

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



Trabajo de graduación
**“Propiedades ópticas de estructuras micorrícicas
arbusculares”**

Presentado por

Br. Rafael Antonio Nolasco García

Para optar al grado de

Licenciado en Física

Docentes directores

Dr. Carlos Rudamas

Dra. Beatriz Dreyer

Ciudad Universitaria, junio de 2015

Aprobación de docentes directores:

Prof. Dr. Carlos Rudamas

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 MATEMÁTICA

M.Sc. Martín Enrique Guerra Cáceres

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE FÍSICA

M.Sc. Víctor Laureano Cortez Lara

Ciudad Universitaria, junio de 2015

Dedicado a la memoria de María Antonia Chévez de García.

Agradecimientos

La mayoría de materiales empleados en esta investigación han sido adquiridos mediante el financiamiento del Consejo de Investigaciones Científicas de la Universidad de El Salvador (CIC-UES), por medio de 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 micropropagación 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 micorrízica 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 además al grupo de investigación dirigido por el Dr. Rudamas por su constante colaboración en la toma de datos y la discusión de los resultados, y al grupo de investigación dirigido por la Dra. Dreyer por su ayuda con la preparación de muestras y uso de equipo en CENSALUD; al Dr. David Torres, de la Facultad de Química y Farmacia por su ayuda para purificar algunos extractos, al Sr. director de la Escuela de Física y al Sr. Decano de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática por gestionar los permisos necesarios para ingresar al campus universitario en período de vacaciones para realizar actividades del grupo de investigación, y al MSc. Rosendo Pichinte Alvarenga y la Lic. Mirna Arely Castro Martínez por sus valiosas observaciones para la mejora de este documento.

Índice general

Agradecimientos	IV
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	X
Resumen	XI
Introducción	XII
1. Fundamento teórico	1
1.1. Asociación micorrícica arbuscular	1
1.1.1. Beneficios de las micorrizas	1
1.1.2. Tipos de asociaciones micorrícicas	2
1.1.3. Componentes moleculares en las asociaciones micorrícicas arbusculares	2
1.2. Interacciones de la radiación con la materia	6
1.2.1. Transiciones electrónicas y coeficientes de Einstein	6
1.2.2. Fotoluminiscencia	7
1.2.3. Ley de Beer-Lambert	8
1.3. Antecedentes y estado del conocimiento	9
1.3.1. Fotoluminiscencia de estructuras intrarradicales	11
1.3.2. Fotoluminiscencia de estructuras extrarradicales	13
1.3.3. Sustancias que pueden contribuir a la fotoluminiscencia	17
2. Experimento	22
2.1. Equipo utilizado	22
2.1.1. Fuentes de luz	22
2.1.2. Equipo óptico	23
2.1.3. Espectrógrafos	24
2.1.4. Microscopio de epifluorescencia	25
2.2. Preparación de muestras	26

2.2.1.	Esporas y micelio	26
2.2.2.	Raíces	27
2.2.3.	Extracción de componentes	28
2.3.	Espectroscopia óptica	30
2.3.1.	Espectroscopia de absorción	30
2.3.2.	Espectroscopia de fotoluminiscencia	30
3.	Resultados y discusión	33
3.1.	Micro-PL de estructuras MA de <i>Glomus mosseae</i>	33
3.1.1.	Esporas de <i>Glomus mosseae</i>	33
3.1.2.	Micelio de <i>Glomus mosseae</i>	38
3.2.	Micro-PL de raíces de <i>Sorghum bicolor</i>	40
3.3.	Absorción y fotoluminiscencia de extractos de raíces y suelo	44
3.3.1.	Extracto metanólico (pigmento amarillo)	44
3.3.2.	Protocolo de Driver <i>et al.</i> (glomalina)	53
3.4.	Extractos de otras fuentes	58
3.4.1.	Quitina de artrópodos	58
3.4.2.	Glucanos de levadura	59
4.	Conclusiones y recomendaciones	60
4.1.	Conclusiones	60
4.2.	Recomendaciones	60
	Anexos	62

Índice de figuras

1.1. Corte transversal de una raíz de una planta y estructuras formadas por hongos micorrícicos arbusculares.	2
1.2. Representación de moléculas de la pared celular de los hongos.	3
1.3. Algunas moléculas basadas en la glucosa.	4
1.4. Diagrama del compartimiento interfacial hongo-planta.	5
1.5. Absorción, emisión inducida y emisión espontánea en un sistema de dos niveles energéticos.	6
1.6. Diferentes tipos de transiciones de una molécula.	8
1.7. Absorción de la luz en un medio.	9
1.8. Niveles de colonización arbuscular por diferentes métodos de visualización. . . .	10
1.9. Fotoluminiscencia de estructuras intrarradicales de <i>Glomus</i>	12
1.10. Espectro de fotoluminiscencia de arbusculos de <i>Glomus</i>	12
1.11. Espectros de excitación de esporas e hifas de hongos del género <i>Gigaspora</i>	13
1.12. Fotoluminiscencia de arbusculos y esporas de <i>Glomus</i>	14
1.13. Espectros de micro-PL de esporas de cuatro inóculos de hongos MA.	15
1.14. Espectro de Micro-PL de esporas de <i>Glomus intraradices</i> y simulación de este como perfil gaussiano.	16
1.15. Fotografía de la fotoluminiscencia de citoplasma y pared celular de esporas de un hongo MA.	16
1.16. Espectros de fotoluminiscencia y micro-PL de esporas de <i>Glomus caledonium</i>	17
1.17. Espectros de excitación y de luminiscencia de vesículas aisladas de <i>Glomus</i> y de quitina extraída de cascarones de crustáceo.	18
1.18. Comparación de fotoluminiscencia de esporas y de extractos de glomalina.	19
1.19. Espectros de absorción de pigmento amarillo, micorradicina y blumenol C celobiósido. .	20
1.20. Espectros de absorción de células micorrizadas pigmentadas y de extracto metanólico de pigmento amarillo.	20
1.21. Comparación de absorción de pigmento amarillo por Klingner y por Fester.	21
1.22. Espectros de absorción y fotoluminiscencia de pigmento amarillo extraído de raíces de maíz y de limón.	21

2.1.	Espectrógrafo OceanOptics USB4000.	24
2.2.	Arreglo de filtros de microscopio de epifluorescencia (azul-verde).	25
2.3.	Arreglo de filtros de microscopio de epifluorescencia (verde-rojo).	25
2.4.	Arreglo para medir espectros de absorción.	30
2.5.	Arreglo para medir espectros de fotoluminiscencia.	30
2.6.	Esquemas de monitoreos de excitación usados en espectroscopia de emisión. . . .	31
2.7.	Geometría de filtros utilizada para la microscopia de epifluorescencia.	31
3.1.	Fotografías de esporas de <i>Glomus mosseae</i> bajo microscopio óptico y de epifluorescencia.	34
3.2.	Espectro de micro-PL de grupo de esporas de <i>Glomus mosseae</i>	36
3.3.	Espectros de micro-PL de esporas de <i>Glomus mosseae</i> con excitación a 405 nm. . .	37
3.4.	Fotoluminiscencia de hifa de <i>Glomus mosseae</i>	39
3.5.	Fotografías bajo microscopio óptico de segmentos sin tratar de raíces de <i>Sorghum bicolor</i> infectadas con <i>Glomus mosseae</i>	41
3.6.	Fotografías y espectros de fotoluminiscencia de segmentos de raíz micorrizada bajo microscopio de epifluorescencia.	42
3.7.	Ajuste Gaussiano y simulación de espectro de emisión de mancha fluorescente en la superficie de una raíz de <i>D. bicolor</i> inoculada con <i>G. mosseae</i>	43
3.8.	Fotografías bajo microscopio óptico y bajo microscopio de epifluorescencia de segmentos de raíz micorrizada aclarada por un tratamiento alcalino.	44
3.9.	Espectros de fotoluminiscencia de pigmento amarillo de raíces de <i>Citrus × limon</i> . . .	46
3.10.	Absorción y fotoluminiscencia de pigmento amarillo de <i>Zea mays</i>	47
3.11.	Ajuste gaussiano de espectros de fotoluminiscencia del pigmento amarillo de maíz excitado a 365 nm y 395 nm.	48
3.12.	Absorción de pigmento amarillo de <i>Zea mays</i>	48
3.13.	Comparación del crecimiento de plantas de sorgo micorrizadas y de control, bajo condiciones de sol o sombra.	50
3.14.	Comparación de espectros de absorción y fotoluminiscencia de extractos metanólicos de raíces de sorgo en condiciones de sol y de sombra.	50
3.15.	Ajustes en perfiles gaussianos de extractos de pigmento amarillo de sorgo.	51
3.16.	Espectros de absorción y fotoluminiscencia de glomalina.	54
3.17.	Espectros de fotoluminiscencia de glomalina de raíces de sorgo extraída por el método de Driver.	55
3.18.	Fotoluminiscencia de glomalina de sustrato de sorgo por método de Driver, excitando alrededor de 365 nm y 395 nm.	57
3.19.	Espectros de fotoluminiscencia de quitina de cascarones de crustáceos.	58
1.	Espectro de emisión para la lámpara de arco de Deuterio.	63
2.	Espectro de emisión de la lámpara de vapor de Mercurio.	64
3.	Espectro de emisión de LED violeta acoplado al espectrógrafo de fotoluminiscencia. . .	65

4.	Espectro de emisión de puntero láser violeta a 45 nm.	66
5.	Espectro de emisión de lámpara halógena de Tungsteno.	66
6.	Espectros de transmisión de filtros pasa banda.	67
7.	Espectros de transmisión de filtros de paso largo.	68
8.	Atenuación de las fibras ópticas QP200-2-UV-VIS y QP400-2-UV-VIS.	69
9.	Eficiencia del detector Toshiba TCD1304AP.	69
10.	Eficiencia de las rejillas de difracción de los espectrógrafos.	70
11.	Espectro de emisión de extracto de clorofila en acetona.	70
12.	Correcciones realizadas a luz de fondo para el microscopio de epifluorescencia. . .	71

Índice de tablas

1.1. Energías y rangos espectrales de varios tipos de transiciones moleculares.	7
1.2. Máximos de emisión para diferentes estructuras MA.	14
2.1. Equipo a utilizar para preparación de muestras y para espectroscopia óptica . . .	23
2.2. Software para captura, procesamiento y gráfico de datos	23
3.1. Posiciones y amplitudes relativas de bandas de emisión de esporas excitando con lámpara de mercurio y con láser a 405 nm.	38
1. Líneas intensas del Mercurio.	65

Resumen

El objetivo de este trabajo de graduación fue analizar las propiedades ópticas de las estructuras micorrícicas arbusculares usando métodos de espectroscopia óptica, para que en el futuro puedan aplicarse como herramienta que permita la evaluación de niveles de colonización micorrícica arbuscular en cultivos salvadoreños.

En este trabajo se tomaron espectros de fotoluminiscencia de esporas y micelio del hongo micorrícico arbuscular (MA) de la especie *Glomus mosseae* y de raíces colonizadas por este hongo MA como espectros patrón, y por otro lado se tomaron espectros de absorción y fotoluminiscencia de algunos extractos de sustancias para ayudar a determinar el posible origen de esta emisión.

El hongo MA de la especie *Glomus mosseae* fue propagado usando *Sorghum bicolor* como cultivo trampa. De este sustrato se recolectaron esporas mediante tamizado húmedo y decantación. De las raíces y del sustrato se realizaron extractos con los protocolos propuestos para la proteína conocida como glomalina y para el complejo de lípidos conocido como pigmento amarillo, también se recolectaron segmentos de raíces enteros. Se extrajo quitina de cascarones de crustáceos y glucanos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

Las muestras fueron observadas bajo estereomicroscopio y microscopio de epifluorescencia. Se tomaron espectros de absorbancia en longitudes de onda ultravioletas (UV) y visibles, se tomaron espectros de fotoluminiscencia en longitudes de onda visibles excitando en los intervalos de 365 - 405 nm y 400 - 500 nm.

Las muestras de esporas y micelio de hongos MA presentaron emisión en el rango verde-amarillo, con bandas de emisión alrededor de los 530, 565, 613 y 671 nm, similares a las encontradas para los extractos de glomalina. Estos extractos presentaron espectros muy similares para raíces micorrizadas y de control no micorrizadas.

Las muestras de extractos de pigmento amarillo presentaron máximos de emisión alrededor de los 443, 509, 550 y 604 nm, algunos de estos similares a la emisión de segmentos de raíces colonizadas. Además se observan notables diferencias en los espectros tanto de absorción como de emisión de pigmento amarillo para raíces colonizadas y no colonizadas.

La quitina mostró una emisión de intensidad relativamente baja, con bandas de emisión alrededor de 436, 523 y 580 nm, similares tanto a la emisión de esporas e hifas como a la emisión de glomalina.

No se observó fotoluminiscencia en el caso de los glucanos.

Introducción

Estudios de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) muestran que un tercio de los suelos a nivel mundial se encuentran bajo procesos severos de degradación [1]. La región latinoamericana muestra alrededor de un 75 % de degradación de los suelos [2] y cerca del 70 % de las áreas de pastoreo de América Latina y el Caribe se encuentran en proceso de degradación en diverso grado [3].

El presente trabajo de graduación se concentrará en caracterizar la fotoluminiscencia en la pared celular de los hongos micorrícicos arbusculares, y de algunas moléculas que se sabe que existen en estas asociaciones para determinar cuales de estas pueden contribuir a la emisión de luz. La principal herramienta en esta investigación será la espectroscopia óptica de absorción y de emisión.

Micorriza es el nombre de una asociación generalmente benéfica entre ciertas especies de hongos y las raíces de una planta. Esta asociación se puede aprovechar para mejorar el crecimiento y resistencia de los cultivos y para reparar suelos contaminados.

Las micorrizas arbusculares (MA) son la asociación micorrícica más común, presentándose en la mayoría de plantas terrestres. En este tipo de micorrizas se ha observado el fenómeno de fotoluminiscencia, que consiste en la emisión de luz visible al excitar una estructura con luz de corta longitud de onda.

Actualmente el origen de esta emisión no está claro, y pocos investigadores se han dedicado a estudiar este fenómeno. Varios autores han propuesto diferentes componentes o moléculas de la pared celular y del citoplasma del hongo como posibles responsables de la fotoluminiscencia, algunas de estas sustancias son polímeros (quitina), proteínas (glomalina), o compuestos fenólicos.

El estudio de la fotoluminiscencia de las estructuras micorrícicas arbusculares es un campo nuevo y prometedor, pues conociendo las características de esta emisión, se podrían desarrollar sensores ópticos para evaluar la colonización micorrícica arbuscular, lo que facilitaría la implementación y optimización de las asociaciones micorrícicas arbusculares como biofertilizante, biorremediadores y bioprotectores.

El presente documento está dividido en cuatro capítulos: fundamento teórico, experimento, resultados y discusión, y conclusiones y recomendaciones, y está estructurado según sugiere Sampieri *et al.* en *Metodología de la Investigación*, y sigue la guía de estilo de la *American Physical Society*, todo esto sin dejar de lado los requisitos del *Normativo de trabajos de graduación de la*

Facultad de Ciencias Naturales y Matemática.

Objetivos

Al iniciar esta investigación, y en cumplimiento del *Normativo de trabajos de graduación*, se plantearon los siguientes objetivos en el Proyecto de trabajo de graduación:

Objetivo general

Analizar las propiedades ópticas de las estructuras micorrícicas arbusculares usando métodos de espectroscopia óptica, para que en el futuro puedan aplicarse como herramienta que permita la evaluación de niveles de colonización micorrícica arbuscular en cultivos salvadoreños.

Objetivos específicos

1. Poner a punto un montaje experimental para la toma de espectros de absorción y de fotoluminiscencia en muestras fúngicas y vegetales.
2. Evaluar si existen diferencias entre las propiedades ópticas de estructuras intrarradicales y extrarradicales de hongos MA, que puedan reflejar cambios moleculares al establecerse la simbiosis.
3. Determinar cómo contribuyen algunas macromoléculas a la fotoluminiscencia de las estructuras micorrícicas arbusculares.

Debido a que aún no se tiene completamente claro el origen de la fotoluminiscencia de estas estructuras, aún se realizó una investigación exploratoria, no concentrándose en una sola estructura o sustancia, sino estudiando partes del sistema no estudiadas antes en esta línea de investigación, para concentrarse al final en las que dieron resultados más interesantes teniendo en cuenta la posible detección de la simbiosis. Los objetivos han sido alcanzados parcialmente, mas siempre cabe extenderse principalmente en la investigación de estructuras intrarradicales, además de las sustancias en el sistema.

Capítulo 1

Fundamento teórico

Este capítulo está dividido en dos secciones. Primero se explica el sistema estudiado, que son las asociaciones simbióticas conocidas como micorrizas arbusculares (MA), específicamente algunas estructuras y moléculas en estas. Luego se explican los diferentes fenómenos físicos que surgen de la interacción de la radiación con la materia, haciendo énfasis en los fenómenos de absorción y de emisión.

1.1. Asociación micorrícica arbuscular

La palabra *micorriza* significa hongo-raíz (*mykós-rhiza*) y se usa para definir a una relación simbiótica entre ciertos hongos y las raíces de las plantas (véase Figura 1.1). Esta relación da un beneficio a la planta, ya que el micelio del hongo explora un mayor volumen de suelo y penetra poros más pequeños que la raíz, mejorando la absorción de nutrientes para la planta [4]. Esta simbiosis se observa en aproximadamente el 90 % de las plantas terrestres [4-6], y existe desde hace aproximadamente 400 millones de años, es decir desde que las plantas comenzaron a habitar el suelo [4, 5].

1.1.1. Beneficios de las micorrizas

Entre los beneficios que la colonización por hongos MA le brinda a las plantas se pueden mencionar: el intercambio nutricional, donde la planta aporta carbohidratos al hongo, a cambio de los minerales que el hongo absorbe del suelo y aporta a la planta [4]; la presencia de hongos micorrícicos mejora el crecimiento y la tolerancia de las plantas frente a problemas de salinidad y sequía [4, 5], o a infecciones patógenas [4]; mejoran la estructura del suelo y le dan resistencia contra la erosión, ya que el micelio estabiliza el suelo y además secreta proteínas que funcionan como agente cementante [4, 7-9].

1.1.2. Tipos de asociaciones micorrícicas

Actualmente se reconocen siete tipos de asociaciones micorrícicas, estas son: micorrizas arbusculares, micorrizas arbutoides, micorrizas monotropoides, micorrizas ericoides, micorrizas orquidioides, ectomicorrizas y ectendomicorrizas. Las micorrizas arbusculares se dan exclusivamente con hongos de la división *Glomeromycota*, mientras que los demás tipos de hongos micorrícicos pertenecen a las divisiones *Basidiomycota* y *Ascomycota*. Los dos tipos de asociaciones micorrícicas más comunes son las arbusculares y ectomicorrizas. Los primeros cinco tipos de micorrizas mencionados se conocen en conjunto como endomicorrizas. En general, las hifas del hongo en las endomicorrizas penetran las células de las raíces de la planta para establecer una simbiosis intracelular, como se muestra en la Figura 1.1. En las ectomicorrizas las hifas son extracelulares y en las ectendo hay una parte de la simbiosis fuera y otra dentro de la raíz [4, 5, 10].

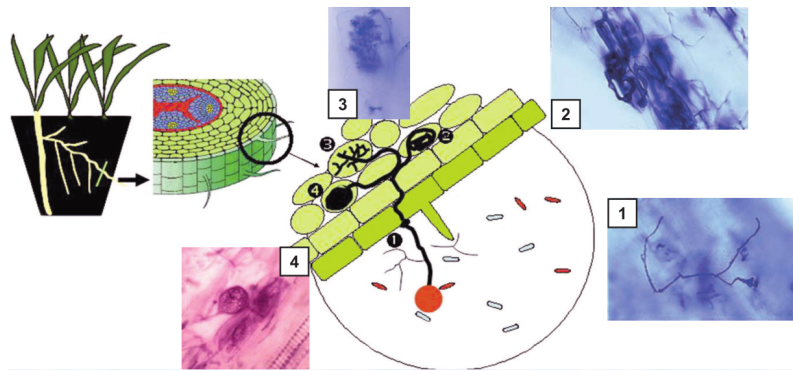


Figura 1.1: Dibujo esquemático del corte transversal de una raíz de una planta, que muestra en su interior las estructuras formadas por hongos micorrícicos arbusculares. En color rojo se muestra una espora, que al germinar forma una hifa en color negro, para penetrar en la corteza de la raíz forma un apresorio (1), e hifas intercelulares, posteriormente forma las estructuras intracelulares: (2) 'coil' o hifa, (3) arbusculo, (4) vesícula. Tomado de B. Dreyer *et al.* [4].

Las ectomicorrizas las forman tan sólo entre el 3 % al 5 % de las plantas terrestres, distribuidas en 140 géneros, y más de 6,000 especies fúngicas de 65 géneros están involucradas en este tipo de asociaciones micorrícicas. Por otro lado, sólo unas 150 especies fúngicas son responsables de la formación de las micorrizas arbusculares en más del 90 % de las plantas terrestres [4-6].

1.1.3. Componentes moleculares en las asociaciones micorrícicas arbusculares

Para tener una idea del posible origen de la autofluorescencia es necesario conocer los tipos de moléculas presentes en las estructuras micorrícicas arbusculares. A continuación se presenta un resumen de los tipos de moléculas que se han encontrado en los hongos MA y hongos en general, y en la interfaz hongo-planta de la asociación MA.

1.1.3.1. Pared celular

La pared celular de los hongos tiene una estructura muy única y diferente a las células vegetales. Las paredes celulares fúngicas están compuestas de glicoproteínas y polisacáridos, principalmente glucanos y quitina [11] (véase Figura 1.2). La componente de glucanos es principalmente $\beta(1-3)$ glucano. En algunas paredes celulares se encuentran, en menor medida, $\beta(1-4)$ glucano y $\beta(1-6)$ glucano [11].

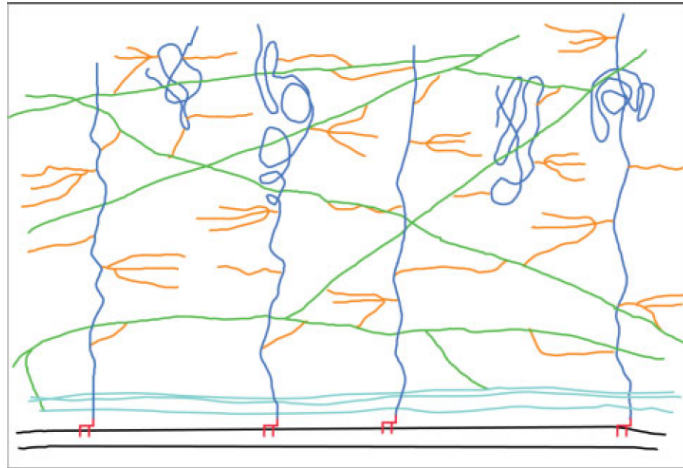


Figura 1.2: Representación de moléculas de la pared celular de los hongos. Hacia abajo es el interior de la célula. Cian, Quitina; verde, $\beta(1-3)$ glucano; azul, proteína; naranja, oligosacáridos; rojo, ancla GPI; negro, membrana de plasma. Tomado de S. Bowman y J. Free [11].

Quitina La quitina está compuesta de unidades de N-acetilglucosamina con enlaces $\beta(1-4)$ (véase Figura 1.3b). En las paredes celulares de las levaduras, la quitina constituye solo el 1-2 % del peso de la pared celular, mientras que las paredes celulares de hongos filamentosos contienen 10-20 % de quitina [11].

Glucanos Los glucanos son los principales polisacáridos estructurales de la pared celular de los hongos. Constituyen el 50-60 % del peso de la pared celular. Los polímeros de glucanos están compuestos de residuos de glucosa unidos en cadenas mediante una variedad de enlaces químicos (véase Figura 1.3a). En general, entre el 65 % y 90 % de glucanos de la pared celular resulta ser $\beta(1-3)$ glucano (véase Figura 1.3c), pero en varios hongos se han encontrado otros glucanos como $\beta(1-6)$, $\beta(1-3)$ y $\beta(1-4)$ combinados, $\alpha(1-3)$ y $\alpha(1-4)$ [11].

Se ha encontrado que las paredes celulares de levaduras contienen $\beta(1-3)$ y $\beta(1-6)$ glucanos ramificados, mientras que las paredes celulares de muchos hongos filamentosos no contienen $\beta(1-6)$ glucano [11]. Cada una de estas largas cadenas de glucanos están compuestas de aproximadamente 1,500 residuos de glucosa conectados por enlaces $\beta(1-3)$. Dentro de cada cadena de

glucano, las posiciones del carbono 6 de aproximadamente 40-50 residuos de glucosa se vuelven sitios en los cuales se enlazan $\beta(1-3)$ glucanos adicionales para generar una estructura ramificada [11]. Los glucanos ramificados a la vez se vinculan entre sí y a la quitina y manoproteínas para proporcionarle fuerza e integridad a la pared celular.

Glicoproteínas Todas las paredes celulares de hongos tienen una componente de proteínas fuertemente entrelazada con la matriz estructural de quitina y glucanos. Se reporta que las proteínas constituyen un 30-50 % del peso de las levaduras, mientras que los hongos filamentosos tienen un estimado de 20-30 % de proteínas en la pared celular [11]. Las proteínas típicas de la pared celular son glicoproteínas, que están extensamente modificadas con oligosacáridos enlazados por O y N. Las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* contienen manoproteínas, que están glicosiladas con cadenas ricas en manosa, conocidas como mananos. En contraste, las glicoproteínas de *Neurospora crassa* y *Aspergillus fumigatus* contienen estructuras de galactomanano, compuestas de residuos de manosa y galactosa. Además de estas modificaciones, algunas proteínas de la pared celular reciben un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI), una estructura que contiene lípidos y oligosacáridos. La mayoría de las proteínas de la pared celular están integradas en la pared mediante enlaces covalentes entre los azúcares presentes en los sitios enlazados por N y O y/o en el ancla de GPI con aquellos en los polímeros de quitina o glucanos.

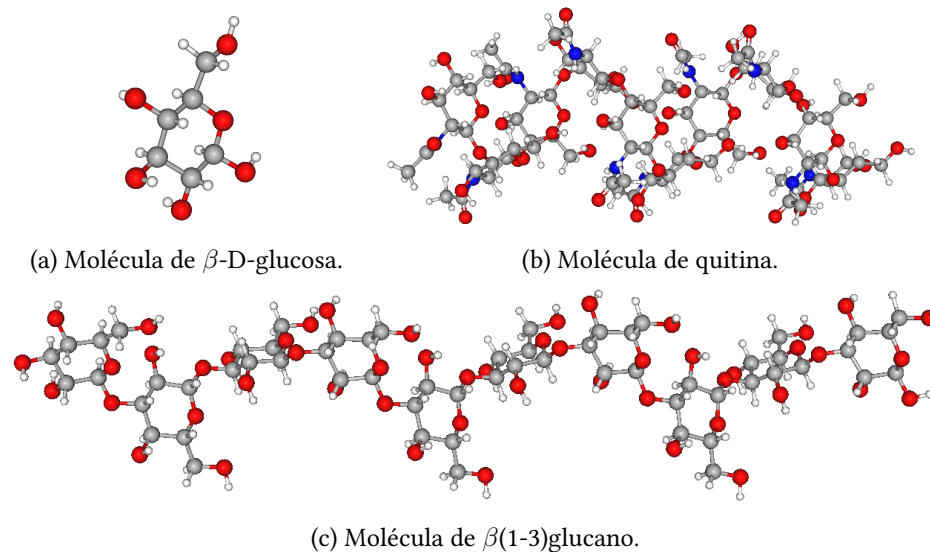


Figura 1.3: Algunas moléculas basadas en la glucosa. Gris: carbono, blanco: hidrógeno, rojo: oxígeno, azul: nitrógeno.

