



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“Identificación molecular de Hongos Micorrízicos
Arbusculares (HMA) asociados a *Cinchona pubescens*
(*Rubiaceae*): una especie invasora en la isla
Santa Cruz (Galápagos)”**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Fernando Javier Serrano Tamay

DIRECTOR: M.Sc. Paulo Ignacio Herrera Vargas

LOJA – ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN

M.Sc.

Paulo Ignacio Herrera Vargas

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, denominado: "Identificación molecular de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) asociados a *Cinchona pubescens* (*Rubiaceae*): una especie invasora en la isla Santa Cruz (Galápagos)"; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes

Loja, octubre de 2013

f) _____

M.Sc. Paulo Ignacio Herrera Vargas

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Fernando Javier Serrano Tamay declaro ser autor del presente trabajo de fin de titulación y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico, o institucional (operativo) de la Universidad”.

f.....

Fernando Javier Serrano Tamay

1103932461

DEDICATORIA

*Dedico este trabajo de investigación a toda mi familia.
A mis padres por darme la vida y haberme formado íntegramente. A mis segundos padres:
Jorge y Marina, dos personas de infinita bondad y que conforman mi sitio seguro en el mundo. A mi hermano Iván, porque de que de una u otra forma, sé que siempre estarás allí para mí. Finalmente a la persona que siempre creyó en mí e hizo de mí persona el profesional que soy ahora, a ti madre, mi vida, mis triunfos y todo este trabajo.*

Fernando Serrano

AGRADECIMIENTO

A Dios que ilumina día a día mi vida y hoy me permite culminar con éxito una más de mis metas.

A la Universidad Técnica Particular de Loja y de manera especial a la Titulación de Bioquímica y Farmacia, por acogerme y brindarme los conocimientos que de seguro darán sus frutos en mi vida profesional.

Al proyecto VALORAM por el financiamiento y disposición de equipos para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A Heinke Jäger, Ingeborg Haug, Ana Tztzqui y todo el grupo de Micorrizas del departamento de Ciencias Naturales, por su apoyo y predisposición

De manera especial al M.Sc. Paulo Herrera Vargas, director de esta investigación por todo el apoyo y los conocimientos brindados durante el desarrollo del proyecto de investigación.

A Juan Sebastián Eguiguren, compañero y amigo, por su significativa colaboración dentro del trabajo de laboratorio.

A todos los docentes, compañeros y pasantes del departamento de Ciencias Naturales.

A los amigos, hermanos que uno elige y que en las buenas y en las malas, de forma directa o indirecta siempre estuvieron ahí de forma incondicional.

A todos, gracias, muchas gracias.

Fernando Serrano

INDICE DE CONTENIDOS

	PÁG
PORTADA	I
APROBACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO I	5
1. MARCO TEORICO	6
1.1. Generalidades del genero <i>Cinchona</i>	6
1.1.1 <i>Cinchona</i> : Planta Nacional del Ecuador	6
1.1.2 Descripción del género	6
1.1.3 Descripción de <i>Cinchona pubescens</i> VAHL	7
1.1.4 Taxonomía de <i>C. pubescens</i>	8
1.1.5 Ubicación geográfica y distribución de <i>C. pubescens</i>	8
1.1.6 Situación actual de <i>Cinchona pubescens</i>	8
1.2 Los hongos y las asociaciones micorrízicas	10
1.3. Micorrizas Arbusculares (MA)	10
1.4. Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA)	11
1.4.1. Morfología de los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA)	11
1.4.1.1 Hifas	12
1.4.1.2 Micelio Externo	12
1.4.1.3 Micelio Interno	12
1.4.1.4 Espora	12
1.4.1.5 Arbúsculo	12
1.4.1.6 Vesículas	13
1.4.1.7 Células Auxiliares	13

1.4.1.8 Apresorios	13
1.4.2 Clasificación de los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA)	13
1.5 Identificación de HMA	14
CAPÍTULO 2	18
2. FIN, PRÓPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO	19
2.1 Fin del proyecto	19
2.2 Propósito del proyecto	19
2.3 Componentes del proyecto	19
CAPITULO 3	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Sitio de estudio	21
3.2 Muestreo	21
3.3 Porcentaje de colonización	21
3.4 Identificación molecular y análisis filogenético	22
3.4.1 Extracción de DNA	22
3.4.2 Amplificación, <i>cloning</i> y secuenciación de DNA	22
3.4.3 Análisis filogenético y determinación de OTUs	23
3.4.4 Riqueza de OTUs de HMA en <i>C. pubescens</i>	24
CAPITULO 4	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1 Muestreo	26
4.2 Porcentaje de colonización	26
4.3 Análisis moleculares	28
4.4 Análisis filogenético y determinación de OTUs	29
4.5 Riqueza de OTUs de HMA en <i>C. pubescens</i>	34
CAPITULO V	37
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39
ANEXOS	47

ÍNDICE DE TABLAS

	PAG.
Tabla 1. Clasificación de los hongos formadores de micorrizas.	14
Tabla 2. OTUs de HMA en <i>C. pubescens</i> observadas a dos umbrales diferentes.	29
Tabla 3. Proporción de OTUs de HMA registradas en raíces de <i>C. pubescens</i> .	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAG.
Figura 1. A) Árbol de <i>C. pubescens</i> , B) Flores de <i>C. pubescens</i> . Parte alta de la isla Santa Cruz, Galápagos.	7
Figura 2. Incremento de la presencia y densidad de la Cascarilla desde el año 1975 en las tierras altas de la Isla Santa Cruz.	9
Figura 3. Principales estructuras de una Asociación Micorrízica Arbuscular. En la figura se muestran: apresorio, hifa intracelular, vesícula, hifa intercelular y arbusculos.	13
Figura 4. Representación esquemática de las regiones 18S (SSU), ITS1, 5.8S, ITS2 y 28S (LSU), estudiadas del DNA ribosomal.	15
Figura 5. Mapa de región 18S. Representación esquemática de la región 18S del gen ribosomal de nrDNA con sitios de anillamiento de los cebadores AML1 y AML2.	16
Figura 6. Porcentaje de colonización por HMA, en raíces de <i>C. pubescens</i> .	26
Figura 7. Estructuras micorrízicas de HMA colonizando raíces de <i>C. pubescens</i> . A) Hifas, vesícula B) Arbusculo.	27
Figura 8. Electroforesis en Gel de Agarosa 0.7%, con productos de PCR amplificados con los cebadores AML1-AML2 de las muestras P12, P16, P17, P28, P29 y B (Blanco). Peso aproximado de las bandas: 800pb.	28
Figura 9. Porcentaje total de familias de HMA en raíces de <i>C. pubescens</i>	29
Figura 10. Árbol filogenético de OTUs inferido con un análisis de Máximo Likelihood (ML) de la región 18S de nrDNA.	31
Figura 11. Árbol filogenético de HMA asociados a <i>C. pubescens</i> , basado en la región 18S, inferido con análisis de Maximum likelihood (ML).	32
Figura 12. Frecuencia de OTUs obtenidas desde 20 individuos de <i>C. pubescens</i> definidas con umbral de 97% de similaridad de secuencia.	35
Figura 13. Frecuencia de OTUs obtenidas desde 20 individuos de <i>C. pubescens</i> definidas con umbral de 99% de similaridad de secuencia.	35
Figura 14. Curva de acumulación de OTUs en <i>C. pubescens</i> .	36

RESUMEN

Cinchona pubescens, una planta introducida en la isla Santa Cruz (Galápagos), se ha convertido en una invasora agresiva, desplazando especies de plantas nativas. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) establecen simbiosis con la mayoría de plantas vasculares, favoreciéndolas en la absorción de nutrientes y podrían ser un factor clave en la adaptación y el desarrollo de *Cinchona* en Galápagos. Mediante la delimitación de OTUs, usando técnicas moleculares investigamos la diversidad de HMA en *C. pubescens* y su posible relación en la invasión de esta planta en la isla. Basados en la similaridad de secuencias, con un umbral de 97% obtuvimos 9 OTUs y con un umbral de 99% obtuvimos 18 OTUs. Todas las OTUs estuvieron distribuidas entre los órdenes *Glomerales* y *Diversisporales*. Tres OTUs fueron muy frecuentes, el resto más raras y algunas diferentes a las publicadas en el GenBank, las cuales podrían estar determinando el éxito de propagación de *C. pubescens* en la Isla. Aún es necesario estudiar la diversidad de HMA asociados a *Cinchona* en Ecuador continental, así como otros factores ecológicos para comprender mejor su propagación y planear posibles estrategias de conservación de la planta en su hábitat natural.

Palabras Clave: *Cinchona pubescens*, Hongos micorrízicos arbusculares (HMA), Unidades taxonómicas operacionales (OTUs).

ABSTRACT

Cinchona pubescens, an introduced plant in the Santa Cruz Island (Galapagos), has become an aggressive invader, displacing native plant species. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) establish symbiosis relationships with most arbuscular plants, favoring them in the absorption of nutrients, and these could be a key factor in the adaptation and development of *Cinchona* in Galapagos. Through delimitation of species using molecular techniques we investigated the diversity of AMF in *C. pubescens* and its possible connection in the invasion of this plant in the island. On the basis of sequence similarity, with a threshold of 97% we obtained 9 OTUs and with a threshold of 99% we obtained 18 OTUs. All OTUs were distributed among *Glomerales* and *Diversisporales* orders. Three OTUs were very frequent, other more rare and some different to those published in GenBank, which could be determining the success of propagation of *C. pubescens* on the island. Further study of the diversity of AMF of *Cinchona* in continental Ecuador still needs to be done, as well as other ecological factors to better understand their spread and create conservation strategies for the plant in its natural habitat.

Key words: *Cinchona pubescens*, Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), operational taxonomic units (OTUs).

INTRODUCCIÓN

Cinchona pubescens VAHL comúnmente conocida como quinina o cascarilla, es un árbol perteneciente a la familia *Rubiaceae*. El tronco alcanza en promedio los 10 metros de altura y 30 cm de diámetro. Las hojas son pubescentes, ovaladas, de 21 a 29 cm de largo y 12 ó 13 cm de ancho, de color verde oscuro. Las flores de color blanco, rosa o rojo, se producen en panículas (espiga de flores) terminales. El fruto es una cápsula con numerosas semillas (Ortega, 2008).

Esta especie ampliamente cultivada en el bosque nublado invade una gran variedad de hábitats forestales y no forestales. Es originaria de Colombia, Venezuela, Perú, Bolivia y Ecuador (Global Invasive Species Database; Garmendia, 2005; Ortega, 2008). Actualmente se localiza una baja cantidad de individuos, por la sobreexplotación causada años atrás por las llamadas “expediciones cinchoneras”, que buscaban la planta por sus propiedades febrífugas y antipalúdicas (Garmendia, 2005).

En las Islas Galápagos, esta especie fue introducida en los años 1940 y desde entonces se ha extendido por un área de más de 12000 hectáreas en la parte alta de la isla Santa Cruz, que se caracteriza por tener un hábitat perturbado que favorece su crecimiento, debido al suelo volcánico rico en materia orgánica (Acosta-Solís, 1945). En esta región, *C. pubescens* se ha convertido en una especie invasora, por lo que se han creado mecanismos para tratar de exterminarla (Buddenhagen, *et al.* 2004).

C. pubescens, ha causado una reducción de la diversidad y la abundancia de las especies de plantas nativas (Jäger *et al.*, 2009; Palacios, 1993) así como cambios en el régimen de la luz, del agua y de los nutrientes (Jäger *et al.*, 2009). Las características ecológicas que permiten la exitosa propagación de *C. pubescens* en estos hábitats son: la abundante producción de semillas, un crecimiento muy rápido de las plántulas; crecen aproximadamente un metro por año produciendo semillas a los dos años (H. Jäger com. personal, 2011). Otro factor podría ser la asociación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) asociados a las raíces de la planta, sin embargo actualmente no se conoce sobre la diversidad de los hongos que podrían estar ayudando a la propagación de esta especie.

Los HMA son un grupo muy selecto de hongos que pertenecen al phylum *Glomeromycota* (Schußler *et al.*, 2001) y se asocian con un 70-90% de las plantas terrestres (Smith y Read, 2008). Se caracterizan por la formación de arbusculos, vesículas (en algunas especies) e hifas, dentro de las células corticales de las plantas que colonizan (Douds & Millner, 1999). El micelio de los HMA incrementa el área de absorción de la raíz de la planta

(Smith & Read, 1997) facilitando la toma de nutrientes (Colozzi & Cardoso, 2000) como: N, P, K, Ca, Mg, Cu, Mn, Zn, S y B (Taber *et al.*, 1982), mejorando así su tolerancia al estrés biótico y abiótico (Simard *et al.*, 1997; Simard & Durall, 2004).

