

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <http://www.researchgate.net/publication/230801366>

G.A. Carrillo-B, S. Martin-Solano. Estudio Preliminar sobre la comunidad de primates en el bosque protector del Oglán Alto. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas. V...

ARTICLE *in* REVISTA ECUATORIANA DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS · OCTOBER 2010

DOWNLOADS

859

VIEWS

165

2 AUTHORS, INCLUDING:



[Sarah Martin Solano](#)

University of Liège

7 PUBLICATIONS 0 CITATIONS

SEE PROFILE

ISSN 00349313

Revista
Ecuatoriana de

MEDICINA
Y CIENCIAS
BIOLÓGICAS

VOLUMEN XXXI
NÚMEROS 1 y 2
OCTUBRE / 2010

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas

Volumen XXXI Números 1 y 2

Octubre 2010

Casa de la Cultura Ecuatoriana Benjamín Carrión, 2010

Dirección de Publicaciones / CCE

Av. Seis de Diciembre N16-224 y Patria, Quito, Ecuador

Diseño portada: Andrés Cepeda, AC Imagen

Fotografía portada: Santiago F. Burneo

Diagramación: César E. Salazar O.

Corrección: SEB-Pichincha

ISSN 00349313



DIRECTORIO**Casa de la Cultura**

Presidente: Dr. Marco Antonio Rodríguez

Secretario General: Dr. José Merino

Director de Publicaciones: Dr. Fabián Guerrero Obando

Sección de Ciencias Naturales, Biológicas y Ciencias Exactas

Presidente: Dr. Claudio Cañizares Proaño

Secretaria: Dra. Nina León (E)

Vocales: Dr. Plutarco Naranjo Vargas

Dra. Laura Arcos Terán

Dr. David Niell

Miembros

Laura Arcos Terán

Fernando Astudillo Arroyo (+)

Holm Nielsen Lauritz

Enriqueta Banda de Naranjo

Jaime Bhreil

Augusto Bonilla Barco

Claudio Cañizares Proaño

Eugenia Del Pino

Jaime Díaz Moreno

Rodrigo Fierro Benítez

Raúl Granda

Alex Hirtz

Eduardo Luna Yépez

Aníbal Jarrín

Oswaldo Morán Pinto

Marcelo Moreano Dávila

Miguel Moreno Espinoza (+)

Plutarco Naranjo Vargas

Celín Astudillo Espinoza

David Niell

Arturo Nina León

Tjitte de Vries

Milton Paz y Miño

Hernán Proaño

Edgar Samaniego Rojas

Cristóbal Santacruz

Fausto Sarmiento Rodríguez

Jorge Suárez Armijos

Fernando Sempértegui Ontaneda

Jorge Soria

José Varea Terán

Henrik Balslev

Rodrigo Yépez Miño

Editores

Dr. Sergio Barba (Medicina)

Dr. Carlos A. Soria (Ciencias Naturales)

Comité Editorial

Licd. Santiago Burneo

ISSN 003349313

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas - Vol. XXXI Números 1 y 2
1-127, octubre 2010

ÍNDICE

Directorio de la Casa de la Culturapág. 3

Editorialpág. 5

Trabajos originales

Impacto genético en comunidades Amazónicas del Ecuador localizadas en zonas petroleras

César Paz-y-Miño, Bernardo Castro, Andrés López-Cortés, María José Muñoz, Alejandro Cabrera, Catalina Herrera, Adolfo Maldonado, Carolina Valladares, María Eugenia Sánchez.....pág. 7

Resistencia a carbapenemes asociada a integrones clase 1 en *Pseudomonas aeruginosa*

María Fernanda Yauri, Iliana Alcocer, Mercedes Rodríguez-Riglos & Jeannete Zurita.....pág. 20

Estandarización de la metodología para el conteo cromosómico en especies del género *Polylepis* en el Ecuador

Quija-Lamina, P., Segovia-Salcedo, C., Jadán, M. & Proaño Kpág. 33

Análisis RAPD de la diversidad genética de *Theobroma cacao* L. de una población del Literol Ecuatoriano.

Mercedes Carranza, Emmerick Motte, Virma Cedeño, Orly Cevallos, Silvia Saucedo, Hyron Canchingnia, Ariel Escobarpág. 50

Control de nemátodos en maracuyá usando benzimidazoles en ácidos húmicos

Carlos A. Soria.....pág. 58

Un método cuantitativo para medir el área de tubérculo dañado por larvas de *Tecia solanivora* (Lep.; Gelechiidae) a través de análisis de imágenes digitales

Carlos Carpio, Jean-Louis Zeddami, Álvaro Barragán, Gustavo Nuñez, Marcelo Patiño & Olivier Danglespág. 69

Estudio preliminar sobre la comunidad de primates en el bosque protector del Oglán Alto. Araujo-Pastaza.

Gabriel Alberto Carrillo Bilbao & Sarah Martin-Solano.....pág. 79

Trabajos de revisión

La gastrulación en ranas con diversos modos de reproducción

Eugenia del Pinopág. 94

Resúmenes Simposio: 200 años de Humboldt.....pag. 106

EDITORIAL

Estandarizar conteos cromosómicos o hablar de huellas digitales con microsatélites como marcadores de la diversidad genética o de la necesidad de la conservación, tiene similar importancia como hablar de resistencia o sensibilidad microbiana o de métodos para remover nitratos, contaminantes del agua y modernos detractores de la salud.

También podríamos especializarnos en el uso de membranas proteicas bacterianas que secuestran nanobiomoléculas, estimuladoras de la absorción de nutrientes o en el uso de enzimas o cepas microbiológicas para degradar colorantes o desperdicios industriales.

La investigación plantea infinidad de temas, antes impensables, como la extracción de carotenoides o de keratinasas de los desperdicios orgánicos y de su uso en la medicina o en la industria cosmética, o quizá nos advierte sobre el metano de los rumiantes o de los basureros y su significativa contribución al efecto invernadero.

Imagínese lector lo fascinante que sería ahondar en temas como las diferencias a nivel molecular en los procesos de gastrulación o el papel de la arginina decarboxilasa en la transformación de los estados extracelulares a intracelulares en los protozoos parásitos. No estará muy lejos el día en que se pueda hablar de vacunas efectivas contra los mismos retrovirus o entender molecularmente el papel de las poliaminas de la leche materna o del maíz como factores de crecimiento infantil, o hasta podría imaginar a las arañas fabricando variadas proteínas en fase líquida que al expulsarse por las hilanderías, en contacto con el medio y al cambiar su pH, se vuelve fibra muy resistente o tela de araña para cazar o bolas de fibroin que responde a las corrientes de aire y que les sirve para transportarse grandes distancias.

No dejaría de sorprendernos que los mortiños de nuestros páramos fueran fuente de prociamidinas conocidas en la prevención de enfermedades coronarias, diabetes y obesidad. O que los aceites esenciales del clavo de olor o del árbol del té o de la canela, entre otros, controlen infecciones entéricas o parasitarias o actúen como antioxidantes naturales.

Como ciudadanos de la tierra, se vuelve deber el entender y enseñar el respeto por la vida y su entorno; que nuestros bosques, por ejemplo, no son solamente celulosa y clorofila o que debajo de ellos se esconden riquezas hidrocarburíferas. ¿Qué pasó por ejemplo con la sobreexplotación del saprol del árbol de canela hace años no muy lejanos? Ahora conocemos la disminución continua de su biomasa por falta de sostenibilidad y equilibrio entre producción y comercialización. La destrucción de las frágiles comunidades ecológicas del páramo, del bosque tropical, de

los manglares, causarían una disminución peligrosa de la disponibilidad de hábitats silvestres a medida que crece la densidad poblacional, las plagas, el avance de los cultivos extensivos o la explotación no controlada de orgánicos y minerales. ¿Cuántas hectáreas de mundo ecológico destruimos al día?

El tener conciencia sobre estos temas se lo debemos a nuestros investigadores, capital intelectual importante en la toma de decisiones, especialmente en los conflictos entre economía política y economía ecológica.

Nuestra Revista de Medicina y Ciencias Biológicas recogerá y publicará artículos científicos generados por los diferentes caminos que ofrece la investigación de las Ciencias Biológicas y Médicas. Es nuestra forma de socializar lo aprendido y estimular la creatividad del investigador.

Dr. Carlos A. Soria
Editor, Sección Ciencias Biológicas

TRABAJOS ORIGINALES

Impacto genético en comunidades Amazónicas del Ecuador localizadas en zonas petroleras

César Paz-y-Miño¹, Bernardo Castro¹, Andrés López-Cortés¹, María José Muñoz, Alejandro Cabrera¹, Catalina Herrera¹, Adolfo Maldonado², Carolina Valladares², María Eugenia Sánchez¹

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de las Américas. Av. de los Granados y Colimes. Quito, Ecuador.
Postal code: 1712842
cpazymino@udla.edu.ec

² Corporación Acción Ecológica. Área de investigación en salud y ambiente.
Alejandro de Valdez N24-33 y La Gasca. Quito, Ecuador. Postal code: 1715246-C
Recibido: 2010-02-05, aprobado: 2010-08-31

RESUMEN.- La exposición de agentes carcinógenos usados en la industria petrolera incrementa el desarrollo de cáncer tanto en hombres como en mujeres y niños. Se ha observado que los individuos expuestos a agentes genotóxicos presentan una inestabilidad general del genoma humano que puede ser evaluada por medio del estudio de cromosomas o de genes involucrados en daño genético a través del análisis del nivel de fragmentación del ADN en individuos expuestos a los hidrocarburos. Para el estudio se escogieron 23 mujeres que viven cerca de la actividad petrolera y a quienes se supone presentaron una mayor exposición a las fuentes de contaminación. Los individuos control fueron 25 mujeres provenientes de la Joya de Los Sachas, en Orellana, sin antecedentes de exposición continua a genotóxicos. La técnica usada para determinar alteraciones genéticas fue el ensayo cometa. Los datos obtenidos indican que existe un mayor riesgo a padecer cáncer, malformaciones congénitas y abortos en las zonas ubicadas más cerca a la actividad petrolera, por ende con mayor exposición a factores tóxicos. La distancia al foco de exposición y la asimilación de los mismos facilita la mutación del ADN en las células, originando fallas en los sistemas de reparación.

PALABRAS CLAVE: Petróleo, genotóxicos, inestabilidad genómica, fragmentación de ADN, ensayo cometa.

ABSTRACT.- The exposition to the carcinogenic agents used in the oil industry increment the development of cancer in the Amazonian communities. According to revised health data, exposed individuals to genotoxic agents present general instability of the human genome. This instability can be measured through analysis of the

DNA fragmentation level in individuals exposed to hydrocarbons. For the present study, 23 women who live near oil activity and contamination sources, are considered to be exposed to major contamination environments. Control individuals were 25 women who live in Joya de los Sachas, in the Orellana province, without continuous exposure to genotoxics. The technique used to determine genetic alterations was the Comet Assay. The data obtained indicate that there is an increased risk of cancer, congenital malformation and abortions in the zones located closer to oil activity. The distance to the contamination source and assimilated genotoxic agents, facilitate the DNA mutation in the cells, originating failures in the repairing systems.

KEY WORDS: Oil, genotoxics, genomic instability, DNA fragmentation, Comet Assay.

INTRODUCCIÓN.- En Ecuador, el petróleo ha sido y continúa siendo, además de la fuente principal de ingreso económico, una de las amenazas más importantes hacia el ambiente y la población nativa de la región Amazónica del Ecuador. La actividad petrolera, en Ecuador, empezó en 1972 (1). En el proceso, millones de galones de petróleo y desechos tóxicos han sido eliminados directamente al ambiente, ocasionando problemas a la salud pública (2).

Desde los primeros años de la explotación petrolera en el Ecuador, las comunidades indígenas y campesinas, así como grupos ecologistas nacionales, se han organizado en oposición a la falta de regulación del desarrollo petrolero y denunciado que la contaminación ha causado un daño enorme tanto al ambiente como a la salud de la población (2, 3).

El petróleo y sus componentes pueden ingresar al cuerpo por medio de tres vías: a) absorción por la piel, b) ingestión de comida y bebida, y, c) inhalación de gases por medio de la respiración (4); además, la exposición al petróleo no está limitada al área cercana a la contaminación. Cuando el petróleo contamina el ambiente, los componentes más pesados tienden a depositarse en los sedimentos desde donde pueden contaminar repetidamente las fuentes de agua o ser consumidos por organismos que pueden entrar en la cadena alimenticia del hombre. Los componentes del petróleo más ligeros pueden evaporarse en cuestión de horas y ser depositados a gran distancia de su lugar de producción a través del aire o del agua (5).

Los hidrocarburos de gran poder toxicológico, que se encuentran presentes en el petróleo, son compuestos orgánicos volátiles, como el benceno, tolueno

no, xileno e hidrocarburos aromáticos polinucleares (6). Altas concentraciones de benceno causan síntomas neurotóxicos que desarrollan daños en la médula ósea con pancitopenia persistente y la exposición a este agente químico es una de las causas del desarrollo de leucemia y tumores de carácter hematológico (1). La exposición de agentes carcinógenos usados en la industria petrolera incrementa el desarrollo de cáncer tanto en hombres como en mujeres y niños. Se ha observado incremento en el número de casos con cáncer de pulmón, esófago, recto, piel y riñones en hombres; en mujeres se ha observado más casos de cáncer de cérvix, ganglios linfáticos y vejiga; en niños, los casos de cáncer de carácter hematopoyético han ido en aumento (1).

Las petroleras en la Amazonía Ecuatoriana

La Amazonía del Ecuador está formada por más de 10 millones de hectáreas de bosque tropical situadas en las cabeceras de la inmensa red de ríos amazónicos. La región contiene una diversidad de plantas y animales más rica del mundo, que tiene su máxima concentración en el denominado Parque Nacional Yasuní (7, 8).

En 1967, el consorcio Texaco-Gulf descubrió un rico campo de petróleo bajo el suelo amazónico ecuatoriano que condujo a un “boom” petrolero que ha modificado la región permanente-

mente. Desde entonces, compañías petroleras internacionales junto con la compañía nacional Petroecuador han extraído miles de millones de barriles de crudo de la Amazonía ecuatoriana. Las actividades de explotación petrolera incluyen diversos procesos contaminantes del ambiente. En la Amazonía del Ecuador, la explotación del petróleo ha ocasionado la apertura de caminos en el interior de la selva y cientos de miles de detonaciones en la fase sísmica que han causado la erosión de la tierra y la dispersión de la fauna. Cada pozo de exploración que se perfora produce un promedio de 4.000 metros cúbicos de desechos de perforación. Estos desechos se depositaron durante muchos años en huecos excavados en la tierra que se denominan piscinas donde por filtración, sobreflujo o directamente, son eliminados al ambiente (3); en la actualidad suelen depositarse, sin aislamiento o tratamiento alguno, en las plataformas de los mismos pozos.

Si se encuentran cantidades de petróleo comerciales, comienza la fase de producción. Durante esta fase, el petróleo se extrae mezclado con agua de formación y gas y se lleva a una central de separación. En esta central, más de 4,3 millones de galones de líquidos de desechos se generan cada día y se eliminan sin tratamiento a las piscinas. Aproximadamente, millones de pies cúbicos de gas procedentes del proceso de separación se queman diariamente

en la Amazonía ecuatoriana. Este gas se quema sin ningún tipo de control de la temperatura o de las emisiones contaminándose el aire con un gran número de sustancias tóxicas (7). Las actividades de mantenimiento en los más de 1.000 pozos de producción de la Amazonía Ecuatoriana descargan cada año aproximadamente 5 millones de galones de desechos tóxicos no tratados en el ambiente. Los escapes y derrames de los pozos y tanques son también habituales (9).

Los daños genéticos y el petróleo

En 1994, el Centro de Derechos Económicos y Sociales publicó un informe documentando peligrosos niveles de contaminación por petróleo en los ríos del nororiente ecuatoriano. En ese estudio, se encontraron concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en las aguas utilizadas para beber, bañarse o pescar de 10 a 10.000 veces superiores a los límites permitidos por la Agencia de Protección Medio Ambiental de los Estados Unidos. En ese mismo informe se reportaron numerosos problemas de piel (dermatosis) entre la población local aparentemente relacionados con la contaminación petrolera. Asimismo, el gobierno ecuatoriano fue acusado de violación de los derechos humanos (5).

La relación entre exposición a agentes químicos y cáncer se inicia con una observación efectuada por el médico

británico Percival Pott, en cuyos resultados publicados en 1775 describe una prevalencia del cáncer genital en individuos expuestos al hollín (10).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son un grupo numeroso de sustancias que, químicamente, son derivados poliméricos del benceno. Históricamente fueron los primeros agentes químicos en ser reconocidos como causantes de tumores malignos en humanos (11) y actualmente se ha correlacionado la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos con el desarrollo de cáncer pulmonar (12, 13, 14).

Según datos de salud revisados, se ha observado que los individuos expuestos a los compuestos volátiles de los hidrocarburos presentan síntomas leves como irritación de la piel, comezón, irritación de los ojos, náusea, mareo, vértigo y dolor de cabeza (15). De la misma forma, la exposición a agentes genotóxicos produce una inestabilidad general del genoma humano que puede ser evaluada por medio del estudio de cromosomas o de genes involucrados en daño genético a través del análisis del nivel de fragmentación del ADN en individuos expuestos a los hidrocarburos. A nivel cromosómico los agentes genotóxicos producen roturas e inestabilidad cromosómica. Medir el porcentaje de presentación de estas alteraciones citogenéticas constituye un método confiable de biomonitorización de población expuesta (1).

Muchas actividades enzimáticas involucradas en el metabolismo de xenobióticos humanos son sujetas a polimorfismos genéticos y se han reportado los estudios de asociación entre la susceptibilidad al cáncer y la presencia de estos polimorfismos (1). Otros factores que influyen la respuesta a los xenobióticos y el daño que puede ser inducido en el ADN son los genes de reparación (1).

El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto genético en los individuos que viven en las comunidades que se encuentran en las cercanías de la actividad petrolera, reportadas en los Bloques 7 y 21, y localizadas en la provincia de Orellana; además de relacionar la distancia entre los focos de contaminación y las viviendas de los individuos con el daño genético presente en las células.

MATERIALES Y MÉTODOS

Áreas de estudio

Las comunidades seleccionadas para el estudio como afectadas por la contaminación petrolera fueron: Los Vencedores, 15 de Abril, Asociación Payamino y Flor de Manduro en la provincia de Orellana, reportadas como comunidades influenciadas por las actividades petroleras en los Bloques 7 y 21 (16). Estas muestras fueron comparadas con un grupo control con características geográficas similares, localizada dentro de la misma provincia a más de diez kilómetros de

la actividad petrolera en el cantón de la Joya de los Sachas.

Población de estudio y obtención de las muestras

La población de estudio consiste en 23 mujeres que viven cerca de la actividad petrolera. De las cuales, ocho provienen de la comunidad de Los Vencedores, siete de la comunidad Flor de Manduro y ocho de las comunidades Payamino–15 de Abril; a estas últimas se les ubicó en un mismo grupo ya que ambas comunidades se encuentran muy cerca una de la otra. Las comunidades fueron escogidas porque suponen mayor exposición a contaminantes debido a que los focos de emisión se encuentran en los alrededores de las mismas.

Los individuos control fueron 25 mujeres provenientes de la Joya de Los Sachas en Orellana, sin antecedentes de exposición continua a genotóxicos. El grupo de exposición a petróleo tiene una media de edad de 36,4 años frente a los 37,5 de edad media del grupo control en la Amazonía ecuatoriana. El rango de edad de los individuos afectados se encuentra entre los 3 y 72 años, mientras que en el grupo control el rango se encuentra entre los 21 y 71 años de edad. Se realizaron historias clínicas y se obtuvieron muestras de sangre periférica para los análisis genéticos de los individuos de estudio y los individuos control.

Análisis genético

Ensayo cometa – Electroforesis en gel alcalino de células individuales

La técnica del ensayo cometa es un método relativamente rápido y simple para la detección del daño de ADN *in vivo* (17, 18), debido a la exposición de factores como rayos X, pesticidas, hidrocarburos (17, 19, 20). La prueba

un filtro de 515-560nm de excitación. El daño es clasificado por medio de 6 categorías predefinidas (de la A hasta F) dependiendo del nivel de fragmentación del ADN presente en la cola del cometa, siendo A: sin daño, B: bajo nivel de daño, C: nivel medio de daño, D: alto nivel de daño, E y F: daño total (Figura 1).

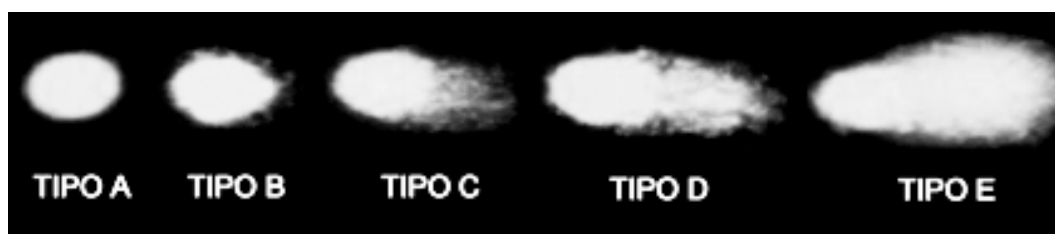


Figura 1. Tipos de núcleos observados en el ensayo cometa. El tamaño de la cola determina la cantidad ADN fragmentado.

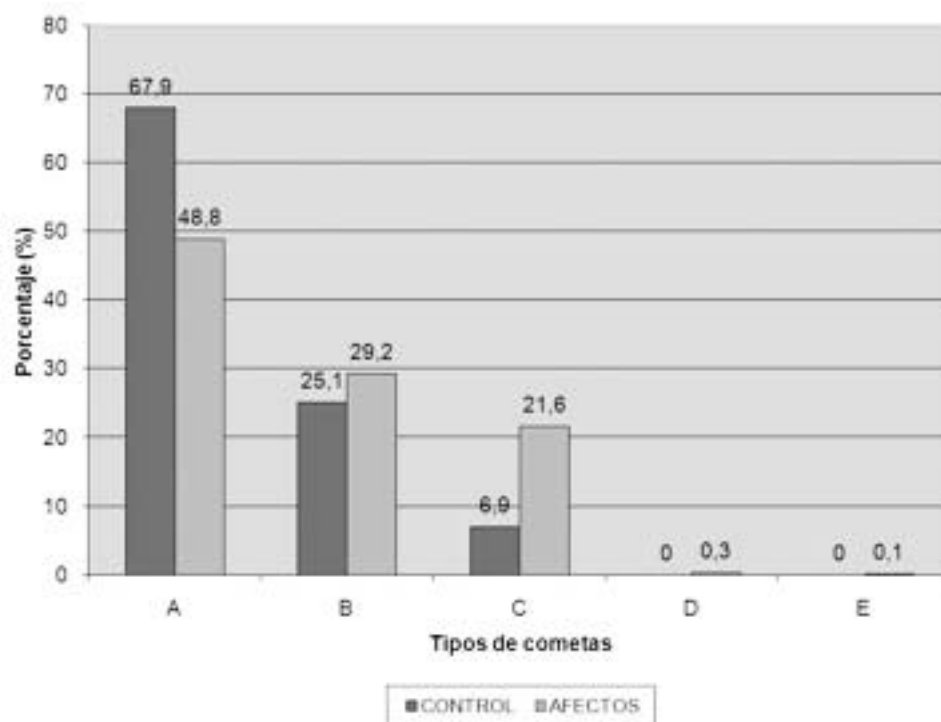
consiste en someter los leucocitos sanguíneos a un campo eléctrico. Si no hay daño celular el material genético no se altera y los núcleos celulares se mantienen circulares. Conforme se incrementa el daño al material genético, los núcleos celulares se van deformando por el desplazamiento de los fragmentos de las cadenas y van adquiriendo una forma de cometa estelar, de ahí su nombre, que en función del daño tendrá mayor o menor extensión de la dispersión (16).

Las muestras fueron analizadas por medio de la técnica descrita por Singh y colaboradores (17) con implementaciones realizadas en otras investigaciones (20, 21). Las placas fueron analizadas usando un microscopio de fluorescencia con una lámpara de mercurio y

RESULTADOS

Comparando los grupos expuestos y los control es a la actividad petrolera, se observa un incremento notable del cometa tipo C en el grupo de expuestos (21,6% daño medio), D (0,3% daño alto) y E (0,1% daño muy alto) que están presentes en una media del 22%, lo que significa tres veces más fragmentación del ADN que el grupo control de la Amazonía (Figura 2).

Se observa que en las comunidades donde existe mayor contaminación, como son en Los Vencedores y Flor de Manduro, existe una mayor cantidad de cometas tipo B y C. Los cometas tipo C se encuentran con mayor frecuencia en la población de Los Vencedores (Figura 3) y los cometas tipo B en la población



* n = Número de individuos

Figura 2. Relación entre afectos y grupo control. Los valores observados corresponden a la media de los resultados observados.

de Flor de Manduro y Joya de los Sachas (Figuras 4, 5). Mientras que la comunidad Payamino 15 de abril presenta mayor porcentaje de cometas tipo A (Figuras 6).

Se observa una relación entre la distancia de las viviendas de los individuos afectados con las fuentes de contaminación (mecheros) y los daños celulares registrados por el ensayo. Los individuos fueron agrupados en 3 categorías de acuerdo a la distancia de la que se encuentran de los focos de con-

taminación: distancia menor a 250 m, de 251 a 500 m y de 501 a 1.500 m.

Conforme los individuos se encuentran más lejos de los focos de contaminación se observa que la cantidad de cometas tipo C analizados también disminuye, pasando de 49,5 % presente en individuos que viven a una distancia menor a 250 m, a 24,2 % y 14 % observados en individuos que viven a una distancia de 251 a 500 m y 501 a 1.500 m, respectivamente (Figura 7). Usando una escala de distancia más precisa (de

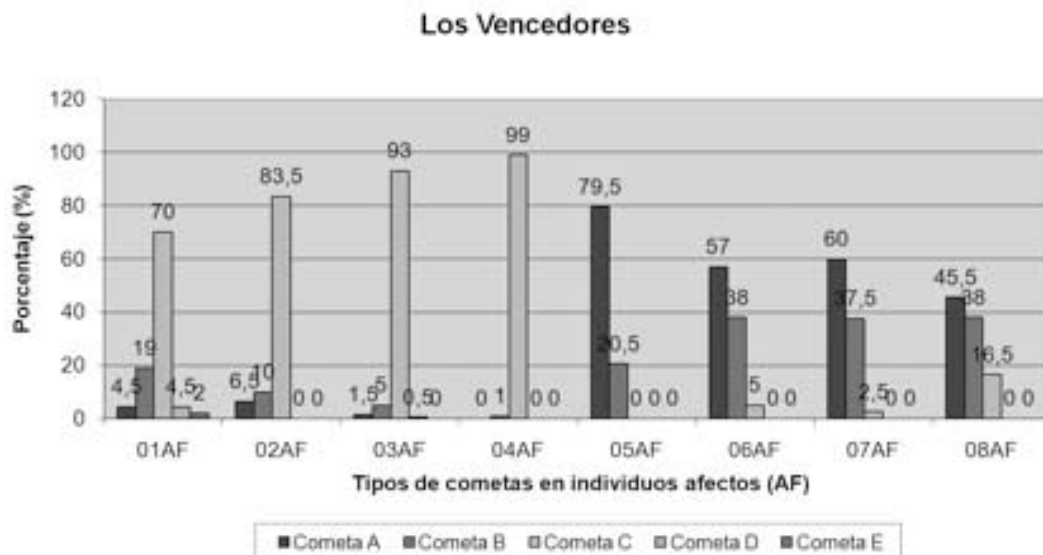


Figura 3. Porcentaje y tipos de cometas en los individuos afectados de la comunidad Los Vencedores.

375 a 3 025 m), se observa que la cantidad de cometas tipo A presentes en la población estudiada van en aumento conforme los individuos vivan más lejos de los focos de contaminación (6,5% de cometas A en una distancia de 375 m y 72% de cometas A en una distancia de 3.025 m; Figura 8).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La evidencia científica indica que los individuos expuestos a hidrocarburos presentan mayor riesgo mutagénico y carcinogénico (1). Los individuos que están expuestos a los agentes químicos usados en la indus-

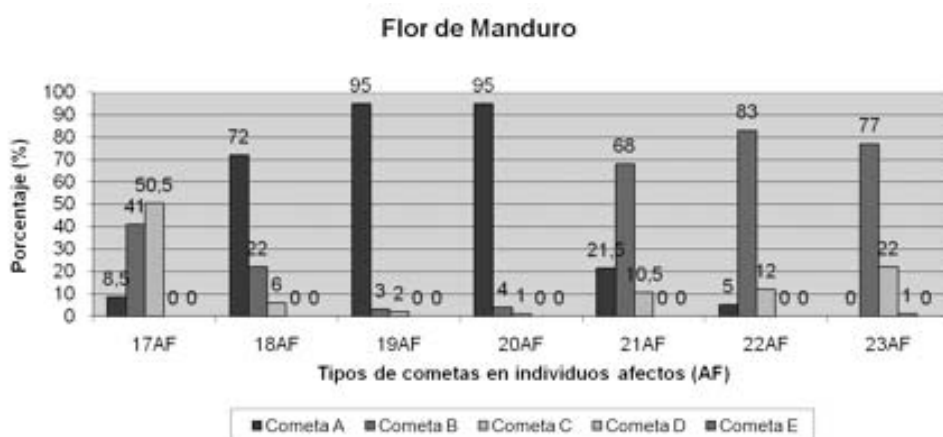


Figura 4. Porcentaje y tipos de cometas en los individuos afectados de la comunidad Flor de Manduro.

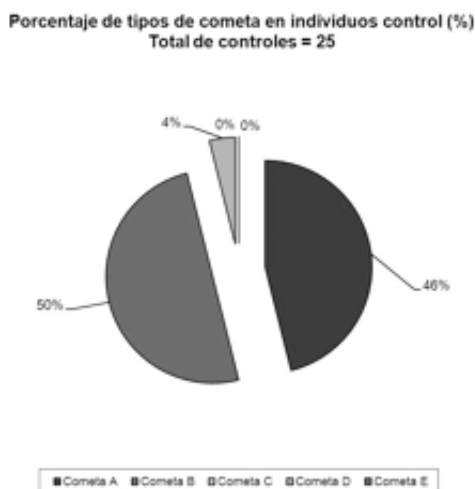


Figura 5. Porcentaje y tipos de cometas en los individuos control de Joya de los Sachas

tria petrolera presentan ligeros, pero frecuentes síntomas de fatiga, micosis cutánea, dolores de cabeza, dermatitis, irritación nasal y ocular, gastritis, náusea y diarrea (1). El ensayo cometa es una técnica muy sensible a los cambios o alteraciones de una o de las dos cadenas de ADN, sobre las cuales

ha actuado el agente genotóxico. La genotoxicidad es la facilidad para producir alteraciones en el material genético y por lo tanto aumenta la propensión al cáncer, a las mutaciones y alteraciones en el embrión que pueden acabar en abortos (22).

Los datos indican que existe un mayor riesgo a padecer cáncer, malformaciones congénitas y abortos en las zonas ubicadas más cerca a la actividad petrolera, por ende con mayor exposición a factores tóxicos. Comparando estos resultados con los obtenidos en un estudio realizado en trabajadores petroleros de la comunidad de San Carlos en la provincia de Orellana, Ecuador, se observa que la exposición a hidrocarburos afecta directamente al daño del ADN en las células (1).

La presencia de cometas tipo C en las células de los individuos que se

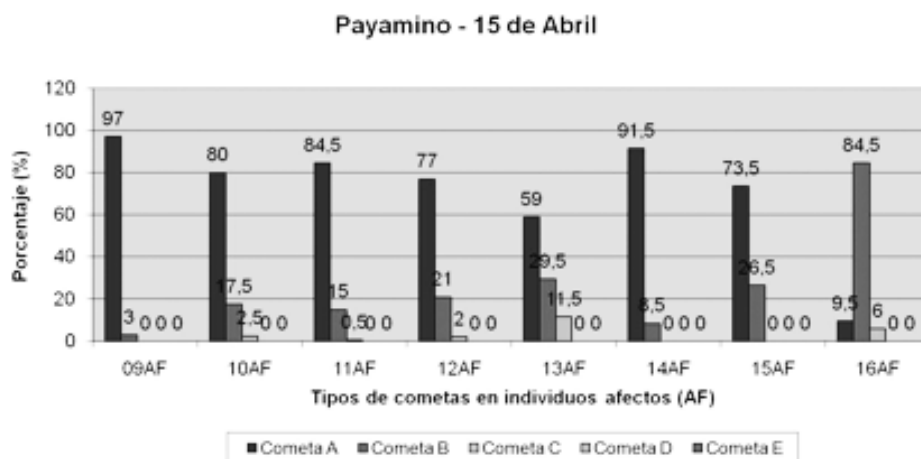


Figura 6. Porcentaje y tipos de cometas en los individuos afectados de la comunidad Payamino 15 de Abril.

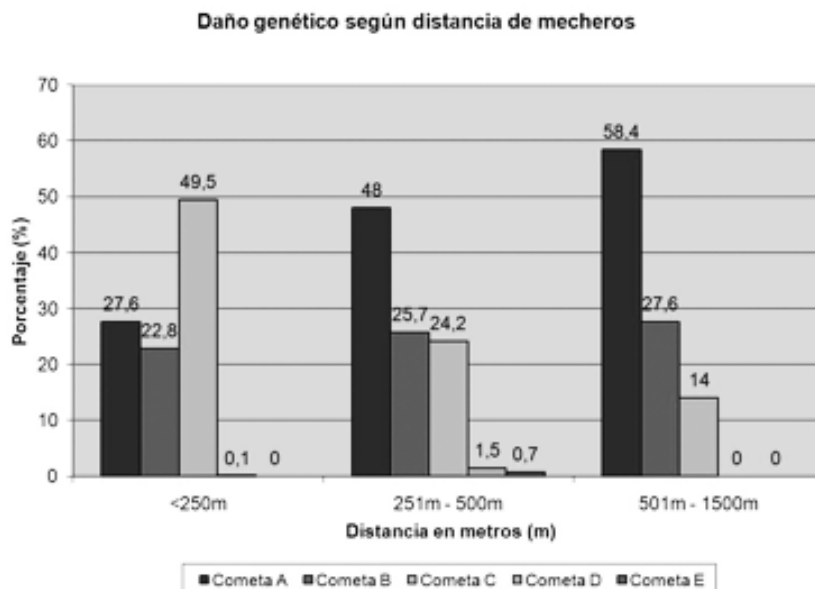


Figura 7. Daño genético observado en cometas, de acuerdo a la distancia de la fuente de contaminación (mecheros).

encuentran expuestos a contaminantes hidrocarbúricos indican daño genético medio en la población afectada. Los individuos que viven más cerca de los focos de contaminación o mecheros presentan una mayor cantidad de daño genético (como cometas tipo C) a diferencia de los individuos que viven más lejos de los focos de contaminación que no presentan daño genético (cometas tipo A) o daño genético bajo (cometas tipo B). Este dato sugiere que la distancia está relacionada con una mayor exposición a agentes contaminantes.

La distancia al foco de emisión de agentes genotóxicos y la asimilación de los mismos facilitan la mutación del ADN en las células, originando fallas en los sistemas de reparación (1). En el

estudio realizado en San Carlos, se relaciona los resultados de individuos expuestos a hidrocarburos con polimorfismos del gen *MSH2*, en el cromosoma 13, encargado de la reparación de nucleótidos mal pareados en el ADN (1). Los resultados obtenidos en ese estudio demuestran que los individuos expuestos a hidrocarburos y los polimorfismos en los genes tienen una mayor susceptibilidad mutagénica, carcinogénica y teratogénica (1), lo que nos permite suponer que las comunidades que viven cerca de los focos de contaminación presentes en los Bloques 7 y 21 pueden presentar alteraciones genéticas.

Los derrames de petróleo y de desechos tóxicos en el ambiente sin tratamiento son problemas graves en el

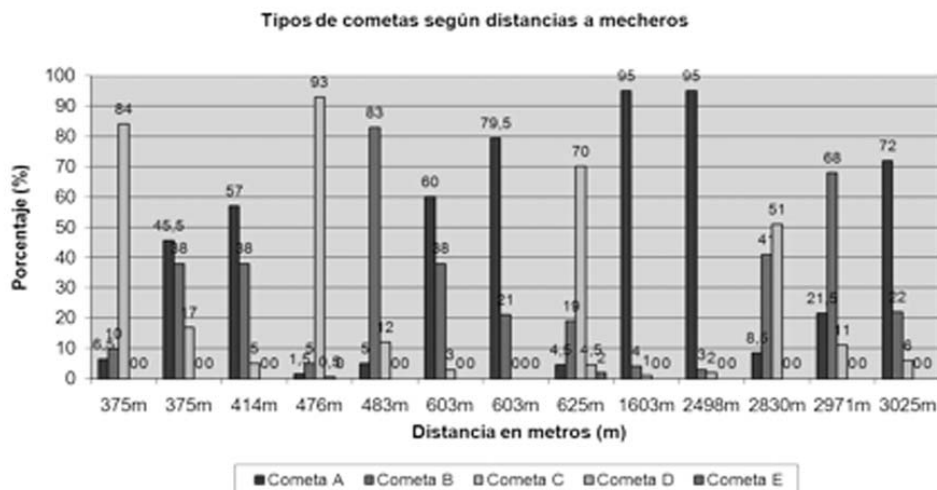


Figura 8. Cometas según distancia a la fuente de contaminación (mecheros).