1.1.3.2. Interfaz hongo-planta

Balestrini y Bonfante [12] proporcionan una revisión sobre los cambios que experimentan las células vegetales en el proceso de colonización micorrícica y la abundancia molecular en el compartimiento interfacial (véase Figura 1.4):

La pared celular vegetal tiene una estructura y composición muy homogénea que consiste de tres dominios entrelazados: una red de celulosa y hemicelulosa, otra de pectinas heterogéneas y una tercera de proteínas. Durante la colonización intracelular, los hongos MA cambian drásticamente la estructura de las células hospederas. Cuando los hongos MA forman coils, hifas o arbusculos intracelulares, la membrana de plasma de la planta hospedera se invagina y prolifera alrededor de todas las estructuras fúngicas en desarrollo. Se fija material apoplástico entre esta membrana y la superficie celular del hongo, creando un nuevo compartimiento interfacial de 80-100 nm de espesor. Este compartimiento interfacial tiene una gran complejidad molecular. En este se fijan moléculas comunes a la pared celular vegetal, como: $\beta(1-4)$ glucanos, homogalacturonanos no esterificados, proteínas ricas en Hidroxiprolina (HRGPs), proteínas arabinogalactanos (AGPs). En algunas plantas como el maíz, se han encontrado glucanos de enlaces mixtos $\beta(1-3)$ y $\beta(1-4)$ glucano en etapas específicas del desarrollo de la colonización [12].

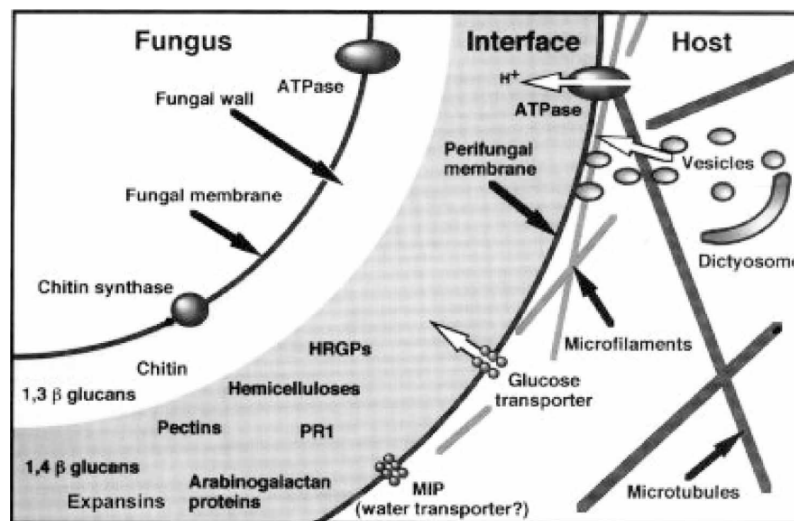


Figura 1.4: Diagrama que ilustra la complejidad molecular del compartimiento interfacial hongo-planta, enumerando algunas de las moléculas hasta el momento determinadas. Tomada de R. Balestrini y P. Bonfante [12].

1.2. Interacciones de la radiación con la materia

1.2.1. Transiciones electrónicas y coeficientes de Einstein

Un sistema molecular puede experimentar transiciones electrónicas entre estados ψ_k y ψ_i con sus energías correspondientes $E_k < E_i$ mediante la absorción o emisión de un fotón con la energía

$$h\nu = E_i - E_k \quad (1.1)$$

Para las transiciones de un electrón en la capa exterior de un átomo, la diferencia de energía en la ecuación 1.1 es del orden de los electronvolts ($1 \text{ eV} = 1.602 \times 10^{-19} \text{ J}$), lo que corresponde a la región del espectro electromagnético del infrarrojo cercano, la luz visible y el ultravioleta cercano [13].

En la Figura 1.5 se muestran las posibles transiciones que se pueden dar entre dos estados de energía electrónicos. Cuando sobre un átomo en el estado ψ_k incide radiación con la misma frecuencia ν que la ecuación 1.1, este átomo tiene una probabilidad P_{ki}^{abs} de experimentar una transición $k \rightarrow i$ dada por

$$\frac{dP_{ki}^{abs}}{dt} = B_{ki}w_\nu(\nu) \quad (1.2)$$

donde $w_\nu(\nu)$ es la densidad espectral de energía $w_\nu(\nu) = n(\nu)h\nu$, y $n(\nu)$ es el número de fotones por unidad de volumen. El factor de proporcionalidad B_{ki} es el *coeficiente de Einstein de absorción*.

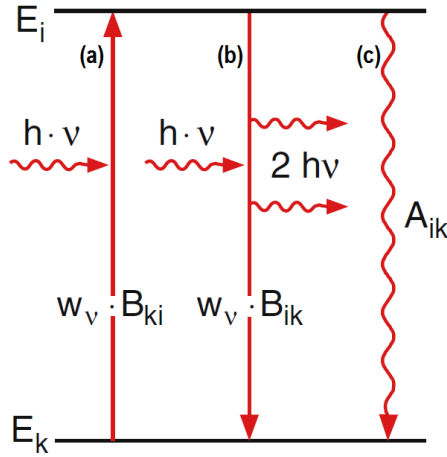


Figura 1.5: Absorción (a), emisión inducida (b) y emisión espontánea (c) en un sistema de dos niveles energéticos. Tomado de W. Demtröder [13].

El campo de radiación también puede inducir a la recombinación de átomos en el estado excitado ψ_i mediante la emisión de un fotón con energía $h\nu = E_i - E_k$ hacia el estado E_k . Este proceso se llama *emisión estimulada*, y la probabilidad de esta transición está dada por

$$\frac{dP_{ik}^{em.ind.}}{dt} = B_{ik}w_\nu(\nu) \quad (1.3)$$

donde el factor B_{ik} se llama *coeficiente de Einstein de emisión inducida*.

Un átomo excitado también puede relajarse de manera espontánea sin un campo de radiación externo. Este proceso se llama *emisión espontánea*. La probabilidad de este tipo de transición es

$$\frac{dP_{ik}^{em.esp.}}{dt} = A_{ik} \quad (1.4)$$

donde A_{ik} es el *coeficiente de Einstein de emisión espontánea*.

1.2.2. Fotoluminiscencia

La fotoluminiscencia es la emisión de luz de un sistema molecular cuyos estados electrónicos han sido excitados por radiación electromagnética. La fotoluminiscencia se divide en dos categorías, fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado [14].

En estados de *singlet* excitados, el electrón en el orbital excitado está apareado (con espín opuesto) al segundo electrón en el orbital del estado base. El regreso al estado base es una transición permitida por el espín y ocurre rápidamente con la emisión de un fotón fluorescente. La fosforescencia es la emisión de luz de estados excitados de *triplet*, en los cuales el electrón en el orbital excitado tiene la misma orientación de espín que el electrón en estado base. Las transiciones al estado base son prohibidas por el espín y las tasas de emisión son lentas, de modo que las vidas medias para la fosforescencia son mucho mayores que en el caso de la fluorescencia.

A nivel molecular, la absorción de luz resulta de un cambio en el estado molecular. Además de los niveles electrónicos, una molécula tiene niveles energéticos vibracionales y rotacionales, según la parte del sistema molecular involucrada. La transición entre niveles electrónicos puede considerarse como la transición de uno de los electrones de un orbital a otro. Los niveles vibracionales están relacionados con los movimientos de vibración de las moléculas. Estas transiciones no tienen mayor efecto en el subsistema electrónico. Los niveles rotacionales surgen de rotaciones de moléculas enteras.

En la tabla 1.1 se muestran las energías y las regiones del espectro que corresponden a transiciones vibracionales y rotacionales. Sólo las transiciones electrónicas corresponden al intervalo visible del espectro, y las transiciones vibracionales y rotacionales corresponden al infrarrojo.

Tabla 1.1: Energías y rangos espectrales de varios tipos de transiciones moleculares. Modificado de [15].

Transición	Energía, J	Frecuencia, Hz	Longitud de onda
Electrónica	$(2 - 10) \times 10^{-19}$	$(3 - 15) \times 10^{14}$	200 - 1,000 nm
Vibracional	$(2 - 20) \times 10^{-20}$	$(3 - 30) \times 10^{13}$	1 - 10 μm
Rotacional	$(2 - 20) \times 10^{-21}$	$(3 - 30) \times 10^{12}$	10 - 100 μm

En el estado base de una molécula los núcleos se encuentran en equilibrio en el sentido que no experimentan fuerza neta de los electrones y de los demás núcleos de la molécula. Inmediatamente

después de una transición electrónica, los núcleos están sujetos a diferentes fuerzas y la molécula puede responder comenzando a vibrar.

En un *proceso de decaimiento radiativo* una molécula descarta su energía de excitación en forma de un fotón. Más comunes son los *decaimientos no radiativos*, en los que la energía se transfiere como vibración, rotación y desplazamiento de la moléculas circundantes.

1.2.2.1. Secuencia de pasos que conducen a la fluorescencia

En la Figura 1.6 se ilustran las posibles transiciones que puede experimentar un sistema molecular. La absorción inicial de un fotón lleva a la molécula a un estado electrónico excitado, la molécula esta sujeta a colisiones con las moléculas que le rodean, y al perder energía de forma no radiativa se relaja al nivel vibracional más bajo del estado molecular electrónicamente excitado. Las demás moléculas ahora son incapaces de aceptar la mayor diferencia de energía para que esta decaiga al estado electrónico base, y esta puede sobrevivir el suficiente tiempo para experimentar una emisión espontánea, y emitir la energía restante en forma de un fotón. La fluorescencia ocurre a frecuencias menores (longitudes de onda más largas) que la radiación incidente ya que la transición radiativa ocurre luego de haberse cedido energía vibracional al entorno. La intensidad de la fluorescencia dependerá de la capacidad que tengan las moléculas del medio de aceptar las diferencias de energía electrónicas y vibracionales [16].

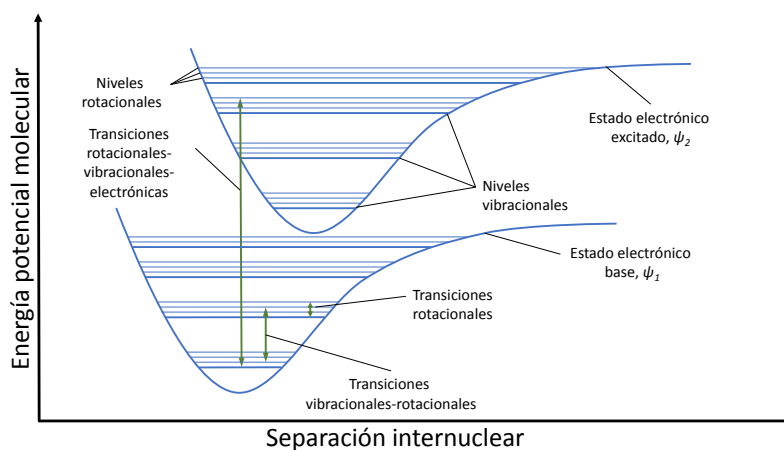


Figura 1.6: Diferentes tipos de transiciones de una molécula.

1.2.3. Ley de Beer-Lambert

Si consideramos un haz de luz que se propaga en un medio, en un punto x , la intensidad es $I(x)$ (véase Figura 1.7). En una capa de espesor Δx la luz interactúa con el medio y en el punto $x + \Delta x$

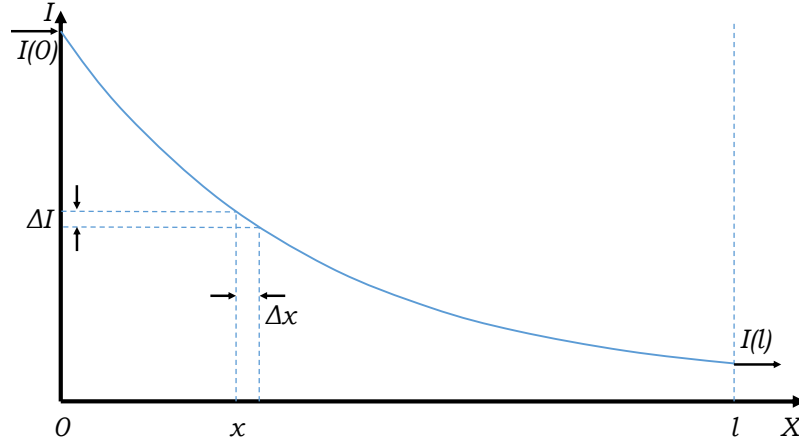


Figura 1.7: Absorción de la luz en un medio.

la intensidad de la luz disminuye en ΔI , es decir

$$I(x + \Delta x) = I(x) + \Delta I(x, \Delta x) \quad (1.5)$$

Aplicando el límite $\Delta x \rightarrow 0$

$$\lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{\Delta I(x, \Delta x)}{\Delta x} = \frac{dI(x)}{dx} = -\alpha I(x) \quad (1.6)$$

resolviendo para $I(x)$ obtenemos la ley de Beer-Lambert:

$$I(x) = I_0 e^{-\alpha x} \quad (1.7)$$

donde α es el coeficiente de absorción. La *absorbancia* o *densidad óptica* está definida como

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad (1.8)$$

Se puede observar que cuando menor sea la intensidad de radiación transmitida $I(x)$, mayor valor tendrá la absorbancia. La dependencia de la absorbancia con la longitud de onda de la radiación incidente es una forma de medir en el laboratorio las energías correspondientes a las transiciones ópticas de un sistema molecular, es decir las diferencias de energía entre los diferentes estados de una molécula.

1.3. Antecedentes y estado del conocimiento

Los métodos para cuantificar el grado de colonización micorrícica arbuscular más usados involucran la digestión de segmentos de raíz con sustancias corrosivas, seguido de la tinción de

las estructuras intraradicales del hongo para visualizarlas por microscopia de transmisión de luz. Con frecuencia se usan tintes como azul de tripano, negro de clorazol E o fucsina ácida. Además de que algunos tintes se han reportado o se sospecha que son cancerígenos o mutagénicos, se ha mostrado que los datos sobre niveles de micorrización pueden diferir considerablemente entre métodos de visualización o especie de planta, sobretodo en muestras de campo (véase Figura 1.8). También ya ha sido reportado que se podría aprovechar la fluorescencia de los arbuscúlos del hongo micorrícico arbuscular para cuantificar el grado de colonización micorrícica, y este método tiende a dar resultados mayores y más consistentes, empleando un menor tiempo que los demás métodos, aunque existen críticas que el material fluorescente puede deberse a estructuras muertas [17-19].

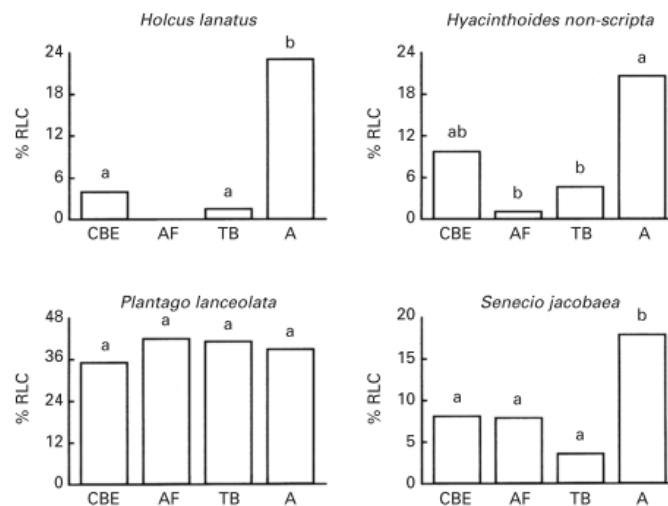


Figura 1.8: Niveles de colonización arbuscular por diferentes métodos de visualización. %RLC: porcentaje de longitud de raíz colonizada, CBE: negro de clorazol E, AF: fucsina ácida, TB: azul de tripano, A: autofluorescencia sin digestión. Tomada de Gange *et al* [17].

Desde el primer reporte sobre la fotoluminiscencia de estructuras micorrícicas arbusculares para su observación en 1982 [20], han sido muy pocos los estudios dedicados a este fenómeno. Casi cada investigación reporta fotoluminiscencia en distintas estructuras o partes de la célula del hongo o de la planta, o propone una sustancia diferente como posible origen a la emisión. Para validar la emisión de luz por las estructuras MA como método para cuantificar el grado de colonización es necesario tener claro cuáles estructuras presentan emisión y en qué rangos de longitudes de onda, o más a profundidad, a qué transiciones de niveles de energía moleculares en el sistema corresponde la emisión y absorción. A continuación se presenta una reseña de las investigaciones que conocemos sobre fotoluminiscencia de las estructuras producidas por hongos MA, así como de las posibles sustancias que se sospecha pueden contribuir a la emisión.

1.3.1. Fotoluminiscencia de estructuras intrarradicales

El primer trabajo en emplear la fotoluminiscencia de las estructuras formadas por los hongos MA fue por R. Ames *et al.*, quienes observaron fluorescencia de arbusculos de hongos de los géneros *Glomus*, *Gigaspora* y *Acaulospora* en segmentos de raíz enteros sin tratar. Esto los llevó a plantear la observación usando la fluorescencia propia (autofluorescencia) del hongo como una alternativa simple y no destructiva al uso de fluoróforos como diacetato de fluoresceína y evitar el uso de otras sustancias tóxicas o cáusticas [20]. En esta investigación no se observó fluorescencia en otras estructuras MA, y las muestras que emitían dejaron de hacerlo al ser digeridas y teñidas, por lo que estos autores propusieron que la fluorescencia podía ser debido a sustancias de la matriz o plasmalema de la planta. Evaluando el grado de colonización micorrícica por fluorescencia dio resultados prácticamente iguales que por digestión y tinción. Las muestras fueron observadas en microscopio de epifluorescencia excitando a 455 - 490 nm y observando a 520 - 560 nm.

De manera similar, Vierheilig *et al.* observaron emisión únicamente en arbusculos. La emisión fue detectada solo en arbusculos colapsados y metabólicamente inactivos, por lo que la emisión podría deberse a sustancias que originan de la planta, entre ellas compuestos fenólicos liberados como una respuesta inmune a los tejidos muertos del hongo [18].

Por otro lado, Jabaji-Hare *et al.* observaron fluorescencia de vesículas, arbusculos e hifas intracelulares de hongos del género *Glomus* en raíces de *Allium porrum*, la cual persistió aún luego de digerir las raíces en KOH y en NaOH. Ya que esto elimina material del citoplasma, se podría asociar la fotoluminiscencia con sustancias de la pared celular del hongo. Se tomaron espectros de excitación de 250 a 390 nm, y de fluorescencia de 350 a 600 nm, excitando con radiación de 325 nm (véase Figura 1.17). Se observó una emisión “amarillo intenso” en microscopio de epifluorescencia, excitando con filtros en el rango UV (330 - 385 nm), violeta (385 - 425 nm), azul (420 - 490 nm) y verde (500 - 550 nm).

Finalmente, Dreyer *et al.* observaron fotoluminiscencia en todas las estructuras intrarradicales (hifas, vesículas y arbusculos) formadas en raíces de palmeras por hongos de la especie *Glomus mosseae*, tanto vivas como muertas (véase Figura 1.9). Se presentó fluorescencia “verde” bajo excitación con luz azul (450 - 490 nm), no así con radiación ultravioleta (340 - 380 nm). En hifas, se determinó que la fuente de la emisión está ubicada principalmente en la pared celular del hongo, pero en arbusculos no se pudo determinar debido a la gran intensidad de la emisión. Se tomaron espectros de fotoluminiscencia de arbusculos aislados excitando a 488 nm (véase Figura 1.10)[21].

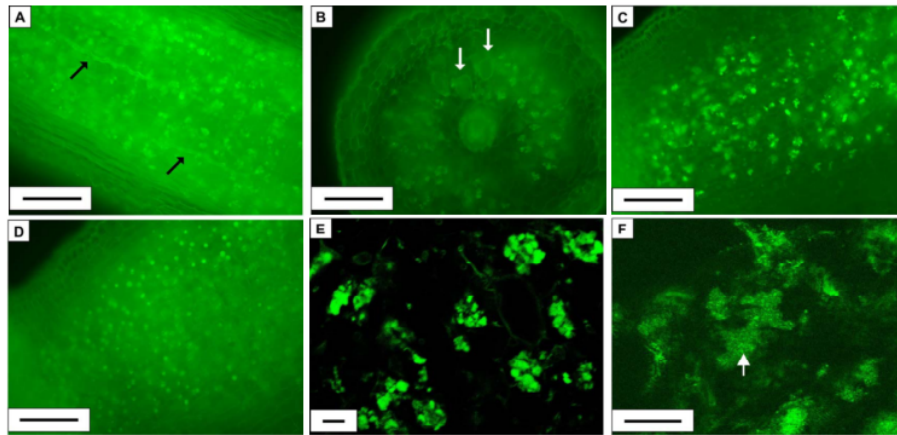


Figura 1.9: Fotografías tomadas en microscopio de epifluorescencia, que muestran la fotoluminiscencia de estructuras intrarradicales de *Glomus*. Tomadas por Dreyer *et al.* [21]. (A) sección longitudinal de raíz con arbusculos, (B) sección transversal de raíz con arbusculos y vesículas, (C) sección longitudinal de raíz mostrando arbusculos y gotas de pigmento, (D) misma sección que en (C) tras digestión, (E) y (F) arbusculos.

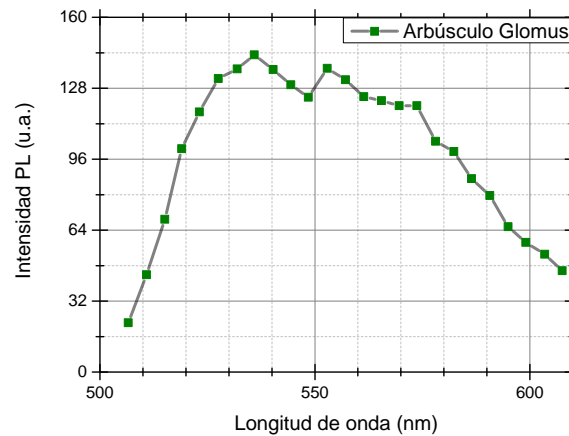


Figura 1.10: Espectro de fotoluminiscencia de esporas de *Glomus*. Elaboración propia con datos de Dreyer *et al.* [21].

1.3.2. Fotoluminiscencia de estructuras extrarradicales

También se ha detectado fotoluminiscencia en las estructuras extrarradicales: esporas y micelio. Uno de los estudios realizados en estas estructuras fue realizado por Séjalon-Delmas *et al.*, quienes estudiaron hongos MA de las especies *Gigaspora gigantea* y *Gi. margarita* cultivados en simbiosis con *Daucus carota*. Se observó la emisión “verde amarillenta” en microscopio de epifluorescencia, excitando de 450 a 490 nm, con filtro de emisión a 520 nm. Se tomaron espectros de excitación de esporas y de hifas en el rango de 350 a 500 nm detectando la emisión a 520 nm. Tanto esporas como hifas de *Gi. gigantea* emiten fluorescencia, y solamente las esporas emiten en el caso de *Gi. margarita* (véase figura 1.11). Se observó que el material fluorescente se mueve con la corriente citoplasmática, y además la emisión no se presenta en hifas septadas desprovistas de citoplasma [22].

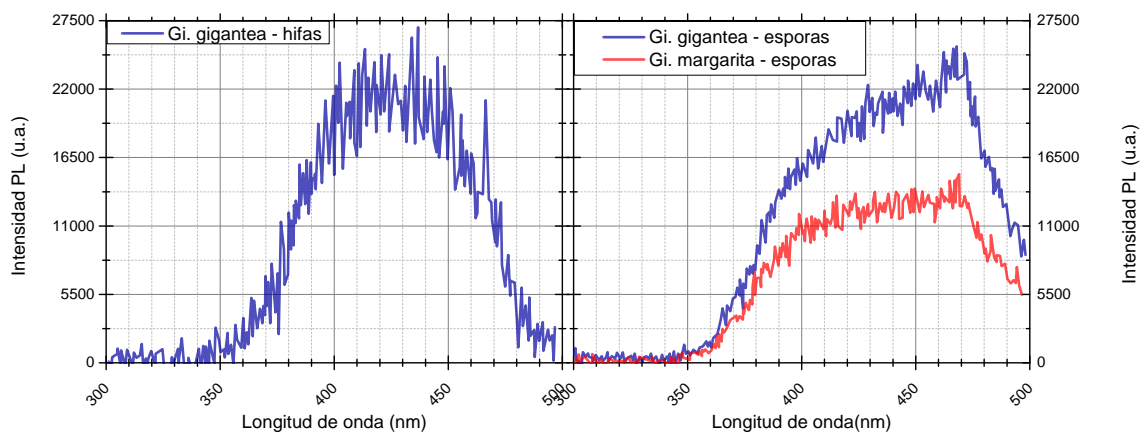


Figura 1.11: Espectros de excitación de fluorescencia de hifas (izquierda) y de esporas (derecha) de los hongos MA *Gigaspora gigantea* y *Gi. margarita*. Elaboración propia con datos de Séjalon-Delmas *et al.* [22].

Dreyer *et al.* detectaron emisión en esporas bajo microscopio confocal láser de barrido. Las esporas jóvenes mostraron emisión verde excitando a 488 nm y en esporas viejas también se observó emisión roja al excitar a 543 nm. Mediante barrido espectral en el microscopio se encontraron tres máximos de emisión, dos en el verde y uno en el rojo (véase Tabla 1.2. La emisión fue localizada en la pared celular (véase Figura 1.12) [21].

Esta línea de investigación ha sido retomada por A. Pérez, quien ha estudiado la fotoluminiscencia y absorción de esporas de cinco especies de hongos MA (de los géneros *Glomus*, *Scutellospora* y una especie desconocida), observándose espectros prácticamente idénticos en todas las especies (véase Figuras 1.13 y 1.14). Además de esto ha encontrado que la emisión de la pared celular y citoplasma de esporas tienen una emisión similar, por lo que esta puede deberse a sustancias comunes en ambas partes de la espora, como se puede ver en la Figura 1.15.

Uno de los principales hallazgos es que la fotoluminiscencia se da tanto en la pared celular como

Tabla 1.2: Máximos de emisión para diferentes estructuras MA usando barrido espectral del microscopio confocal láser de barrido. Los máximos 1 y 2 se obtuvieron al excitar a 488 nm y el máximo 3 al excitar a 543 nm. Tomado de Dreyer *et al.* [21]

Estructura MA	Máximos de emisión (nm)		
	1	2	3
Vesículas	515-529	572-600	
Arbúsculos	526-536	550-576	
Esporas	503-527	559-608	655-680

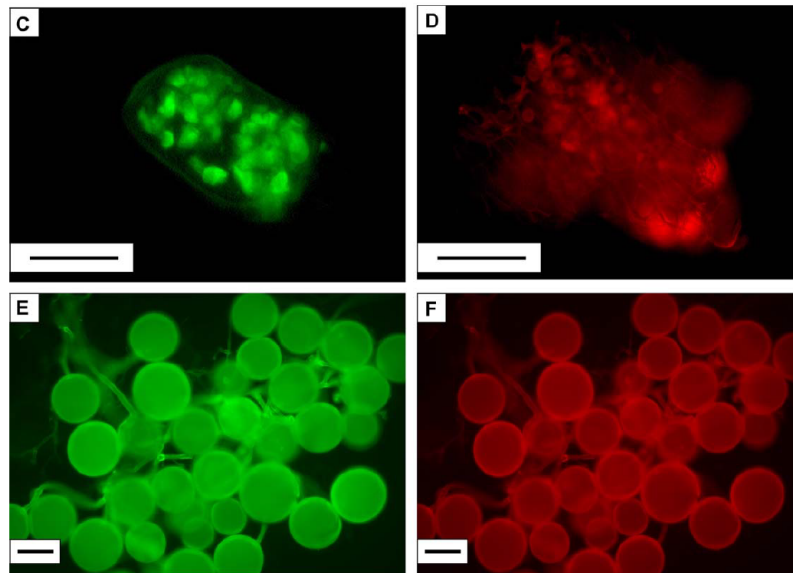


Figura 1.12: Imágenes de estructuras de *Glomus intraradices* tomadas con microscopio de epifluorescencia tomadas por Dreyer *et al.* [21]. C y D son arbúsculos, E y F son esporas, C y E fueron excitadas con luz azul, D y F fueron excitadas con luz verde.

en el citoplasma de la espora y que los espectros de emisión son muy similares, por lo que uno de los principales candidatos entre las fuentes de la emisión puede ser un componente común a ambas partes de la célula, uno de estos componentes puede ser la glomalina.

