



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja.

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Identificación de Hongos Micorrízicos Arbusculares en plantas de *Cinchona*
spp. en sitios perturbados y no perturbados de la Provincia de Loja**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Guamán Álvarez, Paola del Cisne

DIRECTOR: Herrera Vargas, Paulo Ignacio, Mgs. BQ.

LOJA – ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Mgs. BQ.

Paulo Ignacio Herrera Vargas.

DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: Identificación de Hongos Micorrízicos Arbusculares en plantas de *Cinchona* spp. en sitios perturbados y en sitios no perturbados de la Provincia de Loja realizado por Paola del Cisne Guamán Álvarez, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por lo que se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Marzo del 2014

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Paola del Cisne Guamán Álvarez, declaro ser autor (a) del presente trabajo de fin de titulación: Identificación de Hongos Micorrízicos Arbusculares en plantas de *Cinchona* spp. en sitios perturbados y no perturbados de la Provincia de Loja, de la Titulación Bioquímico Farmacéutico, siendo Paulo Ignacio Herrera Vargas director (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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.....

Autor: Paola del Cine Guamán Álvarez

Cédula: 1104548670

DEDICATORIA

Quiero dedicar con mucho cariño y de manera especial, mi trabajo de fin de titulación a Dios el dueño de mi vida, a mis Esposo: Leonardo, a mi hijo Jorgito que forman parte de mi motivación e inspiración de mi vida

A mis queridos padres Jorge y María Dolores, por ser los apoyos primordiales en cada momento de mi existencia que durante todos estos años supieron siempre darme apoyo incondicional, palabras de aliento, sin su ayuda no hubiese podido alcanzar este triunfo.

Paola G.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme la sabiduría y valor necesario para llevar con éxito esta investigación. A mis padres, a mi esposo, a mi tía Luz Álvarez, a mi tía Amada Guamán y mis demás familiares, por la confianza y apoyo.

A la Universidad Técnica Particular de Loja en la cual tuve la oportunidad de formarme integral y profesionalmente, al Departamento de Ciencias Naturales por brindarme los medios para llevar a cabo esta investigación.

Agradezco a mi director de tesis, el Mgs. BQ. Paulo Ignacio Herrera Vargas quien compartió sus conocimientos, experiencias y que mucha paciencia fue mi guía, apoyándome en todo momento.

Paola G.

INDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRAC	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I	5
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Generalidades y usos del género <i>Cinchona</i>	5
1.1.1 Generalidades y usos.....	5
1.1.2 Descripción del género.....	5
1.1.3 <i>Cinchona officinalis</i>	6
1.1.3.1 Taxonomía.....	7
1.1.3.2 Ubicación geográfica y distribución de <i>Cinchona officinalis</i>	7
1.1.4 <i>Cinchona pubescens</i>	7
1.1.4.1 Descripción taxonómica.....	8
1.1.4.2 Ubicación geográfica y distribución <i>Cinchona pubescens</i>	8
1.2 Micorrizas.....	9
1.3 Micorrizas Arbusculares	9
Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA).....	10
1.3.1 Morfología de los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA)	10
1.4 Clasificación de Glomeromycota.....	11
CAPÍTULO II	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Área de estudio	16
Muestreo.....	16
2.3 Porcentaje de colonización radical.....	16
2.4 Extracción de DNA y PCR.....	17

2.4.1	Cloning, Secuenciación, determinación de OTUs.....	18
	Riqueza de HMA en sitios perturbados y no perturbados.....	18
2.4.2.....		18
CAPITULO III		17
3. RESULTADOS Y DISCUSION		20
3.1.	Muestreo.....	20
3.2.	Colonización y Observación Morfológica de HMA.....	20
3.3.	Extracción DNA Y PCR.....	20
3.4	Determinación de OTUs	21
3.5	Riqueza de HMA del género <i>Cinchona</i>	23
CONCLUSIONES		27
RECOMENDACIONES		28

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hojas de <i>Cinchona officinalis</i>	7
Figura 2. Árbol de <i>Cinchona pubescens</i>	8
Figura 3. Principales estructuras de una Asociación Micorrízica Arbuscular. En la figura se muestran: apresorio, hifa intracelular, vesícula, hifa intercelular y arbuscúlos.	11
Figura 4. Mapa de la región 18S. Representación esquemática de la región 18S del gen de DNArn con los sitios de anillamiento de los cebadores AML1 y AML2.	13
Figura 5. Proceso de clareo y tinción de raíces.	17
Figura 6: Estructuras de HMA encontradas en las plantas de <i>Cinchona officinalis</i> y <i>Cinchona pubescens</i> .: <i>Arbuscúlos, vesículas e hifas</i> . Escala = 10um con el objetivo de 40.	20
Figura 7: Gel de Agarosa 0.7%, con productos de PCR de las muestras C4, C5, C6, C7, C8, C9 Y B (Blanco) Peso aproximado de las bandas: 800pb.....	21
Figura 9. Curva de Acumulación de OTUs en <i>Cinchona Officinalis</i> y <i>Cinchona pubescens</i> Las líneas de color gris representan los OTUs del bosque perturbado y las líneas negras representan los OTUs del bosque no perturbado, en comparación con las muestras.	23
Figura 10. Frecuencia de HMA en bosque no perturbado, de <i>C. officinalis</i> y <i>C. pubescens</i> los OTUs más frecuentes son el 36 y 53, con menor frecuencia 35,44, 45, 46 y el resto de OTUs se representan como generalista.....	24
Figura 11. Frecuencia de HMA en bosque no perturbado de <i>C. officinalis</i> y <i>C. pubescens</i> los OTUs más frecuentes son el 31 y 35, con menor frecuencia 33,41, 44, y el resto de OTUs se representan como generalista.....	25

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de Glomeromycota	12
Tabla 2: OTUs encontrados en el género <i>Cinchona</i> , con el 3% de diferencia de secuencia.	21
Tabla 3: Índices de presencia de OTUs en raíces de <i>C. officinalis</i> y <i>C. pubescens</i> en bosques perturbado y no perturbados.....	24

RESUMEN

El género *Cinchona*, conocido comúnmente como “cascarilla”, es nativo y endémico del valle de Loja, siendo *C. pubescens* y *C. Officinalis* las especies más conocidas. Debido a su sobreexplotación y a la baja tasa de regeneración en su hábitat natural, estas plantas se encuentran en peligro de extinción. La asociación con hongos micorrízicos arbusculares (HMA), pueden actuar como moduladores de la capacidad de propagación. Mediante la delimitación de Unidades taxonómicas operacionales (OTUs), se investigó la diversidad de HMA en dos especies del género *Cinchona* en bosques con diferente grado de alteración en la provincia de Loja. Con un umbral de 3% de diferencia de secuencias se detectaron 32 OTUs en bosques no perturbados y 35 en bosques perturbados. The two forest types differed significantly in their composition of OTUs. The OTUs belonged to Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales and Archeosporales orders. Even greater sampling effort for the diversity of AMF associated with gender *Cinchona* as a conservation strategy is needed.

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

ABSTRAC

The genus *Cinchona*, commonly known as "husk" is native and endemic to the valley of Loja, being *C. pubescens* and *C. officinalis* the best known species. Due to overexploitation and the low rate of regeneration in their natural habitat, these plants are endangered. The association with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can act as modulators of the ability to spread. By the definition of operational taxonomic units (OTUs), diversity of AMF was investigated in two species of *Cinchona* in forests with different degree of alteration in the province of Loja. With a threshold of 3% sequence difference 32 OTUs were detected in 35 undisturbed and disturbed forests in forests. The two forest types differed significantly in their composition of OTUs. The two forest types differed significantly in their composition of OTUs. The OTUs belonged to Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales and Archeosporales orders. Even greater sampling effort for the diversity of AMF associated with gender *Cinchona* as a conservation strategy is needed.

