



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Establecimiento de procedimientos para el aislamiento, cultivo y fermentación de hongos basidiomicetos colectados en bosque húmedo tropical.

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTORA: Romero Camacho, Estefanía Elizabeth

DIRECTOR: Cartuche Flores, Luis Emilio, M. Sc.

LOJA – ECUADOR

2015



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magíster.

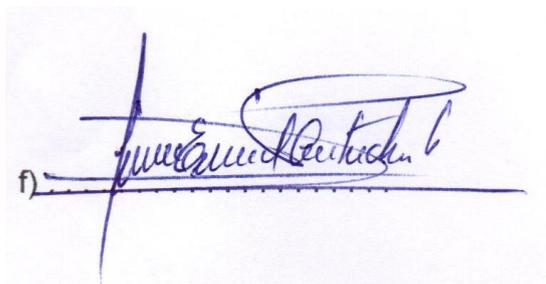
Luis Emilio Cartuche Flores.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **“Establecimiento de procedimientos para el aislamiento, cultivo y fermentación de hongos basidiomicetos colectados en bosque húmedo tropical”** realizado por **Romero Camacho, Estefanía Elizabeth**; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, octubre de 2015



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Romero Camacho Estefanía Elizabeth, declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “**Establecimiento de procedimientos para el aislamiento, cultivo y fermentación de hongos basidiomicetos colectados en bosque húmedo tropical**”, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Luis Emilio Cartuche Flores director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a 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. 88 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 investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.



f.

Autora: Romero Camacho Estefanía Elizabeth

Cédula: 0706575750

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de tesis a Dios por permitirme llegar hasta este punto de mi vida y haberme concedido salud para lograr mis objetivos, por darme la oportunidad de vivir y estar conmigo en cada paso que doy, ayudándome diariamente sin que nada ni nadie afecte mi personalidad, principios y valores. Además por obsequiarme la dicha de tener tantas personas virtuosas en mi vida como mi familia y amigos que han sido mi soporte, mi compañía día a día y han intervenido para hacer de mí una mejor persona.

A mis padres principalmente ya que gracias a su lucha constante, su sacrificio y gran esfuerzo me han permitido llegar hasta esta fase de mis estudios, siempre con su apoyo, ayuda y sobre todo por creer en mí y entregarme su confianza.

A cada uno de los integrantes de mi familia, a los que siguen a mi lado y los que guían mis pasos desde el cielo, por su amor incondicional y porque cada uno a su manera ha estado siempre presente y me han sabido apoyar incondicionalmente tanto en mis proyectos estudiantiles como en los de mi vida diaria.

A mis amigos, ya que la palabra amigo es algo muy difícil de representar, pero ellos me han sabido brindar su amistad verdadera que posee un valor incalculable, con los que he acumulado inmensos recuerdos atesorados, a los que conocí en varios momentos y tipos de circunstancias, escuela, colegio, universidad, y en diferentes días de mi vida, y que aún permanecen cultivando y haciendo creciente nuestra amistad.

A mis maestros y profesores que han estado presentes en diferentes etapas de mi vida sabiendo impartir sus enseñanzas que han ayudado al desarrollo de mi intelecto y conocimientos. Principalmente a los que han intervenido en mi formación profesional y en la elaboración de esta tesis al haber compartido su tiempo y su guía.

AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar a Dios por cada día de vida obsequiado, por la vitalidad de seguir adelante, por su sabiduría y guía en el mundo.

A mis abuelitos Nieves y Angel (†); y mis padres Amalia y Fredis, por sus cuidados, atenciones, confianza y apoyo constantes.

A mis hermanos Carmen, Walter (†), Fredy (†), Angel y Héctor y primos Jonathan y Bryan, por sus palabras, ánimos, diversión y compañía en todo momento.

A mis tíos Gladis, Héctor, Milta y Lilia, por sus atenciones, guía y ayuda dada en ocasiones hasta sin saber que la necesitaba.

A mis sobrinitos Carlos y Cristian, por representar una alegría inmensa en mi vida con su llegada y ser los motivos de continuar a pesar de todo.

A mis amigos todos y cada uno, a ti, por su presencia en mi vida y convertir cada momento en uno de los mejores.

A los docentes que intervinieron en mi formación profesional a lo largo de mi carrera Bioquímica y Farmacia, principalmente al M. Sc. Luis Cartuche por invertir su tiempo en transmitir sus conocimientos y experiencias durante el desarrollo de este proyecto de tesis; al BQF. Darío Cruz por su colaboración con sus conocimientos para la culminación de este trabajo.

A las instituciones educativas que me han abierto sus puertas para forjar mi educación, como la Universidad Técnica Particular de Loja, en la cual curse mis estudios al brindarme un educación de calidad, a todos quienes conforman el laboratorio de Bioensayos en el departamento de Química, y a aquellos que intervinieron directa e indirectamente en la elaboración de este proyecto de tesis.

A todos muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	5
1.1. Bosques húmedos tropicales.....	6
1.1.1. Hotspots	7
1.2. Hongos	9
1.2.1. Macrohongos	10
1.2.2. Basidiomicetos	11
1.2.2.1. Generalidades	11
1.2.2.2. Morfología.....	12
1.2.2.3. Ciclo biológico	14
1.2.2.4. Importancia	15
1.3. Muestreo y cultivo primario de hongos	16
1.4. Aislamiento de cultivos primarios de hongos	17

1.5.	Cultivos de hongos	18
1.6.	Medios de cultivo	18
1.6.1.	Condiciones de crecimiento	20
1.7.	Caracterización de hongos	21
1.7.1.	Identificación morfológica	21
1.7.2.	Identificación molecular	21
1.8.	Métodos analíticos para riqueza metabólica y actividad biológica de extractos de hongos	23
1.8.1.	Cromatografía de capa fina (CCF)	23
1.8.2.	Concentración mínima inhibitoria (CMI)	24
 CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS		26
2.1.	Recolección, aislamiento y caracterización de hongos	27
2.1.1.	Sitios y forma de recolección	27
2.1.2.	Aislamiento	27
2.1.3.	Caracterización	29
2.1.3.1.	Identificación morfológica	29
2.1.3.2.	Identificación molecular	29
2.1.3.3.	Análisis filogenético	30
2.2.	Cultivo in vitro	31
2.2.1.	Cultivo sólido	31
2.2.1.1.	Condiciones de cultivo	31
2.2.1.2.	Crecimiento radial	32
2.2.2.	Cultivo líquido	32
2.2.2.1.	Condiciones de cultivo	32
2.2.2.2.	Obtención de extractos	33
2.2.2.3.	Cromatografía en capa fina (CCF)	33
2.2.2.4.	Concentración mínima inhibitoria (CMI)	34

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
3.1. Recolección de hongos basidiomicetos.....	36
3.2. Obtención de cultivos puros por aislamiento	37
3.3. Identificación de basidiomicetos recolectados y cultivos puros	38
3.3.1. Identificación de morfología macroscópica in vitro	38
3.3.2. Identificación molecular	39
3.3.3. Análisis filogenético	40
3.3.4. Descripción de Basidiomicetos	41
3.3.4.1. <i>Pycnoporus sanguineus</i>	41
3.3.4.2. <i>Fuscoporia</i> sp.	43
3.4. Cultivo in vitro	44
3.4.1. Cultivos sólidos	44
3.4.1.1. Crecimiento radial	46
3.4.2. Cultivos líquidos	49
3.4.2.1. Rendimiento de Micelio	50
3.4.2.2. Rendimiento de extractos	50
3.4.2.3. Cromatografía en capa fina (CCF)	53
3.4.2.4. Concentración mínima inhibitoria (CMI)	54
CONCLUSIONES	56
RECOMENDACIONES	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación general de los hongos	9
Tabla 2. Datos de recolección de hongos	36
Tabla 3. Resultados de identificación molecular por PCR	39
Tabla 4. Datos de crecimiento radial de BC 011 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	46
Tabla 5. Datos de crecimiento radial de BC 018 <i>Fuscoporia</i> sp.	47
Tabla 6. Datos de extractos de BC 011 <i>Pycnoporus sanguineus</i> en medio SDB.....	51
Tabla 7. Datos de extractos de BC 011 <i>Pycnoporus sanguineus</i> en medio YNPD	51
Tabla 8. Datos de extractos de BC 018 <i>Fuscoporia</i> sp. en medio SDB	51
Tabla 9. Datos de extractos de BC 018 <i>Fuscoporia</i> sp. en medio YNPD	51
Tabla 10. Resultados de CMI	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica de hotspots mundiales	8
Figura 2. Hotspots en Ecuador	8
Figura 3. Partes de un basidioma	12
Figura 4. Ciclo de vida de basidiomicetos	14
Figura 5. Siembra de cultivo primario	28
Figura 6. Basidiomas recolectados	37
Figura 7. Cultivos aislados puros	38
Figura 8. Cultivo in vitro de basidiomas recolectados	39
Figura 9. Árbol filogenético	40
Figura 10. Basidioma de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	41
Figura 11. Basidioma de <i>Fuscoporia</i> sp.	43
Figura 12. Cultivo sólido in vitro de BC 011 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	45
Figura 13. Cultivo sólido in vitro de BC 018 <i>Fuscoporia</i> sp.	45
Figura 14. Curva de crecimiento radial de BC 011 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	46
Figura 15. Fase de crecimiento exponencial de BC 011 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	47
Figura 16. Curva de crecimiento radial de BC 018 <i>Fuscoporia</i> sp.	48
Figura 17. Fase de crecimiento exponencial de BC 018 <i>Fuscoporia</i> sp.	48
Figura 18. Cultivos líquidos in vitro	49
Figura 19. Rendimiento de micelio	50
Figura 20. Peso de extractos obtenidos de BC 011 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	52
Figura 21. Peso de extractos obtenidos de BC 018 <i>Fuscoporia</i> sp.	52
Figura 22. CCF de extractos obtenidos de BC 011 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	53
Figura 23. CCF de extractos obtenidos de BC 018 <i>Fuscoporia</i> sp.	54
Figura 24. Resultados de actividad biológica por CMI	55

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de preparación de medios sólidos de aislamiento	65
Anexo 2. Protocolo de preparación de medios sólidos de cultivo	66
Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN	68
Anexo 4. Protocolo de preparación de medios líquidos de cultivo	69
Anexo 5. Procedimiento para la obtención de extractos	70
Anexo 6. Datos experimentales	73

RESUMEN

Los bosques húmedos tropicales son áreas de alta biodiversidad ubicados en Ecuador en su Zona 7 Región Sur, enriquecidos en diversidad biológica de flora, fauna y micobiota; representando a esta última los hongos destacando por su función, micelio y variedad. La recolección de macrohongos basidiomicetos se efectuó mediante expediciones micológicas durante cinco meses en el año 2014, en áreas boscosas elegidas al azar en Saraguro y Zamora. De los 52 especímenes, se obtuvo cultivos primarios, aislamientos y cultivos puros, con una identificación morfológica y molecular acertada. Se trabajó con las especies *Pycnoporus sanguineus* y *Fuscoporia* sp. utilizando diferentes cultivos sólidos y líquidos, evaluando su crecimiento radial y extracto obtenido. Los análisis indicaron que el medio YNPD otorga un crecimiento abundante mientras el medio SDA es óptimo para favorecer la fermentación. Los extractos destacados en cantidad fueron los obtenidos del cultivo agotado, evidenciándose en CCF diferentes compuestos obtenidos por metabolismo secundario de la extracción con cloroformo; y en CMI con actividad biológica presente de 500 µg/ml para *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*, y de 1000 µg/ml para *Enterococcus faecalis*.

PALABRAS CLAVES: Bosque húmedo tropical, medios de cultivo, *Pycnoporus Sanguineus*, *Fuscoporia* sp., aislamiento, crecimiento radial, extractos, CCF, CMI.

ABSTRACT

Tropical rain forests are areas of high biodiversity in Ecuador located in the South Zone 7 region, rich in biodiversity of flora, fauna and mycobiota; the latter representing fungi distinguished by their function, mycelium and variety. Basidiomycetes macrofungi collection was performed by mycological expeditions for five months in 2014, in wooded areas randomly selected Saraguro and Zamora. Of the 52 specimens were obtained primary cultures, insulation and pure cultures, with a successful morphological and molecular identification. *Pycnoporus sanguineus* and *Fuscoporia* sp. species were studied using different solids and liquids cultures, evaluating their radial growth and extracts obtained. The analysis indicate that the YNPD medium gives abundant growth while SDA medium is optimal to favor fermentation. The extracts highlighted in quantity were obtained from spent culture, therefore, different compounds obtained from secondary metabolism by extraction with chloroform were observed using TLC; and in MIC present biological activity of 500 µg/ml for *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*, and 1000 µg/ml for *Enterococcus faecalis*.

KEYWORDS: Tropical rain forest, culture media, *Pycnoporus sanguineus*, *Fuscoporia* sp., insulation, radial growth, extracts, TLC, MIC.

INTRODUCCIÓN

Ecuador es considerado un país megadiverso por tres factores principales: su ubicación geográfica, el levantamiento de la Cordillera de los Andes y la influencia de las corrientes marinas en sus costas (Bussmann, 2005). Dentro de la gran diversidad existente se destacan los bosques húmedos tropicales considerados "hotspots" (Myers et al., 2000; Dirzo & Raven, 2003) que son altamente llamativos por su singularidad y rareza, con ecosistemas frágiles que contienen una gran diversidad biológica como flora, fauna y micobiota (Josse et al., 2009).

En nuestro país se estima fácilmente 100 000 especies de hongos, con un alto porcentaje de ellos por descubrirse, debido a que solamente se conocen 5000 especies (Freire, 2004). Estos organismos pertenecientes al reino Fungi son grandes colaboradores en el equilibrio del ecosistema (De las Salas, 1987; Gentry, 1990), sin embargo, toda esta diversidad de organismos vivos es constantemente amenazada por varios factores como la deforestación e intervención humana (Gentry, 1995; Brummitt & Lughadha, 2003); además de un alto nivel de vulnerabilidad frente a los cambios globales como el cambio climático y las dinámicas de cambios de cobertura y uso de la tierra (Cuesta, Peralvo & Valarezo, 2009).

Por esta razón es prioritario el tema de conservación de la diversidad de organismos a nivel internacional y nacional, siendo llevada a cabo por líneas estratégicas y programas de investigación encabezados e impulsados dentro de la Universidad como: La Conservación de Recursos Naturales y su aprovechamiento sustentable, aprovechando la elevada diversidad de flora y fauna de la región Sur del Ecuador.

En la actualidad el interés científico está enfocado en la actividad biológica de diferentes organismos debido a que los metabolitos secundarios son vistos como fuentes para la elaboración de productos empleados principalmente en medicina, alimentación e industria (Piepenbring et al., 2012). Los hongos son ampliamente reconocidos como un origen prolífero de metabolitos secundarios con una gran diversidad estructural, a los cuales se les han atribuido diversas propiedades biológicas de gran beneficio para la humanidad. Entre estos se conoce que las especies de basidiomicetos son un importante componente en términos de diversidad, micelio y funcionamiento; además de que se han identificado con un gran potencial de producción de metabolitos biológicamente activos cuya investigación inició en la última década por lo que ha sido apenas investigada; siendo de importancia en la elaboración de productos biofarmacéuticos (Brizuela et al., 1998).

Este proyecto se basó en el aislamiento, cultivo, fermentación y conservación in vitro de 52 especímenes de hongos basidiomicetos colectados en el bosque húmedo tropical ubicado en Pituka y Campanillas (Zamora Chinchipe) e Inkapirca (Loja), además del establecimiento de

una validación del potencial farmacológico de estos especímenes. Actualmente no existe una bibliografía específica con respecto al cultivo y fermentación de hongos basidiomicetos; por lo que el enfoque estuvo dirigido a describir a detalle desde el aislamiento de muestras, pasando por su cultivo en medios nutritivos sólidos y líquidos, pudiendo ser estos comerciales o no comerciales, siendo estos últimos diseñados a medida de los requerimientos con fórmulas básicas para el crecimiento de este tipo de hongos.

Finalmente se obtuvo la forma de cultivos en morfología y fermentación, el producto y micelio de los basidiomicetos, se analizó la presencia de los compuestos contenidos en los extractos mediante el método cualitativo de cromatografía de capa fina, y ya que los hongos basidiomicetos son una alternativa a la escasa variedad de fuentes naturales para la obtención de metabolitos secundarios que poseen potencial de actividad antibacteriana y antifúngica, se evaluó la misma aplicando la microdilución en caldo frente a bacterias y hongos patógenos.

Por ello esta investigación aportó a la generación de conocimiento y conservación de recursos permitiendo a futuro mejorar la gestión, sostenibilidad y protección de ecosistemas terrestres principalmente del bosque húmedo tropical.

CAPITULO I
MARCO TEORICO

1.1. Bosques húmedos tropicales

En Ecuador los bosques húmedos tropicales o también conocidos como los bosques montanos tropicales por su geografía irregular (Busmann, 2005), es el área biótica o bioma más complejo de la tierra y es famoso por su exuberancia en términos de estructura, condiciones climáticas y la mayor diversidad de especies en el mundo (Gentry, 1990). Una característica principal de este ecosistema es el microclima de su suelo dado por el tipo de cubierta forestal y estructura boscosa, este es un fenómeno basado en la humedad del ambiente la cual está determinada por la relación entre temperatura y precipitación, otra característica es su espectro de vida diferente a las de otras áreas ya que ocurre bajo condiciones ambientales óptimas para la vida como la disponibilidad de calor durante todo el año y abundante precipitación (De las Salas, 1987).

En este tipo de bosques no hay estaciones de crecimiento e hibernación como en las zonas templadas de los hemisferios norte y sur; aunque si se observa un periodo de estacionalidad que afecta el ritmo de los procesos biológicos de las especies de manera particular (De las Salas, 1987), de tal forma la vegetación se encuentra muy desarrollada y puede ser dividida en muchos estratos o “pisos”, dependiendo de su altura (suelo, sotobosque, dosel, árboles emergentes.) los más frecuentes son el dosel que normalmente está formado por árboles altos (25 a 35 m de altura) y los árboles emergentes gigantes (más de 50 m de altura) (Gentry, 1990).

En su sistema de clasificación de zonas de vida, la flora y fauna es ampliamente variada, pero los principales actores sin duda son los pertenecientes al reino Fungi, ya que ejecutan el mecanismo más importante para la conservación, absorción y translocación de nutrimentos (De las Salas, 1987) con el favorecimiento de la perpetua humedad y el calor se efectúa un rápido reciclaje de los nutrientes por parte de hongos, microorganismos e insectos que descomponen con rapidez los materiales muertos y los vuelven a integrar a la cadena de nutrientes que toman las plantas (Gentry, 1990).

Comúnmente los hongos de estos bosques se encuentran en ectomicorrizas y en su mayoría son Basidiomicetos, algunos Ascomicetos y otros deutromicetos (De las Salas, 1987), los cuales viven asociados a las raíces de muchos árboles de dosel aumentando su superficie de absorción y han sido de gran ayuda para permitir que grandes extensiones de bosque crezcan sobre suelos muy pobres en nutrientes, como los suelos arenosos de gran parte de la cuenca amazónica (Gentry, 1990).

Los principales representantes de los bosques húmedos tropicales del Ecuador son los ubicados en la Zona 7 (El Oro – Loja - Zamora Chinchipe) en la Región Sur del territorio, en

Loja los bosques han demostrado ser más diversos que los de la parte norte del país (Lozano, 2002) sobre todo los del Parque Nacional Podocarpus a 2800 m s.n.m. en el existe una densidad de 2310 árboles por hectárea. Otros son los remanentes de vegetación húmeda montana baja de la Costa en los cuales se han realizado registros únicos para el país que están representados por la Cordillera de Mullupungo (Borchsenius, 1997) y por el sector “Buenaventura” en el interior de la provincia de El Oro (Kessler, 1992).

En la provincia de Zamora Chinchipe, sigue sumando especies nuevas entre los bosques andinos y tropicales húmedos, con una mezcla de especies de ambos ecosistemas dándole atributos de alto endemismo y flora diversa (Borchsenius, 1997), además de ser descritos como bosques de los más extensos e intactos, considerándose un verdadero refugio para varias formas de vida (Lozano, 2002).

1.1.1. Hotspots.

Lo puntos calientes de biodiversidad o “hotspots”, son una referencia sobre el estado de conservación de la biodiversidad mundial, acuñado por el ambientalista británico Norman Myers a finales del siglo XX, se trata de zonas del planeta donde se encuentran gran cantidad de especies endémicas, únicas de esa área y cuyo hábitat natural se encuentra amenazado o en proceso de destrucción. Myers quería que su concepto de “hotspots” sirviera para identificar y ayudar a conservar zonas, especies y hábitats únicos. (DePaolo & Manga, 2003). Así, aparece repetidamente en la literatura el término “hotspots” para referirse a las áreas que concentran grandes cantidades de biodiversidad, los primeros trabajos sobre este tema se centraban fundamentalmente en la identificación de núcleos de diversidad a escala global (Razola et al., 2006).

Una área que es un “hotspots” debe poseer al menos el 0,5 % de especies de plantas vasculares endémicas, y haber perdido al menos el 70 % de su vegetación primaria (DePaolo & Manga, 2003). Así existieron 25 “hotspots” identificados (Figura 1) que corresponden al análisis de las preguntas claves de relaciones especies/área y congruencia entre taxones (Myers et al., 2000). Estos 25 puntos representaban solamente el 1,4 % de la superficie terrestre pero albergan las últimas poblaciones del 44 % de las especies de flora vascular y del 35 % de vertebrados pero sólo el 38 % estaba protegido de alguna forma (DePaolo & Manga, 2003; Razola et al., 2006). Refiriéndonos a los límites de los “hotspots” estos han sido determinados por comunes biológicos, cada una de las áreas cuenta con una biota o comunidad de especies separada que encaja como una unidad biogeográfica (Myers et al., 2000).

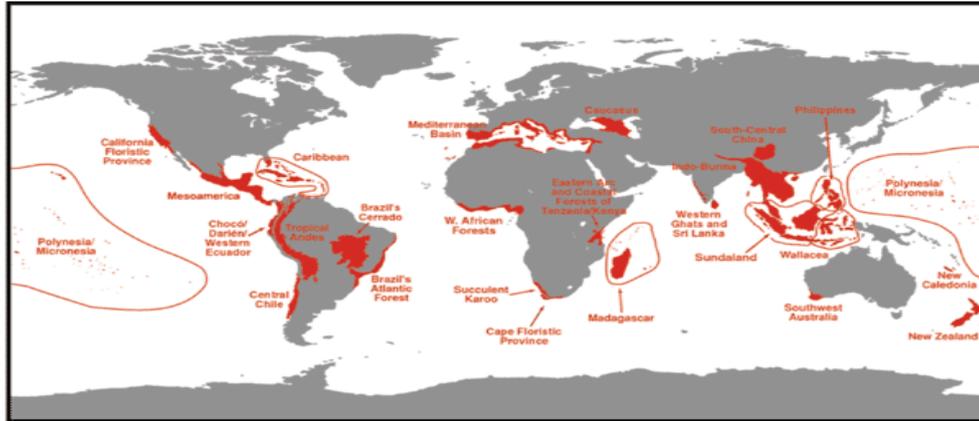


Figura 1. Ubicación geográfica de Hotspots Mundiales.
Fuente: Myers et al., 2000.

En la actualidad la organización de Conservación Internacional (CI) ha identificado 34 “hotspots” en el planeta que acogen en sus ecosistemas el 75 % de los mamíferos, aves y anfibios más amenazados del mundo. El Ecuador posee 2 de los 34 “hotspots” (Figura 2) de todo el mundo (Courty et al., 2003), siendo los bosques húmedos tropicales los que se encuentran entre las 10 áreas que:

- a. Se caracterizan por concentraciones excepcionales de especies con altos niveles de endemismo y,
- b. Están experimentando tasas inusualmente rápidas de agotamiento.

