

e-ISSN 2477 - 9148

REVISTA ECUATORIANA
DE MEDICINA Y
CIENCIAS BIOLÓGICAS

VOLUMEN XLII - Nº 2 - NOVIEMBRE 2021

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas
Volumen XLII Número 2 - Noviembre - 2021
e-ISSN 2477 - 9148

Centro de Publicaciones de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Dir: Av. 12 de Octubre 1076 y Roca, Quito, Ecuador

Diseño y diagramación:



Diseño de portada: Belén Mena
Foto portada: Fotografías cortesía de Christopher Davidson & Sharon Christoph (Flora of the World).
El mortiño (*Vaccinium floribundum*, Ericaceae) arbusto característico de los páramos ecuatorianos.
Los frutos maduros son ingrediente indispensable en para la típica "colada morada" para el Día de los
Difuntos (2 de noviembre) en Ecuador.



**REVISTA ECUATORIANA DE MEDICINA Y
CIENCIAS BIOLÓGICAS
REMCB**

DIRECTORIO

Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Rector: Dr. Fernando Ponce León S.J.

Sociedad Ecuatoriana de Biología

Presidente: Lic. Ricardo Zambrano

Casa de la Cultura Ecuatoriana Benjamín Carrión

Presidente: Mgt. Fernando Cerón

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Doris Vela Peralta (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador)

Dr. Rommel Montúfar Galárraga (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador)

Dra. Catalina Quintana (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador)

Dra. Carmen Ulloa Ulloa (Missouri Botanical Garden, USA)

Dra. Lorena Endara (Universidad de Florida, USA)

CONSEJO CIENTÍFICO

Dr. Hugo Romero-Saltos (Universidad Yachay Tech, Ecuador)

Dr. Enrique Terán (Universidad San Francisco de Quito, Ecuador)

Dra. Paola Leone (Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador)

Dr. Thomas Couvreur (IRD, Francia)

La Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas (REMCB) es un órgano de difusión científica auspiciada por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), la Casa de la Cultura Ecuatoriana Benjamín Carrión (CCE), y la Sociedad Ecuatoriana de Biología (SEB).

La REMCB publica trabajos originales fruto de la investigación científica y experimental en todas las áreas de la Medicina y las Ciencias Biológicas y está dirigida a los científicos nacionales e internacionales así como a estudiantes de las Ciencias de la Vida.

La REMCB se publica en formato electrónico en la web <http://remcb-puce.edu.ec/remcb/> y se encuentra incluida en el catálogo Latindex 2.0 (e-ISSN 2477-9148) y en las bases de REDIB y Dialnet. La REMCB mantiene un sistema de revisión por pares, su publicación es semestral, su contenido es de libre acceso y se distribuye bajo una licencia *CC BY-NC 4.0*. El contenido de los artículos científicos y de las publicaciones que aparecen en la revista son responsabilidad exclusiva de sus autores.

CONTENIDO

RE
MCB

EDITORIAL	7
Dr. Hugo Romero-Saltos	
ARTÍCULO DE REVISIÓN	
The Plant Family Ericaceae (“blueberries”) in Ecuador: Ecology, Diversity, Economic Importance, and Conservation	79
James L. Luteyn	
ARTÍCULOS CIENTÍFICOS	
Identificación de <i>Cercospora</i> spp. como agente causal de mancha foliar en cultivos de uvilla (<i>Physalis peruviana</i> L.) en la Sierra norte del Ecuador	103
Melany Paredes, Jeniffer Yáñez, Martín Marcial-Coba	
Inmunotipificación y cuantificación de cadenas ligeras libres en pacientes ecuatorianos con gammapatías monoclonales	123
Diego Talledo Pinargote, Aron Zamora Cedeño , Lilian Sosa Fernández-Aballí, Alberto Campos García y Ivon Howland Álvarez	
<i>Pseudolycopodiella iuliformis</i> (Lycopodiaceae, Lycopodielloideae) in Ecuador and Peru; a disjunct species between the Guyana Shield and the Cordillera del Cóndor	133
Nicolás Zapata, Álvaro J. Pérez, Kevin Burgess, Edison Rea, David A. Neill, Daniela Cevallos, Claes Persson, Benjamin Øllgaard	
On the relationship between nest concealment and the conspicuous coloration of female passerines: a test of Wallace’s hypothesis	141
Jay P. McEntee, Zoe Zelazny, J. Gordon Burleigh	
NOTA CIENTÍFICA	
Vitrificación de óvulos para preservar la fertilidad en una paciente con Teratoma Ovárico Bilateral	163
Adán Quisaguano, José Arias, Augusta Cordova, Mauro Montenegro, Denise Medina, Roberlis Aguirre, William Guamán	

EDITORIAL

Agradezco la invitación por parte del Comité Editorial para presentar, a manera de Editorial, el presente número de la Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas (REMCB). En sus 42 volúmenes anuales de producción científica¹, y particularmente desde la fundación oficial de la Sociedad Ecuatoriana de Biología en 1978, la REMCB ha representado el espacio insigne dedicado a la comunidad de profesionales ecuatorianos y extranjeros para compartir sus encuentros, y desencuentros, con las ciencias de la vida, usualmente desde un enfoque local. En esta ocasión compartimos estudios relacionados a plantas, hongos, aves y humanos.

Relacionado a plantas y hongos, en este número presentamos tres estudios. Primeramente, J. Luteyn, curador emeritus del Jardín Botánico de New York, nos comparte su conocimiento sobre la familia de plantas Ericaceae. En Ecuador, esta familia tiene alrededor de 230 especies, siendo la 13ra. o 14ta. familia más diversa del país, a la par con Euphorbiaceae. Vale recalcar que esta revisión enfatiza los detalles ecológicos de las especies, como sus mecanismos reproductivos, interacciones, información etnobotánica y aplicaciones en acciones de restauración o conservación. Por otra parte, Paredes et al. reafirman, no solo en base a estudios moleculares sino también mediante experimentos *in vivo* (bioensayo), que *Cercospora* sp. (Mycosphaerellaceae), un hongo deuteromicete, y más probablemente *Cercospora beticola*, es el fitopatógeno responsable de la "mancha foliar", enfermedad comúnmente observada en nuestra familiar "uvilla", *Physalis peruviana* (Solanaceae), una especie nativa de los Andes, domesticada y ampliamente cultivada. Este estudio resulta relevante considerando que la "uvilla" en la última década ha repuntado en el país como un interesante producto alternativo de exportación. Finalmente, Zapata et al. reportan un peculiar patrón biogeográfico: *Pseudolycopodiella iuliformis*, un licopodio antes solo observado en los tepuis del Escudo Guayanés, en Venezuela, ha sido también registrado en los "tepuis" ecuatorianos/peruanos de la Cordillera del Cóndor, a cientos de kilómetros de distancia. Este inesperado reporte abre la puerta para que futuros estudios diluciden el mecanismo ecológico o evolutivo detrás de esta distribución muy disyunta.

En cuanto a aves, McEntee et al. nos presentan un estudio filogenético muy completo que analiza al menos 2000 especies de aves, diseñado para probar varias hipótesis relacionadas a la evolución del plumaje en hembras de Passeriformes, el orden de aves más diverso del mundo, y su relación con datos de tamaño, tipo de nido y nivel de gregarismo—caracteres que a su vez dependen de procesos ecológico-evolutivos como el riesgo de predación y la competencia por nidos (selección social). Sus hipótesis, en cierto sentido clásicas pues vienen proponiéndose desde los tiempos de Wallace y Darwin, aprovechan sin embargo el poder de las actuales herramientas filogenéticas y de estadística inferencial. Si bien en su mayoría las hipótesis propuestas no se confirmaron, los patrones detectados por los análisis en sí mismo resultan enriquecedores para la contenciosa discusión entre causas y efectos evolutivos en este taxón de aves.

¹El primer volumen de la REMCB data de 1963, pero hay un corte de 14 años que inició en los 1990s
²La inclusión de investigaciones en medicina como parte integral de la REMCB es un acierto histórico pues da al lector una visión más holística e interdisciplinaria de las ciencias de la vida..

En el área de la biomedicina², tenemos el gusto de exponer dos experiencias. Por una parte, Talledo et al. reportan y comparan datos de estadística descriptiva sobre decenas de resultados de pruebas realizadas con diferentes técnicas moleculares estándar para diagnóstico de gammapatías monoclonales (GM)—electroforesis de proteínas (ELP), inmunotipificación (IT) y cuantificación de cadenas ligeras libres (CLL) y totales (CLT)—en pacientes del Hospital SOLCA de Portoviejo. Ellos concluyen que la técnica de CLL, desarrollada durante este milenio, es altamente recomendable para la confirmación del diagnóstico de GM, el cual puede desembocar en mieloma múltiple. Por otra parte, Quisaguano et al. describen detalladamente el procedimiento que siguieron para extraer y vitrificar (criopreservar en nitrógeno líquido) algunos óvulos de una paciente con teratoma benigno utilizando tecnología y procedimientos de vanguardia. Su descripción y discusión del procedimiento es muy informativo y puede resultar útil para otros profesionales en esta área de la medicina reproductiva en Ecuador. Es menester recordar que el fin último de la vitrificación de óvulos es ayudar a la mujer a preservar su fertilidad futura, en caso que la integridad de sus óvulos se vea comprometida a corto plazo.

A nombre de la REMCB, presento con fervor este número que tiene espacios dedicados a biomédicos, zoólogos, botánicos, micólogos y ecólogos evolutivos “de bata”, pero que son también “de bata”. ¡Esperamos que lo disfruten!

Hugo Romero-Saltos, Ph.D.

Profesor de Biología
Universidad Yachay Tech

ARTÍCULO
DE
REVISIÓN

The Plant Family Ericaceae (“blueberries”) in Ecuador: Ecology, Diversity, Economic Importance, and Conservation

La familia de plantas Ericaceae (“mortiños”) en Ecuador: Ecología, Diversidad, Importancia económica y Conservación

Revista Ecuatoriana de Medicina
y Ciencias Biológicas
Volumen 42. No. 2, Nov. 2021

James L. Luteyn¹

¹ New York Botanical Garden
(Emeritus), Bronx, NY 10458, U.S.A.

*Corresponding author:
jim.luteyn@gmail.com

Recibido 15-09-2021
Aceptado 4-11-2021

DOI: 10.26807/remcb.v42i2.911

e-ISSN 2477-9148

© 2021. This paper is published
under a CC BY-NC 4.0 license.

Citation:
Luteyn JL. 2021. The Plant Family
Ericaceae (“blueberries”) in Ecuador:
Ecology, Diversity, Economic
Importance, and Conservation.
Revista Ecuatoriana de Medicina y
Ciencias Biológicas 42(2): 79-98.
doi: 10.26807/remcb.v42i2.911

Abstract.- Species of the plant family Ericaceae found in Ecuador are generally discussed and characterized as to their diversity, economic importance, conservation, and ecology.

Key words: Andes, conservation, endemism, Neotropics, pollination

Resumen.- En el presente trabajo se discuten y caracterizan la diversidad, importancia económica, conservación y ecología de las especies de la familia de plantas Ericáceas de Ecuador.

Palabras clave: Andes, conservación, endemismo Neotrópico, polinización

Introduction

The plant family Ericaceae, locally known in Ecuador as “familia del mortiño”, is one of the key families of vascular plants in the threatened montane forest ecosystem of the Neotropics, where its diversification has been both recent and rapid (Churchill et al. 1995; Luteyn 2002, 2004; Kron & Luteyn 2005; Schwery et al. 2015). Many species are mycorrhizal and have large, showy flowers with colors in the red and orange range and are pollinated by hummingbirds; however, some species, and even entire genera, have rather inconspicuous flowers of muted colors more suitable for insect pollination (Naskrecki & Colwell 1998; Luteyn 2002). The fruits are mostly blue-black, juicy berries distributed by birds (Fig. 1); some berries are edible and have potential for commercial cultivation.

Taxonomy

In Ecuador, the Ericaceae are well represented with approximately 230 species, second only in the Neotropics to Colombia (with approx. 300 spp.)—131 Ecuadorean species (i.e., 57%) are endemic or nearly so (Luteyn 1996 and herein updated). Seventeen genera of Ericaceae in Ecuador have inferior ovaries (tribe Vaccinieae; approx. 82% of the overall species in Ecuador) characterized by berry fruits, the largest genera being *Ceratostema* (32 species), *Psammisia* (27 spp.), *Macleania* (22 spp.), *Cavendishia* (21 spp.), and *Disterigma* (23 spp.); Vaccinieae may be terrestrial or epiphytic in their habit. Four genera (approx. 18% of the species) have superior ovaries and capsular fruits, the largest being *Gaultheria* (16 spp.) and *Bejaria* (5 spp.); *Pernettya* has a berry fruit (see Luteyn 1985, 1995, 1996); all superior-ovary genera are terrestrial in habit. A full taxonomic description for the family and all Ecuadorean species has been provided by Luteyn (1996). For a color-photo field guide to the Ericaceae of Ecuador, see Luteyn 2006. It is felt that many new species are yet to be discovered, principally in the “Oriente”.

Ecology, Distribution, and Biogeography

General Ecology.—In Ecuador, species of Ericaceae are a conspicuous feature in montane cloud forests (between 1700–2500 m elevation), where the soils are well-drained, acidic, and high in organic matter, and where there is sufficient precipitation in the form of fog, mist, or rain; they are not found on the dry side of mountains. In their montane habitats, Ecuadorean Ericaceae are woody subshrubs 0.1–0.2 m tall, shrubs 1–3 m tall, or rarely trees to 10 m tall, and terrestrial or epiphytic in habit; some species are lianoid scramblers and at least one case of facultative hemiepiphytism has been documented in Ecuador (Zotz et al. 2021).



Figure 1. *Macleania* flowers and fruits. A) *M. pentaptera* flowers (Ecuador, Luteyn & Sylva S. 14719, NY); B) *M. pentaptera* fruits (Ecuador, Luteyn et al. 8026, NY); C) *M. rupestris* flowers (Ecuador, Luteyn et al. 14118, NY); D) *M. rupestris* fruits (Costa Rica, Luteyn s.n.). Photos: James L. Luteyn.

While most species are montane, some Ericaceae have adapted to the cooler, but not freezing temperatures of páramo landscapes (3200–4500 m) where they may be creeping subshrubs or even cushion plants. On the opposite side of the spectrum, a few other taxa are found in much warmer habitats as epiphytes in the Pacific-coast mangrove or as lianoid scramblers in lowland rainforests (Smith 1946; Benzing 1987; Luteyn & Sylva 1994; Luteyn 1999, 2002; Cornejo 2014). As epiphytes, Ericaceae usually grow in the crotches of larger branches of medium-aged to older trees, not on young twigs or young trees. They have a mutualistic relationship with mycorrhizae. They are anchored to the substrate and are aided in climbing by roots that arise from lignotubers or adventitious roots from moss-covered nodes in very moist sites. These epiphytes receive nutrients and absorb water from host-plant bark runoff or through their roots that penetrate the organic matter and detritus that accumulate around their roots (i.e., non-terrestrial sources). Their relatively large and thick leaves with thick cuticles store water, provide ample surface area to photosynthesize, and slow transpiration during dry and/or windy periods (see Jeník 1971; Gotsch et al. 2015). In low-light or closed-canopy forest situations Ericaceae, whether terrestrial or as epiphytes, can be scandent, and some species are characteristically lianoid scramblers (Luteyn & Pedraza-Peñalosa 2021). Populations within mature, montane cloud forest, however, are usually epiphytic, often with a few inflorescences and sometimes with large lignotubers for

storage. Under these low light intensity situations it is difficult for Ericaceae to photosynthesize enough to produce flowers—some may never flower, there not being enough energy reserves for both vegetative growth and flowering (pers. observ.).

In the open subpáramo to páramo regions, Ericaceae tend to be terrestrial, larger in size (or sometimes cushion plants in highly exposed habitats), and often clonal (e.g., *Macleania rupestris*, *Pernettya prostrata*, *Gaultheria* spp., *Vaccinium floribundum*), frequently containing large numbers of inflorescences and flowers. In these areas, several species in the genera *Gaultheria* and *Pernettya* are frequently found as pioneers following volcanic activity or recent landslides, as part of the edge community around mature forests, or in disturbed areas such as clearings after logging or road building, where humans have had great influence. Pioneering populations, however, eventually become overgrown and shaded by other plants, then light is limited and after many years they become weak competitors and do not flower. A particularly abundant species in the páramo, *Pernettya prostrata*, is resistant to trampling by cattle and is a successional species in heavily grazed areas. This species is especially common in páramo where the vegetation is low and open and persists after the vegetation recovers—fire does not affect it directly, but actually helps spread it indirectly because it opens the vegetation (Pels & Verweij 1992). *Macleania salapa* (Loja-N Peru), on the other hand, is fire-resistant due to its large lignotuber that sprouts new growth after fire destroys the main stems (pers. observ.).

Distribution and Biogeography.—The family Ericaceae is clearly Andean-centered and the Ecuadorean species have a close relationship with those of Colombia and Peru. Several species that occur in Ecuador are geographically widespread, such as *Cavendishia bracteata* (S Mexico to N Bolivia), *Macleania rupestris* (Costa Rica to N Bolivia), and *Sphyrospermum buxifolium* (Caribbean and S Mexico to N Bolivia). However, about 57% of the Ecuadorean species are endemics (or nearly so) with a narrow altitudinal range (Luteyn 2002). Centers of species diversity in Ecuador (based on numbers of species) include: **1**) the general northwestern slopes of the Andes (1700–2500 m elevation); **2**) eastern Andean “Oriente”, extending from Sucumbíos Prov. south into Peru (900–2500 m elev.); **3**) the southern Ecuadorean scrub vegetation (mostly Loja Prov. and into Peru); **4**) the high-Andean páramo (3000–3500 m) extending from Colombia throughout the “volcanic belt” of Ecuador; and **5**) the low-elevation, Pacific-facing “Chocó biogeographic region” that extends from the Colombia/Ecuador border in Carchi Prov. south into Pichincha Prov. (0–1000 m) (see Luteyn 2002).

Breeding Systems and Dispersal

In the Ecuadorean species of Ericaceae there is still a scarcity of information about reproductive systems, pollination biology, and plant/animal interactions; many questions lack hard data and thus remain unanswered.

Asexual Reproduction.—Asexual or vegetative reproduction within Ericaceae in cloud forest, páramo, and boggy habitats, is often accomplished by means of rhizomes or stolons (see Laegaard 1992) and can form large clones and extensive colonies, especially in species such as *Pernettya prostrata*, *Disterigma empetrifolium*, and *Macleania rupestris*, among others. Some species of *Ceratostema* and *Macleania* have lignotubers within which there are meristematic zones—these taxa sprout easily after cutting or fire damage (Luteyn 2002). *Macleania rupestris* is also facultatively lignotuber-producing, probably depending on where the seeds initially land (Sierra & Mora-Osejo 1994).

Sexual Reproduction.—The flowers of the vast majority of Ericaceae have both staminate and pistillate parts (i.e., flowers perfect), although Sleumer (1952, 1985) reported dioecism for *Pernettya howellii* (endemic to the Galápagos Islands) and Middleton (1991) reported gynodioecism for *Pernettya prostrata* from Ecuador. Their pollen is already mature and sometimes shed within the bud. Slight tapping of the pendent or horizontally oriented flowers often produces a shower of pollen onto the stigma. The stigma appears receptive quite soon after flowers open, as evidenced by the appearance of a small viscid droplet on the stigma. Although most Ecuadorean Ericaceae pollination syndromes point toward cross-pollination, species such as *Bejaria resinosa*, *Pernettya prostrata*, and several *Gaultheria* are self-compatible

(Melampy 1987; Luteyn 1995; Kraemer 2001). The fact that several high-elevation species with high flower densities, such as *Pernettya prostrata*, *Gaultheria* spp., *Cavendishia bracteata*, *Macleania rupestris*, and *Thibaudia floribunda*, always produce abundant fruit leads me to hypothesize that some species are facultatively self-compatible (Luteyn 2002, but see also Baker 1974; Jacquemart 2003; Chamorro & Nates-Parra 2015). In fact, in environments where pollinators are more scarce (disturbed/regenerating areas) or in cold/wet páramos, species such as *Macleania rupestris* may benefit by having the option of multiple reproductive strategies (Navarro et al. 2007). In Ecuador I suspect that the small white flowers of *Vaccinium floribundum*, *Disterigma* spp., *Pernettya prostrata*, and *Gaultheria* spp., are self-compatible and most likely pollinated by European honeybees (*Apis mellifera*). However, the study of Navarro et al. (2007) showed that the Ecuadorean *Disterigma stereophyllum*, with small white flowers, has a mixed pollination syndrome, i.e., it prefers hummingbird pollination (outcrossing) and also profits from small bee visitors, but still maintains the option of autonomous self-pollination. Although no data are available concerning compatibility in the majority of Ecuadorean species of Ericaceae, Luteyn (2002) predicted and Navarro (1999, 2001) and Navarro et al. (2007, 2008) proved self-compatibility in *Macleania bullata*, *Macleania rupestris*, and *Disterigma stereophyllum*. Navarro (2001) stated that in *Macleania bullata* pollinator visits are required for reproduction.

In Ecuadorean Ericaceae, most plants depend on animals for pollination and seed dispersal with rewards of nectar, pollen and/or nutritious fruit. The long-tubular corollas of many Ecuadorean Ericaceae (tribe Vaccinieae) contain a large volume of high energy nectar that provides that reward and also helps to guard the nectar from non-pollinators. The red to orange colors of many Ericaceae flowers also provide a visual and/or contrasting display against the foliage for the birds and at the same time act again as a nectar guard since these floral colors are relatively invisible to insects (Raven 1972; Heinrich 1981). Ericaceae flowers obligately pollinated by hummingbirds may also support a variety of non-pollinating nectar-eating organisms including various “nectar robbers” such as birds, bees, ants, butterflies, mites, bats, bacteria, protozoans, and yeasts (see also Colwell 1973). However, organisms other than birds probably only rarely contact the reproductive parts of the flowers and although they may carry pollen between flowers, the quantities must be very small, so in effect, they do not add much as pollinators. Flowers of Ecuadorean species of Ericaceae are of major importance to birds in montane regions, not only as pollinators but as fruit dispersers. “If one considers numbers of flowers, ... the Ericaceae is easily the most important family...” (Stiles 1985). Parada-Quintero et al. (2012) stated that “Shrubs and species of Ericaceae were the most important elements ... throughout the year” [in central Colombia]. Ecuadorean species of Ericaceae display the floral traits commonly associated with plants adapted for pollination by hummingbirds, i.e., bird-pollination or “ornithophily” (Table 1).

Dispersal.— Nearly all Ecuadorean Ericaceae attract animal dispersers, especially birds, by means of certain fruit characters, i.e., a bird dispersal syndrome or strategy (see Table 2 and also Snow 1971; van der Pijl 1972; Denslow & Moermond 1985). Normally, Ecuadorean Ericaceae display large numbers of small, brightly-colored, fleshy, high carbohydrate/low lipid, accessible fruits with numerous, small seeds and a high pulp vs. seed ratio (i.e., nutrition). Vaccinieae especially are of great importance as sources of food for opportunists (herein defined as animals that take advantage of whatever food is available at any given time) with their brightly-colored flowers (pendant for hummingbird foraging and pollination) and many-seeded berry fruits (presented erect for foraging and dispersing frugivores), and they meet most of the fruit criteria for ornithochory listed in Table 2 [*Psammisia* fruits are the only exception known, having a green, tough outer pericarp and dry inner pulp (pers. observ.)].

Seed dispersal in Ecuadorean Vaccinieae is primarily of two types—autochory and zoochory. Autochory is the mechanism in which plants carry out dispersal of fruits and seeds by themselves, which occurs when, after falling to the ground, the sticky (viscous) mucilaginous sheath that encloses the seeds attaches them to the ground, where they cannot move any further—it is present in several species of *Macleania*. The second type of dispersal in Ericaceae is called zoochory of which dispersal via ingestion (endozoochory) followed by regurgitation or defecation is the most frequent type. In Ecuador, I have also observed ant-mediated seed

Table 1. Characters of ornithophily in Ericaceae seen as adaptations for hummingbird pollination (modified from Proctor & Yeo 1973; Faegri & van der Pijl 1979; Luteyn & Sylva 1999).

—cool, moist, montane habitats; sun-loving terrestrial and epiphytic lifestyles
—inflorescences with numerous hanging flowers exhibiting negative angles with respect to the horizontal, facing outward, often opening for a long time; held away from the rest of the plant to ease access by hoverers
—flowers odorless
—flowers often with presence of “parrot colors,” i.e., brightly colored, often in the red and orange range, often with contrasting colors in different parts of the inflorescence
—corolla thick in texture, long, narrow, tubular with a constricted throat and a slightly flaring mouth, but without a lip on which insects can land
—style usually equaling corolla length with receptive stigma and pollen load located at the mouth of the corolla tube so that the bird must come into contact with each when foraging
—anthers rigid, attached to the outside of the nectariferous disk, forming a tunnel leading to the nectar source; dehiscence introrse
—pollen located at bottom of long, tubular-adorned anthers, the theca of which are granular and need to be moved to effect pollen discharge; pollen dry, loose
—ovary inferior, the numerous ovules mechanically protected by and separated from the nectar source
—nectariferous disc located at base of corolla, fleshy
—nectar abundant, diluted, rich in sucrose with average sucrose equivalence 20.4% and highsucrose:hexose ratio

dispersal—myrmecochory—in *Cavendishia lebroniae*, where numerous small, black ants cleaned the seeds of their juicy pulp and then transported the seeds into the undergrowth—I presume to their nests. Ants do this to make “stores” or “caches” for feeding of the young, or possibly for their ant gardens; theoretically, any uneaten seeds would germinate some distance away from the parent plant. Within the superior-ovary genera such as *Gaultheria* and *Pernettya* seed dispersal is similar to the Vaccinieae (pers. observ.).

Interactions with Animals

In the following paragraphs I discuss avian and non-avian animal species that interact in some way with species of Ecuadorean Ericaceae.

Birds.—In Ecuador, hummingbirds are the most frequent pollinators of Ericaceae species with colorful (red to orange), long-tubular flowers, including tubular species of the superior-ovary genus *Bejaria* (Melampy 1987; Navarro 1999, 2001; Luteyn 2002 and pers. observ.; Navarro et al. 2007, 2008, but see also Kraemer 2001). Hummingbirds hover continuously while searching for food. They are guided to the nectar at the base of the flowers by the narrow, tubular corolla with constricted throats, where they drink nectar as a food source and in so doing touch the stamens dislodging pollen and causing it to fall downward onto the hummingbird’s body onto surfaces that brush against the stigmas as the bird probes for nectar. The pollen is then physically transported to the next flower to be visited effecting pollination (Table 2).

Birds are also the most common nectar-robbers of Ericaceae. Nectar-robbing birds or flowerpiercers (“pinchaflores,” “robamieles,” “robadores de néctar”) are not adapted to the elongated flower morphology of many Vaccinieae. Therefore, legitimate nectar-robbers pierce floral tissues near the base of the corolla to extract nectar. Illegitimate nectar-robbers, also called thieves (e.g., ants, mites), obtain nectar after entering the flower through prior-made holes or through the same natural openings used by legitimate pollinators. Thus, in so doing, both types of robbers generally circumvent the anthers and stigma, i.e., they remove floral resources without pollinating (Inouye 1980, 1983; Bronstein et al. 2006; Torres et al. 2008; Irwin et al. 2010). In Navarro et al.’s (2007, 2008) study of *Disterigma stereophyllum*, they found that “when the robber [*Diglossa albilatera*] forcefully shook the flower, this caused some release of pollen from the poricidal anthers, most of which fell to the ground, but some adhered to stigmas within the

Table 2. Adaptive ornithochorous characters seen in the plants and fruits of Ericaceae (including modifications from Snow 1971, van der Pijl 1972, and Denslow & Moermond 1985).

—“in secondary or open vegetation fruits with many small seeds are the rule, since a premium is set on efficient dispersal to take advantage of the many spaces available” (Snow 1971)
—plant with most abundant, accessible, and attractive fruits have selective advantage
—high visibility due to contrasting colors of fruit (often red, orange, white, blue/black) with accessory structures (red pedicels) and surrounding vegetation
—“ripeness signaled by change in color, carbohydrate content, and succulence” (Denslow & Moermond 1985)
—absence of a hard outer cover (i.e., no closed or hard rind)
—no smell (“birds have only a weak sense of smell, or none at all, and are purely visual animals” (van der Pijl 1972)
—fleshy, nutrient-rich, edible pulp
—small sizes of fruits and seeds
—outer protection against being eaten prematurely (acids or tannins present in the immature fruit)
—inner protection of the seed against damage in digestive tract (bitterness, hardness, presence of toxic compounds)
—semi-permanent attachment to pedicel until physical removal by frugivore
—occupy no special position on the plant (ex., not on long-pendent peduncles)

pierced flowers.” Nectar robbing is common in neotropical Ericaceae and Rojas-Nossa et al. (2016, in Colombia) also found nectar robbing in the Ecuadorean species *Bejaria resinosa*, *Cavendishia bracteata*, *Gaultheria erecta*, *G. lanigera*, *Gaylussacia buxifolia*, *Macleania rupestris*, *Pernettya prostrata*, *Thibaudia floribunda*, and *Vaccinium floribundum*.

Birds and to a much lesser extent mammals that eat fruits (i.e., frugivores) are the most important seed dispersers of Ericaceae. It is the pulp of the fruits that is normally eaten and digested by these frugivores. Seeds are generally regurgitated or defecated soon after being eaten, but remain viable and their germination rate may increase or decrease by passage through the digestive tract of the disperser (see for example, Traveset 1998; Herrera 2002; Ortiz & Umba 2010; Luteyn pers. observ.).

Bees.—In Ecuadorean Ericaceae, European honeybees (“abejas”) act as the primary pollinators of short-tubular or urceolate, white-flower species of the genera *Gaultheria*, *Pernettya*, *Agarista*, and *Vaccinium*; whereas, large bees (*Bombus*) are common pollinators of the long-tubular, red-flowered species of *Bejaria* (Clemants 1995; Melampy 1987; Navarro et al. 2007, 2008; Luteyn pers. observ., but see also Freitas et al. 2006). In the long-tubular flowers of the inferior-ovary Vaccinieae, bumblebees (*Bombus* spp.) along with carpenter bees, wasps, and ants commonly act as nectar-robbers; whether pollinators or nectar-robbers bees are usually foraging for nectar not pollen (Inouye 1983; Heinrich 1983; Irwin et al. 2010). Instead of hovering in front of a flower (as hummingbirds do), bees grasp the hanging flowers with their mandibles and shake the pollen out of the tubular anthers while probing for nectar (see Heinrich 1976).

Ants.—From field observations, ants do not appear to be pollinators, nor are they myrmecophilous, but rather are more likely nectar thieves, protectors from herbivores of young leaves or other plant parts that secrete nectar, secondary dispersers, or harvesters (see Blüthgen et al. 2000; Beattie and Hughes 2002; Bronstein et al. 2006). Interactions observed in Ecuadorean Ericaceae are seemingly based on resources provided by the plants, i.e., nectar, fruits, or seeds, three examples being: Luteyn (1979) observed ants that cleaned seeds from fruit pulp of *Cavendishia lebroniae* and then dispersed those seeds or possibly ate them; Luteyn (1981) also reported leaves and immature fruits of *Cavensishia colombiana* eaten by a black, fungus ant *Acromyrmex hystrix* in a fashion similar to leaf-cutter ants, and ants eating leaves of *C. palustris*; and Luteyn (1983) also observed aggressive red biting ants (genus unknown) present on badly damaged leaves of several species of Vaccinieae (*C. tenella*, *C. angustifolia*, *C. micayensis*, *C. palustris*, and *Macleania stricta*) growing together in a decaying tree trunk. Other interactions with ants

include nesting sites, for example: Luteyn and Wilbur (1977) reported that the root system of *Disterigma utleyorum* (Costa Rica-Ecuador) was associated with colonies of ants and in which the ants aggressively defended their home environment by painful bites. Pedraza-Peñalosa (2010 and pers. comm.) confirmed seeing plants of *D. utleyorum* in Ecuador defended by ants of the subfamilies Dolichoderinae and Formicinae, and also Luteyn (1979) noted that the pith region of mature stems of *Ceratostema megabracteatum* (endemic to Ecuador) became hollow with age and provided a home for tiny, black, non-biting ants.

Miscellaneous Insects.—In general, many insect larvae cause floral damage in Ericaceae and thereby interfere with seed production; they probably also drink nectar which reduces its reward to pollinators. Their presence is usually noted by debris within flowers including their own fecal material and exit holes in fruits and pedicels. Navarro's (2001) study of *Macleania bullata* noted that rotted flowers contained beetle larvae (Curculionidae). I have also observed maggot-like larvae feeding on flowers and ovaries of *Macleania rupestris* and leaving exit holes. Larval damage of the micromoth *Caloptilia camaroneae* (Gracillariidae) has been observed infecting *Macleania rupestris* in Colombia (Arévalo 2014). Wasps may act as nectar robbers in the corolla tubes of *Macleania rupestris* (G. Weber, pers. comm. 2019). Butterflies and moths have long enough tongues to forage in the long corollas of some Ecuadorean Vaccinieae and are probably mostly nectar-robbers. Navarro (1999, 2001, pers. comm.) noted the butterfly *Pronophila orcus* as a primary nectar robber on *Macleania bullata* along the Ecuador border with Colombia. The "Western Flower Thrip" (*Frankliniella occidentalis*), the "Treehopper" (*Ennya* sp.), "weevils" (Curculionidae), and "true bugs" (Hemiptera) have all been observed visiting *Macleania rupestris* in Colombia (J.-L. Combita, pers. comm. 2019). "Leaf miners" (Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, and Hymenoptera) also visit *Macleania rupestris* in Colombia (Arévalo 2014).

Arachnids.—Mites of the family Ascidae depend upon Ericaceae flowers not only as their source of food (nectar and pollen), shelter, and a place for reproduction, but also upon the birds themselves, because their primary means of dispersal from flower to flower is on the bills and in the nasal cavities of hummingbirds (Colwell 1985; Colwell & Naeem 1994)—an ideal example of a three-way mutualistic relationship! Hummingbird-flower mites may also be classified as nectar thieves (Colwell et al. 1974)—they are not parasitic—, but given their abundance they are likely to be significant competitors with hummingbirds (Colwell 1995). Naskrecki and Colwell (1998) determined that *Rhinoesius* mites were quite conservative with regard to host plant genera and families, and that with but a single exception, "every species in the genus *Rhinoseius* for which host plant records exist has been collected from plants of the family Ericaceae. In contrast, none of the [mite] species of the genus *Tropicoseius* is known from ericads, except for a single specimen of *T. steini* collected from *Ceratostema peruvianum*." My own personal observations in the laboratory over nearly 50 years have demonstrated that mites of the genus *Rhinoseius* inhabit nearly every flower of Vaccinieae dissected and that their presence in the flowers of dried herbarium specimens, such as in *Macleania coccoloboides* (Ecuador, Luteyn 8474, NY), is indirect proof of hummingbird visitation and subsequent pollination.

Mammals.—The herbivorous rodent known as "guanta de páramo" in Ecuador (*Cuniculus taczanowskii* (the Mountain Paca, Colombia–Bolivia) eats mostly fruits and seeds. In Colombia its diet includes the fruits of Ericaceae such as *Gaultheria erecta*, *Thibaudia floribunda*, and *Macleania rupestris* (Osbaehr et al. 2007), species also represented in Ecuador. The Andean bear, better known as "oso de anteojos" (*Tremarctos ornatus*; spectacled bear), is an endangered forest and páramo dispersal agent (Panama–Bolivia) that eats primarily plant leaves, fruits and small animals (i.e., omnivore). It purportedly eats berries of *Gaultheria*, *Pernettya prostrata*, *Cavendishia bracteata*, *Macleania rupestris*, and *Vaccinium floribundum* (Hernani-Lineros et al. 2020).

Fungal Interactions

Fungal visitors with Ericaceae may be divided into two groups—phytopathogenic and mycorrhizal fungi.

Phytopathogens.— Studies of phytopathogens of Ericaceae are scarce, but studies from Colombia, which share many Ericaceae species with Ecuador, found necrotic lesions ("manchas")

on the leaves, flowers, and fruits of *Macleania rupestris* caused by the fungal pathogens *Pestalotia*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Gloeosporium*, as well as cotton-like (“algodonoso”) mycelia, brown lesions, and white pulverulent (“pulvurento”) mycelia of *Gloeosporium* and *Cladosporium* which covered flowers and fruits; these pathogens affected the normal growth, development, and fruit production of the plant (Gutiérrez 1991). Romero and Sánchez-Nieves (2004) found 12 genera of pathogenic and saprophytic fungi associated with *Macleania rupestris*, viz., *Absidia*, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Pestalotia*, *Stemphylium*, *Thielaviopsis*, and *Trichoderma*. In Peru, Oblitas (2012) observed leaf lesions in cultivated *Macleania rupestris* that were produced by species of *Colletotrichum* and *Gloeosporium*.

Mycorrhizae.—Ericaceae depend strongly on mycorrhizal fungi for nutrient acquisition from soil organic matter and are viewed as a key adaptation that enables Ericaceae to survive and dominate in nutrient poor soils (Read et al. 2004; Vohník et al. 2012); however, mycorrhizae have rarely been studied in tropical regions. Early studies of Ecuadorean fungi by Bermudes and Benzing (1989) demonstrated “fungal associations” in epiphytic roots of *Macleania cordifolia*. It has also recently been shown that the tribe Vaccinieae is seemingly characterized by a group of ectendomycorrhizae, named “cavendishoid” mycorrhizae, because they were discovered in *Cavendishia nobilis* var. *capitata* from southern Ecuador (Setaro et al. 2006, 2013; Brundrett & Tedersoo 2018) and that the dominant mycobiont belongs to the Sebaciniales (Kottke et al. 2008, 2013; Selosse et al. 2007; Setaro & Kron 2011). Cavendishoid ectendomycorrhizae associations have been also reported in other *Cavendishia*, *Ceratostema*, *Diogenesia*, *Disterigma*, *Macleania*, *Orthaea*, *Psammisia*, *Semiramisia*, *Spherospermum* and *Thibaudia* (Brundrett 2008).

Hybridization

Hybridization in Ecuadorean Ericaceae under natural conditions is rare, although Middleton (1989, 1990, 1991) and Luteyn (1995 and pers. observ.) reported intergeneric hybridization events between *Pernettya* and *Gaultheria*, and infrageneric hybridization in *Gaultheria*. Several species of *Macleania*, such as *M. bullata*, *M. floribunda*, and *M. stricta*, do hybridize under greenhouse conditions (J.R. Ballington, pers. comm. 1993).

Ethnobotany

Naranjo (1994), stated he believed that at the time of the Spanish conquest in the 15th-Century, *Macleania floribunda* (“gualicón”, “joyapa”) was one of the species cultivated for its fruits within the interandean region. Currently, *Macleania rupestris* (“joyapa”, “zagalita”, amongst other names) may be purchased in some larger supermarkets, where they are found as fresh or dried fruits, jams or marmalades, or as nectar drinks or wine (Sælemyr 2004; Van den Eynden & Cueva 2008). *Vaccinium floribundum* (“mortiño”) is most commonly known in the traditional “colada morada” or “mazamorra morada” prepared with “guaguas de pan” (or “t’anta wawa” bread that has the shape of a doll) and consumed every year on November 2 “All Souls’ Day” or “Día de los Difuntos.”

Traditional Uses—Species of Ericaceae have a long history of use by indigenous Ecuadoreans and the large number of common names given to them give credence to the fact that numerous species have been and are currently used locally. Although understudied, ethnobotanical observations confirm culinary, cultural, and medicinal uses of several species. A comprehensive review of the useful species of Ericaceae are contained in the “Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador,” where the editors reported that 65 of the approx. 225 species of Ericaceae in Ecuador that they listed had a use (Torre et al. 2008: tabla 1 and pp. 311–316; see also Van den Eynden & Cueva 2008: table 1). A summary of which (with specific references, and where known species and common names) is given below:

Edible fruits: See Popenoe 1924 (*Ceratostema alatum* “pera silvestre”, “manzanilla”; *Disterigma alaternoides* “tira”; *Disterigma empetrifolium* “chirimote”; *Macleania rupestris* “hualicón”, “chaquilulii”, “joyapa”, “salapa”; *Vaccinium floribundum* “mortiño”); Cordero 1950 (*Ceratostema peruvianum* and other spp. “joyapa”, “hualicón”; *Macleania floribunda* “joyapa”; *Vaccinium floribundum* “mortiño”); CESA 1992 (*Macleania floribunda*, *M. rupestris*); Cerón 1993 (*Disterigma acuminatum* “gualicón”; *Macleania cordifolia*, *M. loeseneriana*, and *M. rupestris* all “gualicón”; *Psammisia*

graebneriana "gualicón de árbol"); Cerón 2002a (*Cavendishia bracteata* "zagalita"; *Disterigma acuminatum* "sarsal", *D. empetrifolium* "chirimote"; *Gaultheria glomerata* "chigunda"; *Macleania loeseneriana* "gualicón"; *Thibaudia floribunda* "gualicón"); Cerón 2002b (*Cavendishia tarapotana* "cuyac"; *Disterigma acuminatum* "mortiño", "tirag"; *Macleania* cf. *loeseneriana* "gualicón", *M. rupestris* "cuya"; *Psammisia sclerantha* "gualicón" all as "alimento").

