



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**



## **INSTITUTO DE POSTGRADO**

### **MAESTRIA EN GESTIÓN SUSTENTABLE DE RECURSOS NATURALES**

**“Desarrollo de un proceso para el aislamiento, conservación y producción del hongo medicinal oreja de palo (*Pycnoporus spp.*) a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana”**

**Trabajo de Investigación previo a la obtención del Título de Magíster en Gestión Sustentable  
de Recursos Naturales**

**Director:** Pineda Insuasti, Julio Amilcar, PhD

**Autor:** Gómez Andrade, William Edison

**Ibarra - Ecuador**

**2017**

## **APROBACION DEL TUTOR**

En calidad de tutor del Trabajo de Grado, presentado por el Ingeniero Willian Edisson Gómez Andrade, para optar por el grado de Magíster en Gestión Sustentable de los Recursos Naturales, doy fe de que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a presentación (pública o privada) y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

En la ciudad de Ibarra, a 09 días del mes de Junio del 2017.

  
Ing. Julio Pineda Insuasti, PhD

**Desarrollo de un proceso para el aislamiento, conservación y producción del hongo medicinal oreja de palo (*Pycnoporus spp.*) a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana**

Por: Willian Edison Gómez Andrade

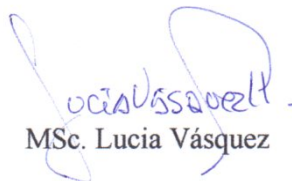
Trabajo de Grado de Maestría aprobado en nombre de la Universidad Técnica del Norte, por el siguiente jurado, a días 09 de junio del 2017.



PhD José País



MSc. Lennys Berutti



MSc. Lucia Vásquez

## **DEDICATORIA**

A mi esposa por ese optimismo que siempre me impulsó a seguir adelante y el apoyo incondicional desde el inicio de mis estudios de la maestría, a mis hijos Andréé y Juan José por todas las veces que no pudieron tener a su padre a tiempo completo.

A mis familiares y amigos que siempre tuvieron una palabra de apoyo para mí durante mis estudios.

## **AGRADECIMIENTO**

A todas instituciones que aportaron para llevar a cabo esta investigación, de manera muy especial al Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA), al Ingenio Azucarero del Norte (IANCEM) y a la Universidad Técnica del Norte (UTN).

Aquellas personas que compartieron sus conocimientos para hacer posible la culminación de esta investigación. De manera especial al Ing. Julio Pineda Insuasti PhD, tutor de este trabajo, por su ayuda y seguimiento al mismo.

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**INSTITUTO DE POSTGRADO**

**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**

**AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA  
UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA**

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto Repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la Universidad.

Por medio del presente documento dejo sentada mi voluntad de participar en este proyecto, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

<b>DATOS DE CONTACTO</b>			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	DE	1001977030	
APELLIDOS Y NOMBRES:	Y	Gómez Andrade William Edison	
DIRECCIÓN:		Tena 8-20 y Tungurahua	
EMAIL:		williamedisson@yahoo.es	
TELÉFONO FIJO:	062607022	TELÉFONO MÓVIL:	0983000610

<b>DATOS DE LA OBRA</b>	
<b>TÍTULO:</b>	<b>Desarrollo de un proceso para el aislamiento, conservación y producción del hongo medicinal oreja de palo (<i>Pycnoporus spp.</i>) a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana</b>
<b>AUTOR (ES):</b>	Gómez Andrade Willian Edison
<b>FECHA:</b>	09 de junio del 2017
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
<b>PROGRAMA:</b>	<input type="checkbox"/> <b>PREGRADO</b> <input type="checkbox"/> <b>POSGRADO</b>
<b>TITULO POR EL QUE OPTA:</b>	Magíster en Gestión Sustentable de los Recursos Naturales
<b>ASESOR /DIRECTOR:</b>	Ing. Julio Amilcar Pineda Insuasti, (PhD)

## 2. AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

Yo, William Edison Gómez Andrade, con cédula de ciudadanía Nro. 1001977030, en calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de grado descrito anteriormente, hago entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con la Ley de Educación Superior Artículo 144.