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

INTRODUCCIÓN

El género *Cinchona* conocida como “cascarilla o árbol de quina”, pertenece a la familia Rubiaceae. Generalmente son árboles de tamaño mediano a pequeño o también arbustos con corteza amarga, son de color verde con pequeñas flores, fabricantes de semillas y pueden alcanzar una altura que puede llegar hasta los 25 metros o un poco más. *Cinchona officinalis* es endémica y *Cinchona pubescens* es nativa de la región sur del Ecuador específicamente del valle de Loja, siendo estas dos especies más conocidas (Garmendia, 2005).

Tradicionalmente el género *Cinchona* ha utilizado con fines medicinales, por cuanto ha sido objeto de sobreexplotación, a tal punto, que ahora no es fácil encontrar poblaciones. Además del uso antropogénico, se ha podido observar que en condiciones naturales el género *Cinchona* presenta baja tasa de germinación y regeneración, encontrándose únicamente en lugares apartados y en pequeños grupos (Buddenhagen. CE, J. Renteria., M. Gardener, S.R. Wilkinson. M. Soria, P. Yanez, A. Tye, and R. Valle. 2004). Por estos motivos, *C. officinalis* y *C. pubescens* están en peligro de desaparición y son consideradas como especies prioritarias de conservación y estudio. En consideración a lo antes mencionado, el estudio de la diversidad de los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), podrían ayudar en el establecimiento de nuevas estrategias de recuperación y conservación.

Los HMA son un grupo de hongos que pertenecen al filum Glomeromycota (Schußler *et al.*, 2001), los más abundantes en el suelo e importantes funcionalmente ya que son generalistas y responsables de la dependencia micotrófica de 90% de las plantas terrestres del planeta (Smith y Read, 2008).

Los HMA caracterizan por la formación de arbusculos, vesículas (en algunas especies) e hifas. El micelio de los HMA permite incrementar el área de absorción de la raíz de la planta (Smith y Read, 1997) facilitando la toma de nutrientes (Colozzi y 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 y Durall, 2004).

Mediante el uso de herramientas moleculares pretendemos obtener secuencias de ADN y determinar la diversidad de HMA mediante OTUs en plantas de *C. pubescens* y *C. officinalis* en bosques perturbados y no perturbados en la provincia de Loja, con la finalidad de aportar información que sea especialmente útil en planes de conservación o recuperación de las especies de *Cinchona*.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades y usos del género *Cinchona*

El género *Cinchona* conocida como cascarilla o quina fue descubierto en Ecuador en el siglo XVII. Ecuador como país originario e histórico de la especie de *Cinchona* “brindó al mundo” uno de los más importantes medicamentos, abasteciendo cerca del 95% de la producción mundial de quina, que fue utilizada 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).

1.1.1 Generalidades y usos

El género *Cinchona* contiene cerca de cuarenta especies de árboles, de los cuales 24 arboles pertenecen a *Cinchona officinalis* que crecen desde 15-20 metros de altura y producen flores de color blanco, rosa o amarillo.

Aproximadamente el 60% de cortezas de *C. officinalis* y *C. pubescens*, se utilizan en la producción de medicamentos y actualmente, quinina es muy utilizada en la industria de alimentos y bebidas, como las aguas tónicas de sabor amargo, el más conocido “gin tonic” que ha conquistado varios mercados europeos (Ulloa,2006). 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 en la producción de fármacos antimaláricos. En la actualidad esta planta ha sido remplazada por la artemisia que es una planta indispensable en medicina china ya que posee un efecto antimalárico y antineoplásico actualmente se la utiliza en la producción de fármacos antimaláricos (Ghalib, 2007).

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).

Generalmente son árboles de tamaño mediano a pequeño o también arbustos con corteza amarga. Las hojas son de color verde con pequeñas flores, productoras de

semillas y pueden alcanzar una altura que puede llegar a los 25 metros o un poco más (Mahecha *et al.*, 2004). Las hojas son opuestas, lanceoladas a redondeadas, perennes de 1-4 dm de longitud. Las flores de color blanco, rosa o rojo se producen en panículas terminales. El fruto es una cápsula con numerosas semillas.

Se conocen 24 especies, de las cuales más de la mitad se encuentran en Ecuador, principalmente en provincias como Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay, Morona, Zamora y Loja (Tapia, 2013; Garmendia, 2005). Dos de las especies más reconocidas son *C. officinalis* y *C. pubescens*.

El género *Cinchona* ha sido objeto de una explotación sin provisiones para el futuro a tal punto, que ahora no es fácil dar con porciones apreciables de ellas, si es que no se penetra en lugares casi inaccesibles, y aún en éstos, la explotación ha llegado venciendo todo tipo de dificultades. En los últimos años las actividades como la tala de bosques, la agricultura y la ganadería han tenido un impacto muy significativo en la destrucción de su habitat. (Madsen, 2012). Loja conocida como la patria de las cascarillas antiguamente, ya no posee cantidades explotables de este árbol, solo quedan pequeñas poblaciones en unos pocos bosques del sur de la misma provincia (Cuvi, 2009).

1.1.3 *Cinchona officinalis*

Cinchona officinalis es un árbol de 11 a 15 m de alto, de 30 a 40 centímetros de diámetro de tallo; ramificación simpodial; con copa globosa irregular, bastante densa. La corteza externa es de color marrón oscuro, ligeramente fisurada y desprende pequeñas placas en forma irregular. La forma de la hoja varía de casi orbicular o lanceolada de 8 a 27 cm de largo y 7 a 18 cm de ancho (Andersson, 1998).

Las flores se encuentran en panículas terminales de 20 a 25 cm de longitud, son hermafroditas, actinomorfas; la corola es blanca-roja. Los frutos son cápsulas de color marrón oscuro, de forma elipsoide (Garmendia, 2005).

El desarrollo particularmente en los primeros años es rápido, los árboles de 6 a 8 años de edad pueden alcanzar 12 m de altura. Las ramas principales parten del tronco a una altura de más o menos 6 m, puesto que las ramas bajas son desechadas continuamente (**Figura 1**).



Figura 1. Hojas de *Cinchona officinalis*

Fuente 1: Autora

1.1.3.1 Taxonomía

Grupo: Euasterids.

Orden: Gentianales.

Familia: Rubiaceae.

Género: *Cinchona*.

Nombre científico: *Cinchona officinalis*.

Nombre común: *Cinchona*, cascarilla, quina.

1.1.3.2 Ubicación geográfica y distribución de *Cinchona officinalis*

Es un árbol o arbusto nativo de los Andes encontrados entre los 1000 a 3500 m.s.n.m. En el Ecuador está ampliamente distribuido en las provincias de Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay, Morona, Zamora y Loja. Según estudios realizados por Garmendia (2005). La especie de *Cinchona officinalis* se la conoce como endémica de la región sur del Ecuador específicamente del valle de Loja.

1.1.4 *Cinchona pubescens*

El árbol alcanza los 20 m de altura, y 40 cm de diámetro de su tronco. 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, los frutos de 2 cm de largo por 3 mm de ancho, cilíndricos y encapsulados, con numerosas semillas, las flores son en forma de globo, color rosadas (**Figura 2**).



Figura 2. Árbol de *Cinchona pubescens*

Fuente 2: Autora.

1.1.4.1 Descripción taxonómica.

Grupo: Euasterids.

Orden: Gentianales.

Familia: Rubiaceae.

Género: *Cinchona*.

Nombre científico: *Cinchona pubescens* Vahl.

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

1.1.4.2 Ubicación geográfica y distribución *Cinchona pubescens*

El árbol puede encontrarse desde 3000-3900 m.s.n.m. Se encuentra distribuida en Costa Rica, Panamá, Bolivia, Colombia, Perú y Venezuela (Buitrón, 1999) y en el Ecuador. específicamente (Celica, Portovelo, Loja etc.) (Garmendia, 2005). También se halla introducida en la Isla Santa Cruz del Archipiélago de Galápagos, donde ha causado graves problemas en algunos ecosistemas y se ha convertido en una invasora muy agresiva (Garmendia, 2005).