Estas zonas experimentan un episodio masivo de extinción en curso que se centra en gran medida en que contengan al menos la mitad de todas las especies y se están agotando más rápido que cualquier otro bioma (Myers et al., 2000) ya que son propensos a perder el 90 % de su cubierta forestal al final del siglo o poco después, causando la extinción de casi el 7 % de las especies de plantas y animales de la Tierra (Myers, 1988).



Figura 2. Hotspots en Ecuador.
 (A), Hotspot Tumbes-Choco-Magdalena: abarca 274.597 km² e incluye partes de Panamá, Ecuador, Colombia, las Islas Galápagos y Perú. (B), Hotspot Andes Tropicales: abarca parte de Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia, Argentina y Chile con una extensión de 1.542.644 km².
Fuente: Conservation International CI, 2011.

Ante esta alarmante situación no han sido pocos los científicos que han detectado esta necesidad de priorizar espacios para la conservación (Razola et al., 2006), así los “hotspots” son los puntos de concentración donde las necesidades son mayores y donde la rentabilidad de las medidas de salvaguardia también sería mayor (Myers, 1988); concluyendo que estas áreas tienen un papel prominente en la conservación de la biología, pero sigue siendo controvertido hasta qué punto los diferentes tipos de “hotspots” son congruentes (Orme et al., 2005). Esto sugiere que, incluso dentro de una sola clase taxonómica, diferentes mecanismos son responsables del origen y mantenimiento de diferentes aspectos de la diversidad (Myers et al., 2000), en consecuencia, los diferentes tipos de puntos de acceso también varían mucho en su utilidad como herramientas de conservación. (Orme et al., 2005).

1.2. Hongos

Los hongos son un grupo de seres vivos unicelulares o pluricelulares (Ainsworth, 1976) pertenecientes a el reino Fungi (Tabla 1) (Aguirre et al., 2014) que representa una de los más grandes acervos de biodiversidad con actividades ecológicas cruciales en todos los ecosistemas y con una gran variabilidad en morfología y ciclos de vida, poseen gran capacidad de adaptación y pueden desarrollarse sobre cualquier medio o superficie, tanto en los bosques como en las ciudades (Alexopoulos, Mims & Blackwell, 1996).

Estos organismos no forman tejidos, sus células se agrupan formando un cuerpo filamentoso muy ramificado llamado micelio, y cada filamento se denomina hifa (Ainsworth, 1976), con pared celular principalmente constituida por quitina o celulosa (Aguirre et al., 2014). La reproducción de los hongos puede ser asexual (por esporas diseminadas principalmente por el viento y por el agua) y sexual (Ainsworth, 1976).

Tabla 1. Clasificación general de los hongos.

CLASIFICACIÓN DE REINO FUNGI	
EUMYCOTA	
Filos	Clases
Mastigomycota	- Chytridiomycetes - Oomycetes
Zygomycota	- Zygomycetes - Trichomycetes
Basidiomycota	- Teliomycetes - Hymenomycetes - Gasteromycetes
Ascomycota	- Hemiascomycetes - Erotiales

División Eumycota (hongos verdaderos).

Fuente: Montes, Restrepo & McEwen, 2003.

Los hongos son eucarióticos, aclorófilos, heterótrofos por absorción puesto que no pueden realizar la fotosíntesis porque no tienen clorofila (Alexopoulos, Mims & Blackwell, 1996); por

su tipo de vida pueden ser saprofitos como el champiñón o la trufa que se alimentan de sustancias en descomposición, parásitos que se alimentan de los líquidos internos de otros seres vivos y simbioses por que se asocian con otros organismos y se benefician mutuamente (Ainsworth, 1976).

En cuanto a la estimación de la diversidad de hongos en el planeta no se conoce con exactitud el número de especies (Alexopoulos, Mims & Blackwell, 1996) pero los estudios que se han realizado desde 1991 hasta la fecha se basan en parámetros que revelan cifras muy variables, que van desde 500 000 hasta 9,9 millones de especies (Aguirre et al., 2014) y se han descrito alrededor de 100 000 especies de hongos, pero se estima que puede existir un número total de 1,5 millones de especies (Montes, Restrepo & McEwen, 2003). En Ecuador se conocen alrededor de unas 3200 especies, pero se calcula que en el territorio podrían habitar entre 96 000 (Alexopoulos, Mims & Blackwell, 1996).

El estudio sobre los hongos es en base a la etnomicología y a la micología aplicada de la región dando el conocimiento de la diversidad de tales organismos, como sus productos, aplicaciones, enfermedades y usos en América Latina, aquí incluye más de 5500 nombres y para cada nombre se señala su adscripción geográfica y/o étnica y la aplicación del hongo (Guzmán, 1997).

1.2.1. Macrohongos.

El término macrohongo se utiliza para referirse al cuerpo fructífero o a la estructura reproductiva que por su tamaño, color y forma pueden ser vistos por el ojo humano y tomados con la mano (Miles & Chang, 2002). Tienen formas muy variadas; entre las más comunes están los de sombrilla, repisa, costra, oreja, estrella, coral o trompeta, entre otros; y su apariencia o consistencia puede ser gelatinosa, cartilaginosa, esponjosa, carnosa, leñosa e incluso como corcho (Chaves, Navarro & Alvarado, 2008).

Los macrohongos son organismos importantes en los ecosistemas terrestres por su rol en los procesos de descomposición, reciclaje de nutrientes y gran potencial de uso. Algunas de las especies encontradas han sido reportadas como comestibles y de interés medicinal (García & Bolaños, 2011).

Los cuerpos fructíferos están formados en su mayoría por un sombrero, debajo de este se encuentra el tejido generalmente fértil que puede ser totalmente liso o estar formado por lamelas, venaciones, arrugas, dientes, poros, etc., que se encuentran cubiertos o tapizados por las estructuras reproductoras especializadas que producen las esporas, sosteniendo esta estructura se encuentra el estípite (Chaves, Navarro & Alvarado, 2008).

Los recursos como el viento y el agua son los encargados de dispersar las esporas de los macrohongos enviándolas a diferentes sustratos y cuando las condiciones ambientales como humedad y temperatura son las adecuadas (humedad relativa de aproximadamente 70 % y una temperatura que va de 10 a 25 °C), éstas germinan y producen el micelio que puede desarrollarse sobre diferentes hábitats: terrestre, lignícola, coprófilo, fungícola, como parásito o asociado con raíces de ciertos tipos de árboles formando una micorriza (Chaves, Navarro & Alvarado, 2008).

Los macrohongos pueden encontrarse creciendo en forma solitaria, dispersos (varios dentro de una misma área), gregarios (muy próximos pero no enlazados entre sí) y cespitosos (juntos formando racimos y con una base en común) (Mata, Halling & Mueller, 2003).

La mayoría de los macrohongos se encuentra en la División Basidiomycota (Mata, Halling & Mueller, 2003), en esta existen 30 000 especies (Brizuela et al., 1998) y más de 10 000 producen basidiocarpos de tamaño y textura adecuados para alimento (Miles & Chang, 2002); además, este grupo es de gran importancia ya que contiene especies que establecen relaciones mutualistas con las plantas como las micorrizas y con algas como los líquenes, algunas son especies comestibles y otras tienen propiedades medicinales (García & Bolaños, 2011).

1.2.2. Basidiomicetos.

1.2.2.1. Generalidades.

Los basidiomicetos son hongos más desarrollados, con más de 30 000 especies (Brizuela et al., 1998) y constituyen el segundo grupo en importancia entre los hongos superiores que se caracterizan por tener núcleo dicariótico (Alexopoulos & Mims, 1985). Estos comprenden especies medicinales y comestibles, puesto que contienen proteínas de alta calidad y muchas sustancias bioactivas con efectos inmunomodulatorios y antitumorales (Bolaños & Soto, 2012). La División Basidiomycota alberga las clases: Ustilaginomycetes, Urediniomycetes y Hymenomycetes (Alexopoulos & Mims, 1985).

De los 5,1 millones de especies de hongos estimados por estudios recientes basados en métodos moleculares; 14 000 forman cuerpos de fructificación visibles, de estos se calcula que más de 3000 pueden ser consideradas especies comestibles y 1800 especies con propiedades medicinales (Bolaños & Soto, 2012).

Nutricionalmente los hongos comestibles contienen proteína de alta calidad por lo que son buena fuente de grasa, fosforo, hierro y vitaminas (tiamina, rivo flavina, ácido ascórbico, ergosterol y niacina) por ello contribuyen en el aspecto medicinal (Alexopoulos & Mims, 1985);

además poseen sustancias como polisacáridos, glicoproteínas, triterpenoides, esteroides y ácidos nucleicos y un grupo particular de proteínas fúngicas inmunomodulatorias (FIPS) las cuales son conocidas como sustancias funcionales, nutraceúticas o nutraceuticas y tienen un rol en la prevención y supresión de enfermedades (Miles & Chang, 2002).

1.2.2.2. *Morfología.*

La mayoría tienen cuerpos fructíferos macroscópicos (Miles & Chang, 2002) denominados basidiomas sus partes características son: píleo, estípite o pie, margen, himenóforo, poros o laminillas, contexto y capa de tubos (Figura 3) (Urcelay et al., 2012).

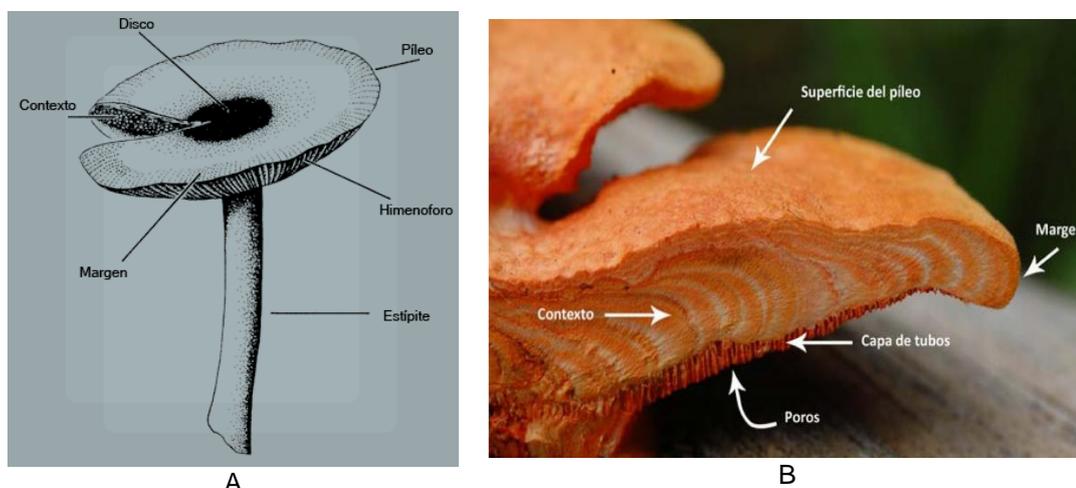


Figura 3. Partes de un basidioma (A), Constituido principalmente por píleo (superficie fértil), himenóforo, estípite o pie, margen, contexto y disco. (B), Corte longitudinal del basidioma donde permite observar la superficie del pileo, margen, himenóforo, contexto, capa de tubos y poros. **Fuente:** Mata, Halling & Mueller, 2003; Urcelay et al., 2012.

El píleo es la superficie fértil del basidioma, su textura se determina por el desarrollo de pelos en la superficie, cuando carece de pelos se denomina glabra la misma que puede ser lisa, brillante u opaca, presentar irregularidades como pequeñas verrugas o tener una cubierta muy dura y rígida denominada laca, mientras, que cuando presenta pelos recibe distintas denominaciones de acuerdo al largo y la densidad de los mismos (Urcelay et al., 2012).

Otras características pueden estar dadas en variaciones del color de la superficie o de la pilosidad por la reflexión diferencial de la luz y debido a la forma de crecimiento la zonación es generalmente concéntrica en el punto de adhesión al sustrato (Alexopoulos & Mims, 1985).

En cuanto al el estípite o pie es de importancia la inserción y la forma que presenta la sección transversal (al cortarlo se ve circular, aplanado, etc.), así como también su textura (Urcelay et al., 2012).

El margen es la zona de activo crecimiento y constituye el borde, convirtiéndose en el límite entre los poros y la superficie del píleo (Alexopoulos & Mims, 1985). Su color y textura son diferentes al de la superficie del píleo, su forma se ve en corte y puede ser aguda o redondeada (Urcelay et al., 2012).

El himenóforo es el conjunto de tubos o láminas de un cuerpo de fructificación constituido por el himenio que es la capa que tapiza la superficie interna de los tubos y es donde se desarrollan estructuras microscópicas tales como las esporas, cistidios y setas; este suele ser liso, formar tubos y poros (circular a angular), láminas o ser dentado (Alexopoulos & Mims, 1985). En ocasiones se da la fusión de poros generando un poro irregular, de aspecto sinuoso o dedaloide que puede llegar al extremo de adquirir la forma de láminas. (Urcelay et al., 2012).

Los poros tienen un tamaño de 0,102 micras de diámetro y su función es seleccionar el tipo de partículas que van a pasar de una célula a otra (Alexopoulos & Mims, 1985), es típico que el poro tenga en sus extremos una estructura como un “casco” que se llama parentosoma o banda de cierre y que seleccionan aún más el paso de sustancias (Miles & Chang, 2002).

El contexto es la zona que está entre la superficie del píleo y los tubos o láminas, su color y zonación pueden diferenciarse por tonalidad, además de la medida en centímetros que alcanza en la base del basidioma (Urcelay et al., 2012). Cuando hablamos de capa de tubos, nos referimos a la zona por debajo del contexto y que termina en los poros (Alexopoulos & Mims, 1985).

Los basidiomicetes son meiosporangios por que producen en su exterior basidiosporas (esporas de origen sexual) sobre pedúnculos o esterigmas (Miles & Chang; 2002), siendo su micelio septado haploide y su pared celular está formada por quitina. Las esporas que se originan después de la meiosis son exosporas (se forman en número de cuatro) (Alexopoulos & Mims, 1985).

Los basidiomicetes tienen básicamente dos estrategias de fructificación:

- a. Las especies “anuales” son aquellas que producen una fructificación por año; esta fructificación posee un sola capa de tubos o forma láminas y por lo general es de consistencia blanda, y
- b. Las especies “perennes” desarrollan una fructificación persistente, generando una capa de tubos sobre otra cada año, suelen ser de consistencia más dura que las anuales y perduran en el tiempo por más de un año (Urcelay et al., 2012).

1.2.2.3. Ciclo biológico.

El ciclo vital (Figura 4) se distingue por la corta duración del micelio que se forma al originar las basidiósporas (Alexopoulos & Mims, 1985), este micelio primario o monocariótico puede producir mitósporas a modo de conidios (Miles & Chang, 2002).

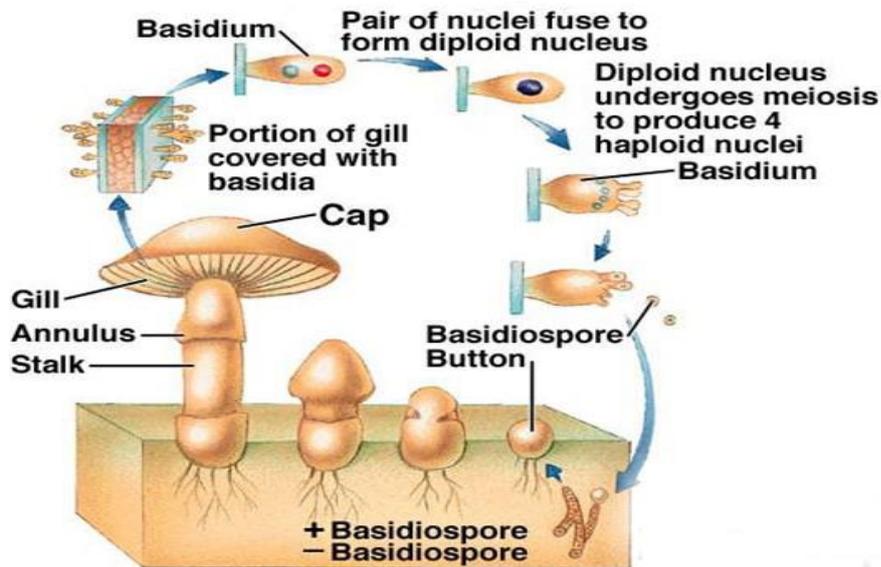


Figura 4. Ciclo de vida de basidiomicetos
Formación de basidiosporas y ciclo biológico de basidiomicetos.
Fuente: Park & Talaro, 1999.

Existen dos tipos de reproducción:

- Reproducción sexual: Es muy sencilla y la más común, se da por simple fusión de hifas compatibles (somatogamia) (Alexopoulos & Mims, 1985). El micelio dicariótico así formado puede ser muy resistente y durar muchos años por lo que una sola plasmogamia puede conducir a la formación de muchas fructificaciones (basidiomas) enteramente formadas por micelio dicariótico. La plasmogamia también puede ocurrir en ocasiones mediante espermatización (Miles & Chang, 2002).
- Reproducción asexual: Se da de vez en cuando mediante la formación de conidios, artrósporas y clamidósporas (Alexopoulos & Mims, 1985) y consta de diferentes etapas partiendo de una basidióspora que germina y emite un tubo germinativo y un micelio tabicado con un núcleo en cada una de sus células (Miles & Chang, 2002); este micelio primario es de vida corta y en la somatogamia los dos micelios primarios se ponen en contacto para formar un micelio secundario con dos núcleos cada uno (dicariótico) suele ser hipogeo (subterráneo) y puede aguantar durante muchos años de vida (Alexopoulos & Mims, 1985). En ciertas épocas de la vida el micelio se organiza y forma falsos tejidos (estructuras pseudoparenquimáticas) y eso se llama basidioma o basidiocarpo (Miles & Chang, 2002); las hifas que forman ese tejido falso de los

basidiomas se llama micelio terciario (que no es nada más que la estructuración del micelio secundario); y cuando pasa la época de fructificación las setas se mueren pero el micelio secundario sigue viviendo y al año siguiente formará micelio terciario otra vez (Alexopoulos & Mims, 1985). En una célula del himenio continua el proceso de reproducción (cariogamia) formándose células diploides (probasidios), después ocurre la meiosis en donde se forman cuatro núcleos (metabasidio) los que a través de los esterigmas van a formar las cuatro basidiósporas formadas fuera del basidio (exógenas); esto ocurre en todas las células del himenio, habiendo por tanto una gran cantidad de basidiósporas, las cuales caen al suelo, germinan y forman el micelio primario (Miles & Chang, 2002).

1.2.2.4. Importancia.

Los basidiomicetos constituyen una clase de hongos cuyo metabolismo y capacidad de producción poseen una gran importancia en la actualidad (Brizuela et al., 1998), debido a que, sus cuerpos fructíferos poseen un gran valor económico por ser una fuente de alimentación humana y son especialmente apreciadas los ejemplares obtenidos por recolección en los bosques y praderas por su delicado sabor, además de que es posible cosechar algunas especies en grandes cantidades por medio de cultivos a escala industrial (Herrera, Ulloa & Oronoz, 1998).

El metabolismo secundario de los basidiomicetos es rico en terpenoides, especialmente sesquiterpenoides (Brizuela et al., 1998) por lo que varias especies de estos hongos se extraen sustancias que tienen diversos usos en la industria y en la medicina (Herrera, Ulloa & Oronoz, 1998), estas sustancias constituyen fuentes naturales potenciales de componentes bioactivos y han motivado en las últimas décadas el interés en estudiar estos organismos, llegando a producir una amplia gama de productos naturales que abarca desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológicamente activos hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, enzimas, reguladores de crecimiento y aromas (Brizuela et al., 1998).

Un punto importante es la ayuda ambiental que ofrecen, ya que existen especies de hongos parásitos que causan daño a la vegetación, la misma que es de importancia para la humanidad, en esto intervienen los basidiomicetos estableciendo una relación de simbiosis con la vegetación afectada ayudando en gran parte a la recuperación, protagonizando un papel fundamental en la conservación de los recursos forestales y del equilibrio ecológico de la naturaleza (Herrera, Ulloa & Oronoz, 1998). Los basidiomicetos y hongos miceliares en general presentan potencialidades de biosíntesis más interesantes y numerosas, por lo que

resulta conveniente profundizar en el cultivo y manejo de estos microorganismos, con el fin de identificar metabolitos nuevos y útiles al hombre (Brizuela et al., 1998).

1.3. Muestreo y cultivo primario de hongos

La utilización de un programa de muestreo especifica el tamaño, el número de las unidades de muestra y la disposición espacial y temporal de las muestras; de modo que puedan lograrse los objetivos establecidos de la recolección, este programa debe diseñarse de modo cuidadoso empleando las técnicas de muestreo que son los procedimientos (equipo y modo en que se hace el recuento) utilizados para recoger la información en una unidad de muestreo dada. (Mueller, Bills & Foster, 2004)

En las expediciones micológicas se utilizan dos estrategias de muestreo diferentes:

- a. Muestreo por transectos: Se establecen cinco transectos de 25 m de largo cada uno, los cuales estarán separados uno del otro por 10 m de distancia, y
- b. Muestreo por parcelas: Se establecerán cinco parcelas de 5 m de lado (25 m² cada una), las cuales estarán ubicadas al menos a 10 m de distancia una de la otra. (Mueller, Bills & Foster, 2004)

Tanto en los transectos como en las parcelas se sigue la misma metodología de colecta, se requiere de una buena visualización de los ejemplares a recolectar (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013), se recolecta todos los cuerpos fructíferos encontrados tratando de alterarlos lo menos posible (Mueller, Bills & Foster, 2004) y tomar los datos necesarios, fotografiarlos (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013) y en el caso de que el sustrato sea madera en descomposición se consideraran I, II y III estadios (Mueller, Bills & Foster, 2004).

Se realiza el transporte en el menor tiempo posible y en las condiciones adecuadas a fin de evaluar sus capacidades y la confección del ejemplar del herbario el mismo que pertenece casi siempre a universidades o museos, y deben poner su material a disposición del científico que lo necesite de modo que la determinación pueda ser verificada cuantas veces sea necesarios (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013).

Al llegar a laboratorio son identificados por sus caracteres morfológicos entre los principales grupos de hongos, y cuando sea posible serán identificados a nivel de género o especie (Mueller, Bills & Foster, 2004). Tanto para los transectos, las parcelas y el set de datos completo se construye una curva de rarefacción para comparar la riqueza de especies obtenida con cada metodología de muestreo (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013), además de un análisis de correlación de componentes principales se realiza con el fin de determinar la preferencia de sustratos de los macrohongos encontrados (Mueller, Bills & Foster, 2004).

La elaboración de fichas técnicas con las características morfológicas detalladas del muestreo es indispensable junto con el debido etiquetado de muestras (Mueller, Bills & Foster, 2004) A partir de las muestras recolectadas se debe lograr cultivos primarios axénicos (libres de contaminación de cualquier otro microorganismo) aplicando antibacterianos, en ocasiones obtener estos cultivos es imposible dado que solo crecen en condiciones muy estrictas o por que viven en estrechas simbiosis con otros seres vivos.

Afortunadamente existen miles de especies capaces de crecer en medios sencillos y de bajo costo, haciendo posible la investigación y la producción a gran escala. (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013).

Las investigaciones en fisiología y biotecnología como el estudio de regulación de la producción de enzimas o la optimización de la producción de antibióticos, necesitan de cultivos puros; mientras que aquellos estudios donde se explore la biología o ecología de algún grupo de hongos, necesitan además de los herbarios (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013).

1.4. Aislamiento de cultivos primarios de hongos

El desarrollo alcanzado en las técnicas de aislamiento de muestras a nivel de las investigaciones mundiales hacen que el área de los productos naturales sea la de mayor crecimiento dentro del campo de la química orgánica (López & Torres, 2006), además del creciente desarrollo de la biotecnología, bioingeniería y la aparición de nuevas demandas en la terapia humana que han conllevado a la apertura de nuevos horizontes para la aplicación de productos microbiales en la medicina, la veterinaria y la agricultura (Arias y Piñeros, 2008).