Toxic fruits: See Cordero 1950 (*Pernettya prostrata* "taruga joyapa", "tirag"); Luteyn 1995 (*Pernettya prostrata*); Cerón 2002a (*Pernettya prostrata* "moridera"); Kvist & Alarcón S. 2008 (species not given).

Wood as firewood and for woodworking: See Cerón 1993 (*Cavendishia bracteata* "zagalita"); Cerón 2002a (*Thibaudia floribunda* "gualicón"); CESA 1992 (*Macleania floribunda*, *M. rupestris*); Clemants 1995 (*Bejaria*). Ellemann (1991) listed useful woods, but did not give more specific uses, for the following species: *Bejaria aestuans* "payama", *Gaultheria erecta* "mote pelado", *Macleania rupestris* "joyapa", and *Pernettya prostrata* "payanchillo de cerro."

Medicinals: Cordero (1950) mentioned that from *Bejaria resinosa* (and other spp. of *Bejaria*) a decoction was made from "aserraduras of polvo del tronco o de la raíz" for people suffering from liver or intestinal diseases. For *Macleania rupestris* the leaves were made into a drink that accelerated labor ("parto") and reduced labor pains (CESA 1992; Abril 2015). Cerón et al. (2004) found that in *Macleania pentaptera* the entire plant was macerated and applied on the forehead as a plaster, then in steam baths and as a drink to eliminate cholesterol, fainting attacks, and severe headaches. The Cayapa Indians use *Macleania smithiana* medicinally as a cure for poisonous and non-poisonous snake bites (see Luteyn 1996; Cornejo 2014). Tene et al. (2007) found that an aqueous infusion of the fresh, mature leaves of *Macleania rupestris* was drunk as a tonic, while Rios et al. (2007) stated that *Macleania rupestris* was drunk in a decoction of the flowers to treat nerves.

For other, more general but less specific, cultural and medicinal uses of Ecuadorean Ericaceae, including cooking, see Muñoz (2004), Bussmann and Sharon (2006), Rios et al. (2007), Reyna Achi (2012), Moncayo (2014), Abril (2015), and Gallardo de la Puente (2015).

Horticultural and Ornamental Uses.—Many species of *Cavendishia*, *Ceratostema*, *Disterigma*, *Macleania*, *Psammisia*, and *Vaccinium* have potential as new floricultural crop plants, some being highly ornamental with large, dark green, evergreen leaves and large, brightly colored flowers (Ballington et al. 1993; photos in Luteyn 1996). Although Torre et al. (2008) reported that in Ecuador no native species were known to be used as ornamentals, Cerón (2002a,b) reported that both *Cavendishia tarapotana* ("orquidea", "cuyac") and *Macleania loeseneriana* ("gualicón") were used as both "ornamento" and "alimento."

Medicinal Uses.—A few Ecuadorean species of Ericaceae have been investigated for their antioxidant compounds, including *Anthopterus wardii*, *Cavendishia grandifolia*, *Cav. isernii*, *Ceratostema silvicola*, *Disterigma rimbachii*, *Macleania coccoloboides*, *M. cordifolia*, *M. rupestris*, and *Sphyrnospermum buxifolium*—they are high in natural antioxidants and have been called "superfruits" because of their bioactive properties and high levels of antioxidant compounds (NRC 1989; Ballington et al. 1990; Cardozo et al. 2009; Dastmalchi et al. 2011; Flores et al. 2012). These antioxidant compounds, such as phenolics (polyphenols, flavonoids, and tannins), fruit colorants (anthocyanins and carotenoids), vitamins (ascorbic acid), and minerals play a fundamental role in preventing chronic and degenerative diseases. Some of these neotropical blueberries, demonstrated significantly stronger antioxidant activities than North American highbush blueberry *Vaccinium corymbosum* (Flores et al. 2012; Ma et al. 2013; Debnath & Goyal 2020). For other recent articles about the chemical composition and antioxidant activity of the Andean *Vaccinium floribundum*, see Vasco et al. (2009), Schreckinger et al. (2010), Ortiz et al. (2013), Prencipe et al. (2014), Alarcón-Barrera et al. (2018), and Llivisaca et al. (2018).

Nutritional Uses.—Within the last two decades major efforts are underway in Colombia and Ecuador to produce new, small-fruit crops from native (wild) species from the Andean regions,

namely *Cavendishia bracteata* ("uva de anís"), *Macleania rupestris* ("joyapa", "gualicón"), and *Vaccinium floribundum* ("mortiño"), all three also native to Ecuador (see Ligaretto 2009). In all propagation studies of *Macleania rupestris* and *Vaccinium floribundum*, propagation by cuttings is recommended (Brand-Prada 1994; Acero & Bernal 2003; Boni Duchitanga 2016). Although the plants are readily accessible to small producers and the cost is low, the absence of an adequate propagation protocol is still one of the difficulties in their introduction for commercial cultivation (Durán-Casas et al. 2013; Veloza-Suan et al. 2014). For further discussion of the cultivation of wild Andean species, see Torres et al. (2009) and Debnath and Goyali (2020).

Land Use, Restoration Ecology, and Conservation

Hofstede et al. (2002) and Quiroz Dahik et al. (2019) have demonstrated in Ecuadorean subpáramo and páramo areas where species of Ericaceae are represented, that pine plantations (*Pinus patula*), intensity of grazing by cattle, and the frequency of burning were all factors in lowering species richness when compared with natural grassland vegetation, thus highlighting the importance of controlling these activities so commonly practiced in the Ecuadorean Andes. Therefore, the several native species of Ericaceae that act as pioneers are increasingly seen as beneficial species for land use, restoration ecology, and vegetation regeneration purposes, especially in areas of anthropogenic disturbance, where biodiversity loss is creating serious problems (see Rodríguez & Peña 1984; DAMA 2000; Zuluaga & Espinosa 2005; Montenegro & Vargas 2008; Torre et al. 2008; Cardozo et al. 2009; Álvarez & Contreras 2012). Añazco (2008), for example, mentioned six species of Ericaceae, native to Ecuador, that are of major importance in regeneration after forest fires—*Bejaria aestuans* ("joyapa") and *B. resinosa* ("payana"), *Gaultheria erecta* and *G. reticulata* ("mote pelado"), *Macleania salapa* ("joyapa blanca"), and *Vaccinium floribundum* ("mortiño"). Fadaei (2019) also pointed to the importance of reclamation with ericaceous shrubs, because they add beneficial mycorrhizal fungi to the soils. Studies that have also shown the importance of Ericaceae in the overall maintenance of avian biodiversity include the following. In the Andes of eastern Ecuador, Nieto and Silva (2012) studied the influence of timber extraction, grazing, burning, and alien plant species in Ericaceae-dominated, shrubby vegetation areas, where only a few remnants of original vegetation remained and how that habitat alteration affected hummingbird usage of floristic resources (i.e., nectar). There, six species of Ericaceae proved to be the most visited species during their flowering periods and the most important plant resources for the hummingbirds in the secondary forest. In another study in the Colombian Andes, Ortiz and Umba (2010) have shown that Ericaceae are the principal plant family in the diet of frugivorous birds throughout the year and that they are responsible for Ericaceae dispersal.

As seen throughout this paper, several species of Ecuadorean Ericaceae are among the most widespread and ubiquitous neotropical Ericaceae and some may even act as pioneers in areas of natural or man-made disturbance. However, others are rare in nature and poorly known or scarcely collected. Approximately 57% of Ecuadorean Ericaceae are endemic (occur only in Ecuador) or nearly so (i.e., in close proximity in two adjacent countries). Many of these species have restricted distributional ranges and are known from very few specimens, about 51% are known from fewer than 10 collections (Luteyn 1996 and unpubl. data). These and others often grow in areas with deteriorating environmental conditions and increasing human pressure. Therefore, it is imperative that better land-use practices and conservation efforts are undertaken to protect these and other species.

The Tropical Andes biogeographic region is the most species rich and ecologically threatened region on Earth and montane ecosystems like the cloud forests, where Ericaceae abound, are today reduced to 10% of their original extent, mostly due to destructive human activities such as burning, deforestation, road-building, and introduction of domestic livestock (Henderson et al. 1991; Chaves & Arango 1998; Mast et al. 1999; Hamilton 2001; Orme et al. 2005; United States Agency for International Development 2009). According to Pedraza-Peñalosa et al. (2011) and Luteyn and Pedraza-Peñalosa (2013) "89% of the Ericaceae endemic to Ecuador have some level of threat." Therefore, many of the Ecuadorean Ericaceae are endangered.

In summary, Andean montane ecosystems are home to about 80% of the different neotropical Ericaceae species. For this reason, reforestation programs are needed, taking into account that some native Ericaceae are successful colonizers of natural or anthropogenically disturbed areas,

while others are threatened by habitat loss and are on the verge of extinction (see Durán-Casas et al. 2013). Thus, conservation of native vegetation, including ericaceous-rich habitats especially in montane elevations, must be undertaken in order to sustain species diversity of both plants and animals. Valencia et al. (2000), León-Yáñez et al. (2011), and Luteyn and Pedraza (2013) have made critical evaluations of the endemic Ecuadorean species of Ericaceae in which they followed the *IUCN Red List* guidelines—it is hoped that formal conservation assessments might soon be carried out for the entire family.

Acknowledgments

I appreciate the many helpful comments made on drafts by Dra. Carmen Ulloa Ulloa (Missouri Botanical Garden, St. Louis) and one anonymous reviewer. Dr. Edward J. Kennelly (Lehman College, City University of New York, Bronx) provided pdf copies of literature. I thank Dra. Carmen Galdames who prepared figure 1.

Author's Request: As stated several times in the text, there are few actual studies of many of the biological aspects of Ecuadorean Ericaceae—pollination and dispersal systems, chemistry, cytology, mycorrhizae, conservation—and this author would very much appreciate receiving general information of ongoing research in these areas, as well as references to and pdf copies of published papers, or contact information from current researchers (i.e., email addresses). It is also hoped that this review of Ecuadorean Ericaceae will stimulate others to collect more field data and make more observations on pollination and dispersal interactions, as well as other biological phenomena in neotropical Ericaceae.

Literature Cited

- Abril, SF. 2015. Estudio etnobotánico de la comunidad Shiña, provincia del Azuay. Tesis de pregrado. Universidad del Azuay, Cuenca, Ecuador. <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/4847>
- Acero LE, Bernal HY. 2003. Guía para el cultivo, aprovechamiento y conservación de la uva camarona (*Macleania rupestris*) (H.B.K.) A.C. Smith. Primera Edición. Editorial Convenio Andrés Bello, España.
- Alarcón-Barrera KS, Armijos-Montesinos DS, García-Tenesaca M, Iturralde G, Jaramilo-Vivanco T, Granda-Albuja MG, Giampieri F, & Alvarez-Suarez JM. 2018. Wild Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) and Andean blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth) from the highlands of Ecuador: nutritional composition and protective effect on human dermal fibroblasts against cytotoxic oxidative damage. *J. Berry Res.* 8: 223–236.
- Álvarez C, JP, Contreras C, GE. 2012. Síntesis in vitro de micorrizas en *Macleania rupestris* y *Cavendishia bracteata* a partir de hongos aislados de raíces y suelo rizosférico. Trabajo de Grado. Universidad Francisco de Paula Santander, Ingeniería Biotecnológica. Cúcuta, Colombia.
- Añazco M. 2008. Usos medioambientales de las plantas. Pp.115–119. In: Torre L de la et al., eds. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito & Universidad de Aarhus, Denmark.
- Arévalo Maldonado HA. 2014. Caracterización morfológica y del daño de Gracillariidae (Lepidoptera: Gracillariidae) en plantas de importancia económica en Colombia. Unpubl. thesis "Magister en Ciencias Agrarias Entomología." Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Baker HG. 1974. The evolution of weeds. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 5: 1–24.
- Ballington JR, Luteyn JL, Thompson MM. 1990. Small fruit germplasm resources in the Andean region of Ecuador. North Carolina State Univ. Horticultural Crops Research Series No. 91.
- Ballington JR, Luteyn J, Thompson MM, Romoleroux K, Castillo R. 1993. *Rubus* and vacciniaceous germplasm resources in the Andes of Ecuador. *Plant Genetic Resources Newsletter* 93: 9–15.

- Beattie AJ, Hughes L. 2002. Ant-plant interactions. Chap. 8, pp. 211–235. *In*: Herrera CM & Pellmyr O, eds. Plant-animal interactions: an evolutionary approach. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Benzing DH. 1987. Vascular epiphytism: taxonomic participation and adaptive diversity. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 74(2): 183–204.
- Bermudes D, Benzing DH. 1989. Fungi in neotropical epiphyte roots. *BioSystems* 23: 65–73.
- Blüthgen N, Verhaagh M, Goitía W, Jaffé K, Morawetz W, Barthlott W. 2000. How plants shape the ant community in the Amazonian rainforest canopy: the key role of extrafloral nectaries and Homopteran honeydew. *Oecologia* 125: 229–240.
- Boni Duchitanga SM. 2016. Evaluación de un sustrato orgánico para el enraizamiento de las estacas de joyapa (*Macleania rupestris*). Tesis previa a la obtención del título de Ingeniera Agrónoma. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias Carrera de Ingeniería Agronómica. Cuenca, Ecuador.
- Brand-Prada M. 1994. Interacciones entre colibríes y las ericáceas *Macleania rupestris* y *Befaria resinosa* en un páramo de Colombia. Pp. 663–677. *In*: Mora-Osejo LE, Sturm H, eds. Estudios ecológicos del páramo y del bosque altoandino Cordillera Oriental de Colombia. Tomo II. Academia Colombiana de Ciencias, Exactas, Físicas y Naturales, Colección Jorge Álvarez Lleras No 6. Santa Fe de Bogotá, D.C.
- Bronstein JL, Alarcón R, Geber M. 2006. The evolution of plant-insect mutualisms. *New Phytol.* 172: 412–428.
- Brundrett MC. 2008-continuous. Mycorrhizal associations: the web resource. <https://mycorrhizas.info>, ver. 2.
- Brundrett MC, Tedersoo L. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytol.* 220: 1108–1115.
- Bussmann RW, Sharon D. 2006. Traditional medicinal plant use in Loja province, southern Ecuador. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 2: 44.
- Cardozo RH, Córdoba SL, González JD, Guzmán JR, Lancheros HO, Mesa LI, Pacheco RA, Pérez BA, Ramos FA, Torres ME, Zúñiga PT. 2009. Uva Camarona *Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Smith. Pp. 81–93. *In*: Guzmán-Castañeda JR, Córdoba-Cárdenas SL, Zúñiga-Upegüi PT, Torres-Cárcamo ME, Pérez-Martínez BA, Mesa-Castellanos LI, Pacheco-Salamanca RA, Córdoba C, eds. Especies útiles en la Región Andina de Colombia. Tomo 1. Jardín Botánico José Celestino Mutis. Bogotá, Colombia.
- Cerón CE. 1993. Etnobotánica del Ecuador: estudios regionales. *Hombre y Ambiente Monogr.* No. 25. Abya-Yala, Quito.
- Cerón CE. 2002a. Etnobotánica del Pondo, volcán Tungurahua. *Cinchonia* 3: 26–35.
- Cerón CE. 2002b. Etnobotánica del Río Upano, sector Purshi-Zuñac, Parque Nacional Sangay. *Cinchonia* 3: 36–45.
- Cerón CE, Montalvo C, Calazación A, Toasa G. 2004. Etnobotánica Tsáchila, Pichincha-Ecuador. *Cinchonia* 5: 109–194.
- CESA (Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas). 1992. Usos tradicionales de las especies forestales nativas en el Ecuador, 2 vols. FEPP, Quito.
- Chamorro FJ, Nates-Parra G. 2015. Floral and reproductive biology of *Vaccinium meridionale*

- (Ericaceae) in the Eastern Andes of Colombia. *Revta. Biol. Trop.* 63: 1197–1212.
- Chaves ME, Arango N, eds. 1998. Informe nacional sobre el estado de la biodiversidad 1997: Causas de pérdida de biodiversidad, 3. Instituto Alexander von Humboldt, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente-PNUMA, Ministerio del Medio Ambiente, Bogotá.
- Churchill SP, Balslev H, Forero E, Luteyn JL, eds. 1995. Biodiversity and conservation of neotropical montane forests. New York Botanical Garden, Bronx, NY.
- Clemants SE. 1995. *Bejaria*. Pp. 54–106. *In*: Luteyn JL, ed. *Fl. Neotr. Monogr.* 66. Ericaceae Part II, the superior-ovary genera. New York Botanical Garden, Bronx.
- Colwell RK. 1973. Competition and coexistence in a simple tropical community. *Amer. Naturalist* 107: 737–760.
- Colwell RK. 1985. Stowaways on the hummingbird express. *Nat. Hist.* 7/85: 56–63.
- Colwell RK. 1995. Effects of nectar consumption by the hummingbird flower mite *Proctolaelaps kirmsei* on nectar availability in *Hamelia patens*. *Biotropica* 27: 206–217.
- Colwell RK, Naeem S. 1994. Life history patterns of hummingbird flower mites in relation to host phenology and morphology. Chap. 2, pp. 23–44. *In*: Houck MA, ed. 1994. *Mites: ecological and evolutionary analyses of life history patterns*. Chapman & Hall, New York.
- Colwell RK, Betts BJ, Bunnell P, Carpenter FL & Feinsinger P. 1974. Competition for the nectar of *Centropogon valerii* by the hummingbird *Colibri thalassinus* and the flower-piercer *Diglossa plumbea*, and its evolutionary implications. *Condor* 76: 447–452.
- Cordero L. 1950. Enumeración botánica de las principales plantas, así útiles como nocivas, Indígenas ó aclimatadas, que se dan en las provincias del Azuay y del Cañar de la República del Ecuador. 2nd ed. Afrodisio Aguado S.A., Madrid.
- Cornejo X, ed. 2014. Plants of the South American Pacific mangrove swamps: Colombia, Ecuador, Peru). Universidad de Guayaquil y Conservación Internacional (Ecuador), Guayaquil. [Ericaceae, pp. 152–158, plates 21–23].
- DAMA. 2000. Protocolo distrital de restauración ecológica: guía para la restauración de ecosistemas nativos en las áreas rurales de Santa Fé de Bogotá. Departamento Técnico Administrativo Medio Ambiente (DAMA), Alcaldía Mayor de Santa Fé de Bogotá, Bachaqueros, Fundación Estación Biológica. Santa Fé de Bogotá.
- Dastmalchi K, Flores G, Petrova V, Pedraza-Peñalosa P, Kennelly EJ. 2011. Edible neotropical blueberries: antioxidant and compositional fingerprint analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2011: 3020–3026.
- Debnath SC, Goyali JC. 2020. In vitro propagation and variation of antioxidant properties in micropropagated *Vaccinium* berry plants—a review. *Molecules* 25: 788.
- Denslow JS, Moermond TC. 1982. The effect of accessibility on rates of fruit removal from tropical shrubs: an experimental study. *Oecologia* 54: 170–176.
- Durán-Casas S, Veloza-Suan C, Magnitskiy S, Lancheros HO. 2013. Evaluation of uva camarona *Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Smith propagation with air layering (Evaluación de la propagación de uva camarona *Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Smith por medio de acodos aéreos). *Agron. Colomb.* 31: 18–26.
- Ellemann L. 1991. El uso de la madera del bosque montano por los Saraguros. Pp. 139–148. *In*:

- Rios M, Pedersen HB, eds. Las plantas y el hombre. 1ra Ed. Abya Yala, Quito, Ecuador.
- Fadaei S. 2019. Effects of ericoid mycorrhizal fungi on growth and salt tolerance of blueberry (*Vaccinium myrtilloides*), lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*), and Labrador tea (*Rhododendron groenlandicum*): implications for oil sands reclamation. MS degree. University of Alberta, Canada.
- Faegri K, van der Pijl L. 1979. The principles of pollination ecology. Third edition. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Flores G, Dastmalchi K, Dabo AJ, Whalen K, Pedraza-Peñalosa P, Foronjy RF, D'Armiento JM, Kennelly EJ. 2012 Antioxidants of therapeutic relevance in COPD from the neotropical blueberry *Anthopterus wardii*. Food Chemistry 131: 119–125.
- Freitas L, Galetto L, Sazima M. 2006. Pollination by hummingbirds and bees in eight syntopic species and a putative hybrid of Ericaceae in Southeastern Brazil. Pl. Syst. Evol. 258(1): 49–61.
- Gallardo de la Puente C. 2015. Mortiño: la perla de los Andes. Centro de Investigación, Innovación y Promoción de la Gastronomía Ecuatoriana (CIGE) de la UDLA, Rescate de los Sabores Tradicionales del Ecuador, y Alcaldía de Quito.
- Gotsch SG, Nadkarni N, Darby A, Glunk A, Dix M, Davidson K, Dawson TE. 2015. Life in the treetops: ecophysiological strategies of canopy epiphytes in a tropical montane cloud forest. Ecol. Monogr. 85: 393–412.
- Gutiérrez B, Cobián de. 1991. Hongos fitopatogenos encontrados en hojas, flores y frutos de *Macleania rupestris* (H.B.K.) A.C. Smith. Agron. Colomb. 8: 257–260.
- Hamilton LS. 2001. Una campaña por los bosques nublados: ecosistemas únicos y valiosos en peligro. Pp. 41–50. In: Kappelle M, Brown AD, eds. Bosques nublados del Neotrópico. Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio, Santo Domingo de Heredia.
- Heinrich B. 1976. The foraging specializations of individual bumblebees. Ecol. Monogr. 46: 105–128.
- Heinrich B. 1981. The energetics of pollination. Ann. Missouri Bot. Gard. 68: 370–378.
- Heinrich B. 1983. Insect foraging energetics. Pp. 187–214. In: Jones CE, Little RJ, eds. Handbook of experimental pollination biology. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Henderson A, Churchill SP, Lutey JL. 1991. Neotropical plant diversity. Nature 351: 21–22.
- Hernani-Lineros L, García E, Pacheco LF. 2020. Andean bear diet near to and far from a road. Ursus 2020(31e7): 1–7.
- Herrera CM. 2002. Seed dispersal by vertebrates. Pp. 185–208. In: Herrera CM, Pellmyr O, eds. 2002. Plant-animal interactions: an evolutionary approach. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Hofstede RGM, Groenendijk JP, Coppus R, Fehse JC, Sevink J. 2002. Impact of pine plantations on soils and vegetation in the Ecuadorian high Andes. Mt. Res. Dev. 22(2): 159–167.
- Inouye DW. 1980. The terminology of floral larceny. Ecology 61: 1251–1253.
- Inouye DW. 1983. The ecology of nectar robbing. Chap. 5, pp. 152–173. In: Bentley BL, Elias TS, eds. The biology of nectaries. Columbia University Press, New York.
- Irwin RE, Bronstein JL, Manson JS, Richardson L. 2010. Nectar robbing: ecological and evolutionary perspectives. Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst. 41: 271–292.

- Jacquemart A-L. 2003. Floral traits of Belgian Ericaceae species: are they good indicators to assess the breeding systems? *Belgian J. Bot.* 136: 154–164.
- Jeník J. 1971. Root structure and underground biomass in equatorial forests. Pp. 323–337. *In: Productivity of forest ecosystems. Proceedings of the Brussels Symposium, UNESCO and IBP, 27–31 October 1969. UNESCO, Paris, France.*
- Kottke I, Haug I, Setaro S, Suárez JP, Weiß M, Preußing M, Nebel M, Oberwinkler F. 2008. Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest. *Basic Appl. Ecol.* 9: 13–23.
- Kottke I, Setaro S, Haug I, Herrera P, Cruz D, Fries A, Gawlik J, Homeier J, Werner FA, Gerique A, Suárez JP. 2013. Mycorrhiza networks promote biodiversity and stabilize the tropical mountain rain forest ecosystem: perspectives for understanding complex communities. Chapter 14, pp. 187–203. *In: Bendix J, Beck E, Brauning A, Makeschin F, Mosandl R, Scheu S, Wilcke W, eds. Ecosystem services, biodiversity and environmental change in a tropical mountain ecosystem of South Ecuador. Ecological Studies 221. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.*
- Kraemer M. 2001. On the pollination of *Bejaria resinosa* Mutis ex Linné F. (Ericaceae), an ornithophilous Andean páramo shrub. *Flora* 196: 59–62.
- Kron KA, Luteyn JL. 2005. Origins and biogeographic patterns in Ericaceae: new insights from recent phylogenetic analyses. *Biol. Skr.* 55: 479–500.
- Kvist LP, Alarcón S, D. 2008. Plantas tóxicas. Pp. 99–104. *In: Torre L de la et al., eds. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito & Universidad de Aarhus, Denmark.*
- Laegaard S. 1992. Influence of fire in the grass páramo vegetation of Ecuador. Pp. 151–170. *In: Balslev H, Luteyn, JL, eds. Páramo: an Andean ecosystem under human influence. Academic Press, London.*
- León-Yáñez S, Valencia R, Pitman N, Endara L, Ulloa Ulloa C, Navarrete H, eds. 2011. Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. 2nd ed. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Llvisaca S, Manzano P, Ruales J, Flores J, Mendoza J, Peralta J, Cevallos-Cevallos JM. 2018. Chemical, antimicrobial, and molecular characterization of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) fruits and leaves. *Food Sci. Nutr.* 6: 934–942.
- Luteyn JL. 1979. Notes on neotropical Vaccinieae (Ericaceae) VII. Novelties from Ecuador. *Brittonia* 31: 156–163.
- Luteyn JL. 1981. Notes on neotropical Vaccinieae (Ericaceae). IX. Seven new Andean blueberries. *Brittonia* 33: 371–381.
- Luteyn JL. 1983. Part I. *Cavendishia*. *Fl. Neotrop. Monogr.* 35: 1–290.
- Luteyn JL. 1985. Clave para los géneros de las Ericáceas en el Ecuador. *Revista Publ. Mus. Ecuatoriano Cienc. Nat.* 4, Año 6: 5–8.
- Luteyn JL. (coauthor & ed.). 1995. Ericaceae, Part II. The superior-ovary genera (Monotropoideae, Pyroloideae, Rhododendroideae, and Vaccinioideae p.p.). *Fl. Neotr. Monogr.* 66. [Authors: Luteyn JL, Clemants SE, Diggs GM, Dorr LJ, Judd WS, Sørensen PD, Stevens PF, Wallace GD] [*Pernettya*, pp. 365–383; *Gaultheria*, pp. 384–488]
- Luteyn JL. 1996. Ericaceae. *In: Harling G, Andersson L, eds. Fl. Ecuador* 54: 1–404, i–viii. Department of Systematic Botany, Goteborg University, Copenhagen.

- Luteyn JL. 1999. Páramos: a checklist of plant diversity, geographical distribution, and botanical literature. Mem. New York Bot. Gard. 84. New York Botanical Garden Press, Bronx, NY.
- Luteyn JL. 2002. Diversity, adaptation, and endemism in neotropical Ericaceae: biogeographical patterns in the Vaccinieae. *In*: Young K, Ulloa Ulloa C, Luteyn JL, Knapp S, coauthors & eds. Plant evolution and endemism in Andean South America. Bot. Rev. 68: 55–87.
- Luteyn JL. 2004. Ericaceae (Heath family). Pp. 140–143. *In*: Smith N, Mori SA, Henderson A, Stevenson DW, Heald SV, eds. Flowering plants of the Neotropics. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Luteyn JL. 2006. Ericaceae de Ecuador. Rapid Color Guide # 203 versión 1. 7/2006. The Field Museum. [www.fmn.org/plantguides/]
- Luteyn JL, Pedraza-Peñalosa P. 2013. Nomenclature, taxonomy, and conservation of the neotropical genus *Sphyraspermum* (Ericaceae: Vaccinieae), including five new species for Colombia, Ecuador, and Peru. Phytotaxa 79: 1–29.
- Luteyn JL, Pedraza-Peñalosa P. 2021. Ericaceae. *In*: Acevedo-Rodríguez P, ed. 2015-onwards. Lianas and climbing plants of the Neotropics. <https://naturalhistory.si.edu/research/botany/research/lianas-and-climbing-plants-neotropics>
- Luteyn JL, Sylva S, DS. 1999. "Murri" (Antioquia Department, Colombia): hotspot for neotropical blueberries (Ericaceae: Vaccinieae). Brittonia 51: 280–302.
- Luteyn JL, Wilbur RL. 1977. New genera and species of Ericaceae (Vaccinieae) from Costa Rica and Panama. Brittonia 29: 255–276.
- Ma C, Dastmalchi K, Flores G, Wu S-B, Pedraza-Peñalosa P, Long C, Kennelly EJ. 2013. Antioxidant and metabolite profiling of North American and neotropical blueberries using LC-TOF-MS and multivariate analyses. J. Agric. Food Chem. 61: 3548–3559.
- Mast RB, Rodríguez-Maecha JV, Mittermeier RA, Mittermeier CG. 1999. Tropical Andes. Pp. 68–85. *In*: Mittermeier RA, Robles-Gil P, Mittermeier CG, eds. Hotspots: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX S.A., Mexico City.
- Melampy MN. 1987. Flowering phenology, pollen flow and fruit production in the Andean shrub *Befaria resinosa*. Oecologia 73: 293–300.
- Middleton DJ. 1989. Taxonomic studies in the genus *Gaultheria* L. and related genera (Ericaceae). Ph.D. dissertation, University of Aberdeen, Scotland.
- Middleton DJ. 1990. *Pernettya* or *Gaultheria*? Plantsman 12(3): 167–177.
- Middleton DJ. 1991. Ecology, reproductive biology and hybridization in *Gaultheria* L. Edinburgh J. Bot. 48: 81–89.
- Moncayo Loor AS. 2014. Evaluación del potencial inhibidor de las enzimas alfa y beta glucosidasa en algunos frutos nativos del Ecuador. Trabajo de grado. Universidad del Azuay, Cuenca.
- Montenegro AL, Vargas O. 2008. Atributos vitales de especies leñosas en bordes de bosque altoandino de la Reserva Forestal de Cogua (Colombia). Revta. Biol. Trop. 56(2): 705–720.
- MuñozVV. 2004. Determinación de métodos para producción de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), con fines de propagación y producción comercial. Tesis para optar el Título de Ingeniero en Agroempresas, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.

- Naranjo P. 1994. Plantas alimenticias del Ecuador precolombino. Pp. 283–303. *In*: Rios M, Pedersen HB, eds. Las plantas y el hombre. Ediciones Abya-Yala, Quito.
- Naskrecki P, Colwell RK. 1998[1999]. Systematics and host plant affiliations of hummingbird flower mites of the genera *Tropicoseius* Baker & Yunker and *Rhinoseius* Baker & Yunker (Acari: Mesostigmata: Ascidae). Monogr. Thomas Say Publ. Entomology. Entomological Society of America, Lanham, MD.
- Navarro L. 1999. Pollination ecology and effect of nectar removal in *Macleania bullata* (Ericaceae). *Biotropica* 31: 618–625.
- Navarro, L. 2001. Reproductive biology and effect of nectar robbing on fruit production in *Macleania bullata* (Ericaceae). *Plant Ecology* 152: 59–65.
- Navarro L, Ayensa G, Guitián P. 2007. Adaptation of floral traits and mating system to pollinator unpredictability: the case of *Disterigma stereophyllum* (Ericaceae) in southwestern Colombia. *Pl. Syst. Evol.* 266: 165–174.
- Navarro L, Guitián P, Ayensa G. 2008. Pollination ecology of *Disterigma stereophyllum* (Ericaceae) in southwestern Colombia. *Pl. Biol.* 10: 512–518.
- Nieto Orellana AV, Silva Alemán CF. 2012. Influencia de la alteración de hábitat en el uso de recursos florísticos por el ensamble de colibríes en bosques altoandinos del sur del Ecuador. Trabajo de Graduación. Universidad del Azuay, Cuenca.
- NRC (National Research Council). 1989. Lost crops of the Incas: little known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. National Academy Press, Washington, D.C.
- Oblitas Edquén I. 2012. Determinación morfológica del alicón (*Macleania rupestris*). Trabajo de investigación. Escuela Académico Profesional de Agronomía. Universidad Nacional de Cajamarca, Perú.
- Orme CDL, Davies RG, Burgess M, Eigenbrod F, Pickup N, Olson VA, Webster AJ, Ding T, Rasmussen PC, Ridgely RS, Stattersfield AJ, Bennett PM, Blackburn TM, Gaston TM, Owens IPF. 2005. Global hotspots of species richness are not congruent with endemism or threat. *Nature* 436: 1016–1019.
- Ortiz J, Marín-Arroyo M-R, Noriega-Domínguez M-J, Navarro M, Arozarena I. 2013. Color, phenolics, and antioxidant activity of blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth.), and apple wines from Ecuador. *J. Food Sci.* 78(7):C985–C993.
- Ortiz Melo, CL, Uмба Erazo AC. 2010. Dinámica anual de un ensamble de aves frugívoras y su relación con la dispersión de semillas. Chap. 6, pp. 171–192. *In*: Rosero L, ed. 2010. Estudios ecológicos en el Parque Natural Municipal Ranchería, un aporte para su conservación. UPTC-CORPOBOYACÁ. Colección Investigación UPTC No. 27. Tunja, Colombia.
- Osahr K, Ortiz Montero JD, Pérez-Torres J. 2007. Amplitud de nicho y selectividad alimentaria del tortugo de páramo (*Cuniculus taczanowski*) (Stolzmann 1885) en un bosque andino nublado (Zipacón - Cundinamarca). *Revta. U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica* 19: 105–114.
- Parada-Quintero M, Alarcón-Jiménez D, Rosero-Lasprilla L. 2012. Fenología de la floración de especies ornitófilas de estratos bajos en dos hábitats altoandinos del Parque Natural Municipal Ranchería (Paipa–Boyacá–Colombia). *Caldasia* 34: 139–154.
- Pedraza-Peñalosa P. 2010. *Disterigma* (Ericaceae: Vaccinieae). *Fl. Neotr. Monogr.* 108. The New York Botanical Garden Press, Bronx.

- Pedraza-Peñalosa P, Valencia R, Montúfar R, Santiana J, Tye A. 2011 Ericaceae. Pp 299–315 *In*: León-Yáñez, S, Valencia R, Pitman N, Endara L, Ulloa Ulloa C, Navarrete H, eds. Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. 2nd ed. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Pels B, Verweij PA. 1992. Burning and grazing in a bunchgrass páramo ecosystem: vegetation dynamics described by a transition model. Pp. 243–264. *In*: Balslev H, Luteyn JL, eds. Páramo: an Andean ecosystem under human influence. Academic Press, London.
- Popenoe W. 1924. Economic fruit-bearing plants of Ecuador. *Contrib. U.S. Natl. Herb.* 24:101–134.
- Prencipe FP, Bruni R, Guerrini A, Rossi D, Benvenuti S, Pellati F. 2014. Metabolite profiling of polyphenols in *Vaccinium* berries and determination of their chemopreventive properties. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 89: 257–267.
- Proctor M, Yeo P. 1973. The pollination of flowers. Collins, London.
- Quiroz Dahik C, Marín F, Arias R, Crespo P, Weber M, Palomeque X. 2019. Comparison of natural regeneration in natural grassland and pine plantations across an elevational gradient in the páramo ecosystem of southern Ecuador. *Forests* 10(745) (27 pp.).
- Raven PH. 1972. Why are bird-visited flowers predominantly red? *Evolution* 26: 674.
- Read DJ, Leake JR, Perez-Moreno J. 2004. Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Canad. J. Bot.* 82: 1243–1263.
- Reyna Achi CE. 2012. Evaluación del potencial antioxidante de joyapa (*Macleania rupestris*), y aplicación en el procesamiento de alimentos. Tesis de pregrado. Universidad del Azuay, Cuenca, Ecuador.
- Rios M, Koziol MJ, Pedersen HB, Granda G, eds. 2007. Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas [Useful plants of Ecuador: applications, challenges, and perspectives]. Ediciones Abya-Yala, Quito.
- Rodríguez J, Peña J. 1984. Flora de los Andes. Impresión Escala, Bogotá.
- Romero O, Sánchez Nieves J. 2004 [Abstract]. Hongos asociados a *Macleania rupestris* (H.B.K) A.C. Smith en los páramos El Granizo y Guasca, Colombia. *Acta Biol. Colomb.* 9: 128–129.
- Rojas-Nossa SV, Sánchez JM, Navarro L. 2016. Nectar robbing: a common phenomenon mainly determined by accessibility constraints, nectar volume and density of energy rewards. *Oikos* 125: 1044–1055.
- Sælemyr ST. 2004. People, park and plant use: perception and use of Andean 'nature' in the southern Ecuadorian Andes. *Norsk Geogr. Tidssk.* 58: 194–203.
- Schreckinger ME, Wang J, Yousef G, Lila MA, Gonzalez de Mejia E. 2010. Antioxidant capacity and in vitro inhibition of adipogenesis and inflammation by phenolic extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*. *J. Agric. Food Chem.* 58: 8966–8976.
- Schwery O, Onstein RE, Bouchenak-Khelladi Y, Xing Y, Carter RJ, Linder HP. 2015. As old as the mountains: the radiations of the Ericaceae. *New Phytol.* 207: 355–367.
- Selosse M-A, Setaro S, Glatard F, Richard F, Urcelay C, Weiß M. 2007. Sebaciales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytol.* 174: 864–878.
- Setaro SD, Kron KA. 2011. Neotropical and North American Vaccinioideae (Ericaceae) share their

mycorrhizal Sebaciales - an indication for concerted migration? PLoS Currents Tree of Life. 2011 Jul 18. Edition 1.

Setaro S, Weiß M, Oberwinkler F, Kottke I. 2006. Sebaciales form ectendomycorrhizas with *Cavendishia nobilis*, a member of the Andean clade of Ericaceae, in the mountain rain forest of southern Ecuador. *New Phytol.* 169:355–365.

Setaro S, Suárez JP, Herra P, Cruz D, Kottke I. 2013. Distinct but closely related Sebaciales form mycorrhizae with coexisting Ericaceae and Orchidaceae in a neotropical mountain area. Chapter 5, pp. 81–105. *In: Varma A, Kost G, Oelmüller R, eds. Piriformospora indica: Sebaciales and their biotechnological applications. Soil Biol.* 33. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg.

Sierra Escobar A, Mora Osejo LE. 1994. Estudio morfológico del sistema radical de plantas del páramo y del bosque altoandino. Pp. 353–405. *In: Mora-Osejo LE, Sturm H, eds. Estudios ecológicos del páramo y del bosque altoandino Cordillera Oriental de Colombia. Tomo II. Academia Colombiana de Ciencias, Exactas, Físicas y Naturales, Colección Jorge Álvarez Lleras No 6. Santa Fe de Bogotá, D.C.*

Sleumer HO. 1952. Die Arten der Gattung *Gaultheria* L. in Brasilien. *Bot. Jahrb. Syst.* 75: 443–450.

Sleumer HO. 1985. Taxonomy of the genus *Pernettya* Gaud. (Ericaceae). *Bot. Jahrb. Syst.* 105: 449–480.

Smith AC. 1946. Studies of South American plants, XI: noteworthy species of Hippocrateaceae and Vacciniaceae. *J. Arnold Arb.* 27: 86–120.

Snow DW. 1971. Evolutionary aspects of fruit-eating by birds. *Ibis* 113: 194–202.

Stiles FG. 1985. Seasonal patterns and coevolution in the hummingbird-flower community of a Costa Rican subtropical forest. Pp. 757–787. *In: Buckley PA, Foster MS, Morton ES, Ridgely RS, Buckley FG, eds. Neotropical ornithology. Ornithol. Monogr.* 36. American Ornithologists' Union, Lawrence, KS.

Tene V, Malagón O, Finzi PV, Vidari G, Armijos C, Zaragoza T. 2007. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *J. Ethnopharmacology* 111: 63–81.

Torre L de la, Navarrete H, Muriel M, P, Macía MJ, & Balslev H, eds. 2008. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito & Universidad de Aarhus, Denmark.

Torres I, Salinas L, Lara C, Castillo-Guevara C. 2008. Antagonists and their effects in a hummingbird-plant interaction: field experiments. *Ecoscience* 15: 65–72.

Torres WS, Montoya IA, Ligarreto GA. 2009. Aspectos sociales y económicos de la producción de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). Pp. 113–134. *In: Ligarreto MGA, ed. Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño (Vaccinium meridionale Swartz) en la zona altoandina colombiana. Primera edición. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.*

Traveset A. 1998. Effect of seed passage through vertebrate frugivores' guts on germination: a review. *Perspect. Pl. Ecol. Evol. Syst.* 1: 151–190.

United States Agency for International Development. 2009. Latin America and the Caribbean selected economic and social data. United States Agency for International Development, Bureau for Latin America and the Caribbean. Washington DC.

Valencia R, Pitman N, León-Yáñez S, Jørgensen PM, eds. 2000. Libro rojo de las plantas endémicas

del Ecuador 2000. Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.

Van den Eynden V, Cueva E. 2008. Las plantas en la alimentación. Pp. 62–66. *In*: Torre L. de la et al., eds. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito & Universidad de Aarhus, Denmark.