1.2 Micorrizas

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

La asociación micorrízica y la interacción hongo, planta con el suelo probablemente surgió como un mecanismo de supervivencia para ambos socios en ambientes terrestres de baja fertilidad, sequía, enfermedades y temperaturas extremas donde no hubieran podido establecerse solos (Marx y Cordell, 1989). Los organismos asociados a la mayor parte de las plantas vasculares pertenecen al reino Fungi especialmente a los miembros de los filum Zygomycota, Basidiomycota, Ascomycota y Glomeromycota (Harley y Smith, 1983).

1.3 Micorrizas Arbusculares

Las micorrizas arbusculares (MA) son asociaciones ecológicamente mutualistas que se establecen entre un selecto grupo de hongos Glomeromycota y muy pocos pertenecientes a los Zygomycota, con la gran mayoría de las plantas. Aproximadamente un 80-90% de las familias de plantas existentes tienen la potencialidad de formar este tipo de asociación, se caracterizan por la formación de algunas estructuras dentro de las células corticales que colonizan (Colozzi y Cardoso, 2000), tales como arbusculos, vesículas (en algunas especies) y un conjunto de hifas conformando agrupaciones denominadas micelio (Montaña *et al.*, 2007).

Actualmente son bien conocidos los efectos beneficiosos de las MA, los cuales comprenden una mayor absorción de elementos poco móviles en el suelo como el fósforo P, cobre Cu y zinc Zn por parte de las plantas micorrizadas en comparación con las no micorrizadas (Smith y Read, 1997).

Por otra parte, las plantas micorrizadas son capaces de hacer un mejor uso de los fertilizantes orgánicos, bien sea debido a la producción de fosfatasas por parte de los hongos mismos (Joner y Johansen, 2000) o bien gracias a la asociación existente entre las hifas de las MA y los microorganismos que participan en la mineralización de la materia orgánica. Existen evidencias de que las MA protegen a las plantas del ataque de patógenos (Newsham *et al.*, 1995) y del déficit hídrico (Ghneim *et al.*, 2003).

También son conocidos los efectos de las MA en la formación de la estructura del suelo, a través de su papel en la constitución de agregados estables al agua, en los que el micelio externo de las MA tiene una notable participación, así como a través de la producción de una glicoproteína llamada glomalina, la cual por sus características químicas favorece la agregación de las partículas de suelo (Rillig, 2004).

Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA).

Los HMA son un componente natural de los suelos en la mayoría de los ecosistemas terrestres, son capaces de presentar una asociación simbiótica con ellos y pueden ser considerados como una extensión de las raíces de las plantas ya que amplían considerablemente el volumen de suelo que puede ser explorado y por ende se incrementa la cantidad de nutrientes que pueden ser obtenidos por la planta (Cuenca *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 HMA 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).

1.3.1 Morfología de los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA)

Las estructuras que forman los hongos micorrízicos arbusculares son: esporas, arbusculos, vesículas, hifas que pueden formar agrupaciones miceliares externas o internas, células auxiliares y apresorios.

En Los HMA el sistema de hifas interno (micelio interno) denominado el aparato de nutrición del hongo se desarrolla intracelularmente (crecen dentro de la pared de la células de la raíz) o intercelularmente (crecen entre la pared de las células de la raíz) (Guzman y Farias, 2005; Buevas y Peñates, 2008; Guachón y Prado, 2012;) (**Figura 3**). **El sistema de hifas externo (micelio externo)** funciona como una prolongación del sistema radicular de la planta, permitiéndole explorar un área mayor del suelo, (Buevas y Peñates, 2008) (**Figura 3**). Espora forman hinchazones en una o más hifas en el suelo o en las raíces, poseen resistencia para sobrevivir en el suelo durante muchos años, pudiendo funcionar también como “propágulos” y son órganos de conservación sexual o

asexual (Brundrett *et al.*, 1996; Buelvas y Peñates, 2008) (**Figura 3**). Arbúsculo minúsculas ramificaciones dicotómicas de hifas intracelulares, que sirven como sitio de intercambio nutrimental entre el hongo y el hospedero (Buelvas y Peñates, 2008) (**Figura 3**). Vesículas son estructuras de almacenamiento, cuya formación de sustancias como lípidos tiene lugar a partir del hinchamiento de una hifa generalmente terminal. Estos son órganos de reserva, se forman intra o intercelularmente en el sistema radical y fuera de él (Guachón y Prado, 2012) no están presentes en todos los géneros de HMA (Brundrett *et al.*, 1996) (**Figura 3**). Células Auxiliares estructuras cilíndricas y espinosas, las cuales se forman en hifas gruesas, alrededor de las raíces, son abundantes durante la colonización temprana y luego estas disminuyen cuando la esporulación aumenta (Brundrett *et al.*, 1996) (**Figura 3**). Apresorios apéndices especializados del micelio externo de una hifa o tubo germinativo, imitando una bomba, ejerce presión sobre el tejido que va a colonizar y facilita la penetración del hongo (**Figura 3**).

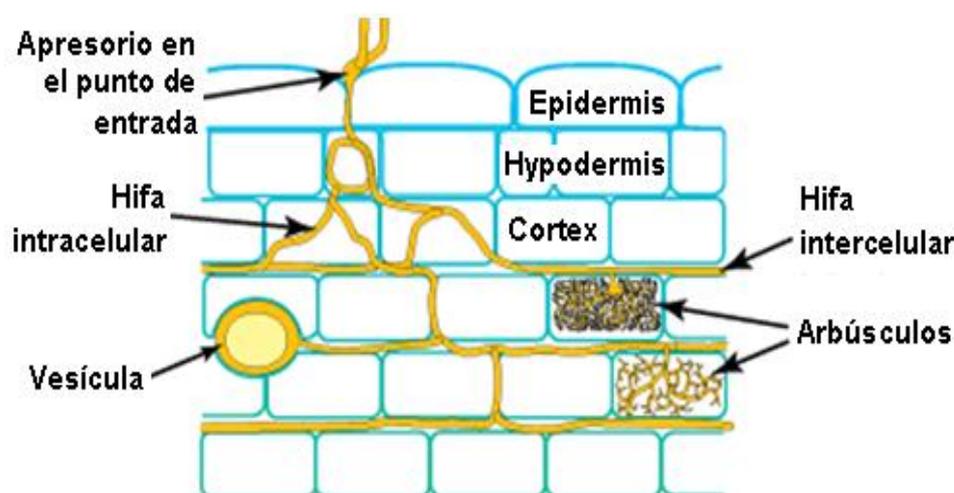


Figura 3. Principales estructuras de una Asociación Micorrízica Arbuscular. En la figura se muestran: apresorio, hifa intracelular, vesícula, hifa intercelular y arbúsculos.

Fuente 3: Modificado de Brundrett *et al.*, (1996).

1.4 Clasificación de Glomeromycota

Schüßler y 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 Glomeromycota

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

Fuente: (Schüßler y Walker, 2010).

2.4 Identificación de HMA

Actualmente existe un registro de aproximadamente 160 especies de HMA que han sido descritas por la morfología de sus esporas de acuerdo a la colección internacional de cultivos de micorrizas vesiculares-arbusculares (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 la identificación de la familia del hongo a la que pertenece (Redecker, 2000; Lee *et al.*, 2008).

Es posible identificar algunas especies de HMA comparando sus patrones de colonización dentro de las raíces (Brundrett *et al.*, 1996) o por medio de la utilización de isoenzimas y anticuerpos (Hepper *et al.*, 1988; Sanders *et al.*, 1992). Sin embargo, las estructuras vegetativas dentro de las raíces colonizadas son de uso limitado dadas las similitudes entre las especies de hongos y los efectos de la planta hospedera en la morfología del hongo. Estas técnicas no pueden identificar una sola especie individual dentro de una raíz y por eso existe la necesidad de desarrollar, técnicas sensibles de detección y cuantificación como son las técnicas moleculares.

Desde principios de la década pasada, los HMA han sido objeto de investigaciones basadas en el DNA a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), donde uno de los aspectos a tratar es referido 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 DNA ribosomal nuclear (DNArn) como la región 18S que se encuentran relativamente conservadas entre los hongos, facilitando una base molecular para buscar relaciones filogenéticas a diferentes niveles (Ochoa, 2008). 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).