En la actualidad se reportan cerca de un millón de productos naturales aislados a partir de diferentes fuentes y se ha detectado el surgimiento de novedosos y sofisticados métodos y técnicas de aislamiento (López & Torres, 2006), así para el aislamiento de hongos se pueden emplear algunas técnicas como aislamiento directo, método de esporulación y método por dilución de esporas (Arias y Piñeros, 2008).

Constituyendo los macrohongos una de las fuentes de productos naturales de las menos estudiadas y que sin embargo ofrece grandes posibilidades para la obtención de nuevas estructuras y actividades biológicas (López & Torres, 2006), son los organismos perfectos para la aplicación de las técnicas de aislamiento in vitro (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013).

Para un aislamiento exitoso se debe tomar en cuenta la elección del medio de cultivo correcto para la muestra de interés y las condiciones de crecimiento ambientales; al cabo de pocos días el crecimiento establecido comienza su desarrollo, a esta forma indiferenciada de

crecimiento que no recuerda en absoluto al cuerpo fructífero se denomina micelio (López & Torres, 2006).

Una vez completado el aislamiento el hongo es recomendable realizar los publicados correspondientes en nuevas placas de cultivo para asegurar el organismo de interés. A partir de este momento el hongo está en condiciones de ser analizado en busca de antibióticos, enzimas, polisacáridos u otros de los tantos compuestos útiles para el hombre (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013).

1.5. Cultivos de hongos

Para realizar un cultivo se debe sembrar sobre el medio elegido parte de un cultivo puro (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013), para las muestras de macrohongo el medio de cultivo debe poseer vitaminas, proteínas, minerales y muchos azúcares (López & Torres, 2006), para el desarrollo de las enzimas fúngicas son ampliamente utilizadas en distintas industrias, por ejemplo en la industria alimenticia se utiliza pectinasas, xilanasas y celulasas para extraer y clarificar jugos, aromas y aceites; otras enzimas muy importantes son las ligninasas, producidas por los hongos para degradar la lignina presente en materiales vegetales, por ello son utilizadas en la industria papelera (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013).

El cultivo de hongos depende del objetivo del estudio teniendo diferentes ventajas en cada tipo de cultivo, si nos referimos al cultivo sólido contribuye a un desarrollo de la morfología más detallado y visible, además de que hace que los posibles contaminantes típicos en este tipo de muestras no se mezclen fácilmente con el hongo de interés como lo harían si estuvieran libres en el seno de un medio líquido (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013).

Mientras que un cultivo líquido es ideal para obtener los compuestos resultantes de la fermentación del hongo como desechos lignocelulósicos para estudiar el potencial de producción de cinabarina y lacasas la más abundante con peso molecular de 68 kDa, enzima termoestable a temperatura de 60°C, los extractos obtenidos generalmente poseen actividad biológica con bacterias Gram positivas y negativas, pero se requiere una fuente de carbono adecuada para obtener la pigmentación típica (Acosta et al., 2010).

1.6. Medios de cultivo

Los medios de cultivo son fuentes naturales o sintéticas, que semejan el nicho ecológico en que se desarrollan los microorganismos (Narrea & Malpartida, 2006) este puede ser un sustrato o una solución de nutrientes y componentes que permiten el crecimiento en las condiciones adecuadas de laboratorio (López & Torres, 2006).

El objetivo en la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas, se deben incluir los macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca y Mg) y los microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl); además existe evidencia de que se debería añadir níquel en la lista (Krikorian, 1991). Para el cultivo de hongos existen en el mercado medios comerciales como el Agar Sabouraud, Agar extracto de Malta y Agar Papa Dextrosa que por su composición son fáciles de preparar en laboratorio y son tradicionalmente empleados en la propagación de hongos (Narrea & Malpartida, 2006).

Según su estado físico (consistencia) existen:

- a. Medios líquidos o caldos; el más utilizado es el caldo nutritivo (contiene extracto de carne, peptona y agua) (Arias y Piñeros, 2008) para la obtención de una suspensión con una determinada concentración (López & Torres, 2006),
- b. Medios sólidos los que se preparan a partir de los medios líquidos, agregándoles un agente gelificante que puede ser gelatina o agar, este último soporta 37 °C de temperatura, se funde a 90 °C y solidifica una vez fundido alrededor de los 45 °C (Arias y Piñeros, 2008) y es utilizado para la industria alimenticia, agares purificados y agarosa utilizada para electroforesis en gel (López & Torres, 2006), y
- c. Medios semisólidos que se preparan a partir de los medios líquidos, agregando a éstos un agente solidificante en una proporción menor que para preparar medios sólidos (López & Torres, 2006), utilizados para la investigación de la movilidad de microorganismos (Arias y Piñeros, 2008).

A causa de los requerimientos químicos de las muestras, a veces es necesario agregar o eliminar componentes químicos del medio (López & Torres, 2006) por ello según su composición son:

- a. Comunes o universales: su finalidad es el crecimiento de la mayor parte de las muestras poco existentes, por ejemplo: agar común o caldo común (Arias y Piñeros, 2008),
- b. Enriquecidos: están compuestos de un medio base al que se agrega un gran exceso de nutrientes como suplementos nutritivos (López & Torres, 2006), utilizado para muestras que tienen grandes exigencias nutricionales, por ejemplo: sangre, suero, líquido ascítico, etc. (Arias y Piñeros, 2008), y
- c. Selectivos: la selectividad se consigue alterando las condiciones físicas del medio y añadiendo o suprimiendo componentes químicos específicos con el fin de inhibir el crecimiento de especies químicas cuyo crecimiento no interesa (López & Torres,

2006), utilizado para seleccionar y aislar, por ejemplo: Agar salado-manitol o Chapman (permite el crecimiento de ciertos estafilococos) (Arias y Piñeros, 2008).

1.6.1. Condiciones de crecimiento.

Una muestra de macrohongos necesitan condiciones óptimas de pH, temperatura, tensión de oxígeno, humedad, disponibilidad de nutrientes, consistencia adecuada del medio, luz ambiental y esterilidad para su crecimiento in vitro y entre los requerimientos más importantes para su desarrollo están el carbono, el oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono e hidrógeno (López & Torres, 2006). Las condiciones ambientales necesarias para el crecimiento deben ser simuladas en un laboratorio con la ayuda de los equipos y métodos necesarios, logrando la germinación de esporas, reproducción y en general todas las actividades del organismo de un cultivo de interés. (Alexopoulos, Mims & Blackwell, 1996).

Una de las condiciones más influyentes es la temperatura, en los hongos estos se pueden clasificar como psicrófilicos (temperatura de crecimiento 0 °C – 17 °C), mesófilicos (temperatura de crecimiento 15 °C – 40 °C) o termófilicos (temperatura de crecimiento 35 °C – 50 °C) (Kendrick, 2000) y la mayoría de los hongos crecen a un rango de temperatura entre 25 °C a 30 °C, al emplear una incubadora apropiada este requerimiento se la puede manejar con exactitud. (Kavanagh, 2005).

Otra de las condiciones importantes es el pH ya que es fundamental para el desarrollo de los macrohongos, a un pH alto se ve afectada la solubilidad de los metales y a pH bajo se afectan los sistemas enzimáticos, el ingreso de vitaminas esenciales, ácidos orgánicos y la toma de minerales (Cochrane, 1963). El pH óptimo se encuentra entre 4 y 6, el cual es determinado y manipulable con ciertas sustancias tampón ácidas o básicas con exactitud empleando un pHmetro (Kavanagh, 2005).

La humedad y la luz son condiciones manipulables pero carentes de exactitud en este tipo de cultivos, ya que no se las puede determinar en forma certera; siendo simuladas con vapor de agua y una luz artificial o completa oscuridad (Ojeda & Subero, 2006). Los macrohongos en su mayoría necesitan de la presencia de humedad, de luz baja y oscuridad en horas intercaladas (Luque, 1989).

Los sustratos ya sea para el aislamiento o cultivo especializado para estudio, son semejados por el medio de cultivo que debe cumplir condiciones de esterilidad y disponibilidad de nutrientes, el cual es elegido dependiendo de los datos de ubicación en el momento de la recolección; estos son los que determinan la velocidad de crecimiento, forma, esporulación y

fermentación (Ojeda & Subero, 2006). El medio de cultivo elegido normalmente por sus componentes son MEA y PDA (Luque, 1989).

1.7. Caracterización de hongos

Para ubicar en lugar dentro de la clasificación taxonómica, es necesaria la identificación de especímenes que se da principalmente por el estudio de sus características macroscópicas y moleculares, tomando en cuenta que la sistemática y filogenia de hongos son basados en datos moleculares y han evolucionado muy rápidamente en las últimas dos décadas (Solé, 2004). Así para una caracterización completa y acertada, se requiere de la determinación de características morfológicas y ultraestructurales, rasgos ecológicos, caracteres bioquímicos, metabolitos secundarios químicos, así como la filogenia molecular siendo todos igualmente importantes en la comprensión de la evolución de los basidiomicetes (Yang, 2011).

1.7.1. Identificación morfológica.

Es la descripción de las características macroscópicas desarrolladas por los especímenes dentro de una determina población de individuos en un hábitat específico. Estos caracteres específicos pueden ser organizados por claves taxonómicas, guías visuales entre otras bibliografías pueden ser útiles para una clasificación taxonómica (Mata, Halling & Mueller, 2003). La descripción macroscópica de los hongos debe realizarse en el laboratorio o área de trabajo lo más pronto posible, ya que la mayoría de ellos pierden humedad en muy poco tiempo y por lo tanto se producen cambios de tamaño y color, aspectos muy importantes para efectos taxonómicos (Silva, Landa & Agosin, 1990). Para completar una identificación morfológica macroscópica es necesaria la observación del crecimiento in vitro de hongos, así se emplea diferentes tipos de agar para obtener un crecimiento completo y característico iniciado desde un basidioma. (Yang, 2011).

1.7.2. Identificación molecular.

Durante los últimos 20 años se ha hecho un notable progreso en el estudio de la evolución molecular de basidiomicetos con la introducción de métodos moleculares, con la implementación de nuevos métodos estadísticos y avances en la tecnología computacional se realiza la evaluación de la evolución. Con la invención y el desarrollo de técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la cual se emplea en el análisis filogenético de las secuencias de ADN o de proteínas ya que se ha convertido en una herramienta poderosa para el estudio de la evolución molecular en los hongos (White et al., 1990).

La PCR ha tenido un efecto importante en muchos de los campos de investigación de la biología, su principio es muy simple y se basa en la amplificación in vitro del ADN lo que trae

como resultado la replicación exponencial de la secuencia blanco hasta en un millón de veces, aun en presencia de gran cantidad de moléculas de ADN no relacionadas, obteniéndose como producto un ADN altamente homogéneo que se convierte en fuente excelente para diversas manipulaciones moleculares (Ayra et al., 2001). La elección del programa de temperatura es un importante criterio para el control del PCR, no obstante los factores más importantes en la repetibilidad de los resultados son la pureza relativa y el ajuste correcto de la concentración de la muestra de ADN y la concentración de los cebadores amplificadores (Linz, 1991).

La PCR enfocada a muestras de macrohongos se incluyeron cebadores universales todavía ampliamente utilizados para la amplificación de tres componentes principales de la fúngica operón ribosómico:

- a. La subunidad grande (LSU, referido indistintamente como 26S o 28S, y que incluye dos subregiones variable llamada D1 y D2);
- b. La subunidad pequeña (SSU, o 18S), separados por
- c. Las ITS, que comprende dos secciones (ITS1, ITS2) que enmarquen la región conservada 5.8S. (Lutzoni et al, 2004).

Debido a las limitaciones de longitud de secuenciación manual, los primeros estudios de los hongos a menudo se centraron sólo en ITS1 o ITS2. (Seifert, 2009). Las secuencias de ADN ribosomal (ADNr) han proporcionado una gran cantidad de información acerca de las relaciones filogenéticas y los estudios de secuencias de ADNr se han utilizado para inferir la historia filogenética a través de un espectro muy amplio, desde los estudios entre los linajes basales de la vida a las relaciones entre las especies y poblaciones estrechamente relacionadas (Yang, 2011).

Entre las regiones del cistrón ribosomal, el espaciador transcrito interno (ITS) tiene la mayor probabilidad de éxito para la identificación de la más amplia gama de hongos, con la diferencia de códigos de barras más claramente definida entre la variación inter e intraespecífica (Yang, 2011).

Estudios filogenéticos moleculares han dado lugar a avances significativos en la comprensión de las relaciones de más alto nivel de basidiomicetos, y en consecuencia, toda la jerarquía taxonómica de la Basidiomycota (Schoch et al., 2012), se ha alterado radicalmente por la Red Profunda Hifa Coordinación de Investigación y Montaje del árbol por hongos del proyecto Life (Lutzoni et al., 2004) y proyectos adicionales, así se propuso una clasificación exhaustiva de hongos sobre la base de los resultados filogenéticos y adoptado por el Diccionario de la Hongos (Kirk et al., 2008).

1.8. Métodos analíticos para riqueza metabólica y actividad biológica de extractos de hongos

Existen métodos cualitativos para analizar la riqueza metabólica de los extractos y métodos para la evaluación de la actividad biológica de extractos de hongos.

1.8.1. Cromatografía en capa fina (CCF).

La cromatografía en capa fina es una técnica analítica rápida y sencilla, muy utilizada en un laboratorio de Química Orgánica (Cases & Hens, 1988), esta permite determinar el grado de pureza de un compuesto con la efectividad de una etapa de purificación comparando muestras, así si dos muestras corren igual en placa podrían ser idénticas pero si al contrario corren distinto entonces no son la misma sustancia; y realizar el seguimiento de una reacción haciendo posible estudiar cómo desaparecen los reactivos y cómo aparecen los productos finales, es decir saber cuándo la reacción ha acabado (Bevenue, 1974).

Al igual que otras cromatografías está constituida de una fase estacionaria y una fase móvil y el mismo principio: la sustancia de interés se adherirá a la fase estacionaria o se moverá con la fase móvil, viajando una distancia que es inversamente proporcional a la afinidad por la fase estacionaria (Cases & Hens, 1988).

La fase estacionaria puede ser variada: de papel, de celulosa o de un gel de silicato (vidrio molido bien fino) unido a una superficie sólida (una placa de vidrio, aluminio, plástico o papel) siendo la superficie sólida rígida o flexible (Bevenue, 1974). La fase móvil consiste de un solvente que puede ser agua, un solvente orgánico o una mezcla de ambos (Vilanova & Sogorb, 2004). El tipo de fases, tanto estacionaria como móvil que se utilice en un experimento dependerá del tipo de moléculas que se quieran separar, incluso vienen algunas placas con indicadores fluorescentes (Cases & Hens, 1988).

La retención se puede explicar en base a la competencia que se establece entre el soluto a separar y la fase móvil por adsorberse a los centros activos polares de la fase estacionaria; así, las moléculas de soluto se encuentran adsorbidas en la fase estacionaria y a medida que se produce la elución van siendo desplazadas por la fase móvil (Cases & Hens, 1988).

La selectividad en la separación dependen de los valores respectivos de las constantes de los diferentes equilibrios químicos que están en función de la polaridad del compuesto, determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes (Bevenue, 1974). Los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a

los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares se eludirán con mayor facilidad debido a la naturaleza del disolvente (Vilanova & Sogorb, 2004).

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como R_f , y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.) (Cases & Hens, 1988). El valor del R_f se obtiene de la división de la distancia recorrida por el compuesto para la distancia recorrida por el eluyente multiplicado por el valor de π por el radio al cuadrado de la siembra de la muestra.

La mayor parte de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm o 365 nm), por lo que el indicador absorbe la luz UV y emite luz visible (Vilanova & Sogorb, 2004). La presencia de un compuesto activo en el UV evita que el indicador absorba la luz en la zona en la que se encuentra el producto, y el resultado es la visualización de una mancha en la placa que indica la presencia de un compuesto (Cases & Hens, 1988). En el caso de compuestos que no absorben luz UV, la visualización del cromatograma requiere utilizar un agente revelador, este tiene que reaccionar con los productos adsorbidos proporcionando compuestos coloreados (Vilanova & Sogorb, 2004).

1.8.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI).

Es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico o de un hongo a un antifúngico (Andrews, 2001); siendo la concentración más baja del agente antimicrobiano que en determinadas condiciones in vitro (Fernández et al., 1998), que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de un periodo de incubación favorable para este (Ramírez & Castaño, 2009).

En esta técnica son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones decrecientes del extracto vegetal o fúngico (Ramírez & Castaño, 2009); generalmente diluciones 1:2 y los antibióticos o antifúngicos se preparan en "soluciones madre" concentradas y luego se diluyen en caldo hasta obtener las concentraciones apropiadas (Andrews, 2001). El organismo en estudio es inoculado en los diferentes pocillos de las microplacas (Ramírez & Castaño, 2009) y un pocillo de caldo se mantiene sin inocular como control negativo de crecimiento (Andrews, 2001). La CMI es determinada después de la incubación (Ramírez & Castaño, 2009) mediante la observación de la turbidez de los pocillos que indica el desarrollo del microorganismo, el cual crecerá en el tubo control y en todos los que no contengan suficiente antibiótico que sea capaz de inhibir su desarrollo; por

ello la concentración de antibiótico que presente ausencia de crecimiento es la Concentración Mínima Inhibitoria. (Andrews, 2001)

La cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. La CMI se ha establecido como "gold Standard" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado (Fernández et al., 1998). El método de microdilución en caldo es una técnica útil para determinar CMI en un gran número de muestras. La ventaja radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos de origen natural, además permite diferenciar entre un efecto tóxico y bacteriostático o fungiestático (Ramírez & Castaño, 2009).

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Recolección, aislamiento y caracterización de hongos

2.1.1. Sitio y forma de recolección.

Se recolectaron 52 especímenes en las localidades de Pituka y Campanilla (Zamora Chinchipe 9537781 N - 179428 E) e Inkapirca (Loja 9593668 N – 696838 E) como parte del proyecto PROY_QUI_817. “Recolección, caracterización y evaluación del potencial farmacológico de actinomicetos y basidiomicetos en la Región Sur del Ecuador”, financiado por la UTPL en el 2014. Los hongos recolectados fueron caracterizados y clasificados por el BQF. Darío Cruz y de estos se seleccionaron dos especímenes debido a sus características destacadas en cuanto a su morfología y crecimiento, estudios moleculares y actividad biológica contra microorganismos patógenos.

Generalmente para la recolección se utiliza la metodología basada en remover el basidioma con una cuchilla o puñal, introduciéndola unos cuantos centímetros hacia abajo de la su base para no cortar el estípite, cuando este está presente (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013), y removiéndolo con una porción pequeña de sustrato en su base. Así se recolectó especímenes tanto jóvenes como maduros y en la mayor cantidad posible con el debido etiquetado.

Posteriormente para el traslado de los cuerpos fructíferos desde su ambiente natural al laboratorio se los colocó sobre papel aluminio en una envoltura para luego almacenarlos temporalmente en bolsas plásticas estériles de cierre hermético, de manera que se pudieron cerrar los extremos sin producir daños a la muestras (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013), y se transportó en el menor tiempo posible dentro de una canasta adecuada que otorgó condiciones de refrigeración (Mueller, Bills & Foster, 2004).

Las muestras fueron transportadas y procesadas el mismo día en el laboratorio; y se reservó un ejemplar para la confección del cuerpo fructífero seco encontrado en la naturaleza (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013), para el Herbario UTPL sección Fungario HUTPL(F) con los códigos de los seleccionados:

- HUTPL(F) 803, colector JMA 002, aislado BC 011, Pituka, 19/03/2014.
- HUTPL(F) 820, colector JMA 019, aislado BC 011, Inkapirca, 19/03/2014.
- HUTPL(F) 801, colector JMA 039, aislado BC 018, Inkapirca, 08/05/2014.

2.1.2. Aislamiento.

Los especímenes de macrohongos se retiraron de las bolsas con cuidado de no perder parte de su basidiocarpo, y en el laboratorio se aplicó procedimientos microbiológicos de rutina (López & Torres, 2006), primeramente se obtuvo un cultivo axénico inicial a partir de un tejido

fresco del macrohongo antes de que este muera (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013), para esto se empleó medios de cultivo básicos como MEA y PDA suplementados con Cloranfenicol 3 % (Anexo 1) (López & Torres, 2006).

Este fue obtenido realizando una disección exponiendo una superficie de la fructificación que esté libre de gérmenes de la muestra dentro de una cabina nivel de contención II, utilizando alcohol al 70 % y agua destilada estéril como los reactivos para eliminar las impurezas externas de la muestra (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013).

Se procedió a sembrar pedazos diseccionados cortados con un bisturí estéril de diferentes partes del hongo recolectado para identificar si existe algún cambio morfológico según la parte seleccionada (López & Torres, 2006). Con una pinza se recoge el “explanto”, que consiste en una pequeña porción viva del cuerpo del hongo. Inmediatamente se lo pone sobre un medio de cultivo sólido de modo que disponga de oxígeno y nutrientes para poder reanudar su crecimiento activo (Figura 5) (Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2013). Además para un estudio molecular posterior se recolecta explanto en un tubo eppendorf con alcohol al 70 %.

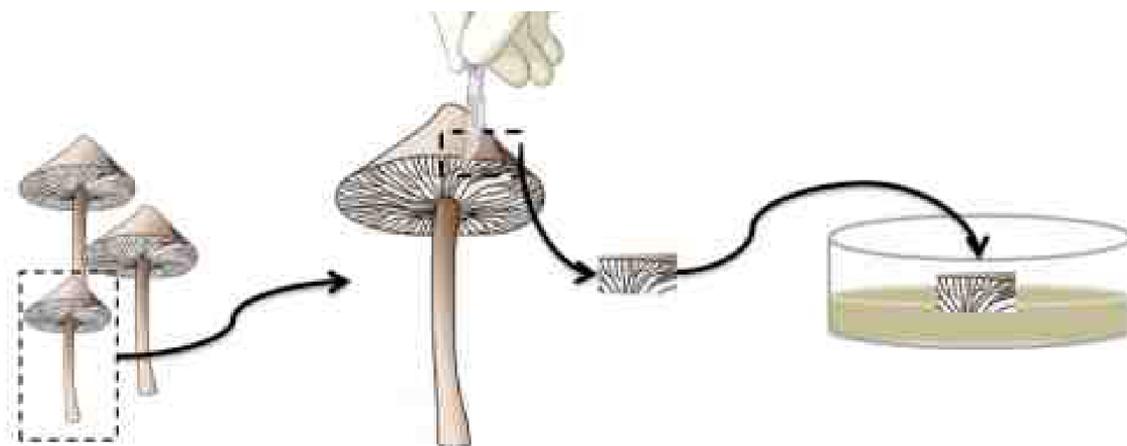


Figura 5. Siembra de cultivo primario.

Se inicia el flujo de tareas en un laboratorio de micología eligiendo los hongos encontrados en la naturaleza y se toma una porción muy pequeña en condiciones asépticas colocándolo en un medio de cultivo apropiado.

Fuente: Kuhar, Castiglia & Papinutti, 2003.

Una vez logrado el cultivo inicial con un óptimo crecimiento y totalmente axénico se procede a realizar el aislamiento en el que empleamos el medio sólido MEA (Agar Extracto de Malta) (Anexo 2); el cual fue preparado con agua destilada, esterilizados a temperaturas elevadas en autoclave y vaciados en placas Petri esterilizadas por medio de UV durante 20 minutos (Narrea & Malpartida, 2006).

Luego bajo condiciones asépticas se procedió a sembrar el hongo utilizando un cultivo primario axénico que presentaban abundantes conidios y micelio. Del cultivo se tomó inóculos de micelio de 3 mm a 5 mm y se colocaron en el centro de cada placa.

Las placas se incubaron por 5 días en oscuridad a 30 °C y humedad relativa del 70 % (Kavanagh, 2005), luego de un crecimiento establecido y avanzado; se colocaron a temperatura ambiental (23 ± 2 °C) y periodos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno, cada cultivo de hongo tuvo un duplicado (Ojeda & Subero, 2006).

2.1.3. Caracterización.

La identificación se basó principalmente en el estudio de los caracteres morfológicos macroscópicos del basidioma. Se tomaron datos del espécimen fresco y en el laboratorio se la identificó los especímenes siguiendo las claves de taxonómicas (Montoya et al, 2011; Ryvardeen, 2004; Wright & Albertó, 2002).

