

Identificación morfológica de hongos micorrízicos arbusculares en poblaciones nativas de *Cinchona officinalis* en la provincia de Loja, Ecuador

Morphological identification of arbuscular mycorrhizal fungi in native populations of Cinchona officinalis in the Loja province, Ecuador

Yajaira Arévalo^{1,*} and Paúl Loján²

¹ Centro de investigaciones y Servicios de Análisis Químico (CISAQ), Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador, yajaira.arevalo@unl.edu.ec

² Departamento de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador, pdlojan@utpl.edu.ec.

* Autor para correspondencia: yajaira.arevalo@unl.edu.ec

Fecha de recepción del manuscrito: 06/04/2023 Fecha de aceptación del manuscrito: 07/08/2023 Fecha de publicación: 30/12/2023

Resumen—*Cinchona officinalis* (cascarilla) ha sido usada para combatir la fiebre causada por el paludismo, por esta razón ha sido sobreexplotada en el sur del Ecuador desde la época colonial llegando a diezmar sus poblaciones nativas. Bajo este contexto, es necesario establecer estrategias que permitan la reintroducción de esta especie en sus zonas originales de distribución. Una de estas estrategias es la asociación en su fase temprana de desarrollo con hongos micorrízicos arbusculares (HMA). El objetivo de la presente investigación fue identificar los géneros de HMA asociados a poblaciones naturales de *Cinchona officinalis* a través de un análisis morfológico de las esporas apoyado en descripciones del International Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM). La zona de estudio se concentró en cinco sitios del cantón Loja, de donde se extrajeron muestras de rizósfera y raicillas. Posteriormente se instalaron sistemas trampa para el cultivo de hongos micorrízicos arbusculares con *Plantago lanceolata* como planta hospedera. Luego de nueve meses del establecimiento de los sistemas trampa, se calcularon los porcentajes de colonización y longitud de colonización de raíces. El análisis morfológico de las esporas permitió identificar cuatro géneros de hongos micorrízicos arbusculares: *Gigaspora*, *Funneliformis*, *Glomus* y *Acaulospora*, el más abundante fue *Glomus*, seguido de *Acaulospora*, mientras que *Gigaspora* fue el más escaso. El porcentaje de colonización en raíces de *C. officinalis* varió entre el 80% a 89%, mientras que el porcentaje de longitud de colonización de raíz tuvo una variación de entre el 20,97 y 38,12%. Estos resultados sugieren que, en su ecosistema natural, *C. officinalis* tiene una alta colonización de hongos micorrízicos, siendo *Glomus* el género dominante. Los porcentajes de colonización fueron elevados, a diferencia de las plantas trampa, esto pudo deberse a diferencias en las condiciones ambientales y características del suelo.

Palabras clave—Simbiosis, Conservación, Restauración ecológica, Perturbación, Adaptación.

Abstract—*Cinchona officinalis* (quinine) has been used to combat fever caused by malaria and other types of fevers, which is why it has been overexploited in southern Ecuador since colonial times, leading to the decimation of its native populations. In this context, it is necessary to establish strategies that allow the reintroduction of this species in its original distribution areas. One of these strategies is the association in its early developmental stage with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). The objective of this research was to identify the AMF genera associated with natural populations of *Cinchona officinalis* through a morphological analysis of the spores, based on descriptions from the International Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM). The study area focused on five sites in the Loja canton, where rhizosphere and root samples were collected. Then, trap systems were established for the cultivation of AMF using *Plantago lanceolata* as the host plant. After nine months of establishing the trap systems, colonization percentages and root colonization length were calculated. The morphological analysis of the spores allowed the identification of four genera of arbuscular mycorrhizal fungi: *Gigaspora*, *Funneliformis*, *Glomus*, and *Acaulospora*, with *Glomus* being the most abundant, followed by *Acaulospora*, and *Gigaspora* being the least common. The percentage of colonization in *C. officinalis* roots ranged from 80% to 89%, while the percentage of root colonization length in field samples varied between 20.97% and 38.12%. These results suggest that in its natural ecosystem, *C. officinalis* has a high colonization of arbuscular mycorrhizal fungi, with *Glomus* being the dominant genus. The colonization percentages were high, unlike the trap plants, which could be attributed to differences in environmental conditions and soil characteristics.

Keywords—Symbiosis, Conservation, Ecological restoration, Disturbance, Adaptation.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Cinchona* fueron catalogadas como “Salvadoras de la Humanidad” (Zevallos, 1989) y

“Planta Nacional del Ecuador” (Acosta-Solis, 1989), al ser medicina natural de tradición incaica (Villar del Fresno y Doadrio, 2008), por su uso en el tratamiento de fiebre causada por el paludismo, desde la época colonial (alrededor

de 1630) (Canales *et al.*, 2020; Júnior *et al.*, 2012; Zevallos, 1989). La Corona Española declaró a los bosques de cascari-lla de las colinas cercanas a Loja como Reserva Real en 1751 (Crawford, 2016) con la finalidad de proveer de *Cinchona* a la Farmacia Real de Madrid (Fernández-Pérez *et al.*, 2004).

C. officinalis, quina o cascarilla, es una especie endémica del Valle de Loja (Acosta-Solis, 1946; Garmendia, 2005), pertenece a la familia Rubiaceae. Posee hojas simples, enteras, de disposición opuesta e inflorescencias cimosas completas (Villar del Fresno y Doadrio, 2008). El género *Cinchona* está compuesto por árboles y arbustos que pueden alcanzar hasta 20 m de altura con un diámetro entre 15 y 20 cm (Júnior *et al.*, 2012) de madera liviana con poco brillo (Feijóo *et al.*, 2019).

Los árboles de *Cinchona* tienen una amplia distribución; se han encontrado especímenes desde Costa Rica hasta Bolivia (Andersson, 1998) en un gradiente altitudinal desde 640 a 3200 m s.n.m., pueden ser encontrados en la mayoría de bosques andinos en las estribaciones oriental y occidental de la Cordillera de los Andes (López, 2016), pero la cascarilla de Loja fue considerada como la mejor según curanderos y shamanes de la época quienes poseían sus propios métodos para evaluar e identificar los diferentes tipos de corteza (Crawford, 2016; Fernández-Pérez *et al.*, 2004; Moraes *et al.*, 2006). Es así que la cascarilla fue explotada por más de un siglo en los sectores Cajanuma y Uritusinga (Armijos-González y Pérez-Ruiz, 2016), provocando que toneladas de corteza fueran enviadas a diferentes partes del mundo (Nair, 2010). La importancia medicinal de la quina radica en sus componentes químicos propios de la familia Rubiaceae: quinina, quinidina, cinconina, cinconidina y diastereoisómeros (Aymard, 2019; Bajtai *et al.*, 2020; Canales *et al.*, 2020; Choong, 2009; Nair, 2010).

