

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Diversidad fúngica asociada a raíces de tres especies de árboles del género
Matisia, que presentan distintos patrones de agregación en el Parque
Nacional Yasuní.**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en
Ciencias Biológicas**

BRYAN RICARDO ZAMBRANO CEVALLOS

Quito, 2017

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Bryan Ricardo Zambrano Cevallos ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

María Eugenia Ordoñez Maldonado, Ph.D

Directora de la Disertación

Quito, 1 de diciembre de 2017

DEDICATORIA

A la vida, maestra y forjadora de carácter, por permitirme ser parte de ella y enseñarme a valorar las pequeñas cosas, las que realmente importan.

“Haz solo lo que amas y serás feliz. El que hace lo que ama está benditamente condenado al éxito, que llegará cuando deba llegar, porque lo que debe ser será, y llegará naturalmente”

Facundo Cabral

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, ente generador de fuerza y fe para luchar diariamente. A mi madre Elizabeth por enseñarme a amar a la naturaleza y forjarme como el hombre que soy ahora, a mi padre Neurio que con su peculiar forma de ser me ha enseñado que en la vida nunca se termina de aprender ni de trabajar. A mi hermana Eli por siempre darme su cariño y a mi hermano Alejo que ha sido mi gran apoyo, mi mejor amigo. A Alejandro y Male, gracias por ser parte de la familia y brindarme la felicidad de mis sobrinos Mathías, Sara y Alegría.

A mis amigos: Andrés, Diego, Francisco, Santi, Víctor, Henry y Christopher por amenizar mis días, por darme consejo y saber ser familia. A Milena, por darme un hogar en esta etapa de mi vida y brindarme el entusiasmo de una amiga y hermana. A Bianca, por siempre apoyarme y ser la mejor compañera de equipo. Gracias a ustedes por aceptarme tal cual soy y por seguir conmigo en este camino.

En el ámbito académico agradezco a Rafael Cárdenas quien me invitó a ser parte de este proyecto de investigación, a Mariu Ordoñez por guiarme durante este trabajo y con cariño enseñarme que los hongos tienen su encanto. A Renato Valencia, Catalina Quintana y Álvaro Pérez por ser mis grandes mentores y ejemplos a seguir en la ciencia y la botánica, mis grandes pasiones. A Alejandra Camacho y Santiago Burneo por acogerme y apreciar el tiempo que le dediqué a la mastozoología.

Agradezco a Julio Sánchez, Dianita Flores, Eri Caicedo y Milton Zambrano, sin sus conocimientos este trabajo no se hubiera podido realizar. A Rosi, Carmita y Paty por ser tan protectoras y tiernas conmigo, gracias por siempre darme su mano amiga. A todas esas personas que ya no están, que fueron, que colaboraron y me dieron su afecto. Gracias a todos.

Finalmente agradezco a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, mi hogar, por haberme brindado todas las oportunidades pertinentes para el desarrollo de mi carrera y profesionalización. Agradezco especialmente a los proyectos: “Dinámica y diversidad forestal de un bosque megadiverso en el Parque Nacional Yasuní, Amazonía Ecuatoriana” y “Diversidad Micológica ecuatoriana: colección, descripción e identificación de especies de hongos en el Ecuador”, por haber financiado todo este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. OBJETIVOS	7
3.1.1. OBJETIVO GENERAL	
3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. ÁREA DE ESTUDIO	8
4.2. SELECCIÓN DE ESPECIES ARBÓREAS	8
4.3. COLECTA DE MUESTRAS	8
4.4. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS DE HONGOS	9
4.4.1. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA	9
4.4.2. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	9
4.4.3. OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS DE HONGOS	9
4.5. EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE HONGOS	10
4.6. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA Y MACROSCÓPICA DE LOS HONGOS ENCONTRADOS	10
4.7. ANÁLISIS DE DATOS	11
5. RESULTADOS	12
5.1. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE ESTRUCTURAS FÚNGICAS	12
5.2. OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS DE HONGOS	12
5.3. IDENTIFICACIÓN DE CULTIVOS DE HONGOS EN BASE A SECUENCIAS DE ADN	12
5.4. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA Y MACROSCÓPICA DE LOS HONGOS ENCONTRADOS	13
5.5. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE ESPECIES DE HONGOS ASOCIADOS A LAS RAÍCES	14

6.	DISCUSIÓN	15
6.1.	PRESENCIA DE ESTRUCTURAS FÚNGICAS ASOCIADAS A RAÍCES	15
6.2.	DIVERSIDAD DE HONGOS ENCONTRADOS	16
6.3.	HONGOS “ESPECIALISTAS” Y “GENERALISTAS”	18
6.3.1.	HONGOS “GENERALISTAS” O COMPARTIDOS ENTRE LAS ESPECIES DE <i>MATISIA</i>	18
6.3.2.	HONGOS “ESPECIALISTAS” O ÚNICOS DE CADA ESPECIE DE <i>MATISIA</i>	20
6.3.2.1.	HONGOS ASOCIADOS A <i>M. CORDATA</i>	20
6.3.2.2.	HONGOS ASOCIADOS A <i>M. MALACOCALYX</i>	21
6.3.2.3.	HONGOS ASOCIADOS A <i>M. OBLONGIFOLIA</i>	21
6.4.	RELACIÓN ENTRE LA DIVERSIDAD FÚNGICA ENCONTRADA Y LOS PATRONES DE DISTRIBUCIÓN DE LAS TRES ESPECIES DE <i>MATISIA</i>	22
7.	CONCLUSIONES	29
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
9.	FIGURAS	41
10.	TABLAS	48
11.	ANEXOS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Observación macroscópica de varias porciones apicales de raíz de <i>Matisia cordata</i> , <i>Matisia malacocalyx</i> y <i>Matisia oblongifolia</i> en aumento 2.7X.....	41
Figura 2.	Observación microscópica de tinción radicular en <i>Matisia cordata</i> en aumento 10X	42
Figura 3.	Observación microscópica de tinción radicular en <i>Matisia cordata</i> en aumento 40X	42
Figura 4.	Observación microscópica de tinción radicular en <i>Matisia malacocalyx</i> en aumento 10X	43
Figura 5.	Observación microscópica de tinción radicular en <i>Matisia malacocalyx</i> en aumento 40X	43
Figura 6.	Observación microscópica de tinción radicular en <i>Matisia oblongifolia</i> en aumento 40X	44
Figura 7.	Observación microscópica de tinción radicular en <i>Matisia oblongifolia</i> en aumento 40X	44
Figura 8.	Árbol consenso generado con el método “ <i>Neighbor Joining</i> ”	45
Figura 9.	Asociación de cada una de las especies de hongos con una o más especies de <i>Matisia</i>	46
Figura 10.	Resultado del análisis NMDS	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Listado de hongos encontrados en asociación a raíces de <i>Matisia cordata</i> , <i>Matisia malacocalyx</i> y <i>Matisia oblongifolia</i>	48
Tabla 2. Descripción macroscópica de las especies de hongos asociados <i>Matisia cordata</i> , <i>Matisia malacocalyx</i> y <i>Matisia oblongifolia</i>	49
Tabla 3. Descripción microscópica de las especies de hongos asociados <i>Matisia cordata</i> , <i>Matisia malacocalyx</i> y <i>Matisia oblongifolia</i>	51
Tabla 4. Resultados de los análisis ANOSIM (análisis de similitud) y SIMPER (porcentaje de similitud) entre las tres especies de <i>Matisia</i> estudiadas y sus hongos asociados	54

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** Figuras de la distribución espacial de las tres especies de *Matisia* dentro de la parcela de estudio permanente de 50 hectáreas 56
- Anexo 2.** Figuras de “wavelet variaciones” basados en la metodología generada por Detto & Muller-Landau (2013) y desarrollados por R. Cárdenas para las tres especies de *Matisia* 59
- Anexo 3.** Gel representativo de los productos de amplificación de la región ITS (secuencia del transcrito interno) del ADN ribosomal con los cebadores ITS1F e ITS4 por medio del método PCR, obtenidos de 13 cultivos puros de hongos pertenecientes a *Matisia oblongifolia*..... 62
- Anexo 4.** Figuras descriptivas obtenidas de las dieciséis especies de hongos asociados a las raíces de *M. cordata*, *M. malacocalyx* y *M. oblongifolia* 63

1. RESUMEN

Los bosques húmedos tropicales lluviosos pertenecen a los biomas con mayor número de especies de plantas, animales y hongos del mundo. Allí, los organismos vegetales pueden mostrar patrones de distribución, tradicionalmente explicados por factores abióticos y bióticos como el clima, las propiedades físico-químicas del suelo, la propensión a la transmisión de patógenos y herbivoría. En los últimos años la exploración de las asociaciones entre árboles y hongos del suelo ha sido sugerida como uno de los mecanismos que permiten a los árboles vivir en patrones espaciales no esperados como la agregación. Por lo tanto, en el presente estudio se buscó verificar si los patrones de distribución de árboles se relacionan a la presencia de ciertas especies de hongos, determinando la diversidad fúngica asociada a raíces de *Matisia cordata*, *M. malacocalyx* y *M. oblongifolia* y asociándola con los patrones de agregación bajo, intermedio y alto, respectivamente, de estas especies de árboles en la parcela de 50 hectáreas del Parque Nacional Yasuní. Para esto se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas, se verificó la presencia de micelio asociado a las raíces, luego se generaron cultivos puros cuyas especies fueron identificadas por sus características morfológicas y según la secuencia de la región ITS del ADN ribosomal. Se encontraron 16 especies de hongos en asociación a las raíces y estos fueron diferentes entre las tres especies de árboles. La mayor diferenciación de hongos asociados a raíces se encontró en *M. oblongifolia*, cuyo nivel de agregación es el más alto, además se observó que posee especies de hongos especialistas que podrían ayudar a mitigar los efectos negativos dependientes de la densidad. En contraste, *M. malacocalyx* presentó un conjunto de hongos generalistas compartidos con *M. cordata*, lo que posiblemente pudiera explicar su nivel de agregación intermedio. Se propone, además, que *M. cordata* es dependiente de otros factores del tipo abiótico para explicar su bajo nivel de agregación, como la disponibilidad de luz, más no de la composición de hongos presentes en el suelo.

Palabras clave: diversidad de hongos, efectos negativos dependientes de la densidad, agregación, Parque Nacional Yasuní.

2. ABSTRACT

Tropical rain rainforests are part of the biomes with the largest number of plants, animals and fungal species in the world. In these forests plant organisms can show patterns of distribution traditionally explained by abiotic and biotic factors such as climate, physical-chemical properties of the soil, the propensity to transmit pathogens and herbivory. In recent years, the exploration of associations between trees and soil fungi has been suggested as one of the mechanisms that allows trees to live in unexpected spatial patterns such as aggregation. In this study we determined if tree distribution patterns are related to the presence of certain fungal species associated with roots of *Matisia cordata*, *M. malacocalyx* and *M. oblongifolia*, which show low, intermediate and high aggregation patterns, respectively. The tree species were located in the 50-hectare plot of the Yasuní National Park. Macroscopic and microscopic observations of the roots were made to verify the presence of mycelium associated with the roots. Pure cultures of the root associated fungi were obtained, and the species were identified by morphological characteristics and the sequence of the ITS region of the ribosomal DNA. Sixteen species of fungi were found in association with the roots that were different among the three tree species. The greatest differentiation of fungi associated with roots was found in *M. oblongifolia*, whose level of aggregation was the highest and had species of specialized fungi that might help mitigate the density-dependent negative effects. In contrast, *M. malacocalyx* presented a set of generalist fungi shared with *M. cordata*, which could possibly explain its level of intermediate aggregation. It is also proposed that *M. cordata* might depend on other factors such as the availability of light, and not the fungal species available in the soil, to explain its low level of spatial aggregation.

Keywords: fungal diversity, aggregated distribution pattern, density-dependent negative effects, Yasuní National Park.

3. INTRODUCCIÓN

Los bosques húmedos tropicales lluviosos pertenecen a los biomas con mayor número de especies de plantas, animales y hongos del mundo (Kricher, 2011). Esta gran biodiversidad implica un vasto número de interacciones entre estos organismos al generar complejas redes ecológicas a través de distintos niveles de adaptación y especialización (Piepenbring, 2011). Entre las interacciones más importantes destacan aquellas que permiten la supervivencia, adaptabilidad y desarrollo de las plantas, tales como el proceso de la polinización y la dispersión de semillas (Kricher, 2011; Piepenbring, 2011). Estos niveles de interacción no podrían ser llevados a cabo sin que las plantas obtengan los nutrientes y el agua necesarias del suelo, procesos que se creían regulados únicamente por la maquinaria para realizar fotosíntesis, propia y única de las plantas.

Sin embargo, ahora se reconoce que alrededor del 80% de las plantas terrestres tienen algún tipo de relación con hongos, sean estos micorrizas (hongos de raíz), endófitos o saprótrofos que son capaces de facilitar procesos biogeoquímicos tales como la fijación de nitrógeno, obtención de fósforo, solubilización de fosfatos, entre otros (Piepenbring, 2011; Pagano y Gupta, 2016). A cambio, en el caso de las micorrizas, estas obtienen alrededor del 10 – 20% de azúcares producto de la fotosíntesis de las plantas (Piepenbring, 2015). Los hongos endófitos adquieren un hospedero para alguna etapa o todo su ciclo de vida (Rodríguez et al., 2009) y los hongos saprótrofos generan alimento proveniente de la materia en descomposición circundante (Baldrian, 2017).

Las micorrizas son hongos mayormente adaptados a la vida simbiote con raíces, éstos están en contacto con las células corticales de las raíces secundarias de las plantas a través de sus hifas, que son mucho más finas que los pelos radicales, con lo que logran incrementar el área de absorción de nutrientes al generar contacto con otras raíces de varias especies colindantes y formar una red de información e intercambio de reactantes y productos necesarios para la nutrición de las diferentes comunidades de organismos (Piepenbring, 2011; Corrales et al., 2015; Corrales et al., 2016).

Existen varias asociaciones micorrízicas que han sido clasificadas según su forma de intercambio de nutrientes y asociaciones con el hospedero, sus dos principales divisiones son: ectomicorrizas y endomicorrizas (Piepenbring, 2011). Las ectomicorrizas forman asociaciones externas con las células corticales de las raíces, es decir, utilizan la vía del apoplasto para el intercambio de nutrientes y son capaces de generar cuerpos fructíferos visibles alrededor de las plantas, mientras que las endomicorrizas se asocian con el interior de las células, están en íntimo contacto con el protoplasto y son incapaces de generar cuerpos fructíferos visibles (Piepenbring, 2011). Estas diferencias dependen de la biología de cada planta hospedera y el hongo simbiote, que puede pertenecer a varias divisiones del reino Fungi, principalmente Ascomycota, Basidiomycota y Glomeromycota (Pagano y Gupta, 2016; Urgiles et al., 2016).

Los hongos endófitos, en cambio, poseen una relación comensal y rara vez simbiote (Abello y Kelemu, 2006; Rodriguez et al., 2009). Habitan latentes durante largos periodos de tiempo en pequeñas áreas del tejido intercelular, incluyendo raíces, y su presencia puede generar en las plantas la acumulación de compuestos químicos (micotoxinas), capaces de proteger a su hospedero de herbivoría y enfermedades producidas por bacterias y otros hongos (Arnold et al., 2003; Vijayalakshmi et al., 2014). También se ha demostrado que esta clase de hongos pueden generar crecimiento más vigoroso del xilema, más biomasa, e inclusive convierten a las plantas en resistentes organismos contra la sequía (Rodriguez et al., 2009). De la misma manera, los hongos saprótrofos que se alimentan de materia vegetal en descomposición producen enzimas que facilitan la degradación de nutrientes y la posterior toma de estos a través de las raíces (Baldrian, 2017).

Algunos estudios de diversidad de hongos en zonas tropicales exploran la diversidad fúngica asociada a raíces y cómo ésta se ve involucrada con ciertos patrones de diversidad en las plantas. Por ejemplo, en África, el Sudeste Asiático, Guyana Francesa y Panamá, se observan comunidades monodominantes de ciertas especies de plantas, donde aproximadamente el 60% del área basal, o el 50% del dosel de un bosque, es dominado por solo una especie de planta (Peh et al., 2011; Corrales et al., 2016). Se propone que estos

bosques pueden ser generados de dos maneras: la primera, por el aumento en cantidad de individuos de varias especies de ectomicorrizas asociadas a plantas adultas que favorecen el crecimiento de plántulas conespecíficas a su alrededor, evitando así la competencia por recursos como luz, agua, nutrientes, polinizadores y dispersores con otras especies. Y la segunda, involucra la defensa contra patógenos en el suelo por parte de micorrizas asociadas en las plantas, lo que disminuiría la mortalidad de plántulas conespecíficas alrededor de las plantas adultas (Corrales et al., 2016).

Los bosques monodominantes demuestran que en las comunidades de plantas en zonas tropicales, donde generalmente la riqueza local de especies vegetales es alta, a menudo sobre las 100 especies de árboles por hectárea (Wright, 2002), se pueden presentar otros patrones de distribución no esperada, en este caso densamente agregadas, gracias a la posible intervención de micorrizas u otro tipo de hongos que facilitan la toma de nutrientes como nitrógeno o fósforo y evitan la competencia intraespecífica por este tipo de recursos (Bever et al., 2011; Corrales et al., 2016).

En el Ecuador, pocos estudios se han enfocado en analizar patrones de distribución vegetal y cómo estos pudieran estar asociados a hongos. Uno de los estudios que destaca a nivel ecológico se llevó a cabo en bosques tropicales montanos del sur del Ecuador, dirigido a la producción de inóculos de endomicorrizas para mejorar el crecimiento vegetal de árboles de esa zona, con el propósito de generar programas de reforestación (Urgiles et al., 2016). En el área agrícola e industrial se han realizado estudios generales enfocados en la evaluación del crecimiento de varias especies vegetales de importancia alimenticia asociadas a micorrizas como la chirimoya o banano (Tafur, 2010; Conrado, 2015), así como también en la producción y mejoramiento de orquídeas (Hoyos y Rodríguez, 2013). Se denota, sin embargo, el déficit de estudios ecológicos de hongos asociados a raíces en zonas del bosque húmedo tropical lluvioso.

En el Parque Nacional Yasuní, localizado al sur del río Napo con 9820 km² de área protegida, con ~ 3000 mm de lluvia anual y una temperatura promedio de 25 °C (Valencia et al., 2004), se estima existen entre 3000 y 3500 especies de árboles y 500 de

lianas (Pérez et al., 2014), lo que hace que esta zona sea una de las más biodiversas a nivel mundial. Dentro del Parque Nacional Yasuní se ubica una parcela de estudio permanente de 50 hectáreas, que alberga 1140 especies de árboles y arbustos (Pérez et al., 2014), las cuales presentan diferentes patrones visuales de distribución y agregación en una escala espacial determinada (Valencia et al., 2004). Estos variantes de distribución y agregación de especies vegetales se pueden explicar, en parte, por la influencia de factores abióticos, como la heterogeneidad microambiental debida a variación topográfica de la parcela, características del suelo, o nivel de entrada de luz (Valencia et al., 2004; Pérez et al., 2014). Pero, cabe recalcar que las plantas también dependen de factores bióticos y en este caso, por lo ya expuesto, las asociaciones fúngicas que pudieran ser de importancia.

El presente estudio se enfocó en determinar la diversidad de hongos asociados a las raíces de tres especies de plantas del género *Matisia* Bonpl. con distintos patrones de distribución o agregación en el Parque Nacional Yasuní, como un primer paso para comprobar si las poblaciones de hongos pueden estar relacionadas con los distintos patrones de distribución de especies vegetales en el bosque húmedo tropical. Las especies de *Matisia* con las que se trabajó fueron: *Matisia cordata*, que presenta un bajo nivel de agregación y es poco común dentro de la parcela de 50 hectáreas con alrededor de 2 individuos/hectárea; *Matisia malacocalyx* y *Matisia oblongifolia*, que poseen individuos notoriamente agregados espacialmente dentro de la parcela y son consideradas comunes con 88 y 119 individuos/hectárea, respectivamente. Se analizaron las diferencias de la diversidad fúngica y el nivel de agregación de las tres especies de *Matisia*.

3.1. OBJETIVOS

3.1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación entre la diversidad fúngica asociada a raíces de *M. cordata*, *M. malacocalyx* y *M. oblongifolia* y sus patrones de agregación en el Parque Nacional Yasuní.

3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia de hongos asociados a las raíces de las tres especies de árboles en estudio.
- Identificar los hongos asociados a las raíces.
- Asociar la diversidad fúngica de las raíces con los patrones de agregación de los árboles estudiados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio comprendió zonas de bosque de tierra firme aledañas a la parcela de 50 hectáreas de estudio permanente, ubicada dentro del Parque Nacional Yasuní, Estación Científica Yasuní, provincia de Orellana, coordenadas: 76°24'1,8"W; 0°40'16,7"S .