Otro resultado importante de A. Pérez es que al excitar la fotoluminiscencia de esporas con longitudes de onda menores a 365 nm, el máximo de emisión se corre a longitudes de onda también más cortas (véase Figura 1.16), lo que indicaría que estas estructuras poseen bandas de emisión en un rango de longitudes de onda muy amplio, aproximadamente entre los 300 y 800 nm. Esto podría significar que las esporas de hongos MA contienen alguna sustancia con muchas bandas de emisión en todo este intervalo, o que varias sustancias contribuyan a la emisión, cada una en un subintervalo de estas longitudes de onda.

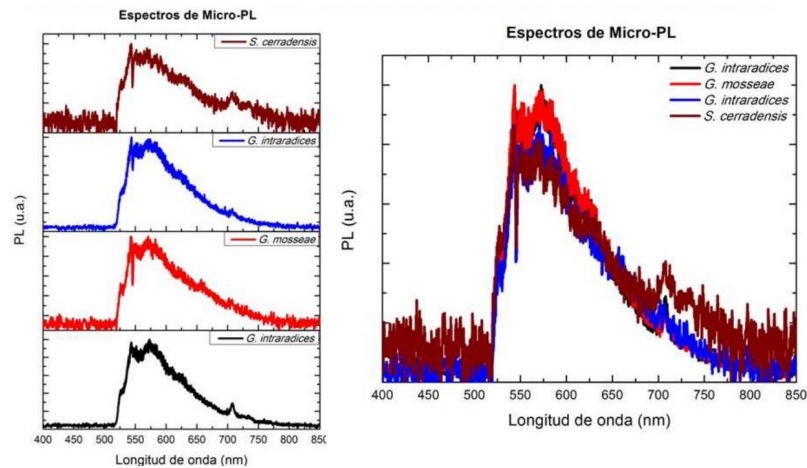


Figura 1.13: Espectros de micro-PL para esporas de hongos MA excitadas a 435 nm. Rojo oscuro: *S. cerradensis*, azul: *G. intraradices*, rojo claro: *G. mosseae*, negro: *G. intraradices*. Figura tomada de A. Pérez.[23].

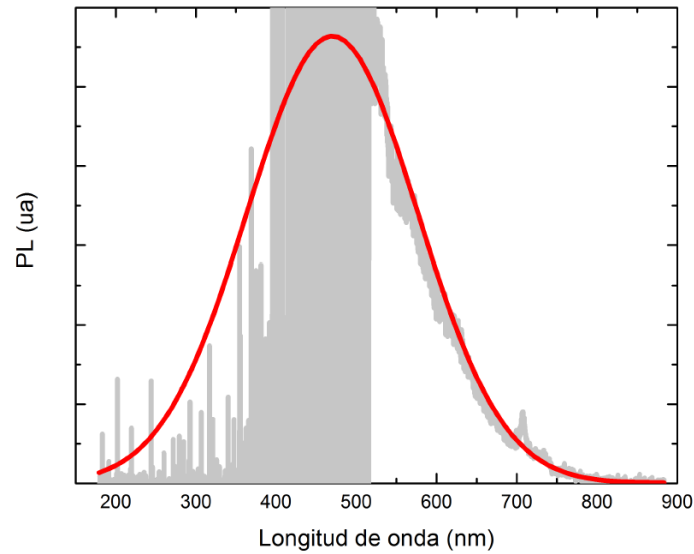


Figura 1.14: Espectro de Micro-PL de esporas de *Glomus mosseae*. En gris micro-PL corregida por el filtro de emisión, en rojo simulación de una banda gaussiana. Figura tomada de A. Pérez [23].

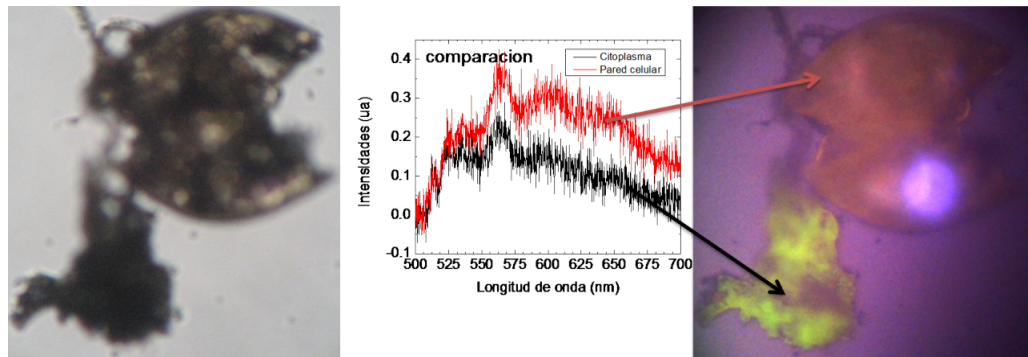


Figura 1.15: Fotoluminiscencia de citoplasma y pared celular de esporas de un hongo MA no identificado. Izquierda: fotografía tomada en un microscopio óptico. Centro: en color rojo el espectro de emisión de la pared celular, y en negro el correspondiente al citoplasma que ha escapado de la espora. Derecha: fotografía tomada en un microscopio de epifluorescencia excitando a 435 nm, mostrando emisión tanto en pared celular como en el citoplasma. Figura tomada de A. Pérez [23].

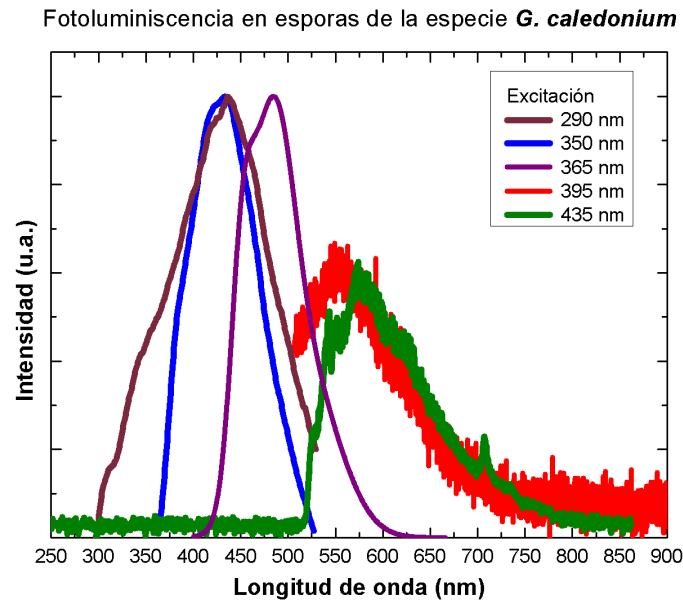


Figura 1.16: Espectros de fotoluminiscencia y micro-PL de esporas de *Glomus caledonium* a diferentes longitudes de onda de excitación. Figura tomada de A. Pérez [23].

1.3.3. Sustancias que pueden contribuir a la fotoluminiscencia

1.3.3.1. Quitina

La quitina es uno de los componentes más importantes de la pared celular de un hongo, y es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, presente en los hongos y en los artrópodos. Hay pruebas de niveles de colonización por hongos MA que convierten la quitina del hongo en glucosamina para medir su concentración [24] (destruyendo la pared celular del hongo). Si la quitina emite fluorescencia puede funcionar como indicador de presencia de hongos.

S. Jabaji-Hare *et al.* realizaron una prueba en la que comparó espectros de excitación y de emisión de fluorescencia de quitina y de vesículas de hongos MA [25] (véase Figura 1.17). Se observó que los espectros de emisión de quitina y vesículas muestran picos idénticos a 413 nm y otro pico menor alrededor de 493 nm. Sin embargo, los espectros de excitación no corresponden exactamente, ya que la excitación de las vesículas muestra dos picos prominentes a 305 y 323 nm, mientras que la quitina muestra un solo pico ancho a 335 nm. El espectro de excitación se obtuvo detectando a 413 nm, y el espectro de emisión se obtuvo excitando a 325 nm.

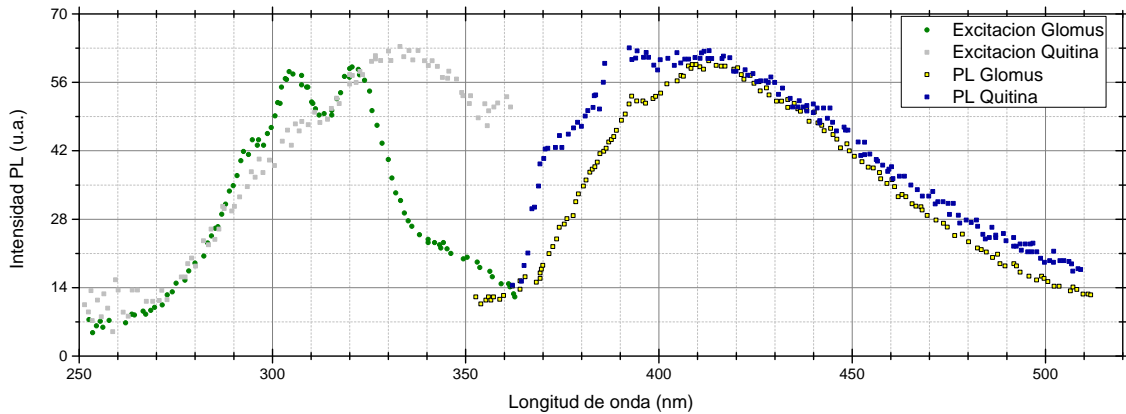


Figura 1.17: Espectros de excitación y de luminiscencia de vesículas aisladas de *Glomus* y de quitina extraída de cascarones de crustáceo. Elaboración propia con datos de Jabaji-Hare *et al.* [25].

1.3.3.2. Glomalina

El nombre glomalina viene de la orden Glomales, es una proteína fuertemente unida a la pared celular de esporas e hifas de los hongos MA y es secretada al suelo, por lo que ayuda a la agregación de suelos y a su resistencia contra erosión y sequías. Fue descubierto por el grupo al que pertenece Sarah Wright en 1996 [26, 27] y es una proteína cuya estructura o incluso su identidad aún no se conoce, tiene relación (homología) con proteínas HSP60 o chaperones [28, 29].

A. Pérez propone a la glomalina como posible contribuyente de la emisión por sus observaciones de fotoluminiscencia tanto en pared celular como en citoplasma de esporas. Debido a que los espectros de emisión resultantes de extractos de glomalina de suelos y de esporas son muy similares con los propios espectros de emisión de las esporas (véase Figura 1.18). Estos extractos de glomalina fueron realizados siguiendo el método propuesto por Wright y Upadhyaya, y por el método propuesto por Driver *et al.* [23].

Los diferentes extractos conocidos como glomalina o GRSP (*Glomalin Related Soil Proteins*: proteínas del suelo afines a la glomalina) están compuestos por una proteína o más probablemente por un compuesto de proteínas producidas por el hongo MA y tienen las propiedades de inmunofluorescencia y autofluorescencia [7, 26, 27].

Algunos de los posibles componentes de la glomalina son proteínas llamadas chaperones [29] o un complejo de sustancias similares a: tirosina, triptófano, ácido fúlvico, subproductos microbianos solubles, ácido húmico, nitrobenzoxadiazole, y blanco de calcoflúor [30].

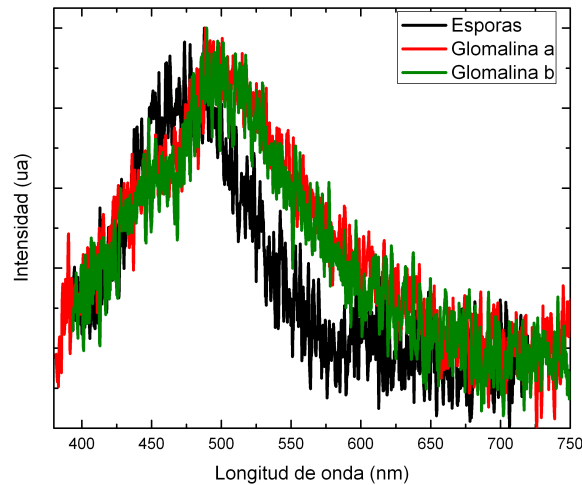


Figura 1.18: Comparación de fotoluminiscencia de esporas y de extractos de glomalina. Negro: fotoluminiscencia de esporas, Rojo: extracto de glomalina de esporas, Verde: extracto de glomalina. Figura tomada de A. Pérez [23].

1.3.3.3. Pigmento amarillo

El pigmento amarillo en sí no es una sustancia perteneciente a los hongos MA, pero se produce abundantemente en las raíces de algunas especies de plantas (algunas de gran importancia económica como el maíz, trigo y sorgo) al producirse arbuscúlos dentro de sus células. De este se han encontrado dos componentes principales, los cuales son micorradicina y blumenol C celobiósido (véase Figura 1.19)[31]. Debido a su acumulación en raíces (véase Figura 1.20) puede servir como indicador del grado de colonización y han habido pruebas que hacen correlación entre la absorbancia de extractos alcohólicos o en agua con el porcentaje de longitud colonizada [32], y creemos que la caracterización de su fotoluminiscencia puede servir como un nuevo indicador mínimamente invasivo del grado o presencia de colonización.

Se han reportado espectros de absorción de los extractos metanólicos de raíces micorrizadas, con máximos alrededor de 240, 320, 380 y 400 nm (véase Figura 1.21) [31, 33]. Al aislarse en sus principales componentes se encuentran máximos a 245 nm para el blumenol C celobiósido, y a 379 y 398 nm para la micorradicina [31].

La caracterización óptica del pigmento amarillo ha sido retomada por A. Pérez *et al.* [34], en el caso de raíces de maíz (*Zea mays*) y limón (*Citrus × limon*), encontrando en el caso del maíz espectros de absorción que coinciden con los reportados por Fester *et al.* para pigmento amarillo no tratado [31], y para raíces de limón las bandas de absorción difieren de este resultado (véase figura 1.22). Esta es la única publicación en la que se presentan espectros de fotoluminiscencia de pigmento amarillo, encontrando que para ambos extractos existen bandas de emisión alrededor de los 510, 485 y 450 nm. Anteriormente A. Klingner *et al.* reportan (sin mostrar espectros) que el pigmento amarillo de maíz tiene emisión con máximos alrededor de 498 y 533 nm [33, 35].

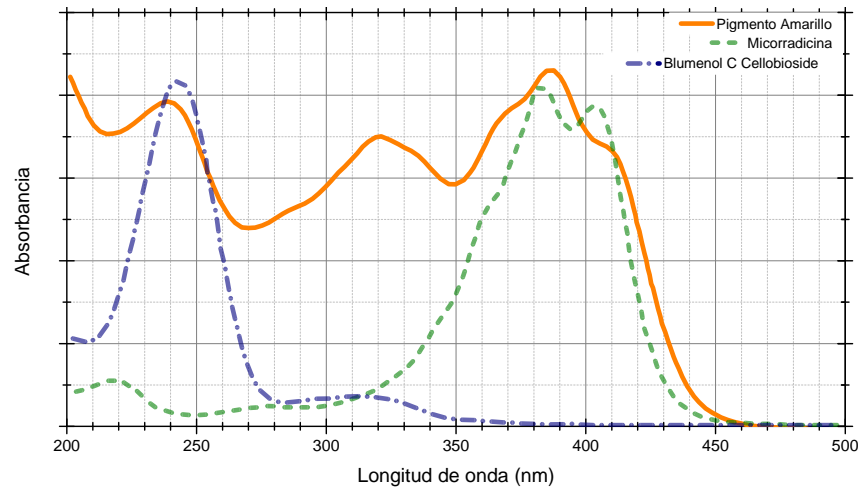


Figura 1.19: Espectros de absorción de pigmento amarillo, micorradicina y blumenol C celobiósido. Tomados por Fester *et al.* [31].

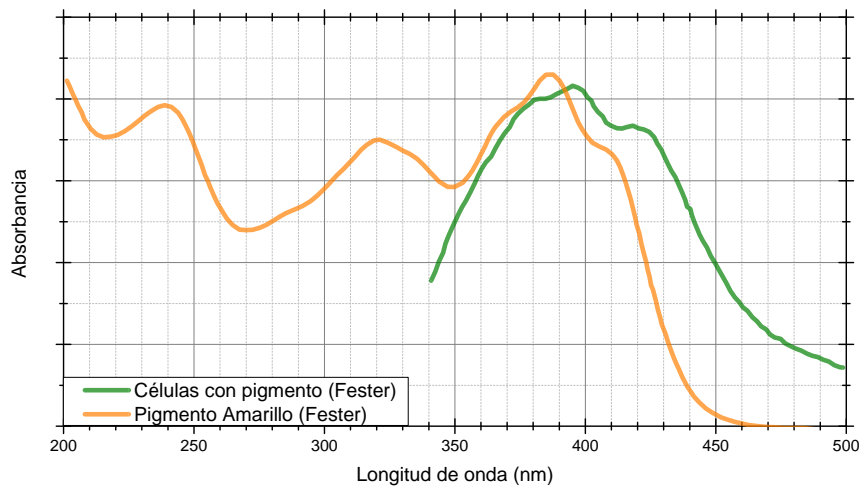


Figura 1.20: Espectros de absorción de células micorrizadas pigmentadas y de extracto metanólico de pigmento amarillo. Tomados por Fester *et al.* [31].

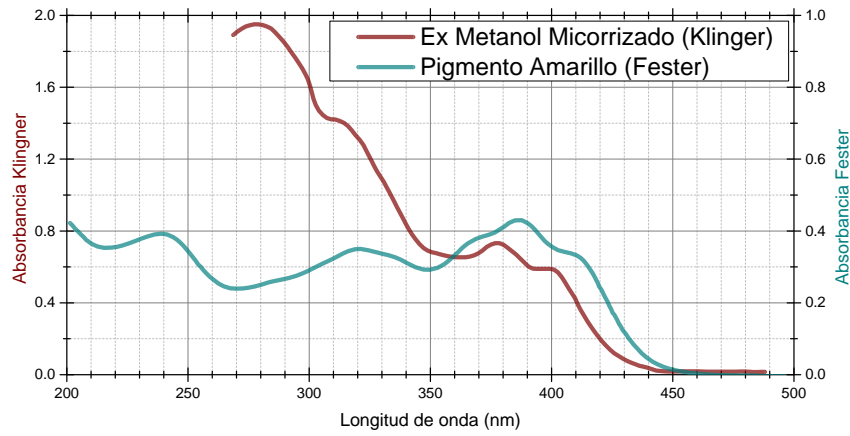


Figura 1.21: Comparación de absorción de pigmento amarillo obtenido calentando (Klingner) y a temperatura ambiente (Fester).

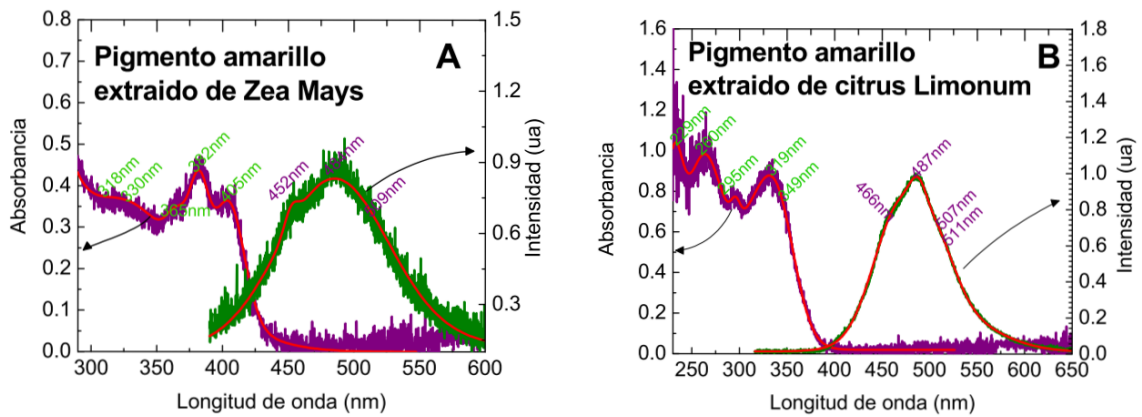


Figura 1.22: Espectros de absorción y fotoluminiscencia de pigmento amarillo extraído de raíces de maíz y de limón, por A. Pérez *et al.* [34].

Capítulo 2

Experimento

Las técnicas experimentales usadas para estudiar las estructuras micorrícicas y los diferentes extractos es la espectroscopia óptica de absorción y fotoluminiscencia, tanto a nivel macroscópico como microscópico.

2.1. Equipo utilizado

En la tabla 2.1 se enumera el equipo disponible en el laboratorio de espectroscopia óptica y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), y en la tabla 2.2 el software empleado para controlar los espectrógrafos y procesar los datos.

2.1.1. Fuentes de luz

El tipo de fuente a utilizar para un experimento dado depende del tipo de medida que se realiza y la región espectral de interés. En general se utilizaron lámparas con emisión en el ultravioleta y visible, para medidas de absorción se usaron fuentes de luz con espectros continuos, como lámparas de arco de Deuterio y halógena de Tungsteno (Figuras 1 y 5), y para medidas de fluorescencia se excita la muestra con lámparas con suficiente intensidad en el rango de longitudes de onda de 350 a 500 nm (UV cercano a azul o verde), como la lámpara de vapor de Mercurio (Figura 2), en este caso se suelen usar filtros pasa banda para delimitar la excitación a un pequeño intervalo de longitudes de onda. Como fuente monocromática se puede usar un puntero láser a 405 nm (Figura 4).

Lámpara de Deuterio Tiene una emisión continua entre los 185 y 900 nm, y muestra las líneas de Balmer D_{α} (656 nm) y D_{β} (486 nm) (véase Figura 1 en Anexos). Debido a su intensa emisión de radiación de 185 a 450 nm se usa esta lámpara para realizar medidas de absorción en el ultravioleta.

Lámpara de vapor de Mercurio La principal característica de esta lámpara es la emisión de líneas espectrales bien definidas, mucho más intensas que su emisión continua (véase Figura 2 Y

Tabla 2.1: Equipo a utilizar para preparación de muestras y para espectroscopia óptica

Equipo	Marca	Modelo
Espectrógrafos	Ocean Optics	USB4000-UV-VIS USB4000-FL-395
Fibra óptica	Ocean Optics	QP400-2-UV-VIS QP200-2-UV-VIS
Cubetas de cuarzo	Starna Cells	
Porta cubetas	Ocean Optics	CUV-ALL-UV
Filtros pasa banda	Edmund Optics	U330
Filtros pasa banda y paso largo	Oriel	BP35, LP39
Lentes colectores		
Lámpara de vapor de Mercurio		
Lámpara de Deuterio	Bausch and Lomb	
Microscopio de disección	Leica	
Microscopio de epifluorescencia	CETI	059272
Centrífuga	Selecta	Macrofriger-BL
Tamices	Fisher	09127052
Autoclave		
Computadora		

Tabla 2.2: Software para captura, procesamiento y gráfico de datos

Software	Plataforma	Versión
Ocean Optics SpectraSuite	Windows, Linux	2.0.162
Ocean Optics Overture	Windows	1.0.1
Orgin Pro	Windows	8.0724, 9.0.0
QtiPlot	Windows, Linux	0.9.8.9

Tabla 1 en Anexos), por esto se puede utilizar en aplicaciones de fotoluminiscencia para excitar con líneas específicas que se aíslan mediante el uso de filtro pasa banda. En particular se excita con las líneas alrededor de 365, 404 y 435 nm.

2.1.2. Equipo óptico

Filtros Para espectroscopia de emisión se hace uso de filtros de pasa banda para la excitación (véase Figura 6 en Anexos), y de paso largo para la detección (véase Figura 7 en Anexos).

Celdas Cuando se trabaja con muestras líquidas como el pigmento amarillo o glomalina se usan celdas espectrofotométricas de vidrio de cuarzo fundido, que poseen una excelente transmisión de

170 a 2500 nm.

Fibra óptica Las fibras ópticas utilizadas tienen una atenuación mínima en el intervalo de longitudes de onda de 500 a 800 nm, y en general es lo suficientemente baja para el intervalo de longitudes de onda que puede aprovechar el espectrógrafo (véase Figura 8 en Anexos).

2.1.3. Espectrógrafos

2.1.3.1. Espectrógrafos

Se cuenta con dos espectrógrafos de marca Ocean Optics, de la línea USB4000 (véase Figura 2.1). Estos cuentan con un detector CCD lineal Toshiba TCD1304AP de 3648 píxeles, con una eficiencia máxima entre 400 y 700 nm (véase Figura 9 en Anexos). El espectrógrafo empleado para experimentos de absorbancia cuenta con una rendija de apertura de 25 μm y una rejilla de difracción con ángulo blaze para eficiencia máxima alrededor de 300 nm (nombrada rejilla #1 por el fabricante), resultando en una eficiencia óptima a longitudes de onda de 179 a 883 nm, con una resolución de aproximadamente 1.5 nm. El espectrógrafo empleado para experimentos de fotoluminiscencia (PL) cuenta con una rendija de apertura de 200 μm y una rejilla de difracción con ángulo blaze para eficiencia máxima alrededor de 500 nm (nombrada rejilla #3 por el fabricante), resultando en una gran sensibilidad en la región de longitudes de onda de 345 a 1041 nm, con una resolución de aproximadamente 10 nm. La eficiencia de las rejillas de difracción se muestra en la Figura 10 en los Anexos.

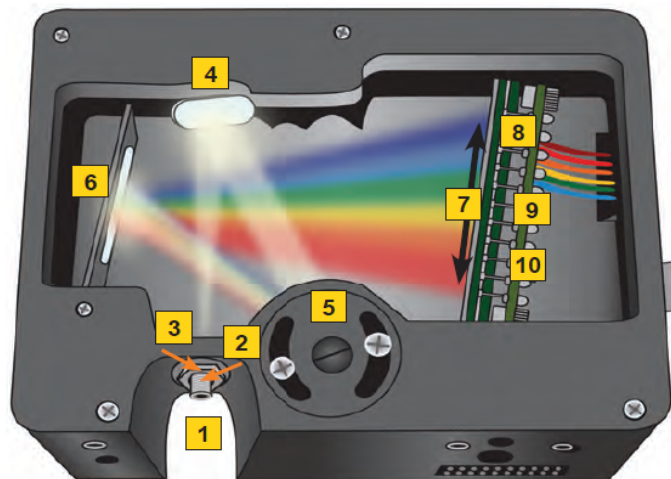


Figura 2.1: Espectrógrafo OceanOptics USB 4000. 1 conector a fibra óptica, 2 rendija de entrada, 3 filtro de absorción de paso largo, 4 espejo colimador, 5 rejilla de difracción, 6 espejo enfocador, 7 lente colector, 8 detector CCD, 9 filtro de paso largo, 10 convertidor analógico-digital [36].

2.1.4. Microscopio de epifluorescencia

El microscopio de epifluorescencia usa una lámpara de mercurio para excitar la muestra, y tiene dos modos de excitación y observación: excitación con luz azul y observación en verde, y excitación con luz verde y observación en rojo. En las Figuras 2.2 y 2.3 se observan espectros de la luz con la que se excitan las muestras y de la transmisión de los filtros de emisión.

