intraradices*. El espectro de la línea continua azul y negra son de la misma especie, pero propagadas en diferentes lugares. A la derecha de la figura 3.8, se muestran los mismos espectros de la izquierda, pero presentados en una sola lámina con el fin de observar la coincidencia de los espectros.

Como se puede observar en la figura 3.8, hay mucha similitud de los espectros de Micro-PL. La similitud podría ser porque la fuente de emisión de esporas de hongos MA es la misma independientemente de la especie. Por otra parte, el rango donde se observa la Micro-PL, esta dentro de los intervalos donde observaron máximos de emisión que fueron reportados por Dreyer et al. [13, 14] (véase tabla 1.2). Como se mencionó antes, debido a la transmisión del filtro de emisión del microscopio de epifluorescencia, no se puede medir longitudes de onda que están abajo de los 520 nm, por ello fue necesario hacer medidas de luminiscencia, utilizando diferentes longitudes de onda de excitación que están comprendidas alrededor de los 290 nm, 350 nm, 365 nm y 395 nm. Para cada longitud de onda de excitación, fue necesario utilizar diferentes equipos de medida que están descritos en el capítulo dos. A continuación, se presentan los resultados de fotoluminiscencia y se observará la similitud que tienen algunos espectros con la Micro-PL en esporas de hongos MA.

En la figura 3.9, se presentan espectros de fotoluminiscencia (PL) (líneas continuas negras, azules, púrpura y roja) y espectro de Micro-PL (línea continua verde) para esporas de hongos MA de la especie *G. caledonium*. La longitud de onda de excitación se detalla en el recuadro que aparece en la derecha del gráfico. Los espectros fueron tomados con diferentes equipos de medida como se mencionó antes.

Se puede observar que en los espectros mostrados en la figura 3.9, algunos no muestran mucha similitud entre ellos, una de las causas podría ser las longitudes de onda con la que se excitó. Para cada una de las medidas se excitaron con diferente longitud de onda, como se mencionó anteriormente. Para las líneas continua negra y azul los espectros son muy similares, la excitación se hizo a 290 nm para la línea continua negra de la figura 3.9 y de 350 nm para la línea continua azul, en ambos casos el máximo de emisión coincide alrededor de los 417 nm. El máximo de emisión para eso dos espectros casi coincide con los reportados por Jabaji-Hare et al. (1984) [11] (véase figura 1.5), donde la excitación fue alrededor de 325 nm y el escaneo para obtener la emisión la colectaron de 350 nm hasta 600 nm, comparando el espectro de emisión de vesículas que está en la figura 1.5, con el de esporas que se muestran en la figura 3.9 (solo línea continua negra y azul), se podría decir que hay resultados coherentes con los mostrados

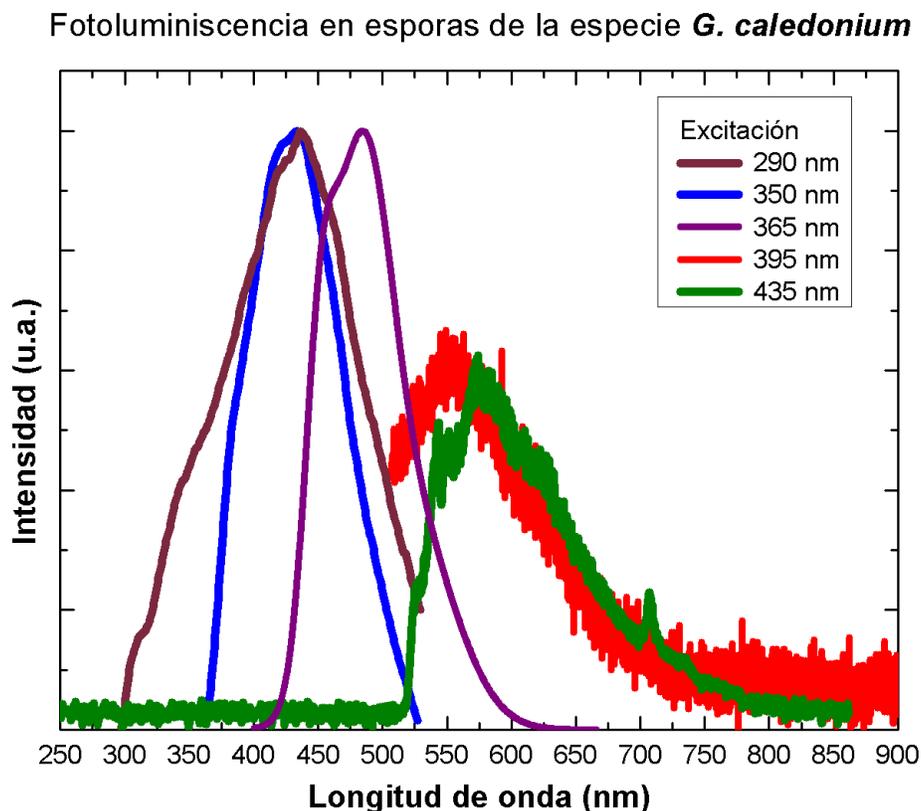


Figura 3.9: Espectro de fotoluminiscencia en esporas de la especie *Glomus caledonium*. Línea continua azul y negra es el espectro de fotoluminiscencia utilizando el LS 55, las líneas de excitación fueron 290 nm y 350 nm, respectivamente. Línea continua púrpura, espectro tomado con el espectrógrafo de absorción USB4000-UV-VIS, excitación alrededor de los 365 nm. Línea continua roja, fotoluminiscencia tomada con un espectrógrafo de fluorescencia USB4000-FL-395, excitación alrededor de 395 nm. Línea continua verde, espectro de Micro-PL, excitación alrededor de 435 nm.

por Jabaji-Hare et al. [11]. Para la línea continua púrpura se excitó alrededor de los 365 nm, el máximo de emisión no coincide para ninguna de las bandas mencionadas anteriormente, el máximo de emisión para este espectro anda alrededor de los 480 nm y presenta otro que está alrededor de los 470 nm, el máximo que está alrededor de los 470 nm coincide con el máximo obtenido para la simulación de la banda gaussiana que se mostró en la figura 3.7. La línea continua roja es el resultado de excitar alrededor de los 395 nm y la línea continua verde fue excitada alrededor de los 435 nm. En la figura 3.9 se puede observar la emisión para la línea continua negra y azul es muy similar, pero para la emisión de la línea continua púrpura es diferente, como se mencionó antes tiene dos máximos de emisión, para el caso de la línea continua roja y verde se observa mucha similitud, como se había mencionado anteriormente para la línea continua verde que es un espectro de Micro-PL podría ser el ala de una banda de emisión, de la misma manera se observa la línea continua roja, ya que estas dos últimas

coinciden como se muestra en la figura 3.9. Al hacer la comparación con la simulación de la banda gaussiana, se observó que la banda prácticamente abarca todo el rango de longitudes de onda, donde se encuentran los espectros de emisión de la figura 3.9. Haciendo la comparación de los espectros de emisión que reportaron Jabaji-Hare et al. 1984, y como se había mencionado con anterioridad no solo la quitina podría ser el responsable de la emisión para hongos MA. A continuación se presentan resultados comparados con Dreyer et al. 2006 [13]

En la figura 3.10 se muestran espectros de PL, la línea continua roja es el mismo espectro mostrado en la figura 3.9 (línea continua roja), hay un recuadro azul donde se amplifica la región de la PL comprendida entre 500 *nm* y 625 *nm*, en la amplificación se muestra puntos negros, estos puntos negros representan el espectro de emisión de arbusculos de hongos MA de la especie *G. intraradices* y que fue presentado en el capítulo 1 (véase figura 1.10).

Al observar la similitud en los espectros de PL, se podría decir que la fuente de emisión tanto para estructuras intra y extraradicales podría ser la misma. Además, esto concuerda con lo que se había mencionado antes, que la fuente de emisión no depende de la especie de los hongos MA. Se han reportado máximos de emisión en esporas que están alrededor de los 503 - 527 *nm*, 559 - 608 *nm* y 655 - 680 *nm* (véase tabla 1.2).

En los resultados de este trabajo se puede observar un máximo que está alrededor de 550 *nm*, los otros máximos reportados por Dreyer et al. (2006) [13] pueden estar dentro del ala de la banda de emisión, de la línea continua roja de la figura 3.10.

Además, en este trabajo se ha reportado otros máximos de emisión que no fueron reportados por Dreyer et al. (2006) [13], ni por Jabaji-Hare et al. (1984) [11].

Buscando posibles responsables de la fuente de emisión para hongos MA, se procedió a hacer algunos extractos de componentes que podrían contribuir en la emisión. Uno de los componentes que podría contribuir a la emisión es la glomalina. La glomalina se extrajo porque se ha encontrado glomalina tanto en la pared celular como el citoplasma de hongos MA [16].

Hay otros componentes que podrían contribuir a la emisión de hongos MA, que no se extrajeron y que también pueden contribuir a la emisión de hongos MA, estos son glucanos, quitina, entre otros. Los resultados obtenidos para glomalina se mencionarán en la siguiente sección.

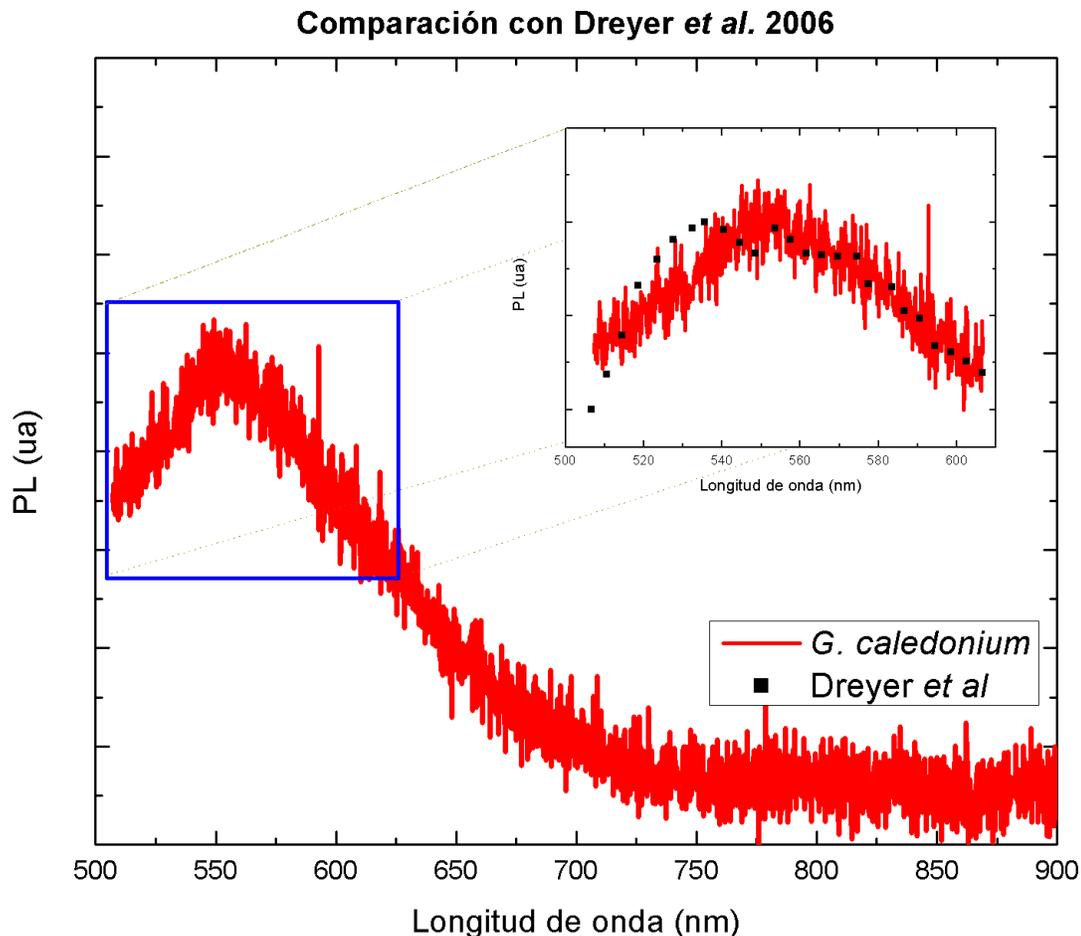


Figura 3.10: En grande con línea continua roja es el espectro de emisión obtenido para la especie *Glomus caledonium*. La región marcada con color azul es donde se comparan los resultados con B. Dreyer et al. Los resultados obtenidos por B. Dreyer et al. son los que están marcados con puntos negros y pertenecen a arbusculos de la especie *G. intraradices*. $\sim \lambda_{exc} = 435$ nm.