4.2. SELECCIÓN DE ESPECIES ARBÓREAS

Se seleccionaron tres especies de plantas para el estudio, por ser comunes en el área, por su fácil identificación taxonómica y por sus niveles de agregación espacialmente diferenciados (Anexo 1). Se determinó los niveles de agregación de las plantas en base a gráficos de “wavelet variances” desarrollados por R. E. Cárdenas (comunicado personal) y en base a la metodología desarrollada por Detto & Muller-Landau (2013) para tres especies de *Matisia* (Anexo 2). Los gráficos demuestran a qué escala espacial las distribuciones de los individuos se encuentran en agregación, así *M. cordata* posee una baja agregación, *M. malacocalyx* una agregación intermedia (a partir de ca. 30 m) y *M. oblongifolia* una alta agregación a pequeñas escalas espaciales (a partir de ca. 6 m) dentro de la parcela de 50 hectáreas.

4.3. COLECTA DE MUESTRAS

Se colectó el sistema radicular entero de un total de 20 individuos reclutas por cada especie de *Matisia*, es decir, plantas juveniles con una altura mayor a 40 cm y menor a 100 cm, principalmente debido a que las estructuras morfológicas de las raíces pudieron ser apreciadas en su totalidad, además en este estadio de vida es más probable que la colonización por parte de hongos se haya establecido, situación que no ocurriría en estadios más tempranos, como en el caso de plántulas. De esta manera se pudo realizar detalladas observaciones del sistema radicular de cada especie de árbol.

4.4. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS DE HONGOS

4.4.1. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA

Bajo el estereomicroscopio se observaron las estructuras radiculares de cada espécimen colectado para constatar la presencia de tejido fúngico asociado a la raíz.

4.4.2. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Se tiñeron segmentos apicales de las raíces secundarias de cada uno de los especímenes con azul de Tripiano, utilizando el método de tinción de raíces para observar colonización micorrízica propuesto por Phillips y Hayman (1970) y modificado por Koske y Gemma (1989). Los segmentos preparados se observaron bajo un microscopio óptico Zeiss: Axiostar Plus, y se tomaron fotografías con el Equipo Infinity 2, acoplado al modelo de microscopio ya mencionado.

4.4.3. OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS DE HONGOS

Para obtener cultivos puros de los hongos asociados a la raíz, se lavaron las raíces con agua corriente para eliminar tierra y otros materiales contaminantes. Seguidamente, se cortaron tres áreas apicales de raíces secundarias seleccionadas al azar de cada individuo de *Matisia*, esta sección de la raíz, al ser tejido joven, es activo y se relaciona directamente con las hifas de los hongos. Los segmentos extraídos de las raíces secundarias fueron cortados en pedazos de alrededor de 1 cm de largo con un bisturí estéril y fueron colocados en cajas petri con medio de cultivo Sabouraud según el Protocolo caldo Sabouraud Dextrose Broth (HiMedia Laboratories, 2015) + 0.5 gramos/litro de estreptomina, este último para evitar el crecimiento de bacterias asociadas a las raíces. Las cajas fueron incubadas a 24 °C a oscuridad total, y se revisaron periódicamente para controlar el crecimiento de organismos.

Al generarse crecimiento miceliar dentro de la misma caja se observó las diferencias morfológicas más relevantes entre los hongos que allí crecían. El color, la forma y el tipo de crecimiento del micelio fueron los discriminantes para elegir entre morfotipos, los cuales fueron transferidos a una nueva caja petri donde se obtuvo el cultivo puro.

4.5. EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE HONGOS

A partir de los cultivos puros obtenidos, se extrajo el ADN total utilizando el Wizard Genomic Purification Kit: Isolation of Genomic DNA from Yeast Cultures or Plant Tissue (SIGMA-ALDRICH, 2010), según las especificaciones del fabricante. La concentración y calidad del ADN obtenido se midió con un espectrofotómetro, Nanodrop 1000 – Thermo Fischer Scientific.

Se amplificó la región ITS (secuencia espaciadora del transcrito interno) del ADN ribosomal con los cebadores ITS1F e ITS4 por medio del método PCR (White et al, 1990). Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, y enviados a la compañía Macrogen para ser secuenciados, previo el tratamiento con la enzima ExoSap (Thermo Fisher Scientific, 2017) según las recomendaciones del fabricante. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa Geneious V.9.1; se realizaron alineamientos para cada muestra analizada, y los consensos fueron comparados con otras secuencias disponibles públicamente en GenBank mediante la búsqueda BLASTn. Cuando el porcentaje de cobertura e identidad superó el 98% se designó género y especie a las muestras, caso contrario se manejaron como unidades taxonómicas operacionales. Además se generó un árbol consenso con el método “*Neighbor Joining*” para verificar las relaciones entre las secuencias obtenidas y las descargadas del BLASTn.

4.6. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA Y MACROSCÓPICA DE LOS HONGOS ENCONTRADOS

Para la descripción microscópica de las estructuras de los hongos se utilizó la técnica de montaje con cinta adhesiva, que consiste en tomar con pinzas un segmento de

cinta adhesiva de aproximadamente 4 cm de largo, y se la presiona con firmeza sobre la superficie de la colonia de hongos a estudiar. Posteriormente el segmento se coloca con las estructuras fúngicas adheridas hacia abajo en un porta objetos, que lleva una gota de colorante azul de metileno o floxina; esta técnica es ampliamente usada ya que permite observar con claridad las hifas y las estructuras sexuales de los hongos (Harris, 2000). Se tomaron medidas del ancho de las hifas y de ser encontradas, el ancho y largo de las estructuras sexuales. Se describieron características taxonómicas de importancia como la presencia o ausencia de septos, color y forma de las hifas. Estas observaciones fueron realizadas en un microscopio óptico Zeiss: Axiostar Plus, con varias magnificaciones que dependieron de la estructura micelial, y se tomaron fotografías con el Equipo Infinity 2, acoplado al modelo de microscopio ya mencionado.

La descripción macroscópica se basó en técnicas clásicas de observación de colonias de microorganismos que crecen en placas (Bergey y Holt, 1994). Se describió el color, tamaño, superficie, forma, elevación y margen de cada una de las colonias de hongos. Además se tomaron fotografías de las colonias con una cámara Nikon modelo D3100.

4.7. ANÁLISIS DE DATOS

Se realizaron tres tipos de análisis estadísticos para observar la disimilitud en composición de especies de hongos asociados a raíces de *M. cordata*, *M. malacocalyx* y *M. oblongifolia*: NMDS (escalamiento multidimensional no métrico), ANOSIM (análisis de similitud) y SIMPER (porcentajes de similitud), con el propósito de explorar cómo son de similares o distintas las especies de hongos asociados a las raíces de las plantas ya mencionadas (Sánchez, 2017). Estos análisis se realizaron por medio del paquete estadístico “IBM SPSS Statistics 22” y “PAST 3.14” (Hammer et al., 2001).

5. RESULTADOS

5.1. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE ESTRUCTURAS FÚNGICAS

A simple vista, no se observó micelio sobre las raíces de las tres especies de *Matisia*, sin embargo, se observaron estructuras que posiblemente sean ectomicorrizas, principalmente el engrosamiento del meristemo apical de las raíces secundarias con una coloración oscura (Figura 1).

Se observaron un total de 120 tinciones microscópicas en placas, 40 de cada especie de planta; en cada placa se observó y confirmó la presencia de micelio asociado a las raíces secundarias de todas las especies de *Matisia*. Se reconocieron vesículas, que son estructuras propias y únicas de endomicorrizas o micorrizas arbusculares, usadas como reservorios de lípidos, también se pudo observar gigaesporoides, que son estructuras capaces de generar esporas en ciertas etapas del ciclo de vida de estos hongos (Figuras 2 - 7).

5.2. OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS DE HONGOS

Se obtuvieron 90 cultivos en total a partir de los segmentos de raíz, los cuales generaron 63 cultivos puros: 22 pertenecientes a *M. cordata*, 20 a *M. malacocalyx* y 21 a *M. oblongifolia*, se descartaron 27 cajas por contaminaciones severas.

5.3. IDENTIFICACIÓN DE CULTIVOS DE HONGOS EN BASE A SECUENCIAS DE ADN

Se extrajo el ADN y se obtuvo la secuencia de los 63 hongos aislados en cultivo puro (Anexo 3). Siete cultivos no mostraron buena calidad de secuencias por lo que no se pudo obtener los consensos de esas muestras. Por lo tanto, se trabajó con 56 secuencias, originarias de 56 cultivos: 19 de *M. cordata*, 16 de *M. malacocalyx* y 21 de *M. oblongifolia*.

Las secuencias presentaron un porcentaje de cobertura e identidad sobre el 98% en su búsqueda BLASTn en GenBank. Estas fueron comparadas, alineadas y editadas con un mínimo de otras tres secuencias disponibles en GenBank. Las relaciones genéticas entre las muestras de hongos obtenidas y las descargadas del BLASTn se pueden apreciar en el árbol consenso generado por el método de “*Neighbor Joining*” (Figura 8).

En total se obtuvieron 16 especies de hongos asociados las raíces de las tres especies de *Matisia*. De la división Ascomycota se encontraron un total de ocho especies: *Neopestalotiopsis clavispota* (Amphisphaeraceae), *Lasiodiplodia* sp (Botryosphaeriaceae), *Trichoderma harzianum*, *T. ovallisporum*, *T. spirale*, *T. strigosum*, *T. virens* y *Trichoderma* sp. (Hypocreaceae). De la división Zygomycota se encontraron cinco especies: *Mucor circinelloides*, *Mucor* sp., *Rhizomucor* sp. (Mucoraceae), *Mortierella* sp. 1 y *Mortierella* sp. 2 (Mortierellaceae). Las tres especies restantes son unidades taxonómicas operacionales y se las denominó como Fungal sp. 1, Fungal sp. 2 y Fungal sp. 3 (Tabla 1).

Trichoderma spirale, *Rhizomucor* sp., *Neopestalotiopsis clavispota* y Fungal sp. 3 fueron los hongos más abundantes en este estudio con un total de trece, nueve, ocho y seis cultivos, respectivamente. Del resto de especies de hongos se obtienen menos de cuatro cultivos en total.

5.4. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA Y MACROSCÓPICA DE LOS HONGOS ENCONTRADOS

La descripción morfológica macroscópica de las 16 especies encontradas se muestra en la Tabla 2, y la descripción microscópica en la Tabla 3. Se corroboró la morfología de los géneros y especies con las identificaciones realizadas a nivel molecular, a excepción de Fungal sp. 1, Fungal sp. 2 y Fungal sp. 3, de los cuales se desconoce su identidad concreta. Las fotografías de lo observado de cada especie tanto microscópica como macroscópicamente se muestran en el Anexo 4.

5.5. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE ESPECIES DE HONGOS ASOCIADOS A LAS RAÍCES

Se observó que algunas especies de hongos fueron exclusivas de una especie de *Matisia*, siendo *M. oblongifolia* la que posee un total de cinco especies no compartidas: *Mortierella* sp. 1, *Mortierella* sp. 2, *Mucor* sp., *Rhizomucor* sp. y *Trichoderma* sp.. *Matisia cordata* presentó tres especies no compartidas: Fungal sp. 1., *Mucor circinelloides* y *T. virens*. *Matisia malacocalyx* también presentó tres especies no compartidas: Fungal sp. 2, *T. ovalisporum* y *T. strigosum*. Las especies restantes, Fungal sp. 3., *Nopestalotiopsis clavispora*, *T. harzianum* y *T. strigosum*, se compartieron entre las tres especies de *Matisia* a excepción de *Lasiodiplodia* sp. que solo fue compartida entre *M. cordata* y *M. malacocalyx* (Figura 9).

Según los análisis NMDS, ANOSIM y SIMPER existe consistencia en la diferencia de las comunidades de hongos aisladas de las raíces de las tres especies de *Matisia*.

El gráfico obtenido a partir del análisis NMDS (Stress= 0.17, R^2 eje 1= 0.422 y R^2 eje 2= 0.395) permitió apreciar las diferencias entre las comunidades de hongos asociados a las tres especies de *Matisia*, siendo visualmente *M. oblongifolia* la especie de planta que posee la comunidad de hongos más diferenciada (Figura 10).

El análisis ANOSIM (Tabla 4) demostró diferencias entre las tres comunidades de hongos asociados a las tres especies de árboles (R = varía entre 0.15 y 0.21; $P < 0.07$). Sin embargo, entre *M. cordata* y *M. malacocalyx* las diferencias no fueron significativas ($P = 0.06$).

Así mismo, el análisis SIMPER (Tabla 4) mostró que entre las tres especies existió una disimilitud global promedio de 92.41%, y entre especies varió entre 85.07% y 95.9%. *M. cordata* y *M. malacocalyx* tuvieron especies de hongos más similares, mientras que las especies de hongos de *M. oblongifolia* fueron distintas a las otras dos especies de *Matisia* (Tabla 4).

6. DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos, se pudo verificar que existieron asociaciones fúngicas relevantes y diferenciales entre las raíces de *M. cordata*, *M. malacocalyx* y *M. oblongifolia*. Se cumplió, de esta manera, con los objetivos planteados en este estudio.

6.1. PRESENCIA DE ESTRUCTURAS FÚNGICAS ASOCIADAS A LAS RAÍCES

La observación macroscópica y microscópica, permitió notar la presencia de micelio asociado a las raíces. Este fue un importante indicador de que, al igual que en otras especies de plantas pertenecientes a regiones tropicales que pueden o no vivir en agregación (Heijden et al., 2015; Piepenbring, 2015), en las tres especies en estudio existieron asociaciones directas en el córtex radicular, lo que permitiría varios procesos integrativos a nivel de hongo y planta. Además, es importante destacar que no solo el micelio fue una evidencia de estas interacciones, sino también las estructuras propias de micorrizas (Figuras 1-7), tales como el engrosamiento del meristemo apical de raíces secundarias, la presencia de clamidosporas y el desarrollo de vesículas.

El engrosamiento de las raíces secundarias es un efecto producido por las asociaciones de hongos comúnmente conocidos como ectomicorrizas. Se diferencian de otras raíces no micorrízicas por ser más cortas, tener un mayor grosor y porque son fuertemente ramificadas (Piepenbring, 2015). En nuestro caso, las raíces de las plantas en estudio presentaron esta morfología probablemente debido a que están cubiertas por una capa de hifas denominada “manto”, por medio de este y varias extensiones a lo largo del suelo, las plantas son capaces de intercambiar nutrientes y explorar de mejor manera el suelo circundante (Heijden et al., 2015; Piepenbring, 2015). Las hifas del manto son capaces de crecer entre las células corticales, tal como se pudo resaltar en nuestras observaciones, formando una red denominada “Red de Hartig”; este micelio observable entre las células radiculares es el principal responsable del intercambio de glucosa a cambio de fosfatos y otras sustancias nutritivas vía el apoplasto (Piepenbring, 2015).

Las estructuras del tipo clamidosporas y vesículas son propias del orden Glomeromycota, endomicorrizas o micorrizas arbusculares (Webster y Weber, 2007). Estas no forman una red de Hartig como en el caso de las ectomicorrizas, sino que dentro de las células corticales de la raíz estos hongos generan “arbúsculos”, estructuras parecidas a un árbol que son puntas de hifas densamente ramificadas (de ahí su nombre) que permiten un intercambio de nutrientes directamente en el citoplasma (Webster y Weber, 2007). Estas estructuras no fueron observadas en las raíces de este estudio pero sí se observó clamidosporas y vesículas. Las clamidosporas fueron observadas por superposición ya que estas no estaban dentro de las células corticales. Este tipo de estructuras generan colonias de micorrizas, es decir, de ellas germinan las hifas que eventualmente crecerán dentro de las raíces. Las vesículas, en cambio, son engrosamientos que fueron observados dentro o fuera de las células corticales, permiten el almacenamiento de sustancias de reserva y también pueden generar clamidosporas como parte de un proceso reproductivo asexual (Heijden et al., 2015; Piepenbring, 2015).

De acuerdo a la evidencia mostrada, se confirma la presencia de ectomicorrizas y endomicorrizas simultáneamente, en las tres especies de plantas. Esto no es algo inesperado ya que alrededor del 90% de plantas superiores están asociadas a micorrizas de algún tipo (Chilvers et al., 1987; Albornoz et al., 2016); No se pudo identificar a estos hongos ya que ninguno ha sido descrito en asociación a las tres especies de plantas de *Matisia* en este estudio (Tabla 1). La falta de identificación de estos hongos se debió a la metodología del presente estudio, ya que los hongos endomicorrízicos no pueden ser aislados en cultivos. Técnicas especializadas de extracción de ADN a partir del suelo y raíces deben ser aplicadas para poder corroborar no solo la identidad de este tipo de hongos, sino también la función de estos en las tres especies de *Matisia*.

6.2. DIVERSIDAD DE HONGOS ENCONTRADOS

La diversidad de hongos encontrados se resume en la Tabla 1, siendo en total 16 hongos asociados a las tres especies de plantas. Se considera a éste un número relativamente bajo de hongos, ya que de cada sistema radicular por individuo de planta se

obtuvieron como máximo tres cultivos puros de hongos. En otros estudios los hongos cultivados a partir de raíces y asociados al suelo muchas veces superan las 30 o 40 especies reportadas (Vandenkoornhuyse et al., 2002; Anderson y Cairney et al., 2004; Buée et al., 2009; Shi et al., 2014). Se hubiera esperado el crecimiento de más morfotipos fúngicos asociado a raíces de *Matisia*, sin embargo, es posible que por limitaciones del método la verdadera diversidad ecológica de hongos fue subestimada, ya sea por el lento crecimiento de algunos morfotipos que finalmente no fueron identificables o el crecimiento veloz de uno o más hongos dentro de las placas, que pudieron limitar el crecimiento de otras especies.

Otra posibilidad para explicar el número de especies encontradas es el tiempo de colonización por parte de los hongos en cada individuo de planta. Este es un factor importante, ya que se ha demostrado que el tiempo de colonización de hongos en las raíces es variable y dependiente del estadio en el cual la planta se encuentra (Koziol y Bever, 2015). Es posible que el estadio juvenil de las plantas que fueron muestreadas, el cual supera los 40 cm pero no supera los 100 cm de alto, haya influenciado en el número de especies de hongos, sin embargo, en este estudio no fue planteada la idea de comprobar esta diferencia por estadios.

Cabe recalcar que la identificación de las 16 especies encontradas tuvo un firme sustento molecular. La región ITS y los cebadores ITS1F e ITS4 usados en este estudio, son considerados como un código de barras universal para hongos (Yahr y Dentinger, 2016) y tal como se muestra en el árbol consenso generado por el método de “*Neighbor Joining*” (figura 8), las secuencias obtenidas de los cultivos puros y las descargadas del motor de búsqueda BLASTn coincidieron de manera contundente en clados dentro del árbol, siendo los taxa más cercanos los más emparentados molecularmente.

Además, la identificación molecular fue corroborada por medio de descripciones morfológicas (Tablas 2 y 3), donde los géneros y las especies coincidieron macroscópicamente y microscópicamente con claves taxonómicas, a excepción de Fungal sp. 1, Fungal sp. 2 y Fungal sp. 3, cuya determinación aún es desconocida.

6.3. HONGOS “ESPECIALISTAS” Y “GENERALISTAS”

El estudio de las asociaciones fúngicas ha despuntado en los últimos años. El microcosmos del suelo se ha convertido en tema importante para comprender cómo y cuándo las relaciones fúngicas con las raíces pueden dar forma a aspectos de la ecología observable únicamente sobre la superficie (Bardgett y van der Putten, 2014). Por esto, en el presente estudio se buscó la relación entre la diversidad fúngica y el nivel de agregación de las tres especies de árboles analizados, siendo este un estudio pionero en un bosque megadiverso del Ecuador.

La diversidad fúngica encontrada en este estudio se puede dividir en dos grupos: las especies de hongos compartidas entre especies de *Matisia* y las especies de hongos únicas a cada especie de *Matisia* (Figura 9). Las especies compartidas pudieran ser “generalistas” en asociación radicular, mientras que las especies únicas pudieran ser “especialistas”, sin embargo, es importante reconocer en base a lo anteriormente mencionado en esta discusión que la diversidad real de hongos podría verse subestimada.

6.3.1. HONGOS “GENERALISTAS” O COMPARTIDOS ENTRE LAS ESPECIES DE *MATISIA*

Las hongos generalistas por definición, son aquellos que son capaces de acoplarse a varios tipos de hábitat y extraer una amplia gama de recursos a partir de ello, sin generar ningún vínculo estrecho con su hospedero (Kricher, 2010). En este caso, en asociación radicular con *M. cordata*, *M. malacocalyx* y *M. oblongifolia* se encontró a *N. clavispora*, *T. spirale*, *T. harzianum* y Fungal sp. 3. *Lasiodiplodia* sp. fue una especie de hongo compartida entre *M. cordata* y *M. malacocalyx*, que para fines de la discusión, será tratada como un hongo generalista para estas dos especies de plantas.