Van der Pijl L. 1972. Principles of dispersal in higher plants. 2nd ed. Springer-Verlag, New York.

Vasco, C, Riihinen K, Ruales J, Kamal-Eldin A. 2009. Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *J. Agric. Food Chem.* 57: 8274–8281.

Veloza-Suan C, Durán S, Magnitskiy S, Lancheros H. 2014. Rooting ability of stem cuttings of *Macleania rupestris* (Kunth) A.C.Sm., a South American fruit species. *Intern. J. Fruit Sci.* 14: 343–361.

Vohník M, Sadowsky JJ, Kohout P, Lhotáková Z, Nestby R, Kolařík M. 2012. Novel root-fungus symbiosis in Ericaceae: sheathed ericoid mycorrhiza formed by a hitherto undescribed Basidiomycete with affinities to Trechisporales. *PLoS ONE* 7(6): e39524.

Zotz G, Almeda F, Bautista-Bello AP, Eskov A, Giraldo-Cañas D, Hammel B, Harrison R, Köster N, Krömer T, Lowry PP, Moran RC, Plunkett GM, Weichgrebe L. 2021. Hemiepiphytes revisited. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*.

Zuluaga Bonilla JE, Espinosa Blanco AS. 2005. Las aves como dispersoras de semillas en la sucesión secundaria de un sector quemado del S.F.F. Iguaque, Boyacá. Trabajo de Grado. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja.

ARTÍCULOS
CIENTÍFICOS

Identificación de *Cercospora* spp. como agente causal de mancha foliar en cultivos de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en la Sierra norte del Ecuador

Identification of *Cercospora* spp. as causal agent of leaf spot in goldenberry (*Physalis peruviana* L.) crops in the northern Sierra of Ecuador

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas
Volumen 42. No. 2, Nov. 2021

Melany Paredes¹, Jeniffer Yáñez^{1*}, Martín Marcial-Coba¹

¹Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

*Autor de correspondencia:
jyanez989@puce.edu.ec

Recibido 14-07-2021
Aceptado 26-10-2021

DOI: 10.26807/remcb.v42i2.899

e-ISSN 2477-9148

© 2021. Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una licencia CC BY-NC 4.0

Como citar este artículo:
Paredes M, Yáñez J. L., Marcial-Coba M. 2021. Identificación de *Cercospora* spp. como agente causal de mancha foliar en cultivos de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en la Sierra norte del Ecuador. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas 42(2): 103-121.
doi: 10.26807/remcb.v42i2.899

Resumen.- La uvilla (*Physalis peruviana* L.) es una planta herbácea originaria de Sudamérica. El fruto tiene un alto contenido nutricional asociado con la creciente demanda del producto a nivel nacional e internacional. Lamentablemente, el cultivo de esta planta se ha visto afectado por diversas enfermedades como la mancha foliar causada por *Cercospora* spp. Esta se caracteriza por presentar manchas de color marrón en las hojas y puede provocar una defoliación prematura de la planta, disminuyendo el rendimiento y la calidad del cultivo. Es por ello que esta investigación tiene como objetivo identificar a *Cercospora* sp. en plantas de uvilla. Para este fin, se realizó un muestreo en diferentes parcelas ubicadas en las provincias de Imbabura y Pichincha. Los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de las lesiones compatibles con el género se caracterizaron a nivel macroscópico y microscópico. La caracterización genética de las cepas se realizó con la amplificación de los genes ITS y TEF- 1α. Las secuencias obtenidas se compararon con las bases de datos GenBank y Mycobank, donde la identidad de las cuatro cepas aisladas correspondió a *Cercospora beticola*. Finalmente, los postulados de Koch confirmaron que este hongo fitopatógeno es el agente causal de la mancha foliar en cultivos de uvilla.

Palabras clave: *Cercospora beticola*, mancha foliar, *Physalis peruviana* L., hongo fitopatógeno, agente causal.

Abstract.- The Goldenberry (*Physalis peruviana* L.) is an herbaceous plant native to South America. This fruit has a high nutritional content, which has led to increased consumption, both locally and internationally. Unfortunately, various diseases, such as leaf spot caused by *Cercospora* spp., have affected the cultivation of this plant. This disease produces brown spots on the leaves and can cause premature defoliation of the plant, reducing crop efficiency and quality. This research, thus, aims to identify *Cercospora* sp. in goldenberry plants. Sampling was carried out in different plots located in the provinces of Imbabura and Pichincha. The strains isolated from typical lesions in plant material were characterized macro- and microscopically. The genetic characterization of the isolated strains was carried out based on amplification of the ITS and TEF-1α. The resulting sequences were compared with those deposited into the GenBank and Mycobank databases, where four strains of *Cercospora beticola* were identified. Finally, Koch's postulates confirmed that this phytopathogenic fungus is the causal agent of leaf spot in goldenberry crops.

Keywords: *Cercospora beticola*, leaf spot, *Physalis peruviana* L., phytopathogenic fungus, causal agent.

Introducción

La uvilla (*Physalis peruviana* L.) es una planta herbácea y perenne que forma parte de la familia Solanaceae (Fischer et al. 2021). Es originaria de los Andes sudamericanos; en especial, de Colombia, Perú y Ecuador, donde crece como una planta silvestre o semi-silvestre en zonas altas entre 1500 y 3000 m.s.n.m. (Trillos et al. 2008). Aunque también se ha confirmado la presencia de esta planta en algunos países como Kenia, Sudáfrica y Egipto, donde puede crecer en los trópicos o subtropicales y no, exclusivamente, en condiciones frías y templadas (Fischer y Melgarejo 2020). En Ecuador crece entre 1300 a 3500 m.s.n.m, con temperaturas promedio de 13 a 15 °C y puede alcanzar una altura de 1-1,5 metros (Fischer et al. 2014).

Physalis peruviana L. produce una fruta exótica que, cuando alcanza la madurez, presenta un sabor agrídulce y posee un color amarillo-anaranjado. Su forma es redonda y su tamaño oscila entre 1,5-2,5 cm de diámetro (Giraldo et al. 2017). Además, se presenta envuelta en un cáliz, también conocido como capacho o capuchón, que protege el fruto de las condiciones climáticas extremas, enfermedades, aves e insectos hasta la madurez (Balaguera- López et al. 2014). Las temperaturas entre 13-15 °C, y la luz con una intensidad lumínica entre 1,500 y 2,000 horas luz/año, resultan favorables para un mejor rendimiento del cultivo y frutos con mayor coloración, gran contenido de azúcares y almidones (López- Sandoval et al 2018). Esta fruta posee altos niveles de azúcar, especialmente, glucosa, sacarosa y fructosa, vitaminas A, B y C (Corrales-Bernal et al. 2015). Adicionalmente, contiene microelementos tales como fósforo, hierro, calcio, zinc y potasio, los cuales le atribuyen propiedades nutricionales y medicinales (González Cabrera et al. 2020). En función de su contenido nutricional, el consumo de uvilla se asocia con efectos antioxidantes y antiinflamatorios, que podrían tener un uso médico para el control de ciertas enfermedades como hepatitis, reumatismo y diabetes (Fischer y Melgarejo 2020).

En el Ecuador, las principales provincias dedicadas a cultivar esta fruta con fines comerciales son Cotopaxi, Pichincha, Carchi e Imbabura, las cuales representan el 74% de la superficie de cultivos de uvilla en el país (MAG 2020). Las características nutricionales antes mencionadas se relacionan con el aumento de la demanda de uvilla a nivel nacional e internacional; especialmente, Canadá, Estados Unidos, Alemania, España y Países Bajos (Portal Frutícola 2020). Consecuentemente, las exportaciones, tanto del fruto fresco como deshidratado, se han incrementado en los últimos años. Entre el 2016 y el 2019 se evidenció un crecimiento en la exportación anual del 53,1% de uvilla deshidratada. Además, según el Banco Central del Ecuador, en el 2019 se exportó un volumen correspondiente a 208 mil dólares de uvilla fresca (Pro Ecuador 2020). Los principales destinos de las exportaciones de uvilla en 2019 fueron: Australia (210 mil dólares), Alemania (204 mil dólares), Estados Unidos (108 mil dólares), Reino Unido (64 mil dólares) y Canadá (23 mil dólares) (Pro Ecuador 2020).

Lamentablemente, el cultivo de esta planta se ha visto seriamente afectado por diversas enfermedades causadas por microorganismos que disminuyen el rendimiento y la calidad del cultivo, generando daños significativos en la planta y provocando grandes pérdidas económicas a los productores (Catarina 2014). En Colombia, las enfermedades de mayor importancia económica son: el marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum*; la muerte descendente generada por *Phoma* spp. en ambientes que presentan alta humedad y baja temperatura; y la mancha de la hoja y el capacho, causada por *Cercospora* spp. Esta última es la mayor enfermedad foliar de la uvilla (Catarina 2014; Fischer et al. 2014).

El género *Cercospora*, perteneciente a la familia Mycosphaerellaceae, es uno de los géneros más grandes y sus especies se consideran patógenos importantes de una amplia variedad de plantas (Park et al. 2017; Rangel et al. 2020). Se reconocen 659 especies en el género *Cercospora* y 281 especies morfológicamente idénticas que se incluyen en el complejo *Cercospora apii* (Groenewald et al. 2005; Park et al. 2017). La mayoría de especies de este género no tienen una etapa sexual conocida y en las pocas especies que tienen una etapa sexual, el teleomorfo pertenece al género *Mycosphaerella* (Goodwin et al. 2001; Świdarska-Burek et al. 2020). Las especies de *Cercospora* spp. se asocian con infecciones que generan manchas de las hojas y frutas en diferentes plantas cultivadas y silvestres en todo el mundo (Nguanhom et al. 2015). Los síntomas de la mancha foliar se presentan con mayor intensidad en las partes más externas e

inferiores de la planta, aunque pueden encontrarse en cualquier parte de la hoja, como pequeñas manchas irregulares de color marrón claro o, incluso, blancas, con halos amarillos que se tornan secos y quebradizos (Tian et al. 2008). Durante las primeras etapas de la infección, el hongo posee un estilo de vida biotrófico. Sin embargo, cambian su estilo de vida a uno necrotrófico en el que se produce la muerte de la célula huésped para completar su ciclo de vida (Ebert et al. 2020).

Actualmente, en Ecuador, las investigaciones realizadas en relación a enfermedades del cultivo de uvilla son escasas. En el estudio realizado por Díaz et al. (2019) sobre hongos asociados a las manchas foliares en hojas de la uvilla, se logró aislar e identificar *Cercospora* sp., pero no se determinó la especie causante de la enfermedad denominada mancha foliar. Además de la limitada información referente a esta enfermedad en plantas de uvilla, las características morfológicas del fitopatógeno asociado tienen una estrecha similitud con géneros como: *Corynespora* spp., *Pseudocercospora* spp., *Mycosphaerella* spp., etc.; lo que dificulta aún más la identificación del género (Groenewald et al. 2013). En este contexto, el presente estudio resulta de gran interés agrícola, al proponer aislar e identificar a nivel de especie al agente causal de la enfermedad. De esta manera, se pretende que la metodología aplicada y los resultados generados en esta investigación contribuyan al establecimiento de eficientes medidas de control orientadas a la prevención y correcto diagnóstico de *Cercospora* spp. en cultivos de uvilla.

Materiales y Métodos

Recolección de muestras de tejido vegetal

El muestreo se realizó en siete localidades, pertenecientes a las provincias de Pichincha (El Tingo, San José de Minas y Aloasí) e Imbabura (Moraspungo, Huchingero/ Alesochopa y Cumbasconde). En cada una de las parcelas, las muestras se tomaron de acuerdo con el modelo aleatorio estratificado, donde se seleccionaron las plantas con sintomatología compatible con aquella descrita brevemente arriba y que es ocasionada por la infección de *Cercospora* spp. en cultivos de uvilla. Con base en esto, se recolectaron las hojas con pequeñas manchas, de la zona baja, media y superior de cada planta (Tian et al. 2008).

Las hojas se colocaron en fundas de cierre hermético y fueron etiquetadas con datos correspondientes a fecha, hora, nombre de la finca y georeferencia. Las muestras se transportaron en una caja hermética a los laboratorios de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador para su posterior análisis en un lapso de 24 horas.

Aislamiento del hongo

Para la desinfección superficial del tejido foliar, primero se realizó un lavado de la hoja en agua potable para eliminar contaminantes presentes en la superficie. Posteriormente, se cortaron secciones de aproximadamente 1 cm² de la zona de la hoja donde se encontraba la lesión (Farrag 2011). Inmediatamente, los fragmentos de tejido sintomático se sumergieron en alcohol etílico al 70% durante 1 min. Luego, se colocaron en hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min y, finalmente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril (Rengifo-Guzmán et al. 2002; Agrios 2005). Los cortes de hoja desinfectados fueron secados en papel absorbente estéril y, posteriormente, se sembraron en cajas Petri conteniendo Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) suplementado con gentamicina (80 mg/L). Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente (20 a 25° C) y se observó el desarrollo de los cultivos diariamente por aproximadamente 10 días (Milosavljević et al. 2014a). Los hongos aislados con características macroscópicas similares a *Cercospora* spp. se purificaron en los medios PDA, Agar zanahoria (CA, por sus siglas en inglés) y Agar extracto de malta (MEA, por sus siglas en inglés) hasta conseguir un cultivo axénico en cada uno de los medios.

Caracterización morfológica a nivel macroscópico y microscópico

La descripción de la morfología a nivel macroscópico se realizó a partir de los cultivos axénicos obtenidos en los medios PDA, MEA y CA. Estos fueron incubados a 23 ± 2 °C durante tres semanas. Se tomó en cuenta características como textura, bordes, presencia de exudados y coloración de anverso y reverso.

La caracterización microscópica se realizó con base en la morfología que presentaron las cepas cultivadas en medio CA por su capacidad de promover la esporulación (Chen et al. 1979). Para esto, se realizó una impronta con cinta adhesiva del micelio aéreo de la colonia fúngica, la cual se ubicó en un portaobjetos con azul de lactofenol. De forma paralela, se cortó un pequeño fragmento de la colonia fúngica con una aguja micológica y se colocó sobre un portaobjetos con agua. Las placas se observaron en el microscopio con un aumento de 400x (López et al. 2014). Las estructuras observadas fueron fascículos de conidióforos y conidios, los cuales se midieron mediante el software DinoCapture 2.0 (Mukhtar et al. 2019). Las características macroscópicas y microscópicas se compararon con fotografías y descripciones detalladas del género *Cercospora* en literatura científica (Agrios 2005; Crous et al. 2006; Park et al. 2020).

Identificación molecular de los aislamientos fúngicos

Se extrajo ADN a partir de los aislados fúngicos de 10 días, utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, Wisconsin, E.E.U.U. 2019). La concentración y calidad de ADN se midieron, espectrofotométricamente, usando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, E.E.U.U. 2009).

La amplificación de las secuencias nucleotídicas de interés se llevó a cabo mediante Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). La región ITS (espaciador transcrito interno del ADN nuclear ribosomal) fue amplificada utilizando los pares de cebadores ITS-1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'), ITS-4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al. 1990). Los parámetros programados para esta reacción fueron: etapa de desnaturalización inicial de 1 min a 95 °C, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, una hibridación de *primers* a 55 °C por 30 seg, una elongación por 1 min a 72 °C y una elongación final de 5 min a 72 °C. Asimismo, el gen Factor de elongación 1-alfa (TEF-1 α) se amplificó con los cebadores EF1-983 (5' GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT 3'), EF1-2218 (5' ATGACACCRACRGCRCRGTGTG 3') (Rehner y Buckley 2005). La desnaturalización inicial se realizó a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 60 seg, la hibridación de *primers* a 55 °C por 60 seg, una elongación de 72 °C por 60 seg y, finalmente, una elongación a 72 °C por 4 min. Ambas reacciones tuvieron un volumen final de 25 μ l, utilizando el kit comercial GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU. 2018).

Los productos de PCR (500 y 900pb, respectivamente) obtenidos en la amplificación se separaron mediante electroforesis (95 voltios por 60 minutos) en gel de agarosa 1,5% y visualizados mediante luz UV (Cornejo Romero et al. 2014). Los amplicones fueron secuenciados mediante el método de Sanger por Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

Las secuencias consenso se alinearon mediante la herramienta ClustalW, perteneciente al programa MEGA-X (Kumar et al. 2018). Posteriormente, estas secuencias se compararon con aquellas depositadas en la base de datos Mycobank y, a través de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de GenBank (NCBI), para determinar el género y la especie de los hongos aislados.

Postulados de Koch

Las plántulas de uvilla sanas, de 15 días de edad, fueron proporcionadas por Terrafertil (Tabacundo, Pichincha). Estas se sembraron en tarrinas con el sustrato comercial de vermiculita PRO-MIX GPX (PRO MIX, Quakertown, Pennsylvania, EE. UU. 2012) y se mantuvieron en un invernadero con condiciones controladas de temperatura dentro de un rango de 15-23 °C y un porcentaje de humedad entre 70-80% (Crosley et al. 2019).

Para la preparación del inóculo se propagaron, previamente, de forma individual, las cuatro cepas de *Cercospora* sp. en 12 cajas Petri conteniendo el medio CA. Estas fueron incubadas a 25 °C con fotoperiodo de 12h/12h por tres semanas (Rooney-Latham et al. 2011). A partir de estos cultivos, se procedió de dos maneras. En el primer caso, se colocaron 5 mL de agua estéril y se removieron las esporas superficiales de la colonia fúngica con la ayuda de un asa de Drigalsky. La suspensión obtenida se diluyó en una solución acuosa de polisorbato 80 al 0,1%, hasta obtener una concentración de 1×10^4 conidias/mL (Caesar et al. 2009), misma que fue confirmada

mediante recuento en cámara de Neubauer (Aguilar- Ulloa et al. 2015). En el segundo método se utilizaron discos miceliales de 5 mm de diámetro, obtenidos a partir de los cultivos del hongo en CA (Bobev et al. 2009; Mukhtar et al. 2019).

La inoculación en plantas, de aproximadamente cinco semanas de edad, se realizó por triplicado para cada cepa seleccionada y modalidad de inoculación (Bobev et al. 2009). De forma previa a la inoculación de las cepas fitopatógenas, bajo las dos modalidades, se realizaron pequeñas laceraciones con una aguja de 6 mm en las hojas de 24 plantas, previamente desinfectadas con alcohol etílico 70% (Milosavljević et al., 2014b). En el primer método, se roció la suspensión obtenida previamente (1×10^4 conidias/ mL) hasta la escorrentía; mientras que en el segundo método se colocaron, al menos, tres tampones miceliales directamente sobre cada hoja. También se utilizaron tres controles negativos en los cuales se roció agua estéril. Todas las plantas se mantuvieron en cámara húmeda durante 72 horas y, posteriormente, se transfirieron a un invernadero, donde se mantuvieron en condiciones de luz/oscuridad de 12/12h a 25 °C y 80% de humedad (Marin et al. 2020).

Diariamente, se evaluó la ocurrencia de cambios y la aparición de sintomatología característica de la mancha foliar por *Cercospora* sp. en las hojas inoculadas y se aisló el patógeno, mediante la metodología arriba descrita, para su posterior identificación molecular con los *primers* ITS 1 e ITS 4 utilizando el protocolo descrito anteriormente (Soylu et al. 2003). Se utilizó la región ITS para la identificación de cepas en postulados de Koch, debido a la disponibilidad inmediata de los cebadores para la amplificación de esta región. Sin embargo, lo ideal sería identificar las cepas tanto con la región ITS como la región TEF-1 α para obtener resultados más precisos.

Resultados

Aislamiento y caracterización fenotípica de *Cercospora* spp.

Los síntomas característicos de la infección por *Cercospora* spp. en las hojas de uvilla se presentaron como manchas necróticas de forma circular o irregular, con un centro gris blanquecino, un marcado borde de color marrón oscuro y un pequeño halo de color marrón claro (Figura 1). A partir de las muestras procesadas, se obtuvieron cuatro aislados fúngicos que coincidieron con las características macroscópicas de *Cercospora* spp. (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas obtenidas en cada localidad muestreada entre enero 2020- enero 2021

Provincia	Localidad	Georreferencia	Mes de muestreo	Código de cepa
Pichincha	San José de Minas	00° 16' 52.2" N 078° 21' 03.8" W 0° 17' 44.352" S	Enero	- ET-41
Pichincha	El Tingo	78° 26' 51.682" W	Noviembre	ET-22 ET-24 ET-81
Pichincha	Aloasí	0° 30' 8.679" S 78° 36' 48.36" W	Diciembre	-
Imbabura	Huchinguero/ Alesochopa	0° 15' 25.279" N 78° 20' 22.372" W	Enero	-
Imbabura	Moraspungo	0° 16' 31.742" N 78° 21' 5.493 W	Enero	-
Imbabura	Cumbasconde	00°15'45.0" N 078° 18' 55.1" W	Enero	-

Los códigos ubicados en la parte derecha de la tabla pertenecen a la codificación interna del laboratorio

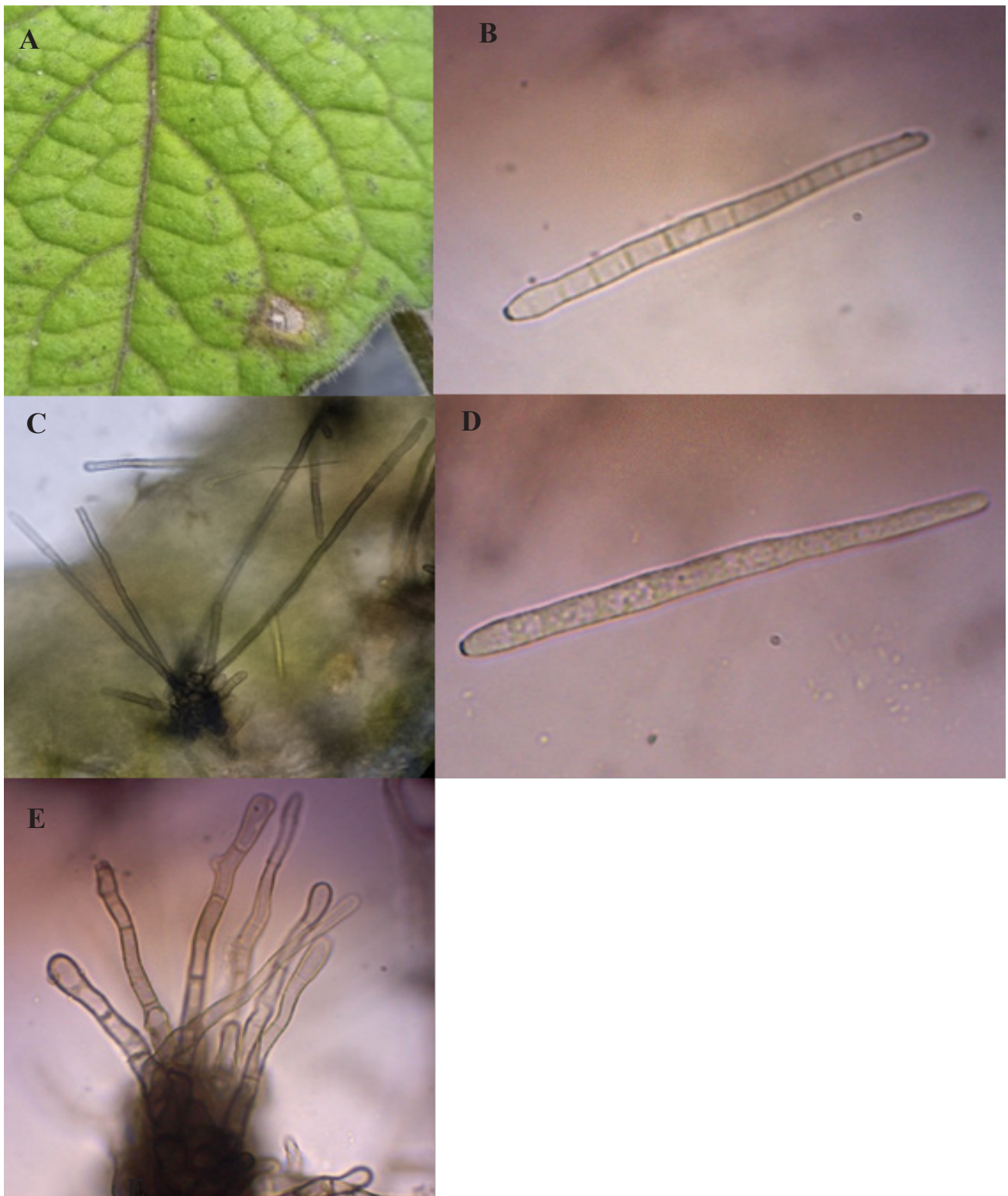


Figura 1. A) Mancha necrótica característica de *Cercospora* spp. en hoja de uvilla. Observación microscópica de las estructuras de *Cercospora* spp. en Agar zanahoria (CA, por sus siglas en inglés) después de 10 días. B) Conidio con septos; C- E) Fascículos de conidióforos; D) Conidio sin septos (Aumento total: 400x).

Debido al crecimiento lento del hongo, las características macroscópicas en los medios PDA, MEA y CA se evaluaron después de tres semanas de incubación. En el medio PDA, las colonias presentaron una forma irregular, bordes erosionados, micelio aéreo moderado, presencia de exudados; con un color blanco en el centro de la colonia, seguido de un anillo irregular color verde oliváceo y, finalmente, un borde blanco grisáceo. En el reverso de las colonias se observó un color completamente negro (ET-22, ET-24 y ET-41), mientras que ET-81 presentó un color negro con borde negro azulado (Figura 2). Por otra parte, las colonias desarrolladas en MEA presentaron una forma circular, elevación plana, micelio aéreo moderado, borde liso (ET-81 y ET-22) o borde irregular (ET-24 y ET-41), centro gris oliváceo o gris blanquecino con borde negro blanquecino y una tonalidad amarillo-verdosa en la periferia. El aislamiento ET-41 difirió del resto, ya que en el borde no presentó coloración amarilla y, en su lugar, presentó una tonalidad blanca. En el reverso, se observó un color negro en el centro con un anillo negro grisáceo y un ligero color amarillo (Figura no presentada).

Por último, en CA la forma de las colonias fue irregular o circular, colonia elevada, bordes bien definidos y micelio algodonoso de color marrón oscuro a negro con una capa de color gris blanquecino encima. En el reverso, se presentó una coloración negra en todas las colonias (Figura 2).

La descripción microscópica se realizó a partir de un cultivo en agar zanahoria de 20 días. Se observaron entre 3 y 17 conidióforos agrupados en fascículos sueltos. Los conidióforos filiformes, rectos o ligeramente curvados presentaron color marrón claro y contenían entre 2 y 4 septos (Figura 1). Los conidios se presentaron de forma aislada, fueron hialinos, rectos o curvados, más anchos en el centro y en algunos casos con forma de aguja en uno de los extremos; se presentaron entre 0 y 14 septos (Figura 1). Las mediciones de los conidióforos y los conidios realizadas se presentan en la Tabla 2.

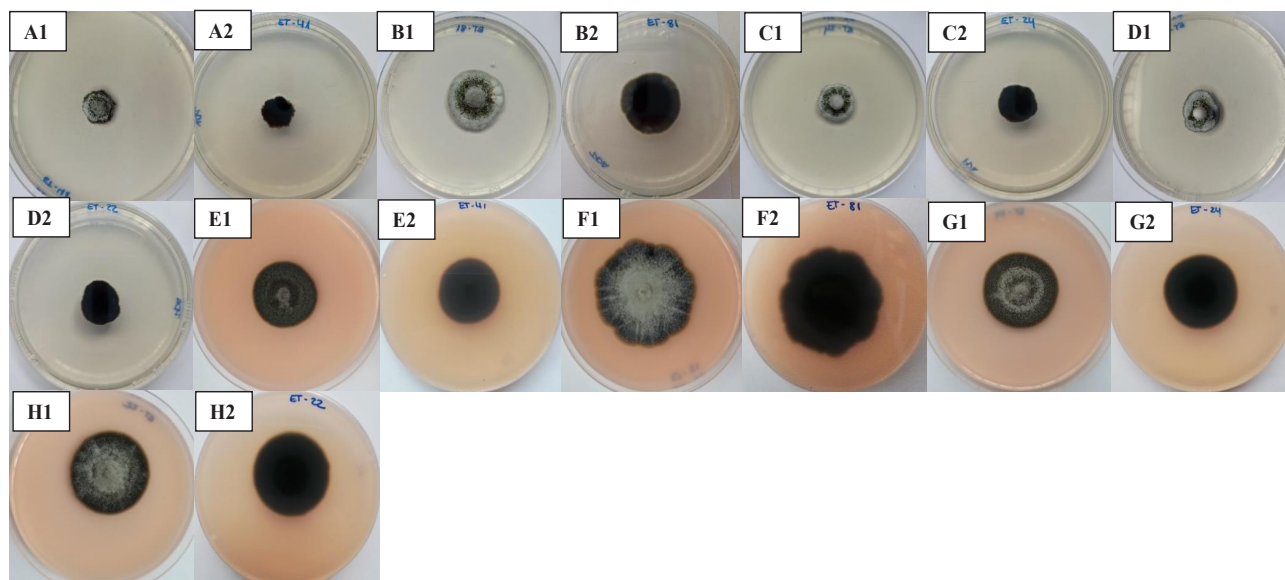


Figura 2. Observación macroscópica de los aislados de *Cercospora* spp. después de 3 semanas de crecimiento. 1) Anverso; 2) Reverso; A-D) Colonias en agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés); E-H) Colonias en agar zanahoria (CA, por sus siglas en inglés).

Tabla 2. Tamaño de las estructuras microscópicas (conidios y conidióforos) después de 20 días de crecimiento.

Código de cepa	Conidióforos		Conidios	
	Largo (μm)	Ancho (μm)	Largo (μm)	Ancho (μm)
ET-41	56,3- 103,9	2,9- 5	36.7- 171.7	3.0- 5.1
ET-22	33,3- 103,8	2,2- 5,2	39.2- 138.7	2.3- 4.2
ET-24	37,1- 100,3	3,6- 4,4	49.4- 144.3	2.9- 4.4
ET-81	37,9- 66,2	2,7- 3,9	33.3- 97.6	2.6- 4.3

μm : micrómetros; Número de estructuras medidas de conidióforos: 5;

Número de estructuras medidas de conidios: 25

Identificación molecular

Los amplicones obtenidos mediante PCR, a partir de cuatro aislados, correspondientes a las regiones ITS y TEF-1 α , tuvieron un tamaño aproximado de 500 y 900 pb, respectivamente. Las secuencias consenso obtenidas a partir de la secuenciación y alineamiento del gen ITS, resultaron en la identificación del género *Cercospora*, debido a que se observó un porcentaje de similitud $\geq 99\%$, de manera simultánea, con diferentes especies de *Cercospora* spp. (Tabla 3); mientras que las secuencias obtenidas con el gen Factor de elongación, resultaron en la identificación de *Cercospora beticola* con un porcentaje $\geq 98\%$ de similitud y $\geq 99\%$ de cobertura, al menos, en una de las bases de datos consultadas (Tabla 3).

Postulados de Koch

Las cuatro cepas inoculadas, individualmente, en plantas de uvilla presentaron sintomatología característica de la mancha foliar por *Cercospora* spp. En la Tabla 4 se describe la presencia de síntomas de forma semicualitativa. Los primeros síntomas se evidenciaron 12 días después de la inoculación. Estos se presentaron como pequeñas manchas irregulares y blanquecinas alrededor de las heridas (Figura 3). Después de 7 días de la aparición de los primeros síntomas, las manchas se agrandaron y se evidenciaron manchas con un centro de color marrón claro, borde marrón oscuro y un halo verde grisáceo o marrón (Figura 3). Adicionalmente, se presentó una defoliación prematura y clorosis en todas las plantas, mientras que el control negativo no presentó cambios visibles. Por otro lado, el tratamiento con discos miceliales resultó en la ocurrencia de 10 a 15 manchas necróticas por hoja, mientras que el tratamiento de aspersión con esporas condujo a la formación de 2-4 manchas necróticas por hoja. En el aislamiento del patógeno, a partir de las plantas infectadas, se identificaron las cuatro cepas por medio de métodos moleculares; no obstante, únicamente, se logró llegar a nivel de género debido a que la similitud fue de 100% con diferentes especies. Así, se determinó que el causante de los síntomas fue *Cercospora* sp.

Discusión

El género *Cercospora* incluye una gran cantidad de especies consideradas importantes patógenos de plantas, las cuales causan graves problemas económicos debido a su distribución mundial y la carencia de mecanismos eficientes de resistencia por parte de los hospedadores (Daub et al. 2005; Park et al. 2020). Este hongo es considerado un importante patógeno de la uvilla en Colombia, donde se ha observado que provoca manchas necróticas en las hojas y el capacho causando pérdidas en los cultivos (Fischer et al. 2014). Adicionalmente, la mancha foliar puede conducir a una defoliación total cuando la enfermedad no es controlada a tiempo; por lo que se le atribuye una gran importancia económica (Shahzady et al. 2017). En Ecuador, se han reportado síntomas característicos de esta enfermedad en diferentes localidades, pero no se han realizado los estudios necesarios para su correcta identificación y reporte (A. Jarrín, comunicación personal, 16 diciembre 2020). En este estudio, se lograron identificar cuatro cepas de *Cercospora* spp. en la Sierra norte del Ecuador. A pesar de que se realizaron muestreos en distintas localidades, la enfermedad solo pudo encontrarse en la localidad de El Tingo, Pichincha. Es posible que esto se deba a que ciertas localidades no presentaron la temperatura y humedad necesaria (24-27 °C y $\geq 90\%$ de humedad) para el desarrollo de la enfermedad, durante los

Tabla 3. Identificación molecular en base a la comparación de secuencias de la región ITS y TEF obtenidas de las cepas con las bases de datos NCBI y Mycobank.

Código de la cepa	Región de ADN	Número de acceso de referencia	Microorganismo	Porcentaje de similitud (%)	Porcentaje de cobertura (%)
ET-41	ITS	MZ047502.1 (GenBank)	<i>Cercospora</i> sp.	99,32	100
		MW581369.1 (GenBank)	<i>Cercospora beticola</i>	99,32	100
		MF681087 (Mycobank)	<i>Cercospora beticola</i>	99,32	100
		CBS 140164 (Mycobank)	<i>Cercospora glycinicola</i>	99,32	100
		MF681101 (Mycobank)	<i>Cercospora</i> sp.	99,32	100
		MF681072 (Mycobank)	<i>Cercospora apii</i>	99,32	100
	TEF-1 α	XM_023594009.1 (GenBank)	<i>Cercospora beticola</i>	98,97	100
		CBS 116456 (Mycobank)	<i>Cercospora beticola</i>	98,77	100
ET-22	ITS	JX143616.1 (GenBank)	<i>Cercospora</i> cf. <i>ipomoeae</i>	100	100
		AY840540.1 (GenBank)	<i>Cercospora apiicola</i>	100	100
		MW581361.1 (GenBank)	<i>Cercospora beticola</i>	100	100
		CBS 140164 (Mycobank)	<i>Cercospora glycinicola</i>	100	100
		JX143590 (Mycobank)	<i>Cercospora delaire</i>	100	100
		JX143616 (Mycobank)	<i>Cercospora</i> sp.	100	100
	AY840540 (Mycobank)	<i>Cercospora apiicola</i>	100	100	
TEF-1 α	XM_023594009.1 (GenBank)	<i>Cercospora beticola</i>	98,2	100	
		CBS 116456 (Mycobank)	<i>Cercospora beticola</i>	98,19	99,46
ET-24	ITS	JX143616.1 (GenBank)	<i>Cercospora</i> cf. <i>ipomoeae</i>	100	100
		MK752901.1 (GenBank)	<i>Cercospora nicotinae</i>	100	100
		MK318663.1 (GenBank)	<i>Cercospora beticola</i>	100	100
		MF681101 (Mycobank)	<i>Cercospora</i> sp.	100	100
		MF681092 (Mycobank)	<i>Cercospora beticola</i>	100	100
		MF681072 (Mycobank)	<i>Cercospora apii</i>	100	100
	TEF-1 α	XM_023594009.1 (GenBank)	<i>Cercospora beticola</i>	98,24	99
		CBS 116456 (Mycobank)	<i>Cercospora beticola</i>	98,43	99,61
ET-81	ITS	MF681169.1 (GenBank)	<i>Cercospora beticola</i>	100	100
		MT626618.1 (GenBank)	<i>Cercospora</i> sp.	100	100
		MK989498.1 (GenBank)	<i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i>	100	100
		MT338044.1 (GenBank)	<i>Cercospora</i> cf. <i>sigesbeckiae</i>	100	100
		MF681093 (Mycobank)	<i>Cercospora beticola</i>	100	100
		CBS 140167 (Mycobank)	<i>Cercospora</i>	100	100
	CBS 140166 (Mycobank)	<i>Cercospora cyperina</i>	100	100	
	CBS 128.27 (Mycobank)	<i>Cercospora kikuchii</i>	100	100	
	TEF-1 α	XM_023594009.1 (GenBank)	<i>Cercospora beticola</i>	97,93	99
		CBS 116456 (Mycobank)	<i>Cercospora beticola</i>	98,12	99,63

meses en los que las muestras fueron recolectadas (De Lemos Cardoso et al. 2013; Rangel et al. 2020). Esta enfermedad se desarrolla frecuentemente durante el verano y debe tener una alta humedad con largos periodos de lluvia (Fischer et al. 2014; Shahzady et al. 2017).

Según Catarina (2014), los síntomas de la infección por este hongo fitopatógeno se presentan en hojas y en capachos de la uvilla como pequeñas áreas necróticas de color gris, con presencia de pequeños halos amarillos y la formación de anillos concéntricos en función del progreso de la infección en el tejido vegetal. Sin embargo, en otros casos, se presentan como lesiones irregulares con bordes definidos limitados por las nervaduras. Por el contrario, Tian et al. (2008), reportan que las lesiones necróticas provocadas por *Cercospora* spp. se distinguen de las causadas por el patógeno *Alternaria* spp. (tizón tardío) por la ausencia de anillos concéntricos. Los síntomas encontrados en este estudio coincidieron con lo reportado en el estudio de Chai et

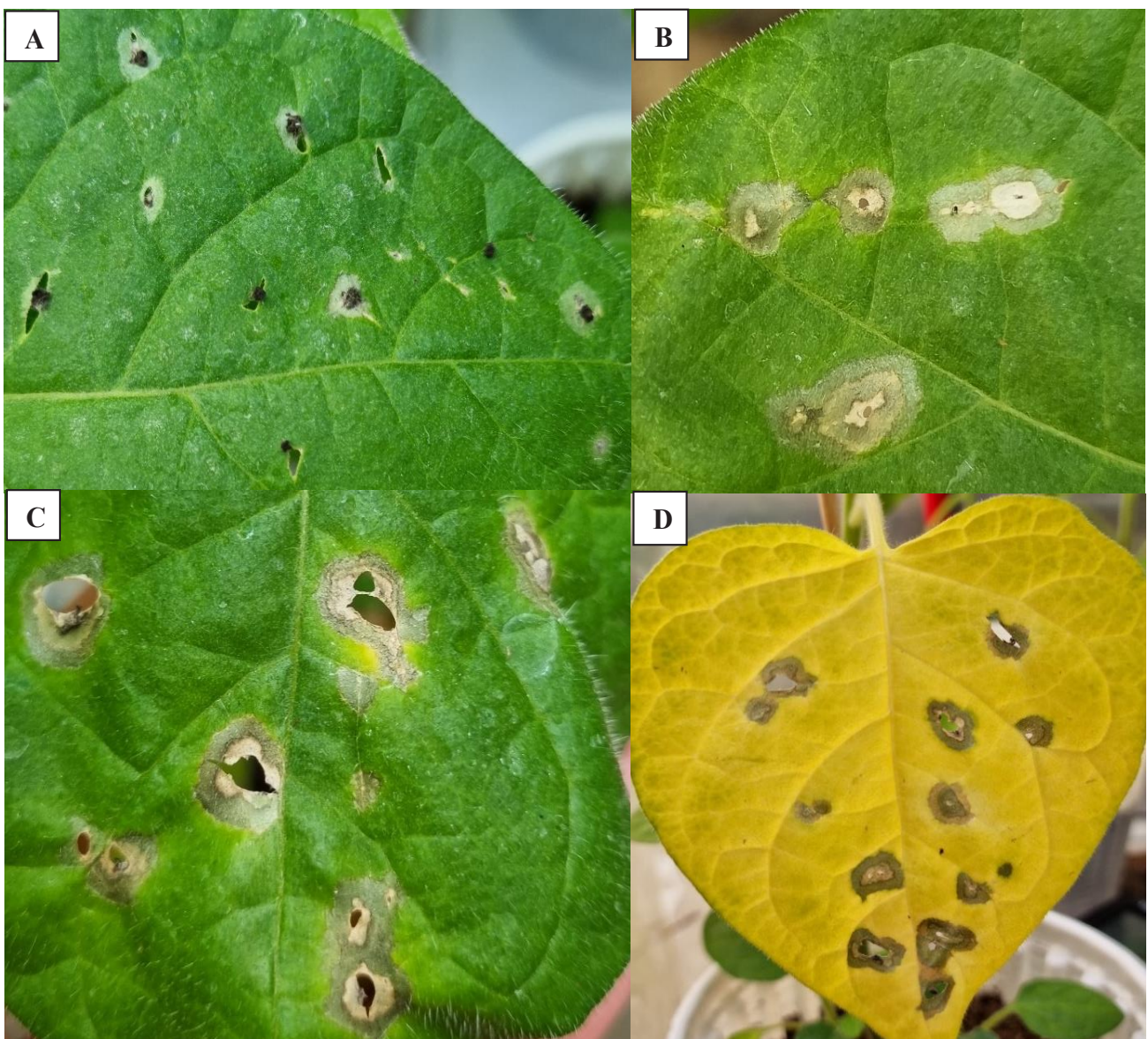


Figura 3. Lesiones producidas por *Cercospora* spp. en los postulados de Koch utilizando plantas de uvilla. A) Primeras lesiones producidas después de 12 días; B-C) Manchas necróticas producidas después de 19 días; D) Clorosis completa y manchas necróticas.