3.2. Absorción y fotoluminiscencia de glomalina

3.2.1. Glomalina fácilmente extraíble

En la figura 3.11, se muestran cinco espectros de absorción y cinco de emisión, para la glomalina que fue extraída utilizando el protocolo propuesto por Wright y Upadhyaya, las gráficas están en parejas (absorción y emisión). Las bandas de absorción obtenidas se representan con líneas continuas púrpuras; las líneas continuas verdes es la fotoluminiscencia para cada una de las muestras.

Para los espectros de absorción se utilizó como fuente de luz una lámpara de deuterio, para

la emisión se excitó alrededor de los 365 nm, utilizando como fuente de luz una lámpara de mercurio. Además, para cada espectro aparece una línea continua roja, la línea continua roja representa el resultado de hacer deconvoluciones gaussianas a cada uno de los espectros, las deconvoluciones gaussianas se obtuvieron fijando los máximos que aparecen detallados en cada uno de los espectros de la figura 3.11.

La subfigura 3.11a, muestra los espectros de absorción y emisión de la glomalina extraída de raíces de maíz, la subfigura 3.11b los espectros de absorción y emisión de la glomalina extraída de raíces de limón, la subfigura 3.11c los espectros de absorción y emisión de la glomalina extraída de suelo de maíz, la subfigura 3.11d los espectros de absorción y emisión de la glomalina extraída de suelo de limón y la subfigura 3.11e los espectros de absorción y emisión de la glomalina extraída de esporas de hongo MA.

El resultado de la deconvolución gaussiana da los máximos señalados en cada espectro, están de color rojo. Para los espectros de emisión (líneas continuas verdes). Para estas muestras se obtiene una gran dispersión de los valores máximos, esto podría ser porque no solo se extrajo glomalina utilizando el protocolo de glomalina fácilmente extraíble propuesto por Wright y Upadhyaya [23]. Sin embargo, los espectros de absorción se observan muy similares.

Las bandas de emisión de la glomalina extraída de raíces de *Z. mays*, *C. limonum*, suelo de *Z. mays*, suelo de *C. limonum* y esporas de hongos MA de especie desconocida utilizando el protocolo de glomalina fácilmente extraíble se han mostrado en la figura 3.11. Los máximos obtenidos de la deconvolución gaussiana son muy dispersos. Aunque, se observa gran similitud entre las bandas. Más adelante se observará la comparación de los espectros de emisión

En el protocolo propuesto por Driver et al. (2005) [24], anteponen unos pasos al protocolo propuesto por Wright y Upadhyaya, con estos pasos ellos proponen que es probable que se logre separar la glomalina que está fuertemente unida a la pared celular de hongos MA [24].

En la tabla 3.1, se resumen los máximos de emisión señalados en los espectros de la figura 3.11, se observará que los máximos obtenidos con las deconvoluciones en perfiles gaussianes están muy dispersas, esto podría ser debido a que están involucrados otros componentes en la separación de la glomalina como se había mencionado arriba.

Comparación de espectro de absorción y emisión ($\lambda_{exc} = 365nm$) de la glomalina

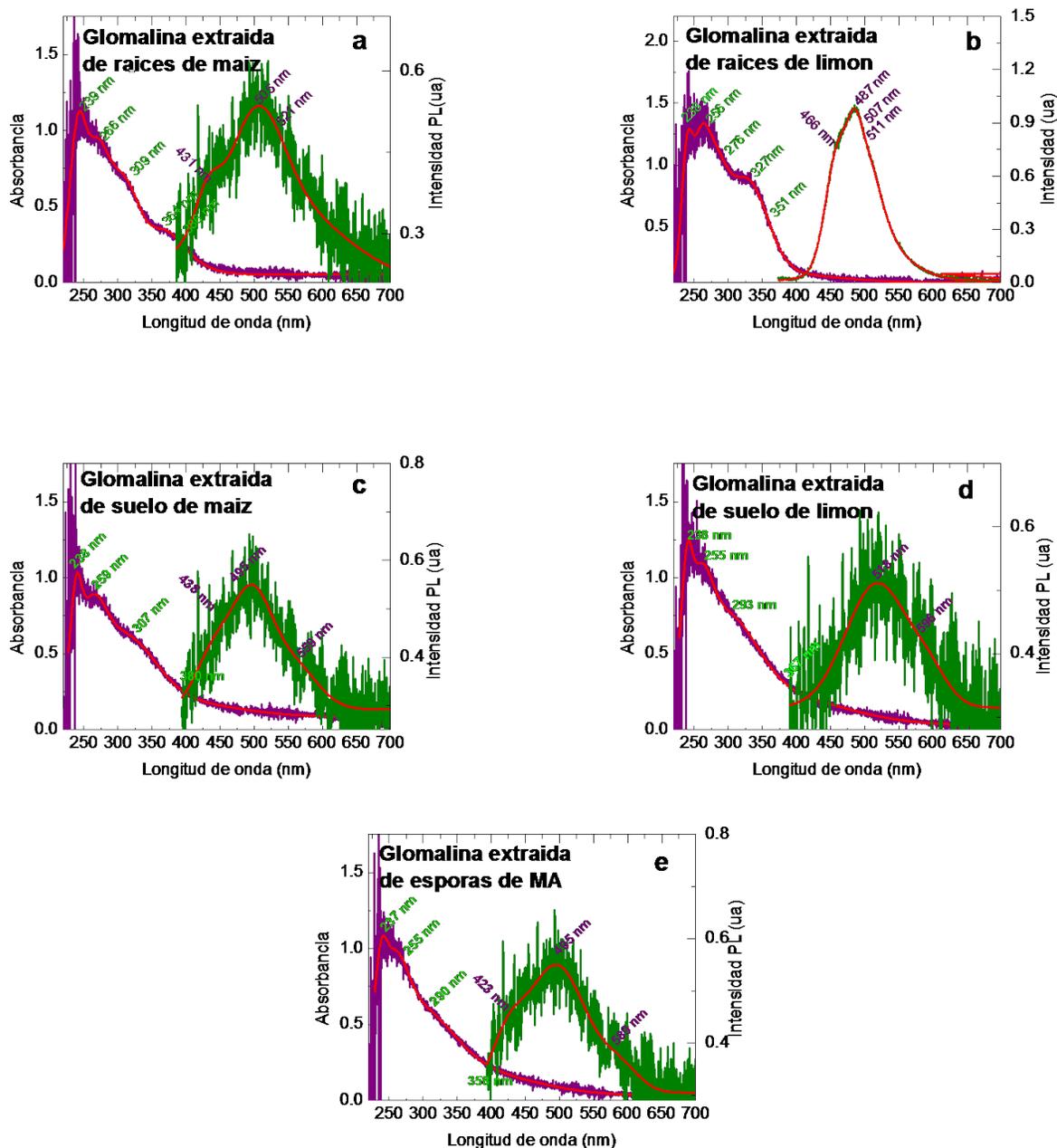


Figura 3.11: Gráficas donde se muestran los espectros de absorción (líneas púrpuras) y de emisión (líneas verdes), para la glomalina extraída utilizando el protocolo de glomalina fácilmente extraíble **a.** Glomalina extraída de raíces de *Z. mays*, **b.** Glomalina extraída en raíces de *C. limonum*; **c.** Glomalina extraída de suelo de *Z. mays*; **d.** Glomalina extraída de suelo de *C. limonum*, **e.** Glomalina extraída de esporas de MA. Los máximos obtenidos de una deconvolución gaussiana (líneas rojas) se muestran en cada espectro.

Tabla 3.1: Máximos obtenidos de la deconvolución gaussiana realizada a las bandas de emisión de glomalina extraída de raíces micorrizadas, suelos y esporas MA utilizando el protocolo de glomalina fácilmente extraíble. Para facilitar su visualización los máximos obtenidos se han ordenado en las mismas filas en donde aparecen máximos con longitudes de onda muy similares.

Máximos (nm)				
Raíces de <i>Zea mays</i>	Raíces de <i>Citrus limonum</i>	Suelo de <i>Zea mays</i>	Suelo de <i>Citrus limonum</i>	Esporas de MA de suelo de <i>Sorghum</i>
-	-	-	525	-
-	512	-	-	-
504	-	-	-	-
-	492	495	-	489
-	485	-	-	-
-	456	-	-	-

Como se puede observar no hay mucha similitud entre los máximos de emisión en estos extractos de glomalina, para la glomalina extraída en esporas, se observa diferente la banda de absorción comparadas con los otros extractos.

3.2.2. Glomalina extraída con el método de Driver.

En la figura 3.12, se muestran las subfiguras 3.12a-3.12e donde están las bandas de absorción y emisión obtenidas para glomalina extraída siguiendo el protocolo de Driver et al. [24]. Las líneas continuas púrpuras que están situadas a la izquierda de cada subfigura son el espectro de absorción para cada una de las muestras y las líneas continuas verdes es la fotoluminiscencia. A cada una de estas bandas se les ha aplicado una deconvolución gaussiana (líneas continuas rojas) de donde se obtienen los máximos que están señalados en cada uno de los espectros. Las medidas fueron realizadas de forma similar a los resultados que se mostraron en la figura 3.11

Como se observa claramente las bandas de absorción de glomalina extraída de suelos y raíces, utilizando este protocolo son muy similares, especialmente para las longitudes de onda por debajo de 338 nm. Por otra parte, la banda de absorción obtenida para la glomalina extraída de esporas de hongos MA también es muy similar a las correspondientes de raíces y suelo. Sin embargo, la deconvolución gaussiana de ésta, solamente da como resultado dos máximos

Comparación de espectro de absorción y emisión ($\lambda_{exc} = 365nm$) de la glomalina