El haber encontrado estas especies de hongos en las raíces de las tres especies de *Matisia*, permite sugerir que independientemente del nivel de agregación, tipo de hábitat, o

cantidad de nutrientes en el mismo, es probable que estas especies se acoplen y asocien a las formas de vida vegetal circundantes a la parcela de 50 hectáreas indiscriminadamente, sin poder concluir si estas pueden otorgar alguna adaptación especial que genere las características espaciales descritas para estas especies de plantas.

Trichoderma spirale y *T. harzianum* son hongos saprótrofos, cosmopolitas, (Hoyos-Carvajal et al., 2009; Chaverri et al., 2015) que se aíslan mayormente del suelo y materiales como madera, cortezas, otros hongos e innumerables otros sustratos. Son oportunistas con alto potencial de adaptación a varias condiciones ecológicas (Druzhinina et al., 2011). Es posible que por estas características *Trichoderma* fue el género más abundante en este estudio. Además, puede presentar micoparasitismo, es decir, ser capaz de infectar otros hongos, en su mayoría patógenos de plantas, colonizando varios hábitats y sirviendo como un control biológico natural (Druzhinina et al., 2011; Chaverri et al., 2015). Esta última característica podría explicar que estas dos especies de hongos se asociaron de manera endófitas e indiferente a las raíces las tres especies de *Matisia*, y tal vez controló de manera eficaz a otros hongos que pudieron generar potenciales enfermedades en las raíces, esto, a cambio de nutrientes y hábitat durante varias etapas de su ciclo de vida.

Neopestalotiopsis clavispora pertenece a un grupo de hongos patógenos que generan varios metabolitos secundarios capaces de producir enfermedades en plantas (Maharachchikumbura et al., 2014), incluyendo pudrición de raíces, troncos y manchas difusas en las hojas de especies vegetales comerciales (Chamorro et al., 2016; Maharachchikumbura et al., 2017; Yang, et al., 2017). Sin embargo, no se observó síntomas de enfermedad en las plantas analizadas, por lo que se podría decir que este hongo no influyó positiva o negativamente en la distribución directa de las especies bajo estudio ya que la función y el proceso de interacción de este hongo no se conoce.

Lasiodiplodia sp., al igual que *N. clavispora*, pertenece a un género de hongos patógenos, ampliamente distribuidos y bien conocidos en los trópicos como los principales causantes de varias enfermedades en cultivos, entre ellas: Gomosis o “enfermedad de las cortezas sangrantes”, pudrición del tronco del árbol de marañón y deterioro de varios

órganos en plantas de mango, incluyendo raíces (Marques et al., 2013; Coutinho et al., 2017; Mohali et al., 2017). Al no observarse síntomas de enfermedad en las especies de *Matisia*, su presencia en *M. cordata* y *M. malacocalyx* no contribuye a deducir su verdadero potencial en la distribución de estas especies vegetales. Su presencia evidencia que comunidades naturales de plantas también deben lidiar con hongos patógenos comunes a muchos cultivos comerciales, un tema que aún se desconoce y debería ser tratado a profundidad.

Para el hongo clasificado como Fungal sp. 3, no se pudo determinar el beneficio o perjuicio que éste pudiese generar ya que se desconoce el género o cómo este pudiera estar asociado a los individuos de *Matisia*.

6.3.2. HONGOS “ESPECIALISTAS” O ÚNICOS DE CADA ESPECIE DE MATISIA.

Las especies de hongos especialistas podrían mostrar un grado de relación estrecha con las especies de plantas en estudio. Como su nombre lo indica, los organismos que se especializan para convivir, en este caso de manera simbiote con otro, generan exclusividad y en muchos casos beneficios únicos para ambas partes (Douglas, 1998). Podría ser el caso que éstos sean los hongos que generen los singulares patrones de distribución agregados en *M. oblongifolia*.

6.3.2.1. HONGOS ASOCIADOS A *M. CORDATA*

En este estudio se determinó que los hongos únicos o especialistas asociados con *M. cordata* fueron *T. virens*, *M. circinelloides* y Fungal sp. 1. *Trichoderma virens*, al igual que otras especies dentro del género, pertenece a un grupo de hongos endófitos que son capaces de proteger a sus hospederos por medio de interacciones antagonistas micoparásitas (Schuster y Schmoll, 2010). El potencial de este hongo al asociarse con *M. cordata* sería el de brindar protección contra otras especies de hongos patógenos. *Mucor circinelloides* ha sido reportado como endófito de algunas especies de planta. Su función

dentro de los ecosistemas es desconocida, pero se sabe que en conjunto con otras especies de hongos, especialmente del género *Trichoderma*, puede promover el crecimiento vegetal vigoroso en algunas especies de plantas (Zhang et al., 2007). Este hongo puede también almacenar y producir grandes cantidades de lípidos generados a partir de materia a base de carbono (Wynn et al., 2001; Zhang et al., 2007; You et al., 2011).

El beneficio o perjuicio que pudiese generar el hongo clasificado como Fungal sp. 1, es desconocido ya que no se pudo determinar el género y por lo tanto cómo este podría estar asociado a *M. cordata*.

6.3.2.2. HONGOS ASOCIADOS A *M. MALACOCALYX*

En este estudio se determinó que los hongos únicos o especialistas para *M. malacocalyx*, fueron *T. strigosum*, *T. ovalisporum* y Fungal sp. 2. *Trichoderma strigosum* y *T. ovalisporum*, como se mencionó anteriormente, pertenecen al género más común dentro de este estudio, hongos capaces de generar relaciones endófitas con sus plantas hospederas y que son benéficos al controlar otros hongos patógenos (Holmes et al., 2004; Hoyos-Carvajal et al., 2009).

El beneficio o perjuicio que pudiese generar el hongo clasificado como Fungal sp. 2, es desconocido ya que no se pudo determinar el género y por lo tanto cómo este podría estar asociado a *M. malacocalyx*.

6.3.2.3. HONGOS ASOCIADOS A *M. OBLONGIFOLIA*

En este estudio se determinó que los hongos únicos o especialistas para *M. oblongifolia* fueron *Mortierella* sp. 1, *Mortierella* sp. 2, *Mucor* sp., *Rhizomucor* sp. y *Trichoderma* sp. *Mortierella* sp. 1 y *Mortierella* sp. 2, son un género conocido por estar presente en el suelo. Son importantes ya que pertenecen a un grupo funcional de hongos conocidos como “solubilizadores de fosfato” (Osorio y Habte, 2013; Beltrán, 2014). Estos hongos participan en el ciclo del fósforo en los suelos y gracias a su actividad las plantas

pueden aprovechar las grandes reservas de fósforo insoluble que se ha fijado a los minerales del suelo. Las especies de *Mortierella* ayudan a las plantas a tomar este nutriente de vital importancia por sus raíces con mayor facilidad (Moratto et al., 2005; Osorio y Habte, 2014).

Mucor sp. y *Rhizomucor* sp., son hongos asociados a géneros principalmente descomponedores y patógenos. Pese a esto se conoce que algunas especies de *Mucor* pueden remover metales pesados perjudiciales para plantas, además de ser capaces de biodegradar materiales orgánicos en el suelo de forma eficaz y rápida en comparación a otros hongos (Yan y Viraraghava, 2003; Dan et al., 2006). *Rhizomucor* sp. es un hongo difícil de asignar función dentro de este estudio ya que especies del género han sido consideradas desde patógenas de humanos (Martínez – Mugica et al., 2017) hasta endófitas, capaces de biocatalizar ácidos grasos (Rodrigues y Fernández, 2010; Duan et al., 2016). Sin una identidad de especie se desconoce su función, pese a ser el hongo con mayor número de cultivos obtenidos en esta especie de *Matisia*.

En cuanto a *Trichoderma* sp. como ya se ha mencionado, es un género beneficioso y participa activamente como control biológico.

6.4. RELACIÓN ENTRE LA DIVERSIDAD FÚNGICA ENCONTRADA Y LOS PATRONES DE DISTRIBUCIÓN DE LAS TRES ESPECIES DE MATISIA

Los resultados mostraron que hubo una diferenciación en composición de especies de hongos entre las tres especies de *Matisia* analizadas, como se puede observar en los resultados del NMDS (Figura 10). *Matisia oblongifolia* fue la especie que mayor cantidad de hongos únicos presentó en este estudio, además de ser la especie con mayor agregación espacial. Se diferenció en composición de especies de hongos de las otras dos especies de plantas cuyas especies de hongos, en su mayoría, se solapan. También, como soporte estadístico, las pruebas de ANOSIM y SIMPER (Tabla 4) indicaron altos porcentajes de disimilitud y diferencias altamente significativas entre la composición de hongos de

M. oblongifolia y las otras dos especies. *Matisia cordata* y *M. malacocalyx* no presentaron diferencias significativas entre ellas y su porcentaje de disimilitud fue bajo.

¿Qué podría estar ocurriendo? Pues es conocido que los patrones espaciales no aleatorios se presentan de manera indistinta en la ecología de varios hábitats (Law et al., 2009). Estos son capaces de otorgar abundante información sobre cómo las comunidades se estructuran y cómo diversos factores pueden alterar la dinámica de las especies (McIntire y Fajardo, 2009; Detto y Muller-Landau, 2013). Tradicionalmente, la dinámica de las especies vegetales se explicaba en base a factores abióticos como el clima, las propiedades físico-químicas del suelo y factores bióticos como la herbivoría (Bardgett y van der Putten, 2014), sin embargo, en años recientes se ha aceptado de manera amplia que la dinámica de las plantas se encuentra estrechamente relacionada con interacciones entre las raíces y organismos que poseen ciclos de vida edáficos, patógenos, simbiosis y descomponedores a escalas espaciales locales (Ettema y Wardle, 2002; Bardgett y van der Putten, 2014). En este estudio, se cree que la biología de suelo y sus componentes, específicamente los hongos, pudieran estar afectando la distribución espacial de especies de *Matisia* dentro de la parcela de 50 hectáreas.

Matisia cordata fue la especie que presentó los niveles de agregación más bajos y alrededor de 2 individuos por hectárea. Pero, ¿por qué razón no hubo una diferencia significativa en cuanto a especies de hongos con *M. malacocalyx* si esta última posee un nivel de agregación medio con alrededor de 88 individuos por hectárea? Pues existen algunos factores que podrían dar una explicación a este fenómeno. En primer lugar, se debe resaltar que *M. cordata* es una especie rara dentro de la parcela y más bien en muchas ocasiones se la asocia a claros del bosque. La forma y tamaño de su hoja resemble a las hojas de plantas tolerantes y que prefieren grandes cantidades de luz solar, tales como *Cecropia ficifolia* o *Pourouma bicolor*. Además, es una especie de árbol alto, muy distinto a *M. malacocalyx* y *M. oblongifolia* cuyos individuos son árboles pequeños y delgados. Igualmente se observó un individuo adulto, en un claro de bosque cercano a la carretera que dispersó sus semillas bajo su sombra, generando plántulas que ocupaban una buena porción del claro.

Las características mencionadas indican que *M. cordata* es una especie pionera o de estadios tempranos de sucesión dentro del bosque (Swaine y Whitmore, 1988). Las interacciones entre *T. virens* y *M. circinelloides*, como ya fue revisado, podrían contribuir al rápido y vigoroso crecimiento de *M. cordata* en asociación a claros. Sin embargo, el nivel de agregación y distribución de esta especie puede depender de otros factores del tipo abiótico, como sería la dependencia de luz solar. El área de distribución de *M. malacocalyx*, dónde principalmente existen claros de bosque, también sería un ambiente ideal para *M. cordata*, consecuentemente existen varias especies de hongos compartidas entre estas dos especies de plantas.

El bajo número de especies de hongos especialistas en las raíces de *M. cordata* y *M. malacocalyx* puede sugerir que sus especies únicas *T. strigosum*, *T. ovallisorum*, *T. virens*, *M. circinelloides*, Fungal sp. 1 y Fungal sp. 2, también son hongos comunes del estrato edáfico de la parcela, que posiblemente pueden ser afines al hábitat de ambas especies de plantas, siendo *M. malacocalyx* una especie exitosa en cuanto a número de individuos y distribución espacial agregada debido a las asociaciones del tipo generalista con hongos, los que serían más eficaces en la adquisición de recursos al asociarse indiferentemente a estas dos especies de plantas. Por lo que, los hongos tendrían una redundancia funcional por determinar, donde estos no poseen una especificidad en función al hospedero, sino que colaboran de manera equitativa con varias especies de plantas solapándose en función (Rineau y Courty, 2011).

Es importante enfatizar que esta redundancia funcional típicamente analiza una o varias características de las especies en estudio, y no analiza la perspectiva multidimensional del nicho que habitan (Klironomos, 2000; Lilleskov et al., 2011), por lo tanto se podría subestimar el efecto real de la diversidad funcional de estos hongos al sobreestimar su redundancia funcional.

Matisia cordata y *M. malacocalyx* presentaron especies muy parecidas de hongos pese a que su grado de agregación fue muy distinto, al igual que su número de individuos.

En el caso de *M. oblongifolia* los resultados indicaron que esta especie de planta presentó alrededor de 119 individuos por hectárea, el nivel de agregación más alto y estadísticamente las especies de hongos mayormente diferenciadas, tanto para *M. malacocalyx* como para *M. cordata*, con porcentajes de disimilitud del 94.5% y 95.9%, respectivamente. *M. oblongifolia* demostró lo esperado, es decir, que al ser más densa en número de individuos y más agregada espacialmente, debe manejar de alguna manera la coexistencia con otras especies de plantas, para no ser desproporcionalmente abundante en la escala local y así poder mantener la diversidad dentro de la parcela.

Es claro que *M. oblongifolia*, al igual que *M. malacocalyx*, fueron especies numerosas y agregadas. Esto implica que estas plantas debieron desarrollarse en altas densidades de vecinos conespecíficos y por ende debieron conllevar los efectos positivos o negativos de establecerse cerca, a menudo bajo, los adultos de la misma especie (Metz et al., 2010), cosa que no ocurrió con *M. cordata* cuya distribución fue disgregada. Como una premisa para mantener la diversidad en agregaciones grandes de individuos se ha establecido que los efectos negativos dependientes de la densidad (ENDD) (Peters, 2003; Johnson et al., 2012; LaManna, 2017) juegan un rol importante en el mantenimiento y estructuración de muchos sistemas naturales, tanto en zonas templadas como en zonas tropicales (Metz et al., 2010; LaManna, et al., 2017). Se sabe que cuando las especies habitan en agregación los recursos como luz, agua y nutrientes del suelo se volverían un limitante para dispersarse de manera anormal. Por ejemplo, se ha demostrado que dentro de la parcela de 50 hectáreas en Yasuní, la densidad de plántulas que se desarrollan en sus primeros estadios de vida pueden generar altas tasas de mortalidad en su primer año de desarrollo (Metz et al., 2010), debido en gran medida a la acción de enemigos naturales como herbívoros y patógenos de diferente índole como hongos o bacterias (Janzen, 1970; Connell, 1971). El resultado de este proceso negativo para las plántulas o estadios juveniles ayudaría a incrementar la distancia entre individuos de la misma especie y por ende el establecimiento exitoso de otras especies de plantas (Bagchi et al., 2010; Metz et al., 2010).

Pese a lo mencionado anteriormente, observamos que tanto *M. oblongifolia* como *M. malacocalyx*, desafían esta regla general al poseer una gran densidad de individuos por área en comparación a otras especies dentro de la parcela. Se podría atribuir esta capacidad de evitar los efectos negativos dependientes de la densidad precisamente por la asociación con hongos especializados en la toma de recursos del suelo, permitiéndoles mejor crecimiento y una óptima toma de luz, además de convertirlas en resistentes organismos en contra de hongos patógenos y otras enfermedades a nivel de raíz (Brundrett, 2002). Empero, como se discutió anteriormente y en base a las especies de hongos que se obtuvo en *M. malacocalyx*, se podría decir que ésta se benefició por un conjunto generalista de hongos, en cambio, *M. oblongifolia* mostró cinco especies únicas por lo que su adaptabilidad al evitar los ENDD puede depender de una estrecha especialización con estos hongos.

Por lo expuesto, se propone que los hongos especialistas asociados a *M. oblongifolia* tuvieron una retroalimentación positiva y no provocaron ENDD en la cercanía de juveniles y adultos que viven estrechamente agregados. De este modo la planta acumuló microorganismos del suelo que son beneficiosos y específicos para el huésped, y generó una situación desestabilizadora que llevó a dominar una sola especie (Bever et al., 2010). El soporte para esta propuesta se basa en la composición diferencial fúngica que presentó esta especie, tanto ectomicorrizas como endomicorrizas (observadas micro y macroscópicamente dentro y fuera del córtex de la raíz) podrían actuar en conjunto con las dos especies del género *Mortierella* encontradas únicamente en esta especie de planta para asegurar la toma de nitrógeno y fosfatos del suelo.

En este sentido, es bien conocida la paradoja de los suelos extremadamente pobres en nutrientes en la amazonia (Vitousek y Sanford, 1986). En algunas partes de la cuenca del Río Amazonas se pueden observar suelos arenosos, arcillosos que han evolucionado a través de la erosión por millones de años (Lehmann et al., 2003, Kricher, 2011), y aun así, albergan la diversidad vegetal más rica de todo el planeta (Hopkins, 2007, Kricher, 2011). Se sabe que las plantas manejan esta deficiencia en nutrientes generando raíces muy superficiales y aprovechando la alta tasa de degradación de la materia orgánica en estos

bosques para así obtener nutrientes esenciales para su crecimiento y desarrollo (Ward et al., 2013), sin embargo, como pudimos observar *M. oblongifolia* posee un alto número de individuos en la parcela de 50 hectáreas y los recursos serían insuficientes para mantener tal población de individuos conespecíficos; es aquí donde los hongos encontrados pudieron ser de relevancia.

Las endomicorrizas (observadas bajo microscopio) facilitarían la adquisición de nitrógeno necesario para generar aminoácidos, componentes básicos para la construcción de estructuras más complejas como tejidos u hormonas (Barea et al., 2005). Usualmente las plantas extraen nitrógeno del suelo en forma de nitratos y amonio, pero este es un elemento escaso en suelo amazónico, o solo se encuentra presente como nitrógeno inorgánico (Barea et al., 2005; Hodge y Storer, 2015). Las micorrizas podrían, entonces, estar colaborando en la toma del nitrógeno, transformándolo en nitratos y amonio para el uso metabólico de *M. oblongifolia*. También se encontró dos especies del género *Mortierella* asociadas únicamente a esta especie de planta, y como se discutió antes, este género se caracteriza por participar activamente del ciclo del fósforo en el suelo, solubilizándolo en forma de fosfatos que se han fijados a los minerales del suelo, introduciéndolo en el mecanismo metabólico de las plantas. Estas dos asociaciones fúngicas podrían potenciar la capacidad competitiva y reducir la redundancia funcional en relación a otras especies de hongos, además de mitigar los ENDD asociados al alto nivel de agregación de *M. oblongifolia*.

Los hongos *Trichoderma* sp. y *Mucor* sp. también podrían representar importantes agentes en la defensa de esta especie contra organismos patógenos del suelo y participar activamente en la descomposición de materia orgánica, respectivamente (Yan y Viraraghava, 2003; Dan et al., 2006; Chaverri et al., 2015). Es importante resaltar que *Rhizomucor* sp. es el género que mayor diferenciación otorgó a esta especie de planta, pero su identificación a especie no fue posible por lo que su función no pudo ser analizada en profundidad. No se pudo conocer qué adaptación competitiva pudo haberse generado en *M. oblongifolia*.

La causa para la distribución espacial de estas especies de plantas queda aún por resolverse. Existen otros factores tanto bióticos como abióticos, ya sean variables como la dispersión de semillas, biología de dispersores, adaptaciones morfológicas y fisiológicas como la forma de las hojas, tolerancia a la luz y sombra, respuesta a disturbios, entre otras, que deben ser tomadas en cuenta para responder preguntas de distribución a largo plazo en un área local como la parcela de 50 hectáreas en Yasuní. Sin embargo, el presente estudio dió una primera aproximación acerca del papel que los hongos asociados a las raíces de las especies pueden estar desempeñando.

7. CONCLUSIONES

Se concluye que sí existen asociaciones fúngicas variadas en las raíces de *Matisia cordata*, *M. malacocalyx* y *M. oblongifolia*. Estas asociaciones fueron del tipo ectomicorrízicas, endomicorrízicas y endófitas. Siendo *M. oblongifolia* la que posee un mayor número de especies únicas de hongos asociadas a sus raíces.

La acción en conjunto de estos hongos únicos o especialistas, además de las posibles endomicorrizas, podría sugerir la existencia de ventajas adaptativas que permiten a *M. oblongifolia* desarrollarse en grandes agregaciones y evitar así los efectos negativos dependientes de la densidad.

En contraste, *Matisia malacocalyx* presentó un conjunto de hongos generalistas que probablemente favorece su crecimiento agregado en estos bosques.

El nivel de agregación de *M. cordata* al parecer depende de factores abióticos como la disponibilidad de luz, pero posiblemente no de la composición de hongos presentes en el suelo.

El estudio de la biología reproductiva y de dispersión de las especies de árboles analizados también podría influir con su distribución espacial, por lo que se recomienda analizar estos factores en futuros estudios.

