



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Caracterización molecular de Basidiomycetes a partir de aislamientos y fructificaciones colectados en la Reserva Biológica San Francisco RBSF

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Flores Lozano, Oscar Iván

DIRECTOR: Cruz Sarmiento, Darío Javier, BQ.

LOJA – ECUADOR

2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

BQF.

Darío Javier Cruz Sarmiento

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mí consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: **“Caracterización molecular de Basidiomycetes a partir de aislamientos y fructificaciones colectados en la Reserva Biológica San Francisco RBSF”** realizado por el profesional en formación: Oscar Iván Flores Lozano, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2015.

f).....

Bqf. Darío Javier Cruz Sarmiento.

DIRECTOR DE TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.

C.I: 1104012016

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Flores Lozano Oscar Iván declaro ser autor del presente trabajo de fin de titulación: Caracterización molecular de Basidiomycetes a partir de aislamientos y fructificaciones colectados en la Reserva Biológica San Francisco RBSF de la titulación de Bioquímico Farmacéutico, siendo Darío Javier Cruz Sarmiento director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigadores, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....

Autor: Flores Lozano Oscar Iván

C.I: 1103826762

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico:

A Dios por iluminar mi vida.

A mi esposa, Gabriela y a mis hijos, Oscar, David y Anhely, por haberme dado luz y la fortaleza para alcanzar mis metas junto a ellos, por ser el pilar fundamental para alcanzar este objetivo de superación personal y profesional.

A mis padres, Ángel y Esthela, por su apoyo invaluable, su constancia y su ejemplo de fortaleza y humildad, con lo que he forjado mi personalidad, y que han sido mi principal motivación en todos estos años de estudio.

A mis hermanos Ximena, Henry, Christian y demás familiares por su apoyo incondicional.

Y a todos mis amigos y amigas, que han creído en mí y que han estado conmigo en todo momento.

Oscar Iván Flores Lozano

AGRADECIMIENTO

Una de las metas más importantes de la vida es la culminación de los estudios universitarios para llegar a la profesionalización por eso quiero expresar mi sincero agradecimiento, al Bqf. Darío Javier Cruz Sarmiento, ya que gracias a su acertada dirección hizo posible la realización de éste trabajo de fin de titulación, brindándome sus valiosos conocimientos y compartiendo invalorable experiencias.

A la Universidad Técnica Particular de Loja por contribuir en mi formación personal y profesional.

Al equipo humano del Fungario HUTPL, en especial a Juan Sebastián, Andrés, Karla, Cindy y a Victoria por sus esfuerzos compartidos y conocimientos impartidos para realizar esta investigación.

A todas las personas que han sido partícipes en mí acontecer académico desde el primer día hasta conseguir a cabalidad mi meta propuesta.

Oscar Iván Flores Lozano

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	- 1 -
ABSTRACT	- 2 -
INTRODUCCIÓN.....	- 3 -
CAPITULO I.....	- 4 -
MARCO TEÓRICO	- 4 -
1.1. El reino de los hongos	- 5 -
1.1.2. Clasificación morfológica y molecular.....	- 5 -
1.1.3. Roles beneficiosos de los hongos.....	- 7 -
1.2. Hongos Basidiomycetes	- 10 -
1.2.1. Generalidades.....	- 10 -
1.2.2. Morfología.....	- 10 -
1.2.3. Reproducción y Ciclo de vida.....	- 11 -
1.2.4. Aislamiento y cultivo.....	- 12 -
1.3. Caracterización de hongos	- 14 -
1.3.1. Identificación morfológica.....	- 14 -
1.3.2. Identificación molecular	- 14 -
CAPITULO II.....	- 16 -
MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 16 -

2.1. Sitio de muestreo y colecta	- 17 -
2.2. Aislamiento	- 17 -
2.3. Caracterización molecular.....	- 18 -
2.4. Análisis filogenético.....	- 19 -
CAPITULO III.....	- 20 -
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 20 -
3.1. Colección y aislamiento in vivo	- 21 -
3.2. Caracterización molecular.....	- 24 -
CONCLUSIONES	- 31 -
RECOMENDACIONES	- 32 -
REFERENCIAS	- 33 -
ANEXOS.....	- 39 -
Anexo 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN: DNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen:.....	- 39 -
Anexo 2. PROTOCOLO DE PCR: para polimerasa Platinum ® PCR Super Mix.....	- 41 -
Anexo 3. PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR: QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen)	- 42 -

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Clasificación taxonómica de los hongos en base a datos moleculares..... - 7 -
- Figura 2.** Ciclo de vida general en Basidiomycetes. - 12 -
- Figura 3.** Basidiomas colectados en su actividad descomponedora de materia orgánica: a) IR067F_Gerronema sp. b) IR079F_Gymnopus sp. c) IR082F_Crepidotus sp. d) IR028C_Coriolopsis sp. e) IR026C_Crepidotus sp. f) IR148C_Campanella sp..... - 21 -
- Figura 4.** Ascomycetes en cultivo puro, junto a su tinción con floxine al 0.1 % a) IR066C_Penicillium_sp. b) IR022C_Fusarium_sp., c) IR018C_Pestalotiopsis_sp., d) IC007C_Aspergillus_sp. Las conidias son indicadas con flechas negras. Fotos microscópicas se realizan a un aumento de 1000X con objetivo de 100X..... - 23 -
- Figura 5.** Hipótesis filogenética para la región LSU (D1/D2) obtenida con secuencias de fructificaciones mediante un ML. El árbol muestra la diversidad de Basidiomycetes en la RBSF. El árbol fue enraizado con Xylaria spp. como grupo externo. Los nombres en negrilla corresponden a secuencias obtenidas en este estudio. - 26 -
- Figura 6.** Hipótesis filogenética para la región ITS1-5.8S (ITS1-5.8S-ITS2) obtenida con secuencias de cultivos puros de Basidiomycetes mediante un ML. El árbol fue enraizado con Xylaria sp. HQ130668 como grupo externo. Los nombres en negrilla corresponden a secuencias obtenidas en este estudio. - 28 -
- Figura 7.** Hipótesis filogenética para la región ITS1-5.8S (ITS1-5.8S-ITS2) obtenida con secuencias de cultivos puros de Ascomycetes mediante un ML. El árbol fue enraizado con Trametes versicolor sp. como grupo externo. Los nombres en negrilla corresponden a secuencias obtenidas en este estudio. - 29 -

RESUMEN

Ecuador es uno de los países más biodiversos donde los bosques montanos tropicales como el de la Reserva Biológica San Francisco (RBSF) son altamente llamativos por su singularidad y rareza, con ecosistemas frágiles que contienen una gran diversidad biológica pero escasamente registrada, especialmente en cuanto a la diversidad de hongos Basidiomycetes. Se efectuaron colecciones de basidiomas durante cinco meses en el bosque montano tropical de la RBSF. Los basidiomas en fresco se aislaron en medios de cultivos sólidos y en seco, posteriormente se almacenaron en el fungario-HUTPL. Molecularmente se obtuvieron secuencias tanto para basidiomas como para los cultivos puros de las regiones ITS-5.8S y LSU parcial (D1/D2). Se colectaron 186 basidiomas y se logró aislar 18 para basidiomycetes y 37 para ascomycetes. El análisis filogenético determina alta diversidad molecular en cuatro órdenes (Agaricales; Boletales; Geastrales y Polyporales) con 13 familias desde basidiomas; dos órdenes (Agaricales y Polyporales) con tres familias desde cultivos puros basidiomycetes y tres órdenes (Diaporthales; Hypocreales y Xylariales) con seis familias desde cultivos puros Ascomycetes. Los órdenes más comunes y abundantes fueron los Agaricales e Hypocreales respectivamente.

Palabras clave: Bosque montano tropical, diversidad molecular, basidiomas, Basidiomycetes, Ascomycetes.

ABSTRACT

Ecuador is one of the most biodiverse countries where tropical montane forests as the Biological Reserve of San Francisco (RBSF) are highly conspicuous by its singularity and rarity, with fragile ecosystems. Biodiversity is poorly recorded in areas like RBSF, especially regarding Basidiomycetes fungal diversity. Basidiomata were sampled during five months in the tropical montane forest RBSF. We attempt to isolate fungi from fresh basidiomata in solid culture media and keep dry specimens in the fungario-HUTPL. Molecular sequences from basidiomata and pure cultures were amplified for the genes ITS-5.8S and partial LSU (D1/D2). Basidiomata (186 on total) were collected, however only from few of them attempt to isolate were successful (18 for basidiomycetes and 37 for ascomycetes). Phylogenetic analysis showed high molecular diversity mainly into four orders (Agaricales; Boletales; Geastrales and Polyporales) that includes 13 families from basidiomata; two orders (Agaricales and Polyporales) that include three families from pure cultures of basidiomycetes, and three orders (Diaporthales; Hypocreales and Xylariales) that include six families from pure cultures of Ascomycetes. The most common and abundant orders correspond to Agaricales and Hypocreales respectively.

Keywords: tropical mountain forest, molecular diversity, basidiomata, Basidiomycetes, Ascomycetes.

INTRODUCCIÓN

Desde 1969 los hongos tomaron un lugar como Reino con la clasificación taxonómica de los seres vivos según Robert Whittaker (1969) y desde entonces podemos reconocer que el Reino de los Hongos es mucho más diverso que el Reino de las Plantas y Animales, ya que incluye 7 Filos (Basidiomycota; Blastocladiomycota; Ascomycota; Glomeromycota; Chytridiomycota, Neocallimastigomycota y Microsporidia). Se estima que existen aproximadamente 6 hongos por cada planta vascular, lo que nos indica que probablemente pueden existir en el mundo cerca de 1.5 millones de especies de hongos (Hawksworth, 2001), de los cuales hasta la actualidad no se conoce ni la octava parte.

Ecuador es uno de los países más biodiversos del mundo, donde los bosques montanos tropicales como el de la Reserva Biológica San Francisco (RBSF) (norte del Parque Nacional Podocarpus; Zamora Chinchipe-Zona 7) son altamente llamativos por su singularidad y rareza, con ecosistemas frágiles que contienen una gran diversidad biológica como flora, fauna y micobiota. Se estima 4000 especies de plantas vasculares para el parque Podocarpus, y mediante la regla de 6:1 hongos/planta se estimaría fácilmente 24.000 especies de hongos para esta zona protegida, con un alto porcentaje de especies de hongos por descubrirse. Toda esta diversidad de organismos vivos se encuentra amenazada debido al alto nivel de vulnerabilidad frente a los cambios globales como por ejemplo el cambio climático y las dinámicas de cambios de cobertura y uso de la tierra.

Por estas razones, en esta investigación colectamos, aislamos y caracterizamos molecularmente una pequeña parte de la diversidad de hongos Basidiomycetes en la RBSF. Para la identificación de los hongos Basidiomycetes se usará la región conservada del espaciador transcrito interno que comprende la región desde ITS1-5.8S-ITS2 y también la región de la subunidad grande (LSU parcial), amplificado desde el ADN Ribosomal Nuclear (ADNr_n) tanto de fructificaciones como de los aislamientos puros *in vivo*. Los especímenes colectados y las cepas aisladas aportarán al incremento de muestras para el herbario HUTPL así como colecciones *in vivo*. Las cepas puras de los aislamientos serán una fuente de organismos para posteriores análisis así como para investigaciones de bioprospección con aplicabilidad en diferentes campos como medicina o industria.