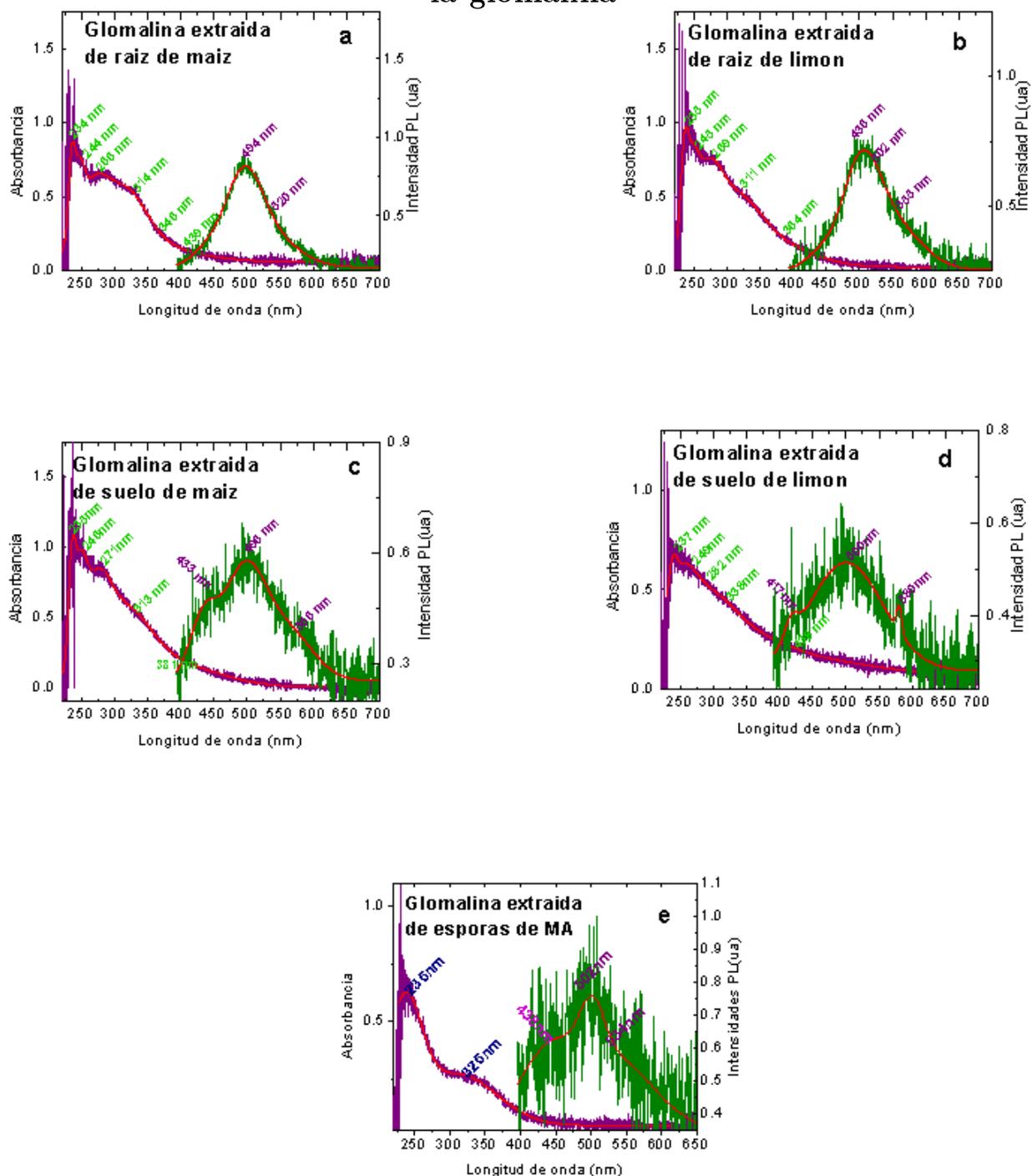


Figura 3.12: Gráficas donde se muestran los espectros de absorción (líneas púrpuras) y de emisión (líneas verdes), para la glomalina utilizando el protocolo de extracción de Driver. **a.** Glomalina extraída de raíces micorrizadas de *Z. mays*; **b.** Glomalina extraída en raíces micorrizadas de *C. limonum*; **c.** Glomalina extraída de suelo de *Z. mays*; **d.** Glomalina extraída de suelo de *C. limonum*, **e.** Glomalina extraída de esporas MA. En cada gráfico se detallan los máximos obtenidos de una deconvolución gaussiana (líneas rojas) de las bandas.

a 311 nm y 235 nm. Estos máximos coinciden con dos de los máximos obtenidos para la glomalina extraída de suelos y raíces.

Las similitudes en las bandas de absorción se podrían interpretar como la absorción de esporas de hongos MA tiene su origen principalmente en la glomalina, aunque el propósito de este trabajo es caracterizar la emisión. Para la glomalina extraída de esporas se observan muy similar los espectros de emisión como se puede apreciar en las subfiguras 3.11e y 3.12e. El protocolo de Driver es mejor para extraer glomalina para suelo y raíces, no obstante se pueden usar los dos cuando se extrae glomalina de esporas de hongos MA. Más adelante se realizará una comparación de ambos espectros, para corroborar si son similares.

En la tabla 3.2, se puede observar los máximos más representativos del resultado de hacer la deconvolución gaussiana a los espectros de emisión mostrados en la figura 3.12.

Tabla 3.2: Máximos obtenidos de la deconvolución gaussiana realizada a las bandas de emisión de glomalina extraída de raíces, suelos y esporas MA utilizando el protocolo de Driver et al (2005) [24]. Para facilitar su visualización los máximos obtenidos se han ordenado en las mismas filas en donde aparecen máximos con longitudes de onda muy similares.

Máximos (nm)				
Raíces de <i>Zea mays</i>	Raíces de <i>Citrus limonum</i>	Suelo de <i>Zea mays</i>	Suelo de <i>Citrus limonum</i>	Esporas de MA de suelo de <i>Sorghum</i>
520	555	566	580	534
494	502	496	500	501
439	436	433	417	438

Se puede observar los máximos están muy cercanos, con ello podemos decir que la glomalina podría contribuir a la emisión de hongos MA, además como se observó en las figuras 3.3 y 3.4 que hay emisión tanto en el citoplasma como en la pared celular. Esto podría contribuir con la discusión que realizaron S. Purin y M. Rillig, donde observaron glomalina en el citoplasma y pared celular de hongos MA, mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM: por sus siglas en inglés. Transmission Electron Microscopy) [16].

Como se ha observado en las figuras 3.11 y 3.12, se observan diferentes las fotoluminiscencia, a excepción de cuando se hace el extracto de glomalina a esporas . Para el caso de

la glomalina extraída de suelo de maíz, de los dos protocolos de extracción de glomalina que fueron utilizados, hay una diferencia muy notoria en la fotoluminiscencia (véase figura 3.13).

Comparación de fotoluminiscencia en glomalina extraída de suelo de maíz. ($\lambda_{exc} \approx 365nm$)

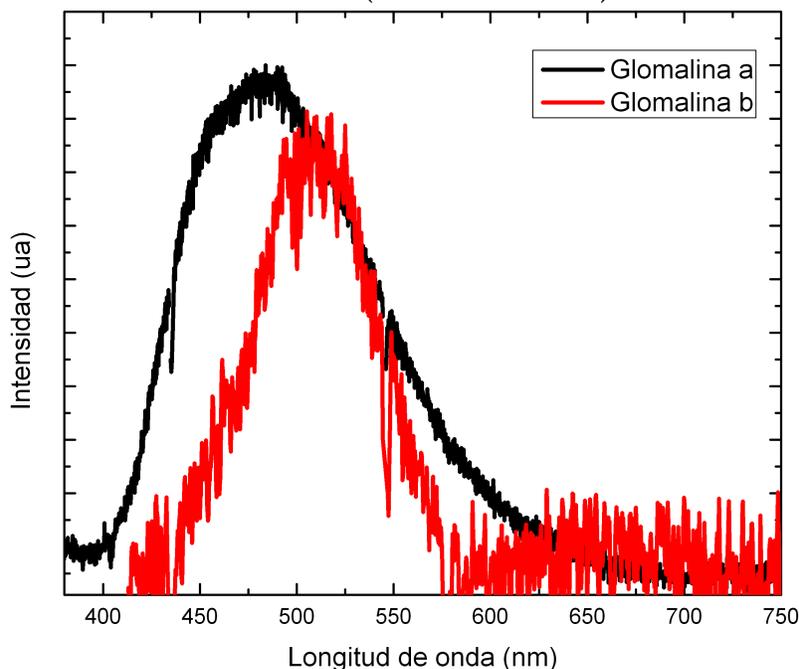


Figura 3.13: Espectros de fotoluminiscencia de extractos de glomalina de suelo de *Z. mays*. Glomalina a, extracto de glomalina fácilmente extraíble; Glomalina b, extracto de glomalina utilizando el protocolo de Driver.

En la figura 3.13, la línea continua negra es el espectro de emisión del extracto de glomalina fácilmente extraíble (Glomalina a); línea continua roja espectro de fotoluminiscencia del extracto de glomalina utilizando el protocolo de Driver (Glomalina b). Hay una notoria diferencia que muestran los espectros de la figura 3.13, esto podría ser probablemente porque en el protocolo utilizado para glomalina fácilmente extraíble se extraen otros componentes que no necesariamente puede ser glomalina [24, 29].

A la glomalina extraída de suelo cuando se utiliza el protocolo de glomalina fácilmente extraíble también se le conoce con el nombre de Glomalin-related soil protein (GRSP). De la GRSP ya hay inicio de encontrar su estructura molecular [26, 54]. Pero se ha encontrado según reportes que la estructura es muy compleja [55]. Además, se ha reportado que existen varias proteínas relacionadas con el GRSP incluyendo muchas impurezas [54].

Por otra parte, cuando se extrae glomalina de raíces utilizando los dos protocolos mencionados arriba, los espectros de emisión son muy similares (véase figura 3.14).

Comparación de fotoluminiscencia en glomalina extraída de raíces de maíz. ($\lambda_{exc} \approx 365nm$)

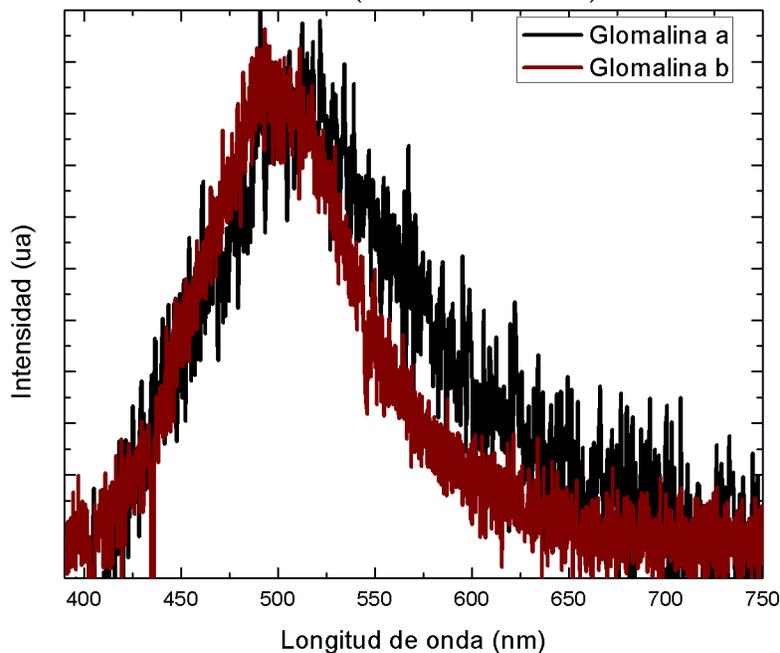


Figura 3.14: Espectros de fotoluminiscencia de extractos de glomalina de raíces de *Z. mays*. Glomalina a, extracto de glomalina fácilmente extraíble; Glomalina b, extracto de glomalina utilizando el protocolo de Driver.

Los espectros mostrados en la figura 3.14 están normalizados, la línea continua negra (Glomalina a) es la fotoluminiscencia de la glomalina fácilmente extraíble, la línea continua café (Glomalina b) es la fotoluminiscencia de la glomalina extraída con el protocolo de Driver. Se puede observar que hay mucha similitud en los espectros de emisión, esto podría ser porque se logra extraer la glomalina que está fuertemente unida a la pared celular de las estructuras micorrizas intraradicales [24, 25].

Se podría decir que para el caso de las raíces micorrizadas es indiferente el protocolo a utilizar para el extracto de glomalina, como se pudo observar en la figura 3.14 el máximo de la fotoluminiscencia es muy similar. Además, al comparar los espectros de emisión de la glomalina extraída de suelo y raíces, utilizando el protocolo de Driver. La emisión también coincide (véase figura 3.15).