Se espera poder continuar con el análisis de la distribución de otras especies de árboles dentro de la parcela de 50 hectáreas para clarificar si su distribución espacial es consistente o relacionada con asociaciones fúngicas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abello, J. F., & Kelemu, S. (2006). Endophytic fungi: Adaptive advantages within plants. *Corpoica ciencia y tecnología agropecuaria* 7(2), 55-57.

Albornoz, F. E., Lambers, H., Turner, B. L., Teste, F. P., & Laliberté, E. (2016). Shifts in symbiotic associations in plants capable of forming multiple root symbioses across a long-term soil chronosequence. *Ecology and evolution*, 6(8), 2368-2377.

Anderson, I. C., & Cairney, J. W. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental microbiology*, 6(8), 769-779.

Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kylo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15649-15654.

Bagchi, R., Swinfield, T., Gallery, R. E., Lewis, O. T., Gripenberg, S., Narayan, L., & Freckleton, R. P. (2010). Testing the Janzen-Connell mechanism: pathogens cause overcompensating density dependence in a tropical tree. *Ecology letters*, 13(10), 1262-1269.

Baldrian, P., & Kohout, P. (2017). Interactions of saprotrophic fungi with tree roots: can we observe the emergence of novel ectomycorrhizal fungi?. *New Phytologist*, 215(2), 511-513.

Bardgett, R. D., & van der Putten, W. H. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, 515(7528), 505-511.

Barea, J. M., Werner, D., Azcón-Guilar, C., & Azcón, R. (2005). Interactions of arbuscular mycorrhiza and nitrogen-fixing symbiosis in sustainable agriculture. In *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment* (pp. 199-222). Springer Netherlands.

Beltrán, M. E. (2014). Hongos solubilizadores de fosfato en suelo de páramo cultivado con papa (*Solanum tuberosum*). *Ciencia en Desarrollo*, 5(2), 145-154.

Bergey, D., & Holt, J. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology: Ninth edition*. Williams & Wilkins, Baltimore USA.

Bever, J. D., Dickie, I. A., Facelli, E., Facelli, J. M., Klironomos, J., Moora, M., Rilling, M., Stock, W., Tibbett, M., & Zobel, M. (2010). Rooting theories of plant community ecology in microbial interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(8), 468-478.

Brundrett, M. C. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New phytologist*, 154(2), 275-304.

Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., & Martin, F. (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, 184(2), 449-456.

Chamorro, M., Aguado, A., & De los Santos, B. (2016). First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. *Plant Dis*, 100(7), 1495.

Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., & Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558-590.

Chilvers, G. A., Lapeyrie, F. F., & Horan, D. P. (1987). Ectomycorrhizal vs endomycorrhizal fungi within the same root system. *New Phytologist*, *107*(2), 441-448.

Connell, J. H. (1971). On the role of natural enemies in preventing competitive exclusion in some marine animals and in rain forest trees. *Dynamics of numbers in populations*, Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, The Netherlands.

Conrado, C. H. (2015). Integración de micorrizas y nutrición temprana con fósforo sobre el desarrollo, vigor y calidad de plántulas de banano (Musa AAA) en fase de aclimatación. Tesis de pregrado en Ingeniería agronómica. Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

Corrales, A., Arnold, E., Ferrer, A., Turner, B., & Dalling, J. (2015). Variation in Ectomycorrhizal Fungal Communities Associated With *Oreomunnea mexicana* (Juglandaceae) in a Neotropical Montane Forest. *Mycorrhiza* *26* (1), 1-17.

Corrales, A., Mangan, S. A., Turner, B. L., & Dalling, J. W. (2016). An ectomycorrhizal nitrogen economy facilitates monodominance in a neotropical forest. *Ecology letters*, *19* (4), 383–392.

Coutinho, I. B. L., Freire, F. C. O., Lima, C. S., Lima, J. S., Gonçalves, F. J. T., Machado, A. R., Silva A. & Cardoso, J. E. (2017). Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. *Plant Pathology*, *66*(1), 90-104.

Dan, S. U., Li, P. J., Frank, S., & Xiong, X. Z. (2006). Biodegradation of benzo [a] pyrene in soil by *Mucor* sp. SF06 and *Bacillus* sp. SB02 co-immobilized on vermiculite. *Journal of Environmental Sciences*, *18*(6), 1204-1209.

Detto, M., & Muller-Landau, H. C. (2013). Fitting ecological process models to spatial patterns using scalewise variances and moment equations. *The American Naturalist*, *181*(4), E68-E82.

Douglas, A. E. (1998). Host benefit and the evolution of specialization in symbiosis. *Heredity*, *81*(6), 599-603.

Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P., Zeilinger, S., Grigoriev, I & Kubicek, C. P. (2011). Trichoderma: the genomics of opportunistic success. *Nature reviews. Microbiology*, *9*(10), 749.

Duan, X., Zheng, M., Liu, Y., Jiang, Z., & Yang, S. (2016). High-level expression and biochemical characterization of a novel cold-active lipase from *Rhizomucor endophyticus*. *Biotechnology letters*, *38*(12), 2127-2135.

Ettema, C. H., & Wardle, D. A. (2002). Spatial soil ecology. *Trends in ecology & evolution*, *17*(4), 177-183.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T. & Ryan, P. D. (2001). PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologica Electronica*, *4*(1): 1–9.

Harris, J.L. (2000). Safe, Low-Distortion Tape Touch Method for Fungal Slide Mounts. *Journal of clinical microbiology* *38* (12), 4683-4684.

Heijden, M. G., Martin, F. M., Selosse, M. A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, *205*(4), 1406-1423.

HiMedia Laboratories. (2015). Sabouraud Dextrose Broth (Technical Data Sheet). Tomado de <http://himedialabs.com/TD/M033.pdf> el 10/04/2017.

Hodge, A., & Storer, K. (2015). Arbuscular mycorrhiza and nitrogen: implications for individual plants through to ecosystems. *Plant and soil*, 386(1-2), 1-19.

Holmes, K. A., Schroers, H. J., Thomas, S. E., Evans, H. C., & Samuels, G. J. (2004). Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. *Mycological Progress*, 3(3), 199-210.

Hopkins, M. J. (2007). Modelling the known and unknown plant biodiversity of the Amazon Basin. *Journal of Biogeography*, 34(8), 1400-1411.

Hoyos, L.R. y Rodriguez, A.D. (2013). Aislamiento de micorrizas en seis especies nativas del Ecuador para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en rusticación de orquídeas. Tesis de pregrado en Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales. Universidad Politécnica Salesiana.

Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., & Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*, 46(9), 615-631.

Janzen, D. H. (1970). Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *The American Naturalist*, 104(940), 501-528.

Johnson, D. J., Beaulieu, W. T., Bever, J. D., & Clay, K. (2012). Conspecific negative density dependence and forest diversity. *Science*, 336(6083), 904-907.

Klironomos, J. N. (2000). Host-specificity and functional diversity among arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbial Biosystems: New Frontiers*, 1, 845-851.

Koske, R. E., & Gemma, J. N. (1989). A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological research*, 92(4), 486-488.

Koziol, L., & Bever, J. D. (2015). Mycorrhizal response trades off with plant growth rate and increases with plant successional status. *Ecology*, 96(7), 1768-1774.

Kricher, J. (2011). *Tropical Ecology*. New Jersey: Princeton University Press.

LaManna, J. A., Mangan, S. A., Alonso, A., Bourg, N. A., Brockelman, W. Y., Bunyavejchewin, S., et al. (2017). Plant diversity increases with the strength of negative density dependence at the global scale. *Science*, 356(6345), 1389-1392.

Law, R., J. Illian, D. F. R. P. Burslem, G. Gratzer, C. V. S. Gunatilleke, and I. A. U. N. Gunatilleke. 2009. Ecological information from spatial patterns of plants: insights from point process theory. *Journal of Ecology* 97, 616–628.

Lehmann, J., da Silva, J. P., Steiner, C., Nehls, T., Zech, W., & Glaser, B. (2003). Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. *Plant and soil*, 249(2), 343-357.

Lilleskov, E. A., Hobbie, E. A., & Horton, T. R. (2011). Conservation of ectomycorrhizal fungi: exploring the linkages between functional and taxonomic responses to anthropogenic N deposition. *Fungal Ecology*, 4(2), 174-183.

Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. (2014). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79, 121-186.

Maharachchikumbura, S. S., Larignon, P., AL-SADI, A. M., & Zuo-Yi, L. I. U. (2017). Characterization of *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* and *Truncatella* species

associated with grapevine trunk diseases in France. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(3), 380-390.

Marques, M. W., Lima, N. B., de Morais, M. A., Barbosa, M. A. G., Souza, B. O., Michereff, S. J., Phillips, A. & Câmara, M. P. (2013). Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*, 61(1), 181-193.

Martinez-Mugica, C., Alba, S. R., Boga, J. A., & Rodriguez-Guardado, A. (2017). Cutaneous infection due to *Mucor irregularis* (*Rhizomucor variabilis*) in a immunocompetent traveller. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*, 35(1), 56-57.

McIntire, E. J., & Fajardo, A. (2009). Beyond description: the active and effective way to infer processes from spatial patterns. *Ecology*, 90(1), 46-56.

Metz, M. R., Sousa, W. P., & Valencia, R. (2010). Widespread density-dependent seedling mortality promotes species coexistence in a highly diverse Amazonian rain forest. *Ecology*, 91(12), 3675-3685.

Mohali, S. R., Castro-Medina, F., Úrbez-Torres, J. R., & Gubler, W. D. (2017). First report of *Lasiodiplodia theobromae* and *L. venezuelensis* associated with blue stain on *Ficus insipida* wood from the Natural Forest of Venezuela. *Forest Pathology*.

Moratto, C., Martínez, L. J., Valencia, H., & Sánchez, J. (2005). Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca). *Agronomía colombiana*, 23(2).

Osorio, N. W., & Habte, M. (2013). Phosphate desorption from the surface of soil mineral particles by a phosphate-solubilizing fungus. *Biology and fertility of soils*, 49(4), 481-486.

Osorio, N. W., & Habte, M. (2014). Soil phosphate desorption induced by a phosphate-solubilizing fungus. *Communications in soil science and plant analysis*, 45(4), 451-460.

Pagano, M. C., & Gupta, V. K. (2016). Overview of the Recent Advances in Mycorrhizal Fungi. In *Recent Advances on Mycorrhizal Fungi* (pp. 1-13). Springer International Publishing.

Peh, K. S. H., Lewis, S. L., & Lloyd, J. (2011). Mechanisms of monodominance in diverse tropical tree-dominated systems. *Journal of Ecology*, 99(4), 891-898.

Pérez, A.J., Hernández, C., Romero – Saltos H. y Valencia R. (2014). Árboles Emblemáticos de Yasuní, Ecuador. Quito – Ecuador: Publicaciones del Herbario QCA. Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Peters, H. A. (2003). Neighbour-regulated mortality: the influence of positive and negative density dependence on tree populations in species-rich tropical forests. *Ecology letters*, 6(8), 757-765.

Phillips, J. M., & 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), 158-161.

Piepenbring, M. (2015). *Introducción a la Micología en los Trópicos*. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society.

Rineau, F., & Courty, P. E. (2011). Secreted enzymatic activities of ectomycorrhizal fungi as a case study of functional diversity and functional redundancy. *Annals of Forest Science*, 68(1), 69-80.

Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2010). Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66(1), 15-32.

Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*, 182(2), 314-330.

Sánchez, J. (2017). Introducción a la Estadística no Paramétrica y al Análisis Multivariado. Giro Creativo – Ecuador.

Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3), 787-799.

Shi, L. L., Mortimer, P. E., Slik, J. F., Zou, X. M., Xu, J., Feng, W. T., & Qiao, L. (2014). Variation in forest soil fungal diversity along a latitudinal gradient. *Fungal diversity*, 64(1), 305-315.

SIGMA-ALDRICH. (2010). GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (User Guide). Tomado de <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/dna-and-rna-purification/plant-genomic-dna.html> el 10/04/2017.

Swaine, M. D., & Whitmore, T. C. (1988). On the definition of ecological species groups in tropical rain forests. *Plant Ecology*, 75(1), 81-86.

Tafur, M.S. (2010). Evaluación de la eficiencia del uso de micorrizas en el crecimiento de plantas de Chirimoya (*Annona cherimola*), variedad Cangahua, bajo condiciones semicontroladas. Tesis de pregrado de Licenciatura en Microbiología Clínica y Aplicada. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Thermo Fischer Scientific. (2017). ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (User Guide). Tomado de <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/78200b.pdf> el 10/04/2017

Urgiles, N., Haug, I., Setaro, S., y Aguirre, N. (2016). Introduction to Mycorrhizas in the Tropics with emphasis on the Montane Forest in Southern Ecuador. Universidad Nacional de Loja. Ecuador.

Valencia, R., Foster, R. B., Villa, G., Condit, R., Svenning, J. C., Hernandez, C., Romoleroux, K., Losos, E., Magard, E., & Balslev, H. (2004). Tree species distributions and local habitat variation in the Amazon: large forest plot in eastern Ecuador. *Journal of Ecology*, 92(2), 214-229.

Vandenkoornhuyse, P., Baldauf, S. L., Leyval, C., Straczek, J., & Young, J. P. W. (2002). Extensive fungal diversity in plant roots. *Science*, 295(5562), 2051-2051.

Vijayalakshmi, A., Sharmila, R., Gowda, N. K. S., & Sindhu, G. (2014). Study on antifungal effect of herbal compounds against mycotoxin producing fungi. *Journal of Agricultural Technology*, 10(6), 1587-1597.

Vitousek, P. M., & Sanford Jr, R. L. (1986). Nutrient cycling in moist tropical forest. *Annual review of Ecology and Systematics*, 17(1), 137-167.

Ward, N. D., Keil, R. G., Medeiros, P. M., Brito, D. C., Cunha, A. C., Dittmar, T., Yagger, P. Krusche, A. & Richey, J. E. (2013). Degradation of terrestrially derived macromolecules in the Amazon River. *Nature Geoscience*, 6(7), 530.

Webster, J. & Weber, R. (2007). Introduction to fungi: Third edition. Cambridge University Press.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

Wright, J. S. (2002). Plant diversity in tropical forests: a review of mechanisms of species coexistence. *Oecologia*, 130(1), 1-14.

Wynn, J. P., Hamid, A. A., Li, Y., & Ratledge, C. (2001). Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology*, 147(10), 2857-2864.

Yahr, R., Schoch, C. L., & Dentinger, B. T. (2016). Scaling up discovery of hidden diversity in fungi: impacts of barcoding approaches. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 371(1702), 20150336.

Yan, G., & Viraraghavan, T. (2003). Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water research*, 37(18), 4486-4496.

Yang, L. N., Miao, X. Y., Bai, Q. R., Wang, M. Q., Gu, M. L., & Zhao, T. C. (2017). *Neopestalotiopsis clavispora* Causing Leaf Spot on *Phedimus aizoon* var. *latifolius*, a New Disease in China. *Plant Disease*, PDIS-03.

You, Y. H., Yoon, H. J., Woo, J. R., Seo, Y. G., Kim, M., Choo, Y. S., & Kim, J. G. (2011). Plant growth-promoting activity of endophytic fungi isolated from the roots of native plants in Dokdo Islands. *Journal of Life Science*, 21(11), 1619-1624.

Zhang, Y., Adams, I. P., & Ratledge, C. (2007). Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation. *Microbiology*, 153(7), 2013-2025.

9. FIGURAS



Figura 1. Observación macroscópica de varias porciones apicales de raíz de A) *Matisia cordata*, B) *Matisia malacocalyx* y C) *Matisia oblongifolia* en aumento 2.7X. Se observan engrosamientos marrones en el meristemo apical.

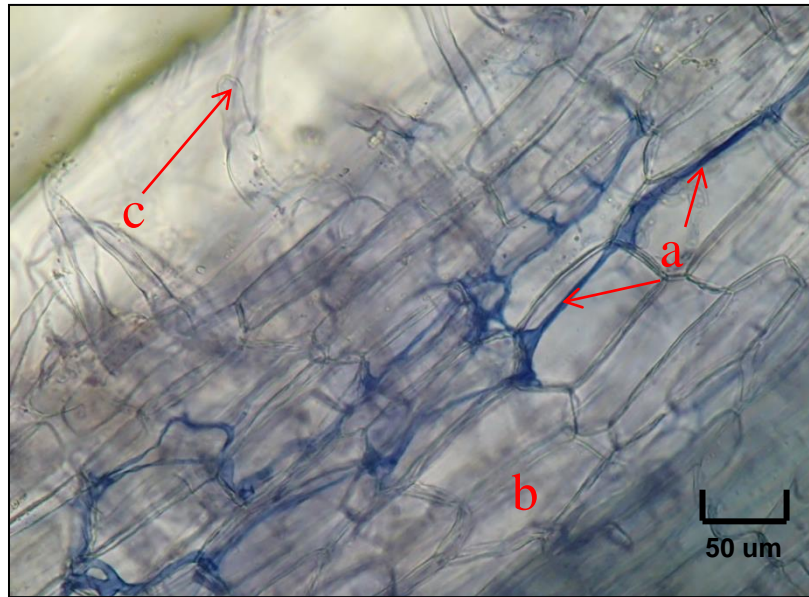


Figura 2. Observación microscópica de tinción radicular en *Matisia cordata* en aumento 10X. Se observan hifas asociadas (a) dentro del córtex de la raíz (b), nótese los pelos radiculares (c).

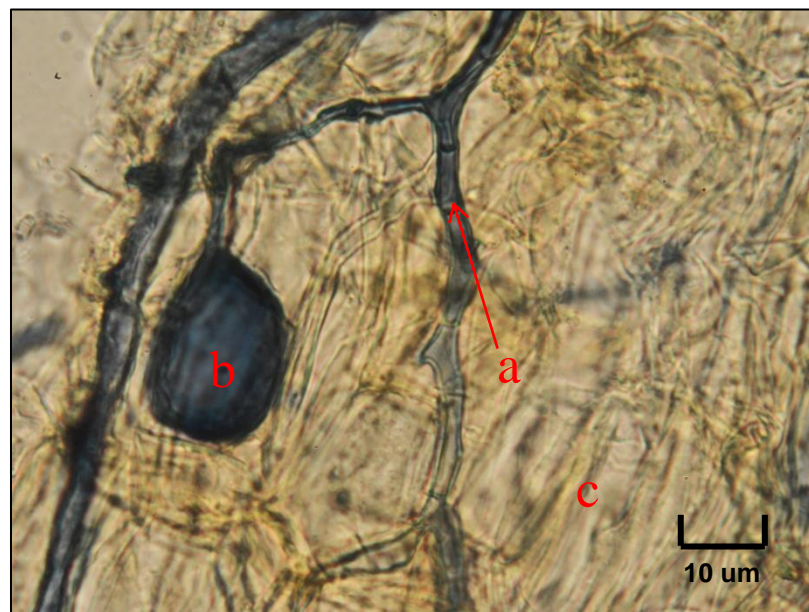


Figura 3. Observación microscópica de tinción radicular en *Matisia cordata* en aumento 40X. Se observan hifas (a) y vesículas de Glomeromycota (endomycorriza) (b) dentro de las células corticales de la raíces (c).

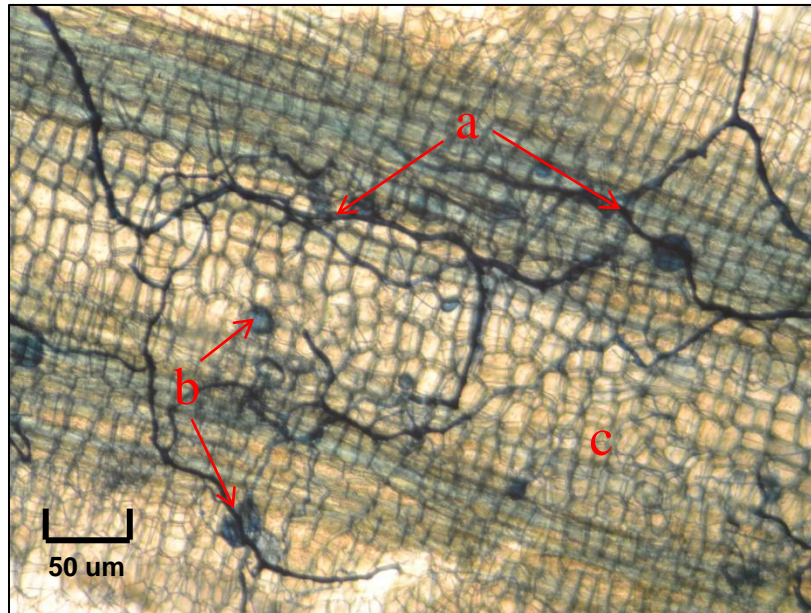


Figura 4. Observación microscópica de tinción radicular en *Matisia malacocalyx* en aumento 10X. Se observan hifas (a) y vesículas de Glomeromycota (endomicorriza) (b) dentro de las células corticales de la raíces (c).