2.1.3.1. Identificación morfológica.

Se utilizó el medio sólido MEA (Agar Extracto de Malta) (Anexo 2); luego bajo condiciones asépticas se procedió con la siembra utilizando un cultivo de aislamiento puro de los especímenes escogidos uno de doce días y otro de catorce días de crecimiento, los cuales presentaban abundantes conidios y micelio. Del cultivo se tomó inóculos de micelio de 3 mm a 5 mm y se colocaron en el centro de cada placa.

Las placas fueron dejadas en incubación por 5 días bajo condiciones de oscuridad a 30 °C con humedad relativa del 70 % (Kavanagh, 2005). Luego de un crecimiento establecido y avanzado; se colocaron a temperatura ambiental (23 ± 2 °C) y periodos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno. Para esta prueba se utilizó un diseño completamente aleatorizado constituyendo cada caja Petri con el hongo una repetición (Ojeda & Subero, 2006).

Los resultados obtenidos luego de tres semanas del crecimiento de cultivo se utilizó para la identificación del género y posible especie de los hongos filamentosos aislados fue necesario la utilización de claves taxonómicas y literatura necesaria sobre identificación de hongos filamentosos (Mata, Halling & Mueller, 2003), para ello se tuvo en cuenta las características macroscópicas, es así como fue preciso examinar in vivo los basidiomas e in vitro los cultivos, estos últimos se monitorearon a lo largo de 3 semanas con un completo desarrollo en la caja Petri para la caracterización macroscópica e inducción de estructuras de reproducción.

2.1.3.2. Identificación molecular.

Las muestras a las que se les extrajo el ADN fueron tanto de los basidiomas recolectados como de los cultivos puros aislados, aplicando el kit y protocolo estándar sugerido en DNeasy Plant Mini Kit extraction (Qiagen) (Anexo 3), luego se procedió a la amplificación de este ADN empleando la técnica de PCR (Flores, 2015). El volumen de reacción de la PCR fue de 25 μ L,

empleando 22.5 µL de Platinum® PCR Supermix de Invitrogen, 0.5 µL de BSA (Suero de Albumina Bovino) al 10 % y 2 µL de ADN.

Se empleó el par de primers universales: ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') combinado con el Reverse NL4 (5'- GGTCCGTGTTTCAAGACGG -3') (White et al., 1990) para amplificar el ADN de los basidiomas; de igual forma se empleó directamente una mezcla de los mismos primers para la amplificación del ADN de los cultivos puros (Schoch et al., 2012).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: iniciando en una fase de desnaturalización a 94 °C por 3 minutos; seguida de 35 ciclos de amplificación consistentes en desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, anillamiento a temperaturas de 55 °C a 60 °C por 30 segundos y la extensión a 72 °C durante 2 minutos; y finalmente una extensión a 72 °C por 10 minutos (White et al., 1990).

La evaluación de esta amplificación fue realizada mediante electroforesis con gel de agarosa al 1 % (agar más solución 1X de Gel Red Biotium) según la norma de manufactura; así 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) (Flores, 2015).

El corrido fue en buffer TBE 1X (Trisborato, EDTA) empleando 128 V, 300 mA durante 25 minutos. Los productos positivos fueron purificados usando el kit QIAquick PCR Purification Kit Protocol (Quiagen) y enviados a secuenciar a la empresa Macrogen (Seoul - Korea). (Flores, 2015).

2.1.3.3. Análisis filogenético.

Mediante las secuencias finales obtenidas de ADN ribosomal nuclear (región ITS) de basidiomas y cultivos se desarrollaron alineamientos que permitieron generar el árbol filogenético de interés. Para este análisis se utilizó el programa Codon Code Aligner V.4.2.4. para editar todas las secuencias obtenidas; y se procedió a comparar estas frente a secuencias similares encontradas empleando el buscador BLAST en la base de datos GenBank, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Una vez con al menos tres secuencias de comparación por cada secuencia obtenida continuamos con el alineamiento de todas las secuencias tanto las obtenidas como las de comparación en el programa MAFFT y al ejecutar el programa Se-A1 permitió visualizar y revisar el alineamiento final de las secuencias relacionadas entre sí.

Finalmente las filogenias se obtuvieron con la utilización del programa filogenético de máxima verosimilitud el Maximun likelihood empleando el software MEGA V.5. (Flores, 2015); de acuerdo a las secuencias escogidas la estructura de las filogenias se visualizarán en un árbol enraizado en punto medio.

2.2. Cultivo in vitro

Este tipo de cultivo se inició en agares puros sin suplemento de antibióticos y posteriormente se procedió en dos subfases, una de cultivo líquido y una de sólido con el empleo de diferentes agares básicos comerciales y experimentales.

2.2.1. Cultivo sólido.

Se utilizó diferentes agares de cultivo para el desarrollo de las características macroscópicas así como de fermentación de cada ejemplar. Los medios de cultivo sólidos utilizados fueron 3 comerciales: MEA (Agar de extracto de Malta), PDA (Agar dextrosa patata) y SDA (agar dextrosa sabouraud), y 2 obtenidos con una formulación experimental: YNPD - Agar Nutritivo (Blanchette, Farrell & Iverson, 1998) + 1,5 % Agar y SMA - Agar Sabouraud Maltosa (Narrea & Malpartida; 2006) (Anexo 2).

Estos medios fueron preparados con agua destilada, esterilizados a temperaturas elevadas en autoclave y dispensados en placas Petri plásticas de 8 cm de diámetro esterilizadas por medio de UV durante 20 minutos (Narrea & Malpartida, 2006). Fue de importancia realizar crioreservas a -80 °C con las muestras de los cultivos puros.

Luego bajo condiciones asépticas, se procedió a sembrar el hongo a partir del cultivo primario obtenido en la evaluación de la morfología macroscópica de los especímenes elegidos con tres semanas de crecimiento, ambos presentaban un abundante y diferenciado crecimiento. Del cultivo se tomó inóculos de micelio de 3 mm a 5 mm y se colocaron en el centro de cada placa con los diferentes medios.

2.2.1.1. Condiciones de cultivo.

Los cultivos de agar fueron sometido durante un periodo de 5 días a condiciones de oscuridad, temperatura a 30 °C, y humedad relativa del 70 %, luego de un crecimiento establecido y avanzado; se colocaron a temperatura ambiental ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) y periodos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno (Kavanagh, 2005); se midió el pH inicial del agar empleando el pH-metro; y cada 3 días se tomó datos básicos como características desarrolladas macroscópicamente (color, forma, consistencia) y producción de fermentación.

Los cultivos fueron monitoreados durante un lapso de un mes hasta la visualización de aspectos de interés. Los agares empleados se evaluaron según su composición y las características a las que fueron sometidos, esto se llevó a cabo en un desarrollo experimental en el cual se estableció la composición, temperatura y tiempo de incubación. Fue de importancia realizar un duplicado por cada muestra y agar (Ojeda & Subero, 2006).

2.2.1.2. Crecimiento radial.

El procedimiento se realizó en base a la técnica de transferencia de discos no centrales, de un cultivo elegido con buen crecimiento de entre los cultivos de hongo antes realizados a la parte central de una caja monopetri de agar YNPD - Agar nutritivo (Blanchette, Farrell & Iverson, 1998) (Anexo 2), se incubó a 30 °C, con humedad relativa del 70 % y oscuridad por 24 horas, luego a temperatura ambiental (23 ± 2 °C) hasta observar un completo crecimiento.

La recopilación de datos de medición se realizó cada 24 horas. Para el análisis de datos se empleó una fórmula matemática basada en el número de generaciones (n) y el tiempo en horas (G).

$$n = 3.3 \times \log\left(\frac{x}{y}\right)$$

Donde **3.3** es una constante; **x** es el crecimiento del día 1, **y** es el crecimiento del último día en forma ascendente (Cabeza, 2011).

$$G = \frac{T}{n}$$

Donde **T** es el tiempo que transcurrió desde el inicio del crecimiento hasta el día que este se detiene, **n** es el número de generaciones ya calculado, el dato resultante indica el tiempo que toma la duplicación de masa celular (Cabeza, 2011).

2.2.2. Cultivo líquido.

Se utilizó medios de cultivo para fortalecer la fermentación y la obtención de micelio. Los seleccionados fueron: medio comercial SDB (Caldo Sabouraud dextrosa) y medio experimental YNPD - Caldo Nutritivo (Blanchette, Farrell & Iverson, 1998) (Anexo 4). Se realizó dos cultivos por cada ejemplar uno por cada medio.

2.2.2.1. Condiciones de cultivo.

El cultivo líquido se evaluó en condiciones de temperatura a 30 °C, en oscuridad por los primeros 5 días y al ambiental (23 ± 2 °C) por aproximadamente 4 a 6 semanas inicialmente

(Kavanagh, 2005), además de nutrientes en la composición de cada agar, pH inicial y final empleando el pH-metro, agitación (rpm), espacio de crecimiento, color, características desarrolladas y producción de fermentación.

Los cultivos se monitorearon durante un lapso final de un período de 3 a 4 meses similar a como indica Ojeda & Subero, 2006; los medios líquidos empleados tuvieron una composición preestablecida comercial o modificada de forma experimental.

2.2.2.2. Obtención de Extractos.

Culminado el tiempo de incubación del cultivo líquido se estableció el procedimiento más adecuado y favorable para la obtención de extractos descrito en el Anexo 5, una vez establecido el procedimiento se sometió a este a los cultivos líquidos de SDB y YNPD de los dos ejemplares de interés. Paralelamente se llevó un monitoreo del rendimiento de cada extracción por cada ejemplar y se lo expresó en % p/p o % p/v de producción.

2.2.2.3. Cromatografía en capa fina (CCF).

Se empleó la cromatografía de capa fina para la comparación de los compuestos contenidos en los extractos obtenidos por ejemplar y los extractos EJMA 019 y EJMA 039 como referencia los cuales fueron obtenidos en el desarrollo del proyecto PROY_QUI_817 mencionado anteriormente. Debido a la polaridad de los extractos se utilizó placas CCF de fase inversa RP-18, con una fase móvil líquida de Metanol-Agua (6:4) con la cual se obtuvo una buena separación de los compuestos de los extractos (Vilanova & Sogorb, 2004), y fueron observados en luz UV con longitud de onda de 254 nm y 365 nm (Bevenue, 1974).

En el procedimiento se colocó la siembra de las 9 muestras diluidas en agua destilada (único disolvente para este tipo de extracto) a un centímetro del borde y de entre sí iniciando en uno de los extremos de la placa de fase inversa (fase estacionaria), se dejó secar y se colocó la placa en un envase (cámara de desarrollo) que contiene los disolventes mezclados (eluyente o fase móvil), se tapó y se dejó correr (Bevenue, 1974). El solvente subió por capilaridad y fue arrastrando las moléculas, las cuales se movieron según la afinidad (polaridad) que muestren por la fase estacionaria (Cases & Hens, 1988), produciéndose un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente (Bevenue, 1974).

Si la mezcla de muestras que se está analizando presenta color, se verán los distintos colores migrando a distintas velocidades y si son incoloras hay que someter la placa a algún tratamiento con una sustancia desarrolladora (developer) para poder determinar la presencia de sustancias sobre el silicato (Vilanova & Sogorb, 2004). El tipo de desarrollador dependerá del tipo de moléculas que se analizan (Cases & Hens, 1988).

El revelado de las placas se realizó con ácido sulfúrico y vainillina 1 %, y luego la aplicación de calor hasta observar los colores de los compuestos (Vilanova & Sogorb, 2004).

2.2.2.4. Concentración mínima inhibitoria (CMI).

Se evaluó la actividad biológica de todos los extractos obtenidos utilizando los valores de CMI que se determinaron por el método de microdilución, se preparó una dilución de extracto en agua destilada en una concentración 20 mg/ml (Ramírez & Castaño, 2009). El ensayo se llevó a cabo en las placas de 96 pocillos estériles y se siguió el procedimiento de dilución doble seriada para obtener concentraciones desde 1000 µg/ml a 0,024 µg/ml. (Andrews, 2001)

El procedimiento antibacteriano se realizó usando el Caldo Muller hinton, con una incubación a 37 °C por 24 horas, y control positivo Tetraciclina 500 mg / 100 ml; y las bacterias patógenas fueron inoculadas desde un criotubo con sus códigos respectivamente *Salmonella typhimurium* (LT 2) en Caldo oxoid; *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853) y *Proteus vulgaris* (ATCC 8427) en Caldo Muller hinton; siendo todas las anteriores Bacterias Gram negativas; *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) en caldo BHI (infusión cerebro-corazón); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) siendo las dos bacterias Gram positivas, *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) en TSC (caldo soya-tripticosa) (Fernández et al.; 1998).

En el procedimiento antifúngico se utilizó caldo Sabouraud dextrosa, con una incubación de 30 °C por 4 días, y como control positivo Itraconazol 10 mg/ml; y los hongos patógenos fueron colocados directamente desde el criotubo con sus códigos respectivamente *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185) (Fernández et al., 1998).

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Recolección de hongos basidiomicetos

En la recolección se etiquetó con códigos alfa-numéricos como JMA 002 en el que las letras indican las iniciales del recolector Mgtr. José Miguel Andrade y el número es de acuerdo al orden de muestreo, en la Tabla 2 se indica los códigos de especímenes escogidos, la posible especie a la que pertenecía el basidioma in situ, el sitio exacto, fecha, ecología y datos visibles de morfología y sustrato.

Tabla 2. Datos de recolección de hongos.

Código de recolección / número de fotografía	Especie / Familia / Orden	Sitio de recolección	Fecha de recolección	Ecología / Geografía	Datos de recolección
JMA 002 / JMA 002	<i>Pycnoporus sanguineus</i> / Polyporaceae / Polyporales	Zamora (Pituka)	19/03/2014	Bosque Húmedo tropical	Crece sobre madera caída, hongo de color anaranjado intenso, sin estípites.
JMA 019 / JMA 019	<i>Pycnoporus sanguineus</i> / Polyporaceae / Polyporales	Saraguro (Inkapirca)	19/03/2014	Bosque Húmedo tropical	Crece sobre madera caída, hongo de color anaranjado intenso, sin estípites.
JMA 039 / JMA 039	<i>Fuscoporia sp.</i> / Polyporaceae / Hymenochaetales	Saraguro (Inkapirca)	08/05/2014	Bosque Montano Alto	Crece sobre tronco caído, sobrero semicircular de color café oscuro.

Constan con código correspondiente, información básica de sitio de recolección y datos relevantes.

Fuente: Cartuche, Cruz & Andrade, 2014.

El método empleado para recolección fue el apropiado ya que se pudo recolectar la mayoría del basidioma y en ocasiones completo, además los datos visibles fueron los necesarios para la identificación in situ; así en cuanto al basidioma de los códigos JMA 019 (Figura 6A) y el JMA 002 (Figura 6B) debido a sus características morfológicas únicas como su color anaranjado intenso, su forma flabeliforme y que se encontraba fuertemente adherido al sustrato por la base, por lo que pertenecen al *Pycnoporus sanguineus*; mientras que el basidioma del código JMA 039 poseía una superficie con distintas tonalidades café oscuro, forma de abanico o semicircular, margen redondeado, debido a que estas características morfológicas pueden pertenecer a las especies como *Trichaptum sp.* o *Fuscoporia sp.* siendo este último el más probable debido a que puede abarcar distintas tonalidades de color desde marrón amarillento oscuro hasta café oscuro (Figura 6C).



Figura 6. Basidiomas recolectados. Fotografías capturadas en el ambiental natural de donde fueron recolectados los basidiomas y en momento de su almacenamiento. (A), JMA 002. *Pycnoporus Sanguineus*; (B), JMA 019. *Pycnoporus Sanguineus*; (C), JMA 039. *Fuscoporia* sp.
Fuente: Cartuche, Cruz & Andrade, 2014.

3.2. Obtención de cultivos puros por aislamiento

Se inició por la obtención de un cultivo primario desarrollado correctamente en medios MEA y PDA suplementados con antibiótico Cloranfenicol al 3 % que inhibió microorganismos parásitos contaminantes y permitió el desarrollo del cultivo del hongo sin ningún problema, luego se logró un aislamiento exitoso debido a que se consiguió un cultivo aislado completamente puro de cada uno de los ejemplares sin visualización de ningún microorganismo que no sea el de interés; la utilización del medio de cultivo MEA fue acertada ya que ayudó al desarrollo del cultivo proporcionando gran cantidad de nutrientes como fuente de nitrógeno y carbono, lo que permitió recuperar una amplia variedad de hongos filamentosos, obteniendo características similares a las de los basidiomas de origen.

Para un mejor manejo de los cultivos se optó por la utilización de nuevos códigos alfanuméricos con BC que abrevia Basidiomiceto Cultivo y la parte numérica por el orden final de los cultivos puros obtenidos, así de los basidiomas JMA 002 y JMA 019 se obtuvieron cultivos in vitro puros idénticos por lo que pertenecerían a la misma especie y se decidió unirlos en el mismo código BC 011 (Figura 7A) el crecimiento observado fue blanquecino y de micelio fino blando, luego de ocupar la mitad de la placa Petri se comenzó a tornar anaranjado que es su

pigmento característico; de la misma forma del basidioma JMA 039 se obtuvo un cultivo in vitro puro con el código BC 018 (Figura 7B) su crecimiento fue de micelio blanco de consistencia dura con crecimiento abultado en centro y hacia arriba, en los dos cultivos no hubo visualización de algún contaminante en el micelio o por exteriores de este.

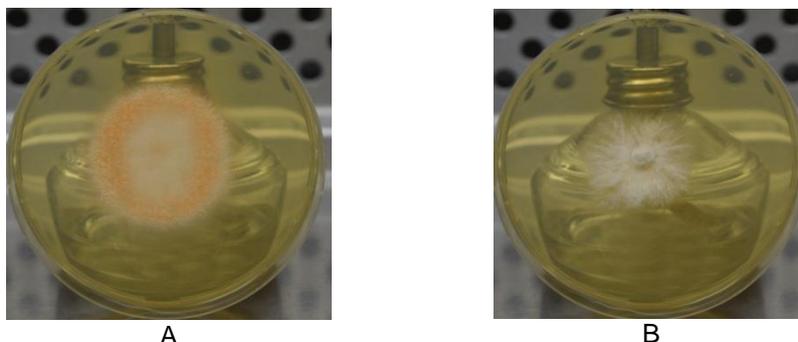


Figura 7. Cultivos aislados puros. Medio de aislamiento MEA (A), JMA 002 y JMA 019. *Pycnoporus Sanguineus*; (B), JMA 039. *Fuscoporia* sp.
Fuente: Autora, 2015.

3.3. Identificación de Basidiomicetos recolectados y cultivos puros

3.3.1. Identificación de morfología macroscópica in vitro.

Los cultivos en MEA luego de tres semanas de crecimiento notaron marcadamente sus características macroscópicas in vitro, así el cultivo BC 011 (Figura 8A) inició con un crecimiento establecido de color blanco de consistencia fina, no densa, blanda y no compacta, luego al ir aumentando su diámetro de crecimiento aumenta su densidad pero solo en la capa inferior pegada al agar mientras el micelio superior sigue siendo delgado y blando, su color se empieza a teñir de anaranjado intenso en partes rotativas, el borde y centro, y otras se quedan blancas. Mientras que el cultivo BC 018 (Figura 8B) inicia con un crecimiento establecido más lento, de color blanco y muy denso, al aumentar su diámetro a una velocidad lenta se colorea de marrón oscuro en los bordes y fermenta el mismo pigmento en el agar, concluye su crecimiento en forma muy densa, con cúmulos abultados hacia arriba en el centro y con su pigmento fermentado en grandes proporciones en el agar. Los pigmentos característicos de cada ejemplar que tiñe la capa de micelio y que se fermenta en el agar son el producto de la biosíntesis de metabolitos secundarios.

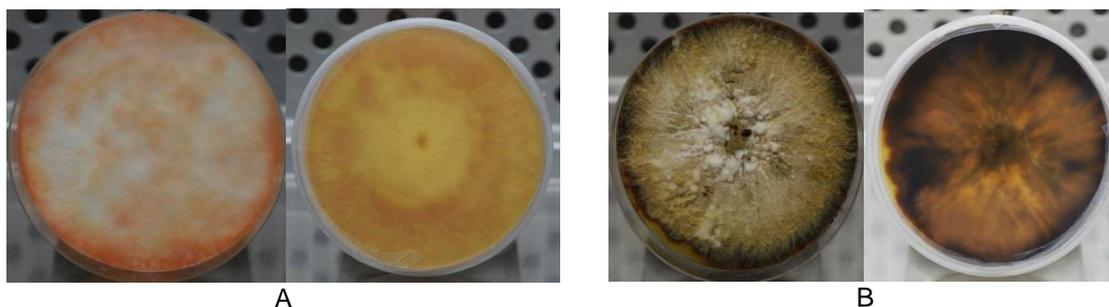


Figura 8. Cultivo in vitro de Basidiomas recolectados. (A), BC 011. *Pycnoporus sanguineus*; y (B) BC 018. *Fuscoporia* sp. Fuente: Autora, 2015.

Como resultado de la identificación de morfología macroscópica in vitro se determinó que las características observadas en el cultivo de cada ejemplar reflejan gran similitud con el basidioma originario de su cultivo; así el cultivo BC 011 pertenece a la especie *Pycnoporus sanguineus* y el cultivo BC 018 fue identificado como *Fuscoporia* sp.

3.3.2. Identificación molecular.

En la identificación molecular se obtuvo resultados de los análisis realizados de PCR (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de identificación molecular por PCR.

Código	Nombre fungario	Primer F	Búsqueda Blast	Plat e	Primer R	Búsqueda Blast
JMA002	Pycnoporus	ITS1	<i>Trametes sanguínea</i> voucher MEL:2382627 (Eukaryota; fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Polyporales; Trametes)	A2	NL4	<i>Trametes sanguínea</i> voucher MEL:2382815 internal transcribed spacer 1
JMA019	Pycnoporus = Trametes sanguinea	ITS1	<i>Trametes sanguínea</i> voucher MEL:2382627 (Eukaryota; fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Polyporales; Trametes)	C5	NL4	<i>Trametes sanguínea</i> voucher MEL:2382815 internal transcribed spac
JMA039		ITS1	<i>Fuscoporia</i> sp. (Eukaryota; fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Hymenochaetales; Hymenochaetaceae; Fuscoporia)	F3	NL4	<i>Fuscoporia</i> sp. 1 GMB-2014 voucher MEL:2382697 internal transcrib
BC011		ITS1	<i>Trametes sanguínea</i> voucher MEL: 2382697 internal trans	C8	NL4	
BC018		ITS1	<i>Hymenochaetaceae</i> sp. 1 GMB-2014 voucher MEL:2382697	D10	NL4	

El estudio se realizó tanto en basidiomas como en cultivos in vitro puros.

Fuente: Cartuche, Cruz & Andrade, 2014.

Con estos resultados se comprobó completamente que la identificación in situ, el aislamiento y la identificación macroscópica in vitro fueron acertadas y correctamente realizadas ya que podemos ver que la especie identificada por ADN es la misma tanto en los basidiomas recolectados como en los cultivos puros por aislamiento finales obtenidos de estos, comprobando así que no se cultivó ningún organismo que no haya sido el de interés. Se obtuvo el análisis molecular con el empleo de los primers ITS 1 y NL4, identificando en las secuencias F3 y D10 a JMA 039 y BC 018 como pertenecientes al género *Fuscoporia*; y en las secuencias A2, C5 y C8 a JMA 002, JMA 019 y BC 011 como pertenecientes a la especie *Trametes sanguinea* o actualmente conocida como *Pycnoporus Sanguineus* (Lloyd, 1924).