Como se puede ver en la figura 3.15, se observan muy similares los espectros de emisión,

Comparación de fotoluminiscencia en glomalina extraída de raíces y suelo de maíz. ($\lambda_{exc} \approx 365nm$)

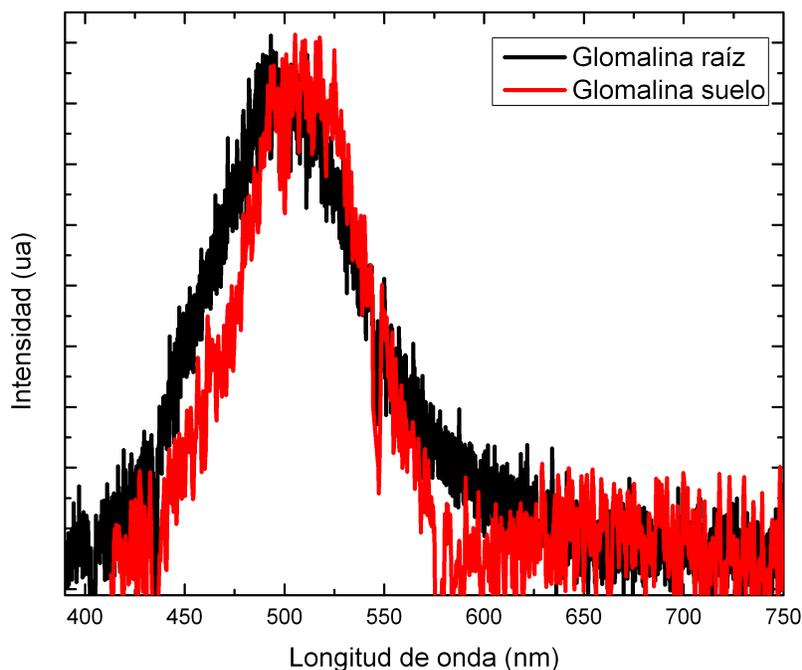


Figura 3.15: Espectros de fotoluminiscencia de extractos de glomalina de raíces y suelo de *Z. mays* utilizando el protocolo de Driver. Línea continua negra, extracto de glomalina de raíces; línea continua roja, extracto de glomalina de suelo.

la línea continua roja es el espectro de emisión para el extracto de glomalina en suelo y la negra para raíces, ambos espectros se mostraron en las figuras 3.13 y 3.14, respectivamente. La similitud podría ser debido a que la glomalina es depositada en el suelo por las hifas extrarradicales [23]. También, la glomalina está fuertemente unida a la pared celular y en el citoplasma de hongos MA [16, 23, 24].

Los extractos de glomalina utilizando el protocolo de Driver, debido a que se le antepone algunos pasos respecto a los extractos de la glomalina utilizando el protocolo de glomalina fácilmente extraíble, como se mencionó en el segundo capítulo, por ello a cada una de las separaciones se les midió el espectro de emisión (véase figura 3.16). En los espectros mostrados en la figura 3.16, la línea continua negra (Glomalina a), es la fotoluminiscencia del extracto de glomalina utilizando el protocolo de glomalina fácilmente extraíble; línea continua roja (Separación 1), espectro de emisión después del lavado que se hizo con dodecilsulfato sódico (SDS) al 2% (p/v); Separación 2, Separación con hidróxido de sodio (NaOH) al 1M; Glomalina b, Extracto de glomalina luego de pasar todas las separaciones que indica con el protocolo de Driver et al [24]. Los espectros muestran mucha similitud, esto podría ser

Comparación de fotoluminiscencia en las diferentes separaciones de glomalina extraída de raíces utilizando el protocolo de Driver.
($\lambda_{exc} \approx 365nm$)

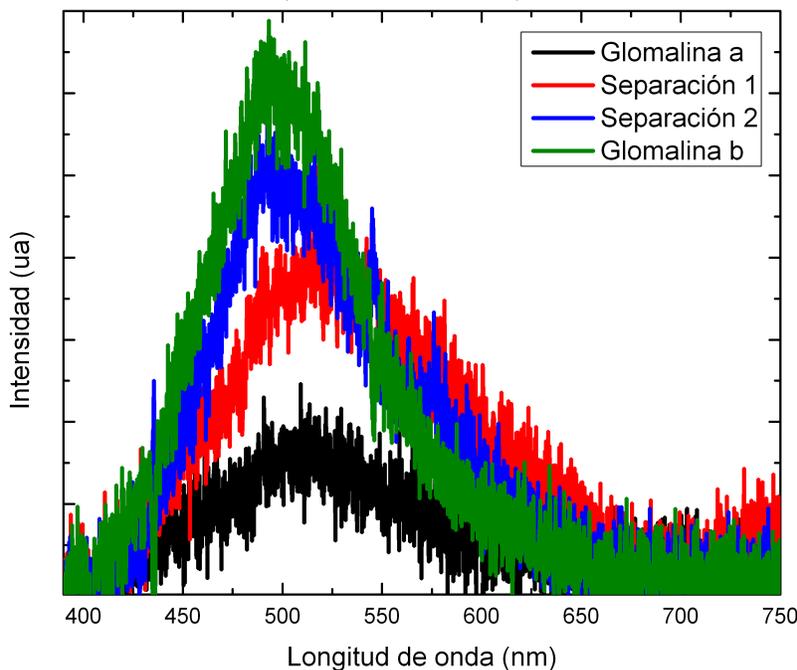


Figura 3.16: Comparación de fotoluminiscencia de las diferentes separaciones del extracto de glomalina de raíces de *Z. mays* utilizando el protocolo de Driver. Glomalina a: extracto de glomalina utilizando el protocolo de glomalina fácilmente extraíble, Separación 1: Separación que se hace con dodecilsulfato sódico (SDS) al 2% (p/v), Separación 2: Separación con hidróxido de sodio (NaOH) al 1M, Glomalina b: Extracto de glomalina con el protocolo de Driver et al.

porque cuando se hacen las Separación 1 y 2 hay desprendimiento de glomalina por la solubilidad que tiene el SDS y el NaOH con proteínas que están fuertemente unidas a la pared celular de hongos MA [24]. La glomalina a se observa que tiene menor intensidad que la Glomalina b, esto podría ser porque la concentración de glomalina extraída con el protocolo de Driver es mayor, debido a que se extrajo la glomalina que está fuertemente unida a la pared celular. Con la extracción fácilmente, es probable que aun quede glomalina en las estructuras intrarradicales por lo que los espectros están a diferentes intensidades. Sin embargo, cuando se normalizaron ambos espectros se observan muy similares (véase figura 3.14).

Para apreciar de mejor manera la contribución en la emisión que hay en los extractos de la Separación 1 y 2, se normalizaron los espectros de Separación 1, Separación 2 y Glomalina b que fueron mostrados en la figura 3.14 (véase figura 3.17).

Como se puede observar en la figura 3.17, los espectros son muy similares, con al diferencia

Espectros normalizados de fotoluminiscencia en las diferentes separaciones de glomalina extraída de raíces utilizando el protocolo de Driver. ($\lambda_{exc} \approx 365nm$)

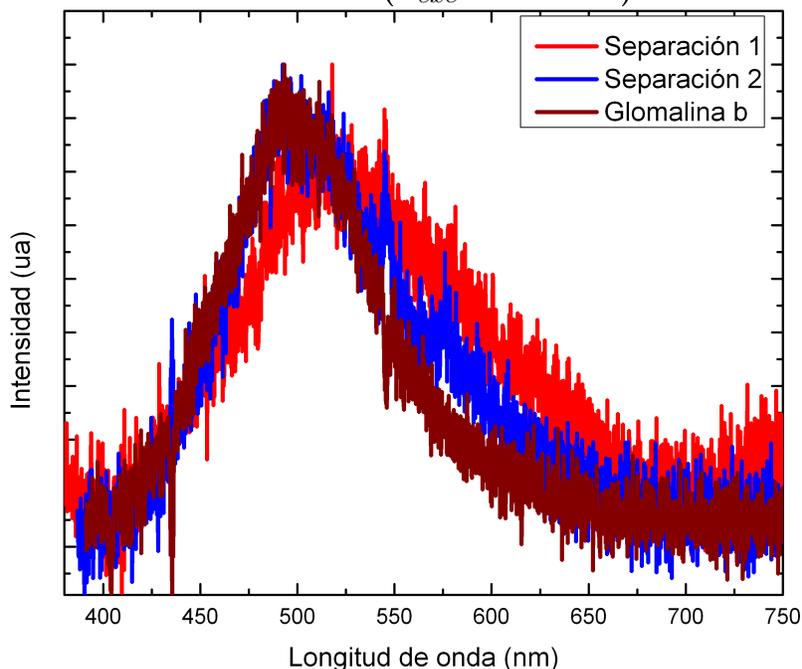


Figura 3.17: Espectros normalizados de fotoluminiscencia de las diferentes separaciones del extracto de glomalina de raíces de *Z. mays* utilizando el protocolo de Driver. Separación 1: Separación que se hace con dodecilsulfato sódico (SDS) al 2% (p/v), Separación 2: Separación con hidróxido de sodio (NaOH) al 1M, Glomalina b: Extracto de glomalina con el protocolo de Driver et al.

que entre los 525 - 650 nm, se observa una banda mayor pronunciada similar a la que se observó en la figura 3.14, esto podría ser que en las separaciones 1 y 2 están otras proteínas solubles que probablemente emitan en esa región. Aunque no se descarta como se mencionó arriba que en las separaciones queden extractos de glomalina, por la similitud y coincidencia de los máximos de emisión.

Para el caso de las esporas se trataron de manera similar, como se observó en los espectros de las figuras 3.11e y 3.12e. Los espectros de emisión de los extractos de glomalina de esporas son muy similares (véase figura 3.18). En la figura 3.18, se presentan 4 espectros de emisión; la línea continua negra (Glomalina a), es la fotoluminiscencia para el extracto de glomalina utilizando el protocolo de glomalina fácilmente extraíble; la línea continua roja (Separación 1), fotoluminiscencia de la primera extracción utilizando dodecilsulfato sódico (SDS) al 2% (p/v); línea continua azul (Separación 2), emisión de la segunda extracción utilizando hidróxido de sodio (NaOH) al 1M; Por último la línea continua verde (Glomalina b), es la fotoluminiscencia que presenta el extracto de glomalina luego de pasar por las separaciones

Comparación de fotoluminiscencia de glomalina extraída de esporas de hongos MA ($\lambda_{exc} \approx 365nm$)

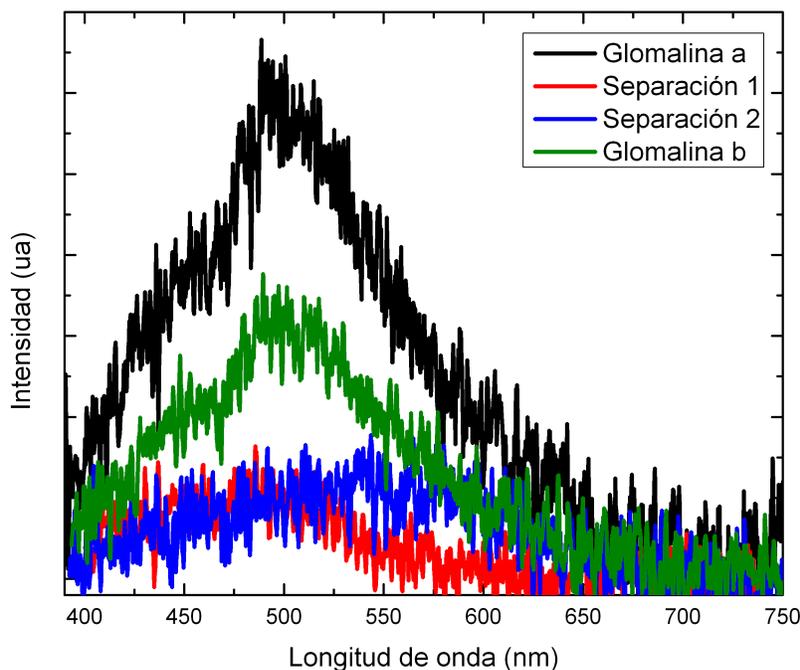


Figura 3.18: Comparación de fotoluminiscencia de las diferentes separaciones del extracto de glomalina de esporas de hongos MA utilizando el protocolo de Driver. Glomalina a: extracto de glomalina utilizando el protocolo de glomalina fácilmente extraíble, Separación 1: Separación que se hace con dodecilsulfato sódico (SDS) al 2% (p/v), Separación 2: Separación con hidróxido de sodio (NaOH) al 1M, Glomalina b: Extracto de glomalina con el protocolo de Driver.

antes mencionadas. Se puede observar en la figura 3.18 que en las separaciones 1 y 2, no muestra mucho emisión, y la poca que muestra podría ser de manera similar como se discutió en los extractos de glomalina en raíces, que podría ser otras proteínas solubles tanto en NaOH y SDS. Para las separaciones de glomalina, los espectros de Glomalina a y b, se puede observar que son muy similares, pero es más intenso el espectro de Glomalina a, caso contrario a como sucedió con las raíces. Esto podría ser porque en las esporas la concentración de glomalina está depositada en mayor concentración, en cambio en raíces es probable que la extracción que se hace con el protocolo de glomalina fácilmente extraíble no llegue a separar en totalidad la glomalina que esté fuertemente unida a las estructuras intrarradicales. Sin embargo, en las esporas es de una manera más directa porque en raíces se tiene que romper la estructura vegetal para tratar de extraer la glomalina y probablemente con el primer protocolo no se puede lograr en su totalidad. Por ello podría ser más viable hacer extractos de glomalina para esporas utilizando el protocolo de glomalina fácilmente extraíble y con el protocolo de Driver para raíces y suelos. Además, la glomalina extraída de raíces es muy similar al de las

esporas cuando se extrae utilizando el protocolo de Driver (véase figura 3.19).