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. El reino de los hongos

1.1.1. Generalidades.

Los hongos son organismos eucariontes que constituyen un conjunto de seres vivos micro y macroscópicos tanto unicelulares como pluricelulares que se pueden desarrollar en varios ambientes pero preferentemente en sitios húmedos y con poca luz (Herrera y Ulloa, 1990). Los hongos están formados principalmente por células con una pared rígida rica en quitina. Son en su mayoría inmóviles, y su nutrición es heterótrofa (quimio-organótrofos) por absorción y con reproducción sexual y asexual (Webster y Weber, 2007).

Los hongos unicelulares o microscópicos son las denominadas levaduras. En cambio los hongos pluricelulares están formados por células cilíndricas alargadas que forman filamentos llamados hifas, que al agruparse forman micelios visibles que confieren características morfológicas individuales (Herrera y Ulloa, 1990). Los hongos cumplen con la labor de degradar la materia orgánica muerta mediante enzimas extracelulares (Arenas, 2003) en moléculas simples y solubles absorbibles a través de su pared celular. (Cepero, Restrepo, Franco-Molano, Cárdenas, y Vargas, 2012).

Los hongos se pueden reproducir de forma sexual (división meiótica y fusión de gametos) o asexual (división mitótica sin fusión de gametos) (García, Onco, y Susan, 2006). La gran mayoría de estos organismos se reproduce asexualmente o de forma imperfecta. Por ejemplo en las levaduras la célula hija se separa de la madre mediante división celular y se pueden dispersar. En cambio en los hongos filamentosos las células hijas se forman en el extremo apical de los filamentos, por elongación y tabicación, por lo que no se separan de la hija, llegando a formar un himenio donde se establecen las basidias, se forman esterigmas y esporas para facilitar la dispersión a distancia (Webster y Weber, 2007).

1.1.2. Clasificación morfológica y molecular.

Los hongos se han clasificado con criterios muy diferentes según el interés de estudio: taxonómico, patogénico, epidemiológico o en la actualidad molecularmente. La nomenclatura utilizada para clasificar a los hongos taxonómicamente establece una serie de categorías (Haro y Melic, 2002), de las cuales las categorías taxonómicas más importantes son: reino, división o filum, clase, familia, género y especie. Todas las normas que controlan la creación de nombres

científicos para las plantas y hongos con sus categorías taxonómicas están contenidas en el Código Internacional de Nomenclatura Botánica que establece doce categorías que son: reino, división, clase, orden, familia, tribu, género, sección, serie, especie, variedad y forma (visto el 18 de Julio de 2014 en http://www.plantasyhongos.es/taxonomia/jerarquia_taxonomica.htm).

Para calificar la morfología de los hongos se debe diferenciar características micro y macroscópicas como el tamaño y forma de las estructuras que se desarrollan en fructificaciones o de estructuras sexuales como las esporas (Haro y Melic, 2002). Las formas y medidas de esporas son una característica distintiva entre los hongos inclusive a nivel de especie. Dentro del grupo de hongos microscópicos, los más conocidos son las levaduras, los mohos y los dermatofitos. Respecto a los macroscópicos su descripción se basa fundamentalmente en determinar los principales caracteres externos que va a presentar el cuerpo fructífero o carpóforo (Pfenning y Abreu, 2000).

Actualmente, los análisis moleculares han permitido proponer una clasificación actualizada, que corrobora los grupos tradicionales determinados con morfología, así como proponer nuevos grupos. Hibbet et al., (2007) establece una clasificación de los hongos basados en datos moleculares, estableciendo jerárquicamente un subreino Dikarya, siete Phylum, 10 Subphylum, 35 Clase, 12 Subclase y 103 órdenes, 484 familias, 4.979 géneros y unas 80.000 especies descritas de acuerdo con el Diccionario de Hongos (Kirk, Cannon, Minter, y Stalpers, 2008) Los Filum Ascomycota y Basidiomycota según Hibbet et al., (2007) se encuentran clasificados en el subreino Dikarya como se describe en la **Figura 1**.

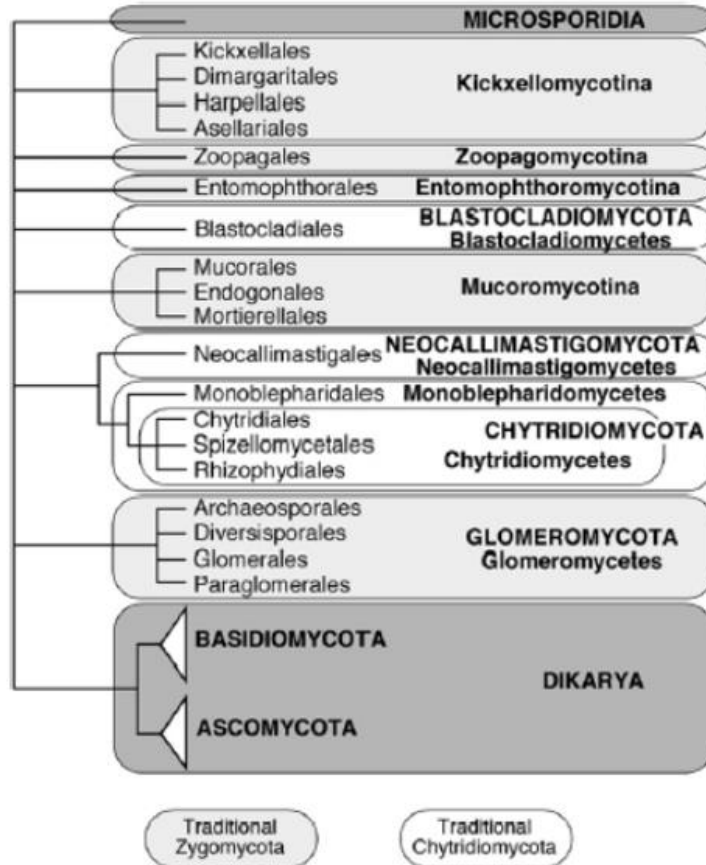


Figura 1: Clasificación taxonómica de los hongos en base a datos moleculares. Tomado de Hibbett et al., (2007).

1.1.3. Roles beneficiosos de los hongos.

En la actualidad se desarrollan múltiples estudios científicos de hongos, con interés sistemático, ecológico, cultural e inclusive biotecnológico como por ejemplo hongos micorrízicos o ectomicorrízicos (Haug et al., 2010; Kottke et al., 2010; Suárez et al., 2006, 2008) hongos comestibles y medicinales, etnomicología (Andrade et al., 2012), hongos productores de metabolitos secundarios como enzimas ligninolíticas (Brizuela, García, Pérez, y Mansur, 1998; Harborne, 2001; Quintero, Feijoo, y Lema, 2006), entre otros.

Existen varias asociaciones simbióticas formadas por los hongos, ya sea con plantas vasculares, con algas o con otros organismos para cumplir importantes roles ecológicos dentro de sus ecosistemas, como por ejemplo:

1.1.3.1. Micorrizas.

En la antigüedad se usaba el término simbiosis y mutualismo tanto para asociaciones micorrízicas, líquenes y parásitos, pero en la actualidad el término simbiosis se aplica solo para asociaciones benéficas. Las asociaciones de hongos se la concluía como toda unión donde el hongo entraba en contacto con un hospedero vivo y de este recibía por cualquier vía, metabolitos y nutrientes, esta definición excluía a las plantas mico-heterotróficas que son completamente beneficiadas por un hongo (Brundrett, 2004). Micorrizas (hongo-raíz) son asociaciones simbióticas entre hongos especializados y raíces de plantas. Se reconocen siete tipos de micorrizas: Micorrizas vesículo-arbusculares (VAM); Ectomicorrizas (ECM); Micorrizas de orquídeas; Micorrizas ericoides y asociaciones Ectendo-, arbutoides y motropoides (Brundrett, 2009), algunas probablemente muy similares estructuralmente (Brundrett, 2002). Estas asociaciones se encuentran en plantas terrestres, como también en musgos, hepáticas, helechos (Márquez, 2009) y también orquídeas epifitas (Kottke et al., 2010; Smith y Read, 2008; Suárez et al., 2008).

La formación de micorrizas aumenta la capacidad de la planta de absorber agua y nutrientes minerales a cambio de la obtención de hidratos de carbono provenientes de la misma. Estos hongos se caracterizan por producir estructuras típicas que se internan en las células de las raíces de las plantas, a diferencia de las ectomicorrizas que forman estructuras que no rompen la pared celular pero que si llegan hasta lugares importantes de las raíces donde intercambian nutrientes entre sí como sucede principalmente en plantas arbóreas, las cuales se pueden ver externamente de la raíz a simple vista (Smith y Read, 2008).

1.1.3.2. Líquenes.

El término liquen proviene del latín = lichen o griego = leichein y significa que pueden chupar o succionar algo, comúnmente los líquenes se conocen como musgo de árbol. Uno de los rasgos distintivos y más interesantes de los líquenes es que son organismos formados de la asociación simbiótica de un hongo con un organismo fotosimbiótico (capaz de hacer fotosíntesis), ya sea un alga, una cianobacteria o ambas. El hongo liquenizado se comporta como un solo organismo en el que cada una de las partes depende de la otra, dando como

resultado un ser vivo sorprendente por su naturaleza dual. Su naturaleza doble fue puesta de manifiesto entre 1857 y 1869, por el botánico suizo Schwendener (Hawksworth, 1989).

Como consecuencia de la simbiosis liquénica, se forman numerosos metabolitos secundarios que hoy en día ya son empleados en diferentes ramas de la medicina como antibacterianos, antivirales y anticancerígenos (Cubas, 2007; Mejía y Gamboa, 2010).

1.1.3.3. Importancia a nivel Industrial y médica de los hongos

Los hongos tanto macro y microscópicos mantienen escondidas varias propiedades que pueden favorecer la industria y la medicina. Varios ejemplos pueden ser citados en éste contexto. Cerca del 40 % de las enzimas comercialmente disponibles (saborizantes, mentol, lactonas, etc) se obtienen de hongos filamentosos, como por ejemplo las especies de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma* son rentables en fermentaciones a gran escala (Guerra et al., 2007; Smith, Rowan y Sullivan, 2002).

El campo industrial más desarrollado que emplea hongos es la industria alimenticia, en donde se usan desde levaduras hasta hongos filamentosos, como por ejemplo para la fermentación de vino (*Saccharomyces ellipsoideus*), fermentación de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*), y en el caso de los quesos se emplean *Penicillium roqueforti*, *Geotrichum candidum* y *Penicillium candidum*. Entre los hongos comestibles tenemos los champiñones (*Agaricus bisporus*), el *Tricholoma matsutake*, y otros más que pertenecen a los órdenes Agaricales, Boletales y Cantharellales que son muy apetecidos especialmente por europeos y asiáticos (Pitt, Hocking, y Diane, 2009)

Medicinalmente los basidiomicetes ofrecen propiedades antiinflamatorias, antioxidativas y algunos con alta actividad citotóxica. Extractos de *Geastrum saccatum* han sido utilizados para inhibir la generación de radicales superóxido, y la peroxidación de lípidos que producen el envejecimiento celular (Guerra et al., 2007). También, extractos de *Trametes versicolor* son usados para eliminar la proliferación de células cancerígenas (Smith, Rowan, y Sullivan, 2002).