Citando los objetivos planteados, con esta investigación, se pretende conocer la diversidad de HMA y determinar si éstos tendrían algún efecto sobre el crecimiento de *C. pubescens* en la isla Santa Cruz. Para esto fue evaluado el porcentaje de colonización de hongos presentes en raíces, mediante un método de tinción desarrollado por Phillips & Hayman (1970). Posteriormente, utilizando herramientas moleculares se amplificó, clonó y secuenció el gen 18S de nrDNA fúngico para tratar de dar respuesta a los objetivos planteados mediante la determinación de OTUs y la construcción de análisis filogenéticos. Finalmente se evaluó la riqueza de especies presente en *C. pubescens* mediante curvas de acumulación de especies.

La meta propuesta es determinar si los hongos influyen en el desarrollo de *C. pubescens* en la isla Santa Cruz, con el propósito final de dar pie a la implementación de medidas de conservación de la planta en la región continental, donde la sobreexplotación de la cascarilla destruyó gran parte del bosque nublado y hace que en la actualidad no sea fácil encontrar esta especie (Tapia, 2013).

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades del género *Cinchona*.

1.1.1. *Cinchona*: Planta Nacional del Ecuador.

La *Cinchona* está considerada como la planta nacional del Ecuador por ser nativa. Representa a las tres regiones continentales: Costa, Sierra y Amazonía (Buitrón, 1999) pues habita en las estribaciones occidentales y orientales de las dos cordilleras de los Andes (Tapia, 2013) y simbolizó el origen histórico del “Árbol de la Vida”. La cascarilla o “quina” fue considerada como uno de los principales productos forestales del Ecuador; siendo económicamente más importante desde el punto de vista medicinal. La provincia de Loja fue la primera en adquirir fama como la más importante fuente de *Cinchona* (Acosta-Solís, 1947; Madsen, 2002), atribuyéndose su origen y principal centro de producción al nudo de Cajanuma (Buitrón, 1999).

Descubierta en Ecuador en el siglo XVII, la Cascarilla o Quina Roja, como también se la denominó, contiene en su corteza un compuesto que fue utilizado desde el tiempo de los Incas para curar el paludismo o malaria, y fue considerada como la “Salvación de la Humanidad” por ser el remedio contra las fiebres palúdicas (Buitrón, 1999).

Son cuatro los compuestos (alcaloides) más conocidos y estudiados de *Cinchona* que están presentes en su corteza: cinchonina, cinchonidina, quinidina y quinina, éste último es el más importante antimalárico. En 1820, se aisló el alcaloide quinina con el cual se pudo certificar su contenido en las diferentes especies de *Cinchona* sp. (Tapia, 2013).

1.1.2. Descripción del género

Cinchona es un género de plantas fanerógamas, pertenece a la familia *Rubiaceae* y es nativo de los valles andinos de Sudamérica (Buitrón, 1999; Garmendia, 2005; Jäger *et al.*, 2007), se distribuye a lo largo de la zona tropical y ecuatorial de la cordillera de los Andes desde 12° latitud norte hasta 20° latitud sur, encontrándose en alturas que van desde los 700 metros hasta los 2900 metros sobre el nivel del mar (Garmendia, 2005). Los árboles de quina en estado natural constituyen pocas veces bosques por sí mismos, generalmente forman grupos poco compactos esparcidos en medio del bosque, llamados manchas (Garmendia, 1999).

El género *Cinchona* presenta hojas opuestas, lanceoladas o redondeadas y perennes de 10 a 40 cm de longitud. Las flores de color blanco, rosa o rojo, se producen en panículas

(espiga de flores) terminales. El fruto es una cápsula con numerosas semillas (Ortega, 2008).

Agrupada unas 21 especies, de las cuales más de la mitad se encuentran en Ecuador, principalmente en provincias como Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay, Morona, Zamora y Loja (Garmendia, 2005; Tapia, 2013). Dos de las especies más reconocidas son *Cinchona officinalis* L. y *Cinchona pubescens* VAHL (antes *C. succirubra*), siendo esta última la más extendida y conocida, pues fue de la que se descubrieron sus múltiples aplicaciones terapéuticas (Andersson & Taylor, 1994; Jäger *et al.*, 2013; Mahecha *et al.*, 2004; Ortega, 2008; **Figura 1**).

1.1.3. Descripción de *Cinchona pubescens* VAHL

El tronco alcanza en promedio los 10 m de altura y 30 cm de diámetro. Las hojas son pubescentes, ovaladas, de 21 a 29 cm de largo y 12 ó 13 cm de ancho, de color verde oscuro, con pecíolo de 3 a 7 cm de longitud. Presenta inflorescencia terminal, flores rojas con corola blanca o rosada y los lóbulos internamente amarillentos, agrupadas en panículas. Los frutos son angostos, cilíndricos y encapsulados de 3.5 a 4 cm de largo por 0.7 cm de ancho, con 3 ó 4 semillas (Ortega, 2008; **Figura 1**).

Figura 1. **A)** Árbol de *C. pubescens*, **B)** Flores de *C. pubescens*. Parte alta de la isla Santa Cruz, Galápagos.



Fuente: Heinke Jäger; Fundación Charles Darwin (<http://checklists.datazone.darwinfoundation.org>).

1.1.4. Taxonomía de *C. pubescens*.

Grupo: Euasterids I

Orden: *Gentianales*

Familia: *Rubiaceae*

Género: *Cinchona*

Nombre científico: *Cinchona pubescens* Vahl.

Nombre común: árbol de quinina, cinchona roja, cascarilla, quina, entre otros.

1.1.5. Ubicación geográfica y distribución de *C. pubescens*.

El área de distribución de *C. pubescens* coincide exactamente con la del género *Cinchona*, por lo tanto ésta es una especie generalista y su área de distribución abarca, casi por completo, el de todas las otras especies de *Cinchona* tanto latitudinalmente como altitudinalmente (Garmendia, 2005). Se encuentra distribuida en Costa Rica, Panamá, Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela (Buitrón, 1999), y se ha introducido a muchos lugares como Hawai, Tahití y Galápagos (Jäger *et al.*, 2007; Starr *et al.*, 2003).

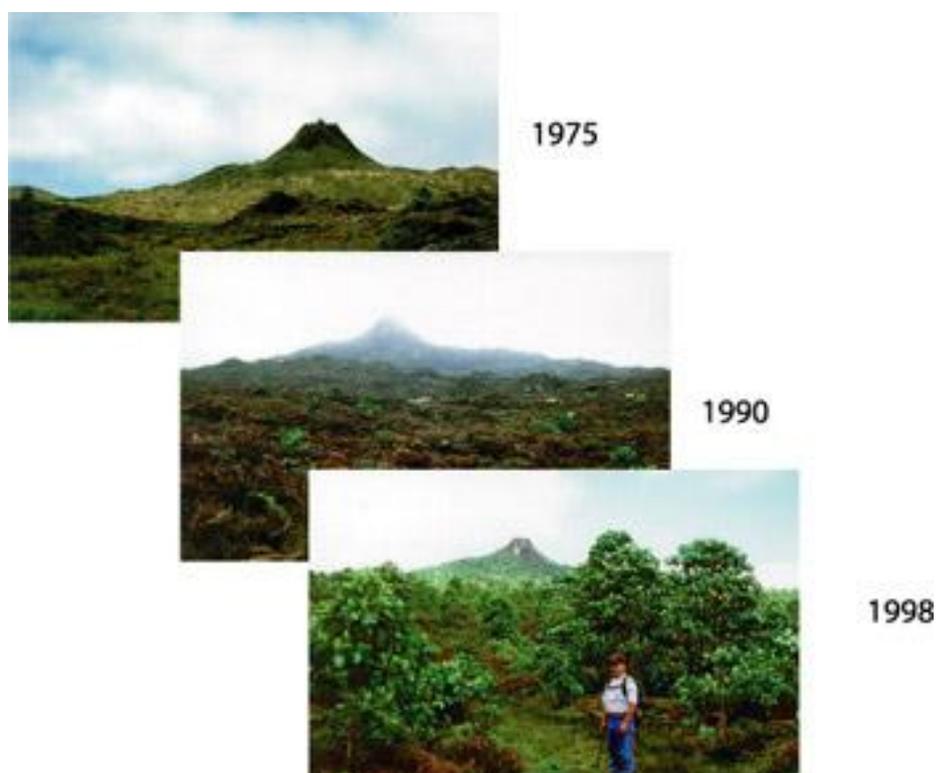
Específicamente en Ecuador, en los “bosques isla” de la región costera (Celica, Portovelo, etc.) se encuentra únicamente *C. pubescens* (Garmendia, 2005). También se halla introducida en la Isla Santa Cruz del Archipiélago de Galápagos, donde ha causado graves problemas en algunos ecosistemas (Jäger *et al.*, 2007; Starr *et al.*, 2003) y se ha convertido en una invasora muy agresiva (Garmendia, 2005).

1.1.6. Situación actual de *Cinchona pubescens*

Muchas son las teorías sobre la introducción de *Cinchona* al archipiélago de Galápagos. Entre las más reconocidas cuentan que al comenzar la II Guerra Mundial la producción de quina se convirtió en objetivo militar. Cuando los japoneses se apoderaron de Indonesia y sus Islas de Java, los aliados decidieron fomentar las plantaciones en Sudamérica, en Puerto Rico y en otros lugares donde se convirtieron en problemas ecológicos, como en el caso de las islas Galápagos (Cuvi, 2009). Otras teorías dicen que podría haberse importado a las islas desde Ecuador continental con fines madereros para la construcción de casas.

Algunos estudios han demostrado que las especies con rangos limitados de distribución, tales como *C. officinalis*, son altamente susceptibles al fenómeno de fragmentación que afecta a su estado de conservación (Garmendia, 2005), sin embargo *C. pubescens* introducida en 1940 en las Islas Galápagos se ha extendido por un área de más de 12000 hectáreas en la parte alta de la isla Santa Cruz (Acosta-Solís, 1945; **Figura 2**).

Figura 2. Incremento de la presencia y densidad de la Cascarilla desde el año 1975 en las tierras altas de la Isla Santa Cruz.



Fuente: Ole Hamman (<http://www.hear.org/galapagos/invasoras/temas/manejo/plantas/proyectos/cinchona.htm>).

En dicha isla, la especie ha causado una reducción de la diversidad y la abundancia de las especies de plantas nativas (Palacios, 1993; Jäger *et al.*, 2009), así como cambios en el régimen de la luz, del agua y los nutrientes (Jäger *et al.*, 2009). Actualmente domina gran parte de la zona de helechos y juncia, y es codominante con *Miconia robinsoniana* en la Zona de *Miconia*. Muchas especies en estas zonas de vegetación se encuentran amenazadas de acuerdo a la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Jäger *et al.*, 2007).

Las características ecológicas que permiten la exitosa propagación de *C. pubescens* en estos hábitats son: la abundante producción de semillas, un crecimiento muy rápido de las plántulas; crecen aproximadamente un metro por año produciendo semillas a los dos años (H. Jäger com. personal, 2011). La Isla Santa Cruz se caracteriza por tener un hábitat perturbado que favorece el crecimiento de la planta, debido al suelo volcánico rico en materia orgánica (Acosta-Solís, 1945). Este tipo de suelo naturalmente tiene bajos niveles de ciertos nutrientes (especialmente nitrógeno y fósforo), por lo que las plantas nativas se encuentran adaptadas a estas condiciones (Jäger *et al.*, 2007).

Además de las características antes mencionadas, *C. pubescens* podría estar beneficiándose del incremento en la toma de nutrientes debido a su asociación mutualista con hongos micorrízicos arbusculares (HMA), conocida como micorriza arbuscular (MA; Jäger *et al.*, 2007). Jäger *et al.* (2007) comenta que otras especies nativas de la isla como *Miconia* y *Juncia* no están altamente colonizadas por este tipo de hongos micorrízicos, pero, si existiere una elevada colonización en *C. pubescens*, los hongos podrían estar beneficiando a la planta en el aprovechamiento de nutrientes, adaptación e invasión de la Isla Santa Cruz.

1.2. Los hongos y las asociaciones Micorrízicas.

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos que presentan una amplia distribución en la naturaleza, son el segundo grupo con mayor número de especies entre los seres vivos, después de los insectos (Pontón *et al.*, 2002). Se estima que existen cerca de 1.5 millones de especies de hongos (Hawksworth, 2001) de las cuales se han descrito 98998 (Kirk *et al.*, 2008); y aunque cada año se registran cerca de 1500 nuevas especies, aún sigue siendo uno de los reinos biológicos menos conocido (Montaño *et al.*, 2007).

La mayor parte de los hongos juegan un papel de vital importancia en el mantenimiento de los ecosistemas (Montealegre, 2002). Un grupo funcional de hongos que cumple un papel fundamental en las comunidades vegetales son los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), que establecen una de las simbiosis más sobresalientes en la naturaleza, denominada micorriza arbuscular (MA).