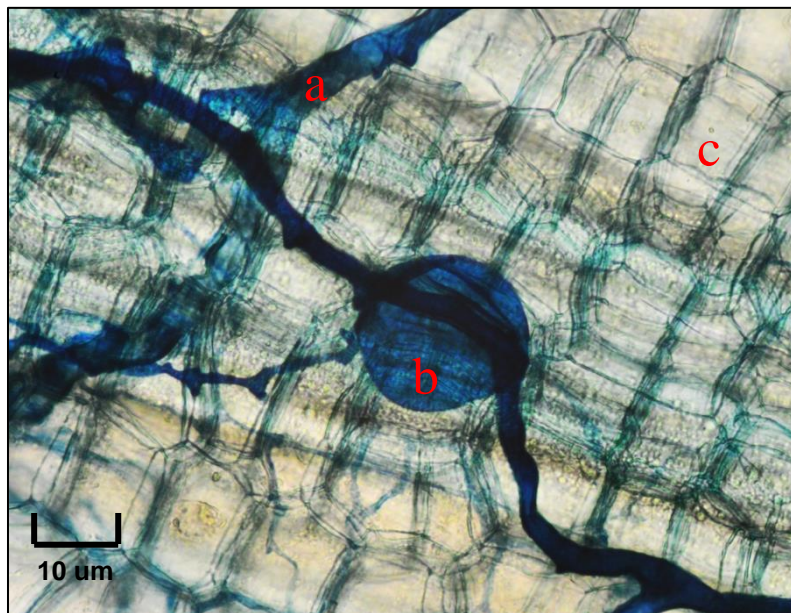


Figura 5. Observación microscópica de tinción radicular en *Matisia malacocalyx* en aumento 40X. Se observan hifas (a) y clamidosporas de Glomeromycota (endomicorriza) (b) dentro y fuera, respectivamente, de las células corticales de la raíces (c).

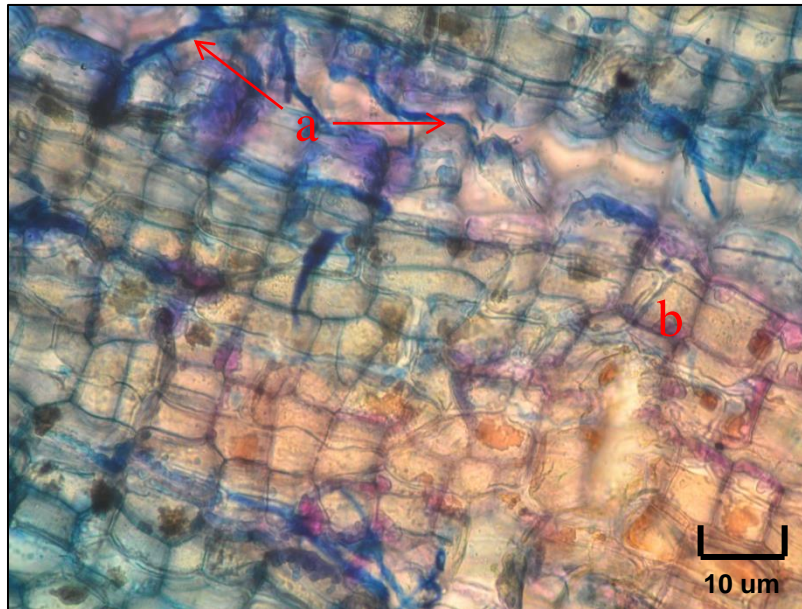


Figura 6. Observación microscópica de tinción radicular en *Matisia oblongifolia* en aumento 40X. Se observan hifas (a) dentro de las células corticales de la raíces (b).

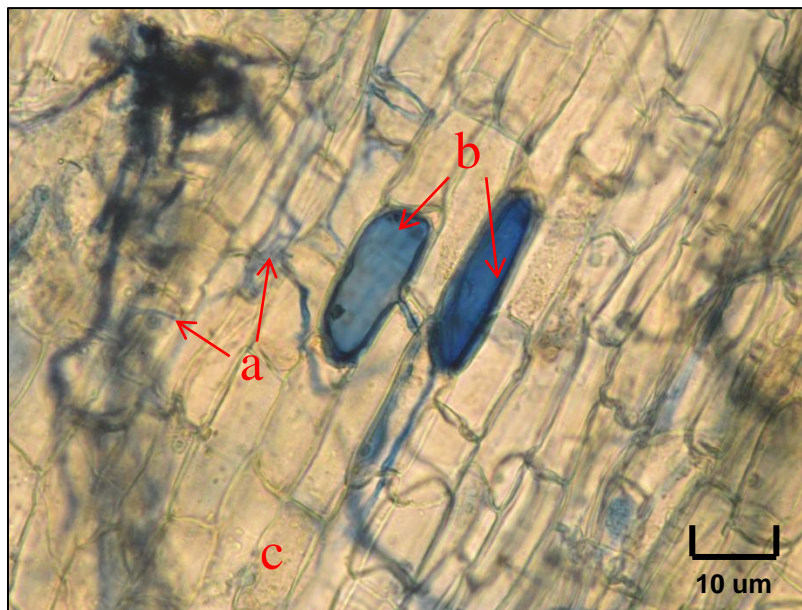


Figura 7. Observación microscópica de tinción radicular en *Matisia oblongifolia* en aumento 40X. Se observan hifas (a) y vesículas de Glomeromycota (b) dentro de las células corticales de la raíces (c).

Fotografías: Ricardo Zambrano Cevallos.

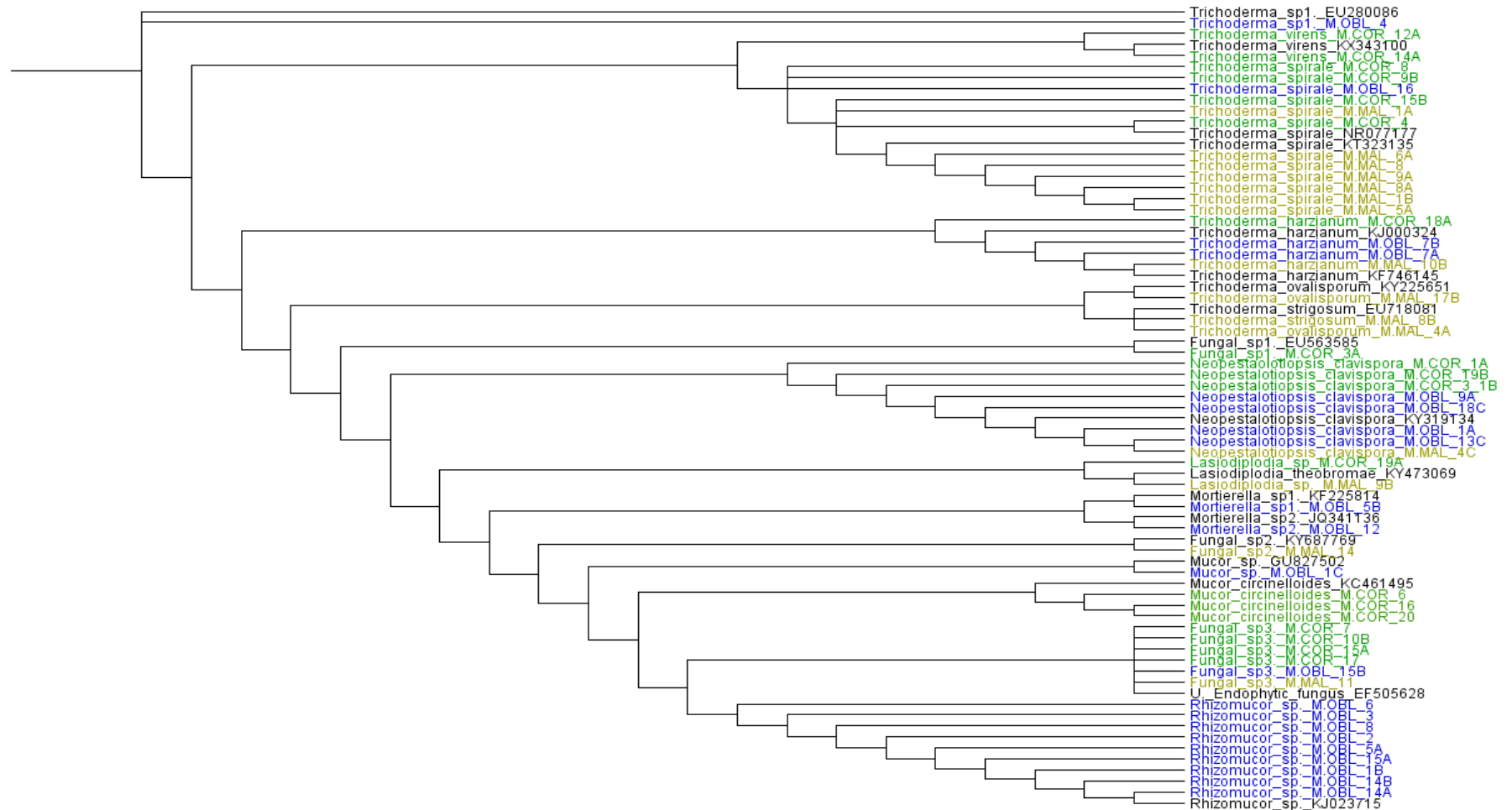


Figura 8. Árbol consenso generado con el método “Neighbor Joining” para verificar las relaciones entre las secuencias obtenidas por el método PCR y las descargadas del BLASTn. En verde se observan las secuencias de los hongos asociados a *Matisia cordata*, en beige a *M. malacocalyx*, en azul a *M. oblongifolia* y en negro las secuencias descargadas del BLASTn.

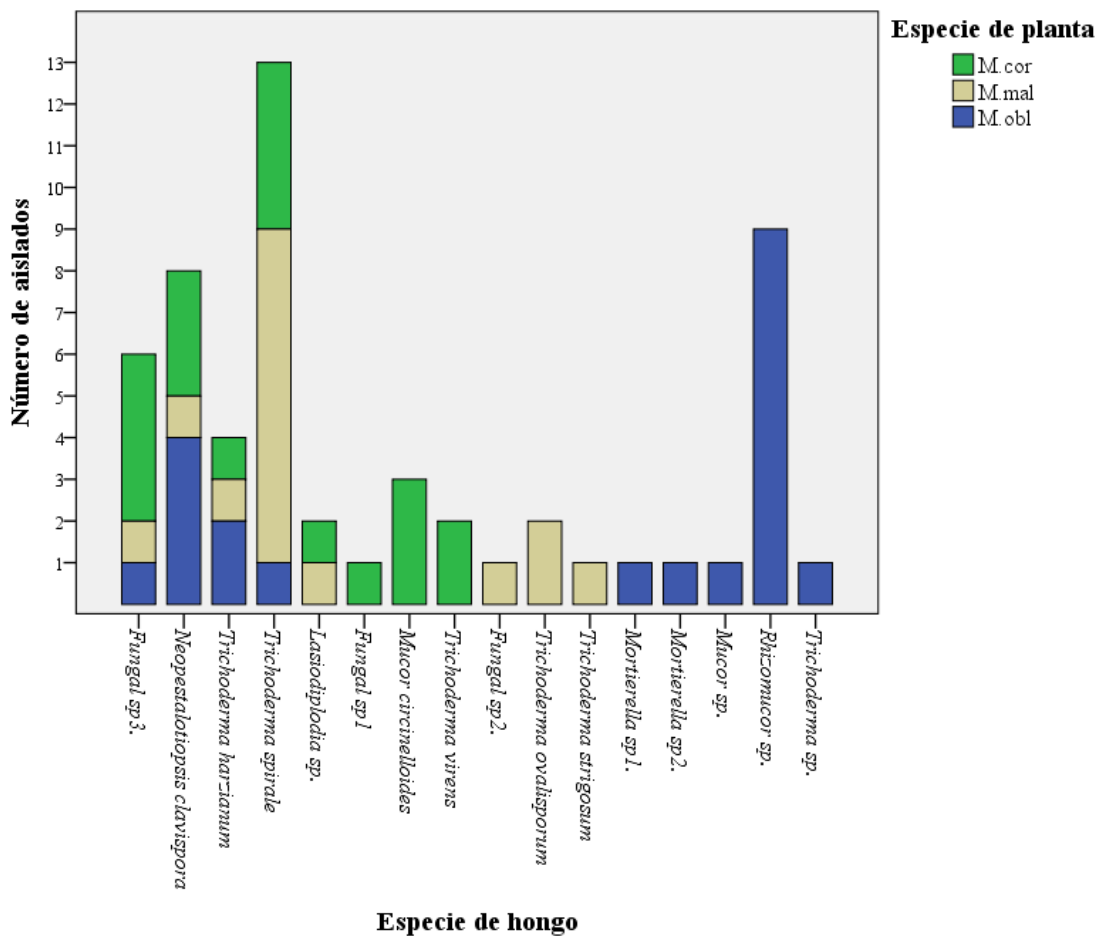


Figura 9. Asociación de cada una de las especies de hongos con una o más especies de *Matisia*. Nótese que las especies de hongos pueden ser exclusivas de una sola especie de *Matisia*. Siendo *Matisia oblongifolia* la que posee un total de 5 especies no compartidas: *Mortierella* sp. 1, *Mortierella* sp. 2, *Mucor* sp., *Rhizomucor* sp. y *Trichoderma* sp.. *Matisia cordata* presenta 3 especies no compartidas: *Fungal* sp. 1., *Mucor circinelloides* y *Trichoderma virens*. *Matisia malacocalyx* también presenta 3 especies no compartidas: *Fungal* sp. 2, *Trichoderma ovalisporum* y *Trichoderma strigosum*. El resto: *Fungal* sp. 3, *Nopestalotiopsis clavispora*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma strigosum* se comparten entre las tres especies de *Matisia* a excepción de *Lasiodiplodia* sp. que solo es compartida entre *M. cordata* y *M. malacocalyx*.

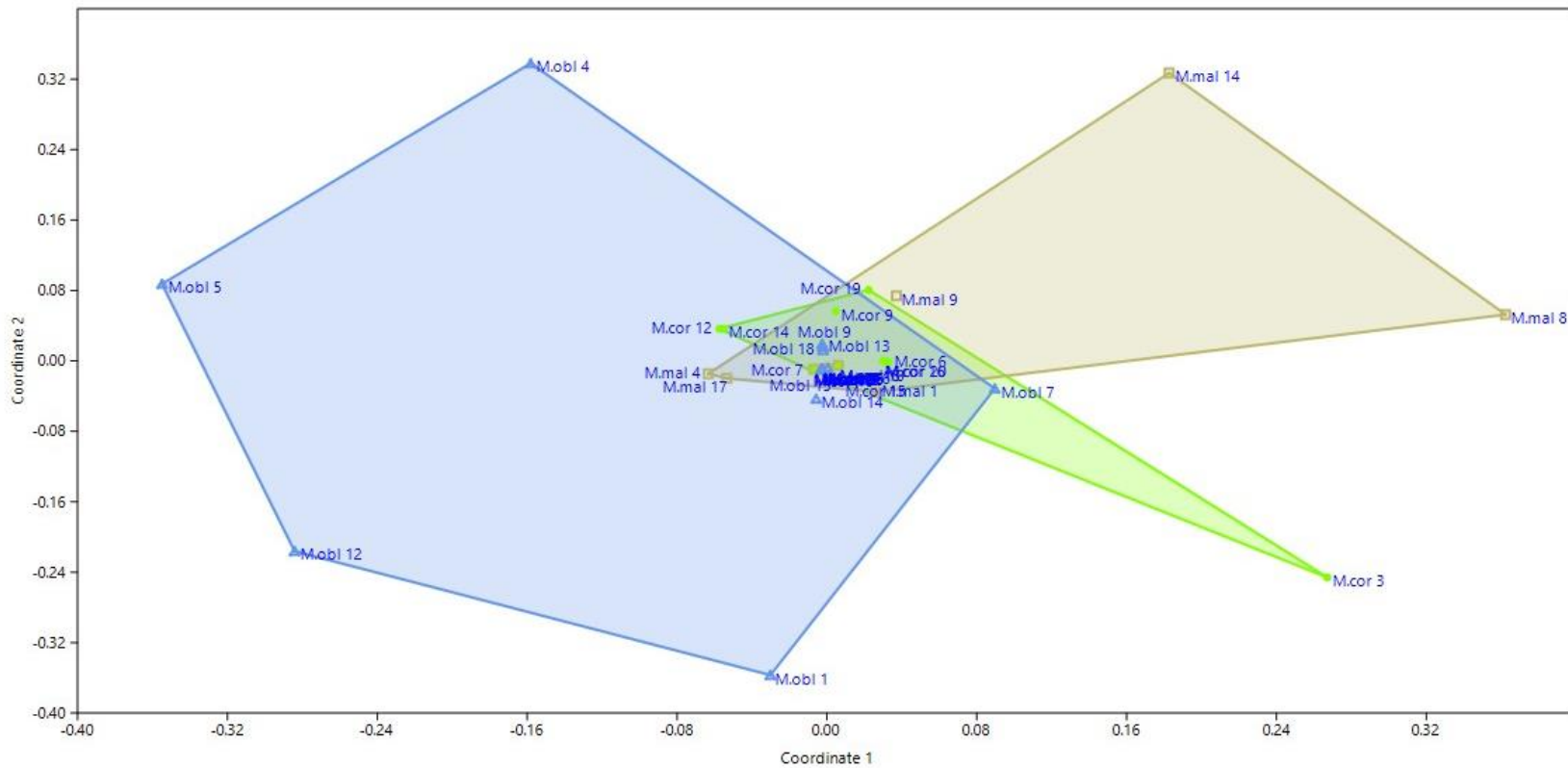


Figura 10. Resultado del análisis NMDS (Stress= 0.17, R^2 eje 1= 0.422 y R^2 eje 2= 0.395). Se utilizó la medida de similitud de Mahalanobis. Se observa en color verde a *M. cordata*, beige a *M. malacocalyx* y azul a *M. oblongifolia*. Las especies de hongos se solapan mayormente en el área central, donde existen algunas especies en común, pese a esto, se puede apreciar que *M. oblongifolia* se diferencia de las otras dos especies de plantas que se solapan en su mayoría de especies de hongos.

10. TABLAS

Tabla 1. Listado de hongos encontrados en asociación a raíces de *Matisia cordata*, *M. malacocalyx* y *M. oblongifolia*.

Especie de hongo	División	Familia	Número de aislados	Asociado a:		
				<i>M. cor.</i>	<i>M. mal.</i>	<i>M.obl.</i>
1. Fungal sp. 1	-	-	1	X		
2. Fungal sp. 2	-	-	1		X	
3. Fungal sp. 3	-	-	6	X	X	X
4. <i>Lasiodiplodia</i> sp.	Ascomycota	Botryosphaeriaceae	2	X	X	
5. <i>Mortierella</i> sp. 1	Zygomycota	Mortierellaceae	1			X
6. <i>Mortierella</i> sp. 2	Zygomycota	Mortierellaceae	1			X
7. <i>Mucor circinelloides</i>	Zygomycota	Mucoraceae	3	X		
8. <i>Mucor</i> sp.	Zygomycota	Mucoraceae	1			X
9. <i>Neopestalotiopsis clavispورا</i>	Ascomycota	Amphisphaereaceae	8	X	X	X
10. <i>Rhizomucor</i> sp.	Zygomycota	Mucoraceae	9			X
11. <i>Trichoderma harzianum</i>	Ascomycota	Hypocreaceae	4	X	X	X
12. <i>Trichoderma owallisporum</i>	Ascomycota	Hypocreaceae	2		X	
13. <i>Trichoderma</i> sp.	Ascomycota	Hypocreaceae	1			X
14. <i>Trichoderma spirale</i>	Ascomycota	Hypocreaceae	13	X	X	X
15. <i>Trichoderma strigosum</i>	Ascomycota	Hypocreaceae	1		X	
16. <i>Trichoderma virens</i>	Ascomycota	Hypocreaceae	2	X		

Tabla 2. Descripción macroscópica de las especies de hongos asociados *Matisia cordata*, *M. malacocalyx* y *M. oblongifolia*.

Especie de hongo	Descripción morfológica macroscópica						Observaciones
	Color	Tamaño/ diámetro	Superficie	Forma	Elevación	Margen	
Fungal sp. 1	Blanco	Mediano/ 6.5 cm	Algodonosa	Irregular	Plana	Ondulado	Al madurar los bordes se tornan ligeramente amarillos.
Fungal sp. 2	Crema	Grande/ 9 cm	Algodonosa/ rugosa	Circular	Umbonada	Entero a filiforme	El micelio maduro crece algodonoso sobre el rugoso.
Fungal sp. 3	Amarillo	Grande/ 9 cm	Aterciopelada	Circular	Umbonada	Entero	El micelio más antiguo se torna de color crema intenso.
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Negro	Grande/ 9 cm	Algodonosa/ filamentosa	Circular	Plana y filiforme	Filiforme	Blanco al ser recién cultivado y negro verduzco al madurar
<i>Mortierella</i> sp. 1	Blanco	Pequeño/ 5 cm	Algodonosa	Irregular	Elevada	Filiforme y ondulado	Crecimiento en forma de "ondas" o lóbulos solapados
<i>Mortierella</i> sp. 2	Blanco	Grande/ 9 cm	Algodonosa	Irregular	Filamentosa	Ondulado	Crecimiento en forma de "ondas" o lóbulos solapados.
<i>Mucor circinelloides</i>	Blanco opaco	Mediano/ 7 cm	Aterciopelada	Irregular	Plana	Ondulado y filiforme	No
<i>Mucor</i> sp.	Blanco opaco	Grande/ 9 cm	Algodonosa	Circular	Plana	Filiforme	Negro al centro debido a la presencia de esporangios.
<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	Blanco o marrón	Pequeño/ 5 cm	Algodonosa o crustosa	Irregular	Plana o irregular	Ondulado o filiforme.	Blanco al ser recién cultivado y café - amarillento al madurar

Tabla 2. (Continuación...) Descripción macroscópica de las especies de hongos asociados *Matisia cordata*, *Matisia malacocalyx* y *Matisia oblongifolia*.