### 3. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, al 09 de junio del 2017

**EL AUTOR:**



Willian Edison Gómez Andrade

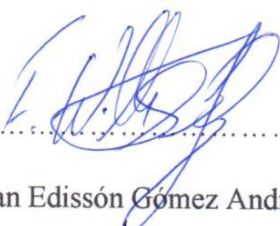
C.C.: 1001977030



**CONCESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE GRADO A  
FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

Yo, Gómez Andrade Willian Edison, con cédula de ciudadanía Nro. 1001977030 manifiesto mi voluntad de ceder a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de Propiedad Intelectual del Ecuador, artículos 4, 5 y 6, en calidad de autor del trabajo de grado denominado: “Desarrollo de un proceso para el aislamiento, conservación y producción del hongo medicinal oreja de palo (*Pycnoporus spp.*) a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana”, que ha sido desarrollado para optar por el título de Magíster en Gestión Sustentable de los Recursos Naturales, en la Universidad Técnica del Norte, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.

  
.....

Willian Edissón Gómez Andrade

1001977030

## RESUMEN

En Ecuador no se conoce el protocolo de aislamiento conservación y producción a escala laboratorio de la cepa nativa *Pycnoporus sanguineus*. El cuerpo fructífero se recolectó en la ciudad del Tena; misma que se encontraba en troncos en descomposición de *Pollalesta discolor*. La reproducción celular se realizó tanto por medio de tejido como por esporas en un medio rico en PDA se incubaron a 22 °C. durante seis días se procedió a la purificación de la cepa por la técnica de repique hasta lograr una cepa pura. La identificación fue realizada por laboratorios IDgen en la cual se determinó 99% de identidad en el fragmento ITS es *Pycnoporus sanguineus*. En el análisis químico bromatológico se determinó que la especie tiene un ELN de 49.12% para el análisis de macro elementos se encontró en mayor cantidad potasio 0,52%; micro elementos como hierro 136 ppm. Para la conservación de la cepa se aplicó la técnica de la liofilización, se preparó dos medios de cultivo MEA y PDA se esterilizó y se sirvió en tubos de 5 ml y luego se inocularon con la cepa nativa seleccionada, se incubaron por 7 días a 22 °C. Los tubos colonizados fueron liofilizados. Para determinar la velocidad de crecimiento de la cepa nativa se utilizó como medio de cultivo PDA y MEA en donde fue colocada la cepa anteriormente liofilizada en el centro de la caja petri con la ayuda de cinta métrica se determinó la velocidad de crecimiento diariamente, se incubó durante siete días, la mayor velocidad de crecimiento se observa en el medio de cultivo MEA de 3.85 mm/día. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de velocidad entre un nivel de medio y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

## SUMMARY

In Ecuador is not known isolation Protocol-scale production and conservation laboratory or the native strain of *Pycnoporus sanguineus*. The fruiting body is collected in the city of Tena; same that was in trunks in decomposition of *Pollalesta discolor*. Cellular reproduction was carried out both by means of tissue and spores in an environment rich in PDA incubate to 22 °C, six days was purification or the strain by the technique of tolling to achieve a pure strain. The identification was performed by laboratories IDgen 99% identity in the fragment was determined in which ITS is *Pycnoporus sanguineus*. The bromatological chemical analysis determined that the species has an ELN of 49.12% for the analysis of macro elements found in most potassium 0.52%; micro elements as iron 136 ppm. For the conservation of the strain was applied the technique of lyophilization, it was prepared two culture media MEA PDA was sterilized and served in 5ml tubes and they were then inoculated with the native strain selected, they were incubated for 7 days at 22 degrees. Colonized tubes were lyophilized. To determine the rate of growth of the native strain was used as a PDA culture medium and MEA where was placed the above freeze-dried strain in the center of the box petri, with the help of tape measure determined the speed of growth daily, incubated for seven days, the higher speed of growth is observed in the culture medium MEA 3.85 mm/day. Since the disagreement of the test F is less than 0.05 there is a statistically significant difference between the average speed between a middle level and another, the 95.0% confidence level.