1.3. Micorrizas Arbusculares.

El término micorriza proviene del griego *mykes*, hongo y *rhiza*, raíz (Montaño *et al.*, 2007; Simon *et al.*, 1993), y fue acuñado por A.B. Frank en 1885, para describir las asociaciones simbióticas entre raíces y hongos.

Existen algunos tipos de micorrizas, entre los cuales se destacan las micorrizas arbusculares (MA), que representan un relación mutualista establecida entre HMA y la mayoría de plantas terrestres (aproximadamente 70% a 90%). Los hongos que forman parte de esta simbiosis pertenecen al phylum *Glomeromycota* (Shüßler *et al.*, 2001) y se caracterizan por la formación de algunas estructuras dentro de las células corticales que colonizan (Colozzi & Cardoso, 2000), tales como arbúsculos, vesículas (en algunas especies) y un conjunto de hifas (micelio) (véase en el apartado 1.4.1) (Montaño *et al.*, 2007).

El micelio de los HMA incrementa el área de absorción de la raíz de la planta (Smith y Read, 1997), permitiendo una mayor exploración y explotación de suelos (Tapia 2003), facilitando la toma de nutrientes (Colozzi & Cardoso, 2000) como: N, P, K, Ca, Mg, Cu, Mn, Zn, S y B (Montaño *et al.*, 2007; Taber *et al.*, 1982), y mejorando así su tolerancia al estrés biótico y abiótico (Simard *et al.*, 1997; Simard & Durall, 2004). Por otro la planta beneficia al hongo suministrándole fuentes de carbono procedentes de la fotosíntesis (proceso que el hongo no puede realizar) y brindándole protección (Montaño *et al.*, 2007).

La MA se origina a partir de hifas que proceden de los propágulos existentes en el suelo (esporas maduras, fragmentos de raíz micorrizados, plantas micorrizadas que crecen en vecindad) (León, 2006). La asociación inicia cuando las hifas del suelo responden a la presencia de una raíz, establecen contacto, crecen a lo largo de su superficie y forman un apresorio que origina seguidamente la hifa colonizadora que penetrará en la célula epidérmica o atravesará el espacio intercelular (Brundrett *et al.*, 1996; León, 2006).

En la zona externa del cortex de la raíz forman estructuras intracelulares típicas en forma de enrollamientos; en la zona media las hifas crecen normalmente de forma longitudinal en los espacios intercelulares; mientras que en la zona interna las hifas forman los arbusculos (León, 2006). De la formación arbuscular sigue el crecimiento hifal, progresando hacia el exterior desde el punto de entrada (Brundrett *et al.*, 1996). Las vesículas son formadas tempranamente, después de los primeros arbusculos, pero continúan su desarrollo cuando éstos envejecen (Brundrett *et al.*, 1996).

La MA influye en la estabilización del suelo y determina la composición vegetal, productividad, diversidad y sustentabilidad en los ecosistemas (van der Heijden *et al.*, 1998). El efecto positivo de los HMA se observa en la planta hospedera, al mejorar su adaptación (reproducción y supervivencia) y producción de biomasa (Castillo, 2005). Las MA bien podrían representar el segundo componente más grande de biomasa en muchos ecosistemas terrestres (Montaño *et al.*, 2007). La estructura y estabilidad de las comunidades vegetales nativas o de ambientes conservados se encuentran fuertemente influenciadas por esta simbiosis (Castillo, 2005).

1.4. Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA).

1.4.1. Morfología de los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA).

Los HMA poseen algunas estructuras características, tales como hifas, micelio externo, micelio interno, esporas, arbusculo, vesícula, células auxiliares y apresorios.

1.4.1.1 Hifas.

Son estructuras filamentosas que en conjunto forman un micelio. Los HMA poseen dos sistemas de hifas, uno interno y otro externo. El primero se desarrolla intercelularmente (crecen dentro de la pared de la células de la raíz) o intracelularmente (crecen entre la pared de las células de la raíz) en las células corticales de la raíz; el segundo emerge de la raíz y se extiende por el suelo varios centímetros, dando lugar al micelio externo que constituye el sistema de absorción de nutrientes (Buelvas & Peñates, 2008; Guachón & Prado, 2012; Guzman & Farias, 2005; **Figura 3**).

1.4.1.2 Micelio externo.

El micelio externo se constituye en el colonizador de la raíz de la planta y del suelo (rizosfera), funciona como una prolongación del sistema radicular de la planta, permitiéndole explorar un área mayor de suelo que el alcanzado por las raíces de las plantas que no presentan proceso simbiótico de micorrización, generando un aumento de 40 veces mayor aprovechamiento de los nutrientes (N, P, K, Mg, Cu, entre otros; Buelvas & Peñates, 2008).

1.4.1.3 Micelio interno.

Conforma el aparato de nutrición del hongo, el cual se ubica dentro de la corteza de las raíces micorrizadas. Optimiza la asimilación del recurso hídrico disponible en el suelo y favorece la interacción con otros microorganismos del suelo (Buelvas & Peñates, 2008).

1.4.1.4 Espora.

Forman hinchazones en una o más hifas en el suelo o en las raíces, a menudo desarrollan paredes gruesas y poseen resistencia para sobrevivir en el suelo durante muchos años, pudiendo funcionar también como propágulos (Brundrett *et al.*, 1996; Buelvas & Peñates, 2008).

1.4.1.5 Arbúsculo.

Minúsculas ramificaciones dicotómicas de hifas intracelulares, que sirven como sitio de intercambio nutrimental entre el hongo y el hospedero, y presentan corta duración (9-15 días; Requena, 1996). Se forman poco tiempo después de iniciada la infección. Cuando se forma un arbúsculo el almidón de la célula invadida desaparece al tiempo que el núcleo se alarga y se divide. Los arbúsculos son digeridos rápidamente y absorbidos por el huésped. Los núcleos vuelven a su tamaño normal y el almidón suele reaparecer (Buelvas & Peñates, 2008; **Figura 3**).

1.4.1.6 Vesículas.

Se forman posteriormente a los arbusculos y son estructuras ovoides que contienen material lipídico. Estos son órganos de reserva, se forman intra o intercelularmente en el sistema radical y fuera de él. Durante situaciones de estrés estas reservas se utilizan y las vesículas se degeneran (Buelvas & Peñates, 2008). Ellas funcionan como esporas para algunas endomicorrizas, y no están presentes en todos los géneros de HMA (Brundrett *et al.*, 1996; Guachón & Prado, 2012; **Figura 3**).

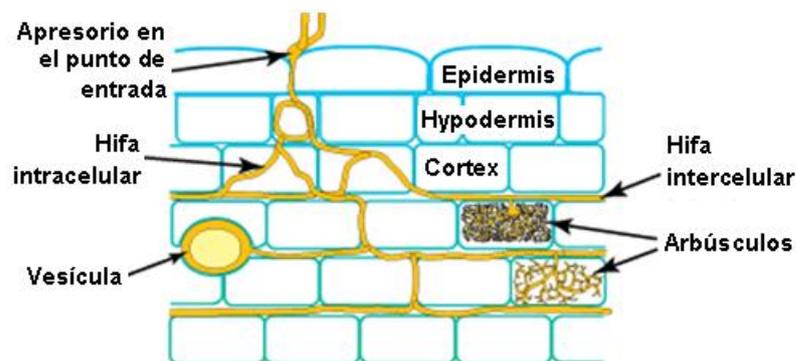
1.4.1.7 Células Auxiliares.

Son estructuras abultadas con paredes delgadas, producidas en el micelio externo. Son características de los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*, estos nunca forman vesículas (Guachón & Prado, 2012). La función de estas estructuras no es conocida (Buelvas & Peñates, 2008) y aparentemente no funcionan como propágulos (Brundrett *et al.*, 1996).

1.4.1.8 Apresorios.

Son apéndices formados por la hinchazón de la hifa cuando esta hace contacto con la superficie de una célula epidérmica de la raíz (Brundrett *et al.*, 1996; Guachón & Prado, 2012; **Figura 3**).

Figura 3. Principales estructuras de una Asociación Micorrízica Arbuscular. En la figura se muestran: apresorio, hifa intracelular, vesícula, hifa intercelular y arbusculos.



Fuente: Modificado de Brundrett *et al.* (1996).

1.4.2. Clasificación de los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA).

Schüßler & Walker (2010) propusieron la clasificación taxonómica más actual para los HMA, basados principalmente en la morfología de estructuras micorrízicas e identificación molecular (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación de los hongos formadores de micorrizas.

Reino	División	Clase	Orden	Familia	Género
Fungi	<i>Glomeromycota</i>	<i>Glomeromycetes</i>	<i>Glomerales</i>	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i> <i>Funnelformis</i> <i>Rhizophagus</i> <i>Sclerocystis</i>
				<i>Claroideoglomeraceae</i>	<i>Claroideoglomus</i>
			<i>Diversisporales</i>	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Gigaspora</i> <i>Scutellospora</i> <i>Racocetra</i>
				<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i>
				<i>Entrophosporaceae</i>	<i>Entrophospora</i>
				<i>Pacisporaceae</i>	<i>Pacispora</i>
				<i>Diversisporaceae</i>	<i>Diversispora</i> <i>Otospora</i> <i>Redeckera</i>
			<i>Paraglomerales</i>	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i>
			<i>Archaeosporales</i>	<i>Geosiphonaceae</i>	<i>Geosiphon</i>
				<i>Ambisporaceae</i>	<i>Ambispora</i>
				<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Archaeospora</i>

Fuente: Schüßler & Walker, 2010.

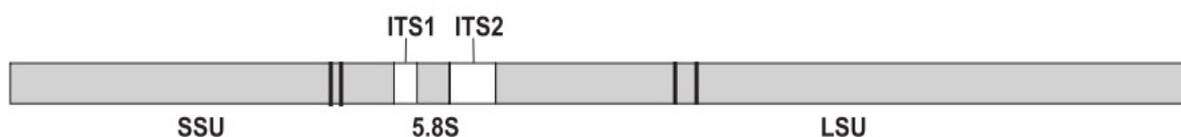
1.5. Identificación de HMA.

Aproximadamente 160 especies de HMA han sido descritas por la morfología de sus esporas de acuerdo a la colección internacional de cultivos de Micorrizas vesiculares-arbusculares (INVAM; Lee *et al.*, 2008), pero la producción de esporas no siempre está correlacionada con la colonización de las raíces, dado que muchos HMA pueden reproducirse solo vegetativamente sin producción de esporas. Cuando las esporas no están formadas, las estructuras intraradicales de los HMA permiten a lo sumo la identificación de la familia del hongo (Lee *et al.*, 2008; Redecker, 2000).

Muchos linajes recientemente caracterizados no se distinguen con procedimientos estándar como aislamiento en cultivos o identificación por morfología de sus estructuras, debido a la gran variación en la morfología de sus esporas incluso dentro de la misma especie de HMA (Lee *et al.*, 2008). Esta limitación de los caracteres morfológicos para diferenciar hongos estrechamente relacionados, así como la laboriosidad requerida en su estudio y, en algunos casos, la insuficiente resolución que proporcionan a nivel taxonómico, ha propiciado el uso de las técnicas moleculares (Franco, 2005) como la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) (Lee *et al.*, 2008; Redecker, 2000).

Desde principios de la década pasada, los HMA han sido objeto de investigaciones basadas en el DNA a través de *PCR*, donde uno de los aspectos a tratar es el concerniente a la filogenia y taxonomía de estos organismos, así como su identificación y monitoreo en el suelo (Perez *et al.*, 2011). Para ello se han estudiado las regiones del nrDNA como la 18S o también llamada subunidad pequeña (*SSU*, por sus siglas en inglés), 5.8S y 28S o también llamada subunidad grande (*LSU*, por sus siglas en inglés), que se encuentran relativamente conservadas entre los hongos, facilitando una base molecular para buscar relaciones filogenéticas a diferentes niveles (Ochoa, 2008). Así también se han utilizado las regiones ITS1 e ITS2 (Espaciador interno transcrito) de nrDNA que son más variables y sirven para la comparación de especies de hongos dentro de un género o cepas dentro de una especie (Said *et al.*, 2007; Stockinger *et al.*, 2010; **Figura 4**). Sin embargo, aún no existe una suficiente base de datos que nos permita hacer comparaciones más precisas utilizando esta región en este tipo de hongos (HMA).

Figura 4. Representación esquemática de las regiones 18S (*SSU*), ITS1, 5.8S, ITS2 y 28S (*LSU*), estudiadas del DNA ribosomal.



Fuente: Krüger *et al.*, 2009.