Desde el siglo XVIII, los bosques de *Cinchona* fueron perturbados en su hábitat natural al ser descortezados y talados, sin considerar criterios para su conservación (Fernández-Pérez *et al.*, 2004). Los avances científicos promovieron que en el siglo XX los compuestos químicos provenientes de *Cinchona* fueran sintetizados, lo que ocasionó que la demanda de corteza de *C. officinalis* disminuyera, reduciendo la presión sobre los bosques andinos donde se desarrolla esta especie (Armijos-González y Pérez-Ruiz, 2016). Sin embargo, actividades antrópicas como la conversión de bosques hacia áreas donde se practica la agricultura y ganadería continúan ejerciendo presión sobre los bosques andinos (Aymard, 2019), lo cual ha generado consecuencias severas para los remanentes de *C. officinalis* y los bosques andinos en general, ya que ha resultado en una reducción de la diversidad genética y endogamia de las especies que habitan estas zonas (Cueva-Agila *et al.*, 2019).

En la actualidad las especies de *C. officinalis* están expuestas a problemas de conservación y regeneración natural, y la vegetación original de sus zonas de distribución ha sido eliminada casi en su totalidad (Villar del Fresno y Doadrio, 2008). A pesar de que *C. officinalis* tiene una alta capacidad de formar semillas, la regeneración natural de esta especie es baja, debido a la especificidad en los requerimientos de crecimiento y germinación de la especie, esto ha provocado que exista escasez de condiciones para su crecimiento y conservación (Armijos-González y Pérez-Ruiz, 2016). La semilla de *C. officinalis* tiene un bajo nivel de pureza y viabilidad y

características recalcitrantes, lo que provoca que no puedan ser conservadas por largos periodos de tiempo, dificultando la propagación sexual de la especie (Caraguay-Yaguana *et al.*, 2016). Esto ha provocado que la diversidad y población de *C. officinalis* no se pueda recuperar y cada vez sea más difícil de encontrar en los bosques andinos (López, 2016).

La especificidad de condiciones para la propagación y regeneración de *Cinchona officinalis*, está ligada a las poblaciones de microorganismos que interactúan en las raíces de las especies en regiones montañosas (Jäger *et al.*, 2007). En los Andes existe una gran diversidad de hongos que se relacionan de forma simbiótica con las especies vegetales, donde las plantas reciben nutrientes como el fósforo y nitrógeno proveniente del suelo (Barnes *et al.*, 2016). Las micorrizas arbusculares son asociaciones simbióticas entre las raíces de las plantas y hongos del suelo, que son capaces de mejorar la absorción de nutrientes y agua por parte de la planta. Estos hongos son muy comunes en la naturaleza llegando a establecer relaciones simbióticas con más del 80% de las plantas terrestres (Smith y Read, 2010).

En el contexto de la introducción de especies forestales, las micorrizas arbusculares también juegan un papel importante, siendo esenciales para el éxito de la restauración de bosques tropicales, ya que pueden mejorar la supervivencia y el crecimiento de las plántulas introducidas (Urgiles *et al.*, 2009). Las estrategias para ayudar al establecimiento y crecimiento de plántulas de *C. officinalis* se basan en la simbiosis y caracterización de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y su ubicación en diferentes escalas geográficas (Haug *et al.*, 2010). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue identificar los principales géneros de HMA que se encuentran asociados con *C. officinalis* en el valle de Loja, evaluar la colonización micorrízica natural de la especie y generar aportes importantes para el conocimiento local relacionado con la regeneración de *C. officinalis* en asociación con HMA y su posterior incorporación a bosques naturales de la zona o para su inoculación en la fase de propagación en vivero. Para esto, se evaluó también la morfología y porcentajes de colonización en plantas trampa *Plantago lanceolata* para detectar, monitorear y evaluar la presencia y actividad de organismos específicos en el suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de estudio

La zona de estudio se ubicó en el cantón Loja y provincia de Loja, Ecuador, latitud: 3°59.588' S, longitud 79°12.253' O donde se recolectaron muestras de rizósfera y raicillas de individuos adultos de cascarilla de cinco sectores diferentes: i) Parque Nacional Podocarpus (sector Cajanuma), ii) Granadillos, iii) Congoya, iv) Yamburara y v) Uritusinga (Figura 1).

Recolección de raicillas y rizósfera

Una vez identificados los remanentes de *C. officinalis*, junto a la base de cada árbol se realizó un agujero de ~15 cm en el suelo de donde se extrajeron raicillas y suelo de rizósfera, la recolección se realizó en 10 individuos adultos excepto en el sector de Uritusinga donde solo se encontraron especímenes jóvenes (tres años). Las muestras de raicillas fueron con-

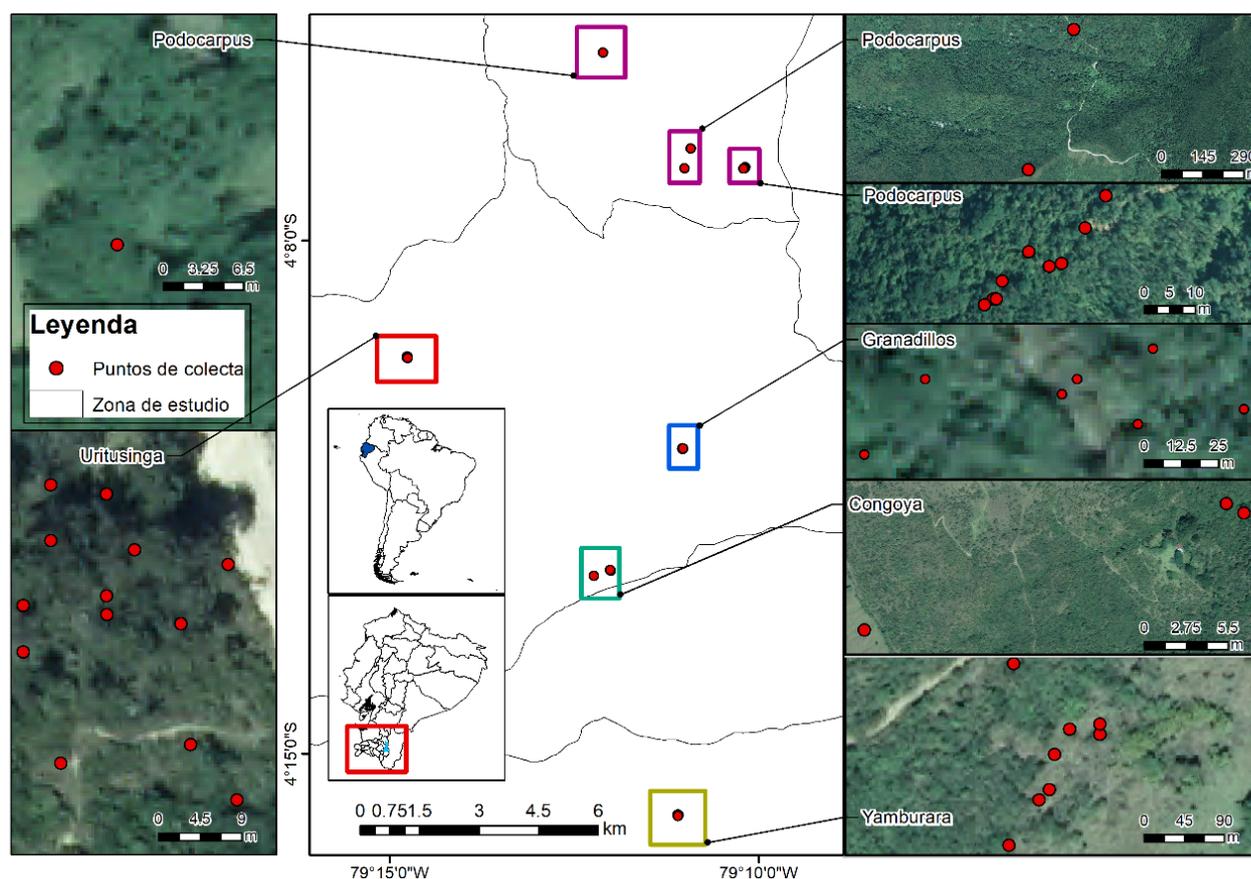


Fig. 1: Caracterización de los sitios de colecta de muestras de rizósfera y raicillas de individuos adultos de casahuate.