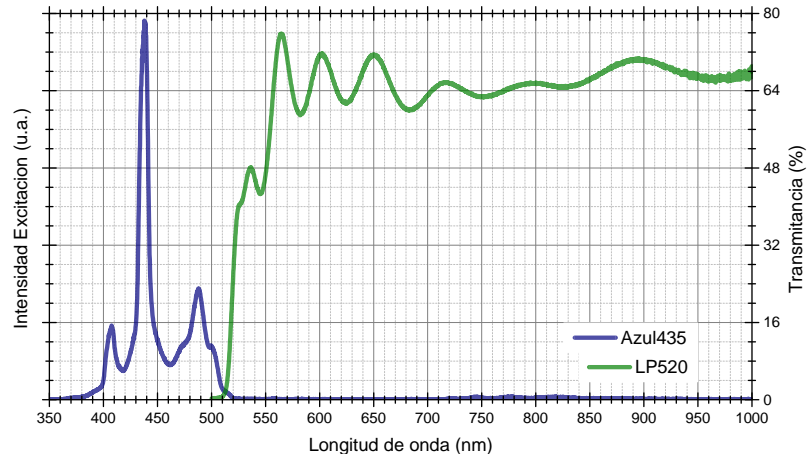


Figura 2.2: Arreglo de filtros de microscopio de epifluorescencia. Azul: espectro de emisión correspondiente al arreglo de excitación con luz azul. Verde: Transmitancia del filtro para observar emisión en verde.

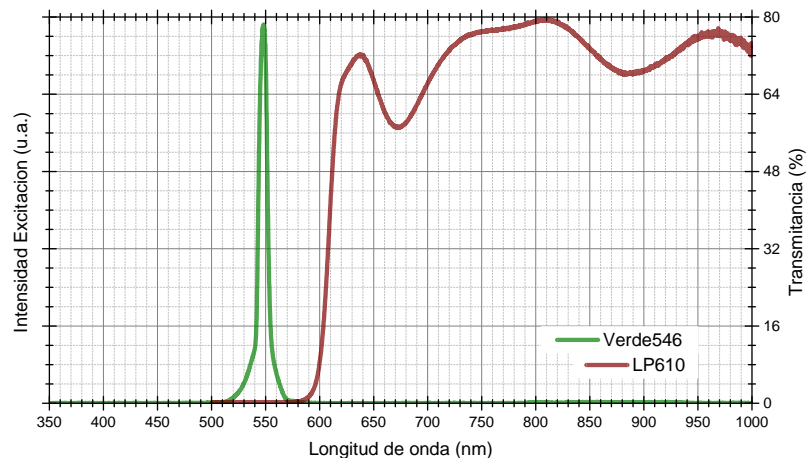


Figura 2.3: Arreglo de filtros de microscopio de epifluorescencia. Verde: espectro de emisión correspondiente a la excitación con luz azul. Rojo: transmitancia del filtro para observar emisión en rojo.

2.2. Preparación de muestras

Se cuenta con inóculos proporcionados por la Dra. Asunción Morte, de la Universidad de Murcia. Debido a unas pruebas preliminares en varias especies se observa que las esporas de diferentes especies presentan espectros de emisión similares, de acuerdo con los resultados presentados por A. Pérez [23], por esto en lo que sigue se trabajó principalmente con el inóculo de *Glomus mosseae* que proviene del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA), en España.

A partir del inóculo de colección de *Glomus mosseae* se prepararon varias muestras con la propagación del hongo usando sorgo o maicillo (*Sorghum bicolor*) como cultivo trampa. De este se extrajeron raíces vivas en simbiosis, y tras la muerte de la planta y esporulación del hongo MA se extrajeron esporas del nuevo inóculo producido.

2.2.1. Esporas y micelio

2.2.1.1. Técnica de tamizado húmedo

A partir de inóculo seco se usó el método de tamizado húmedo de Gerdeman y Nicolson para separar las esporas y las fibras de micelio o hifas de su sustrato, como lo describen Utobo, Ogbodo y Nwogbaga [37]:

- Se suspenden de 50 a 100 g de suelo en un contenedor de 2 litros y se agregan 1.5 litros de agua, se mezcla vigorosamente la suspensión para liberar las esporas del suelo y raíces.
- A continuación se deja que las partículas más pesadas en la suspensión se asienten por 15 a 45 s y se decanta el sobrenadante en los tamices en orden descendiente de tamaño del poro (1 mm; 250, 125 y 53 μm).
- Se examina el contenido de los tamices superiores (1 mm y 250 μm) para buscar esporocarpos que pueden tener un diámetro de hasta 1 mm.
- Para suelos de arcilla, es aconsejable repetir el procedimiento de decantado y tamizado con el suelo asentado.
- El material tamizado retenido por los demás tamices se vierte en placas de Petri separadas para extraer manualmente las esporas e hifas.

2.2.1.2. Técnica de centrifugación con sacarosa

Se pueden separar las esporas junto con una mínima cantidad de partículas orgánicas volviendo a suspender el material tamizado en una solución de 40 % o 50 % de sacarosa y centrifugando [37]:

- Transferir el material tamizado a tubos de centrífuga de 50 ml con un chorro fino de agua de una botella de lavado y balancear en tubos opuestos.
- Centrifugar de 1,200 a 1,300 \times g por 3 min, dejando que la centrífuga se detenga sin frenarla.

- Retirar el sobrenadante cuidadosamente para evitar perturbar el precipitado y luego retirar dedo los residuos orgánicos adheridos a la pared del tubo.
- Suspender las partículas de suelo en sacarosa 1.17 M enfriada, mezclar los contenidos con una espátula y centrifugar las muestras inmediatamente de 1200 a 1300 \times g por 1.5 min, aplicando el freno para detener la centrifuga.
- Verter el sobrenadante a través del tamiz de malla pequeña, enjuagar cuidadosamente las esporas retenidas en el tamiz con agua corriente y verter las esporas en una placa de Petri.

2.2.1.3. Separación de micelio

Luego de la propagación del hongo MA *Glomus mosseae* con plantas de sorgo como cultivo trampa, se extrajo micelio del nuevo inóculo para estudiar sus propiedades ópticas. Bajo microscopio óptico se monta una placa de Petri de igual forma que para la recolección de esporas. Con ayuda de una lámpara de tungsteno las hifas individuales son más fácilmente distinguibles.

2.2.2. Raíces

Conociendo los espectros de emisión de esporas y micelio del hongo MA *Glomus mosseae*, se desea comparar estos espectros con los de las raíces colonizadas por un hongo de la misma especie con el fin de verificar cual de los siguientes tres casos se cumple: si se puede detectar directamente bajo microscopio de epifluorescencia la presencia del hongo MA mediante su espectro de emisión, si anteponiendo algunos pasos sencillos de aclarado de la corteza se puede mejorar la captura de espectros, o si se pierde la propiedad de autofluorescencia luego del proceso de aclarado. Para esto, a partir del mismo inóculo de *Glomus mosseae* del que se extrajeron las esporas utilizadas en el apartado anterior, se preparó un sustrato rico en esporas en el cual se sembraron semillas de *Sorghum bicolor*, y de las plantas que germinaron se extrajeron sus raíces a las seis semanas de edad. Estas raíces fueron lavadas y cortadas en segmentos longitudinales de aproximadamente 5 mm para ser montadas en agua sobre un portaobjetos bajo el microscopio de epifluorescencia.

En este momento, en el tubo del tercer ocular del microscopio se adaptó un telescopio casero con un lente de cuarzo y una fibra óptica dirigida al espectrómetro para capturar sus espectros de emisión.

Para observar estructuras MA dentro de la raíz es necesario eliminar el citoplasma y compuestos fenólicos de las células corticales usando agentes químicos que remueven los contenidos de las células y los pigmentos de la pared celular. Para raíces no pigmentadas, en general se usa hidróxido de potasio (KOH) al 10 %, y para raíces pigmentadas se usa H₂O₂ o NaOCl [37]. Bajo microscopio óptico y de epifluorescencia primero se observaron segmentos de raíz enteros sin tratar, y luego los mismos segmentos fueron sometidos al proceso de aclaramiento de la forma siguiente:

- Se colocan las muestras de raíces en frascos de plástico o vidrio y se sumergen en KOH al 10 %.

- Se calientan los especímenes en baño de agua a 90° por 1 h o en autoclave a 15 psi por 10 min.
- Luego de calentar, se elimina la solución de KOH y se enjuagan las muestras de raíz con agua corriente.
- Si las raíces aún siguen pigmentadas, se vuelven a colocar en un beaker y se cubren con H₂O₂ a temperatura ambiente por 10 a 20 min.
- Luego de la limpieza se enjuagan las raíces por lo menos tres veces con agua corriente para eliminar el H₂O₂, luego se agrega HCl diluido (1-3 %) y finalmente se enjuaga por 3-4 min.

2.2.3. Extracción de componentes

Se realizaron extractos de glomalina y de pigmento amarillo de estructuras MA, y por otro lado, debido a que no es factible recolectar esporas en cantidades de varios gramos para realizar la extracción de sustancias de su pared celular, se procedió a obtenerlas de otras fuentes en las que son más abundantes. Se extrajo quitina de cascarones de crustáceos, y glucanos de la pared celular de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

2.2.3.1. Glomalina

Para la obtención de glomalina de raíces y de sustrato se sigue el protocolo propuesto por Driver *et al.*, que antepone varios pasos al protocolo de extracción de glomalina total y glomalina fácilmente extraíble propuesto por Wright y Upadhyaya [27] con el fin de separar otras moléculas orgánicas unidas a la pared celular del hongo. El protocolo de extracción de Driver *et al.* es el siguiente [38]:

- La muestra de suelo, raíces micorrizadas o esporas se mezcla con dodecilsulfato sódico (SDS) al 2 % caliente.
- Se homogeneiza la muestra en SDS y se coloca en tubos de ensayo a 100 °C durante 5 minutos, para liberar el material orgánico.
- Se centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos, para obtener el sobrenadante conteniendo las proteínas solubles, esto se reserva y el sedimento con la pared celular se lava con agua estéril.
- Se añade al sedimento hidróxido de sodio (NaOH) al 1 M y se incuba a 65 °C durante 30 minutos, para liberar el material soluble en medio alcalino.
- Se centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos y se conserva el sobrenadante.
- El sedimento se lava con tampón Tris-HCl al 10 mM (pH 7.5) para mantener el pH.

- Se mezcla con citrato de sodio a 50 mM (pH 8.0) para extraer las proteínas fuertemente unidas a la pared celular.
- Se calienta en autoclave a 121 °C por 30 minutos para liberar la fracción de glomalina.
- Se centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos y se conserva el sobrenadante que contiene el extracto de glomalina.

2.2.3.2. Pigmento amarillo

Se extrajeron raíces de algunas muestras de campo y de plantas cultivadas en control aproximadamente a seis semanas de crecimiento en simbiosis con un hongo seleccionado. Se colocan las raíces lavadas en metanol al 90 %, calentando en un beaker con agitación constante por 2 horas a 50 °C, luego este extracto es filtrado y se conserva el líquido [31, 35].

2.2.3.3. Obtención de quitina

Uno de los métodos más sencillos para la obtención de quitina es el propuesto por Chávez Huerta *et al.* [39].

- Se lavan y secan 20 g de cascarones de camarón.
- Se realiza su desproteinización calentándolos en solución de NaOH al 10 % y Na₂SO₃ al 0.1 % por una hora.
- Luego de enfriar y enjuagar, la desmineralización se realiza en HCL 6M a temperatura ambiente hasta que cese la efervescencia.
- La despigmentación se realiza con lavados de etanol puro por 1 hora.
- Finalmente se lava y seca el sedimento para obtener quitina en forma de hojuelas blancas.

2.2.3.4. Obtención de β -glucanos

Para obtener glucanos a partir de levaduras de pan, se sigue parcialmente el método usado por Lee *et al.* [40].

- Se suspenden 50 g de levadura en 500 ml de NaOH al 2 %.
- Se calienta la mezcla a 90°C por 4 horas con agitación constante.
- Se centrifuga a 3500 RPM por 15 min y se neutraliza el sobrenadante con ácido acético 2M.
- Se agrega etanol puro para formar un precipitado.
- Se separa el precipitado y se disuelve en ácido acético al 3 %.

2.3. Espectroscopia óptica

De las muestras preparadas se midieron espectros de absorción y de fotoluminiscencia para obtener información sobre los estados electrónicos.

2.3.1. Espectroscopia de absorción

En la Figura 2.4 se esquematiza el arreglo experimental para medir espectros de absorción. Mediante una fibra óptica (FO) se conecta la fuente de luz (F) con la muestra (M), se conecta otra fibra óptica directamente al porta muestra, de forma colineal con la otra fibra, y a la vez se conecta a un espectrógrafo (EG), que mediante una interfaz (USB) transmite la señal a una computadora personal (PC).

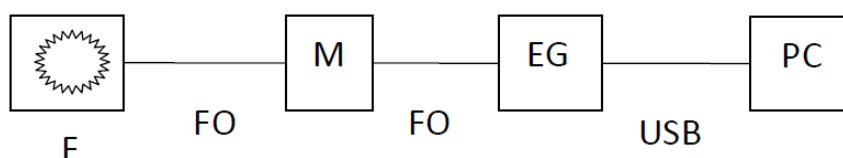


Figura 2.4: Arreglo para medir espectros de absorción.

2.3.2. Espectroscopia de fotoluminiscencia

Con uso de cubetas o porta objetos se observó, a nivel macroscópico, la fotoluminiscencia de esporas, micelio y los diferentes extractos preparados (véase Figura 2.5). En el caso que la intensidad de la luz de la fuente no es la suficiente para excitar la muestra, se colocara un arreglo de lentes (L) para concentrar la mayor intensidad de radiación posible sobre la muestra. Otra diferencia al montaje para absorción es que la fibra óptica conectada al espectrógrafo ahora se coloca en un ángulo indirecto. La configuración geométrica depende del tipo de muestra con que se trabaja (véase Figura 2.6).

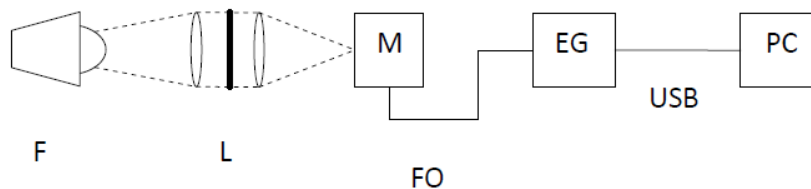


Figura 2.5: Arreglo para medir espectros de fotoluminiscencia.

De los espectros de absorción y de fotoluminiscencia se realizan ajustes en perfiles gaussianos para determinar las energías correspondientes a las transiciones electrónicas. Esto es preferible a comparar espectros de diferentes muestras a simple vista, pues se puede determinar con mayor

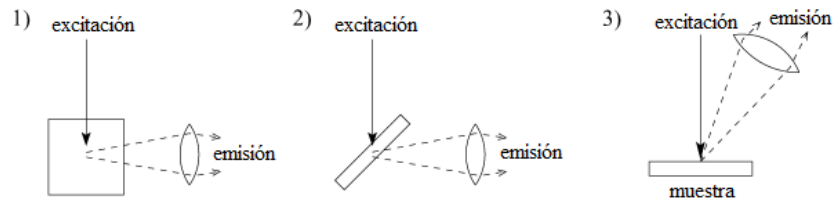


Figura 2.6: Esquemas de monitoreos de excitación usados en espectroscopia de emisión. 1) esquema en ángulo recto para estudios de soluciones, 2) esquema en ángulo recto usado para muestras delgadas transparentes, 3) esquema de excitación frontal para muestras no transparentes. Modificado de N. Tkachenko[15].

precisión los centros y las anchuras de las bandas de emisión. El ajuste en curvas gaussianas se realiza en el software Origin Pro 9.0, mediante ajuste por mínimos cuadrados no lineales, usando el algoritmo de Levenberg-Marquardt. Las variables de interés en este caso son los centros de las curvas gaussianas y sus respectivos anchos, expresados como FWHM (*full width at half-maximum*).

2.3.2.1. Microfotoluminiscencia (micro-PL)

En la Figura 2.7 se ilustran los componentes del microscopio de epifluorescencia utilizado para observar y captar espectros de absorción y fotoluminiscencia de estructuras de hongos MA, específicamente esporas, micelio y raíces colonizadas.

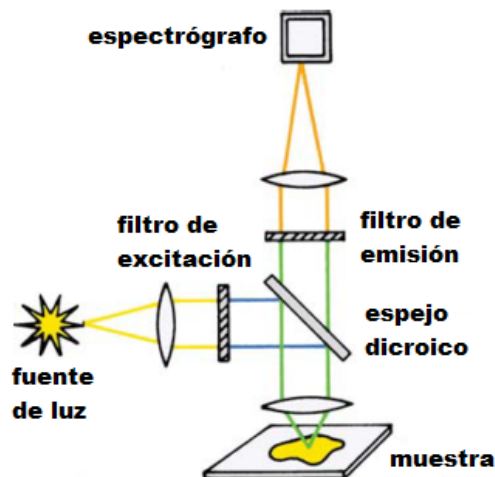


Figura 2.7: Geometría de filtros utilizada para la microscopia de epifluorescencia. Modificado de J. Lakowicz [14].

Los espectros capturados haciendo uso del microscopio de epifluorescencia no pueden ser interpretados inmediatamente, ya que los filtros de barrera que posee este microscopio consisten en interferómetros de Fabry-Perot, resultando en una transmitancia no uniforme, como se observa en el capítulo del Experimento en la Figura 2.2, así que estos espectros tienen que ser divididos por la transmitancia de este filtro para obtener una aproximación al espectro de emisión verdadero. Además existe una región en común entre los filtros de excitación y de emisión de aproximadamente 10 nm, lo que resulta en una aparente banda centrada cerca de 516 nm. Con todas estas consideraciones se pueden obtener espectros de Micro-PL aceptables en la región entre 530 y 680 nm.

Capítulo 3

Resultados y discusión

En este capítulo se ilustran y describen los resultados haciendo uso de fotografía microscópica óptica y de epifluorescencia, y espectros de absorción y fotoluminiscencia tomados haciendo uso de la óptica de los microscopios. Por otro lado se muestran espectros de extractos usando espectroscopia de absorción y fotoluminiscencia con métodos convencionales para determinar si algunas de estas sustancias pueden contribuir a la fotoluminiscencia de las estructuras MA.

3.1. Micro-PL de estructuras MA de *Glomus mosseae*

Como ya ha sido mostrado en el capítulo de Antecedentes, las esporas de todas las especies de los inóculos de hongos MA que se tienen disponibles en esta línea de investigación (5 cultivos del género *Glomus* y uno de *Scutellospora*) tienen espectros de fotoluminiscencia casi idénticos, según A. Pérez [23], por esto en esta investigación se decidió trabajar únicamente con una especie de hongo, *Glomus mosseae*, elegida por ser una de las especies con mayor nivel de esporulación al ser propagada con *Sorghum bicolor*.

3.1.1. Esporas de *Glomus mosseae*

Luego del proceso de tamizado húmedo y decantación de un inóculo de aproximadamente un año de edad, se prepararon muestras de unas pocas decenas de esporas de *Glomus mosseae* en portaobjetos de vidrio para ser observadas bajo el microscopio de epifluorescencia en modo óptico como se observa en las Figuras 3.1a y 3.1c, y también en modo de epifluorescencia con filtros de excitación para seleccionar las líneas de emisión de mercurio entre 400 a 500 nm (principalmente la línea alrededor de 435 nm) como se ve en las Figuras 3.1b y 3.1d, o bien la línea de emisión alrededor de 546 nm. En las subfiguras 3.1e y 3.1f se muestran esporas propagadas a partir de primer inóculo, y de unos 6 meses de edad.

Al excitar las esporas con radiación de 400 a 500 nm, se observó que hay una emisión amarillanaranja intensa tras un fondo verde. Esta luz de fondo se debe a un solapamiento entre la transmisión de los filtros de excitación y de emisión del microscopio de epifluorescencia, como se puede ver

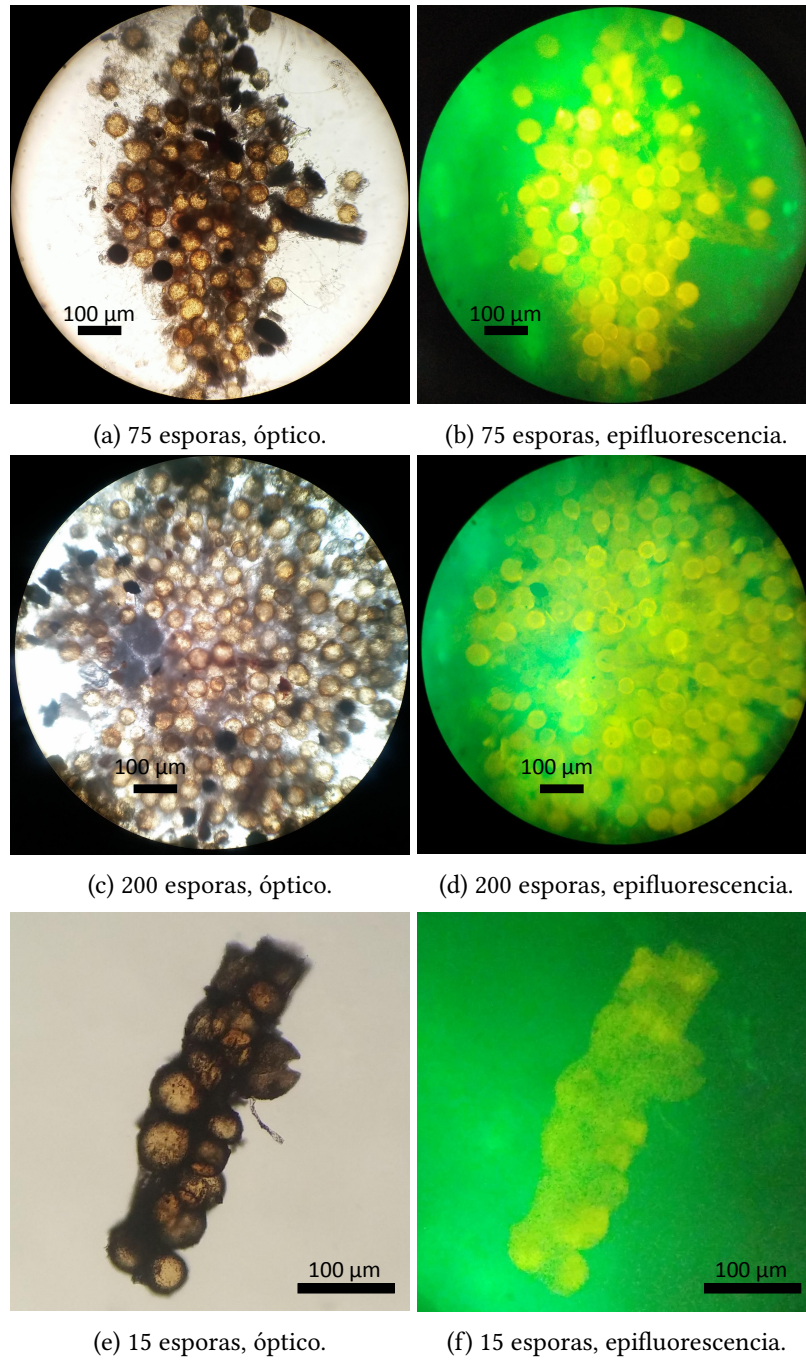
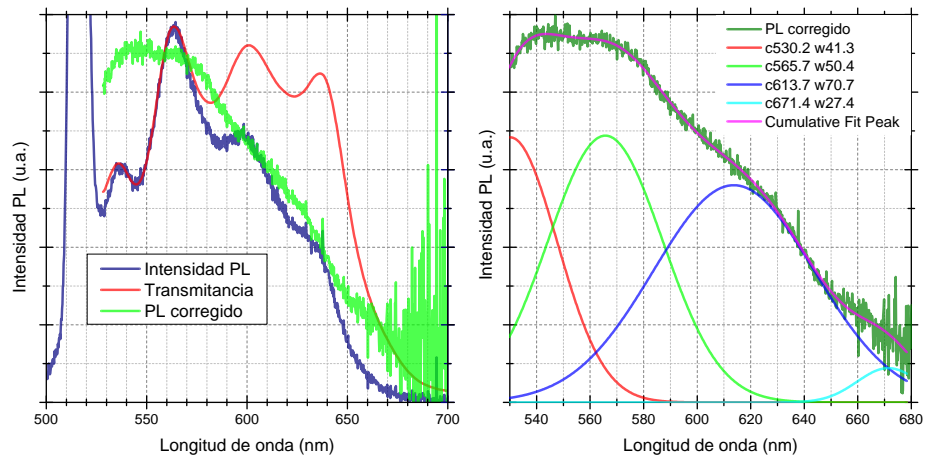


Figura 3.1: Fotografías de esporas de *Glomus mosseae*. Izquierda: bajo microscopio óptico. Derecha: bajo microscopio de epifluorescencia. Escala aproximada de 100 µm. Excitación de 400 a 500 nm.

en la Figura 2.2 y puede ser por un leve desalineamiento del juego de filtros, ya que la transmisión del espejo dicroico depende tanto de la longitud de onda como del ángulo de incidencia de la luz sobre este [13]. Esto provoca que parte de la radiación que incide en la muestra para excitarla sea reflejada por el vidrio del portamuestra y luego transmitida hacia el ocular. Para determinar la región de longitudes de onda que pueden ser aprovechadas para la espectroscopia se colocó una placa de vidrio sin muestra y el microscopio en modo de epifluorescencia para emisión en verde. El espectro correspondiente a esta luz de fondo se muestra en la Figura 12 en los Anexos. La región del espectro de micro-fotoluminiscencia afectada está entre los 500 y 530 nm, pudiéndose aún aprovechar la región de 530 a 700 nm para la captura de espectros de micro-PL.

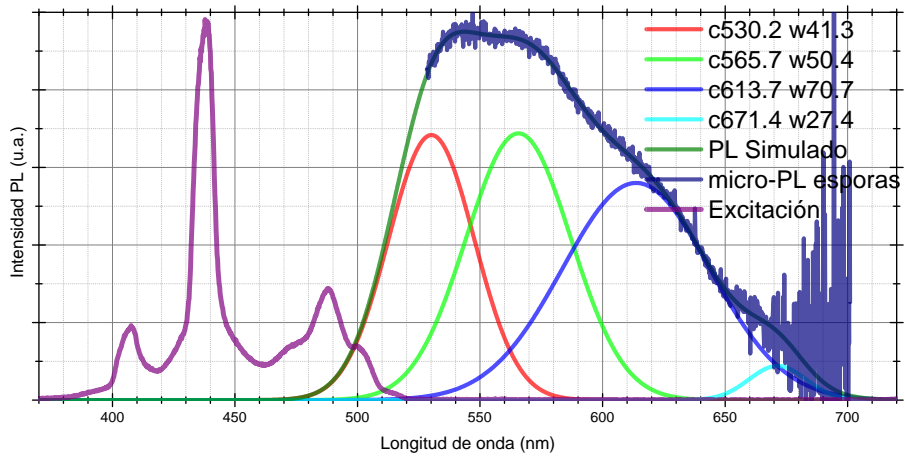
En la Figura 3.2a se muestra el espectro de micro-PL correspondiente al grupo de esporas de las subfiguras 3.1e y 3.1f, que son resultado de la propagación y pertenecen a un inóculo de 6 meses. En azul se muestra el espectro capturado sin corregir, el cual muestra cinco aparentes bandas de emisión, la que se encuentra a longitudes de onda más cortas (500 - 530 nm) se debe a la luz reflejada recién descrita, y los otros cuatro se deben a los modos de resonancia de Fabry-Pérot del espejo dicroico y coinciden con las bandas del espectro de transmisión de los filtros que se muestra en rojo. Al corregir el espectro de emisión por la transmitancia de los filtros, dividiendo entre esta se obtiene el espectro corregido que se muestra en verde. Este espectro corregido se muestra también en la figura 3.2b, y parece estar formado de una o varias bandas de emisión centradas alrededor de 550 nm y con un ancho de unos 100 nm o más. Para conocer la composición de este espectro en bandas de emisión se realizó un ajuste por perfiles gaussianos, encontrándose que el mejor ajuste para este espectro se obtiene utilizando cuatro perfiles gaussianos que corresponden a bandas de emisión, tres de estas de intensidad similar y centradas alrededor de 530, 566 y 613 nm y una banda de poca intensidad alrededor de 671 nm. Usando los parámetros de estos perfiles gaussianos se simula el espectro de emisión completo como se muestra en la figura 3.2c, por lo que se esperaría que las esporas tengan una emisión de 480 a 700 nm.