### **Palabras clave**

Aislamiento, biodiversidad, caracterización, conservación, fúngica, liofilización, *Pycnoporus*

## ABREVIATURAS

BRGM	Banco de Recursos Genéticos Microbianos
EE	Extracto Etéreo o grasa bruta
ELN	Elementos Libres de Nitrógeno
FEL	Fermentación Estado Líquido
FES	Fermentación Estado Solido
IANCEM	Ingenio Azucarero del Norte Compañía de Economía Mixta
LSD	Diferencia Mínima Significativa
MAE	Ministerio del Ambiente Ecuador
MAISFCI	Modelo de Atención Integral de Salud Familiar, Comunitario e Intercultural
MEA	Agar Malta Dextrosa
ODM	Objetivos de Desarrollo del Milenio
PDA	Agar Papa Dextrosa
SEMPLADES	Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo
WFP	Proyecto Mundial de Alimentación

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>9</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>10</b>
<b>1 PROBLEMA</b> .....	<b>17</b>
1.1 Introducción .....	17
1.2 Situación problemática.....	18
1.3 Problema científico .....	19
1.4 Objetivos de la investigación .....	19
1.5 Hipótesis.....	20
<b>2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
2.1 La salud un desafío global.....	21
2.1.1 <i>Situación actual</i> .....	21
2.1.2 <i>Situación futura</i> .....	21
2.1.3 <i>Propuestas al desafío</i> .....	21
2.2 Género <i>Pycnoporus spp.</i> .....	22
2.2.1 <i>Recolección</i> .....	22
2.2.2 <i>Aislamiento</i> .....	24
2.2.3 <i>Identificación</i> .....	26
2.2.4 <i>Caracterización</i> .....	26
2.2.5 <i>Conservación</i> .....	27
2.3 Producción de Biomasa.....	30
2.3.1 <i>Parámetros de operación</i> .....	30
2.3.2 <i>Medios de cultivo</i> .....	30
2.3.3 <i>Incubación</i> .....	31
2.4 Producción de metabolitos .....	32
2.4.1 <i>Cinnabarina</i> .....	32
2.4.2 <i>Vainillina</i> .....	33

2.4.3	<i>Enzimas ligninolíticas</i> .....	33
2.4.4	<i>Inductores</i> .....	34
2.5	Importancia industrial .....	36
2.5.1	<i>Degradación de compuestos xenobióticos</i> .....	36
2.5.2	<i>Control biológico</i> .....	37
2.5.3	<i>Obtención de compuestos de interés farmacéutico</i> .....	37
2.5.4	<i>Producción de aditivos alimentarios</i> .....	38
2.6	Marco legal.....	38
<b>3</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	<b>47</b>
3.1	Aislamiento, identificación y caracterización de la cepa nativa <i>Pycnoporus spp.</i> .....	47
3.1.1	<i>Materiales y métodos</i> .....	48
3.1.1.1	Aislamiento .....	48
3.1.1.2	Identificación.....	49
3.1.1.3	Caracterización.....	50
3.1.2	<i>Resultados y discusión</i> .....	50
3.1.2.1	Aislamiento .....	50
3.1.2.2	Identificación.....	54
3.1.2.3	Caracterización.....	55
3.2	Protocolo para la conservación de la especie nativa <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....	56
3.2.1	<i>Materiales y métodos</i> .....	56
3.2.2	<i>Resultados y discusión</i> .....	57
3.3	Determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....	60
3.3.1	<i>Materiales y métodos</i> .....	60
3.3.2	<i>Resultados y discusión</i> .....	61
3.4	Ficha de cepas microbianas para su conservación en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM) .....	65

3.4.1	<i>Introducción</i> .....	65
3.4.2	<i>Ficha Pycnopus sanguineus</i> .....	67
3.4.3	<i>Registro de la cepa Pycnopus sanguineus</i> .....	69
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>70</b>
<b>5</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>87</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Carpóforos de <i>Pycnoporus spp.</i> sobre madera en descomposición.....	23
Figura 2.2 Laboratorio del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente. ...	28
Figura 3.1 Proceso para el aislamiento, identificación y caracterización de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....	47
Figura 3.2 Ubicación de recolección del hongo del género <i>Pycnoporus</i> .....	48
Figura 3.3 <i>Pycnoporus sanguineus</i> creciendo en troncos en descomposición de Pollalesta discolor .....	49
Figura 3.4 Género <i>Pycnoporus spp.</i> guardado en una bolsa de polietileno .....	51
Figura 3.5 Preparación y esterilización del medio rico en PDA y MEA .....	51
Figura 3.6 Obtención de esporas del cuerpo fructífero del hongo .....	52
Figura 3.7 Inoculación del medio con esporas del hongo.....	52
Figura 3.8 Muestras de crecimiento de la célula filamentosa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....	53
Figura 3.9 Proceso para establecer un protocolo para la conservación de la especie .....	56
Figura 3.10 Cultivo de <i>Pycnoporus sanguineus</i> . en tubos para liofilización.....	57
Figura 3.11 Proceso de liofilización.....	58
Figura 3.12 Liofilización de la cepa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....	58
Figura 3.13 Muestra de <i>Pycnoporus sanguineus</i> liofilizada .....	59
Figura 3.14 Proceso para determinar el mejor medio para la producción de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....	60
Figura 3.15 Velocidad de crecimiento lineal de <i>Pycnoporus sanguineus</i> en dos medios de cultivo .....	62
Figura 3.16 Desviación estándar velocidad de crecimiento en dos medios de cultivo .....	62
Figura 3.17 Determinación de la velocidad de crecimiento de la Cepa.....	64