servadas usando tubos Falcon de 50 ml con alcohol al 70 %, mientras que las muestras de suelo rizosférico se colocaron en bolsas selladas y rotuladas, y se trasladaron al Laboratorio de Cultivo y Conservación de microorganismos de la Universidad Técnica Particular de Loja, donde se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Instalación de plantas trampa

Debido a la naturaleza de simbioses obligados de los HMA, se utilizó *Plantago lanceolata* como planta hospedera para el establecimiento de los cultivos trampa. Se utilizó un sustrato a base de arena de mina y tierra en proporción 2:1, v/v. El sustrato fue esterilizado una vez durante 20 minutos (120 °C, 1,1kgf/cm²) y se colocó en macetas de 1 kg (75 % de su volumen). Para el establecimiento de los cultivos trampa de HMA, se pesaron 100 g de suelo rizosférico (suelo de rizósfera + raicillas) de cada árbol y se realizó una muestra compuesta por cada sitio. De esta muestra se prepararon siete cultivos trampa de HMA por sitio. Cada maceta contenía ~750 g de sustrato desinfectado, 100 g de suelo rizosférico y 10 semillas desinfectadas de *P. lanceolata*. Las macetas se colocaron dentro de fundas sunbag (Sigma-Aldrich) y permanecieron en el invernadero durante nueve meses desde la siembra hasta la cosecha para análisis de las esporas y raíces (Walker, 1999), se instalaron también siete macetas de plantas testigo con sustrato y semilla desinfectado sin suelo rizosférico de campo ni raicillas.

Aislamiento de esporas

El aislamiento de las esporas de HMA se hizo tanto de las muestras de suelo colectadas del campo (días luego del muestreo) como de los cultivos trampa (al finalizar los 9 meses de establecimiento de los cultivos). En ambos casos se siguió el procedimiento propuesto por Gerdemann y Nicolson (1963). Como primer paso se prepararon muestras compuestas de suelo por cada sitio (la primera en el momento de la instalación y la segunda al aislar las esporas). Para ello, se colectaron 100 g de suelo de cada cultivo trampa, la muestra se colocó en un recipiente, al cual se añadió agua corriente y se agitó con una varilla de vidrio por cinco minutos hasta disolver los agregados de suelo. Luego de revolver, se esperó 30 segundos para que los materiales pesados se precipitaran y se vertió el sobrenadante sobre dos tamices de 125 µm y 45 µm, apilados en ese orden desde arriba hacia abajo. Se repitió este proceso hasta que el agua del recipiente con la muestra de suelo hubiera tomado un color transparente claro. Los sólidos retenidos en los dos tamices fueron colocados en tubos Falcon de 50 ml, se añadieron 40 ml de agua destilada y se centrifugaron a 3500 revoluciones durante tres minutos y se eliminó el sobrenadante para desechar la materia orgánica en exceso procedente del suelo rizosférico. En el siguiente paso, se agregó a los tubos 40 ml de una solución de sacarosa al 70 %, se agitó la mezcla hasta disolver el pellet de suelo y se llevó a la centrifuga a las condiciones descritas. Terminado este proceso se colocó el sobrenadante sobre un tamiz de 38 µm y se lavó bajo un chorro de agua, los sólidos fueron colocados en un tubo Falcon con agua destilada y refrigerados para su posterior análisis.

Análisis morfológico de esporas y establecimiento de morfotipos

El material recolectado en los tubos se vertió en lunas de reloj y fue observado a través de un estereoscopio ZEISS Ste-mi DV4 de 32x. Con ayuda de una pipeta Pasteur se separaron todas las esporas de HMA con apariencia de viabilidad (con contenidos lipídicos, sin manchas en la pared externa de las esporas y turgentes) de los residuos. Las esporas recolectadas fueron colocadas en tubos Eppendorf de 1,5 ml con etanol al 70%. Se separaron en función de su forma, color, tamaño (se midió el diámetro de 20 esporas por morfotipo y se obtuvo la media), ornamentación y presencia de hifa de suspensión llegando así a establecer diferentes morfotipos (Bagyaraj y Stürmer, 1995). Se realizaron montajes permanentes con soluciones de alcohol polivinílico-ácido láctico-glicerol (PVLG) y PVLG con solución de Melzer (1:1, v/v). Las observaciones microscópicas de las placas se realizaron en un microscopio óptico con objetivos 40x y 100x. Las características fueron anotadas y contrastadas con las descripciones del INVAM - The International Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Schenck, 2006).

Tinción de raicillas de *Cinchona officinalis*

Las raicillas de cada árbol que fueron extraídas se cortaron en piezas de un centímetro, se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml y siguiendo el método propuesto por Phillips y Hayman (1970), las raicillas fueron aclaradas en KOH al 10% a 80 °C por una hora en un bloque de calentamiento Fisher Scientific, enjuagadas tres veces con agua corriente y acidificadas con HCl al 10% a temperatura ambiente por 10 minutos. Se desechó el HCl y los segmentos de raicilla sin enjuagar se tiñeron con 0,05% de azul de metileno diluido en ácido láctico al 90% a 80 °C durante una hora en el bloque de calentamiento. Finalmente, las raicillas se enjuagaron con ácido láctico al 50% para eliminar el exceso de azul de metileno.

Tinción de raicillas de *Plantago lanceolata*

Para la tinción de raicillas se usó la metodología ya mencionada con diferencias de temperaturas y tiempos de tinción, las raicillas se colocaron en KOH durante 30 minutos a una temperatura de 65 °C en el bloque de calentamiento; luego de tres enjuagues con agua destilada, se colocó HCl durante un minuto y sin enjuagar se colocó azul de metileno al 0,05% por 30 minutos a 65 °C en el bloque de calentamiento. Los segmentos de raicilla tinturados se colocaron en portaobjetos con un microscopio con una amplificación de objetivo 40x y se observaron las vesículas, arbuscúlos e hifas.

Evaluación del porcentaje de colonización por HMA

Para determinar los niveles de colonización de las raíces en *Plantago lanceolata* se examinaron cinco plantas por sitio, y para *Cinchona officinalis* se analizó una placa por árbol, siguiendo la metodología propuesta por Trouvelot *et al.* (1986), en la que se asigna una categoría, tomando en cuenta las estructuras micorrízicas y su abundancia: cada fragmento de raíz fue calificado de 0 a 5 según su nivel de colonización

(Figura 2).