Ecuador. No existe una legislación clara que proteja a los habitantes de las cercanías de los campos de explotación, ni al ambiente de la selva ecuatoriana. Se deben desarrollar programas de control de explotación de recursos hidrocarbúricos, productos primarios y secundarios derivados del petróleo y desechos generados por la explotación petrolera para disminuir el impacto de la misma en la Amazonía a nivel ambiental, sanitario y social.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Paz-y-Miño C., López-Cortés A., Arévalo M., Sánchez M. 2008. Monitoring of DNA damage in individuals exposed to petroleum hydrocarbons in Ecuador. *Annals of the New York Academy of Science (NYAS)* 1140, 121-8.
2. Kimmerling J., Henriksen S. 1991. Amazon crude. Natural Resources Defense Council. New York, USA.
3. Jochnick C., Normand R., Zaidi S. 1994. Rights violations in the Ecuadorian Amazon: The human consequences of oil development. The Center for Economic and Social Rights.
4. San Sebastián M. 2000. Informe Yana Curi – Impacto de la actividad petrolera en poblaciones rurales de la Amazonía Ecuatoriana. Instituto de Epidemiología y Salud Comunitaria “Manuel Amunárriz”. Ecuador.
5. Centro de Derechos Económicos y Sociales (CDES). 1994. Violaciones de derechos en la Amazonía Ecuatoriana. *Hombre y ambiente*. Abya Yala. Quito, Ecuador.

6. ARC. 1989. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: Occupational exposures to petroleum refining; crude oil and major petroleum fuels. International Agency for Research on Cancer Vol 45. Lyon, France.
7. Hurtig AK., San Sebastián M. 2002. Cáncer en la Amazonía del Ecuador (1985-1998). Instituto de Epidemiología y Salud Comunitaria "Manuel Almunárriz". Coca, Ecuador.
8. Bass M., Finer M., Clinton N., Kreft H., Cisneros-Heredia D., McCracken S., Pitman N., English P., Swing K., Villa G., Di Fiore A., Voigt C., Kunz T. 2010. Global Conservation Significance of Ecuador's Yasuní National Park. PLoS One 5(1), e8767.
9. Almeida A. 2000. Reseña sobre la historia ecológica de la Amazonía Ecuatoriana. En: Martínez E. (ed.). Ecuador post petrolero. Acción Ecológica. Quito, Ecuador.
10. Vives I., Grimalt J., Guitart R. 2001. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. Apuntes de Ciencia y Tecnología. Asociación para el Avance de la Ciencia y la Tecnología en España (AACTE) 3, 45-51.
11. Ortiz P., Varea A. 1995. La explotación petrolera en el Ecuador: historia e impactos socioambientales. Marea negra en la Amazonía: Conflictos socioambientales vinculados a la actividad petrolera en el Ecuador. Abya-Yala. Quito, Ecuador.
12. IARC. 1983. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: Polynuclear aromatic hydrocarbons. International Agency for Research on Cancer Vol 34. Lyon, France.
13. Mastrangelo G., Fadda E., Marzia V. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. Environmental Health Perspectives 104(11), 1166-1170.
14. Nadon L., Siemiatycki J., Dewar R., Krewski D., Gerin M. 1995. Cancer risk due to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. American Journal of Industrial Medicine 28, 303-324.
15. Campbell D., Cox D., Crum J., Foster K., Christie P. 1993. Initial effects of the grounding of the tanker Braer on health in Shetland. British Medical Journal 307(6914), 1251-1255.
16. Maldonado A., Saravia A., Valladares C., Álvarez S., Bonilla M., Maldonado P., Supliguicha V. 2008. Estudio del Impacto de la Actividad Petrolera de Perenco en el Bloque 7 de la Región Amazónica Ecuatoriana. Acción Ecológica. Quito, Ecuador.

17. Singh N., McCoy M., Tice R., Schneider E. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175(1), 184-91.
18. Monroy C., Cortes A., Sicard D., de Restrepo H. 2006. Cytotoxicity and genotoxicity of human cells exposed in vitro to glyphosate. *Bio-medica* 25(3), 335-45.
19. Leroy T., van Hummelen P., Anard D. 1996. Evaluation of three methods for the detection of DNA single-strand breaks in human lymphocytes: alkaline elution, nick translation, and single-cell gel electrophoresis. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 47(5), 409-422.
20. Paz-y-Miño C., Sánchez M.E., Arévalo M., Muñoz M.J., Witte T., Oleas De-la-Carrera G., Leone P. 2007. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genetics and Molecular Biology* 30(2), 456-460.
21. Paz-y-Miño C., Dávalos V., Sánchez M.E., Arévalo M., Leone P. 2002. Should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence based on the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 516 (1-2), 57-61.
22. Paz-y-Miño C., Bustamante G., Dávalos V., Burgos R., Pérez J., Sánchez M.E., Leone P. 2000. Monitoreo citogenético en población ecuatoriana expuesta ocupacionalmente a pesticidas. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas* 25(1), 15-21.

Resistencia a carbapenemes asociada a integrones clase 1 en *Pseudomonas aeruginosa*

María Fernanda Yauri¹, Iliana Alcocer¹, Jeannete Zurita² & Mercedes Rodríguez-Riglos¹

¹Laboratorio de Microbiología, Escuela de Ciencias Biológicas, PUCE,
Quito, Ecuador. iralcocer@puce.edu.ec

²Departamento de Microbiología, Zurita&Zurita Laboratorios, Quito, Ecuador

Recibido: 2010-05-27, aprobado: 2010-08-31.

RESUMEN: *Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo, oportunista de humanos, comúnmente aislado de infecciones nosocomiales. Es difícil de tratar por su inherente resistencia a varios antibióticos y por su rápida adquisición de genes de resistencia. En los últimos años han sido reportados aislados multiresistentes de *P. aeruginosa* con genes que codifican enzimas que confieren resistencia a los carbapenemes: las metalo- β -lactamasas (MBLs). Estos genes, comúnmente, se encuentran localizados en integrones. El objetivo del estudio fue identificar genes que codifican metalo- β -lactamasas (MBLs) y su ubicación en integrones clase 1 en aislados clínicos de *P. aeruginosa*. Se colectaron 129 aislados clínicos en Zurita&Zurita Laboratorios entre enero de 2005 a diciembre de 2008. La detección de genes que codifican MBLs se realizó por PCR, amplificando los genes mayormente diseminados entre bacilos Gram negativos no fermentadores productores de MBLs y encontrados en Latinoamérica: *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} y *bla*_{SPM}. La ubicación de estos genes en integrones clase 1 fue determinada por PCR anidado. De los 129 aislados analizados, 46 aislados fueron resistentes a carbapenemes. De los 46 aislados resistentes 34 (73,9%) presentaron genes que codifican MBLs y el 14,7% estuvieron ubicados en integrones clase 1. Fue evidente la alta prevalencia de genes productores de MBLs en la población estudiada.

PALABRAS CLAVE: Carbapenemes, integrones, metalo- β -lactamasas, multiresistencia, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT.- *Pseudomonas aeruginosa* is a microbial agent, human opportunistic and commonly isolated from nosocomial infections. It is a difficult organism to treat because of its inherent resistance to various antibiotics and rapid acquisition of resistance genes. In recent years, it has been reported multiresistant isolates of *P. aeruginosa* with genes that encode enzymes which confer principally resistance

to carbapenems: metallo- β -lactamases (MBLs). These genes are often located in integrons. Its importance lies in the spread of resistance genes between Gram-negative bacteria. The aim of this study was to identify genes that encode metallo- β -lactamases (MBLs) and their location in class 1 integrons in clinical isolates of *P. aeruginosa*. The 129 clinical isolates were collected in Zurita&Zurita Laboratories between 2006 and 2008. The detection of genes that encode MBLs was performed by PCR, amplifying the genes mostly scattered among non-fermenting Gram negative bacilli that produce MBLs: *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{SPM}. The location of these genes in class 1 integrons was determined by nested PCR. Of the 129 isolates analyzed, 46 were resistant to carbapenems. Of the 46 resistant isolates, 34 (73.9%) had genes encoding MBLs. Only 14.7% were located in class 1 integrons. It was evident the high prevalence of MBLs producing genes in the population studied.

KEYWORDS: Carbapenems, integrons, metallo- β -lactamase, multiresistance, *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN.- *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria aerobia, Gram negativa, no fermentadora ni formadora de esporas, móvil por la presencia de flagelos lofótricos y miembro de la familia Pseudomonadaceae. Es un patógeno oportunista comúnmente asociado a personas inmunocomprometidas que presentan infecciones en pulmones, oído, válvulas cardíacas, tracto urinario, sistema nervioso central, piel y en heridas quirúrgicas. Adquiere especial importancia en pacientes con fibrosis quística (1). El programa Internacional de Control de las Infecciones Nosocomiales (INICC) describe a las infecciones nosocomiales como uno de los mayores problemas sanitarios, siendo de particular importancia las infecciones causadas por bacterias multiresistentes (2). Además, establece que la mayor pre-

valencia mundial de infecciones intrahospitalaria corresponde a América Latina, donde el 11,4% de los aislados obtenidos son de *P. aeruginosa* (3).

Pseudomonas aeruginosa es inherentemente resistente a una amplia variedad de antisépticos y antibióticos como cefalosporinas de primera y segunda generación, tetraciclinas, clo-ranfenicol, macrólidos, novobiocina; dejando como última alternativa de tratamiento al grupo de los carbapenemes (4). Los carbapenemes son los antimicrobianos β -lactámicos en la terapia contra *P. aeruginosa* mayormente empleados. Sin embargo, durante la última década, la aparición de nuevos factores de resistencia ha elevado el número de aislados resistentes a estos antibióticos (5 y 6).

La resistencia en *P. aeruginosa* a los carbapenemes es generada por múltiples mecanismos, tales como: bombas de flujo, mutación de porinas, producción de enzimas que hidrolizan al antibiótico. Este estudio se centró en este último mecanismo: la producción de metalo- β -lactamasas (MBLs; 7). Las MBLs son enzimas bacterianas con una elevada actividad hidrolítica que inactivan a todos los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes), transformando a estos agentes terapéuticos en compuestos inofensivos para las bacterias (8). Las más comunes y ampliamente reportadas MBLs son las tipo VIM e IMP, las cuales exhiben una amplia distribución a nivel mundial con más de 50 variantes alélicas descritas (9 y 10). Los genes que codifican enzimas tipo MBLs son, generalmente, transferidos por determinantes genéticos móviles como son los plásmidos o transposones, los cuales a su vez pueden contener sistemas de recombinación sitio-específica denominados integrones (11). Esto sumado a su frecuente relación con otros genes que confieren resistencia a diversas familias de antibióticos (como aminoglucósidos), convierten a estos aislados en un importante problema terapéutico a nivel hospitalario (12).

Los primeros aislados resistentes a carbapenemes y productores de MBLs fueron registrados en la década de los 80 en Asia y Europa (8). En Latinoamé-

rica no fueron encontradas sino hasta el 2003, siendo descritas por primera vez en Chile y Venezuela (13).

Las MBLs han sido descritas y clasificadas en cuatro tipos clínicamente relevantes: IMP reportada en Japón (14), VIM detectada originalmente en Italia (15); GIM observada en Alemania (16) y SPM descubierta en Sao Paulo, Brasil (17).

Diversos estudios de genes que codifican MBLs demostraron su ubicación como genes "cassette" en integrones clase 1 (18). Los integrones son sistemas formados de dos segmentos conservados y separados por una región variable capaz de insertar y escindir genes en "cassettes" (19). Los genes en "cassette" son elementos móviles extracromosómicos circularizados que no se expresan hasta que son insertos en un integrón. Los integrones son movilizados por transposición en plásmidos y transposones (19).

En el Ecuador no existen datos que demuestren el estudio de la resistencia en Gram negativos no fermentadores. Así, este trabajo contribuye en el conocimiento de la multiresistencia, la presencia de genes relacionados con la resistencia y su relación con integrones clase 1. El objetivo de este estudio fue identificar los genes relacionados con la resistencia a carbapenemes tipo metalo- β -lactamasas y su ubicación en integrones clase 1 en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes

a imipenem y meropenem. Los objetivos específicos fueron: a) Identificar fenotípica y genotípicamente los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* mediante pruebas bioquímicas y moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) por amplificación del gen de la proteína de la membrana externa *oprL*. b) Detectar la presencia de genes productores de metalo- β -lactamasas (MBLs) mediante PCR. c) Determinar la localización de los genes que codifican metalo- β -lactamasas a través de la amplificación de la región variable de integrones clase 1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos

Se analizaron 129 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* recibidas de la colección del Departamento de Microbiología de los laboratorios Zurita & Zurita y tomados de muestras clínicas de pacientes atendidos en diversos centros hospitalarios de Quito. El período de colección de los aislados fue comprendido entre enero de 2005 a diciembre de 2008. La identificación y el perfil de resistencia fueron obtenidos mediante MicroScan (VITEK) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Caracterización fenotípica y genotípica de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa de acuerdo a sus reacciones bioquímicas se

identifica como un bacilo Gram negativo móvil, no fermentador de azúcares, oxidasa positiva, productora de ornitina descarboxilasa, no productora de triptofanasas y sintetizadora de lisina descarboxilasa. Para evidenciar este perfil se realizaron las pruebas bioquímicas estándares: Agar con triple azúcar y hierro (TSI), Motilidad, Indol, Ornitina (MIO), Motilidad, indol, lisina (MILI), óxido fermentación (O-F).

La confirmación molecular de los aislados se realizó mediante la técnica de PCR amplificando el gen que codifica la proteína *oprL* de la membrana externa, empleando los iniciadores y condiciones descritos por Xu *et al.* (20): F 5' ATGGAAATGCTGAAATTCGGC 3' y R 5'CTTCTTCAGCTCGACGCGACG 3'.

El templado fue preparado mediante kit de extracción de ADN genómico (PROMEGA nro. A1120). La reacción se preparó en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 1,25 U de *Taq* polimerasa (PROMEGA nro.M8295) 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 3,5 mM de KCl, 0,1 μ M de cada iniciador y 4 μ l de ADN templado en tampón para PCR 1X. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer). El programa de PCR consistió en 35 ciclos de 96 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por un minuto, seguido de un paso de extensión final de 72 °C por diez minutos.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa (Invitrogen) al 1% a 125 V/cm por 60 min en tampón 44,5 mM tris-HCl, 44,5 mM ácido bórico, 1,5 mM EDTA (TBE). Se empleó como marcador molecular ADN de 100 pb (Invitrogen). Los geles fueron teñidos empleando Syber gold 10.000x en DMSO (Invitrogen). Los productos de amplificación se analizaron en Safe Imager (Invitrogen) por examen visual considerando todas las bandas visibles, independientemente de su intensidad.

Detección de genes que codifican MBLs

La detección de genes productores de MBLs se realizó por PCR. Fueron analizados los dos genes más frecuentemente encontrados entre bacilos Gram negativos no fermentadores y un gen reportado únicamente para Latinoamérica (7 y 10).

Los iniciadores empleados para el gen *blavIM* fueron: F 5' GTTGG TCGCATATCGCAAC 3' y R 5' AATGCGCAGCACCAGGATAG 3' (21); para el gen *blaIMP* los iniciadores empleados fueron F 5' GAAGGYGTT-TATGTTCATAC 3' y R 5' GTAMGTTTCAAGAGTGATGC 3' (10); y para el gen *blasPM* se usaron los iniciadores F 5' CTGCTTGGATTC ATGGGCGC 3' y *blasPM* R 5' CCTTTT CCGCGACCTTGATC 3'

(21). Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Pitaut *et al.* (21).

El templado fue preparado mediante kit de extracción de ADN genómico (PROMEGA No. A1120). La reacción se preparó en un volumen final de 25 µl, conteniendo 1 U de *Taq* polimerasa (PROMEGA No.M8295), 0,16 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,16 mM de cada iniciador y 2 µl de ADN templado en tampón para PCR 1X (PROMEGA). La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer). El programa de PCR consistió de una incubación inicial de 37 °C por 10 minutos, una denaturación inicial de 94 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 54 °C por 31 minutos y un paso de extensión final de 72 °C por 1,5 minutos.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis con las mismas condiciones empleadas para la identificación molecular de *P. aeruginosa*.

Determinación de la localización de los genes que codifican MBLs

El ADN de los aislados que resultaron positivos para la presencia de genes codificantes de MBLs fue empleado en una segunda PCR para determinar la región variable de integrones de clase 1. Los iniciadores empleados son los detallados por Pitout *et al.* (21). Para la reacción en cadena de la polimerasa se

prepararon reacciones de 25 µl conteniendo: 1 U de *Taq* polimerasa (PRO-MEGA nro. M8295), 0,16 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,16 mM de cada iniciador y 2 µl de ADN templado en tampón para PCR 1X.

Los parámetros de amplificación fueron: 95 °C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos, y un período de extensión final de 72 °C por 10 minutos.

Los productos resultantes de la PCR fueron separados a través de electroforesis horizontal en geles de agarosa (Invitrogen 15510-027) al 1%.

Los productos obtenidos de las amplificaciones anteriores fueron usados como templados para la ejecución de la PCR anidada y fueron empleados iniciadores para cada uno de los genes encontrados (*blavIM* y *blaIMP*). Las cantidades y los parámetros de amplificación son los mismos descritos anteriormente.

RESULTADOS

El 100% de los aislados (129) fueron confirmados como *Pseudomonas aeruginosa* mediante análisis molecular del gen que codifica la proteína *oprL* de la membrana externa (Figura 1). La identificación molecular concordó con la identificación fenotípica realizada a través de pruebas bioquímicas.

De los 129 aislados estudiados, 46 mostraron resistencia a carbapenemes. Los datos del origen de los aislados resistentes se encuentran en la Tabla 1.

Los perfiles de resistencia a los carbapenemes evaluados en los 46 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* mostraron un alto porcentaje de resistencia a ambos β-lactámicos empleados (imipenem y meropenem), con 34 aislados resistentes (73,9%); nueve aislados (19,6%) fueron resistentes únicamente a imipenem y tres (6,5%) fueron únicamente para meropenem (Figura 2).

De los 46 aislados resistentes, 34 (73,9%) presentaron uno o dos genes que codificaban MBLs. En los doce aislados restantes (26,1%) no fue detectado ningún gen estudiado. De los 34 aislados portadores de genes que codifican MBLs, 24 (70,6%) presentaron el gen *blavIM*, seis (17,6%) registraron el gen *blaIMP* y cuatro aislados (11,8%) presentaban ambos genes *blavIM* /*blaIMP* (Figura 3). Cinco (14,7%) de los 34 aislados codificantes de MBLs fueron ubicados en la región variable de integrones clase 1 y 29 (84,3%) no lo fueron.

De los 24 aislados que presentaron el gen *blavIM*, cinco (20,8%) fueron ubicados en la región variable de integrones clase 1 (Figura 4). De los seis aislados portadores del gen *blaIMP*, tan solo uno (16,7%), pudo ser situado en la región variable de integrones clase 1 (Figura 5). Finalmente, de los cuatro aislados positivos para ambos genes, dos aislados (50%) fueron ubicados en región variable de integrones clase 1.

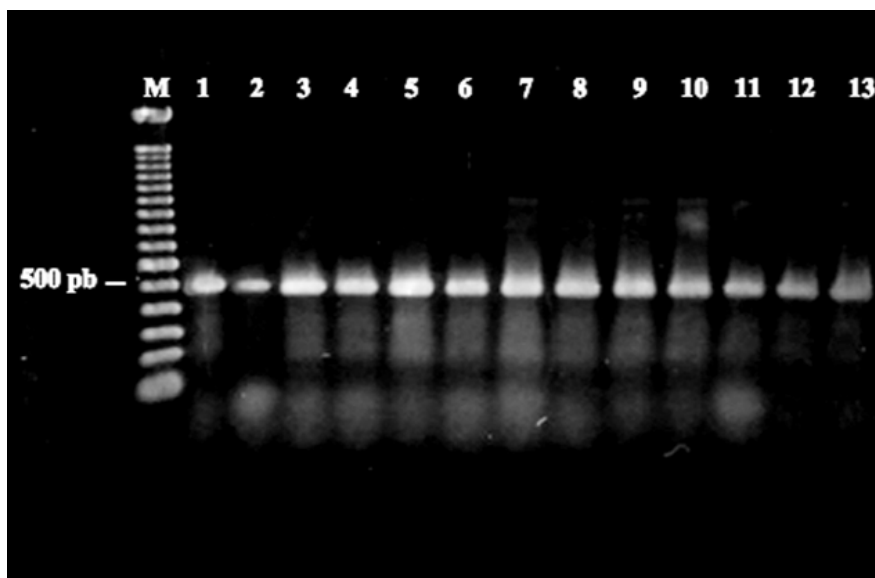


Figura 1. Representación gráfica de la identificación de la proteína de la membrana externa *oprL* para confirmación genotípica de *Pseudomona aeruginosa*. M, marcador de peso molecular 100pb; canaletas 1-13, aislados de *Pseudomonas aeruginosa* confirmados.

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha observado el incremento de genes productores de MBLs asociados a integrones, los cuales a su vez se relacionan con plásmidos y transposones, facilitando su transferencia vertical a una amplia gama de agentes patógenos (11).

El estudio de la presencia de genes que codifican MBLs reveló un alto porcentaje de genes *blaVIM* (70,6%), en los aislados analizados resistentes a carbapenemes. Datos que concuerdan con estudios previos, donde el gen *blaVIM*, especialmente la variante alélica *blaVIM-2*, ha sido identificada de manera predominante en Latinoamérica y varios países alrededor del mundo (7, 9, 12 y 22).

El gen *blaIMP* fue registrado en un menor porcentaje (17,6 %). Anteriormente se ha descrito porcentajes similares de presencia para genes *blaIMP* en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes (8, 21 y 24).

Los aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemes arrojaron un 0,0% de presencia de genes productores de MBLs tipo SPM, resultado que contribuye a su localización endémica al norte de Brasil (17).

Mecanismos como la baja permeabilidad para el ingreso del antibiótico por pérdida de porinas o expulsión del mismo a través de bombas de flujo podrían explicar la resistencia observada en los aislados que no pro-

Tabla 1 Datos de origen de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* analizados en este estudio (Continuación)

Bacteria			Paciente		
Código de Congelación	Código Hospital	Fecha de Aislamiento (años)	Sexo muestra	Edad	Origen de la
13 Ps aer	10	01/07/2005	M	2	Herida
16 Ps aer	4	01/07/2005	M	5	Biopsia
17 Ps aer	7	08/07/2005	F	7	Herida
23 Ps aer	274	09/08/2005	F	16	Herida
28 Ps aer	60	09/09/2005	M	59	Herida
29 Ps aer	237	22/09/2005	F	19	Espuito
40 Ps aer	189	01/10/2005	D	ND	Absceso
45 Ps aer	773	01/10/2005	D	ND	Absceso
48 Ps aer	835	24/10/2005	M	8	Biopsia
57 Ps aer	430	13/12/2005	M	30	Herida quirúrgica
95 Ps aer	714	22/03/2006	F	79	Herida
97 Ps aer	483	15/03/2006	M	6	Hemocultivo
104 Ps aer	1042	31/03/2006	F	34	Secreción traqueal
130 Ps aer	597	19/05/2006	F	40	Secreción traqueal
140 Ps aer	638	22/06/2006	F	31	Secreción traqueal
142 Ps aer	632	22/06/2006	M	56	Líquido peritoneal
150 Ps aer	899	30/06/2006	M	26	Secreción traqueal
167 Ps aer	3532	22/08/2006	F	48	Herida quirúrgica
191 Ps aer	4149	03/10/2006	M	ND	Absceso
228 Ps aer	26	01/12/2006	M	36	Secreción traqueal
235 Ps aer	565	20/06/2007	F	2 meses	Hemocultivo
236 Ps aer	945	28/12/2006	M	27	Secreción traqueal
237 Ps aer	942	28/12/2006	M	72	Secreción traqueal
310 Ps aer	4831	15/11/2007	M	ND	Espuito
319 Ps aer	924	28/11/2007	M	60	Secreción traqueal
326 Ps aer	256	08/12/2007	F	77	Secreción traqueal
330 Ps aer	528	16/12/2007	M	21	Secreción traqueal
332 Ps aer	742	22/12/2007	M	86	Líquido pleural
333 Ps aer	768	23/12/2007	F	80	Secreción traqueal
335 Ps aer	800	24/12/2007	F	61	Herida quirúrgica
345 Ps aer	963	29/12/2007	F	61	Secreción traqueal
346 Ps aer	975	30/12/2007	M	61	Espuito
355 Ps aer	183	06/03/2008	M	ND	Urocultivo
362 Ps aer	595	26/09/2008	F	22	Secreción traqueal
365 Ps aer	466	26/09/2008	F	ND	Espuito
377 Ps aer	332	26/09/2008	M	ND	Secreción traqueal
381 Ps aer	334	30/09/2008	F	ND	Herida
385 Ps aer	467	30/09/2008	M	46	Secreción traqueal
387 Ps aer	531	30/09/2008	M	8	Herida quirúrgica
403 Ps aer	792	30/09/2008	M	77	Secreción traqueal
411 Ps aer	944	30/09/2008	F	ND	Herida quirúrgica
413 Ps aer	153	30/09/2008	M	74	Hemocultivo
429 Ps aer	818	01/10/2008	F	ND	Herida quirúrgica
437 Ps aer	508	02/10/2008	M	ND	Herida quirúrgica
438 Ps aer	170	01/10/2008	M	26	Secreción traqueal
443 Ps aer	3560	01/10/2008	F	75	Espuito

F, femenino; M, masculino; ND, no determinado

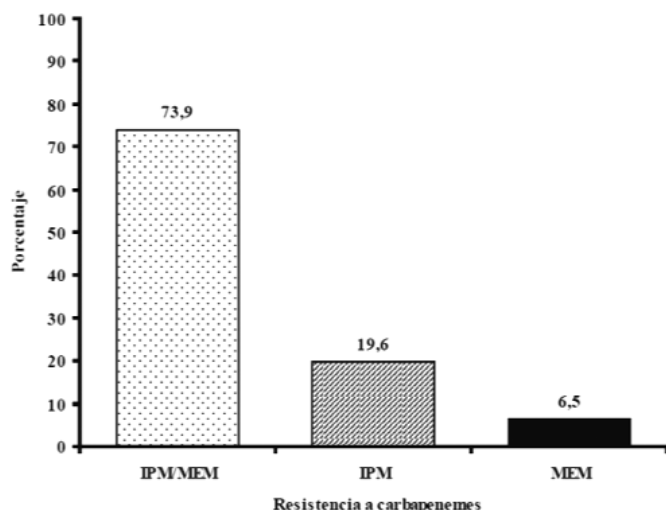


Figura 2. Porcentaje de resistencia a carbapenemes en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

ducían MBLs (7). Estos mecanismos no fueron analizados en el presente trabajo.

En cuanto a la ubicación de los genes que codifican MBLs, el estudio demostró que fueron pocos los aislados de *P. aeruginosa*, alrededor del 14,0%, encontrados como “cassettes” génicos en la región variable de integrones clase 1; a pesar de encontrarse a estos elementos genéticos ampliamente distribuidos entre los bacilos Gram negativos no fermentadores (19,23).

La presencia del “cassette” portador del gen *bla_{VIM}* y *bla_{IMP}* en un integrón no confiere movilidad por sí solo, pero sí pueden encontrarse insertos en elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones. Los integrones al encontrarse asociados a plataformas genéticas móviles incrementan su diseminación y transferencia intra e interespecífica (18).

CONCLUSIONES

Los 129 aislados clínicos fueron confirmados como *Pseudomonas aeruginosa* mediante pruebas bioquímicas.

La identificación genotípica de *Pseudomonas aeruginosa* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue positiva para los 129 aislados.

La mayoría de aislados resistentes a carbapenemes, imipenem y meropenem (73,9%), presentaron genes que codifican metalo- β -lactamasas.

Los genes *bla_{VIM}* y *bla_{IMP}* fueron encontrados en la mayoría de aislados resistentes a carbapenemes en un 70,6% y 17,6%, respectivamente. Un bajo porcentaje de aislados presentaron ambos genes. El gen *bla_{SPM}* no fue encontrado en ningún aislado resistente de origen hospitalario.

Un considerable porcentaje del total de los aislados resistentes a carbapenemes fueron ubicados en integrones clase 1.

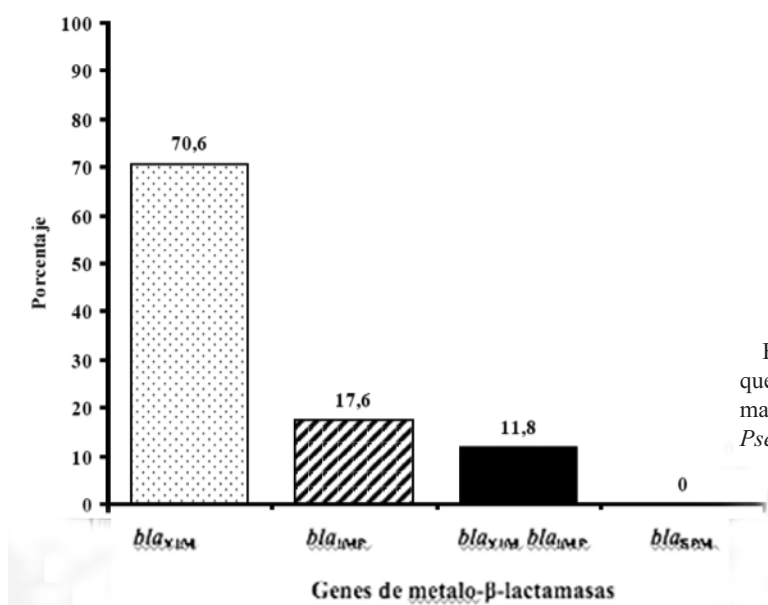


Figura 3. Porcentaje genes que codifican metalo-β-lactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

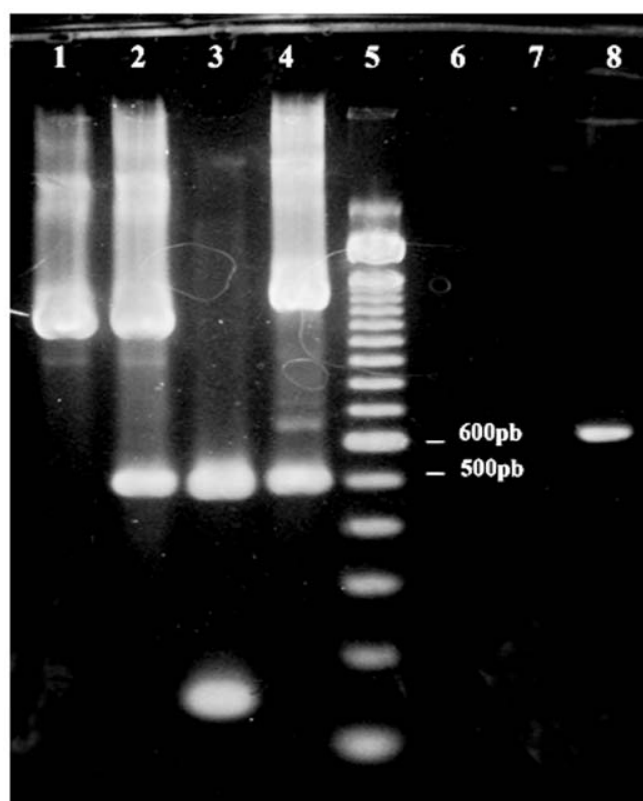


Figura 4. Representación gráfica de electroforesis de los genes *bla_{VIM}* y *bla_{IMP}* de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes. Canaletas 1, integrón; canaleta 2 y 4, integrón y gen *bla_{VIM}*; canaleta 3, gen *bla_{VIM}*; canaleta 5, marcador de peso molecular 100pb; canaletas 6 y 7, control negativo y canaleta 8, gen *bla_{IMP}*

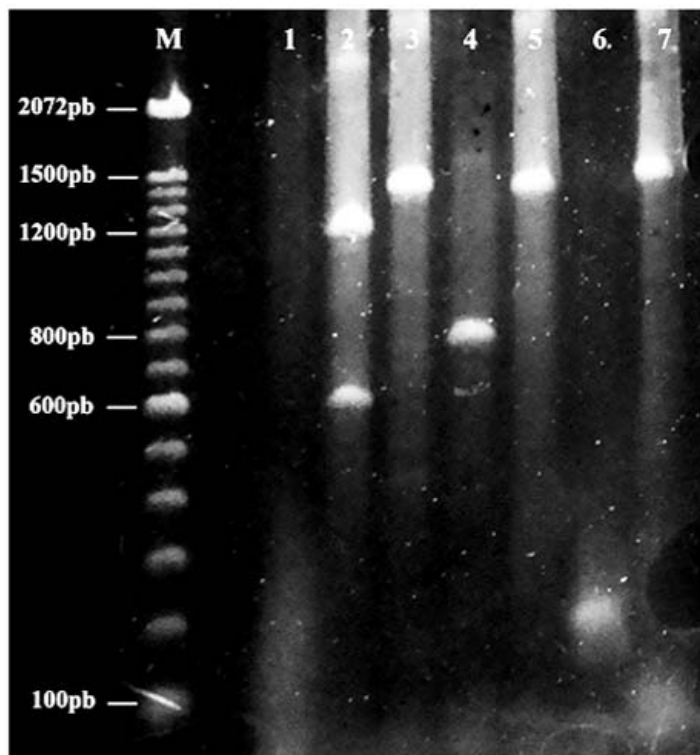


Figura 5. Representación gráfica de eletroforesis del gen *bla*_{IMP} de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes. M, marcador de peso molecular 100pb; canaleta 1, control negativo; canaleta 2, integrón y gen *bla*_{IMP}; canaleta 3, 4 y 5, integrón; canaletas 6 ausencia integrón y canaleta 7 integrón.

LITERATURA CITADA

1. RUIZ, S. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis de Doctorado, Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
2. ROSENTHAL, D.; MAKI DG, L.; MEHTA, A.; ALVAREZ-MORENO, C.; HIGUERA, F.; CUELLAR, L.; MADANI, N. 2008. International Nosocomial
3. CANO, M.; DOMÍNGUEZ, M.; EZPELETA, C.; PADILLA, B.; RAMÍREZ, E.; MARTÍNEZ, L. 2008. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 26: 220-229.

Infection Control Consortium report, data summary for 2002-2007, issued January 2008. *American Journal of Infection Control*. 36: 627-637.

4. RAHAL, J. 2008. The role of carbapenems in initial therapy for serious Gram negative infections. *Bio-Med Central LTD*. 12 (Suppl 4).
5. OLIVER, A. 2009. Impacto de la diseminación de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente productora de metalo- β -lactamasas en los hospitales: presente y futuro. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27: 255-256.
6. PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. 2010. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 34: 235-240.
7. ANDRADE, V. 2005. Emergencia de la resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo- β -lactamasas. *Bioquímica*. 30: 52-58.
8. WALSH, T.; TOLEMAN, M.; POIREL, L.; NORDMANN, P. 2005. Metallo- β -lactamase: the Quiet before the Storm? *Clinical Microbiology Reviews*. 18: 306-325.
9. AUBRON, C.; POIREL, L.; FORTINEAU, N.; NICOLAS, P.; COLLET, L.; NORDMANN, P. 2005. Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the metallo- β -lactamase VIM-2 in a hematology unit of a French hospital. *Microbial Drug Resistance*. 11:254-259.
10. PAGNIEZ, G.; RADICE, M.; CUIROLO, A.; RODRÍGUEZ, O.; RODRÍGUEZ, H.; CAY, C.; FAMIGLIETTI, A.; GUTKIND, G. 2006. Prevalencia de metalo- β -lactamasas a carbapenemes en un hospital Universitario de Buenos Aires. *Revista Argentina de Microbiología*. 38: 33-37.
11. GILLINGS, M.; BOUCHER, Y.; LABBATE, M.; HOLMES, A.; KRISHNAN, S.; HOLLEY, M.; STOKES, W. 2008. The Evolution of class 1 Integrons and the Rise of Antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*. 190: 5095-5100.
12. LOLANS, K.; QUEENAN, A.; BUSH, K.; SAHUD, A.; QUINN, J. 2005. First Nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing an Integron-borne Metallo- β -lactamase (VIM-2) in the United States. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49: 3538-3540.
13. SÁNCHEZ, D.; MARCANO, D.; SPADOLA, E.; LEÓN, L.; PAYARES, D.; UGARTE, C.; SALGADO, N.; GUEVARA, A.; TORRES, S.; RODRÍGUEZ, J.; FLORES, R. 2008. Metaloenzimas tipo VIM detectadas en aislamientos clínicos en *Pseudomonas aeruginosa* en cuatro hospitales en Venezuela. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*. 39 (2).
14. OSANO, E.; ARAKAWA, Y.; PORN, R.; OHTA, M. 2004. Molecular Characterization of an Enterobacterial Metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows Imipenem resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 38: 71-78.