Comparación de fotoluminiscencia de glomalina extraída de raíces y esporas de hongos MA ($\lambda_{exc} \approx 365nm$)

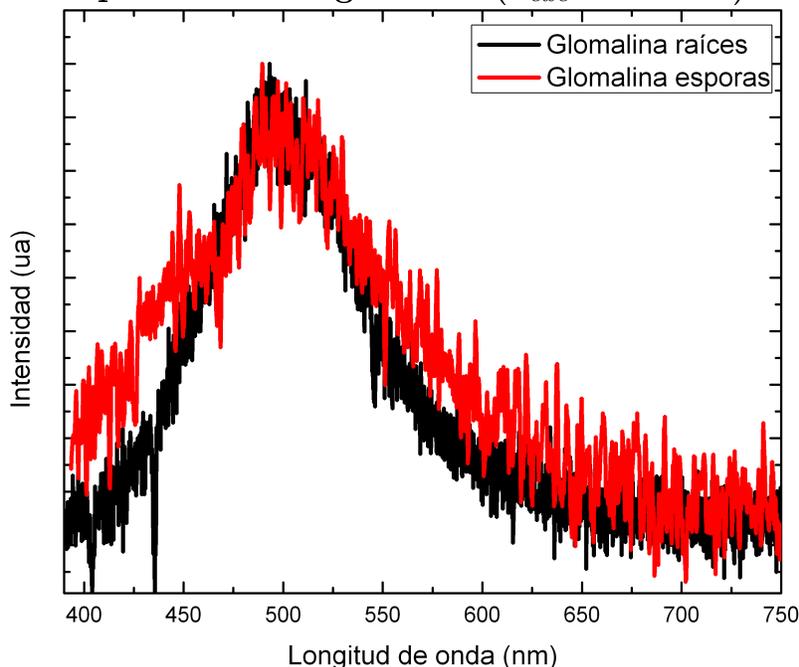


Figura 3.19: Comparación de fotoluminiscencia de los extractos de glomalina utilizando el protocolo de Driver. Línea continua negra, extracto de glomalina en raíces; línea continua roja extracto de glomalina de esporas

En la figura 3.19 están representados los espectros de emisión de extracto de glomalina en raíces (línea continua negra) y esporas (línea continua roja). El extracto se hizo utilizando el protocolo de Driver. La fotoluminiscencia para el extracto de glomalina en raíces es el mismo que se mostró en la figura 3.14 (línea continua café) y para las esporas el mostrado en la figura 3.16 (línea continua verde). Los espectros coinciden en su máximo aunque la emisión en las esporas sale más ancha que la de las raíces. Se podría decir que los espectros son muy similares y que se puede constatar que se extrajo glomalina tanto de estructuras intrarradicales como extrarradicales.

Por otra parte, al comparar los espectros de emisión ya normalizados de los extractos de glomalina mostrados en los espectros de la figura 3.18. Se puede observar la contribución de la glomalina a la emisión de esporas (véase figura 3.20).

Se puede observar en la figura 3.20 que la fotoluminiscencia en esporas (línea continua negra) es similar a la de glomalina (línea continua roja y verde) en el rango de los 400 a 480 nm aproximadamente; pero en el espectro mostrado para esporas se ve una caída de ésta entre

Comparación de fotoluminiscencia de esporas y glomalina extraída de esporas de hongos MA ($\lambda_{exc} \approx 365nm$)

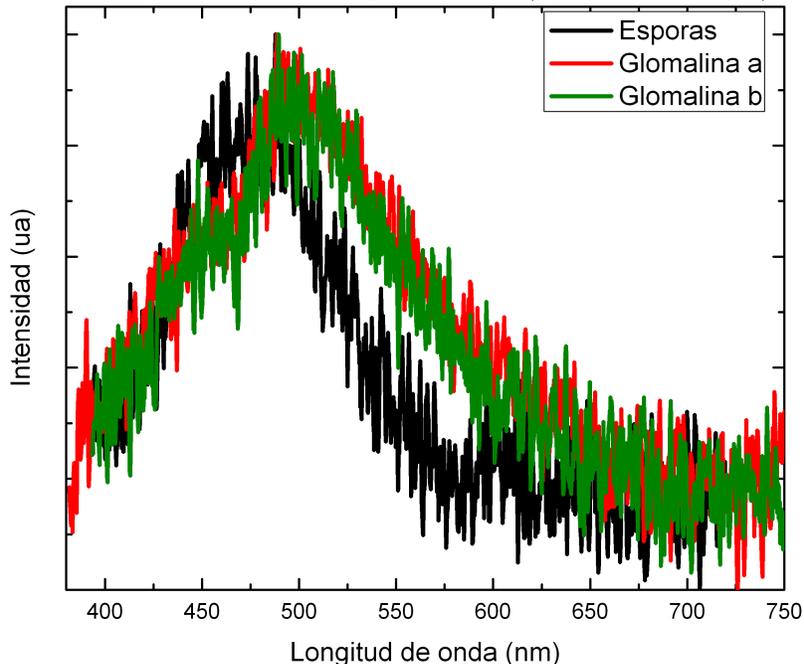


Figura 3.20: Comparación de fotoluminiscencia de esporas y de extractos de glomalina. Línea continua negra, Fotoluminiscencia de esporas; Glomalina a: Línea continua roja extracto de glomalina de esporas utilizando el protocolo de glomalina fácilmente extraíble; Glomalina b: Línea continua verde, extracto de glomalina

los 500 a 600 nm , en las cuales no coinciden y podría ser debido a que la glomalina no es la única responsable en la emisión de esporas de hongos MA, pero sí contribuye a la emisión de los mismos. Además, se observa que en la glomalina extraída utilizando ambos protocolos es muy similar para esporas aunque la intensidad es diferente, como se mostró en la figura 3.19. Es por ello que para extraer glomalina de esporas es mejor el protocolo de glomalina fácilmente extraíble.

Para tener una idea, por donde estarán los máximos de emisión, se procedió a realizar deconvoluciones en perfiles gaussianos, debido a que las líneas espectrales tienen un ensanchamiento por efecto Doppler [34]. La deconvolución en perfiles gaussianos se muestra para el espectro de PL en esporas en la figura 3.21.

Los perfiles gaussianos que se muestran en la figura 3.21, el primero, contando de izquierda a derecha tiene un máximo que está alrededor de los 461 nm y un FWHM de 89 nm , el segundo, tiene un máximo alrededor de los 493 nm e igual FWHM que el anterior. La línea

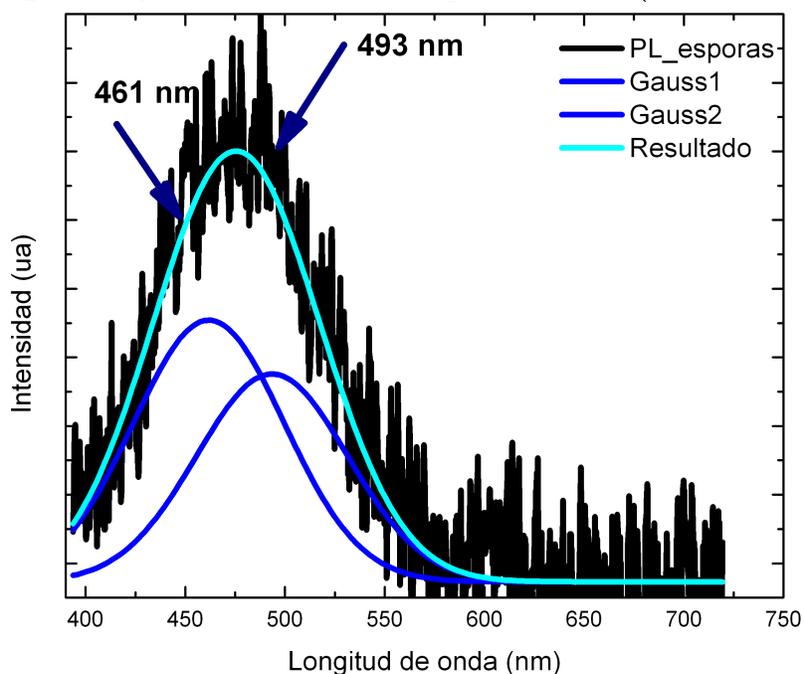
PL esporas y deconvolución gaussiana ($\lambda_{exc} \approx 365nm$)

Figura 3.21: Deconvolución gaussiana a fotoluminiscencia de esporas de hongos micorrízicos arbusculares. Línea continua negra: Fotoluminiscencia de esporas de hongos MA. Azul: Perfiles gaussianos. cian: Resultado de la deconvolución gaussiano

continua cian es el resultado de la deconvolución gaussiana de los perfiles que se mencionaron antes (líneas continuas azules).

También, para la fotoluminiscencia de los extractos de glomalina se le hizo deconvoluciones gaussianas (véase figura 3.22).

Para las figuras 3.22, los perfiles gaussianos, contando de izquierda a derecha tienen un máximo que está alrededor de los 430 nm y un FWHM de 50 nm , un segundo máximo, alrededor de los 493 nm con un FWHM de 64 nm , el tercer máximo está alrededor de los 549 nm con un FWHM alrededor de los 120 nm . La línea continua cian es el resultado de la deconvolución gaussiana de los perfiles que se mencionaron antes (líneas continuas azules). Cabe mencionar, que resultados similares se obtuvieron para la deconvolución gaussiana que se le realizó a la glomalina extraída con el protocolo de Driver.