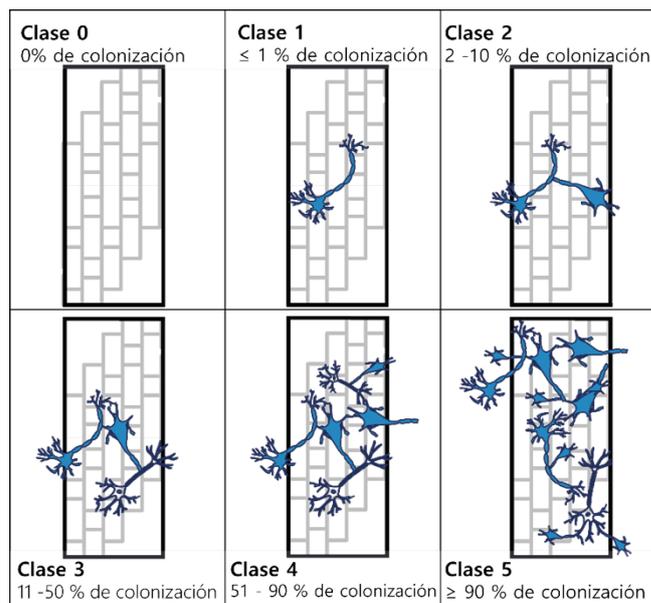


Fig. 2: Clases de hongos micorrízicos arbusculares usados para cuantificar el porcentaje de colonización. Adaptado de Trouvelot *et al.* (1986).

La frecuencia del porcentaje de colonización (%F) fue determinada con la ecuación 1:

$$\%F = \frac{N - no}{N} \times 100 \quad (1)$$

Donde N es el número de fragmentos observados y no es el número de fragmentos sin colonias de micorrizas.

La intensidad de colonización, medida mediante el porcentaje de la longitud radicular colonizada (%RLC), fue calculada con un promedio de 30 raicillas por árbol usando la ecuación 2:

$$\%RLC = \frac{95n^5 + 70n^4 + 30n^3 + 5n^2 + n}{N} \quad (2)$$

Donde n^5 , n^4 , n^3 , n^2 , n son la cantidad de fragmentos registrados como 5, 4, 3, 2, 1 y N es el total de fragmentos observados.

El porcentaje de colonización de raíz indica cuán invadidas se encuentra el grupo de raicillas observadas por HMA, mientras que el porcentaje de RLC indica, mediante categorías, el porcentaje de invasión del individuo evaluado.

Análisis estadístico

El análisis de varianza se realizó utilizando las librerías normtest, nortest y moments en R Core Team (2021). La normalidad de los datos fue verificada para determinar el tipo de análisis a implementar. Se efectuó la prueba de Shapiro-Wilks para determinar la normalidad de los datos de colonización de raíces y colonización de la longitud de la raíz. Una vez determinado el comportamiento no paramétrico de los datos se procedió a realizar un test de Levene utilizando la librería Car en R Core Team (2021), esto permitió analizar la homocedasticidad de los datos y así verificar el comportamiento homogéneo de las medias, así como la distribución de las varianzas. Debido a que no se cumplió con el supuesto de

Tabla 1: Características de esporas usadas para la identificación de morfotipos de HMA en *Cinchona officinalis* de la provincia de Loja, Ecuador.

Morfotipo	Tamaño (um)	Forma	Color	Melzer	N. de paredes	Hifa	Característica pared
<i>Acaulospora</i>	75,19 – 299,7	Globosa, subglobosa	Amarillo anaranjado, amarillo claro, amarillo pastel, marrón anaranjado.	Positivo	3	Cilíndrica	Rugosa
<i>Funneliformis</i>	62,87 – 251,50	Globosa, subglobosa	Amarillo anaranjado, amarillo claro, amarillo pastel, amarillo con tinte verde pálido	Negativo	3	Cilíndrica	Cicatriz
<i>Gigaspora</i>	202,15 – 923,52	Globosa, subglobosa	Amarillo anaranjado, amarillo claro, amarillo pastel	Negativo	3	Ninguna	Lisa
<i>Glomus</i>	51,73 – 148,72	Elipsoidal, globosa, subglobosa	Amarillo anaranjado, amarillo claro, amarillo pastel, amarillo con tinte verde pálido	Negativo	3	Acampanada	Lisa

Tabla 2: Número de esporas viables caracterizadas por género y sitio en 100 g de suelo, tanto directamente de campo (directamente en *Cinchona officinalis*) como de las plantas trampa (*Plantago lanceolata*).

Sitios	N. de esporas viables caracterizadas	Géneros			
		<i>Glomus</i>	<i>Funneliformis</i>	<i>Acaulospora</i>	<i>Gigaspora</i>
Campo					
Cajanuma	41	28	1	10	2
Granadillos	64	37	10	12	5
Yamburara	60	22	19	18	1
Congoya	35	11	10	13	1
Uritusinga	23	15	6	2	0
Plantas trampa					
Cajanuma	16	7	5	4	0
Granadillos	41	25	13	0	3
Yamburara	22	16	3	3	0
Congoya	22	17	2	1	2
Uritusinga	25	8	17	0	0
Total	349	186	86	63	14

distribución normal, se procedió a realizar el test de Kruskal-Wallis implementado para un set de datos no paramétricos, considerando un nivel de significancia del 0,05, este test emplea rangos al comparar las medianas y contrasta la hipótesis de que las muestras han sido obtenidas de una misma población o no.

RESULTADOS

Identificación morfológica de esporas

A partir del análisis morfológico de las esporas recolectadas, en todos los sitios se lograron identificar cinco morfotipos de HMA (Figura 3) que luego se clasificaron en cuatro géneros.

La identificación se realizó tomando en cuenta características similares de color, forma, tamaño, número y rasgos de paredes, tipo de hifa, ornamentación y reacción al reactivo de Melzer (Tabla 1).

El morfotipo de esporas más abundante corresponde a esporas con características similares en forma color y estructura a las esporas del género *Glomus* con un número de esporas

viables contabilizadas de 186, seguido de *Funneliformis* con 86, *Acaulospora* 63, mientras que *Gigaspora* exhibió el menor número con solo 14 esporas (Tabla 2).

Porcentaje de colonización en raíces de *Cinchona* (campo), y en raíces de *Plantago lanceolata* (plantas trampa)

Las principales estructuras encontradas en las raíces correspondieron a: hifas, vesículas y esporas intrarradiculares. Se observó una abundante colonización en las raíces de cascarilla obtenidas de campo que varió entre el 80 y 89%, en las plantas trampa el porcentaje de colonización fluctuó entre el 2 y 7%. Por otro lado, el porcentaje de RLC de muestras de campo tuvo una variación de entre el 20,97 y 38,13%, y en las plantas trampas fue considerablemente menor entre 0,20 y 1,53% (Tabla 3).