15. LAURETTI, L.; RICCIO, A.; MAZZARIOL, G.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, R.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G. 2000. Cloning and Characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 43: 1584-1590.
16. CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M.; JONES, R.; SCHMID, F.; WALSH, T. 2004. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1} encoding a new subclass of Metallo- β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48: 4654-4661.
17. MAGALHAES, V.; LINS, A.; MAGALHAES, M. 2005. Metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in Hospitals in Recife, PE, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36: 123-125.
18. IYOBE, S.; YAMADA, H.; MINAMI, S. 2006. Insertion of a carbapenemase gene cassette into an integron of a *Pseudomonas aeruginosa* plasmid. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 39: 824-829.
19. XU, Z.; LI, L.; SHIRTLIFF, M.; ALAM, M.; YAMASAKI, S.; SHI, L. 2009. Occurrence and Characteristics of Class 1 and 2 Integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Southern China. *Journal of Clinical Microbiology*. 47: 230-234.
20. XU, J.; MOORE, J.; MURPHY, P.; MILLAR, C.; ELBORN, J. 2006. Early detection of *Pseudomonas aeruginosa* – comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 3: 21-25.
21. PITOUT, J.; GREGSON, D.; POIREL, L. 2005. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing Metallo- β -Lactamases in a large centralized laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 3129 – 3135.
22. SIARKOU, V.; VITTI, D.; PROTONOTARIOU, E.; IKONOMIDIS, A.; SOFIANOU, D. 2009. Molecular epidemiology of Outbreak related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant *bla*_{VIM-17} Metallo- β -lactamase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53: 1325-1330.
23. GOOTZ, T. 2010. The global problem of antibiotic resistance. *Critical Reviews in Immunology*. 30: 79-93.
24. GIBB, A.; TRIBUDDHARAT, R.; MOORE, T.; LOUIE, W.; KRULICKI, D.; LIVERMORE, M.; PALEPOU, F.; WOODFORD, N. 2002. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*_{IMP} allele, *bla*_{IMP-7}. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46: 255-258.

Estandarización de la metodología para el conteo cromosómico en especies del género *Polylepis* en el Ecuador

Quija-Lamina, P.¹, Segovia-Salcedo, C.^{1,2}, Jadán, M.¹ & Proaño K.¹

¹Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ing. en Biotecnología, ESPE, Sangolquí, Ecuador.
pauliquijah@gmail.com

²Universidad de Florida, Departamento de Biología, Florida Museum of Natural History (FLMNH), Gainesville, USA

Recibido: 2010-05-21, aprobado: 2010-08-30

RESUMEN.- El género *Polylepis* incluye 26 especies de árboles y arbustos que habitan desde Venezuela hasta la parte central de Argentina. Los bosques de *Polylepis* constituyen en su mayor parte la vegetación natural de los Andes con una fauna y flora sumamente especializada y de gran importancia ecológica. En las últimas décadas, varios intentos de clarificar su filogenia a través de técnicas moleculares no han tenido éxito. Debido posiblemente a la frecuente hibridización; otras hipótesis se centran en la poliploidía, la cual no ha sido analizada con éxito, debido a la falta de protocolos en el área de citogenética. Esta investigación presenta por primera vez una metodología estandarizada para la visualización y conteo de cromosomas, así como para la obtención de fases celulares en las especies del género *Polylepis*. Se utilizaron meristemos radiculares y botones florales para estandarizar la metodología. Adicionalmente, fueron llevados a cabo estudios del ciclo celular para determinar la hora apropiada de recolección de las muestras. Las placas preparadas permitieron obtener los números cromosómicos de las especies de *Polylepis* presentes en el Ecuador, los cuales revelan por primera vez la presencia de poliploidía dentro del género, proceso muy importante dentro de la diversificación de las especies.

PALABRAS CLAVE: Ciclo celular, conservación, cromosomas, índice mitótico, *Polylepis*

ABSTRACT.- The genus *Polylepis* include 26 species of trees and shrubs distributed from Venezuela to central Argentina. *Polylepis* forests are mostly natural vegetation of the Andes with a highly specialized fauna and flora and they have great ecological importance. In recent decades, several attempts to clarify their phyloge-

ny through molecular techniques have not been successful. One of the possible reasons could be the frequent hybridization, other hypotheses focus on the presence of polyploidy, phenomenon that has not been tested with success, due to lack of protocols for conducting cytogenetic studies. This research has developed for the first time a standardized methodology for visualization and chromosome counting of genus *Polylepis* as well as data about the cellular phases. Root tips and flower buds were used to standardize the methodology. Additionally cell cycle studies were carried out to determine the proper time of collection of samples. The plates prepared allowed to obtain the chromosome numbers of *Polylepis* species present in Ecuador, which revealed for the first time, the presence of polyploidism in this genus, a very important condition in the diversification of the species.

KEYWORDS: Cell cycle, conservation, chromosomes, mitotic index, *Polylepis*

INTRODUCCIÓN.- El género *Polylepis* incluye 26 especies de árboles y arbustos que habitan desde los Andes Venezolanos hasta la parte central de Argentina (1). En el Ecuador encontramos ocho especies que pertenecen a los diferentes complejos evolutivos desde el grupo basal *Sericea* hasta el más derivado: el complejo *Incana* (2). Los bosques de *Polylepis* forman parte de la vegetación natural de los Andes con una fauna sumamente especializada. Sin embargo, la distribución actual de éstos ha sido disminuida de manera alarmante por procesos antropogénicos como agricultura, pastoreo, tala, quema e introducción de especies exóticas (2).

En las últimas décadas varios intentos de aclarar su filogenia a través de técnicas moleculares se han visto truncados por la falta de resolución en los análisis

a nivel de especies (3). Una de las posibles razones de esta falta de claridad evolutiva se puede centrar en la frecuente hibridización entre las especies de este género, por razones naturales (polen que puede viajar largas distancias) y por reubicación de poblaciones debido a actividades humanas (reforestación no tecnificada; 4, 5, 6). Otras hipótesis se enfocan en la existencia de poliplodía en el género, la cual no ha podido ser analizada con éxito (7).

Los estudios cromosómicos son una herramienta importante y básica para el análisis intra e inter-poblacional, evolutivo y sistemático, permitiendo diferenciar especies morfológicamente similares o con un estatus taxonómico incierto. Los conteos cromosómicos mitóticos y meióticos son usados comúnmente para determinar hibridización, relaciones entre especies, análisis de cario-

tipos y translocaciones (8), además constituyen la vía más directa para establecer niveles de ploidía (9, 10).

De igual manera, el análisis del ciclo celular presenta varias aplicaciones como eliminar el factor del azar y utilizar criterios objetivos para la toma de las muestras vegetales y esclarecer las causas que determinan el rol de la poliploidía (11, 12). Además, permite determinar la mejor hora del día para la prefijación, en función del número de células en división y de los componentes del índice mitótico (11). Estos datos constituyen las herramientas principales para aumentar la efectividad de los métodos químicos y físicos para la visualización de cromosomas en especies vegetales (13).

En el caso del género *Polylepis*, los estudios cromosómicos son relevantes para aclarar las hipótesis sobre poliploidía, así como supuestos de hibridación y apomixis (3). Sin embargo, dichos estudios no se han podido realizar debido a la falta de una metodología estandarizada que permita la visualización de cromosomas metafásicos.

Simpson (16) menciona, en su estudio sistemático, que los ensayos no dieron resultados específicos, y Kessler (15) observó números cromosómicos de 80 en muestras de raíces meristemáticas en tres especies de *Polylepis*, pero el conteo exacto no fue posible debido al tamaño reducido de los cromosomas que fácilmente se pueden confundir con

partículas del colorante y suciedades (3). Posteriormente, Schmidt-Lebuhn et al., aseguran que debido al tamaño de los cromosomas y a la dificultad de determinar metafases en este género, es virtualmente imposible obtener conteos cromosómicos (14).

La presente investigación presenta una metodología estandarizada que permite la visualización de fases celulares y cromosomas metafásicos en las especies del género *Polylepis*, presentes en el Ecuador. Método que nos permitirá obtener por primera vez los números cromosómicos para el género *Polylepis*, datos sumamente importantes y básicos para aclarar las hipótesis sobre su origen y evolución.

Además, los estudios del ciclo celular en *P. pauta* y *P. incana* permitirán realizar análisis genéticos comparativos para la determinación de mecanismos citológicos como la duplicación somática y la no reducción de los gametos que inducen poliploidía en plantas (17).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de meristemo radicular y botón floral de las especies del género *Polylepis* fueron obtenidas para estandarizar la metodología para la obtención de cromosomas metafásicos, así como células en diferentes fases del ciclo celular. Diferentes variaciones en los procesos de pretratamiento, fijación, hidrólisis, tinción y preparación de placas, en base a las características

de los cromosomas observados en ensayos previos fueron utilizadas para la estandarización de la metodología.

Recolección de las muestras vegetales

Se utilizaron muestras de meristemos radiculares (1-2 cm de longitud) y ovarios de botones florales de las especies de género *Polylepis* las cuales fueron colectadas durante los meses de junio y julio del 2008, en diferentes localidades de los páramos ecuatorianos.

Se tomaron datos de localización geográfica, localidad, especie y tipo de muestras de cada una de las poblaciones. Se colectaron plántulas de 5–10 cm y muestras de botones florales (Tabla 1). Las plántulas fueron transportadas con

técnica del Ejército, en donde fueron transferidas a macetas con un sustrato apropiado para su enraizamiento con la finalidad de obtener muestras de meristemo radicular en forma regular y en cantidades adecuadas para la estandarización de la metodología.

Los botones florales encontrados fueron pretratados en el sitio de colección y transportados en un contenedor que permitía mantenerlos a temperaturas bajas. En el laboratorio, después del proceso de fijación y lavado, las muestras se almacenaron a -20 °C en etanol al 70% hasta su posterior uso.

Estudio del ciclo celular

Los estudios del ciclo celular fueron realizados en muestras de meristemo radicular en dos especies del género

Tabla 1. Muestras de las especies del género *Polylepis* con sus detalles de localidad, puntos de localización geográfica (GPS) y tipo de muestra colectada.

Especie	Localidad	Puntos GPS	Muestra
<i>P. incana</i>	Illinizas	S 00 °12' 8.56"W 68 °40' 24.65"	Plántulas, Botón floral
	Papallacta	S 00 °19' 01.0" W 78 °13' 28.6"	Plántulas, Botón floral
	El Ángel, Potrerillos	N 00 °48' 31.6" W 77 °58' 31.9"	Plántulas
	Mojanda	N 00 °08' 18.9" W 78 °5' 17.4"	Plántulas, Botón floral
<i>P. pauta</i>	Papallacta	S 00 °20' 41.5" W 78 °12' 2.0"	Plántulas, Botón floral
	Mojanda	N 00 °08' 07.4" W 78 °15' 22.5"	Plántulas, Botón floral

bloques de tierra hasta los invernaderos del laboratorio de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela Poli-

Polylepis: *P. pauta* de la localidad de Papallacta, Páramo de Guamaní y *P. incana* de los Illinizas. El cálculo del

tamaño la muestra “n” o número de células en mitosis a analizar por cada hora de colección, fue determinado mediante la fórmula del tamaño muestral para la estimación de la proporción poblacional (18).

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 S^2}{E^2}$$

Donde la expresión $Z_{\alpha/2}^2$ corresponde al percentil de la ley normal estándar cuyo valor es de 1.96 para un 95% de confianza en el estudio, S^2 es la varianza de la proporción, su valor es de 0,25, ya que la varianza se maximiza con una proporción poblacional estimada de 0,5, debido a la ausencia de estudios previos en el género y E^2 es el error máximo permitido del 5%.

Para calcular el tamaño muestral total a analizar que incluye células en interfase, se realizó una prueba piloto en *P. incana* con un total de 3.751 células de las cuales 1.332 eran mitóticas, esto nos indica que por cada 2,82 células una se encuentra en mitosis. En consecuencia, se debe multiplicar 2,82 por el tamaño muestral mitótico (385), determinado mediante la ecuación para obtener el número de células totales que se deben contabilizar por cada hora de colección para obtener resultados con el 95% de confianza, el resultado es de 1.085 células. Los datos tomados de la prueba piloto demuestran que se puede encontrar en promedio 6,76 células en

mitosis por cada imagen proyectada, por lo que para lograr obtener las 385 células mitóticas y por ende las 1.085 células totales, 60 imágenes diferentes fueron analizadas.

Preparación de las placas. Para el estudio del ciclo celular se colectaron de tres a cuatro raíces meristemáticas de 1 a 2 cm de longitud directamente en el fijador Carnoy (etanol:ácido acético 1:3; 19), cada 30 minutos, desde las 7:30h hasta las 18:00 h. Después de hidrolizar con HCl (ácido clorhídrico) 1N durante 25 minutos a 60 °C y teñir con aceto-carmín al 1% durante al menos tres horas a temperatura ambiente, se prepararon las placas para su observación.

Recopilación de datos. Fueron preparadas al menos tres placas, para examinar un total de 60 imágenes (20 por cada placa). Se anotaron las frecuencias de interfases, profases, metafases, anafases y telofases encontradas en cada imagen y se capturaron aquellas donde se observaron las mejores células en cada fase. Las microfotografías fueron tomadas con una cámara fotográfica digital de 20 MPX adaptada al microscopio invertido marca LOMO con un aumento de 1.040 X.

Análisis de los datos. Los cálculos del índice mitótico (IM) y los índices de fases (IF), parciales y totales se llevaron

a cabo mediante las ecuaciones utilizadas por Matos & Molina (1997) (22) en trabajos realizados con *Aloe vera*.

$$IM = \frac{\text{No. células en mitosis}}{\text{No. células totales}} \times 100$$

$$IF = \frac{\text{No. células en fase}}{\text{No. total de células en mitosis}} \times 100$$

Pretratamiento

Meristemo radicular. Una vez conocida la o las horas apropiadas para la recolección de las muestras, se colectaron meristemos radiculares limpios de 1 - 2 cm de longitud en microtubos que contenían los diferentes agentes antimitóticos, permitiéndonos variar tanto la concentración, como la temperatura y el tiempo de aplicación para la estandarización del proceso (Tabla 2).

También fueron probadas temperaturas bajas durante 4 horas antes de usar los agentes químicos.

Botones florales. Las muestras fueron pretratadas a diferentes horas del día en los sitios de colección en 8 hidroxiquinolina 2mM y agua helada durante 24 horas a 4 °C (20, 19), razón por la cual no se determinó la hora de colección.

Fijación

Meristemo radicular. Se usaron diferentes soluciones de fijación: ácido acético, etanol (1:3; 26) ácido acético, cloroformo, etanol (1:3:6; 19) y metanol, ácido propiónico, cloroformo (6:3:2; 21). Los meristemos radiculares después de varios lavados con agua

Tabla 2. Agentes inhibidores de la mitosis, con sus detalles de variación en la concentración, tiempo y temperatura utilizados para estandarizar el proceso de pretratamiento en muestras de meristemo radicular.

Agente	Tratamiento		
	Concentración	Periodo	Temperatura
Agua helada		24 horas	4 °C
		48 horas	0 °C
		4 horas	
		3 horas	4 °C
		4 horas	RT*
8-hidroxiquinolina 2mM		5 horas	
		24 horas	
		1 hora RT más 24 h a 4 °C	
	Colchicina	0,2 %	1 hora
		0,5 %	2 horas
			3 horas

*RT, Temperatura ambiente (16 – 18 °C).

destilada fueron fijadas en dichas soluciones ensayándose diferentes tiempos: 4, 21, 22, 23, 24 y 48 horas, a diferentes temperaturas: 4 °C y a temperatura ambiente. En caso de no usarlas inmediatamente, luego de la fijación se repiten los lavados y se preservan en alcohol al 70% a -20 °C, hasta su posterior uso.

Botones florales. Las muestras pretratadas en el lugar de colección, fueron fijadas en una solución de etanol, ácido acético (3:1; 19) durante 24, 48 y 72 horas a 4°C. Posteriormente fueron lavadas para ser preservadas en etanol al 70% a -20 °C, hasta su posterior uso.

Hidrólisis

Meristemo radicular. Después de lavar la muestra se utilizó una hidrólisis con HCl 1N a 60 °C (11), ensayando diferentes tiempos (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 60 minutos).

Botones florales. Fueron retirados del etanol al 70% y disectados para obtener los ovarios y estambres (Figura 1), los cuales fueron lavados para someterlos al proceso de hidrólisis en HCl 1N a 60 °C (11), ensayando diferentes tiempos (5, 10, 15, 20 y 25 minutos).

Tinción y preparación de placas. Fueron probados diferentes colorantes: aceto-carmín/orceína 1%, aceto-carmín/orceína 2%, propiónico car-

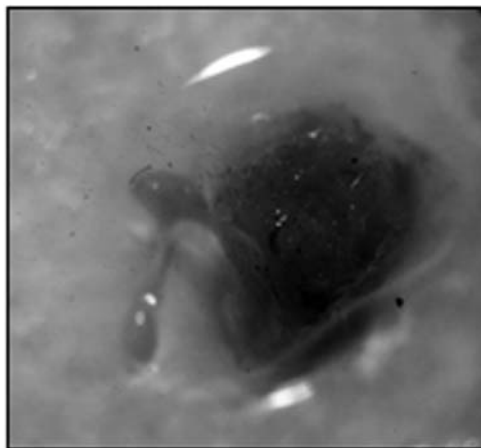


Figura 1. Botón floral de *P. incana* disectado para obtener el ovario y los estambres (2.5X).

mín/orceína 1%, lacto-propiónico orceína 2% (26, 27) y Reagent Shiff (10). Después de hidrolizar y lavar la muestra, se colocó el colorante en el microtubo, durante diferentes periodos de tiempo: 1, 2, 3 y 24 horas, a temperatura ambiente y 60 °C. Una vez teñidas las muestras, se prepararon las placas con la técnica convencional del aplastado o *squash* (11).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio del ciclo celular. El estudio microscópico de las células mitóticas e interfásicas en meristemos radicales permitió conocer cuantitativamente el proceso de división mitótica en las dos especies del género *Polylepis*: *P. incana* y *P. pauta* cuyos resultados y análisis son presentados por primera vez para estas especies.

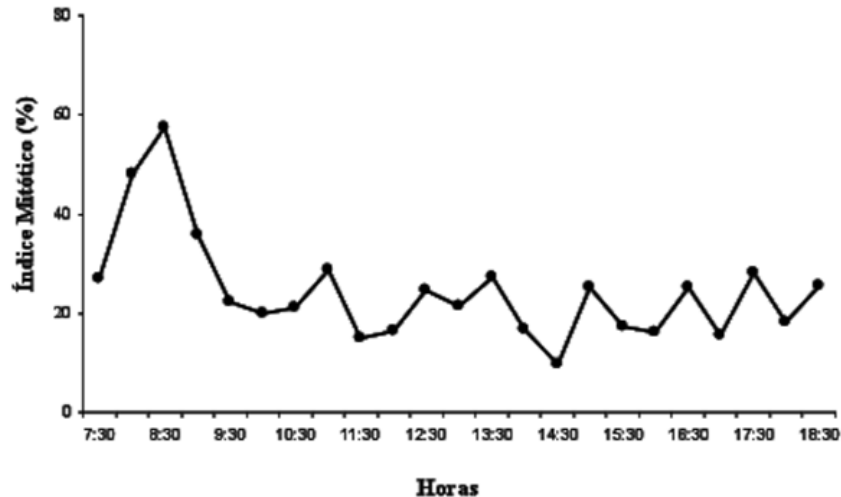


Figura 2. Secuencia del ciclo celular en *P. incana* de los Illinizas en un periodo de recolección de 12 horas

La determinación del ciclo celular y de la hora mitótica constituyen las herramientas principales para aumentar la efectividad de los métodos químicos y físicos usados en la preparación y visualización de los cromosomas en especies vegetales, así como la eliminación del azar, utilizando criterios objetivos para la toma de las muestras. De igual manera permiten determinar la presencia de poliploidía como un proceso de diversificación de las especies propias de zonas montañosas (13, 11). La información obtenida en esta investigación en relación al ciclo celular ofrece la oportunidad de investigar procesos de poliploidía en este género, no solamente en las especies ecuatorianas si no a nivel regional.

Para la estimación del ciclo mitótico en las dos especies del género *Polylepis*, *P. incana* y *P. pauta*, fueron

analizadas un total de 55 200 células, discriminadas en células en interfase y células en mitosis. En base a la evaluación de un período de 12 horas de los índices de fase (IF) e índice mitótico (IM) parciales y totales, se estableció que la mejor hora para la prefijación de las muestras de meristemo radicular en *P. incana*, está comprendida entre las 08:00h y 08:30h (IM=57,50 %). Durante las demás horas los IM fueron bajos, fluctuando entre el 9 % (14H30) y 28 % (11H00) de la población celular (Figura 2). Es posible observar que el porcentaje de profases ocupa la mayor parte de la población celular en división, especialmente entre las 08:00h y 08:30h. Durante las otras horas, las fases restantes (metafases, anafases y telofases) se presentan en pequeña proporción, en forma irregular (Figura 3).

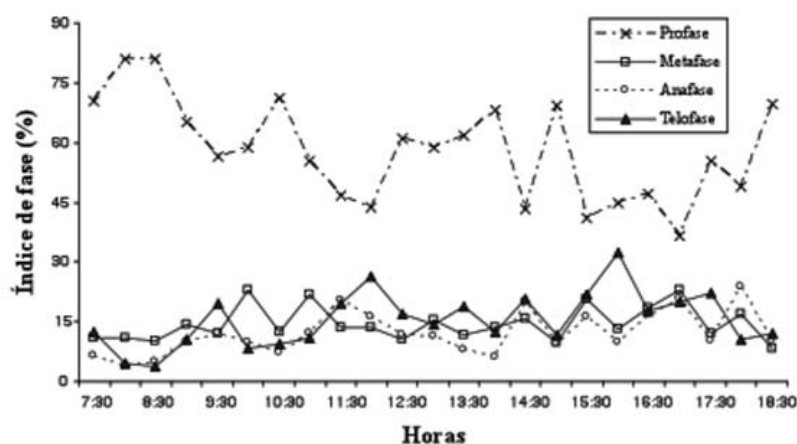


Figura 3. Secuencia de los índices de fase en *P. incana* de los Illinizas en un periodo de recolección de 12 horas.

La mejor hora para la prefijación de las muestras de meristemo radicular en *P. pauta*, está comprendida entre las 8:00h y 9:30h (IM = 43,08 – 49,00 %), observando un pico mayor a las 8:30h (IM = 53,92%). Durante las demás horas los IM fueron bajos, fluctuando entre el 14 % (17:00 h) y 37 % (10:00 h) (Figura 4).

De igual manera, es posible observar que el porcentaje de profases ocupa la mayor parte de la población celular en división, especialmente entre las 08:00h y 10:00h. Durante las demás horas, se nota una acumulación leve de telofases. Las fases restantes (metafases y anafases) se presentan en pequeña proporción, en forma irregular (Figura 5).

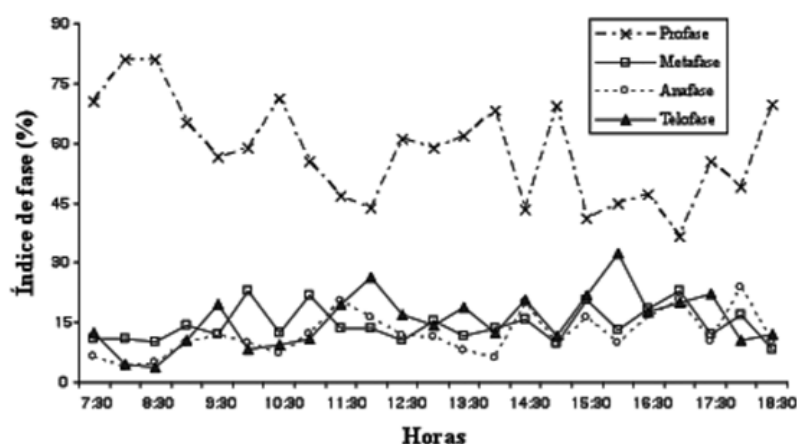


Figura 4. Secuencia del ciclo celular en *P. pauta* del Páramo de Guamaní - Papallacta, en un periodo de recolección de 12 horas.

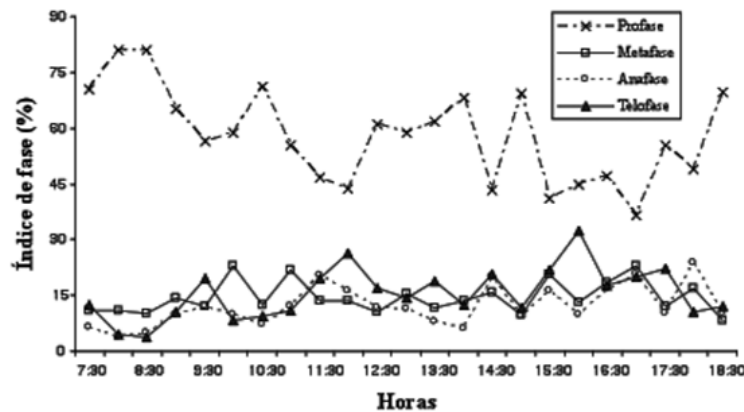


Figura 5 Secuencia de los índices de fase en *P. pauta* del Páramo de Guamaní-Papallacta, en un periodo de recolección de 12 horas.

Las horas de colección obtenidas para las dos especies son consistentes con otras investigaciones donde el mayor número de células en mitosis se observan en las primeras horas de la mañana hasta aproximadamente las 11:00h. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que el momento del día en el cual las células se multiplican con mayor rapidez varía de una especie a otra (22).

La curva de la Figura 2 nos permite asumir un valor medio de 2 horas para un ciclo de división celular completo en *P. incana*, por lo que la duración del ciclo mitótico en base a la evaluación de los índices de fase (IF) e índices mitóticos (IM) totales es de 29 minutos, de los cuales 18 minutos son ocupados por la profase; cuatro minutos por la metafase, tres minutos por la anafase y cuatro minutos por la telofase. En *P. pauta* la Figura 4 nos permite asumir un valor medio de tres horas para un ciclo

de división celular completo, por lo que la duración del ciclo mitótico en base a la evaluación de los IF e IM totales, es de 53 minutos, de los cuales 35 minutos son ocupados por la profase; seis minutos por la metafase, cuatro minutos por la anafase y siete minutos por la telofase. En las Figuras 6 y 7 se muestran fotografías de fases mitóticas observadas en las especies evaluadas.

Se destaca un mayor tiempo para las células en interfase, aunque una vez iniciada la actividad mitótica, las células permanecen más tiempo en profase, la anafase dura un lapso más corto, lo que concuerda con Raven, Evert & Curtis (1976) (23) quienes señalan que las fases de la mitosis son variables en longitud siendo la profase la más larga y la anafase la más corta. En este sentido, las frecuencias de las fases mitóticas permanecen dentro de los rangos normales reportados (23, 24).

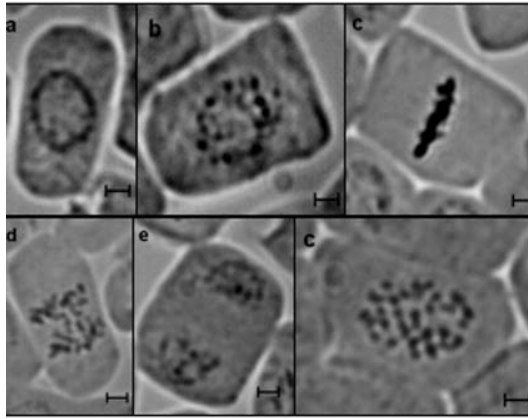


Figura 6. Algunas de las fases mitóticas observadas en *P. incana* de los Illinizas. (a) Interfase, (b) Profase, (c) Metafase, (d) Anafase, (e) Telofase. Barra representa 5 µm.

La variación presentada tanto en la hora de colección como en la duración del ciclo mitótico y sus distintas fases en *P. incana* y *P. pauta*, se debe posiblemente a la propiedades celulares de cada especie y a su distinta reacción ante la acción de factores ambientales (11), probablemente se obtendrán resultados diferentes en las mismas especies bajo diferentes condiciones.

En las dos especies se registra cierta irregularidad en el curso del ciclo celular, caracterizado por un mayor porcentaje de profases dentro de la población celular en división y a una acumulación de telofases en *P. pauta*, indicándonos la presencia ciclos irregulares. La alternancia de interfases normales con mitosis irregulares en otras especies analizadas como oca y olluco, constituyen uno de los probables mecanismos de poliploidización (11).

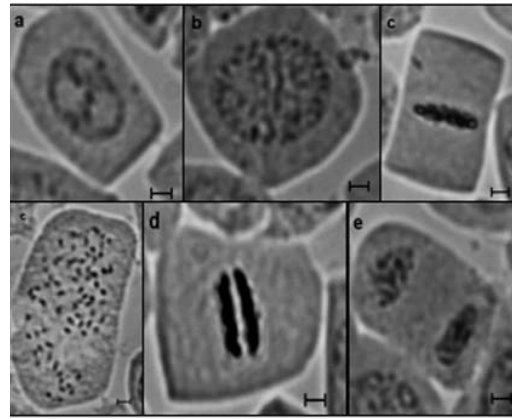


Figura 7. Algunas de las fases mitóticas observadas en *P. pauta* del Páramo de Guamaní. (a) Interfase, (b) Profase, (c) Metafase, (d) Anafase y (e) Telofase. Barra representa 5 µm

Estandarización de la metodología. La metodología que se logró estandarizar para el conteo cromosómico utilizando muestras de meristemo radicular y botón floral, para las especies del género *Polylepis*, no se basó en un protocolo específico, sino sobre la base de las características de los cromosomas descritos por Kessler (1995) (28) en tres especies de *Polylepis*: *P. neglecta*, *P. triacontandra*, *P. tarapacana*, quien observó numerosos cromosomas ($2n = 82$) de tamaños sumamente pequeños, los que se confundían con las partículas de colorante (3).

Pretratamiento de las muestras. Otro factor crítico, a más de la determinación de la hora de colección apropiada, para mejorar los resultados del proceso de pretratamiento, es el tipo de agente inhibidor de la mitosis que se utiliza (25).

En los pretratamientos con agentes químicos no se obtuvo buena condensación y dispersión de los cromosomas como se observó al utilizar temperaturas bajas positivas de 4 °C (Figura 8). La utilización de frío o calor, previo al tratamiento con sustancias químicas, ayuda a desestabilizar los microtúbulos. Además, el tratamiento previo de meristemos radiculares con frío induce la acumulación de células en metafase (26) condición deseable para la realización de pretratamientos con agentes químicos. Sin embargo, en este caso la utilización de frío no ayudó a mejorar la acción de la 8-hidroxiquinolina. Por lo que se sugiere utilizar como pretratamiento, agua destilada a 4 °C durante 24 horas, la cual se recomienda cuando las especies a estudiar poseen numerosos cromosomas (19), como es el caso del género *Polylepis*.



Figura 8. Cromosomas metafásicos en muestras de meristemo radicular de *P. microphylla* de la localidad de Achupallas. Barra representa 5 μm.

Se deben usar períodos de al menos 24 horas y no más de 26 horas en agua destilada a 4 °C, ya que la longitud de los cromosomas se acorta considerablemente (19) y las células se destruyen. Los períodos cortos (cuatro horas) tampoco arrojan buenos resultados, no se observa destrucción celular pero tampoco cromosomas claros e individuales. Con la utilización de la temperatura de congelación, se destruyen las células y sus componentes. Para las muestra de botones florales funcionan bien los pretratamientos utilizados en meristemo radicular.

Fijación de las muestras. Las tres mezclas de fijación, ensayadas durante 24 horas a 4 °C proporcionaron buenos resultados en la interrupción de los procesos vitales de la célula sin dañar su estructura (4). Se prefirió usar Carnoy (ácido acético:etanol 1:3; 19) ya que las otras mezclas contenían cloroformo, el cual es un químico nocivo para la salud y el medio ambiente.

Hidrólisis de las muestras. El proceso de hidrólisis con HCl 1N a 60 °C fue estandarizado para las muestras de meristemo radicular, ovario y estambre, obteniéndose diferentes períodos de tiempo, los cuales dependen de la naturaleza del tejido (20). En las muestras de ovario y estambre se obtuvo una buena separación de las células sin destrucción de las mismas con cinco y diez

minutos respectivamente, tiempo menor al utilizado con raíces meristemas radiculares (25–30 minutos), debido probablemente a que tanto el tejido del ovario como el del estambre son blandos y están protegidos por las otras estructuras florales externas a diferencia de la raíz que está expuesta directamente al suelo.

Tinción de las muestras. La superposición, la pobre coloración y el tamaño extremadamente pequeño de los cromosomas son factores que han limitado los estudios citogenéticos (27). Sin embargo, el uso de aceto-carmín o aceto-orceína ha facilitado la obtención de buenos resultados (28) en las especies donde se han observado dichos factores como es el caso de las del género *Polylepis* (3). En el presente estudio, de todos los colorantes probados, sólo el uso del aceto-carmín al 1% permitió obtener una tinción adecuada de los cromosomas, fases celulares y citoplasmas claros en las muestras de meristemo radicular y ovario.

La partículas del colorante que pueden confundirse con los cromosomas han impedido también obtener conteos exactos en ensayos anteriores en algunas especies de *Polylepis* (15, 16), ésta dificultad fue superada usando el colorante en baja concentración (1%) y filtrándolo, cada vez antes de utilizarlo, aunque esto impli-

caba un mayor tiempo de tinción, el cual se reduce calentando las muestras en el colorante. Cabe recalcar que concentraciones mayores del colorante destruyen el tejido. Una vez teñidas las muestras pueden permanecer en el colorante, debido a que el ácido acético del mismo actúa también como fijador (20), pero se deben evitar dejarlas durante largos periodos de tiempo ya que las partículas del colorante tienden a sedimentar acumulándose en el tejido. Se recomienda mantener las muestras en refrigeración para evitar la proliferación de bacterias.

Números Cromosómicos. Los cromosomas son reconocidos por su importancia en los estudios taxonómicos y evolutivos. El número cromosómico, teniendo en cuenta dos variables: el número básico y el nivel de ploidía, constituyen datos relevantes para la resolución de problemas taxonómicos y la comprensión de las tendencias evolutivas (29, 11). A pesar de esta importancia, los estudios cromosómicos completos en las especies del género *Polylepis* no han sido realizados, se han intentado conteos cromosómicos desde 1979 sin resultados específicos (3).

En el presente trabajo, se presentan por primera vez los números cromosómicos ($2n$) de la especie del Género *Polylepis* presentes en el Ecuador (Tabla 3), iniciando de esta manera el

Tabla 3. Números cromosómicos somáticos de las especies del género *Polylepis* con detalles de muestra utilizada, localidad y número de células metafísicas analizadas.

<i>Especie</i>	<i>Muestra</i>	<i>Localidad</i>	<i>No células</i>	<i>No. Cromosomas</i>	<i>2n</i>
<i>P. incana</i>	Meristemo radicular	El Ángel	2	38(1), 40(1)	38-40
		Illinizas	23	38(11), 39(5), 40(4), 41(1), 42(2)	38-42
		Papallacta	25	39(2), 40(7), 41(9), 42(7)	39-42
	Ovario	Papallacta	15	40(7), 41(3), 42(5)	40-42
<i>P. pauta</i>	Meristemo	Papallacta	1	71(1)	71
	Radicular	Papallacta	25	67(9), 68(2), 72(2) 73(2), 74(1) 75(1), 76(3), 77(1), 78(1), 80(1), 81(1), 83(1)	67 - 83
	Ovario	Papallacta	25	67(9), 68(2), 72(2) 73(2), 74(1) 75(1), 76(3), 77(1), 78(1), 80(1), 81(1), 83(1)	67 - 83
		Mojanda	12	70(6), 71(1), 72(1), 73(1), 75(1), 78(1), 84(1)	70 - 84
<i>P. sericea</i>	Ovario	El Ángel	8	37(5), 39(2), 40(1)	37 - 40
		Fierrouroco	25	39(10), 40(6), 41(7), 42(2)	39 - 42
		Yanacocha	9	59(2), 64(1), 66(1), 10(1), 71(1), 74(1), 76(1), 77(1)	59 - 77
<i>P. microphylla</i>	Meristemo radicular	Achupallas	25	70(3), 71(1), 72(1), 73(2), 74(4), 75(2), 76(1), 77(5), 78(2), 79(2), 82(2)	70 - 82
<i>P. weberbauri</i>	Meristemo Radicular	Zhud	10	37(9), 42(1)	37 - 42
	Ovario	Zhud	16	37(7), 38(1), 39(4), 40(2), 41(1), 42(1)	37- 42
<i>P. lanuginosa</i>	Meristemo radicular	Zhud	25 42(5)	38(2), 39(8), 40(5), 41(5),	38 - 42
<i>P. reticulata</i>	Meristemo radicular	Oyacachi	15	87(2), 94(1), 96(1), 104(3), 108(2), 109(2), 111(1), 114(1), 118(2)	87 - 118
	Ovario	Soldados	11	36(5), 38(1), 39(1), 40(2), 41(1), 42(1)	36 - 42
<i>P. racemosa</i>	Meristemo Radicular	Oyacachi	25	69(9), 70(4), 71(3), 72(2), 74(3), 76(2), 78(1), 80(1)	69 - 80
	Ovario	Oyacachi	2	72(1), 77(1)	72 - 77

conocimiento cromosómico de este género y contribuyendo a su delimitación taxonómica. La variación presentada en los números cromosómicos dentro de las especies y entre poblaciones de la misma especie nos confirma, por primera vez, la presencia de poliploidía en el género en poblaciones naturales, lo cual estaría indicando la importancia de los cambios cromosómicos numéricos en la diversificación de las especies de este género, posiblemente debido a causas, entre ellas medioambientales, que aún no están muy claras.