Tabla 4. Determinación semicualitativa del desarrollo de síntomas de cada cepa analizada en los postulados de Koch.

	Cepa	Sintomatología		
		Clorosis	Manchas irregulares	Defoliación prematura
ET- 41	Tratamiento 1	++	++	+
	Tratamiento 2	+++	+++	++
ET- 81	Tratamiento 1	+	+	+
	Tratamiento 2	++	+++	++
ET- 24	Tratamiento 1	+	++	+
	Tratamiento 2	+++	+++	+++
ET- 22	Tratamiento 1	+	+	+
	Tratamiento 2	+	++	++

alao, ya que las lesiones se caracterizaron por presentar un centro color blanco grisáceo, con un borde marrón oscuro seguido de un halo marrón claro o verdoso, con forma irregular y bordes bien definidos. Además, coincidieron parcialmente con lo reportado por Catarina (2004), ya que no presentaron anillos concéntricos, sino, únicamente un halo alrededor de la mancha.

Las cepas aisladas en PDA se caracterizaron por la presencia de exudados en las colonias que presentaron tonalidades blancas, verde oliva y gris con un crecimiento lento. Estos resultados son parcialmente similares a los obtenidos por Chai et al. (2021), quienes describen a las colonias en PDA como blanquecinas a grises con micelio aéreo algodonoso; mientras que en las colonias desarrolladas en MEA se observaron colores verde-grisáceo, amarillo, gris y negro blanquecino. Crous et al. (2006) reportan resultados parcialmente similares describiendo una colonia en MEA con micelio aéreo escaso, márgenes irregulares, superficie gris oliva con manchas irregulares de color blanco o gris hierro. Tanto en MEA, como en PDA, el crecimiento fue lento y no se observó el desarrollo de conidióforos ni conidios. Por otro lado, el crecimiento en CA también fue lento y dio como resultado colonias marrón oscuro y una alta producción de conidios, aunque los fascículos fueron escasos. Marin et al. (2020) llegaron a la conclusión de que el cultivo de *Cercospora* spp., en los medios CA y PDA + sacarosa al 6%, conduce a una gran producción de estructuras reproductivas (conidióforos y conidios), lo que permite la correcta identificación microscópica del hongo. Adicionalmente, este género fúngico se caracteriza por tener un buen crecimiento en diferentes medios de cultivo como V8, OMA (Agar harina de avena), PDA, MEA y CA, donde las temperaturas de incubación óptimas son 24-25 °C con un fotoperiodo de 12h/12h (Mukhtar et al. 2019).

Según Crous et al. (2007) es posible distinguir, morfológicamente, al género *Cercospora* spp. de otros géneros similares (*Passalora*, *Pseudocercospora* y *Stenella*) a través de rasgos en la estructura de las cicatrices de conidios, estructura de las hifas y presencia o ausencia de pigmentación de conidios y conidióforos (Bakhshi et al. 2012; Świdarska-Burek et al. 2020). Las características microscópicas observadas del hongo en este estudio presentaron conidióforos de color marrón, rectos o ligeramente curvos, multiseptados, distribuidos en fascículos de 3 a 17 y con un tamaño de 2-5 µm x 33-104 µm, mientras que los conidios fueron hialinos, con septos de 0 a 14, rectos o ligeramente curvos y presentaron un tamaño de 33-175 x 2-5 µm. Estas características coinciden con las reportadas en el estudio de Mukhtar et al. (2019) donde los conidióforos se presentaron de forma simple, color marrón, pero subhialinos en el ápice, rectos, con un tamaño de 4,5 a 5 x 20 a 100 µm, y cicatrices de esporas distintivas. Los conidios fueron solitarios, hialinos, filiformes, rectos o ligeramente curvados, el ápice fue obtuso o en punta, multiseptados (1 a 18) y un tamaño de 28 a 230 x 2,5 a 4 µm. De la misma forma, Marin et al. (2020), describieron características similares a las presentadas anteriormente con pequeñas variaciones, tanto en el tamaño de los conidióforos como en el de los conidios.

Aunque las características morfológicas son utilizadas frecuentemente para identificar aislamientos fúngicos, no es posible distinguir a las especies pertenecientes a *Cercospora* spp., únicamente, con base en la morfología; muchas veces, hay una superposición significativa en estas características y complica la taxonomía del género (Meghvansi et al. 2013; Park et al. 2017). Es por ello que los enfoques polifásicos, basados en ecología, morfología y estudios moleculares, se utilizan para la identificación de las especies de este género (Park et al. 2020; Świdarska-Burek et al. 2020). En esta investigación se utilizaron las regiones ITS y TEF-1 α , dando como resultado amplicones de 500 y 900 pb, respectivamente, en todas las cepas analizadas. Los cuatro aislados fúngicos no pudieron ser identificados a nivel de especie mediante la secuenciación de la región ITS, debido a que se obtuvo la máxima similitud con diferentes especies del género *Cercospora* y resultó imposible discriminar entre estas e identificar cada cepa con una especie determinada. Por lo tanto, los resultados fueron inconcluyentes al comparar las secuencias en las bases de datos GenBank y Mycobank. El espaciador transcrito interno (ITS) es un fragmento de ADN que actualmente es considerado un código de barras universal de los hongos, debido a que tiene la mayor probabilidad de identificación exitosa para una amplia gama de hongos (Schoch et al. 2012; Badotti et al. 2017). Sin embargo, Groenewald et al. (2010) sugieren que la región ITS tiene una baja capacidad para distinguir entre especies de *Cercospora* spp. Park et al. (2017) obtuvieron resultados similares al obtener 100% de similitud con diferentes especies utilizando la región ITS. Estos autores tuvieron que realizar un análisis multigénico para encontrar la especie de *Cercospora* spp. Por lo tanto, en esta investigación se amplificó y secuenció el gen de Factor de elongación para discriminar entre especies de este género. Como resultado, se pudieron identificar los cuatro aislados como *Cercospora beticola* con un alto porcentaje de identidad y cobertura, tanto en la base de datos GenBank como en Mycobank. Actualmente, los códigos de barras de ADN secundarios se implementan cada vez más para grupos donde ITS no proporciona suficiente precisión (Lücking et al. 2020). En varios estudios, se ha determinado que la combinación de genes de actina (ACT), calmodulina (CAL), histona (H3), Factor de elongación (TEF 1- α) y β -tubulina (TUB) es una de las formas más efectivas para diferenciar entre las especies de *Cercospora* spp. (Montenegro-Calderón et al. 2011; Groenewald et al. 2013; Meghvansi et al. 2013). Adicionalmente, se han utilizado los genes ARN polimerasa II y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa que ayudan para la identificación de algunas especies del complejo *C. apii* (Świdarska-Burek et al. 2020).

Las cuatro cepas con las que se infectaron las plantas de uvilla, en el ensayo de postulados de Koch, produjeron síntomas de la enfermedad de la mancha foliar por *Cercospora beticola*. Las lesiones iniciales se observaron como pequeñas manchas blanquecinas e irregulares similares a las reportadas en el estudio realizado por Mi-Jeon et al. (2020). Con el avance de las lesiones, se observó un centro gris blanquecino con un borde marrón oscuro y un halo marrón grisáceo, además de clorosis completa de la hoja y defoliación prematura. Rangel et al. (2020), describieron síntomas idénticos a los descritos en este estudio y también reportaron que, a medida que avanza la enfermedad, se produce clorosis de la hoja y las manchas pueden fusionarse para formar áreas necróticas más grandes (Marin et al. 2020). Vaghefi et al. (2017) encontraron síntomas similares y mencionaron que las lesiones necróticas se expandieron en la superficie de la hoja. Esta expansión se debe a una colonización necrotrófica para obtener nutrientes que podría matar a sus células huésped mediante toxinas (Jay et al. 2020; Andrade et al. 2021). Adicionalmente, se produce una defoliación prematura hasta del 90%. Incluso, cuando la enfermedad tiene una alta severidad se puede producir la muerte de la planta (Guzmán-Piedrahita y Rivillas-Osorio 2005). El tratamiento en el que se utilizaron discos miceliales presentó mayor cantidad de manchas en menos tiempo (4 días antes). Por eso, se considera que fue más efectivo, en relación método de infección con suspensión de esporas. En ambos tratamientos, se realizó una pequeña laceración para permitir la entrada del patógeno en el tejido foliar. El daño físico provocado en las hojas ayuda a aumentar la gravedad de la enfermedad, ya que facilita la adhesión y penetración del micelio en las hojas (Subedi et al. 2019). Por último, se observó la aparición de síntomas similares a los de *Cercospora* sp. y se realizó el aislamiento del patógeno para su posterior secuenciación, en donde se demostró que el causante de las manchas necróticas fue el hongo fitopatógeno aislado previamente, cumpliendo así con los postulados de Koch.

Los resultados obtenidos en este estudio son de gran importancia en la investigación sobre enfermedades foliares de la uvilla porque contribuyen al desarrollo de técnicas rápidas y precisas para el diagnóstico de la mancha foliar. *Cercospora beticola* es, principalmente, conocido por asociarse con la enfermedad foliar más importante y destructiva en la remolacha azucarera, provocando graves pérdidas económicas en este cultivo donde fue identificada por primera vez (Turgay et al. 2010; Zhou et al. 2014). Se caracteriza por diseminar sus esporas a través del viento, la lluvia, el riego, las salpicaduras de agua o la transferencia de insectos. Adicionalmente, los restos de plantas infectadas se consideran una fuente importante de inóculo que inicia las epidemias de la mancha foliar, ya que este hongo fitopatógeno puede persistir en forma de micelios y pseudoestromas durante un máximo de 22 meses a 3 años (Vaghefi et al. 2017). De esta manera, las esporas entran en contacto con los estomas de la hoja y dan lugar al crecimiento de hifas intercelulares (Rangel et al. 2020). En este estudio, se observaron manchas necróticas de coloración marrón que avanzaban hasta fusionarse entre ellas. Esta fase se conoce como necrotrofica y, en ella, empieza la producción de fitotoxinas y proteínas que conducen a la muerte de la célula huésped (Daub y Chung 2007). Una de las toxinas más conocidas que produce *Cercospora* spp. es la cercosporina. Esta toxina produce una coloración rojiza o marrón que se evidencia en la superficie del hospedero y se activa en presencia de luz y oxígeno, produciendo la muerte celular; por lo que se considera un factor de virulencia de este género (Mitchell et al. 2002). Las manchas necróticas que produce este hongo pueden expandirse por todas las hojas causando una defoliación prematura de la planta, lo que provoca pérdidas de rendimiento superiores al 50% (De Lemos Cardoso et al. 2013). La severidad del ataque de este hongo, registrado en diferentes cultivos, ha provocado que se preste especial atención a este fitopatógeno y se realice estudios en los posibles cultivos en los que podría atacar. Al haber identificado *Cercospora* spp. en cultivos de uvilla en Colombia, es de gran importancia identificarlo en Ecuador también para evaluar los posibles efectos que tenga en los cultivos de uvilla del país para evitar daños a nivel de grandes plantaciones. Actualmente, se utiliza la aplicación de una mezcla de fungicidas, con diferentes modos de acción, para controlar al hongo fitopatógeno *Cercospora* spp. También se pueden utilizar cultivos de alto rendimiento con resistencia mejorada del hospedador y diferentes prácticas culturales como la rotación de cultivos, el manejo de malezas hospedantes y raleo de las plantas (Rangel et al. 2020).

Conclusiones

Este es el primer reporte de la presencia de *Cercospora beticola* en cultivos de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en la región centro norte de la Sierra ecuatoriana. Los postulados de Koch confirmaron que este hongo es el agente causal de la mancha foliar en cultivos de uvilla, mediante la presencia de sintomatología en plántulas sanas. Finalmente, esta investigación servirá como base para el desarrollo de métodos de identificación rápidos y eficaces de este microorganismo. También, será una contribución para próximos estudios sobre estrategias para la prevención y control de esta enfermedad, evitando así pérdidas económicas causadas a los pequeños y grandes agricultores.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el proyecto titulado "Diagnóstico de las enfermedades y de plagas en cultivos comerciales de uvilla (*Physalis peruviana*) en el Ecuador" patrocinado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Un agradecimiento a la empresa TERRAFERTIL y sus agricultores asociados por permitir el muestreo en diferentes parcelas y por facilitar plántulas de uvilla para el desarrollo de los postulados de Koch.

Por último, un especial agradecimiento a la empresa Golden Sweet Spirit por permitirnos realizar un muestreo en sus instalaciones ubicadas en Aloasí, Pichincha.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución de los autores

MP: Diseño experimental del estudio, adquisición/ colección de datos, análisis e interpretación de datos, redacción de la primera versión del manuscrito.

JY: Concepción y diseño del estudio, revisión del manuscrito y gestión de financiamiento.

MMC: Análisis e interpretación de datos y revisión del manuscrito.

Referencias Bibliográficas

- Agrios G. 2005. Plant Pathology. 5th. Florida (Estados Unidos): Elsevier Academic Press. 397.
- Aguilar-Ulloa W, Arce-Acuña P, Galiano-Murillo F, Torres-Cruz TJ. 2015. Aislamiento de esporas y evaluación de métodos de inoculación en la producción de micorrizas en cultivos trampa. Tecnología en Marcha [Internet]. [citado 11 de junio de 2021]; 2016: 5-14. Disponible en: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v29s3/0379-3982-tem-29-s3-5.pdf>.
- Andrade CCL, de Resende MLV, Moreira SI, Mathioni SM, Botelho DMS, Costa JR, Andrade ACM, Alves E. 2021. Infection process and defense response of two distinct symptoms of *Cercospora* leaf spot in coffee leaves. Phytoparasitica [Internet]. [citado 10 de junio de 2021]; 49: 727-737. Disponible en: 10.1007/s12600-021-00902-2.
- Badotti F, Silva de Oliveira F, Garcia CF, Martins Vaz AB, Camargos Fonseca L, Alves Nahum L, Oliveira G, Góes-Neto A. 2017. Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). BMC Microbiology [Internet]. [citado 27 de junio de 2021]; 17(42): 1-12. Disponible en: 10.1186/s12866-017-0958-x.
- Bakhshi M, Arzanlou M, Babai-Ahari A. 2012. Morphological and molecular characterization of *Cercospora zebrina* from black bindweed in Iran. Plant Pathology and Quarantine [Internet]. [citado 27 junio 2021]; 2(2): 125-130. Disponible en: 10.5943/ppq/2/2/5.
- Balaguera-López HE, Martínez CA, Herrera-Arévalo A. 2014. Papel del cáliz en el comportamiento poscosecha de frutos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) Ecotipo Colombia. Rev. Colomb. Cienc. Hortíc [Internet]. [10 de junio de 2021]; 8(2): 181-191. Disponible en: https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_horticolos/article/view/3461.
- Bobev SG, Groenewald JZ, Crous PW. 2009. First Report of *Cercospora beticola* as a pathogen of German Statice (*Goniolimon tataricum*) in Bulgaria. Plant Dis [Internet]. [citado 25 junio 2021]; 93(5): 553. Disponible en: 10.1094 / PDIS-93-5-0553A.
- Caesar AJ, Lartey RT, Berner DK, Souissi T. 2009. First report of leaf spot caused by *Cercospora bizzozeriana* on lepidium draba in the United States. Plant Dis [Internet]. [citado 25 junio 2021]; 93(1): 108. Disponible en: 10.1094/PDIS-93-1-0108B.
- Catarina P. 2014. Uchuva (*Physalis peruviana*) fruta andina para el mundo. Alicante (España): Cebas- CSIC. 49.
- Chai A, Zhao Q, Shi Y, Xie X, Li L, Li B. 2021. First report of *Cercospora* leaf spot caused by *Cercospora* cf. *flagellaris* on Okra in China. Plant Dis [Internet]. [citado 28 junio 2021]; 105(7): 1. Disponible en: 10.1094 / PDIS-10-20-2155-PDN.
- Chen MD, Lyda SD, Halliwell RS. 1979. Environmental factors influencing growth and sporulation of *Cercospora Kikuchii*. Mycology [Internet]. [citado 27 junio 2021]; 71(6): 1150-1157. Disponible en: 10.1080/00275514.1979.12021126.
- Corrales-Bernal A, Vergara AI, Rojano B, Yahia E, Maldonado ME. 2015. Características nutricionales y antioxidantes de la uchuva colombiana (*Physalys peruviana* L.) en tres estadios de su maduración. ALAN [Internet]. [citado 05 de mayo de 2021]; 65(4): 254-262. Disponible en: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2015/4/art-6/#>.

- Cornejo Romero A, Serrato Díaz A, Rendón Aguilar B, Rocha Munive MG. 2014. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. 1st Ed. México DF (México): Instituto nacional de ecología y cambio climático (INECC). 27.
- Crosley L, Henríquez JM, Parra F, Pacheco P, Escobar H, Parra C. 2019. Rescate del cultivo de Goldenberry (*Physalis peruviana*) en los Andes del norte de Chile. Idesia [Internet]. [citado 28 junio 2021]; 37(4): 115-118. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/idesia/v37n4/0718-3429-idesia-37-04-115.pdf>.
- Crous PW, Braun U, Groenewald JZ. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. Stud in Mycol [Internet]. [citado 25 junio 2021]; 58: 1-32. Disponible en: 10.3114/sim.2007.58.01.
- Crous PW, Groenewald JZ, Groenewald M, Caldwell P, Braun U, Harrington TC. 2006. Species of *Cercospora* associated with grey leaf spot of maize. Stud in Mycol [Internet]. [citado 26 junio 2021]; 55: 189-197. Disponible en: 10.3114/sim.55.1.189.
- Daub ME, Herrero S, Chung KR. 2005. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. FEMS. Microbiology Letters [Internet]. [citado 24 junio 2021]; 252(2): 197-206. Disponible em: 10.1016/j.femsle.2005.08.033.
- Daub ME, Herrero S, Chung KR. 2007. Cercosporin: A photoactivated toxin in plant disease. Plant disease [Internet]. [citado 20 junio 2021]; 38: 461-490. Disponible en: 10.1094/APSnetFeature/2007-0207.
- De Lemos Cardoso RM, Dias Chaves JC, Fantin D, Lourenço Jr. V. 2013. Efficiency of green manures for *Cercospora* leaf spot management in coffee plants. Tropical Plant Pathology [Internet]. [citado 20 junio 2021]; 38(2): 122-127. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/tpp/a/HKyqfx8cGdvQnK4QN4gBmHx/?lang=en>.
- Díaz JL, Chavez-Acuña W, Yáñez J. 2019. Diversity of fungal communities inhabiting symptomatic leaves of Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in the Ecuadorian Andes Revista Ecuatoriana de medicina y ciencias biológicas [Internet]. [citado 21 junio 2021]; 40(2): 77-85. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7404872>.
- Ebert MK, Rangel LI, Spanner RE, Taliadoros D, Wang X, Friesen TL, de Jonge R, Neubauer JD, Secor GA, Thomma BPHJ. 2020. Identification and characterization of *Cercospora beticola* necrosis-inducing effector CbNip1. Molecular Plant Pathology [Internet]. [citado 15 mayo 2021]; 22(3): 301-316. Disponible en: 10.1111/mpp.13026.
- Farrag E. 2011. First Record of *Cercospora* Leaf Spot Disease on Okra Plants and its Control in Egypt. Plant Pathology Journal [Internet]. [citado 18 mayo 2021]; 10(4): 175-180. Disponible en: 10.3923/ppj.2011.175.180
- Fischer G, Almanza-Merchán, PJ, Miranda D. 2014. Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Rev. Bras. de Frutic [Internet]. [citado 18 mayo 2021]; 36(1): 1-15. Disponible en: 10.1590/0100-2945-441/13.
- Fischer G, Balaguera-López HE, Magnitskiy S. 2021. Revisión de la ecofisiología de frutos andinos importantes: Solanaceae. Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica [Internet]. [citado 22 mayo 2021]; 24(1): 1-12. Disponible en: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/1701/2156>.
- Fischer G, Melgarejo LM. 2020. The ecophysiology of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) - an Andean fruit crop. A review. Revista Colombiana de ciencias hortícolas [Internet]. [citado 20 mayo 2021]; 14(1): 76-89. Disponible en: 10.17584/rcch.2020v14i1.10893.
- Giraldo GI, Cruz CD, Sanabria NR. 2017. Propiedades físicas del jugo de uchuva (*Physalis peruviana*)

clarificado en función de la concentración y la temperatura. Scielo. [Internet]. [citado 15 de junio de 2021]; 28(1): 133-142. Disponible en: 10.4067/S0718-07642017000100013.

González Cabrera MV, Sánchez Herrera TE, Paredes Peralta AV. 2020. Determinación de la capacidad conservante del aceite esencial de canela sobre uvilla (*Physalis peruviana*) como tratamiento postcosecha. Ciencia digital [Internet]. [citado 26 mayo 2021]; 3(2.1): 210-230. Disponible en: 10.33262/concienciadigital.v3i2.1.1235.

Goodwin SB, Dunkle LD, Zismann VL. 2001. Phylogenetic Analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* Based on the Internal Transcribed Spacer Region of Ribosomal DNA. Ecology and Population Biology [Internet]. [citado 26 junio 2021]; 91(7): 648-658. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18942994/>.

Groenewald M, Groenewald JZ, Crous PW. 2005. Distinct species exist within the *Cercospora apii* Morphotype. Phytopathology [Internet]. [citado 02 junio 2021]; 95(8): 951. Disponible en: 10.1094 / PHYTO-95-0951.

Groenewald JZ, Groenewald M, Braun U, Crous PW. 2010. *Cercospora* speciation and Host range. En: Lartey RT, Weiland JJ, Panella L, Crous PW, Windels CE, editores. *Cercospora* leaf spot of sugar beet and related species. Minnesota (EU): APS Press. 21-37.

Groenewald JZ, Nakashima C, Nishikawa J, Shin H-D, Park J-H, Jama AN, Groenewald M, Braun U, Crous PW. 2013. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. Stud Mycol [Internet]. [citado 15 junio 2021]; 75(1): 115-170. Disponible en: <https://doi.org/10.3114/sim0012>.

Guzmán-Piedrahita OA, Rivillas- Osorio CA. 2005. Producción in vitro de conidios de *Cercospora coffeicola*. Cenicafé [Internet]. [citado 15 junio 2021]; 56(1): 67-77. Disponible en: <https://www.cenicafe.org/es/publications/arc056%2801%29067-078.pdf>.

Jay S, Comar A, Benicio R, Beauvois J, Dutartre D, Daubige G, Li W, Labrosse S, Thomas S, Henry N, et al. 2020. Scoring *Cercospora* Leaf Spot on Sugar Beet: Comparison of UGV and UAV Phenotyping Systems. Plant Phenomics [Internet]. [citado 03 junio 2021]; 2020: 1-18. Disponible en: 10.34133/2020/9452123.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution [Internet]. [citado 14 junio 2021]; 35(6): 1547-1549. Disponible en: 10.1093 / molbev / msy096.

López-Jácome LE, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Ortega-Peña S, Cerón-González G, Franco-Cendejas R. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Mediagraphic [Internet]. [citado 20 junio 2021]; 3(1): 10-18. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invis/ir-2014/ir141b.pdf>.

López-Sandoval JA, Morales-Rosales EJ, Vibrans H, Morales-Morales EJ. 2018. Tasa de asimilación neta y rendimiento de *Physalis* bajo cultivo en dos localidades. Redalyc [Internet]. [citado 18 junio 2021]; 41(2): 187-197. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/610/61059020010/html/>.

Lücking R, Aime MC, Schoch CL. 2020. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?. IMA Fungus [Internet]. [citado 21 mayo 2021]; 11(14): 1-32. Disponible en: 10.1186/s43008-020-00033-z.

Marin MV, Coburn J, Desaegeer J, Peres NA. 2020. First report of *Cercospora* leaf spot caused by *Cercospora* cf. *flagellaris* on Industrial Hemp in Florida. Plant disease [Internet]. [citado 15 junio 2021]; 104(5): 1536. Disponible en: 10.1094/PDIS-11-19-2287-PDN.

- Meghvansi MK, Haneef Khan M, Gupta R, Veer V. 2013. Identification of a new species of *Cercospora* causing leaf spot disease in *Capsicum assamicum* in northeastern India. Elsevier [Internet]. [citado 26 mayo 2021]; 164(9): 894-902. Disponible en: 10.1016/j.resmic.2013.08.003.
- Milosavljević A, Pfaf-Dolovac E, Mitrović M, Jović J, Toševski I, Duduk N, Trkulja N. 2014a. First report of *Cercospora carotae*, causal agent of *Cercospora* leaf spot of carrot, in Serbia. Plant Disease [Internet]. [citado 05 junio 2021]; 98(8): 1153. Disponible en: 10.1094/PDIS-08-13-0858-PDN.
- Milosavljević A, Pfaf-Dolovac E, Mitrović M, Jović J, Toševski Y, Duduk N, Trkulja N. 2014b. First report of *Cercospora apii*, causal agent of *Cercospora* early blight of celery, in Serbia. Plant Disease [Internet]. [citado 26 mayo 2021]; 98(8): 1157. Disponible en: 1157. 10.1094 / PDIS-02-14-0135-PDN.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. 2020. Resumen Ejecutivo de los Diagnósticos Territoriales del Sector Agrario [Internet]. Quito (EC): Ministerio de Agricultura y Ganadería; [citado 2021 mayo 17]. Disponible en: https://www.agricultura.gob.ec/wp-content/uploads/2020/08/Resumen-Ejecutivo-Diagn%C3%B3sticos-Territoriales-del-Sector-Agrario_14-08-2020-1_compressed.pdf.
- Mitchell TK, Chilton WS, Daub ME. 2002. Biodegradation of the Polyketide Toxin Cercosporin. Appl Environ Microbiol [Internet]. [citado 22 mayo 2021]; 68(9): 4173-4181. Disponible en: 10.1128/AEM.68.9.4173-4181.2002.
- Montenegro-Calderón JG, Martínez Álvarez JA, Vieyra-Hernández, MT, Rangel-Macías LI, Razzo-Soria T, Chávez-Herrera R, Ponce-Noyola P, Leal-Morales CA. 2011. Molecular identification of two strains of *Cercospora rodmanii* isolated from water hyacinth present in Yuriria lagoon, Guanajuato, Mexico and identification of new hosts for several other strains. Fungal Biol [Internet]. [citado 16 junio 2021]; 115(11): 1151-1162. Disponible en: 10.1016/j.funbio.2011.08.001.
- Mukhtar I, Khokhar I, Yan Y, Xie B. 2019. First report of *Cercospora* leaf spot caused by *Cercospora beticola* on spinach in Pakistan. Plant Disease [Internet]. [citado 06 junio 2021]; 103(7). Disponible en: 10.1094/PDIS-12-18-2274-PDN.
- Nguanhom J, Cheewangkoon R, Groenewald J, Braun U, Anun C, Crous P. 2015. Taxonomy and phylogeny of *Cercospora* spp. from Northern Thailand. Phylotaxa [Internet]. [citado 25 mayo 2021]; 233(1): 27-48. Disponible en: 10.11646/phytotaxa.233.1.2.
- Park MJ, Back CG, Park JH. 2020. Occurrence of *Cercospora* Leaf Spot Caused by *Cercospora* cf. *flagellaris* on Melon in Korea. Mycobiology [Internet]. [citado 05 junio 2021]; 48(5): 418-422. Disponible en: 10.1094/PDIS-11-19-2287-PDN.
- Park SH, Choi IY, Lee WH, Lee KJ, Galea V, Shin HD. 2017. Identification and Characterization of *Cercospora malayensis* causing leaf spot on kenaf. Mycobiology [Internet]. [citado 16 junio 2021]; 45(2): 114-118. Disponible en: 10.5941 / MYCO.2017.45.2.114
- Portal Frutícola. 2020. Ecuador se enfoca en Reino Unido y Europa para la expansión de uvilla [Internet]. Santiago de Chile (CL): Portal Frutícola; [citado 2021 mayo 19]. Disponible en: <https://www.portalfruticola.com/noticias/2020/08/03/ecuador-se-enfoca-en-reino-unido-y-europa-para-la-expansion-de-la-uvilla/>.
- Pro Ecuador. 2020. Oferta de uvilla ecuatoriana en mercados potenciales [Internet]. Quito (EC): Ministerio de producción, comercio exterior, inversiones y pesca; [citado 2021 mayo 6]. Disponible en: <https://www.proecuador.gob.ec/oferta-de-uvilla-ecuatoriana-en-mercados-potenciales-2020/>.
- PRO MIX. 2012. PRO- MIX PGX [Internet]. Quakertown (EU): PRO MIX; [citado 15 junio 2021]. Disponible en: <https://www.pthorticulture.com/media/3815/sds-promix-pgx-gtx.pdf>.

- Promega. 2018. GoTaq® Green Master Mix [Internet]. Wisconsin (EU): Promega Corporation; [citado 02 mayo 2021]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/products/pcr/taq-polymerase/gotaq-master-mixes/?catNum=M7122>.
- Promega. 2019. Wizard Genomic DNA purification kit [Internet]. Wisconsin (EU): Worldwide Promega; [citado 2021 mayo 15]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/>.
- Rangel LI, Spanner RE, Ebert MK, Pethybridge SJ, Stukenbrock EH, De Jonge R, Secor GA, Bolton MD. 2020. *Cercospora beticola*: The intoxicating lifestyle of the leaf spot pathogen of sugar beet. *Molecular Plant Pathology* [Internet]. [citado 10 mayo 2021]; 21(8): 1020-1041. Disponible en: 10.1111/mpp.12962.
- Rehner SA, Buckley E 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* [Internet]. [citado 15 junio 2021]; 97(1): 84-98. Disponible en: 10.1080/15572536.2006.11832842.
- Rengifo-Guzmán HG, Leguizamón-Caicedo JE, Riaño-Herrera NM. 2002. Algunos aspectos biológicos de *Cercospora coffeicola*. *Cenicafé* [Internet]. [citado 25 junio 2021] 53(3): 169-177. Disponible en: [https://www.cenicafe.org/es/publications/arc053\(03\)169-177.pdf](https://www.cenicafe.org/es/publications/arc053(03)169-177.pdf).
- Rooney-Latham S, Scheck HJ, Walber TM. 2011. First report of *Cercospora beticola* causing a leaf spot disease on *Acanthus mollis* in California. *Plant Dis* [Internet]. [citado 25 mayo 2021]; 95(2): 224. Disponible en: 10.1094/pdis-10-10-0700.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* [Internet]. [citado 18 junio 2021]; 109(16): 6241- 6242. Disponible en: 10.1073/pnas.1117018109.
- Shahzady HM, Ahmad T, Moosa A, Ahmed Khan W, Naeem I, Nasir M, Aslam Khan M, Abbas A. 2017. A general review of *Cercospora* leaf spot disease of mungbean and its management. *International Journal of Scientific Footprints* [Internet]. [citado 25 mayo 2021]; 5(2): 81-84. Disponible en: 10.22576/ijfs/sf-2017-84.
- Soylu S, Soylu EM, Kurt S. 2003. First report of *Cercospora* leaf spot on Swiss chard caused by *Cercospora beticola* in Turkey. *Plant Pathology* [Internet]. [citado 27 mayo 2021]; 52: 804. Disponible en: <https://www.ndrs.org.uk/article.php?id=007026>.
- Subedi U, Acharya S, Chatterton S, Thomas J, Friebe D. 2019. Techniques for screening *Cercospora* leaf spot resistant fenugreek genotypes. *Canadian Journal of Plant Science* [Internet]. [citado 16 junio 2021]; 99(3). Disponible en: 10.1139/cjps-2018-0247.
- Świdarska-Burek U, Daub ME, Thomas E, Jaszek M, Pawlik A, Janusz G. 2020. Phytopathogenic Cercosporoid Fungi—From Taxonomy to Modern Biochemistry and Molecular Biology. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. [citado 14 junio 2021]; 21(22): 8555. Disponible en: 10.3390/ijms21228555.
- Thermo Fischer Scientific [Internet]. 2009. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. Wilmington, Delaware: Thermo Fischer Scientific Inc.; [citado el 20 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>.
- Tian SM, Ma P, Liu DQ, Zou MQ. (2008). First Report of *Cercospora concors* causing *Cercospora* leaf blotch of potato in Inner Mongolia, North China. *Plant Dis* [Internet]. [citado 24 mayo 2021]; 92(4): 654. Disponible en: 10.1094 / PDIS-92-4-0654C.

Trillos González O, Cotes Torres JM, Medina Cano CI, Lobo Arias M, Navas Arboleda AA. 2008. Caracterización morfológica de cuarenta y seis accesiones de uchuva (*Physalis peruviana* L.), en Antioquia (Colombia). Revista Brasileira de Fruticultura [Internet]. [citado 19 junio 2021]; 30(3): 708-715. Disponible en: 10.1590/S0100-29452008000300025.

Turgay EB, Bakir M, Özeren P, Katrciog˘lu YZ, Maden S. 2010. Detection of pathotypes and genetic diversity of *Cercospora beticola*. The Plant Pathology Journal [Internet]. [citado 23 mayo 2021]; 26(4): 306-312. Disponible en: 10.5423/PPJ.2010.26.4.306.

Vaghefi N, Nelson SC, Kikkert JR, Pethybridge SJ. 2017. Genetic structure of *Cercospora beticola* populations on *Beta vulgaris* in New York and Hawaii. Sci Rep [Internet]. [citado 14 junio 2021]; 7(1726): 1-16. Disponible en: 10.1038/s41598-017-01929-4.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics PCR protocols, a guide to methods and applications. New York (Estados Unidos): Academic Press. 315-322.

Zhou R, Kaneko S, Tanaka F, Kayamori M, Shimizu M. 2014. Disease detection of *Cercospora* leaf spot in sugar beet by robust template matching. Computers and Electronics in Agriculture [Internet]. [citado 15 junio 2021]; 108(2014): 58-70. Disponible en: 10.1016/j.compag.2014.07.004.

Inmunotipificación y cuantificación de cadenas ligeras libres en
pacientes ecuatorianos con gammopatías monoclonalesImmunotyping and quantification of free light chains in Ecuadorian patients
with monoclonal gammopathyDiego Talledo Pinargote^{1,6}, Aron Zamora Cedeño², Lilian Sosa Fernández-Aballí³,
Gusdanis Alberto Campos García⁴ y Ivon Howland Álvarez^{5*}¹ Laboratorios GAMMA, Portoviejo, Manabí, Ecuador, diego22antonio@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5856-9855>² Laboratorios GAMMA, Portoviejo, Manabí, Ecuador, eirom16raff@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0993-9220>³ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador, lilian.sosa@utm.edu.ec, <https://orcid.org/0000-0002-3460-4297>⁴ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador, gusdanis.campos@utm.edu.ec, <https://orcid.org/0000-0001-8178-7973>⁵ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador, ivon.howland@utm.edu.ec, <https://orcid.org/0000-0003-0958-5562>⁶ Instituto de Posgrado de la Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.*Autor de correspondencia:
ivon.howland@utm.edu.ec

Recibido 9-08-2021

Aceptado 26-10-2021

DOI: 10.26807/remcb.v42i2.905

e-ISSN 2477-9148

© 2021. Este es un artículo
publicado en acceso abierto bajo
una licencia CC BY-NC 4.0

Como citar este artículo:

Talledo Pinargote D, Zamora Cedeño A, Sosa Fernández-Aballí L, Campos García A, Howland Álvarez I. 2021. Inmunotipificación y cuantificación de cadenas ligeras libres en pacientes ecuatorianos con gammopatías monoclonales. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas 42(2):123-132. doi: 10.26807/remcb.v42i2.905

Resumen: Actualmente, algunas de las neoplasias hematológicas, entre ellas, las gammopatías monoclonales (GM) son incurables a pesar de los avances en las terapias oncológicas. Los estudios de GM en Ecuador son escasos; en las últimas estadísticas, se muestra que el mieloma múltiple (MM) se encuentra entre los primeros 20 tumores en el país. Las pruebas de diagnóstico más utilizadas son electroforesis y cadenas ligeras. Con el objetivo de caracterizar los resultados en suero de electroforesis de proteínas (ELP), inmunotipificación (IT) y cuantificación de cadenas ligeras libres en sangre (CLL) de pacientes con GM en Portoviejo, Manabí, Ecuador, se realizó un estudio observacional, descriptivo y retrospectivo que incluyó 237 ELP, 42 IT y 58 CLL, provenientes de pacientes atendidos en Servicios de Hematología de la región desde enero a julio 2019. Se utilizaron las técnicas de Sebia ELP e IT y para CLL la de Seralite. El 14% de las ELP fueron GM, 70% de género masculino con un promedio de 64 años. Más de la mitad de las GM tenían diagnóstico de MM, de los cuales 15% eran menores de 40 años. EL 69% de las IT fueron positivas y predominó el isotipo IgG kappa (κ). El 91% de las CLL presentaron patológica la relación κ/λ . La IT no mostró utilidad diagnóstica en los casos de MM no secretor u oligosecretor. Los resultados de CLL fueron significativamente mayores a los reportados por la técnica de cadenas ligeras totales, por lo que esta prueba aumentó la posibilidad de detección de MM en todas sus variantes.

Palabras claves: gammopatía monoclonal, componente monoclonal, electroforesis de proteína, inmunotipificación, cadenas ligeras libres.

Abstract.- Despite advances in oncological therapies, certain hematological neoplasms, among them monoclonal gammopathies (MG), are at present incurable. Studies of MG in Ecuador are scarce; the latest statistics show that multiple myeloma (MM) is among the top 20 most frequent types of tumors in the country. To characterize the results of immunotyping (IT) and quantification of free light chains in the blood (FLC) of patients with MG in Portoviejo, Manabí Ecuador, an observational, descriptive, longitudinal and retrospective study was carried out that included 237 protein electrophoresis (PEL), 42 IT and 58 FLC, from patients seen at the regional hematology services from January to July 2019. The techniques were used Sebia ELP and IT and for CLL, Seralite. Of the GM studied, 14% were GM; 70% male with an average age of 64 years and a range of 31-87 years. More than half of the GM had a diagnosis of Multiple Myeloma (MM), of which 15 % were under 40 years of age. For IT, 69% were positive and the IgG kappa (κ) isotype predominated. IT did not show diagnostic utility in non-secretory or oligosecretory MM cases. A total of 91% of the FLC presented pathological results of a κ/λ relationship. The FLC results were significantly higher than those reported by the technique traditionally used in the total light chain region, meaning that the test increased the possibility of MM detection of in all its variants.

Keywords: monoclonal gammopathy, monoclonal component, protein electrophoresis, immunotyping, free light chains

Introducción

Las gammapatías monoclonales (GM) son un grupo de trastornos caracterizados por la proliferación de un clon de células plasmáticas, proveniente de los linfocitos B que, generalmente, producen en exceso, y de manera descontrolada, inmunoglobulinas idénticas, subunidades o fragmentos idénticos entre sí; se las denomina componente/proteína monoclonal o proteína M (CM) (Laribi et al. 2018; Murata et al. 2019).

Por lo general, una GM puede corresponder a inmunoglobulina intacta secretada en exceso, un exceso exclusivo de cadenas ligeras producidas sin una cadena pesada asociada, o ambas. (Marco 2014; Caravaca-Fontán et al. 2017; Delgado 2019). Las GM más mencionadas incluyen: GM de Significado Incierto (GMSI), Mieloma Múltiple (MM) y sus variantes (Morrison et al. 2019) y Amiloidosis primaria (Murata et al. 2019; Seth et al. 2020). Cualquiera que sea el caso, la evaluación del CM es considerada el marcador tumoral por excelencia; por lo que su estudio es fundamental para el diagnóstico certero, pronóstico y seguimiento de la enfermedad (Marco 2014; Caravaca-Fontán et al. 2017; Delgado 2019).

Actualmente, algunas de las neoplasias hematológicas, entre ellas, las GM son incurables a pesar de los avances en las terapias oncológicas. Una de las descritas con mayor frecuencia es el MM que, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), representa el 1% de todas las neoplasias y alrededor del 10-15% de las neoplasias hematológicas. Es una enfermedad maligna y multisistémica, que se ha descrito con más frecuencia en la población afrodescendiente y, en la cual, la presencia del CM se puede identificar por diversas técnicas de laboratorio clínico tanto en sangre como en orina (Rincón 2016).