La comparación de los datos de colonización en frecuencia e intensidad por sitio, incluido muestras de campo y plantas trampa, arrojó un p-value de 0,31 (>0,05), por lo que se concluyó que no existen diferencias significativas entre los sitios

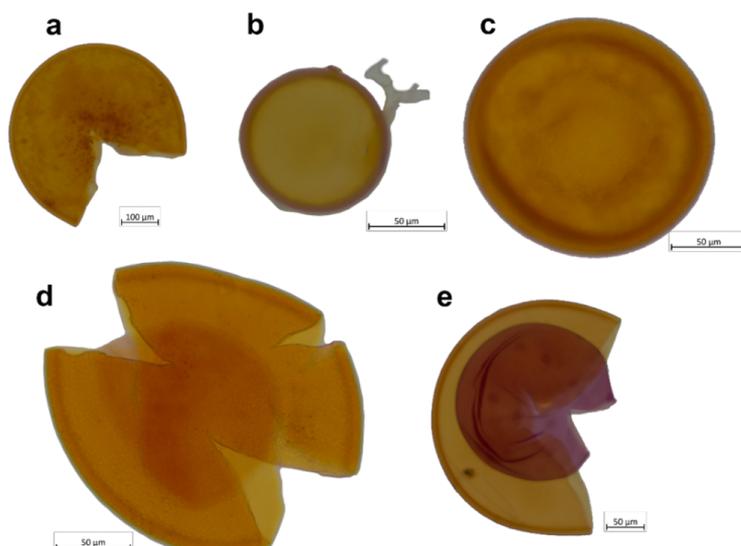


Fig. 3: Morfotipos de esporas encontradas en *Cinchona officinalis* de las zonas de estudio de la provincia de Loja, Ecuador: a) *Gigaspora* (10x); b) *Funneliformis* (40x); c) *Glomus* (40x); d) *Acaulospora* (40x); e) *Acaulospora* (20x). Esporas observadas en PVLG + Melzer.

de estudio. Se realizó un análisis por pares de datos, en donde se encontró diferencias significativas entre el testigo y los otros lugares muestreados. El único grupo que mostró diferencias significativas con el resto de sitios fue el testigo, ya que este grupo de plantas trampa no tenía esporas, hifas o raíces colonizadas provenientes del campo.

Tabla 3: Porcentaje de colonización y porcentaje de RLC en *Cinchona officinalis* (campo) y *Plantago lanceolata* (planta trampa).

Sitio	Variable	Colonización %	RLC %
Podocarpus	Campo	81,00	38,12
Granadillos	Campo	89,00	35,35
Yamburara	Campo	79,00	33,81
Congoya	Campo	83,33	29,50
Uritusinga	Campo	80,00	20,97
Podocarpus	Planta trampa	4,60	1,36
Granadillos	Planta trampa	3,40	0,92
Yamburara	Planta trampa	4,40	0,52
Congoya	Planta trampa	7,00	1,53
Uritusinga	Planta trampa	2,00	0,20
Testigo	Planta trampa	0,00	0,00

La Figura 4 nos permite apreciar que existió un mayor porcentaje de colonización en las muestras de campo, con promedios muy similares en todos los sitios, entre 79 y 83%. La colonización de las raíces de Uritusinga y Yamburara tienen un comportamiento similar, tanto en las medias como en los valores mínimos y máximos, Congoya mantiene el mismo promedio y el mismo máximo pero un mínimo mayor, mientras que Granadillos tiene un valor de media superior, pero al igual que en los otros tres sitios presenta muestras que alcanzan el 100%. Por su parte, las muestras tomadas en el Parque Nacional Podocarpus presentaron baja variabilidad, a excepción de 3 outliers que pueden ser similares a los niveles de colonización de los otros sitios.

Para las muestras provenientes de campo existe un p-value de 0.5819 (>0.05), por lo tanto no se encontraron diferencias significativas entre las muestras de los sitios, tampoco se encontraron diferencias entre el testigo y los demás trata-

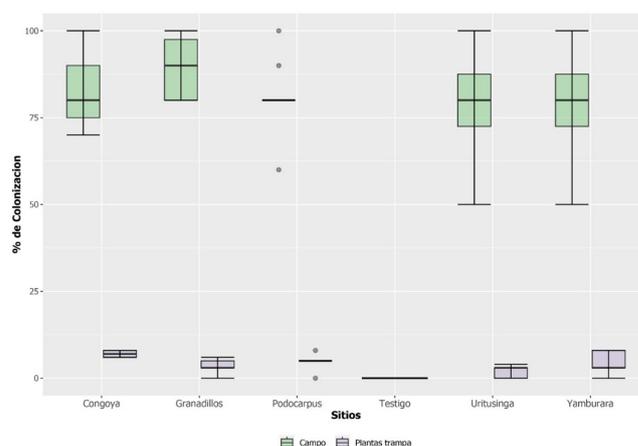


Fig. 4: Box-plot de porcentaje de colonización de HMA en raíces de *Cinchona officinalis* (campo) y en las plantas trampa *Plantago lanceolata* (plantas trampa).

mientos.

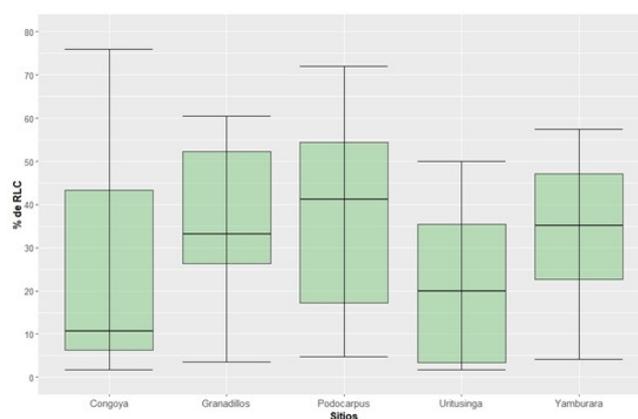


Fig. 5: Box-plot de intensidad de colonización de HMA (%RLC) en raíces de *Cinchona officinalis*.

Una vez analizados los datos de porcentaje de colonización por longitud de raíz de HMA en las muestras de *Cinchona officinalis*, se pudo observar que las muestras de cam-

po tienen comportamiento heterogéneo en función de la zona de muestreo. El Parque Nacional Podocarpus muestra un mayor porcentaje de colonización, seguido de Granadillos y Yamburara; Uritusinga muestra un menor porcentaje de colonización junto a Congoya, que tiene una tendencia menor, con ciertas muestras con valores máximos.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que existe una alta colonización de HMA coexistiendo en las raíces de *C. officinalis* a nivel de campo, las características morfológicas descritas en los resultados fueron comparadas con la base de datos de INVAM (Schenck, 2006), encontrando similitudes y algunas variaciones en su descripción.

En el género *Acaulospora* se coincide en la descripción de las esporas de forma globosa o subglobosa, así como en la presencia de una unión entre la spora y la hifa, además de la reacción positiva al reactivo de Melzer. Sin embargo, se observan discrepancias en cuanto al color de las esporas, se obtuvieron tonos como: amarillo anaranjado y amarillo claro, mientras que en la base de datos señala que las esporas son subhialinas en su etapa juvenil y se tornan marrón claro al madurar.