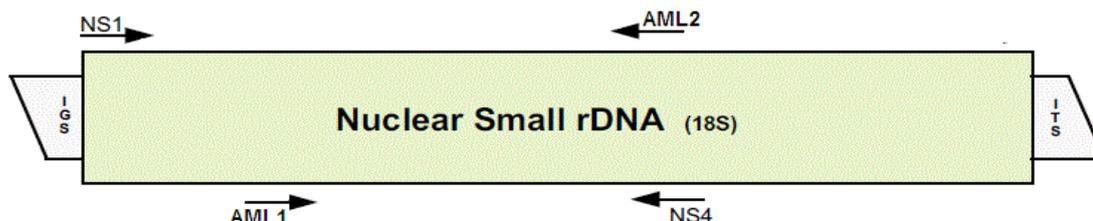
Estos análisis tienen el potencial de identificar activamente los hongos en muestras de campo independientemente del criterio morfológico. Los genes ribosomales han sido usados en la mayoría de estudios moleculares ecológicos de HMA, y generalmente concuerdan con la clasificación basada en la morfología de esporas. Por lo tanto, se ha sugerido que el rDNA proporciona las herramientas adecuadas para la identificación y estudio filogenético en HMA (Lee *et al.*, 2008).

Las secuencias del ITS han sido ampliamente utilizadas para la taxonomía molecular (Redecker, 2000), pero exhiben un alto nivel de variación dentro de las especies de HMA e incluso dentro de esporas individuales. Por lo tanto, el gen 18S de nrDNA será utilizado para su amplificación en este estudio, por ser menos variable que las demás subunidades y porque permite una resolución suficiente hasta el nivel de especie en HMA (**Figura 5**).

Para el estudio del DNA, se utilizan cebadores específicos y universales, que amplifican regiones determinadas del mismo. Para este trabajo se utilizarán cebadores específicos para *Glomeromycota*, necesarios para la identificación a nivel molecular de la diversidad de

HMA, en este caso, asociados a *C. pubescens*. Estos, fueron diseñados por Lee *et al.* (2008) y se denominan AML1 y AML2 (**Figura 5**).

Figura 5. Mapa de región 18S. Representación esquemática de la región 18S del gen ribosomal de nrDNA con sitios de anillamiento de los cebadores AML1 y AML2.



Un método usado en los últimos años para estudiar la diversidad es la identificación de lo que se conoce en taxonomía numérica tradicional (Sneath & Sokal, 1973; Sokal & Sneath, 1963) como unidades taxonómicas operacionales (*OTU* por sus siglas en inglés) o filotipos (Herrera, 2012), que pueden ser definidos simplemente por la identidad de secuencias (Blaxter, 2004). Estas OTUs definirían teóricamente a especies, y pueden ser utilizadas en estudios ecológicos como los de diversidad.

El número de especies es, quizá, el atributo más frecuentemente utilizado a la hora de describir una taxocenosis, ya que es una expresión mediante la cual se obtiene una idea rápida y sencilla de su diversidad (Jiménez & Hortal, 2003). En estudios de conservación, se necesita a menudo determinar el número de especies (riqueza de especies) encontrado en un área dada, o comparar el número de especies entre áreas distintas, por lo tanto es necesario hacer un muestreo, tomando en consideración que la riqueza de especies observada dentro de hábitats es notablemente dependiente del tamaño de muestra (Colwell *et al.*, 2004).

Uno de los métodos que se empezó a utilizar con más frecuencia para conocer la riqueza de especies total de una comunidad es la curva de acumulación de especies (Escalante, 2003), que se describe como la gráfica del número de especies observadas como función de alguna medida del esfuerzo de muestreo requerido para observarlas (Colwell *et al.*, 2004), de tal manera que la riqueza aumentará hasta que llegue un momento en el cual por más que se recolecte, el número de especies alcanzará un máximo y se estabilizará en una asíntota (Escalante, 2003).

Las curvas de acumulación permiten 1) dar fiabilidad a los inventarios biológicos y posibilitar su comparación; 2) una mejor planificación del trabajo de muestreo, tras estimar el

esfuerzo requerido para conseguir inventarios fiables; y 3) extrapolar el número de especies observado en un inventario para estimar el total de especies que estarían presentes en la zona (Jiménez & Hortal, 2003).

Se han propuesto varias funciones diferentes para modelizar la relación entre el esfuerzo de muestreo y el número de especies encontrado, siendo las más utilizadas la función exponencial negativa y la ecuación de Clench, esta última es el modelo más utilizado y ha demostrado un buen ajuste en la mayoría de las situaciones y para con la mayoría de taxones. Para la ecuación de Clench, y empleando como unidad de esfuerzo individuos o registros de una base de datos como son las OTUs, el inventario puede considerarse suficientemente fiable, aún cuando se tenga un esfuerzo de muestreo incompleto (Jiménez & Hortal, 2003).

Con base en la delimitación de OTUs, en el presente trabajo de investigación se estudiará la riqueza de HMA asociados a *C. pubescens* en la Isla Santa Cruz (Galápagos), con el fin de determinar la diversidad de estos hongos y así aportar en el entendimiento de los mecanismos invasivos de esta planta en la Isla.

CAPÍTULO II

**FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL
PROYECTO**

FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

2.1 Fin del proyecto.

- Conocer el efecto de las comunidades de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) sobre el crecimiento de *C. pubescens* en la isla Santa Cruz- Galápagos.
- Contribuir al estudio de la asociación micorrízica en *C. pubescens*.

2.2 Propósito del proyecto.

- Determinar la colonización de HMA en raíces de *C. pubescens* provenientes de la isla Santa Cruz, Galápagos.
- Identificar molecularmente las comunidades de HMA asociados a *C. pubescens* de la isla Santa Cruz, Galápagos.

2.3 Componentes del proyecto.

- Con este estudio, y en base a los objetivos propuestos se espera obtener:
- Secuencias de HMA identificados a nivel de especie.
- Registro filogenético de HMA que se encuentren asociados a raíces de *C. pubescens* de la isla Santa Cruz, Galápagos.

CAPÍTULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sitio de estudio.

Las raíces colectadas provinieron de las Islas Galápagos (ubicadas en el Océano Pacífico sobre la línea ecuatorial, aproximadamente a 960 Km de la costa continental ecuatoriana), específicamente la Isla Santa Cruz (S 0.66226 W 90.32485), que se ubica en la parte central del archipiélago, y cuenta con una superficie de 986 km² y una altitud máxima de 864 m (www.ecuale.com/galapagos/santacruz.php).

3.2 Muestreo.

Se colectaron raíces de 20 individuos de *C. pubescens*, excavando primeramente la tierra al pie de cada árbol, desde el cuello de la raíz. Se localiza una raíz secundaria asegurándose de que pertenezca al árbol, se despeja la tierra de la raíz y se extraen las raíces más finas o pelos absorbentes de la zona pilífera, tratando de colectar siempre la misma cantidad de raíces de cada individuo. Se muestrea de 3 a 4 raíces secundarias por cada árbol.

Las raíces obtenidas fueron conservadas en alcohol al 50% y almacenadas en refrigeración hasta su análisis en el departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Técnica Particular de Loja.

3.3 Porcentaje de Colonización

De las muestras recolectadas en la Isla Santa Cruz (Galápagos), se extrajeron al azar las raíces más jóvenes y finas (cinco a seis fragmentos de aprox. 5 cm por individuo), se cortaron en piezas de aproximadamente 1.5 cm de longitud y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 cm. Luego se procedió a calcular el porcentaje de colonización por tinción de las raíces con azul de metileno, usando el método de Phillips y Hayman (1970, **Anexo 1**). Se montaron los segmentos teñidos (aprox. 10 por individuo) paralelamente en portaobjetos y con la ayuda de un microscopio (Leitz WETZLAR SM-Lux), a 100X y 400X de magnificación se observaron las diferentes estructuras como vesículas, arbuscúlos e hifas.

Los niveles de colonización de las plantas se determinaron de acuerdo a la estimación de micorrización según Trouvelot, *et al.* (1986), en la que se asigna una clase, tomando en cuenta las diferentes estructuras micorrízicas de cada fragmento de raíz y la abundancia de arbuscúlos (**Anexo 2**).

Cada segmento fue categorizado entre las clases 0 (0% infección) hasta 5 (>95% colonización). Simultáneamente, la proporción de arbusculos en cada porción infectada fue categorizada entre A0 (0% arbusculos) hasta A3 (100% arbusculos) (**Anexo 2**). Las clases obtenidas se analizaron en el software "Mycocalc" para calcular los parámetros: Frecuencia de HMA en las raíces (%F) y Abundancia arbuscular en el sistema radicular (%A).

3.4 Identificación molecular y análisis filogenético.

3.4.1 Extracción de DNA.

A partir de raíces colonizadas se realizó la extracción de DNA con el kit *DNeasyPlant Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, incluyendo un paso previo de trituración del tejido con el uso del molino de extracción (Retsch MM301).

3.4.2 Análisis moleculares.

Para la amplificación de la región 18S del nrDNA se realizó una PCR utilizando los cebadores específicos para *Glomeromycota*, AML1/AML2 (5'-ATC AAC TTT CGA TGG TAG GAT AGA-3'/5'-GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC C-3') (Lee *et al.*, 2008), con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 98°C por 15 min; 30 ciclos, cada ciclo consta de un paso de desnaturalización a 98°C por 10 s, anillamiento a 60°C por 40 s, extensión a 72°C por 55 s y una extensión final a 72°C por 10 min.

Para algunas muestras de DNA no amplificadas directamente con los cebadores AML1 y AML2, se procedió con una PCR anidada, primero con cebadores universales para eucariotas NS1/NS4 (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3'/5'-CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG-3') (White *et al.*, 1990) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min; 30 ciclos, cada ciclo consta de un paso de desnaturalización a 94°C por 30 s, anillamiento a 40°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min; segundo, con cebadores específicos AML1/AML2, usando condiciones similares a las detalladas previamente pero con diferente temperatura de anillamiento (57°C) y número de ciclos (40).

Para amplificar la región 18S con ambos pares de cebadores, se usó la *Taq Phusion High-Fidelity DNA polymerase 2x Mastermix* (Finnzymes, Espoo, Finland), en una mezcla de reacción para PCR que contiene un volumen final de 20 µL: 10 µL de *2x Phusion Mastermix*, 6.4 µL de agua dd, 0.4 µL de cada cebador (10 pmol/µL), 0.8 µL de *Bovine Serum Albumin* 10% (BSA) y 2 µL de DNA.

Los productos de PCR (2 μ L de azul de bromofenol con 3 μ L de cada producto de PCR) se verificaron por medio de electroforesis (128 V, 300 mA, 30 min) en gel de agarosa 0.7% teñido en *Gel Red™ Nucleic Stain* (Biotium), usando 1.5 μ L de marcador molecular de 1 Kb en el primer pocillo. La observación se hizo en un transiluminador UV.

Se realizó *cloning* molecular con el *Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las colonias crecieron en Medio *LB Agar, Miller* (Difco™) de donde se tomaron hasta 12 colonias individuales para comprobar la inserción del DNA. Estas colonias fueron amplificadas por PCR usando cebadores M13F y M13R modificados (Krüger *et al.* 2009). Los productos se comprobaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

Finalmente se tomaron, en promedio, 8 colonias que se cultivaron por 24 horas en medio líquido *LB Broth Miller* (Difco™) y se purificaron usando el kit *SNAP miniprep* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de DNA purificados fueron secuenciados en la empresa Macrogen (Seoul, Korea), en ambas direcciones, con los cebadores M13F y M13R.

3.4.3 Análisis filogenético y determinación de OTUs.

Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas para formar consensos usando el software *Codon Code Aligner* (v. 4.1.1). Las secuencias consensos fueron comparadas usando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Como un concepto provisional para “especies”, se definieron las OTUs o Unidades Taxonómicas Operacionales, agrupando las secuencias sobre la base de su similaridad de secuencia con OPTSIL (Göker *et al.* 2009), usando dos diferentes umbrales: $\geq 97\%$ y $\geq 99\%$ de similaridad con una fracción de unión de 0.5 que combina dos grupos si las distancias entre el 50% de las secuencias en cada grupo son iguales o están por debajo del valor de corte.

Primeramente se alinearon las secuencias del estudio usando la opción “G-INS-i” implementada en MAFFT v5.667 (Kato *et al.*, 2005), y las OTUs obtenidas con los dos umbrales fueron mapeados en un árbol inferido mediante análisis de *Maximum Likelihood* (ML) en el programa MEGA v. 5.2.1 con GTR+I+G (Swofford *et al.*, 1996) como modelo de sustitución combinado con un análisis bootstrap de 1000 replicaciones (Felsenstein, 1985). Los gaps fueron tratados como datos perdidos y se usó el método de punto medio para enraizar el árbol (**Figura 10**).