En la mayoría de estudios moleculares ecológicos, los genes ribosomales se los ha utilizado en la identificación de especies de HMA, por lo cual, se ha indicado que el DNArn proporciona las herramientas adecuadas para la identificación y estudio filogenético en HMA (Lee *et al.*, 2008) (**Figura 4**).

Para el estudio del DNA se utilizan cebadores específicos y universales, que amplifican regiones determinadas del mismo. Para este trabajo se utilizó cebadores específicos para Glomeromycota, necesarios para la identificación molecular de la diversidad de HMA, en este caso, asociados a *C. officinalis* y *C. pubescens*. Estos fueron diseñados por (Lee *et al.*, 2008) y se denominan AML1 y AML2 (**Figura 4**).

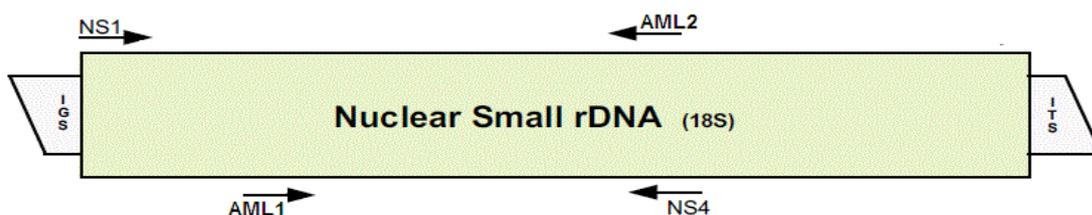


Figura 4. Mapa de la región 18S. Representación esquemática de la región 18S del gen de DNArn con los sitios de anillamiento de los cebadores AML1 y AML2.

Fuente 4: (Serrano, 2013).

Unidades Taxonómicas Operaciones como medidas de diversidad

En los últimos años para estudiar la diversidad e identificación de HMA se ha estudiado el gen ribosomal 18S de Glomeromycota basado en la determinación de secuencias para estudios de HMA (Simon *et al.*, 1992, 1993). La técnica, denominada taxonomía numérica tradicional (Sneath y Sokal, 1973; Sokal y Sneath, 1963) como unidades taxonómicas

operacionales (OTUs por sus siglas en inglés) o filotipos (Herrera, 2012), que pueden ser definidos simplemente por la identidad de secuencias (Blaxter, 2004) pueden representar diferentes especies (Blaxter, 2004). Estos OTUs definirían teóricamente a especies, y pueden ser utilizadas en estudios ecológicos como los de diversidad (Jiménez y Hortal, 2003). El número de especies, comúnmente ha sido utilizado a la hora de describir una taxocenosis, que nos permite obtener una idea rápida y sencilla de su diversidad (Jiménez y Hortal, 2003).

Umbral de diferencia de secuencias para definir OTUs pueden ser variables en diferentes organismos, no obstante el 3% de diferencia de secuencia para delinear OTUs en Glomeromycota para la región 18S es uno de los más considerados en estudios de diversidad de generos y especies (Haug I, *et al.*, 2013).

Por ende, 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).

La curva de acumulación de especies (Escalante, 2003), que se describe como la gráfica del número de especies observadas para conocer la riqueza de especies total de una comunidad como función de alguna medida del esfuerzo de muestreo (Colwell *et al.*, 2004), nos permite analizar la riqueza que aumentará hasta que llega 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 y Hortal, 2003).

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio

Las muestras fueron colectadas en dos sitios de la Provincia de Loja. El primer sitio fue un bosque no perturbado ubicado en la Parroquia Changaimina perteneciente al cantón Gonzanamá a una Altitud de 1.968 m.s.n.m, Latitud: 04° 13' S y Longitud: 079° 31' O. El segundo sitio fue un bosque perturbado, en el barrio Palmas (Sitio Lungame), perteneciente a la Parroquia de Mercadillo del cantón Puyango a una altitud de 1920 m.s.n.m. Latitud: 04° 01' 25" S y Longitud: 79° 56' 02" O.

Muestreo

Se recolectaron un total de 38 muestras de raíces de *Cinchona* spp., las 16 primeras muestras de raíces pertenecieron a *C. officinalis* encontradas en bosque no perturbado y las 22 muestras restantes fueron de *C. pubescens* encontradas tanto en bosque perturbado y no perturbado, Primeramente se hizo una excavación de la tierra al pie de cada árbol, seguidamente se localizó las raíces secundarias asegurándose de que pertenezcan al árbol, y finalmente se extrajeron las raíces más finas, tratando de coleccionar siempre la misma cantidad de raíces de cada individuo. Se recolecto de 5 a 10 raíces secundarias por cada árbol.

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

2.3 Porcentaje de colonización radical

De cada muestra se extrajo al azar las raíces más jóvenes y finas (5 a 10 fragmentos de aprox. 5 cm por individuo), y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1.5 cm de longitud y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL (**Figura 5**).

Se procedió a calcular el porcentaje de colonización, usando el método de (Phillips y Hayman, 1970) (**Anexo 1**). Se colocaron los segmentos de raíces teñidos (alrededor de 10 raíces por individuo de aproximadamente 1cm de longitud) paralelamente en una placa portaobjetos y se observó mediante microscopía, las estructuras micorrízicas de HMA (Leitz WETZLAR SM-Lux), a 40X y 100X (**Figura 5**).

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 establece una clase, teniendo presente las diferentes estructuras micorrízicas de cada fragmento de raíz y la abundancia de arbusculos.

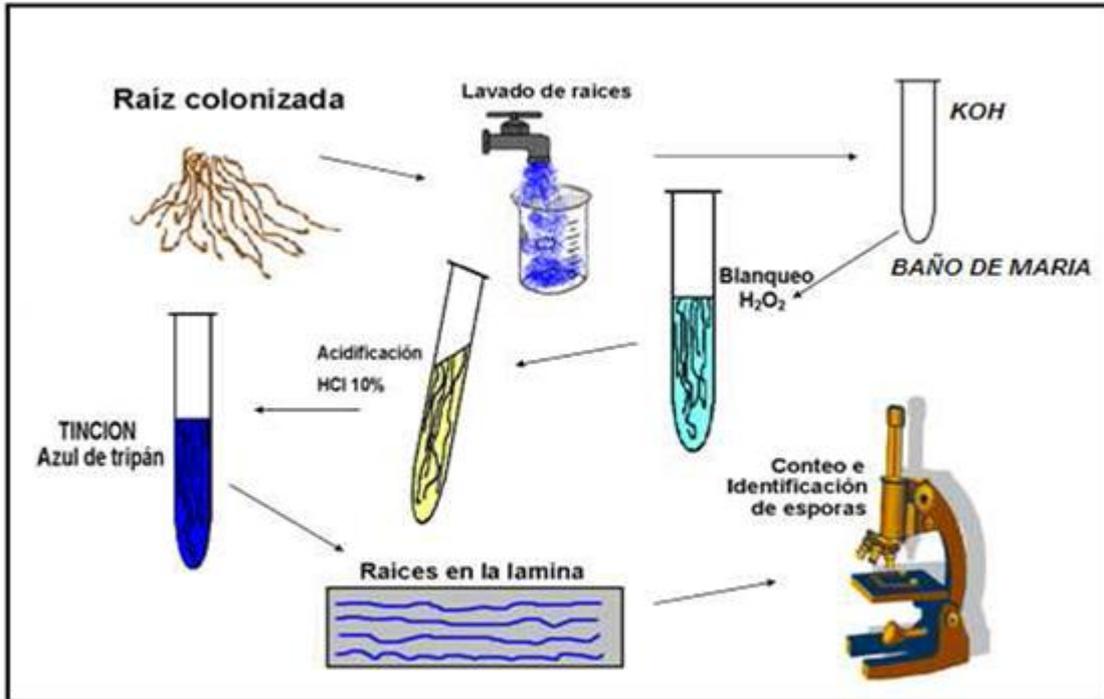


Figura 5. Proceso de clareo y tinción de raíces.

Fuente 5:(Phillips y Hayman, 1970).