El género *Funneliformes* descrito en la presente investigación coincide con la base de datos en la forma de las esporas globosa y subglobosa, también se observaron tres capas en la estructura de las esporas y la hifa se describe como cilíndrica, pero se observaron pequeñas variaciones en la identificación de los colores de las esporas, ya que en la base de datos no se menciona la reacción al reactivo de Melzer.

Las características de *Gigaspora* coinciden en su forma globosa y subglobosa y tonalidades de color amarillo anaranjado, claro y pastel, sus paredes presentan tres capas, y aunque en este estudio no se observaron hifas, en el INVAM se describe una hifa sustentadora con un ancho de 32 a 45 micras. Este género fue el menos representado con solo 14 esporas viables, esto podría deberse a que este género requiere de condiciones más específicas de desarrollo y mayor tiempo para esporular (Hart y Reader, 2002). En el género *Glomus* se concuerda en la forma de las esporas: elipsoide, globosa y subglobosa, el color de las esporas en tonalidades de amarillo y en la reacción negativa a Melzer, pero sí existió una variación en la hifa: se observó una hifa acampanada, mientras que la base de datos describe una hifa subtendida.

Las diferencias morfológicas encontradas en todos los géneros descritos pueden atribuirse a variaciones entre especies o subespecies, a diferentes métodos de estudio utilizados o a posibles variaciones en los especímenes analizados. Sin embargo, el hecho de que no haya diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de esporas analizados sugiere que existe una variabilidad aleatoria y no una verdadera diferencia en la población. Es importante destacar que muchos caracteres morfológicos se conservan en diferentes taxones en Glomales, y su diseño simple oculta una divergencia considerable a nivel molecular (Morton y Redecker, 2001; Schussler y Walker, 2010). Walker et al. (2007) en su estudio observó la presencia de un hongo formador de esporas dimórficas, produciendo dos tipos de esporas, cada uno de los cuales se habían clasificado en un género distinto. La caracterización y descripción de especies de HMA están li-

mitadas por el estado del conocimiento y la disponibilidad de referencias, por lo que se vuelve necesario combinar morfología, filogenia y ecología para caracterizar adecuadamente a los HMA (Gamper et al., 2009). Integrando estos enfoques, podremos obtener una visión más completa y precisa de la diversidad y las relaciones evolutivas de los HMA.

El género *Glomus* fue encontrado en todos los sitios muestreados, lo cual podría indicar que tiene un rango de presencia amplio. Esto coincide con el estudio de Apolo (2012) quien identificó a los géneros *Glomus* y *Acaulospora* tanto en la provincia de Loja como en las islas Galápagos. Esta tendencia concuerda con los trabajos de Karaarlan et al. (2015), Medina et al. (2010) y Urgiles et al. (2019), quienes han descrito al género *Glomus* como una especie generalista. Estudios realizados por Guamán (2014) en la provincia de Loja, por Serrano (2013) en las islas Galápagos, por Medina et al (2010) en Cuba y por Pérez y Peroza (2013) en Colombia, coinciden en que el género más dominante es *Glomus* con un porcentaje que va desde el 64,4 al 92 % de los morfotipos evaluados, *Paraglomus* y *Gigaspora* son los menos abundantes con un rango de 1,6 a 4 %.

El menor porcentaje de colonización de raíces de cascarilla fue en el sitio Uritusinga, donde se encontraron los especímenes de menor edad, razón por la cual se asume que la simbiosis tarda en establecerse, supuesto que coincide con Dodd (2011) quien afirma que las plantas con sistemas radiculares jóvenes son menos micotróficas que las que tienen raíces más gruesas y leñosas y esto determina la capacidad de absorción de nutrientes.

Se obtuvo una abundante colonización y porcentaje de RLC en las raíces de cascarilla obtenidas de campo, mientras que en las plantas trampa estos porcentajes fueron escasos. En estudios similares en *Cinchona*, Guamán (2014), Apolo (2012), Guachón y Prado (2012), Rodríguez (2014) y Serrano (2013) obtuvieron altos porcentajes de colonización de raíz de *Cinchona sp.* que variaron entre el 58 y 100 %, datos que concuerdan con la presente investigación donde se encontró un porcentaje de colonización promedio de 79 % a 83 %, demostrando el alto grado de micotrofia de esta especie, por lo que los HMA podrían tener un rol importante para su desarrollo y adaptación al medio.

Apolo (2012) obtuvo un porcentaje de colonización menor al 1 % en plantas trampa, lo cual coincide con los resultados de esta investigación donde se obtuvo un máximo de 7 % de colonización de raíces de *P. lanceolata*; esta diferencia en porcentaje de colonización entre raíces de campo y plantas trampa se presume podría deberse a la diferencia de las condiciones ambientales y la escasa fertilidad del sustrato usado para *P. lanceolata*: tal y como lo afirman Urgiles et al. (2016), la inoculación de HMA y la aplicación de fertilizantes en cantidades moderadas facilita y mejora el establecimiento de plántulas, teniendo en cuenta que tanto la diversidad de especies de HMA como su dominancia están relacionadas con propiedades físico-químicas del suelo, el contenido de nutrientes y la composición florística de cada lugar (Urgiles et al., 2019; van der Heijden et al., 2003),

Las diferencias de porcentajes de colonización entre los distintos géneros encontrados en el suelo rizosférico, es probable que se atribuyan a la diferencia de estrategias de colonización usadas por los diferentes taxones de HMA: *Glomus* y *Acaulospora* tienen un micelio extra-radicular altamente

infeccioso con hifas delicadas y difusas mientras que *Gigaspora* se regenera con mayor frecuencia a partir de esporas, tienen hifas robustas y densamente agregadas, la latencia de las esporas y las necesidades ambientales específicas para la germinación de las esporas presumiblemente ralentizan la velocidad a la que los HMA que se regeneran por esporas pueden colonizar las raíces de las plantas (Hart y Reader, 2002).

Los resultados de la presente investigación ayudan a comprender la complejidad y dinámica de la rizósfera. El análisis morfológico del suelo puede proporcionar información sobre la estructura y composición del suelo asociado a *C. officinalis*, incluyendo la presencia y distribución de los agregados del suelo y su influencia en la productividad de las plantas y el funcionamiento de los ecosistemas (Rillig y Mummey, 2006). El porcentaje de colonización micorrícica puede indicar la presencia y nivel de la simbiosis entre los hongos micorrícicos y las raíces de las plantas. Philippot *et al.* (2013) en su revisión afirman que la red de micelios puede funcionar como un sistema de mensajería, lo que implica que una alta colonización de HMA podría ser beneficiosa para la planta al permitir una comunicación más eficiente para la activación de las defensas contra herbívoros. El porcentaje de RLC ofrece información sobre la extensión de la red micorrícica y su contribución a la formación de agregados estables en el suelo, que mejoran la porosidad del suelo y permiten el flujo de aire y agua. La rizósfera es compleja y dinámica por lo que entender su ecología y evolución es clave para mejorar la productividad de las plantas y el funcionamiento de los ecosistemas (Philippot *et al.*, 2013).