Teniendo esta diversidad de números cromosómicos y niveles de ploidía, es obvio que tanto la aneuploidía como la poliploidía han jugado un rol importante en la evolución del género *Polylepis*, así como en otros, lo cual lo convierte también en un género atractivo para el análisis de dichos eventos (25). En el futuro, sería interesante estudiar los cromosomas de un mayor número de poblaciones, establecer las relaciones entre los niveles de ploidía y su localización geográfica, hábitat, etc. Además, sugerir modelos evolutivos para las especies de este género cuyo rol ecológico es fundamental para el ecosistema en donde habita. En la Figura 8 se presenta una fotografía de cromosomas metafísicos de *P. microphylla*, resultado de la utilización de la metodología antes descrita.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se realizó gracias al apoyo económico del Proyecto Páramo Andino, Tropical Development and Conservation Program y la Escuela Politécnica del Ejército con su programa de iniciación científica ESPE 2008.

BIBLIOGRAFIA

1. KESSLER, M., & SCHMIDT-LEBUHN, A. 2006. Taxonomical and distributional notes on *Polylepis* (Rosaceae). *Diversity and Evolution*, 6, 67-69.
1. JAMESON, S., & RAMSAY, P. 2007. Changes in high-altitude *Polylepis* forest cover and quality in the Vilcanota Cordillera, Peru 1956-2005. *Biological Conservation*, 138, 38-46.
2. SCHMIDT-LEBUHN, A., KESSLER, M., & KUMAR, M. 2006. Promiscuity in the Andes: Species Relationships in *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae) Based on AFLP and Morphology. *Systematic Botany*, 31, 547-559.
3. SELTMANN, D., COCUCCHI, A., HENSEN, I., & JUNG, J. 2007. Fragment size, pollination efficiency and reproductive success in natural populations of wind-pollinated *Polylepis australis* (Rosaceae) trees. *Flora*, 202, 547-554.

4. HOCH, G., & KÖRNER, C. 2005. Growth, demography and carbon relations of *Polylepis* trees at the world's highest tree line. *Functional Ecology*, 19, 941-951.
5. CIERJACKS, A., IGLESIAS, K., WESCHE, K., & HENSEN, I. 2007. Impact of sowing, canopy cover and litter on seedling dynamics of two *Polylepis* species at upper tree lines in central Ecuador. *Journal of Tropical Ecology*, 23, 309-318.
6. SCHMIDT-LEBUHN, A., SELTMANN, P., & KESSLER, M. 2007. Consequences of the pollination system on genetic structure and pattern of species distribution in the Andean genus *Polylepis* (Rosaceae): a comparative study. *Plant Systematic and Evolution*, 266, 91-103.
7. ORTIZ, V. 2007. Chromosome numbers, nuclear DNA content, and polyploidy in *Consolea* (Cactaceae), an endemic cactus of the Caribbean Islands. *American Journal of Botany*, 94, 1360-1370.
8. PÉREZ, R., HERNÁNDEZ, M., ROSE, V., CALLEROS, V., & PANZERA, F. 2003. Citotaxonomía y evolución cromosómica en Triatominae, insectos vectores de la enfermedad de Chagas (heteroptera-reduviidae). *Entomology Vector* 10: 543-550.
9. TUNA, M., VOGEL, P., ARUMUGANATHAN, K. & GILL, S. 2001. DNA content and ploidy determination of bromegrass germplasm accessions by flow cytometry. *Crop Science*, 41, 1629-1634.
10. SEMINARIO, J. 2004. Raíces andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). No. 6. Lima, Perú: Universidad Nacional de Cajamarca, Centro Internacional de la Papa, Agencia Zuiza para el desarrollo y la cooperación.
11. TALLEDO, D., ESCOBAR, E., & ALLEMAN, V. 1995. El ciclo celular en vegetales; su estudio, importancia y aplicaciones. *Biotempo*, 2, 13-31.
12. FERRER, H., ALCORCÉS DE GUERRA, N. C., & MÉNDEZ, J. R. 2007. Determinación del ciclo mitótico de dos cultivares de *Gossypium hirsutum* L. y dos ecotipos de *Gossypium barbadense* L. *Acta Biol. Par., Curitiba*, 36, 121-149.
13. SCHMIDT-LEBUHN A, FUCHS, J., HERTE, D., HIRSCH, H., TOIVONEN, J., & KESSLER, M. 2010. An Andean radiation: Polyploidy in the tree genus *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae). *Plant Biology*. Publicado online Feb 2010.

14. RAMSEY, J., & SCHEMSKE, D. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploidy formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 29, 467–501.
15. JARA-SEGUEL, P., ROMERO-MIERES, M., & PALMA-ROJAS, C. (2006). Chromosome numbers of Chilean pteridophytes: First contribution. *Guyana Botany*, 63, 115-118.
16. FERNÁNDEZ, A., KRAPOVICKAS, G., & SEIJO, A. (2003). Los cromosomas de Malváceas. (Resumen, Universidad Nacional del Norte, 2003). Resumen: B-044.
17. GALINDO, E. 2006. Problemas y ejercicios de probabilidad y estadística. Quito – Ecuador: Policiencia Editores.
18. SINGH, J. 2002. Plant cytogenetic. Illinois, Estados Unidos: CRC Press.
19. SHARMA, A., & SHARMA, A. 1999. Plants Chromosome, analysis, manipulation end engineering. London. England: CRC Press.
20. MARTINEZ-GOMEZ, P., SANCHEZ-PEREZ, R., VAKNON, Y., DICENTA, F. AND GRADZIEL, T., 2005. Improved technique for counting chromosomes in almond. *Scientie Horticulturae* 105:139-143
21. SWANSON, C., MERZ, T., & YOUNG, W. 1981. Cytogenetics. The chromosome in division, inheritance, and evolution. New Jersey, U.S.A: Prentice Hall, INC. Englewood Cliffs.
22. MATOS, A., & MOLINA, J. 1997. Estudio citogenético en células radicales de *Aloe vera* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 14, 173-182.
23. RAVEN P., EVERT, R., & CURTIS, H. 1976. Biology of plants. New York, U.S.A.: Worth Publishers, INC.
24. RODRÍGUEZ, V., & SEIJO, G. 2001. Estudio del ciclo celular de una especie leñosa: *Gleditsia amorphoides* (Leguminosae). *Ciencias Agrarias*, 14, 321-324.
25. GOULD, A. 1984. Staining and Nuclear Cytology of Cultured Cells. Indra Vasil (Ed.). In *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Academic Press, Inc., 1, 699-711.
26. IDEHEN, E., KEHINDE, O., & ADEGBITE, A. 2006. Somatic chromosome counts and yields performance of some accessions of 'egusi' melon (*Citrullus lanatus*). *African Journal of Biotechnology* 5, 2049-2052.
27. SCHIMOTSUMA, M 1961. Chromosome number of *Citrullus* species. Chromosome information service 2, Kyushu, kukuoka. Japan.
28. KESSLER, M. 1995. The genus *Polylepis* (Rosaceae) in Bolivia. *Candollea*, 50, 31-71.
29. SIMPSON, B. B. 1979. A revision of the genus *Polylepis* (Rosaceae: Sanguisorbeae). *Smithsonian Contributions to botany*, 43, 1-62.

Análisis RAPD de la diversidad genética de *Theobroma cacao* L. de una población del Litoral Ecuatoriano

Mercedes Carranza¹, Emmerick Motte², Virna Cedeño², Orly Cevallos¹, Silvia Saucedo¹, Hayron Canchignia¹, Ariel Escobar¹.

¹Unidad de Investigación, Laboratorio de Biotecnología, Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo, Los Ríos, Ecuador. susycespinosa@yahoo.es

²Laboratorio del Programa de Biotecnología. Universidad de Guayaquil. Guayaquil (Guayas, Ecuador)

Recibido: 2010-06-01, aprobado: 2010-08-31

RESUMEN.- En este estudio, los análisis con marcadores RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) fueron usados para estimar la diversidad genética y la relación de 20 accesiones de *Theobroma cacao* L. de la variedad Nacional en la finca (La Buseta) ubicada en la Parroquia Tenguel provincia del Guayas. Las plantas fueron seleccionadas con criterios de productividad, resistencia, susceptibilidad a enfermedades causadas por hongos como *Ceratocystis fimbriata*, *Moniliophthora roreri* y *Crinipelis perniciosa*. Se utilizaron 14 primers, de los cuales nueve amplificaron, generando 67 bandas de las cuales 59 (88%) fueron polimórficas. Los resultados indican la formación de dos grupos de accesiones A y B, en el grupo A se incluyen dos accesiones y, en el grupo B se encuentran 18 de los cuales incluyen 2 subgrupos B1 y B2. En el subgrupo B1 se incluye la accesión (L-22-H-40), y en el subgrupo B2 están incluidas las accesiones que poseen características de productividad. El nivel de diversidad genética más alto se obtuvo con los primers OPC 04 (0,80), OPC 07 (0,82) y el nivel más bajo fue OPC 01 (0,37). Las accesiones (L-22-H-40; 0,75; L-34-H-07; 0,86) y el (L-42-H-60; 0,72) presentaron los niveles de variabilidad genética más altas, siendo los valores más bajos los mostrados por las accesiones (L-26-H-64; 0,48) y (L-23-H-63; 0,47). El valor de la diversidad total (Ht) obtenida para las 20 accesiones de *T. cacao* L. mediante RAPD fue de 0,636.

PALABRAS CLAVE: accesiones, genética, polimórficas, subgrupos.

ABSTRACT.- In this study, the analysis with RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) was used to estimate genetic diversity and relationships of 20 accessions of *Theobroma cacao* L. National variety on the farm (the minibus) located in the parish Tenguel province of Guayas. Plants were selected on criteria

of productivity, resistance, susceptibility to diseases caused by fungi such as *Ceratocystis fimbriata*, *Moniliophthora roreri* and *Crinipelis perniciosa*. We used 14 primers, nine of them amplified, generating 67 bands of which 59 (88%) were polymorphic. The results indicate the formation of two groups of accessions A and B. The group A includes two accessions while in B are 18, divided in two subgroups B1 and B2. The subgroup B1 includes the accession (L-22-H-40) and the subgroup B2 includes accessions that have productivity features. The highest level of genetic diversity was obtained with the primers OPC 04 (0.80), OPC 07 (0.82) and the lowest was OPC 01 (0.37). Accessions (L-22-H-40; 0.75; L-34-H-07; 0.86) and (L-42-H-60; 0.72) had levels of genetic variability quite large, reaching the lowest values shown by the accessions (L-26-H-64; 0.48) and (L-23-H-63; 0.47). The value of the total diversity (Ht) obtained for the 20 accessions of *T. cacao* L. RAPD was 0.636.

KEYWORDS: Accessions, gene, polymorphic, subgroups

INTRODUCCION

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una de las principales plantas perennes de uso agroindustrial que se cultiva en la mayoría de países que se encuentran en la zona intertropical; tiene gran importancia dentro de la economía del Ecuador que es exportador desde 1830 del cacao fino de aroma a base de la variedad conocida como Nacional (1). En la actualidad la superficie cultivada en el país de cacao se estima en aproximadamente 362 120 hectáreas, con una producción anual de 95 000 TM y un rendimiento de 0.27 TM/ha-1, lo que significa 5,40 quintales por hectárea al año (2). El Banco de germoplasma de cacao variedad "Nacional" existente en la finca experimental "La Buseta", propiedad de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, es el resultado de la

colección sistemática de muestras representativas de cacao Nacional existentes en la región desde la década del 40 por la United Fruit. Sin embargo, esta caracterización se ha basado en caracteres fenotípicos, directamente influenciados por factores ambientales, herencia multigénica, herencia cuantitativa y por la dominancia parcial de algunos caracteres, la cual puede confundir la expresión de un rasgo genético (3).

El mejoramiento genético en cultivos perennes puede tomar varios años y en el caso del cacao puede llevar de diez a doce años hasta lograr un nuevo cultivo; este proceso puede ser acelerado mediante el uso de técnicas moleculares, las cuales han demostrado ser herramientas útiles para el mejoramiento genético y para la selección de variedad

des con características importantes. Con la identificación de marcadores moleculares asociados a *loci* que codifican tanto para características cualitativas como cuantitativas (QTL's), por su acrónimo en inglés, es posible realizar una selección asistida por marcadores (4).

El presente trabajo busca identificar y caracterizar clones de cacao de la variedad Nacional de las cuales existen registros de comportamiento en campo, utilizando marcadores moleculares RAPD's, la cual es una herramienta adecuada para estudios genéticos, ya que destacan en la mayoría de los casos las limitaciones de los métodos tradicionales (5); además, se lograría una mejor reclasificación de los materiales en grupos de determinadas tendencias y sería de incalculable ayuda para trabajos a mediano plazo en la obtención de progenies con características estabilizadas gracias al descarte de plántulas

inestables con las cuales se podría iniciar programas de mejoramiento genético. El objetivo de este estudio fue estimar la diversidad genética de una colección de *Theobroma cacao* L. variedad Nacional usando marcadores RAPD's.

MATERIALES Y METODOS

Las muestras foliares de las 20 accesiones de cacao fueron recolectadas e identificadas en la Finca "La Buseta" ubicada en la Parroquia Tenguel provincia del Guayas, Ecuador, Figura 1; posteriormente llevadas al Laboratorio del Programa de Biotecnología de la Universidad de Guayaquil para la extracción de ADN. Las accesiones fueron seleccionadas en base a los siguientes criterios: productivo, tolerante, susceptible y resistente a *Monillia*, susceptible y resistente a *Ceratocystis* y susceptible a *Crinipellis*.



Figura 1. Ubicación geográfica de los principales bancos de germoplasma de cacao Nacional y plano de la finca La Buseta (centro de cacao de aroma Tenguel) Provincia del Guayas de donde se seleccionaron las accesiones de *Theobroma cacao* L.

El análisis estadístico se basó en la codificación de cada banda polimórfica representada a través de las variables presencia (1) o ausencia (0) los mismos que fueron procesados con el método de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Paired Prouping Method with Arithmetic Average*) y el coeficiente de similitud de Nei & Li (1979) (6). Se registraron por inspección en una matriz de datos binarios en el programa Ntedit del paquete estadístico Ntsys pc ver. 2,0 (*Applied Biostatistics Inc*, 1998). No se tomaron en cuenta polimorfismos que involucren datos dudosos.

Para la extracción de ADN de cacao se probaron algunos protocolos aplicados a tejidos vegetales, con la finalidad de obtener ADN de buena calidad y aplicable a todas las muestras sometidas al proceso de extracción. El protocolo modificado (Doyle & Doyle 1990) (7) fue el que mejores resultados dio en cuanto a la calidad y concentración del ADN. La integridad y concentración del ADN fueron analizadas por electroforesis en minigeles de agarosa al 1,2% en tampón TAE 1X. La electroforesis se realizó a 90 V por 30 min. (8).

Las muestras de ADN fueron amplificadas utilizando el protocolo propuesto por Faleiro (2001) (10); 40 ciclos cada uno constituido por el primer segmento 94° C 4', segundo segmento 15'' a 94 °C, 30'' a 36 °C 90 '' a 72 °C, ter-

cer segmento 7 minutos a 72 °C, y Conservación a 4 °C). A cada muestra se colocó 3 ml de una mezcla de azul de bromofenol (0,25%; 10). Para la mezcla de la AP-PCR en cada tubo de reacción se colocó una alícuota de los siguientes componentes: ADN (5 ng/ml) 1,00 ml 10X buffer, 5 ml 50mM ClMg, 5 ul primer (1,0 mM), 2,00 ml dNTPs (2,5 mM cada uno), 4,00 ml Taq polimerasa Invitrogen (5 U/ml) 0,2 ml, agua ultra pura 31,8m volumen final: 50,00 ml. Se probaron 14 primers (OPA-02, OPA-04, OPA-07, OPA-12, OPA-15, OPA-16, OPC-01, OPC-04, OPC-08, OPC-09, OPC-10, OPC-07, OPC-13, OPC-14), mismos que han sido empleados en trabajos anteriores de caracterización y diversidad genética de cacao realizados por (Faleiro *et al.* 2002 y Araujo *et al.* 1999) (9), respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

La extracción de ADN de cacao se la realizó a partir de hojas de cacao en estado intermedio de madurez, las cuales mostraron los mejores resultados, con el protocolo modificado de Doyle y Doyle (1990), se obtuvo ADN de buena calidad y cantidad, sin degradación, que migró en el gel de agarosa como una banda única de alto peso molecular (Figura 2).

Utilizando las condiciones óptimas de amplificación fue posible analizar la diversidad genética de 20 accesiones de

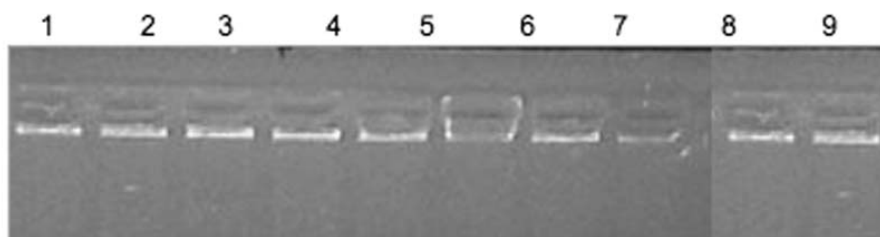


Figura 2. Bandas de ADN a partir de la extracción de 10 accesiones de *Theobroma cacao* L con el método modificado de Doyle y Doyle (1990).

cacao. De los nueve primers utilizados se generaron un total de 67 bandas con un buen nivel de repetitividad. De ellas el 88% (59) bandas mostraron perfiles polimórficos (Tabla 1).

Sobre los 14 primers probados se pudo obtener marcadores RAPD's dirigidos a tres de las 20 accesiones, de los cuales nueve primers (OPA-15, OPC-07, OPC-9, OPC-4, OPA-03, OPC-1, OPA-12, OPC-13 y OPA-7) amplificaron bandas claras y reproducibles.

Estos primers fueron aplicados a las 20 accesiones con dos repeticiones mostrando perfiles polimórficos. (Figura 3).

Los datos obtenidos con los nueve primers permitieron la construcción de un dendrograma que mostró las relaciones génicas entre las 20 accesiones de cacao (Figura 4). Este dendrograma mostró dos grandes grupos A y B, el grupo A se incluyó a las accesiones (L-30-H-62) que fenológicamente poseen características de susceptibilidad a *Cri-*

Código Operón	Productos amplificados		Polimorfismo (%)
	Monomórficas	Polimórficas	
OPA-15	1	8	87
OPA-03	2	9	77
OPC-04	2	3	33
OPC-13	1	5	80
OPA0-07	0	6	100
OPC-09	1	7	85
OPA-12	0	8	100
OPC-01	1	7	85
OPC-07	0	6	100
TOTAL	8	59	

Tabla 1. Productos RAPD amplificados con nueve primers decaméricos en 20 accesiones de *Theobroma cacao* L. existentes en la finca la Buseta.

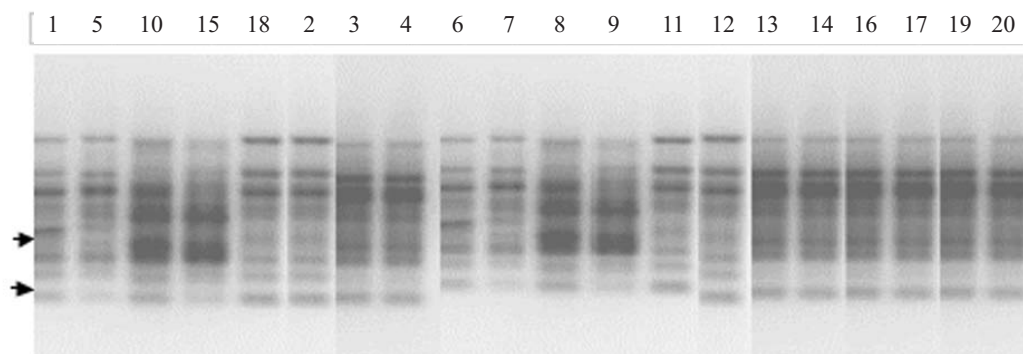


Figura 3. Perfiles RAPDs obtenidos con el primer OPA- O3. Carril 1 al 20 accesiones de *Theobroma cacao* L. Se marcan con una flecha algunas bandas Monomórficas (Ver tabla 1 para la identificación de las accesiones) .

nipellis y la accesión (L-34-H07) resistencia a *Ceratocystis*, y en el grupo B se encuentran las 18 accesiones restantes el cual incluye dos subgrupos B1 y B2, en el subgrupo B1 se incluye la accesión (L-22-H40) el cual fenológicamente posee características de resistencia a *Crinipellis*. Y el subgrupo B2 en donde están incluidos las accesiones que poseen características de productividad. Los primers que produjeron los niveles más altos de diversidad fueron OPC 04 (0,80) y OPC 07 (0,82). El primer que reportó el nivel más bajo fue OPC 01 (0,37). Las accesiones que presentaron los niveles de variabilidad más altos fueron (L-22H-40; 0,75; L-34-H07; 0,86) y (L-42-H60; 0,72) mientras que los valores más bajos los mostraron las accesiones (L-26-H64; 0,48) y (L-23-H63; 0,47). La diversidad génica total (Ht) obtenida para las 20 accesiones de cacao mediante RAPD's fue de 0,636.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que el mejor protocolo de extracción de ADN de *Theobroma cacao* L. fue el propuesto por Doyle y Doyle (1990) con modificaciones desarrolladas en nuestro laboratorio.

Los primers OPC-4 y OPC-7 mostraron los niveles de diversidad más altos. Los niveles de diversidad media para los primers usados en todas las muestras fue de (Ht=0.63). Los porcentaje de bandas polimórficas para las 20 accesiones de cacao fue 88% con los nueve primers. Las accesiones con características de productividad mediante el análisis RAPD fueron agrupadas en el mismo grupo B2.

Con el propósito de contribuir con la selección asistida por marcadores (MAS) es imperioso desarrollar otros marcadores moleculares hasta alcanzar la cobertura completa del genoma de

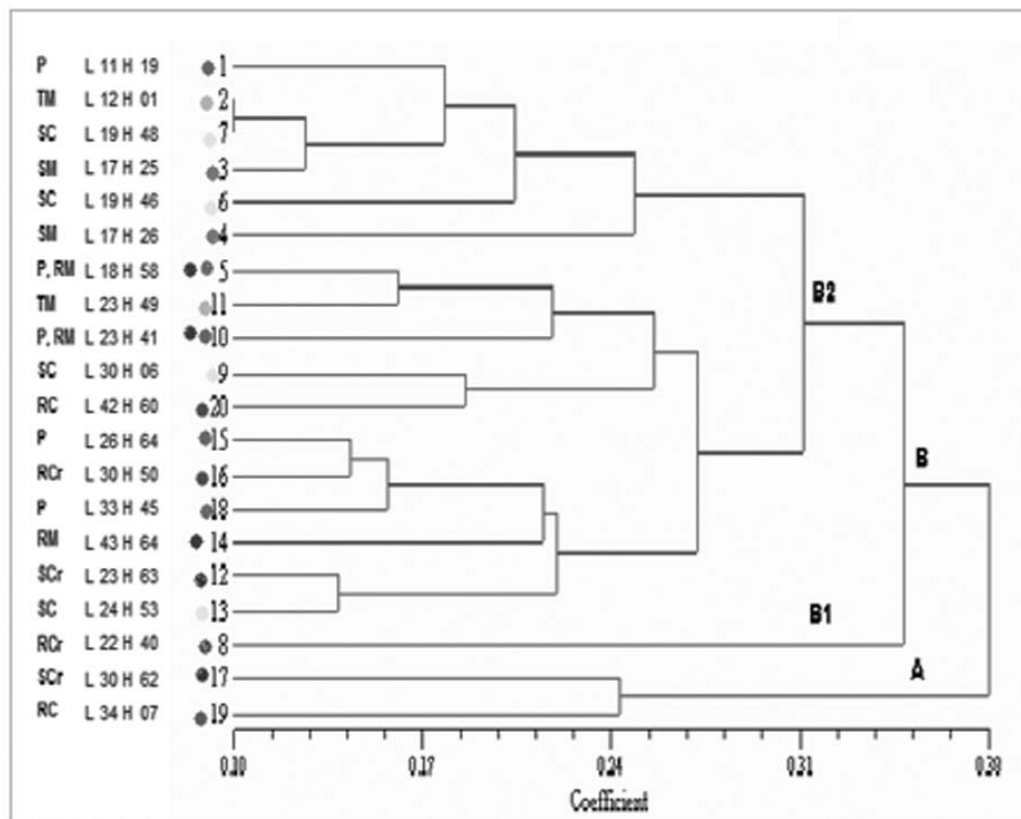


Figura 4. Dendrograma de las 20 accesiones de *Theobroma cacao* L. basado en los RAPDs obtenidos con el coeficiente de similitud de Nei y Li y el método de agrupamiento UPGMa (los números indican a cada accesión, las letras A y B representan cada una de los grupos principales del árbol y las letras B1 y B2 corresponden a los sub grupos). RCr resistencia *Crinipellis*, RC resistencia a *Ceratocystis*, P Productores, SC susceptible a *Ceratocystis*, SCr susceptible a *Crinipellis*, RM resistencia a *Monillia* TM Tolerante a *Monillia*, SM susceptible a *Monillia*

Theobroma cacao L. como los AFLP (Amplificación de fragmentos de longitud polimórfica) y SSCP (Polymerase chain reaction single- strand conformation polymorphism).

LITERATURA CITADA

1. AMORES, F. 1999. La dificultad

para establecer el rumbo tecnológico que han limitado el impacto económico de la investigación de cacao durante los últimos 50 años Quito - Ecuador, tesis de maestría. Universidad Internacional SEK pág. 188.

2. SICA. 2005. Servicio de información agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecu-

- dor. Ecuador: Producción mundial de cacao. Fuente:1991-1995- Sistema Estadístico Agropec. Nacional - INEC-1996-1999 Direcciones Provinciales -MAG- DIA *Proyecto ECUANECACAO- Elaboración: Proyecto SICA/MAG- Ecuador (www.sica.gov.ec) 14/septiembre/2005.
3. WILDE, J. R. WAUGH Y POWELL. 1992. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic dna MARKERS. *Theor. Appl. Genet* 83: 87.877.
 4. FALEIRO, F. 2001. Proyecto BIOMOL/CEPEC/CEPLAC El uso de Técnicas Moleculares para la búsqueda de variedades resistentes a enfermedades de escoba de bruja en cacao. Ilhéus, Brasil, CEPLAC
 5. WILLIAMS, J.G.K. LIVAK, K. RAFASKI, J. TINGEY, S. 1990 DNA polymorphic GOMEZ, P. 1998. amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers *Nucleic Acids. Reserach* 18: 341-345.
 6. NEI, M. Y W.H. LI. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 5269-5273.
 7. DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
 8. FERREIRA, M. Y GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. p 100-105. EMBRAPA. Brasil..
 9. ARAUJO, L. G., PRABHU, A.S. & FILLIPI, M.C. 1999. Genetic analysis of leaf blast resistance in somaclones of rice cultivar Araguaia. *Fitopatología Brasileira* 24:182-184.
 10. FALEIRO, F., ARAUJO, I., BAHIA, R., SANTOS, R., YOMADA, M. Y ANHERT, D. 2002. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD. *Agrotrópica (Brasil)* 14(2): 31-34.

Control de nemátodos en maracuyá usando benzimidazoles en ácidos húmicos

Carlos A. Soria

Laboratorios Labitech Cia. Ltda., Quito. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
casoria@puce.edu.ec

Recibido: 2010-04-19, aprobado 2010-08-25

RESUMEN.- Los nemátodos son un problema fitosanitario en los cultivos de maracuyá. Su presencia se asocia, generalmente, con el apareamiento de nódulos radiculares que obstruyen el flujo savial, disminuyen la vida de la planta y afectan considerablemente su producción. Del estudio fitonemático del maracuyá, se descubre su susceptibilidad al ataque de géneros polifitófagos encontrados, como *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* y *Rotylenchus*.

Los benzimidazoles son compuestos orgánicos cíclicos nitrogenados con actividad antiparasitaria. Bioterr de Labitech, un nematicida formulado con derivados de benzimidazol, nos permitió estudiar su efecto novedoso en el control de nemátodos, más aún, si se administra acompañado de ácidos húmicos (Orgánica, Labitech), conocidos como modificadores de los corpúsculos de suelo y como acarreadores moleculares, en presencia de saprófitos poco afectados por el benzimidazol. Los controles indicaron una infección significativa con nemátodos, algunos, formadores de nódulos radiculares, pocas raicillas nuevas, menor peso radicular y menor producción. Mientras que en los cultivos tratados, se observó lo contrario: disminución significativa de nemátodos, presencia de más raicillas, mayor peso radicular y aumento significativo de la producción.

PALABRAS CLAVE: maracuyá, nemátodos, control, benzimidazol, rendimiento.

ABSTRACT.- Nematodes are a very common phytosanitary problem for passion fruit, causing the appearance and proliferation of typical root nodules which obstruct sap flux, reduce yield production and plant's life expectancy. Susceptibility of this crop is mainly to the attack of phytonematodes belonging to the genera: *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* and *Rotylenchus*.

Benzimidazoles are cyclic nitrogenated organic compounds with anti-parasite activity. Bioterr from Labitech, formulated with types of benzimidazole, allowed us to study its novel effect in phytonematode's control when administered with

humic acids, known as soil corpuscle modifiers and molecular carriers. Little effect was found in saprofitas also considered as soil modifiers. Controls indicated a significant nematode infection, evidenced by the presence of root nodules, absence of secondary roots, lower root weights and scarce production, contrary to the results observed after treatment, evidenced by a significant reduction of numbers of nematodes, presence of secondary roots, increased total root weight and better yields.

KEYWORDS: passion fruit, nematodes, benzimidazole, control, better yields.

INTRODUCCION

Los nemátodos fitófagos, phylum Nematoda, clase Secernentea del orden Tylenchida, son las plagas que más daño causan a la agricultura (1) ocasionando problemas como pudrición o daños a la raíz de más de 2 000 especies de hortalizas, leguminosas y frutales (2, 3).

Cuando el parásito daña los tejidos externos de la raíz o avanza hacia el conducto interno radicular, inyecta sus toxinas esofágicas y puede transmitir virus, bacterias u hongos que ingresan a través de las heridas ocasionadas. Se reporta, por ejemplo, infecciones con *Fusarium oxysporum* a través de lesiones causadas por *Pratylenchus* sp. (4) o *Meloidogyne* sp. (5).

El ataque del género *Meloidogyne* es el más común (5) y se caracteriza por el apareamiento de nódulos o agallas en la raíz que obstaculizan el flujo de nutrientes y pueden causar necrosis tisular.

Pero los nematoparásitos son diversos, algunos de vida libre o ectoparásitos (Trychodoridos) fáciles de controlar; otros facultativos (ecto o endoparásitos), productores de huevos con

matrices gelatinosas (*Meloidogyne*, *Tylenchus*, *Rotylenchus*) o quistes (*Globodera*, *Heterodera*) difíciles de eliminar; y, además, otros endoparásitos exigentes (*Pratylenchus*, *Rodopholus*), cuyo control resulta aun más difícil por estar protegidos dentro de tejidos radiculares, por ende, difíciles de ser alcanzados y fácilmente transmisibles de una plantación a la siguiente (1).

Estos diferentes tipos de parasitismo, solos o en sinergismo entre ellos, debilitan a las plantas huéspedes, ocasionando pérdidas económicas calculadas en miles de millones de dólares a nivel mundial, ya sea por mermas en la producción, aumento de la mortalidad del cultivo o por la suma de las dos (2, 5, 6).

Productos fosforados o carbamatos, tóxicos tanto para el usuario como para el medio ambiente, se han utilizado por mucho tiempo en controles fitosanitarios. En humanos y animales, el efecto de los organofosforados se mide por la inhibición de la colinesterasa,

enzima que interviene en la hidrólisis de la acetocolina, en las sinapsis neuronales colinérgicas. El uso continuo de estos organofosforados se asocia con daños neuronales (2, 7, 8).

El benzimidazol y la úrea sustituida son los componentes principales del Bioterr de Labitech Cia. Ltda., una nueva alternativa para control fitonemático, libremente soluble en el agua de riego y de fácil migración en el suelo, por difusión y convección.

En el Ecuador, el cultivo de maracuyá, *Passiflora edulis*, se ha extendido a aproximadamente 30 000 ha, principalmente en las provincias de Los Ríos, Guayas, Manabí, Bolívar, Esmeraldas y Santo Domingo de los Tsáchilas (9). Los nemátodos están entre los problemas fitosanitarios más comunes de este cultivo.

Durante este estudio, se probaría la eficacia antinematódica de una formulación con derivados de benzimidazol y ácidos húmicos, en maracuyá. Se reconocería y cuantificaría los diferentes tipos de nemátodos en muestras de suelo control y tratado. Se estudiaría los daños ocasionados a la raíz y se asociaría este parasitismo con disminución en los niveles de producción.

MATERIALES Y METODOS

Cultivos

Se utilizaron 6 ha de cultivos comerciales de maracuyá en cinco fincas pequeñas de Chone. Cada ha en producción constaba de 750 plantas

adultas de dos años de edad. Tres de las fincas, totalizando 4 ha, fueron asignadas para recibir tratamiento; las otras dos no recibieron ninguno y sirvieron de control.

Tratamiento

Bioterr (Labitech Cia. Ltda.) es un nematocida consistente de 150 g de derivados de benzimidazol y 820 g de úrea amoniacal más excipiente, por kg. Orgánica (Labitech) es un desestresante y activador de suelos que contiene 150 g de ácidos húmicos por litro de producto.

Las plantas tratadas recibieron 188 mg de Bioterr (benzimidazol) y 188 mg de Orgánica (ácidos húmicos), aplicados en 250 cc de agua de riego por planta. El producto fue aplicado una sola vez, en drench, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Previo a la aplicación, el suelo debe estar húmedo a capacidad de campo, para favorecer la penetración del producto hacia el sector de las raíces secundarias donde se localiza mayormente la infección (10). El resultado que se obtenga, dependerá totalmente de esta condición.

Conteo e identificación de nemátodos

Muestras de 100 g de suelo colectadas al azar, totalizando aproximadamente 1 kg por cada finca, por control o por suelo tratado, fueron mezcladas en una funda plástica, separado los controles de los suelos tratados.

De cada total de muestra proveniente de cada finca, se pesaron 20 g de suelo, cantidad que fue suspendida con agitación continua durante dos min, en 250 cc de agua de la llave reposada (durante la noche) en botellas cilíndricas de boca ancha, de 500 cc de capacidad. Luego se dejó decantar durante 1 minuto y el sobrenadante fue filtrado por malla de tela fina.

A continuación se pasó por una malla de 40 μ m, y lo que quedó en la malla fue recolectado y lavado con 20 cc de agua en un vaso de precipitación. De esta fracción, se tomó una muestra volumétrica de 5 cc, la cual fue depositada en una caja petri para el conteo o identificación de nemátodos en 25 campos, usando un estéreo microscopio con 50 aumentos.

Se reportó el total observado por género, incluyendo estadíos larvales y adultos por volumen de muestra. El resultado obtenido en cada muestra se multiplicó por 20 y se reportó como número total por género (o grupo de saprófitos y otros) por 100 g de suelo. Los conteos corresponden al promedio de 3 repeticiones.

Nódulos en las raíces

Se estudiaron los nódulos radiculares en las raíces colectadas a 20 cm de profundidad, de cada una de las 20 plantas que sirvieron de control y por separado, de otras 20 que recibieron tratamiento.

Las raíces de cada grupo (15 g por planta) fueron mezcladas manualmente en fundas separadas, luego se pesaron 100 g de cada grupo y se contaron nódulos de 3 mm o más de diámetro. Los muestreos y conteos de los controles y de las plantas tratadas se hicieron a los 30 días posteriores a la aplicación del tratamiento; los nódulos encontrados se reportaron por 100 g de raíces en cada grupo y para cada uno de tres ensayos o repeticiones.

Desarrollo radicular

Se seleccionaron al azar y en forma separada tres plantas adultas tanto del cultivo control como del que recibió tratamiento. Se sacrificó cada una de estas plantas, se extrajo completamente la raíz y se procedió a pesarla y a reportarla en gramos, tanto el peso de las raicillas como el de la raíz total, incluido su peso promedio.

Producción

Durante tres semanas se registró la producción semanal de maracuyá tanto en los cultivos que recibieron tratamiento como en los que no recibieron, y el resultado se reportó como kg de producción semanal por ha; se calculó también la producción promedio semanal. Los datos extrapolados de la producción en kg por ha fueron obtenidos contabilizando el peso de la producción semanal de las dos fincas control, comparado con la producción de las tres fincas que recibieron tratamiento.

Estadística

Se realizaron análisis de varianza para detectar diferencias estadísticas en las muestras ensayadas y adicionalmente pruebas de significación de Tukey al 0,05.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos (Figura 1, cultivo tratado) se expresaron como número de nemátodos por género y por muestra en 100 g de suelo, tanto para los controles como para las muestras tratadas. Muestreos y conteos se realizaron 30 días después de aplicado el nematicida con los ácidos húmicos.

Del conteo realizado en los suelos controles (Tabla 1), se pudo observar una infección considerable de nemátodos parásitos (entre 160 hasta 400 individuos por 100 g de suelo), de los géne-

ros *Meloidogyne*, *Pratylenchus* y *Helicotylenchus*, así como una población numerosa de saprófitos (entre 300 y 360). También se detectaron números menores de *Radophylus* y *Rotylenchus* (entre 40 y 80) y de otros nemátodos (entre 100 y 160) que no pudieron ser identificados.