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Sustratos vegetales donde crece <i>Pycnoporus spp.</i> .....	24
Tabla 2.2. Medios de cultivo reportados para el aislamiento de <i>Pycnoporus spp.</i>	25
Tabla 2.3 Producción de lacasa por <i>Pycnoporus spp.</i> con inductores por FEL... 35	
Tabla 2.4 Producción de lacasas de <i>Pycnoporus spp.</i> por FES.....	35
Tabla 3.1 Velocidad de crecimiento de <i>Pycnoporus</i> a partir de cepa liofilizada..	61
Tabla 3.2 Velocidad promedio de crecimiento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> en dos medios de cultivo .....	62
Tabla 3.3 Análisis de varianza para Velocidad por Medio .....	63
Tabla 3.4 Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.....	63

# 1 PROBLEMA

## 1.1 Introducción

Los hongos son imprescindibles para el funcionamiento de la vida. Sin ellos, la acumulación de residuos orgánicos formaría enormes cementerios de cadáveres vegetales y animales produciendo grandes trastornos en la naturaleza (Zeikus, 1981). La cadena trófica se modificaría de tal manera que provocaría la desaparición de muchas especies (de Diego Calonge, 2009).

*Pycnoporus spp* ha sido durante mucho tiempo utilizado en la medicina popular de África y América para tratar numerosas enfermedades. Los extractos de este hongo son demostrados por poseer ingredientes bioactivos involucrados en tratamiento antitumoral y actividades antioxidantes (Cao, Zhang, & Xu, 2014). Por el potencial lignocelulítico y los metabolitos secundarios de este hongo es importante la búsqueda de sustancias antivirales, antioxidantes, antifúngicas, y antibacterianas (Smânia et al. 2003). Se cuenta con el recurso natural, pero no se han realizado estudios de como producir y conservar la cepa nativa (Cruz Muñoz et al. 2015a).

Se pretende aportar con un banco de recursos genéticos con la posibilidad de que esta cepa sea utilizada en el sector farmacéutico por su actividad biológica antioxidante, antifúngica, y antibacterial (Smânia et al. 1995); y en el sector textil, ya que produce un pigmento extraído llamado cinnabarin, que se utiliza para la decoloración parcial y completa de ciertos tintes (Schliephake, Lonergan, Jones, & Mainwaring, 1993); en el sector alimentario para la producción de vainilla (Zheng et al. 2007).

En términos económicos, la implementación de este proyecto a escala industrial generaría ingresos por concepto de venta de metabolitos producidos por la cepa nativa ecuatoriana *Pycnoporus spp*. Por ejemplo, la vainilla natural producida por el hongo tiene un costo en el mercado de 4000 USD/Kg, ingresos que se quedarían en manos de los productores nacionales. Además, la creación de estas industrias generaría fuentes de trabajo y ayudaría al aumento de la balanza comercial nacional.

En términos ambientales, el hongo podría emplearse en la biodegradación de compuestos recalcitrantes presentes en los efluentes contaminados, gracias a su sistema enzimático de ligninasas y en la degradación de residuos de madera en aserraderos (Kirk, 1971). Adicionalmente, el aislamiento y almacenamiento de la cepa nativa de *Pycnoporus spp.* en Bancos de Recursos Genéticos, con fines industriales y académicos promovería la preservación de la especie.

En el ámbito social se mejoraría el nivel educativo de la población en términos de preservación y aprovechamiento de la biodiversidad fúngica, de la cual no se tiene más conocimiento que los usos ancestrales (Hawksworth, 1991). Además, mejoraría la calidad de la salud de la población, gracias a sus propiedades medicinales, ya comprobadas científicamente; por lo que su potencial en la industria farmacéutica es grande.