1.2. Hongos Basidiomycetes

1.2.1. Generalidades.

Dentro del Reino de los Hongos, el Filo Basidiomycota es uno de los más estudiados, comprende aproximadamente 31.515 especies que corresponden al 32,27 % de las especies de hongos descritas por Kirk en 2008 (Cepero et al., 2012), dentro de ellos están los denominados setas o champiñones, y todos los hongos con cuerpo fructífero en forma de sombrilla al que todo el mundo asocia con la palabra hongo (Alonso, 1998). Sin embargo también existen algunas especies extremadamente dañinas para los cultivos agrícolas, como por ejemplo las royas y los tizones o carbones que son típicos formadores de teliosporas (Espadas y Zita, 2005).

1.2.2. Morfología.

Principalmente se caracterizan por la formación del basidio, que se origina como una estructura binucleada en la que se lleva a cabo la cariogamia y la meiosis, siendo notable el hecho que las basidiosporas por él producidas están situadas por fuera, a diferencia de los ascomicetos que conservan sus ascosporas dentro del asco. Estas basidiosporas son haploides ya que se originaron por meiosis (Arias y Piñeros, 2008).

El basidiocarpo maduro tiene como unidad estructural básica a los basidios, que se caracterizan por poseer sus ápices dilatados, sobre los cuales hay generalmente cuatro esterigmas con sus respectivas basidiosporas (Álvarez, 2012). Como el basidio altera su estructura a medida que se desarrolla, se ha usado el término probasidio para indicar la célula en la que ocurre la cariogamia, mientras que metabasidio se asocia con el desarrollo de la meiosis. Lo más común es que ambos sean parte del mismo compartimento celular, pero a veces se da que el metabasidio es una extensión del probasidio, la cual se origina luego de la cariogamia (Arias y Piñeros, 2008).

Los esterigmas pueden variar en tamaño y forma, desde pequeñas espículas hasta estructuras más masivas, de formas globosas o alargadas. Una vez el basidiocarpo está maduro, se verifica la dispersión de las basidiosporas haploides, las cuales germinan produciendo micelios haploides. Cuando dos de estos micelios se encuentran, ocurre la

plasmogamia y se regenera el estado dicarionte, que reinicia el ciclo de vida (Calle y Rivera, 2005) .

1.2.3. Reproducción y Ciclo de vida.

El ciclo de vida típico de los Basidiomycetes consta de un estado diploide muy corto y uno dicariótico mucho más prolongado (**Figura 2**) (Raven y Johnson, 2002). Al germinar una espora liberada de un basidio da origen a un micelio haploide monocariótico, el cual va adquiriendo septos que originan células uninucleadas. Estos micelios monocarióticos fusionan entre si sus citoplasmas, y sus núcleos se intercambian entre de cada hifa. Las hifas que resultan de ésta interacción son dicarióticas, es decir, poseen la condición $n+n$. Este micelio prolifera manteniendo esta situación genética por bastante tiempo, lo cual logra mediante la formación de conexiones en asa (Berne, Pohleven, Turk, y Sepčić, 2008). La formación en asa empieza con un abultamiento en la pared de la hifa terminal, más o menos entre los dos núcleos que al dividirse por mitosis, el núcleo más terminal se asocia al asa en formación y uno de sus núcleos hijos queda en el interior de dicha estructura. El otro núcleo recientemente formado se ubica lejos del ápice de la hifa y se separa de la célula terminal mediante un septo, formando así una célula uninucleada, la cual es contactada por el asa que continúa doblándose, para unirse por disolución de las paredes celulares en el punto de contacto del asa con la célula posterior, reconstituyendo la condición $n+n$. En la base del asa se forma un septo que separa las células permanentemente, y este proceso se perpetua formando micelios dicarióticos (Hood, 2006). Cuando las condiciones ambientales son apropiadas, este micelio dicariótico experimenta cambios morfogénéticos que inician la formación del basidioma. Éste posee células estériles y fértiles, todas en la condición dicariótica. En las células fértiles, llamadas basidios, los dos núcleos haploides experimentan cariogamia y producen un nuevo núcleo diploide ($2n$), el cual entra rápidamente en meiosis originando así cuatro núcleos hijos haploides. En la superficie del basidio usualmente se desarrollan cuatro prolongaciones citoplasmáticas externas denominadas esterigmas, en cuyos respectivos ápices se formarán las basidiosporas (Cubas, 2007).

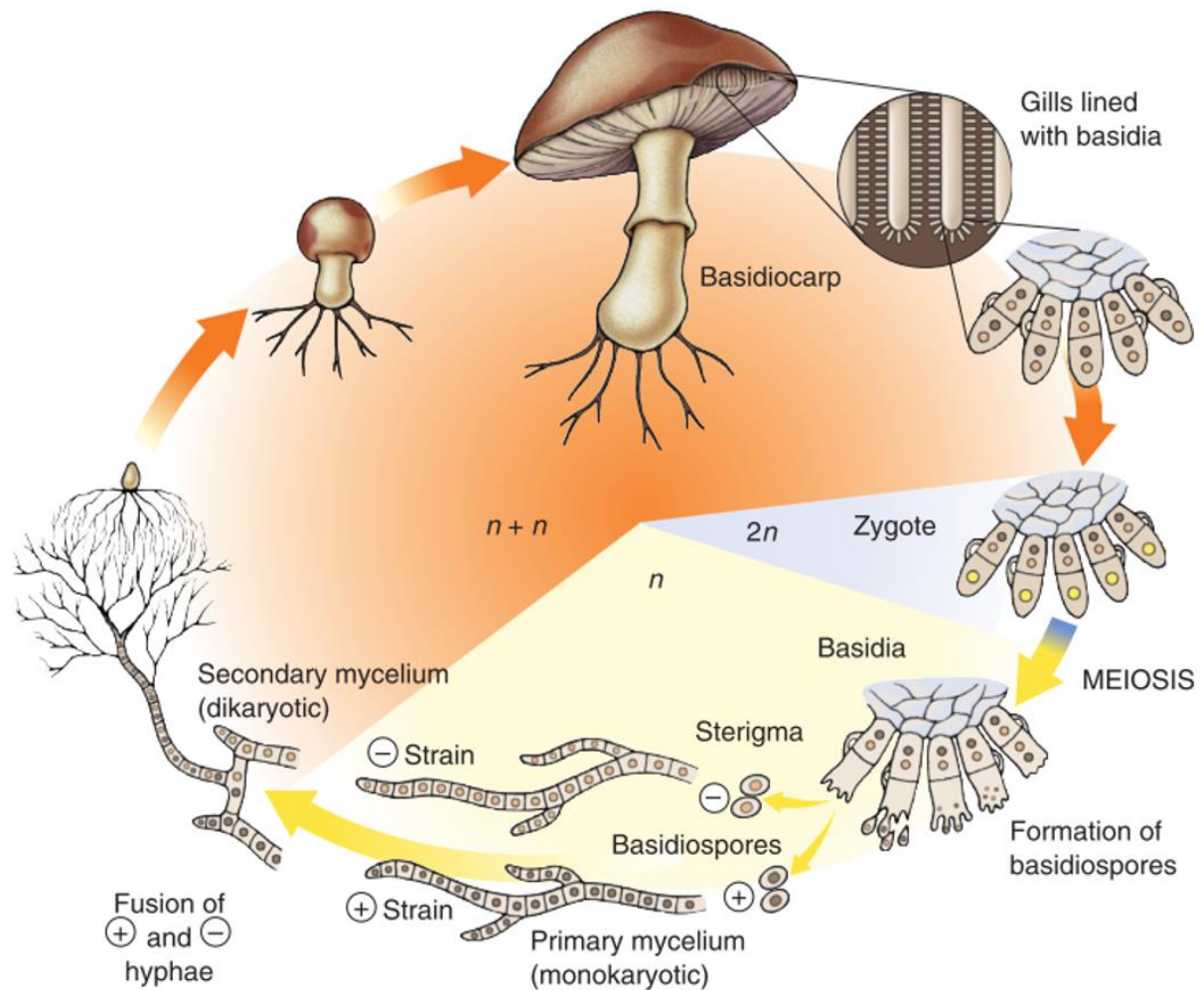


Figura 2. Ciclo de vida general en Basidiomycetes.
Tomado de Raven y Johnson, 2002

1.2.4. Aislamiento y cultivo.

Para el estudio de la diversidad de hongos, ya que muchos de ellos raramente están disponibles en el medio ambiente y son de vital importancia ecológica para su entorno, es necesario el cultivo, conservación y el monitoreo de los hongos en ceparios (Cepero et al., 2012; Webster y Weber, 2007). Varias técnicas de aislamiento pueden ser aplicadas para lograr el objetivo de aislar los hongos en medios puros, complementados con medios enriquecidos o especiales por sus nutrientes. Dentro de las técnicas más comunes de aislamiento tenemos: aislamiento directo, método de esporulación y método por dilución de esporas (Arias y Piñeros, 2008).

1.2.4.1. Aislamiento directo

Aislamiento directo de hongos, se entiende por la replicación de un hongo sobre medio de cultivo partiendo de un segmento tomado directamente de la fructificación. Hongos con tamaño pequeño o muy delgados, pueden complicar esta técnica ya que es muy complicado tomar un buen explanto (García et al., 2013).

Para la obtención de cultivos puros por aislamiento directo varias metodologías coinciden en los siguientes puntos: 1) Desinfección externa de la fructificación que puede ser con alcohol (etanol) al 70 %. 2) El medio de cultivo más general para el aislamiento de hongos es el agar extracto de malta (MEA) ya que contiene vitaminas, proteínas, minerales, y muchos azúcares, y 3) Al ser sólido proporciona un sustrato de fijación para el hongo (Arias y Piñeros, 2008; M. García et al., 2011). Esta técnica es rápida de efectuar, sin embargo puede ser de muy fácil contaminación por lo que se recomienda replicación continua tan pronto haya crecimiento de micelio (Mata, Umaña, y Chaves, 2009). La incubación generalmente óptima para crecimiento de hongos oscila entre 24 y 27°C.

1.2.4.2. Método de esporulación

Es un método de aislamiento de hongos especialmente Basidiomycetes. Este proceso puede tomar más tiempo que el método directo, pero los resultados pueden ser mucho más puros. El proceso se basa principalmente en colocar un segmento que contenga el himenio de la fructificación, por ejemplo, sombrero con laminillas (laminillas direccionadas al medio de cultivo) adherida en la tapa de la caja de Petri, de manera que las esporas sean depositadas sobre el medio de cultivo. Preferentemente se debe rotar la tapa al menos en cuatro puntos de la caja (cada 24 horas) (Mata et al., 2009).

1.2.4.3. Método por dilución de esporas

Esta técnica permite obtener cultivos puros y monospóricos, para lo cual se permite esporular al hongo sobre un papel para recoger sus esporas. El proceso generalmente es seguido de desinfección en cloro, lavado y secado. Para su inoculación en medios de cultivos estériles es conveniente preparar diluciones. Principalmente las diluciones parten de una solución madre en la cual se toma una determinada parte de esporas desde el papel y se las disuelve en 10 mL de solución salina estéril. Una vez escogidas las diluciones se debe inocular

una alícuota sobre el medio sólido o líquido hasta observar crecimiento micelial. Al obtener una cantidad de micelio adecuado se procede a replicar e incubar por lo general a 27°C (Brizuela et al., 1998; Langer, 2003).

1.3. Caracterización de hongos

Hoy en día la identificación de especímenes se da principalmente por el estudio de sus características morfológicas (macroscópicas y microscópicas), como por sus características moleculares, que le confieren un lugar en su clasificación taxonómica (Seifert, 2009).