2.4 Extracción de DNA y PCR

Se realizó primeramente la trituración de la raíz del género *Cinchona* con un molino de extracción (Retsch MM301). Se aisló el DNA con el kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La región 18S DNArn se amplificó mediante el uso de una PCR anidada. En la primera se realizó una PCR con los cebadores NS1/NS4 (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3'/5'-CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG-3') (White *et al.*, 1990), y para la segunda PCR se usó los cebadores AML1/AML2 (5'-ATC AAC TTT CGA TGG TAG GAT AGA-3'/5'-GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC C-3'), 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 (Serrano, 2013).

Para la amplificación de 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 con 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 (Serrano, 2013)

Los productos de PCR se evaluaron por medio de electroforesis (2 μ L de azul de bromofenol con 3 μ L de cada producto de PCR) (128 V, 300 mA, 30 min) en geles 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.

2.4.1 Cloning, Secuenciación, determinación de OTUs

Los productos de DNA fueron clonados y secuenciados en la empresa Macrogen (Seoul, Korea). Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas para formar consensos usando el software Codon Code Aligner (v. 4.1.1). La búsqueda de secuencias similares se llevó a cabo utilizando BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Las secuencias fueron alineadas usando la opción “G-INS-i” implementada en MAFFT v5.667 (Kato *et al.*, 2005). Se calculó Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) con un umbral del 3% de diferencia de secuencias usando el programa OPTSIL (Göker *et al.*, 2009). Cada OTU fue comparado mediante BLAST.

2.4.2 Riqueza de HMA en sitios perturbados y no perturbados.

Las Unidades taxonómicas operacionales (OTUs) se definieron como equivalentes de las especies de HMA. En primer lugar, para determinar si el número de OTUs difería *Cinchona officinalis* y *Cinchona 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 y Llorente, 1993) con el programa *Statística 7.0.61.0* siguiendo las directrices de (Jiménez y Hortal, 2003). A partir de los parámetros de la curva se obtuvo el valor asintótico de OTUs esperado al acumular muestras de *Cinchona*.

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Muestreo.

Se muestrearon un total de 22 plantas al azar del género *Cinchona* en bosque perturbado y 16 en el bosque no perturbado. 15 de ellas pertenecieron a *Cinchona officinalis* y 23 a *Cinchona pubescens*.

3.2. Colonización y Observación Morfológica de HMA

De acuerdo a la estimación de micorrización según Trouvelot *et al.* (1986) obtenida a través del software MycoCalc, se determinó una frecuencia de colonización de 58% a 100% en las muestras de raíces de *Cinchona* spp. La observación de la alta colonización micorrízica muestra que estas especies, poseen un alto grado de micotrofia. Esta aseveración es demostrable por la alta ocurrencia de arbusculos, vesículas y principalmente hifas en el interior de las células corticales de las raíces (**Figura 6**).

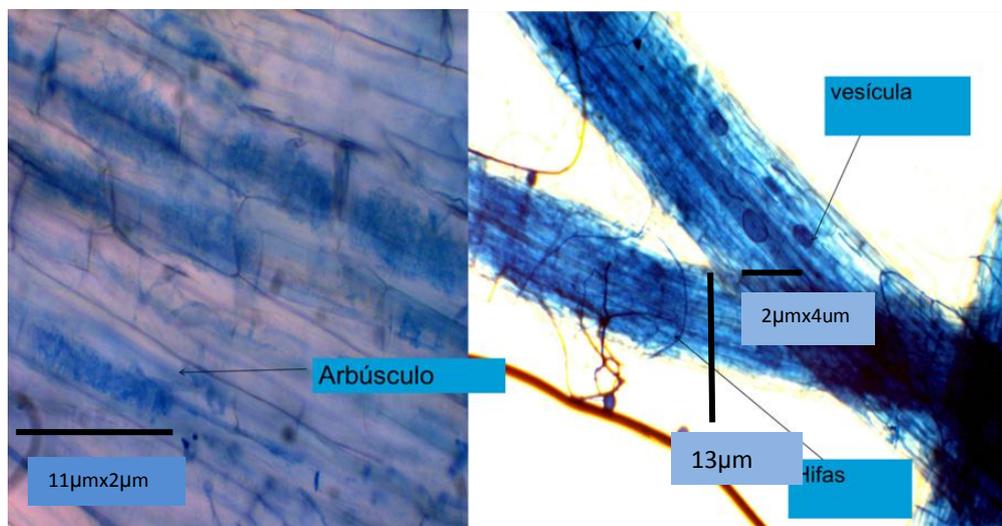


Figura 6: Estructuras de HMA encontradas en las plantas de *Cinchona officinalis* y *Cinchona pubescens*.: Arbúsculos, vesículas e hifas. Escala = 10µm con el objetivo de 40.

Fuente 6: Autora.

3.3. Extracción DNA Y PCR

Todas las 38 muestras fueron amplificadas mediante la PCR. Se obtuvieron productos de buena calidad de aproximadamente 800 pb (**Figura 7**).

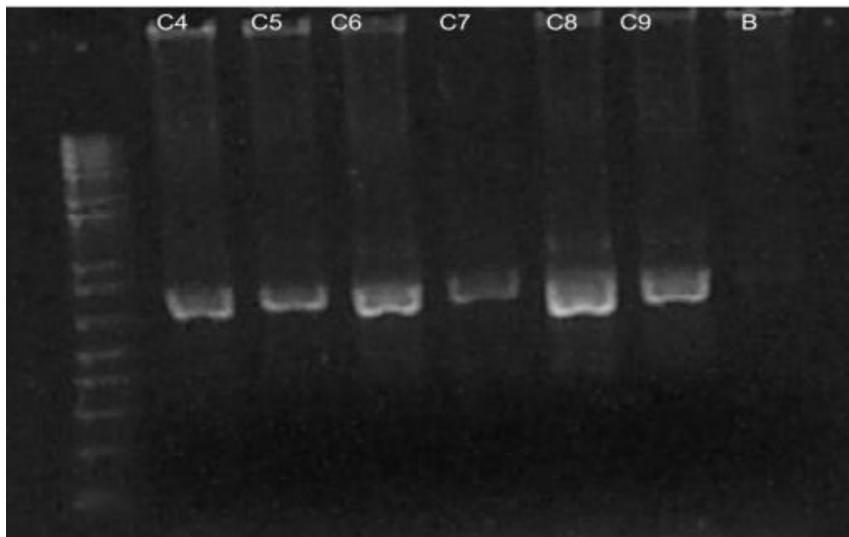


Figura 7: Gel de Agarosa 0.7%, con productos de PCR de las muestras C4, C5, C6, C7, C8, C9 Y B (Blanco) Peso aproximado de las bandas: 800pb.

Fuente 7: Autora.

3.4 Determinación de OTUs

Se encontró una alta riqueza de Glomeromycota, tanto en bosque perturbado y no bosque perturbado. De 38 plantas se determinó 228 secuencias de las cuales 114 secuencias pertenecieron a Glomeromycota, sobre la base del 3% de diferencia de secuencia de la región 18 S DNArn (aproximadamente 800 pb), con el programa OPSIL se determinó el 3% de diferencia de secuencia, dándonos como resultado que la mayoría de los OTUs pertenecía a *Glomus* (46.6%), seguido por *Rhizophagus* (6.3%), y *Acaulospora* (6.7%), *Archeospora* (6.7%). Muchos de los OTUs se encontraron sólo una o dos veces (**Tabla 2**). Al comparar nuestros resultados con los encontrados en otros estudios (Haug I *et al.*, 2013) el número de OTUs encontrado en nuestro estudio es excepcionalmente alto. Se determinaron 59 (OTUs) de los cuales, 32 OTUs se encontraron en el bosque no perturbado y 35 OTUs en el bosque perturbado

Tabla 2: OTUs encontrados en *Cinchona* spp, con el 3% de diferencia de secuencia.