En América Latina, resaltan las investigaciones epidemiológicas procedentes de países como Argentina, Brasil, Chile y México, las cuales han documentado información clínica y genética del MM (Montesdeoca Narváez 2015). Los estudios del MM en Ecuador son escasos y se debe estudiar su comportamiento por varias causas, incluyendo que la población ecuatoriana es una mezcla compleja entre nativos americanos, europeos y africanos. En un estudio genético de 61 pacientes con MM, realizado por Leone et al. (2017), los cuales fueron comparados con un control saludable, se mencionó que en la ascendencia genética de individuos mestizos ecuatorianos con MM, la ascendencia africana no influyó en el desarrollo de este cáncer. Se planteó, además, que los casos con mayor porcentaje de ascendencia nativa americana tuvieron más riesgo de desarrollar el MM. El grupo étnico mestizo, con todos sus componentes, nativo americano, europeo y africano, tuvo su propio comportamiento con respecto al MM. Esto explicaría las diferencias en los datos clínicos en relación con otras poblaciones y hace que la población ecuatoriana tenga sus particularidades genéticas que la diferencian de las de otras regiones del mundo para este tipo de cáncer.

El Registro Nacional de Tumores (RNT) de la Sociedad de Lucha contra el Cáncer (SOLCA) en Ecuador, en las estadísticas publicadas en el año 2019, mostró que el MM se encuentra entre los primeros 20 tumores en el país, registrando un 55% de casos en hombres, un 45 % de casos en mujeres (Cueva et al. 2019). En el RNT de 2013 se indicó que el 14% de los casos con MM tenían relación con el curtido de cuero y agricultura y que, en rasgos generales, desde 1986 han aumentado el número de casos de MM en el país.

Basados en el hecho de que era difícil el diagnóstico preventivo y la enfermedad era detectada en estadios en los cuales había compromiso sistémico, en 1975 se desarrolló el sistema de estratificación del MM de Durie-Salmon, el cual une los principales parámetros clínicos en correlación con la masa de células de mieloma cuantificados y con énfasis en los rangos clínicos de cada paciente de manera individual. En 2009, el Grupo Internacional de Trabajo en Mieloma (IMWG, del inglés *International Myeloma Working Group*) estableció las primeras normas publicadas para el diagnóstico del MM mediante criterios diferidos. Desde entonces, el IMGW publica las directrices para el análisis en el diagnóstico y seguimiento del MM, además de las pruebas de laboratorio tradicionales; mismas que, conjunto a las técnicas de imagen, ayudan a clasificar mejor las opciones de tratamiento, evaluar la extensión de la enfermedad y estadificar el MM (Alvarado-Ibarra et al. 2015).

Los criterios actualizados representan un cambio de paradigma ya que permiten el diagnóstico temprano y la iniciación de la terapia antes del daño al órgano terminal. Cuando se sospecha clínicamente de MM en los pacientes, se debe analizar la presencia de CM utilizando una combinación de pruebas que deben incluir una electroforesis de proteína en suero (ELP), inmunofijación y el ensayo de cadenas ligeras libres en suero (CLL) (Rajkumar 2018). Paralelamente al desarrollo de la ELP capilar, también ha ido avanzando un método alternativo para identificar el CM: la llamada electroforesis de inmunotipificación por sustracción, también conocida por su término en inglés *immunotyping* (IT). Esta técnica ha sido estandarizada desde 2008 y separa proteínas de suero tras una breve incubación del suero en la presencia de antisuero para cada una de las cadenas pesadas y ligeras, elimina los inmunocomplejos formados y permite la detección cualitativa de inmunoglobulinas monoclonales en función de su ausencia, en comparación con la electroforesis de proteínas séricas realizada sin antisueros. Asimismo, resulta de gran utilidad para la identificación de CM, pues, utiliza menor cantidad de muestra con un alto grado de resolución (McCudden et al. 2008) y tiene una sensibilidad muy aceptable; además, no utiliza colorantes, lo cual lo hace más inocua para el medio ambiente.

En este trabajo se estudiaron pacientes con GM diagnosticadas clínicamente y con detección electroforética del CM en ELP sérica, así como su confirmación mediante IT y CLL. Todo ello, para caracterizar los resultados de estas pruebas en el diagnóstico de los pacientes con GM en esta región y, de esta forma, concienciar al personal de salud de la necesidad de utilizarlas de forma rutinaria siempre que exista la sospecha diagnóstica de esta enfermedad.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio observacional, descriptivo y retrospectivo desde enero a julio de 2019 con resultados electroforéticos del Laboratorio Clínico Gamma de Portoviejo. Se verificaron 237 ELP patológicas, 42 IT, 58 CLL y 58 cadenas ligeras totales (CLT) en pacientes a los que se les indicaron estas pruebas y en los que constaba el diagnóstico clínico del tipo de GM que presentaban. Para ello, se revisaron las historias clínicas de estos pacientes que fueron atendidos en el Servicio de Hematología del Hospital Oncológico "Dr. Julio Villacreses Colmont" (SOLCA) de la ciudad de Portoviejo.

Las IT y las ELP fueron resultados obtenidos con equipo Minicap Flex Piercing de Sebia. Para la cuantificación de CLL κ y λ se usó el dispositivo de flujo lateral inmunocromatográfico de SERALITE® y para su interpretación se empleó el lector ADxLR5® Reader System de Abingdon. Se revisaron en las historias resultados para beta2 microglobulina, hemoglobina, creatinina y calcio. El procesamiento de los datos se realizó con el apoyo del programa SPSS (versión 23).

Se realizó la prueba de Wilcoxon para la comparación de los valores de relación κ/λ , en función de la prueba de laboratorio empleada (CLL y CLT), en los casos en los cuales ambos métodos fueron realizados a los mismos pacientes. Se empleó la prueba Mc Nemar para establecer si existían diferencias entre los resultados por las pruebas. En todos los casos, se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

El trabajo contó con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Manabí, mismo que cuenta con los principios referentes al código de ética de acuerdo con la declaración de Helsinki. Toda la información de los pacientes contó con los principios de confidencialidad que rigen la investigación científica.

Resultados

En el período estudiado, del total de ELP realizadas, 81% de los casos fueron patológicos y 19% supuestamente normales. Según la interpretación del laboratorio clínico, al momento de analizar las alteraciones cualitativas en el proteinograma, se reportó que 29% de los casos cursó con patrón inflamatorio crónico, 12% con patrón inflamatorio agudo, 12% con presencia de patrón anormal (disminución o aumento aislado de algunas de las fracciones no gammaglobulinas), 10% con hipergammaglobulinemia o gammapatía policlonal, 3% con hipogammaglobulinemia, 1% en el cual el puente beta-gamma fue clasificatorio para un patrón de enfermedad hepática, y 14% presentó un patrón electroforético de GM.

Del total de GM, 17% presentó un patrón biclonal en la región gamma, lo cual correspondió al 3% del total de las ELP patológicas. 70% del total de las GM correspondió al género masculino y 30% al femenino. En cuanto a la edad, el promedio fue 64,5 años; el paciente con mayor edad fue de 87 años y el menor, de 31 años. El grupo etario con mayor número de GM correspondió a los mayores de 60 años, seguido del grupo que comprendió las edades entre 31-40 años, luego los de 51-60 años y, por último, el grupo de 41-50 años.

El 53% de todas las GM detectadas se correspondió con el diagnóstico clínico de MM con características clásicas, 12% fueron MM no secretor (MMNS), 14% fueron linfomas (cuatro no Hodgkin, dos de ellos difuso y un caso de Hodgkin), 12% correspondieron a un Síndrome mielodisplásico; 6% tenían diagnóstico de Plasmocitoma solitario, 3% GMSI y 3% Leucemia linfoide crónica.

En cuanto a las IT, del total de GM detectadas, 69% dieron positivas, es decir, se tipificó CM. Una única proteína monoclonal se observó en el 72% de la IT positivas (figuras 1B y 2A), 21% fueron GM biclonales (figura 2B) y 7% componentes oligoclonales (figura 2C). Dentro de los CM únicos, el 67% fue IgG κ , 19% IgG λ , 5% IgM κ (figura 3A) y 9% se presentó en forma de cadena ligera de tipo λ (figura 3B). En el caso de los 6 pacientes con biclonalidad, en dos pacientes los dos CM fueron IgG κ , en dos se observó un CM IgG κ y en uno IgM κ , en un paciente cadenas pesadas y ligeras eran diferentes (IgG κ + IgA λ) y hubo un paciente con dos cadenas ligeras de tipo κ .

La cuantificación de las inmunoglobulinas, por método nefelométrico, se relacionó con el tipo de CM identificado en los pacientes con MM. En el 61% de los CM de tipo IgG, y el 67% de tipo IgM, se presentaron concentraciones de la inmunoglobulina implicada por encima de los rangos de referencia. Sin embargo, al analizar la inmunoglobulina implicada como CM, junto al descenso de las otras inmunoglobulinas, se observó que solo en el 33% de los isotipos IgG existió disminución de la concentración de alguna de las otras dos IgA o IgM, ya sea en ambas o en, al menos, alguna de ellas.

Del total de las CLL realizadas, el 91% de los resultados de pacientes diagnosticados con GM presentó resultados mayores a los valores de referencia en κ , λ o ambas. Para el resto, se reportaron valores dentro del rango de referencia. Al comparar los resultados de los valores del radio κ/λ , por la técnica de CLL que utiliza un suero policlonal específico para detectar epítomos de las cadenas ligeras libres κ y λ con los resultados obtenidos a partir del ensayo de CLT que cuantifica cadenas κ y λ unidas las inmunoglobulinas intactas, se observó que los resultados del radio κ/λ por la técnica CLL fueron significativamente mayores ($p=0,021$; $p<0,05$) a los reportados por la prueba CLT.

Además, en los resultados encontrados de los pacientes con GM, se observó que el 59% presentó valores de beta2 microglobulina mayores al rango de referencia y, en estos pacientes, también se presentaron valores elevados de las CLL. Es de destacar que, en las historias clínicas de los pacientes con MM, se observó que solamente un bajo porcentaje de ellos presentaron anemia (hombres 31%, mujeres 12%), creatinina sérica elevada (hombres 15% y mujeres 12%) y ninguno de ellos presentó hipercalcemia.

Discusión

La inmunofijación en suero o su variante la IT consiste en la detección, mediante electroforesis y uso de anticuerpos, de proteínas monoclonales o CM. La IT está indicada en los pacientes que presentan un pico en las regiones beta o gamma de las ELP y que tienen sospecha de GM, especialmente, en el MM. De igual manera, si no es evidente la banda o pico monoclonal en la ELP, pero hay sospecha clínica de este tipo de neoplasia, está indicado la IT, ya que al poseer mayor sensibilidad y uso de anticuerpos específicos ayuda a identificar el CM. En la literatura se plantea que en el 93% de los casos de pacientes con MM se detecta una proteína M en la inmunofijación y la cifra aumenta a 97% si se complementa con IF en orina. Por ello, se recomienda que la búsqueda del CM se realice tanto en suero como en orina. Aunque no cuantifica el componente monotípico, se emplea para el seguimiento y evaluación de respuesta al tratamiento de pacientes con estas neoplasias.

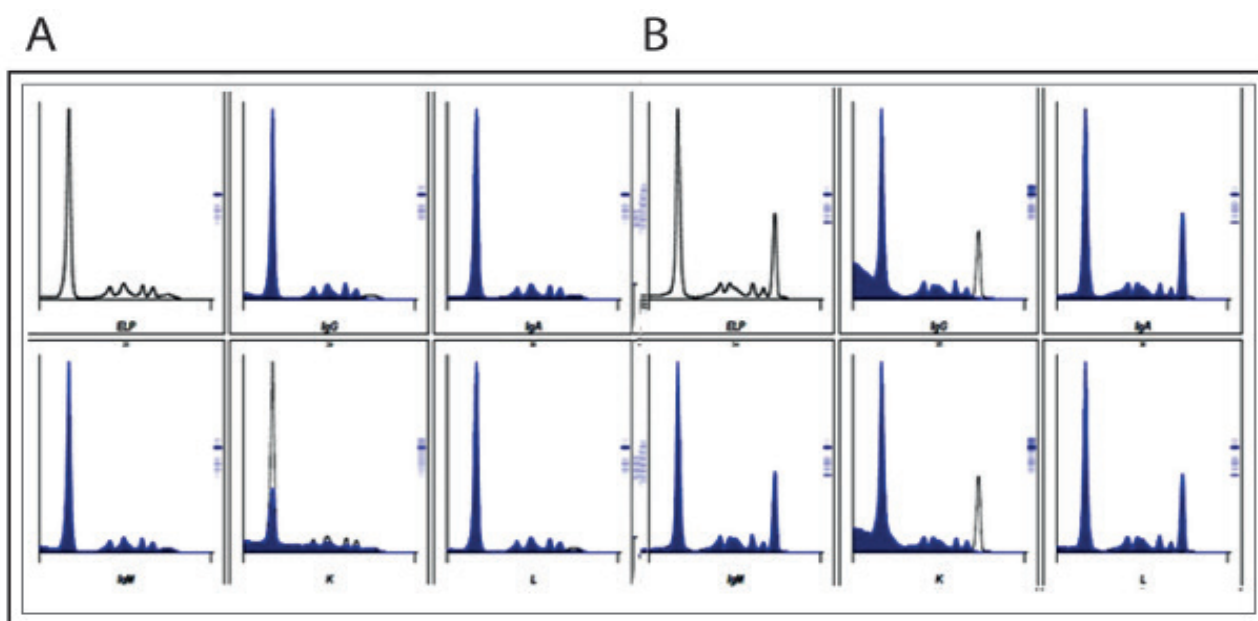


Figura 1. A: Inmunotipificación negativa; B: Inmunotipificación positiva para componente monoclonal IgG K.

Las IT fueron realizadas con la técnica Minicap Immunotyping, basada en el principio de la electroforesis capilar en solución libre. En esta técnica, las proteínas son separadas y detectadas directamente durante la migración mediante absorbancia UV. Las inmunoglobulinas reaccionan específicamente con su antisuero correspondiente. Al resultado final del análisis, sobre cada perfil del antisuero (IgG, IgA, IgM, κ y λ), se superpone la curva de la ELP. La desaparición o sustracción en el perfil tratado con el antisuero en la fracción gamma o beta-gamma indica la presencia de una proteína monoclonal que, como se observa en la figura 1, muestra una IT negativa (A) donde no hay ninguna sustracción en los perfiles; en el otro (B), se muestra un resultado positivo donde es evidente la sustracción en los perfiles IgG y κ , es decir, la IT es positiva para CM de tipo IgG κ . Mediante la prueba de IT se pueden detectar concentraciones de CM de 150 mg/L a 500 mg/L, pero no resulta de utilidad en el diagnóstico de MMNS, el cual se caracteriza por un patrón electroforético normal y una producción constante de concentraciones de cadenas livianas menores al límite de detección del tipo de prueba (Vázquez y Palma 2015).

Las gammopatías biclonales, por lo general, están relacionadas a discrasias de células plasmáticas; aunque, también, se pueden encontrar asociadas a otras neoplasias hematológicas, especialmente las linfoides de estirpe B, a enfermedades de tipo autoinmune o a crioglobulinemia (García-García et al. 2015). Las oligoclonales generalmente están asociadas con infecciones crónicas, enfermedades por inmunocomplejos, autoinmunes, hepatitis crónicas y, en algunos casos, con pacientes VIH positivos (Mexicana 2004).

El predominio del CM de tipo IgG de este trabajo guarda relación con otros estudios, los cuales indican una mayor cantidad de pacientes con MM de tipo IgG. En un estudio similar, publicado en el año 2013 en Cuba, se analizaron 285 pacientes con diagnóstico de MM, obteniendo como resultado que un 72,28% presentaron MM de tipo IgG, 25,62% MM de tipo IgA y 2,1 MM de tipo IgM (Arce-Hernández et al. 2013). Igualmente, en un estudio del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de Lima, Perú, en el 2016, de una cohorte conformada por 92 pacientes diagnosticados con MM, el 59% presentó CM de tipo IgG, 25% IgA y el 13% tenían producción exclusiva de cadenas ligeras (Pizarro et al. 2016). En otra investigación, realizada en China, sobre la distribución de inmunotipado de paraproteína monoclonal sérica, entre agosto del 2013 a junio del 2015, se evaluaron 327 ELP, 46 casos correspondieron a ELP positivas. La distribución de inmunotipado más frecuente en suero fue IgG κ con 25 casos, seguida con IgA λ 7 casos, y e IgG λ en sujetos con GM (Chang et al. 2016).

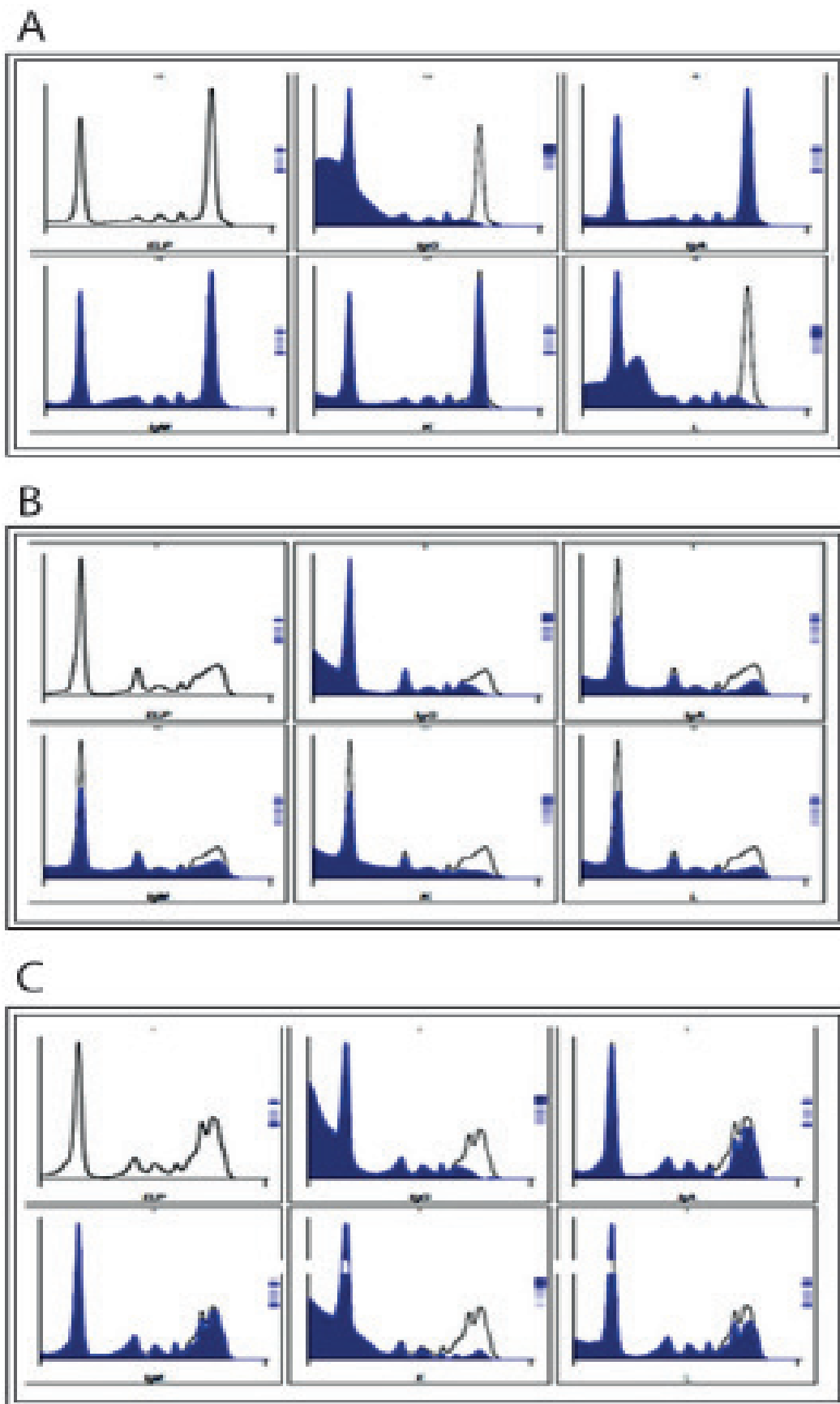


Figura 2. A: Inmunotipificación positiva IgG Lambda; B: Inmunotipificación positiva IgG Kappa-IgA Lambda; C: Inmunotipificación positiva oligoclonal 2 IgG Kappa-1 débil IgA Kappa.

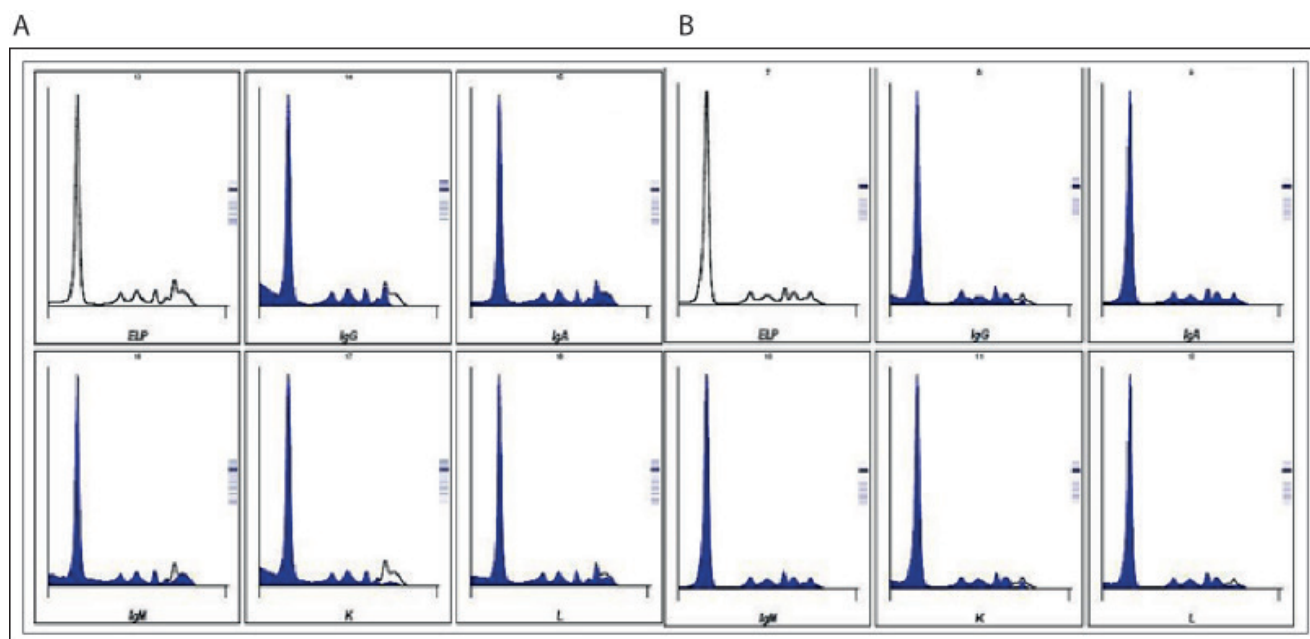


Figura 3. A: Inmunotipificación positiva IgM Kappa; B: Inmunotipificación positiva Lambda.

Durante varios años, los intentos de detección de CLL no tuvieron éxito, ya que ningún método analítico fue capaz de distinguir entre cadenas libres unidas a inmunoglobulina intacta y CLL. Sin embargo, a principios del año 2000, se desarrolló un ensayo capaz de detectar el epítipo oculto en la inmunoglobulina intacta y visible en la CLL. La determinación de estas cadenas libres es un marcador imprescindible para el diagnóstico y seguimiento de las GM. Existen inmunoensayos que cuantifican las cadenas κ y λ , de manera automatizada, aportando gran especificidad y sensibilidad al diagnóstico de las GM. Desde el año 2009 hasta la actualidad, el IMWG recomienda la combinación de ELP, electroforesis por inmunofijación y CLL para el diagnóstico y seguimiento de las GM (Peña et al. 2018).

En varios estudios, se da a conocer la importancia del uso de CLL para la detección de monoclonalidad por su gran sensibilidad. En el año 2005, se identificaron 39 GM de un total de 1.003 muestras, con ayuda de técnicas de ELP; además, con ayuda de las CLL, se sumaron 16 pacientes aumentando la tasa de detección en un 43% (Jenner 2014). Un estudio análogo en Chile reveló que, de un total de 312 pacientes estudiados, al incorporar el estudio de CLL, hubo un incremento del 29% de sensibilidad (Peña et al. 2018). En el año 2016, en Perú, la determinación de las concentraciones de CLL y la evaluación del radio κ/λ , fue útil en la detección de 81 del total de 92 pacientes con MM. Al analizar de manera conjunta los métodos de ELP, inmunofijación y CLL, se observó un incremento en la sensibilidad de detección, logrando un diagnóstico acertado del 100% (Pizarro et al. 2016). En un estudio realizado en el 2017, sobre la validación clínica del ensayo de CLL de Seralite®, un total de 576 pacientes se clasificaron como MM de cadenas livianas porque no tenían una proteína M intacta en la inmunofijación sérica; pero, sí tenían CLL en la inmunofijación de la orina. De estos pacientes, el 81% también tenían una CLL detectable en suero por inmunofijación y la relación sérica κ/λ fue anormal en todos los pacientes. Por lo tanto, pudieron diagnosticar con gran sensibilidad el mieloma de casos de cadenas livianas independientemente de los resultados en orina (Heaney et al. 2017).

En el 2009, el IMWG realizó un conjunto de recomendaciones acerca del esquema de diagnóstico inicial referido a la detección de la proteína monoclonal o CM. Esas guías son aceptadas y usadas en varios países, las cuales recomiendan la realización de una ELP junto con un ensayo de CLLs de la misma muestra y, si una o ambas dieran positivas, sobre la misma muestra se realiza una inmunofijación para tipificar la GM (Rajkumar et al. 2014). Además, según las directrices del IMWG para el análisis de CLLs en el MM y trastornos relacionados de los pacientes que tienen una enfermedad no secretora u oligosecretora y, para la mayoría de los pacientes con

AL, los métodos tradicionales (ELP, IF y medición nefelométrica de cadenas pesadas) no son adecuados. El desarrollo del ensayo de CLLs ha demostrado su utilidad para el seguimiento de estos pacientes (Rajkumar et al. 2014), tal y como se muestra en los resultados de este trabajo.

Conclusiones

El 14% de las electroforesis de proteínas séricas tenía diagnóstico de gammapatía monoclonal, 70% de ellas de pacientes del género masculino con un promedio de edad de 64 años. Más de la mitad de los pacientes con gammapatías monoclonales tenían diagnóstico de mieloma múltiple, de los cuales 15% eran menores de 40 años. EL 69% de las electroforesis por inmunotipificación séricas fueron positivas y predominó el isotipo IgG kappa (κ). El 91% de los resultados de cuantificación de cadenas ligeras libres en sangre fueron patológicos para el radio o relación κ/λ . La prueba de electroforesis por inmunotipificación sérica no mostró utilidad diagnóstica en los casos con diagnóstico clínico de mieloma múltiple no secretor u oligosecretor. Los resultados de cuantificación de cadenas ligeras libres en sangre fueron significativamente mayores a los reportados por la técnica de cuantificación de cadenas ligeras totales de la casa comercial Roche, ampliamente utilizada en el medio; es así que la cuantificación de cadenas ligeras o livianas libres aumentó la posibilidad de detección de mieloma múltiple en todas sus variantes con gran importancia en los de tipo oligosecretores.

Agradecimientos

A la dirección de Laboratorios Gamma de Portoviejo por facilitar datos para realizar este trabajo; a las autoridades de la Universidad Técnica de Manabí que, igualmente, proporcionaron facilidades para la obtención y el manejo de datos; a los médicos del Servicio de Oncohematología del Hospital de la SOLCA Portoviejo, que contribuyeron a la atención de los pacientes aportando datos sobre el comportamiento de la enfermedad; y, en especial, al Dr. Danilo Navarrete. A los pacientes, principales protagonistas de este trabajo y para los cuales están encaminados todos nuestros esfuerzos.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Contribuciones de los autores

DTP: Adquisición / Colección de datos, revisión bibliográfica, análisis e interpretación de datos, redacción de la primera versión del manuscrito, revisión del manuscrito.

AZC: Concepción y diseño del estudio, diseño experimental, análisis e interpretación de datos, redacción de la primera versión del manuscrito, revisión del manuscrito.

LSFA: análisis e interpretación estadística de datos, revisión del manuscrito.

ACG: Revisión bibliográfica, análisis e interpretación de datos, revisión del manuscrito, gestión del financiamiento.

IHA: Concepción y diseño del estudio, diseño experimental, análisis e interpretación de datos, redacción de la primera versión del manuscrito, revisión del manuscrito, gestión del financiamiento.

Referencias bibliográficas

Alvarado Ibarra M, Luis Álvarez Vera J, Anaya Cuéllar I, De La Peña Celaya A, García Fernández L, Hernández Ruiz E, Herrera Olivares W, Leyto Cruz F, Loera Fragozo et al. 2015. Primer Consenso Nacional de Mieloma Múltiple por Hematólogos del ISSSTE. artículo *Espec Rev Hematol Mex.* 16: 306–332.

Arce Hernández AA, Villaescusa Blanco R, Morera Barrios LM, Junco González Y, Merlín Linares JC, Ramón Rodríguez L, Hernández Padrón C. 2013. Distribution of types of paraproteins in a sample of patients with multiple myeloma. *Rev Cuba hematol inmunol hemoter.* 29(2): 183–188.

Caravaca Fontán F, Gutiérrez E, Delgado R, Praga M. 2017. Monoclonal gammopathies of renal significance. *Nefrol English Ed.* 37(5): 465–477.

Chang CC, Su MJ, Lee SJ, Tsai YH, Kuo LY, Lin IH, Huang HL, Yen TH, Chu FY. 2016. The immunotyping distribution of serum monoclonal paraprotein and environmental impact on multiple myeloma

(MM) and monoclonal gammopathy of uncertain significance (MGUS) in Taiwan: A medical center-based experience. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 17(1): 395–399.

Cueva Ayala P, Yépez Maldonado J, Tarupi Montenegro W. 2019. *Epidemiología del Cáncer en Quito*. 16th ed. Quito. Ecuador: Editorial UTE.

Delgado MF. 2019. Utilidad del ensayo de cadenas livianas libres en suero en el manejo de gammopatías monoclonales: diagnóstico, pronóstico y monitoreo. *Rev Médica del Uruguay.* 30(1): 65–75.

García García P, Enciso Alvarez K, Diaz Espada F, Vargas Nuñez JA, Moraru M, Yebra-Bango M. 2015. Gammopatías biclonales: estudio retrospectivo de 47 pacientes. *Rev Clin Esp.* 215(1): 18–24.

Heaney JJJ, Campbell JP, Griffin AE, Birtwistle J, Shemar M, Child JA, Gregory WM, Cairns DA, Morgan G, Jackson G, et al. 2017. Diagnosis and monitoring for light chain only and oligosecretory myeloma using serum free light chain tests. *Br J Haematol.* 178(2): 220–230. Jenner E. 2014. Serum free light chains in clinical laboratory diagnostics. *Clin Chim Acta.* 427: 15–20.

Laribi K, Alani M, Lemaire P. 2018. IgM k multiple myeloma with monoclonal surface immunoglobulin expression. *Int J Hematol.* 108(1): 3–4.

Leone PE, Cabrera-Andrade A, García-Cárdenas JM, González DA, Guevara-Ramírez P, López-Cortés A, Zambrano AK, Paz-y-Miño C. 2017. Ancestry study in Ecuadorian population with multiple myeloma. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 6: 435–436.

Marco P. 2014. El laboratorio en el diagnóstico de las gammopatías monoclonales. *Dep Bioquímica Clínica INFIBIOC Fac Farm y Bioquímica UBACentro Hematol Pavlov.* 18: Numero extraordinario 9-11.

McCudden CR, Mathews SP, Hainsworth SA, Chapman JF, Hammett-Stabler CA, Willis MS, Grenache DG. 2008. Performance comparison of capillary and agarose gel electrophoresis for the identification and characterization of monoclonal immunoglobulins. *Am J Clin Pathol.* 129(3): 451–458.

Montesdeoca Narváez MB. 2015. Estado del mieloma múltiple, diagnóstico clínico, medicina de laboratorio e identificación de alteraciones genéticas asociadas con la patogénesis en el Hospital Carlos Andrade Marín en un periodo de tiempo comprendido entre 1986 a 2012.

Morrison T, Booth RA, Hauff K, Berardi P, Visram A. 2019. *Laboratory assessment of multiple myeloma*. 1st ed. Elsevier Inc. Murata K, Mccash S, Landgren CO. 2019. 80 - Monoclonal Gammopathies. In: *Clinical Immunology. Principles and Practice*. Fifth Edit. Elsevier Ltd. 1079-1093.

Osatinsky R, Desimone I, Garnek L. 2004. Incidencia de patente oligoclonal en población adulta aparentemente sana. *Rev Mex Patol Clínica.* 51(2): 90–92.

Peña C, Ortiz M, Voisin J, Peralta A, Balboa V, Delgado F. 2018. Sensibilidad diagnóstica de electroforesis de proteínas y cadenas livianas libres séricas en gammopatías monoclonales. *Rev Med Chil.* 146(1): 64–67.

Pizarro R, Samanez C, Cartolin M, Delgado F. 2016. Efecto de la medición de cadenas ligeras libres en suero en el diagnóstico de gammopatías monoclonales; experiencia en Perú. *Rev Hematol Mex.* 17(2): 99–106.

Rajkumar SV. 2018. Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 93(8): 1091–1110.

Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, Kumar S, Hillengass J, Kastritis E, Richardson P, et al. 2014. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 15(12): 538–548.

Rincón N. 2016. Neoplasias hematológicas: un mundo aún por descubrir Hematologic neoplasms: a world yet to be discovered Hospital General de Medellín. *Med Lab.* 22(3–4): 109–110.

Seth S, Zanwar S, Vu L, Kapoor P. 2020. Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance: Current Concepts and Future Prospects. *Curr Hematol Malig Rep.* 15(2): 45–55.

Vázquez AP, Palma AZ. 2015. Utilidad de pruebas de laboratorio en el diagnóstico de mieloma múltiple. *Rev Latinoam Patol Clínica.* 62(1): 55–62.

Pseudolycopodiella iuliformis (Lycopodiaceae, Lycopodielloideae) in Ecuador and Peru; a disjunct species between the Guyana Shield and the Cordillera del Cóndor*Pseudolycopodiella iuliformis* (Lycopodiaceae, Lycopodielloideae) en Ecuador y Perú; una especie disyunta entre el Escudo Guayanés y la Cordillera del Cóndor

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas
Volumen 42. No. 2, Nov 2021

Nicolás Zapata¹, Álvaro J. Pérez^{1*}, Kevin Burgess², Edison Rea^{2,1}, David A. Neill³, Daniela Cevallos⁴, Claes Persson⁵, Benjamin Øllgaard⁶

¹Herbario QCA, Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Ecuador, Av. 12 de octubre 1076 y Roca, Apartado 17-01-2184, Quito, Ecuador.

²Department of Biology, College of Letters & Sciences, Columbus State University, University System of Georgia, 4225 University Ave, Columbus, GA 31907, USA.

³Universidad Estatal Amazónica, Paso lateral, Puyo, Pastaza, Ecuador.

⁴Grupo de Investigación en Biodiversidad, Medio Ambiente y Salud (BIOMAS), Universidad de las Américas (UDLA), Vía Nayón s/n, Quito, Ecuador.

⁵Department of Biological and Environmental Sciences, University of Gothenburg, P.O. Box 461, 40530 Göteborg, Sweden.

⁶Herbarium AAU, Science Museums, and Section for Ecoinformatics and Biodiversity, Department of Biology, Building 1137, University of Aarhus, DK-8000 Aarhus, Denmark.

*Corresponding author: ajperez@puce.edu.ec

Recibido 31-07-2021

Aceptado 21-11-2021

DOI: 10.26807/remcb.v42i2.903

e-ISSN 2477-9148

© 2021. This paper is published under a CC BY-NC 4.0 license.

Citation:

Zapata N, Pérez AJ, Burgess K, Rea E, Neill DA, Cevallos D, Persson C, Øllgaard B. 2021. *Pseudolycopodiella iuliformis* (Lycopodiaceae, Lycopodielloideae) in Ecuador and Peru; a disjunct species between the Guyana Shield and the Cordillera del Cóndor. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas 42(2): 133-139 doi: 10.26807/remcb.v42i2.903

Abstract.- Recent floristic surveys in Ecuador and Peru have found many disjunct species between the Guyana Shield and the Cordillera del Cóndor. Here, we report the occurrence of another disjunct species between these two ranges, *Pseudolycopodiella iuliformis* (Underw. & F.E. Lloyd) Holub, recently discovered in the Cordillera del Cóndor range. We present a morphological description, photographic documentation, and an updated distribution map. In addition, we highlight the morphological differences between *P. iuliformis* and its congeners historically recorded for Ecuador and Peru. This research highlights an urgent need for further exploration of the Cordillera del Cóndor range, as it seems likely, based on our findings and those of previous floristic surveys, that additional disjunct species are likely to be found in the area.

Keywords: Andean tepui, Conservation, Distribution range, Disjunct species, Lycophytes, Phytogeography, Taxonomy

Resumen.- Recientes estudios florísticos en Ecuador y Perú han registrado varias especies disyuntas entre el Escudo Guayanés y la Cordillera del Cóndor. Aquí, reportamos la ocurrencia de otra especie disyunta entre estas dos cordilleras, *Pseudolycopodiella iuliformis* (Underw. & F.E. Lloyd) Holub, recientemente registrada en la Cordillera del Cóndor. Presentamos una descripción morfológica, fotografías, y un mapa de distribución actualizado. Adicionalmente, resaltamos las diferencias morfológicas entre *P. iuliformis* y sus congéneres históricamente registrados en Ecuador y Perú. Esta investigación enfatiza la necesidad urgente de una mayor exploración de la Cordillera del Cóndor, ya que parece probable, con base a nuestros hallazgos y los de estudios florísticos previos, que se encontrarán más especies disyuntas en esta área.

Palabras clave: Conservación, Especies disyunta, Fitogeografía, Licofitos, Rango de distribución, Taxonomía, Tepuy Andino.

Introduction

Pseudolycopodiella Holub consists of ~15 poorly understood species distributed in tropical and temperate regions of western Asia, Australia, and western North and South America (Holub 1983, Øllgaard and Windisch 2016). In the Neotropics, Brazil has the highest diversity of species (seven), followed by Venezuela, with four species. For western South America in particular, only *Pseudolycopodiella meridionalis* (Underw. & F.E. Lloyd) Holub is recorded in Ecuador (Øllgaard 2016), whereas *Pseudolycopodiella contexta* (Mart.) Holub and *Pseudolycopodiella caroliniana* (L.) Holub var. *mesetarum* (B.Øllg.) B.Øllg are recorded in Peru (Ulloa Ulloa et al. 2017).

Pseudolycopodiella can be distinguished from other South American members of the subfamily Lycopodielloideae (i.e., *Lycopodiella* Holub, *Palhinhaea* Vascon. & Franco) by the following character states: 1) sporophytes with prostrate, rooting, indeterminate, isophyllous to strongly anisophyllous, horizontally branching shoots and dorsally arising, erect, simple strobiliferous branches with leaves that conform with those of the prostrate shoots or leaves that are strongly reduced and distant; 2) sporophylls arranged in alternating whorls of 3–5, rarely decussate, forming 4–10 (–12) longitudinal ranks, free, not enclosing the sporangia at maturity, without

veinal mucilage canals; and 3) sporangia isovalvate, reniform, widely attached to the sporophyll stalk: sporangium epidermis cells with incompletely lignified or with incomplete semiannular thickenings (Øllgaard 2014, Øllgaard and Windisch 2016).

Explorations in the Ecuadorian and Peruvian Cordillera del Cóndor range have revealed several disjunct plant genera/species with the Guyana Shield, i.e., *Stenopadus* (Asteraceae), *Digomphia densicoma* (Mart. ex DC.) Pilg. (Bignoniaceae), *Everardia montana* Ridl. (Cyperaceae), *Dendrothrix* (Euphorbiaceae), *Euceraea* (Salicaceae), *Phainantha* (Melastomataceae), *Podocarpus tepuiensis* J. Buchholz & N.E. Gray (Podocarpaceae), *Pterozonium* (Pteridaceae), *Perissocarpa* (Ochnaceae), *Retiniphyllum* (Rubiaceae), *Bonnetia* (Bonnetiaceae), and *Aratitiopea* (Xyridaceae) (Berry et al. 1995, Neill 2005, 2007, Wurdack 2017); several new taxa have also been discovered (Gradstein et al. 2019, Mashburn et al. 2020, Pérez et al. 2020, 2021). The disjunct distribution of plant species between the Cordillera del Cóndor and the Guyana Shield may be explained by the two regions having a similar substrate (i.e., sandstone rock), though the age of their formation differs (Gregory-Wodzicki 2000). Recent studies suggest that plant species have migrated to the Cordillera del Cóndor region via occasional, long-distance dispersion events in relatively recent times, following its diversification over a more extended period in the Guiana Shield region (Neill 2007).