1.3.1. Identificación morfológica

La identificación morfológica es la descripción de las características microscópicas y macroscópicas desarrolladas por los especímenes dentro de una determinada población de individuos en un hábitat específico. Dichas caracteres distintivos pueden ser organizados a través de claves taxonómicas siendo las más generales las dicotómicas. Guías visuales y otras fuentes bibliográficas también pueden ser útiles para llegar a clasificar taxonómicamente los organismos desde el punto de vista morfológico (Mata et al., 2006). En el caso directo de hongos Basidiomycetes se suelen medir las estructuras microscópicas como, hifas, basidias, cistidias, esterigmas y esporas (Largent et al., 1973; Leonard y Fechner, 2010; Tulloss, 2009).

1.3.2. Identificación molecular

En las últimas décadas, el desarrollo de herramientas de biología molecular han jugado un papel fundamental en la taxonomía moderna de los hongos y otros organismos. Existen varios marcadores moleculares que se aplican para identificar hongos a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Ayra, Cabrera, Gómez, y Hernández, 2001), la cual permite amplificar fragmentos específicos de ADN en una serie de repeticiones de ciclos a temperaturas determinadas (Costa, 2004). Uno de los marcadores moleculares ampliamente usados en la identificación de hongos y actualmente considerado como barcoding universal es la región ITS-5.8S de ADNrn (Schoch et al., 2012), debido principalmente a su fácil obtención y a la información existente en bases de datos que permiten establecer de mejor manera las relaciones filogenéticas a diferentes niveles e inclusive especie (Yang, Matheny, Ge, Slot, y Hibbett, 2005; Yang, 2011).

Adicionalmente existen otros marcadores que se aplican en la identificación de hongos como por ejemplo la subunidad grande (LSU) del gen 28S para ADNrn (Solé, 2004).

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sitio de muestreo y colecta

El muestreo se realizó en la Reserva Biológica San Francisco (RBSF), ubicada en la vertiente oriental de la Cordillera de El Consuelo (3°58'S, 79°04'W) en el norte del Parque Nacional Podocarpus (Zamora Chinchipe; Zona 7). El sitio se clasifica como un bosque inferior siempre verde y superior lluvioso montano caracterizado por la riqueza de plantas vasculares, criptógamas y epífitas (Beck, Bendix, Kottke, Makeschin, y Mosandl, 2008).

Los macrohongos se colectaron a lo largo del sendero T2 de la RBSF (transecto de 500 m de longitud por 2 m de ancho aproximadamente), que se encuentra entre los 1800 y 2200 m s.n.m. El tiempo de muestreo fue durante cinco meses, dos colectas por mes con una semana de diferencia. Las colectas se realizaron al azar buscando los hongos a cada lado y a lo largo del transecto, tomando como referencia ecológica si estos se encuentran creciendo directamente sobre el suelo, sobre hojas, ramas, troncos muertos y en descomposición. En total se muestreo 5 veces por sector debido a que los hongos son de vida efímera y muchas veces pueden o no encontrarse en el mismo lugar.

Se colectaron hongos jóvenes, como mínimo 2 a 4 cuerpos fructíferos por especie, asignándoles una ficha de información con su código respectivo en la que se incluye: datos del colector, lugar y fecha de colección, y una descripción rápida de las características macroscópicas más considerables. También se registró fotografías que muestran los detalles macroscópicos del espécimen.

El material colectado se analizó de preferencia en el mismo día en el laboratorio, y se seleccionó los especímenes para ser aislados así como un segmento pequeño para extracción de ADN. Finalmente, el resto de cuerpos fructíferos se dejaron secar para luego almacenarlos en funda de papel junto a su respectiva ficha de datos en el herbario HUTPL.

2.2. Aislamiento

Para el aislamiento, se colocó 2 segmentos de 5 mm² en medio de cultivo sólido estéril de *agar de extracto de malta* (MEA 3.36 %) o medio *agar papa dextrosa* (PDA 3.9 %) adicionando 0,5 % de cloranfenicol). La incubación fue a 27 °C, controlando su desarrollo en un periodo de 4 días en busca de similitudes morfológicas constantes, que nos den seguridad de haber obtenido un cultivo puro.

2.3. Caracterización molecular

Se extrajo ADN tanto de las fructificaciones como de los cultivos puros, aplicando el kit y protocolo estándar sugerido en DNeasy Plant Mini Kit extraction (Qiagen) (Anexo 1), para luego ser amplificado mediante la técnica de PCR.

Las condiciones de PCR constan de 35 ciclos empezando con una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos; seguido de cada ciclo que consiste de un paso de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos; temperaturas de anillamiento según la combinación de primers, (55 - 60 °C) por 30 segundos y extensión a 72 °C durante 2 min; y una extensión final a 72 °C por 10 min. El volumen de reacción de la PCR fue de 25 µL, con volúmenes de 22.5 µL de Platinum ® PCR Supermix de Invitrogen, y 0.5 µL de BSA (Suero de albumina bovino) al 10 % y 2 µL de ADN (Anexo 2).

El ADN de fructificaciones fue amplificado con el par de primers universales: *forward* ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'; White, Bruns, Lee, y Taylor, 1990) o ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'; White et al., 1990) combinado con el *reverse* NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG -3'; White et al., 1990).

En el caso de cultivos se evaluó directamente varias cepas aplicando la combinación de *primers* antes mencionada. No obstante por la obtención de secuencias de Ascomycetes se procedió a aplicar un primer *reverse* para Basidiomycetes el ITS4B (5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG -3'; White et al., 1990), y así amplificar la región ITS1-5.8S-ITS2.

La amplificación de ADN fue evaluada mediante electroforesis con gel de agarosa al 1 % (agar más solución 1X de Gel Red (Biotium) según norma de manufactura. Se tomó 3 µl de producto de PCR más 2 µl 5X Green GoTaq® Reaction Buffer y 1.5 µl de marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen), el corrido fue en buffer TBE 1X (Trisborato, EDTA). Las condiciones de corrida de electroforesis fueron 128 V, 300 mA durante 25 minutos. Los productos positivos fueron purificados usando el kit QIAquick PCR Purification Kit Protocol (Quiagen) (Anexo 3) y enviados a secuenciar a la empresa MacroGen (Seoul - Korea).

Previo al análisis filogenético todas las secuencias se editaron en el programa Codon Code Aligner V.4.2.4. Las secuencias fueron comparadas frente a secuencias de la base de datos

GenBank, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante búsqueda rápida de BLAST (Altschul y Madden, 1997).

2.4. Análisis filogenético

Los alineamientos obtenidos con nuestras secuencias permitieron generar varios árboles filogenéticos tanto para fructificaciones como para cultivos. Sin embargo varios árboles preliminares (no presentados) fueron inferidos por Neighbor-Joining (NJ) en el software MEGA V.5 con el fin único de filtrar secuencias que interferían en la generación de buenos soportes para los diferentes clados.

Finalmente se desarrolló tres árboles filogenéticos (**Figuras 5, 6 y 7**). El primer árbol (**Figura 5**) solamente fue generado para fructificaciones de Basidiomycetes con la región conservada LSU parcial (D1/D2) debido al gran número de secuencias pertenecientes a diferentes órdenes y géneros. Las secuencias ITS-5.8S obtenidas para las fructificaciones se utilizaran más adelante para generar filogenias independientes para cada género.

En el caso de cultivos de Basidiomycetes se obtuvo solamente secuencias (forward) para la región ITS-5.8S con lo cual se generó el segundo árbol (**Figura 6**). Sin embargo por la heterogeneidad del alineamiento en esta región, se procedió a eliminar las regiones ambiguas con el programa Gblocks Versión 0.91b (http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html).

El tercer árbol (**Figura 7**) fue generado con secuencias correspondientes a la región ITS-5.8S obtenidas de algunos cultivos contaminantes (Ascomycetes). Este alineamiento fue muy homogéneo en esta región, por lo cual no se aplicaron exclusiones.

Las filogenias fueron inferidas por medio del análisis *Maximun likelihood* empleando el software MEGA V.5, bajo los siguientes parámetros: 1000 réplicas de bootstrap (BS), modelo General time reversible (GTR) con la probabilidad de distribución Gama dentro de los sitios variantes (Felsenstein, 1985). Todos los alineamientos para este estudio se efectuaron usando la opción "GINS-i" implementada en MAFFT v5.667 (Katoh, Misawa, Kuma, y Miyata, 2002), sin realizar ninguna corrección manual del mismo.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Colección y aislamiento in vivo

Durante este estudio se colectaron 186 especímenes correspondientes a basidiomas o fructificaciones en su mayoría alojados sobre troncos caídos, ramas, hojas y madera en proceso de descomposición (**Figura 3**). La mayoría de estos hongos principalmente actúan en la descomposición de la materia orgánica siendo saprófitos y ayudando con el recambio en el ciclo de nutrientes de este bosque u ambiente (López, Vasco, y Franco, 2011).



Figura 3. Basidiomas colectados en su actividad descomponedora de materia orgánica: a) IR067F_*Gerronema* sp. b) IR079F_*Gymnopus* sp. c) IR082F_*Crepidotus* sp. d) IR028C_*Coriolopsis* sp. e) IR026C_*Crepidotus* sp. f) IR148C_*Campanella* sp.

De los 186 especímenes colectados solamente se usaron 131 especímenes para aislamiento, debido a que algunas muestras fueron escasas o algunas de ellas estuvieron muy viejas y en inicio de descomposición. De estos 131 especímenes se logró obtener 55 cultivos puros con características microscópicas para probables basidiomycetes e.g. micelio esterilia, estructuras monilioides o hifas en forma de “T” con ángulos cerca de 90° (Webster y Weber, 2007). Estos cultivos puros representan el 42 % de los 131 hongos, lo cual representa una efectividad de menos de la mitad de los aislamientos. Existen varias razones por las cuales obtuvimos un porcentaje tan bajo de efectividad, sin embargo mencionamos dos de ellas. Primero, los requerimientos nutricionales de los hongos ambientales, son superiores a los brindados por el medio sólido aplicado. Probablemente nuestro medio de cultivo es muy bajo en nutrientes, como por ejemplo, vitaminas u otros minerales que impiden el correcto crecimiento de estos Basidiomycetes (Stretton, Baker, Flentje, y McKenzie, 1964). Una segunda razón puede ser la especificidad de sustrato u hospedero. Las fructificaciones colectadas de basidiomycetes están sobre sustratos como suelo, hojarasca etc. Sin embargo, no determinamos si estos a su vez están asociados a raíces de plantas vasculares por medio de su micelio. Es así que existe una alta probabilidad de que muchos de nuestros hongos sean micorrízicos de alguna planta. Por lo que muy difícilmente crecerán sin cumplir sus condiciones medioambientales (Smith y Read, 2008).

El 58 % de aislados restantes presentaron características como por ejemplo *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Pestalotiopsis* spp. o *Fusarium* spp. (**Figura 4**), por lo que los denominamos como contaminantes. Nosotros atribuimos este alto crecimiento de ascomicetos a que los hongos colectados provienen de un bosque lluvioso tropical donde la diversidad de organismos es impresionante y muchos de ellos están en contacto directo, con bacterias, mohos, esporas etc., difícilmente eliminadas con un simple lavado de nuestra muestra (Brundrett, 2004; Pfenning y Abreu, 2000).