OTUs	GÉNERO	PORCENTAJE (%)
1, 2, 3, 6, 11, 12, 14, 15, 16, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 46, 47, 51, 52, 54, 57, 58, 59	<i>Glomus</i>	64,4
4, 19 y 20	<i>Rhizophagus</i>	6.7

7, 6, 38	<i>Scuellospora</i>	3.3
24 y 38	<i>Gigaspora</i>	3.3
14	<i>Slerocystis</i>	1.6
15, 39, 53,	<i>Acaulospora</i>	6.7
44	<i>Paraglomus</i>	1.6
35	<i>Claroideoglomus</i>	1.6
48	<i>Ambispora</i>	1.6
50	<i>Geosiphon</i>	1.6
49 y 56	<i>Archeospora</i>	6.7

De los 59 OTUs encontrados el más común fue *Glomus*, con el 64.4% seguido por los géneros *Acaulospora*, *Claroideoglomus*, *Paraglomus*, *Ambispora*, *Archeospora*, *Slerocystis*, *Gigaspora* y *Scutellospora* que fueron menos frecuentes. Estos resultados en comparación con los estudios realizados de diversidad de HMA por Castillo, (2005) describe a *Glomus* como el género dominante en la mayoría de las poblaciones y es posible que se encuentre en simbiosis activa en mayor proporción que los demás, lo que refleja su capacidad de adaptación a las condiciones edáficas y ofrece un alto potencial para su uso como biofertilizante.

Geosiphon es la única especie de *Glomeromycota* conocida por formar simbiosis entre un hongo y cianobacterias (Wettstein, 1915). Tiene gran similitud morfológica y molecular de *Glomus*. En nuestro estudio, se encontró *Geosiphon* mediante la utilización de primers específicos para *Glomeromycota*. Estudios realizados de *Geosiphon pyriformis* demuestran que existen secuencias de nucleótidos (18SDNAr), que tienen gran similitud con hongos pertenecientes al orden Glomales, que con hongos fuera de este orden (Gehrig., et al 1996) y sus esporas guardan cierta semejanza con especies típicas del género *Glomus* (Schussler et al., 1994). Sin embargo, *Geosiphon* ha sido considerados como un raro sistema endocitobiótico primitivo, porque los procariontes encontrados en su interior pueden ser experimentalmente separados y unificados (Kluge et al., 1997), poniéndose en evidencia no solo el origen de estos HMA, sino también que en el hongo reconocido como más antiguo se ha detectado la presencia de microorganismos endógenos.

3.5 Riqueza de HMA del género *Cinchona*

La riqueza observada fue de 32 OTUs en bosque no perturbado y 35 en el bosque perturbado. Sin embargo, las curvas de acumulación de riqueza de OTUs en bosques perturbados y no perturbados no llegaron a la asíntota, y se estimó una riqueza de 91 y 150 OTUs respectivamente. Aún es necesario un mayor esfuerzo de muestreo para completar la riqueza estimada (Tabla 2). De acuerdo con estos resultados, la diversidad de OTUs entre los bosques perturbados y no perturbados difiere significativamente. Como resultado de la interacción entre el árbol y las estructuras de HMA en conjunto con, factores abióticos se genera una heterogeneidad ambiental que contribuye a mantener la elevada riqueza taxonómica de la comunidad de hongos HMA (Wolfe y Kironomos, 2005) (**Figura 9**).

La diversidad encontrada en este estudio puede deberse a factores edáficos (composición del suelo) o ambientales (temperatura, humedad) (Wolfe *et al.*, 2006). Mummey y Rilling, (2008) determinan que existe mayor abundancia de HMA en bosques perturbado debido a la escases de nutrientes, el micelio externo es más extenso, favoreciendo la captación de agua y nutrientes. En cambio en bosques no perturbados existe una mayor competencia de nutrientes y por ende baja tasa de micorrización (Simard *et al.*, 2002).

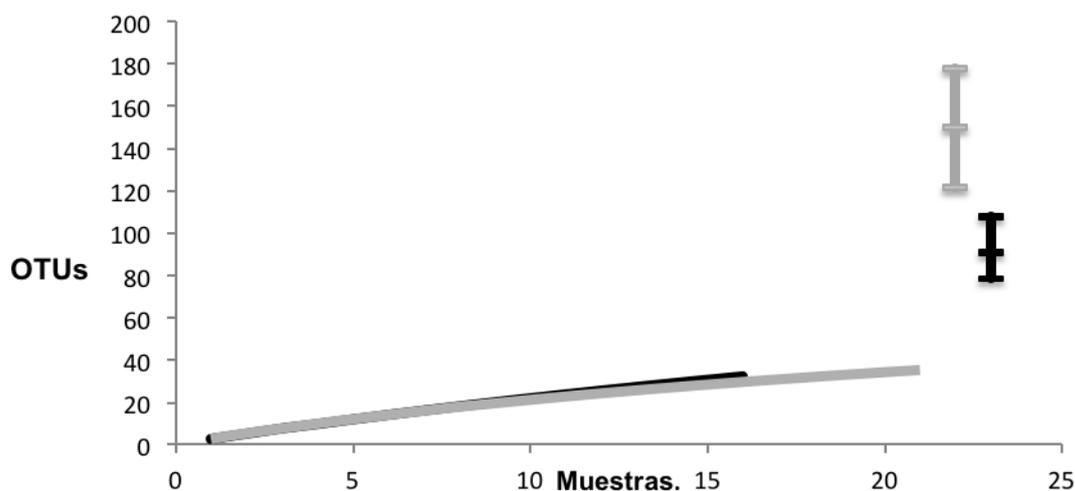


Figura 8. Curva de Acumulación de OTUs en *Cinchona Officinalis* y *Cinchona pubescens* Las líneas de color gris representan los OTUs del bosque perturbado y las líneas negras representan los OTUs del bosque no perturbado, en comparación con las muestras.

Fuente 8: Autora

En este estudio la comunidad de HMA, es muy diversa, según Van der Heijden *et al.*, (2002), nos menciona, que cuando existe una comunidad de HMA muy diversa, también poseen un micelo extraradical más extensivo, aunando esta información se puede explicar que las plantas de *Cinchona*, pueden crecer y desarrollarse bajo condiciones de estrés ambientales (Hart y Klimonos, 2002).

Tabla 3: Índices de presencia de OTUs en raíces de *C. officinalis* y *C. pubescens* en bosques perturbado y no perturbados.

<i>Tipo de Bosque</i>	<i>Riqueza (R2)</i>	<i>Varianza Explicad</i>	<i>Proporción de especies registrada</i>	<i>Asíntota Índice superior inferior</i>	<i>Esfuerzo de muestreo</i>
Perturbado	0,999	91	38,60%	108	633
No perturbado	0,999	150	14,70%	91	1117

Las frecuencias de OTUs presentes en ambos tipos de bosques se calcularon como ocurrencias existentes en diferentes muestras (árboles).

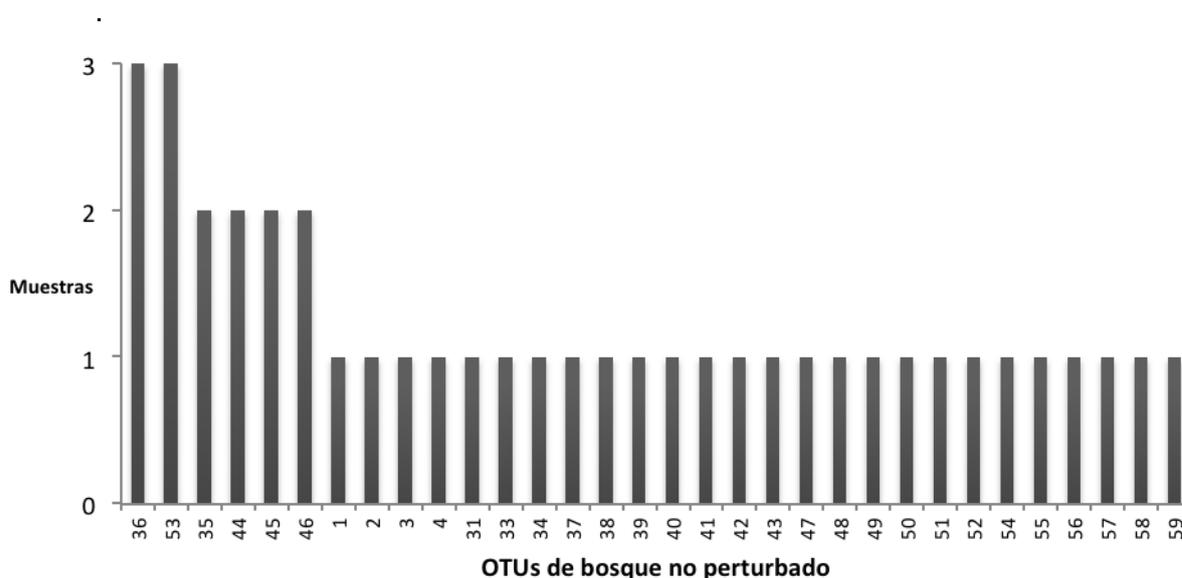


Figura 9. Frecuencia de HMA en bosque no perturbado, de *C. officinalis* y *C. pubescens* los OTUs más frecuentes son el 36 y 53, con menor frecuencia 35,44, 45, 46 y el resto de OTUs se representan como generalista.