For this study, we identify specimens collected from the Cordillera del Cóndor that are deposited at the Herbarium QCA; one of these specimens is *Pseudolycopodiella iuliformis* (Underw. & F.E. Lloyd) Holub (Figure 1), which is the first recording of this species as a disjunct between the Cordillera del Cóndor range (Southern Ecuador - Northern Peru) and the tepuis of the Guyana Shield in southern Venezuela and northern Brazil. Based on this finding and those of previous plant collecting expeditions to the region, we emphasize the importance of conducting additional floristic explorations to contribute to our understanding of the diversity, endemism, and phytogeography of the Cordillera del Cóndor range. This area is also severely threatened due to deforestation and mining activities.

Here, we present a morphological description, photographic documentation, and an updated distribution map for *P. iuliformis*, and highlight the morphological differences between *P. iuliformis* and its congeners in Ecuador and Peru. Currently, two species of *Pseudolycopodiella* are recorded for Ecuador, and three species for Peru.

Materials and methods

Pseudolycopodiella specimens collected from the Cerro Plateado Biological Reserve and the Machinaza region in the Zamora-Chinchi Province, southern Ecuador, formed the basis of this study. Additionally, we revised material from QCA and QCNE herbaria. We based identification on the pertinent literature, high-resolution images for the type of material of Neotropical taxa (Tropicos database, <https://www.tropicos.org/> and the JSTOR Global Plants website <http://plants.jstor.org>) and the Pteridportal website (www.Pteridportal.org).

Dry material and pictures of our specimens formed the basis for updating the morphological description of *P. iuliformis* (Øllgaard and Windisch 2016). All measurements were performed on dry material, and fine-scale observations and measurements of reproductive structures were made with a dissecting microscope.

Taxonomy

Pseudolycopodiella iuliformis (Underw. & F. E. Lloyd) Holub, Folia Geobot. Phytotax. 18: 442. 1983. *Lycopodium iuliforme* Underw. & F. E. Lloyd, Bull. Torrey Bot. Club 33: 120. 1906. - *Lycopodiella iuliformis* (Underw. & F. E. Lloyd) B. Øllg., Opera Bot. 92: 176. 1987.

Type: Venezuela: Summit of Roraima, 8600 ft, *McConnell & Quelch* 572 (Holotype NY! 143999).

Figure 1, 2

Horizontal shoots closely appressed to the ground, 5–20 cm long, rooted with short intervals, sparsely to densely branching in the horizontal plane, usually forming small mats, bearing stiffly erect, dorsally arising, simple, 6–30 cm tall strobiliferous branches. Horizontal shoots densely



Figure 1. *Pseudocyclopediella iuliformis*. A. Habitat in Cerro Plateado Reserve; mat growing under thick organic matter surrounded by bryophytes. B. Creeping shoots entirely isophyllous. C. Detail of young strobilus. Photographs: A, B by Álvaro J. Pérez, C by Nicolás Zapata.

covered on all sides by leaves, 4–10 mm diam. incl. leaves. Stems excl. leaves 1–3 mm thick. Leaves of horizontal shoots uniform, usually upward secund and curved, acicular, flattened with a subterete to compressed leaf base (angular when dried), or sometimes terete or angular throughout, 3–6 × 0.4–0.8 (–1) mm, with smooth margins. Leaf bases not, or only slightly acroscopically adnate, short to long decurrent. Erect strobiliferous shoots 3–4 mm diam. incl. leaves, 1.5–2 mm excl. leaves, with uniform, radially arranged leaves. Vegetative leaves of erect shoots borne in alternating, irregular whorls of 3–6, 2–4 mm apart, forming 8–12 obscure longitudinal ranks, appressed throughout, flattened, subulate, ca. 5 × ca. 0.8 mm, evenly tapering. Strobili 2.5–11 cm long, 3–5 mm diam. with appressed sporophylls, to 14 mm in diam. with distended sporophylls. Sporophylls borne in alternating whorls of 5–6, forming 10–12 longitudinal ranks, subpeltate, with a basiscopic, compressed membranaceous wing on the stalk, the exterior face with a widely ovate to rhombic basal part and an abruptly to evenly tapering, long apex, 4–8 × 1.5–2 mm, with finely erose-dentate margins. Sporangia borne on the sporophyll base, reniform, isovalvate, 1.5–2 mm wide.

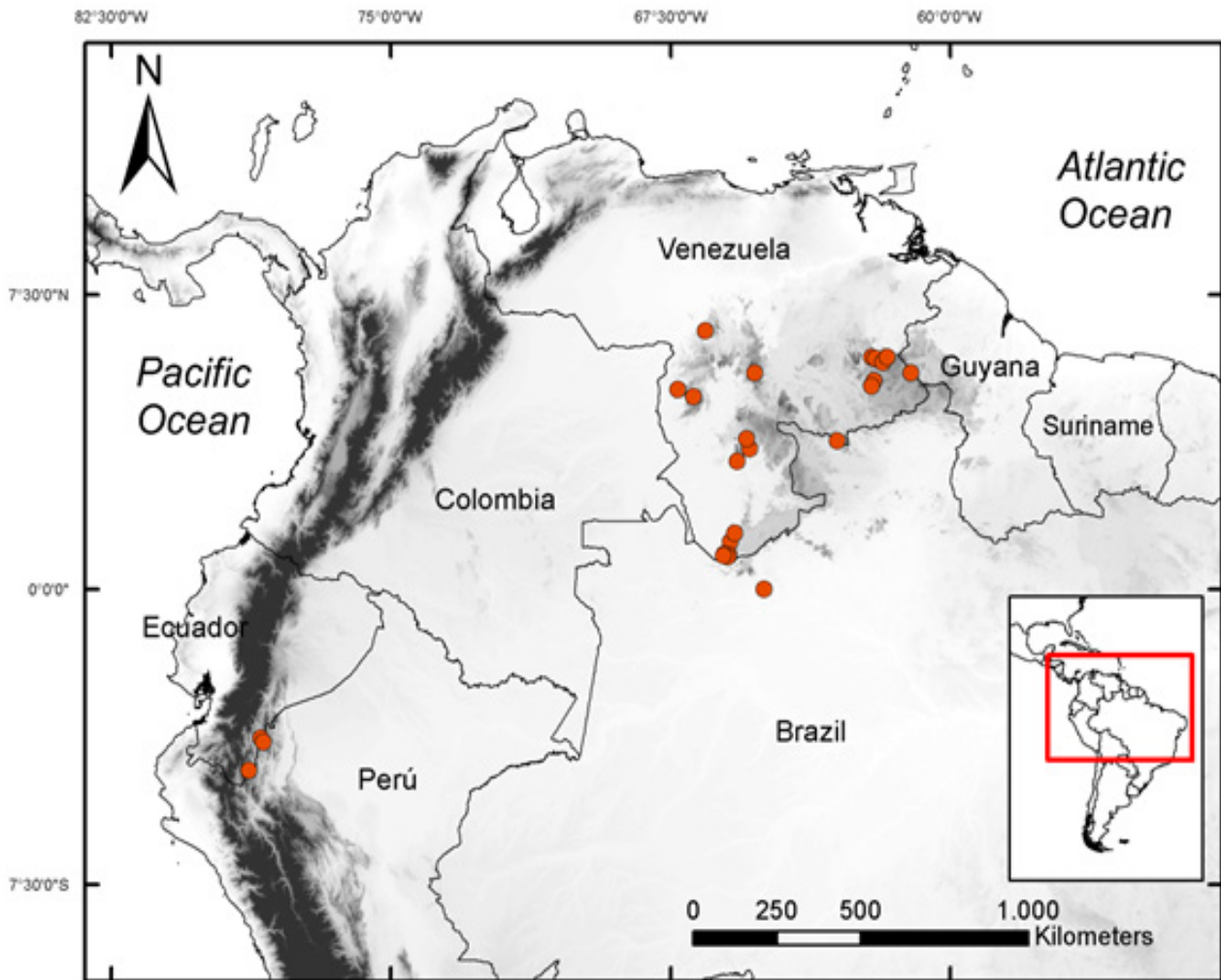


Figure 2. Distribution map of *Pseudolycopodiella iuliformis*

Distribution and habitat

Pseudolycopodiella iuliformis is a highly variable species previously considered endemic to the Guyana Highlands in Venezuela and Brazil, which grows in sandy, nutrient-poor, acidic soils (Øllgaard and Windisch 2016). The focal populations of *P. iuliformis* recorded in the Cordillera del Cóndor range of Ecuador and Peru grow in similar abiotic conditions, supporting a disjunct distribution between two similar geological formations, but separated by more than 1500 km (Figure 2). The Guyana Shield has a long geological history, and its formation dates to the Precambrian (~1.7 billion years ago). In contrast, the uplift of the Cordillera del Cóndor is much younger (5 - 10 million years ago) (Berry et al. 1995, Gregory-Wodzicki 2000, Schulenberg and Awbrey 1997). However, the phytogeography of these regions requires further study to better understand the distribution of plant species and the ecological and evolutionary processes associated with colonization and speciation processes in the area.

Pseudolycopodiella iuliformis is recorded from two sites in the Cordillera del Cóndor range close to the border of Ecuador and Peru. In Ecuador, the species is documented in two localities in the Zamora-Chinchipec Province: the Andean tepuis zone of Cerro Plateado Reserve (2400–2600 m) and the Machinaza region (1500 m). In Peru, *P. iuliformis* occurs in the Condorcanqui Province of the Amazonas Department, at the summit of Cerro Machinaza (2160 m) (Figure

2). *Pseudolycopodiella iuliformis* grows in humid habitats with sandstone soils, together with a dense layer of bryophytes, and it is surrounded by terrestrial bromeliads and sclerophyllous shrubs (Figure 3). According to specimen label notes (Pérez et al. 7365, 7468, 10080, 10083), associated species include *Drosera condor* Gonella, A. Fleischm. & Rivadavia, *Drosera peruensis* T. Silva & M.D. Correa, *Everardia montana* Ridl., *Ladenbergia franciscana* C.M. Taylor, *Macrocarpaea subsessilis* Weaver & J.R. Grant, *Miconia machinazana* C. Ulloa & D.A. Neill, *Symbolanthus nebulosus* J.E. Molina & Struwe, and *Ugni myricoides* (Kunth) O. Berg, among others (Figure 3).

Discussion

Plants of *P. iuliformis* observed in the Ecuadorian and Peruvian Cordillera del Cóndor tend to form smaller mats with shorter strobiliferous branches than those found in the Guyana Shield; however, this range in morphological variation is consistent with the overall description of the species (Holub 1983, Øllgaard and Windisch 2016). *Pseudolycopodiella iuliformis* is distinguished from *P. meridionalis* and *P. caroliniana* var. *mesetarum* by its creeping shoots, which are entirely isophyllous (vs anisophyllous in *P. meridionalis* and *P. caroliniana*). In addition, *P. iuliformis* differs from *P. contexta* in two ways: 1) vegetative leaves with strobiliferous branches distant or subdistant, their bases flattened and appressed, often with slightly recurved tips; and 2) strobili appearing thicker than vegetative strobiliferous branches including the leaves (vs. vegetative leaves of erect, strobiliferous branches densely crowded, strongly ascending from an almost perpendicular, terete to angular leaf base; strobiliferous branches, including the leaves, appearing as thick as, or thicker than the strobilus in *P. contexta*).

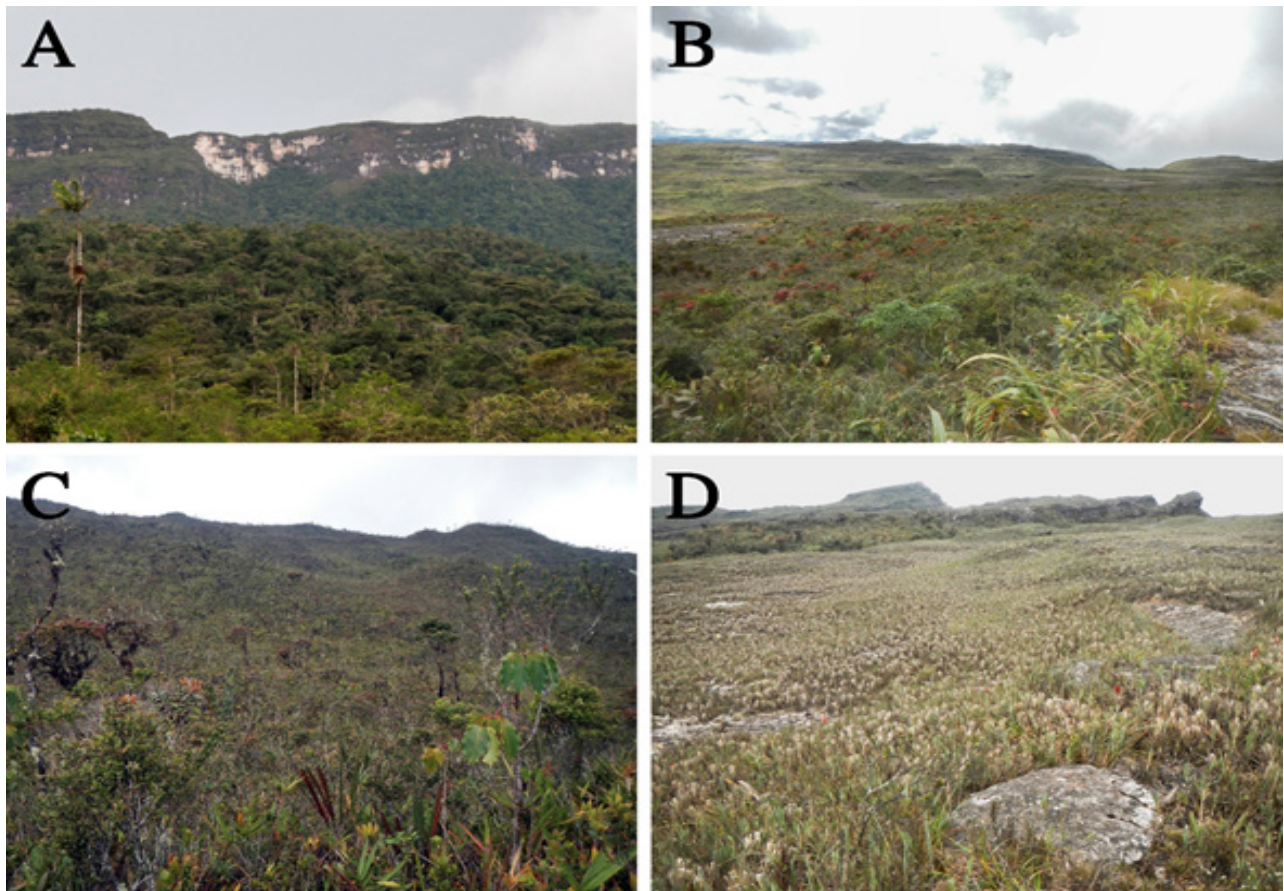


Figure 3. The habitat of *Pseudolycopodiella iuliformis* in the Andean tepuis: A. view of Cerro Machinaza from Río Blanco community in Zamora-Chinchiipe, Ecuador. B. Vegetation at the summit of Cerro Machinaza (2400 m): scattered sclerophyllous shrubs, elfin forest, and open areas with sandstone outcrops. C. Elfin forest at the Cerro Plateado Reserve (2500 m). D. Vegetation at the summit of Cerro Plateado (2900 m). Photographs: A by Edison Rea; B, C, D by Álvaro J. Pérez.

Currently, *P. iuliformis* presents a disjunct distribution (1500 km) between the Guyana Shield (southern Venezuela and adjacent Brazil) and the Cordillera del Cóndor range (Ecuador and Peru) (Figure 2). Both regions share similar abiotic conditions, with sandy, nutrient-poor, acidic soils. In the Cordillera del Cóndor range, *P. iuliformis* grows on a thick organic matter covered by bryophytes in open areas with sandstone outcrops or between terrestrial bromeliads and scattered sclerophyllous shrubs; all of which being habitats that dominate the Andean tepuis (Figure 3).

The complete distribution of *P. iuliformis* remains uncertain. More exploration is needed in the Cordillera del Cóndor range to understand the phytogeography of this highly diverse area and support conservation efforts in the face of deforestation and mining activities in the region (Mazabanda et al. 2018, Piotrowski and Ortiz 2019).

Specimens examined. ECUADOR. Zamora-Chinchipe: Cantón Nangaritza, Reserva Biológica Cerro Plateado, Colecciones en la meseta o tepuy andino sobre el campamento 2, 04°36'16"S 078°49'16"W, 2400–2600 m, 22 Sep. 2016, Pérez et al. 10068 (QCA); 8 Aug. 2021, Pérez et al. 11708 (QCA). Cantón Yantzaza, Parroquia Los Encuentros, Campamento Las Peñas, entrada a la Cantera, área circundante al Cerro Machinaza, 03°46'36"S, 78°29'53"W, 1500 m, 20 Oct. 2020, Zapata et al. 720 (QCA).

Additional specimens examined. PERU. Amazonas: Condorcanqui, Cima del Cerro Machinaza, Arriba del puesto de vigilancia Alfonso Ugarte (PV3), Meseta de roca arenosa con capa de humus, 3°52.7'S, 78°25.8'W, 2160 m, 31 Jul. 1994, Beltrán et al. 1529 (UC 2044145, USM 119241).

Acknowledgements

Fieldwork was granted by the Ministry of the Environment of Ecuador (MAE-DNB-ARRGG-CM-2014-0002). We are grateful to the Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de la República del Ecuador (SENESCYT, Arca de Noé Initiative, S. R. Ron and O. Torres–Carvajal, Principal Investigators) for financial support. Curators of cited herbaria allowed us to review the material. Finally, we thank the editors and two anonymous reviewers for their valuable suggestions that improved this paper.

Declaration of interest and Authors' contributions

All authors declare that there is no conflict of interest. AJP, NZ collected and photographed the plants in Ecuador. BØ, NZ and DC identified the specimens. AJP, CP, DC, DN, ER, KB, BØ, and NZ wrote the text and revised herbarium collections. The Arca de Noe project and International Palm Society funded the fieldwork in Ecuador.

References

Berry PE, Huber O, Holst BK. 1995. Phytogeography of the Guayana Region. (Steyermark JA, Berry PE, Holst BK (eds) Flora of the Venezuelan Guayana: volume 1). Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.

Gradstein SR, Reeb C, Persson C, Zapata N, Pérez ÁJ. 2019. *Riccardia verticillata* Gradst. & Reeb, a new dendroid species of *Riccardia* (Aneuraceae) from the Cordillera del Cóndor, Ecuador. *Journal of Bryology* 41(4): 322–327.

Gregory-Wodzicki KM. 2000. Uplift history of the central and northern Andes: a review. *Geological Society of America Bulletin* 112: 1091–1105.

Holub J. 1983. Validation of Generic Names in Lycopodiaceae: with a Description of a New Genus *Pseudolycopodiella*. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 18: 439–442.

Mashburn B, Pérez ÁJ, Persson C, Zapata N, Cevallos D, Muchhala N. 2020. *Burmeistera quimiensis* (Lobelioideae, Campanulaceae): A new species from the Cordillera del Cóndor range in southeast

Ecuador. *Phytotaxa* 433(1): 67–74.

Mazabanda C, Kemper R, Thieme A, Hettler B, Finer M. 2018. Impacts of mining project “Mirador” in the Ecuadorian Amazon. [Internet]. [accessed 2021 Jun 18]. <https://maaproject.org/mirador-ecuador/>

Neill DA. 2005. Cordillera del Cóndor: botanical treasures between the Andes and the Amazon. *Plant Talk* 41: 17–21.

Neill DA. 2007. Botanical exploration of the Cordillera del Cóndor region of Ecuador and Peru: project activities and scientific findings, 2004–2007. [Internet]. [accessed 2021 Jun 18]. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/ecuador/cordillera/welcome.shtml>

Øllgaard B. 2015. Six new species and some nomenclatural changes in Neotropical Lycopodiaceae. *Nordic Journal of Botany* 33: 186–196.

Øllgaard B. 2016. Additions, deletions and changes to the Ecuadorian Lycopodiaceae. *Phytotaxa* 246(2): 93–106.

Øllgaard B, Windisch PG. 2016. Lycopodiaceae in Brazil. Conspectus of the family II. The genera *Lycopodiella*, *Palhinhaea*, and *Pseudolycopodiella*. *Rodriguésia* 67(3): 691–719.

Pérez ÁJ, Persson C, Zapata N, Mashburn B, Vázquez-García JA. 2020. *Magnolia lozanoi* (*Magnolia* subsect. *Dugandiodendron*, Magnoliaceae) rediscovered on Ecuadorian “tepuis” in Reserva Biológica El Quimi, Cordillera del Cóndor: Critically endangered by open-pit mining. *Phytotaxa* 428: 255–262.

Pérez ÁJ, Zapata N, Cevallos D, Persson C, Rea E, Øllgaard B. 2021. First record of *Phlegmariurus pruinosus* (Herter) B. Øllg. (Lycopodiaceae) for Ecuador from the Cordillera del Cóndor range. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 42(1): 57–62.

Piotrowski M, Ortiz E. 2019. Nearing the Tipping Point: Drivers of Deforestation in the Amazon Region. [Internet]. [accessed 2021 Mar 31]. <https://www.thedialogue.org/analysis/nearing-the-tipping-point-drivers-of-deforestation-in-the-amazon-region/>

Schulenberg TS, Awbrey K. 1997. The Cordillera del Cóndor region of Ecuador and Peru: a biological assessment. RAP Working Papers 7. Conservation International, Washington, DC.

Ulloa Ulloa C, Acevedo-Rodríguez P, Beck S, Belgrano MJ, Bernal R, Berry PE, Brako L, Celis M, Davidse G, Forzza RC, Gradstein SR, Hokche O, León B, León-Yáñez S, Magill RE, Neill DA, Nee M, Raven PH, Stimmel H, Strong MT, Villaseñor JL, Zarucchi JL, Zuloaga FO, Jørgensen PM. 2017. An Integrated Assessment of the Vascular Plants Species of the Americas. *Science* 358: 1614–1617.

Wurdack KJ. 2017. A new disjunct *Dendrothrix* (Euphorbiaceae, tribe Hippomaneae): a Guiana Shield element in sub-Andean cordilleras of Ecuador and Peru. *PhytoKeys* 86: 117–130. doi: 10.3897/phytokeys.86.14761

On the relationship between nest concealment and the conspicuous coloration of female passerines: a test of Wallace's hypothesis

Sobre la relación entre el ocultamiento de nido y la coloración conspicua de las hembras paserinas: una prueba de la hipótesis de Wallace

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas
Volumen 42. No. 2, Nov 2021

Jay P. McEntee^{1,2}, Zoe Zelazny¹, J. Gordon Burleigh^{1,*}

¹Department of Biology, University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA

²Department of Biology, Missouri State University, Springfield, MO 65897, USA

*Corresponding author:
gburleigh@ufl.edu

Recibido 13-08-2021
Aceptado 24-11-2021

DOI: 10.26807/remcb.v42i2.906

e-ISSN 2477-9148

© 2021. This paper is published under a CC BY-NC 4.0 license.

Citation:
McEntee JP, Zelazny Z, Burleigh JG. 2021. On the relationship between nest concealment and the conspicuous coloration of female passerines: a test of Wallace's hypothesis. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 42(2): 141-158.
doi: 10.26807/remcb.v42i2.906

Abstract.- Alfred Russel Wallace hypothesized that the use of cavity or dome nests releases incubating birds from predation risk, and that this allows the evolution of conspicuous coloration in females. By this hypothesis, females that use open nests are subject to strong selection for crypsis. Here, we test the validity of Wallace's proposed evolutionary correlation between nest type and conspicuous coloration in females across the largest avian radiation, the Passeriformes, using phylogenetic comparative methods. We also test an alternate hypothesis that cavity-nesting results in greater conspicuousness because competition for cavities is stronger than for other nest sites, and such competition can drive social selection on female plumage. By this hypothesis, dome-nesting females should generally be less conspicuous than cavity-nesting species. We found no support for Wallace's hypothesis that concealed nests yield conspicuous plumage while open nests yield dull plumage, and some support for the social selection hypothesis in smaller-bodied, gregarious species. While our analyses do not support the core part of Wallace's hypothesis, they corroborate his contention that evolutionary transitions in nest type are rare, indicating that nest types may influence macroevolutionary selective regimes for other traits.

Keywords: social selection, macroevolution, behavior, breeding site

Resumen.- Alfred Russel Wallace hipotetizó que el uso de nidos en cavidad y en domo libera a los pájaros en incubación del riesgo predatorio, lo que permitiría la evolución de la coloración conspicua en las hembras. Bajo esta hipótesis, las hembras que usan nidos abiertos están sujetas a una fuerte selección por cripsis. En este trabajo probamos la validez de la propuesta de Wallace que correlaciona la evolución de los tipos de nidos con la coloración conspicua de las hembras, utilizando métodos filogenéticos comparativos y la radiación aviar más grande, los Passeriformes. También exploramos la hipótesis alterna que propone que la anidación en cavidades produce un plumaje conspicuo ya que la competencia por cavidades es más fuerte que en otros sitios de anidación, y esta competencia provocaría selección social en el plumaje de la hembra. Bajo esta hipótesis, las hembras de las especies que anidan en domos deberían ser generalmente menos conspicuas que aquellas que anidan en cavidades. No encontramos apoyo para la hipótesis de Wallace que indica que los nidos ocultos producen plumaje conspicuo y que los nidos abiertos o expuestos producen plumaje apagado, sin embargo, encontramos un leve apoyo para la hipótesis de selección social en las especies gregarias y de cuerpos pequeños. Si bien nuestros análisis no apoyan la hipótesis central de Wallace, estos corroboran su contención ya que las transiciones evolucionarias en los tipos de nido son raras, lo que indica que los tipos de nido pueden influenciar regímenes selectivos macro evolucionarios para otras características o rasgos.

Palabras claves: selección social, macroevolución, comportamiento, sitios de apareamiento

Introduction

A century and a half ago, Alfred Russel Wallace (1868, 1871) presented evidence that visibly conspicuous female morphologies principally occur in bird species with concealed nest types (i.e., holes, cavities, or domes), and that cryptic female coloration principally occurs in bird species with open nests (i.e., nests that are not enclosed and do not have a 'roof'). The association between nest type and conspicuousness implies that incubation-associated predation is a principal factor influencing the evolution of visual signals and/or nesting behavior (Martin 1995). Darwin (1874) accepted Wallace's evidence that the nest type and the conspicuousness of incubating individuals are associated across terrestrial birds, allowing for a few exceptions, and much subsequent research has focused on the role of predation in limiting or directing the evolution of visual signals (Zuk and Kolluru 1998; Jennions et al. 2001) and behavior (Lima and Dill 1990; Martin 1995; Lima 1998; Sih et al. 2004).

Although Wallace and Darwin agreed that an association between female conspicuousness and nest type exists, they disagreed on how it arose. Wallace (1871) hypothesized that female visual signals evolve under selective regimes defined by nest types (concealed versus exposed), which are evolutionarily conserved. By this hypothesis, female signals are subject to strong selection for reduced conspicuousness in open cup-nesting birds, while birds with concealed nests escape such selection and are free to evolve conspicuous signals. Critical to Wallace's view is the notion that female signals respond to selection somewhat independently of male plumage (Amundsen 2000). In contrast, Darwin (1874) argued that extent of sexual dichromatism is largely evolutionarily conserved, such that transitions between strong sexual dichromatism and monochromatism are rare. Further, Darwin (1874) suspected that nest type was relatively labile, and so he hypothesized that nest type evolved against a backdrop of conserved conspicuousness states. Thus, whereas Wallace (1871) contended that female signals readily evolve as a response to selection for predation risk, Darwin proffered that nest type instead readily evolves as a response to selection from predation risk. Both these processes should result in a similar contemporary association between traits.

Wallace and Darwin could not, of course, evaluate their ideas using phylogenetic trees. Examining the hypothesis that nesting behavior limits the evolution of female conspicuousness (Wallace 1871) or vice versa (Darwin 1874) across species requires comparative approaches that adequately address the phylogenetic non-independence of evolutionary states in different species. Two studies that account for these issues using comparative methods and molecular phylogenies (Soler and Moreno 2012; Drury and Burroughs 2016) have found mixed support for the correlation between nest type and female conspicuousness. Soler and Moreno (2012) found an evolutionary correlation between nest type (cavity vs. open cup, with domed nesting species excluded) and sexual dichromatism in European passerines. However, the correlation was driven primarily by changes in male rather than female plumage conspicuousness, in contrast to Wallace's explanation which predicts changes in female plumage conspicuousness. These authors found further support for a nest type – female plumage correlation when limiting their analysis to monochromatic species, in which cavity-nesting females are more conspicuous than open cup-nesting females. In a study of New World blackbirds (Icteridae), Drury and Burroughs (2016) found that species with concealed nests are more likely to be sexually monochromatic (with conspicuous females) than species that are visible on nests. However, the evidence from Drury and Burroughs (2016) leaves open both evolutionary scenarios that could result in such an association, with plumage responding evolutionarily to nest type (Wallace 1871) or with nest type responding to plumage state (Darwin 1874). This mix of evidence suggests that nest type and plumage evolution may be correlated, but that the relationship may not be as strong as Wallace (1868, 1871) originally conceived.

Predation risk is not the only factor that could drive a relationship between nest type and conspicuousness. Different nest types are likely to be associated with differing intensities of nest-site competition (Newton 1994). Under social selection theory (West-Eberhard 1979, 1983, 2014; Lyon and Montgomerie 2012; Tobias et al. 2012), competition for any resources can drive the evolution of conspicuous signals. Interestingly, nest-site competition has been identified as a common source of selection on female social traits (Tobias et al. 2012). Thus, if nest types

differ in associated intensities of nest-site competition, there may be differences in female signaling evolution associated with nest type, with greater conspicuousness found in nest types associated with greater intensity of nest-site competition.

Cavity supplementation and removal studies have revealed that cavities can be a limiting resource on the growth of bird populations (Lack 1954; von Haartman 1971; Newton 1994; Cockle et al. 2010), and cavity nest-sites vary in quality, such that competition for high quality sites could be mediated by signals of dominance (Cockle et al. 2008). Cavity-associated social selection on female plumage has been demonstrated for the parrot *Eclectus roratus*, which exhibits 'reverse' sexual dichromatism, where females are more conspicuous than males (Heinsohn et al. 2005). In contrast, nest-site competition dynamics are likely to be reduced in species that do not nest in cavities or natural holes, as their nest sites are unlikely to be as limiting. While the usurpation/defense dynamics expected of strong nest-site competition have been described in many cavity-nesting species (Short 1979; Collias and Collias 1984), there are comparatively few instances of such dynamics noted among species that do not use cavities (Collias and Collias 1984; Tobias et al. 2012). Overall, the potential for social selection on female signals from nest site competition should be elevated in cavity-nesting species relative to those that build nests elsewhere. If nest-site competition is important in the evolution of social signals, we expect that cavity-nesting females are more conspicuous than those that nest in open cups or domes across phylogeny (Soler and Moreno 2012).

Here we examine the predictions of nest type – female coloration correlations that result from Wallace's (1868, 1871) predation risk hypothesis and the social selection-inspired hypothesis that cavity nesters are subject to stronger selection on female signals than those that do not nest in cavities (Soler and Moreno 2012). We follow Wallace (1871) and Collias (1997) in categorizing nests into three basic types: 1) cavity (i.e., a hole in a tree, cliff, bank, rock, or nest box), 2) domed (i.e., roofed, but not in a cavity or hole), and 3) open cup (i.e., not roofed, not built in a cavity or hole). According to our framework and assuming that nest types are evolutionarily conserved, female signals should evolve contingent on the three nest-associated evolutionary regimes. We predict that females nesting in cavities should be most conspicuous (low predation risk, strong social selection potential), followed by those nesting in domes (low predation risk, weak social selection potential), and those nesting in cups (high predation risk, weak social selection potential). To test whether nest types are evolutionarily conserved (Wallace 1871) or labile (Darwin 1874), we begin by examining the evolutionary history of nest types across the Passeriformes. We then examine the correlation between nest type and female plumage conspicuousness while accounting for two additional traits that may impact plumage evolution: body size and gregariousness. We include body size because predation risk may be reduced at larger body size in passerines (Wallace 1871), potentially reducing the importance of cryptic coloration. With respect to gregariousness, the demands of social signaling may be different in gregarious and non-gregarious species (Gomes et al. 2016), with visual conspicuousness more beneficial in gregarious species.

Methods

Trait scoring.— We categorized nest types as open cup, domed, or cavity, for all passerines species whose nests are described in Handbook of the Birds of the World Alive, hereafter HBW Alive (del Hoyo et al. 2015; 4,401 species). We assigned 3,242 of these species as tips in the maximum likelihood phylogenetic tree of Burleigh et al. (2015) – hereafter "Burleigh tree". 104 of the species we scored use more than one type of nest. These flexibly nesting species were scored as *x* or *y* (e.g., open cup or cavity). For nests described as 'purses' (51 species), we scored nests as open cup where descriptions or photographs indicate that adults enter at the top and as domed when they have side entrances. Three species' nests were described in HBW Alive (del Hoyo et al. 2015) as partially domed, and one species' nest was described as being either 'partially or fully domed'. We scored both of these variants as 'domed'. Cavity nest sites may be more limited for non-excavating species than excavating species (Martin and Li 1992), which could influence intensities of nest site-associated social selection. However, even species that excavate cavities frequently do so only in particular substrates with limited availability (e.g., mud banks for some hirundinids), again suggesting limited availability of nest sites. Moreover, many excavating

species must compete with non-excavating species for the cavities they create, especially in trees (Short 1979). Thus, we do not differentiate between excavators and non-excavators.

We also scored species for gregariousness (gregarious vs. nongregarious), which is associated with visual signal evolution (Gomes et al. 2016) and can be scored for many species. We defined gregariousness by whether species are group-living, irrespective of season, based on descriptions in HBW Alive (del Hoyo et al. 2015). Thus, birds that breed in colonies are gregarious, as are birds that flock in the non-breeding season but breed in territorial social pairs. Nongregarious species are those that do not occur in groups beyond parent-offspring relations. We treat ambiguous cases (where species are only described as occurring in 'small groups' or in either family groups and small groups) as gregarious. Results from analyses where ambiguous cases are treated as nongregarious instead were extremely similar, and are not presented.

Predation pressure may vary with body size in passerines (Wallace 1871), as larger species may be less subject to predation risk. Such a pattern could imply that larger species have less constraint on female plumage conspicuousness than smaller species, especially in open cup-nesting taxa. To account for this possibility, we included body mass data in phylogenetic general linear models (see below). We obtained body mass data from Dunning (2008, 2015). We used mean body mass across sexes as a predictor because most species in the data set do not have masses split out by sex. The nest type, gregariousness, and body size data are available in Dryad (<https://doi.org/10.5061/dryad.76hdr7sx7>).

Plumage scoring.- We limit our focus to female plumage conspicuousness, and do not address male plumage. This approach is justified by recent studies that have shown that female plumage evolves at rates as high or higher than male plumage in passerines (Price and Birch 1996; Hofmann et al. 2008; Johnson et al. 2013; Price and Eaton 2014; Dale et al. 2015), and thus is evolving sufficiently independently of males (allowing for similarities in the particular dull or conspicuous colors used by males and females; Dale et al. 2015).

We sought to develop a single composite conspicuousness score for adult females of each species that captured plumage conspicuousness. We followed other recent studies that characterized plumage phenotypes based on human vision (Amundsen and Pärn 2006; Seddon et al. 2010; Dale et al. 2015; Drury and Burroughs 2016). Recent studies have shown that sexual dichromatism scores using human vision are consistent with plumage scores developed using an avian bird vision model of spectrophotometer measurements (Armenta et al. 2008; Seddon et al. 2010; Drury and Burroughs 2016). Another recent study showed that scores developed from spectrophotometer measurements of plumage depiction plates in the Handbook of the Birds of the World (del Hoyo et al. 2003-2011) and analyzed in a trichromatic color space were highly correlated with scores developed from spectrophotometer measurements of museum specimens and analyzed in a tetrachromatic color space (Dale et al. 2015). High correspondence between such scores suggests that human vision is sufficient to characterize much of the among-species plumage variation. Additionally, given that one of our major goals was to understand the evolution of conspicuousness in relation to predation risk, it is important to consider not only passerine vision but also the vision of their predators. Human vision is most relevant as a proxy for the vision of other trichromatic primates, which occur pan-tropically (SurrIDGE et al. 2003, Jacobs 2009).

We developed a composite score that incorporated the color conspicuousness of plumage patches on the nape and upper back and the presence or absence of color contrast between these patches. For color conspicuousness, we scored each patch as cryptic, intermediate, or conspicuous. A single observer (ZZ) categorized patch conspicuousness based on the depictions in HBW Alive (del Hoyo et al. 2015), which are set against a white background, and the accompanying plumage descriptions. In our scoring, 'conspicuous' scores (value = 1) were typically assigned to plumage patches described as black, red, orange, yellow, blue, purple, white, or iridescent, whereas 'cryptic' scores (value = 0) were typically assigned to plumage patches described as brown, olive, dull green, and dull gray, and 'intermediate' scores (value = 0.5) were typically assigned to plumage patches described as light gray, bluish-gray, yellowish, orange-brown, and rufous.

e or absence of color contrast between four sets of adjacent patches (crown vs. nape, nape vs. upper back, upper vs. lower back, and upper back vs. wing coverts), and the presence or absence of contrast within the wing coverts. We interpreted contrast between color patches as contributing to conspicuousness because contrast between large plumage patches should generally make birds more evident rather than cryptic. This notion is consistent with the existence of high-contrast aposematic coloration in nature, including in toxic birds (Dumbacher and Fleisher 2001). However, it is possible that such contrast between large plumage patches can, in some instances, make birds more cryptic. Contrast within wing coverts also likely increases conspicuousness, perhaps especially during flight, which may increase conspicuousness of females while approaching and leaving the nest, and where open cup-nesting species have greater predation risk while on the nest. Contrast between plumage patches was scored as present where there is an abrupt transition between different color patches and absent where there is a color gradient across patches. Contrast within wing coverts was scored as present where there was distinct color contrast (including when such contrast is described as ‘bands’ or ‘wingbars’) within wing coverts. For both of these plumage aspects, a value of 1 was assigned for ‘present’ and 0 for ‘absent’.

From the set of seven color and contrast scores for each species, we took the sum as a composite score for female dorsal plumage conspicuousness. We scored 5,912 species and their differently-plumaged subspecies, and included 3,242 species in phylogenetically informed analyses (Supporting Data). We followed the taxonomy used by HBW Alive (2015) with respect to subspecies, and did not add in the subspecies that are ranked as species in the Burleigh et al. (2015) phylogeny. For other taxa, we reconciled species names where species are given different names by HBW Alive (del Hoyo et al. 2015) and the Clements et al. (2015) Checklist of the Birds of the World, the latter of which was used for the phylogenetic analyses of Burleigh et al. (2015). Our plumage scores are available in Dryad (<https://doi.org/10.5061/dryad.76hdr7sx7>).

Alternate plumage scores.- We focused on dorsal plumage because it should be most associated with varying selection from predation risk by nest type. The dorsal plumage can be highly exposed in open cup nests, but it is generally less exposed in cavity or dome nests. However, our dorsal plumage scoring may not include the most important plumage regions for social signaling, as plumage signals involved in competition over nest sites may be concentrated in the head and chest area (Dale et al. 2015). We therefore analyzed an alternate set of plumage scores that focus on the head and ventral plumage (Dale et al. 2015; hereafter “Dale scores,” see App. B). Dale et al. (2015) scored how “male-like” female plumages are (hereafter, “plumage male-ness”) by examining the relative frequency of male and female scores in the near vicinity of the three-dimensional color space score for a given species. These authors obtained RGB color scores for six plumage patches (nape, crown, forehead, throat, upper breast, lower breast) by digitizing plates from HBW Alive (del Hoyo et al. 2015). The scores have naturally continuous distributions, which is desirable for GLM-type analyses. While these scores do not account for avian vision, the authors performed validation analyses using UV-Vis spectrographic measurements on museum specimens, showing that scores in RGB and spectrographic color space are strongly correlated for plumage male-ness.

Phylogeny and taxonomic reconciliation for comparative analysis.- For the purposes of phylogenetic comparative analyses, we used the topology of the supermatrix phylogenetic tree of Burleigh et al. (2015). We transformed the branch lengths to be ultrametric by performing a penalized likelihood analysis with r8s v. 1.71 (Sanderson 2003). The branch lengths were calibrated using twenty fossil calibrations from throughout the avian phylogeny (Baiser et al. 2018). The optimal smoothing parameter was estimated in r8s via a cross-validation analysis. For this analysis, the age of crown Psittacopasserae was fixed to 60 million years, midway between the minimum (53.5 my) and maximum (66.5 my) estimated ages (see also Baiser et al. 2018; McEntee et al. 2018). We determined the optimal smoothing parameter by checking how closely the unconstrained fossil age estimates matched their fossil-constrained age estimates, resulting in an optimal smoothing parameter of 3.2. We then trimmed the phylogenetic tree so that it included only the Passeriformes.