Los hongos ascomicetos, a pesar de no ser los aislados correspondientes a fructificaciones de basidiomycetes de donde se los aisló, se los mantiene debido a que pueden poseer usos potenciales en aplicaciones biotecnológicas o industriales.

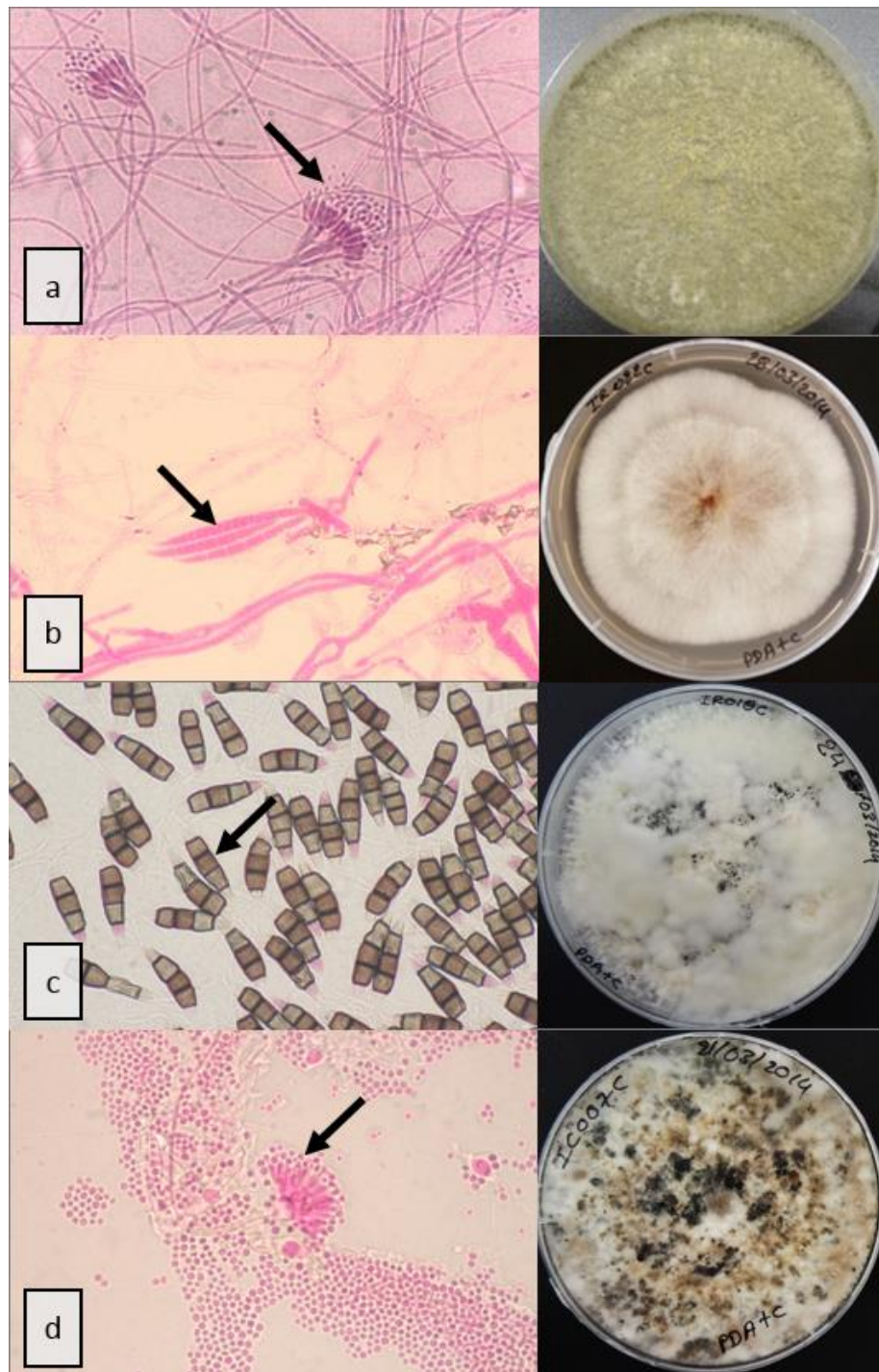


Figura 4. Ascomycetes en cultivo puro, junto a su tinción con floxine al 0.1 % a) IR066C_*Penicillium*_sp. b) IR022C_*Fusarium*_sp., c) IR018C_*Pestalotiopsis*_sp., d) IC007C_*Aspergillus*_sp. Las conidias son indicadas con flechas negras. Fotos microscópicas se realizan a un aumento de 1000X con objetivo de 100X.

3.2. Caracterización molecular

El ADN total proveniente de 131 fructificaciones y de 55 cultivos puros fue depurado y editado hasta obtener 60 secuencias con similitud del 99 % y el 100 % de cobertura en BLAST para ser consideradas de buena calidad: 34 para la región ITS-5.8S y 26 para la región LSU parcial (D1/D2). Al rededor del 55 % de las muestras totales de ADN no proporcionaron secuencias con similitud alguna en BLAST y por ello podrían ser especímenes no registrados o secuencias de mala calidad. Para estos casos, será necesario hacer en lo posterior una re amplificación a partir del ADN total.

Las regiones anteriormente nombradas sirven para discriminar diferentes organismos eucariotas a diferentes niveles como por ejemplo Ordenes, Familias, Géneros e inclusive especies (Hildén et al., 2008). Es así que el espaciador ITS se lo ha denominado como el marcador universal para hongos (Schoch et al., 2012; Seifert, 2009). No obstante dicho espaciador muchas veces es altamente heterogéneo y difícil de alinear (Hildén et al., 2008; Van den Berg et al., 2000) provocando dificultades en estudios de diversidad y delimitación de especies (Cruz, Suárez, Kottke, y Piepenbring, 2014; Cruz, Suárez, Kottke, Piepenbring, y Oberwinkler, 2010). En el otro lado el marcador LSU por ser considerado altamente conservado, permite realizar análisis de diversidad o riqueza a niveles más amplios incluyendo varios órdenes, familias y géneros sin ser afectados por la variabilidad genómica de especies (Dentinger et al., 2010; Kottke et al., 2010). Inclusive esta región puede ser utilizada en la definición de especies según el grupo de hongos que se estudie, por ejemplo Sebaciales, Basidiomycota (Setaro, Garnica, Herrera, Suárez, y Göker, 2011).

Nuestros resultados filogenéticos de LSU parcial (D1/D2) a partir de fructificaciones (**Figura 5**) sugiere una alta diversidad de especies de hongos ubicados en varios géneros pertenecientes a 4 ordenes (Agaricales, Boletales, Geastrales y Polyporales) donde se incluyen 13 familias que se sustentan con valores estadísticos entre 80 a 90 %. Los Agaricales constituyen el orden más diverso, con nueve de las 13 familias (**Figura 5**), dentro de las cuales se resaltan las familias Agaricaceae y Omphalotaceae; por lo que contienen varias secuencias pertenecientes a diferentes especies de al menos cuatro géneros (no definidos). Los Boletales presentan dos familias (Tapinellaceae y Bolitenalceae). Seguidos finalmente por los ordenes Geastrales y Polyporales con una familia Geastraceae y Poliporaceae, respectivamente. Esta alta diversidad a nivel de géneros, familias y ordenes son un indicativo de que existen muchos hongos

presentes en los bosques tropicales lluviosos como se lo ha demostrado en otros estudios de los trópicos (Piepenbring, 2007).

Sin embargo, nuestro análisis de LSU parcial, no nos permite llegar a definir especies por varias razones. No para todas las secuencias obtenidas, disponemos de secuencias relacionadas en las bases de datos de genes, como es el caso del GenBank. Además no todas las fructificaciones pudieron ser identificadas de manera morfológica, por lo cual nos queda la incertidumbre sobre si nuestros especímenes corresponden a especies ya descritas en otras partes del mundo (Cepero et al., 2012) o si es que representan nuevas especies para los trópicos y el Ecuador. Nuestros análisis preliminares de definición morfológica en varias ocasiones fue contrastada correctamente con los datos moleculares. Es así el caso de varias morfoespecies como *Oudemansiella cf. canarii*, *Agaricus*, *Tapinella*, *Mycena* etc. coinciden o se agrupan dentro sus respectivas familias validadas internacionalmente en el Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

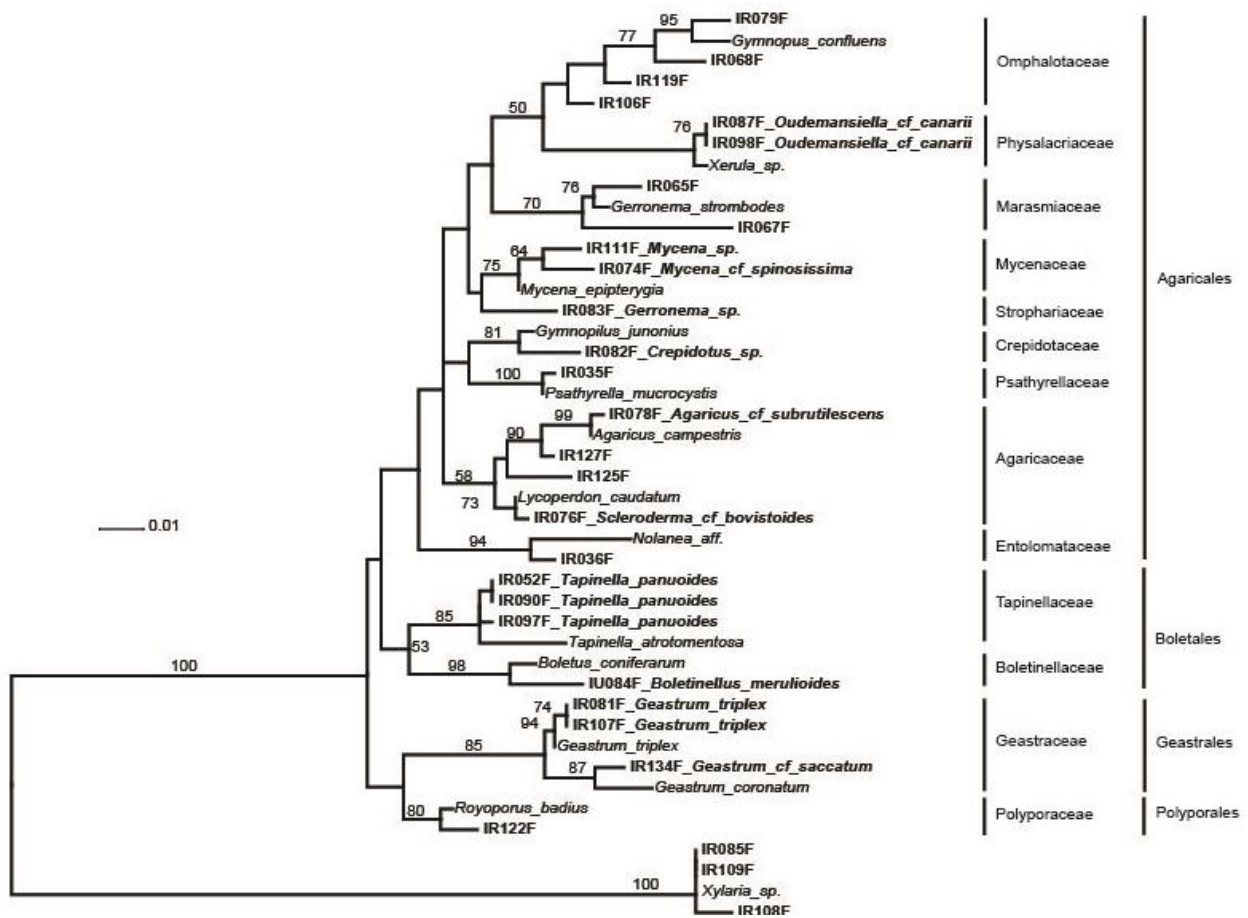


Figura 5. Hipótesis filogenética para la región LSU (D1/D2) obtenida con secuencias de fructificaciones mediante un ML. El árbol muestra la diversidad de Basidiomycetes en la RBSF. El árbol fue enraizado con *Xylaria* spp. como grupo externo. Los nombres en negrilla corresponden a secuencias obtenidas en este estudio.