La academia se vería favorecida a su vez, gracias a la recopilación de métodos y datos técnicos necesarios para la conservación y almacenamiento de la cepa, facilitando el desarrollo de investigaciones de carácter químico y biotecnológico (Cruz, 2004).

## **1.2 Situación problemática**

En el campo de la salud, el no aprovechamiento de los metabolitos fúngicos provocaría un caos en el tratamiento de ciertas enfermedades, ya que muchos medicamentos son producidos a partir de estos (Chang & Miles, 2004). Hay que recordar el papel que desempeña la penicilina descubierta por Fleming en 1928 a partir del hongo *Penicillium notatum*, para el tratamiento de las infecciones (Valdés et al. 1998). En la actualidad se conoce miles de sustancias medicinales producidos por hongos y pronto saldrán más, incluso capaces de combatir el SIDA (Calonge, 2009).

No obstante, muchas especies de hongos están bajo amenaza de desaparecer como consecuencia del deterioro o destrucción de los ecosistemas (Hernández, González, Hernández, Herrera, & Camino, 2014).

El Ecuador es un país pequeño, pero uno de los más biodiversos por su ubicación espacial (Estrella, Manosalvas, Mariaca, & Ribadeneira, 2005). El 18% de la superficie nacional considerada como área protegida para la conservación de la riqueza natural (MAE, 2008). El aprovechamiento sostenible de la biodiversidad nacional es promovido por el Plan Nacional para el Buen Vivir; que enfatiza en el bioconocimiento y su aplicación para la producción de nuevos bienes y servicios ecológicamente sustentables, suscitando al cambio de la matriz productiva (Senplades, 2009).

### **1.3 Problema científico**

Se evidencia limitado conocimiento en el manejo sustentable del género fúngico *Pycnoporus spp* nativa ecuatoriana, haciéndose necesario el establecimiento de protocolos para: aislamiento, conservación purificación, producción específica de cepas nativas, propagación o crecimiento celular en medios artificiales o naturales y producción.

#### **Objeto**

El proceso de producción y conservación de la especie nativa ecuatoriana de *Pycnoporus spp*.

#### **Campo**

Conservación de los recursos genéticos microbianos

### **1.4 Objetivos de la investigación**

#### **➤ Objetivo General**

Desarrollar un proceso a escala laboratorio para la producción de la especie nativa ecuatoriana de *Pycnoporus sanguineus*. mediante procesos que permitan la conservación del recurso natural fúngico y su aprovechamiento de manera sustentable.

➤ **Objetivos específicos**

- Aislar, identificar y caracterizar la especie fúngica de *Pycnoporus sanguineus*.
- Desarrollar un protocolo para la conservación de la especie.
- Seleccionar el mejor medio de cultivo para la producción de *Pycnoporus spp.* a través de la velocidad de crecimiento lineal.
- Diseñar una ficha de cepas microbianas puras para su conservación en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM).

## 1.5 Hipótesis

### **Hipótesis alternativa**

Si se desarrolla un proceso a escala laboratorio para la producción de la especie nativa ecuatoriana de *Pycnoporus sanguineus* se lograría la conservación del recurso y su aprovechamiento de manera sustentable

### **Hipótesis nula**

Si se desarrolla un proceso a escala laboratorio para la producción de la especie nativa ecuatoriana de *Pycnoporus sanguineus* no se lograría la conservación del recurso y su aprovechamiento de manera sustentable

## **2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 La salud un desafío global**

Es una realidad compleja, a través de un enfoque interdisciplinario que supera los límites del paradigma positivista de la ciencia clásica (Alcántara-Moreno, 2008), depende de la interacción de múltiples factores sociales, políticos, económicos, culturales y científicos (Roberto Briceño-León, 2000), y responde a una condición histórica, ya que la visión particular de la sociedad va cambiando con el tiempo (Ritzer, 2001).

#### ***2.1.1 Situación actual***

Dentro de los objetivos del desarrollo sostenible (2015), el objetivo 3 comprende garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades. La participación mancomunada de los países para cumplir los ODM ha desencadenado en el movimiento contra la pobreza más exitoso de la historia, especialmente en temas de salud y alimentación mundial.

#### ***2.1.2 Situación futura***

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013) ha pedido a los países que sigan invirtiendo en investigaciones de ámbito nacional, con el objetivo de poner en marcha un sistema de cobertura sanitaria universal adaptado a las necesidades particulares de cada país.