Because the taxonomies of our trait data set (del Hoyo et al. 2015) and phylogenetic tree (Burleigh et al. 2015) are different, performing phylogenetic comparative analyses required taxonomic reconciliation between the trait data set and the phylogenetic tree. We examined all cases where a taxon in the Burleigh et al. (2015) phylogenetic tree did not have a corresponding taxon with the exact same name in the data set using the HBW Alive (del Hoyo et al. 2015) taxonomy. We examined the taxonomic history for these taxa in the online database Avibase (<https://avibase.bsc-eoc.org/avibase.jsp?lang=EN>), and changed the taxon name to match the Burleigh et al. (2015) phylogenetic tree when an alternate name matched a taxon name from the HBW Alive taxonomy. Taxa treated as subspecies in the HBW Alive taxonomy and species in Burleigh et al. (2015) were not included in our analyses. The phylogenetic tree used for our analyses is available in Dryad (<https://doi.org/10.5061/dryad.76hdr7sx7>).

Conservation of nest type and testing Wallace's nest type transition bias hypothesis.- We used maximum likelihood models of discrete character evolution to examine the conservation of nest type and the patterns of nest type transitions across the passerine phylogeny. Among the 3,242 species with nesting behaviors characterized in HBW Alive (del Hoyo et al. 2015) and represented in the (Burleigh et al. 2015) phylogeny, eighteen were obligate interspecific brood parasites who do not incubate nestlings. We excluded these inter-specific brood parasites from further analyses. To make the analyses more computationally tractable, we also removed species with flexible nesting (102 species), leaving 3,122 species as tips on the phylogeny.

Wallace (1871) argued that the two primary nesting categories across birds are 'open' (open cup nests) and 'hidden' (including domed and cavity nests), and that transitions between open and hidden nests would be rare relative to transitions within the hidden category (between cavity and domed nests). We examined transition rate models for the three nest types by our categorizations to formally test Wallace's assertion. We examined relative support among four transition rate models: ER (equal rates among all transitions), SYM (symmetric transition rates into and out of nest type states, but allowing different rates for each pair of states), ARD (all rates different), and a model with one rate for transitions between 'hidden' nests (cavity and dome) and a second rate between hidden and open cup nests. The last of these models is one way to represent Wallace's hypothesis about these transitions (fast transition rate between hidden nest types, slow transitions between hidden and open cup nests). We performed these analyses using the ace function in the R package ape (Paradis et al. 2004), which required arbitrarily resolving the polytomies ($n = 46$ of 3,075 nodes), which we did by randomly resolving the relationships and replacing zero-length branches with extremely short branches (length = 10^{-5}).

Phylogenetic linear modeling.- To analyze the influence of behavioral traits and body mass on female plumage conspicuousness, we employed phylogenetic linear models, using likelihood calculations in the R package phylolm (v. 2.4.2; Ho and Ané 2014; Ho et al. 2016). Our regression approach uses a single-regime Ornstein-Uhlenbeck (OU) process to model residual error. The OU process can be represented by the stochastic equation

$$dy(t) = \alpha(\theta(t) - y(t))dt + \sigma dB(t), \quad (1)$$

where y is the trait of interest and t is time (Hansen, 1997). The second component of the right-hand side corresponds to Brownian motion of traits along the branches of the phylogeny, and the first component of the right-hand side corresponds to a constraining process in which values are attracted toward a trait optimum. In the constraining process, θ is the optimum, and α gives the strength of attraction towards the optimum. In a phylogenetic context, the α can also be interpreted as determining the strength of phylogenetic inertia: higher values of α correspond to lower strength of phylogenetic inertia. When $\alpha=0$, the process reduces to Brownian motion.

In this framework, trait covariance is determined by both the phylogeny and the trait evolution model. In our estimation of GLMs, the covariance parameters are jointly estimated with the regression coefficient parameters using maximum likelihood (Ho and Ané 2014). We implement these models by assigning a stationary distribution for the continuous trait value at the root, and

correspondingly the covariance matrix is defined as

$$V_{ij} = \frac{\sigma^2}{2\alpha} e^{-\alpha d_{ij}}$$

where d_{ij} is the phylogenetic distance between the taxa i and j (Ho and Ané 2014).

To analyze the plumage scores, we took the cube root of the natural logarithm of the conspicuousness scores to better meet the assumption that traits follow multivariate normal distributions. We then built phylogenetic linear models incorporating the three predictors of interest: nest type (categorical: open cup, domed, or cavity), gregariousness (binary: gregarious or nongregarious), and log body mass. The full model included all possible pairwise interactions in the model set, and reduced models were built under the constraint that all models were marginal. We examined relative model support by comparing AIC scores. We obtained confidence limits on parameter estimates for the model with best AIC support by performing 2,000 parametric bootstrap replicates (Ives and Garland 2010; Ho and Ané 2014).

Initial attempts to fit phylogenetic linear models with `phylolm` indicated that the $\hat{\alpha}$ (171.33), though high, may still be downwardly biased. We suspected the bias because the $\hat{\alpha}$ in parametric bootstrap analyses were lower than the value (171.33) used to simulate data for these bootstrap estimates ($\hat{\alpha}$ bootstrap mean = 3.437, $\hat{\alpha}$ bootstrap CI: 1.10 – 9.18; Cécile Ané pers. comm.). We subsequently visualized the distribution of the conspicuousness score across the phylogeny, and noted that it appeared to have little phylogenetic signal across much of the phylogenetic tree (Figure 1). Additionally, the product $\hat{\alpha} * \text{mean tree height}$ can give an indication of the degree of independence of trait evolution. When this product $\gg 1$, the trait values are close to independent at the tips (Cécile Ané, pers. comm.). In our analyses, $\hat{\alpha} * \text{mean tree height} = 9,747$, which may yet be an underestimate because of the bias we found in estimating α .

We used two additional approaches to account for the challenges we encountered in the phylogenetic, OU regression framework. First, because the conspicuousness score exhibited little phylogenetic signal, we fit linear models without correcting for phylogeny. Interestingly, these models are nearly identical to the results obtained when accounting for phylogeny in the OU framework (see Results, App. B). Secondly, we generated a binary score that categorized species as being either conspicuously monochromatic or not. The former category includes females that are conspicuously colored, while the latter includes females that are inconspicuous or relatively inconspicuous compared to males. This categorization conforms well to the distinctions made by Wallace (1868, 1871). Dichromatism was scored by human vision. Ambiguous cases were coded as such (dichromatic = 867 species, monochromatic = 1,332 species, ambiguously dichromatic = 243 species,). We performed sets of analyses where ambiguously dichromatic species were scored either as dichromatic or monochromatic. As there is a secondary mode in our conspicuousness scores at 2, we employed a minimum “conspicuous” score of 2 as a conspicuousness threshold in the primary analysis. We then performed analyses in which inconspicuous monochromatic species were either included or excluded (App. A, Figure A3). As Wallace (1871) focused on explaining the evolution of inconspicuous females in dichromatic species, and offered no explicit explanation for the origin of monochromatically inconspicuous species, the latter set of analyses may successfully represent his hypothesis as it relates to dichromatism.

Analyses of the “Dale scores” (Dale et al. 2015) in phylogenetically informed linear models paralleling the analyses with our own conspicuous scores achieves two further goals. First, because our scores had little phylogenetic signal, we were concerned that our scoring system may have resulted in elevated levels of noise. The Dale scores had more favorable statistical distributions for linear modeling. Secondly, as detailed above, the Dale scores cover breast and head plumage (often used in competitive signaling) instead of the head and dorsal plumage (which our scores focused on). Because one of our hypotheses involves signal evolution by

social selection via competition for nest sites, the analysis of the Dale scores additionally serves as a sensitivity analysis on plumage patch choices for analyses. We analyzed the Dale scores as an untransformed response variable in phylogenetic linear models otherwise similar to our analyses of our conspicuousness scores, and report the results in Appendix A.

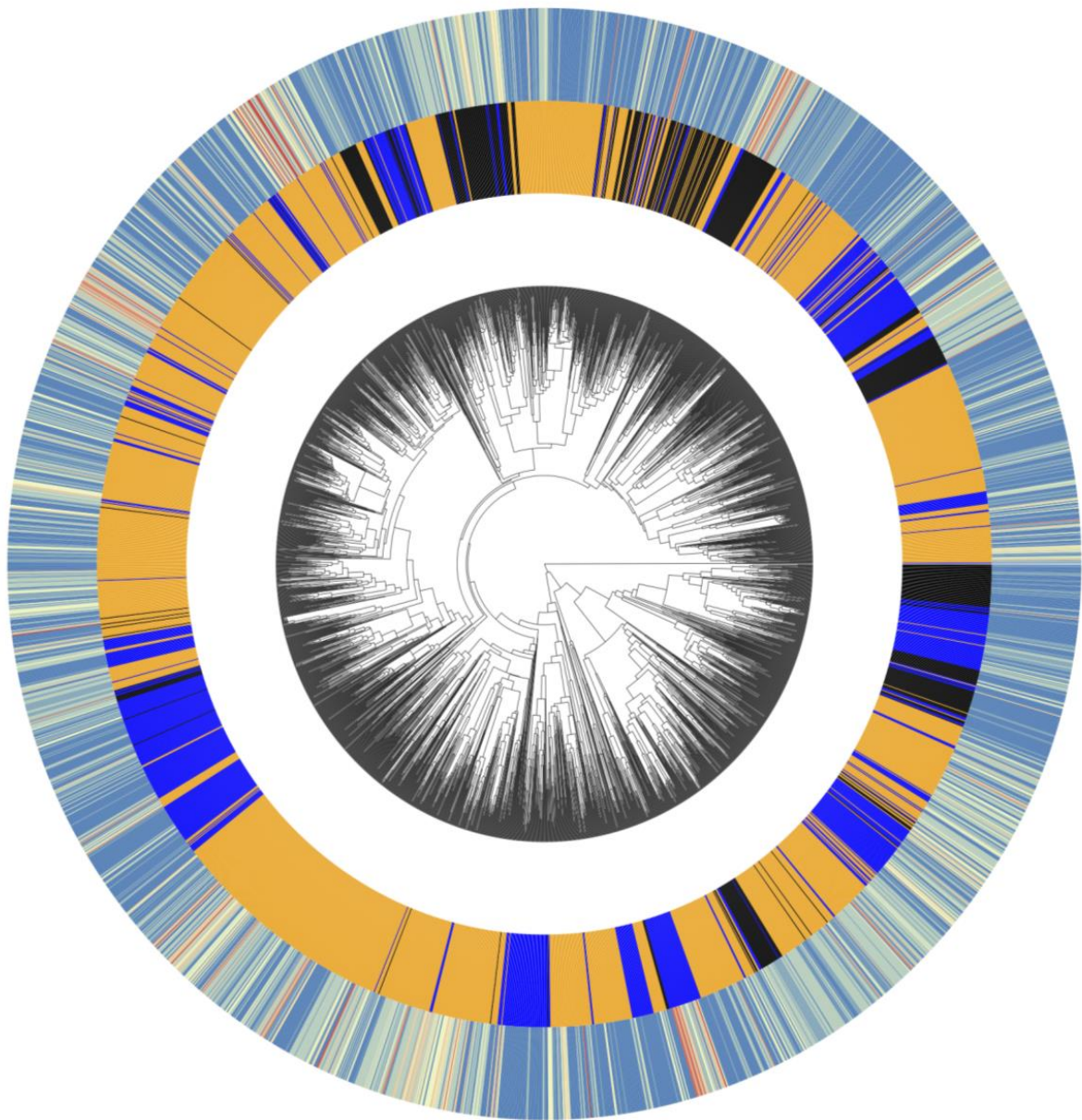


Figure 1. Species scores for female plumage conspicuousness (outer circle: most conspicuous = red, least conspicuous = blue) and nest type (inner circle: orange = cup, blue = dome, black = cavity) across a 3,122 taxon subtree of the Burleigh et al. (2015) maximum likelihood phylogeny. Note that plumage phenotypes vary greatly within clades dominated by a single nesting type, suggesting that plumage conspicuousness rapidly evolves independently of nest type transitions.

Table 1. AIC scores for evolutionary transition models in nesting type and gregariousness (see Methods).

	AIC	Δ AIC
<i>Nesting behavior</i>		
All rates different	2120.65	0
Equal rates	2203.72	83.07
Symmetric	2204.08	83.43
Symmetric hidden and open	2205.45	84.80
<i>Gregariousness</i>		
Rates not constrained	3423.14	0
Equal rates	3429.63	6.49

Results

Phylogenetic analysis of behavioral trait evolution: Nest type.- Cup, dome, and cavity nesting states are strongly conserved across most of the passerine phylogeny. Among the four transition rate models we fit by ML, the ARD (all-rates-different) model had the best AIC score (Table 1). In this model, transition rates were highest from the 'hidden' nest types (cavity and dome) to cup nests, contra Wallace's (1871) transition bias hypothesis that transition rates would be highest within the two hidden (cavity and domed) nest types, and not between hidden and open cup nest types. Transition rates are low (see Table 2; all transition rates ≤ 0.104 per million years while tree height = 56.9 million years), and nest types often are conserved across large clades (Figure 1). This result is consistent with Wallace's (1868, 1871) hypothesis that transitions among nest types are relatively rare, and indicates that nesting behavior could constrain female plumage states, instead of the reverse. Moreover, female plumage conspicuousness varies greatly among closely related species with the same nest type in many passerine clades (Figure 1).

General linear models of female plumage conspicuousness scores.- Model selection by AIC among candidate linear models favored the most complex model in both phylogenetically-controlled and standard analyses. These most complex models included nest type, gregariousness, and log body mass, plus all their pairwise interactions, as predictors (Tables 3 and 4). The results of phylogenetic and standard linear models are nearly identical (Table A1). We do not find universal support for our prediction that cavity-nesting females are more conspicuous than females from species with dome or cup nests (Figure 3). However, when we limit our consideration to gregarious species, cavity nesters have higher predicted female conspicuousness scores than cup and dome nesters (Figure 3a). Among gregarious species, the difference in predicted conspicuousness by nest type is greatest at low body mass. Among gregarious species at high body mass, cavity and dome nesters have similar predicted female conspicuousness, slightly higher than predicted female conspicuousness of cup nesters. In nongregarious species, these relationships are different. Nongregarious, cavity-nesting females have lower predicted conspicuousness values than cup- and dome-nesting females at intermediate and large body mass (Figures 2b, 3). At low body masses, dome nesters have slightly lower predicted conspicuousness than cavity nesters (Figure 2b).

An additional result from the phylogenetic linear model results is that female dorsal plumage conspicuousness generally increases with body mass (Figures 2, 3). However, there are exceptions depending on gregariousness: among nongregarious species, the conspicuousness of cavity and cup nesters has a slightly negative relationship with body mass. Further, across all nest type states the slope of conspicuousness with body mass is more positive in gregarious than in nongregarious species (Figure 2).

The model gives evidence for a difference in evolutionary trajectory for female conspicuousness

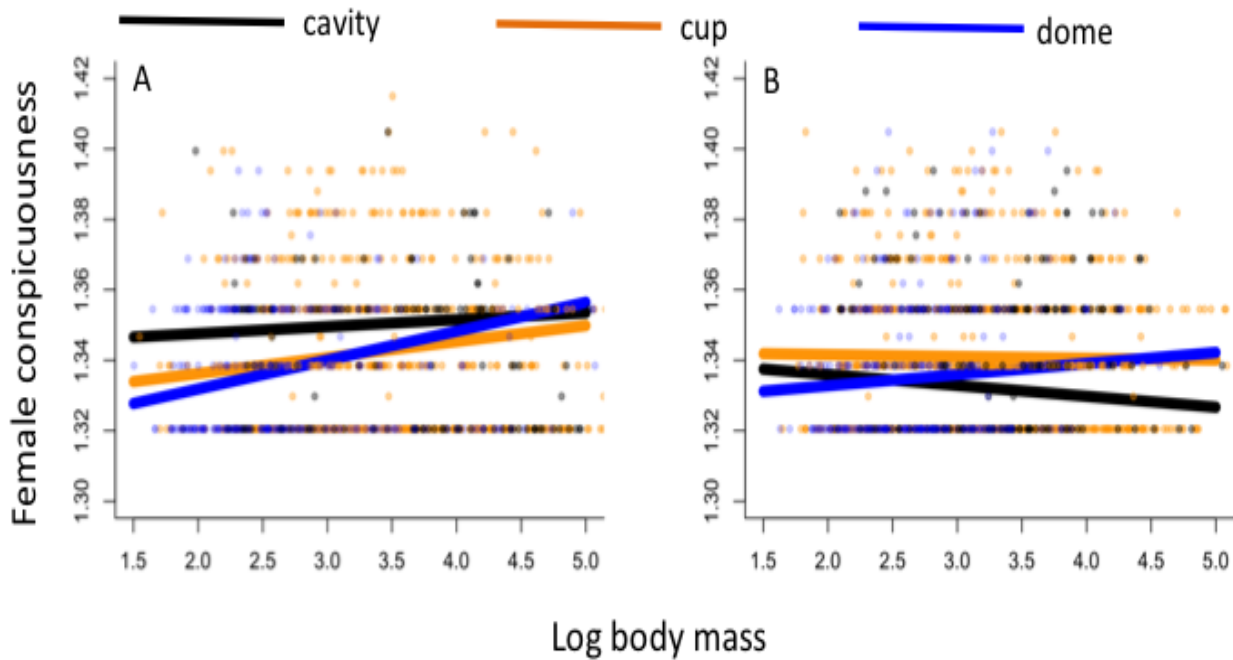


Figure 2. Prediction lines from phylogenetic linear models of female conspicuousness scores for *A*, gregarious species, and *B*, nongregarious species. Note that female conspicuousness is positively, if weakly, associated with log body mass for all nest types among gregarious species, and that this is not the case for nongregarious species. Figure 3 presents the same predictions, but split by nest type instead of gregariousness.

between gregarious and nongregarious cavity nesters (Figure 3). While the prediction lines for gregarious and nongregarious species over the body mass spectrum cross in cup and dome nesters (Figure 3a and 3c), those in cavity nesters do not (Figure 2b).

The predictors account for some of the variation in the female dorsal conspicuousness scores, but there is much variation left to be explained (Figures 2 and 3). While *a priori* one would expect from Wallace's (1871) hypothesis on nesting behavior and predation risk that cup nesters would be constrained to low conspicuousness values, there is substantial variation within cup nesters, including females with some of the highest conspicuousness scores (Figure 3). Thus, beyond the evidence we present that predicted conspicuousness values from our preferred models are not lower for cup nesters, the conspicuousness score variance among female cup nesters suggests that they are not highly constrained in plumage evolution.

Sensitivity analyses.- Standard GLMs performed in the absence of phylogenetic controls were nearly identical to the phylogenetically informed GLMs (Figure A1). Phylogenetically informed GLMs of the Dale scores yielded results that are similar to the analyses of our own conspicuousness scores (compare Figure 3 and Figure A2), suggesting our analyses are robust to major differences in scoring approach and substantial non-overlap in plumage patches scored. Finally, results from the full models in GLMs analyzing the probability of conspicuous monochromatism were consistent with our analyses of female plumage conspicuousness in that they provide some support that gregarious species are more likely to be both monochromatic and conspicuous than nongregarious species, among cavity-nesters (Figure A3). They do not provide similar support for a gregarious-nongregarious split in cup- and dome-nesting species, and they do

not provide any unambiguous evidence for Wallace's (1871) hypothesis.

Discussion

Predation risk, nest type, and female conspicuousness.— Our analyses did not find a general evolutionary correlation between 'hidden' nests and conspicuous plumage, or cup nests and inconspicuous plumage, for female passerines. Thus, we do not find support from the largest avian radiation for the component of Wallace's (1871) 'theory of birds' nests' with which Darwin (1874) agreed. A striking aspect of our results is that cup-nesting females vary greatly in plumage conspicuousness (based both on our conspicuousness scoring and the plumage male-ness spectrum of Dale et al. 2015, App. B), and are not generally restricted to having dull coloration. In conjunction with the lack of general evolutionary correlation between nest type and plumage conspicuousness, the great variation in conspicuousness among cup-nesting females suggests that predation risk as a consequence of visual exposure is not as different for open cup-nesting females compared to concealed-nesting females as Wallace (1871) surmised. That is, many cup-nesting females are conspicuously ornamented. What Wallace (1871) and Darwin (1874) interpreted as exceptional instances of female conspicuousness in cup-nesting species are instead commonplace.

How do cup-nesting females manage conspicuous ornamentation? Nest site selection and other behaviors that help to conceal the nest may be important in many cup-nesting species (Lima 2009). Cup nests are frequently built so that the female is visually concealed by nearby, or overhanging, vegetation or rocks (Martin 1993; Hansell 2000). Moreover, birds also may select nest sites with visual backgrounds that accentuate crypsis (Stevens et al. 2017). Behavioral accommodation like this may help to explain how the most conspicuous females, e.g. Flame-faced Tanagers *Tangara parzudakii*, maintain some crypsis while open cup-nesting despite their elaborate ornamentation. However, such species still must manage their conspicuousness in approaching and leaving the nest, and it is largely unclear how conspicuous cup-nesting species can prevent nest predation in these circumstances (Grzybowski et al. 2005; Lima 2009), especially in the tropics where nest predation rates are at their highest (Skutch 1985).

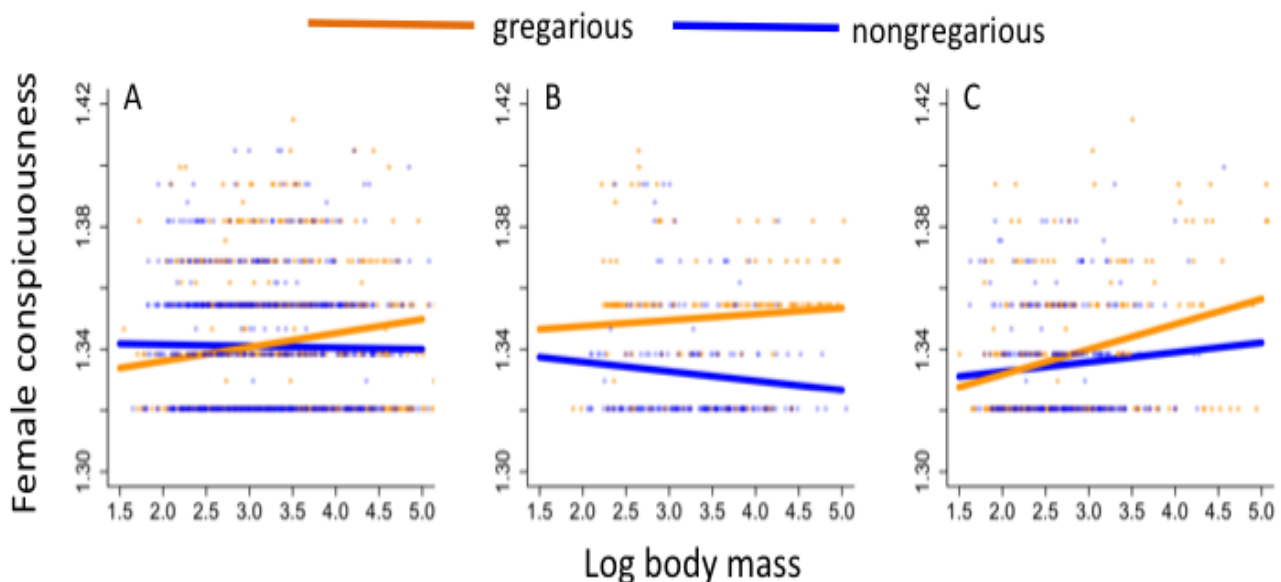


Figure 3. Prediction lines from phylogenetic linear models of female conspicuousness scores separated for *A*, cup-nesting species, *B*, cavity-nesting species, and *C*, dome-nesting species. Note the large variance in scores at all body masses for females of cup-nesting species, contra Wallace's hypothesis that these species should be tightly constrained to be inconspicuous (i.e. have low conspicuousness scores). Note also that gregarious versus non-gregarious cavity-nesting species show different relationships between body mass and conspicuousness, and that there is a paucity of cavity-nesting species at the low end of the passerine body mass spectrum. Figure 2 presents the same predictions, but split by gregariousness instead of nest type.

Table 2. Evolutionary transition rates between nesting states from the ARD (all-rates-different) model for nesting behavior states. Wallace hypothesized that such rates would be highest between ‘hidden’ nest types (between cavity and dome states, boldface), but the transition rate from cavity to cup nesting is an order of magnitude greater than the transition rates between ‘hidden’ nest types. Overall transition rates are low (see Figure 1).

Transition	Estimated rate (± SE)
cup -> cavity	0.001238 ± .0001945
dome -> cavity	0.001860 ± .0004542
cavity -> cup	0.010390 ± .0010950
dome -> cup	0.004109 ± .0005852
cavity -> dome	0.006875 ± .0009814
cup -> dome	0.003192 ± .0002882

Moreover, many females appear surprisingly conspicuous when incubating on unconcealed cup nests (e.g. Fork-tailed Drongo *Dicrurus adsimilis* and Many-colored Rush Tyrant *Tachuris rubrigastra*). Wallace (1871) attempted to account for some of these species, which he saw as notable exceptions to the more general pattern he proposed, by invoking other traits that might decrease predation risk, namely aggressive behavior toward potential predators (e.g. for *Dicrurus* drongos; see also Baker and Parker 1979) and large body size (e.g. for corvids like Common Ravens *Corvus corax*). We found some support for the latter hypothesis from our comparative analyses, as body mass was a positive predictor of conspicuous monomorphism in cup-nesting species (Figure A3) and of female dorsal conspicuousness in gregarious cup-nesting species (Figures 2, 3). Additionally, our re-analysis of the Dale scores found that body mass is a positive predictor of female plumage male-ness on the breast and head for all three nest types (Figure A2), suggesting a more general effect of lessened predation risk at larger body size. Beyond aggression and size, an additional strategy that may allow cup-nesting females to manage conspicuousness is nest placement that prevents efficient predation. For example, construction in flimsy vegetation over water, as in *T. rubrigastra* (del Hoyo et al. 2015), may in some instances prevent access by mammalian and larger avian predators that must stand or perch to access the nest.

Cavity nesting and social selection.- We hypothesized that social selection intensities should be greater for cavity-nesting species than dome- or cup-nesting species, and that female conspicuousness should correspondingly be greater in cavity-nesting females. Though we did not find general support for this hypothesis across all passerines, we present evidence that females of gregarious cavity-nesting species tend to be more conspicuous than females of gregarious cup- and dome-nesting species for all but the largest species. This result is bolstered by a corresponding result from our re-analysis of the Dale scores (App. B), indicating that the same result holds when considering female head and breast coloration instead of dorsal plumage. This evidence supports the social selection hypothesis more so than Wallace’s hypothesis, as the predicted conspicuousness scores of cup- and dome-nesting species are largely similar, which they should not be under Wallace’s hypothesis. The greater conspicuousness of gregarious, cavity-nesting females may be interpreted as providing limited support for the social selection hypothesis, and complements previous work suggesting that visual signals are especially important for mediating nest site competition in gregarious species (Heinsohn et al. 2005). However, the divergence in predicted conspicuousness of gregarious versus nongregarious cavity-nesting species in our analyses is also striking, and must be explained if our results are to be interpreted as evidence for the social selection hypothesis. Why is there a large conspicuousness difference associated with gregariousness in cavity-nesting species, while this difference is not as evident in cup- and dome-nesting species (Figures 4, A2)? As in the social selection hypothesis, an explanation may lie in the strong nest site competition associated with cavity-nesting. In this

Table 3. Model comparison for candidate phylogenetic linear models of female dorsal plumage conspicuousness, with nest type, gregariousness, log body mass, and all pairwise interactions included among predictors.

Predictors	Interactions	AIC	Δ AIC
nest + gregariousness + log mass	all pairwise	-12033.51	0
nest + gregariousness + log mass	nest*gregariousness + gregariousness*log mass	-12026.25	7.26
nest + gregariousness + log mass	nest*gregariousness + nest*log mass	-12012.50	21.01
nest + gregariousness + log mass	nest*gregariousness	-12004.52	28.99
nest + gregariousness + log mass	nest*log mass + gregariousness*log mass	-11989.06	44.45
nest + gregariousness + log mass	gregariousness*log mass	-11983.04	50.47
nest + gregariousness	nest*gregariousness	-11981.61	51.90
gregariousness + log mass	gregariousness*log mass	-11973.67	59.84
nest + gregariousness + log mass	nest*log mass	-11967.02	66.49
nest + gregariousness + log mass	none	-11960.53	72.98
gregariousness + log mass	none	-11950.90	82.61
nest + log mass	nest*log mass	-11945.54	87.97
nest + log mass	none	-11940.19	93.32
nest + gregariousness	none	-11939.57	93.94
logmass	none	-11931.83	101.68
gregariousness	none	-11916.97	116.54
nest	none	-11912.80	120.71
none (intercept)	none	-11890.81	142.70

study, we have thus far considered predation risk as the sole selective force countering social selection for increased conspicuousness. However, exposure to competitors may also counter social selection, and cause decreased conspicuousness (Butcher and Rohwer 1989). In this case, crypsis may benefit some females that possess a valuable resource, the nest site, that is likely difficult or expensive to defend. Thus, there may be two “strategies” adopted by cavity-nesting females with respect to plumage signals: employ conspicuous plumage signals in advertising a willingness to defend valuable nest sites, or decrease exposure to competition for valuable nest sites by limiting nest site discovery by competitors. We suggest that for cavity-nesting species, the social environment may tip the balance in this tradeoff towards one strategy or other. In gregarious cavity-nesting species, the benefits of visual conspicuousness to conspecifics may more frequently outweigh the costs of exposure to competition. In nongregarious cavity-nesting species, the benefits of visual conspicuousness to conspecifics may be more limited, and consequently the drawbacks of conspicuousness may outweigh these benefits. We suggest that future research on these subjects may more strongly consider the costs of conspicuousness in terms of exposure to competition, which seems to have been little explored in birds. Considering the exposure to competition also prompts us to recognize that conspicuous females must manage exposure not only to predators (as discussed above) but also to competitors.

Nest type evolution.- Despite our failure to find support for a correlation between nest type and conspicuousness, we found strong support for Wallace’s hypothesis that nest types are conserved over evolutionary time (Figure 1, Table 2). This finding, in conjunction with the evidence that plumage conspicuousness varies greatly among closely related species with the

Table 4. Coefficient estimates for the best supported phylogenetically informed general linear model of female plumage conspicuousness scores across 2,442 passerine species. These values assume an Ornstein-Uhlenbeck model for evolution, with $\sigma^2 = 0.144$ and $\alpha = 171.3$. Confidence intervals for coefficient estimates were calculated from 2000 parametric bootstrap replicates. Because there are interactions, individual coefficient estimates should not be interpreted in isolation: interpretation should instead be made from model predictions in Figures 2 and 3.

Coefficients	Estimate	SE	t	lower CI	upper CI	p
Intercept	13.421	5.37E-03	2.50E+02	1.332	1.353	<2.2e-16
Cup nest	5.19E-04	5.41E-03	9.58E-02	-9.99E-03	1.08E-02	9.24E-01
Dome nest	-1.56E-02	6.16E-03	-2.534	-2.69E-02	-3.80E-03	1.14E-02
Gregarious	1.51E-03	4.15E-03	3.65E-01	-6.59E-03	9.30E-03	7.15E-01
Log body mass	-3.09E-03	1.58E-03	-1.95E+00	-6.07E-03	-2.00E-04	5.11E-02
Cup x gregarious	-1.70E-02	2.43E-03	-6.99E+00	-2.09E-02	-1.32E-02	3.61E-12
Dome x gregarious	-1.26E-02	2.88E-03	-4.38E+00	-1.81E-02	-7.30E-03	1.27E-05
Cup x log body mass	2.57E-03	1.58E-03	1.62E+00	-3.29E-04	5.70E-03	1.05E-01
Dome x log body mass	6.23E-03	1.92E-03	3.24E+00	2.54E-03	9.80E-03	1.22E-03
Gregarious x log body mass	5.06E-03	1.05E-03	4.81E+00	3.49E-03	6.70E-03	1.60E-06

same nest type (Figure 1) confirms Wallace's (1871) view, and opposes Darwin's (1874), that nest type states could serve as evolutionary regimes for conspicuousness. Hence, we document the plausibility of Wallace's hypothesis in terms of macroevolutionary lability of traits, and provide evidence that conserved nest types help to predict female plumage conspicuousness, even if not in the way that Wallace had envisioned. An intriguing aspect of this evolutionary relationship is that nest type is a behavioral trait, and the relatively infrequent transitions in nest type alter the selective regimes, in combination with other traits, for plumage conspicuousness. Similarly, our score for gregariousness, also a behavioral trait, had strong phylogenetic signal (Figure A2) and helped to predict female plumage conspicuousness. While behavior has frequently been understood as labile relative to morphological traits (Blomberg et al. 2003), and therefore more likely to respond to, rather than set, selective regimes, our analyses suggest that some behavioral traits are sufficiently conserved at macroevolutionary scales to set macroevolutionary selective regimes for the evolution of morphological traits (Wcislo 1989).

Conclusions

We found no support for the nest type – conspicuousness correlation that Wallace (1868, 1871) proposed, and that he and Darwin (1874) attempted to explain. A strength of our analyses is that they cover a broad scope of avian diversity – the phylogenetic linear models included 2,442 species. If the proposed correlation existed to the broad degree that Wallace suggested, we should have found evidence for it in the species-rich Passeriformes, which shows great diversity and rapid evolutionary change in female plumage, and numerous transitions between nest types. The results of this study indicate that it is unlikely that nest type evolution, by itself, generally has strong effects on female plumage conspicuousness via predation risk. This does not mean that predation risk cannot have strong effects on female plumage evolution, but that nest type itself does not primarily determine the evolutionary impact of predation risk on plumage.

While we focused on passerines, Wallace (1871) and Darwin (1874) both considered a number of species outside the passerines in assessing the evidence for evolutionary correlation between nest type and plumage conspicuousness. They were persuaded of the correlation in part because of the many conspicuously plumaged cavity-nesting females in the Trogoniformes (trogons), Coraciiformes (e.g. bee-eaters, kingfishers, todies, and motmots), Piciformes (e.g. barbets, woodpeckers, and jacamars), and Bucerotiformes (hornbills, hoopoes, and wood-hoopoes). Phylogenetic studies have revealed that all these taxa are members of a single clade (Hackett et al. 2008; Jarvis et al. 2014; Prum et al. 2015), and the ubiquity of cavity-nesting across this clade suggests a single origin of cavity-nesting. Further, sexual dichromatism is extremely limited in

this clade, suggesting strong conservatism of near-monochromatism. Thus, what appeared to Wallace and Darwin as evidence for a correlation from a number of distantly related taxa appears instead to be very limited evidence because of shared phylogenetic history. Darwin (1874) seems to have had these groups, together with the distantly related parrots (Hackett et al. 2008; Jarvis et al. 2014; Prum et al. 2015), in mind when he constructed his argument that the limits of dichromatism are evolutionarily conserved. As Darwin (1874) hypothesized that both male-female correlations in plumage development and nest type might be established early in clade history and then conserved, these non-passerine groups may provide some evidence for his hypothesis.

Acknowledgements

Cecile Ané provided critical insight on phylogenetic general linear models and technical assistance with phylolm. We thank Renee Duckworth, Jordan Price, Daniel Baldassare, Walter Koenig, Eric Walters, Janis Dickinson, Rebecca Kimball and the Scott Robinson lab for discussion, and Lauryn Benedict for suggestions that improved the manuscript. Lorena Endara translated our abstract and keywords.

Declaration of interest and Authors' contributions

All authors declare that there are no conflicts of interest. JPM and JGB designed the study. JPM and ZZ compiled data from the literature. JPM performed statistical analyses with input from JGB. JPM and JGB wrote the manuscript, and ZZ contributed to revisions.

References

- Amundsen T. 2000. Why are female birds ornamented? *Trends in Ecology & Evolution* 15: 149-155.
- Amundsen T, Pärn H. 2006. Female coloration: review of functional and nonfunctional hypotheses. *Bird Coloration* 2: 280-345.
- Armenta JK, Dunn PO, Whittingham LA. 2008. Quantifying avian sexual dichromatism: a comparison of methods. *The Journal of Experimental Biology* 211: 2423-2430.
- Baiser B, Valle D, Zelazny Z, and Burleigh JG. 2018. Non-random patterns of invasion and extinction reduce phylogenetic diversity in island bird assemblages. *Ecography* 41: 361-374.
- Baker RR, Parker G. 1979. The evolution of bird coloration. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 287: 63-130.
- Blomberg SP, Garland T, Ives AR. 2003. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* 57: 717-745.
- Burleigh JG, Kimball RT, Braun EL. 2015. Building the avian tree of life using a large-scale, sparse supermatrix. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 84: 53-63.
- Butcher GS, Rohwer S. 1989. The evolution of conspicuous and distinctive coloration for communication in birds. *Current Ornithology* 6: 51-108.
- Clements JF, T. S. Schulenberg TS, Iliff MJ, Sullivan BL, Wood CL, Roberson D. 2011. The Clements checklist of birds of the world, Version 6.6. .
- Cockle KL, Martin K, Drever MC. 2010. Supply of tree-holes limits nest density of cavity-nesting birds in primary and logged subtropical Atlantic forest. *Biological Conservation* 143: 2851-2857.
- Cockle K, Martin K, Wiebe K. 2008. Availability of cavities for nesting birds in the Atlantic forest, Argentina. *Ornitologia Neotropical* 19: 269-278.
- Collias NE. 1997. On the origin and evolution of nest building by passerine birds. *Condor* 99: 253-270.

- Collias NE, Collias EC. 1984. Nest building and bird behavior. Princeton University Press.
- Dale J, Dey CJ, Delhey K, Kempenaers B, Valcu M. 2015. The effects of life history and sexual selection on male and female plumage colouration. *Nature* 527: 367-370.
- Darwin C. 1874. The descent of man. Prometheus Books, New York, ed 2:1874.
- del Hoyo J, Elliott A, Christie DA. 2003-2011. Handbook of the Birds of the World Vols 8 – 16. Lynx Edicions, Barcelona.
- del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J, Christie DA, de Juana E. 2015. Handbook of the Birds of the World Alive.
- Drury JP, Burroughs N. 2016. Nest shape explains variation in sexual dichromatism in New World blackbirds. *Journal of Avian Biology* 47: 312-320.
- Dumbacher JP, Fleischer RC. 2001. Phylogenetic evidence for colour pattern convergence in toxic pitohuis: Mullerian mimicry in birds? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268: 1971-1976.
- Dunning JB. 2008. Body masses of birds of the world. Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida.
- Dunning JB. 2015. <https://ag.purdue.edu/fnr/Documents/WeightBookUpdate.pdf>.
- Gomes ACR, Sorenson MD, Cardoso GC. 2016. Speciation is associated with changing ornamentation rather than stronger sexual selection. *Evolution* 70: 2823-2838.
- Grzybowski JA, Pease CM, Brittingham M. 2005. Renesting determines seasonal fecundity in songbirds: What do we know? What should we assume? *The Auk* 122: 280-291.
- Hackett SJ, Kimball RT, Reddy S, Bowie RCK, Braun EL, Braun MJ, Chojnowski JL, Cox WA, Han K, Harshman J, et al. 2008. A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320: 1763-1768.
- Hansell M. 2000. Bird nests and construction behaviour. Cambridge University Press.
- Hansen TF. 1997. Stabilizing selection and the comparative analysis of adaptation. *Evolution* 51: 1341-1351.
- Heinsohn R, Legge S, Endler JA. 2005. Extreme reversed sexual dichromatism in a bird without sex role reversal. *Science* 309: 617-619.
- Ho LST, C. Ané, Lachlan R, Tarpinian K, R. Feldman R, and Ho, Maintainer Lam Si Tung. 2016. Package 'phylolm'.
- Ho L, Ané C. 2014. A linear-time algorithm for Gaussian and non-Gaussian trait evolution models. *Systematic Biology* 63: 397-408.
- Hofmann CM, Cronin TW, Omland KE. 2008. Evolution of sexual dichromatism. 1. Convergent losses of elaborate female coloration in New World orioles (*Icterus* spp.). *The Auk* 125: 778-789.
- Ives AR, Garland T. 2010. Phylogenetic logistic regression for binary dependent variables. *Systematic Biology* 59:9-26.
- Jacobs GH. 2009. Evolution of colour vision in mammals. *Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 2957-2967.