En segundo lugar, las secuencias pertenecientes a HMA se alinearon conjuntamente con secuencias publicadas en el NCBI (GenBank) que presentaron alto grado de similitud, usando la opción "G-INS-I" implementada en MAFFT v5.667 (Kato *et al.* 2005) y se procedió con un análisis de *Maximum Likelihood* (ML) en el programa MEGA v. 5.2.1 (detallado anteriormente), usando a *Endogone pisiformis* (Número de acceso: X58724) como grupo externo (*out-group*) para enraizar el árbol. En este caso, una secuencia de cada OTU definida con los umbrales de 97% y 99% de similitud de secuencias fue usada para la construcción del árbol (**Figura 11**).

3.4.4 Riqueza de OTUs de HMA en *C. pubescens*.

Para determinar la riqueza de OTUs de HMA presentes en *C. pubescens* se llevó a cabo un análisis de acumulación de especies con el programa *EstimateS* v.8.2.0 (Colwell *et al.* 2012). Los datos se ajustaron a una curva de Clench (Soberón & Llorente 1993) con el programa *Statistica* 7.0.61.0 (Anónimo, 2004), siguiendo las directrices de Jiménez & Hortal (2003). A partir de los parámetros de la curva se obtuvo el valor asintótico de OTUs esperado al acumular muestras de *C. pubescens* y el esfuerzo de muestreo necesario para completar la recolección de individuos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSION

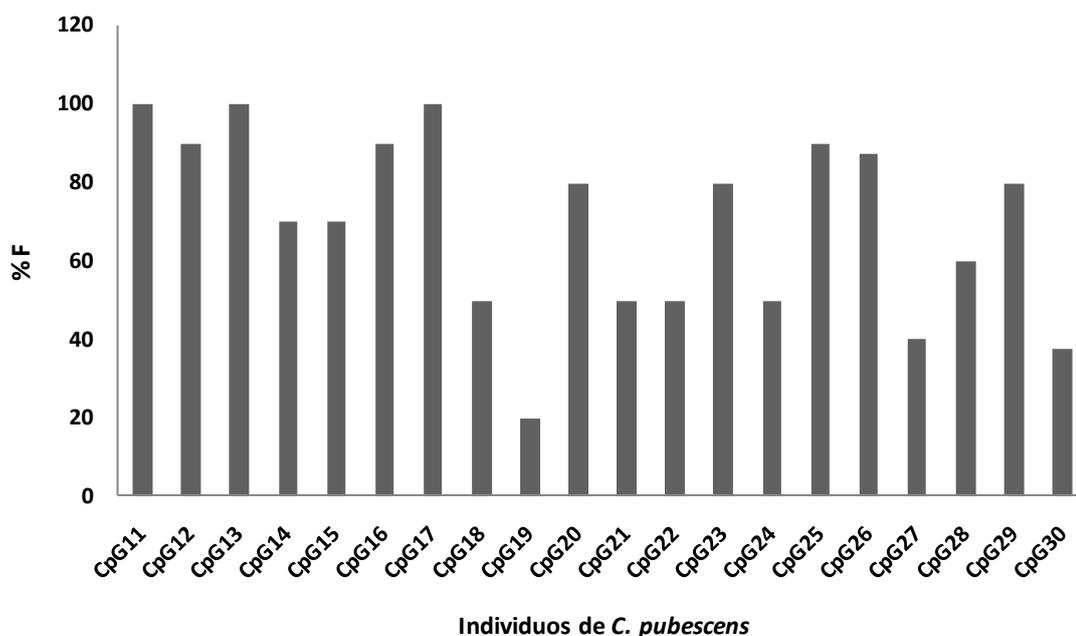
4.1 Muestreo.

En total se muestrearon 20 individuos de *C. pubescens*. Cinco a seis fragmentos de raíz (aproximadamente 5 cm) de cada individuo fueron usados para los análisis de identificación. Cada uno de los fragmentos fue dividido en dos partes, una de ellas se empleó para el análisis del porcentaje de colonización y la otra mitad para el análisis molecular.

4.2 Porcentaje de colonización.

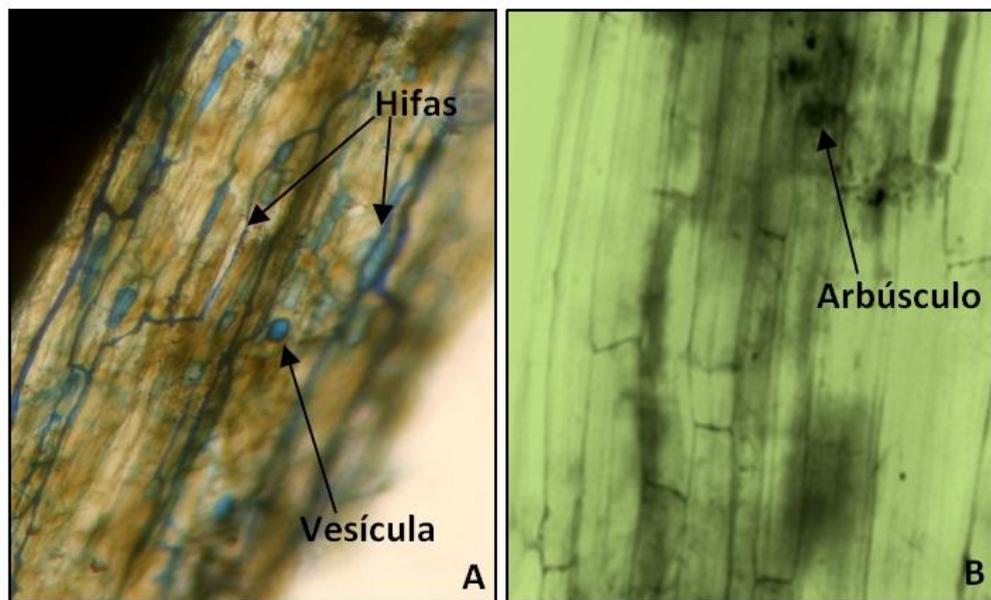
Se determinó el porcentaje de colonización total por hifas, vesículas y arbuscúlos de 20 muestras de la especie *C. pubescens* a través de sus raíces, usando el método de Phillips & Hayman (1970). Bajo el microscopio se observó que todos los fragmentos de raíz, teñidos con azul de metileno, estaban colonizados por HMA y de acuerdo a la estimación de micorrización según Trouvelot, *et al.* (1986) obtenida a través del software MycoCalc, presentaron una Frecuencia (%F) de 20% a 100% (**Figura 6**), lo cual concuerda con Schmidt & Scow (1986), que analizaron morfológicamente estructuras de HMA asociados a algunas plantas introducidas en la Isla Santa Cruz, entre ellas, *C. pubescens*, demostrando alta presencia de HMA. Las raíces colonizadas se usaron para la extracción de DNA.

Figura 6. Porcentaje de colonización por HMA, en raíces de *C. pubescens*.



En las raíces de *C. pubescens* se encontraron más frecuentemente hifas, vesículas y más raramente arbuscúlos de HMA (**Figura 7**). Según Covacevich *et al.* (2001), la técnica empleada es confiable para determinar el porcentaje de colonización en este tipo de raíces mediante el método de Trouvelot, *et al.* (1986). Existen otros métodos como el de Giovanetti-Mosse (1980), con el que se podría obtener porcentajes de Frecuencia de micorrización (%F) ligeramente más altos, pero con igual abundancia arbuscular que el de Trouvelot, *et al.* (1986) (Covacevich *et al.*, 2001).

Figura 7. Estructuras micorrízicas de HMA colonizando raíces de *C. pubescens*. **A)** Hifas, vesícula **B)** Arbúsculo.



Las hifas, y vesículas, a diferencia de los arbuscúlos, se observaron en todas las muestras de raíz colectadas. Al observar bajo el microscopio las placas teñidas se constató una abundante presencia de hifas y vesículas frente a una ausencia mayoritaria de arbuscúlos. Es bien conocido que los arbuscúlos tienen una vida corta (cuatro a cinco días; Guerrero, 1996; Rocha *et al.*, 2009), y cuando estos mueren son reemplazados por otros más jóvenes, siempre y cuando esté activo el intercambio de nutrientes (Cardona, 2000; Guerrero, 1996). Por lo tanto, podemos inferir que los arbuscúlos en nuestras muestras pudieron haberse degradado luego del muestreo. Aunque puede haber más razones, como por ejemplo, que las raíces muestreadas no contenían una suficiente cantidad de arbuscúlos formados debido a su constante degradación para el intercambio de nutrientes.

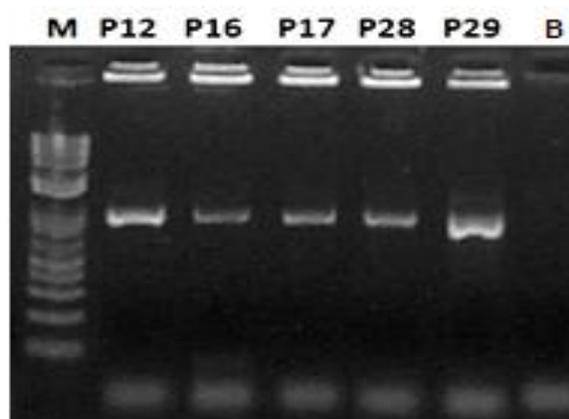
4.3 Análisis moleculares.

Se extrajo el DNA total de las 20 muestras, y todas se amplificaron mediante PCR usando los cebadores específicos para *Glomeromycota* AML1/AML2 (**Figura 8**). Esta combinación de cebadores permite la amplificación de todos los subgrupos de HMA, excluyendo secuencias de otros organismos, y otorgando una rápida detección e identificación directamente desde las raíces provenientes de muestras de campo (Lee *et al.*, 2008). Haug *et al.* (2013) utilizó los mismos cebadores para determinar la diversidad molecular de HMA en algunas especies forestales de un bosque prístino en la Reserva Biológica San Francisco (RBSF), al sur del Ecuador. Según sus resultados, la aplicación de estos cebadores permite una buena detección de los diferentes grupos de HMA.

Dos de las muestras no pudieron ser amplificadas en la PCR directa con los cebadores específicos AML1/AML2, por lo que fueron amplificadas mediante una PCR anidada (*nested PCR*) con cebadores generales NS1/NS4 en la primera PCR, y con cebadores específicos AML1/AML2 en la segunda PCR. Este tipo de PCR anidada facilita la amplificación de genes de HMA especialmente cuando el DNA fúngico en la muestra está en una menor cantidad.

En la clonación molecular (*cloning*) se tomaron 12 colonias o clones por cada muestra para comprobar la inserción del gen objetivo, de los cuales fueron secuenciados un promedio de 8 clones por individuo. Nuestro principal objetivo fue evaluar la diversidad de hongos micorrízicos, y mientras más colonias se tomen mayor puede ser la probabilidad de encontrar más secuencias de hongos distintos. Sin embargo, nos hemos limitado debido al costo de secuenciación.

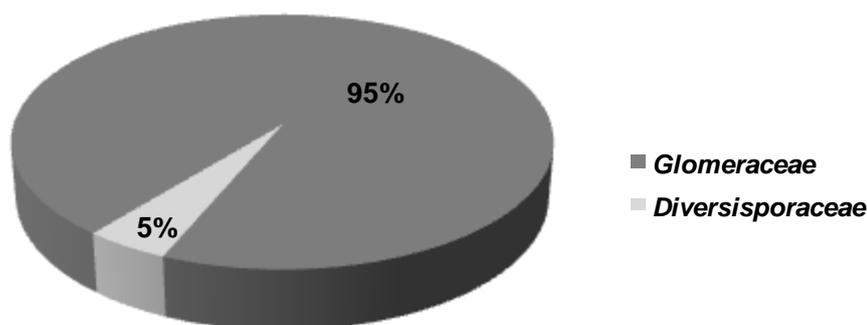
Figura 8. Electroforesis en Gel de Agarosa 0.7%, con productos de PCR amplificados con los cebadores AML1/AML2 de las muestras P12, P16, P17, P28, P29 y B (Blanco). Peso aproximado de las bandas: 800pb.



4.4 Análisis filogenético y determinación de OTUs.

A partir de las 20 plantas se obtuvieron 155 secuencias de buena calidad, y mediante la comparación en BLAST se determinó preliminarmente que el 85.8% de ellas (133 secuencias) pertenecieron a *Glomeromycota*, agrupándose entre los órdenes *Glomerales* (*Glomeraceae*) (127; 95,5%) y *Diversisporales* (*Diversisporaceae*) (6; 4.5%) (**Figura 9**). Las secuencias obtenidas de la región 18S de nrDNA fueron de aproximadamente 800 bp de longitud (**Figura 8**).

Figura 9. Porcentaje total de familias de HMA en raíces de *C. pubescens*.