Como una forma de verificar si alguna de estas bandas de emisión encontradas con el ajuste en perfiles gaussianos se debe a la luz de fondo de la lámpara de mercurio, en las últimas etapas de este trabajo se adquirió un puntero láser con emisión a 405 nm y ancho de banda igual o menor que la mejor resolución de nuestros espectrógrafos (≤ 1.5 nm) cuya emisión se puede ver en la Figura 4. Este fue adaptado en el lugar de la lámpara de mercurio original y se repitió el experimento de micro-PL para dos muestras de esporas. Los espectros de emisión corregidos, con sus correspondientes ajustes por perfiles gaussianos se muestran en la Figura 3.3. En esta figura se puede observar que el ajuste se resuelve usando la misma cantidad de bandas con centro a las mismas longitudes de onda que para la excitación con lámpara de mercurio, y todas las bandas excepto la centrada a cerca de 671 nm tienen una anchura (FWHM) similar. No se pudo obtener un mejor ajuste con una cantidad distinta de bandas de emisión. En la Tabla 3.1 se enumeran los valores de los parámetros encontrados en el ajuste por perfiles gaussianos, para la emisión de esporas excitada tanto con lámpara de vapor de mercurio como con puntero láser a 405 nm. Una diferencia notoria entre estos espectros de emisión es la amplitud relativa de cada una de las bandas de emisión entre las dos fuentes, pues mientras las bandas centradas a 530.2 y 565.7 nm se mantienen con amplitudes similares para ambas fuentes de excitación, se observa que la tercera



(a) Corrección por transmisión de filtros.

(b) Ajuste por perfiles gaussianos.



(c) Radiación de excitación y simulación de espectro de micro-PL completo.

Figura 3.2: Espectro de micro-PL de grupo de esporas de *Glomus mosseae*, corrección y ajuste.

banda más intensa, a 613.7 nm disminuye su intensidad prácticamente hasta la mitad al excitar con el láser, esto se puede deber a que estas dos primeras bandas corresponden a la relajación de estados alcanzados excitando cerca de 404 nm (mercurio) y 405 nm (láser), mientras que la tercera banda puede responder mejor a una excitación a longitudes de onda más largas, cerca de los 435 nm de la lámpara de mercurio.

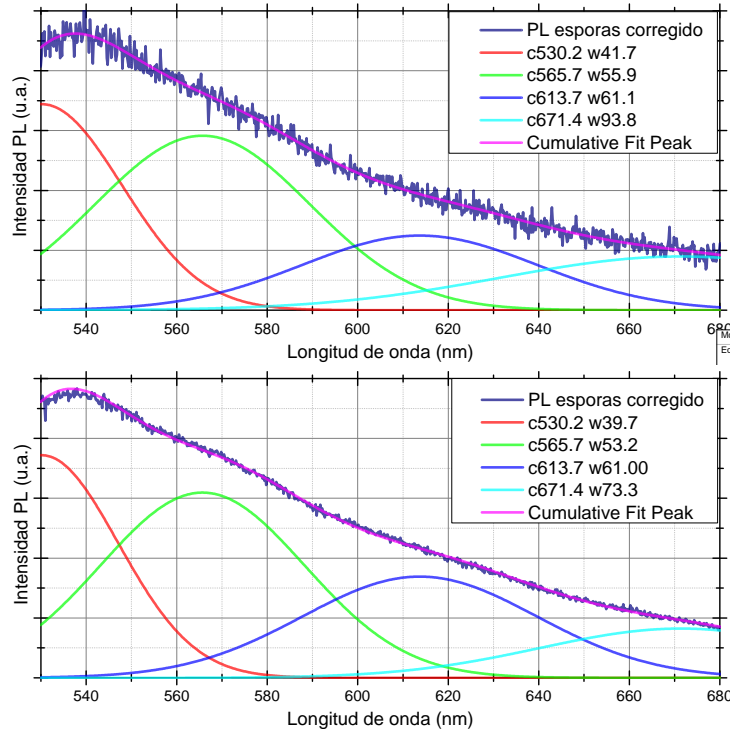


Figura 3.3: Espectros corregidos de micro-PL de esporas de *Glomus mosseae*. Excitación a 405 nm.

Este resultado para la micro-PL de esporas difiere del presentado por A. Pérez [23], quien captó espectros de fotoluminiscencia de esporas del género *Glomus* con el mismo microscopio pero con el espectrógrafo que en esta investigación se emplea para experimentos de absorción, con una resolución de alrededor de 1 nm y sensibilidad máxima alrededor de los 300 nm. A. Pérez capturó espectros de micro-PL de esporas entre 520 a 900 nm, como se puede ver en la Figura 1.14. Por la forma del espectro corregido solo era aparente una banda, lo que le llevó a simular un perfil gaussiano a partir de este espectro, con centro alrededor de 413 nm y ancho de unos 250 nm, por lo que se esperaba una emisión a longitudes de onda entre 200 nm y 750 nm aproximadamente, abarcando emisión desde el infrarrojo cercano hasta el ultravioleta cercano. Además no observó los modos de Fabry-Pérot del filtro de excitación a longitudes de onda mayores a 700 nm, esto debido a que dicho espectrógrafo no es para aplicaciones infrarrojas.

En este trabajo, el espectro simulado entre 480 y 700 nm parece estar más de acuerdo con las

Tabla 3.1: Posiciones y amplitudes relativas de bandas de emisión de esporas excitando con lámpara de mercurio y con láser a 405 nm.

Banda de emisión	1	2	3	4
Longitud de onda (nm)	530.2	565.7	613.7	671.4
Exc. Mercurio (404 y 435 nm + cont.)				
Amplitud	78.66	79.14	64.43	10.2
Amplitud relativa	1	1	0.81	0.13
Exc. Láser (405 nm)				
Amplitud	23.4	19.8	8.5	6.12
Amplitud relativa	1	0.85	0.36	0.26

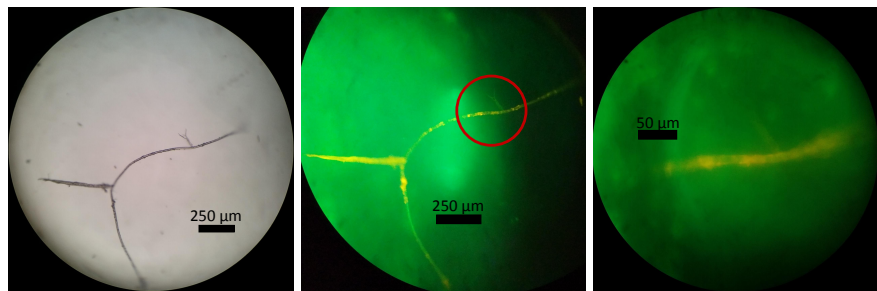
longitudes de onda de excitación usadas, que son más intensas entre 400 y 500 nm. Además, la región de emisión obtenida con el espectro simulado en la subfigura 3.2c no va a longitudes de onda más cortas que la radiación de excitación, sino únicamente tiene un pequeño solapamiento con la luz de la lámpara, como es típico en experimentos de fotoluminiscencia. Los centros de tres de las bandas encontradas (530, 566, y 671 nm) se encuentran cercanos a los reportados por B. Dreyer para esporas de *Glomus intraradices* correspondientes a las regiones de 503-527 nm, 559-608 nm y 655-680 nm que ya han sido mostrados anteriormente en la Tabla 1.2 y fueron obtenidos excitando con un láser a 488 nm [21].

En este trabajo se intentó tomar espectros de absorción tanto con lámpara de deuterio como con lámpara de tungsteno obteniendo espectros con una muy mala relación señal a ruido y con la misma forma monótonamente decreciente obtenida por A. Pérez [23]. No se encontraron bandas de absorción definidas en el intervalo de 325 a 675 nm irradiando esporas con la lámpara de arco de deuterio. Esta forma del espectro podría deberse en parte a fenómenos de dispersión y eclipsamiento de la lámpara de referencia, más a la absorbancia de las esporas, por lo que podría ser más conveniente para investigaciones futuras tomar espectros de excitación en lugar de espectros de absorbancia.

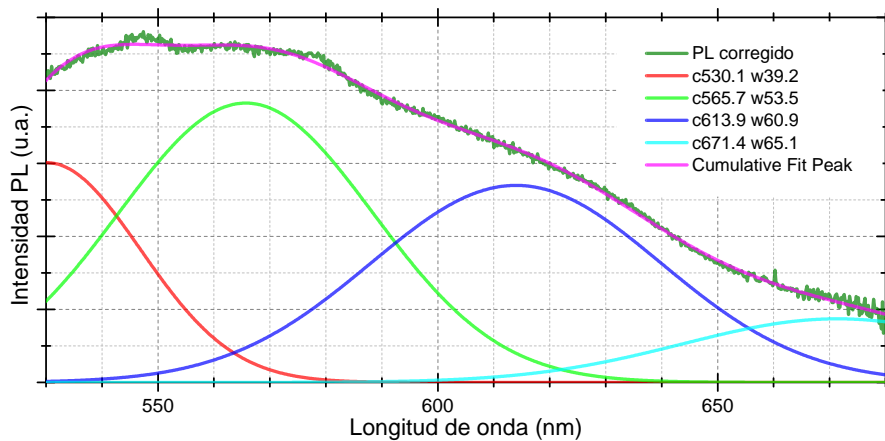
3.1.2. Micelio de *Glomus mosseae*

Del mismo inóculo de la subsección anterior se recolectaron hifas individuales para capturar sus espectros de micro-PL. Estos resultados se muestran en la Figura 3.4. En la fotografía 3.4a se observa una muestra de micelio en modo de microscopio óptico, en 3.4b la misma muestra en modo de epifluorescencia, donde en un círculo rojo se marca la región de la subfigura 3.4c, donde fue tomado su espectro de emisión de micro-PL. En estas fotografías se puede observar que toda la hifa presenta fotoluminiscencia de color amarillo brillante, algunas partes con emisión más intensa, y que a mayores aumentos parece ser parte del citoplasma de estas hifas. Se desconoce si se trata de tejido metabólicamente activo o inactivo, pero esta hifa estaba completamente desprendida de raíces y no se observó ciclosis (cytoplasmic streaming) o movimientos del citoplasma o citosol en

esta muestra, como lo describen Séjalon-Delmas *et al.* para hifas metabólicamente activas y en plena simbiosis [22]. En la subfigura 3.4d se muestra el espectro de micro-PL resultante de excitar la muestra de micelio con la lámpara de vapor de mercurio, en esta se puede notar que hay una influencia mínima de las líneas de emisión de mercurio cerca de 546 y 578 nm, y a pesar de que la muestra no cubre todo el campo (dejando pasar algo de la luz de fondo reflejada), la intensidad de la fotoluminiscencia debe ser considerablemente mayor que la de esta luz de fondo.



(a) Bajo microscopio óptico. (b) Bajo microscopio de epifluorescencia. (c) Región donde se captura espectro.



(d) Espectro de micro-PL y ajuste en perfiles gaussianos.

Figura 3.4: Fotoluminiscencia de hifa de *Glomus mosseae*.

De igual manera que para esporas se realizó un ajuste del espectro de emisión por perfiles gaussianos para determinar su composición en bandas de emisión, encontrando la misma cantidad de bandas centradas en las mismas longitudes de onda para ambas estructuras: alrededor de 530, 566, 614 y 671 nm, todas con un ancho (FWHM) similar entre los 40 y 60 nm.

Es de importancia mencionar que según la revisión bibliográfica, previamente no se han publicado espectros de emisión de hifas de hongos MA, únicamente se sabe de los datos por Séjalon-Delmas [22] sobre espectros de excitación de esporas e hifas, para hongos del género *Gigaspora*, de los

cuales no tenemos inóculos de colección. A pesar de tratarse de hongos MA de diferentes géneros, el intervalo de longitudes de onda de emisión aquí obtenido también puede estar de acuerdo con los resultados obtenidos por Séjalon-Delmas ya que los máximos de excitación entre 400 a 450 nm podrían corresponder bastante bien a máximos de emisión alrededor de los 520 a 550 nm. Esta es sin embargo una comparación muy arriesgada, pues se necesitaría repetir estos experimentos en muestras propias de *Gigaspora* para validar estas comparaciones, y esperaríamos espectros similares solo en el caso de que la emisión se deba a las mismas sustancias entre hongos de diferentes géneros.

El hecho de que los espectros de emisión coincidan para ambas estructuras extrarradicales nos da indicios de que las sustancias responsables de la emisión son comunes a ambas estructuras, sean de la pared celular o citoplasma. Por otro lado, pensando en posibles aplicaciones para la detección de hongos MA por esta emisión, se carecería de especificidad para distinguir entre esporas o micelio, o si las estructuras están metabólicamente activo, pero el hecho que ambas partes emitan facilitaría la detección del hongo en general.

3.2. Micro-PL de raíces de *Sorghum bicolor*

La Figura 3.5 muestra fotografías de algunos segmentos de raíz de *Sorghum bicolor* extraídas de una muestra inoculada con *Glomus mosseae*. Estas fueron tomadas en el microscopio de epifluorescencia iluminando con luz blanca y sin el empleo de filtros ópticos. Se puede observar que sin ayuda de métodos de aclarado y tinción o de autofluorescencia las raíces son muy oscuras y apenas se pueden distinguir detalles de estas.

Estos segmentos de raíz luego fueron observados bajo el mismo microscopio en el modo de epifluorescencia excitando con luz de 400 a 500 nm (principalmente de 435 nm) y detectando en verde a partir de 520 nm. Como se ilustra en la Figura 3.6 ahora se observa que todo el segmento de raíz presenta fluorescencia de color amarillo pálido, con algunos puntos o manchas de un color verde-amarillo de intensidad apreciablemente mayor. También se observa fluorescencia en la parte central (cilindro vascular) de la raíz, de color distinto al de la corteza.

A continuación, se procedió a enfocar el microscopio sobre cada una de estas manchas luminiscentes, a mayores aumentos de modo que la región fluorescente cubra la totalidad del campo de visión del microscopio para tomar los espectros de emisión.

En la Figura 3.6 se muestran al lado izquierdo las fotografías de Micro-PL de los mismos segmentos de raíz que en la Figura 3.5, indicando con números cada una de las regiones en las cuales se enfocó para capturar espectros, y al lado derecho se muestran los respectivos espectros de emisión corregidos por el efecto del filtro. Todas estas manchas fluorescentes, además de parecer del mismo color en las fotografías (y posiblemente ser el mismo tipo de estructura o resultar de acumulaciones del mismo tipo de sustancia), también muestran espectros muy similares entre sí, centrados a 550 nm en lo que parece una banda muy ancha, de aproximadamente 140 nm de ancho (FWHM), pero debido a la pendiente descendiente casi constante, lo más seguro es que esta emisión esté compuesta de varias bandas de emisión superpuestas.



Figura 3.5: Fotografías bajo microscopio óptico de segmentos sin tratar de raíces de *Sorghum bicolor* infectadas con *Glomus mosseae*. Escala aproximada 500 μm .

Como se observa en la Figura 3.7, realizando un ajuste de los espectros de fotoluminiscencia por perfiles Gaussianos, se encuentra que este espectro podría estar formado por una gran banda de emisión centrada alrededor de los 515 nm, con un ancho (FWHM) de cerca de 200 nm, es decir que la muestra emitiría con mayor intensidad entre los 415 y 615 nm aproximadamente. Además de la banda de emisión principal, en este espectro se encuentra emisión adicional alrededor de 550 y 577 nm, pero como ya se observó en los espectros de micro-PL de esporas y micelio, estas pequeñas bandas se pueden deber a las líneas de emisión de la lámpara de mercurio alrededor de 546 nm y alrededor de 577 y 579 nm. Un punto adicional a considerar es que aún cuando la muestra de raíces es de tamaño considerablemente mayor, y los espectros de micro-PL se han tomado prácticamente sin enfocar luz reflejada especularmente por la placa de vidrio, la intensidad de radiación por líneas de emisión de la lámpara es mayor en estos espectros, lo que podría indicar que la superficie de las raíces tiene mayor capacidad de reflejar la radiación incidente que las esporas, las cuales absorberían mejor incluso las longitudes de onda visibles, o bien la emisión de las esporas es mucho más intensa de lo que puedan reflejar.

Esta banda de emisión a 515.5 nm no coincide con ninguna de las obtenidas para las estructuras extrarradicales formadas por el hongo *Glomus mosseae*, lo que probablemente indicaría que la naturaleza de estas manchas fluorescentes es distinta a la de las esporas o hifas, a pesar de que el intervalo de emisión se superpone con la del hongo en la región del verde-amarillo.

El origen de estas manchas fluorescentes puede ser uno de varios, por ejemplo acumulaciones de alguna sustancia orgánica presente en el sustrato, o alguna estructura o material producido por el hongo MA colonizante o por la planta colonizada, o incluso resultado de una infección secundaria. Estas manchas parecen ser muy superficiales, y hay reportes que en plantas que

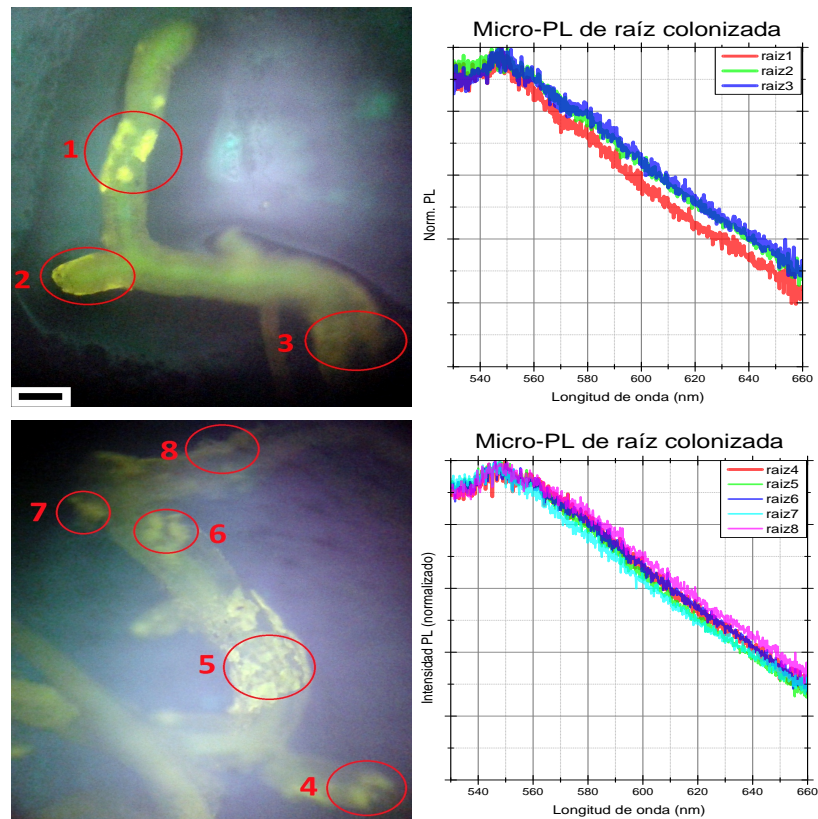


Figura 3.6: Fotoluminiscencia de segmentos de una raíz micorrizada. Izquierda: Fotografías bajo microscopio de epifluorescencia con filtro de excitación alrededor de 435 nm y filtro paso largo de emisión a 520 nm; las marcas enumeradas en rojo son las partes de las que se tomaron espectros. Escala aproximada de 500 μm . Derecha: espectros de fotoluminiscencia de las partes brillantes de la raíz.

producen pigmento amarillo al ser colonizadas, este se acumula en las vacuolas de células del córtex de sus raíces [31, 35]. También podrían ser arbusculos, pero la nitidez de la imagen no es la suficiente para poder identificarlos a simple vista. Además, es poco probable que el origen de esta emisión superficial sea por acumulaciones de ácidos húmicos del sustrato, pues este sustrato es muy pobre en materia orgánica, lo que se puede hacer evidente por la pobre agregación que presentaba antes de la siembra de estos cultivos, y por provenir de una región con muy escasa vegetación u otro origen de materia orgánica.

Asumiendo que estas manchas pueden ser acumulaciones de lípidos carotenoides, comparamos estos resultados de emisión con los obtenidos por Klingner *et al.* [33], que reportan máximos de emisión a 498 y 533 nm, que en nuestro caso no es posible observar el primero debido al intervalo de longitudes de onda en que se capturaron espectros, y para el correspondiente a 533

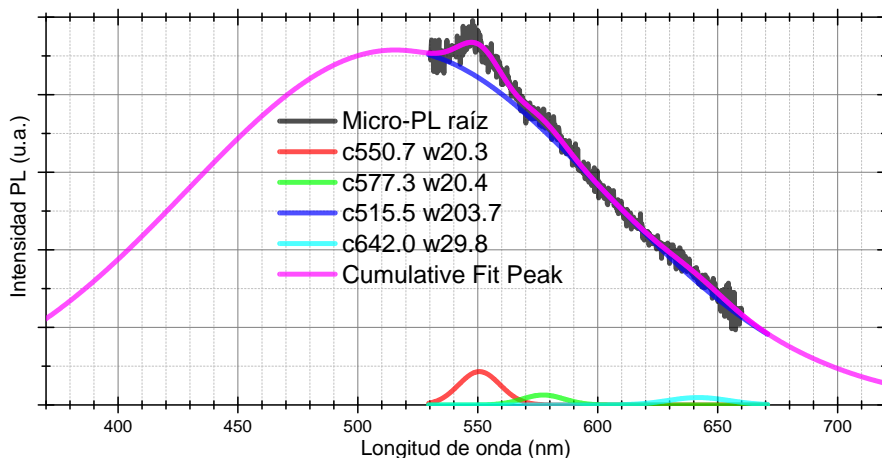


Figura 3.7: Ajuste Gaussiano y simulación de espectro de emisión de mancha fluorescente en la superficie de una raíz de *D. bicolor* inoculada con *G. mosseae*.

nm observaríamos un corrimiento apreciable de unos 17 nm con el espectro encontrado a 550.7 nm a partir del ajuste en perfiles gaussianos. Es importante recalcar que esta comparación es entre un extracto y raíces enteras sin ningún tratamiento, y siempre se espera encontrar diferencias entre estos espectros, además, aunque existen varios reportes de que raíces colonizadas por hongos MA presentan fluorescencia, la publicación por Klingner *et al.* es la única en revistas arbitradas de la que tenemos conocimiento. En la siguiente sección se muestran comparaciones de extractos con los datos que se conocen de la literatura.

La misma muestra de segmentos de raíz fue sometida a un tratamiento alcalino para aclarar la corteza de la raíz, y nuevamente evaluar la autofluorescencia. En la Figura 3.8 se puede observar el resultado del proceso de aclarado de raíces de la misma planta que en las Figuras 3.5 y 3.6. A la izquierda se muestran fotografías en microscopio óptico de raíces que se han vuelto prácticamente transparentes luego del proceso de digestión con KOH, y al lado derecho en las fotografías bajo microscopio de epifluorescencia se observa que las raíces han perdido prácticamente todo el material fluorescente junto con la coloración oscura de su corteza. Esto puede significar que la mayoría del material fluorescente está ubicado en la corteza de la raíz, o bien que el tratamiento en medio alcalino caliente es demasiado fuerte y también digiere sustancias del interior de la raíz.

Lamentablemente al no haberse realizado pruebas adicionales con métodos tradicionales de aclarado y tinción de raíces para cuantificar el grado de colonización de estas, no se puede determinar con seguridad si la planta de hecho se encuentra colonizada o identificar la naturaleza de las estructuras fotoluminiscentes, sin embargo cabe mencionar que la presencia de estas manchas fue mucho menor, casi ausente, en muestras de las plantas de control cultivadas sin agregar esporas.

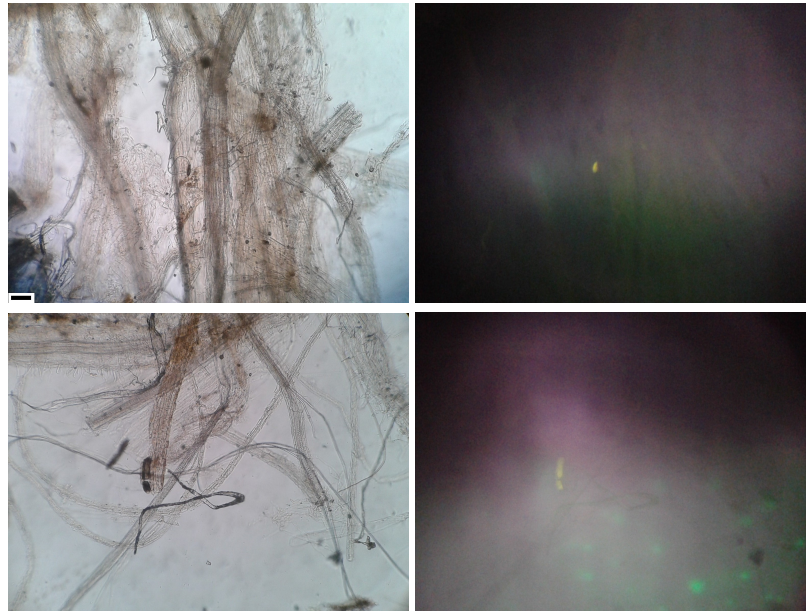


Figura 3.8: Fotografías de raíces aclaradas por tratamiento alcalino. Izquierda: bajo microscopio óptico, derecha: bajo microscopio de epifluorescencia. Escala aproximada de 500 μm .

3.3. Absorción y fotoluminiscencia de extractos de raíces y suelo

Una vez conocidos los espectros de emisión de las esporas y micelio de *Glomus mosseae*, además de raíces de *Sorghum bicolor* posiblemente en simbiosis con este hongo MA, estos se usan para determinar cómo pueden contribuir algunas sustancias a sus propiedades ópticas. Se prepararon extractos siguiendo el método para pigmento amarillo de raíces de limón, maíz y sorgo, y de glomalina de las raíces de limón y sorgo, y del sustrato de sorgo. Por otro lado se consiguió quitina a partir de cascarones de camarón y glucanos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Se tomaron espectros de absorción y fotoluminiscencia de estas muestras para determinar si es posible que algunas de estas sustancias contribuyan a la emisión de las estructuras extrarradicales y de las raíces micorrizadas.

3.3.1. Extracto metanólico (pigmento amarillo)

Se realizaron extractos en metanol de raíces de muestras de campo de limón (*Citrus × limon*) provenientes de la ciudad de Antigua Cuscatlán, y de maíz (*Zea mays*) provenientes de Ciudad Delgado, ambos suelos naturales ricos en materia orgánica, y por otro lado de raíces de *Sorghum bicolor* cultivado bajo control como se describe en los apartados anteriores del capítulo de metodología. Todos los extractos de pigmento amarillo fueron excitados a dos longitudes de onda diferentes para estudiar su fluorescencia: con la línea de emisión alrededor de 365 nm proveniente

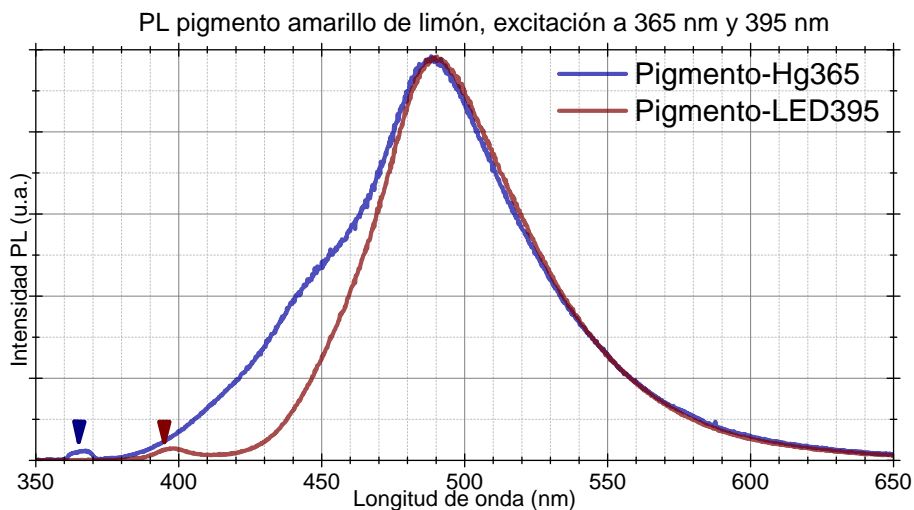
de una lámpara de vapor de mercurio, y con una banda centrada a 395 nm emitida por un LED.