Este trabajo de investigación evidencia la simbiosis entre *C. officinalis* y los HMA que podría servir de línea base en futuras investigaciones que permitan incrementar el conocimiento sobre la importancia de la asociación micorrícica para el crecimiento, desarrollo y rendimiento de las plantas a través de análisis genéticos para una identificación precisa de las especies. También el estudio de las etapas de desarrollo de las esporas proporcionaría una comprensión más completa de su estructura y características a lo largo del ciclo de vida, y adicionalmente se podrían evaluar las interacciones planta-hongo para estudiar los efectos de la colonización micorrícica en el crecimiento, nutrición y la resistencia de la planta, así como las respuestas del hongo a las condiciones del suelo y la planta huésped.

CONCLUSIONES

Se observa una alta interacción de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en las raíces de *C. officinalis* a nivel de campo. Se identificaron diversas especies de HMA, entre ellas, *Acaulospora*, *Funneliformes*, *Gigaspora* y *Glomus*. Es importante destacar que el género *Glomus* fue el más prevalente en todos los sitios muestreados, seguido por *Acaulospora*. La colonización de las raíces de *C. officinalis* por HMA mostró altos niveles en el entorno natural, mientras que se registraron niveles bajos en las plantas trampa. Esta diferencia podría atribuirse a las disparidades en las condiciones ambientales y características del suelo entre los árboles en su hábitat natural y los cultivos trampa. Cabe señalar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de HMA entre los diversos sitios de estudio, lo

que sugiere que las condiciones edáficas y climáticas en todos los sitios evaluados podrían ser similares.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Hernán Lucero por su apoyo en la colecta de muestras, a César Benavidez por su apoyo en la toma de datos de campo y asesoría estadística y a la maestría en Biotecnología con Mención en Producción Vegetal de la Universidad Técnica Particular de Loja por el financiamiento y respaldo en la elaboración de esta investigación.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Conceptualización: YA, PL; metodología: PL y YA; análisis formal: YA, PL; investigación: YA, PL; recursos: PL; curación de datos: YA; redacción — preparación del borrador original: YA; redacción — revisión y edición: YA, PL; visualización: YA; supervisión: PL; administración de proyecto: PL; adquisición de financiamiento para la investigación: PL. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Yajaira Arévalo: YA. Paúl Loján: PL.

FINANCIAMIENTO

Este estudio fue financiado por la Universidad Técnica Particular de Loja, apoyado por el Departamento de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

REFERENCIAS

- Acosta-Solis, M. (1946). *Cinchonas del Ecuador*, Editorial Ecuador-Quito. <https://bibdigital.rjb.csic.es/en/records/item/14677-cinchonas-del-ecuador?offset=1>
- Acosta-Solis, M. (1989). La Cinchona o Quina Planta Nacional del Ecuador. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas*, 17(65), 305–311.
- Andersson, L. (1998). A Revision of the Genus *Cinchona* (Rubiaceae-Cinchoneae). In *Memoirs of the New York Botanical Garden* (p. 64). <https://www.tropicos.org/reference/1020896>
- Apolo, M. (2012). *Germinación en laboratorio e influencia de los hongos micorrízicos y la aplicación de nutrientes en el crecimiento de dos procedencias de Cinchona pubescens, a nivel de invernadero* [Universidad Nacional de Loja]. <https://dspace.unl.edu.ec/handle/123456789/5340>
- Armijos-González, R., y Pérez-Ruiz, C. (2016). In vitro germination and shoot proliferation of the threatened species *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae). *Journal of Forestry Research*, 27(6), 1229–1236. <https://doi.org/10.1007/s11676-016-0272-8>
- Aymard, G. (2019). A brief outline on current taxonomical and nomenclatural aspects of the genus *Cinchona* (Rubiaceae-Cinchoneae). *Revista Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43, 234–241. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1079>
- Bagyaraj, J., y Stürmer, S. (1995). Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA). *Instituto Nacional de Ecología y*

- Cambio Climático*, 7, 217–242.
- Bajtai, A., Ilisz, I., Howan, D. H. O., Tóth, G. K., Scriba, G. K. E., Lindner, W., y Péter, A. (2020). Enantioselective resolution of biologically active dipeptide analogs by high-performance liquid chromatography applying Cinchona alkaloid-based ion-exchanger chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 1611(460574), 12. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460574>
- Barnes, C. J., Maldonado, C., Frøslev, T. G., Antonelli, A., y Rønsted, N. (2016). Unexpectedly High Beta-Diversity of Root-Associated Fungal Communities in the Bolivian Andes. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01377>
- Canales, N. A., Gress Hansen, T. N., Cornett, C., Walker, K., Driver, F., Antonelli, A., Maldonado, C., Nesbitt, M., Barnes, C. J., y Rønsted, N. (2020). Historical chemical annotations of Cinchona bark collections are comparable to results from current day high-pressure liquid chromatography technologies. *Journal of Ethnopharmacology*, 249(112375), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112375>
- Caraguay-Yaguana, K. A., Eras-guaman, V. H., Gonzalez-Zaruma, D., Minchala-Patiño, J., Yaguana-Arévalo, M., y Valarezo-Ortega, C. (2016). Reproductive potential and seed quality analysis of Cinchona officinalis L., from forest relicts in the Province of Loja – Ecuador. *Investigación Altoandina*, 18(3), 271–280. <https://doi.org/dx.doi.org/10.18271/ria.2016.216>
- Choong, E. (2009). *Cinchona Alkaloids in Synthesis and Catalysis* (C. E. Song (ed.)). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527628179>
- Crawford, M. (2016). *The Andean Wonder Drug*. University of Pittsburgh Press. <https://upittpress.org/books/9780822944522/>
- Cueva-Agila, A., Vélez-Mora, D., Arias, D., Curto, M., Meimberg, H., y Brinegar, C. (2019). Genetic characterization of fragmented populations of Cinchona officinalis L. (Rubiaceae), a threatened tree of the northern Andean cloud forests. *Tree Genetics y Genomes*, 15(6), 81. <https://doi.org/10.1007/s11295-019-1393-y>
- Dodd, J. (2011). Recent advances in understanding the role of arbuscular mycorrhizas in plant production. *Inter-Relação Fertilidade, Biologia Do Solo e Nutrição de Plantas*, 3(10), 486–496.
- Feijó, C., Francis, E., Milena, C., Fanny, H., Danny, R., Jorge, J., Moreno, J., Magaly, Y., Víctor, E., y Darwin, P. (2019). Propiedades físicas y características anatómicas de la madera de Cinchona officinalis (L.) Ruiz y Cinchona macrocalyx Pav. ex DC en relictos boscosos al sur de Ecuador. *Bosques Latitud Cero*, 9(1), 94–109.
- Fernández-Pérez, J., Jiménez-Artacho, C., y Fonfría-Díaz, J. (2004). Las Quinas de Caldas. In *VIII Congreso de la Sociedad Española de Historia de las Ciencias y de las Técnicas* (Vol. 40, pp. 226–243). <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1091020>
- Gamper, H. A., Walker, C., y Schüßler, A. (2009). Diversispora celata sp. nov: molecular ecology and phylotaxonomy of an inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*, 182(2), 495–506. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02750.x>
- Garmendia, A. (2005). *El árbol de la Quina (Cinchona spp.) Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura*. Universidad Técnica Particular de Loja. <https://biblioteca.casadelacultura.gob.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=16276>
- Gerdemann, J. W., y Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2), 235–244. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)
- 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* [Universidad Técnica Particular de Loja]. <https://dSPACE.utpl.edu.ec/handle/123456789/2461>
- Guamán, P. (2014). *Identificación de Hongos Micorrízicos Arbusculares en plantas de Cinchona spp. en sitios perturbados y no perturbados de la Provincia de Loja*. [Universidad Técnica Particular de Loja]. <https://dSPACE.utpl.edu.ec/handle/123456789/9108>
- Hart, M. M., y Reader, R. J. (2002). Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 153(2), 335–344. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00312.x>
- Haug, I., Wubet, T., Weiß, M., Aguirre, N., Weber, M., Günther, S., y Kottke, I. (2010). Species-rich but distinct arbuscular mycorrhizal communities in reforestation plots on degraded pastures and in neighboring pristine tropical mountain rain forest. *Tropical Ecology*, 51(2), 125–148.
- Jäger, H., Tye, A., y Kowarik, I. (2007). Tree invasion in naturally treeless environments: Impacts of quinine (Cinchona pubescens) trees on native vegetation in Galápagos. *Science Direct*, 140(3–4), 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2007.08.014>
- Júnior, W. S. F., Cruz, M. P., dos Santos, L. L., y Medeiros, M. F. T. (2012). Use and importance of quina (Cinchona spp.) and ipeca (Carapichea ipecacuanha (Brot.) L. Andersson): Plants for medicinal use from the 16th century to the present. *Journal of Herbal Medicine*, 2(4), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2012.07.003>
- Karaarslan, E., Uyanöz, R., y Doğu, S. (2015). Morphological identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza on bulbous plants (Taurus Mountain in Turkey). *Archives of Biological Sciences*, 67(2), 411–426. <https://doi.org/10.2298/ABS140417007>
- KLópez, N. (2016). Evaluación del paisaje y recursos escénicos después de 350 años de explotación de la “cas-carilla” o “quina” Cinchona officinalis L. (Rubiaceae) en el sector Cajanuma-Rumishitana, Ecuador. *Arnaldoa*, 23(2), 461–474. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.232.23205>
- Medina, L., Rodríguez, Y., Torres, Y., y Herrera, R. (2010). Aislamiento e identificación de hongos micorrízicos arbusculares nativos de la zona de las Caobas, Holguín. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 33–42. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttextypid=S0258-59362010000300014
- Moraes, M., Ollgaard, B., Kvist, L., Finn, B., y Balslev, I.