3.3.3. Análisis filogenético.

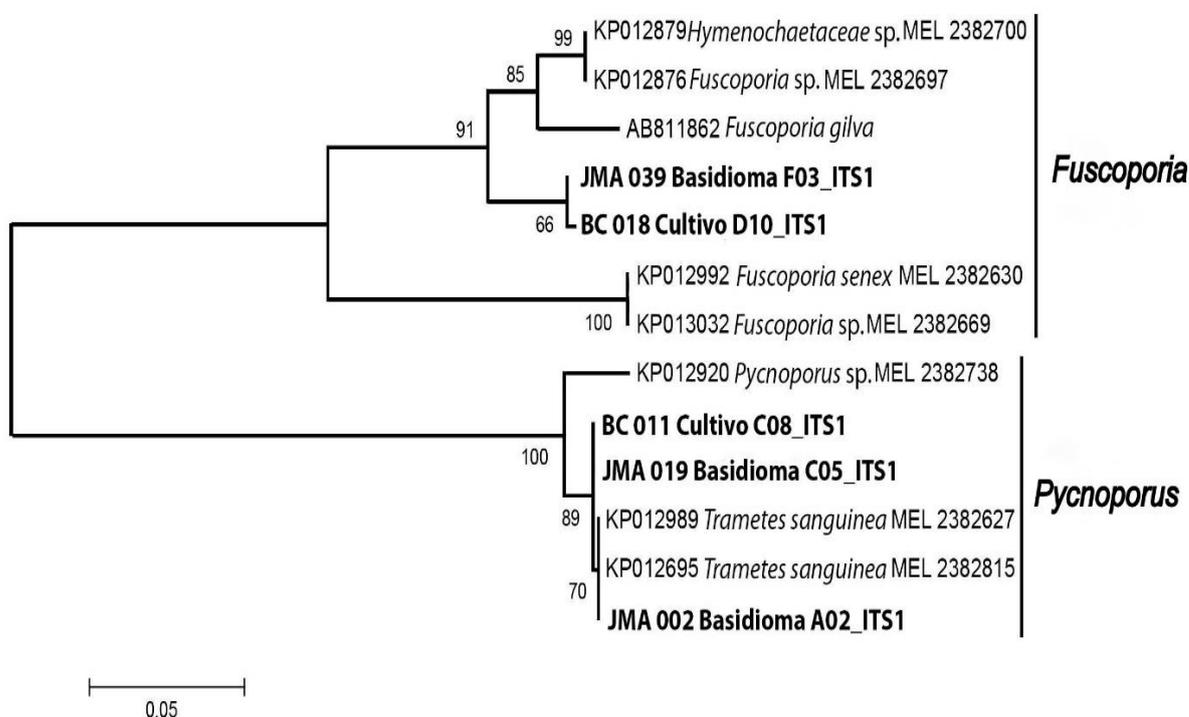


Figura 9. Árbol filogenético.

Árbol enraizado en punto medio (divergencia entre grupos de análisis), analizado desde la región ITS-5.8S a LCU PARCIAL los valores sobre los nodos son mayores al 66 %, las secuencias nuevas obtenidas están indicadas en negrilla.

Fuente: Autora, 2015.

De las 13 secuencias alineadas se obtuvo un árbol filogenético con soportes para los nodos superiores al 66 %, y estuvo enraizado en punto medio originando dos géneros: *Fuscoporia* con un valor del 91 % y *Trametes* con el 100 %. La filogenia de los basidiomas y los cultivos puros aislados a partir de estos coincidieron molecularmente, así el basidioma JMA 039 y su cultivo BC 018 poseen valores del 66 %; y los basidiomas JMA 019 y JMA 002 con el cultivo BC 011 poseen valores del 89 % y 70 % respectivamente (Figura 9).

La estructura del árbol filogenético nos indica los basidiomas JMA 019 y JMA 002 junto con su cultivo BC 011 pertenecen al género *Pycnoporus* o *Trametes* y a la especie *Pycnoporus sanguineus* o *Trametes sanguinea*. Y el basidioma JMA 039 junto con su cultivo BC 018 pertenecen al género *Fuscoporia*.

3.3.4. Descripción de basidiomicetos.

Luego de la identificación completa de los ejemplares de interés se eligió trabajar con dos de ellos que han captado la atención debido a características morfológicas, forma de crecimiento y evidencia de actividad biológica.

3.3.4.1. *Pycnoporus sanguineus*.



Figura 10. Basidioma de *Pycnoporus sanguineus*.
Reino: Fungi; Filo: Basidiomycota; Clase: Basidiomycetes;
Orden: Polyporales; Familia: Polyporaceae; Género:
Pycnoporus; Especie: *Pycnoporus sanguineus*.
Fuente: INBio – Instituto Nacional de biodiversidad.

El *Pycnoporus sanguineus* es un hongo filamentoso que forma parte de la familia Polyporaceae (Ryvarden, 1972) y pertenece a los basidiomicetos de podredumbre blanca degradadores de la madera, se encuentra ampliamente distribuido no solo en ambientes naturales sino creciendo en troncos de parques y plazas de zonas urbanas; de manera silvestre en ambientes tropicales y subtropicales, se ambienta sobre sustratos tan diversos como troncos de encino, eucalipto, caucho, palma de aceite, e incluso sobre troncos quemados (Acosta et al., 2010).

Este ha sido estudiado desde la década de 1990 (Lomascolo, Boukhris & Gimbert, 2011) principalmente por su fuerte capacidad ligninolítica (degradación de lignina) (Acosta et al.,

2010); destaca también por sus vías metabólicas originales que participan en la funcionalización de compuestos aromáticos de la pared celular vegetal para producir moléculas de alto valor, por ejemplo, aromas y antioxidantes (Lomascolo, Boukhris & Gimbert, 2011); y por ser capaz de secretar diversas enzimas extracelulares de interés industrial, entre ellas invertasas, tirosinasas, α -amilasas, β -glucosidasas, xilanasas, lignina peroxidasa, peroxidasa, lacasas y exo-polygalacturonasa (Acosta et al., 2010).

Los basidiomas de esta especie (Figura 10) son de color anaranjado intenso (Acosta et al., 2010), dicho color se lo dan los compuestos cinabarina, tramesanguina y ácido cinabarínico que presentan actividad antibiótica y antiviral (Lomascolo, Boukhris & Gimbert, 2011); por lo general el rango de medida va desde 1,2 cm – 3,5 cm de largo por 1,5 cm – 5 cm de ancho por 0,1 cm – 0,45 cm de grosor, poseen un forma flabeliforme (forma de abanico) y se encuentran fuertemente adheridos al sustrato por la base (Lomascolo, Boukhris & Gimbert, 2011).

Ocasionalmente se pegan basidiomas contiguos; dimidiado a semicircular; superficie velutinosa, algunas veces rugosa, de color rojo-anaranjado brillante cuando está húmedo y anaranjado-rojizo hasta anaranjado-amarillento cuando está muy seco, con la lluvia se lava el pigmento y es opaco y en estado fértil su color es anaranjado-rojizo brillante (Papinutti, 2013). Una de sus caras es lisa mientras que la que mira hacia abajo posee diminutos poros y es por allí donde se liberan las esporas (Acosta et al., 2010).

Este hongo posee una gran importancia ya que ha sido de especial interés por presentar una actividad no específica formando radicales libres para la oxidación y degradación de diferentes compuestos de estructura molecular compleja (Acosta et al., 2010), además de tener un uso prioritario al aprovechar sus lacasas para diversas aplicaciones tales como la bioconversión de subproductos agrícolas y materias primas vegetales en productos valiosos, la biodegradación de contaminantes orgánicos, industriales y xenobióticos (Lomascolo, Boukhris & Gimbert, 2011).

Se han reportado diferentes aplicaciones en la industria biotecnológica, principalmente en biorremediación de compuestos poliaromáticos (lignina, ácido húmico, compuestos fenólicos, fenoles clorinados, hidrocarburos, polivinil alcohol, colorantes) (Acosta et al., 2010) y en la evaluación de durabilidad de maderas; en nanomateriales, alimentos, desarrollo de biosensores para distinguir entre morfina y codeína; y en la industria farmacéutica (Lomascolo, Boukhris & Gimbert, 2011).

3.3.4.2. *Fuscoporia* sp.



Figura 11. Basidioma de *Fuscoporia* sp.

Reino: Fungi; Filo: Basidiomycota; Clase: Basidiomycetes;
Orden: Hymenochaetales; Familia: Hymenochaetaceae;
Género: *Fuscoporia*; Especie: sp.

Fuente: Urcelay et al., 2012; Raymundo et al., 2013; Wagner & Fischer, 2001.

Fuscoporia es un género de hongos en la familia Hymenochaetaceae (Murrill, 1907); en la actualidad se compone de cerca de 40 especies (Marcon et al., 2009). Su hábitat es dentro del bosque con poca luminosidad y mucha humedad, o también creciendo sobre árboles de muchos géneros y usualmente en áreas expuestas (Salvador, 2011). La distribución de Hymenochaetales es cosmopolita. Su distribución territorial es en áreas como la pantropical (Urcelay et al., 2012), extendiéndose desde zonas cálidas a templadas (Salvador, 2011).

Su basidioma (Figura 11) tiene una superficie abhiminal con distintas tonalidades café, glabra a densamente verrugosa o velutinada, tubos color café, abundantes setas prolongándose hasta 30 μm de largo y pequeñas basidiosporas hialinas, elipsoidales de pared delgada (Salvador, 2011). Puede ser anual a perenne, sésil, pileado, en ocasiones efusoreflejo, demediada, aplanada a triquetra (Urcelay et al., 2012), de hábito gregario a imbricado, consistencia leñosa, con un tamaño de 30-50 mm de diámetro (Acosta et al., 2011).

Su píleo es de hasta 6 x 10 x 3 cm (Urcelay et al., 2012), en forma de abanico, de color marrón amarillento obscuro hasta café obscuro, superficie con anillos concéntricos leñosos, escalonados en general fibriloso, aunque existen algunas zonas donde la ornamentación se hace más densa (Acosta et al., 2011). El margen redondeado, concoloro con la superficie del píleo (Urcelay et al., 2012). Himenóforo poroide, color café a café obscuro; poros circulares, de 8 a 10 por mm; tubos concoloros al himenóforo de 1 - 5 mm de profundidad (Acosta et al.,

2011). El contexto castaño dorado, azonado (Urcelay et al., 2012), concoloro al píceo y fibroso (Acosta et al., 2011), de hasta 0,5 cm de grosor (Urcelay et al., 2012).

Poseen un relevante papel en el equilibrio del ecosistema ya que estos son saprofitos y causan vertical de madera pudrición blanca (Raymundo et al., 2013), además tienen una importancia económica y medicinal aportando con metabolitos secundarios y enzimas (Acosta et al., 2011) producidos por ciertos Hymenochaetales que han atraído considerable interés por su uso potencial como medicamentos o para aplicaciones biotecnológicas (Salvador, 2011).

Varias especies de *Fuscoporia* se utilizan en la medicina tradicional asiática, algunos incluso han calificado como un medicamento contra el cáncer, la diabetes, la toxicidad, enfermedades del hígado y el corazón (Salvador, 2011). Las enzimas celulolíticas y ligninolíticas son las más destacadas al ser producidas en el proceso de descomposición de la madera y se han estudiado intensamente con el fin de ponerlas en práctica en la pulpa, papel y productos de limpieza para residuos industriales (Raymundo et al., 2013).

3.4. Cultivo in vitro

Se obtuvieron diferentes resultados tanto en los cultivos de medio sólido como en los de medio líquido, aplicando diferentes metodologías en cuanto a condiciones de crecimiento y monitoreo a cada uno.

3.4.1. Cultivos sólidos.

En los cultivos sólidos se observó que a pesar de ser el mismo hongo y estar sujeto a las mismas condiciones de temperatura, humedad, luz y tiempo, su crecimiento es diferente en algunos aspectos debido a la variedad de medios de cultivo utilizados por la disponibilidad de nutrientes que estos otorgan y su pH; por ello se observó que cuatro características principales como lo son la velocidad de crecimiento, cantidad de micelio, morfología desarrollada y la fermentación en el medio, tuvieron diferencias notables.

En el BC 011 (Figura 12) se observó que la velocidad de crecimiento fue más lenta en MEA y SMA, y más rápida en SDA, PDA y YNPD; la cantidad de micelio fue menos abundante en SMA, MEA y SDA, y más abundante en PDA y YNPD, en cuanto a la morfología los medios que desarrollaron adecuadamente su pigmento y capas de micelio fueron SDA y YNPD. Debido a esto el medio más apto para un crecimiento rápido y para el desarrollo de una morfología y pigmento adecuado son YNPD y SDA, aunque este último en menos cantidad de micelio y no se evidenció en ninguno de los cultivos que el pigmento anaranjado característico se fermentara al medio.

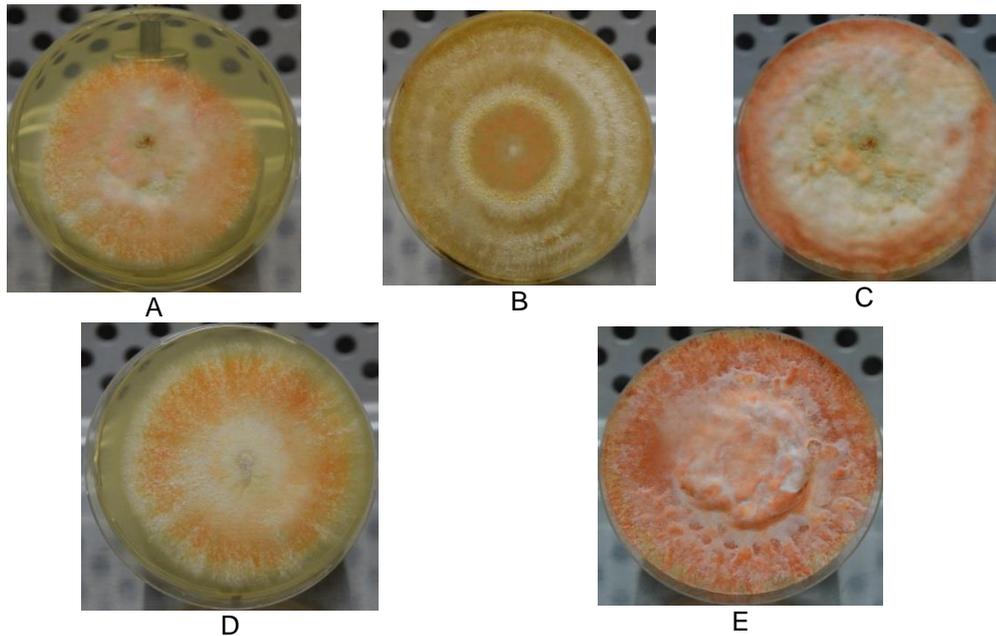


Figura 12. Cultivo sólido in vitro de BC 011 (*Pycnoporus sanguineus*). Medios de cultivo (A), MEA; (B), SMA; (C), PDA; (D), SDA; y (E), YNPD
Fuente: Autora, 2015.

En el BC 018 (Figura 13) la velocidad de crecimiento y cantidad de micelio fue inferior en MEA y SMA, y superior en PDA, SDA y YNPD, y en estos últimos se destacó su pigmento característico y su morfología; en cuanto a su fermentación en el medio fue evidente en SDA. Con ello YNPD es el apto para un crecimiento rápido y morfológico detallado, mientras SDA es el apropiado para obtención de fermentación.

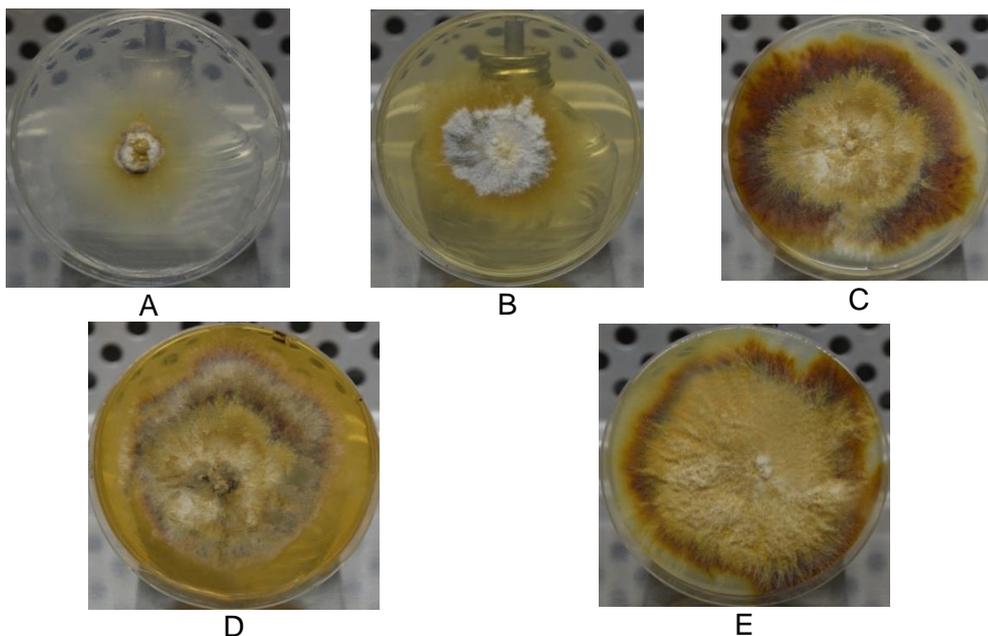


Figura 13. Cultivo sólido in vitro de BC 018 (*Fuscoporia* sp.) Medios de cultivo (A), MEA; (B), SMA; (C), PDA; (D), SDA; y (E), YNPD
Fuente: Autora, 2015.

3.4.1.1. Crecimiento radial.

En base a lo visualizado en los cultivos in vitro para el monitoreo del crecimiento radial se seleccionó el medio sólido YNPD, además de que se realizó con algunas repeticiones por ejemplar por ello se trabajó los datos con un promedio total.

Tabla 4. Datos de crecimiento radial de BC 011 *Pycnoporus sanguineus*.

Especie:		Código:				Días:
<i>Pycnoporus sanguineus</i>		BC011				8
Días	Horas	R1 (cm)	R 2 (cm)	R 3 (cm)	R 4 (cm)	Promedio (cm)
1	24	0,6	0,5	0,4	0,6	0,525
2	48	1,2	1,1	1	1,1	1,1
3	72	1,9	1,8	1,7	1,9	1,825
4	96	2,5	2,4	2,3	2,4	2,4
5	120	3,1	3	2,8	2,9	2,95
6	144	3,5	3,5	3,4	3,5	3,475
7	168	3,7	3,7	3,6	3,6	3,65
8	192	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8

Cultivo de 8 días en condiciones iguales.

Fuente: Autora, 2015.

En los cultivos de BC 011 se realizó 4 repeticiones siendo evaluadas todas (Tabla 4), obteniendo resultados similares por lo que podemos decir que tiene un crecimiento radial total de 2 - 7 mm por día a temperatura 22 – 25 °C, y logra ocupar el total de la caja Petri en 8 días con un micelio no desarrollado morfológicamente.

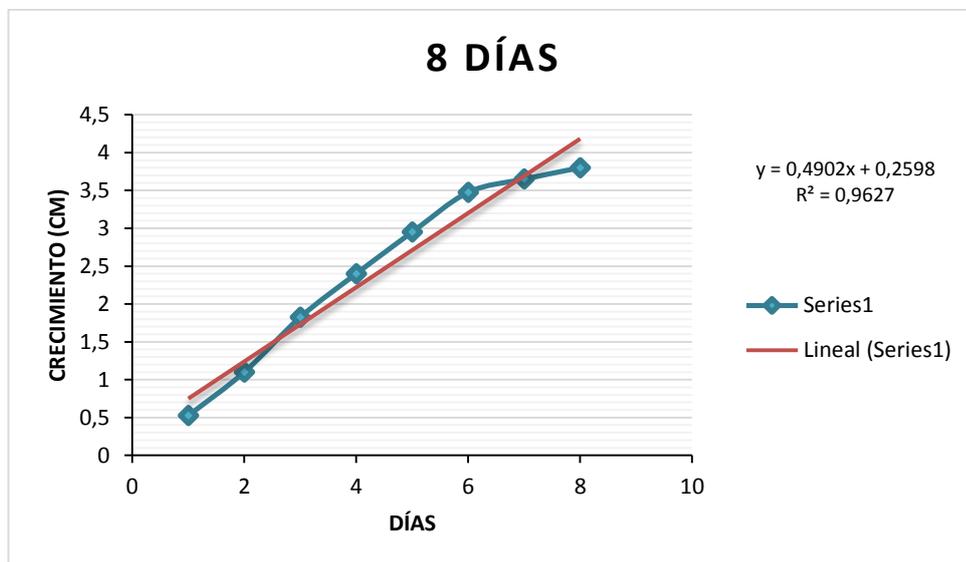


Figura 14. Curva de crecimiento radial de BC 011 *Pycnoporus sanguineus*.

Curva de crecimiento total de 8 días con ecuación lineal.

Fuente: Autora, 2015.

De acuerdo con la Figura 14 la curva de crecimiento tiene un $R^2=0,96$ y se observa que los primeros 5 días de cultivo pertenecen a la fase de crecimiento ascendente (Figura 15) de este hongo por lo que tiene un crecimiento radial ascendente de 5 - 7 mm por día.

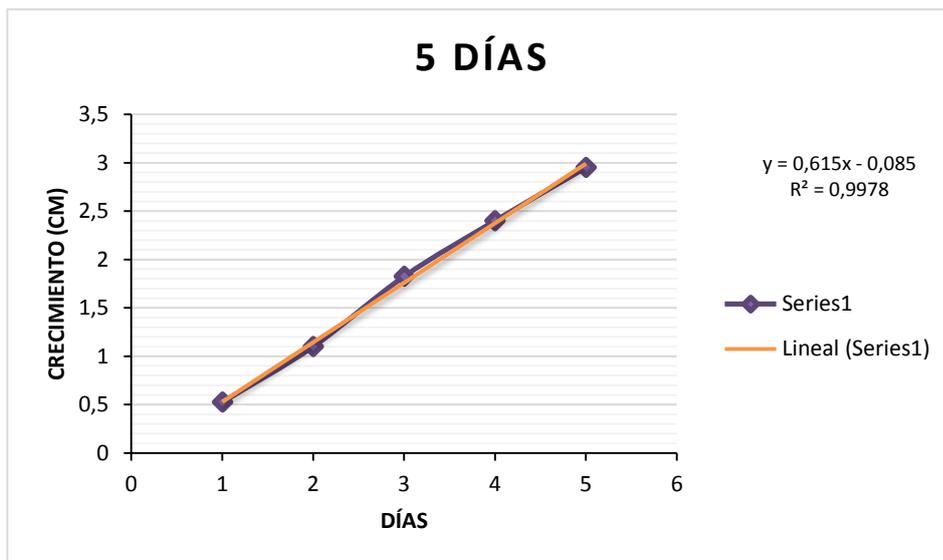


Figura 15. Fase de crecimiento exponencial de BC 011 *Pycnoporus sanguineus*. Curva de crecimiento ascendente con un valor lineal de 0,99.
Fuente: Autora, 2015.

Para los cálculos se empleó los datos del crecimiento del cultivo, el tiempo y la medida del día 1 y 5.

$$n = 3.3 \times \log\left(\frac{x}{y}\right) = 3.3 \times \log\left(\frac{0,525 \text{ cm}}{2,95 \text{ cm}}\right) = 2,4739$$

$$G = \frac{T}{n} = \frac{96 \text{ horas}}{2,4739} = 38,8053 \text{ horas}$$

El cultivo BC 011 presentó un tiempo de generación de 39 horas, por lo que la población celular está creciendo adecuadamente.

Tabla 5. Datos de crecimiento radial de BC 018 *Fuscoporia* sp.

Especie:		Código:		Días:
<i>Fuscoporia</i> sp.		BC018		13
Días	Horas	R 1 (cm)	R 2 (cm)	Promedio (cm)
1	24	0,2	0,2	0,2
2	48	0,5	0,5	0,5
3	72	0,8	0,8	0,8
4	96	1,1	1,1	1,1
5	120	1,4	1,4	1,4
6	144	1,6	1,6	1,6
7	168	1,8	1,8	1,8
8	192	2	2	2
9	216	2,3	2,3	2,3
10	240	2,6	2,6	2,6
11	264	3	3	3
12	288	3,4	3,4	3,4
13	312	3,8	3,8	3,8

Cultivo de 13 días en condiciones iguales.
Fuente: Autora, 2015.