#### ***2.1.3 Propuestas al desafío***

Estudios de casos realizados en muchos países demuestran la importancia que tienen las investigaciones nacionales y mundiales en la mejora de la salud; investigaciones que abarcan desde la prevención y el control de enfermedades específicas hasta la mejora del funcionamiento de los sistemas de salud.

## 2.2 Género *Pycnoporus spp.*

Entre muchos hongos de pudrición blanca, el género *Pycnoporus spp.* es un género representativo de la familia Polyporaceae, que se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial en zonas templadas y tropicales, donde tiene gran importancia en la regulación del ciclo de carbono (Zeikus, 1981). Forma un grupo cosmopolita de cuatro especies: *Pycnoporus puniceus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pycnoporus coccineus*. (Lesage-Meessen et al. 2011). A principios de 1990 el género *Pycnoporus* se perfiló como una alternativa para la consecución de compuestos enzimáticos viables en la degradación eficiente de biomasa y la obtención de metabolitos secundarios de interés, como antioxidantes (Borderes, Costa, Guedes, & Tavares, 2011a), antibacterianos (A. Smânia et al. 1995) y antiparasitarios (Correa et al. 2005).

Pese a que los hongos del género *Pycnoporus spp.* no son especies comestibles, su importancia radica en la capacidad de degradar eficientemente compuestos lignocelulósicos (Asociación Micológica Fungípedia, 2016), lo que les confiere un gran potencial para ser usados en procesos biotecnológicos de degradación de residuos agrícolas hasta azúcares fermentables, útiles en la producción de etanol y otros productos biotecnológicos de alto valor comercial (Call, 1994; Zeikus, 1981). Diversas investigaciones han estudiado las condiciones óptimas para la obtención de compuestos sintetizados por este género y la influencia de diversos factores, logrando un mejor control del bioproceso y una mejor comprensión del metabolismo de *Pycnoporus spp.* (Falconnier et al. 1994; Lesage-Meessen et al. 2011; Levasseur et al. 2014; Liu et al. 2015; Piscitelli et al. 2011; Rivera-Hoyos et al. 2013).

### 2.2.1 Recolección

Para la recolección es necesario conocer de antemano las características macroscópicas del cuerpo fructífero del hongo (Ortiz et al. 2016) *Pycnoporus spp.* posee un basidioma en forma de abanico (flabeliforme) más o menos aplanado, de color naranja intenso y un margen redondeado de color similar al resto del

carpóforo; su tamaño puede variar entre 3 a 10 cm de ancho y su carne varía de corchoso a duro. Se encuentra adherido al sustrato por la base, y ocasionalmente los bordes son confluentes, es decir, que se pegen con los de los basidiomas contiguos. En la zona de unión con el sustrato el basidioma es más grueso, pudiendo alcanzar los 3 cm de grosor, mientras en los bordes es más delgado, alcanzando menos de 1 cm de grosor (Asociación Micológica Fungípedia, 2016; Papinutti, 2013). Se puede observar a simple vista que el himenio de este género posee poros, por donde libera las esporas (Alexopoulos & Benke, 1962), los cuales pueden alcanzar entre 2-3 cm de diámetro y una forma de redondeada u oblonga (Asociación Micológica Fungípedia, 2016). En la figura 2.1 se pueden apreciar las características generales del género.



Figura 2.1 Carpóforos de *Pycnoporus spp.* sobre madera en descomposición.

Fuente: Cortesía de Julio Pineda Insuasti (2016)

Macroscópicamente las especies son diferenciables entre sí, por ejemplo: *P. sanguineus*, tiene un color más rojizo que su homólogo *P. cinnabarinus*; además tiene una base estrecha que le da la apariencia de subestipitado mientras *P. cinnabarinus* es sésil. Este último tiene a su vez una superficie piléica libre o escasa de vellosidades, a diferencia de *P. fulgens*, con el cual suele asemejarse por la



coloración del carpóforo (Asociación Micológica Fungípedia, 2016; Papinutti, 2013).