Con un umbral del 97% de similaridad de secuencias para la región 18S de nrDNA, se identificaron 9 OTUs y con un umbral del 99% de similaridad de secuencias se obtuvieron 18 OTUs. Evidentemente el número de OTUs obtenidas se incrementó cuando el porcentaje de similaridad de secuencias usado para determinar OTUs fue incrementado (**Tabla 2**).

Tabla 1. OTUs de HMA en *C. pubescens* observadas a dos umbrales diferentes.

Porcentaje de similaridad usado para determinar OTUs de HMA en <i>C. pubescens</i>	Número de OTUs observados
97%	9
99%	18

Las OTUs obtenidas con los dos umbrales fueron mapeadas en el árbol filogenético inferido con el análisis de ML (**Figura 10**). En color verde se indican las OTUs obtenidas con el 97% de similaridad de secuencias y en rojo se indican las OTUs obtenidas con el umbral del 99% de similaridad de secuencias.

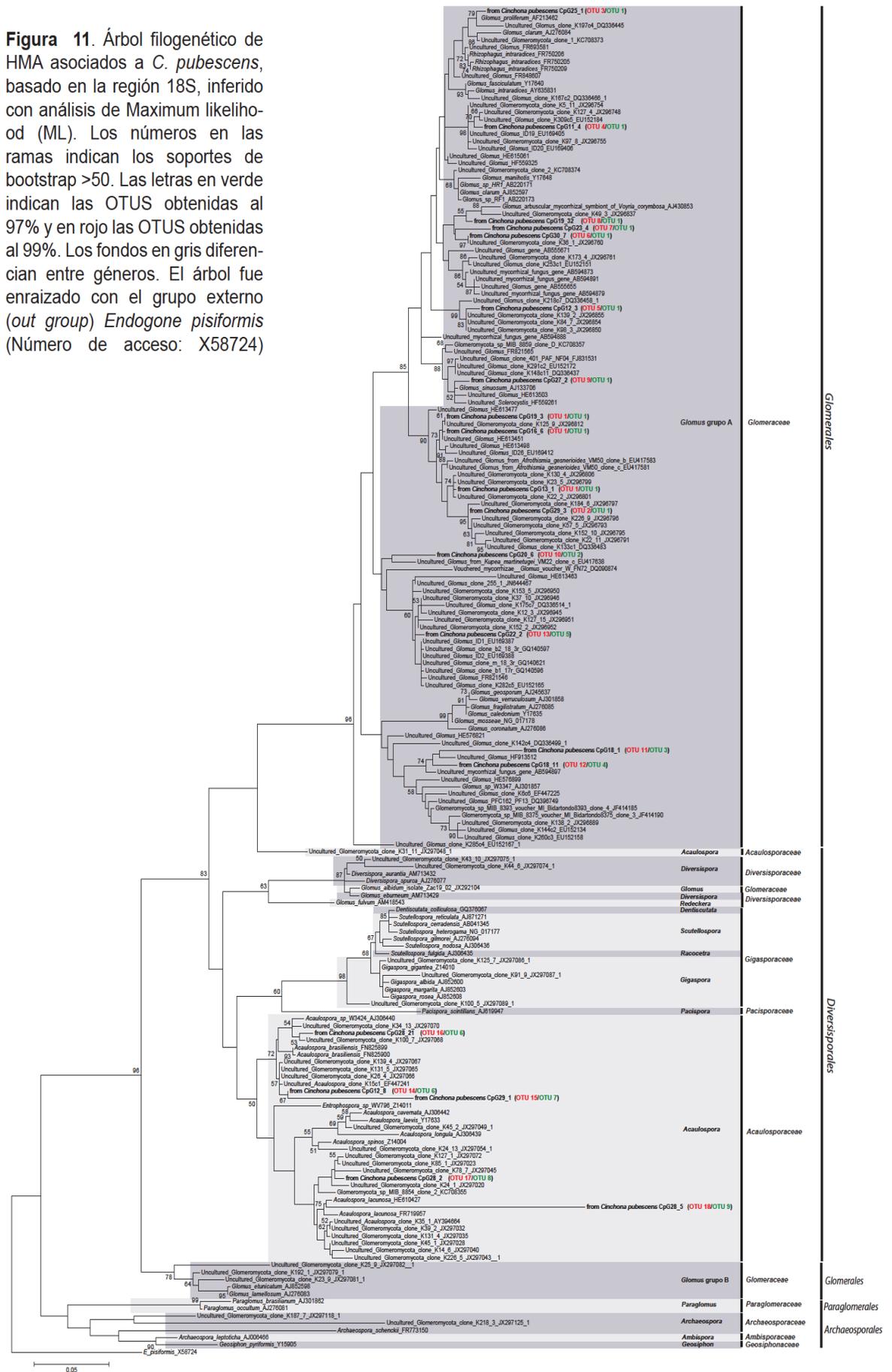
Con un 97% de similaridad de secuencias se mapearon 9 OTUs (OTU 1 - OTU 9). La OTU 1 contiene el mayor número de secuencias (**Figura 10**). Todos los clados en los que se representa a cada OTU se encuentran soportados por altos valores de *bootstrap* (>79%). Además cada OTU pertenece a clados separados, con excepción de OTU 6 que está dividida en dos clados distintos. La OTU 1 contiene secuencias únicas (**Figura 10**).

Con un 99% de similaridad de secuencias se mapearon 18 OTUs (OTU 1 - OTU 18). Nuevamente la OTU 1 contiene el mayor número de secuencias (**Figura 10**). Todos los clados se encuentran soportados por altos valores de *bootstrap* (>68%). Además cada OTU pertenece a clados separados, con excepción de OTU 1 que está dividido en dos clados distintos. Tres de las OTUs definidas presentan secuencias únicas (OTU 1, OTU 3 y OTU 6; **Figura 10**).

Una secuencia de cada OTU, con excepción de OTU 1 (dos secuencias), fue utilizada para construir un árbol filogenético junto con 166 secuencias más parecidas obtenidas desde el GenBank (**Figura 11**). Igual que en la **Figura 10**, se marcan las OTUs obtenidas en colores verde (97% de similaridad de secuencias) y rojo (99% de similaridad de secuencias).

Las OTUs obtenidas corresponden a las familias *Glomeraceae* y *Diversisporaceae* (**Figura 11**). Las OTUs 1, 2, 3, 4 y 5 obtenidos con el umbral del 97% corresponden a *Glomus* grupo A y las OTUs 6, 7, 8, y 9 al género *Acaulospora*. 11 de las OTUs obtenidas con el umbral de 99% de similitud de secuencias corresponden a *Glomus* (*Glomus* grupo A) (OTUs 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 y 13), una a *Rhizophagus* (*Glomus* grupo A) (OTU 3), una a *Sclerocystis* (*Glomus* grupo A) (OTU 9) y cinco a *Acaulospora* (OTUs 14, 15, 16, 17 y 18; **Figura 11**).

Figura 11. Árbol filogenético de HMA asociados a *C. pubescens*, basado en la región 18S, inferido con análisis de Maximum likelihood (ML). Los números en las ramas indican los soportes de bootstrap >50. Las letras en verde indican las OTUS obtenidas al 97% y en rojo las OTUS obtenidas al 99%. Los fondos en gris diferencian entre géneros. El árbol fue enraizado con el grupo externo (*out group*) *Endogone pisiformis* (Número de acceso: X58724)



Algunas de las secuencias usadas para la construcción del árbol filogenético (**Figura 11**) colectadas en el *GenBank* (e.g. JX296755) se agruparon claramente con las secuencias obtenidas en este estudio. La mayoría de nuestras OTUs son muy similares a los hongos encontrados por Haug *et al* (2013), en un estudio realizado en varias especies de plantas de bosque prístino (*Cedrela montana*, *Tabebuia chrysantha*, *Nectandra membranacea*, *Ageratina dendroides*, *Heliocarpus americanus*, *Hyeronima moritziana*, *Myrsine cf. Andina*, *Prunus cf. Opaca*, *Juglans neotropica*, *Brachyotum rotundifolium*, *Guarea kunthiana*, *Melinis minutiflora*, *Clusia sp.* *Setaria sphacelata*) de la Reserva Biológica San Francisco (RBSF) al sur de Ecuador (Haug *et al.* 2013). Basados en este estudio resulta interesante saber que los HMA asociados a *C. pubescens* en las islas Galápagos, se están compartiendo en especies de plantas de Ecuador continental, incluso algunos de ellos (e.g. JX296812) son exactamente el mismo tipo de secuencia. Esto sugiere que estos hongos son generalistas y tendrían una alta distribución. Queda en duda conocer si fueron llevados con las plantas cuando fueron introducidas en la isla, o estaban ya habitando en este territorio. Sin embargo, como era de esperar algunas de nuestras OTUs detectadas (OTUS 2, 3, 7, 9 a 97% y OTUs 10, 11, 15, 18 a 99%, respectivamente) son nuevos o al menos diferentes a los publicados en el *GenBank*. Muy probablemente éstos podrían ser HMA nativos de la isla Santa Cruz (**Figura 11**).

Este resultado sugiere que los HMA generalistas en *C. pubescens* no son la razón principal de la invasión de la planta en las islas Galápagos, por lo que esta característica más bien se puede deber a los hongos más raros o específicos de *Cinchona* en la isla o a factores exclusivamente ecológicos. Schmidt & Scow (1986), comentaron que se debe considerar factores no solo relacionados con la presencia de HMA para determinar cuáles de ellos le otorgan capacidad invasiva a las plantas introducidas. Jäger *et al.* (2007) describe a *C. pubescens* como un “ingeniero del ecosistema” que actúa influenciando la disponibilidad de recursos por alteración de las características bióticas o abióticas del ecosistema. Estas especies introducidas a menudo provocan una cascada de efectos en la biota residente por la modificación física del medio ambiente, favoreciendo por ejemplo la aparición de especies raras como epífitas en los troncos de *C. pubescens* (Jäger *et al.* 2007).

Considerando los factores ecológicos, en cuanto a la invasión, Jäger *et al.* (2007) considera que la sombra sería clave en la adaptación de la especie a este tipo hábitat. Por ejemplo, en zonas con escasez de árboles o arbustos, el surgimiento de *C. pubescens* produjo un 85% de reducción de la radiación solar para las especies nativas, afectándolas gravemente en su desarrollo. Claramente esta planta no tiene competidores por la luz en la isla, a diferencia de las que se encuentran en los bosques tropicales de Ecuador continental

donde la cantidad de especies competidoras es muy grande, y no tiene el mismo desarrollo y capacidad reproductiva que en Galápagos, encontrándose en peligro de extinción. Como es de esperar, cuando la planta tiene competidores pero presenta codominancia, como en el caso de la zona de *Miconia* (Isla Santa Cruz, Galápagos), con *Miconia robinsoniana*, la planta no produce el mismo efecto ecológico negativo como en otras zonas de la isla donde es absolutamente dominante y ha desplazado a especies nativas.

El suelo volcánico es otro de los factores importantes en el desarrollo de *C. pubescens*, pues tiene bajos niveles de nitrógeno y fósforo, y a decir de Jäger *et al.* (2007), la planta podría beneficiarse de la toma de dichos nutrientes al asociarse con HMA (Jäger *et al.* (2007; Schmidt & Scow 1986). Aún queda mucho por estudiar con respecto a los factores ecológicos importantes en la adaptabilidad y desarrollo de la planta en Galápagos, pero en un trabajo paralelo Heinke Jäger, estudia estos posibles factores y su influencia en la adaptación de esta especie en las islas Galápagos.

4.5 Riqueza de OTUs de HMA en *C. pubescens*.

La OTU más frecuente en la comunidad de HMA de *C. pubescens* fue la OTU 1 con ambos umbrales al 97% y al 99% de similaridad de secuencias, que representa el 66.16% con presencia en 18 individuos y 28.57% con presencia en 11 individuos, respectivamente. Dumbrell *et al.* (2010), encontró porcentajes de abundancia similares para una sola OTU, y manifiesta que las comunidades de HMA son típicamente dominadas por un único taxón, representando un porcentaje sobre el 40% del total de abundancia (**Figuras 12 y 13**). Esto sugiere que la OTU 1 (97% y 99%) y las OTU 2 (97%), 10 y 5 (99%) pueden ser hongos más generalistas, por su frecuencia en los 20 individuos analizados y corresponden mayoritariamente a *Glomus* grupo A, que está dominando la comunidad de HMA presentes en las muestras analizadas. A pesar de esto, la OTU 2 (97%) y la OTU 10 (99%) son hongos muy poco parecidos a los ya reportados en el *GenBank*, por lo que puede tratarse de hongos propios de la isla o específicos de *C. pubescens*. Por otro lado la OTU 1 (97%) y la OTU 5 (99%) fueron muy parecidas a los hongos encontrados en el bosque prístino de la RBSF (Haug *et al.* 2013), lo cual también demuestra un conjunto de hongos de amplia distribución (**Figuras 12 y 13**). El resto de los OTUs encontrados son hongos muy poco frecuentes, la mayoría como secuencias solas o “*singletons*”. De ellos los OTUs 2, 3, 7 y 9 (97%) y los OTUs 10, 11, 15 y 18 (99%) son secuencias nuevas que también podrían ser propios del sitio de estudio o específicos de *C. pubescens* en las islas Galápagos. Estos hongos raros o específicos pueden ser la causa de la adaptación de *C. pubescens* en las islas. Pero para comprobar esta hipótesis se necesitan estudios comparativos con *C. pubescens* nativa de la zona continental en Ecuador.