- Jarvis ED, Mirarab S, Aberer AJ, Li B, Houde P, Li C, Ho SY, Faircloth BC, Nabholz B, Howard JT, et al. 2014. Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science* 346: 1320-1331.
- Jennions MD, Moller AP, Petrie M. 2001. Sexually selected traits and adult survival: a meta-analysis. *Quarterly Review of Biology* 76: 3-36.
- Johnson AE, Price J, Pruett-Jones S. 2013. Different modes of evolution in males and females generate dichromatism in fairy-wrens (Maluridae). *Ecology and Evolution* 3: 3030-3046.
- Lack D. 1954. *The natural regulation of animal numbers*. Clarendon Press, Oxford.
- Lima SL. 1998. Stress and decision making under the risk of predation: recent developments from behavioral, reproductive, and ecological perspectives. *Advances in the Study of Behavior* 27:215-290.
- Lima SL. 2009. Predators and the breeding bird: behavioral and reproductive flexibility under the risk of predation. *Biological Reviews* 84: 485-513.
- Lima SL, Dill LM. 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology* 68: 619-640.
- Lyon BE, Montgomerie R. 2012. Sexual selection is a form of social selection. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 367: 2266-2273.
- Martin TE. 1993. Nest predation and nest sites: New perspectives on old patterns. *Bioscience* 43: 523-532.
- Martin TE. 1995. Avian life history evolution in relation to nest sites, nest predation, and food. *Ecological Monographs* 65: 101-127.
- Martin TE, Li P. 1992. Life history traits of open- vs. cavity-nesting birds. *Ecology* 73: 579-592.
- McEntee JP, Tobias JA, Sheard C, Burleigh JG. 2018. Tempo and timing of ecological trait divergence in bird speciation. *Nature Ecology and Evolution* 2: 1120-1127.
- Newton I. 1994. The role of nest sites in limiting the numbers of hole-nesting birds: a review. *Biological Conservation* 70: 265-276.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K. 2004. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289-290.
- Price T, Birch GL. 1996. Repeated evolution of sexual color dimorphism in passerine birds. *The Auk* 113: 842-848.
- Price JJ, Eaton MD. 2014. Reconstructing the evolution of sexual dichromatism: current color diversity does not reflect past rates of male and female change. *Evolution* 68: 2026-2037.
- Prum RO, Berv JS, Dornburg A, Field DJ, Townsend JP, Lemmon EM, Lemmon AR. 2015. A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature* 526: 569-573.
- Sanderson MJ. 2003. R8s: Inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. *Bioinformatics* 19: 301-302.
- Seddon N, Tobias JA, Eaton M, Ödeen A. 2010. Human vision can provide a valid proxy for avian

- perception of sexual dichromatism. *The Auk* 127: 283-292.
- Short LL. 1979. Burdens of the picid hole-excavating habit. *The Wilson Bulletin* 91: 16-28.
- Sih A, Bell A, Johnson JC. 2004. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 372-378.
- Skutch AF. 1985. Clutch size, nesting success, and predation on nests of Neotropical birds, reviewed. *Ornithological Monographs* 36: 575-594.
- Soler J, Moreno J. 2012. Evolution of sexual dichromatism in relation to nesting habits in European passerines: a test of Wallace's hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology* 25: 1614-1622.
- Stevens M, Troscianko J, Wilson-Aggarwal JK, Spottiswoode CN. 2017. Improvement of individual camouflage through background choice in ground-nesting birds. *Nature Ecology and Evolution* 1: 1325-1333.
- Surridge AK, Osorio D, Mundy NI. 2003. Evolution and selection of trichromatic vision in primates. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 198-205.
- Tobias JA, Montgomerie R, Lyon BE. 2012. The evolution of female ornaments and weaponry: social selection, sexual selection and ecological competition. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 367: 2274-2293.
- von Haartman L. 1971. Population dynamics. *Avian Biology* 1: 391-459.
- Wallace AR. 1868. A theory of birds' nests: showing the relation of certain sexual differences of colour in birds to their mode of nidification. *Journal of Travel and Natural History* 1: 73-89.
- Wallace AR. 1871. Contributions to the theory of natural selection: a series of essays. Macmillan.
- Wcislo WT. 1989. Behavioral environments and evolutionary change. *Annual Review of Ecology and Systematics* 20: 137-169.
- West-Eberhard MJ. 1979. Sexual Selection, Social Competition, and Evolution. *Proceedings of the American Philosophical Society* 123: 222-234.
- West-Eberhard MJ. 1983. Sexual Selection, Social Competition, and Speciation. *Quarterly Review of Biology* 58: 155-183.
- West-Eberhard MJ. 2014. Darwin's forgotten idea: The social essence of sexual selection. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 46: 501-508.
- Zuk M, Kolluru GR. 1998. Exploitation of sexual signals by predators and parasitoids. *Quarterly Review of Biology* 73: 415-438.

NOTA CIENTÍFICA

Vitrificación de óvulos para preservar la fertilidad en una paciente con Teratoma Ovárico Bilateral

Vitrification of ovules to preserve fertility in a patient with a Bilateral Ovarian Teratoma

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas
Volumen 42. No. 2, Nov 2021

Adán Quisaguano^{1,2}, José Arias^{1,2}, Augusta Cordova¹, Mauro Montenegro³, Denise Medina^{1,4}, Roberlis Aguirre¹, William Guamán^{1,5*}.

¹Instituto Quiteño de Infertilidad IQUI. Quito, Ecuador.

²Hospital Gineco-Obstétrico de Nueva Aurora "Luz Elena Arismendi". Quito, Ecuador.

³Hospital Quito Sur del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social IESS. Quito, Ecuador.

⁴Hospital San Francisco del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social IESS. Quito, Ecuador.

⁵Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador.

*Autor de correspondencia:
williguaman@gmail.com

Recibido 22-05-2021
Aceptado 26-10-2021

DOI: 10.26807/remcb.v42i2.897

e-ISSN 2477-9148

© 2021. Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una licencia CC BY-NC 4.0

Como citar este artículo:
Quisaguano A, Arias J, Córdova A, Montenegro M, Medina D, Aguirre R, Guamán W. 2021. Vitrificación de óvulos para preservar la fertilidad en una paciente con Teratoma Ovárico Bilateral. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas 42(2): 163-172.
doi: 10.26807/remcb.v42i2.897

Resumen: El objetivo de este trabajo es dar a conocer las ventajas de la técnica de vitrificación de óvulos en reproducción humana para preservar la fertilidad futura de la mujer, en pacientes con diagnóstico de tumores del ovario tales como teratomas o endometriomas y en pacientes que van a someterse a tratamientos de quimio o radioterapia, garantizándose que los óvulos conservarán las mismas características que tenían al momento en que fueron vitrificados, independientemente de la edad de la mujer, evitando así los efectos biológicos de daño molecular ocasionados por la edad o por tratamientos médicos.

Una paciente de 28 años, de sexo femenino, con antecedente de ovariectomía y salpingiectomía derechas por teratoma ovárico confirmados mediante estudio histopatológico, misma que presenta otro teratoma localizado en ovario izquierdo. Dado que, al momento, no desea tener hijos, decide someterse a tratamiento de estimulación ovárica y maduración de óvulos controladas para preservar su fertilidad futura, obteniéndose 4 óvulos, 3 en metafase II y 1 en metafase I, procediéndose mediante el método de Cryotech® a la vitrificación de los óvulos en metafase II.

El manejo de patologías tumorales ováricas es multidisciplinario; los diferentes especialistas deberán analizar la especificidad del caso para sugerir la vitrificación de óvulos a mujeres jóvenes que desean preservar su fertilidad, pudiendo estos ser utilizados a mediano plazo cuando la situación personal y/o clínica de la paciente sean favorables para la gestación.

La vitrificación por el método Cryotech garantiza que no se formen cristales de hielo al interior de los óvulos, protegiéndolos de eventuales daños de sus organelos y manteniéndolos en nitrógeno líquido a - 196 °C. Con la desvitrificación posterior, se recuperan el 97% de estos en óptimas condiciones, lográndose mediante fertilización in vitro tasas de fecundación, implantación y embarazo similares a las obtenidas con óvulos frescos,

Palabras claves: teratoma ovárico, vitrificación de óvulos, estimulación ovárica, agentes crioprotectores.

Abstract: The objective of this work is to present the advantages of the ovule vitrification technique in human reproduction to preserve the future fertility of women, in patients diagnosed with ovarian tumors, such as teratomas or endometriomas, and in patients preparing to undergo chemo or radiotherapy treatments. The aim is to ensure that eggs will retain the characteristics they had at the time they were vitrified, regardless of the woman's age, thus avoiding the biological effects of molecular damage caused by age or medical treatments.

The patient is a 28-year-old female patient with a history of right oophorectomy and salpingectomy due to ovarian teratomam confirmed by histopathological study, who also presented another teratoma located in the left ovary. Since she does currently not want to have children, she decides to undergo ovarian stimulation treatment and controlled egg maturation to preserve her future fertility, obtaining 4 eggs, 3 in metaphase II and 1 in metaphase I; using the Cryotech® method to vitrify the ovules in metaphase II. The management of ovarian tumor pathologies is multidisciplinary: different specialists should analyze the specificities of the

case to suggest the vitrification of ovules to young women who wish to preserve their fertility. These can be used in the medium term when the patient's personal and/or clinical situation is favorable for pregnancy. Vitrification using the Cryotech method ensures that ice crystals do not form inside the ovules, protecting them from eventual damage to organelles and keeping them in liquid nitrogen at -196°C . With subsequent devitrification, 97% of the eggs are recovered in optimal conditions, achieving fertilization, implantation and pregnancy rates similar to those obtained with fresh eggs.

Key words: ovarian teratoma, ovule vitrification, ovarian stimulation, cryoprotective agents.

Introducción

La palabra teratoma se deriva del vocablo griego *teras*, que significa monstruo. El teratoma o «quiste dermoide» es una de las neoplasias benignas más frecuentes del ovario. Las primeras descripciones de esta entidad se remontan al año 1659, cuando Johannes Scultetus describió el primer caso durante la autopsia efectuada a una joven fallecida por un tumor ovárico complicado (Pantoja et al. 1975). Desde la perspectiva anatomopatológica, este tumor se origina en las células germinales del ovario y contiene principalmente tejido maduro ectodérmico (piel, pelo, dientes, tejido óseo o cartílago); puede presentar tejido originado en las tres líneas germinales, siendo lo más frecuente tejidos que procedan del ectodermo. Afecta, principalmente, a mujeres en edad reproductiva y representa entre el 44% al 62% de todos los tumores ováricos diagnosticados en mujeres menores de 40 años y constituye el 15% de los tumores primarios del ovario. Habitualmente, se presenta en un ovario; el compromiso bilateral alcanza entre el 10% al 15% de los casos, siendo benignos alrededor del 95% al 98%. Los teratomas pueden estar presentes al nacer y crecen durante los años de vida reproductiva de la mujer (20 a 40 años) (Park et al. 2008; Ki et al. 2016; Shin et al. 2016). Frecuentemente, son pequeños y no producen síntomas; sin embargo, cuando crecen pueden causar dolor. La transformación maligna de un teratoma maduro de ovario ocurre en el 1% al 2% de los casos, predominando el tipo carcinoma escamoso (75% al 80% de casos), seguido de adenocarcinomas originados en diversos epitelios (6% al 8%) siendo poco común el hallazgo del adenocarcinoma de tipo mucinoso o seroso borderline (Romero et al. 2007; Bal et al. 2007; Guerra et al. 2008; Mateo et al. 2020; Cabezas et al. 2017).

Las características ecográficas del teratoma incluyen la estructura compleja, con ecogenicidad sobre todo líquida y menos sólida, con un contorno liso; la ecografía endovaginal con doppler tiene una sensibilidad y especificidad del 97% y es el estudio diagnóstico estándar de oro para teratomas bien diferenciados y permite distinguir una tumoración ovárica benigna de una maligna (Emoto et al. 2000); especialmente, en los casos que presentan sombras acústicas por la presencia de pelos, dientes o tejido óseo. En caso de presentarse dudas respecto al diagnóstico, la tomografía computarizada es un excelente estudio de imagen con sensibilidad y especificidad cercanas al 100%, ya que permite identificar tejido graso. La resonancia magnética nuclear posee alta sensibilidad y especificidad diagnóstica (Sahin et al. 2017; Nader 2014; American College of Obstetricians and Gynecologists 2016), al detectar lesiones con un diámetro inferior a 0,5 cm, especialmente, las formadas por tejido óseo, cartílago, etc. (Peters et al, 1962).

Clínicamente, ante un dolor localizado de inicio abrupto a nivel de fosa iliaca del ovario afectado, debe sospecharse primero una posible torsión ovárica provocada por el teratoma que conlleva un riesgo del 15%. El riesgo de torsión depende del tamaño tumoral; así, a mayor tamaño, mayor riesgo. Se acepta que los teratomas tienen una mayor tendencia a la torsión, comparados con otros tumores anexiales. Eso se atribuye a su contenido graso que los hace más ligeros y, por lo tanto, más proclives a la torsión.

A la fecha, no existe consenso respecto al manejo del teratoma ovárico, sin embargo, el tratamiento es la extirpación quirúrgica de todo el teratoma independientemente del tamaño. Otra alternativa es reseca únicamente aquellos tumores mayores a 5 cm, considerando el riesgo de torsión durante el proceso de estimulación ovárica en tratamientos de reproducción o durante un futuro embarazo. Esta última alternativa quirúrgica se acepta considerando el lento

crecimiento de los teratomas, la mejor vía de abordaje es la laparoscópica. En general, esta vía se limita a tumores menores a 10 cm de diámetro (Templeman et al. 2000), considerando el riesgo latente de una peritonitis química por vaciamiento accidental del contenido tumoral (grasa, piel, pelos, dientes, material sebáceo, sales biliares, tejido glial, etc.) hacia la cavidad peritoneal; igualmente, pueden romperse espontáneamente provocando, además, hemorragia y choque. El vertido crónico del contenido del tumor causa inflamación granulomatosa crónica (Maiti et al. 2008; Sebastì et al. 2004; Savasi et al. 2009). Se advierte también que luego de la estimulación ovárica, al momento de la aspiración de óvulos guiada por ecografía endovaginal, existe el riesgo de una punción accidental del teratoma ocasionándose una peritonitis química o una hemorragia.

En pacientes con tumores ováricos que van a requerir tratamiento quirúrgico actual o que presenten enfermedades que podrían llevar a la ausencia de producción de óvulos en el futuro como en los teratomas ováricos, en endometriosis severa o que van a ser sometidas a tratamientos oncológicos de quimioterapia en general o radioterapia de la región pélvica (Pesce et al. 2017; Batiza et al. 2020), la vitrificación de óvulos, que preserva la fertilidad, debe ser tomada muy en cuenta y de manera prioritaria, ya que les brinda la posibilidad de tener un hijo con su herencia genética y facilita a la paciente programar una gestación en el tiempo, retrasando el embarazo al momento en que supere la condición clínica que le motivó a criopreservar sus gametos.

En la vitrificación de óvulos la edad de la mujer juega un papel preponderante; la influencia negativa de la edad de la fémina se expresa en: a) el descenso de la cantidad de óvulos producidos (disminución de la reserva ovárica) y b) en la calidad del óvulo que implica aumento de la incidencia de alteraciones cromosómicas y de alteraciones meióticas que producen incremento de aneuploidias (presencia de uno más cromosomas supernumerarios o ausencia de cromosomas), situación que conlleva un desequilibrio en la dotación cromosómica y es la causa más frecuente de abortos asociados a la edad (Coello 2019).

Rall y Fahy (1985) enunciaron las bases teóricas de la vitrificación. El procedimiento recibe su nombre por el fenómeno físico que ocurre cuando una solución con elevada concentración de solutos se somete a bajas temperaturas, empleando altísimas velocidades de enfriamiento. La principal ventaja de esta técnica es la solidificación sin la formación de cristales de hielo. Los óvulos se tratan con agentes crioprotectores (ACPs) y se sumergen directamente en nitrógeno líquido a - 196 oC. La vitrificación que se realiza actualmente usa el método Cryotech® (Reprolife) que consiste en una lengüeta de polipropileno que permite la carga de los óvulos en volúmenes de aproximadamente 0,1 µL; en términos prácticos, una fina capa de medio de vitrificación cubre las muestras que posteriormente serán sumergidas en nitrógeno líquido.

Como dato estadístico, según el Registro Sociedad Española de Fertilidad SEF, en el año 2016, nacieron 2699 niños procedentes de un óvulo previamente vitrificado confirmando la eficacia del procedimiento de criopreservación del gameto femenino (Coello 2019).

El objetivo de este trabajo es dar a conocer la nueva técnica de vitrificación de óvulos en reproducción humana para preservar la fertilidad futura de la mujer, en pacientes con diagnóstico de tumores del ovario tales como teratomas o endometriomas y en pacientes que van a someterse a tratamientos de quimio o radioterapia, garantizándose que los óvulos conservarán las mismas características que tenían al momento en que fueron vitrificados, independientemente de la edad de la mujer, evitando así los efectos biológicos de daño molecular ocasionados por la edad o por tratamientos médicos.

Métodos y Resultados

La paciente en la cual se basa este estudio (28 años) que desea procrear un hijo a futuro, no presenta ninguna sintomatología clínica; durante un control ecográfico endovaginal se detectó un teratoma ovárico izquierdo, de 1,78 cm de diámetro acompañado de un quiste funcional y 6 folículos antrales entre 3 a 6 mm de diámetro, razón por la que fue remitida a nuestra unidad (Instituto Quiteño de Infertilidad-IQUI), con el objeto de realizar un tratamiento para preservar su

fertilidad. Tiene el antecedente quirúrgico de ovariectomía derecha total por teratoma maduro, salpingectomía homolateral y apendicectomía hace 2 años. Como antecedente familiar, el fallecimiento del abuelo paterno por cáncer gástrico. Los antecedentes gineco-obstétricos comprenden: uso de anticonceptivo inyectable mensual durante estos 2 últimos años, nuligesta, menarquia a los 12 años, con ciclos menstruales 28/4 y sus revisiones ginecológicas previas han sido normales.

El laboratorio reporta HCG cuantitativa menor a 0,1 mUI/mL (< 5.3 mUI/mL), AFP (alfa feto proteína) 2,88 ng/mL (< 7.0 ng/mL), CEA (antígeno carcino embrionario) 0,72 ng/mL (< 3.8 ng/mL), CA 125:10,71 U/mL (< 35.0 U/mL), HAM 1,01 ng/mL (1.66 – 3.0 ng/mL), TSH 3,34 uIU/mL (0.4 – 4.0 uIU/mL), T3 3,01 pg/mL (2.0 – 4.4 pg/mL), T4 1,21 pg/mL (0.93 – 1.70 ng/dL), DHL 219 U/L (135 – 214 U/L). Día 3 del ciclo: FSH 5,10 mUI/mL (< 12 mUI/mL), (E2) 17 β -estradiol 34,72 pg/mL (< 60 pg/mL), IMC 22. El cónyuge tiene 28 años y es normozoospermico.

El estudio histopatológico al ovario derecho reportó un quiste compuesto por diferentes tipos de tejidos, con proliferación de glándulas sudoríparas y sebáceas rodeadas por tejido adiposo maduro, con abundantes folículos pilosos. En otros cortes, el estroma ovárico tiene el aspecto de un cuerpo albicans. El diagnóstico es teratoma maduro de ovario derecho (Figura 1).

Por el hallazgo ecográfico del quiste funcional de ovario izquierdo (Figura 2), se prescribió a partir del primer día de la menstruación, un anticonceptivo oral a base de etinilestradiol 0,03 mg y levonorgestrel 0,15 mg durante un mes, tratamiento que resolvió el quiste.

En el nuevo control ecográfico se determinó la resolución del quiste. A fin de satisfacer el futuro deseo reproductivo de la paciente, se inicia la estimulación ovárica al tercer día de la menstruación, mediante FSH subcutánea a dosis de 150 UI/día durante 9 días. Al detectarse un folículo dominante de 14 mm se aplicó, como antagonista de la GnRH, el fármaco acetato de cetrorelix subcutáneo a dosis de 0,25 mg por 3 días. Con folículos de 18, 20, 21 y 22 mm de diámetro y con un valor de estradiol de 567,50 al día 12 del ciclo, se aplicó 250 μ g de hCG recombinante subcutánea para inducir artificialmente la ovulación (Figura 3).

Luego de transcurridas 36 horas desde la aplicación de la hCG, mediante ecografía endovaginal (ecógrafo Mindray DC-40 Pentamedica) se aspiraron los óvulos (OPU oocyte pick up). Previamente, se limpia la cavidad vaginal con solución salina tibia (no se usan antisépticos por

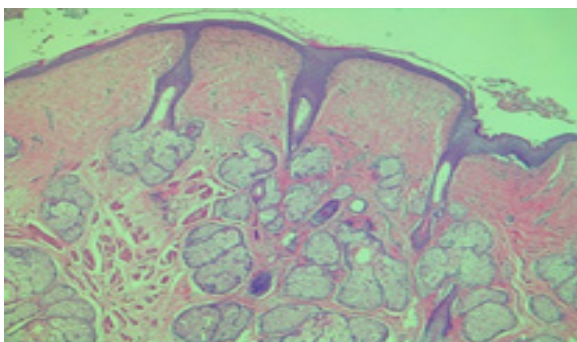


Figura 1. Corte histopatológico a espécimen procedente de ovario derecho, con diagnóstico de teratoma maduro.



Figura 2. Imagen de ultrasonido de ovario izquierdo, donde se aprecia el teratoma maduro (a) y el quiste funcional (b).

el efecto deletéreo que tienen sobre los óvulos). Con una bomba de aspiración Pioneer (Life Global Group LGC) y a una presión de 140 mm de Hg, se aspiraron los folículos para prevenir la punción del teratoma y la consecuente peritonitis química, se puncionó y aspiró el folículo más cercano al punto de entrada de la aguja, colocándola a esta en la mitad del diámetro mayor del folículo, con una visión controlada de la punta que es ecorefringente. Se realizó, además, una movilización intraovario en palillos de abanico sin movimientos bruscos para la punción de los folículos restantes. El procedimiento de captura demandó sedación con propofol, fentanilo intravenosos, ceftriaxona 1 gr IV para prevenir infección y ácido tranexámico a dosis de 1 gr IV como profiláctico de sangrado.

Una vez aspirado el contenido folicular, en laboratorio se identifican y lavan los óvulos extraídos (Figura 4); luego, se realiza la correspondiente decumulación (eliminación de las células del cumulus y de la corona de forma química y mecánica) mediante hialuronidasa (Hyase 10X© Vitrolife) y pipetas pasteur (Origio©) se obtuvieron 3 óvulos en metafase II y uno en metafase I (Figura 5).

Los óvulos que se encontraban en metafase II siguieron el proceso de vitrificación según el método Cryotech© (Reprolife) usado para criopreservación de óvulos y embriones, desarrollado por Kuwayama y colaboradores en el año 2005. El protocolo de vitrificación se divide en 4 etapas: a) equilibrado, b) vitrificación, c) carga, y d) sumersión del Cryotech en nitrógeno líquido a - 196 °C para uso futuro. Quien ejecute el procedimiento verificará la correcta rotulación de las escalerillas con el nombre de la paciente, para que sean fácilmente identificadas en el banco de óvulos.

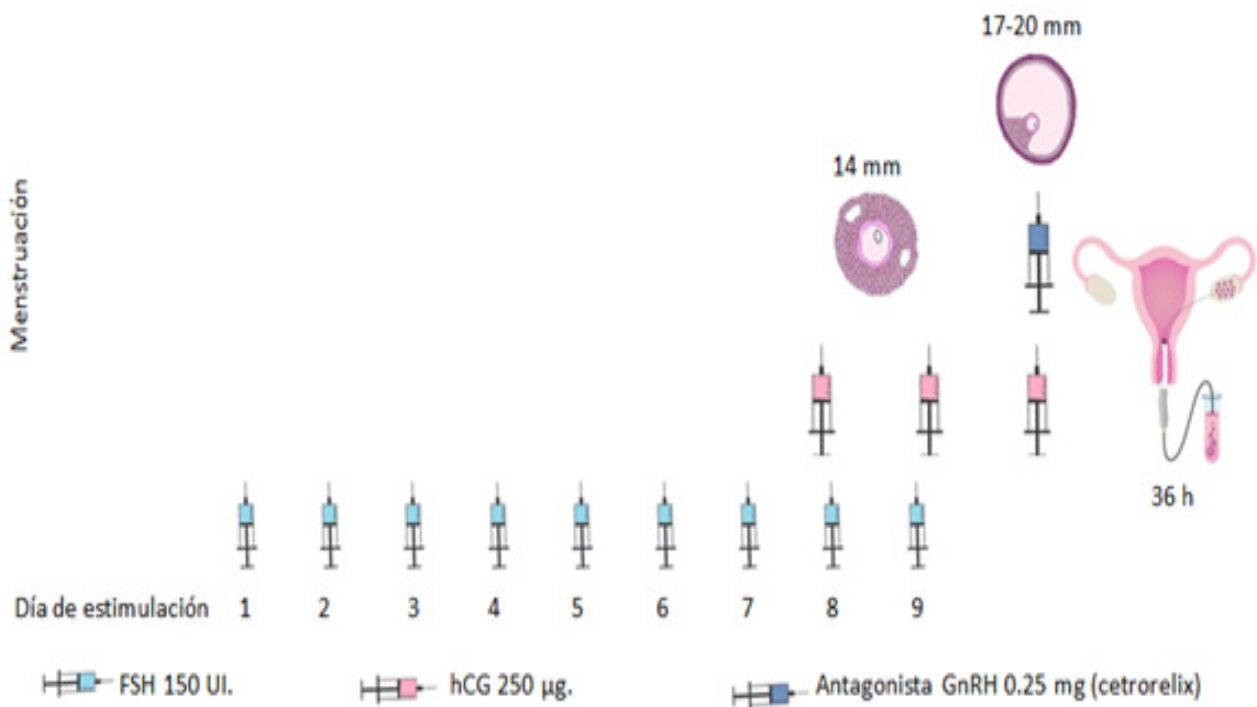


Figura 3. Representación esquemática del protocolo de estimulación ovárica.

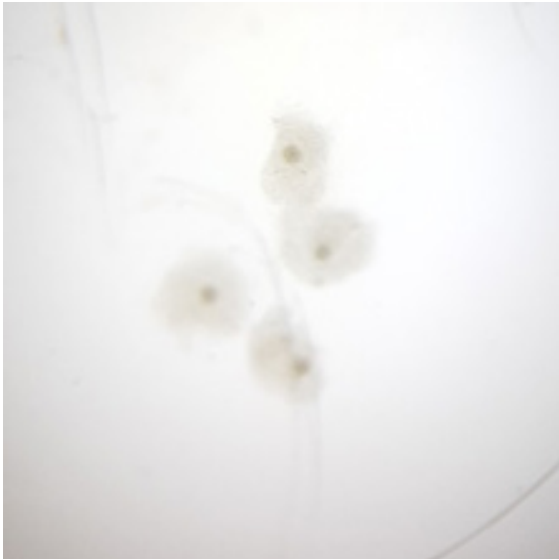


Figura 4. Óvulos captados, rodeados del complejo del cúmulo-corona

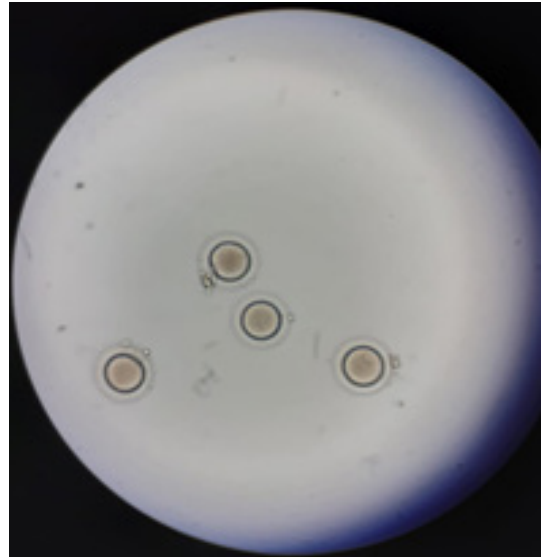


Figura 5. Óvulos decumulados, tres en metafase II y uno en metafase I

Discusión

Los teratomas tienen una forma benigna llamada teratoma maduro y una forma maligna llamada teratoma inmaduro. La teoría partenogénica es la más aceptada y está reforzada por la distribución anatómica de estos tumores en las líneas de migración de las células germinales primordiales, desde el saco vitelino hasta las gónadas primitivas germinales. El hecho de que estos tumores se presenten principalmente en edad reproductiva temprana, apoya a la teoría partenogénica (Patterson et al. 2006). Varios estudios citogenéticos apoyan el origen del tumor desde una sola célula germinal después de la primera división meiótica siendo en la actualidad el postulado más aceptado (Peters et al. 1962).

La cirugía laparoscópica constituye el mejor método diagnóstico y terapéutico directo en caso de un teratoma, debiendo programarse de manera electiva. Se recomienda la cuidadosa disección y la limpieza del tejido circundante para preservar la mayor cantidad de tejido ovárico sano, indispensable para asegurar la calidad de vida de la paciente, usualmente joven, que necesita de la funcionalidad ovárica para su futura fertilidad. Quien ejecute el procedimiento debe ser extremadamente cuidadoso en no dañar la corteza ovárica por una excesiva manipulación mecánica o el uso de medios de energía que podrían dañar a los folículos primarios y secundarios, debido a su termosensibilidad. Se complementa el estudio con marcadores tumorales, necesarios para un correcto diagnóstico diferencial en mujeres jóvenes (Peters et al. 1962; Gadducci et al. 2000). En el presente caso, los marcadores tumorales se encontraron dentro de los límites de la normalidad.

La primera vitrificación exitosa de óvulos de ratón se obtuvo en la década de los años ochenta adjudicándose este logro a Rall y Fahy en el año 1985. La primera publicación sobre un embarazo logrado con un óvulo congelado data del año de 1986 (Chen 1986). El primer caso de recién nacido vivo tras la transferencia de embriones provenientes de óvulos vitrificados fue publicado en 1999 (Kuleshova et al. 1999).

Durante mucho tiempo, la criopreservación del gameto femenino no fue considerada una opción real en la práctica clínica, por la extrema sensibilidad y fragilidad, al punto que los intentos por conseguir un protocolo eficaz de conservación terminaban en fracaso. Esta situación cambió

con el advenimiento de la vitrificación (Rall y Fahy, 1985) y los protocolos para ser aplicados en óvulos (Kuwayama et al. 2005). Entre las razones que determinaron resultados negativos se señala al gran tamaño del óvulo y su forma esférica, el cual inevitablemente condicionan las características de permeabilidad. Al ser una célula de gran tamaño, de 150 μm de diámetro (Sathananthan 1997), y con elevado contenido en agua, tiene menor tolerancia a la congelación. A esto, se suma la baja relación área/volumen que dificulta aún más este intercambio. Además, de la menor permeabilidad de la membrana del óvulo en comparación con la permeabilidad que poseen los embriones; su especial estructura está estrechamente vinculada a la susceptibilidad al enfriamiento. Los óvulos maduros permanecen bloqueados en metafase de la segunda división meiótica. En esta etapa, la cromatina permanece condensada en forma de cromosomas que a su vez se conectan a los microtúbulos del huso. Un huso meiótico es considerado normal cuando se observa una estructura en forma de barril donde los cromosomas se encuentran alineados en el plano ecuatorial del mismo. Mantener la estabilidad estructural tanto del huso como del citoesqueleto, resulta de extrema importancia para la competencia de los óvulos. La alteración de esta estructura conduce a una alineación incorrecta de los cromosomas que puede dar lugar a una segregación cromosómica alterada y por tanto, a mayor incidencia de aneuploidías (Coello 2019).

Este efecto de las técnicas de criopreservación sobre el huso meiótico ha sido, desde el principio, una de las características del óvulo que más ha preocupado a la comunidad científica a la hora de aplicar técnicas de criopreservación. Tras un tiempo de polémica, diferentes estudios mostraron que el descenso de la temperatura en los óvulos humanos también ocasiona alteraciones a nivel del huso, pero que luego de transcurridas dos horas de incubación después de la desvitrificación, se produce una reorganización del huso (Cobo et al. 2008; Coticchio et al. 2009), conservando la capacidad de fecundación y de desarrollo. Se describe el hallazgo de una proporción similar de alteraciones cromosómicas en embriones procedentes de ovocitos frescos y de óvulos vitrificados (Gook y Edgar 2007), como un sustento para ratificar que esta técnica no produce un porcentaje mayor de alteraciones cromosómicas. Existe una amplia bibliografía que avala la vitrificación ovocitaria como técnica segura y eficaz (Cobo et al. 2016; Rienzi et al. 2010; Smith et al. 2010; Parmegiani et al. 2011; De Munck y Vajta 2017).

En la actualidad, la fertilización del óvulo luego de su vitrificación tiene una eficacia similar a la observada en óvulos frescos (Cobo et al. 2016; Rienzi et al. 2010). El verdadero éxito de cualquier técnica de criopreservación de óvulos se circunscribe a la posibilidad de lograr nacidos vivos en una proporción similar a la alcanzada con óvulos frescos. La aplicación clínica de la vitrificación ha demostrado ser eficiente (Nagy et al. 2008; Cobo et al. 2008). Sin embargo, y pese a los buenos resultados conseguidos, los efectos biológicos que conlleva preservar células a bajas temperaturas son complejos y todavía desconocidos en muchos aspectos (Coello 2019). En la paciente, motivo de este reporte, habría que considerar la posibilidad, a corto plazo, de realizar una nueva estimulación ovárica a fin de aumentar el número de óvulos vitrificados.

Conclusiones

El manejo de las patologías tumorales ováricas benignas es multidisciplinario y los diferentes especialistas involucrados deberán analizar el caso específico. Sobre todo, si se trata de pacientes que desean preservar la fertilidad en un futuro mediato. Un procedimiento disponible seguro es la vitrificación de óvulos. Se benefician de esta técnica aquellas pacientes en vida reproductiva que deben someterse a cirugías por tumores ováricos (teratomas, endometriomas, etc.) o con cáncer que deben tratarse mediante quimioterapia o radioterapia y en pacientes con enfermedades que requieren tratamientos potencialmente gonadotóxicos.

Este procedimiento permite a la mujer iniciar una gestación al momento que lo desee, mediante fertilización in vitro. Como requisito, el útero debe encontrarse en buenas condiciones para la receptividad del embrión junto al buen estado general de la mujer. En cuanto a los recién nacidos a partir de óvulos desvitrificados, factores como el peso al nacer, riesgo de prematuridad, puntuación APGAR, mortalidad perinatal, incidencia de anomalías congénitas, entre otras, son equiparables a las observadas en gestaciones espontáneas y en embarazos logrados mediante reproducción asistida usando óvulos frescos. El Ecuador cuenta con centros de fertilidad que

disponen de la infraestructura y la tecnología necesaria para ejecutar estos procedimientos y brindar a la paciente la oportunidad real de preservar su fertilidad.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no poseer ningún conflicto de intereses. El trabajo se realizó con fondos propios.

Contribución de los autores

AQ: concepción y diseño del estudio, colección de datos, redacción de la primera versión del manuscrito.

JA: concepción y diseño del estudio, revisión del manuscrito.

AC: colección de datos, revisión del manuscrito.

MM: colección de datos, análisis e interpretación de datos.

DM: colección de datos, revisión del manuscrito, análisis e interpretación de datos.

RA: revisión inicial y final del manuscrito, redacción final del manuscrito.

WG: concepción y diseño del estudio, revisión y redacción inicial y final del manuscrito.

Referencias bibliográficas

American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Practice Bulletins – Gynecology Gynecologists Committee on Practice. 2016. Practice Bulletin No. 174: evaluation and management of adnexal masses. *Obstet Gynecol.* 128(5): 210-226

Bal A, Mohan H, Singh SB, Sehgal A. 2007. Transformación maligna en teratoma quístico maduro de cinco casos y revisión de la literatura. *Arch Gynecol Obstet.* 275: 179-182.

Batiza V, Aguilar A, Luna R, Pérez E, Gutiérrez A, Ruvalcaba L, Salazar C, Michel J, Shaw R, Barquet S, et al. 2020. Preservación de la fertilidad: opinión de un grupo de expertos, Fertility Preservation: Expert Group Opinion. *Ginecol Obstet.* 88(11): 767-805.

Cabezas M, Rodríguez E, Rodríguez I, Marquez F. 2017. Teratoma ovárico maduro e inmaduro, a propósito de un caso. *Ginecol Obstet Mex.* 85: 331-337.

Chen C. 1986. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet.* 19;1(8486): 884-6.

Cobo A, García-Velasco JA, Coello A, Domingo J, Pellicer A, Remohi J. 2016. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil Steril.* 105: 755-64.

Cobo A, Kuwayama M, Perez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J. 2008. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril.* 89(6): 1657-1664.

Coello Perles A. 2019. Efecto de la vitrificación de ovocitos y embriones en el desarrollo embrionario y resultados clínicos: análisis morfofocinético mediante la tecnología time-lapse. [Tesis de Doctorado, Universidad de Valencia]. Repositorio institucional- Universidad de Valencia. Coticchio G, Bromfield JJ, Sciajno R, Gambardella A, Scaravelli G, Borini A, Albertini DF. 2009. Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. *Reprod Biomed Online.* 19(3): 29-34.

De Munck N, Vajta G. 2017. Safety and efficiency of oocyte vitrification. *Cryobiology.* 78: 119-127. Emoto M, Obama H, Horiuchi S, Miyakawa T, Kawarabayashi T. 2000. Transvaginal color Doppler ultrasonic characterization of benign and malignant ovarian cystic teratomas and comparison with serum squamous cell carcinoma antigen. *Cancer.* 88(10): 298-304.

Gadducci A, Negri S, Fanucchi A. 2000. Valor clínico del análisis de marcadores séricos en el cáncer ginecológico. *Folia Clínica en Obstetricia y Ginecología.* 40: 12.

Gook DA, Edgar DH. 2007. Human oocyte cryopreservation. *Hum Reprod Update.* 13: 591-605.

Guerra A, Bracanto F, Puzzo L, Magro G, Greco P. 2008. Squamous cell carcinoma in situ arising in ovarian mature cystic teratoma. *Pathologica.* 100: 9-12.

- Ki EY, Jang DG, Jeong DJ, Kim CJ, Lee SJ. 2016. Rare case of complete colon structure in a mature cystic teratoma of the ovary in menopausal woman: a case report. *BMC Womens Health*. 16(1): 70.
- Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. 1999. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod*. 14(12): 3077-3079.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 11(3): 300-308.
- Maiti S, Fatima, Z., Anjum, Z., Hopkins R. 2008. Ruptured ovarian cystic teratoma in pregnancy with diffuse peritoneal reaction mimicking advanced ovarian malignancy: A case report. *J Med Case Reports*. 2: 203.
- Mateo-Sánchez, H. A., Mateo-Madrigal, D., Dávalos-Álvarez, A., Domínguez-Dorame, F., Ku-González, J. 2020. Preservación de la fertilidad en una paciente con teratoma bilateral. Reporte de un caso y revisión de la literatura. Preservation of fertility in a patient with bilateral teratoma. Case report and literature review. *Cirugia y cirujanos*. 88(2): 84–89.
- Nader R, Thubert T, Deffieux X, Laveaucoupet J. 2014. Delivery Induced Intraperitoneal Rupture of a Cystic Ovarian Teratoma and Associated Chronic Chemical Peritonitis. *Case Reports in Radiology*
- Nagy ZP, Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Toledo AA, Kort HI. 2008. Evaluación clínica de la eficacia de un programa de donación de ovocitos utilizando crio-banco. *Fertil Steril*, 92 (2): 520-526.
- Pantoja E, MA Noy, FE Colon, Yo Pelegrina. 1975. Ovarian dermoids and their complications: A comprehensive historical review. *Obstet Gynecol Surv*. 30(1): 1-20.
- Park JY, Kim DY, Kim JH, Kim YM, Kim YT, Nam JH. 2008. Malignant transformation of mature cystic teratoma of the ovary: experience at a single institution. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 141(2): 173-178.
- Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante FE, Tabarelli de Fatis C, Arnone A, Maccarini AM, Filicori M. 2011. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 23(4): 505-512.
- Patterson DM, Rustin GJS. 2006. Controversies in the management of germ cell tumors of the ovary. *Current Opin Oncol*. 18(5): 500-506.
- Pesce R, et al. 2010. Preservación de la fertilidad. *Reproducción*. 32 (2): 34-39.
- Peters H, Levy E, Crone M. 1962. Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Oocytes of Mouse Embryos. *Nature*. 195: 915–916.
- Rall WF, Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*. 313: 573-575.
- Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli R, Capalbo A, Baroni E, Colamaria S, Sapienza F, Ubaldi F. 2010. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod*. 25(1): 66-73.
- Romero L, Estrada I. 2007. Teratoma quístico maduro con transformación maligna. *Pathol Rev Latin*. 45(3): 148-149.
- Sahin H, Abdullazade S, Sancı M. 2017. Mature cystic teratoma of the ovary: A cutting edge overview on imaging features. *Insights Imaging*. 8(2): 227-41.

- Sathananthan AH.1997. Ultrastructure of the human egg. *Hum Cell.* 10(1): 21-38.
- Savasi I, Lacy J, Gerstle T, Stephens D, Kives S, Allen L. 2009. Management of ovarian dermoid cysts in the pediatric and adolescent population. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 22(6): 360-364.
- Sebastià C, Sarrias M, Sánchez-Aliaga E, Quiroga S, Boyé R, Álvarez-Castells A. 2004. Rotura de teratoma quístico maduro de ovario: hallazgos por tomografía computarizada. *Radiología.* 46(1): 34-7.
- Shin HJ, Kim KA, Kim BH, Lee JK, Park YS, Lee J, Choi JW, Lee CH, Park CM. 2016. Benign enhancing components of mature ovarian teratoma: magnetic resonance imaging features and pathologic correlation. *Clin Imaging.* 40(6): 1156-1161.
- Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, Alegretti JR, Motta EL. 2010. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril.* 94(8): 2088-2095.
- Templeman C, Fallat M, Lam A, Perlman S, Hertweck P, O'Connor D. 2000. Managing mature cystic teratomas of the ovary. *Obstet Gynecol Surv.* 55(12): 738-45.