En cuanto a los cultivos de BC 018 se realizó por duplicado (Tabla 5), obteniendo resultados similares por lo que podemos decir que tiene un crecimiento radial total de 2 - 4 mm por día a temperatura 22 – 25 °C, y logra ocupar el total de la caja Petri en 13 días.

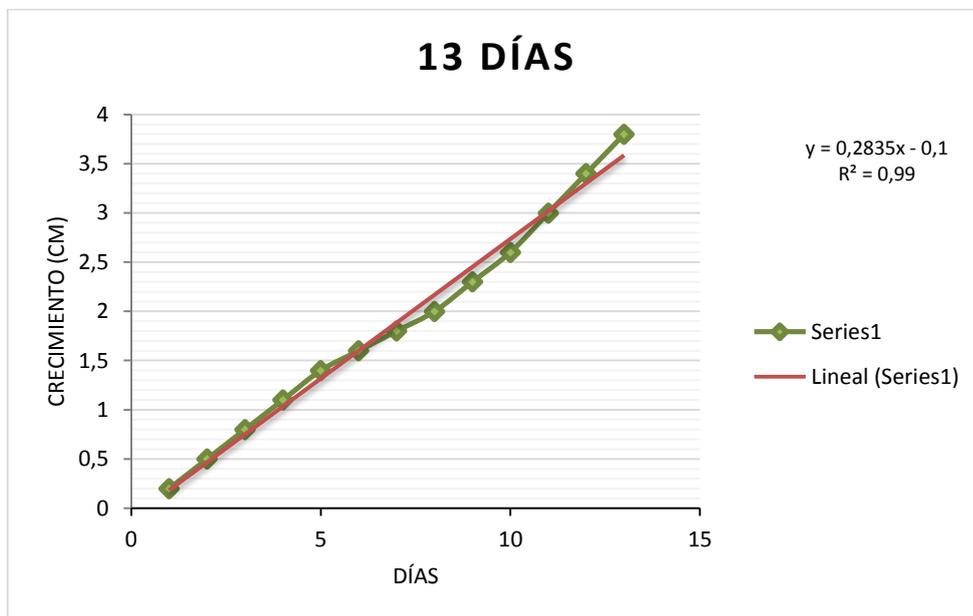


Figura 16. Curva de crecimiento radial de BC 018 *Fuscoporia* sp. Curva de crecimiento total de 13 días con ecuación lineal.

Fuente: Autora, 2015.

De acuerdo con la Figura 16 la curva de crecimiento es de $R^2=0,99$ y los primeros 6 días pertenecen a la fase de crecimiento exponencial (Figura 17) para el cultivo BC 018, por lo que tiene un crecimiento radial ascendente de 2 - 3 mm por día.

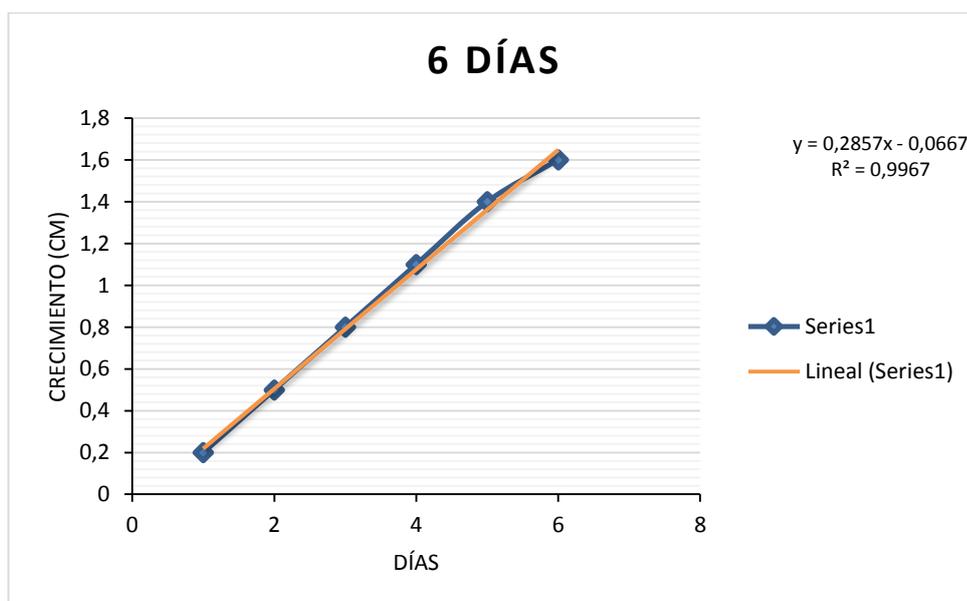


Figura 17. Fase de crecimiento exponencial de BC 018 *Fuscoporia* sp. Curva de crecimiento ascendente con un valor lineal de 0,996.

Fuente: Autora, 2015.

Para los cálculos se emplea los datos de medida del día 1 y 6, y del tiempo transcurrido entre estos.

$$n = 3.3 \times \log\left(\frac{x}{y}\right) = 3.3 \times \log\left(\frac{0,2}{1,6}\right) = 2,9802$$

$$G = \frac{T}{n} = \frac{120 \text{ horas}}{2,9802} = 40,2658 \text{ horas}$$

Así el cultivo de BC 011 tuvo un tiempo de generación de 40 horas por lo que la población celular creció lentamente.

3.4.2. Cultivos líquidos.

Debido a los resultados obtenidos con los cultivos anteriores los cultivos líquidos se hicieron con los medios YNPD para la obtención de micelio y SDB para la fermentación.

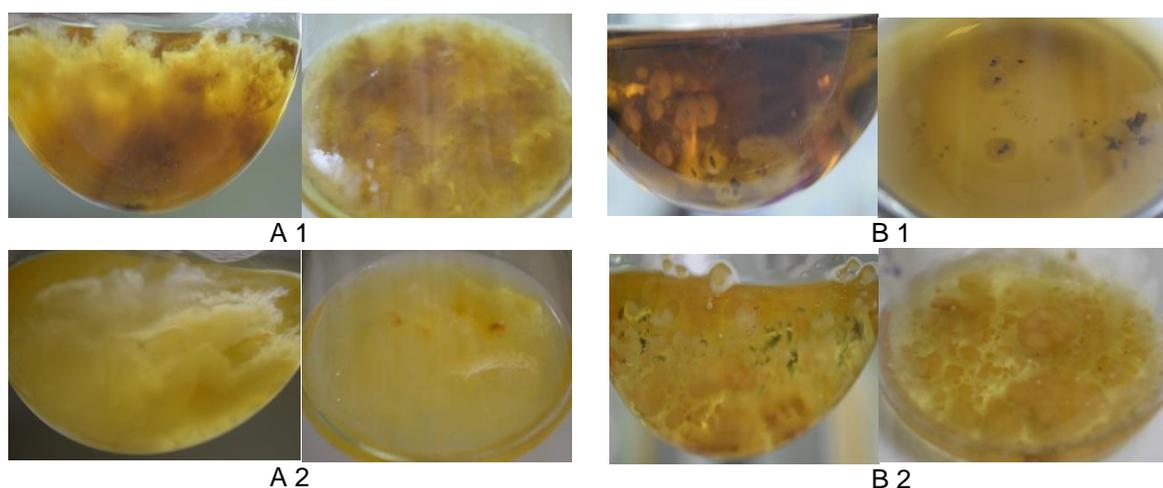


Figura 18. Cultivos líquidos in vitro (A), BC011 *Pycnoporus sanguineus* en medios de cultivo (A1) SDB (A2) YNPD; (B), BC018 *Fuscoporia* sp. en medios de cultivo (B1) SDB (B2) YNPD. **Fuente:** Autora, 2015.

En el cultivo líquido de BC 011 en medio SDB (Figura 18 A1) se observó un micelio abundante, denso, acoplado, color blanco, con pigmentación marrón claro y anaranjado, sin fermentación visible, mientras en YNPD (Figura 18 A2) el micelio se observó en una capa unificada abundante, color blanco y en unas pequeñas partes con pigmento anaranjado. En el cultivo líquido de BC018 en medio SDB (Figura 18 B1) el micelio creció fragmentado y escaso pero con micelios colonizados con buena morfología de color blanco y café oscuro con fermentación visible, en cuanto al cultivo en YNPD (Figura 18 B2) el micelio fue fragmentado en forma de cúmulos gruesos y densos de micelios color blanco sin fermentación. En ambos casos el pH se acidifica, aunque más en BC 011 que en BC 018.

3.4.2.1. Rendimiento de micelio.

Los cultivos se realizaron en un periodo total de 3 a 4 meses (Anexo 6) y en las mismas condiciones de temperatura y luz. En la Figura 19 se muestra con datos contundentes que el cultivo líquido BC 011 posee un crecimiento mayor que el BC 018, y que el medio YNPD es mucho más eficiente que el SDB en el aumento de crecimiento de micelio tanto en el BC 011 como en el BC 018. Adicionalmente, en el cultivo BC018 se evidenció la presencia de pigmentación, tornando el medio SDB de color café oscuro.

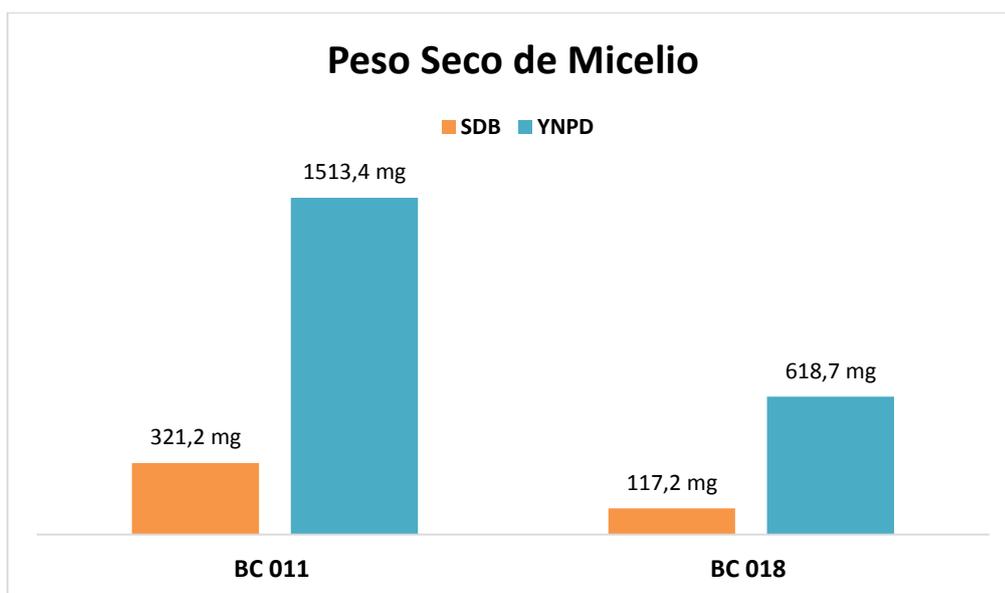


Figura 19. Rendimiento de micelio
Peso de micelio obtenido de los medios de cultivo SDB y YNPD de BC011 *Pycnoporus sanguineus* y BC 018 *Fuscoporia* sp.
Fuente: Autora, 2015.

3.4.2.2. Rendimiento de extractos.

Del cultivo líquido de BC 011 en los medios SDB y YNPD se obtuvieron 8 extractos (4 del medio YNPD y 4 del SDB); de igual manera se obtuvieron 8 extractos del hongo BC 018. Se obtuvo el extracto N° 1 en acetona:cloroformo (1:1), a partir del micelio de BC 011 y otro a partir del micelio de BC 018. Del cultivo agotado mediante partición líquido-líquido empleando cloroformo, se obtuvo el extracto N° 2 de cada hongo. Los metabolitos presentes en el residuo resultante del proceso de bipartición, se extrajeron con resina de adsorción Amberlite® XAD-7HP, la cual fue lavada posteriormente con acetona resultando el extracto N° 3 y finalmente con metanol obteniendo el extracto N° 4. Los extractos se identificaron con un código alfanumérico como BC011M1E1 en el cual BC011 es hongo, M1 es el medio siendo SDB (M1) y YNPD (M2), y E1 es el número de extracto. La consistencia de los extractos fue viscosa acaramelada con sedimentos duros con solubilidad total en agua y parcial en metanol, sus rendimientos y las características de cada extracto se detallan en las Tablas, así los datos de la Tabla 6 pertenecen al cultivo BC 011 del medio SDB, los de la Tabla 7 pertenecen al cultivo

BC 011 del medio YNPD, los de la Tabla 8 pertenecen al cultivo BC 018 del medio SDB y los de la Tabla 9 pertenecen al cultivo BC 018 del medio YNPD.

Tabla 6. Datos de extractos de BC 011 *Pycnoporus sanguineus* en medio SDB.

Peso Neto Seco de Micelio (g/ml)	Extracto	Color	Peso Neto (g)	Rendimiento (%)
0,3212 g / 500 ml	BC011M1E1	Rosa leve	0,0084	2,62 p/p
	BC011M1E2	Blanquecino	0,0211	0,00422 p/v
	BC011M1E3	Anaranjado	0,1027	0,021 p/v
	BC011M1E4	Café	0,1385	0,028 p/v

Cultivo líquido de BC011 en medio SDB extraídos con diferentes solventes.

Fuente: Autora, 2015.

Tabla 7. Datos de extractos de BC 011 *Pycnoporus sanguineus* en medio YNPD

Peso Neto Seco de Micelio (g)	Extracto	Color	Peso Neto (g)	Rendimiento (%)
1,5134 g / 500 ml	BC011M2E1	Rosáceo leve	0,0214	1,414 p/p
	BC011M2E2	Incoloro	0,0066	0,0013 p/v
	BC011M2E3	Amarillento	0,067	0,0134 p/v
	BC011M2E4	Marrón claro	0,0513	0,0103 p/v

Cultivo líquido de BC011 *Pycnoporus sanguineus* en medio YNPD extraídos con diferentes solventes.

Fuente: Autora, 2015.

Tabla 8. Datos de extractos de BC 018 *Fuscoporia* sp. en medio SDB.

Peso Neto Seco de Micelio (g)	Extracto	Color	Peso Neto (g)	Rendimiento (%)
0,1172 g / 500 ml	BC018M1E1	Amarillo leve	0,0011	0,094 p/p
	BC018M1E2	Marrón leve	0,0217	0,0043 p/v
	BC018M1E3	Café claro	0,2243	0,045 p/v
	BC018M1E4	Café oscuro	0,1716	0,0343 p/v

Cultivo líquido de BC 018 *Fuscoporia* sp. en medio SDB extraídos con diferentes solventes.

Fuente: Autora, 2015.

Tabla 9. Datos de extractos de BC 018 *Fuscoporia* sp. en medio YNPD.

Peso Neto Seco de Micelio (g)	Extracto	Color	Peso Neto (g)	Rendimiento (%)
0,6187 g / 500 ml	BC018M2E1	Amarillento	0,003	0,485 p/p
	BC018M2E2	Marrón leve	0,008	0,0016 p/v
	BC018M2E3	Amarillo	0,044	0,0088 p/v
	BC018M2E4	Café	0,0502	0,01 p/v

Cultivo líquido de BC018 *Fuscoporia* sp. en medio YNPD extraídos con diferentes solventes.

Fuente: Autora, 2015.

En el cultivo BC 011 el mayor rendimiento p/p fue 2,62 % en el extracto obtenido del micelio con acetona:cloroformo (1:1) en el medio SDB; y el mayor rendimiento p/v fue 0,028 % en el extracto obtenido del cultivo agotado con metanol en el medio SDB. Mientras en el cultivo BC018 el mayor rendimiento p/p fue 0,485 % en el extracto obtenido del micelio con acetona:cloroformo (1:1) en el medio YNPD; y el mayor rendimiento p/v fue 0,045 % en el extracto obtenido del cultivo agotado con acetona en el medio SDB.

En el cultivo BC 011 el extracto de mayor cantidad fue 138,5 mg obtenido del cultivo agotado SDB con metanol (Figura 20), aunque no se observó una pigmentación destaca en el medio.

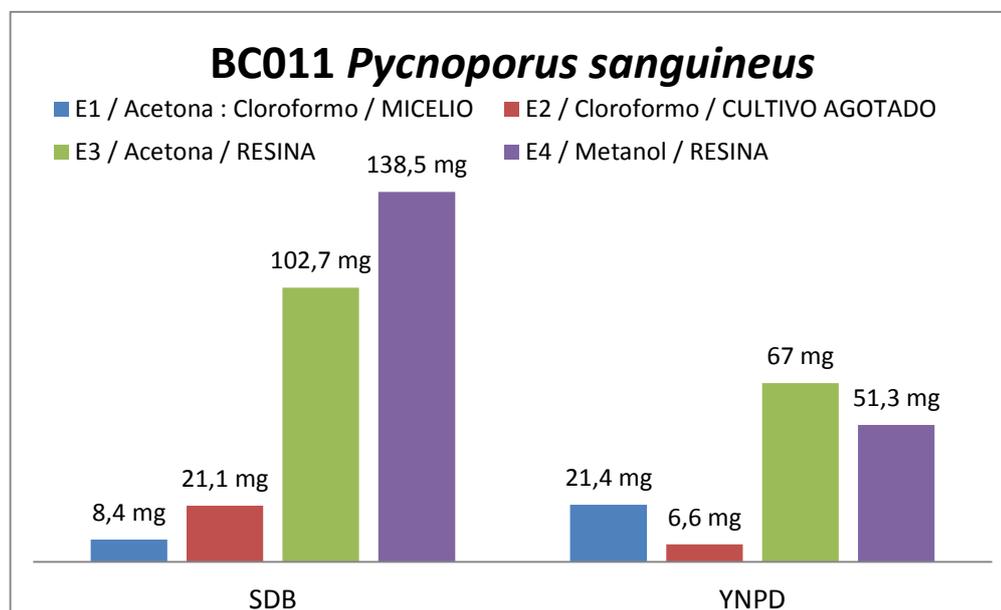


Figura 20. Peso de extractos obtenidos de BC 011 *Pycnoporus sanguineus* Comparación del rendimiento de extractos obtenidos con diferentes solventes del cultivo líquido en SDB y YNPD.
Fuente: Autora, 2015.

En el cultivo BC 018 el extracto de mayor cantidad fue 224,3 mg obtenido del cultivo agotado SDB con acetona (Figura 21), esto se lo pudo evidenciar visualmente debido a la coloración café oscuro que obtuvo el medio SDB.

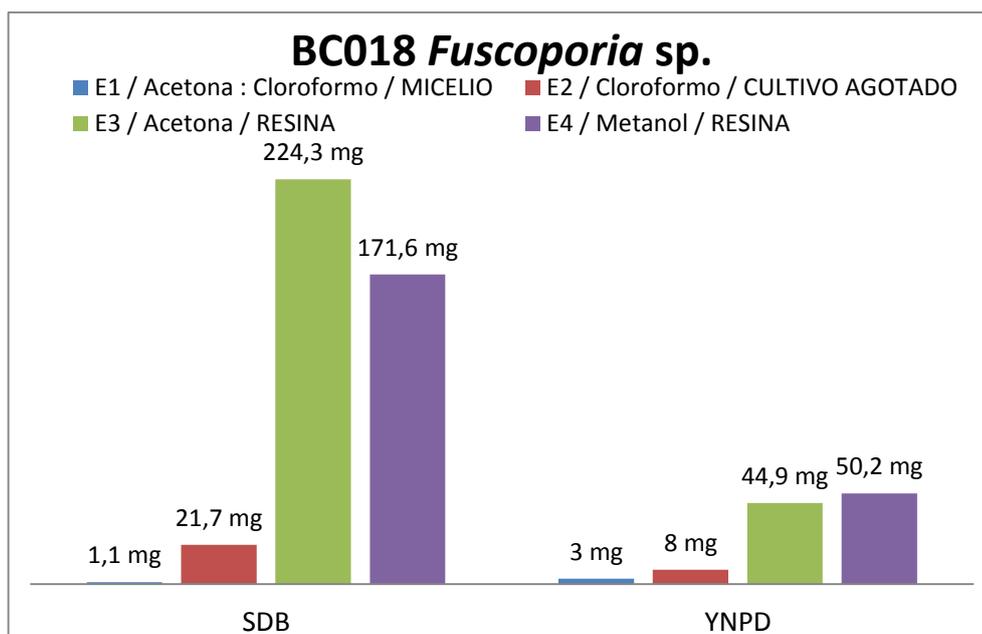


Figura 21. Peso de extractos obtenidos de BC018 *Fuscoporia sp* Comparación del rendimiento de extractos obtenidos con diferentes solventes del cultivo líquido en SDB y YNPD.
Fuente: Autora, 2015.

Se consideró que el rendimiento de los extractos puede variar dependiendo de la naturaleza química de los metabolitos y la polaridad del solvente utilizado.

3.4.2.3. Cromatografía en capa fina (CCF).

Se evaluaron los 8 extractos obtenidos (4 del medio YNPD y 4 del SDB) por ejemplar y el extracto EJMA 019 y EJMA 039 como referencia, visualizando la separación de los productos obtenidos mediante CCF en fase inversa. Se observó distintos componentes entre los extractos (Figura 22 y 23) debido a su composición química, así también se observó que el extracto obtenido cultivo agotado con cloroformo del medio SDB fue el que presentó más variedad de compuestos en los dos ejemplares, seguido por los extractos del cultivo agotado con resina en acetona y metanol en el medio SDB y YNPD pero en este último mucho menos; así se comparándolos con la referencia se pudo extraer varios de los compuestos en los diferentes extractos y se observó varias tonalidades de pigmentaciones azul, rojo y naranja en los extractos obtenidos que estaban presentes en el extracto de referencia.

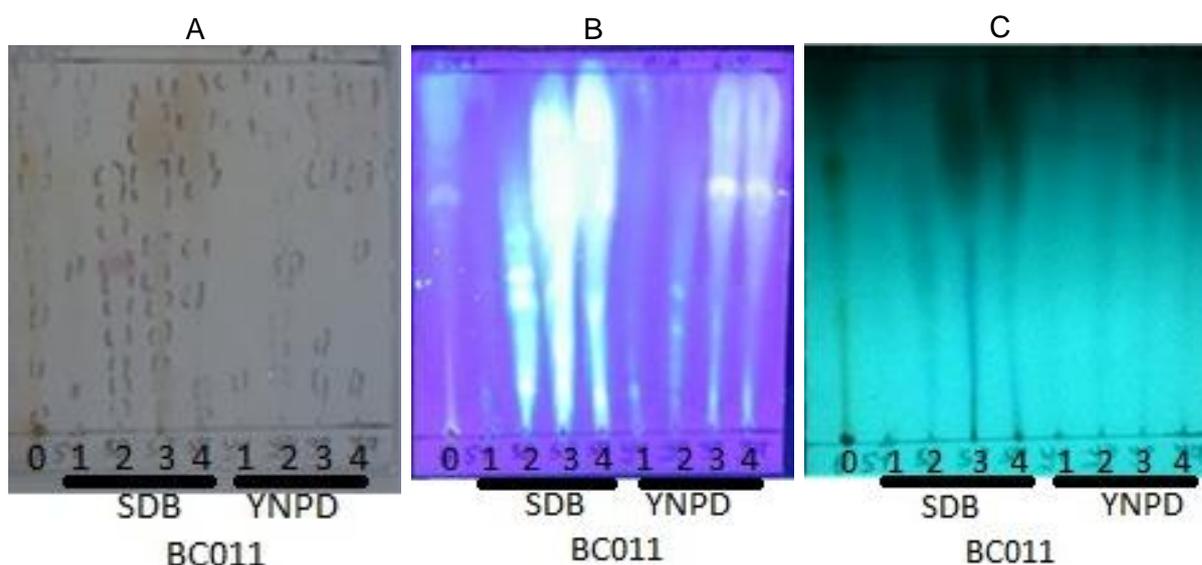


Figura 22. CCF de extractos obtenidos de BC 011 *Pycnoporus sanguineus*

Placa CCF sembrada con los 9 extractos (0: EJMA 019; 1: M1E1, 2: M1E2, 3: M1E3 y 4: M1E4 en SDB y 1: M2E1, 2: M2E2, 3: M2E3 y 4: M2E4 en YNPD); (A), Placa CCF Revelada con Ácido sulfúrico- Vainilina 1 %, (B), Placa CCF observada en UV 365 nm; y (C), Placa CCF observada con UV 254 nm.