Figura 12. Frecuencia de OTUs obtenidas desde 20 individuos de *C. pubescens*, definidas con umbral de 97% de similaridad de secuencia. En la gráfica se observa el número de individuos en los que se presenta cada una de las 9 OTUs.

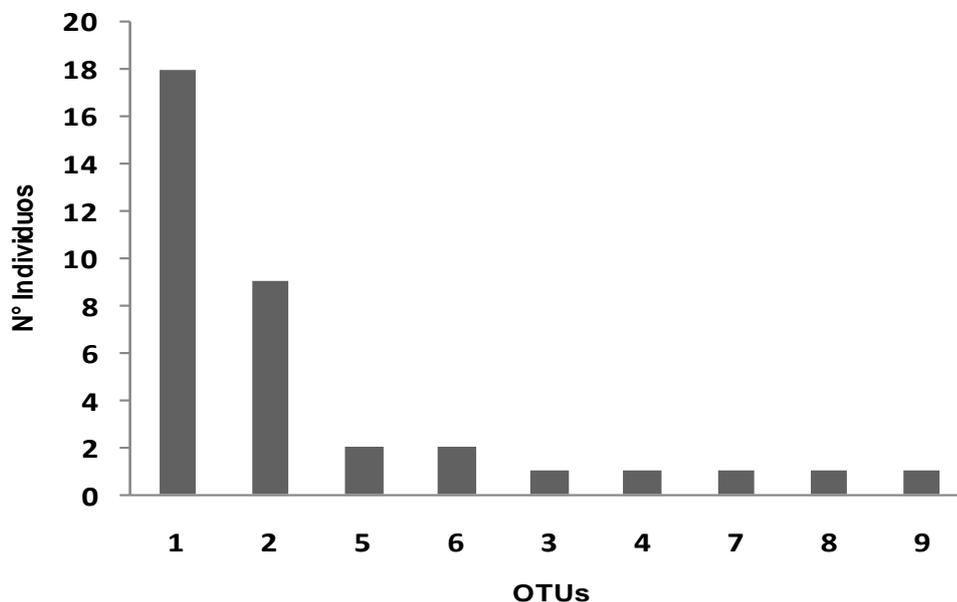
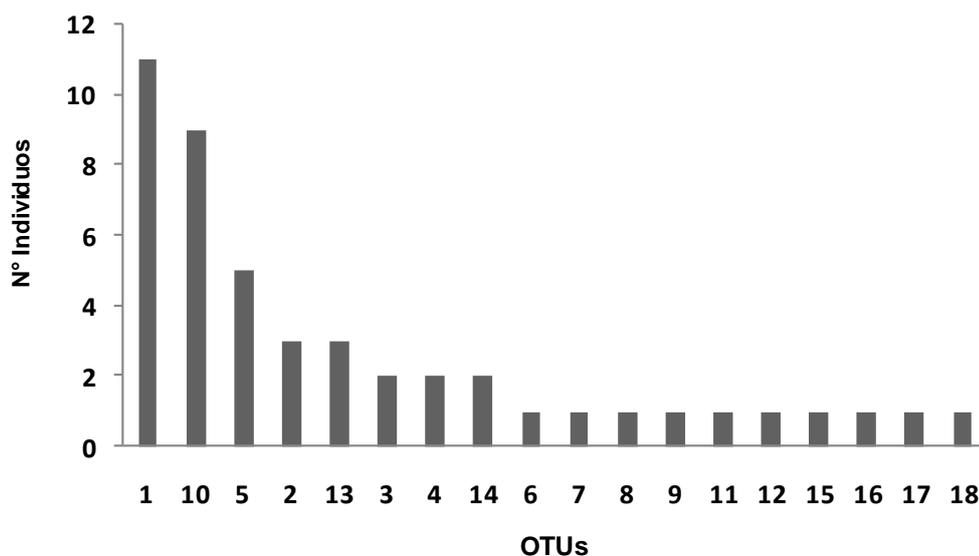


Figura 13. Frecuencia de OTUs obtenidas desde 20 individuos de *C. pubescens*, definidas con umbral de 99% de similaridad de secuencia. En la gráfica se observa el número de individuos en los que se presenta cada una de las 18 OTUs.



Las curvas de acumulación de OTUs en plantas de *C. pubescens* para los umbrales 97% y 99% no llegaron a la asíntota (**Figura 14**), y se estimó una riqueza de 13 y 31 OTUs respectivamente. Las pendientes para cada curva fueron superiores a 0.1 (**Tabla 3**), lo cual

indicó un muestreo incompleto. La proporción de OTUs registrada fue de 68% y 57% en cada umbral y el esfuerzo de muestreo para registrar un 95% de OTUs en *C. pubescens* debería ser de al menos 199 y 288 muestras para los umbrales 97% y 99%, respectivamente (**Tabla 3**). Como se puede notar aún se necesita un esfuerzo de muestreo mucho mayor para completar la riqueza estimada de los HMA en *C. pubescens*, con lo que se esperaría obtener la diversidad total de hongos asociados a esta planta en la isla Santa Cruz.

Figura 14. Curva de acumulación de OTUs en *C. pubescens*. En el eje X se muestra el esfuerzo de muestreo efectuado (n ; número de muestras). El eje Y representa el número de OTUs encontradas por cada número de muestras colectadas. Línea sólida gris: curva obtenida con un umbral de 97% de similaridad de secuencias. Línea sólida color negro: curva obtenida con un umbral de 99% de similaridad de secuencias. Guión gris: asíntota predicha por la función para un umbral de 97% (13.15 especies). Guión negro: asíntota predicha por la función para un umbral de 99% (30.99 especies).

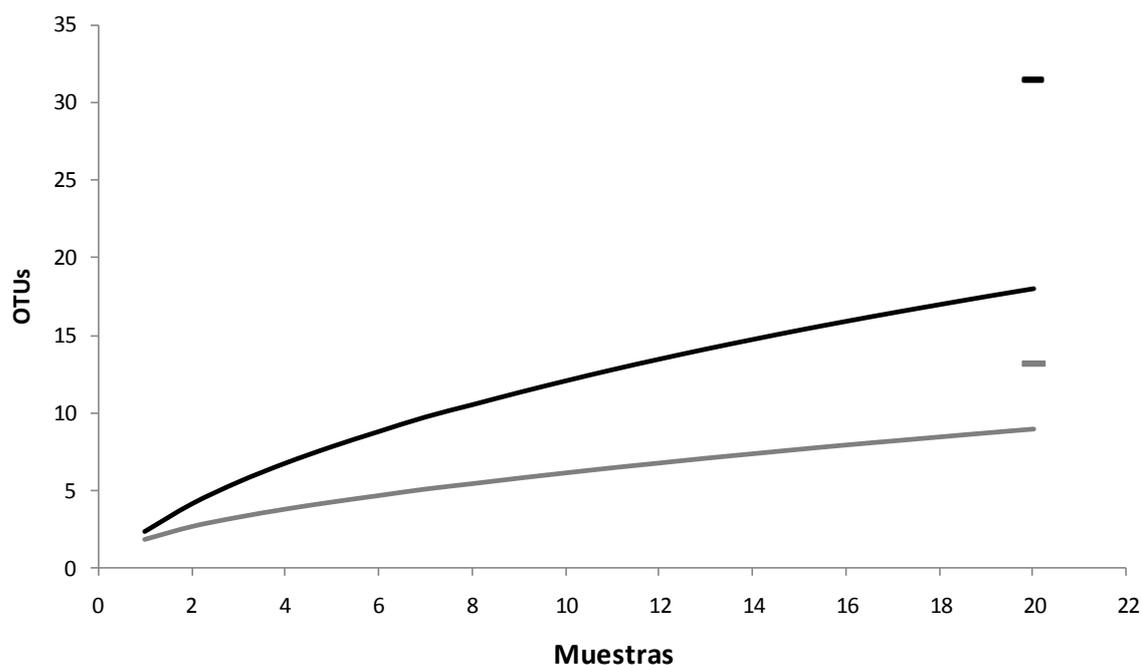


Tabla 3. Proporción de OTUs de HMA registradas en raíces de *C. pubescens*.

Umbral	Pendiente final de la curva para Clench	Proporción de especies registrada	Esfuerzo de muestreo
Umbral 97%	0.149	68%	199
Umbral 99%	0.380	57%	288

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES
Y
RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Hibbett *et al.* (2011) sugiere que a las OTUs bien soportadas se les debe dar nombres idénticos a los que correspondan en su forma a los de taxones ya descritos, y que podrían integrarse perfectamente en las bases de datos taxonómicas existentes. Con este estudio se definieron un total de 9 y 18 OTUs con umbrales de 97% y 99%, respectivamente, demostrando una alta diversidad de HMA en *C. pubescens*. De la riqueza de OTUs presentes en las raíces de *C. pubescens*, se determinó una presencia mayoritaria del género *Glomus* (*Glomus* grupo A), abarcando más del 50% de la diversidad de HMA asociada a *C. pubescens* en las islas Galápagos. Sin embargo no es el único género presente en las muestras analizadas, pues también se presentaron los géneros *Rhizophagus* (*Glomus* grupo A), *Sclerocystis* (*Glomus* grupo A) y *Acaulospora*. Como se comentó, no solo la presencia de HMA influencia la diversidad de las plantas; la composición y la diversidad de la comunidad de HMA también afectan a la diversidad y la productividad vegetal. Los resultados de Hart & Klironomos (2002) indican que donde hay mayor diversidad de HMA en cuanto a géneros, es mayor la productividad de las plantas, que también puede ser interpretado como capacidad de adaptación para *C. pubescens* en la Isla Santa Cruz. Sin embargo, se debe considerar los otros factores ambientales en la adaptabilidad de la planta al medio.

Pese a necesitar un mayor esfuerzo de muestreo de individuos de *C. pubescens*, el estudio muestra claramente la diversidad de la comunidad de HMA presente en la especie. Este representa el primer análisis de identificación molecular de HMA en *C. pubescens* y por ende una referencia para próximos estudios sobre estas comunidades de hongos en especies del género *Cinchona*, especialmente en los bosques del sur de Ecuador, como en la provincia de Loja, donde en las últimas décadas ha sido explotada y actualmente es una especie en peligro de extinción. Frente a este tipo de problemas, el conocer cuales son los hongos y su diversidad podría ayudarnos a plantear medidas de conservación para este tipo de especies.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Solís, M. (1945). *Botánica de las Cinchonas*. Quito: Editorial Flora. Instituto Ecuatoriano de Ciencias Naturales.
- Acosta-Solís, M. (1947). *Cinchonas del Ecuador*. Quito: Editorial del Ecuador.
- Andersson, L. & Taylor, C. (1994). *Rubiaceae-Cinchoneae-Coptosapelteae*. En: Harling, G. & Andersson, L. (Eds), *Flora of Ecuador* (50, p. 114). Council for Nordic Publications in Botany. Museo Botánico.
- Blaxter, M. (2004). The promise of a molecular taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 359, 669–679.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell B., Grove, T., Malajczuk, N. (1996). *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. Australia: ACIAR Monograph.
- Buddenhagen, C., Renteria, J., Gardener, M., Wilkinson, S., Soria, M., Yanez, P., Tye, A., Valle, R. (2004). The Control of a Highly Invasive Tree *Cinchona pubescens* in Galápagos. *Weed Technology*, 18, 1194-1202.
- Buevas, O. & Peñates, W. (2008). *Caracterización de géneros de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) y vesículo arbusculares (HMVA) nativas, asociadas con el pasto angleton (Dichanthiu maristatum), bajo diferentes fuentes de abonamiento en la hacienda Casanare, Municipio de Tolú, Sucre*. (Tesis de grado). Universidad de Sucre, Sucre.
- Buitrón, X. (1999). *Ecuador: uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación*. Ecuador: TRAFFIC International.
- Cardona, G. (2000). *Ocurrencia y cuantificación de hongos formadores de micorriza arbuscular asociados a las especies del genero Capsicum cultivadas en la Amazonía Colombiana*. (Informe técnico). Colombia: Instituto Amazónico de investigaciones científicas SINCHI.
- Castillo, C. (2005). *Biodiversidad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares en ecosistemas agro-forestales del centro sur de Chile*. (Tesis de Doctoral). Universidad de la Frontera, Temuco, Chile.