*Pycnoporus spp.* suele encontrarse en sustratos lignocelulósicos en descomposición, sobre los cuales crece naturalmente (Borderes, Costa, Guedes, & Tavares, 2011b). Una vez reconocido el hongo y recolectado su cuerpo fructífero se deben tomar apuntes acerca de los diferentes sustratos en donde fue encontrado (tierra, madera en descomposición, mantillo del bosque...) (Chanona-Gómez, Andrade-Gallegos, Castellanos-Albores, & Sánchez, 2007), las coordenadas y la temperatura ambiental. En la tabla 2.1 se listan algunos materiales lignocelulósicos de donde se han recolectado las cepas de *Pycnoporus spp.*

Tabla 2.1. Sustratos vegetales donde crece *Pycnoporus spp.*

Especie	Material vegetal en descomposición	Referencia
<i>P. sanguineus</i>	Madera de casuarina y mango	(Cruz Muñoz y col., 2015a)
	Madera contaminada con petróleo	(Acosta-Urdapilleta, Alonso-Paz, Rodríguez, Adame, y col., 2010; Quiroz-Castañeda y col., 2009)
	Troncos de palma	(Achenbach y Blumm, 1991)
	Encino	(Chanona-Gómez y col., 2007)
	Madera de <i>Parkia oppositifolia</i>	(Esposito, Innocentini-Mei, Ferraz, Canhos, y Durán, 1993)
<i>P. cinnabarinus</i>	Madera de pino	(Eggert, Temp, y Eriksson, 1996)
	Troncos quemados	(Guzmán, 1979)
<i>P. coccineus</i>	Eucalipto	(Machuca y Ferraz, 2001)

### 2.2.2 Aislamiento

Se toma una pequeña muestra de tejido del carpóforo y se deposita en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) o Agar Extracto de Malta (MEA, por sus siglas en inglés) y se incuba por 35 días a 25 °C en ausencia de luz. Aunque el rango de crecimiento micelial puede oscilar entre 24 a 30 °C. Una vez desarrollado el hongo se hacen repiques hasta obtener una cepa pura (Cruz Muñoz et al. 2015a; Herpoël, Moukha, Lesage-Meessen, Sigoillot, & Asther,

2000b; Schliephake et al., 1993). Es necesario haber adicionado cloranfenicol (200 g /l) a los medios de cultivo, para evitar contaminaciones bacterianas (Henrique Rosa y col., 2003). Según Correa y colaboradores (2005) el MEA es el medio óptimo para el crecimiento micelial posterior a la purificación, mientras que Acosta-Urdapilleta y colaboradores (2010) afirman que es el Agar Harina Integral de Trigo (HTIA, por sus siglas en inglés). Por su parte, Cruz-Muñoz y colaboradores (2015) aseveran que los medios de cultivo óptimos son los que contienen extracto del material vegetal de donde se recolectó el hongo. En la tabla 2.2 se mencionan los principales medios de cultivo empleados para el aislamiento de *Pycnoporus spp.*

Tabla 2.2. Medios de cultivo reportados para el aislamiento de *Pycnoporus spp.*

<b>Especie</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Referencia</b>
<i>P. sanguineus</i>	Agar Papa Dextrosa	(Acosta-Urdapilleta, Alonso-Paz, Rodríguez, Adame, y col., 2010; Cruz Muñoz y col., 2015a; E. de F. A. Smânia, Smânia Júnior, y Loguercio-Leite, 1998; Vikineswary y col., 2006)
	Agar Harina Integral de Trigo	(Acosta-Urdapilleta, Alonso-Paz, Rodríguez, Adame, y col., 2010; Cruz Muñoz y col., 2015a)
	Agar Extracto de Malta	(Acosta-Urdapilleta, Alonso-Paz, Rodríguez, Adame, y col., 2010; Atteke y col., 2013; Cruz Muñoz y col., 2015a; Machuca y Ferraz, 2001; Schliephake y col., 1993; Uzan y col., 2010)
	Medios afines al material vegetal de donde se recolectó (Agar Extracto de Casuarina, Agar Extracto de Mango)	(Cruz Muñoz y col., 2015)
	Medio Czapek-Dox con sulfato de manganeso, algunas veces adicionado con extracto de semillas de guisantes o salvado de trigo.	(Böse, 1946)
<i>P. cinnabarinus</i>	Agar Extracto de malta	(American Type Culture Collection, 2016a)

Espece	Medio de cultivo	Referencia
	Agar Extracto de levadura	(American Type Culture Collection, 2016b)
	Agar Papa Dextrosa	(FuQuan y QiJin, 2008)