Descripción morfológica macroscópica							
Especie de hongo	Color	Tamaño/ diámetro	Superficie	Forma	Elevación	Margen	Observaciones
<i>Rhizomucor sp.</i>	Amarillo	Grande/ 8 cm	Algodonosa	Circular	Umbonada	Entero	Se puede tornar blanco al centro.
<i>Trichoderma harzianum</i>	Blanco opaco	Grande/ 8 cm	Algodonosa/ aterciopelada	Circular	Plana y filamentosa	Filiforme	No
<i>Trichoderma ovallisporum</i>	Blanco opaco	Grande/ 9 cm	Algodonosa/ aterciopelada	Circular	Plana y filamentosa	Filiforme	Estrías de crecimiento muy marcadas.
<i>Trichoderma sp.</i>	Blanco opaco	Grande/ 8 cm	Aterciopelada	Circular	Plana	Entero	No
<i>Trichoderma spirale</i>	Blanco	Grande/ 9 cm	Algodonosa o aterciopelada	Circular	Plana y filamentosa	Filiforme	Estrías de crecimiento muy marcadas
<i>Trichoderma strigosum</i>	Blanco	Mediano/ 6 cm	Aterciopelada	Irregular	Plana y filamentosa	Filiforme	Estrías de crecimiento muy marcadas
<i>Trichoderma virens</i>	Blanco	Grande/ 9 cm	Aterciopelada	Irregular	Plana	Filiforme	Estrías de crecimiento muy marcadas

Tabla 3. Descripción microscópica de las especies de hongos asociados *Matisia cordata*, *Matisia malacocalyx* y *Matisia oblongifolia*.

Descripción morfológica microscópica				
Especie de hongo	Apariencia de hifas	Ancho de hifas en um	Presencia de septos	Estructuras reproductivas
Fungal sp. 1	Hialinas	2.51 um - 4.99 um	Sí	Conidios unicelulares, de subglobosos a globosos, con alrededor de 72 um de largo y 55 um de ancho.
Fungal sp. 2	Hialinas	6.51 um - 18.33 um	Sí	Conidios unicelulares, de subglobosos a globosos, cubiertos con vaina mucilaginosa, con alrededor de 137.15 um de largo y 48.03 um de ancho
Fungal sp. 3	Hialinas	7.60 um - 15.33 um	Sí	Conidióforos no diferenciados, presencia de artroconidios catenulados con alrededor de 5.67 um de largo y 6.50 um de ancho.
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Negras o pardas	3.14 um - 3.18 um	Sí	No se observan
<i>Mortierella</i> sp. 1	Hialinas	0.42 um - 2.06 um	No	No se observan
<i>Mortierella</i> sp. 2	Hialinas	1.63 um - 4.69 um	No	No se observan
<i>Mucor circinelloides</i>	Hialinas ramificadas	5.92 um - 12.96 um	No	Esporangios globosos con alrededor de 43.83 um de largo y 47.26 um de ancho que nacen de esporangióforos ramificados, columela no visible

Tabla 3. (Continuación...) Descripción microscópica de las especies de hongos asociados *Matisia cordata*, *Matisia malacocalyx* y *Matisia oblongifolia*.

Descripción morfológica microscópica				
Especie de hongo	Apariencia de hifas	Ancho de hifas en um	Presencia de septos	Estructuras reproductivas
<i>Mucor sp.</i>	Hialinas ramificadas	10.85 um - 18.72 um	No	Esporangios subglobosos o globosos con alrededor de 24.32 um de largo y 18.96 um de ancho que nacen de esporangióforos ramificados, columela visible
<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	Hialinas o pardas	2.62 um - 6.82 um	Sí	Células conidiógenas globosas encontradas a lo largo de las hifas con alrededor de 7.71 um de largo y 6.32um de ancho.
<i>Rhizomucor sp.</i>	Hialinas con estolones	5.20 um - 42.01 um	No	Artroconidios catenulados que se desarrollan directamente de las hifas, de tamaño variable, poseen entre 142.3 um de largo 70.33 um de ancho
<i>Trichoderma harzianum</i>	Hialinas	1.79 um - 5.63 um	Sí	No se observan
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	Hialinas	1.28 um - 2.60 um	Sí	No se observan
<i>Trichoderma sp.</i>	Hialinas	2.87um - 4.88 um	Sí	No se observan
<i>Trichoderma spirale</i>	Hialinas	3.33 um - 4.47 um	Sí	No se observan

Tabla 3. (Continuación...) Descripción microscópica de las especies de hongos asociados *Matisia cordata*, *Matisia malacocalyx* y *Matisia oblongifolia*.

Descripción morfológica microscópica				
Especie de hongo	Apariencia de hifas	Ancho de hifas en um	Presencia de septos	Estructuras reproductivas
<i>Trichoderma strigosum</i>	Hialinas	1.40 um - 3.37 um	Sí	Conidióforos globosos 8.39 um de ancho y 9.10 um de largo.
<i>Trichoderma virens</i>	Hialinas	2.91 um - 8.27 um	Sí	No se observan

Tabla 4. Resultados de los análisis ANOSIM (análisis de similitud) y SIMPER (porcentaje de similitud) entre las tres especies de *Matisia* estudiadas y sus hongos asociados.

Comparación global (R= 0.19 ; P= 0.0001) Disimilitud promedio= 92.41

Especie de Hongo	Total de aislados			Contribución%
	<i>M. cordata</i>	<i>M. malacocalyx.</i>	<i>M. oblongifolia</i>	
<i>Trichoderma spirale</i>	4	8	1	21.63
<i>Rhizomucor</i> sp.	0	0	9	16.83
Fungal sp. 3	4	1	1	11.13
<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	3	1	4	10.53
<i>Trichoderma harzianum</i>	1	1	2	7.726
<i>Mucor circinelloides</i>	3	0	0	6.596
<i>Trichoderma virens</i>	2	0	0	4.397
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	0	2	0	3.861
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	1	1	0	3.353
Fungal sp. 1	1	0	0	2.199
Fungal sp. 2	0	1	0	2.834
<i>Trichoderma</i> sp.	0	0	1	2.319
<i>Mortierella</i> sp. 2	0	0	1	2.319
<i>Trichoderma strigosum</i>	0	1	0	1.467
<i>Mortierella</i> sp. 1	0	0	1	1.587
<i>Mucor</i> sp.	0	0	1	1.209

***M. cordata* vs. *M. malacocalyx* (R= 0.15 ; P= 0.0627) Disimilitud promedio= 85.07**

Especie de Hongo	Total de aislados		Contribución %
	<i>M. cordata</i>	<i>M. malacocalyx</i>	
<i>Trichoderma spirale</i>	4	8	30.84
Fungal sp. 3	4	1	14.59
<i>Mucor circinelloides</i>	3	0	9.6
<i>Trichoderma harzianum</i>	1	1	8.033
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	0	2	7.576
<i>Trichoderma virens</i>	2	0	6.4
<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	3	1	5.643
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	1	1	5.643
Fungal sp. 1	1	0	5.617
Fungal sp. 2	0	1	3.2
<i>Trichoderma strigosum</i>	0	1	2.861

Tabla 4. (Continuación...) Resultados de los análisis ANOSIM (análisis de similitud) y SIMPER (porcentaje de similitud) entre las tres especies de *Matisia* estudiadas y sus hongos asociados.

***M. cordata* vs. *M. oblongifolia* (R= 0.18 ; P= 0.0009) Disimilitud promedio= 95.9**

Especie de Hongo	Total de aislados		Contribución %
	<i>M. cordata</i>	<i>M. oblongifolia</i>	
<i>Rhizomucor</i> sp.	0	9	23.94
<i>Trichoderma spirale</i>	4	1	12.88
<i>Neopestalotiopsis clavispota</i>	3	4	12.64
Fungal sp. 3	4	1	12.34
<i>Mucor circinelloides</i>	3	0	9.153
<i>Trichoderma harzianum</i>	1	2	7.222
<i>Trichoderma virens</i>	2	0	6.102
<i>Trichoderma</i> sp.	0	1	3.321
<i>Mortierella</i> sp. 2	0	1	3.321
Fungal sp. 1	1	0	3.051
<i>Mortierella</i> sp. 1	0	1	2.24
<i>Lasioidiplodia</i> sp.	1	0	2.101
<i>Mucor</i> sp.	0	1	1.692

***M. malacocalyx* vs. *M. oblongifolia* (R= 0.21 ; P= 0.0018) Disimilitud promedio= 94.5**

Especie de Hongo	Total de aislados		Contribución %
	<i>M. malacocalyx</i>	<i>M. oblongifolia</i>	
<i>Trichoderma spirale</i>	8	1	26.68
<i>Rhizomucor</i> sp.	0	9	21.17
<i>Neopestalotiopsis clavispota</i>	1	4	11.71
<i>Trichoderma harzianum</i>	1	2	8.218
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	2	0	6.395
Fungal sp. 3	1	1	6.196
Fungal sp. 2	1	0	4.644
<i>Lasioidiplodia</i> sp.	1	0	3.198
<i>Trichoderma</i> sp.	0	1	2.88
<i>Mortierella</i> sp. 2	0	1	2.88
<i>Trichoderma strigosum</i>	1	0	2.445
<i>Mortierella</i> sp. 1	0	1	2.022
<i>Mucor</i> sp.	0	1	1.564

11. ANEXOS

Anexo 1. Figuras de la distribución espacial de las tres especies de *Matisia* dentro de la parcela de estudio permanente de 50 hectáreas.

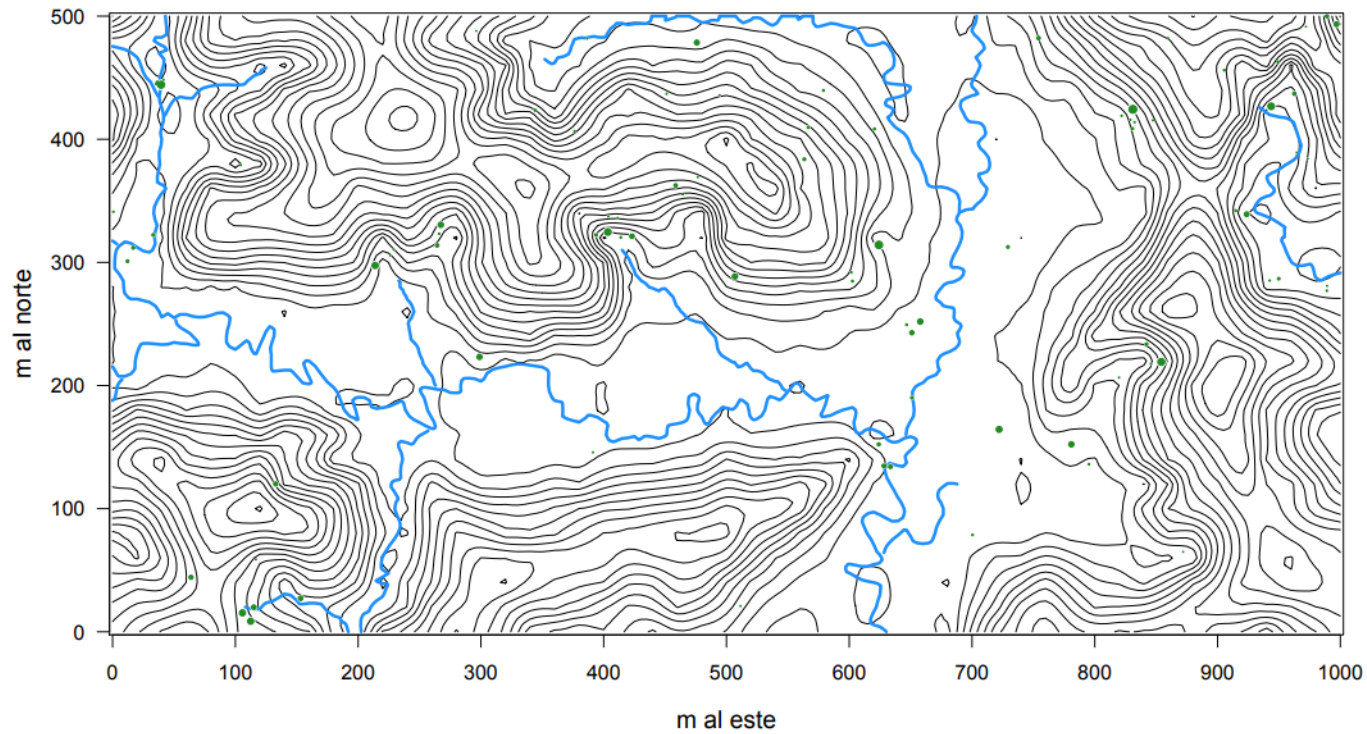


Figura A. Distribución espacial de *Matisia cordata* dentro de la parcela de estudio permanente de 50 hectáreas en Yasuní. Los puntos verdes representan individuos de *M. cordata*, además se aprecian las curvas de nivel y los ríos dentro de la parcela.

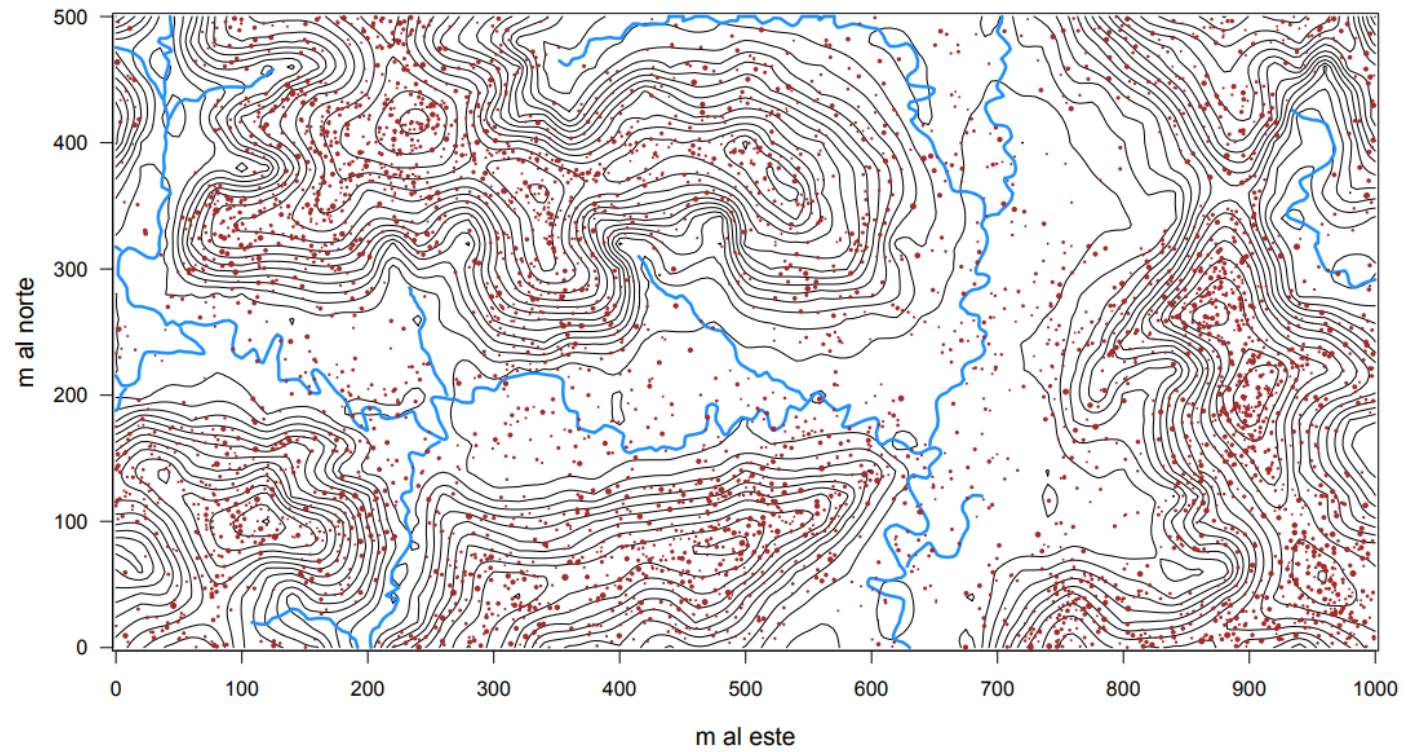


Figura B. Distribución espacial de *Matisia malacocalyx* dentro de la parcela de estudio permanente de 50 hectáreas en Yasuní. Los puntos marrones representan individuos de *M. malacocalyx*, además se aprecian las curvas de nivel y los ríos dentro de la parcela.

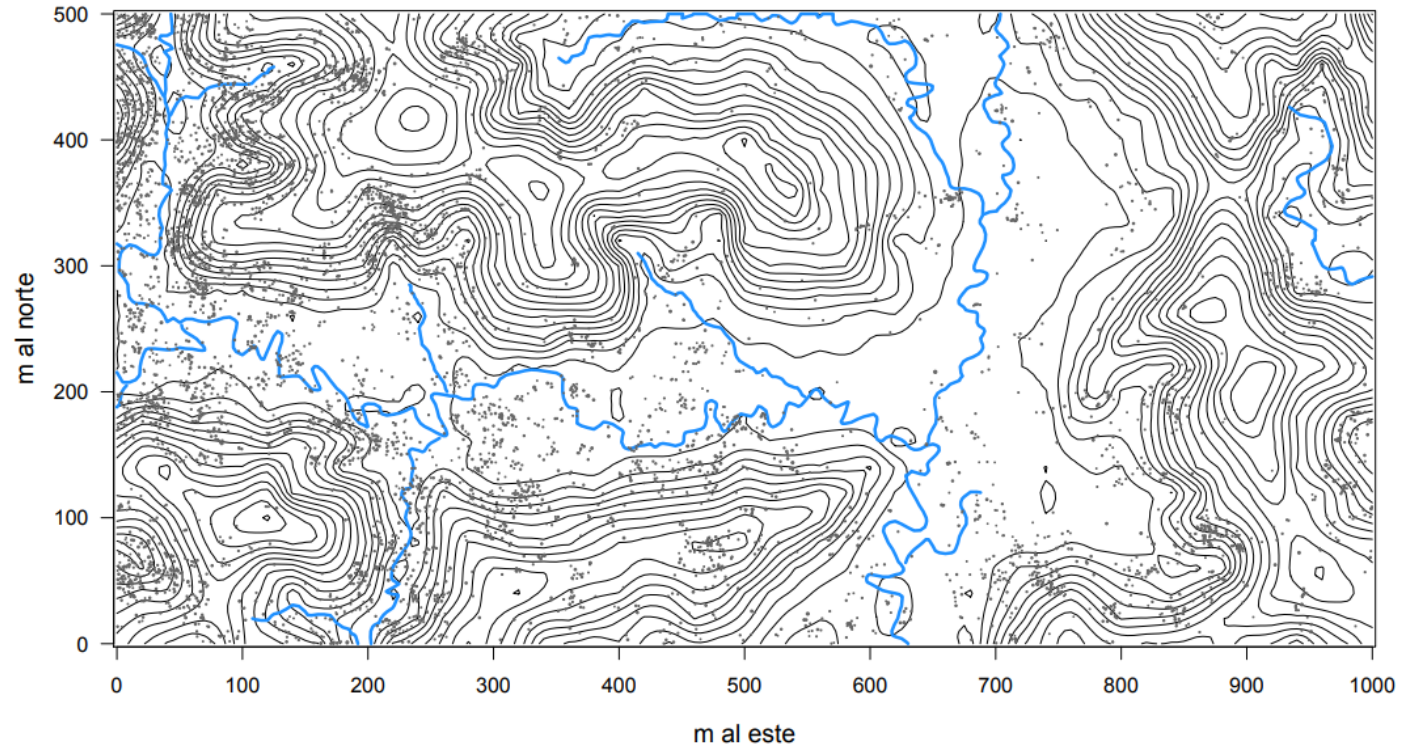


Figura C. Distribución espacial de *Matisia oblongifolia* dentro de la parcela de estudio permanente de 50 hectáreas en Yasuní. Los puntos grises representan individuos de *M. oblongifolia*, además se aprecian las curvas de nivel y los ríos dentro de la parcela.