- Colwell, R., Mao, C., Chang, J. (2004). Interpolando, extrapolando y comparando las curvas de acumulación de especies basadas en su incidencia. *Ecology*, 85 (10), 2717-2727.
- Colozzi, F. & Cardoso, E. (2000). Detecção de fungos micorrízicos arbusculares em raízes de cafeeiro e de crotolária cultivada na entrelinha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35 (10), 2033-2042.
- Covacevich, F., Echeverría, H., Aguirrezabal, L. (2001). Comparación de dos técnicas de cuantificación de infección micorrítica. *Ciencia del Suelo*, 19 (2), 155-158.
- Cuvi, N. (2009). Ciencia e imperialismo en América Latina: La misión de Chinchona y las estaciones agrícolas cooperativas (1940 – 1945). (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Douds, D. & Millner, P. (1999). Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agriculture, ecosystems & environment*, 74, 77-93.
- Dumbrell, A., Nelson, M., Helgason, T., Dytham, C., Fitter, A. (2010). Idiosyncrasy and overdominance in the structure of natural communities of arbuscular mycorrhizal fungi: is there a role for stochastic processes?. *Journal of Ecology*, 98, 419-428.
- Ecuador. (2004-2010). *Isla Santa Cruz*. Ecuador. Recuperado en Septiembre de 2013 desde: <http://www.ecuale.com/galapagos/santacruz.php>.
- Escalante T. (2003). ¿Cuántas especies hay?, los estimadores no paramétricos de Chao. *Elementos*, 52, 53-56.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Franco, A. (2005). *Estudio fisiológico y molecular de especies Ocratoxigénicas*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Garmendia, A. (2005). *El árbol de la quina (Cinchona spp.), Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura*. Loja, Ecuador: Editorial Universidad Técnica Particular de Loja.

- Gascuel, O. (1997). BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology Evolution*, 14, 685-695.
- Giovanetti, M. & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84, 489-500.
- Göeeker, M., García, G., Voglmayr, H., Tellería, M., Martín, M. (2009). Molecular taxonomy of phytopathogenic fungi: a case study in *Peronospora*. *PLoS One*, 29, e6319.
- Guachón, T. & Prado, M. (2012). *Evaluación del efecto del inóculo Micorrízico arbuscular en el crecimiento de Cinchona pubescens y Cinchona officinalis en condiciones de vivero*. (Tesis de Grado). Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.
- Guerrero, E. (1996). *Micorrizas recurso biológico del suelo*. Bogotá, Colombia: Fondo FEN Colombia.
- Guzman, S. & Farías, J. (2005). Biología y regulación molecular de la micorriza Arbuscular. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 9, 17-31.
- Hart, M. & Klironomos, J. (2002). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem functioning. En: M. van der Heijden & I. Sanders (Eds.), *Mycorrhizal Ecology* (pp. 225-242). Ecological Studies, Vol. 157. Springer-Verlag, Berlin.
- Haug, I., Setaro, S., Suárez, J. (2013). Reforestation Sites Show Similar and Nested AMF Communities to an Adjacent Pristine Forest in a Tropical Mountain Area of South Ecuador. *PLoS ONE*, 8 (5), e63524.
- Hawksworth, D. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105, 422-432.
- Herrera, P. (2012). *Diversidad molecular de MOTUs de Tulasnellales en orquídeas epífitas y terrestres en un bosque tropical montano lluvioso del sur de Ecuador*. (Tesis de Maestría). Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, España.
- Hibbett, D., Ohman, A., Glotzer, D., Nuhn, M., Kirk, P., Nilsson, R. (2011). Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews*, 25, 38-47.

- Jäger, H., Alencastro, M., Kaupenjohann, M., Kowarik, I. (2013). Ecosystem changes in Galápagos highlands by the invasive tree *Cinchona pubescens*. *Plant Soil*.
- Jäger, H., Kowarik, I., Tye, A. (2009). Destruction without extinction: long-term impacts of an invasive tree species on Galápagos highland vegetation. *Journal of Ecology*, 97, 1252-1263.
- Jäger, H., Tye, A., Kowarik, I. (2007). Tree invasion in naturally treeless environments: Impacts of quinine (*Cinchona pubescens*) trees on native vegetation in Galápagos. *Biological Conservation*, 140 (3-4), 297–307.
- Jiménez, A. & Hortal, J. (2003). Las curvas de acumulación de especies y la necesidad de evaluar la calidad de los inventarios biológicos. *Revista Ibérica de Aracnología*, 8, 151-161.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., Miyata, T. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, 33, 511-518.
- Kirk, P., Cannon, P., Minter, D., Stalpers, J. (2008). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. (10a.ed). Wallingford, UK: CAB International.
- Krüger, M., Stockinger, H., Krüger, C., Schüßler, A. (2009). DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 183, 212-223.
- Lee, J., Lee, S., Young, J. (2008). Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS microbiology ecology*, 65 (2), 339-49.
- Leon, D. (2006). *Evaluación y caracterización de micorrizas arbusculares asociadas a yuca (manihote sculenta sp) en dos regiones de la amazonía colombiana*. (Tesis de Grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Madsen, J. (2002). Historia cultural de la cascarilla de Loja (pp. 385-399). En: Z. Aguirre, J. Madsen, E. Cotton, H. Balslev (eds.), *Botánica Austroecuatoriana: Estudio sobre los recursos vegetales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe*. Quito, Ecuador: Ediciones Abya Yala,

- Mahecha, G., Ovalle, A., Camelo, D., Rozo, A., Barrero, D. (2004). Vegetación del territorio: 450 especies de sus llanuras y montañas, Bogotá, Colombia 871.
- Montaño, N., Camargo, S., García, R., Monroy, A. (2007). *Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos (Arbuscular mycorrhizae in arid and semiarid ecosystems)*. Distrito Federal, México: Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, Mundi-Prensa SA de CV, UAM Iztapalapa, FES Zaragoza, UNAM.
- Montealegre, J. (2002). *Micología. Cátedra de Microbiología General*. Depto. de Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile.
- Ochoa, D. (2008). *Caracterización molecular de 60 hongos que forman parte del cepario micológico del C.B.C.M. de la universidad técnica particular de Loja*. (Tesis de Grado). Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.
- Ortega, F. (2008). *Sales de amonio de Cinchona como órgano catalizadores en síntesis asimétrica*. (Tesis de Doctoral), Alicante, España.
- Palacios, J. (1993). *Efecto de la Cinchona pubescens Vahl sobre la comunidad de Miconia robinsoniana Cong. En la isla Santa Cruz, Galápagos*. (Tesis de grado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Pérez, A., Rojas, J., Montes, D. (2011). Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el caribe colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 3 (2), 366-385.
- Phillps, J. & Hayman, D. (1970). Improve procedure for clearing roots and stainin parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid asesment of infection. *Transactions of British Mycological Society*, 55, 158-161.
- Pontón, J., Moragues, M., Gené, J., Guarno, J., Quindos, G. (2002). Hongos y Actinomicetos alergénicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22-23.
- Redecker, D. (2000). Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* (2000), 10, 73-80.

- Requena, N. (1996). *Exploración de la biodiversidad microbiana (hongos de las micorrizas arbuscula-Rhizobium-Rizobacterias) en un ecosistema mediterráneo desertificado dirigida a una estrategia de revegetación*. (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, España.
- Rocha, L., Ramos, C., Rosales, C. (2009). *Multiplicación de Hongos Micorrízicos arbusculares MA nativos de cultivos de cacao (Theobroma cacao), en Maiz (Zea mays), bajo distintos tratamientos agronómicos*. (Tesis de Grado). Valledupar, Colombia.
- Said, N., Fernández, J., Acevedo, E. (2007). Aplicación de técnicas de Biología molecular y análisis bio-informático en la tipificación de levaduras nativas procedentes de diversos ambientes. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105, 1413-1421.
- Schmidt, S. & Scow, K. (1986). Mycorrhizal fungi on the Galápagos Islands. *Biotropica*, 18 (3), 236-240.
- Schüßler, A. & Walker C. (2010). *The Glomeromycota. A species list with new families and new genera*. Gloucester, Inglaterra.
- Simard, S. & Durall, D. (2004). Mycorrhizal networks: a review of their extent, function and importance. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1140-65.
- Simard, S., Perry, D., Jones, M., Myrold, D., Murall, D., Molina, R. (1997). Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field, *Nature*, 388, 579-582.
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R., Lalonde, M. (1993). Origin and diversification of endomy- corrhizal fungi and coincidence with vascular plants, *Nature*, 363, 67-69.
- Smith, S. & Read, D. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. Reino Unido: Academic Press.
- Starr, F., Starr, K., Loope, L. (2003). *Cinchona pubescens*-Quinine tree *Rubiaceae*. *Geological Survey Biological*, 36.

- Stockinger, H., Krüger, M., Schüßler, A. (2010). DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 187, 461-474.
- Swofford, D. (2003). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4b10. Sunderland MA: Sinauer Associates.
- Taber, R., Worthington, J., Trappe, J., Taber, W. (1982). Mycorrhizal fungi associated with native and improved varieties of pecan in Texas, *Phytopathology*, 72, 951.
- Tapia, J. (2003). *Identificación de Hongos Micorrizicosarbusculares aislados de suelos salinos y su eficiencia en plantas de lechuga (Lactuca sativa L.)*. (Tesis Doctoral). Universidad de Colima, Colima, México.
- Tapia J. (2013). Estudio de factibilidad para la producción orgánica y comercialización de Quina (*Cinchona officinalis*) en el cantón Loja. (Tesis de grado). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.
- van der Heijden, M., Klironomos, J., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396, 69-72.
- Sneath, R. & Sokal, P. (1973). Numerical Taxonomy, San Francisco: W.H. Freeman. Medical Research Council Microbial Systematics Unit, Univ. Leicester, England and Dept. Ecology and Evolution, State Univ. New York, Stony Brook, NY.
- Soberón, J & Llorente, J. (1993). The use of species accumulation functions for the prediction of species richness. *Conservation biology*, 7, 480-488.
- Trouvelot, A., Kough, J., Gianinazzi, V. (1986). Mesure du taux de mycorrhization va d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi V and Gianinazzi S. (eds.). *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae* (pp. 217-221). Paris: Inra press.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En Innis M., Gelfand D., Sninsky J., White T., (Eds), *PCR protocols. A guide to methods and applications* (pp. 315-22). San Diego: Academic.

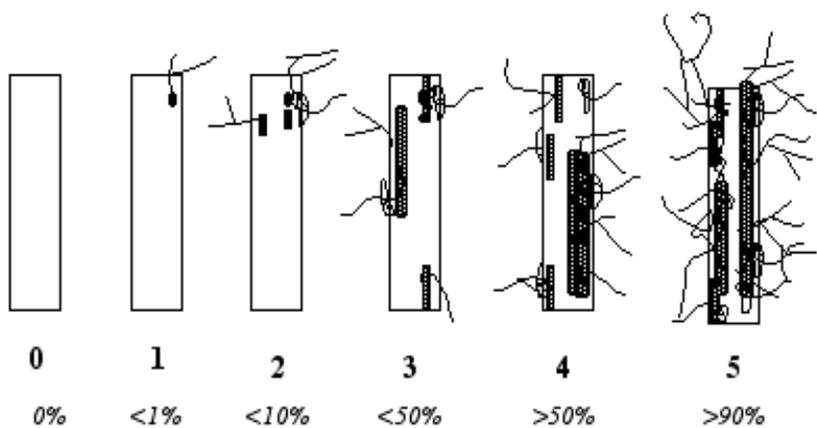
ANEXOS

Anexo 1. Modificación del método de Phillips y Hayman (1974) para la clarificación y tinción de raíces.

- 1.** Desechar el alcohol de las raíces y enjuagar con agua de grifo.
- 2.** Cortar segmentos de aproximadamente 1.5 cm de longitud y colocarlos en tubos Eppendorf de 1.5 ml
- 3.** Adicionar KOH al 10% a las raíces y poner en el bloque calentador a 45°C durante 15-20 minutos. Enjuagar 3 veces con agua de grifo.
- 4.** Adicionar HCl al 10% durante 1 minuto a temperatura ambiente 5. Desechar el HCl y sin lavar, agregar el azul de metileno al 0,05% a 45°C durante 15 minutos.
- 6.** Pasado el tiempo de tinción sacar las raíces y colocarlas en un portaobjetos limpio, agregándoles una gota de Polivinyl-lactoglycerol.
- 7.** Evaluar en el microscopio.

Anexo 2. Estimación de la micorrización según Trouvelot *et al.* (1986).

**SCORING MYCORRHIZAL COLONIZATION
IN CLASSES FROM 0 TO 5**



SCORING ARBUSCULE ABUNDANCE

None : A0
Few arbuscules : A1
Frequent : A2
Abundant : A3