- (2006). Etnobotánica en los Andes del Ecuador. In *Botánica Económica de los Andes Centrales: Vol. Primera ed* (pp. 1689–1699).
- Morton, J. B., y Redecker, D. (2001). Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera Archaeospora and Paraglomus, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*, 93(1), 181–195. <https://doi.org/10.1080/00275514.2001.12063147>
- Nair, K. P. P. (2010). Cinchona (Cinchona sp.). In *The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World* (pp. 111–129). Elsevier. <https://doi.org/B978-0-12-384677-8.00004-7>
- Pérez, C. A., y Peroza C, V. (2013). Micorrizas arbusculares asociadas al pasto angleton (*Dichathium aristatum* Benth) en fincas ganaderas del municipio de Tolú, Sucre-Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 18(1), 3362–3369. <https://doi.org/10.21897/rmvz.199>
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., y Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 11, Issue 11, pp. 789–799). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Phillips, J. M., y Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158–198. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- R Core Team. (2018). *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Rillig, M. C., y Mummey, D. L. (2006). Mycorrhizas and soil structure. In *New Phytologist* (Vol. 171, Issue 1, pp. 41–53). <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01750.x>
- Rodríguez, F. (2014). *Inoculación in vitro de hongos micorrízicos (mucl 46238; mucl 43204) independientemente en Cinchona officinalis* [Universidad Técnica Particular de Loja]. <https://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/9103>
- Schenck, N. (2006). *INVAM International Culture Collection of Arbuscular y Vesicular Mycorrhizal Fungi*. <http://fungi.invam.wvu.edu/>
- Schussler, A., y Walker, C. (2010). The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. *The Royal Botanic Garden Kew*, 60.
- Serrano, F. (2013). *Identificación molecular de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) asociados a Cinchona pubescens (Rubiaceae): una especie invasora en la isla Santa Cruz (Galápagos)* [Universidad Técnica Particular de Loja]. <https://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/7940>
- Smith, S. ., y Read, D. . (2008). *Mycorrhizal Symbiosis* (Academic P). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6>
- Trouvelot, A., Kough, J., y Gianinazzi, V. (1986). Mesure du taux de mycorrhization va d'un systeme radriculaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, 217–221.
- Urgiles, Narcisa; Haug, Ingeborg , Setaro, Sabrina ; Aguirre, N. (2016). *Introduction to mycorrhizas in the tropics with emphasis on the montane forest in Southern Ecuador*.
- Urgiles, N., Lalangui, C., Chamba, E., Loján, P., Poma, L., Encalada, M., y Aguirre, N. (2019). Aislamiento y caracterización morfológica de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) de zonas riparias del Sur del Ecuador: un enfoque a la producción de biofertilizantes. *CEDAMAZ Revista Del Centro de Estudio y Desarrollo de La Amazonía*, 09(01), 1–7.
- Urgiles, N., Loján, P., Aguirre, N., Blaschke, H., Günter, S., Stimm, B., y Kottke, I. (2009). Application of mycorrhizal roots improves growth of tropical tree seedlings in the nursery: a step towards reforestation with native species in the Andes of Ecuador. *New Forests*, 38(3), 229–239. <https://doi.org/10.1007/s11056-009-9143-x>
- Van der Heijden, M. G., Wiemken, A., y Sanders, I. R. (2003). Different arbuscular mycorrhizal fungi alter co-existence and resource distribution between co-occurring plants. *New Phytologist*, 158(3), 569–578. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00805.x>
- Villar del Fresno, Á., y Doadrio, A. (2008). Perspectivas históricas de Las Quinas; Notas botánicas y Geobotánicas sobre el género Cinchona L. (Rubiaceae, Cinchonoideae, Cinchoneae). In *Las Quinas* (p. 106).
- Walker, C. (1999). Methods for culturing and isolating arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza News*, 11(2), 2–4.
- Walker, C., Vestberg, M., Demircik, F., Stockinger, H., Saito, M., Sawaki, H., Nishimura, I., y Schüßler, A. (2007). Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., *Ambisporaceae* fam. nov., and emendation of *Archaeospora* and *Archaeosporaceae*. *Mycological Research*, 111(2), 137–153. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.11.008>
- Zevallos, P. (1989). Taxonomía, distribución geográfica y status del género Cinchona en el Perú. In *Universidad Nacional Agraria La Molina* (p. 75).