Fuente: Autora, 2015.

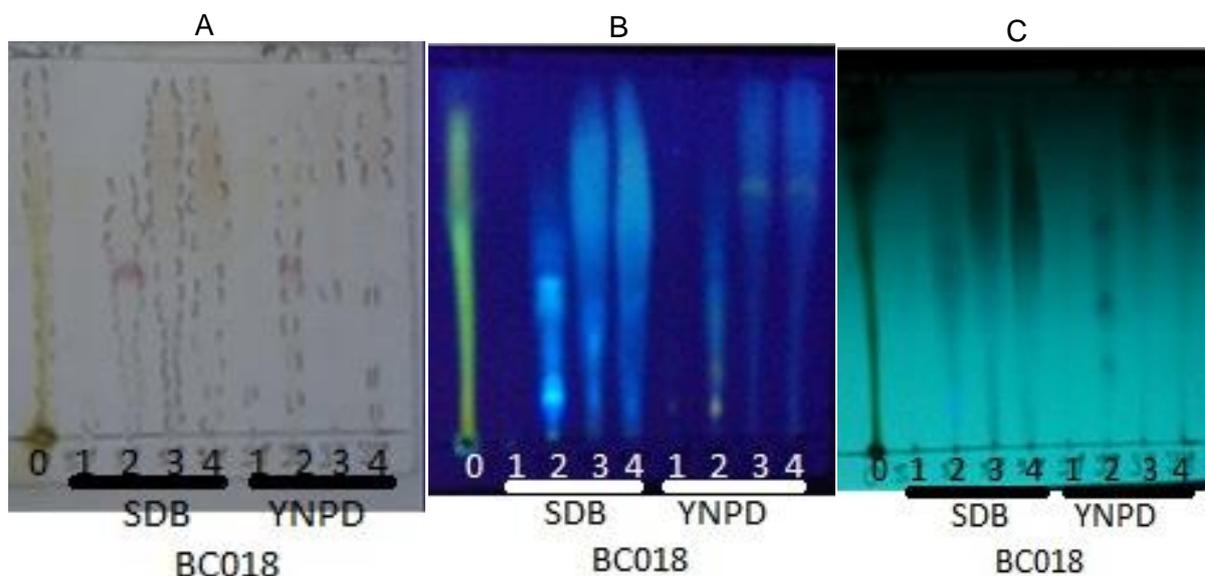


Figura 23. CCF de extractos obtenidos de BC 018 *Fuscoporia* sp.

Placa CCF sembrada con los 9 extractos ((0: EJMA 039; 1: M1E1, 2: M1E2, 3: M1E3 y 4: M1E4 en SDB y 1: M2E1, 2: M2E2, 3: M2E3 y 4: M2E4 en YNPD); (A), Placa CCF Revelada con Ácido sulfúrico- Vainilina 1 %) (B), Placa CCF observada en UV 365 nm; y (C), Placa CCF observada con UV 254 nm.

Fuente: Autora, 2015.

3.4.2.4. Concentración mínima inhibitoria (CMI).

En el cultivo BC 011 la actividad biológica resulto positiva (Figura 24) en el extracto obtenido con metanol de la resina del cultivo agotado SDB contra la bacteria gram positiva *Enterococcus faecalis* con una concentración de 1000 µg/ml, contra los hongos dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *mentagrophytes* con una concentración de 500 µg/ml. Y el extracto EJMA 019 contra los hongos dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *mentagrophytes* con una concentración de 500 µg/ml. En el cultivo BC 018 la actividad biológica resulto positiva en el extracto obtenido con acetona de la resina del cultivo agotado YNPD contra el hongo dermatofito *Trichophyton mentagrophytes* con una concentración de 500 µg/ml; y el extracto obtenido original contra la bacteria Gram positiva *Enterococcus faecalis* con una concentración de 500 µg/ml (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de CMI.

Dilución: 5mg/250ul	Concentración inicial: 1000 µg/ml	Hongos dermatofitos		Bacterias patógenas
		ATCC 28185	ATCC 28188	ATCC 29212 (G+)
		<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Especie:	Extractos:	Concentración activa		
<i>Pycnoporus Sanguineus</i>	BC011M1E4	500 µg/ml	500 µg/ml	Negativo
	EJMA 019	500 µg/ml	500 µg/ml	Negativo
<i>Fuscoporia</i> sp.	BC018M2E3	500 µg/ml	Negativo	1000 µg/ml
	EJMA 039	Negativo	Negativo	500 µg/ml

Resultados positivos de actividad biológica en microorganismos patógenos por cantidad mínima inhibitoria de extractos obtenidos de cultivos líquidos.

Fuente: Autora, 2015.



Figura 24. Resultados de actividad biológica por CMI.

(A), Positivo hasta B en pocillos 5, 6, 7 contra *Trichophyton mentagrophytes*, 8 y 9 contra *Trichophyton rubrum*; (B), Positivo hasta A en pocillo 7 y hasta B en pocillo 9 contra *Enterococcus faecalis*.

Fuente: Autora, 2015.

Según los estándares de actividad biológica como CMI menor a 75,0 µg/ml (actividad antimicrobiana fuerte); de 75,0 a 150,0 µg/ml (actividad antimicrobiana moderada); de 150,0 a 250,0 µg/ml (actividad antimicrobiana débil); y más de 250,0 µg/ml (actividad antimicrobiana nula o inactiva), estos resultados son inactivos totalmente ante los microorganismos analizados, sin embargo, al referirse a extractos obtenidos de hongos basidiomicetos se considera que definitivamente poseen actividad antibacteriana y antifúngica representativa pero en concentraciones elevadas (Prada & Vega, 2008); además de que la CMI no es una constante para un agente determinado ya que está influenciada por varios factores como la naturaleza del organismo en prueba, el tamaño del inóculo, la composición del medio de cultivo, tiempo de incubación y entre otros, ya que si hubo evidencia de actividad pero no significativa.

CONCLUSIONES

Todos los aspectos biológicos (genéticos, taxonómicos, fisiológicos, ecológicos) en los que se ha estudiado a los ejemplares para ampliar el conocimiento, han sido desarrollados con éxito, así en el aislamiento se obtuvieron cultivos in vitro totalmente puros del organismo de interés comprobando esto con los estudios de identificación en los cuales las características morfológicas in vitro (color de micelio y consistencia), las secuencias de ADN analizadas y la filogenia demuestran que las especies estudiadas tanto en ejemplar de recolección como en cultivos in vitro pertenecen a *Pycnoporus sanguineus* y *Fuscoporia* sp.

En los cultivos in vitro sólidos y líquidos es de gran importancia la selección correcta del medio debido a la disponibilidad de nutrientes q estos puedan ofrecer para este tipo de organismos basidiomicetos, en este estudio el medio de cultivo YNPD es ideal para la obtención de crecimiento abundante de micelio y el medio de cultivo SDB es el más adecuado para la fermentación y morfología desarrollada.

El *Pycnoporus sanguineus* tiene su etapa exponencial los 5 días de cultivo (5-7mm diarios), culminando su desarrollo morfológico a 13 días donde alcanza su producción metabólica, evidenciando la disminución del pH del cultivo acidificándolo junto con el cambio de tonalidad intensificado a partir de la tercera semana, siendo un indicativo de mayor producción metabólica.

El *Fuscoporia* sp. tiene su etapa exponencial a los 6 días de cultivo (2-3mm diarios), culminando su desarrollo morfológico a 20 días y alcanza su producción metabólica alrededor de los 13 días, con un pH ligeramente acidificado y con mayor producción metabólica a la cuarta semana con cambio de tonalidad.

El procedimiento de la obtención de extractos fue estudiado y establecido, obteniendo un alto rendimiento de extractos cuantitativamente y cualitativamente, la cantidad fue en base a porcentaje de rendimiento peso/peso siendo más elevada en extractos obtenidos por solventes de metanol y acetona en resina del cultivo agotado; y la variedad en base al estudio de CCF en el que se observó una amplia gama de compuestos químicos obtenidos con cloroformo del cultivo agotado.

Para un análisis completo de los metabolitos secundarios de los extractos obtenidos se realizó CMI en la cual no se obtuvo resultados relevantes pero debe tenerse en cuenta que algunos de los metabolitos que no presentaron actividad antimicrobiana pueden tenerla en algún otro aspecto según el apartados 1.2.2.4.

RECOMENDACIONES

El cultivo de macrohongos tropicales debe continuar en profundo estudio ya que probablemente generen un auge local, disminuyendo costos de producción, plagas y enfermedades y su consumo se incluya en la dieta normal de la población más necesitada de alimento de mayor contenido nutricional.

Enfatizar en la acción individual de cada uno de los componentes de los medios para optimizar el proceso de fermentación del cultivo y así obtener un mayor contenido de micelio y aumento del rendimiento. Establecer un medio óptimo de producción de metabolitos secundarios de interés; además ampliar el estudio del proceso de obtención de extractos con el empleo de varios disolventes en distintas formas de cultivo para extracción de algunos metabolitos no obtenidos que poseen significancia de actividad biológica y que no han sido estudiados en este proyecto.

Realizar estudios complementarios más específicos a partir de los extractos obtenidos como análisis por Cromatografía líquida de alta eficiencia, Espectrofotometría de masas y Resonancia magnética nuclear, que permitan establecer si los diferentes extractos analizados presentan compuestos nuevos, o si se trata de un compuesto conocido y reportado.

El método desarrollado para el cultivo y obtención de extractos sirve como base para posteriores análisis y cuantificación de metabolitos secundarios de diferentes ejemplares y cultivos de basidiomicetos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, E., Olivas, A., De Anda Jáuregui, A., Blanco, J., & Garza, R. (2011). *Los macromicetos del Jardín Botánico de ECOSUR" Dr. Alfredo Barrera Marín", Puerto Morelos, Quintana Roo*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Acosta, L., Alonso, G., Rodríguez, A., Adame, M., Salgado, D., Salgado, J., Montiel, M., Medrano, F., & Villegas, E. (2010). *Pycnoporus sanguineus, un hongo con potencial biotecnológico*. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. ISBN 970-9752-01-4.

Aguirre, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., & Valenzuela, R. (2014). *Biodiversidad de hongos en México*. Revista mexicana de biodiversidad, 85, S76-S81.

Ainsworth, G. (1976). *Introduction to the History of Mycology*. Cambridge University Press. ISBN 0-521-11295-8.

Alexopoulos, C., & Mims, C. (1985). *Introducción a la Micología*. Ed. Omega, Barcelona. Botánica, Ed. McGraw-Hill.

Alexopoulos, C., Mims, C., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. John Wiley and Sons. ISBN 0471522295.

Andrews, J. (2001). *Determination of minimum inhibitory concentrations*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48 (Suppl. 1):5-16.

Arias, E., & 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., & 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.

Bevenue, A. (1974). *Thin-Layer chromatographic examination of various seed oils*. Journal of Chromatography, 95-2. p. 235-237.

Blanchette, R., Farrell, R., & Iverson, S. (1998). *Descomposición de la pez con hongos e la podredumbre blanca*. Clariant Finance (BVI) Limited Citco Building, Wickams Cay, P.O. Box 662 Road Town, Tortola, VG. Oficina Española de Patentes y Marcas. Madrid – España.

Bolaños, A., & Soto, E. (2012). *Macrohongos Comestibles y Medicinales Comunes en la Vegetación de la Universidad del Valle*. Colombia. Revista de Ciencias, 15, 31-38.

Borchsenius, F. (1997). *Patterns of plant species endemism in Ecuador*. Biodiversity and Conservation 6: 379–399.

Brizuela, M., García, L., Pérez, L., & Mansur, M. (1998). *Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios*. Revista Iberoam Micol 15. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). La Habana - Cuba. Pag. 69-74.

Brummitt, N., & Lughadha, E. (2003). *Biodiversity: where's hot and where's not*. Conservation Biology, 17(5), 1442-1448.

Bussmann, R. (2005). *Bosques andinos del sur de Ecuador, clasificación, regeneración y uso*. Revista Peruana de biología. Vol 12, N^o.2, p.203-216. ISSN 1727-9933.

Cabeza, E. (2011). *Fundamentos de microbiología Predictiva: aplicaciones teóricas y prácticas*. Primera edición. Universidad de Pamplona. Complejo científico y tecnológico Simón Bolívar. Pamplona-Colombia. pp 16.

Cartuche, L., Cruz, D., & Andrade J. (2014). *Recolección, caracterización y evaluación del potencial farmacológico de actinomicetos y basidiomicetos en la Región Sur del Ecuador*. Proyecto PROY_QUI_817 de Universidad Técnica Particular de Loja. Área biológica y biomédica.

Cases, M., & Hens, A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Reverté.

Cochrane, V. (1963). *Physiology of Fungi*. John Wiley & Sons Inc. Nueva York. 524pg.

Conservation International. (2011). *Biological diversity in Tumbes-Chocó-Magdalena y Andes Tropicales*.

Courtillota, V., Davaillea, A., Bessea, J., & Stock, J. (2003). *Three distinct types of hotspots in the Earth's mantle*. Earth and Planetary Science Letters.

Chaves, J., Navarro, E., & Alvarado, E. (2008). *Unidad estratégica de hongos*. Instituto Nacional de Biodiversidad. INBio.

Cuesta, F., Peralvo, M., & Valarezo, N. (2009). *Los bosques montanos de los Andes Tropicales*. Programa Regional ECOBONA-Intercooperation.

De las Salas, G. (1987). *Suelos y ecosistemas forestales: con énfasis en América Tropical*. (No. 80). Lica.

Demain, A. (1986). *Regulation of secondary metabolism in fungi*. Pure & Appl Chem., 58, (2), 219—226

DePaolo, D., & Manga, M. (2003). *Deep Origin of Hotspots*. Science. The Mantle Plume Model.

Dirzo, R., & Raven, P. (2003). *Global state of biodiversity and loss*. Annual Review of Environment and Resources, 28(1), 137-167.

Fernández, C., González, M., Illnait, M., & Martínez, G. (1998). *Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico*. Revista Cubana de Medicina Tropical, 50(1), 48-53.

Flores, O. (2015). *Caracterización molecular de Basidiomycetes a partir de aislamientos y fructificaciones colectados en la Reserva Biológica san Francisco RBSF*. Trabajo de fin de titulación. Universidad Técnica Particular de Loja. Área Biológica. Titulación de Bioquímica y farmacia. pp 18 - 19, 39 -42.

Freire, A. (2004). *Botánica Sistemática Ecuatoriana*. St. Louis, MO, Missouri Botanical Garden.: ix, 209p. ISBN 9978-43-481-X.

García, A., & Bolaños, A. (2011). *Macrohongos presentes en el bosque seco tropical de la región del Valle del Cauca*. Colombia. Revista de Ciencias, 14, 45-54.

Gentry, A. (1990). *La región amazónica. Selva Húmeda de Colombia*. Villegas Editores. Bogotá. Colombia. Págs. 53-64.

Gentry, A. (1995). *Diversity and floristic composition of Neotropical dry forests*. Cambridge. Pp. 146-194. In: Bullock, S.H., Mooney, H.A. & Medina, E. (eds) *Seasonally dry tropical forests*. Cambridge University Press.

Guzmán, G. (1997). *Los nombres de los hongos y lo relacionado con ellos en América Latina: introducción a la etnomicobiota y micología aplicada de la región: sinonimia vulgar y científica*. Instituto de Ecología.

Herrera, T., Ulloa, M., & Oronoz, M. (1998). *El reino de los hongos: micología básica y aplicada*. 2da Edición. Editorial Dewey. México.

Josse, C., Cuesta, F., Navarro, G., Barrena, V., Cabrera, E., Chacón, E., & Tovar, A. (2009). *Ecosistemas de los Andes del norte y centro. Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela*. Secretaría General de la Comunidad Andina, Lima.

Kavanagh, K. (2005). *Fungi biology and applications*. John Wiley & Sons Ltd. Inglaterra. 297 pg.

Kendrick, B. (2000). *The Fifth kingdom*. Edition 3. Focus Publishing, Massachessets, EUA 373.

Kessler, M. (1992). *The Vegetation of South-West Ecuador*. Biosphere Publications. Pp. 79-100 en B. J. Best (ed.), *The Threatened Forest of South-West Ecuador*. Leeds.

Kirk, P., Cannon, P., Minter, D., & Stalpers, J. (2008). *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 10th edn. CABI, Wallingford

Krikorian, A. (1991). *Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación*. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 41-77.

Kuhar, F., Castiglia, V., & Papinutti, L. (2013). *Los hongos en el laboratorio: de la naturaleza al cultivo axénico*. Boletín Biológica. Volumen 7. N° 27. pp 5-8.

Linz, U. (1991). *Protocol optimization and the need for standarization of the polymerasa chain reaction*. Methods Mol. Cell. Biol. 2:98-102.

Lloyd, L. (1924). *Trametes sanguinea* (L.) (also see *Species Fungorum: Pycnoporus sanguineus*); *Polyporaceae Trametes sanguinea* (L.). In: Mycol. Writ. 7(Letter 72): 1291.

Lomascolo, A., Boukhris, E., & Gimbert, I. (2011). *Peculiarities of Pycnoporus species for applications in biotechnology*. Appl. Microbiol. Biotechnol. N^o 92. pp 1129 -1149.

López, L., & Torres, C. (2006). *Medios de cultivo*. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de agroindustrias. Microbiología General- Carrera Farmacia.

Lozano, P. (2002). *Los tipos de bosque en el sur de Ecuador*. Bótanica Austroecuatoriana. Estudios sobre los recursos vegetales en las provincial de El Oro, Loja y Zamora-Chinchipe. Abya-Yala, Quito, 29-49.

Luque, J. (1989). *Efectos de la temperatura, medio de cultivo y pH en el crecimiento colonial de "Diplodia mutila"*. Fr. apud Mont. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid* (Vol. 46, No. 1, pp. 215-221). Real Jardín Botánico

Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., Padamsee, M., Hibbett, D., James, T., Baloch, E., Grube, M., Reeb, V., Hofstetter, V., Schoch, C., Arnold, A., Miadlikowska, J., Spatafora, J., Johnson, D., Hambleton, S., Crockett, M., Shoemaker, R., Sung, G., Lücking, R., Lumbsch, T., O'Donnell, K., Binder, M., Diederich, P., Ertz, D., Gueidan, C., Hansen, K., Harris, R., Hosaka, K., Lim, Y., Matheny, B., Nishida, H., Pfister, D., Rogers, J., Rossmann, A., Schmitt, I., Sipman, H., Stone, J., Sugiyama, J., Yahr, R., & Vilgalys, R. (2004). *Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits*. American journal of botany, 91(10), 1446-1480.

Marcon, J., Trierweiler, L., Loguercio, C., & Ryvarden, L. (2009). *Santa Catarina Island mangroves 3: a new species of Fuscoporia*. Mycologia, 101 (6). pp 859-863.

Mata, M., Halling, R., & Mueller, G. (2003). *Macrohongos de Costa Rica*. Vol. 2. Editorial INBio.

Miles, P., & Chang, S. (2002). *Biología de las setas. Fundamentos Básicos y acontecimientos actuales*. Ágora Editores. Santafé de Bogotá-Colombia.

Montes, B., Restrepo, A., & McEwen, J. (2003). *Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su posible aplicación médica*. Biomédica, 23(2), 213-24.

Montoya, A., Hayakawa, H., Minamya, Y., Fukuda, T., Lopez, C., & Franco, A. (2011). *Relaciones filogenéticas y revisión de las especies del género Auricularia (Fungi: Basidiomycetes) en Colombia*. Caldasia, 33(1), 55-66.

Mueller, G., Bills, G., & Foster, M. (2004). *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press. China. 762p.

Murrill, W. (1907). "*Polyporaceae, Parte 1*". North American flora 9 (1): 1-72.

Myers, N. (1988). *Threatened biotas: "hot spots" in tropical forests*. Environmentalist, 8(3), 187-208.

Myers, N., Mittermeier, R., Mittermeier, C., Da Fonseca, G., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.

Narrea, M., & Malpartida J. (2006). *Evaluación de medios de cultivo en la producción de conidias y crecimiento diametral de cuatro cepas del hongo entomopatógeno Beauveria brongniartii (Saccardo) Petch*. *Revista Peruana de Entomología*. 45:145-147.

Procedimiento al que se sometió a los cultivos líquidos de SDB y YNPD de los dos ejemplares de interés.

, A., & Subero, L. (2006). *Crecimiento y esporulación de Bipolaris oryzae (Breda de Haan) Schoem., en diferentes medios de cultivo, condiciones de luz y temperatura*. *Rev. Fac. Agron.(UCV)*, 32, 145-154.

Orme, C., Davies, R., Burgess, M., Eigenbrod, F., Pickup, N., Olson, V., Webster, A., Ding, T., Rasmussen, P., Ridgely, R., Stattersfield, A., Bennett, P., Blackburn, T., Gaston, K., & Owens, I. (2005). *Global hotspots of species richness are not congruent with endemism or threat*. *Nature*, 436(7053), 1016-1019.

Papinutti, L. (2013). *Pycnoporus sanguineus. Ficha micológica*. *Revista boletín biológico*. N^o 29. Año 7. pp 32 – 33

Park, K., & Talaro, A. (1999). *Foundations in microbiology*. Edición 3. The McGraw-Hill Companies, Inc.

Piepenbring, M., Hofmann, T., Unterseher, M., & Kost, G. (2012). *Species richness of plants and fungi in western Panama: towards a fungal inventory in the tropics*. *Biodiversity and Conservation*, 21(9), 2181-2193.

Prada, L., & Vega, P. (2008). *Caracterización y evaluación de actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de hongos de la familia tricholomataceae frente a agentes casuales de dermatomicosis en animales*. Pontificia Universidad Javeriana facultad de ciencias. Carrera de microbiología industrial. Bogotá D.C.

Ramírez, L., & Castaño, D. (2009). *Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal*. *Scientia et Technica*, 2(42).

Raymundo, T., Valenzuela, R., Bautista, S., Esqueda, M., Cifuentes, J., & Pacheco, L. (2013). *El género Fuscoporia (Hymenochaetales, Basidiomycota) en México*. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84, S50-S69.

Razola, I., Benayas, J., De la Montaña, E., & Cayuela, L. (2006). *Selección de áreas relevantes para la conservación de la biodiversidad*. *Revista Ecosistemas*, 15(2).

Ryvarden, L. (1972). *A critical checklist of the Polyporaceae in tropical East Africa*. *Norwegian Journal of Botany* 19: 229–38.

Ryvarden, L. (2004). *Neotropical Polypores Part 1. Synopsis Fungorum 19 Fungiflora*. Norway, Ed, PowerPrint A/S steinkjer 229p.

Salvador, C. (2011). *Diversidad y distribución de políporos (Basidiomycota) en un gradiente altitudinal del corredor biológico Marcapata-Camanti (Cusco)*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de ciencias biológicas. Perú Lima.

Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, C., Chen, W., & Griffith, G. (2012). *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.

Seifert, K. (2009). *Progress towards DNA barcoding of fungi*. *Molecular Ecology Resources*, 9(s1), 83-89.

Silva, H., Landa, A., & Agosin, E. (1990). *Aislamiento, selección y caracterización de hongos ligninolíticos chilenos*. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales*, 23, 41-49.

Solé, M. (2004). *Caracterización morfológica y molecular de hongos queratinofílicos: el orden onygenales*.

Urcelay, C., Robledo, G., Heredia, F., Morera, G., & Montaña, F. (2012). *Hongos de la madera en el arbolado urbano de Córdoba*. Córdoba, Argentina. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (UNC-CONICET).