Como se puede observar los máximos obtenidos, principalmente el que está alrededor de los 493 nm , coinciden en los tres espectros medidos (véase figuras 3.21 y 3.22). Sin embargo, los espectros para glomalina salen más ensanchados. Esto podría ser por la desnaturalización

PL glomalina a y deconvolución gaussiana ($\lambda_{exc} \approx 365nm$)

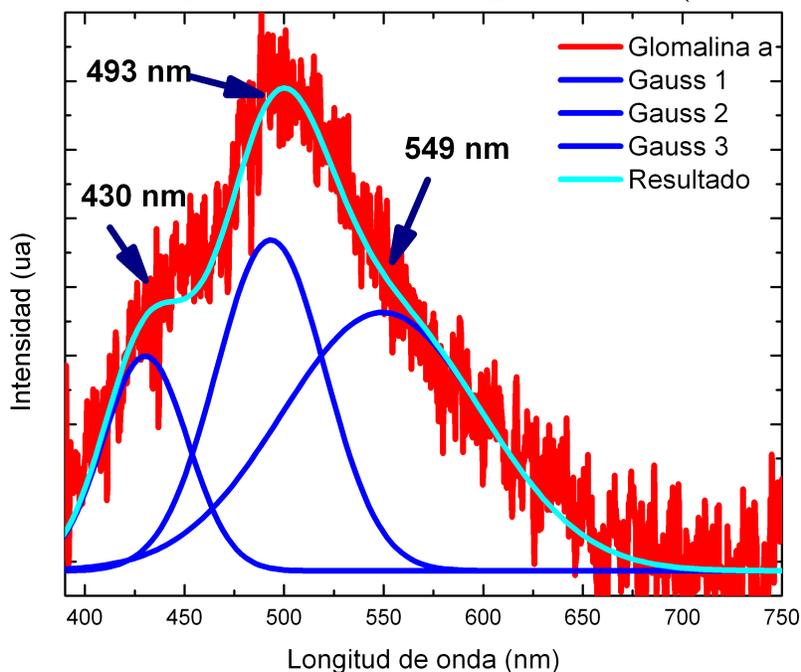


Figura 3.22: Deconvolución gaussiana a fotoluminiscencia de glomalina extraída de esporas de hongos micorrízicos arbusculares utilizando el protocolo de glomalina fácilmente extraíble. Línea continua negra: Fotoluminiscencia de glomalina extraída con el protocolo de glomalina fácilmente extraíble. Azul: Perfiles gaussianos. cian: Resultado de la deconvolución gaussiano

que sufre la glomalina con el citrato de sodio y el autoclavado, al que fueron sometidos [56].

Por otra parte, los resultados obtenidos coinciden con los de Purin y Rillig, (2008) [16]. Ellos reportaron que existe glomalina en el citoplasma y en la pared celular de hongos MA [16]. Y como contribución al conocimiento se podría constatar que también con fotoluminiscencia se puede observar que hay glomalina en hongos MA. También, observando los resultados, se podría decir que la glomalina contribuye al origen de la emisión de hongos MA. Aunque las bandas de emisión, para la glomalina se observan más ensanchadas, comparada con los otros extractos de glomalina esto podría ser debido a la desnaturalización que sufre la supuesta glicoproteína. Esto lleva a que los portadores de carga tienen otras maneras para relajarse y esto afecta la recombinación [56]. Pero posiblemente hay otros componentes que contribuyen a la emisión de hongos MA.

Las esporas de las diferentes especies estudiadas, muestran emisión cuando son excitadas con luz azul. Utilizando el microscopio de epifluorescencia, se ha observado emisión en hifas extraradicales y esporas de hongos MA como se observó en la figura 3.1.

La absorción de la glomalina también coincide con la absorción de esporas, esto se puede observar en la figura 3.23

Absorción glomalina y esporas de *Glomus intraradices*

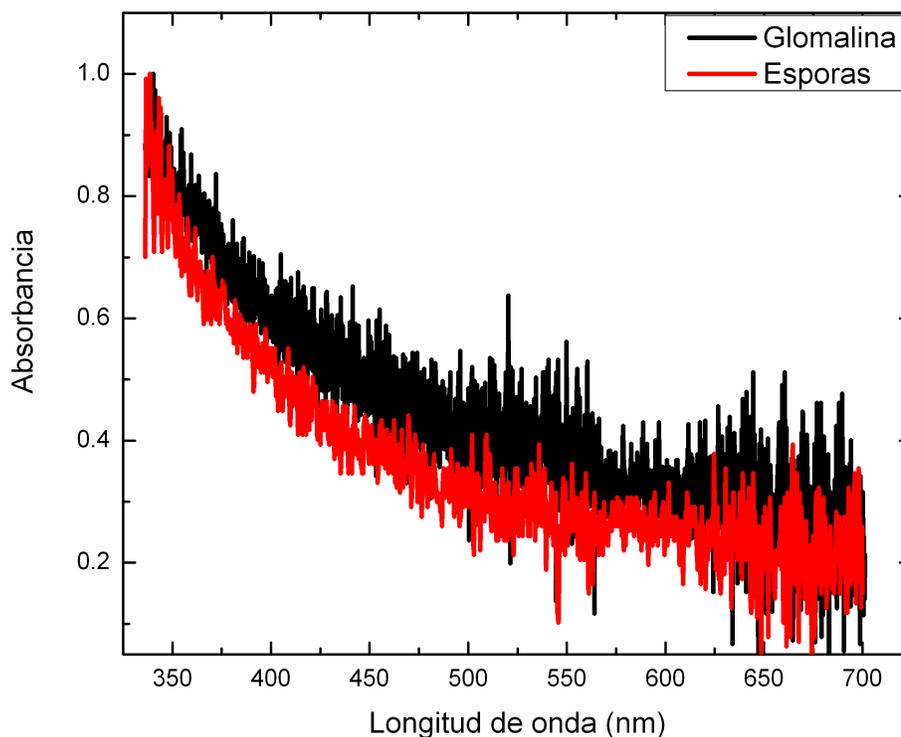


Figura 3.23: Espectro de absorción de glomalina y esporas de la especie *Glomus intraradices*. Línea continua negra: Absorción de glomalina extraída de esporas de la especie *G. intraradices*. Línea continua roja: espectro de absorción de esporas de la especie *G. intraradices*

El espectro de absorción para esporas es uno de los que se presentó en la figura 3.5. Se puede observar que en el rango donde se pudo medir el espectro de absorción de esporas, el espectro de absorción de la glomalina extraída de esporas de la especie *G. intraradices* coincide. Se podría decir, que la glomalina contribuye en la absorción de esporas de hongos MA.

Para todas las especies de hongos MA estudiadas, se obtuvo espectros de absorción similares. Por los resultados observados se podría decir que la glomalina contribuye a la emisión y absorción de hongos MA. Como se mencionó antes podrían estar otros componentes involucrados.

Capítulo 4

Conclusiones y recomendaciones

Durante el desarrollo de este trabajo se obtuvieron resultados muy interesantes, como también, hubieron muchas limitantes. Es por ello que en este capítulo que se divide en dos secciones donde se detallan las conclusiones y recomendaciones a las que se han llegado luego de terminar este trabajo.

4.1. Conclusiones

La implementación de técnicas de espectroscopia óptica ha contribuido a la caracterización del origen de la emisión de esporas de hongos MA. Además, estas técnicas pueden servir como un método alternativo y no invasivo para la detección de hongos MA.

Durante el desarrollo de esta investigación se han obtenido resultados, que son comparables con algunas publicaciones arbitradas a nivel mundial, donde utilizan equipos de alto costo. En cambio las técnicas de espectroscopia ópticas que se han utilizado en este trabajo resultan ser más cómodas que comprar un equipo que no esté al alcance económico de los proyectos que han financiado parcialmente este trabajo.

Para las especies de hongos MA estudiados se ha observado que hay emisión tanto en la pared celular como en el citoplasma. Por lo tanto el o los responsables de la emisión de esporas de hongos MA, podría estar situado tanto en la pared celular como el citoplasma. Y estaría en mutuo acuerdo con lo reportado por N. Séjalon-Delmas et al. (1998) [51] y Dreyer et al. (2006) [13], donde la emisión la localizaban en citoplasma y pared celular, respectivamente.

Los resultados obtenidos coinciden con los que publicó Purin y Rillig en el año 2008 [16]. Purin y Rillig reportaron que hay glomalina en el citoplasma y la pared celular de hongos MA. Ellos utilizaron microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés); en este trabajo se pudo observar emisión en citoplasma y pared celular en esporas de hongos MA, utilizando la técnica de microfotoluminiscencia. Es por ello que podríamos decir que uno de los causantes de la emisión es la glomalina, por lo reportado que se ha encontrado en la pared celular y citoplasma.

Los resultados en este trabajo son similares a los publicados por Dreyer et al en el año 2006 [13]. Donde obtuvieron espectros de fotoluminiscencia para estructuras intraradicales. Este resultado coincide con nuestros resultados en esporas (estructuras extraradicales). Esto nos lleva a concluir que la responsable de la emisión de hongos MA es la misma, tanto para estructuras intraradicales como extraradicales.

Los responsables de la emisión de hongos MA podría ser la misma, independientemente de la especie del hongo MA que fueron utilizados en este trabajo. En los resultados obtenidos se observó que la emisión es similar para los hongos MA de diferentes especies. Para la absorbancia, los resultados fueron similares también.

La glomalina podría contribuir a la absorción y emisión de esporas de hongos MA. Por los resultados que se obtuvieron había mucha similitud con los máximos de emisión y absorción, tanto para glomalina como para las distintas especies de esporas que fueron estudiadas.

La extracción de glomalina en esporas de hongos MA, específicamente de las especies estudiadas en este trabajo, se puede extraer utilizando cualquiera de los dos protocolos que se utilizaron en este trabajo. Los resultados obtenidos para los extractos de glomalina en esporas fueron muy similares. Aunque por facilidad y para obtener mayor cantidad de glomalina es mejor utilizar el protocolo de glomalina fácilmente extraíble, al menos en el caso de esporas.

4.2. Recomendaciones

Para realizar una caracterización más completa de las estructuras micorrícicas arbusculares es recomendable hacer medidas inmediatamente después de extraer las muestras. Además, se deberían extraer otros componentes de las estructuras micorrícicas para saber cuál es su

contribución en la emisión de éstas. Para ello sería seguir un protocolo de fraccionamiento y estudiar las diferentes fracciones por separado

Sería recomendable llevar un control de propagación de hongos micorrícios arbusculares de otras especies que no han sido estudiadas en este trabajo, y realizar las mismas medidas para observar si la emisión y la absorbancia no cambia de una especie a otra.

Se debería tratar de purificar la glomalina y así observar cómo cambia la emisión y la absorción. En comparación con los protocolos utilizados en el presente trabajo de investigación.

Para futuras investigaciones se recomienda usar otras técnicas de espectroscopia óptica, que permitan medir niveles de micorrización como por ejemplo la dispersión.

En cuanto a la documentación de la emisión sería necesario hacer nuevas fotografías, que permitan visualizar mejor la emisión en estructuras de hongos MA.

Un aspecto importante a abordar en futuras investigaciones es la simulación de espectros de absorción y fotoluminiscencia para macromoléculas que estén presentes en los hongos MA, como por ejemplo quitina y glucanos, con el fin de validar los resultados experimentales.

Por último, cabe mencionar que sería importante excitar las muestras en diferentes longitudes de onda, para observar si cambia la emisión de hongos MA.

Bibliografía

- [1] S. E. Smith y D.J. Read, *Mycorrhizal Symbiosis* (Academic Press, New York, 2008), Vol. 2, p. 787.
- [2] B. Dreyer, *El Salvador Ciencia y Tecnología* **12**, 15 (2007).
- [3] B. Bago et al. *New Phytol.* **139**, 375(1998)
- [4] K. Hammond-Kosack y J. Parker. *Curr. Opin. Biotech.* **14**, 177(2003).
- [5] J. Pozo y C. Azcón-Aguilar. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 393(2007).
- [6] V. Göhre y U. Paszkowski. *Planta* **223**, 1115(2006).
- [7] A. Morte et al. in *Proceedings de la feria de calidad ambiental y ecociencia*, 2004.
- [8] Centro Salvadoreño de Tecnología Apropiada (CESTA), Balance de la gestión ambiental realizada por los gobiernos de ARENA [en línea]. Diciembre de 2012 [citado 9 de diciembre de 2012]. Disponible en www-cesta-foe.org.sv/articulos/Balance_de_la_Gestion_Ambiental_por_los_Gob.pdf,2009.
- [9] C. Aguilar y B. Dreyer, Manual sobre técnicas utilizadas en investigaciones sobre micorrizas, No. 1, 2009. (No publicado).
- [10] Ames et al. *Can. J. Microbiol.* **28**, 351 (1982).
- [11] Jabaji-Hare et al. *Can. J. Bot.* **62**, 2665 (1984).
- [12] Vierheilig et al. *Can. J. Bot.* **79**, 231 (2001).
- [13] B. Dreyer et al. *Mycol. Res.* **110**, 887 (2006).
- [14] B. Dreyer y A. Morte, *Symbiotic Fungi: Principles and Practice, Soil Biology* (Springer Verlag, Heidelberg, 2009), p. 120.