3.3.1.1. Pigmento amarillo de raíces de limón

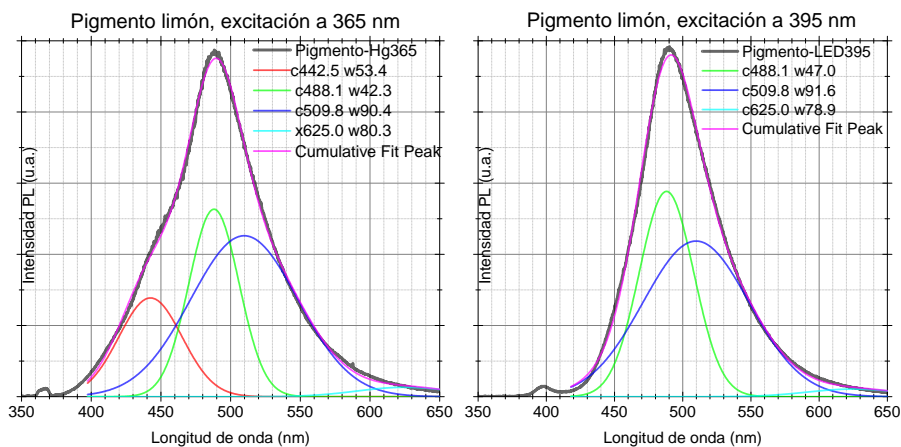
En la Figura 3.9 se muestran espectros de fotoluminiscencia de una misma muestra de pigmento amarillo extraído de raíces de *Citrus × limon*, excitado a las dos longitudes de onda mencionadas anteriormente. Se observa que para ambas excitaciones surgiera el mismo efecto de un aparente máximo de emisión alrededor de 490 nm, pero al excitar a 365 nm se puede observar una banda de emisión alrededor de los 450 nm, la cual no se presenta al excitar a 395 nm. Realizando un ajuste en perfiles Gaussianos de ambos espectros, como se muestra en las subfiguras 3.9b y 3.9c, se pueden distinguir las bandas de emisión que componen el espectro de fotoluminiscencia de esta muestra, con una banda a 442.5 nm que aparece excitando alrededor de 365 nm, y en ambos espectros se observan bandas alrededor de los 488 nm y 510 nm.

Este aparente máximo alrededor de los 490 nm, posiblemente se debe a un efecto de la óptica de este espectrógrafo, considerando que la eficiencia tanto del detector como de la rejilla de difracción son máximas cerca de los 500 nm, además de posibles dispersiones de las fuentes de excitación (véase figuras 9 y 10 en Anexos). Este efecto es particularmente más notorio para señales de baja intensidad, pues en pruebas con varias muestras con una intensidad de fotoluminiscencia muy baja (e.g., muestras de tejidos humanos) generalmente muestran el mismo máximo aparente, pero a longitudes de onda más cortas o más largas se observan las diferencias entre las muestras, mientras que con muestras con una alta eficiencia cuántica se observan máximos a diferentes longitudes de onda (como nanoestructuras semiconductoras de diferentes tamaños).

Klingner *et al.* [33] reporta emisión para extractos de pigmento amarillo de raíces de maíz (*Zea mays*) con máximos a 498 y 533 nm, pero no describe la forma en que fue medida esta emisión. Desafortunadamente este es el único reporte previo que se conoce sobre espectros de emisión del pigmento amarillo. Únicamente Klingner *et al.* y Fester *et al.* publican espectros de absorción [31, 33].



(a) En rojo: excitación a 395 nm, en azul: excitación a 365 nm.



(b) Ajuste gaussiano, excitación a 365 nm. (c) Ajuste gaussiano, excitación a 395 nm.

Figura 3.9: Espectros de fotoluminiscencia de pigmento amarillo extraído de raíces de *Citrus × limon*

3.3.1.2. Pigmento amarillo de raíces de maíz

Para el pigmento amarillo extraído con metanol de raíces de maíz (2 g por 10 ml de MeOH), se obtuvieron espectros de emisión similares a los de limón en el intervalo de 400 a 520 nm, con la misma banda alrededor de 450 nm y la aparente banda alrededor de 490 nm, además de bandas adicionales alrededor de los 550 nm y 675 nm (véase Figura 3.10). Hay reportes que en algunas especies de plantas pueden acumular clorofila en sus raíces, una de estas es el maíz, por esto se le asocia la banda alrededor de 670 nm a la emisión de la clorofila, además para verificar, en los

Anexos se incluye un espectro de emisión de un extracto de clorofila de hojas con su respectivo ajuste en perfiles gaussianos (véase Figura 11).

Por esta razón el ajuste en perfiles gaussianos de estos espectros de emisión se realizó en el intervalo de 400 a 620 nm, región a la cual la clorofila no tiene emisión. Los resultados de estos ajustes se muestran en la Figura 3.11. Aquí se puede ver que estos espectros estarían formados por bandas de emisión centradas a las mismas longitudes de onda que el pigmento amarillo extraído de raíces de limón, a 442, 488 y 509 nm, y además de estas se presentan dos bandas de emisión adicionales, la más importante a 550 nm y otra menos intensa a 604 nm. Para esta muestra el máximo que Klingner *et al.* [33] reportan a 533 nm en esta muestra no se presenta, la más cercana se encuentra alrededor de los 550 nm.

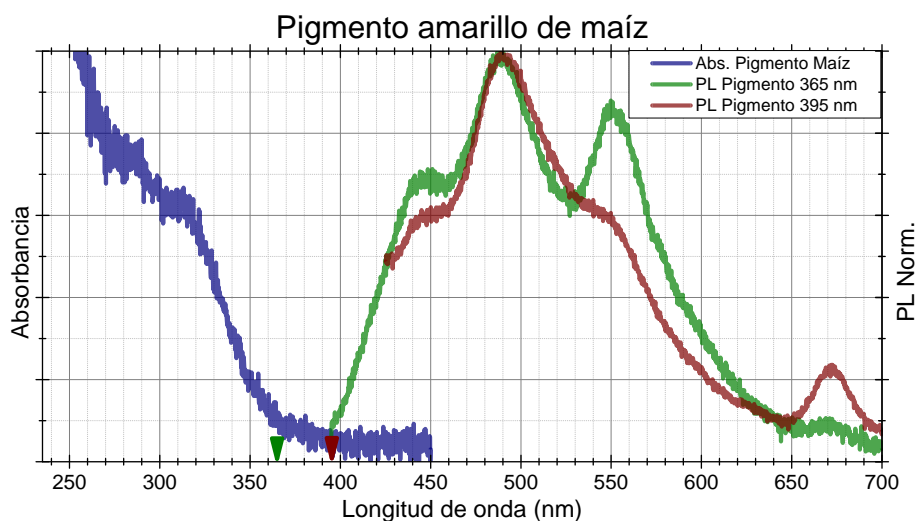


Figura 3.10: Espectros de pigmento amarillo extraído de raíces de *Zea mays*; absorción con lámpara de deuterio, emisión con línea de 365 nm de lámpara de mercurio y con LED a 395 nm.

Respecto al espectro de absorción obtenido, debido a que se realizó este extracto con el método en metanol caliente propuesto por Klingner *et al.*, este debe ser más similar con los espectros presentados por estos autores (véase Figura 3.12). Se puede ver que el espectro de absorción de este extracto tiene bandas de absorción claramente observables alrededor de los 280 y 315 nm, que aparecen tanto en los resultados de Klingner *et al.* como los de Fester *et al.*, que ninguno de estos autores ha asociado con alguna sustancia en específico pero no se ven claramente las bandas de absorción cerca de 375 y 400 nm que ambas publicaciones presentan para extractos de plantas colonizadas por hongos MA. En otras palabras, la absorción de este extracto se asemeja mucho a los espectros que publican Klingner *et al.* para extractos metanólicos de raíces de maíz de control sin micorrización.

Como se puede observar en la Figura 1.19 el máximo de absorción entre 350 y 450 nm observado por Fester *et al.* podría estar asociado principalmente a la micorradicina y la absorción menor a 300

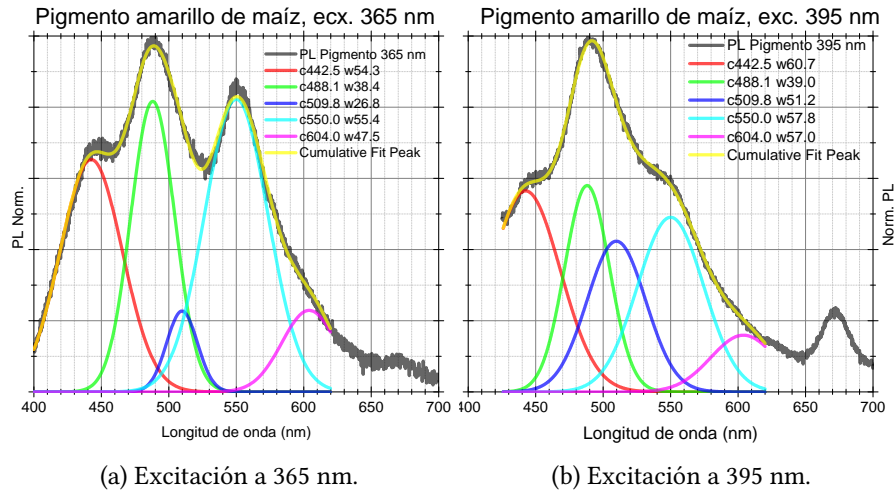


Figura 3.11: Ajuste gaussiano de espectros de fotoluminiscencia del pigmento amarillo de maíz excitado a 365 nm y 395 nm.

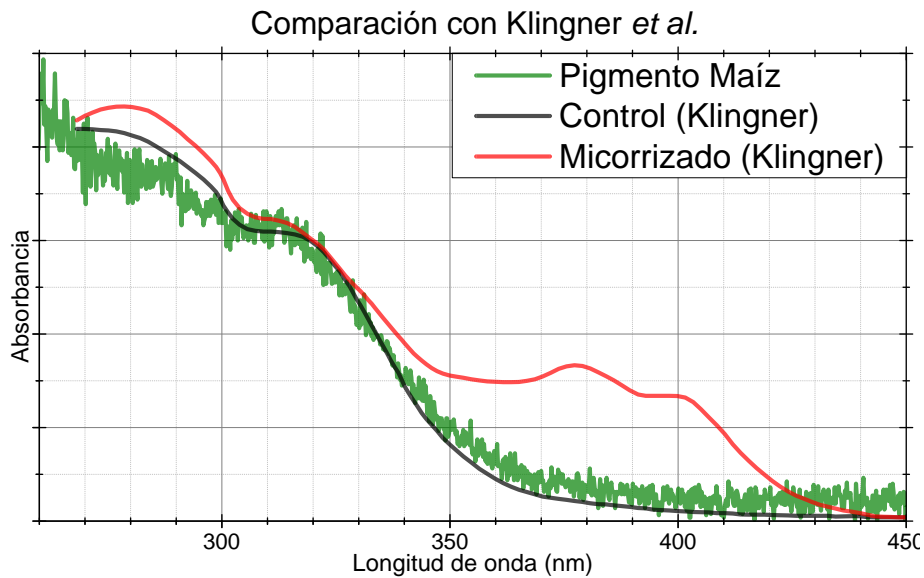


Figura 3.12: Espectro de absorción de pigmento amarillo extraído de raíces de *Zea mays* comparado con los resultados publicados por Klingner *et al.* para el extracto metanólico de raíces de control y micorrizadas.

nm estaría más asociada al blumenol C celobiósido [31]. De modo que es posible que estas muestras de campo tienen niveles de micorrización muy bajos, poseen alguna deficiencia nutricional o

la extracción y manipulación del pigmento amarillo no ha sido la correcta, pues como reportan Klingner *et al.*, el extracto es fotosensible y pierde la absorción a 375 y 395 nm al iluminar con luz blanca aproximadamente por 24 horas [33].

3.3.1.3. Pigmento amarillo de raíces de sorgo

Ya que en muestras de campo hay una gran cantidad de condiciones ambientales que no están bajo nuestro control, y las muestras de campo de raíces de limón y de maíz con las que se trabajó inicialmente son de plantas que no han llevado un control de micorrización ni pasaron por pruebas de evaluación del grado de colonización por hongos MA, para el siguiente experimento se decidió cultivar plantas de sorgo controlando dos condiciones: la presencia del hongo micorrízico y la cantidad de luz solar. Se colocaron dos de estos cultivos bajo pleno sol durante aproximadamente 12 horas diarias, una de estas micorrizada y la otra de control, y se colocaron otras dos bajo la sombra de un árbol. A las 6 semanas de edad se realizaron los extractos en metanol (MeOH) de sus raíces usando el método para extraer el pigmento amarillo descrito en el capítulo de Experimento. En la Figura 3.13 se muestran estos cuatro cultivos previo a la extracción.

En la Figura 3.14 se muestran los resultados obtenidos para la absorción y emisión del extracto metanólico. Se puede observar que ambas condiciones de cantidad de luz solar y de la colonización micorrízica afectan tanto los espectros de absorción como de fotoluminiscencia. Cada una de las cuatro muestras parece poseer espectros formados por las mismas bandas. Entre los espectros de absorción (véase subfigura 3.14a) todas las muestras tienen espectros casi idénticos a partir de los 320 nm, y la variación se encuentra en la banda alrededor de 275 nm, que es bastante mayor para ambas plantas micorrizadas, de mayor a menor absorción en el intervalo de 250 a 320 nm tenemos: 1) Planta colonizada bajo sombra, 2) Planta colonizada bajo sol, 3) Planta de control bajo sol, 4) Planta de control bajo sombra. Esto coincide con el comportamiento del crecimiento relativo de las cuatro muestras como se muestra en la Figura 3.13.

Ambas plantas micorrizadas tienen resultados de absorbancia similares entre sí, y de igual forma ambas plantas de control, por lo que parece que la presencia del hongo micorrízico influye en mayor medida que la cantidad de luz solar que incide en la planta, aún cuando la especie de planta cultivada es conocida por prosperar mejor bajo luz solar directa.

Realizando ajustes en perfiles gaussianos de cada uno de los espectros de absorción (en la Figura 3.15 se muestran al lado izquierdo de Absorción y al lado derecho de Emisión), se encuentra que los cuatro están formados por las mismas bandas de absorción, alrededor de los 221.3, 273.5, 318.4 y 319.9 nm, las primeras tres bandas con ancho (FWHM) entre los 40 y 50 nm. Se muestra el resultado de estos ajustes en la subfigura 3.15a, aquí se puede observar que para los extractos de plantas inoculadas es mayor la banda alrededor de 273.5 nm mientras que la banda a 318.4 nm permanece casi constante.

Aún sabiendo con certeza cuales muestras son inoculadas y cuales de control, los espectros de absorbancia obtenidos para las cuatro muestras son muy similares a las presentadas por Klingner *et al.* en el caso de las plantas de control no micorrizadas [33], sobretodo en el intervalo de 350 nm a 450 nm, pues estas muestras presentan una absorción reducida en este intervalo que es característica



Figura 3.13: Comparación del crecimiento de plantas de sorgo micorrizadas y de control, bajo condiciones de sol o sombra.

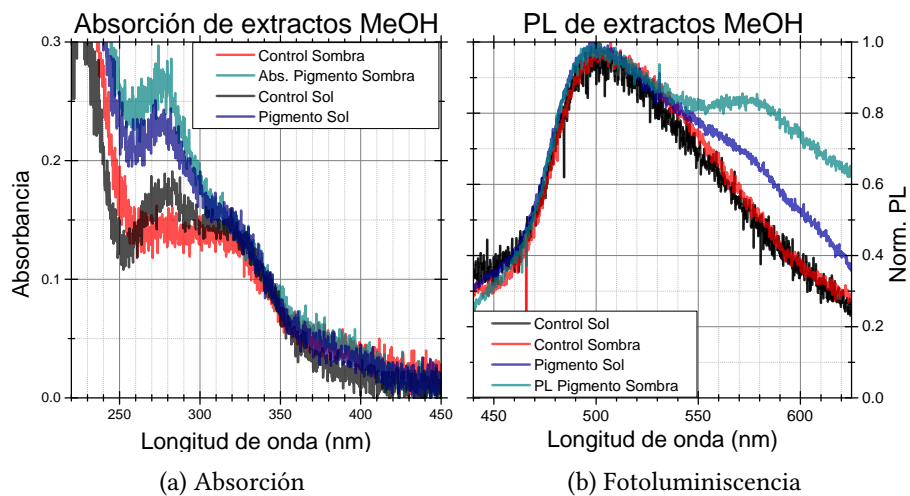


Figura 3.14: Espectros de absorción y fotoluminiscencia de extractos metanólicos de raíces de sorgo en cuatro condiciones distintas: micorrizado bajo sol directo, micorrizado bajo sombra, no micorrizado (control) bajo sol, control bajo sombra.

de los extractos de raíces micorrizadas de maíz. Además, en los resultados presentados por Fester *et al.* no se asocia esta banda de absorción ni a la micorradicina ni al blumenol C celobiósido [31]. En cálculos de estructura electrónica realizados por Abarca y Rudamas, en una investigación paralela a este trabajo, se encuentra una sola banda de absorción asociada a la micorradicina alrededor de 359

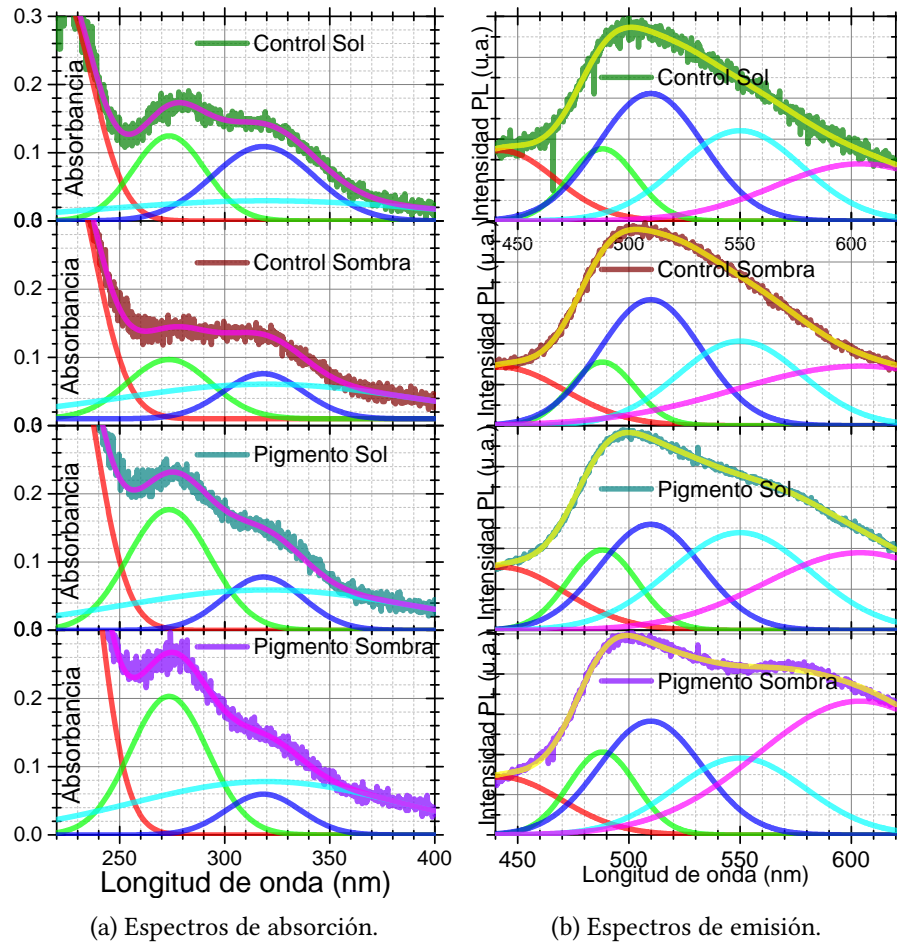


Figura 3.15: Ajustes en perfiles gaussianos de extractos de pigmento amarillo de sorgo.

nm, e igualmente una sola banda de absorción asociada al blumenol C celobiósido alrededor de los 240 nm [41], lo que apoyaría en la interpretación que en estas muestras se tendría principalmente la segunda de estas dos sustancias. Se puede observar, sin embargo, en la figura 1.19 que en el intervalo entre 300 y 350 nm ambas sustancias tienen algo de absorción, y la combinación de la absorción de estas dos sustancias podría explicar la pequeña variación que hemos observado en este experimento para el mismo intervalo. En nuestro caso podría estar influyendo en mayor medida el bumenol C celobiósido, debido a la absorción mayor a longitudes de onda cortas.

En el caso de los espectros de fotoluminiscencia (véase Figura 3.14b), las cuatro muestras presentan emisión con un aparente máximo a 490-500 nm. Las muestras en orden de intensidad a 500 nm son: 1) Planta colonizada bajo sol, 2) Planta colonizada bajo sombra, 3) Planta de control bajo sombra, 4) Planta de control bajo sol. Esto pone en evidencia que la colonización micorrícica

también realza la intensidad de la emisión de fotoluminiscencia de los extractos metanólicos.

Estos espectros han sido normalizados respecto a sus respectivas intensidades de emisión a 500 nm, para observar más fácilmente qué partes del espectro varían con las condiciones de cantidad de luz y de posible micorrización. Se observa que ambos espectros correspondientes a las plantas de control son idénticos en forma, lo que además revela que la inoculación realza la emisión a partir de los 545 nm, sobretodo para la planta inoculada bajo sombra.

De igual manera que con los espectros de absorción, a estos espectros de fotoluminiscencia se les realizó un ajuste en perfiles gaussianos, y se encontró que los cuatro espectros se pudieron resolver utilizando bandas de emisión centradas a las mismas longitudes de onda que se encontraron para los extractos de raíces de limón y de maíz: alrededor de 442.5, 488.1, 509.8, 550 y 604 nm, las primeras cuatro bandas con anchos entre los 40 y 60 nm. Estos resultados se muestran en la subfigura 3.15b. Aquí se puede observar que la parte del espectro de emisión que está cambiando se debe al aumento de intensidad en las bandas de emisión centradas cerca de 550 y 604 nm, mientras que las tres bandas de emisión a longitudes de onda más cortas permanecen casi constantes entre muestras de control e inoculadas. Este resultado interesante muestra que aunque a simple vista los espectros de emisión no son muy similares, estos siempre estarían formados por las transiciones energéticas de una misma sustancia o varias sustancias, las diferencias en la intensidad de cada una de las bandas de emisión se puede deber posiblemente a diferentes proporciones en las concentraciones de varias sustancias solubles en alcohol, en especial considerando que las bandas de emisión asociadas a la clorofila son más intensas para los extractos de raíces de sorgo, seguido por los de raíces de maíz, y son prácticamente inexistentes en el caso de raíces de limón.

Comparando con los resultados reportados por Klingner *et al.* [33], aún cuando no es evidente una banda centrada a 533 nm como lo reportan estos autores, se observa que la diferencia entre extractos para raíces de control y micorrizadas comienza muy cerca de este valor, y posiblemente estos autores observaron una diferente combinación las mismas bandas de emisión encontradas en este trabajo.

3.3.1.4. Comparación con micro-PL de raíces

Comparando los espectros de esta sección, de extractos de pigmento amarillo, contra los obtenidos en la sección de micro-PL de raíces, puede decirse que la única banda de emisión importante encontrada para los segmentos de raíz, centrada alrededor de 515.5 nm, se encuentra muy cercana a una de las bandas de emisión de los extractos de pigmento amarillo, alrededor de 509.8 nm, es decir que hay un desplazamiento de tan solo 5.7 nm entre estas. Sin realizar extracciones adicionales para separar el extracto metanólico en sus componentes, no se puede determinar aún si las demás bandas de emisión se deben a otras sustancias de la planta o el hongo. Por otro lado, ya que en los espectros de micro-PL hay influencia de por lo menos tres líneas de emisión de la lámpara de mercurio, una de estas muy cerca a los 550 nm, hay fuertes dudas de si se puede asociar la emisión adicional cerca de estas longitudes de onda a alguna emisión de pigmento amarillo en las raíces, como se ha visto que esta banda de emisión varía fuertemente en intensidad cuando la planta ha sido inoculada o no. Es recomendable repetir un experimento de micro-PL de raíces micorrizadas

empleando una fuente de excitación monocromática.

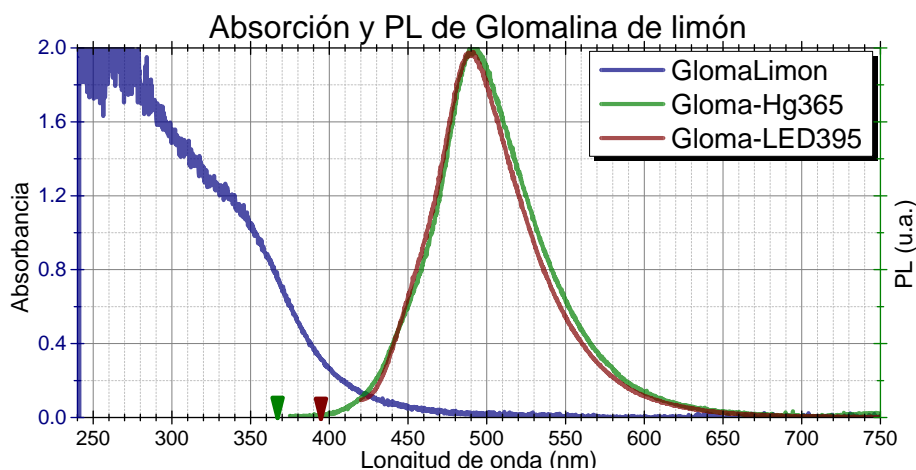
3.3.2. Protocolo de Driver *et al.* (glomalina)

Con algunas de las raíces con las que se ha trabajado en el apartado de extractos metanólicos (limón y sorgo), y del sustrato de sorgo, se realizaron extracciones siguiendo el protocolo de extracción de proteínas propuesto por Driver, Holben y Rillig [38]. También se realizaron extracciones para sustrato de sorgo cultivado en condiciones controladas. De estas muestras se tomaron espectros de absorción y de fotoluminiscencia.

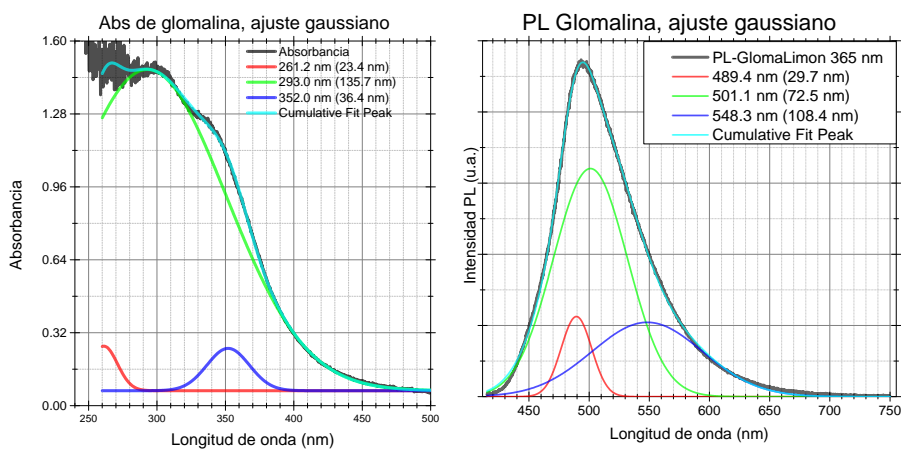
3.3.2.1. Raíces de limón

En la Figura 3.16 se muestran los espectros de absorción y de fotoluminiscencia del extracto de glomalina para raíces de *Citrus × limon* usando el método de Driver *et al.*. En el espectro de absorción de la subfigura 3.16a se pueden apreciar bandas de absorción aproximadamente a 300 y 350 nm y los espectros de fotoluminiscencia no presentan cambios muy evidentes al excitar a 365 nm o 395 nm, con un mismo máximo aparente cerca de los 490 nm. Con el ajuste por perfiles gaussianos se encuentra que el espectro de absorción realmente está formado por una banda principal centrada a 293 nm con una banda secundaria a 352 nm, y en el caso de los espectros de fotoluminiscencia se encuentra que las principales bandas de emisión se encuentran alrededor de a 501 y 548 nm (subfigura 3.16c).