Vilanova, E., & Sogorb, M. (2004). *Técnicas analíticas de contaminantes químicos: Aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias*. Ediciones Díaz de Santos.

Wagner, T., & Fischer, M. (2001). *Natural groups and revised system for the European poroid Hymenochaetales (Basidiomycota) supported by nLSU rDNA sequence data*. *Mycological Research* 105: 773–82.

White, T., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. Academic, San Diego. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. pp 315–322

Wright, J., & Albertó, E. (2002). *Hongos. Guía de la región Pampeana. I. Hongos con laminillas*. Buenos aires Ed., I.O.I.A. 412 p

Yang, Z. (2011). *Molecular techniques revolutionize knowledge of basidiomycete evolution*. *Fungal Diversity*, 50(1), 47-58.

ANEXOS

ANEXO 1. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE MEDIOS SÓLIDOS DE AISLAMIENTO:

MEA (Agar extracto de Malta) o PDA (Agar Papa Dextrosa) suplementado con Cloranfenicol al 3 %

1. Adquirir el medio sólido MEA o PDA comercialmente a través de un distribuidor.
2. Leer cuidadosamente el instructivo del envase del medio de cultivo deshidratado.
3. Realizar cálculos para la cantidad deseada tanto de medio de cultivo deshidratado como para el antibiótico.
4. Preparar según indicaciones generales: MEA (para un volumen 1000 ml de Medio sólido se requiere 33,6 g del contenido del envase) y PDA (para un volumen 1000 ml de Medio sólido se requiere 39 g del contenido del envase)
5. Pesar con exactitud el contenido requerido y disolverlo en el volumen deseado. Para disolver completamente se requiere de calentar el medio por 5 minutos hasta observar una consistencia traslúcida, evitar que la mezcla hierva o se derrame.
6. Comprobar pH: MEA (4.7 ± 0.2) y PDA (3.5 ± 0.2), etiquetar y tapar correctamente.
7. Autoclavar el recipiente con la mezcla a 121 °C durante 20 minutos.
8. Esterilizar cajas monopetri plásticas de 8 cm de diámetro mediante UV por 20 minutos.
9. Una vez autoclavado el medio de cultivo adicionar el volumen requerido de antibiótico (cloranfenicol al 3 %) según los cálculos.
10. Dispensar en un volumen de 25 ml por caja monopetri, dentro de la cabina de contención nivel II.
11. Dejar solidificar, tapar, sellar con parafilm y etiquetar correctamente cada caja con el nombre del medio de cultivo y la fecha de preparación.
12. Almacenar bajo condiciones asépticas y ambientales; llevar una placa a 30 °C como control para comprobar su estado aséptico.

ANEXO 2. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE MEDIOS SÓLIDOS DE CULTIVO:

Medios Sólidos Comerciales: MEA (Agar Extracto de Malta), PDA (Agar Papa Dextrosa) y SDA (Agar Sabouraud Dextrosa).

1. Adquirir el medio sólido MEA, PDA o SDA comercialmente a través de un distribuidor.
2. Leer cuidadosamente el instructivo del envase del medio de cultivo deshidratado.
3. Realizar cálculos para la cantidad deseada de medio de cultivo deshidratado.
4. Preparar según indicaciones generales: MEA (para un volumen 1000 ml de Medio sólido se requiere 33,6 g del contenido del envase); PDA (para un volumen 1000 ml de Medio sólido se requiere 39 g del contenido del envase) y SDA (para un volumen 1000 ml de Medio sólido se requiere 65 g del contenido del envase)
5. Pesar con exactitud el contenido requerido y disolverlo en el volumen deseado. Para disolver completamente se requiere de calentar el medio por 5 minutos hasta observar una consistencia traslúcida, evitar que la mezcla hierva o se derrame.
6. Comprobar pH: MEA (4.7 ± 0.2), PDA (3.5 ± 0.2) y SDA (5.6 ± 0.2), etiquetar y tapar correctamente.
7. Autoclavar el recipiente con la mezcla a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos.
8. Esterilizar cajas monopetri plásticas de 8 cm de diámetro mediante UV por 20 minutos.
9. Dispensar en un volumen de 25 ml por caja monopetri, dentro de la cabina de contención nivel II.
10. Dejar solidificar, tapar, sellar con parafilm y etiquetar correctamente cada caja con el nombre del medio de cultivo y la fecha de preparación.
11. Almacenar bajo condiciones asépticas y ambientales; llevar una placa a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ como control para comprobar su estado aséptico.

Medios Sólidos Experimentales: YNPD (Agar Nutritivo) y SMA (Agar Sabouraud Maltosa)

1. Adquirir componentes de la formulación del medio sólido YNPD y SMA.

YNPD (1000 ml): Agar Bacto 15 g, Glucosa 10 g, Extracto de Malta 10 g, Peptona 2 g, Extracto de Levadura 2 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g y 10 ml Tiamina. (Blanchette, Farrell & Iverson, 1998)

SMA (1000 ml): Agar Bacto 15 g, Peptona 10 g y Maltosa 40 g. (Narrea & Malpartida; 2006)

2. Realizar cálculos para la cantidad deseada de cada uno de los componentes.
3. Pesar con exactitud el contenido requerido de cada componente, mezclar, luego adicionar el agua destilada en el volumen deseado, homogenizar.
4. Para disolver completamente se requiere de calentar el medio por 5 minutos hasta observar una consistencia traslúcida, evitar que la mezcla hierva o se derrame.
5. Adicionar para YNPD el componente líquido (tiamina)
6. Comprobar pH: SMA (7.0 ± 0.2) y YNPD (5.0 ± 0.2), etiquetar y tapar correctamente.
7. Autoclavar el recipiente con la mezcla a 121°C durante 20 minutos.
8. Esterilizar cajas monopetri plásticas de 8 cm de diámetro mediante UV por 20 minutos.
9. Dispensar en un volumen de 25 ml por caja monopetri, dentro de la cabina de contención nivel II.
10. Dejar solidificar, tapar, sellar con parafilm y etiquetar correctamente cada caja con el nombre del medio de cultivo y la fecha de preparación.
11. Almacenar bajo condiciones asépticas y ambientales; llevar una placa a 30°C como control para comprobar su estado aséptico.

ANEXO 3. 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 de 20 µg peso seco y mézclelo por vortex vigoroso.
3. Incube la mezcla por 1^o minutos 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 minutos a máxima velocidad.
5. Vierta el lisado en una columna lila colocada en un tubo de colección de 2 ml y centrifugue por 2 minutos a máxima velocidad.
6. Transfiera la fracción sobrenadante del paso 5 a un nuevo tubo (no incluido) sin alterar el pellet 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 minuto 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 minuto a 600 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 minutos a máxima velocidad para secar la membrana.
12. Transfiera la columna a un nuevo tubo de micro-centrifuga de 1.5 o 2 ml (no incluido) y pipetee 50 µl de buffer AE precalentado a 65 °C directamente en la membrana. Incube por 5 minutos a temperatura ambiental y centrifugue por 1 minuto 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 4. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE MEDIOS LÍQUIDOS DE CULTIVO:

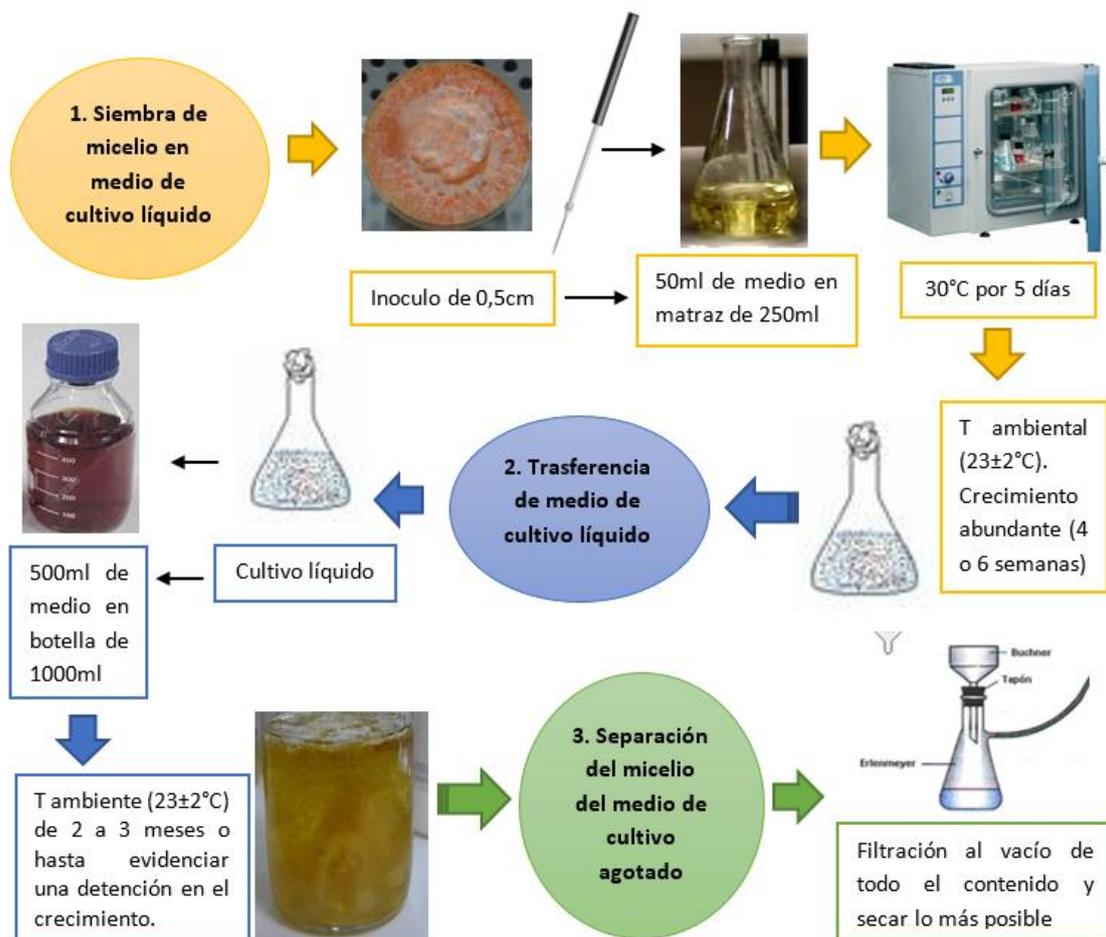
Medios Líquidos Comerciales: SDB (Caldo Sabouraud Dextrosa).

1. Adquirir el medio líquido SDB comercialmente a través de un distribuidor.
2. Leer cuidadosamente el instructivo del envase del medio de cultivo deshidratado.
3. Realizar cálculos para la cantidad deseada de medio de cultivo deshidratado.
4. Preparar según indicaciones generales: SDB (para un volumen 1000 ml de Medio sólido se requiere 30 g del contenido del envase)
5. Pesar con exactitud el contenido requerido y disolverlo en el volumen deseado.
6. Comprobar pH: SDA (5.6 ± 0.2), etiquetar con el nombre del medio de cultivo y la fecha de preparación y tapar correctamente
7. Autoclavar el recipiente con la mezcla a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos.
8. Mantenerlo a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Se recomienda su utilización lo antes posible.

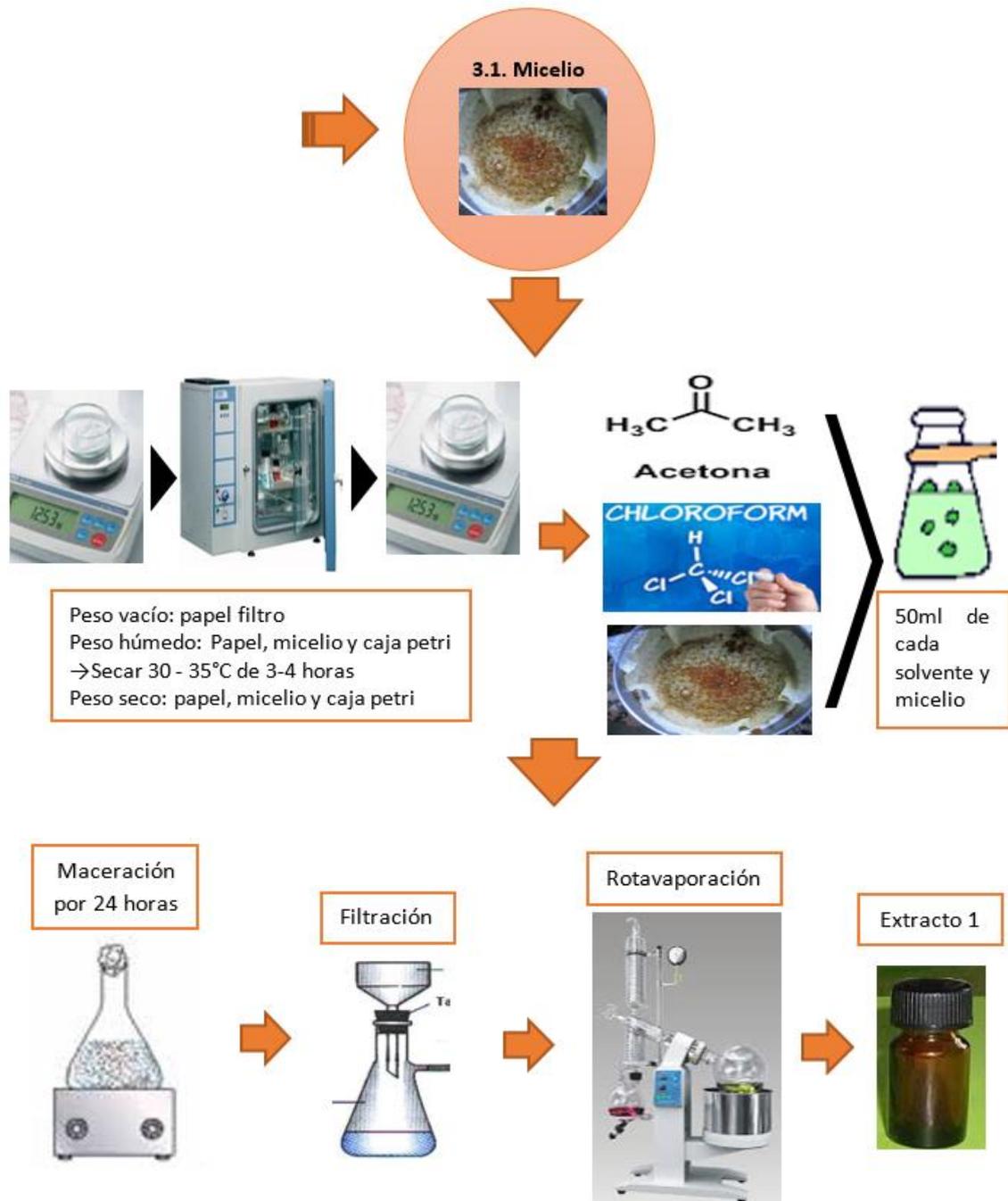
Medios Líquidos Experimentales: YNPD (Agar Nutritivo)

1. Adquirir componentes de la formulación del medio sólido YNPD y SMA.
YNPD (1000 ml): Glucosa 10 g, Extracto de Malta 10 g, Peptona 2 g, Extracto de Levadura 2 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g y 10 ml Tiamina. (Blanchette, Farrell & Iverson, 1998)
2. Realizar cálculos para la cantidad deseada de cada uno de los componentes.
3. Pesar con exactitud el contenido requerido de cada componente, mezclar, luego adicionar el agua destilada en el volumen deseado, homogenizar.
4. Adicionar para YNPD el componente líquido (tiamina)
5. Comprobar pH: YNPD (5.0 ± 0.2), etiquetar con nombre del medio de cultivo y la fecha de preparación y tapar correctamente.
6. Autoclavar el recipiente con la mezcla a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos.
7. Mantenerlo a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Se recomienda su utilización lo antes posible.

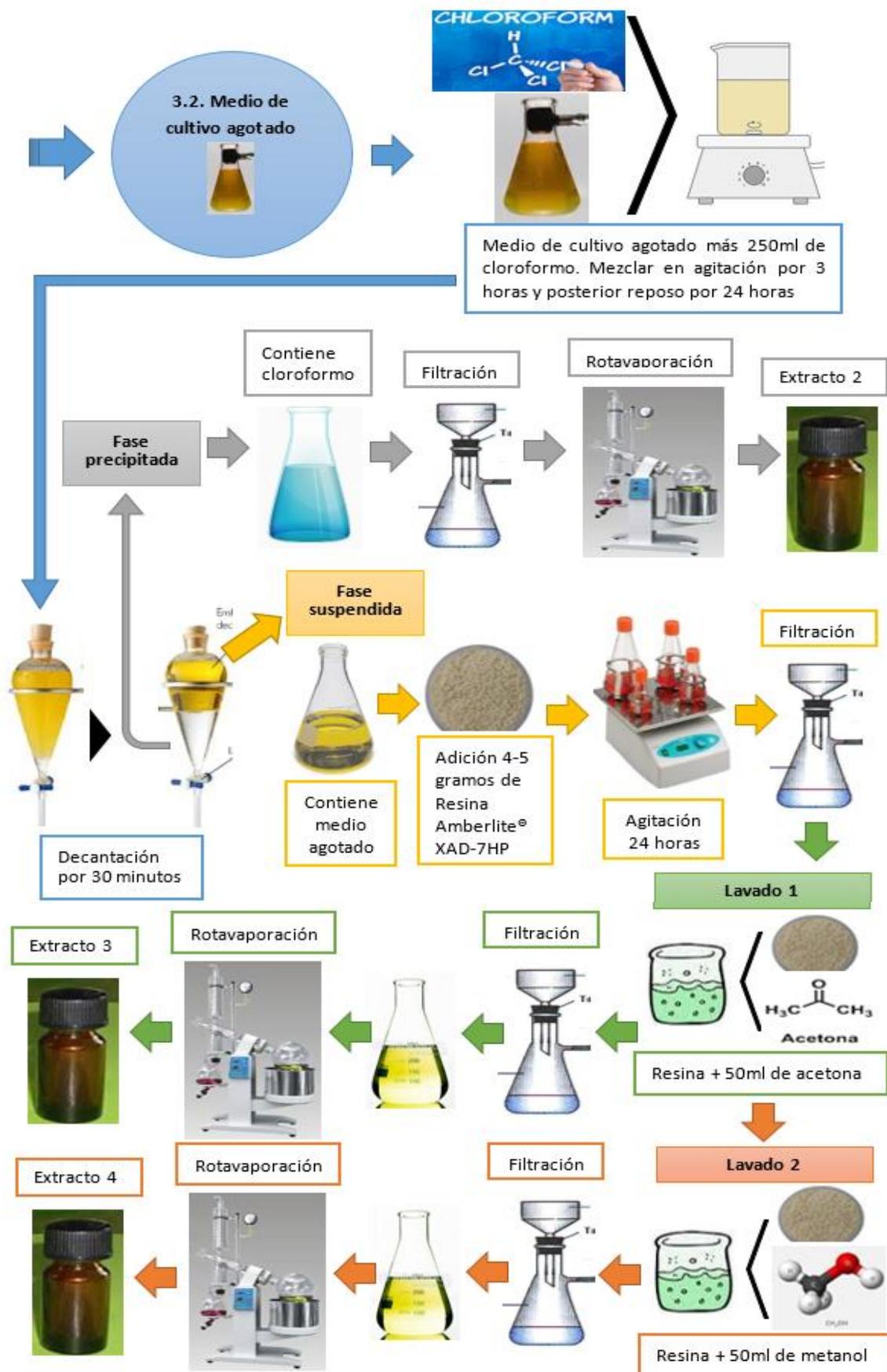
ANEXO 5. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS:



Fuente: Autora, 2015.



Fuente: Autora, 2015.



Fuente: Autora, 2015.

ANEXO 6. DATOS EXPERIMENTALES:

Micelio y extractos obtenidos de cultivos líquidos.

Código:	BC011	Especie:	Siembra (25 ml):	27/10/2014		
Medio:	SDB	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Traspaso (500 ml):	03/12/2014		
pH inicial: 5,6	pH final: 4,4		Fecha final:	10/02/2015		
Recipiente 1:	Micelio de Hongo					
Peso vacío (g):	Peso húmedo (g):	Peso Neto Húmedo (g):	Peso Seco (g):	Peso Neto Seco (g):		
45,001	47,1976	2,1966	45,3222	0,3212		
Recipiente 2:	Extractos de Hongo					
N°	Origen:	Solvente:	Peso Vacío (g):	Peso Seco (g):	Peso Neto (g):	Peso Neto (mg):
1	Micelio	Acetona : Cloroformo (1:1)	8,4522	8,4606	0,0084	8,4
2	Cultivo Agotado	Cloroformo	8,3139	8,315	0,0211	21,1
3	Resina	Acetona	8,4585	8,5612	0,1027	102,7
4	Resina	Metanol	8,3335	8,472	0,1385	138,5

Fuente: Autora, 2015.

Código:	BC011	Especie:	Siembra (25 ml):	27/10/2014		
Medio:	YNPD	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Traspaso (500 ml):	28/11/2014		
pH inicial: 5	pH final: 3,93		Fecha final:	30/01/2015		
Recipiente 1:	Micelio de Hongo					
Peso vacío (g):	Peso húmedo (g):	Peso Neto Húmedo (g):	Peso Seco (g):	Peso Neto Seco (g):		
44,894	52,6636	7,7696	46,4071	1,5134		
Recipiente 2:	Extractos de Hongo					
N°	Origen:	Solvente:	Peso Vacío (g):	Peso Seco (g):	Peso Neto (g):	Peso Neto (mg):
1	Micelio	Acetona : Cloroformo (1:1)	8,3842	8,4056	0,0214	21,4
2	Cultivo Agotado	Cloroformo	8,3043	8,3109	0,0066	6,6
3	Resina	Acetona	8,2724	8,3394	0,067	67
4	Resina	Metanol	8,4377	8,489	0,0513	51,3

Fuente: Autora, 2015.

Código:	BC018	Especie:	Siembra (25 ml):	30/10/2014		
Medio:	SDB	<i>Fuscoporia</i> sp.	Traspaso (500 ml):	23/12/2014		
pH inicial: 5,6	pH final: 5,1		Fecha final:	06/03/2015		
Recipiente 1:	Micelio de Hongo					
Peso vacío (g):	Peso húmedo (g):	Peso Neto Húmedo (g):	Peso Seco (g):	Peso Neto Seco (g):		
45,2354	46,5105	1,2771	45,3506	0,1172		
Recipiente 2:	Extractos de Hongo					
N°	Origen:	Solvente:	Peso Vacío (g):	Peso Seco (g):	Peso Neto (g):	Peso Neto (mg):
1	Micelio	Acetona : Cloroformo (1:1)	8,4454	8,4465	0,0011	1,1
2	Cultivo agotado	Cloroformo	8,4105	8,4322	0,217	21,7
3	Resina	Acetona	8,3229	8,5472	0,2243	224,3
4	Resina	Metanol	8,283	8,4546	0,1716	171,6

Fuente: Autora, 2015.

Código:	BC018	Especie:	Siembra (25 ml):	30/10/2014		
Medio:	YNPD	<i>Fuscoporia</i> sp.	Traspaso (500 ml):	12/12/2014		
pH inicial: 5	pH final: 4,98		Fecha final:	04/03/2015		
Recipiente 1:	Micelio de Hongo					
Peso vacío (g):	Peso húmedo (g):	Peso Neto Húmedo (g):	Peso Seco (g):	Peso Neto Seco (g):		
43,2913	45,3975	2,1062	43,91	0,6187		
Recipiente 2:	Extractos de Hongo					
N°	Origen:	Solvente:	Peso Vacío (g):	Peso Seco (g):	Peso Neto (g):	Peso Neto (mg):
1	Micelio	Acetona : Cloroformo (1:1)	8,2157	8,2187	0,003	3
2	Cultivo agotado	Cloroformo	8,3299	8,3379	0,008	8
3	Resina	Acetona	8,1978	8,2427	0,0449	44,9
4	Resina	Metanol	8,2358	8,286	0,0502	50,2

Fuente: Autora, 2015.