- [15] A. Pérez et al. en *Proceeding de el Simposio Centroamericano y del Caribe de Física, San José, Costa Rica, 2009*, editado por Luz María Moya Rodríguez (Universidad de Costa Rica, Costa Rica, 2009), p.14.
- [16] S. Purin y M. Rillig, *Soil Biol. Biochem.* **40**, 1000(2008).
- [17] R. Sampieri. *Metodología de la investigación* (McGRAW - HILL, México, 1997), p. 60
- [18] R. Larry Peterson, Hugues B. Massicotte *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*(NRC Research Press, Ottawa, 2004), Vol. 1, p.57.
- [19] Claudia Rivera y Laura Renderos, Lic. Tesis, Universidad de El Salvador, 2012.
- [20] J. Pontón, *Rev. Iberoam. Micol.* **25**, 78 (2008).
- [21] M. Shaun et al. *Bio. Essays.* **28**, 799(2006).
- [22] R. Balestrini y P. Bonfante, *Plant Biosystems*,**139**, 8(2005).
- [23] Wright, S. y F. Upadhyaya, *Soil Science*, **161**, 575(1996).
- [24] D. Driver et al. *Soil Biol. Biochem.***37**, 101(2005).
- [25] Gadkar, y Rillig, *Fems Microbiolog y Letter.***263**, 93(2006).
- [26] V. Schindler et al. *Soil Biol. Bio chem* **39**, 320(2007).
- [27] K. A. Nichols, Ph.D. thesis, Maryland University, 2003.
- [28] M. Rillig y D. Mummey, *New Phytol.* **171**, 41(2006).
- [29] David P. Janos et al. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 728(2008).
- [30] A. Klingner et al. *Phyto chemistry.* **38**, 53 (1995).
- [31] A. Klingner et al. *Protoplasma* **185**, 50 (1995)
- [32] T. Fester et al., *Plant Cell. Physiol.***43**, 256 (2002).
- [33] Peter F. Bernath. *Spectra of Atoms and Molecules* (Oxfors University, New York, 1995), Vol. 1, p. 82(1995).
- [34] Demtröder W. *Laser Spectroscopy*(Springer, Berlin, 2003) Vol. 3, p. 142.
- [35] B. Valeour, *Molecular Fluorescencia: Principles and Applications*(Wiley- VCH, Toronto, 2003). p. 36.

- [36] Demtröder W. *Atoms, Molecules and Photons*(Springer, Berlin, 2006) Vol. 1, p. 217.
- [37] Demtröder W. *Molecular Physics*(WILEY-VCH, Germany, 2005) Vol. 1, p. 20.
- [38] Nikolai V. Tkachenko, *Optical Spectroscopy Methods and Instrumentations*(EL SEVIER, Tanpere, 2005), Vol.1, p. 53.
- [39] Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*(Springer, Meryland, 2006) Vol. 3, p. 28 .
- [40] Atkins, *Physycal Chemistry* (Oxford University, New York, 2006), Vol. 8, p. 35.
- [41] J. W. Gerdemann y T. H. Nicolson, Trans. Brit. Mycol. Soc. **46**, 235 (1963).
- [42] J. F. James. *Spectrograph design fundamentals* (Cambridge University, 2007), Vol.1, p. 45
- [43] L. M. A. Alvarado, Lic. Tesis, Universidad de El Salvador, 2011.
- [44] Instrumentalia, Modelo Topic T EPI, de Ceti [en línea]. Septiembre de 2012 [citado 12 de septiembre de 2012]. Disponible en <http://www.instrumentalia.com.ar/instrumentalia/catalogo/>
- [45] TED PELLA, INC. Microscopy Products for Science and Industry [en línea]. Diciembre de 2012 [citado 3 de diciembre de 2012]. Disponible en <http://www.tedpella.com/history/html/coverlip-info.htm>
- [46] Ocean Optics, Installation and Operation Manual, Halma Group Company, USA (2008)
- [47] Ocean Optics, Technical Detector Toshiba TCD1304AP [en línea]. Septiembre de 2013 [citado 18 de septiembre de 2013]. Disponible en <http://www.oceanoptics.com/technical/detectortoshibatcd1304ap.pdf>
- [48] Ocean Optics, USB Optical Bench Options [en línea]. Septiembre de 2012 [citado 12 de septiembre de 2012]. Disponible en <http://www.oceanoptics.com/Products/usb4000fl450.asp>
- [49] Institut Für Biophysik, Universotät Frankfurt [en línea]. Noviembre de 2012 [citado 20 de noviembre de 2012]. Disponible en <http://atlas.biophys.uni-frankfurt.de/index.php/de/>

- [50] PerkinElmer, LS 55 Fluorescence Spectrometer [en línea]. Noviembre de 2012 [citado 23 de noviembre de 2012]. Disponible en <http://www.perkinelmer.com/Catalog/Product/ID/L2250107>
- [51] N. Séjalon-Delmas et al. *Mycologia* **90**, 921 (1998)
- [52] IRTA, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries [en línea]. Febrero 2013 [citado 10 de febrero de 2013]. Disponible en <http://www.irta.cat/en-US/Pages/default.aspx>
- [53] Zaidín, EEZ [en línea]. Febrero de 2013 [citado 10 de febrero de 2013]. Disponible en <http://www.eez.csic.es/>
- [54] Adam W. Gillespie et al. *Soil Biol. Biochem.* **43**, 766 (2011).
- [55] Pradeep Kumar Singh et al., *Protoplasma*. **250**, 663 (2012).
- [56] Joseph R. Lakowicz. *Topics in Fluorescence Spectroscopy. Protein Fluorescence* (Kluwer Academic Publishers, Maryland, 2002), Vol.6, p. 30

Anexos

Durante la investigación se obtuvieron resultados que no se especifico en el capítulo 3, pero si fueron considerados para resaltar algunos resultados. Por otra parte, algunas especificaciones de los equipos utilizados no fue detallado en el capítulo 2. A conitunación, se muestran los espectros de emisión de algunas fuentes de luz que se utilizaron durante la investigación. Además, algunos resultados que contribuyeron con la discusión de los puntos más importantes en este trabajo. También, algunas hojas de especificación de equipo utilizado.

Espectros de emisión de las lámparas de deuterio y mercurio

La lámpara de deuterio fue utilizada para realizar las medidas de absorción.

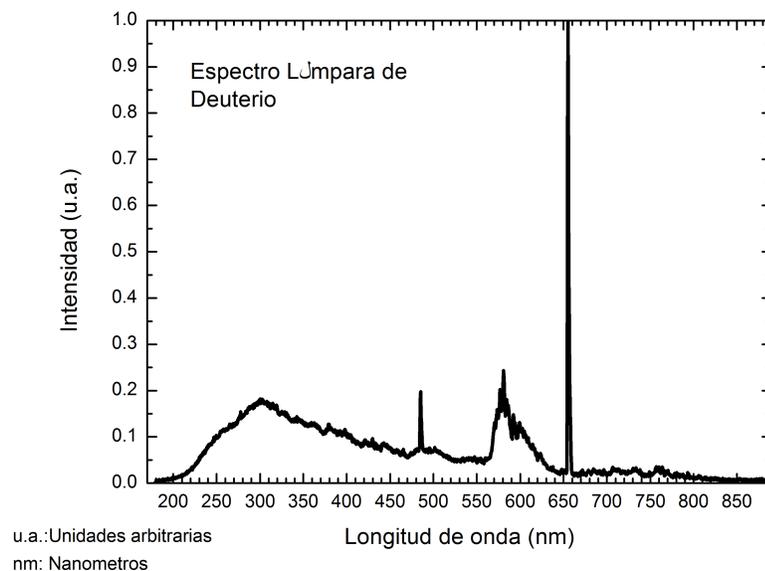


Figura 4.1: Espectro de emisión de la lámpara de deuterio. Esta lámpara fue utilizada para medir absorción.

Para las medidas de fotoluminiscencia y micro-fotoluminiscencia se utilizó una lámpara de mercurio. El espectro de emisión de la fuente de luz de mercurio se muestra a continuación

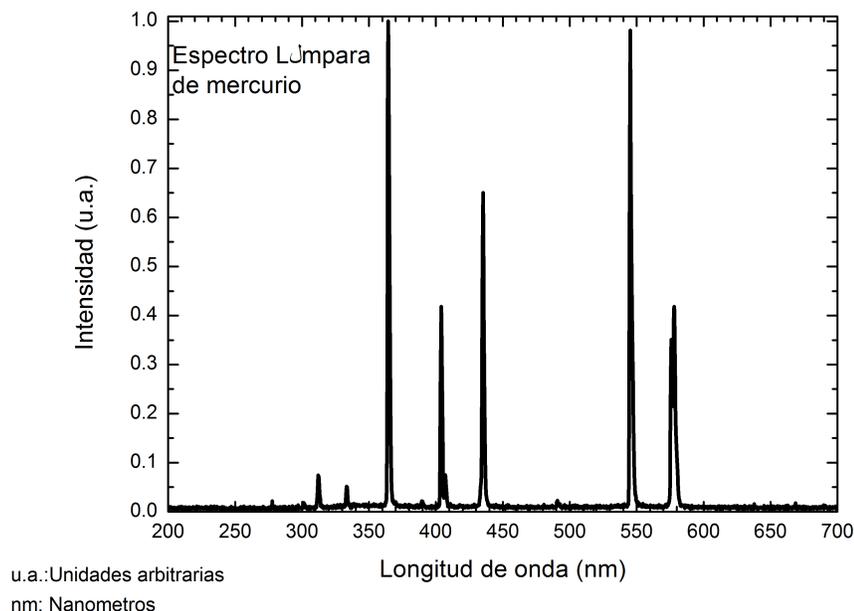


Figura 4.2: Espectro de emisión de la lámpara de mercurio. Esta lámpara fue utilizada para la excitación en foto y Micro-fotoluminiscencia.

Los espectros de transmisión de los filtros que se ocuparon para seleccionar las longitudes de onda de la fuente de luz de mercurio, se mostraron en el capítulo 2.

Resultados de absorción y fotoluminiscencia

Se obtuvieron resultados de absorción para glomalina extraída de esporas, utilizando el método de Driver et al., 2005.(véase figura 4.3).

También, se hicieron medidas de microfotoluminiscencia, excitando a dos longitudes de onda diferente (véase figura 4.4).