En las muestras de suelos que recibieron tratamiento, se notó una disminución significativa ($p < 0,05$) en el número de nemátodos de casi todos los géneros parásitos con la excepción de *Radophylus* ($p=0,058$). Con el tratamiento, también se encontró una aparente disminución de saprófitos (de un promedio de 330 a 293), pero esta diferencia en los resultados no fue significativa ($p > 0,05$).

Se reportaron nódulos en las raíces tanto de los controles como de las plantas tratadas (Tabla 2). Se contaron de 125 a 155 nódulos (Prom = 138) por 100 g de raíces controles. Y en las plantas tratadas, el número fue de 120 a 150 (Prom = 133); por lo tanto, tampoco hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el número de nódulos en las raíces controles y los encontrados en las plantas tratadas.



Figura 1. Cultivo de maracuyá tratado con benzimidazoles y ácidos húmicos (Foto de Abdón Tapia).

Tabla 1. Efecto del tratamiento con derivados de benzimidazoles y ácidos húmicos (a) sobre el número de nemátodos en 100 g de suelo cultivado con maracuyá.

Género/ grupo	Controles			Tratados			
	1(b)	2(b)	Prom(c)	1(b)	2(b)	3(b)	Prom(c)
<i>Meloidogyne</i>	400	360	380	80	100	60	80
<i>Pratylenchus</i>	320	300	310	60	20	40	40
<i>Helicotylenchus</i>	160	180	170	40	20	20	27
<i>Rodophylus</i>	80	60	70	20	40	0	20
<i>Rotylenchus</i>	40	60	50	20	0	0	7
Otros	160	100	130	20	40	40	33
Saprófitos	300	360	330	280	340	260	293

(a) Tratamiento: 188 mg de Bioterr + 188 mg de Orgánica en 250 cc de agua /planta;

(b) Repeticiones: 1,2,3; (c) Prom: promedio

Tres plantas adultas del grupo control y 3 tratadas fueron sacrificadas para poder observar completamente sus raíces (Figura 2, Tabla 3). Se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) en el peso promedio de raicillas nuevas en las plantas tratadas (Prom = 8 g por planta), comparado con el de los controles (Prom = 3 g por planta). De igual forma, el peso total de las raíces sin tra-

tamiento varió entre 197 y 210 g (Prom = 203 g) en comparación con las plantas tratadas que mostraron pesos entre 250 y 281 g (Prom = 262 g), un resultado significativamente más alto que el reportado para los controles ($p < 0,05$).

La producción semanal de las dos fincas sin tratamiento fue comparada con la de las otras tres fincas que sí fueron tratadas. Cada una de estas produc-

Tabla 2. Efecto del tratamiento con derivados de benzimidazoles y ácidos húmicos (a) sobre el número de nódulos en 100 g de raíces de maracuyá.

Número Ensayo	Número nódulos / 100 g de raíces	
	Controles	Tratados
1	155	130
2	125	150
3	134	120

(a) Tratamiento: 188 mg de Bioterr + 188 mg de Orgánica en 250 cc de agua /planta.

ciones semanales (tres semanas) fue extrapolada y reportada como producción semanal de maracuyá por ha (750 plantas adultas por ha) en kg (Tabla 4). Se encontró una producción promedio de 245 kg semanal por ha comparada con una producción significativamente mayor ($p < 0,05$), promedio de 287 kg en las fincas tratadas.

DISCUSION

Los benzimidazoles son compuestos orgánicos cíclicos nitrogenados, derivados de los imidazoles, con intensa actividad antiparasitaria en animales y en el hombre. El tratamiento aplicado con benzimidazoles y ácidos húmicos, para uso agrícola, nos permitió estudiar su efecto novedoso en el control de los nemátodos del suelo (11).

La capacidad del tratamiento para disolverse totalmente en el agua de

riego, facilita su uso. A esto se suma el hecho de ser aparentemente un producto no tóxico, de sello verde, cuyas moléculas activas, además de actuar por contacto, probablemente pueden ser absorbidas o acarreadas a través de la raíz hacia los tejidos infectados cercanos (12). Los otros componentes incorporados, por ejemplo, la úrea sustituida amoniacal y/o los ácidos húmicos, actuarían como moléculas catiónicas con poder surfactante y tensoactivo, que probablemente ayudarían en la penetración o acarreo del benzimidazol y de los nutrientes del suelo.

Se sabe que la absorción radicular de un pesticida en solución acuosa, dependerá de su formulación y entre otros, de la presencia de los ácidos húmicos y fúlvicos (13), como los administrados, cuya incorporación al suelo también ocasionan soltura cor-

puscular, oxigenación por aereación y solubilización por quelación de sales insolubles u otros principios activos no disueltos (datos no reportados).

De lo encontrado, se desprende que estos cultivos de maracuyá son bastante susceptibles al ataque de varios géneros de



Figura 2. Raíces de maracuyá (Foto de Abdón Tapia)

Tabla 3. Efecto del tratamiento (a) sobre el peso de las raicillas y raíces de plantas de maracuyá.

Peso (g)	Sin tratamiento				Tratados			
	1(b)	2(b)	3(b)	Prom(c)	1(b)	2(b)	3(b)	Prom(c)
<i>Raicillas</i>	3	4	2	3	8	10	7	8
<i>Raíces</i>	203	197	210	203	255	250	281	262

(a) Tratamiento: 188 mg de Bioterr + 188 mg de Orgánica en 250 cc de agua /planta;

(b) Planta número: 1,2,3; (c) Prom: promedio.

nemátodos polifitófagos (Tabla 1), de los cuales, los géneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus* y *Helicotylenchus* fueron los más abundantes en el estudio de los grupos control. Otros, como *Radophylus* y *Rotylenchus*, se encontraron en números significativamente más bajos ($p<0,05$), comparados con *Meloidogyne*, por ejemplo, pero no por eso pueden ser considerados infectivamente menos importantes, ya que algunos son endoparásitos portadores y transmisores de infecciones virales (14).

Fue claro el control de la infección después del tratamiento, evidenciado

por la sanidad del cultivo (Figura 1) y la reducción significativa ($p<0,05$) en el número de los nemátodos encontrados (Tabla 1). El benzimidazol, mejor acarreado parcialmente por los ácidos húmicos, en contacto con el nemátodo, sea afuera en el suelo o dentro en la raíz, probablemente es absorbido a su sistema muscular, por contacto externo o con el alimento, provocando parálisis por inhibición enzimática e incapacidad para metabolizar la glucosa muscular. Interacciones del benzimidazol con las glicoproteínas o con los esteroides de las membranas parasitarias (15), podría

Tabla 4. Efecto del tratamiento con benzimidazoles y ácidos húmicos (a) sobre la producción extrapolada semanal de maracuyá en kg/ha/750 plantas.

Sin tratamiento				Tratados			
1(b)	2(b)	3(b)	Prom(c)	1(b)	2(b)	3(b)	Prom(c)
265	240	230	245	280	300	280	287

(a) Tratamiento: 188 mg de Bioterr + 188 mg de Orgánica en 250 cc de agua /planta.

(b) Semana número: 1,2,3.

(c) Prom: promedio.

desencadenar en catástrofes metabólicas suficientes como para causar su mortalidad (16).

La poca mortalidad observada en los saprófitos después del tratamiento, también resulta interesante (Tabla 1). Esta selectividad podría explicarse porque éstos, al alimentarse de tejidos muertos, en vez de tejidos vivos, como es su hábito, no ingieren los antiparasitarios incorporados sistémicamente a la savia (1, 12).

La presencia de saprófitos es una ventaja para el cultivo porque al ser convertidores de tejidos muertos en substratos, algunos asimilables, se vuelven remodeladores y acondicionadores iónicos de los suelos, más aun, en presencia de ácidos húmicos (13). Es la actividad fisiológica de estos nemátodos, más la presencia de los ácidos húmicos que actúan como quelantes o acarreadores iónicos, lo que permite la liberación de nutrientes que pueden estar localizados en algunos nichos y no en otros (17), causando, además, un mejor aprovechamiento del agua y del oxígeno del suelo (8).

El ataque del género *Meloidogyne* es peculiar en más de 3.000 variedades de cultivos (18) y se caracteriza por estimular una multiplicación de células gigantes y aledañas, formadoras de nódulos, donde se acumulan toxinas, celulasas, proteinasas o radicales oxigenados de alta reactividad que suprimen procesos fotosintéticos y de respiración.

El cultivo queda disminuido en el flujo de nutrientes y agua por necrosis radicular y por el apareamiento de infecciones bacterianas, fungosas y virales (5) que ocasionan bajos rendimientos, como se pudo observar en los cultivos control. Estos últimos mantuvieron poblaciones altas de nemátodos (Tabla 1) y baja producción (Tabla 4).

Al estudiar las raíces control y las del grupo tratado (Figura 2), se encontró en ambos la presencia de agallas (Tabla 2) en números similares; es decir, en cifras estadísticamente no significativas ($p > 0,05$). Pero sí se observó una renovación significativamente abundante de raicillas (Tabla 3) en los grupos tratados ($p < 0,05$).

Estos resultados se explican porque una vez iniciado el daño del tejido con el apareamiento de los nódulos (6), éstos permanecen temporalmente aun en ausencia de nemátodos que podrían haber sido ya controlados por el tratamiento (12).

El número bajo de nemátodos que se encontraron en el suelo tratado 30 días atrás, podría explicarse porque los benzimidazoles no sufren fácilmente biotransformaciones (19) por descarboxilación, debido a su estructura anillada que les confiere estabilidad; esta propiedad, permite que estas moléculas puedan permanecer activas en el suelo por más de 30 días, quizá al mantenerse débilmente queladas a los ácidos húmicos. Esta característica de los derivados ani-

llados imidazólicos se traduce en la obtención de mejores cosechas (Tabla 4), debido, entre otros, al control fitone-mático prolongado, a la disponibilidad de nutrientes acondicionados por los nemátodos saprófitos y por los ácidos húmicos, así como al mejoramiento de la absorción que pudiera explicarse por el aumento de la masa radicular, especialmente de las raicillas absorbentes (Tablas 1,2,3). Además del ahorro que ocasiona la implementación de trata-mientos menos seguidos requeridos para romper ciclos nemáticos (5) que ocurren aproximadamente cada 30 días.

LITERATURA CITADA

1. Lamberti F., Greco N., Basile M., 1986. Treatments of soil-nematological aspects. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 16, 327-333.
2. Fleming C., McKinney S., McMaster S., Johnston M., Donnelly P., Kimber, M., Maule A., 2007. Getting to the root of neuronal signaling in plant-parasitic nematodes using RNA interference. *Nematology* 9 (3), 301-315.
3. Ubidia P., Soria C., 2006. Revisión de efectos y daños causados por los nemátodos fitoparásitos en cultivos importantes en la producción agrícola. XXX Jornadas Nacionales de Biología. Sociedad Ecuatoriana de Biología y Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Libro de resúmenes, p. 112.
4. Castillo P., Jimenez R., Gomez A., Vovlas N., 1995. Parasitism of the root-lesion nematode *Pratylenchus thornei* on chickpea. *Plant Pathology* 44, 728-733.
5. Leonard D., 1991. The nematode. *Horticulture* 69 (3), 1-7.
6. Hofmann J., Grundler M., 2007. How do nematodes get their sweets? Solute supply to sedentary plant-parasitic nematodes. *Nematology* 9 (4), 451-458.
7. Pink R., Hudson A., Mourie's M., Bendig M., 2005. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature reviews* 4, 727-740.
8. Blouin M., Zuily-Fodil Y., Pham-Thi A., Laffray D., Reversat G., Pando A., Tondoh J., Lavelle P., 2005. Belowground organism activities affect plant aboveground phenotype, inducing plant tolerance to parasites. *Ecology letters* 8, 202-208.
9. Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. Presentación de Maracuyá (Ing. Olmedo Luna). El cultivo de maracuyá en el Ecuador (Ing. Pablo Rizzo Pástor). <http://www.sica.gov.ec/cadenas/2009>.
10. Araya M., Vargas A., Cheves A., 1999. Nematode distribution in roots of banana (*Musa* AAA cv. Valery) in relation to plant height, distance from the pseudostem and

- soil depth. *Nematology* 1 (7-8), 711-716.
11. Soria C., 2006. Benzimidazoles en el control de nemátodos. XXX Jornadas Nacionales de Biología. Sociedad Ecuatoriana de Biología y Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Libro de resúmenes, p. 51-52.
 12. Soria C., 2009. Bioterr Labitech, un nuevo fitonematicida a base de benzimidazol. *Rev Ecuat Med Cienc Biologicas* 30 (1,2), 28-41.
 13. Kyriakopoulos G., Doulia D., 2006. Adsorption of pesticides on carbonaceous and polymeric materials from aqueous solutions: a review. *Separation and Purification Reviews* 35, 97-191.
 14. González L. 1985. Introducción a la Fitopatología. 4ta Edición, Editoril IICA, San José de Costa Rica, Costa Rica, p. 57-64.
 15. Vervelde L., Van Leeuwen M., Kruidenier M., Kooyman F., Huntley J., VaDie I., Cornelissen A., 2002. Protection studies with recombinant excretory / secretory proteins of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology* 24, 189-201.
 16. Kerboeuf D., Riou M., 2006. Nematodes as Models for the Study of the Regulation of Activity of P-glycoproteins in Multidrug Resistance (MDR). *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* 5, 389-402.
 17. Wurst S., Langel R., Scheu S., 2005. Do endogeic earthworms change Plant competition? A microcosm study. *Plant and Soil* 271, 123-130.
 18. Castagnone P., 2002. Genetic variability in parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., and their ability to overcome plant resistance genes. *Nematology* 4, 605-608.
 19. Ballinger D., Kollmorgen J., 1986. Control of take-all of wheat in the field with benzimidazole and triazole fungicides applied at seeding. *Plant Pathology* 35, 67-73.

Un método cuantitativo para medir el área de tubérculo dañado por larvas de *Tecia solanivora* (Lep.; Gelechiidae) a través de análisis de imágenes digitales

Carlos Carpio ^{1*}, Jean-Louis Zeddam ^{1,2}, Álvaro Barragán¹, Gustavo Nuñez³,
Marcelo Patiño³ & Olivier Dangles^{1,2}

Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Apartado 17-01-2184, Quito, Ecuador.
fccarpio@yahoo.com

² IRD-LEGS and University Paris-Sud 11, Gif-sur-Yvette, Francia.

³ Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias de la Vida, Escuela Politécnica del Ejército, Apartado 171-5-231B, Sangolquí, Ecuador.

Recibido: 2010-03-18, aprobado: 2010-08-30

RESUMEN.- Se desarrolló un nuevo método de evaluación del nivel de daño provocado a los tubérculos por las larvas de polillas de la papa. El método se basa en el análisis de imágenes digitales, mediante la utilización de herramientas tecnológicas como son los paquetes libres: Gimp 2.6.4 y Scion Image. Se hizo una comparación entre la metodología propuesta y la metodología convencional basada en una evaluación visual de los daños. Se encontró que el nuevo método es particularmente confiable para medir los niveles de daño intermedios que son difíciles de estimar de manera visual. Finalmente, se determinó que con el uso de la metodología propuesta se pueden obtener datos más objetivos y precisos debido a que no están sujetos a interpretaciones humanas.

PALABRAS CLAVE: Gimp 2.6.4, índice de daño, polilla de la papa, Scion Image.

ABSTRACT.- This study presents a new method to evaluate the level of tuber damage caused by potato moth larvae. This methodology was based on analyses of digital images through the use of technological tools available on the market such as the free softwares: Gimp 2.6.4 and Scion Image. A comparison was made between the proposed methodology and the conventional one based on a visual assessment of damage. It was found that the new method is particularly reliable for measuring intermediate levels of damage that are difficult to estimate visually.

Finally, we discuss how the use of this methodology could be more objective and accurate to quantify by eliminating human interpretations.

KEY WORDS: Damage index, Gimp 2.6.4, potato moth, Scion Image.

INTRODUCCIÓN

El complejo de las polillas de la papa, *Phthorimaea operculella* (Zeller), *Tecia solanivora* (Polvony) y *Symmetrischema tangolias* (Gyen, 1913) (Lepidoptera: Gelechiidae), es uno de los grupos de plagas que causa mayor daño a este cultivo, tanto en campo como en almacenamiento (1). *T. solanivora* fue introducida a Ecuador en 1996, a través de una importación de semilla no certificada proveniente de Colombia, con destino a las zonas paperas del Carchi (2). La larva se alimenta inicialmente encima de la piel del tubérculo, para luego barrenar más profundamente y formar galerías sinuosas (3).

La estimación visual del daño causado por las plagas ha sido uno de los métodos utilizados históricamente por los investigadores y extensionistas para evaluar la eficiencia de los diferentes controles usados para el manejo de estos insectos (4, 5). En este tipo de evaluación se realiza una estimación visual del porcentaje de daño del tubérculo y se aplica un sistema de puntaje basado en los valores propuestos por Arias *et al.* (6) o Murcia y Barreto (7), con valores que van de 0 (0% de daño)

a 4 (entre 76% a 100% de daño); el problema con este tipo de evaluación es que puede ser subjetivo y tiene limitaciones en cuanto a precisión (8).

Los avances en el procesamiento de imágenes digitales, en las metodologías usadas para los análisis y en cuanto a la tecnología de las computadoras, han exhibido un crecimiento impresionante en las pasadas décadas (9). Todo esto se constituye en tecnologías que lideran importantes áreas; por ejemplo, telecomunicaciones digitales, radiodifusión, imágenes médicas, biología, ciencias de los materiales, sistemas multimedia y sensores remotos; esto se refleja en la existencia de un gran número de publicaciones en revistas científicas internacionales, así como en libros especializados (9).

El software de dominio público SCION IMAGE es utilizado para realizar análisis de imágenes digitales y ha sido aplicado dentro de una amplia gama de novedosos métodos de investigación en agricultura aplicada, como para medir el área de las hojas, la defoliación y el impacto de insectos fitófagos sobre las hojas (10, 11); el porcentaje de cobertura de plagas invasivas (12); la senescencia de las hojas (13,

14), el estado del nutriente foliar (15). Sin embargo, SCION IMAGE no había sido utilizado para estudios relacionados con tubérculos y más específicamente para análisis de daños provocados por polillas de la papa.

Los entomólogos agrícolas siempre han tenido el reto de estimar con precisión el daño causado por las plagas en los cultivos (10, 16). Aunque la papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los principales cultivos de la región andina, sorprendentemente, no existía una metodología que permita evaluar de una manera cuantitativa y objetiva el daño provocado por las plagas en los tubérculos. Este trabajo tiene como objetivo específico el validar una metodología que se basa en el análisis de imágenes digitales para la determinación precisa del nivel de daño producido por *T. solanivora*,

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento del ensayo

Se utilizaron 30 cajas de cartón corrugado de 20 cm de ancho, 20 cm de largo y 25 cm de altura. Cada caja representó una unidad experimental donde se depositaron diez tubérculos de la variedad de papa Leona Blanca, los cuales fueron infestados con 60 huevos de *T. solanivora*. El ensayo se ubicó en una bodega del cantón Salcedo, provincia de Cotopaxi (Ecuador), a una altitud de 2.729 msnm. La temperatura media

al interior de la bodega se registró usando un termómetro máximo-mínimo (Ertco, Dubuque, IA), fue de 14,5 °C (min = 9,5 °C; máx = 20 °C). Después de 50 días se retiró el ensayo de la bodega y los tubérculos fueron llevados a los laboratorios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en Quito para ser evaluados.

Estimación visual del índice de daño provocado por *T. solanivora* en tubérculos de papa

En total se evaluaron 300 tubérculos. Cada tubérculo fue cortado longitudinalmente en cuatro partes; en cada parte se estimó visualmente la intensidad del daño evaluando el área afectada por las larvas (Figura 1A). La sumatoria de daño de cada parte representa la intensidad total del daño por papa que varía entre 0 (ningún daño) y 100 (papa totalmente dañada). Luego, este porcentaje fue transformado a un índice que va de 0 a 1 (6).

Adquisición de la imagen digital de los tubérculos

Se tomaron fotografías de las cuatro partes en las que fue cortada cada una de las papas con una cámara digital Canon Power Shot S40 (Canon, Tokyo, Japón). Se usó un soporte para ubicar la cámara a una altura de 21 cm y un negatoscopio a manera de caja de luz para evitar las sombras.

Como fondo, se utilizaron hojas cuadrículadas A4 (0,5 cm), para tener una medida conocida de referencia. Las fotos fueron exportadas a un computador. Con ayuda del programa de libre acceso GIMP 2.6.4 (Spencer Kimball, Peter Mattis and the GIMP Development Team), se estandarizó el brillo de las fotos, se definió algunos márgenes en los bordes de los tubérculos y se cambió de formato de jpg a tif para que las fotos puedan ser analizadas con el programa de libre acceso Scion Image 4.0.2. Las fotos fueron editadas para generar dos tipos diferentes de imágenes; una para calcular el área dañada de los tubérculos (Figura 1B-1) y otra en la que se invirtieron los colores para poder calcular el área total de la papa (Figura 1B-2).

Procesamiento de las imágenes con Scion Image

Para determinar el índice de daño provocado por las larvas de *T. solanivora* se utilizó el software de dominio público Scion Image 4.0.2 para Windows (National Institute of Health, Bethesda, MD,

www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm).

El programa permite analizar las imágenes en color (Figura 1B-1) o en escala de grises (Figura 1B-2). Se utilizó la versión a color para establecer la

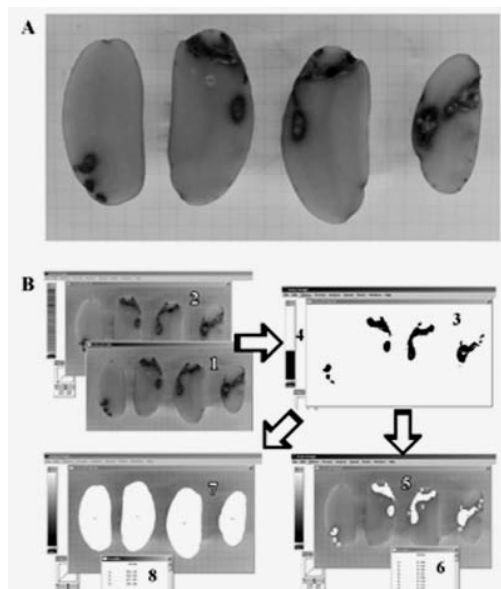


Figura 1 (A).- Foto de tubérculo cortado en cuatro partes usado para el análisis del daño provocado por larvas de *T. solanivora*. (B) Secuencia seguida durante el manejo del programa SCION IMAGE: (1) foto del tubérculo a color, (2) foto de la papa en escala de grises, (3) visualización del área del tubérculo dañada mediante la aplicación de la función Threshold, (4) nivel donde se ubicó la función Threshold para realizar el análisis, (5) área del tubérculo dañada, calculada (6) cuadro de los resultados correspondientes al área de daño calculada, (7) área total de papa calculada, (8) cuadro de los resultados correspondientes al área calculada.

escala real. Se utilizó la hoja cuadrículada A4 para establecer cuantos pixeles correspondían a un centímetro. Luego se escogió del menú: Analyze > Set scale y se ingresó la equivalencia de 1 centímetro en pixeles. Luego, se cerró la imagen a color y se continuó trabajando con la imagen en gradación de grises (Figura 1B-2).

Posteriormente se escogió del menú: *Analyze > Options > Area > OK*. Luego se seleccionó del menú: *Options > Threshold* y se comenzó a bajar el contraste hasta que el umbral llegue a 155, una medida previamente establecida para todas las imágenes (Figura 1B-3, 1B-4). Con este valor se consigue el óptimo de contraste entre las zonas dañadas y las zonas sanas de la papa (en negro en la Figura 1B-3). Seguidamente, se escogió del menú: *Analyze > Analyze particles* y el programa procede a señalar las áreas que se va a calcular (Figura 1B-5). Finalmente, se escogió del menú: *Analyze > Show results* donde apareció en un recuadro los resultados de las áreas calculadas

(Figura 1B-6). Esta información fue copiada y exportada a una plantilla hecha con el programa Excel (Microsoft, USA). Este procedimiento se siguió para calcular el área de daño producido por las larvas (Figura 1B-5, 1B-6) y un procedimiento similar se aplicó para calcular el área total de cada tubérculo (Figura 1B-7, 1B-8). Para determinar el índice de daño de cada tubérculo, se dividió el área dañada para el total fotografiado. El tiempo total para procesar cada foto fue de aproximadamente cuatro minutos.

Análisis estadístico

Para evaluar los métodos (visual vs. análisis de imágenes digitales) de estimación del daño se hizo un análisis de regresión usando Minitab (Versión 1.5). Se asumió que los datos obtenidos a través de la evaluación de las imágenes digitales corresponderían a los valores observados y los datos obtenidos a través de la evaluación visual corresponderían a los valores esperados. Siguiendo las recomendaciones de Piñeiro *et al.* (17), se ubicaron los valores esperados en el eje de las X y los valores observados en el eje de las Y. Se calculó la pendiente y la intersección.

Se calculó el coeficiente parcial de desigualdad de Theil (Usesgo, Upendiente, Uerror), el cual separa el error real de la predicción (la suma de cuadrados del error predicho), en diferentes componentes y complementa la evaluación

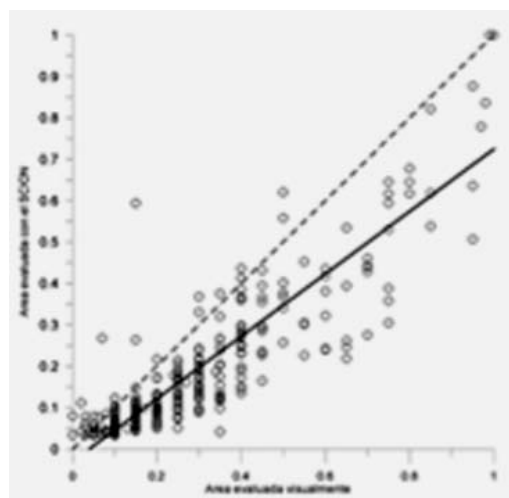


Figura 2.- Relación entre el área evaluada con el método SCION IMAGE y el área evaluada con el método visual. La línea punteada representa una línea de relación 1:1 que ayuda a visualizar mejor relación entre los dos métodos evaluados. La línea continua representa la línea de la regresión ($Y = 0.758 * X - 0.029$, $P. 0.001$)

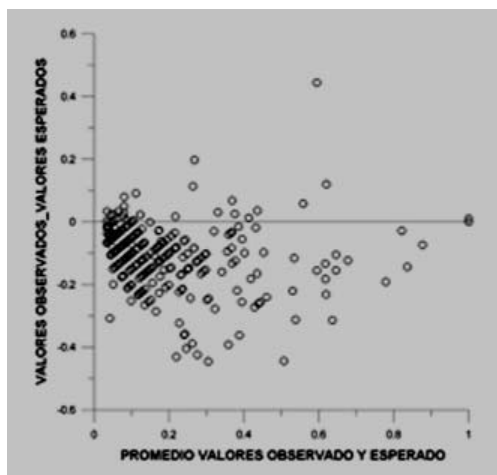


Figura 3.- Distribución del error. Los puntos representan las diferencias entre lo evaluado con el análisis visual y el análisis de imágenes digitales.

hecha con la regresión (18, 19). El coeficiente de Theil divide la varianza de los valores observados no explicados por los valores predichos (llamado la suma de cuadrados del error predicho), siendo U_{esgo} , la proporción asociada con la diferencia de las medias entre los valores observados y los valores predichos, $U_{\text{pendiente}}$, la proporción asociada con la pendiente del modelo ajustado y la línea 1:1 y U_{error} , es la proporción asociada con la varianza inexplicada (18).

Para observar la tendencia en la distribución del error se graficaron los valores promedio de los pares de los valores esperados y los valores observados en el eje de las abscisas y las diferencias en el eje de las ordenadas con el software Grapher (Versión 4.00). Para hacer un análisis del error se hizo una correlación de los datos obtenidos por el Scion Image y la raíz cuadrada

del error medio o RMSE (la diferencia entre los datos obtenidos por el método visual y el Scion Image).

RESULTADOS

Los valores de la estimación visual y de la estimación por análisis de imá-

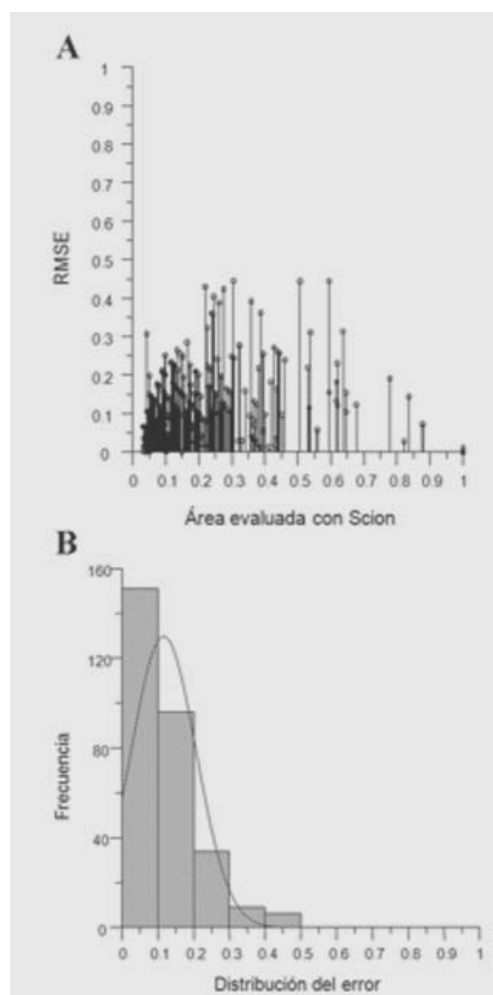


Figura 4.- Análisis de la relación del área evaluada con SCION IMAGE y el RMSE (raíz cuadrada del error medio). (B) Frecuencia de la distribución del error RMSE que cuantifica la diferencia entre ambos métodos.

genes digitales muestran una buena correspondencia (Figura 2, $n = 300$, $r^2 = 0,79$, $P < 0,001$). La intercepción y la pendiente fueron significativamente diferentes de 1 y 0 ($p < 0,001$). La falta de ajuste fue principalmente relacionada al sesgo o a la diferencia media entre lo observado y lo esperado ($U_{\text{sesgo}} = 0,48$; $U_{\text{pendiente}} = 0,13$; $U_{\text{error}} = 0,35$).

La distribución del error sugiere que hay una subestimación cuando aplicamos la evaluación visual para determinar el porcentaje de daño (Figura 3). Este error es mayor en los valores intermedios. La desviación estándar de la estimación visual del porcentaje de daño fue de 0,22 y de la evaluación a través del análisis de imágenes digitales fue de 0,19.

El análisis del error producido al usar el método de la evaluación visual (RMSE) confirmó que la diferencia más grande entre los dos métodos de medida se presentó cuando se evaluaron niveles de daño intermedio, que están entre 0,3–0,7 (Figura 4A) y no en los casos extremos (0–0,3 ó 0,7–1). Con respecto a la distribución del error (Figura 4B), se observó que el grueso de las diferencias entre los dos métodos fue concentrado al inicio del cuadro de barras (0 – 0,2). En el 53% de las muestras evaluadas, se presentó una diferencia en el índice obtenido de 0,1; mientras que en el 84% de las muestras evaluadas existió una diferencia en el índice obtenido de 0,2. Los datos se ajustaron a una curva normal ($n = 300$; $= 0,1164$; $SD = 0,091$).

DISCUSIÓN

Una buena correspondencia de la estimación visual del porcentaje de daño con la evaluación de imágenes digitales ya ha sido reportada en trabajos anteriores en estudios realizados con enfermedades de plantas (6), en la evaluación de daño causado por plagas (20, 21) y en la evaluación de lesiones gástricas (22). En cuanto a la distribución del error, éste es mayor en los valores intermedios, lo que se explica a través de la ley de Weber-Fechner, que propone que el ojo humano estima daños altos o bajos con mayor precisión que rangos medios de severidad (23).

En la práctica, la existencia de una distribución normal es de especial importancia. De hecho, se da mayor peso a los resultados correspondientes a estos niveles intermedios, que son difíciles de medir o donde existe mayor probabilidad de cometer errores de apreciación. Esta situación puede ser importante al momento de tomar una decisión para recomendar un control enfocado en mejorar el manejo de la plaga.

Los resultados obtenidos apuntan a que con el procesamiento de imágenes digitales se pueden obtener datos más precisos y se eliminan errores originados por subjetividad. Esto concuerda con resultados obtenidos por otros investigadores (10, 20, 24, 25).

CONCLUSIONES

El análisis de imágenes digitales se ha utilizado con éxito desde hace algún tiempo atrás en investigaciones relacionadas con agricultura aplicada. Esta es la primera vez que se propone un método cuantitativo, con un procedimiento de evaluación más objetivo y preciso para evaluar niveles de daño provocados por las polillas de la papa y en particular *T. solanivora*. Se podría también usar en el caso de otros insectos plaga de la papa o de otros tubérculos. Esta metodología deja de lado la percepción humana y da paso al uso de herramientas tecnológicas que están a nuestro alcance y nos permiten tener mayor precisión. La evaluación de los daños mediante el método presentado en este trabajo requiere de un poco más de tiempo y esfuerzo que la evaluación visual pero, en contraparte, sin gastos excesivos (por el uso de acceso libre), se obtienen datos más depurados y confiables. Además, hay que mencionar que el SCION IMAGE tiene otras opciones, como la de poder medir cada una de las partículas dañadas. Esto permitiría cuantificar, por separado, el daño producido por varias plagas en un mismo tubérculo. Esta posibilidad parece muy interesante, en particular en la zona andina, considerando que diferentes especies de polillas de la papa se encuentran en simpatría.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Fundación McKnight por el financiamiento de este estudio a través del proyecto *Innovative Approaches for Integrated Pest Managment in the Andes* (Grant 09-022). Gracias a Omar Torres por los comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar este manuscrito.

REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

1. BARRAGÁN, A.; ZEDDAM, J. L.; ONORE, G.; CHEVASCO, V.; CHEVASCO, D.; MORTENSEN, E.; PADILLA, J.; ORBE, K. & LASSO, D. 2005. Problemática de las polillas de la papa en el Ecuador. Memorias del I Encuentro Ecuatoriano de la Papa. Quito, Ecuador, CIP, INIAP-PNRT-Papa, FCA-UCE. 8 pp.
2. GALLEGOS, P. & SUQUILLO, J. 1996. Monitoreo de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Polvony), en el centro y zonas paperas de frontera de la zona del Carchi. En informe Anual 1996 – 1997. INIAP. Quito, Ecuador.
3. TORRES, F. 1998. Biología y manejo integrado de la polilla centroamericana de la papa *Tecia solanivora* en Venezuela. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Fundación para el desarrollo de la Ciencia y Tecnología del estado de Táchira. Serie A-No 14. 57 p.

4. MENA, A. 2004. Comportamiento y control de polillas de la papa (*Tecia solanivora*, *Symmetrischema tangolias* y *Phthorimaea operculella*) en el Valle de Salcedo, Cotopaxi. Facultad de Agronomía, Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador. 125 pp.
5. GALLEGOS, P. 2003. Problemática de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en el Ecuador: antecedentes, desarrollos y perspectivas. En: López, A. (eds.). 2005. III Taller Internacional sobre la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. Cartagena de Indias, Colombia. Centro Internacional de la Papa (CIP). 25-36.
6. ARIAS, J.; JARAMILLO, J.; ARÉVALO, E.; ROCHA, N. & MUÑOZ, L. 1996. Evaluación de la incidencia y severidad del daño de la polilla gigante de la papa *Tecia solanivora* en el Departamento de Antioquia. Boletín de divulgación. Medellín, Colombia, ICA – CORPOICA. 24 pp.
7. MURCIA, G. & BARRETO, N. 1997. Evaluación de parámetros para el almacenamiento de semilla de papa (*Solanum tuberosum*) y mecanismos de control de polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) durante el mismo. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical y Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. 23 pp.
8. WIJEKOON, C.P.; GOODWIN, P.H. & HSIANG, T. 2008. Quantifying fungal infection of plant leaves by digital image analysis using Scion Image software. Journal of Microbiological Methods, **74**: 94-101.
9. PITAS, I. 2000. Digital Image Processing Algorithms and Applications. John Wiley & Sons, Inc.
10. O'NEAL, M.; LANDIS, D. & ISAACS, R. 2002. An inexpensive, accurate, method for measuring leaf area and defoliation through digital image analysis. Journal of Economic Entomology, **95** (6): 1190-1194.
11. JOHNSON, S. 2001. Indirect impacts on a phytophagous insect of birch: The role of fungal phytopathogens and leaf-mining insects. Tesis de Doctorado submitida a Departamento de Biología de la Universidad de York. 223 pp.
12. AUKER, L. & OVIATT, C. 2007. Observations on the colonization of the invasive tunicate *Didemnum* sp. Rhode Island Naturalist, **14** (1): 1 – 4.
13. LEE, D.; O'KEEFE, J.; HOLBROOK, N. & FIELD, T. 2003. Pigment dynamics and autumn leaf senescence in a New England deciduous forest, Eastern USA. Ecological Research, **18**: 677-694.
14. FEILD, T.; LEE, D. & HOLBROOK, N. 2001. Why leaves turn red in autumn. The role of antho-

- cyanins in senescing leaves of Red-osier dogwood. *Plant Physiology*, **127**: 566-574.
15. BUSCAGLIA, H. & VARCO, J. 2002. Early detection of cotton leaf nitrogen status using reflectance. *Journal of Plant Nutrition*, **25**: 2067-2080.
 16. BAKR, E. M. 2005. A new software for measuring leaf area, and area damaged by *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Applied Entomology*, **129**(3): 173-175.
 17. PIÑEIRO, G.; PERELMAN, S.; GUERSCHMAN, J. P. & PARUELO, J. M. 2008. How to evaluate models: Observed vs. predicted or predicted vs. observed? *Ecological Modelling*, **216**: 316-322.
 18. PARUELO, J. M., JOBBAGY, E.G., SALA, O.E., LAUENROTH, W.K. & BURKE, I.C., 1998. Functional and structural convergence of temperate grassland and shrubland ecosystems. *Ecological Modelling*, **8**: 194-206.
 19. SMITH, E.P. & ROSE, K.A., 1995. Model goodness-of-fit analysis using regression and related techniques. *Ecological Modelling*, **77**: 49-64.
 20. CHEN, Y. & WILLIAMS, K. A. 2006. Quantifying Western Flower Thrips (*Frankliniella occidentalis* Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) Damage on Ivy Geranium (*Pelargonium peltatum* (L.) L'Her ex Ait.) (Geraniaceae Juss.) with Adobe Photoshop and Scion Image Software. *Journal of the Kansas Entomological Society*, **79** (1): 83-87.
 21. GILBERT, M. & GRÉGOIRE, J. C. 2003. Visual, semi-quantitative assessments allow accurate estimates of leafminer population densities: an example comparing image processing and visual evaluation of damage by the horse chestnut leafminer *Cameraria ohridella* (Lep., Gracillariidae). *Journal of Applied Entomology*, **127**: 354 - 359.
 22. KHAN, H. A. 2004. Computer-assisted visualization and quantitation of experimental gastric lesions in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **49**: 89-95.
 23. HORSFALL, J. G. & BARRAT, R. W. 1945. An improved grading system for measuring plant diseases. *Phytopathology*, **35**: 655.
 24. SU, N. Y. & MESSENGER, M. T. 2000. Measuring wood consumption by subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) with digitized images. *Journal of Economic Entomology* **93** (2): 412-414.
 25. ALCHANATIS, V.; NAVON, A.; GLAZER, I. & LEVSKI, S. 2000. An image analysis system for measuring insect feeding effects caused by biopesticides. *Journal of Agricultural Engineering Research*, **77** (3): 289-296.