Anexo 2. Gráficos de “wavelet variances” basados en la metodología generada por Detto & Muller-Landau (2013) y desarrollados por R. E. Cárdenas para las tres especies de *Matisia*.

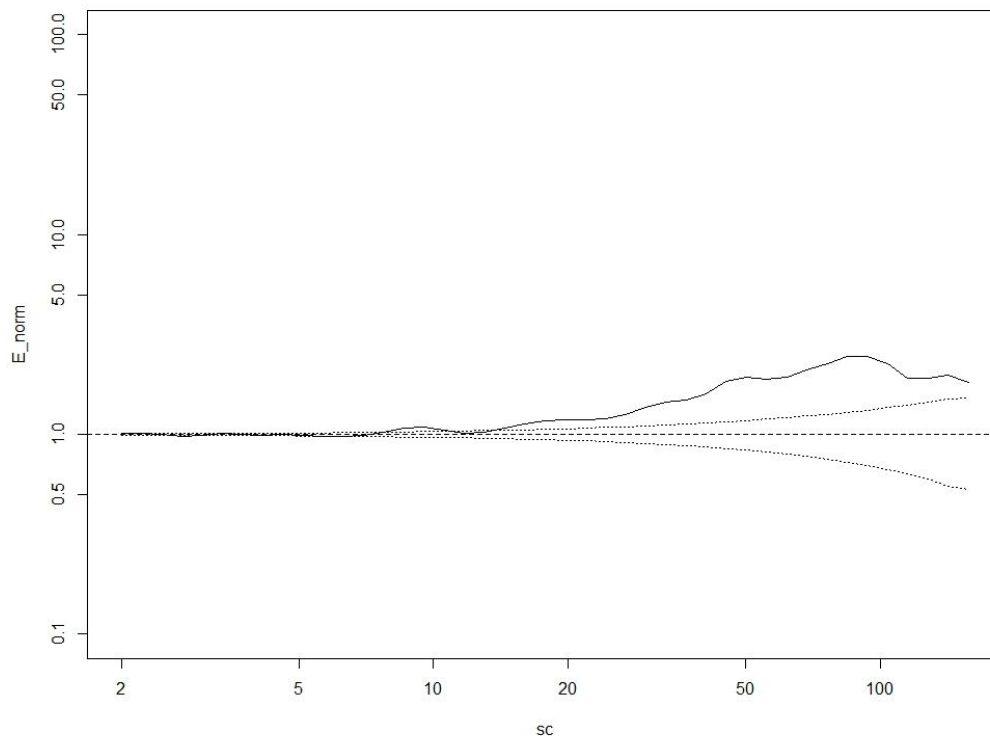


Figura A. “Wavelet variances” de *Matisia cordata*, en el eje X se muestra la escala espacial en metros y en el eje Y la variancia de la distribución de los individuos, en líneas punteadas se observa el intervalo de confianza generado de forma aleatoria, mientras que la línea negra sólida se observa la variancia observada y ajustada de la distribución de los individuos por escala. Cuando la línea continua se separa de las líneas punteadas (varianza >1), se puede decir que existe agregación espacial; *M. cordata* es una especie que presenta un bajo nivel de agregación tanto en escala espacial pequeña como grande, tomando en cuenta todos los individuos de la parcela de 50 hectáreas según el censo de 2002.

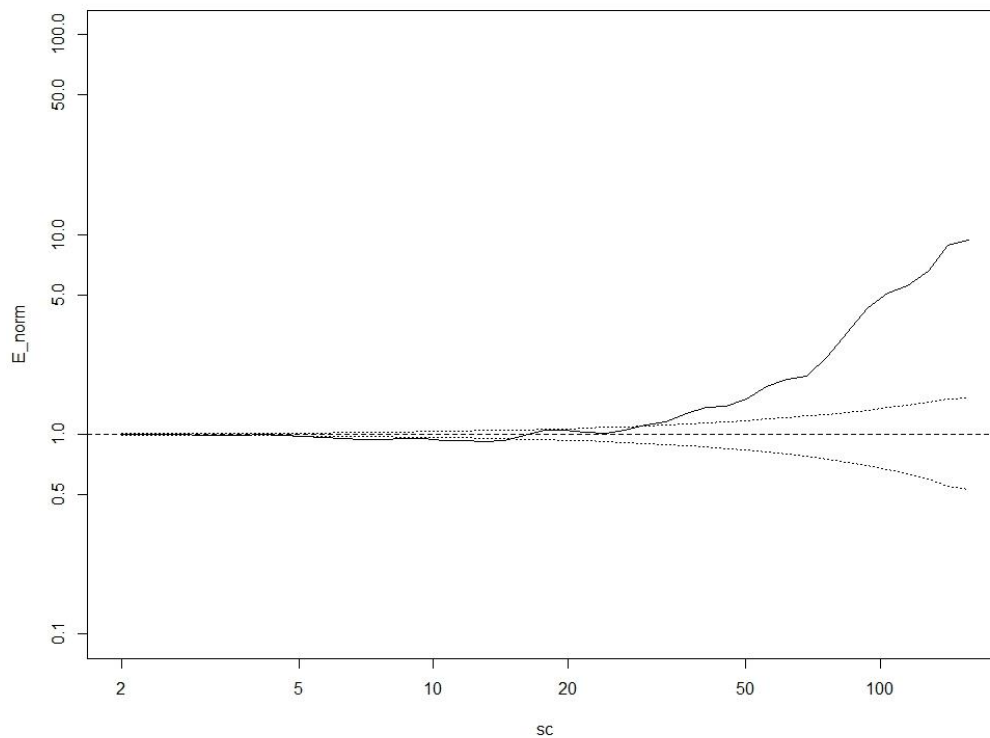


Figura B. “Wavelet variances” de *Matisia malacocalyx*, en el eje X se muestra la escala espacial en metros y en el eje Y la variancia de la distribución de los individuos, en líneas punteadas se observa el intervalo de confianza generado de forma aleatoria, mientras que la línea negra solida se observa la variancia observada y ajustada de la distribución de los individuos por escala. Cuando la línea continua se separa de las líneas punteadas (varianza >1), se puede decir que existe agregación espacial; *M. malacocalyx* es una especie que presenta un nivel de agregación alto en una escala espacial grande, tomando en cuenta todos los individuos de la parcela de 50 hectáreas según el censo de 2002.

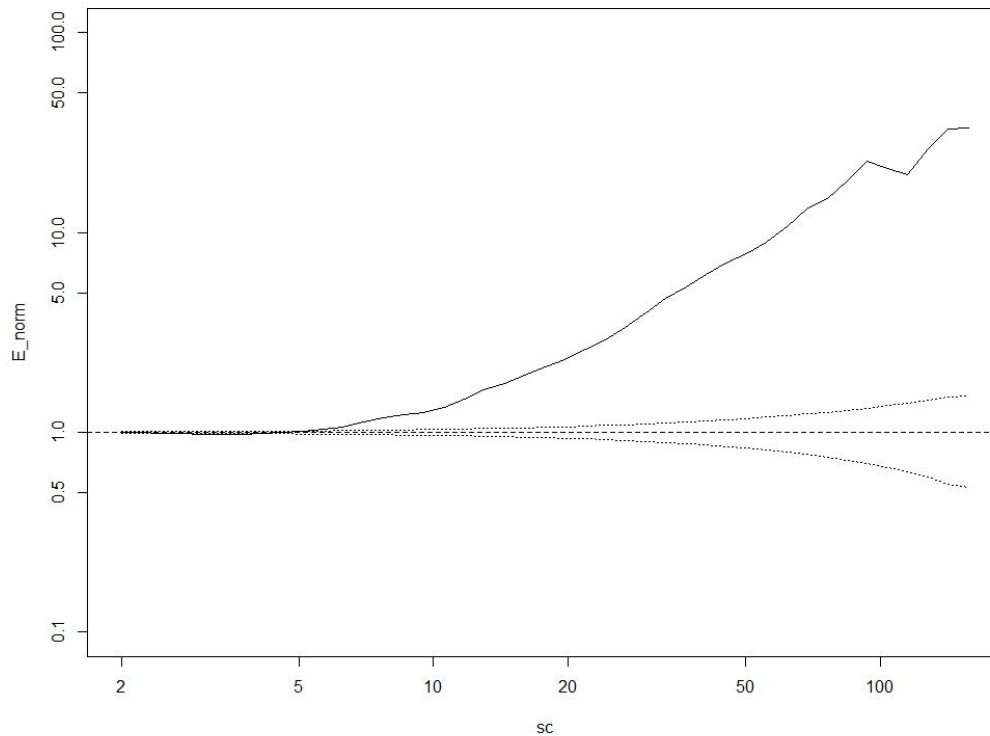
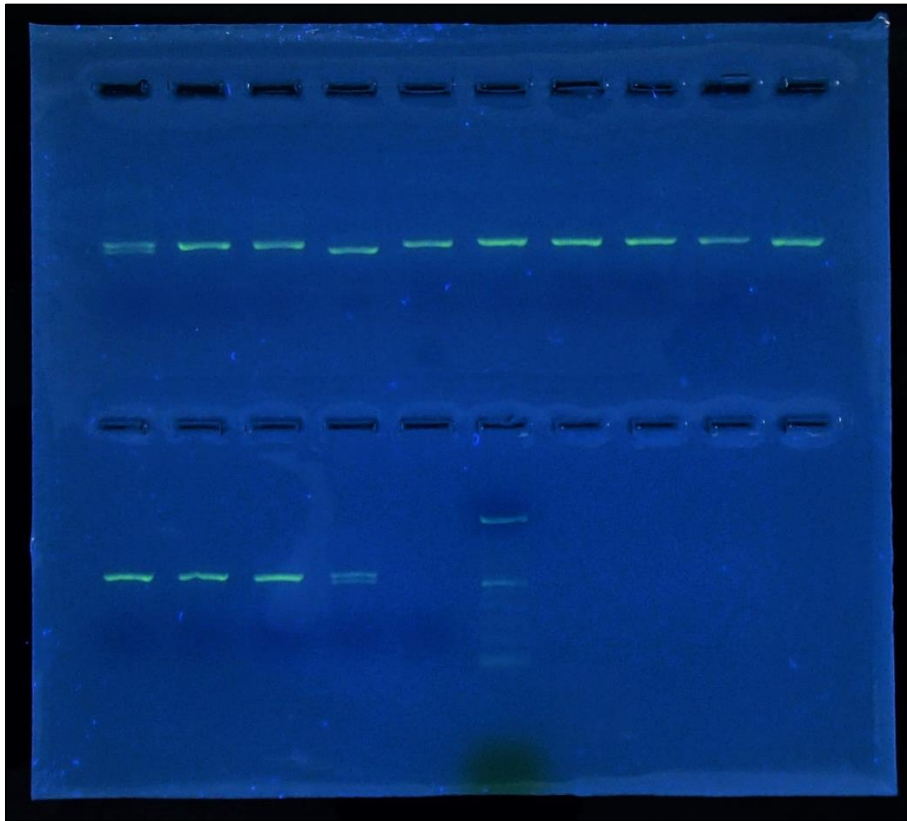


Figura C. “Wavelet variances” de *Matisia oblongifolia*, en el eje X se muestra la escala espacial en metros y en el eje Y la variancia de la distribución de los individuos, en líneas punteadas se observa el intervalo de confianza generado de forma aleatoria, mientras que la línea negra sólida se observa la variancia observada y ajustada de la distribución de los individuos por escala. Cuando la línea continua se separa de las líneas punteadas (varianza >1), se puede decir que existe agregación espacial; *M. oblongifolia* es una especie que presenta un nivel de agregación alto, tanto en escala espacial pequeña como grande, tomando en cuenta todos los individuos de la parcela de 50 hectáreas según el censo de 2002.

Anexo 3. Gel representativo de los productos de amplificación de la región ITS (secuencia del transcrito interno) del ADN ribosomal con los cebadores ITS1F e ITS4 por medio del método PCR, obtenidos de 13 cultivos puros de hongos pertenecientes a *Matisia oblongifolia*. Se observan las 13 reacciones de PCR, el control positivo, negativo, y el marcador molecular de peso, en ese orden.



Fotografía: Ricardo Zambrano Cevallos

Anexo 4. Figuras descriptivas obtenidas de las dieciséis especies de hongos asociados a las raíces de *M. cordata*, *M. malacocalyx* y *M. oblongifolia*.

Reino: Fungi, Determinación: Fungal sp. 1



Figura A.1. Fungal sp. 1 en medio Sabouraud con crecimiento de 4 días.
Figura B.1. Hifas y conidios de Fungal sp. 1, vista 40 x, en azul de metileno.

Reino: Fungi, Determinación: Fungal sp. 2

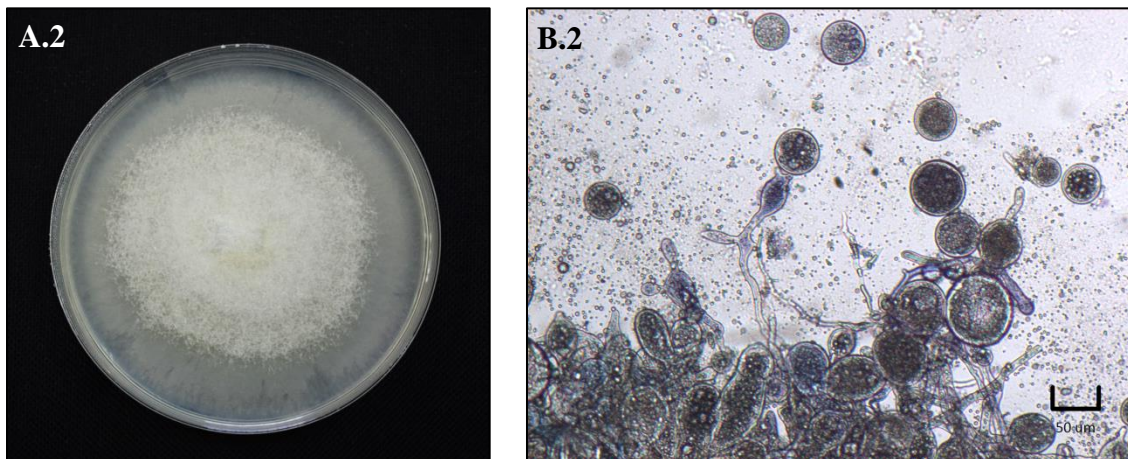


Figura A.2. Fungal sp. 2 en medio Sabouraud con crecimiento de 4 días.
Figura B.2. Hifas y conidios de Fungal sp. 2, vista 10 x, en azul de metileno.

Reino: Fungi, **Determinación:** Fungal sp. 3

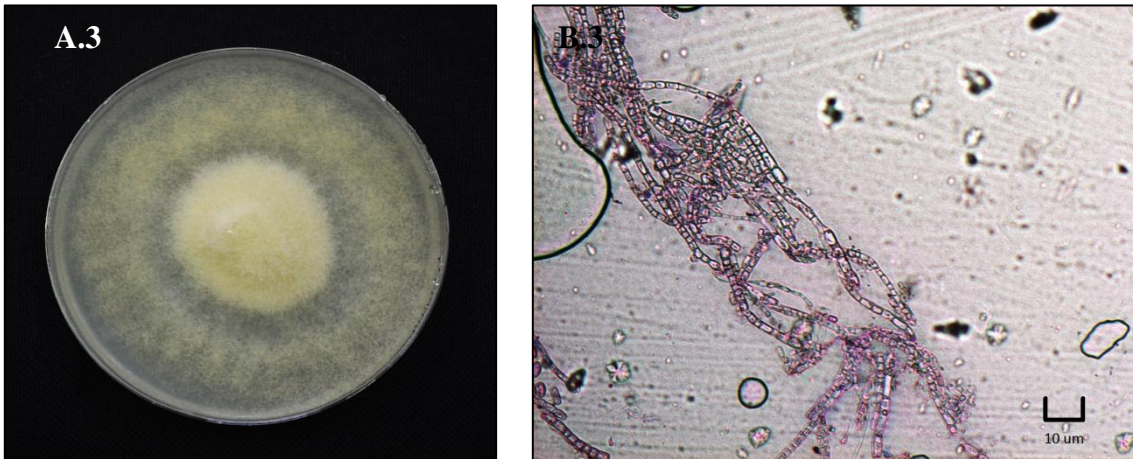


Figura A.3. Fungal sp. 3 en medio Sabouraud con crecimiento de 4 días.
Figura B.3. Hifas y arthroconidios catenulados de Fungal sp. 3, vista 10 x, en azul de metileno.

Reino: Fungi, **Phylum:** Ascomycota, **Orden:** Botryosphaeriales,
Familia: Botryosphaeriaceae, **Género y especie:** *Lasiodiplodia* sp.

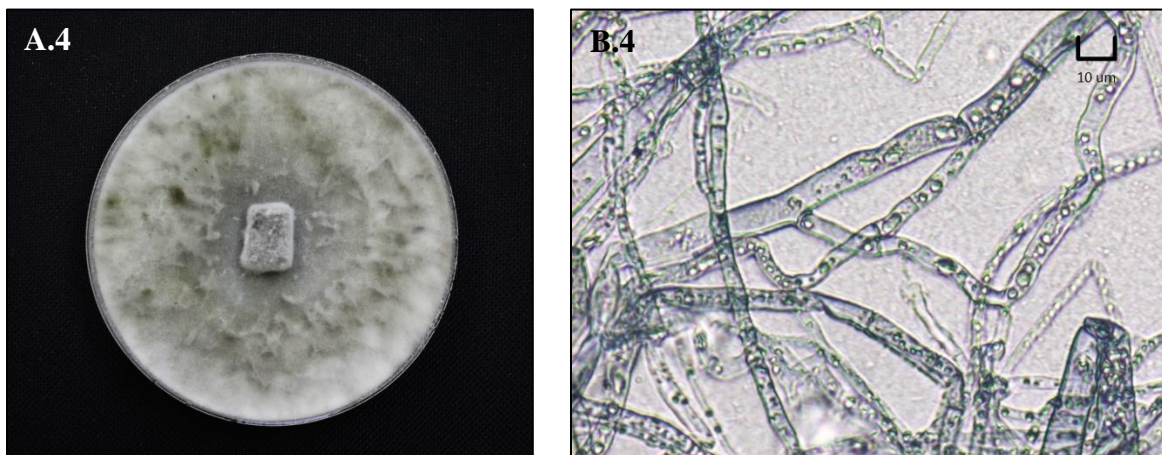


Figura A.4. *Lasiodiplodia* sp. en medio Sabouraud con crecimiento de 4 días.
Figura B.4. Hifas de *Lasiodiplodia* sp. vista 40 x en azul de metileno.

Reino: Fungi, **Phylum:** Zygomycota, **Orden:** Mortierellales, **Familia:** Mortierellaceae,
Género y especie: *Mortierella sp. 1*

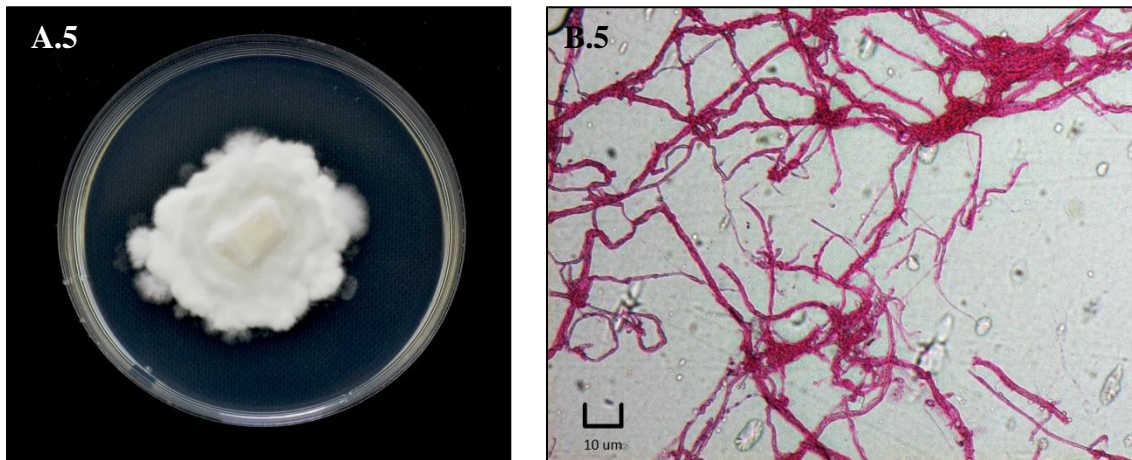


Figura A.5. *Mortierella sp. 1* en medio Sabouraud con crecimiento de 4 días.

Figura B.5. Hifas de *Mortierella sp. 1*, vista 40 x, en floxina.