Desde los cultivos se obtuvo secuencias para la región ITS-5.8S; 12 secuencias correspondieron a miembros de Basidiomycetes y 22 secuencias que correspondieron a miembros de Ascomycetes.

Las 12 secuencias de Basidiomycetes se alinearon de forma heterogénea por lo que se excluyó un 30 % del alineamiento total por medio del programa Gbloks. El 70 % restante permitió obtener el árbol filogenético (**Figura 6**) con soportes superiores a 63 % para los nodos. Nuestros resultados muestran principalmente dos grandes ordenes (Agaricales y Polyporales) con soportes de 97 y 95 % respectivamente. Dentro de estos tres ordenes se ubican tres familias Phanerochaetaceae, Polyporaceae y Omphalotaceae. De las cuales solamente las

familias Omphalotaceae y Polyporaceae también están presentes en la filogenia desde fructificaciones. Esto nos sugiere que algunos de nuestros cultivos puros si provienen de las mismas fructificaciones de basidiomycetes de donde se los aisló, como lo es el caso del cultivo de código IR079c que fue aislado desde el basidioma de código de colecta IR079 y que a su vez de éste se obtuvo la secuenciación del ADN de la fructificación con código IR079f, el cual fue morfológicamente denominado *Gymnopus confluens* sinónimo de *Gymnopus collybioides* dentro de la familia Omphalotaceae (Mata, Halling, y Petersen, 2004).

Por otra parte las secuencias desde los cultivos IR110c; IR128c; IR127c e IR152c corresponden a miembros de la familia Phanerochaetaceae, y las secuencias obtenidas a partir desde sus fructificaciones fueron consideradas de mala calidad. Por esta razón los datos moleculares solo se presentan para cultivos. Especies de hongos de esta familia son ampliamente reportados como potencialmente útiles en biotecnología industrial por su capacidad de degradación de lignina y la remoción de cianuro principalmente (Sáiz, 1983; Triana y Veloza, 2005).

De forma general especies de hongos Polyporales como Agaricales se los reporta con altos potenciales en la alimentación o industrialmente ya que son muy usados como comestibles y algunos usados de forma medicinal (Mejía y Gamboa, 2010; Montoya et al., 2010; Ortiz, 2010). Algunas especies de Agaricales poseen gran importancia forestal al vivir en simbiosis con las raíces de los árboles, poseen una distribución cosmopolita y algunas especies son comestibles (Valenzuela et al., 1996), por lo que nuestros cultivos pueden ser empleados en estudios retrospectivos como para comprender los procesos biológicos que se generan en el área.

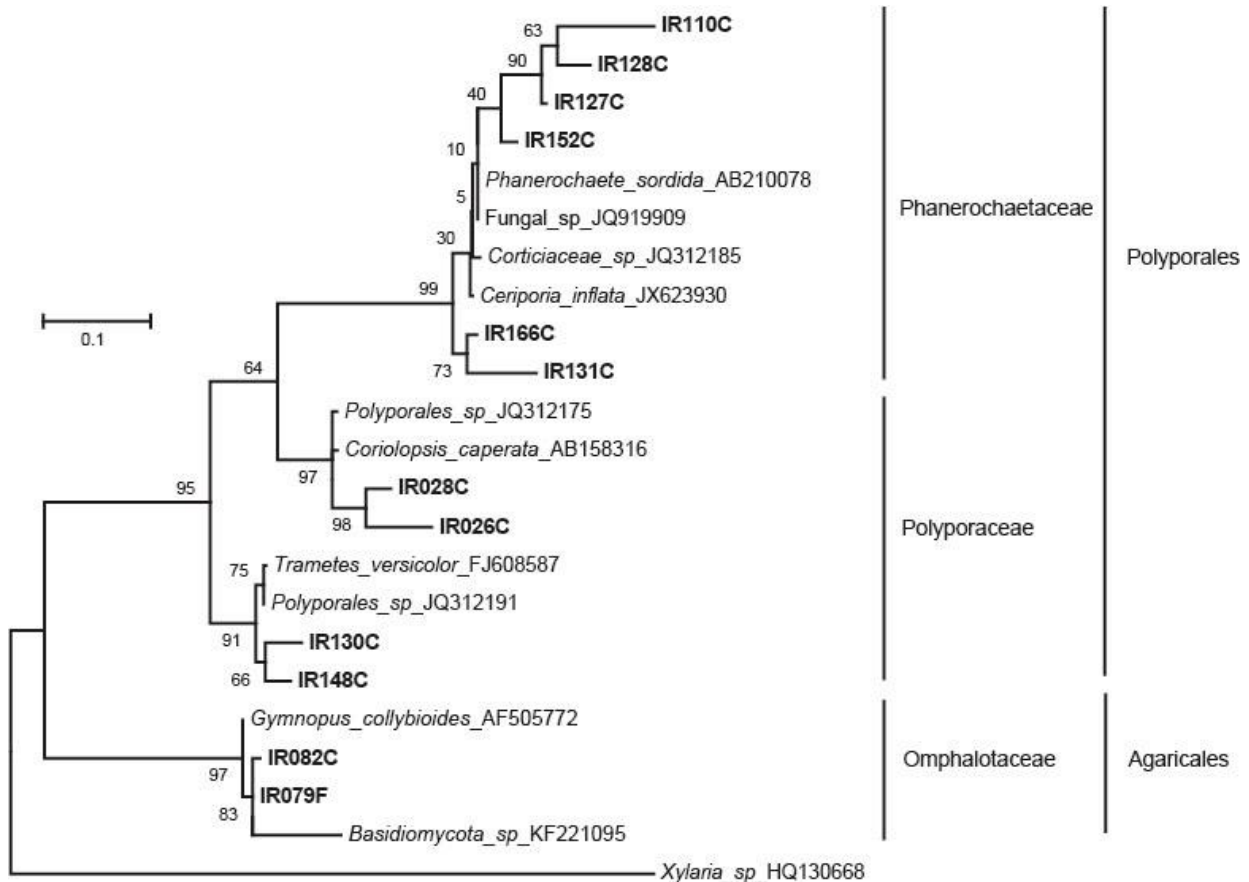


Figura 6. Hipótesis filogenética para la región ITS1-5.8S (ITS1-5.8S-ITS2) obtenida con secuencias de cultivos puros de Basidiomycetes mediante un ML. El árbol fue enraizado con *Xylaria* sp. HQ130668 como grupo externo. Los nombres en negrilla corresponden a secuencias obtenidas en este estudio.

En cuanto a las 22 secuencias de Ascomycetes para la región ITS-5.8S, se obtuvo un alineamiento homogéneo, por lo que no se aplicó exclusiones. Los clados en el árbol filogenético (**Figura 7**) se soportan con valores de similitud superiores al 53 %. Al igual que los Basidiomycetes, este grupo presenta una alta diversidad. Se pueden reconocer tres órdenes Diaporthales; Hypocreales y Xylariales que contiene seis familias (**Figura 7**).

Hypocreales se presenta como el orden más diverso conteniendo tres de las siete familias. Varias especies dentro de este grupo se han considerado importantes económicamente, ya que incluye especies patógenas parásitas de plantas y animales, otras que por sus metabolitos sirven para la industria de medicamentos. Varios especímenes (como IR087c; IR090; IR067, etc.) se agrupan claramente con especies del género *Trichoderma* que se los considera importantes como biocontroladores de plagas de insectos u hongos ya que producen

metabolitos secundarios, entre ellos alcaloides tóxicos para insectos tales como peramina y lolina, y alcaloides tóxicos para vertebrados (Schardl, 2001).

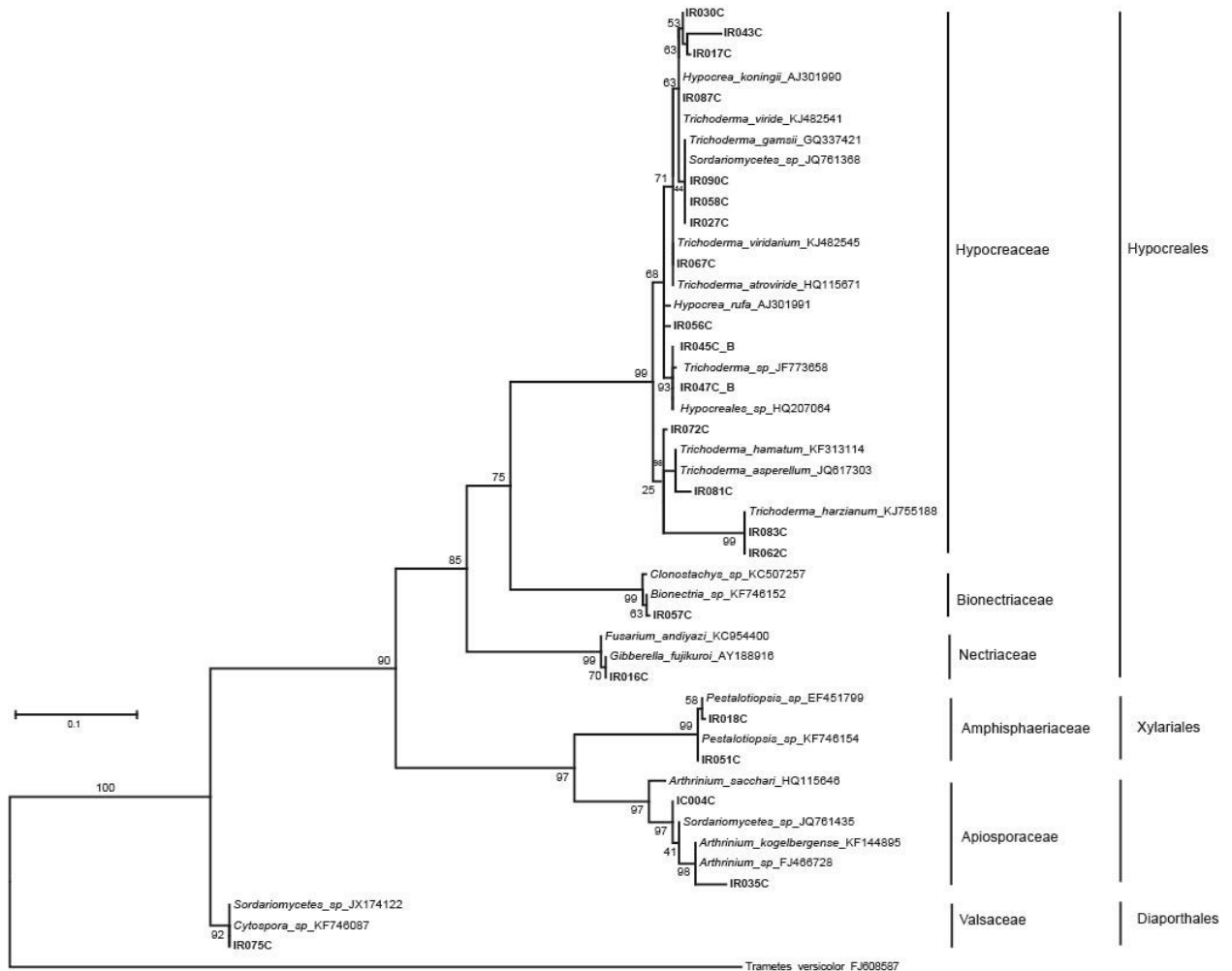


Figura 7. Hipótesis filogenética para la región ITS1-5.8S (ITS1-5.8S-ITS2) obtenida con secuencias de cultivos puros de Ascomycetes mediante un ML. El árbol fue enraizado con *Trametes versicolor* sp. como grupo externo. Los nombres en negrilla corresponden a secuencias obtenidas en este estudio.