Estudio preliminar sobre la comunidad de primates en el bosque protector del Oglán Alto. Arajuno-Pastaza

Gabriel Alberto Carrillo Bilbao^{1,2,3,4} & Sarah Martin-Solano^{1,5}

¹ Estación Científica Amazónica de la Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
gacarrillo@andinanet.net

² Escuela de Biología y Química, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

³ Universidad Internacional Menéndez Pelayo, Madrid, España.

⁴ Ecociencia, Quito, Ecuador.

⁵ Unidad de Biología del comportamiento, Universidad de Lieja, Lieja, Bélgica.
sarahmartinsolano@gmail.com

Recibido: 2010-05-27, aprobado: 2010-08-31

RESUMEN.- Los primates juegan un papel ecológico crucial en los ecosistemas donde se encuentran, por lo tanto los esfuerzos que se realicen para su conservación apoyarán de manera directa la preservación de otros elementos del mismo ecosistema. La Reserva Amazónica del Oglán Alto es, en su mayoría, un bosque primario piemontano y de tierras bajas, entre 420 y 1.100 m.s.n.m., de donde se registran ocho especies de primates, de las cuales cinco se encuentran en el Libro Rojo (1) y además cuatro están bajo presión de caza. Por tal razón, es imprescindible conocer el estado real de la comunidad de primates presentes en esta reserva. Gracias a la elaboración de un sistema de senderos y a la creación de tres transectos, se registró seis especies de primates de las ocho mencionadas en el plan de manejo. Los índices de diversidad sugerirían una diversidad considerable. En el Ecuador, además, existen muy pocos estudios de primates en bosques de estribaciones amazónicas, por lo que estos resultados aportarán datos a las comparaciones y correlaciones tanto ecológicas como etológicas con estudios de primates de amazonía baja y de occidente.

PALABRAS CLAVE: Amazonía, diversidad, ecología, Oglan Alto, primates.

ABSTRACT.- Primates play a crucial ecological role within the ecosystems they inhabit; therefore any effort done in favor of their conservation, will also support

the preservation of the other elements of their ecosystem. The Amazonian Reserve of Oglán Alto is in its majority, a lowland forest and a piemontano primary forest, between 420 and 1100 m.s.n.m. Eight species of primates are registered, five of them are in the Red Book of Ecuador (1) and other four are under hunting pressure which makes it critical to know the real status of the primate community in this reserve. Thanks to the creation of a trail system and three transects, we have registered six of the eight registered species according with the environmental management plan from the Reserve. The diversity index suggests a considerable diversity. Considering that up to date, there is little data recorded in this region, these results will contribute to comparative research, ecological as well as ethological studies, on primates from the low Amazonia and the West.

KEY WORDS: Amazon, diversity, ecology, Oglan Alto, primates.

INTRODUCCIÓN

La Amazonía, considerada el bosque tropical más extenso del planeta, abarca alrededor de 6,6 millones de kilómetros cuadrados, lo que representa el 53 % de las selvas tropicales (2). Los bosques amazónicos se extienden en nueve países: Ecuador, Brasil, Surinam, Guyana, Guayana Francesa, Venezuela, Perú, Bolivia, y Colombia, presentando altos niveles de diversidad y endemismo (2) y la más alta diversidad de primates en el mundo, siendo así que por lo menos seis nuevas especies de primates se han descubierto en los diez últimos años (3).

A partir del análisis de los rangos de distribución de primates, se ha dividido la Amazonía en cuatro áreas o distritos de endemismo (Guayana, Ecuador, Perú y Brasil). Esto, a su vez, ha sido validado por estudios en otros grupos de vertebrados y por el análisis de los

rangos de distribución de primates (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). El distrito de Ecuador se encuentra dividido en dos zonas, Imeri y Napo que al igual que la de Guayana, mantienen más del 40 % del total de su extensión en áreas protegidas (12).

Las actividades antropogénicas son importantes en la pérdida de hábitats en la Amazonía ecuatoriana, especialmente por la conversión de bosques en tierras dedicadas a la agricultura, ganadería o industria (13, 14). En el caso de los primates, la destrucción de sus hábitats, la caza y la captura de ejemplares vivos para su exportación y uso local son las mayores amenazas para su conservación (15, 16). Como producto de la explosión demográfica, que coincidencialmente es mayor en países tropicales, se sabe que entre 1985 y 1995 América Latina y el Caribe han perdido el 9,7 % de bosques.

En concreto, los países en los que se registran poblaciones de primates, perdieron 125 140 km² de bosques anualmente, lo cual no sólo afecta a los propios primates, sino a todos los componentes del ecosistema (16, 14). Por otro lado, el avance del desarrollo social, petrolero y minero, la creación de proyectos de construcción de carreteras, colonización, proyectos hidroeléctricos y tala de bosques, entre otros, han causado que el Ecuador pierda anualmente alrededor del 1,8 % de su cobertura boscosa original (14). Por tanto, priorizar en el desarrollo e implementación de planes efectivos de conservación es fundamental para detener la fragmentación de estos bosques (12).

El Ecuador, hasta la fecha, registra 20 especies de primates distribuidas en cuatro familias: Cebidae, Atelidae, Pitheciidae y Aotidae (17, 1, 18). Un total de 15 especies se encuentran en los bosques tropicales de la Amazonía ecuatoriana.

Existe poca información acerca de los aspectos ecológicos y etológicos de muchas de las especies de primates presentes en el país (19, 20). Prueba de esto es que la mayoría de los recursos bibliográficos existentes sobre los primates ecuatorianos está basada en fuentes extranjeras (14); por tal razón, es necesario obtener datos relevantes sobre el estado actual de las poblaciones de primates (21), tomando en cuenta

que el Ecuador registra el 40 % del total de especies de primates del Nuevo Mundo (Platyrrhini) y el 10,7 % del total de especies a nivel mundial.

Existen numerosas razones por las cuales se deben realizar esfuerzos en la conservación de los primates. Los primates juegan un papel ecológico crucial en los ecosistemas donde estos se encuentran, y su pérdida causaría dramáticos efectos; por ejemplo, todas las especies de primates forman parte de las cadenas alimenticias actuando como presas o predadores y son también dispersores de semillas. Para tener una idea de la importancia que tienen los primates como dispersores en los bosques tropicales, más del 90 % de las plantas leñosas dependen de especies frugívoras para dispersar sus semillas, y los primates comprenden la mayor porción del total de la biomasa de los frugívoros neotropicales (22, 23, 17, 16, 24, 25). Dada la diversidad de primates en el Ecuador, su importancia en la dinámica de los bosques tropicales amazónicos es alta y su ausencia causaría un efecto cascada en la dinámica de los ecosistemas (26). Recordemos que usualmente tienen bajas tasas de crecimiento, una reproducción con largos intervalos entre nacimientos y un tiempo largo de desarrollo (27), lo cual indica que sus bajas densidades poblacionales en bosques intervenidos o en peligro los hacen indicadores muy sensibles del estrés antropogénico (21).

Finalmente, las similitudes genéticas y ecológicas entre los primates no humanos y los humanos pueden permitir dar paso a la necesidad instintiva y ética de conservar y preservar los hábitats de nuestros parientes cercanos (25). Por lo tanto, los esfuerzos satisfactorios que se realicen para su conservación apoyarán de manera directa a la preservación de otros elementos del mismo ecosistema (24).

Antecedentes

La Reserva Amazónica del Oglán Alto es un área de 3 344 ha ubicada en las coordenadas 0°5'19,9"N - - 80°30'46,0"O, entre los 420 y 1.000 m.s.n.m. en el Cantón Arajuno, Provincia de Pastaza. En su mayoría es bosque primario piemontano y de tierras bajas según la clasificación vegetal de Sierra (28). Estos bosques reciben una pluviosidad de 2.000–4.000 mm anuales y no se registran más de cuatro meses consecutivos con una pluviosidad menor a los 100 mm. Este bosque se caracteriza por grandes árboles, llegando en algunos casos a cincuenta o sesenta metros (1, 20, 29, 30).

El tipo de ecosistema presente en la reserva se extiende a lo largo de la línea ecuatorial, en las áreas con tierras bajas. La gran diversidad de especies vegetales es otra característica de estos bosques; de 400 individuos muestreados se han registrado 200 especies de árboles en 128 géneros y 49 familias (31). Ade-

más, la gran variedad de especies vegetales no arbóreas son las que conforman la mayor porción de la biomasa vegetal, lo cual es un verdadero potencial alimenticio para las distintas especies que se desarrollan en este tipo de ecosistemas (32).

El plan de manejo ambiental de la Reserva, realizado previamente a este proyecto (29), fue la base para la decisión de estudiar las poblaciones de primates, ya que se registraron ocho especies: *Callithrix pygmaea*, *Saguinus fuscicollis*, *Cebus albifrons*, *Saimiri sciureus*, *Lagothrix poeppigii*, *Ateles belzebuth*, *Alouatta seniculus* y *Pithecia monachus*, de las cuales cinco (*Lagothrix poeppigii*, *Ateles belzebuth*, *Alouatta seniculus*, *Cebus albifrons* y *Saguinus fuscicollis*) se encuentran incluidas en el libro rojo de mamíferos ecuatorianos (1) y cuatro (*Alouatta seniculus*, *Ateles belzebuth*, *Lagothrix poeppigii* y *Cebus albifrons*) se consideran como especies sometidas a presiones de caza según Redford y Robinson (33). Por tal razón fue imprescindible conocer el estado real de la comunidad de primates presentes en esta reserva. En abril de 2006 se inició el Proyecto Primates Oglán con una salida de prospección. En julio de 2006 se realizó la socialización del Proyecto frente a representantes de ACIA (Asociación de Comunidades Indígenas Arajuno), logrando la aceptación por parte de las comunidades para la ejecución del proyecto.

MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo desde enero del 2007 a noviembre del 2008, para lo cual se destinaron diez días de cada mes para la apertura y mapeo de senderos y transectos y diez días para la búsqueda, habituación y recolección de datos.

Se establecieron tres transectos: uno de tres kilómetros, otro de 1,5 km y otro de 300 m. Además de los transectos, se construyó una red de senderos de alrededor de 17 km, los cuales abarcan el área de una manera espaciada y heterogénea evitando así el re-conteo de individuos (Figura 1).

Cabe recalcar que este estudio se apoya en la metodología de “*Roadside counts*” (34) para monitorear siguiendo un sistema de senderos, el cual utiliza zonas heterogéneas donde los senderos mantienen distancias óptimas de separación para evitar el recuento de individuos. Para minimizar el sesgo en las observaciones se tomó muy en cuenta el protocolo del método de “*Traversing the area and detecting animals*” (35) y “*Line Transect Sampling from a Curving Path*” (36) que básicamente es similar al de “*Roadside counts*”, pero pone énfasis en variables como condiciones del hábitat respecto a variacio-

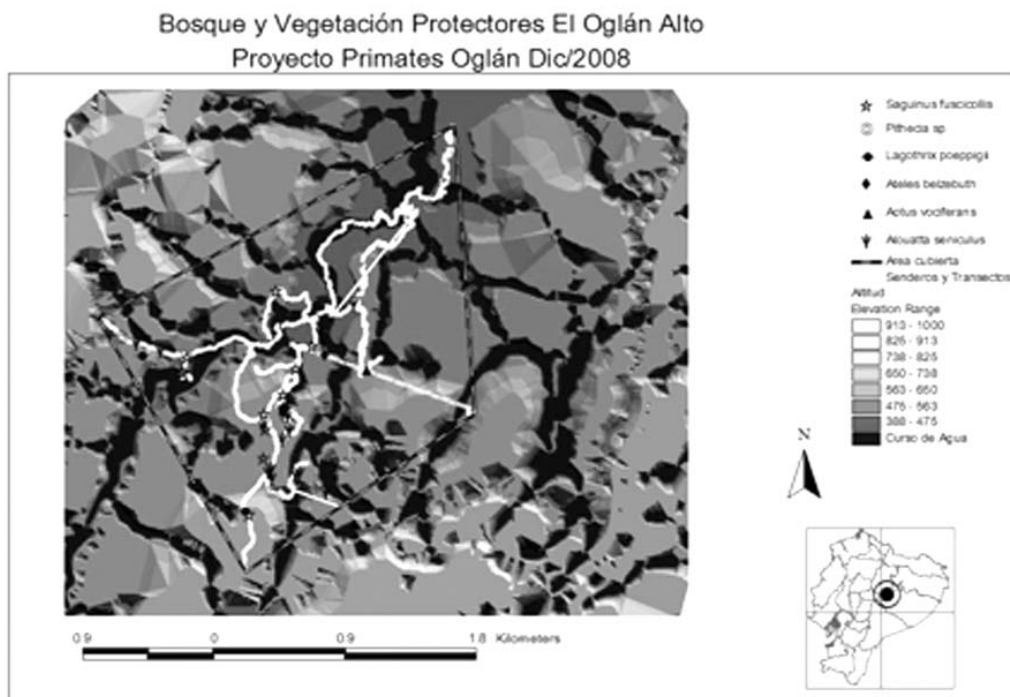


Figura 1. Avistamientos, transectos y senderos del Proyecto Primates Oglán

nes estacionales y condiciones climáticas. Por la dificultad propia asociada a las características geográficas de la zona las metodologías tradicionales requieren más tiempo y esfuerzo para su construcción.

Los primeros diez días de cada mes, dos grupos de observación (un investigador y un asistente) recorrieron los senderos y los transectos en un sentido entre las 6:00 h y 11:00 h y en el sentido contrario entre 13:00 h y 18:00 h, abarcando los picos de actividad de los primates; la velocidad promedio fue de 1,2 km/h (36, 35) con paradas cortas cada 100 m. Se determinó la presencia de primates mediante rastros (fecas), audición y visualización por medio de binoculares 8 x 40 (37, 38).

Se tomaron datos de ubicación de todos los registros y el número total de individuos observados; se siguió la misma metodología de mapeo de senderos y transectos para marcar y graficar estos puntos en un mapa. Se usaron planillas de avistaje para el registro de datos del estudio de monitoreo que incluyeron: ubicación, fecha, hora de inicio y hora de finalización de la observación, especie, número de individuos, composición grupal y datos descriptivos como observaciones y eventos inusuales.

El área de vida de los grupos estudiados fue realizada mediante el programa Arcview 3.2 con la extensión

Animal Movement 2.04 beta. Se generó un "*minumun convex polygon*" que es el polígono que incluye a todas las observaciones de menor área y se calculó la superficie del polígono (20, 39, 40).

El mapeo de los senderos y de los transectos se realizó con brújula y flexómetro; los senderos fueron marcados cada 25 m. Los datos de dirección y distancia fueron transformados a coordenadas UTM's usando un punto georeferenciado con un GPS y trigonometría básica en hojas de cálculo de Microsoft Excel; finalmente los mapas fueron elaborados en los programas Arcview 3.2 y Arcgis 9.0. Se han incluido en el mapa también caminos vecinales y árboles marcados así como los puntos de avistaje de primates (Figura 1).

Los índices de diversidad fueron calculados de acuerdo con Jost (41, 42, 43). Para la estimación del número de especies esperadas se utilizaron los índices Chao1 y Chao1-bc.

Los paquetes estadísticos utilizados para todos los análisis estadísticos fueron ESTIMATES, que se usó para estimar el número de especies totales, SPSS para los cálculos de la curva acumulativa, SPADE en el que se generaron los análisis de Chao1 y Chao1-bc; y DiversityCalculatorLJost500sp para calcular los índices de diversidad.

RESULTADOS

Seis especies de primates se han registrado en el área de estudio: tres correspondientes a la familia Atelidae y una especie de cada una de las familias Pitheciidae, Aotidae y Cebidae. De las seis especies se obtuvieron 42 registros: *Alouatta seniculus* (20 registros), *Saguinus fuscicollis* (15 registros), *Ateles belzebuth* (un registro), *Aotus vociferans* (un registro), *Lagothrix poeppigii* (dos registros) y *Pithecia* sp. (tres registros) mediante el método de observación directa, auditiva (Figura 1).

Se registraron seis grupos de *A. seniculus* (21 individuos), cuatro grupos de *S. fuscicollis* (16 individuos), un grupo de *L. poeppigii* (≥ 35 individuos), dos grupos de *Pithecia* sp. (≥ 2 individuos), un grupo de *Ateles belzebuth* (≥ 8 individuos) y un grupo de *Aotus vociferans* (≥ 1 individuo; Tabla 1).

El grupo A de *A. seniculus* está constituido por un macho adulto, una hembra adulta, un juvenil y un infante independiente; adicionalmente, se re-

gistró un individuo macho adulto solitario. El grupo A de *S. fuscicollis* está constituido ≥ 5 individuos siendo todos sus integrantes de similar tamaño y se han categorizado como adultos o subadultos. El área de vida preliminar para el grupo A de *A. seniculus* fue de 26,6 ha y para el grupo A de *S. fuscicollis* fue de 46,8 hectáreas (Figura 2).

Un total de 807 minutos de observación de primates se contabilizó hasta la fecha: 588 para *Alouatta*, 109 para *Saguinus*, 62 para *Lagothrix*, 8 para *Aotus*, 10 para *Pithecia* y 30 para *Ateles*. (Tabla 2).

La curva de acumulación de especies (Figura 3) muestra que la pendiente aún se encuentra en ascenso, no se evidencia una tendencia a estabilizarse.

El índice de Diversidad Exponencial de Shannon (effective number of species) es de 4,046. El índice Inverso de Simpson (Diversity of order) es de 3,460. El valor del índice de Chao1 (especies esperadas) es de 10,5 y del índice del Chao1-bc es de 7,5.

Tabla 1. Avistajes de Especies según el Número de grupos (n.o de Grupos), solitario (ind/solitarios), media de individuos por grupo (Ind/solitarios) y total de individuos (Total ind), en la reserva del Oglan Alto.

Espece	n.o de Grupos	Ind/solitarios	n.o ind/grupo	Total ind
<i>Alouatta seniculus</i>	6	1	3.5	21
<i>Saguinus fuscicollis</i>	4	0	4	16
<i>Pithecia</i> sp.	2	.	≥ 1	≥ 2
<i>Ateles belzebuth</i>	1	0	≥ 8	≥ 8
<i>Aotus vociferans</i>	1	.	≥ 1	≥ 1
<i>Lagothrix poeppigii</i>	1	0	≥ 35	≥ 35

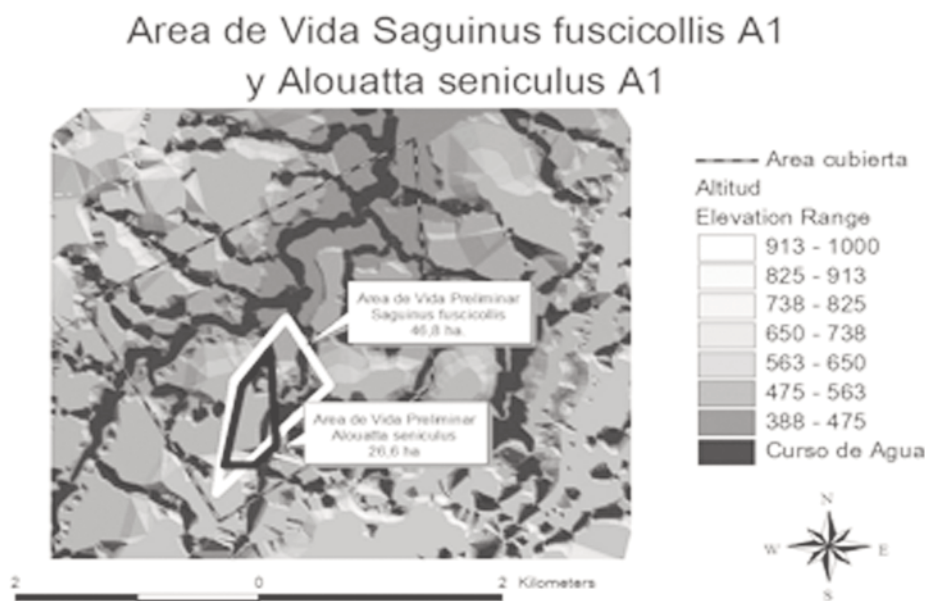


Figura 2. Área de vida de *Alouatta seniculus* A1 y de *Saguinus fuscicollis* A1

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Mediante la metodología planteada se han observado seis especies de primates, lo que difiere con respecto a los datos incluidos en el plan de manejo de la reserva, en el que se incluyeron ocho especies, a partir de las encuestas realizadas. Hay que destacar que las estimaciones de la riqueza de especies alcanzan diez (Chao1) y 7,5 (Chao1-bc) especies en la zona de estudio. Adicionalmente, basados en información bibliográfica sobre el área de vida de las distintas especies (44, 45, 46, 47, 40), se podría sugerir que hasta la fecha se han registrado un total de 15

grupos de primates, datos que serán aceptados o rechazados a medida que se continúe con la toma de datos demográficos. La curva acumulativa de especies no se saturó con los datos recogidos (Figura 3), lo que sugiere que el monitoreo tiene que continuar. Estos análisis permitirán en el futuro realizar y justificar comparaciones con análisis de datos de un monitoreo a largo plazo o con estudios en otras zonas.

Los valores obtenidos con los diferentes índices podrían sugerir que existe una diversidad considerable, lo que podría ser producto de las características de la reserva. El número de especies registradas mediante métodos

Tabla 2. Comportamiento por minutos registrados

Especie	Comportamiento	Minutos Registrados
<i>Alouatta seniculus</i>	Vter	140
	Vxx,Val,Esc	448
<i>Saguinus fuscicollis</i>	Vxx,Val,Esc	108
	Vcon	1
<i>Lagothrix poeppigii</i>	Vxx,Esc,Mxx	62
<i>Ateles belzebuth</i>	Mxx	30
<i>Pithecia sp.</i>	Esc,Val	5
	NR	5
<i>Aotus vociferans</i>	Vter	8

Vter=vocalización territorial, Vxx=Vocalización desconocida, Val=vocalización alarma, Esc=escape, Mxx=Movimiento desconocido, Nr=no registra

directos e indirectos para este estudio es de seis especies de primates, siendo mayor al número de especies registradas en los estudios llevados a cabo en el Parque Nacional Napo-Galeras y en el Parque Nacional Sangay con tres y ninguna especie respectivamente (48, 49). Al contar con escasos sitios de comparación en amazonía de estribaciones, podemos comparar con otros sitios de amazonía baja. Por ejemplo, en un estudio realizado por Heymann y Encarnación (50), encontraron en un monitoreo realizado en el río Curaray y Napo de tres a cinco especies; sin embargo, hay que tomar en cuenta que estos monitoreos se realizaron a corto plazo (menos de un mes). En el Parque Nacional Yasuní, los estudios a largo plazo han logrado identificar diez especies de primates (51, 52), lo cual

reflejaría la importancia de realizar monitoreos constantes y a largo plazo, minimizando el uso de registros bibliográficos ya que esto no permite evidenciar de manera concreta la presencia o ausencia de primates de un sector.

En el futuro se monitorearán zonas más bajas para abarcar la totalidad del rango altitudinal de la reserva y hacer comparaciones a lo largo de este gradiente. Se predice que el número de especie aumentará a medida que se incluyan más zonas de tierras bajas.

Esta reserva representa un refugio para la fauna ya que, en las zonas alejadas, los primates y demás mesomamíferos sufren una alta presión de caza (Bovy *et al*, en rev). De las seis especies encontradas, según la IUCN (53), dos se encuentran amenazadas: *L.*

poeppigii (EN) y *A. belzebuth* (VU). Además, tres se encuentran también en el libro rojo de mamíferos del Ecuador (1). Esto es una razón más para continuar con el monitoreo de la comunidad de primates de la Reserva del Oglán Alto.

Basados en la cantidad de información recopilada, los grupos de primates que mayor número de avistajes presentaron fueron seleccionados como los grupos de estudio. Según Emmons (46), el área de vida de la especie *S. fuscicollis*, puede ser de 16 a 100 ha. El área de vida del grupo de este estudio (46,8 ha) es mayor a los estudios realizados en Bolivia (15,25 ha) y en Perú (15,7 a 16,5 ha) (54, 55). Hay que tomar en cuenta que estos estudios son realizados en Amazonía baja. El área

de vida de *A. seniculus* (26,6 ha) es inferior a los estudios realizados en Caparú, Colombia (182 ha) y en Guyana (45 ha) pero levemente superior al estudio de La Macarena, Colombia (25 ha) (56, 57, 58). Es importante destacar que las áreas de vida presentadas son propias para los grupos en estudio dentro de la reserva del Oglán Alto.

Durante el desarrollo de este estudio se registraron datos comportamentales, ocasionales, ya que en un 77,8 % son comportamientos de vocalizaciones de alarma y eventos de escape, los cuales son característicos de grupos de primates no habituados, lo cual impide determinar las estrategias comportamentales de las especies en estudio (59).

En el Ecuador existen muy pocos estudios de pri-

mates en bosque de estribaciones amazónicas, por lo que estos resultados permitirán comparaciones y correlaciones tanto ecológicas como etológicas con estudios de primates de la Amazonía baja y también del oc-

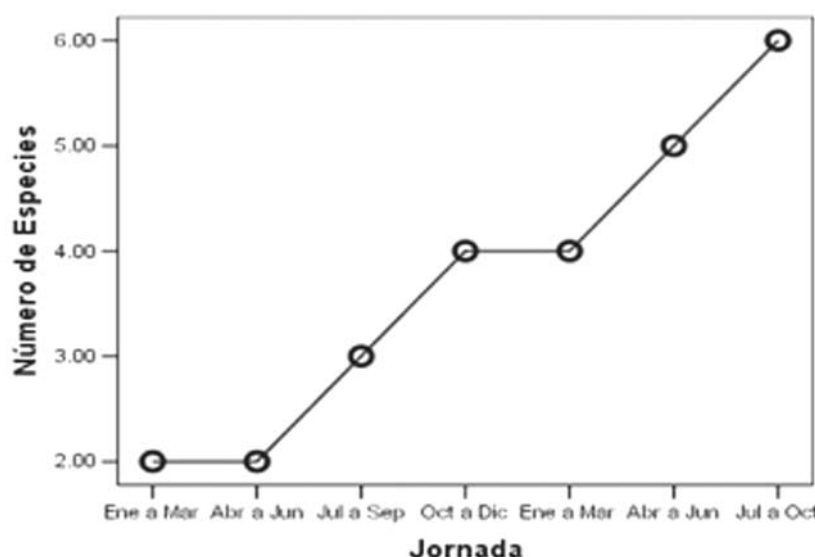


Figura 3. Curva Acumulación de Especies por jornadas de 3 meses de marzo 2007 a octubre 2008

cidente del país.

RECOMENDACIONES

- Dadas las condiciones geográficas de los bosques de estribación, la preparación de un transecto lineal de más de un kilómetro y medio requiere un incremento no lineal del esfuerzo hombre–tiempo, y por lo tanto del dinero necesario. Por este motivo, se propone como forma de apoyo a esta metodología clásica el recorrido de senderos de una manera sistemática, previendo variables como picos de actividad y condiciones climáticas, además de un análisis de datos apropiado, lo que se cree es una alternativa para la determinación acertada de la densidad poblacional de primates.
- Es imprescindible mencionar que al monitorear a largo plazo estaremos tomando constantemente datos demográficos sobre los grupos encontrados con el objetivo de no subestimar o sobrestimar la abundancia de primates del sector (Jost, comm. pers.), lo que aportaría confiabilidad a los análisis.
- No se debe realizar ningún análisis etológico mientras la habituación de los grupos no esté conseguida.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestras instituciones donantes FNRS, ECOCIENCIA, ORGÁNICA, AECID, UCE, así como a nuestros mentores y tutores Dr. Anthony Di-Fiore, Dr. Eduardo Fernández-Duque, Marie Claude Huynen; a nuestra institución Universidad Central del Ecuador, a los investigadores y profesores quienes nos han asesorado, Lou Jost, David Neill, Stella de la Torre, Esteban Suárez y un agradecimiento especial a la comunidad Pablo López del Oglán Alto, a todos los pasantes, voluntariados y tesisistas del Proyecto Primates Ecuador.

LITERATURA CITADA

1. TIRIRA D. ed, 2001. Libro Rojo de los Mamíferos del Ecuador. Quito-Ecuador.
2. CONSERVATION INTERNATIONAL, 2008. Estrategias de Conservación: Áreas Silvestres. PERU: CI PERU ed.
3. MITTERMEIER RA, RYLANDS AB, 2008. The World's 25 most endangered primates - 2008-2010. In: IPS 2008. Edinburg.
4. SNETHLAGE E, 1910. Sobre a distribuicao da avifauna campestre na Amazônia. Boletim do Museu Emilio Goeldi 6:226–235.
5. SICK H, 1967. Rios e enchentes na Amazônia como obstáculo para a avifauna. Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica 5 (Zoologia): pp.

- 495–520.
6. HAFFER J, 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165:131-137.
 7. RYLANDS AB, 1987. Primate communities in Amazonian forests: Their habitats and food resources. *Experientia* 43:265-279.
 8. CAPARELLA AP, 1988. Genetic variations in neotropical birds: implications for the speciation process. *Acta Congressus Internationalis Ornithologici* 19:1658-1673.
 9. CAPARELLA AP, 1991. Neotropical avian diversity and riverine barriers. *Acta Congressus Internationalis Ornithologici* 20:307–316.
 10. AYRES JM, CLUTTON-BROCK T, 1992. River boundaries and species range size in Amazonian primates. *The American Naturalist* 14:531–537.
 11. HAFFER J, 1992. On the “river effect” in some forest birds of southern Amazonia. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Serie Zoologia* 8:217–245.
 12. CARDOSO DA SILVA JM, RYLANDS AB, DA FONSECA GAB, 2005. The Fate of the Amazonian Areas of Endemism. *Conservation Biology* 19:689-694.
 13. GASCON C, BIERREGAARD R, LAURANCE W, RANKIN-DEMERONA J, 2001. Deforestation and forest fragmentation in the Amazon. In: *Lessons from Amazonia: the ecology and Conservation Biology* (Jr. B, Gascon C, Lovejoy T, Mesquita R, eds). New Haven, Connecticut: Yale University Press; 22–30.
 14. CARRILLO-BILBAO GA, 2005. *Primates ecuatorianos en Peligro, un Universo por Descubrir*. El Gavilán Digital 5.
 15. MITTERMEIER RA, CHENEY DL, 1987. Chapter 39: Conservation of primates and their habitats. In: *Primate Societies* (Smuts BB, Cheney DL, Seyfarth RM, Wrangham RW, Struhsaker TT, eds). Chicago: University of Chicago Press; pp. 477-490.
 16. CHAPMAN CA, PERES CA, 2001. Primate Conservation in the New Millennium: The Role of Scientists. *Evolutionary Anthropology* 10:16-33.
 17. DE LA TORRE S, 2000. *Primates de la Amazonía del Ecuador/ Primates of Amazonian Ecuador*. In: *Simbioe*. Quito-Ecuador.
 18. VAN ROOSMALEN M, VAN ROOSMALEN, T. Y MITTERMEIER, R.A., 2002. A taxonomic review of the titi monkeys, genus *Callicebus* Thomas, 1903, with the description of two new species, *Callicebus bernhardi* and *Callicebus stephennashi*, from Brazilia, Amazonia. *Neotrop Primates* 10(Suppl.):1–52.
 19. ALBUJA V. L, 2002. Mamíferos del Ecuador. In: *Diversidad y Conservación de los Mamíferos Neo-*

- tropicales (Ceballos G, Simonetti JA, eds). México: CONABIO; 271-327.
20. CARRILLO-BILBAO GA, 2005. Uso del Tiempo, área de vida y especies vegetales que forman parte de la dieta de *Callicebus discolor* (Primates: Cebidae) en el Parque Nacional Yasuní. Tesis de Licenciatura. Quito: Universidad Central del Ecuador.
21. CARRILLO-BILBAO GA, MARTIN-SOLANO S, BRAVO J, HUYNEN M-C. eds, 2008. Ecuador and Belgium working for the conservation of primates. BELGIUM: Lieja University.
22. CHENEY DL, SEYFARTH RM, SMUTS BB, WRANGHAM RW, 1987. The Study of Primates Societies Research. In: *Primate Societies* (Smuts BB, Cheney DL, Seyfarth RM, Wrangham RW, Struhsaker TT, eds). Chicago: The University of Chicago Press; 1-8.
23. TIRIRA D, 1999. Mamíferos del Ecuador. Quito - Ecuador: ImpreFEPP.
24. DI FIORE A, 2004. *Primate Conservation*. New-York, EEUU.: Mac-Graw-Hill.
25. LOVETT JC, MARSHALL AR, 2006. Why should we conserve primates. *African Journal of Ecology* 44:113-115.
26. CHAPMAN CA, ONDERDONK DA, 1998. Forests without primates: Primate/plant codependency. *American Journal of Primatology* 45:127-141.
27. COWLISHAW G, DUNBAR RIM, 2000. Chapter 4 - Community Ecology. In: *Primates Conservation*. Chicago, EUA: The University of the Chicago Press; pp. 57-92.
28. SIERRA R, 1999. Propuesta Preliminar de un Sistema de Clasificación de Vegetación para el Ecuador Continental. (INEFAN/GEF-BIRF P, ed). Quito- Ecuador: Ecociencia.
29. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, 2006. Plan de Manejo del Bosque del Oglán Alto. Arajuno-Pastaza. (Amazónica EC, ed). Quito-Ecuador: ECA.
30. CITES, 2000. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre.
31. CERÓN CE, REYES C. MCA, VARGAS-GREFA M, 2006. La cuenca alta del río Oglán, Pastaza-Ecuador, diversidad, ecología y flora. Quito: Editorial Universitaria.
32. OATES JF, 1987. Food distribution and foraging behavior. In: *Primate societies* (Smuts BB, Cheney DL, Seyfarth RM, Wrangham RW, Struhsaker TT, eds). Chicago: University of Chicago Press; pp 197-209.
33. REDFORD KH, ROBINSON JG, 1987. The game of choice: patterns of indian and colonist hunting in the

- neotropics. *American Anthropologist* 89:650-667.
34. BROWER J, ZAR, J., ENDE C. ed, 1998. *Field and Laboratory Methods for General Ecology*, 4th ed. USA: McGraw-Hill.
 35. ROSS C, REEVE N, 2003. Survey and census methods: population distribution and density in: Setchell, J & Curtis, D. (ed.). In: *Field and Laboratory Methods in Primatology, a practical guide* (Cambridge-University, ed). Cambridge-UK; pp. 91-101.
 36. HIBY L, KRISHNA M, 2001. Line Transect Sampling from a Curving Path. *Biometrics* 57:727-731.
 37. CARRILLO-BILBAO GA, 2004. Monitoreo Biológico, Socio-Económico y Cultural en el Bloque Sur. Reserva de la Biosfera Yasuní. Especialidad Primates. In: *Monitoreo, Biológico, Socio-Económico y Cultural en el Bloque Sur Reserva de la Biosfera Yasuní* (SIMBIOE, ed). Ecuador.
 38. CARRILLO-BILBAO GA, 2005. Monitoreo Biológico, Socio-Económico y Cultural en el Bloque Tarapoa. Reserva de Producción Faunística Cuyabeno. Especialidad Primates. In: *Monitoreo, Biológico, Socio-Económico y Cultural en el Bloque Tarapoa Reserva de Producción Faunística Cuyabeno* (SIMBIOE, ed). Ecuador.
 39. CARRILLO-BILBAO GA, DI FIORE A, FERNÁNDEZ-DUQUE E, 2005. Dieta, Forrajeo y Presupuesto de Tiempo en Cotoncillos (*Callicebus discolor*) del Parque Nacional Yasuní en la Amazonia Ecuatoriana. *Neotropical Primates* 13:7-11.
 40. FERNANDEZ-DUQUE E, DI FIORE A, CARRILLO-BILBAO G, 2008. Behavior, Ecology, and Demography of *Aotus vociferans* in Yasuní National Park, Ecuador. *Int J Primatol* 29:421-431.
 41. JOST L, 2006. Entropy and diversity. *Oikos* 113:363-375.
 42. JOST L, 2007. Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology* 88:2427-2439.
 43. JOST L, 2008. Dangerous diversity measures. In: *Forum, Conservation Biology*. Baños.
 44. CROCKETT CM, EISENBERG JF, 1987. Howlers: Variations in Group Size and Demography. In: *Primates Societies* (Smuts BB, Cheney DL, Seyfarth RM, Wrangham RW, Struhsaker TT, eds). Chicago: The University of Chicago Press; 54-68.
 45. WILSON GOLDIZEN A, 1987. Tamarins and Marmosets: Communal Care of Offspring. In: *Primate Societies* (Smuts BB, Cheney DL, Seyfarth RM, Wrangham RW, Struhsaker TT, eds). Chicago: The University of Chicago Press; 34-43.
 46. EMMONS LH. ed, 1997. *Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide*, 2nd ed. IL: The University of Chicago Press, Chicago, 396 pp.
 47. SCHMITT CA, DI FIORE A, LINK

- A, MATTHEWS LJ, MONTAGUE MJ, DERBY AM, HURST D, CAR-RILLO-BILBAO GA, SENDALL C, FIELD MY, FERNÁNDEZ-DUQUE E, 2007. Comparative ranging behavior of eight species of primates in a western Amazonian rainforest. Program of the Seventy-Sixth Annual Meeting of the American Association of Physical Anthropologists.
48. TIRIRA D, BURNEO S, CASTRO I, 1996. Mamíferos del Parque Nacional Napo-Galeras (Napo-Ecuador). Quito: Jatun Sacha-Triton Ecuador.
49. CASTRO I, JACOME M, NOLIVOS L, SORNOZA F, 1999. Inventario de Fauna (Aves y Mamíferos) del Parque Nacional Sangay. Quito: Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales.
50. HEYMANN EW, ENCARNACIÓN C. F, 2002. Primates of the río Curaray, Northern Peruvian Amazon. *International Journal of Primatology* 23:191-201.
51. DI FIORE A, 2001. Investigación ecológica y de comportamiento de primates en el Parque Nacional Yasuní. In: *Memorias del Seminario-Taller Yasuní: "Conservación y desarrollo sostenible del Parque Nacional Yasuní y su área de influencia"* - (Jorgenson JP, Coello Rodríguez M, eds). Quito, Ecuador: SIMBIOE; 165-173.
52. POZO R. WE, 2004. Habitat preferences of six non-atelidae primates of Yasuni, Ecuador. *Ecol apl* 3:128-133.
53. IUCN, 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 22 January 2010.
54. SOINI P, 1987. Ecology of the Saddle-Back Tamarin *Saguinus fuscicollis* illiger on the Río Pacaya, Northeastern Peru. *Folia Primatologica* 49:11-32.
55. BUCHANAN-SMITH H, 1990. Polyspecific association of two tamarin species, *Saguinus labiatus* and *Saguinus fuscicollis*, in Bolivia. *American Journal of Primatology* 22:205-214.
56. IZAWA K, NISHIMURA A, 1988. Primate fauna at the study site, La Macarena, Colombia. *Field Studies of New World Monkeys. La Macarena, Colombia* 1:5-11.
57. JULLIOT C, 1992. Diet diversity and habitat of howler monkeys. XIVth congress of the International Primatological Society, Strasbourg, IPS:278.
58. PALACIOS E, RODRIGUEZ A, 2001. Ranging pattern and use of space in a group of red howler monkeys (*Alouatta seniculus*) in a southeastern Colombian rainforest. *American Journal of Primatology* 55:233-251.
59. WILLIAMSON EA, FEISTNER ATC, 2003. Habituating primates: processes, techniques, variables and ethics. In: *Field and Laboratory*

REVISIÓN DE TRABAJOS CIENTÍFICOS

La gastrulación en ranas con diversos modos de reproducción

Eugenia M. del Pino¹

¹Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
edelpino@puce.edu.ec

Recibido: 2010-04-12, aprobado: 2010-08-27

RESUMEN.- Las características de la gastrulación fueron analizadas en las siguientes ranas ecuatorianas *Gastrotheca riobambae*, *Colostethus* (= *Epipedobates*) *machalilla* y *Engystomops* (= *Physalaemus*) *randi* en comparación con *Xenopus laevis*, la rana que se estudia como organismo modelo del desarrollo embrionario. Se han encontrado profundas diferencias en el proceso de gastrulación en estas ranas. La comparación señala que en *C. machalilla* y *G. riobambae*, ranas con desarrollo lento, la convergencia y extensión dorsales (CED) es un proceso que ocurre después de la gastrulación mientras que en las de desarrollo rápido (*X. laevis*, y *E. randi*) la CED ocurre durante la gastrulación.