Reino: Fungi, **Phylum:** Zygomycota, **Orden:** Mortierellales, **Familia:** Mortierellaceae,
Género y especie: *Mortierella sp. 2*

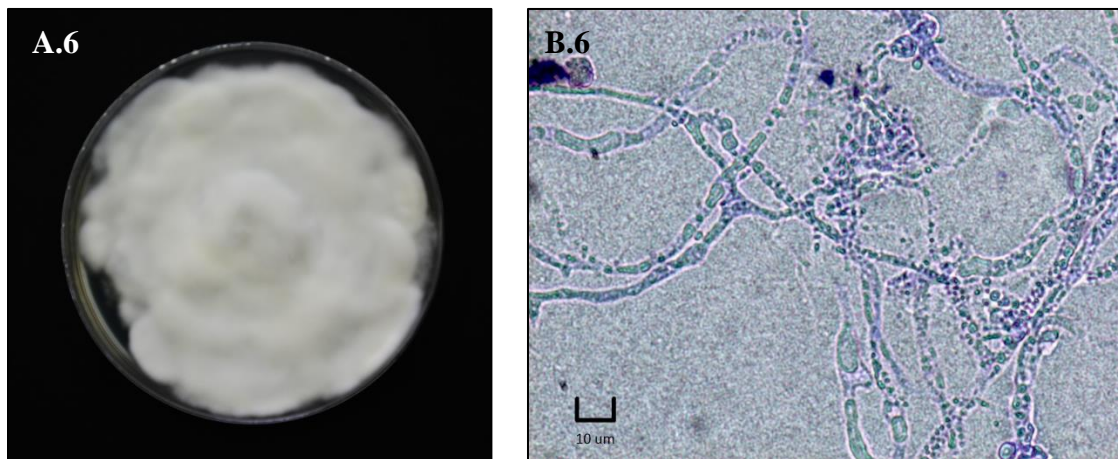


Figura A.6. *Mortierella sp. 2* en medio Sabouraud con crecimiento de 4 días.

Figura B.6. Hifas de *Mortierella sp. 2*, vista 40 x, en azul de metileno.

Reino: Fungi, **Phylum:** Zygomycota, **Orden:** Mucorales, **Familia:** Mucoraceae,
Género y especie: *Mucor circinelloides*

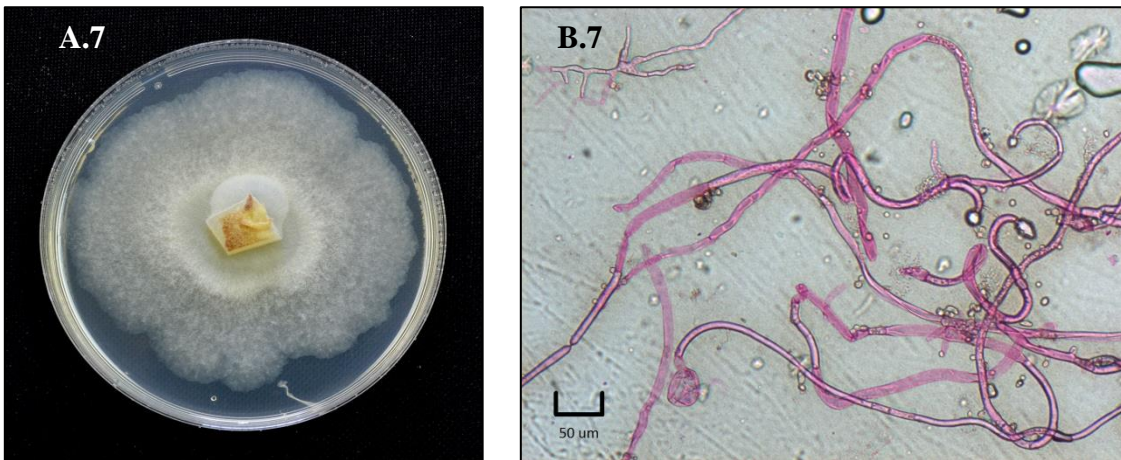


Figura A.7. *Mucor circinelloides* en medio Sabouraud con crecimiento de 4 días.
Figura B.7. Hifas y esporangios de *Mucor circinelloides*, vista 10 x, en floxina.

Reino: Fungi, **Phylum:** Zygomycota, **Orden:** Mucorales, **Familia:** Mucoraceae,
Género y especie: *Mucor* sp.



Figura A.8. *Mucor* sp. en medio Sabouraud con crecimiento de 4 días.
Figura B.8. Hifas y esporangios de *Mucor* sp., vista 40 x, en azul de metileno.

Reino: Fungi, **Phylum:** Ascomycota, **Orden:** Amphisphaeriales,
Familia: Pestalotiopsidaceae, **Género y especie:** *Neopestalotiopsis clavispora*

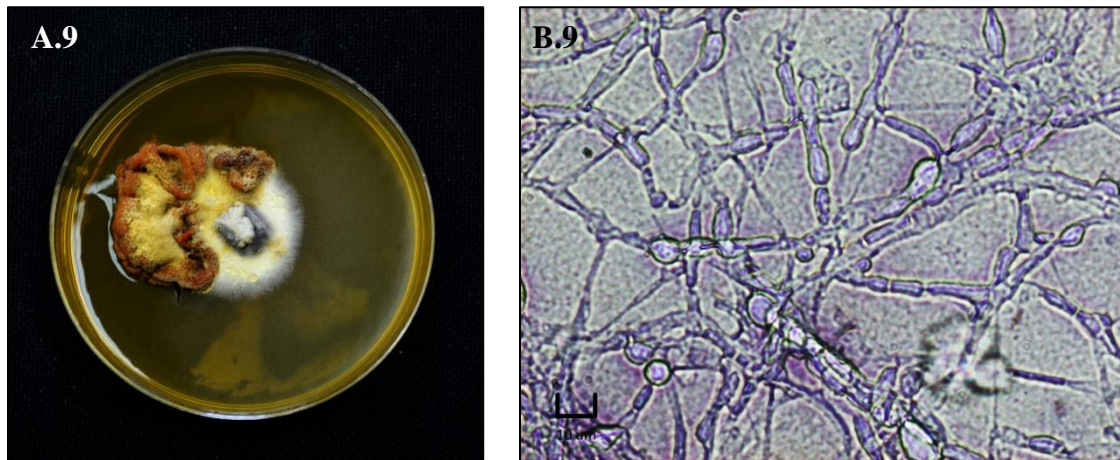


Figura A.9. *Neopestalotiopsis clavispora* en medio Sabouraud con crecimiento de 30 días.

Figura B.9. Hifas y células conidiógenas globosas de *Neopestalotiopsis clavispora*, vista 40 x, en azul de metileno.

Reino: Fungi, **Phylum:** Zygomycota, **Orden:** Mucorales, **Familia:** Mucoraceae,
Género y especie: *Rhizomucor* sp.

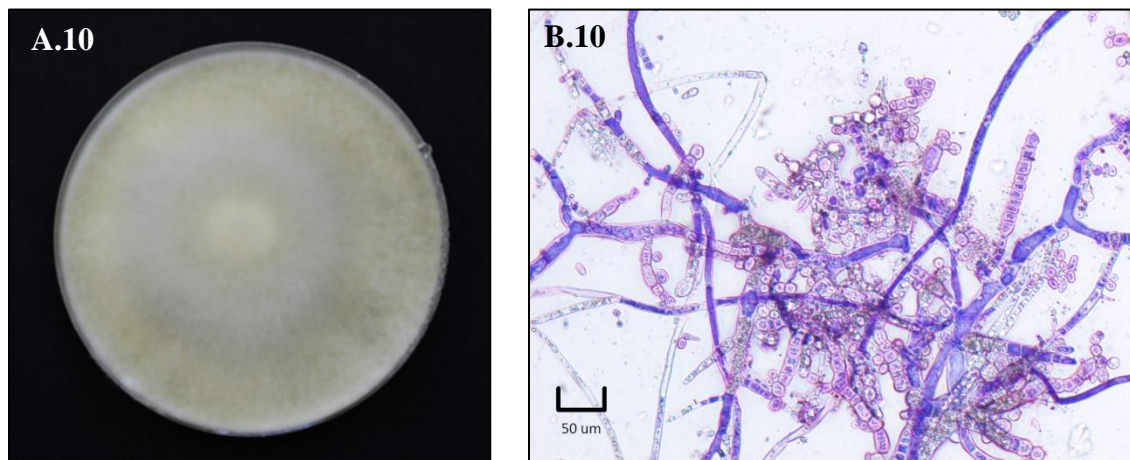


Figura A.10. *Rhizomucor* sp. en medio Sabouraud con crecimiento de 4 días.

Figura B.10. Hifas y artroconidios catenulados de *Rhizomucor* sp., vista 10 x, en azul de metileno.

Reino: Fungi, **Phylum:** Ascomycota, **Orden:** Hypocreales, **Familia:** Hypocreaceae,
Género y especie: *Trichoderma harzianum*

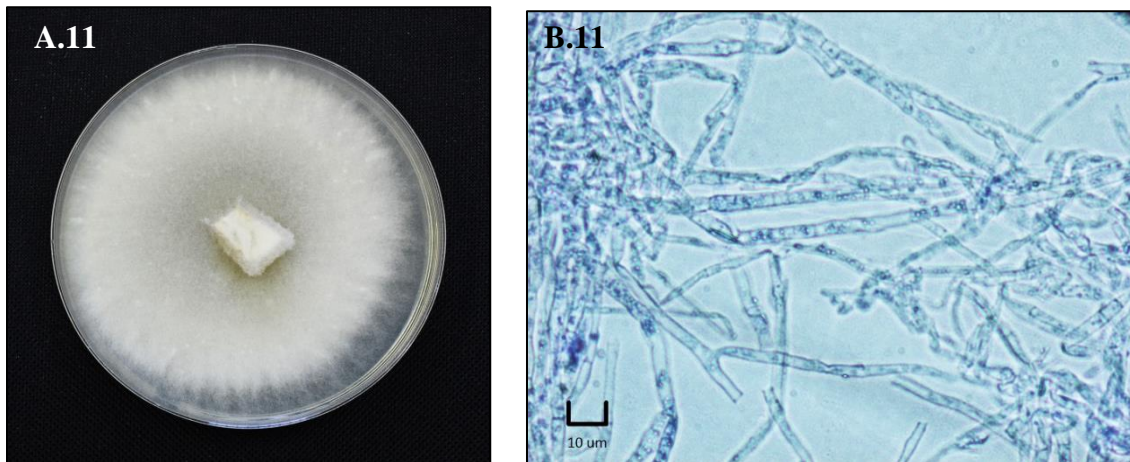


Figura A.11. *Trichoderma harzianum* en medio Sabouraud con crecimiento de 4 días.

Figura B.11. Hifas de *Trichoderma harzianum*, vista 40 x en azul de metileno.

Reino: Fungi, **Phylum:** Ascomycota, **Orden:** Hypocreales, **Familia:** Hypocreaceae,
Género y especie: *Trichoderma ovalisporum*

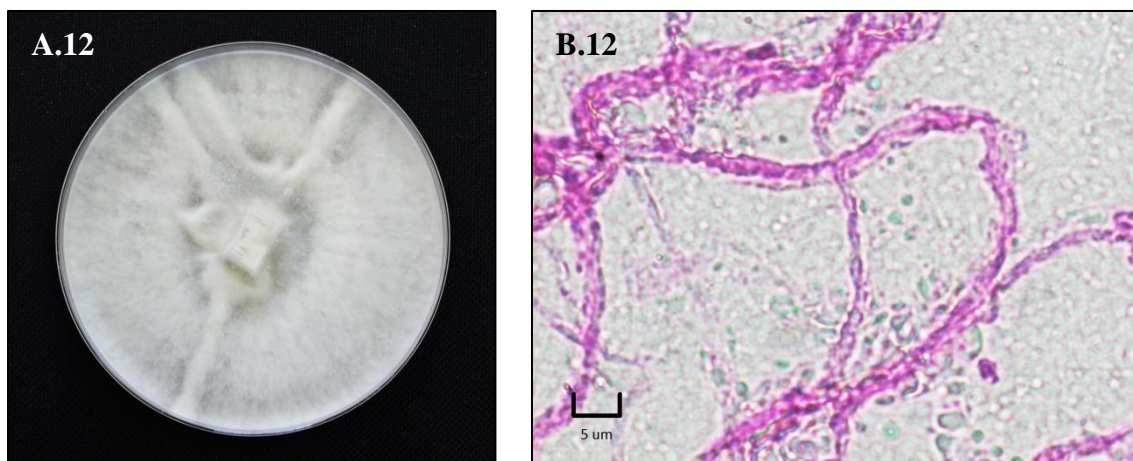


Figura A.12. *Trichoderma ovalisporum* en medio Sabouraud con crecimiento de 4 días.

Figura B.12. Hifas de *Trichoderma ovalisporum*, vista 100 x, en floxina.

Reino: Fungi, **Phylum:** Ascomycota, **Orden:** Hypocreales, **Familia:** Hypocreaceae,
Género y especie: *Trichoderma* sp.

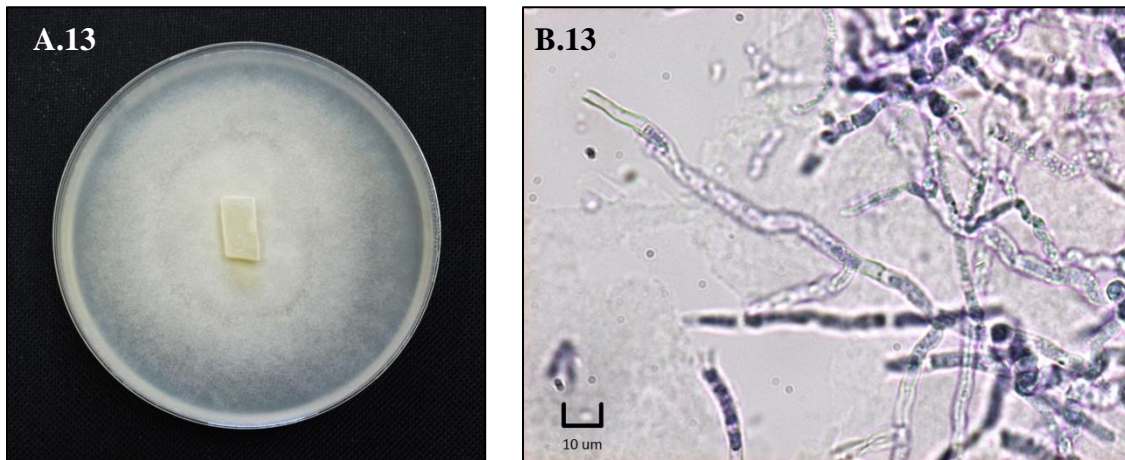


Figura A.13. *Trichoderma* sp. en medio Sabouraud con crecimiento de 4 días.

Figura B.13. Hifas de *Trichoderma* sp., vista 40 X, en azul de metileno.

Reino: Fungi, **Phylum:** Ascomycota, **Orden:** Hypocreales, **Familia:** Hypocreaceae,
Género y especie: *Trichoderma spirale*

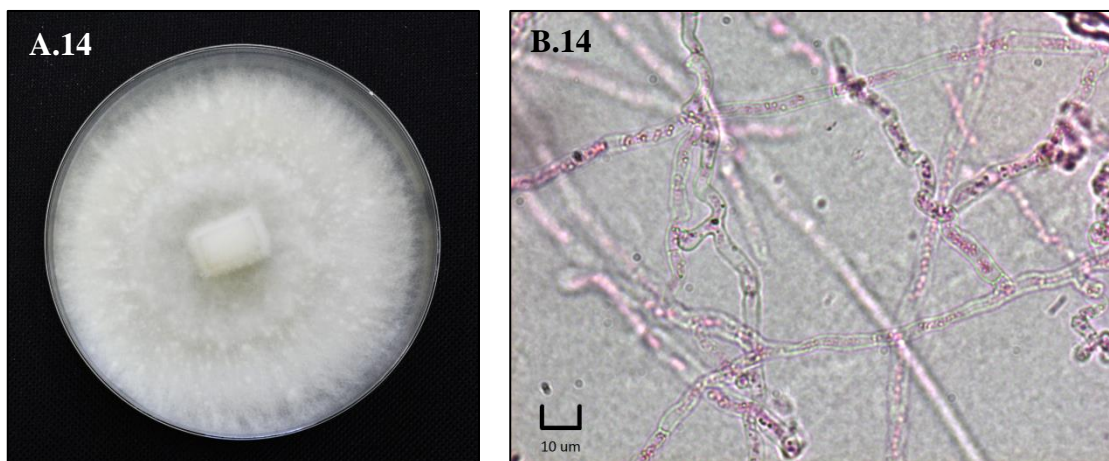


Figura A.14. *Trichoderma spirale* en medio Sabouraud con crecimiento de 4 días.

Figura B.14. Hifas de *Trichoderma spirale*, vista 40 X, en floxina.

Reino: Fungi, **Phylum:** Ascomycota, **Orden:** Hypocreales, **Familia:** Hypocreaceae,
Género y especie: *Trichoderma strigosum*

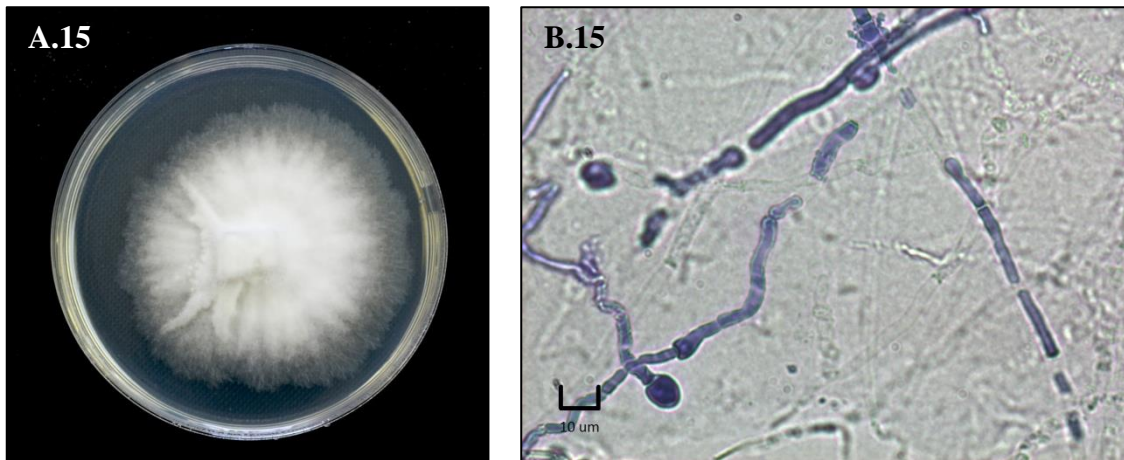


Figura A.15. *Trichoderma strigosum* en medio Sabouraud con crecimiento de 4 días.

Figura B.15. Hifas y conidióforos de *Trichoderma strigosum*, vista 40 x en azul de metileno.

Reino: Fungi, **Phylum:** Ascomycota, **Orden:** Hypocreales, **Familia:** Hypocreaceae,
Género y especie: *Trichoderma virens*

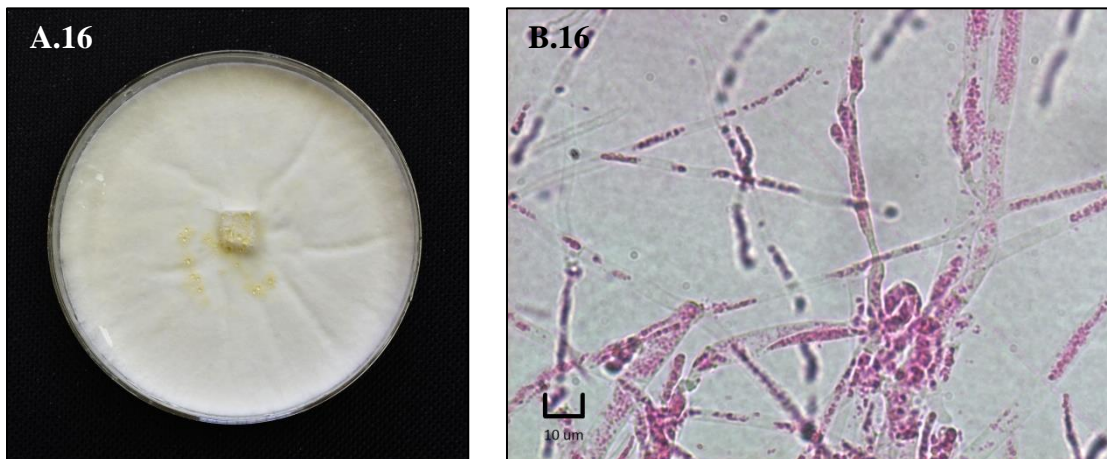


Figura A.16. *Trichoderma virens* en medio Sabouraud con crecimiento de 4 días.

Figura B.16. Hifas de *Trichoderma virens*, vista 40 x en floxina.

Fotografías: Ricardo Zambrano Cevallos.

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Bryan Ricardo Zambrano Cevallos, CI. 172044108-6 autor del trabajo de graduación intitulado: “**Diversidad fúngica asociada a raíces de tres especies de árboles del género *Matisia*, que presentan distintos patrones de agregación en el Parque Nacional Yasuní**”, previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea entregado al Sistema Nacional de Información de La Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca d la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 1 de diciembre de 2017

Bryan Ricardo Zambrano Cevallos

172044108-6