Fuente 9: Autora.

En ambos tipos de bosque se encontró una gran diversidad de hongos. Los más frecuentes en ambos bosques son: los OTUs 31,35 ,36 53 que pertenecen al género *Glomus*, *Claroideoglomus* y *Acaulospora*.

El número menor de OTUs encontrados en bosque no perturbado puede deberse a condiciones ecológicas diferentes al bosque perturbado, como condiciones de pH del

suelo, de contenido de fósforo (más elevado que en otros ambientes, lo que desestimula la producción de HMA) (Siqueira y Franco, 1988).

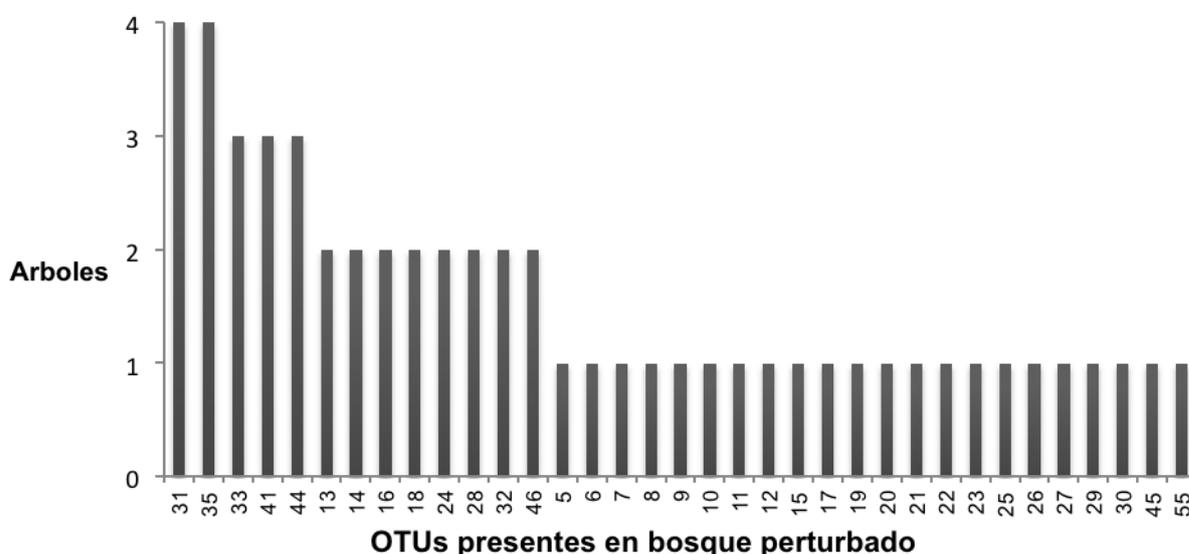


Figura 10. Frecuencia de HMA en bosque no perturbado de *C. officinalis* y *C. pubescens* los OTUs más frecuentes son el 31 y 35, con menor frecuencia 33,41, 44, y el resto de OTUs se representan como generalista.

Fuente 10: Autora.

Serrada (2008), indica que las especies de HMA influenciadas por las pendientes, tienden a ser poco abundantes, por las condiciones meteorológicas y de erosión que implican los terrenos con esta característica, afectando de este modo el crecimiento y mantenimiento del micelio y por ende afectado a la presencia del hongo.

Se determinó 35 OTUs encontrados en bosque perturbado siendo más alto el número de OTUs que en el bosque no perturbado. Trent *et al.* (1994) nos menciona que la abundancia de HMA depende de los niveles de colonización y longitud del micelo, su asociación a la humedad del suelo junto baja disponibilidad de nutrientes de la planta hospedera. Los denomina a los HMA “colonizadores intensivos de las raíces” ya que bajo estas condiciones existirá una alta abundancia de HMA.

Diferentes factores pueden influir en la distribución y la estructura de la comunidad de los HMA, tales como los factores climáticos y edáficos la variación espacial y temporal, el tipo de vegetación (van der Heijden, 1998), la especificidad, entre hongo-planta, la perturbación (Hijri *et al.*, 2006), y la capacidad de esporulación de los HMA independientemente del tipo de suelo en el que estén asociados (Hart y Reader, 2002).

Las plantas de *Cinchona officinalis* y *Cinchona pubescens* estudiadas están asociadas a una gran diversidad de HMA, contrario a lo que sucede en las plantas de *Cinchona* de las islas Galápagos en la que la diversidad de HMA es menor (28 OTUs al 1%

de diferencia de secuencias; (Serrano, 2013). Cabe indicar que no se ha hecho estudios de diversidad de HMA en *Cinchona officinalis* y *Cinchona Pubescens*, solo en el trabajo de (Serrano, 2013).

En nuestro estudio el género *Cinchona* tiene la capacidad de asociarse con una gran diversidad de hongos micorrízicos, y estos no serían los responsables del éxito reproductivo de la planta en Galápagos (Serrano, 2013), ni tampoco estarían involucrados con el poco éxito reproductivo de las plantas de *Cinchona* en Ecuador continental. Probablemente factores ecológicos como competencia, disponibilidad de recursos, clima, entre otros, serían clave en el desarrollo de la planta. Sin embargo no podemos descartar la importancia de los HMA en futuros planes de conservación de las plantas de *Cinchona officinalis* y *Cinchona pubescens*.

CONCLUSIONES

- Todos los individuos analizados estuvieron colonizados por HMA con una frecuencia de micorrización que va del 58 % a 100%.
- El género *Glomus* fue el más abundante, frecuente y dominante de los 58 OTUs, seguido de los géneros *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Archeospora*, *Paraglomus*, *Claroideoglomus*, *Rizhopagus*, *Geosiphon* y *Sclerocyttis*.
- Los OTUs más frecuentes, tanto en el bosque perturbado como en el no perturbado son: OTU 31, 35, 36, 53, los mismos que pertenecen a los géneros *Glomus*, *Claroideoglomus* y *Acaulospora*. Seis de los OTUs estuvieron presentes en ambos bosques estos fueron los OTUs 31, 35, 41, 44, 45, 55 que pertenecieron a los géneros *Glomus* y *Paraglomus*.
- En el bosque perturbado, se determinó tres OTUs con menor frecuencia fueron 33,41 y el 44 y el resto de OTUs: 5,6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 29, 30, 45, 55, de este bosque solo tuvieron una sola presencia.
- En el bosque no perturbado los OTUs menos frecuentes fueron los OTUs 35, 44, 45, 46 y los demás manifestaron una sola vez: OTUs 1, 2, 3, 4, 31, 32, 34, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 59.
- Se concluye que en este trabajo de investigación la diversidad de HMA en ambos bosques fue evidentemente diferente.
- Se necesita realizar un mayor esfuerzo de muestreo, para completar la riqueza estimada de HMA en ambos tipos de bosque.