PALABRAS CLAVE: Gastrulación, *Colostethus*, *Epipedobates*, *Engystomops*, *Physalaemus*, *Gastrotheca*, *Xenopus*.

ABSTRACT.- The features of gastrulation were analyzed in the following frogs from Ecuador *Gastrotheca riobambae*, *Colostethus* (= *Epipedobates*) *machalilla*, and *Engystomops* (= *Physalaemus*) *randi* in comparison with *Xenopus laevis*, the model organism of frog development. There are major differences in the gastrulation process among these frogs. The comparison indicates that in *C. machalilla* and *G. riobambae*, frogs with slow development, dorsal convergence and extension (CED) occurs after gastrulation, whereas in frogs with rapid development (*X. laevis* and *E. randi*), CED occurs during gastrulation.

KEY WORDS: Gastrulation, *Colostethus*, *Epipedobates*, *Engystomops*, *Physalaemus*, *Gastrotheca*, *Xenopus*.

INTRODUCCIÓN

La Biología del Desarrollo analiza los mecanismos celulares y moleculares de la embriogénesis en unas pocas especies,

a las que se les conoce como los organismos modelo del desarrollo embrionario (1). Así, en muchos laboratorios del mundo se analiza a fondo el desarrollo de

la rana acuática *Xenopus laevis*, el organismo modelo de desarrollo para las ranas (1). El conocimiento del desarrollo de las especies modelo nos brinda un marco conceptual comparativo para el estudio de otras, cuya embriogénesis puede presentar modificaciones.

En nuestro laboratorio estudiamos el desarrollo embrionario de ranas con diversos modos reproductivos y lo comparamos con la embriogénesis de *X. laevis*, pues las variaciones de los fenómenos del desarrollo en diferentes especies corresponden a experimentos naturales, cuyo análisis permite un mejor entendimiento de la embriogénesis. Nuestro propósito es avanzar en la comprensión de los mecanismos del desarrollo embrionario y a la vez contribuir al mejor conocimiento de la naturaleza del Ecuador.

Para estudiar el desarrollo temprano se requiere mantener a las ranas en el laboratorio y por tal motivo solamente una pequeña parte de la gran biodiversidad de anfibios ecuatorianos ha podido analizarse desde el punto de vista del desarrollo embrionario. En nuestros estudios hemos tenido la importante colaboración del laboratorio de Herpetología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y de su proyecto “Balsa de los sapos”, cuya meta es la reproducción en cautiverio de numerosas especies de ranas. Hemos estudiado el desarrollo de la rana túngara *Engys-*

tomops (= *Physalaemus*) *randi* Leiuperidae, de la rana dendrobátida *Colostethus* (= *Epipedobates*) *machalilla* y de la rana marsupial *Gastrotheca riobambae* Hemiphractidae, entre otras. En este trabajo se resumen los avances en la comprensión del desarrollo embrionario temprano de estas especies en comparación con la rana *X. laevis*.

Muchas ranas, como es el caso de *X. laevis*, depositan los gametos en el agua, la fecundación es externa y al cabo de 24 a 48 horas eclosionan larvas de vida libre, los renacuajos (2). Estas larvas crecen y durante la metamorfosis, el cuerpo se remodela. En la metamorfosis se reabsorben la cola y las branquias, y se desarrollan las extremidades para dar origen a una nueva rana. La rana juvenil requiere crecer y madurar sexualmente para convertirse en un adulto (1). Cabe señalar que la reproducción acuática es solamente una de las 29 maneras diferentes de reproducción que han sido detectadas en las ranas y que muchas especies de ranas que habitan en las regiones tropicales del mundo depositan sus huevos en ambientes terrestres (3). La humedad del bosque tropical ha permitido a las ranas experimentar con la reproducción y evolucionar modos reproductivos alejados del agua (3). Cabe resaltar que los huevos de las ranas carecen de mecanismos que impidan su desecación, y es por eso que la humedad ambiental de los bosques húmedos ha sido un factor

determinante para la evolución de muchos modos reproductivos en las ranas que viven en tales regiones.

Las ranas del género *Engystomops* protegen a sus huevos y embriones tempranos en nidos de espuma que flotan en los charcos temporales en los que estas ranas se reproducen (4, 5). El nido de espuma se construye a partir de la gelatina de huevo y durante el amplexus, o abrazo sexual, el macho bate con sus patas ese material gelatinoso para formar espuma en la cual los blancos huevos se camuflan y se mantienen suspendidos sobre el agua, evitando de esta manera la depredación de huevos y embriones. Al cabo de aproximadamente 2 días, ocurre la eclosión y los renacuajos caen al agua subyacente (6). Hemos analizado el desarrollo embrionario temprano de *E. pustulosus*, *E. coloradum* y *E. randi* (6).

El desarrollo a partir de huevos terrestres ocurre en las ranas dendrobátidas, entre otras. En *C. machalilla*, los huevos son depositados en nidos terrestres que son protegidos por el macho hasta la eclosión de los renacuajos (7). En tal momento, el macho transporta a sus renacuajos sobre su espalda hasta el agua en donde se completa el desarrollo y los renacuajos alcanzan la metamorfosis (7). El desarrollo de *C. machalilla* en el nido terrestre dura 19 días y hemos podido analizar su desarrollo embrionario hasta la eclosión de los renacuajos (8).

El caso de la rana marsupial *G. riobambae*, Hemiphractidae, es más complejo debido a que los huevos son alojados en el cuerpo de la madre. Al momento del amplexus los embriones son depositados en una bolsa especializada de la madre (9). La hembra transporta a sus embriones en la bolsa materna por aproximadamente 4 meses, al cabo de los cuales nacen renacuajos avanzados, los que completan su desarrollo en el agua (9). Cabe señalarse que las crías nacen directamente como ranas en la mayoría de especies de ranas marsupiales. En tales casos se ha eliminado totalmente el desarrollo acuático.

Hemos analizado la biología reproductiva de la hembra y las características de los embriones de la rana marsupial *G. riobambae*. La bolsa materna es una especialización de la piel dorsal de la hembra y responde a una hormona similar a la progesterona, la hormona de la gestación, con la formación de cámaras vascularizadas para cada uno de los 120 embriones que por promedio se alojan en la bolsa materna (9). Por su parte, las branquias, que en los renacuajos de otras ranas corresponden a estructuras filamentosas que permiten el intercambio gaseoso en el agua, han sido modificadas notablemente. Las branquias de *G. riobambae* se denominan branquias acampanadas debido a su morfología, pues son dos discos que forman un saco altamente vascularizado alrededor de cada embrión. La circu-

lación sanguínea materna de las cámaras embrónicas de la bolsa materna y la circulación embrionaria, presente en las branquias acampanadas, se encuentran en estrecha cercanía. El tipo de intercambios que ocurren entre la madre y los embriones durante el largo período de incubación es en gran parte desconocido, pero la morfología sugiere una estrecha adaptación morfológica y fisiológica entre la madre y embriones para permitir la incubación en el cuerpo materno. Las adaptaciones morfológicas y fisiológicas para la incubación de embriones de la rana marsupial *G. riobambae* representan un modo paralelo al de los mamíferos para la reproducción terrestre (9). En este trabajo se revisan las modificaciones del desarrollo embrionario temprano de la rana marsupial *G. riobambae*, de la rana dendrobátida *C. machalilla* y de la rana con nidos de espuma *E. randi* en comparación con *X. laevis*.

Tamaño del huevo y velocidad del desarrollo

Los huevos de la rana *X. laevis* tienen un hemisferio pigmentado de color oscuro, el denominado “hemisferio animal”; en tanto, el hemisferio opuesto, llamado “hemisferio vegetal”, tiene color claro. El huevo de *X. laevis* mide 1.2 mm de diámetro y en cada desove, la hembra deposita miles de huevos en el agua. Los renacuajos eclosionan al cabo de dos días desde la fecundación

(2). La velocidad del desarrollo de *X. laevis* es rápida en comparación con otras ranas.

Las ranas con nidos de espuma del género *Engystomops* presentan gran similitud con *X. laevis* en cuanto al tamaño del huevo y velocidad del desarrollo. Los huevos de *E. coloradurum* miden 1.2 mm de diámetro, como en *X. laevis*. En contraste, el huevo de *E. randi* mide solamente 0.9 mm de diámetro, lo que significa que el volumen del huevo de *X. laevis* y *E. coloradurum* es superior en 2.3 veces al del huevo de *E. randi*. Los huevos de *E. coloradurum* son uniformemente blancos a diferencia de *X. laevis*. Esta característica ha sido observada también en *E. randi*, *E. pustulosus* (6) y otras especies de *Engystomops* (trabajo en progreso). El color blanco tiene importancia para el camuflaje de los aproximadamente 120 huevos en el blanco nido de espuma de estas especies. Aún cuando los embriones de *Engystomops* son blancos, se encontró que no son albinos, pues tienen pigmento oscuro interno, que se distribuye alrededor de los núcleos (6). La velocidad del desarrollo de los huevos de *E. randi* y *E. coloradurum* en el nido de espuma es similar a lo observado en *X. laevis*, y al cabo de 2 días eclosionan los renacuajos. Es decir, la estrategia reproductiva de *Engystomops* consiste en la formación de nidos de espuma con pequeños huevos dotados de rápido desarrollo (6).

Los nidos terrestres de la rana dendrobátida *C. machalilla* contienen entre 8 a 16 huevos con pigmento oscuro en el hemisferio animal, como en *X. laevis* (8). El tamaño del huevo varía grandemente entre especies de dendrobátidos, así en *C. machalilla* el huevo mide 1.6 mm de diámetro, en *Epipedobates tricolor* 2 mm de diámetro, y en *Dendrobates auratus* el diámetro del huevo es de 3.5 mm de diámetro (10). La relación de volúmenes señala que el huevo de *C. machalilla* es 2.3 veces más grande que el huevo de *X. laevis*, en tanto que el volumen del huevo de *D. auratus* es 25 veces superior al de *X. laevis*. A pesar de las diferencias en el tamaño del huevo, el desarrollo embrionario de las ranas dendrobátidas es parecido entre sí en cuanto a su morfología y a que requieren de aproximadamente de 19 días desde la fecundación hasta la eclosión de renacuajos avanzados (8, 10).

Los embriones de la rana marsupial *G. riobambae* tienen una apariencia blanco amarillenta uniforme, miden 3 mm de diámetro y su volumen es aproximadamente 16-25 veces superior al del huevo de *X. laevis*. En otras especies de ranas marsupiales los huevos alcanzan hasta 10 mm o más de diámetro (11). El desarrollo embrionario protegido en el interior de la bolsa materna ocurre lentamente y alrededor de 100 renacuajos avanzados eclosionan después de 120 días de incubación (11).

El desarrollo que alcanza el renacuajo al tiempo de la eclosión es variable en las diferentes especies. Por tal motivo, consideramos que el tiempo requerido para que los embriones avancen desde la fecundación hasta la culminación del proceso de gastrulación brinda un mejor indicador de la velocidad del desarrollo. Los embriones de *X. laevis* requieren 14 horas para este proceso (2). Las 24 horas requeridas por los embriones de *E. coloradum* es un tiempo ligeramente superior a lo que necesitan los embriones de *X. laevis* para avanzar hasta el final de la gastrulación. (6). En cambio, los embriones de la rana dendrobátida *C. machalilla* requieren de 4 días (8) y los embriones de la rana marsupial *G. riobambae* toman 14 días para el mismo proceso (12). De acuerdo a estas diferencias consideramos que *X. laevis* y *E. coloradum* tienen desarrollo rápido, en tanto que la rana dendrobátida *C. machalilla* y la rana marsupial *G. riobambae* gozan de desarrollo lento. Cabe señalar que aunque el desarrollo embrionario de las ranas es influenciado por la temperatura, las diferencias temporales en la embriogénesis de las ranas de desarrollo lento y rápido son extremadamente grandes para que puedan homologarse solamente con cambios de la temperatura.

Patrones de gastrulación

La morfología de la gastrulación de *X. laevis* al igual que la de varias especies de ranas y urodelos ha sido ampliamente analizada debido a la facilidad de obtener embriones para estudio. Durante el proceso de la gastrulación en las ranas se forma una hendidura, el labio dorsal del blastoporo, en la región subecuatorial. El labio dorsal del blastoporo tiene la propiedad de duplicar los ejes al ser transplantado al lado ventral de otro embrión. Por tal motivo se le conoce como “el organizador”. Las características moleculares del organizador han sido ampliamente estudiadas y se han encontrado numerosos genes que se expresan en esta región del embrión y que tienen la propiedad de duplicar los ejes del embrión al ser expresados en el lado ventral (13). Uno de los genes del organizador es el gen *Lim1* (también conocido como *Lhx1*) (14).

Debido a que todas las ranas analizadas forman un labio dorsal del blastoporo, era de importancia determinar la expresión del gen *Lim1* en la gástrula temprana. Realizamos este análisis al nivel de proteína mediante inmunodetección en montaje entero con un anticuerpo contra la proteína *Lim1*. Determinamos que la proteína *Lim1* se expre-

sa en el labio dorsal del blastoporo de *X. laevis*, *E. randi*, *C. machalilla* y *G. riobambae* (15). Estos descubrimientos señalan que la expresión génica del organizador es altamente conservada. No se ha determinado si el transplante del labio dorsal del blastoporo en la gástrula de diferentes ranas produciría duplicación de los ejes (15).

Una vez que se ha formado el labio del blastoporo, se profundiza y extiende lateral y ventralmente hasta formar un anillo alrededor del tapón de yema (Fig. 1). La formación del blastoporo obedece a movimientos morfogenéticos, entre los cuales cabe señalar el

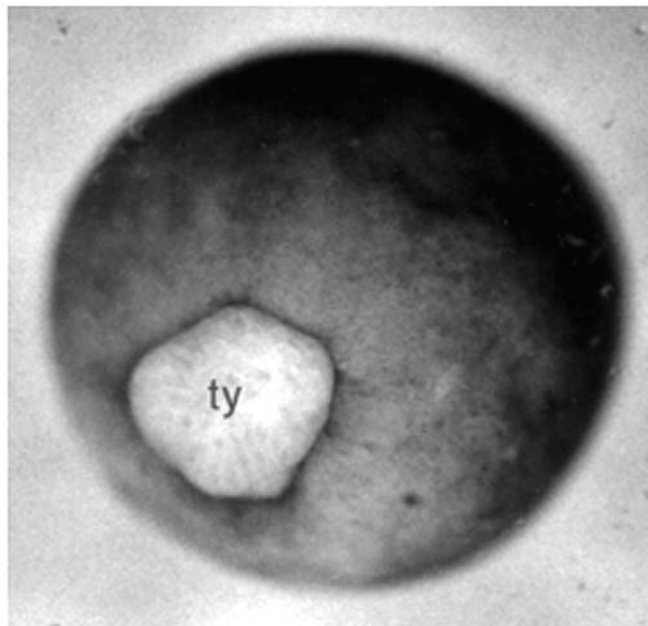


Figura 1. Apariencia externa de la gástrula media de *C. machalilla*. El blastoporo rodea al tapón de yema. Conforme avanza la gastrulación el tapón de yema se reduce hasta ser completamente internalizado cuando se cierra el blastoporo. Abreviatura: ty, tapón de yema.

proceso de involución que guía la internalización de las células superficiales, así como el proceso de CED que cambia la forma del embrión de la esférica del huevo a la alargada del renacuajo (16). Al completar la gastrulación se establece el plan del cuerpo con sus tres capas germinales: el ectodermo, el mesodermo y el endodermo tanto en las ranas, como en todos los vertebrados (1).

En nuestro trabajo nos hemos centrado en el estudio de la gastrulación por la importancia de este proceso y justamente para contribuir a su mejor entendimiento. Todas las ranas estudiadas (*X. laevis*, *E. randi*, *C. machalilla* y *G. riobambae*) forman un blastoporo alrededor de un tapón de yema (Fig. 1). En todos los casos, se forma un labio dorsal del blastoporo en la región sub ecuatorial del huevo. El mismo es morfológicamente visible al inicio de la gastrulación. Sin embargo hemos detectado sutiles diferencias respecto a la extensión del arquenterón y al inicio de la CED, como se señala a continuación.

Uno de los descubrimientos más significativos de nuestro trabajo fue determinar el modo de gastrulación de la rana marsupial *G. riobambae* (17). Los grandes huevos de esta rana forman un área de pequeñas células alrededor del blastoporo. Cuando al final de la gastrulación se retrae el tapón de yema y se cierra el blastoporo, se

forma un disco embriónico alrededor del blastoporo cerrado (Fig.2). El cuerpo del embrión se deriva de este pequeño disco de células (17). En el interior, debido a los movimientos de la gastrulación se forma una nueva cavidad, el arquenterón o intestino primitivo, la cual es muy pequeña y situada directamente por debajo del disco embriónico (Fig. 2). El desarrollo a partir de un disco embriónico es característico de las aves y no de las ranas y el modo de gastrulación de *G. riobambae* es el modo más divergente de gastrulación que se ha detectado en las ranas (17).

Al comparar los embriones de *G. riobambae* con los embriones de *X. laevis* detectamos que la extensión del arquenterón se había retardado en la gástrula de *G. riobambae* (17). Mientras en *X. laevis* el proceso de gastrulación y extensión del arquenterón ocurren simultáneamente, en los embriones de la rana marsupial *G. riobambae*, primero se completa el cerramiento del blastoporo y luego se inicia la extensión del arquenterón (Fig.2). De modo similar a *X. laevis*, los embriones de rápido desarrollo de la rana con nidos de espuma, *E. randi*, expanden el arquenterón durante la gastrulación, en tanto que la rana dendrobátida, *C. machalilla*, cuyo desarrollo es lento, sigue un patrón similar al de *G. riobambae* con un retardo en la extensión del arquenterón.

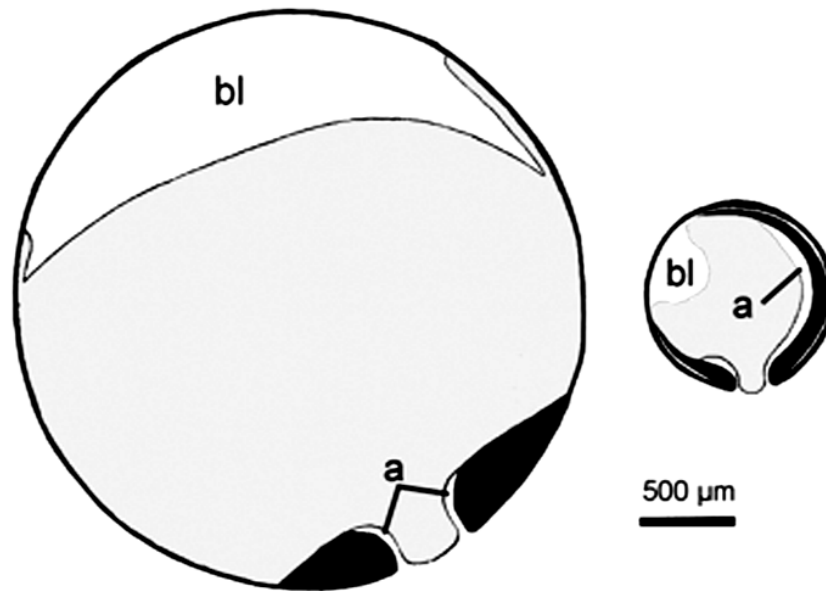


Figura 2. Esquemas de secciones sagitales de la gástrula media de *G. riobambae* y *X. laevis*. En *G. riobambae* el arquenterón se forma durante la gastrulación y se expande después del cerramiento del blastoporo. En cambio, en *X. laevis* la extensión del arquenterón está solapada con el proceso de gastrulación. Los dibujos están realizados a escala. Imagen modificada de la referencia (9). Abreviaturas: a, arquenterón; bl, blastoceles.

Varios movimientos morfogenéticos contribuyen a la formación y extensión del arquenterón, entre ellos la CED juega un importante papel. Los movimientos de CED se inician en la gástrula media de *X. laevis* y son responsables de concentrar a las células hacia el lado dorsal, mientras al mismo tiempo el embrión se alarga en sentido antero-posterior (18, 19). La CED permite el cambio de forma del embrión de la forma esférica del huevo a la alargada del renacuajo. Como resultado de proceso de CED, se forma el notocordio en la línea media dorsal del embrión de *X. laevis* (18, 19). La expresión del gen *Brachyury* (*Bra*) en el notocordio temprano es

evidencia molecular de que se han iniciado los movimientos de CED (20).

Mediante inmuno-detección en montaje entero para la proteína Bra hemos determinado el inicio del alargamiento del notocordio, es decir el inicio de la CED en los embriones de diferentes ranas (12, 21, 22). Los resultados señalan importante variabilidad. En las ranas con desarrollo rápido, *X. laevis*, y en la rana con nidos de espuma, *E. randi*, el alargamiento del notocordio se inicia en la gástrula media (Fig. 3). En tanto en las ranas con desarrollo lento, *C. machalilla* y *G. riobambae*, el inicio de la extensión del notocordio se ha retardado hasta completar la gastrulación (Fig. 3).

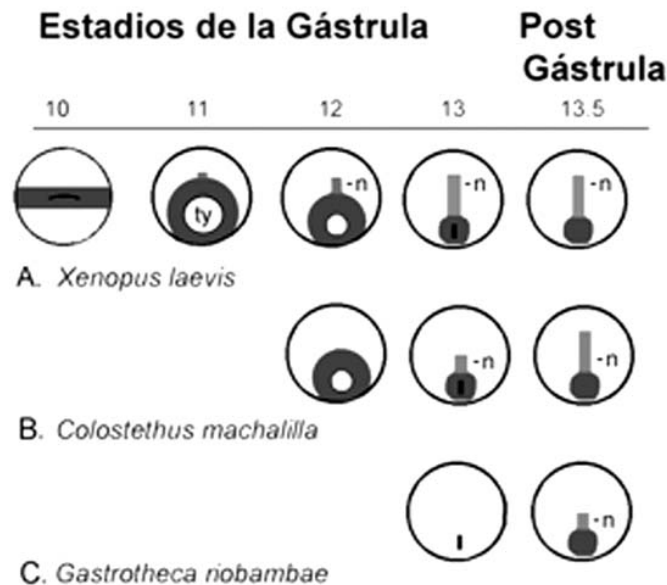


Figura 3. Comparación de la expresión de Bra en la gástrula de (A) *X. laevis*, (B) *C. machalilla* y (C) *G. riobambae*. La expresión de Bra se representa en color negro. Se muestra la expresión de Bra en células profundas del mesodermo prospectivo, que aparece como un anillo alrededor del tapón de yema y en el notocordio en *X. laevis* (24). La extensión del notocordio se inicia durante la gastrulación en *X. laevis* (24) y está retrasada hasta el cerramiento del notocordio en *G. riobambae* y *C. machalilla* (12, 21). Imagen modificada de la referencia (25). Abreviaturas: n, notocordio; ty, tapón de yema.

Cabe preguntarse sobre el significado de las diferencias encontradas: en primer lugar la comparación señala que los movimientos de CED no son intrínsecos a la gastrulación. La CED es un módulo del desarrollo que se encuentra solapado con la gastrulación en ranas de desarrollo rápido (10, 22). Los embriones de *X. laevis*, que experimentalmente tienen defectos en el gen *dsh*, cierran el blastoporo en ausencia de alargamiento del notocordio y del cuerpo (23). El gen *dsh* es parte de la ruta metabólica de la polaridad celular plana que es responsable de

la CED y los embriones defectuosos para *dsh* brindan una evidencia experimental de la modularidad de los procesos de desarrollo embrionario (23).

INTERPRETACIÓN Y CONCLUSIONES

Debido a que la CED alarga el cuerpo del embrión, cabe suponer que en especies con desarrollo acuático el rápido alargamiento del cuerpo es una necesidad para el desarrollo del renacuajo, dicha larva puede nadar y así ocultarse de los predadores. En tanto que en aquellas ranas que tienen repro-

ducción más lenta, no existe esa presión de un rápido alargamiento del cuerpo debido a sus adaptaciones terrestres, y la CED ha sido retrasada hasta completar la gastrulación.

Nuestros resultados señalan que la tarea importante que se realiza durante la gastrulación es la internalización de las células para formar las tres capas germinales. El alargamiento del cuerpo es otro proceso que puede o no estar solapado con la gastrulación. La comparación del desarrollo temprano de diversas ranas nos ha permitido alcanzar esta conclusión.

Desde el punto de vista del mejor conocimiento de las especies ecuatorianas, es de resaltar que las adaptaciones terrestres en las ranas dendrobatidas (Dendrobatidae) y de la rana marsupial *G. riobambae* (Hemiphractidae) van asociadas con lento desarrollo, en tanto que el desarrollo sobre el agua en los nidos de espuma de las ranas túngara (Leuiperidae) es acelerado, al igual que en el organismo modelo del desarrollo, la rana *X. laevis*.

AGRADECIMIENTOS

Se expresan sinceros agradecimientos a todos los estudiantes y colaboradores del laboratorio de Biología del Desarrollo de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) por su apoyo a lo largo de muchos años. Sus aportes han permitido alcanzar esta síntesis. En particular se agradece a la Lic. N. Sáenz Ponce por sus comentarios

críticos. Se reconoce con gratitud la donación de embriones de diferentes ranas realizada por los Drs. L. Coloma, S. Ron, D. Almeida Reinoso, otros miembros del laboratorio de Herpetología de la PUCE y de su proyecto “Balsa de los sapos”. Este trabajo se benefició de las becas de investigación de la PUCE 2008 y 2009 y de becas de investigación anteriores de la PUCE. Se agradece la beca de investigación otorgada por la Academia de Ciencias para el Mundo en Desarrollo, TWAS 07-017 LDC/BIO/LA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wolpert, L.; Jessell, T.; Lawrence, P.; Meyerowitz, E.; Roberson, E. & Smith, J. 2007. Principles of development. Tercera Edición. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
2. Nieuwkoop, P.D. & Faber, J. 1994. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin), Garland Publishing, New York.
3. Duellman W. E. & Trueb L. 1986. Biology of Amphibians. McGraw-Hill, New York.
4. Davidson E. H. & Hough B. R. 1969. Synchronous oogenesis in *Engystomops pustulosus*, a neotropic anuran suitable for laboratory studies: localization in the embryo of RNA synthesized at the lampbrush stage. Journal of Experimental Zoology 172: 25-48.

5. Ryan M. J. 1985. The Túngara Frog: A Study in Sexual Selection and Communication. Chicago: The University of Chicago Press. Chicago.
6. Romero-Carvajal A.; Sáenz-Ponce N.; Venegas-Ferrín M.; Almeida-Reinoso D.; Lee C.; Bond J.; Ryan M. J.; Wallingford J. B. & del Pino, E.M. 2009. Embryogenesis and Laboratory Maintenance of the Foam-Nesting Túngara Frogs, Genus *Engystomops* (= *Physalaemus*). *Developmental Dynamics* 238: 1444–1454.
7. Coloma, L. A. 1995. Ecuadorian frogs of the genus *C. machalilla* (Anura: Dendrobatidae). *Miscellaneous Publication Natural History Museum. University of Kansas, Lawrence* 87: 1-74.
8. del Pino, E. M.; Ávila, M. E.; Pérez, O. D.; Benítez, M. S.; Alarcón, I.; Noboa, V. & Moya, I. M. 2004. Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *International Journal of Developmental Biology*. 48: 663-670.
9. del Pino, E. M. 1989. Modifications of oogenesis and Development in Marsupial frogs. *Development* 107: 169-187.
10. del Pino, E. M.; Venegas-Ferrín, M.; Romero-Carvajal A.; Montenegro-Larrea P.; Sáenz-Ponce N.; Moya I. M.; Alarcón I.; Sudou N.; Yamamoto S. & Taira, M. 2007. A comparative analysis of frog early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U. S. A.* 104: 11882-11888.
12. del Pino E. M. & Escobar B. 1981. Embryonic stages of *Gastrotheca riobambae* (Fowler) during maternal incubation and comparison of development with that of other eggbrooding hyliid frogs. *Journal of Morphology* 167: 277-295.
12. del Pino, E. M. 1996. The expression of *Brachyury (T)* during gastrulation in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *Developmental Biology* 177: 64–72.
13. De Robertis, E.M. 2006. Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos. *Nature Reviews Molecular and Cell Biology* 7: 296–302.
14. Taira, M.; Otani, H.; Saint-Jeannet, J.P. & Dawid, I.B. 1994. Role of the LIM class homeodomain protein *Xlim-1* in neural and muscle induction by the Spemann organizer in *Xenopus*. *Nature* 372: 677-679.
15. Venegas-Ferrín, M.; Sudou, N.; Taira, M. & del Pino, E.M. 2010. Comparison of *Lim1* expression in embryos of frogs with different modes of reproduction. *International Journal Developmental Biology* 54: 195-202.
16. Keller, R. & Shook, D. 2004. Gastrulation in amphibians. En: Stern, C.D. ed. *Gastrulation from Cells to*

- Embryo. 171-203. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
17. del Pino E. M. & Elinson R. P. 1983. Gastrulation produces an embryonic disc, a novel developmental pattern for frogs. *Nature* 306: 589-591.
 18. Keller, R. 1975. Vital dye mapping of the gastrula and neurula of *Xenopus laevis*. I. Prospective areas and morphogenetic movements of the superficial layer. *Developmental Biology* 42: 222-241.
 19. Keller, R. 1976. Vital dye mapping of the gastrula and neurula of *Xenopus laevis*. II. Prospective areas and morphogenetic movements of the deep layer. *Developmental Biology* 51: 118-137.
 20. Winklbauer, R. 1990. Mesodermal cell migration during *Xenopus* gastrulation. *Developmental Biology* 142: 155-168.
 21. Benítez, M.-S. & del Pino, E. M. 2002. The expression of Brachyury during development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *Developmental Dynamics* 225: 592-596.
 22. Moya, I. M.; Alarcón, I. & del Pino, E. M. 2007. Gastrulation of *Gastrotheca riobambae* in comparison with other frogs. *Developmental Biology* 304: 467-478.
 23. Ewald, A.J.; Peyrot, S.M.; Tyszk, J.M.; Fraser, S.E. & Wallingford J.B. 2004. Regional requirements for *Dishevelled* signaling during *Xenopus* gastrulation: separable effects on blastopore closure, mesendoderm internalization and archenteron formation. *Development* 131: 6195-6209.
 24. Smith, J. C.; Price, B. M. J. ; Green, J. B.A.; Weigel, D. & Herrmann, B.G. 1991. Expression of a *Xenopus* homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* 67: 79-87.
 25. Benítez, M. S. & del Pino, E. M. 2003. La expresión de Brachyury en ranas con modos divergentes de desarrollo. *Revista de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador* 71: 7-14.

NOTAS CIENTÍFICAS

Simposio: 200 años de Humboldt

Carlos A. Soria

Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador,
Sociedad Ecuatoriana de Ciencias Biológicas, núcleo de Pichincha

casoria@puce.edu.ec

A partir del siglo XV, llegaron a América grandes exploradores europeos que desafiaron temerariamente el rico legado natural y humano de las nuevas tierras, desconocidas hasta entonces, guiados por intereses de variada índole.

El naturalista alemán, Alexander von Humboldt fue un gran explorador científico, un filántropo y humanista que usó su fortuna personal para realizar sus exploraciones, de las cuales nacieron la geoeología y la climatología, disciplinas que iba desarrollando con cada paso que daba en los más de 10 000 kilómetros de recorrido por Sudamérica en menos de un año.

Sus observaciones, colecciones y escritos de nuestros volcanes, páramos, altiplanos, trópicos y corrientes marinas describieron desde su cosmovisión la existencia de geografías y ecologías impensables y desconocidas en la Europa de hace doscientos años. Sus registros sobre presión atmosférica, tempe-

ratura del aire y del mar, puntos de ebullición del agua, cambios de altura desde el mar a las nieves perpetuas, duración solar diurna y refracción de la luz, la inclinación magnética o las condiciones del suelo, entre las que puedo citar, fueron bases para el desarrollo de sus conceptos sobre líneas isotérmicas y geomagnetismo.

Humboldt dio a entender desde ese momento que las variedades vegetales encontradas respondían a la composición volcánica de nuestros suelos y vertientes, a los microclimas creados por los vientos alisios y rayos solares casi perpendiculares, a la altura de los recovecos de los Andes y a las corrientes marinas de nuestra geografía.