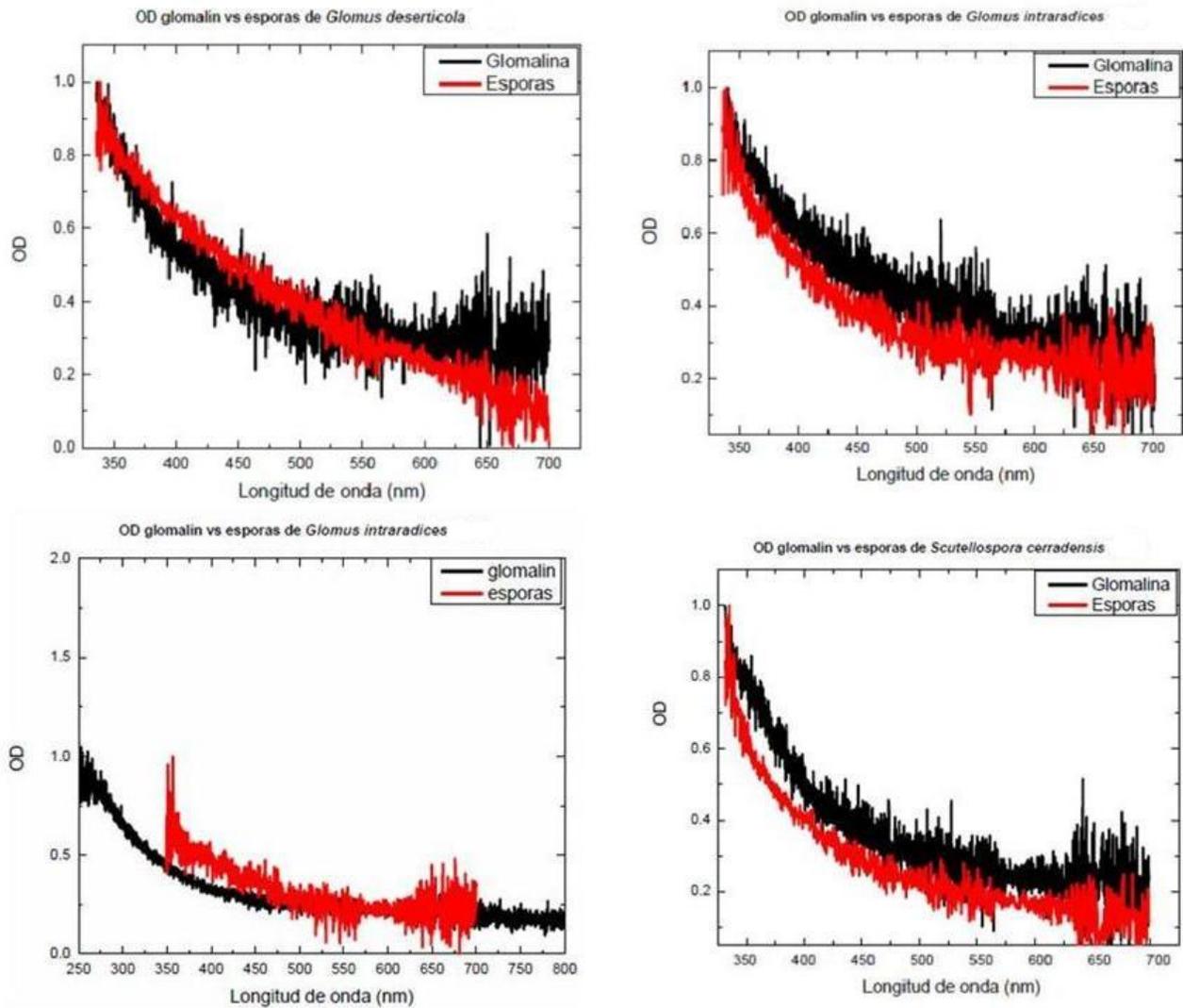


Figura 4.3: Absorbancia en glomalina extraída de esporas de cuatro especies diferentes. Negro: Espectro de absorción del extracto de glomalina. Rojo: Espectro de absorción de esporas.

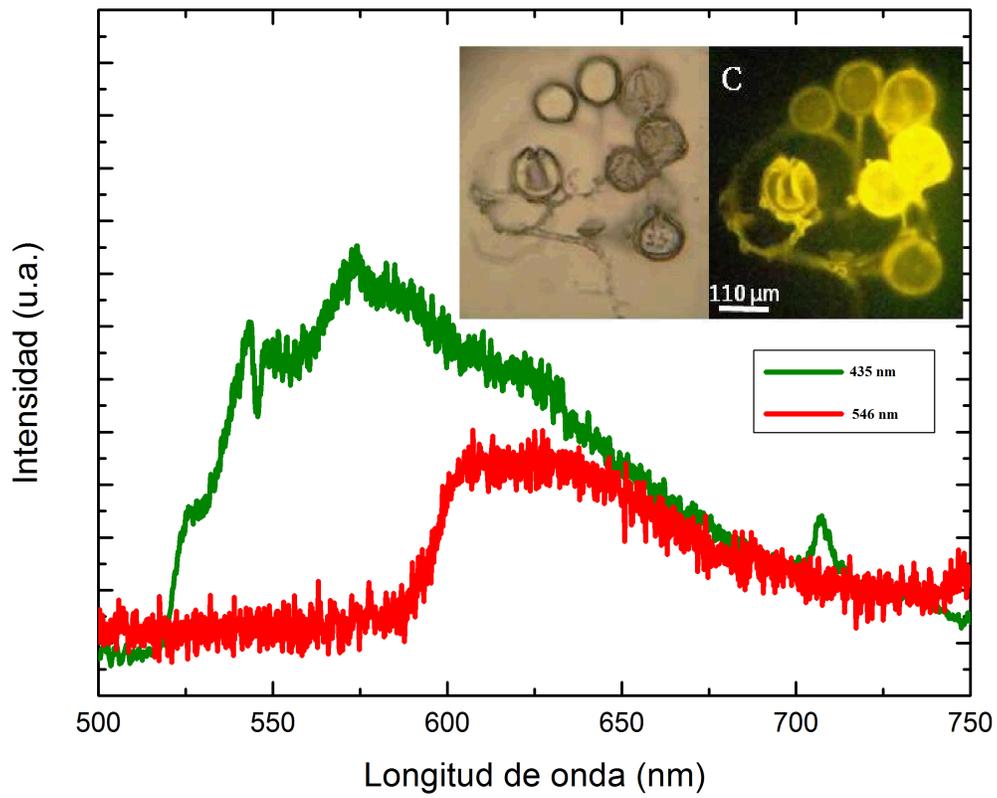
Micro-fotoluminiscencia *Glomus caledonium*

Figura 4.4: Micro-PL de esporas de la especie *G. caledonium*. Espectro negro.

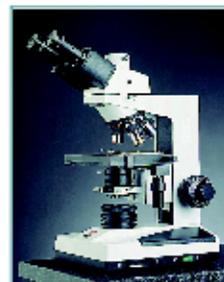
Hoja de datos de equipo utilizado

Microscopio de epifluorescencia CETI

Topic T

Specifications : Topic T

Optical head	- binocular, inclined at 30° - interpupillary distance adjustment (Siedentopf type): 55 to 75 mm - dioptic compensation: on both eyepiece tubes
Eyepieces	high eyepoint 10x/18mm wide-field
Nosepiece	quintuple reversed and revolving with click stop
Objectives: semi- planachromatic	- SP 4x/0.10/160/- - SP 10x/0.25/160/0.17 - SP 40x/0.65/160/0.17 (spring loaded) - SP100x/1.25/160/0.17 oil (spring loaded)
Precondenser with field diaphragm	- brightfield Abbe - NA 1.25 - iris diaphragm and filter holder
Condenser	- centrate through a centring device - focus able with rack and pinion height adjustment system - built-in slit to accept polariser or phase annular stops - size 160x130mm with built-in mechanical stage and slide clip
Stage	- 80mm transversal movement - 50mm longitudinal movement - nonius reading up to 0.1 mm
Focusing knobs	- coaxial coarse and fine - pre-focusing mechanism (on left knob) - tension adjustment ring (on right knob)
Mains power	220-240V/50-60 Hz (euro connector)
Converter	built-in low voltage (12V- electronic) with light intensity control
Bulb	halogen 12V/20W/G4
Supplied with	blue filter, 1 spare bulb, 2 spare fuses, immersion oil 10ml, soft rubber eyecaps, dust cover and instruction manual
Packing	two styrofoam shelves in a cardboard box
Packing dimensions	41x37x29cm (WxDxH). Gross weight: 10 kg



Specifications : Topic T	
Standard specifications identical to Topic-B binocular microscope (2421.0000) with differences on :	
Optical head	trinocular, including vertical photo/video port (Ø35mm) with beam splitting prism on sliding mount (100/0% - 20/80%)

Datos del espectrógrafo de absorción

Specifications

Physical	
Dimensions:	89.1 mm x 63.3 mm x 34.4 mm
Weight:	190 grams
Detector Specifications	
Detector:	Toshiba TCD1304AP Linear CCD array
Detector range:	200-1100 nm
Pixels:	3648 pixels
Pixel size:	8 μm x 200 μm
Pixel well depth:	100,000 electrons
Signal-to-noise ratio:	300:1 (at full signal)
A/D resolution:	16 bit
Dark noise:	50 RMS counts
Corrected linearity:	>99%
Optical Bench	
Design:	f/4, Asymmetrical crossed Czerny-Turner
Focal length:	42 mm input; 68 mm output
Entrance aperture:	5, 10, 25, 50, 100 or 200 μm wide slits or fiber (no slit)
Grating options:	14 different grating options, UV through Shortwave NIR
HC-1 grating option:	No
Detector collection lens option:	Yes, L4
DET4 filter options:	DET4-200-850; DET4-350-1000
Other bench filter options:	Longpass OF-1 filters
Collimating and focusing mirrors:	Standard or SAG+UPG
UV enhanced window:	Yes, UV4
Fiber optic connector:	SMA 905 to 0.22 numerical aperture single-strand optical fiber
Spectroscopic	
Wavelength range:	Grating dependent
Optical resolution:	\sim 0.1-10.0 nm FWHM (grating dependent)
Signal-to-noise ratio:	300:1 (at full signal)
A/D resolution:	16 bit
Dark noise:	50 RMS counts
Integration time:	3.8 ms - 10 seconds
Dynamic range:	3.4×10^6 (system), 1300:1 for a single acquisition
Stray light:	<0.05% at 600 nm; 0.10% at 435 nm

Datos del espectrógrafo de luminiscencia

Specifications

Physical

Spectrometer Dimensions: 89.1 mm x 63.3 mm x 34.4 mm

Weight: 190 grams

Detector Specifications

Detector: Toshiba TCD1304AP Linear CCD array

Detector range: 200-1100 nm

Pixels: 3648 pixels

Pixel size: 8 μm x 200 μm

Pixel well depth: 100,000 electrons

Signal-to-noise ratio: 300:1 (at full signal)

A/D resolution: 16 bit

Dark noise: 50 RMS counts

Corrected linearity: >99.8%

Sensitivity: 130 photons/count at 400 nm; 60 photons/count at 600 nm

Optical Bench

Design: f/4, Asymmetrical crossed Czerny-Turner

Focal length: 42 mm input; 68 mm output

Entrance aperture: 200 μm wide slit

Grating: Grating #3 – groove density 600 lines per millimeter, 360-1000 nm, 500 nm blaze

Detector collection lens: Yes, L4

Fiber optic connector: SMA 905 to 0.22 numerical aperture single-strand optical fiber

Spectroscopic

Wavelength range: 360-1000 nm

Optical resolution: ~10.0 nm FWHM

Signal-to-noise ratio: 300:1 (at full signal)

A/D resolution: 16 bit

Dark noise: 50 RMS counts

Dynamic range: 2×10^8 (system), 1300:1 for a single acquisition

Stray light: <0.05% at 600 nm; 0.10% at 435 nm

Electronics

Power consumption: 250 mA @ 5 VDC

Data transfer speed: Full scans to memory every 5 ms with USB 2.0 port

Inputs/Outputs: Yes, 8 onboard digital user-programmable GPIOs

Breakout box compatible: Yes, with the USB-ADP-BB adapter

Trigger modes: 4 modes

Strobe functions: Yes

Connector: 22-pin connector

Computer

Operating systems: Windows, Linux, OS X

Computer interfaces: USB 2.0 @ 480 Mbps (USB1.1 compatible); RS-232 (2-wire) @ 115.2 K baud

Peripheral interfaces: SPI (3-wire); I²C inter-integrated circuit