Esta muestra de raíces de limón es una muestra de campo en la que no se tiene un control ni se ha evaluado el nivel de colonización por hongos micorrícicos, simplemente se ha asumido que es una planta micorrizada, por el hecho de habitar en un suelo rico en materia orgánica de un país de tropical, donde naturalmente son más abundantes los hongos MA. Los datos tomados por A. Pérez de extractos de glomalina de raíces de varias plantas [23] son similares al extracto de raíces de limón que se presenta en este trabajo, en el sentido que en muestras de campo siempre se ha asumido que las raíces o sustratos recolectados tienen un grado considerable de colonización micorrícica o de esporulación del hongo.



(a) Absorción vs. fotoluminiscencia.



(b) Ajuste gaussiano de absorción.

(c) Ajuste gaussiano de fotoluminiscencia.

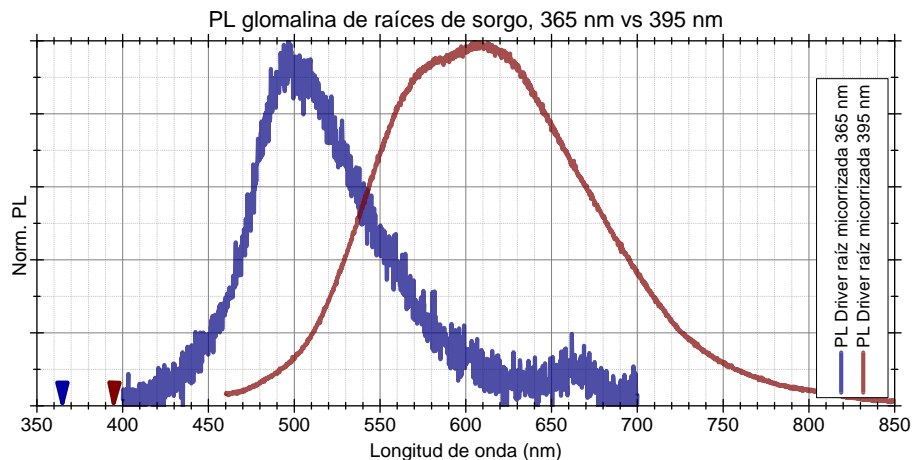
Figura 3.16: Espectros de absorción y fotoluminiscencia de glomalina extraída de raíces de *Citrus × limon*.

3.3.2.2. Raíces de sorgo

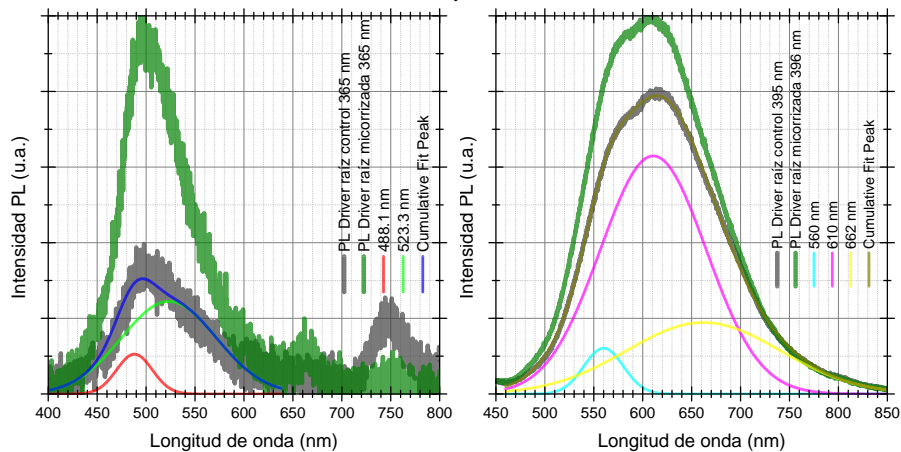
Como un paso adicional en este trabajo, para tener un mejor control sobre como influye la presencia o ausencia del hongo MA en los espectros de absorción y fotoluminiscencia de los extractos, con las mismas raíces de sorgo cultivadas controlando las condiciones de sol/sombra y control/inoculadas también se realizaron extracciones de glomalina por el protocolo de Driver *et al.* [38].

Los resultados para los espectros de fotoluminiscencia de estas muestras se ilustran en la Figura 3.17. Al excitar con la línea alrededor de 365 nm de la lámpara de mercurio se dieron emisiones de

baja intensidad con aparentes máximos alrededor de 500 nm muy similar al espectro observado en las muestras de glomalina de limón, así como de esporas y micelio (véase subfigura 3.17b). Por otro lado, al excitar con el LED de 395 nm se produjo una fotoluminiscencia notablemente más intensa y con una emisión completamente distinta (véase subfigura 3.17c), presentando por lo menos dos aparentes bandas de emisión cerca de 570 y 610 nm, cuya comparación se muestra en la figura 3.17a. Realizando un ajuste en perfiles gaussianos de esta espectro se encuentra que tiene dos bandas importantes centradas a 560 y 610 nm, bandas desplazadas hasta 5 nm respecto a dos de las encontradas para la emisión de esporas y micelio.



(a) Comparación de la fotoluminiscencia de glomalina de raíces de sorgo por método de Driver, excitando alrededor de 365 nm y a 365 nm.



(b) Excitando con 365 nm, misma escala. (c) Excitando con 395 nm, misma escala.

Figura 3.17: Comparación de espectros de fotoluminiscencia de extractos de raíces de sorgo por el método de Driver, tanto en raíces de plantas de control así como micorrizadas.

Es muy importante enfatizar que para las dos longitudes de onda con las que se excitaron las muestras de glomalina de raíces, se obtuvieron espectros de emisión casi idénticos entre las plantas de control y micorrizadas. Esto podría significar que con el protocolo de Driver *et al.* también se están extrayendo proteínas u otras sustancias de la raíz que fluorescen y que están presentes en la planta independientemente de la presencia del hongo MA. Además hay que considerar la naturaleza del sustrato donde fueron cultivadas las plantas de sorgo, que fue un sustrato de piedras de origen volcánico, porosas y con muy poca materia orgánica, y durante el crecimiento de estas plantas únicamente se les agregó agua. Así que es posible que hayan hecho falta algunas sustancias propias de un suelo rico en materia orgánica para nutrir el hongo y la planta y se formara más glomalina. La corta duración del experimento también puede influir en que la glomalina apenas comenzaba a ser producida por el hongo.

3.3.2.3. Sustrato de sorgo

Se realizó el proceso de extracción de glomalina propuesto por Driver *et al.* en el sustrato de las mismas raíces de sorgo. En este caso se produjo fotoluminiscencia de muy baja intensidad, por lo que se esperaría observar el efecto de una aparente banda cerca de 490 nm, y de hecho al excitar en ambas longitudes de onda se produjeron espectros casi idénticos (véase Figura 3.18), y de mayor intensidad el excitado con el LED a 395 nm. Igual que lo observado en el caso de los extractos de raíces, para los extractos de sustrato la forma de los espectros no cambia entre muestras micorrizadas y controles no micorrizados, pero en este caso no se observa el mismo desplazamiento a mayores longitudes de onda al excitar con el LED a 395 nm. Por ajustes en perfiles gaussianos de estos espectros se encontraron bandas de emisión centradas alrededor de 433.5, 488.1, 517.4, y 577.5 nm. De estas, únicamente las dos a longitudes de onda más largas son comparables con la emisión del extracto de raíces así como de la emisión del hongo. La banda a 433.5 nm no fue posible verificar si está presente en la emisión del hongo MA debido a la transmitancia del juego de filtros de epifluorescencia.

Es necesario considerar en qué momento es en el que se produce la glomalina. Hay reportes que la glomalina es depositada en el suelo cuando las hifas ya tienen cierta edad y han dejado de aportar nutrientes a la planta [42, 43], por lo tanto para que hayan cantidades importantes de glomalina en un sustrato deben pasar probablemente varios meses desde el establecimiento de la simbiosis MA. Debido a que el sustrato empleado en este experimento prácticamente no ha sido vegetado anteriormente, este no presentaría cantidades apreciables de materia orgánica y por esto no se estarían extrayendo cantidades importantes de glomalina, mientras que en una muestra de campo con antecedentes de cultivos se estarían extrayendo cantidades de glomalina que corresponden a décadas de que esta se esté acumulando en el suelo.

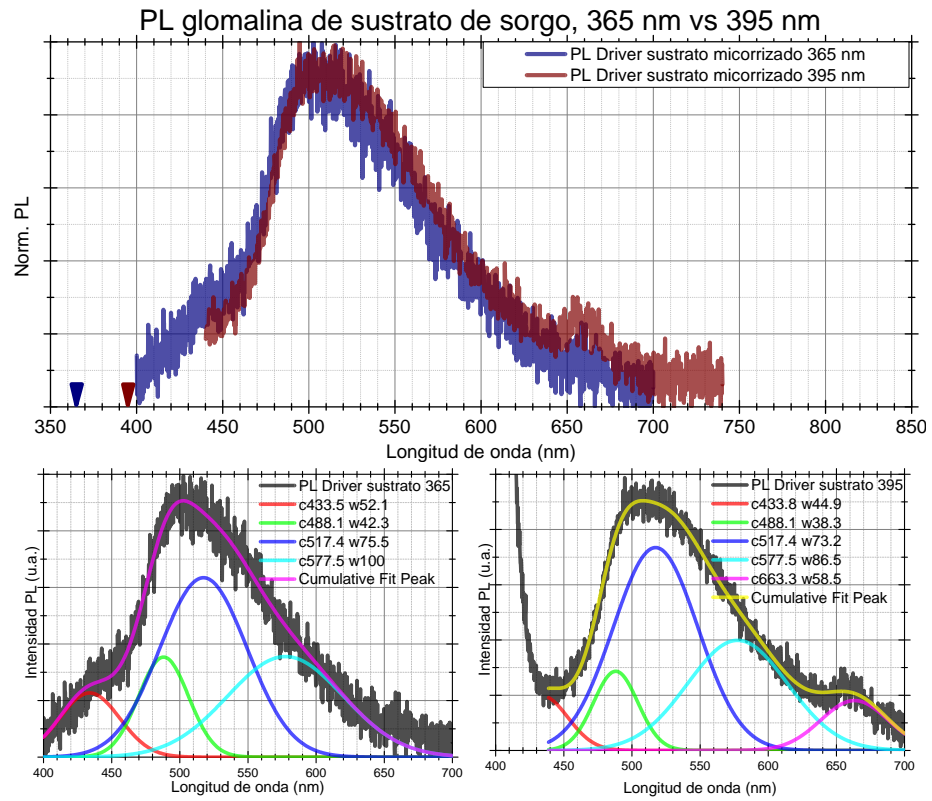


Figura 3.18: Comparación de la fotoluminiscencia de glomalina de sustrato de sorgo por método de Driver, excitando alrededor de 365 nm y a 395 nm.

3.4. Extractos de otras fuentes

3.4.1. Quitina de artrópodos

Se tomaron con pinzas algunas de las hojuelas extraídas de cascarones de crustáceos y fueron excitadas tanto con la línea de emisión alrededor de 365 nm de la lámpara de vapor de mercurio como con el LED a 395 nm para captar sus espectros de fotoluminiscencia. Para la captura de espectros de absorción, estas hojuelas resultaron ser muy opacas, por lo que se diluyeron en ácido fosfórico (H_3PO_4) y se tomó como referencia la luz de una lámpara de deuterio que este ácido en una cubeta deja pasar. Los espectros resultantes de fotoluminiscencia y de absorción se muestran en la Figura 3.19). El espectro de absorción resultante es una sola banda centrada

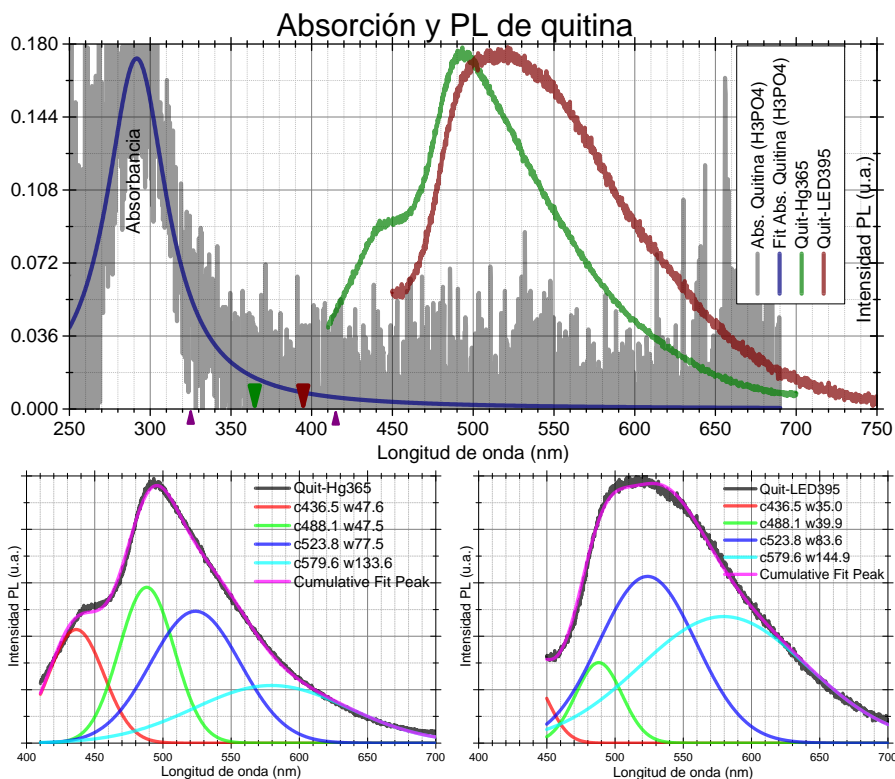


Figura 3.19: Espectros de fotoluminiscencia de quitina extraída de cascarones de crustáceos. En verde el espectro de emisión obtenido al excitar con la línea a 365 nm de una lámpara de vapor de mercurio, y en ocre la emisión al excitar con un LED con máximo a 395 nm.

a 291.7 nm con un ancho de 47.0 nm. Este resultado ha sido confirmado por Abarca y Rudamas [41] en una investigación paralela a este trabajo, en la cual se han realizado cálculos de estructura electrónica para la absorción de algunas sustancias, una de estas es la quitina, encontrando una banda de absorción idéntica a este dato experimental. Para la fotoluminiscencia se puede ver que

excitando a 365 nm hay un máximo cerca de 490 nm con una banda alrededor de 440 nm, este espectro de emisión resulta muy similar al obtenido del extracto de pigmento amarillo de raíces de limón. Para la emisión al excitar a 395 nm el espectro de emisión cambia apreciablemente, la máxima intensidad del espectro está ahora más cerca de 520 nm además de verse más ensanchado, y también disminuye la intensidad de la aparente banda cerca de 450 nm.

Al resolver estos espectros de emisión en perfiles gaussianos se encuentra que a pesar de ser aparentemente diferentes, estos están formados por las mismas bandas de emisión, centradas alrededor de 436.5, 488.1, 523.8 y 579.6 nm. En el espectro obtenido al excitar con 365 nm es más notorio el efecto del equipo de mostrar una aparente banda cerca de 490 nm, y considerando esto en el ajuste, el verdadero máximo de emisión sería el de 523 nm, y en el caso de la excitación a 495 nm, la combinación de esta banda a 523 nm junto con la banda a 579 nm combinadas dan este efecto de una banda de emisión ancha.

La emisión observada en muestras de quitina fue de intensidad baja comparada con la de otros extractos, requiriendo varios segundos para capturar espectros con una buena relación señal a ruido, sin embargo las bandas de emisión encontradas por el ajuste en perfiles gaussianos resultan a longitudes de onda muy cercanas a las encontradas a 530 y 565 nm en esporas y micelio, por lo que esta sustancia podría tener algún papel en la emisión de estas estructuras.

Se desconoce el grado de pureza que puedan tener estas muestras, y para determinar si la quitina puede tener un papel importante en la emisión es necesario realizar pruebas de pureza en las muestras obtenidas, o adquirir muestras con pureza conocida. Adicionalmente, no se conoce la abundancia relativa de la quitina en esta especie de hongo MA, pero al encontrarse en la pared celular, que tiene un espesor de hasta 10 μm [44], la radiación incidente fácilmente puede alcanzar todo el volumen de la pared celular. El hecho de que el espectro de emisión de la quitina varíe notablemente entre las dos longitudes de onda de excitación utilizadas se asemeja a lo observado por A. Pérez en esporas de *glomus caledonium* [23] excitando a cinco longitudes de onda distintas, entre las cuales figuran las dos empleadas en este trabajo, por esto puede ser posible que la quitina tenga algún papel en la emisión de los hongos MA.

3.4.2. Glucanos de levadura

En los glucanos extraídos de levaduras no se observó fluorescencia, y en la literatura consultada no se han encontrado reportes sobre la fluorescencia de esta sustancia. Ya que los glucanos forman alrededor de la mitad del peso de la pared celular de los hongos, es posible que la mayor influencia en la fotoluminiscencia sea por la parte proteínica del hongo, o por sustancias que se encuentran en menor cantidad pero sean emisores más potentes. También es de importancia realizar extracciones de glucanos de otras fuentes y con otros métodos para asegurarse de si presentan o no fotoluminiscencia.

Capítulo 4

Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

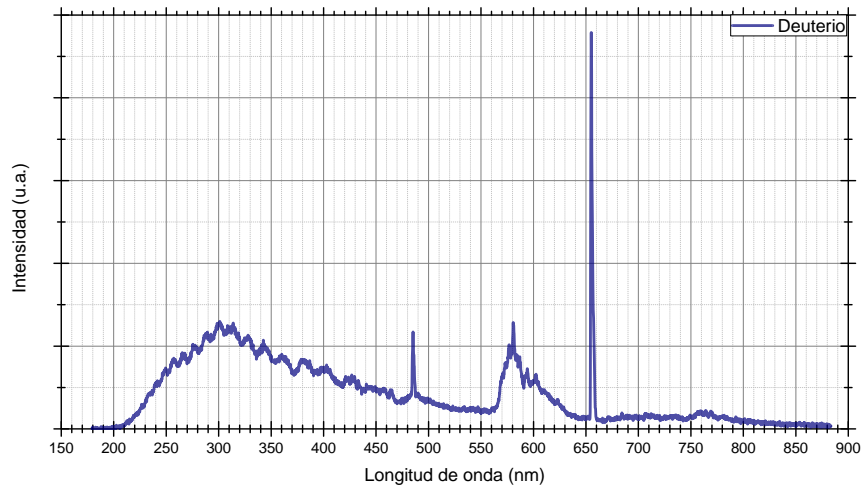
1. Entre esporas y micelio de *Glomus mosseae* se ha encontrado que ambas partes del hongo tienen una emisión en micro-PL casi idéntica, y formada por las mismas bandas de emisión alrededor de 530.2, 565.7, 613.7 y 671.4 nm.
2. El pigmento amarillo, a pesar de no ser una sustancia que juega un papel en la emisión del hongo MA, podría servir como un indicador de niveles de colonización MA por métodos ópticos, ya que bandas específicas de los espectros de absorción (273.5 nm) y de fotoluminiscencia (604 nm) varían notablemente con la presencia de la colonización.
3. Los extractos de glomalina, en las condiciones controladas en este trabajo, no muestran diferencias importantes en sus espectros para plantas micorrizadas y de control, pero esto podría verse influido por la calidad del sustrato, la edad de la planta y otras condiciones del cultivo.
4. Las muestras de quitina preparadas en este trabajo presentaron una emisión poco intensa, pero algunas de sus propiedades indican que pueden tener un papel en la emisión de la pared celular de hongos MA.

4.2. Recomendaciones

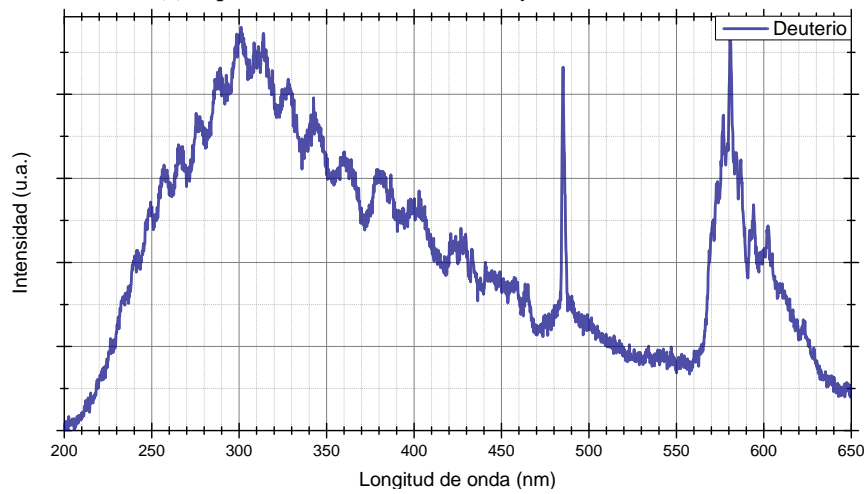
1. Cultivar plantas con control de una mayor cantidad de condiciones ambientales como por ejemplo: salinidad, pH y cantidad de materia orgánica en el suelo, temperatura ambiente, niveles de contaminantes como metales, el uso de soluciones nutritivas para el crecimiento de la planta, diferentes tipos de sustrato y diferentes especies de hongos y plantas. demás realizar estudios en función de la edad de la planta.

2. Auxiliarse de métodos de separación más selectivos en la preparación de extractos, como puede ser la cromatografía HPLC o TLC, electroforesis, etc.
3. Auxiliarse de métodos de aclarado y tinción para determinar el grado de colonización y para identificar las estructuras observadas en raíces.
4. Correlacionar las concentraciones de los diferentes extractos líquidos mediante su absorban-
cia con varios parámetros que indican el grado de colonización micorrícica como: cantidad
de esporas o materia fúngica en su sustrato, porcentaje de longitud de raíces colonizadas.
5. Auxiliarse de otros métodos espectroscópicos como espectroscopia infrarroja (Raman, FTIR)
para tomar espectros patrones de los diferentes extractos, y posteriormente usarlos para su
detección en muestras de campo.

Anexos

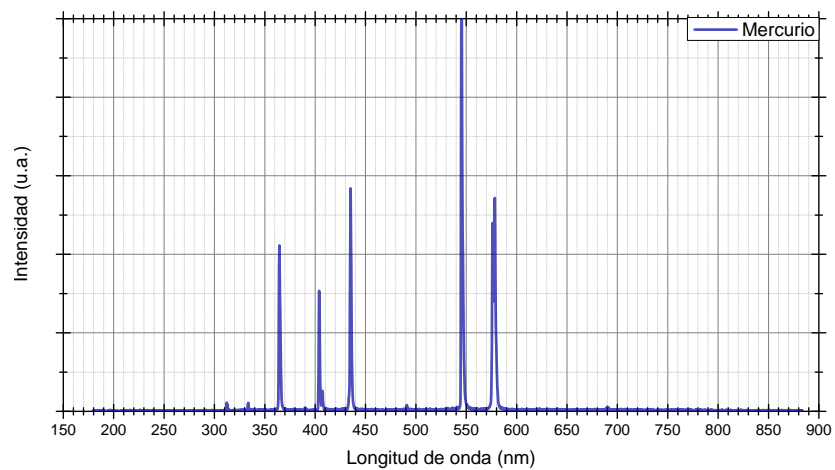


(a) Espectro de emisión continuo y líneas de Balmer.

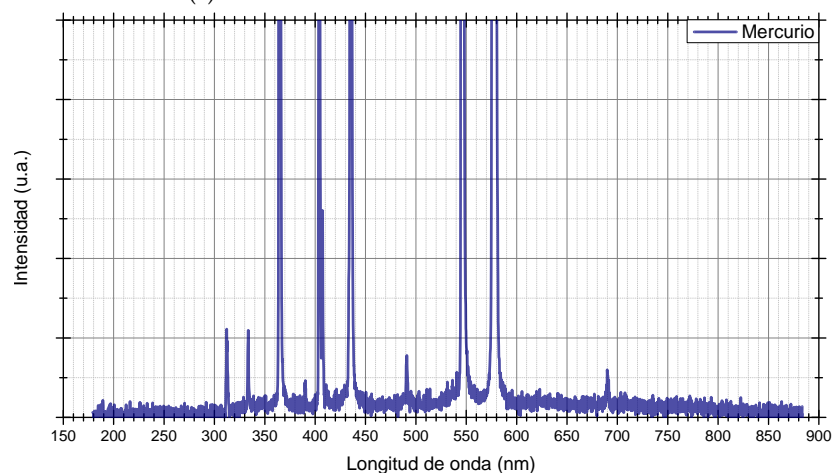


(b) Detalle de la parte continua del espectro de emisión.

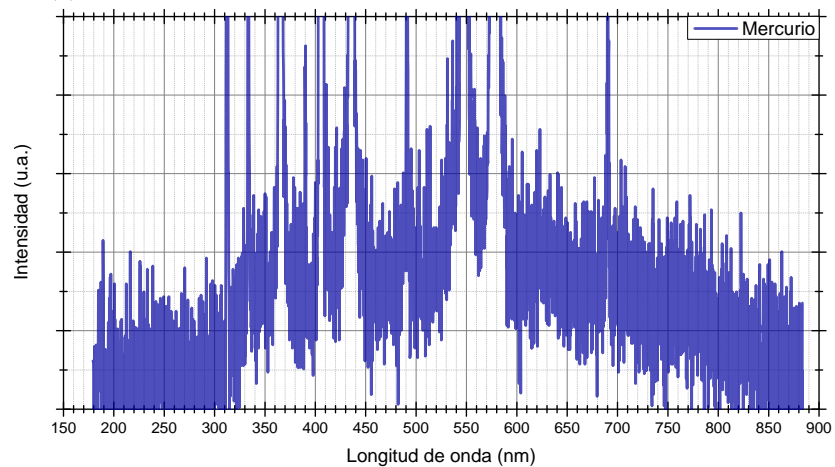
Figura 1: Espectro de emisión para la lámpara de arco de Deuterio.



(a) Líneas de emisión atómica más intensas.



(b) Líneas de emisión atómica menos intensas, escala 10 veces menor.



(c) Continuo de emisión, escala 100 veces menor a la original.

Figura 2: Espectro de emisión de la lámpara de vapor de Mercurio.

Tabla 1: Líneas más intensas del Mercurio. De [45].