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar un mayor esfuerzo de muestreo completar el total de la riqueza estimada de OTUs de HMA en ambos tipos de bosque.
- ✓ El alto porcentaje micorrízico y la gran riqueza de especies registradas en este trabajo, enfatizan la necesidad de estudiar los HMA, ya que pueden ser considerados a futuro, como la herramienta adecuada evitar la extinción de la planta *Cinchona* ya que son un componente común e importante e el desarrollo y mantenimiento de ecosistemas.
- ✓ Utilizar, nuevas metodologías para estudios de hongos micorrízicos como la pirosecuenciación, para obtener una diversidad más real.
- ✓ Realizar estudios de factores bióticos y abióticos que pueden estar involucrados en la diversidad de HMA en ambos tipos de bosque. evaluando la relación con hospederos, cuerpos fructíferos, factores edáficos así como factores ambientales.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, L. (1998). A revisión of the genus *Cinchona* (*Rubiaceae-Cinchonae*). *Memories of the New York Botanical Garden*, Vol. 80, pp. 1-75.
- Blaxter, M. (2004). The promise of a molecular taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 359, 669–679.
- Buitrón, X. (1999). Ecuador: uso y comercio de plantas medicinales situación actual y aspectos importantes para su conservación. Ecuador: *TRAFFIC International*.
- Buevas, O. y 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.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell B., Grove, T., Malajczuk, N. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australia: ACIAR Monograph.
- Buddenhagen. CE.,J. Renteria., M. Gardener, S.R. Wilkinson. M. Soria, P. Yanez, A. Tye, and R. Valle. (2004). Control of a highly invasive tree *Cinchona pubescens* in Galapagos. *Weed Technonolgy* 18: 1194- 1202.
- 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.
- Cuenca G, De Andrade Z, Escalante G. (1998). Diversity of Glomalean spores from natural, disturbed and re-vegetated communities growing on nutrient-poor tropical soils. *Biology y Biochemistry. Biochem.* 30: 711-719

- Cuvi, N. (2009). Ciencia e imperialismo en América Latina: La misión de *Cinchona* y las estaciones agrícolas cooperativas (1940 – 1945). (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Cui M, P S Nobel. (1992) Nutrient status, water uptake and gas exchange for three desert succulents infected with mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 122:643-649.
- Dix NJ y Webster. J. (1995) *Fungal Ecology*, Chapman y Hall, London.
- Escalante, T. (2003). Cuántas especies hay, los estimadores no paramétricos de Chao. *Elementos*, 52, 53-56.
- 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.
- Guachón, T. y 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.
- Guzman, S. y Farías, J. (2005). Biología y regulación molecular de la micorriza Arbuscular. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 9, 17-31.
- Gehrig, H.; Schussler, A. y Kluge, M. Geosiphon pyriforme, a fungus forming endocytobiosis with Nostoc (cyanobacteria) is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, vol. 43, p. 71-81.
- Hart, M.M. and Reader, R.J. (2002). Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 153: 335-344
- Haug I, Setaro S, Sua´rez JP (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. doi:10.1371/journal.pone.0063524
- Harley J.L. y Smith S.E. (1993). *Mycorrhiza Symbiosis*. Academic Press. London New York.

- 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.
- Hepper, C.M., Azcon-Aguilar, C., Rosendahl, S., Sen, R. (1988). Competition between three species of *Glomus* used as spatially separated introduced and indigenous mycorrhizal inocula for leek (*Allium porrum* L.). *New Phytologist* 110, 207±215 INVAM, 2008, <http://www.invam.caf.wvu.edu/>.
- Hijri I, Sykorova Z, Oehl F, Ineichen K, Mäder P, Wiemken A, Redecker D. (2006). Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology* 15:2277–2289.
- Jiménez, A. y 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.
- Joner E.J. Johansen A. (2000). Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal.
- 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.
- 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.
- Kluge, M.; Gehrig, H.; Mollenhauer, D.; Molenhauer, R.; Schnepf, E. y Schübler, A. News on *Geosiphon pyriforme*, an endosymbiotic consortium of a fungus with a cyanobacterium. En: *Eukaryotism and Symbiosis*. *Springler-Verlag*, 1997, p. 469-476.
- 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.
- Mahecha, G., Ovalle, A., Camelo, D., Rozo, A., Barrero, D. (2004). Vegetación del territorio: 450 especies de sus llanuras y montañas, Bogotá, Colombia 871.

- 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.
- Max,D. H. and Cordell, C.E.(1989). In *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth* (J.M.Whipps and R.D Lumsden, eds), pp 1-29 British Mycology Society Combrige University Press, Cambridge.
- 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.
- Mummey, D.L, M.C. (2008) Spatial caracterización of muscular mycorrhizal fungal molecular diversity at the submetre scale in a temperate grassland.FMS *microbiology ecology* 64:260-270
- Newsham KK. Filtter A H. Watterson AR. (1995). Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. *Journal Ecology* 83.991-1000.
- Ochoa, D. (2008). Caracterización molecular de 60 hongos que forman parte del cepario micologico del C.B.C.M. de la universidad técnica particular de Loja. (Tesis de Grado). Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.
- Pérez, A., Rojas, J., Montes, D. (2011). Hongos formadores de micorrizas arbusculares:una alternativa biologica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el caribe colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 3 (2), 366-385.
- Phillps, J. y 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.
- Redecker, D. (2000). Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* (2000), 10, 73-80.

- Rilling MC. (2004). Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecology Lett* 7:740-754.
- Sanders, T.J.M., Spooren, W.P.M., y Noordman, L.G.M. (1992). "Towards a taxonomy of coherence relations". *Discourse Processes* 15: 1-35.
- Serrano F. (2013). Identificación molecular de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) asociados a *Cinchona pubescens* (Rubiaceae): una especie invasora en la isla Santa Cruz (Galápagos (Tesis de Grado). Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, Ecuador.
- Serrada, R. (2008). Apuntes de selvicultura. España: EUIT.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105, 1413-1421
- Schüßler, A. y Walker C. (2010). The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Gloucester, Inglaterra.
- Smith, S. y Read, D. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. Reino Unido: Academic Press.
- Smith S.E, Read D.J (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, Ed 3. Academic Press, New York.
- Simard, S.W, Jones, M.D (2002) Carbon and nutrient fluxes within and between mycorrhizal plants. In van der Heijden, M.G.A, Sanders, I (Eds), *Mycorrhizal Ecological Studies*, Vol. 157. Springer, Berlin, pp.33-74.
- 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.
- Sneath PHA y Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco Schussler, A.; Mollenhauer, D.; Schnepf, E. y Kluge, M. Geosiphon pyriforme, an endosymbiotic association of fungus and cyanobacteria: the spore structure resembles that of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Botanica Acta*, 1994, vol. 107, p. 36-45.
- Siqueira, JO; Franco, AA (1988). Micorrizas. In: Siqueira, JO; Franco, AA *Biotechnologia do solo: fundamentos e perspectivas*. MEC-ESAL, Brasília Brasil, pp 125 -177.

- Starr, F., Starr, K., Loope, L. (2003). *Cinchona pubescens*-Quinine tree Rubiaceae. *Geological Survey Biological*, 36.
- Sokal, R. R. y Sneath, P. H. A. (1963). Principles of Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- 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. (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.
- Trent, D. J, T.J.Sevejkar y Blank, R.R. (1994) Mycorrhizal colonization, hyphal lengths, and soil moisture associate with two Artemisia. 54 : 291- 300.
- Van der Heijden M.G.A., Boller T., Wiemken A. y Sanders I.R.(1998) a. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology*79:2082-2091.
- Van der Heijden M.G.A., Boller T., Wiemken A. y Sanders I.R.(2002) a. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology*79:2082-2091.
- Wettstein, F. von - Geosiphon Fr. Wettst., eme neue interessante Siphonee. Österr. Bot. Z. 65 (1915), 145-156. Wolfe, B.E.,J.N. (2005). Breaking new ground: Soil communitites and exotic plant invasion.*Bioscience* 55:47-487

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.
5. Pasado el tiempo de tinción sacar las raíces y colocarlas en un portaobjetos limpio, agregándoles una gota de Polivinyl-lactoglycerol.
6. Evaluar en el microscopio.