Se sentaban las bases del Ecuador mega-diverso, cuyo territorio, a pesar de representar apenas cerca del 1 % de la superficie de la tierra, alberga más de veinte mil especies botánicas. Dentro de ellas, un sinnúmero de plantas medicinales de conocimiento ancestral, que

han inspirado a químicos, farmacéuticos, médicos y shamanes en el descubrimiento, extracción y aplicación de nuevos principios activos.

Hay mucho que explorar y escribir sobre estos temas: fibras maderables diversas, lignocelulosas, frutos exóticos, los aceites alimenticios o aromáticos perfumados y otros aceites lineales no saturados de alto y fino rendimiento mecánico; los azúcares, amino-ácidos, péptidos, colorantes, vitaminas y antioxidantes, por nombrar unos pocos, son los secretos moleculares que podrían inspirar a las nuevas generaciones de científicos, ávidos por conocer nuestra riqueza genética, inicialmente reportada por pioneros como Humboldt.

El nombre de este naturalista se puede encontrar en instituciones, fundaciones, monumentos, parques, fenómenos naturales o fauna que llevan su nombre; su paso fortuito dejó una huella inmortal en América.

La Pontificia Universidad Católica del Ecuador y la Sociedad Ecuatoriana de Biología, Núcleo de Pichincha, auspiciaron este simposio en honor a Humboldt, el cual se llevó a cabo el 19 de agosto del 2010. Su quehacer científico fue redescubierto por conferencistas ecuatorianos y alemanes que refrescaron el paso de este explorador por América.

Fue un honor haber sido responsable de la organización y moderación de este simposio. Agradezco el apoyo

brindado por la Dra. Laura Arcos Terán, Decana de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, y a la Mter. Mercedes Rodríguez-Riglos, Directora de la Escuela de Biología. Aprecio la colaboración de la Dra. Eugenia del Pino en la organización del evento, a los panelistas, otros colaboradores y al público que llenó nuestro auditorio con su presencia y entusiasmo.

BIBLIOGRAFÍA

- Franzle O. 2001. *Alexander von Humboldt's holistic world view and modern inter-and transdisciplinary ecological research*. *Northeastern Naturalist* **8**, 57.
- Knobloch E. 2006. *Alexander von Humboldt: The Explorer and the scientist. The global and the local: The History of Science and the Culture Integration of Europe*. *Proceedings of the 2nd ICESHS (Cracow, Poland, September 6-9)* p 38-48. Ed. M Kokowski.
- Romero G. 2001. *Alexander von Humboldt's legacy in Venezuela*. *Northeastern Naturalist* **8**, 33.

Unidad de la ciencia en el pensamiento de Humbolt

Oswaldo Báez Tobar

Universidad Central del Ecuador

oswaldobaez@hotmail.com

Para entender la amplitud del pensamiento científico de Alexander von Humboldt y su proyecto científico es preciso mencionar la preparación académica que recibió en la Universidad de Berlín, Gotinga, Hamburgo y en la Escuela de Minas de Freiberg. Estudió matemática, botánica, zoología, anatomía comparada, geografía, geología, vulcanología; minería, lenguas, historia de la cultura, economía política nacional e internacional, además dibujo y grabado. Se relacionó con las más distinguidas personalidades de la cultura y ciencia europea: Johann Goethe, Johann Blumenback (zoólogo), Karl Ludwig Willenou (botánico), Georg Forster (geólogo), Cuvier (zoólogo), Gay-Lussac y Bethelot (químicos), Laplace (astrónomo).

Humboldt se preparó para su proyecto científico. Sus primeros 30 años los dedicó a su preparación para el viaje de estudio en tierras equinocciales de América que le tomaría cinco años; trabajó 50 años en el análisis e interpretación de datos, la preparación y publicación de los libros que contienen su gran obra científica. "Mi verdadera y única

finalidad es investigar cómo se entretienen todas las fuerzas naturales, la influencia de la naturaleza muerta sobre el mundo vivo animal y vegetal". El viaje a América tuvo lugar entre 1799 y 1804, visitó Venezuela, Cuba, Colombia, Ecuador, Perú, México y Estados Unidos. (Mayer-Abich, 1985).

Los conocimientos científicos de Humboldt fueron los más avanzados de su época; a eso se sumó el dominio del método y técnicas de investigación científica. Sostuvo que no puede haber conocimiento científico sin demostración verificable. Empleó numerosos instrumentos de observación y medición geofísica: sextante, cronómetro, hipsómetro, barómetro, telescopio; inclinómetro y declinómetro; termómetro y aerómetro; eudiómetro, electrómetro y el higrómetro, cianómetro... Y estudió las plantas y los animales en relación con las condiciones ambientales. Además observó y describió a las personas que vivían en cada paisaje, en sus contextos sociales, económicos, políticos e históricos, con lo cual logró la aprehensión de la realidad total.

Contribución científica

La principal contribución a la ciencia consta en los textos sudamericanos y otras publicaciones:

- *Viaje a las regiones equinociales del Nuevo Continente*. Obra en 35 volúmenes, publicados en París entre 1805-1834. Incluye varias obras subordinadas, entre ellas: *Ensayo sobre la geografía de las plantas, acompañado de una tabla física de las regiones equinociales* (1807), y *Nova génera de especies de plantas*, que contiene la descripción de más de 4 000 especies de plantas, Humboldt, Bonpland y Kunth.
 - *Observaciones Zoológicas y Anatomía Comparada*, París, 1799-1803.
 - Cuadros de la Naturaleza.
- Cosmos*. Contiene una descripción del mundo físico que había observado y estudiado durante 50 años; representa la síntesis filosófica de todos los conocimientos de su tiempo.
- Contribuciones a la cartografía mediante el levantamiento de mapas físicos de algunas regiones visitadas y perfiles de mapas de asociaciones vegetales.
 - Concepción de varios principios científicos: de la relación entre la latitud y la altitud, unidad dinámica de la naturaleza y del principio de la continentalidad, este último luego de viajar a Rusia y comparar las observaciones de América y Asia.

Contribución a la Botánica y la Fitogeografía

Los aportes a la botánica morfológica y botánica sistemática fueron importantes; pero la contribución científica mayor está en la geografía de las plantas o fitogeografía. En el Ensayo sobre la geografía de las plantas (terminado en Guayaquil en 1803) Humboldt resume las más innovadoras concepciones de la geología, historia de las plantas, taxonomía, ecología, distribución de las plantas y el transformismo. (Zúñiga, 1964). Es, por lo mismo, una síntesis de conceptos y principios de varias ciencias naturales para explicar la regularidad en la distribución de las plantas y las formaciones vegetales. “La geografía de las plantas hizo visibles los variados mosaicos paisajísticos y su interrelación funcional y propuso la idea de la unidad dinámica y variada de la naturaleza” (Castrillón, 2001).

Contribución a la Ecología

La base conceptual inicial de la ecología es otra de las contribuciones de Humboldt; está contenida en el entendimiento humboldtiano de “las interrelaciones entre los organismos entre sí y con su entorno animado e inanimado”. En esta concepción se halla el núcleo de la ecología. Humboldt se propuso “reunir datos para ampliar una ciencia que apenas está en esbozo y falta definición, que en ocasiones es llamada Física del mundo, Teoría de la Tierra, Geo-

grafía física". (Holl, 2001). Esta concepción sustenta a la ecología, aunque la denominación de ecología se debió a Ernest Haeckel en 1866.

El paisaje como término científico-geográfico fue también introducido a principios del siglo XIX por Humboldt al definir al paisaje como la totalidad de características de una región de la Tierra, que abarca la fisiografía, geología y geomorfología regional. (Naveh & Lieberman, 1990). De la conjunción de la ecología y el paisaje surgió la Ecología del Paisaje, que es la descripción de un área geográfica a base de los factores que lo generan: suelo, latitud y altitud, el clima y sus elementos: temperatura, pluviosidad, heliofanía, vientos, humedad ambiental, y la descripción de la cubierta vegetal como el reflejo de su ecología. Bajo el concepto de paisaje, la naturaleza es concebida como un mosaico de unidades definibles: el paisaje ecológico (cuya definición global fue desarrollada en por el geógrafo y botánico alemán Carl Troll en 1938).

Humboldt consideró al paisaje como un espacio de interrelación dentro de la naturaleza y también entre el ser humano y la naturaleza. Así prefijó una visión integradora y globalizante, que casi dos siglos después se concretó en la macroecología, disciplina que surgió de la necesidad de aprehender la realidad regional y global del mundo viviente. La macroecología

tiene la virtud de ampliar la visión más allá del ecosistema, del paisaje, de la ecorregión... para abarcar escalas superiores. La macroecología es una nueva manera de estudiar las relaciones entre los organismos y su ambiente; esto implica caracterizar y explicar los patrones estadísticos de abundancia, distribución y diversidad, para lo cual trabaja a escalas espaciales y temporales grandes, según James Brown (2003). En los trabajos de Humboldt se encuentra el germen del enfoque macroecológico para el estudio de la naturaleza viviente.

La unidad de la Ciencia en el pensamiento de Humboldt

Humboldt fue formado en la observación y experimentación científica de exigencia y reflexión newtonianas, de hondura y rigor kantianos, y amplitud enciclopedista. Hombre sabio con sensibilidad para lo natural y lo humano. Tuvo una capacidad intelectual extraordinaria para relacionar el mundo natural y humano. Humboldt logró conocer distintas ramas de la ciencia; su deseo fue discernir los fenómenos físicos en su interconexión para comprender a la naturaleza como un todo... (Meyer-Alich, 1985). La naturaleza aprehendida por la ciencia cultivada por Humboldt aflora como una unidad en la diversidad de los seres y fenómenos que lo constituyen, entre los cuales existe armonía.

He aquí la clave para entender el pensamiento humboldtiano: la unidad de la naturaleza expresada en la unidad y totalidad de la ciencia. Humboldt buscó la comprensión integral de la Tierra como un todo orgánico, como un cosmos. Así la visión y comprensión integral de la ciencia alcanzó con Humboldt su apogeo y su culminación histórica.

“Sé muy bien que no estoy a la altura de mi gran obra sobre la naturaleza. Esta empresa es un poco grande para un particular, pero no es deshonra sucumbir ante un gran proyecto. El ser humano debe querer lo grande y bueno” afirmó Humboldt en el ocaso de su vida. Este es el mensaje del gran científico y humanista. En esta frase expresa la relación necesaria entre las ciencias naturales y las humanidades.

BIBLIOGRAFÍA

- Brown, J. 2003. Macroecología. Fondo de Cultura Económica. México.
- Castrillón, A. 2001. Humboldt: los viajes, las naturalezas y las ciencias. En: El regreso de Humboldt. Exposición en el Museo de la Ciudad de Quito, junio-agosto 2001.
- Holl, F. 2001. El regreso de de Humboldt: Alexander von Humboldt en Colombia y Ecuador. En: El regreso de Humboldt. Exposición en el Museo de la Ciudad de Quito, junio-agosto 2001.
- Meyer-Abich, A. 1985. Humboldt. Salvat Editores, S. A., Barcelona.
- Naveh, Z., Lieberman, A. 1990. Landscape Ecology: Teoría y Aplicación. Spriger-Verlag, New York.
- Zúñiga, N. 1964. Humboldt y la Geografía de las Plantas. Talleres Gráficos Nacionales, Quito.

Animal Asymmetries: Evolution and Mechanisms

Martin Blum

University of Hohenheim, Institute of Zoology, Garbenstrasse 30, D-70593 Stuttgart,
Germany

Martin.Blum@uni-hohenheim.de

Asymmetry is a feature of animal body plans, which often reveals itself only upon closer inspection. While asymmetric coiling of snail shells is obvious even to the untrained eye, sea stars and sea urchins don't even seem to qualify as bilaterians at first glance, and vertebrate asymmetry is restricted to the asymmetric placement of many of the inner organs of the chest and abdomen.

In my talk I will present asymmetries of animal body plans in protostomians and deuterostomians and discuss their origin and functional relevance. As to the underlying molecular mechanisms, the asymmetric Nodal signaling cascade is a conserved prerequisite for asymmetric body plan specification in all cases. I will present evidence that symmetry breakage by cilia-driven leftward flow presents an ancestral character of vertebrates, likely the chordate phylum and maybe all deuterostomes. In vertebrates, leftward flow occurs in a transient structure, a monociliated epithelium, which is derived from superficial mesoderm and localizes to the

archenteron roof during gastrulation. The chick as an example for the highly derived birds lacks superficial mesoderm and flow. This loss should be secondary, as flow is present from fish and amphibians to mammals.

As well established as leftward flow is as a mechanism of symmetry breakage, as little understood are the exact events around flow, i.e. whether a morphogen is asymmetrically transported across the ciliary field, or whether flow is sensed on the left side, and a cascade of events set into action downstream of flow.

We have recently performed a number of experiments in the South African clawed frog *Xenopus laevis*, which is a particularly accessible model organism for laterality studies, to get insight into these questions. To that end we have performed gain- and loss-of-function studies in which particular components have been knocked down or misexpressed in defined tissues of the frog gastrula and neurula embryo. Our results show that asymmetric transport of a morphogen from right to left via flow

cannot account for symmetry breakage, as flow on the right side is dispensable for symmetry breakage. Rather, flow down-regulates an inhibitor of Nodal, which in frog is called Coco (cerl2 in mouse, charon in zebrafish) specifically on the left side of the ciliated epithelium. Thus, symmetry breakage occurs by release of repression of the Nodal signaling cascade.

Earlier components, which have been described to be asymmetrically localized in early *Xenopus* embryos, could not be confirmed in our experiments. Rather we could show that these so-called early determinants (such as serotonin and the ion pump H-K-ATPase) are involved in the morphogenesis of the ciliated epithelium, most likely by acting upon non-canonical Wnt signaling.

Finally, we have studied the mechanisms by which the first asymmetric cue is transported to the left side, where the Nodal cascade is activated and asymmetric heart looping is induced. We find gap junctional communications to be at the center of this transfer. I will present a comprehensive model of symmetry breakage in the frog *Xenopus*, which should serve as a reference point to investigate symmetry breakage in other deuterostomians as well.

The insights gained in recent years into evolution and mechanisms of animal asymmetry have been made possi-

ble because of international collaborations of scientists from different backgrounds and working on different model organisms. What nowadays is considered standard for scientific research was uncommon in Alexander von Humboldt's days. Humboldt himself can be considered a pioneer of globalized research, as well as of research across discipline boundaries. It is therefore with particular delight to be able to present this lecture to an international audience at the Symposium "200 años of Humboldt" in Quito, the capital of Ecuador, where Humboldt has travelled and worked extensively, and to conduct research in collaboration with Ecuadorian scientists on Ecuadorian frog species.

El impacto de Humboldt en la Botánica y Fitogeografía del Ecuador

Katya Romoleroux

Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador

KROMOLEROUX@puce.edu.ec

Breve reseña sobre el viaje de Humboldt a América

Alexander von Humboldt nace en Berlín en 1769 de una familia rica y noble, su padre muere cuando aún es niño. En 1790, inicia sus estudios en economía en Göttingen; sin embargo, su interés fue siempre las ciencias naturales y termina especializándose en estas áreas. En 1796, mientras es director de una industria minera en Freiberg, su madre muere dejando una herencia apreciable, la cual Humboldt posteriormente usa para la gran expedición científica que había planificado a América.

En 1799, inicia su viaje a América en compañía del botánico francés Aimé de Bonpland, reciben un permiso especial del rey de España para ser recibidos en las colonias españolas. Desde 1799 hasta 1804 visitan los actuales países de Venezuela, Cuba, Colombia, Ecuador, Perú, México, Estados Unidos, y el 9 de julio de 1804 regresan desde Filadelfia hasta Francia (Nelken, 1980).

Estadía de Humboldt y Bonpland en el Ecuador

A fines de diciembre de 1801, Humboldt y Bonpland llegan al Ecuador, atraviesan Carchi e Imbabura y llegan a Quito en enero de 1802, su anfitrión fue Juan Pío Montúfar, su estadía en Quito se prolonga hasta julio de 1802. Durante este período los dos científicos ascendieron al Antisana, al Pichincha y posteriormente al Chimborazo, considerado en ese entonces el volcán más alto del mundo; otras montañas visitadas por ellos fueron Cotacachi, Imbabura, Cayambe, Paschoa, Atacazo, Corazón, Rumiñahui e Iliniza. Luego viajan al sur del Ecuador, en compañía de Carlos Montúfar, ascendieron el Cotopaxi y visitaron varias localidades pasando por Cuenca y Loja donde visitan y estudian los bosques de Cinchona, planta conocida como remedio para curar la malaria; visitan además Zaruma, Gonzanamá hasta Macará. En agosto de 1802, dejan el Ecuador y se dirigen al Perú, posteriormente el 9 de enero de 1803 regresan a Guayaquil, donde se reúnen con Juan Tafalla, botá-

nico español, y visitan Samborondón. Durante su estadía en el Ecuador recorren un total de 169 localidades, en la mayoría de éstas, Humboldt y Bonpland, hacen colecciones de plantas y de otros organismos, además de valiosas observaciones y gráficos que serán esenciales para el progreso de la botánica y la fitogeografía (Sandwith, 1926).

Resultados científicos del viaje Humboldt a América

Colecciones de plantas:

Se colectaron más de 25 000 especímenes de plantas, además de datos climatológicos, geográficos y ecológicos.

Las colecciones se hicieron por triplicado y fueron enviadas a París en tres diferentes barcos para evitar pérdidas, todas llegaron.

Entre los años 1805-1825 Humboldt, Bonpland y Kunth, botánico alemán discípulo de Willdenow, trabajaron arduamente en la catalogación, identificación y descripción en estas muestras.

Descripciones de plantas:

Se realizan descripciones de 7 000 diferentes especies de plantas incluyendo 4 000 nuevas especies para la ciencia. De estas descripciones 5 500 fueron angiospermas (plantas con flores), de éstas 3 000 eran enteramente nuevas (Humboldt, 1807).

La diversidad de las plantas conocidas en el mundo aumentó de 10 000 a

14 000 especies, ningún otro viaje había añadido tantas nuevas especies de plantas.

Muchas de las especies descritas por Humboldt, Bonpland y Kunth fueron anteriormente descritas e ilustradas por el botánico español radicado en Colombia José Celestino Mutis (1770-1806); sin embargo, los datos de Mutis no llegaron a publicarse sino mucho después que los de Humboldt.

Una de las publicaciones más completas con las descripciones de las plantas colectadas es la obra en siete tomos: "Nova Genera et Species Plantarum" descritas por Kunth, Bonpland y Humboldt (1815-1825).

Aporte de las colecciones realizadas por Humboldt y Bonpland para la botánica del Ecuador

Humboldt y Bonpland fueron los primeros botánicos que hicieron una colección importante de plantas ecuatorianas que fue transportada exitosamente a Europa. Sus colecciones fueron depositadas en los principales herbarios de esa época París y Berlín y fueron la base para la publicación de muchos nuevos taxones ecuatorianos.

En la publicación en dos tomos de "Plantes Équinoxiales" (Humboldt y Bonpland 1808, 1809), describen por primera vez varias plantas americanas y más de 20 nuevas especies ecuatorianas con sus respectivas ilustraciones. Algunas de ellas muy útiles como es el caso de *Andromachia igniaria*, cuya

corteza era utilizada para encender leña (Suplemento Ministerial, 2009); en Loja, Humboldt estudia las variedades de *Cinchona* o quinina, la planta curativa contra la malaria, descubre una variedad nueva y mejor a la que nombran *Cinchona condaminea* (Minguet, 1985). Aunque los duplicados de estas especies tipo enviados a Berlín fueron quemados durante la segunda guerra mundial, la mayoría de especies tipo se encuentran en la actualidad en el Herbario de París y algunos herbarios estadounidenses y otros europeos, ya que en muchos casos se hicieron más de tres duplicados. Actualmente, se cuenta con imágenes digitalizadas de muchas de ellas.

Aporte del viaje de Humboldt para la Geografía de las Plantas y Ecología vegetal

Después de del viaje de Humboldt y Bonpland y sus observaciones, prácticamente fundan el nuevo campo de la ciencia que es el estudio de la Fitogeografía o Geografía de la plantas en los trópicos. El concepto de Humboldt sobre geografía de las plantas fue bastante amplio e incluye distribución, ecología y biodiversidad, posteriormente se diferenciaron como disciplinas separadas.

Las dos principales publicaciones en las que Humboldt plasma sus estudios sobre la geografía de las plantas son:

1. “Ideas para una Geografía de las Plantas” (1807), más un Cuadro de la Naturaleza de los países tropicales, esta publicación contiene:
 - A. Descripciones de 17 diferentes formas de vida de las plantas; es decir, las adaptaciones ecológicas de las plantas, este fue el primer sistema de formas de vida vegetales propuesto.
 - B. Descripción de la relación entre clima, elevación y distribución de las plantas en los trópicos plasmado en su Cuadro de la Naturaleza, con el volcán Cotopaxi y el Chimborazo como modelos. La distribución altitudinal de los taxones vegetales fue correlacionada con 14 diferentes parámetros abióticos. Fue la primera descripción de cinturones altitudinales de vegetación de los Andes y de los trópicos.
2. “La distribución geográfica de las plantas en relación al clima y a la elevación” (1817), esta publicación contiene:
 - A. Análisis de la distribución mundial de la riqueza de especies, basados en las familias de plantas. Constituye el primer análisis de biodiversidad.
 - B. Comparación latitudinal de los cinturones altitudinales de vegetación, desde el ecuador hasta los polos, Humboldt demuestra que los cinturones altitudinales de vegetación, que incluyen las líneas de bosque,

decrecen hacia las latitudes más altas. Los cambios latitudinales y de elevación en la vegetación son similares y correlacionados con los cambios climáticos (temperatura). Esta correlación entre temperatura y los cambios de latitudinales y altitudinales en la vegetación es llamada la **Ley de Humboldt**.

Se puede afirmar que Alexander von Humboldt fundó las ciencias de la Ecología vegetal y la Fitogeografía como resultado de sus viajes al Ecuador y otras regiones tropicales con Aimé de Bonpland durante 1799 y 1804. Por lo tanto, con la llegada de Humboldt, hace 200 años, se iniciaron los estudios de vegetación en el Ecuador y fueron el puntal para varios botánicos que siguieron estudiando y publicando descripciones de la vegetación y de la Fitogeografía ecuatoriana.

BIBLIOGRAFÍA

- Botting, D. 1973. *Humboldt and the Cosmos*. Prestel, Munich.
- Humboldt F. W. H. A. von y A. Bonpland. 1808, 1809. *Voyage de Humboldt et Bonpland. Plantes Equinocciales*, vol. 1, 2. Tübingen u. Paris.
- Humboldt, F. W. H. A. von y A. Bonpland. 1807. *Ideen zur einer Geographie der Pflanzen nebst einen Naturalgemälde der Tropenländer*. Tübingen u. Paris.
- Humboldt, F. W. H. A. Von. 1817. *La distribución geográfica de las plantas en relación al clima y a la elevación*. Libreriae Graeco Latino Germanico, Paris.
- Kunth K. S., A. Bonpland y F. W. H. A. von Humboldt. 1915-1825. *Nova Genera et Species Plantarum*, vols. 1-7, Libreriae Graeco Latino Germanico, Paris.
- Minguet, C. 1985. *Alejandro de Humboldt Historiador y Geógrafo de la América Española (1700-1804)*, vol. 1. Imprenta Universitaria, México.
- Nelken, H. 1980. *Alexander von Humboldt. Bildnisse und Künstler eine Dokumentierte Ikonographie*, Berlin.
- Sandwith, N. Y. 1926. Humboldt and Bonpland's itinerary in Ecuador and Peru. Kew Bulletin 181-190.
- Suplemento Ministerial. 2009. *Plantas Ecuatorianas Bicentennarias: Humboldt y Bonpland, contribución al conocimiento de la flora del Ecuador*, Mayo 2009. Ministerio de Cultura, Quito, Ecuador.

Two Hundredth Anniversary of Humboldt – University, time for new cooperations with old friends

Peter Hegemann

Instituto de Biología, Biofísica experimental, Universidad Humboldt de Berlin

hegemape@rz.hu-berlin.de

The Berlin University was founded by the linguist Wilhelm von Humboldt (WvH) in 1810 under a strong influence of the philosopher Fichte and the theologian Schleiermacher. In the following years the University was greatly promoted by the natural Scientist Alexander von Humboldt (AvH) who was basically an interdisciplinary and internationally active observer and collector. The young University acquired and established great collections in the fields of botany, geology, mineralogy, paleontology, zoology etc. that are based on AvHs own expeditions and research activities in South America and Russia, on his promotion of expeditions of other scientists world wide, but – equally important – on his and WvHs great political influence. The collections have been steadily extended and many of them are now unified within the Museum of Natural Science in Berlin, which is the second largest of its kind in Europe. The collections had a strong influence on many zoologists in Europe and in particular on the Charles

Darwin, who established the first consistent concept about “The Origin of Species”.

The international and interdisciplinary perspective of both AvH and WvH and – for his time – exceptional independence of political supervision has established the Berlin University as a paradigm for many other Universities world wide. The highest proficiency level was reached around 1900 before it declined during World War I and during the Nazi Regime, and totally collapsed during World War II. During the DDR time a few branches again reached world standard but a broad international cooperation and the reestablishment of former cooperation has been possible only after reunification of the country. The Times that AvH has spent in South America, and in Ecuador in particular, his excursions including the profit that has been gained from it should be reconsidered and the connections he established in these lands.

Klaus Angerer of our group is working on a project that traces and critical-

ly analyses the modes of sample collection and exploitation of biological materials (*Biodiversity Prospecting*), which is with the perspective of commercialization an extremely sensitive issue, disregarding in past the interest of the home countries.

Daniela Selesi will consider and analyze factors that determine the efficiency of a sustainable agriculture and the perspective for ancient crops in such context. This will involve special considerations of the ethnic and cultural circumstances as well as the particular climatic and logistic conditions of Ecuador. The aim of the study will be to show the development of land use systems in the context of cacao production. The focus will be on how traditional agricultural systems are modified today by combining existing and new knowl-

edge and how they contribute to a sustainable development of the region. In the Sumaco biosphere reserve, cacao is produced in both forms of land use systems, in monoculture and in the chakra system, which will allow her to compare both systems directly.

Other members of the group will follow up AvHs climatology studies at different altitudal levels around the volcanos.

We will also briefly discuss current projects of our group at the Humboldt University and discuss the potential for further cooperation with local universities in Quite and in Ecuador in general.

¡Humboldt tenía la razón!

Christoph Hirtz

Fotógrafo, Quito

hirtz_cristoph@yahoo.com

El Chimborazo es la montaña más alta del mundo. En 1802 el científico alemán Alexander von Humboldt ascendió al coloso hasta una altura de 5.881 metros sobre el nivel del mar y por mucho tiempo fue el récord que un hombre había alcanzado.

Esto lo llevó a afirmar que el Chimborazo era la montaña más alta del mundo. En 1852 se determinó que el Everest es la más alta. Pero considerando que el globo terráqueo es achatado en los polos y ensanchado a lo largo de la línea equinoccial, la posición del Chimborazo con 1,6° al sur de la línea ecuatorial es privilegiada frente al Everest que se encuentra 28° al norte. Entonces la distancia desde el centro de la Tierra al Everest es de 6.382.478 metros y al Chimborazo es de 6.384.673 metros, lo que nos da una altura mayor de 2.195 metros. ¡Humboldt tiene la razón!

Todo depende de cómo se mida o se mire. A nosotros los fotógrafos, como a todos los artistas, nos impresiona el Chimborazo y lo plasmamos en nuestras imágenes con la espectacularidad que se nos presenta: alto, majestuoso.

¡Aquí cuenta la primera impresión!

Y siempre me ocurre lo mismo, voy por una calle, viajo por una carretera, o camino por el campo y de repente ahí está, la montaña, en su máxima expresión y mientras avanzo parece que la altura disminuyera, la montaña se desvanece en la cordillera entre los demás picos. Pero nuestra imagen ya expresa lo que sentimos.

Aquí varios ejemplos de cómo diversos artistas ven a nuestro Chimborazo, esta hermosa montaña que es uno de los símbolos de nuestra Patria.

Bibliografía:

Der Report-Nr.22 Magazin November 1977.



Humboldt Atlas der kleineren Schriften



Del Viajero italiano
Osculati



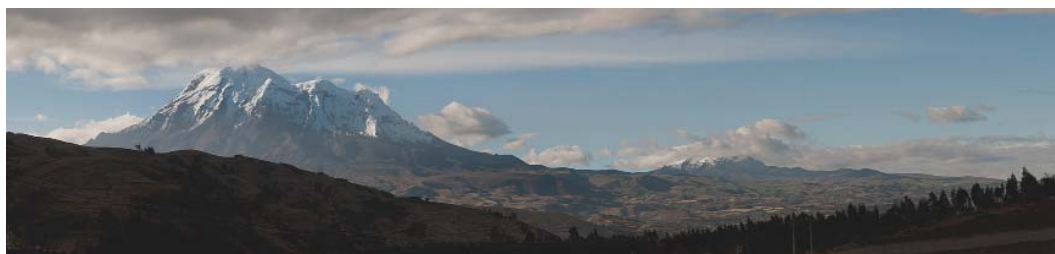
Anónimo



Emilio Moncayo 1940



Gottfried Hirtz 1942



Christoph Hirtz 2010

INSTRUCTIVO PARA AUTORES

REVISTA ECUATORIANA DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA CASA DE LA CULTURA ECUATORIANA

La Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas es el órgano oficial de divulgación científica de la Sección de Ciencias Naturales, Biológicas y Ciencias Exactas de la Casa de la Cultura Ecuatoriana y de la Sociedad Ecuatoriana de Biología, Núcleo de Pichincha. Sus objetivos son: divulgar artículos científicos, presentar casos médicos y publicar notas científicas en las áreas de ciencias biológicas puras, aplicadas y biomédicas; esta revista tiene tres secciones:

A) Artículos Originales, B) Revisión de trabajos y Notas Científicas y C) Hojas de Vida y Reseñas Institucionales. Las secciones B) y C) son opcionales.

Los **Artículos originales** provienen de trabajos de investigación científica realizados por los autores, es responsabilidad de ellos el uso de datos de terceros. Los artículos originales constarán de las siguientes partes: Título, Autor(es), Afiliación Institucional, Resumen, Palabras Clave, Abstract, Keywords, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Agradecimientos y Referencias Bibliográficas.

Los **Trabajos de revisión y notas científicas**, tendrán un formato personalizado por sus autores, pero es obligatorio el uso de las siguientes secciones: Título, Autor(es), Afiliación Institucional, Texto y Referencias Bibliográficas.

Las **Hojas de Vida** de los miembros de la Sección de Ciencias Naturales y Ciencias Exactas de la Casa de la Cultura Ecuatoriana y de la Sociedad Ecuatoriana de Biología Núcleo de Pichincha y las **Reseñas Institucionales** de centros de investigación adscritos a universidades o independientes tendrán un formato libre. Son un ensayo libre descriptivo de una persona o institución que trabaje en áreas importantes de la medicina y de las Ciencias Exactas y Naturales.

Formato del manuscrito

Los manuscritos deben ser presentados, en idioma español o inglés, en papel A4, con los cuatro márgenes de 2,5 cm, tipo de letra "Times New Roman" 12 puntos, doble espacio, justificado y páginas numeradas.

Título en minúsculas, con una extensión ideal de 15 palabras, negrita, centrado, 14 puntos. Ejemplo:

Preferencia de estratos boscosos en la alimentación de *Turdus fuscater* del Paschoa

Autor o Autores: Nombre(s), Apellido(s), en negrita, centrado, 12 puntos. Ejemplo:

Juan Eduardo Pueblo P.¹ & Estelita Estrella²

Afiliación institucional: Institución, ciudad, país, correo electrónico del autor encargado de la correspondencia: Si los autores representan a diferentes instituciones indicar con un numeral, el texto en 10 puntos, centrado. Ejemplo:

¹Centro de Investigaciones Científicas del IASA, Facultad de Ciencias Agropecuarias, ESPE, Sangolquí, Ecuador. j_salazar@espe.edu.ec.

²Departamento de Zoología, Escuela de Biología, Universidad Amazónica del Uruguay.

Para los nombres genéricos y específicos usar itálicas y al ser citados por primera vez en el texto, se debe incluir el nombre del autor(s) y el año de publicación.

En los trabajos que así lo requieran es necesario presentar el listado del material examinado, con las coordenadas de las localidades muestreadas (dentro de lo posible), asimismo citar las instituciones depositarias de los especímenes. Ejemplo:

Material examinado: Holotipo (disectado y guardado en microtubo), etiquetado *D. quillu* holotipo DVela det. 2003/Paschoa, Pichincha, Ecu-

dor DVela col., mar. 2001. Ocho paratipos (disectados y guardados en microtubos), etiquetados *D. quillu* paratipo DVela det. 2003 / Paschoa, Pichincha, Ecuador DVela col., abr. 2002. Holotipos y paratipos depositados en el QCAZ.

RESUMEN con una extensión máxima de 200 palabras. **Palabras clave:** cinco palabras separadas por coma, la primera letra en mayúscula y en orden alfabético

ABSTRACT (Título en inglés) traducción del resumen, **Keywords:** palabras clave traducidas al idioma inglés.

Como se nota de los puntos 7 y 8 los títulos de las secciones van en mayúsculas, negrita, 12 puntos. Si se requiere un subtítulo este va en el mismo párrafo con negrita, separado del texto por punto y raya.

Las figuras (esquemas, diagramas, dibujos, gráficos, fotografías y mapas) deben ser preparadas en formato JPG, y presentarse en hoja aparte y numeradas, adoptando el criterio de rigurosa economía de espacio, considerando, que el área útil de la página (16,5 x 24 cm) y la columna (8 x 24 cm) con el título al pie de la figura en 12 puntos. La posible ubicación de las figuras deben señalarse en el texto del manuscrito con una cita en paréntesis. Ejemplo (Figura 1, aquí). El Comité Editorial se reserva el derecho de ubicar las figuras, en función del espacio disponible, o solicitar a los autores hacer los cambios correspondientes.

Las tablas deben presentarse con el título en la parte superior, de un modo conciso y explicativo, en 12 puntos. La posible ubicación de las mismas, igual debe ser indicada como en el punto 10.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. Se prefieren a revisiones que provengan de artículos publicados en revistas científicas indizadas, libros reconocidos, tesis de doctorado, maestría o pre-grado que reposen en las bibliotecas de las instituciones otorgantes. Los artículos en revisión o en prensa, así como las comunicaciones personales se citarán en el texto, pero no formarán parte de la bibliografía. Las referencias, deben constar en el texto numeradas entre paréntesis y aparecer de acuerdo a la secuencia de citación. Ejemplos de referencias bibliográficas:

ARTÍCULO DE REVISTA CIENTÍFICA

DUCHICELA, E. J. I. 2004. Diversidad funcional de las micorrizas arbusculares asociadas a *Brosimum utile* en condiciones naturales. *Ciencia* 7(8): 65-77.

STAIKOU, A. & LAZARIDOU-DIMITRIADOU, M. 1991. The life cycle, population dynamics, growth and secondary production of the snail *Xeropicta arenosa* Ziegler (Gasteropoda: Pulmonata) in northern Greece. *Zoological Journal of Linnean Society*, London, **101**: 179—188.

DYKE, F. G. V.; BROKE, R. H. & SHAW, H. G. 1986. Use of road track count as indices of mountain lions presence. *Journal of wildlife Management*, Bethesda, **50**(1): 102-109.

b) CAPÍTULO DE LIBRO

EISENBERG, J. F. 1979. Habitat, economy and society: some correlations, and hypotheses for the Neotropical primates. En: Bernstein, I.S and O.E. SMITH. eds. *Primates ecology and human origins: ecological influences on social organization*: 215- 262. Granland STPM Press. New York y London.

c) TESIS DE GRADO

JIMÉNEZ P., P. J. 1995. Área de vida y uso preferencial del hábitat de *Cebus albifrons* (Primates: Cebidae) en Cuyabeno, Amazonía Ecuatoriana. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

d) LIBROS ENTEROS

KREBS, C. H. 1985. *Ecología: estudio de la distribución y abundancia*. Segunda edición. Harla. Ciudad de México. 340 pp.

e) INFORMACIÓN

PROVENIENTE DE INTERNET

Ciertas páginas que tengan información científica relevante pueden citarse así: DI FIORE, A. 2001. Proyecto Primates Ecuador.

Página de Internet:

www.nyu.edu/projects/difiore Consultada 13-enero-2006.

En la presentación de casos, las referencias bibliográficas deben ir de acuerdo a la connotación editorial internacional que consta en la página web: <http://www.icmje.org/>.

El autor principal deberá enviar el manuscrito original (más dos impresiones, una copia electrónica del documento en CD bajo el formato Word 3000 o inferior y de ser factible por vía electrónica), acompañado de una carta dirigida al Editor de la Revista, indicando la originalidad del trabajo. Los manuscritos serán revisados por árbi-

tros asignados por el editor, su aprobación estará sujeta al contenido científico, respaldado por el parecer de los árbitros y del comité Editorial. Se solicitará a los autores realizar los cambios y sugerencias pertinentes mediante la devolución de los manuscritos o documento electrónico, acompañados de las sugerencias.

Para la presentación de casos, notas científicas, hojas de vida o reseñas institucionales, igualmente dirigirse a los editores de la Revista o al Presidente del Núcleo de Pichincha de la Sociedad Ecuatoriana de Biología (SEB-P). Información disponible en el portal de Internet de la SEB-P <http://www.sebpichincha.org/>