Intensidad (u.a.)	Longitud de onda (nm)	Estado de oxidación
400	205.2828	Hg II
400	226.2223	Hg II
1000	253.6517	Hg I
400	284.7675	Hg II
250	296.7280	Hg I
600	365.0153	Hg I
1000	398.3931	Hg II
400	404.6563	Hg I
100	434.7494	Hg I
1000	435.8328	Hg I
500	546.0735	Hg I
200	567.7105	Hg II
250	614.9475	Hg II
250	794.4555	Hg II
200	1013.976	Hg I

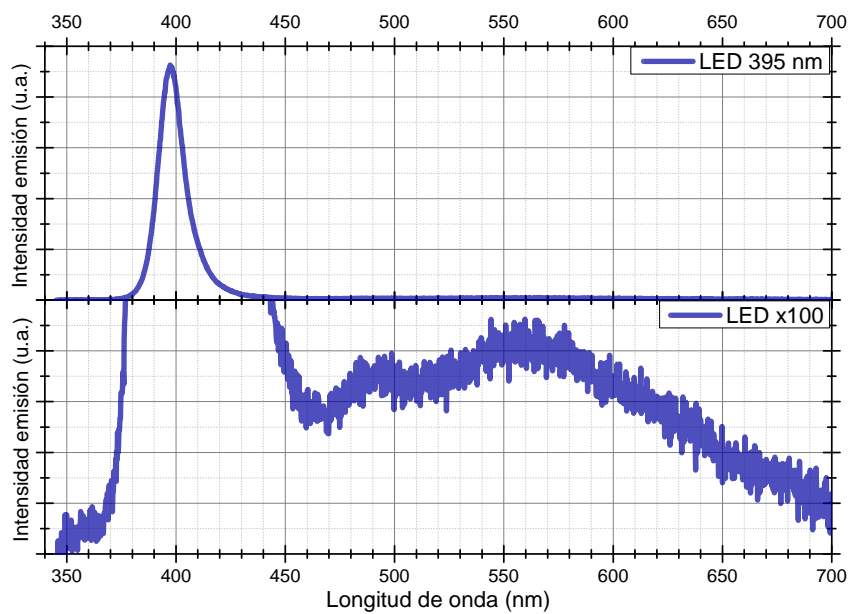


Figura 3: Espectro de emisión de LED violeta acoplado al espectrógrafo de fotoluminiscencia.

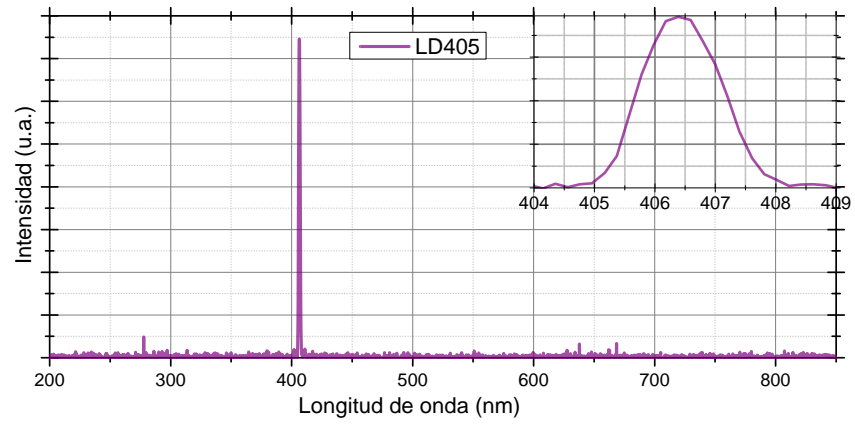


Figura 4: Espectro de emisión de puntero láser violeta a 45 nm.

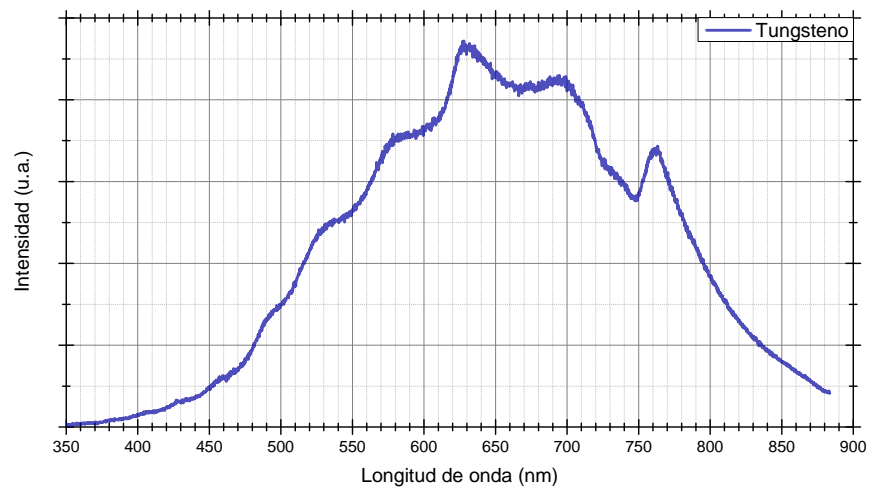


Figura 5: Espectro de emisión de lámpara halógena de Tungsteno.

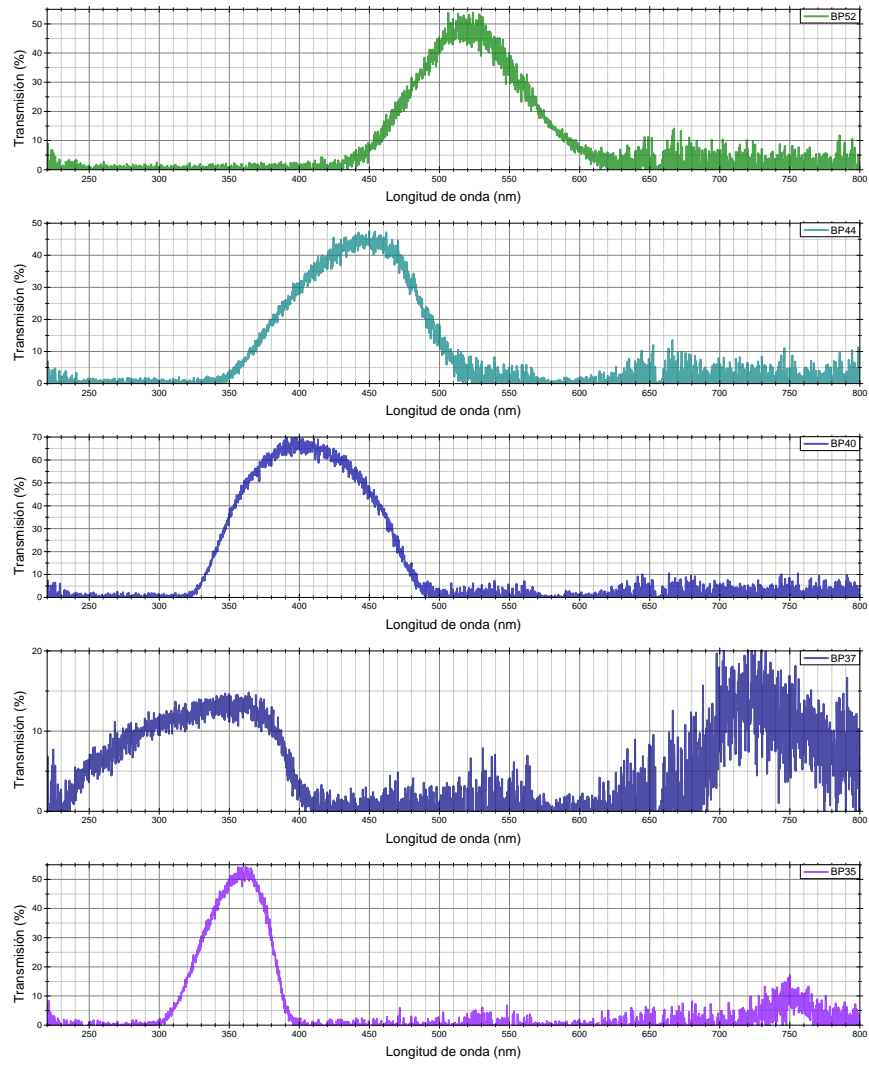


Figura 6: Espectros de transmisión de filtros pasa banda.

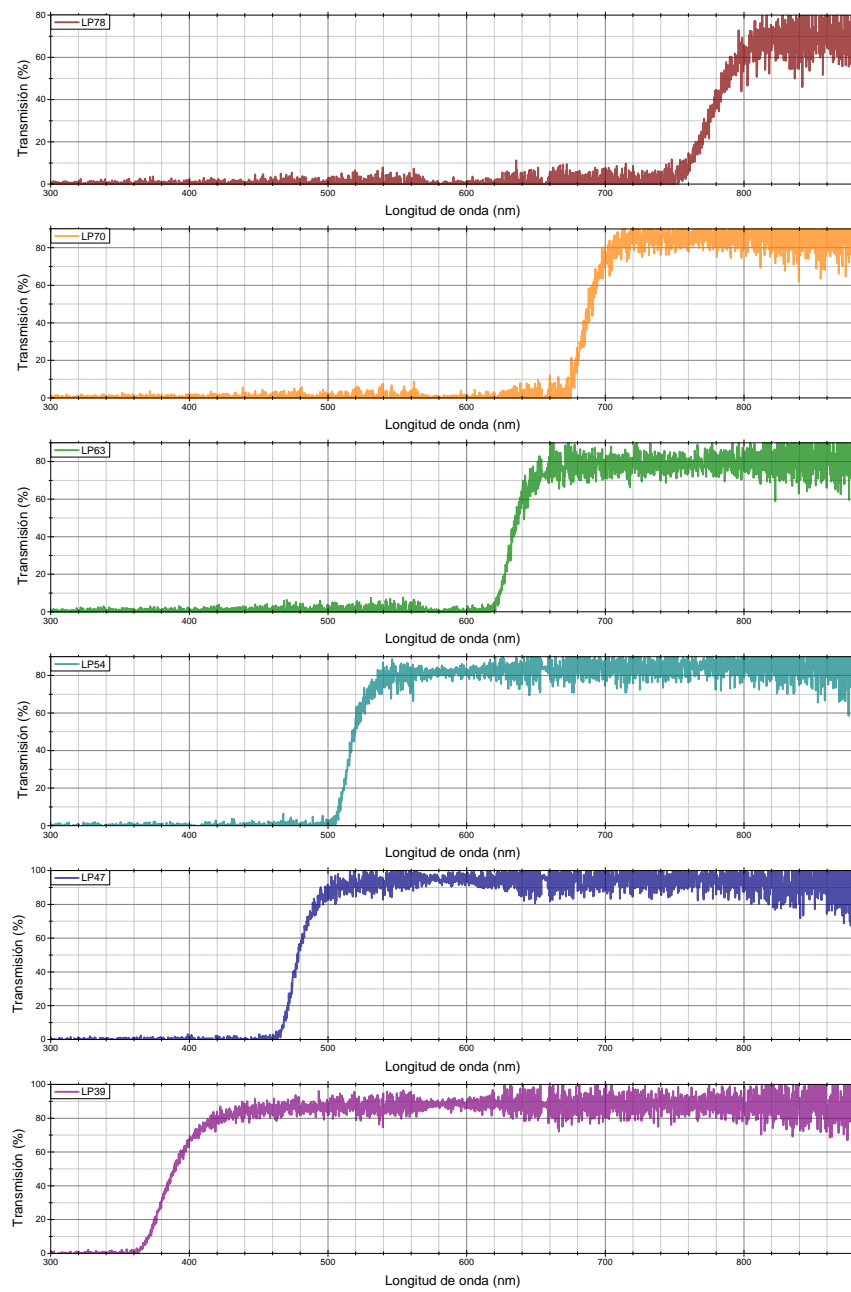


Figura 7: Espectros de transmisión de filtros de paso largo.

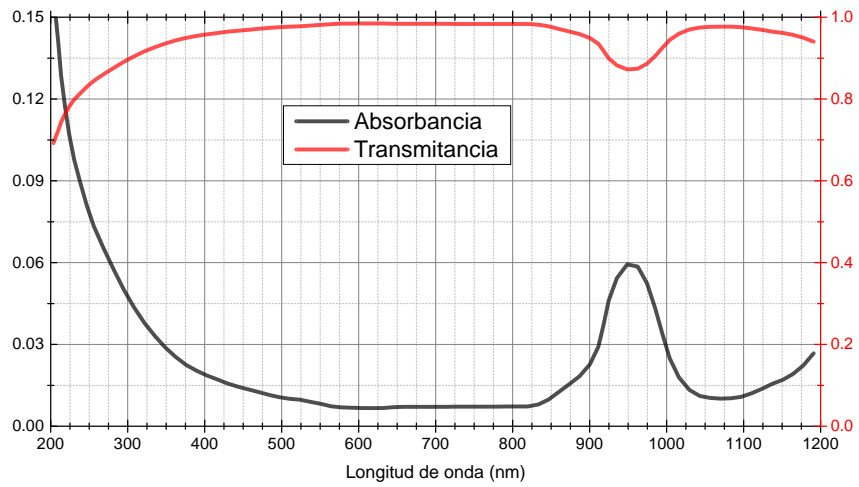


Figura 8: Atenuación de las fibras ópticas QP200-2-UV-VIS y QP400-2-UV-VIS.

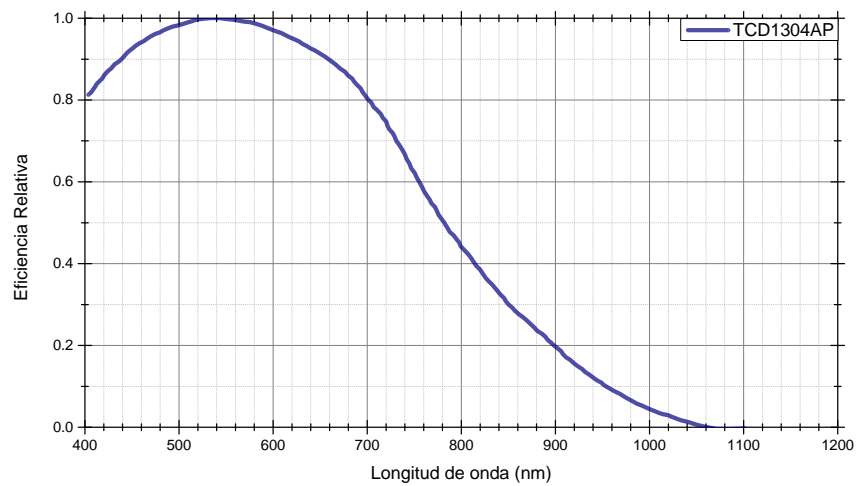


Figura 9: Eficiencia del detector Toshiba TCD1304AP.

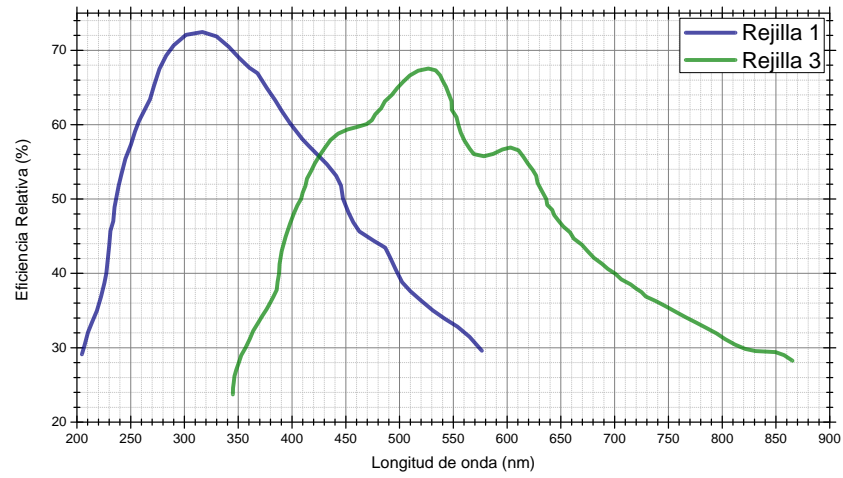


Figura 10: Eficiencia de las rejillas de difracción de los espectrógrafos.

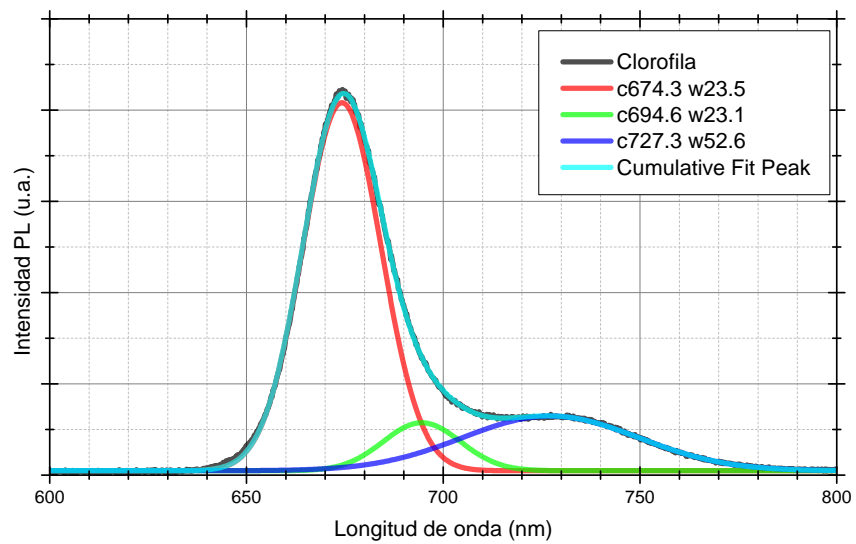


Figura 11: Espectro de emisión de extracto de clorofila en acetona.

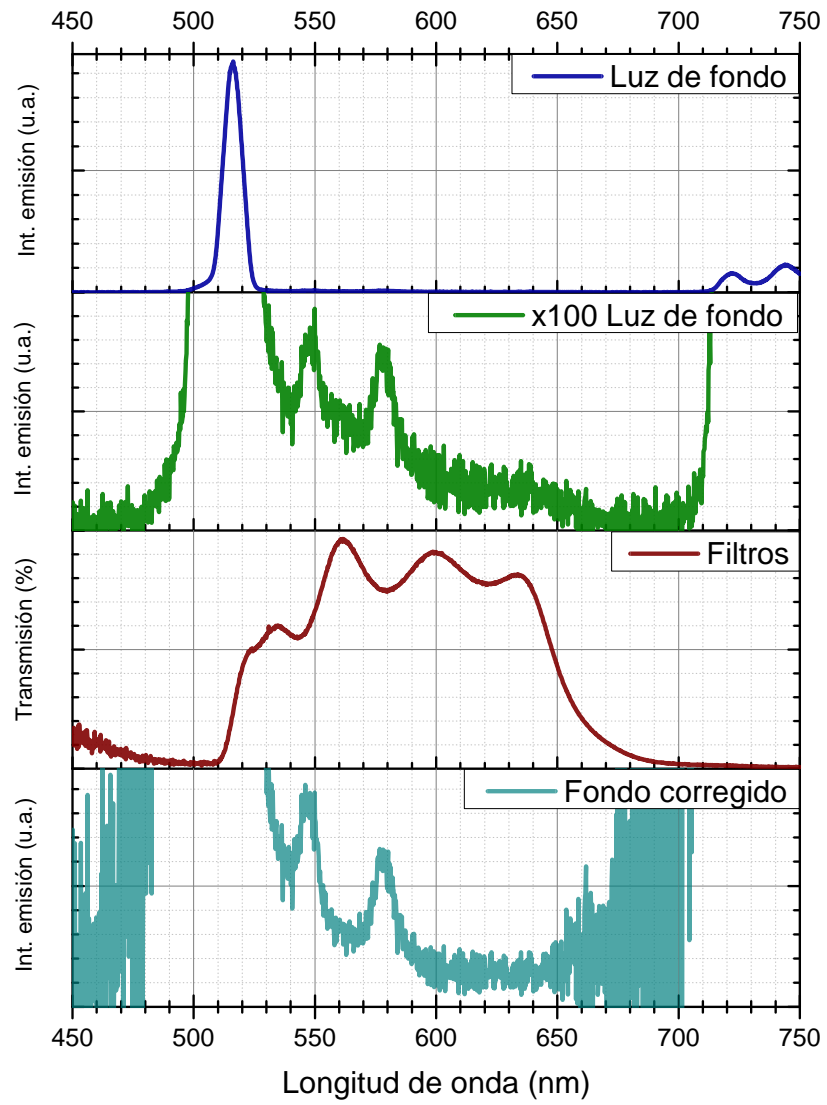


Figura 12: Correcciones realizadas a luz de fondo para el microscopio de epifluorescencia.

Bibliografía

1. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. *Costa Rica y la FAO hacen llamado para proteger el suelo*. En línea. Dic. de 2014. <<http://www.fao.org/americas/noticias/ver/es/c/230458/>>.
2. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. *Expertos de Centroamérica y el Caribe acuerdan estrategias para frenar degradación de las tierras*. En línea. Dic. de 2014. <<http://www.fao.org/americas/noticias/ver/es/c/230337/>>.
3. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. *Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe*. En línea. Dic. de 2014. <<http://www.fao.org/americas/perspectivas/ganaderia/es/>>.
4. Dreyer, B. La investigación de las micorrizas en El Salvador: una inversión para el desarrollo de la agricultura. *El Salvador Ciencia y Tecnología* **12**, 15-22 (2007).
5. Bonfante, P. Plants, mycorrhizal fungi and endobacteria: a dialog among cells and genomes. *Biol. Bull.* **204**, 215-220 (2003).
6. Guzmán González, S y Farías Larios, J. Biología y regulación molecular de la micorriza arbuscular. *Avances en Investigación Agropecuaria* **9**, 17-31 (2005).
7. Wright, S. F. y Upadhyaya, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **198**, 97-107 (1998).
8. González Chávez, M. C. A., Gutiérrez Castorena, M. C. y Wright, S. Hongos micorrícicos arbusculares en la agregación del suelo y su estabilidad. *Terra Latinoamericana* **22**, 507-514 (2004).
9. Rillig, M. C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Can. J. Soil Sci.* **84**, 355-363 (2004).
10. Smith, S. E. y Read, D. J. *Mycorrhizal Symbiosis* 3.^a ed. ISBN: 9780123705266 (Elsevier, 2008).
11. Bowman, S. M. y Free, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* **28**, 799-808 (2006).

12. Balestrini, R y Bonfante, P. The interface compartment in arbuscular mycorrhizae: A special type of plant cell wall? *Plant Biosystems* **139**, 8-15 (2005).
13. Demtröder, W. *Atoms, Molecules and Photons: An Introduction to Atomic-, Molecular-, and Quantum-Physics*. 571. ISBN: 978-3-540-20631-6 (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006).
14. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3.^a ed., 954. ISBN: 978-0387-31278-1 (Springer, New York, 2006).
15. Tkachenko, N. V. *Optical Spectroscopy: Methods and Instruments*. 307. ISBN: 978-0444521262 (Elsevier, Radarweg, Netherlands, 2006).
16. Atkins, P. y de Paula, J. *Physical Chemistry*. 8.^a ed., 1064. ISBN: 9780198700722 (Oxford University Press, New York, 2006).
17. Gange, A. C., Bower, E. y Stagg, P. G. A comparison of visualization techniques for recording arbuscular mycorrhizal colonization. *New Phytol.* **142**, 123-132 (1999).
18. Vierheilig, H. y col. Imaging arbuscular mycorrhizal structures in living roots of *Nicotiana tabacum* by light, epifluorescence, and confocal laser scanning microscopy. *Can. J. Bot.* **79**, 231-237 (2001).
19. Vierheilig, H., Schweiger, P. y Brundrett, M. An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiologia Plantarum* **125**, 393-404 (2005).
20. Ames, R. N., Ingham, E. R. y Reid, C. P. P. Ultraviolet-induced autofluorescence of arbuscular mycorrhizal root infections: an alternative to clearing and staining methods for assessing infections. *Can. J. Microbiol.* **28**, 351-355 (1982).
21. Dreyer, B., Morte, A., Pérez-Gilabert, M. y Honrubia, M. Autofluorescence detection of arbuscular mycorrhizal fungal structures in palm roots: an underestimated experimental method. *Mycol. Res.* **110**, 887-897 (2006).
22. Sejalón-delmas, N., Magnier, A., Douds, D. D. y Becard, G. Cytoplasmic autofluorescence of an arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora gigantea* and nondestructive fungal observations in planta. *Mycologia* **90**, 921-926 (1998).
23. Pérez, E. A. *Cáriterización óptica de micorrizas arbusculares*. Tesis de lic. (Universidad de El Salvador, dic. de 2013).
24. Singh, S. Fungal chitin and its use for estimation of mycorrhizal infection. *Mycorrhiza News* **17**, 2-9 (2005).
25. Jabaji-Hare, S. H., Perumalla, C. J. y Kendrick, W. B. Autofluorescence of vesicles, arbuscules, and intercellular hyphae of a vesicular-arbuscular fungus in leek (*Allium porrum*) roots. *Can. J. Bot.* **62**, 2665-2669 (1984).
26. Wright, S. F., Franke-Snyder, M., Morton, J. B. y Upadhyaya, A. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant and Soil* **181**, 193-203 (1996).

27. Wright, S. F. y Upadhyaya, A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science* **161**, 575-586 (1996).
28. Gadkar, V. y Rillig, M. C. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *FEMS Microbiol. Lett.* **263**, 93-101 (2006).
29. Gillespie, A. W. y col. Glomalin-related soil protein contains non-mycorrhizal-related heat-stable proteins, lipids and humic materials. *Soil Biol. Biochem.* **43**, 766-777 (2011).
30. Wang, Q. y col. Spatial variations in concentration, compositions of glomalin related soil protein in poplar plantations in northeastern China, and possible relations with soil physico-chemical properties. *The Scientific World Journal* **2014**, 160403 (2014).
31. Fester, T. y col. Occurrence and localization of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal plant roots. *Plant Cell Physiol.* **43**, 256-265 (2002).
32. Becker, W. N. y Gerdemann, J. W. Colorimetric Quantification of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Infection in Onion. *New phytol.* **78**, 289-295 (1977).
33. Klingner, A, Hundeshagen, B, Kernebeek, H y Bothe, H. Localization of the yellow pigment formed in roots of gramineous plants colonized by arbuscular fungi. *Protoplasma* **185**, 50-57 (1995).
34. Pérez, A, Dreyer, B y Rudamas, C. *Caracterización Óptica de micorrizas arbusculares en Simposio Centroamericano y del Caribe de Física* (ed. Moya Rodríguez, L. M.) (Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, 2009).
35. Klingner, A, Bothe, H, Wray, V y Marner, F. J. Identification of a yellow pigment formed in maize roots upon mycorrhizal colonization. *Phytochemistry* **38**, 53-55 (1995).
36. *USB4000 Fiber Optic Spectrometer Installation and Operation Manual*. Document Number 211-00000-000-02-201201. Ocean Optics (2008). <<http://oceanoptics.com/wp-content/uploads/USB4000OperatingInstructions.pdf>>.
37. Utobo, E. B., Ogbodo, E. N. y Nwogbaga, A. C. Techniques for Extraction and Quantification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Lybian Agric. Res. Cen. J. Intl.* **2**, 68-78 (2011).
38. Driver, J. D., Holben, W. E. y Rillig, M. C. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* **37**, 101-106 (2005).
39. Chávez Huerta, A., Colina Rincón, M., Valbuena Inciarte, A. C. y López, A. Obtención y catacterización de películas de quitosano elaborado de los desechos de la industria cangrejera. *Revista Iberoamericana de Polímeros* **13**, 77-88 (2012).
40. Lee, J.-N. y col. Purification of Soluble beta-Glucan with Immune-enhancing Activity from the Cell Wall of Yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 837-841 (2001).
41. Abarca, W y Rudamas, C. *Espectroscopia computacional de biomoléculas en XXXII Curso Centroamericano y del Caribe de Física* (Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador, jul. de 2013).

42. Grümberg, B y col. La glomalina y su relación con la productividad del cultivo de maíz. *Informaciones Agronómicas* **47**, 23-25 (2010).
43. Treseder, K. K. y Turner, K. M. Glomalin in Ecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **71**, 1257-1266 (2007).
44. International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi - West Virginia University. *Funneliformis mosseae*. En línea. Dic. de 2014. <<http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae/funneliformis/>>.
45. National Institute of Standards and Technology. *Strong Lines of Mercury*. En línea. Dic. de 2014. <<http://physics.nist.gov/PhysRefData/Handbook/Tables/mercurytable2.htm>>.