El hecho de haber aislado un 50 % de hongos Ascomycetes en nuestros cultivos puros, nos sugiere que la metodología de aislamiento directo no es la más adecuada especialmente para hongos encontrados en bosques tropicales lluviosos donde la diversidad de hongos y otros microorganismos es extensa y por demás desconocida. Esto deja reales y altas probabilidades de obtener contaminates. Sin embargo mucha de esta contaminación especialmente por bacterias fue efectivamente controlada por el cloroanfenicol. Así mismo, el cloroanfenicol limita

el crecimiento de mohos, los cuales tampoco fueron observados en nuestros aislamientos (Flórez, Armijo, y Mediavilla, 1997).

CONCLUSIONES

Nuestro trabajo nos muestra que la diversidad es rica y abundante en bosques tropicales aunque fuertemente desconocida. Las herramientas moleculares nos apoyaron para contrastar algunos géneros, familias y ordenes y menormente a nivel de especie. Es necesario a futuro desarrollar nuevos análisis detallados a nivel de género y especie unificando regiones genéticas como ITS y LSU parcial, ya que como experiencia personal, el Barcode para los hongos aun no es categórico al identificar a nivel de especie. Este trabajo es apenas el inicio del trabajo que se pretende realizar monitoreando e inventariando la diversidad de la zona sur del Ecuador. Estamos aportando con el incremento de la colección del fungario HUTPL y además aportando con secuencias que a futuro servirán para contrastar la diversidad existente en los trópicos. Sin embargo, además de los datos moleculares, debemos poner esfuerzos en la caracterización morfológica que es de vital importancia en la definición de los taxones. Solamente integrando la mayor cantidad de evidencias lograremos entender mejor nuestros ecosistemas y sus especies.

Nuestra técnica empleada para aislamiento fue el factor que no permitió el desarrollo de los basidiomas inoculados en el medio sólido y por el contrario se desarrollaron otros microorganismos que se encontraron en la superficie del mismo o tal vez de forma patógena o simbiótica, para lo cual es necesario aplicar una técnica de desinfección en próximos estudios.

RECOMENDACIONES

Aumentar y mantener muestreos en zonas tropicales con una técnica estandarizada (esfuerzos, cantidad y tiempo de colección) para facilitar el empleo de modelos matemáticos y estadísticos que cuantifiquen los resultados para evaluar la diversidad y riqueza. También es necesario implementar personal al Fungario-HUTPL (taxónomos) para obtener la información de los especímenes que ya éste contiene y que poco a poco se va acumulando sin proporcionar toda la información de cada espécimen que ha ingresado a formar parte del fungario.

Es necesario emplear otras técnicas de aislamiento y cultivo a partir de muestras frescas ya que factores como la humedad y la diversidad de los bosques tropicales proporcionan gran “contaminación” al momento de inocular directamente en el medio sólido, se podría usar métodos de esporulación, dilución de esporas o procedimientos de desinfección más agresivos para los “contaminantes”.

La filogenia es una herramienta muy importante en este tipo de estudios ya que ayuda a los que no somos técnicos taxónomos a identificar a los organismos molecularmente con precisión pero se necesita el crecimiento de los bancos de datos, para lo cual es necesario aportar la información genética obtenida con ética y responsabilidad.

Queda disponible para nuevos estudios un re análisis filogenético a nivel de género para regiones ITS y LSU ya que es posible encontrar nuevas especies presentes en la RBSF y que probablemente se encuentren en el banco de cepas puras que se logró aislar, también estudios de bioprospección en cuanto a este banco de cepas ya que presentan características alotípicas que pueden ser analizados para metabolitos secundarios o el aprovechamiento de los pigmentos que algunos presentan.

REFERENCIAS

- Alonso, J. (1998). Conceptos básicos sobre macromicetos. (pp. 1–59). España.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402.
- Álvarez, C. (2012). Identificación y caracterización bioquímica, morfológica y molecular de microorganismos cultivables asociados a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla (p. 173). Medellín - Colombia: Facultad de Ciencias - Universidad Nacional de Colombia.
- Andrade, J. M., Malagón, O., Piepenbring, M., and Armijos, C. (2012). Etnomicología y valor nutricional de macrohongos silvestres de la comunidad indígena saraguro en el sur del Ecuador. Dpto. de Química, Sección de Procesos, Universidad Técnica Particular de Loja, 193–202.
- Arenas, R. (2003). *Micología médica ilustrada*. McGraw-Hill Interamericana, 17–33.
- Arias, E., and Piñeros, P. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Trabajo de Grado. Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Industrial. (p. 204). Bogotá - Colombia.
- Ayra, L., Cabrera, I., Gómez, M., and Hernández, D. (2001). Empleo de marcadores bioquímicos y de DNA en la caracterización molecular de hongos entomopatógenos. Dpto. de Ácaros Y Hongos Entomopatógenos, Instituto de Investigaciones En Fruticultura Tropical (IIFT). Habana.
- Beck, E., Bendix, J., Kottke, I., Makeschin, F., and Mosandl, R. (2008). The Ecosystem (Reserva Biológica San Francisco) In: Beck, Erwin Bendix, Jörg Kottke, Ingrid Makeschin, Franz Mosandl, Reinhard Gradients in a Tropical Mountain Ecosystem of Ecuador. *Ecological Studies*, 198. (E. Beck, J. Bendix, I. Kottke, F. Makeschin, and R. Mosandl, Eds.) (Vol. 198, p. 524). M.M. Caldwell, Washington, USA G. Heldmaier, Marburg, Germany R.B. Jackson, Durham, USA O.L. Lange, Würzburg, Germany H.A. Mooney, Stanford, USA E.-D. Schulze, Jena, Germany U. Sommer, Kiel, Germany: Springer - Berlin.
- Berne, S., Pohleven, F., Turk, T., and Sepčić, K. (2008). Induction of fruiting in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) by polymeric 3-alkylpyridinium salts. *Mycological Research*, 112(Pt 9), 1085–7. doi:10.1016/j.mycres.2008.03.009
- Brizuela, M., García, L., Pérez, L., and Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol*, 69–74.
- Brundrett, M. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, (134), 275–304.

- Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79(3), 473–95.
- Brundrett, M. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*, 320(1-2), 37–77. doi:10.1007/s11104-008-9877-9
- Calle, J., and Rivera, L. (2005). Caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos de suelo e identificación de bacterias foliares en el cultivo de cebolla. Universidad de Puerto Rico.
- Cepero, M. C., Restrepo, S., Franco-Molano, A. E., Cárdenas, M., and Vargas, N. (2012). *Biología de Hongos*. (E. Uniandes, Ed.) (pp. 1–520). Bogota - Colombia.
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 22(5), 299–305. doi:10.1157/13059826
- Cruz, D., Suárez, J. P., Kottke, I., and Piepenbring, M. (2014). Cryptic species revealed by molecular phylogenetic analysis of sequences obtained from basidiomata of *Tulasnella*. *Mycologia*, 106(4), 1–15. doi:10.3852/12-386
- Cruz, D., Suárez, J. P., Kottke, I., Piepenbring, M., and Oberwinkler, F. (2010). Defining species in *Tulasnella* by correlating morphology and nrDNA ITS-5.8S sequence data of basidiomata from a tropical Andean forest. *Mycological Progress*, 10(2), 229–238. doi:10.1007/s11557-010-0692-3
- Cubas, P. (2007). *Hongos*. Botánica.
- Dennis, R. W. G., and Ainsworth, G. S. (1962). *Dictionary of the Fungi*. *Kew Bulletin* (Vol. 15, p. 418). doi:10.2307/4115605
- Dentinger, B. T. M., Ammirati, J. F., Both, E. E., Desjardin, D. E., Halling, R. E., Henkel, T. W., ... McLaughlin, D. J. (2010). Molecular phylogenetics of porcini mushrooms (*Boletus* section *Boletus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(3), 1276–92. doi:10.1016/j.ympev.2010.10.004
- Espadas, M., and Zita, G. (2005). *Manual de laboratorio de fitopatología*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan Departamento de Ciencias Agrícolas, 46.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783–791.
- Flórez, J., Armijo, J., and Mediavilla, Á. (1997). *Farmacología humana* (3ª Edición., pp. 1130–1144). Barcelona - España: Masson, S.A.

- García, M., Cappello, S., Leshner, J., and Molina, R. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *metarhizium anisopliae*, 21–28.
- García, V. G., Onco, M. A. P., and Susan, V. R. (2006). Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*, 4, 55–79.
- Guerra, C., Azevedo, T., de Souza, M., Rego, L., de Dantas, J., Silva, F., ... Leite, E. (2007). Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of beta-glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. *International Immunopharmacology*, 7(9), 1160–9. doi:10.1016/j.intimp.2007.04.010
- Harborne, J. B. (2001). *Illustrated Dictionary of Mycology*. Phytochemistry. doi:10.1016/S0031-9422(00)00436-2
- Haro, J., and Melic, A. (2002). Clasificación de los microorganismos.
- Haug, I., Wubet, T., Weiß, M., Aguirre, N., Weber, M., Günter, S., and Kottke, I. (2010). Species-rich but distinct arbuscular mycorrhizal communities in reforestation plots on degraded pastures and in neighboring pristine tropical mountain rain forest, 51(2), 125–148.
- Hawksworth, D. (1989). Interacciones Hongo-Alga en simbiosis líquénicas y líquenoides, 13.
- Hawksworth, D. (1997). Fungi and international biodiversity initiatives. *Biodiversity and Conservation*, 668, 661–668.
- Herrera, T., and Ulloa, M. (1990). *El reino de los hongos*. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(Pt 5), 509–47. doi:10.1016/j.mycres.2007.03.004
- Hildén, K., Bortfeldt, R., Hofrichter, M., Hatakka, A., and Lundell, T. (2008). Molecular characterization of the basidiomycete isolate *Nematoloma frowardii* b19 and its manganese peroxidase places the fungus in the corticioid genus *Phlebia*. *Microbiology (Reading, England)*, 154(Pt 8), 2371–9. doi:10.1099/mic.0.2008/018747-0
- Hood, I. (2006). The mycology of the Basidiomycetes. *ACIAR Proceedings*, 7–9.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059–66.
- Kottke, I., and Suárez, J. (2010). Atractiellomycetes belonging to the “rust” lineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. ... of the Royal ..., 277(1685), 1289–98. doi:10.1098/rspb.2009.1884

- Kottke, I., Suárez, J. P., Herrera, P., Cruz, D., Bauer, R., Haug, I., and Garnica, S. (2010). Atractiellomycetes belonging to the “rust” lineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 277(1685), 1289–98. doi:10.1098/rspb.2009.1884
- Langer, E. (2003). *Mycological Course UTPL* (pp. 3–15). Loja - Ecuador.
- Leonard, P., and Fechner, N. (2010). *A Guide to Collecting and Preserving Fungal Specimens for the Queensland Herbarium* (2010th ed., p. 48). Queensland: Department of Environment and Resource Management.
- López, C., Vasco, A., and Franco, A. (2011). Nuevos registros de macromicetos de Colombia I. macromicetos recolectados en zonas urbanas de Medellín (Antioquia), 33(95), 261–274.
- Márquez, M. S. (2009). Estudio de la micobiota endofítica asociada a las gramíneas: *Dactylis glomerata*, *Holcus lanatus*, *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*.
- Mata, J., Halling, R., and Petersen, R. (2004). New species and mating system reports in *Gymnopus* (Agaricales) from Costa Rica. *Fungal Diversity*, 113–129.
- Mata, M., Umaña, L., and Chaves, J. Luis. (2009). Protocolo para la recolecta, descripción, identificación y mantenimiento de hongos. *InBio Costa Rica* (pp. 1–29). Costa Rica.
- Mejía, P., and Gamboa, P. (2010). Guía ilustrada macrohongos útiles de la comunidad Shuar Wisui, Amazonía Ecuatoriana (p. 3).
- Montoya, S., Gallego, J., Sucerquia, Á., Peláez, B., Betancourt, Ó., and Arias, D. (2010). Macromicetos observados en bosques del departamento de caldas: su influencia en el equilibrio y la conservación de la biodiversidad, 14(2), 57–73.
- Ortiz, M. (2010). Macromicetos en Zona Rural de Villavicencio. *Orinoquia*, 14(2), 125–132.
- Pfenning, L., and Abreu, L. (2000). Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas. *Ineccc.gob.mx*, 243–280.
- Piepenbring, M. (2007). Inventoring the fungi of Panama. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 73–84. doi:10.1007/s10531-006-9051-8
- Pitt, J. I., and Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage. Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki* (Third Edit., p. 524). Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-0-387-92207-2
- Quintero, J., Feijoo, G., and Lema, J. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos Basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae (Medellín)*, 13(53), 61–67.

- Raven, P., and Johnson, G. (2002). Fungi. In *Biology* (6th Editio., pp. 719–732). Boston: McGraw-Hill Interamericana.
- Ruiz, R., and Rengifo, L. (1993). Aislamiento y cultivo del hongo comestible *Pleurotus* afin *ostreatus* (jacq. ex Fr) Kumm en Tingo Maria. *Folia Amazonica*, 5, 1–12.
- Sáiz, C. (1983). Posibles aplicaciones del hongo *Phanerochaete chrysosporium* Burds. en Biotecnología. *Experimental'noi I Teoreticheskoi Fiziki'*, 2–9.
- Schardl, C. L. (2001). *Epichloë festucae* and related mutualistic symbionts of grasses. *Fungal Genetics and Biology* : FG and B, 33(2), 69–82. doi:10.1006/fgbi.2001.1275
- Schoch, C. L., Seifert, K. a, Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., and Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6. doi:10.1073/pnas.1117018109
- Seifert, K. a. (2009). Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*, 9 Suppl s1, 83–9. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02635.x
- Setaro, S. D., Garnica, S., Herrera, P. I., Suárez, J. P., and Göker, M. (2011). A clustering optimization strategy to estimate species richness of *Sebacinales* in the tropical Andes based on molecular sequences from distinct DNA regions. *Biodiversity and Conservation*, 21(9), 2269–2285. doi:10.1007/s10531-011-0205-y
- Smith, J., Rowan, N., and Sullivan, R. (2002). *Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical*. University of Strathclyde (p. 273).
- Smith, S., and Read, D. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. (Third edit., p. 815). Great Britain: Elsevier Ltd.
- Solé, M. (2004). *Caracterización morfológica y molecular de hongos queratinofílicos: el orden Onygenales*. Universitat Rovira I Virgili.
- Stretton, H. M., Baker, K. F., Flentje, N. T., and McKenzie, A. (1964). Formation of basidial stage of some isolates of *Rhizoctonia*. *Phytopathology*.
- Suárez, C. (2010). Obtención in vitro de de micelio de hongos comestibles, Shiitake (*Lentinula edodes*) Y Orellanas (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) a partir de aislamientos de cuerpos fructíferos, para la producción de semilla. Universidad Nacional de Colombia.
- Suárez, J., Weiss, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., and Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research*, 110(Pt 11), 1257–70. doi:10.1016/j.mycres.2006.08.004

- Suárez, J., Weiß, M., Abele, A., Oberwinkler, F., and Kottke, I. (2008). Members of Sebaciales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycological Progress*, 7(2), 75–85. doi:10.1007/s11557-008-0554-4
- Triana, W., and Veloza, B. (2005). Utilización del hongo *Phanerochaete chrysosporium* para la remoción de cianuro en reactores de carga secuencial para la industria de recubrimientos electrolíticos (Galvanotécnica). Universidad de la Salle Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria Bogotá D.C.
- Tulloss, R. (2009). *Amanita magniverrucata* — revision of an interesting species of *Amanita* section *Lepidella*. *Mycotaxon*, 108(June), 93–104.
- Valenzuela, E., Ramirez, C., Moreno, G., Polette, M., Garnica, S., Peredo, H., and Grinbergs, J. (1996). Agaricales más comunes recolectados en el Campus Isla Teja de la Universidad Austral de Chile, 17(1), 51–63.
- Van den Berg, C., Higgins, W., Dressler, R., Whitten, M., Soto, M., Culham, A., and Chase, M. (2000). A phylogenetic analysis of Lealinae (Orchidaceae) based on sequence data from Internal Transcribed Spacers (ITS) of Nuclear Ribosomal DNA. *Lindleyana*, 15(2), 96–114.
- Webster, J., and Weber, R. (2007). *Introduction to fungi* (Third Edit., pp. 1 – 875). New York.
- White, T., Bruns, T., Lee, B., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand H, Sninsky JS, White TJ (eds) *PCR-protocols and applications: a laboratory manual*. Academic, San Diego, 315 – 322.
- Whittaker, R. H. (1969). New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science*, 163, 150–160. doi:10.1126/science.163.3863.150
- Yang, Z. L. (2011). Molecular techniques revolutionize knowledge of basidiomycete evolution. *Fungal Diversity*, 50(1), 47–58. doi:10.1007/s13225-011-0121-1
- Yang, Z. L., Matheny, P. B., Ge, Z.-W., Slot, J. C., and Hibbett, D. S. (2005). New Asian species of the genus *Anamika* (euagarics, hebelomatoid clade) based on morphology and ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, 109(11), 1259–1267. doi:10.1017/S0953756205003758

ANEXOS

Anexo 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN: DNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen:

Previo: Mantener el bloque calentador a 65°C, calentar el buffer AE a 65°C.

1. Rompa el tejido vegetal utilizando nitrógeno líquido hasta convertirlo en un fino polvo usando micropestles.
2. Añada 400 µl de buffer AP1 y 4 µl de RNAasa solución stock (100 mg/µl) a un máximo de 100 µg tejido peso húmedo a 20 µg peso seco y mézclelo por vortex vigoroso.
3. Incube la mezcla por 10 min a 65 °C. Mezcle 2-3 veces durante la incubación invirtiendo el tubo.
4. Añada 130 µl de buffer AP2 para lisar, mezcle e incube en hielo por 5 minutos. Opcional: centrifugue el lisado por 5 min a máxima velocidad.
5. Vierta el lisado en una columna lila colocada en un tubo de colección de 2 mL y centrifugué por 2min a máxima velocidad.
6. Transfiera la fracción sobrenadante del paso 5 a un nuevo tubo (no incluido) sin alterar el pelet de células.
7. Añada 1.5 volúmenes de buffer AP3/E a producto del paso 5 y mezcle por pipeteo.
8. Aplique 650 µl de la mezcla del paso 7, incluido cualquier precipitado que se pueda haber formado, a una columna blanca colocada en un tubo de colección de 2 mL. Centrifugue por 1 min a 6000 g (8000 rpm) y descartar el sobrenadante.
9. Repita el paso 8 con el resto de la muestra. Descarte el sobrenadante y el tubo de colección.
10. Coloque la columna blanca en un nuevo tubo de colección y añada 500 µl de buffer AW a la columna y centrifugue por 1 min a 6000 g (8000 rpm). Elimine el sobrenadante y reutilice el tubo de colección en el paso 11.
11. Añada 500 µl de buffer AW a la columna blanca y centrifugue por 2 min a máxima velocidad para secar la membrana.

12. Transfiera la columna a un nuevo tubo de micro-centrífuga de 1.5 o 2 mL (no incluido) y pipetee 50 μ l de buffer AE precalentado a 65°C directamente en la membrana. Incube por 5 min a temperatura ambiente y centrifugue por 1 min a

6000 g (8000 rpm). Para incrementar la concentración final del ADN se puede reducir la cantidad de buffer AE.

13. Repita el paso anterior. Deseche la columna y guarde el ADN en el congelador a 20°C.

Anexo 2. PROTOCOLO DE PCR: para polimerasa Platinum® PCR Super Mix

PROTOCOLO DE PCR

Número: / FECHA: /

NOMBRE: Oscar Flores L.

N / COD	Descripción	Dil.
A1		
A2		
A3		
A4		
A5		
A6		
A7		
A8		

N / COD	Descripción	Dil.
B1		
B2		
B3		
B4		
B5		
B6		
B7		
B8		

N / COD	Descripción	Dil.
C1		
C2		
C3		
C4		
C5		
C6		
C7		
C8		

Bio Rad :
Programa Termociclador:
A&B :

	x 1 (25uL)	x
Platinum® PCR Super Mix	22,5 uL	
Primers ITS1 (10uM)	0,7 uL	
Primers ITS4B (10uM)	0,7 uL	
BSA 10%	0,4 uL	
DNA Template	uL	
Total	uL	

+2 uL de DNA por reacción = 25 uL

N°	Descripción	94°C	3:00
1	Desnaturalización inicial		
2	N° ciclos touch down		
3	Desnaturalización		
4	Anillamiento		
5	Extensión		
6	N° ciclos constantes		35
7	Desnaturalización	94°C	0:30
8	Anillamiento	55°C	0:30
9	Extensión	72°C	2:00
10	Extensión Final	72°C	10:00
		4°C for ever	

UTPL CBCM. MICORRIZAS DE ORQUIDEAS. Ext. 2516

Bq. Darío Cruz

Anexo 3. PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR: QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen)

1. Agregar 5 volúmenes de buffer PB a 1 vol. del producto de PCR (250 μ l PB) y mezcle (vórtex). Esperar 5 min.
2. Colocar en una columna lila QIAquick con tubo de colección de 2 ml (proveído) y centrifugar 1 min a 13000 rpm.
3. Descartar el sobrenadante y rehusar el tubo más la columna.
4. Agregar 750 μ l de buffer PE a la columna QIAquick y centrifugar por 1 min a 13000 rpm.
5. Descartar el sobrenadante y centrifugar nuevamente
6. Desechar el sobrenadante y el tubo de colección y rehusar la columna.
7. Ubicar la columna QIAquick en un tubo de 1.5 ml (no incluido).
8. Adicionar 50 μ l de buffer EB.
9. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
10. Centrifugar, descartar la columna y almacenar el nuevo tubo que contiene el ADN.