### 2.2.3 Identificación

Microscópicamente, se pueden identificar cuatro tipo de hifas: 1) las de los tubos o poros, que son de pared delgada, ramificadas y se tiñen con fioxina; 2) las del margen y el píleo, que son un poco más gruesas, no ramificadas, no se tiñen con fioxina, y usualmente tienen gránulo anaranjados que se disuelven en KOH; 3) las de la zona de transición y tubos, que tienen grosor variable y se disponen en capas; y 4) las que se encuentran únicamente en la zona de transición, que son delgadas, con ramificaciones cortas y recurvadas (Papinutti, 2013). Para la diferenciación entre *P. sanguineus* y *P. cinnabarinus*, es necesario saber que el primero tiene un sistema de hifas dimítico mientras el del segundo es trimítico. (Asociación Micológica Fungípedia, 2016). Para evitar vacilaciones, lo más preciso es realizar pruebas a nivel molecular mediante extracción del ADN ribosomal, y su amplificación, secuenciación y alineación con las bases de datos del banco de genes (Cruz Muñoz et al. 2015a).

### 2.2.4 Caracterización

Para la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento y la producción de metabolitos secundarios se toman discos (5 mm de diámetro) de PDA con micelio del borde radial de cultivos de 30 días de edad y se depositan en nuevas cajas de petri con medio de cultivo acorde con lo que se quiera medir o producir, se incuba por 30 días más a 23 °C con luz blanca continua (Curz et al. 2015a). El crecimiento micelial, no de manera obligatoria, está relacionado con la producción de metabolitos secundarios (Baumer, Mas Diego, Pacheco, Morgado, & Furigo, 2008). Los metabolitos primarios y secundarios producidos por el género *Pycnoporus spp.* varían dependiendo de la especie y condiciones de cultivo (Acosta, Paz, Rodríguez, Adame, & col., 2010); una vez extraídos en algún tipo de solvente,

según el experimento ejecutado, se identifican por cromatografía de capa fina, mediante comparación de los frentes de retención (Cruz et al. 2015a), cromatografía de gases o espectrometría de masas (Teoh, Don, y Ujang, 2011). En el anexo 3 se nombran los principales metabolitos producidos por *Pycnoporus spp.*

Es necesario realizarle a la cepa purificada ensayos de actividad enzimática, para identificar algunos usos potenciales a nivel industrial. Como éste género pertenece a los hongos de pudrición blanca, se deben realizar ensayos de actividad ligninolítica, celulolítica, hemicelulolítica, de acuerdo con el Manual de Micología Experimental de la Universidad de Buenos Aires (Forchiassin et al. 2014). Las enzimas ligninolíticas más abundantes en éste hongo son las lacasas (Eggert et al. 1996), lo que facilita su proceso de purificación. Se había llegado a pensar que la producción de peroxidasas extracelulares era nula (Machuca & Ferraz, 2001).

#### **2.2.5 Conservación**

La cepa debe ser almacenada en refrigeración a 4 °C para que no pierda su viabilidad (Borderes et al. 2011b; Schliephake et al., 1993). Aunque existen otros métodos que también pueden emplearse: Inmersión en agua destilada, inmersión en aceite mineral, liofilización, congelación, repique (Ortiz et al. 2016). La temperatura de congelación es de -80 °C en hielo seco o nitrógeno líquido, y la de liofilización de 2 a 8 °C. Cada vez que se vaya a usar la cepa, limpie su envase con etanol al 70 % y transfiera asépticamente (American Type Culture Collection, 2016a, 2016b; Uzan & col., 2010). El período de viabilidad para algunos hongos conservados bajo este método es de 23 años (Smith & Onions 1994). En la figura 2.2 se observa un laboratorio apto para la obtención de recursos genéticos fúngicos.



Figura 2.2 Laboratorio del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente.

Fuente: Cortesía de Julio Pineda Insuasti (2016)

Métodos a corto plazo que ayudan a la conservación de la cepa se aplica cuando su uso es generalmente frecuente (García & Uruburú, 1991) dentro de estos métodos se tendría:

**El cultivo seriado** consiste en resembrar al microorganismo cada cierto tiempo en un medio adecuado este método es válido para períodos de 15 días, se incrementa la posibilidad de contaminación de la cepa (Mateos, 2002).

**La conservación por suspensión en agua destilada** es un método sencillo, económico y seguro, capaz de garantizar la supervivencia de cultivos fúngicos por períodos prolongados de dos hasta siete años (Jong & Birmingham, 2001). Consiste en suspender en agua estéril células de cultivo como conidias, esporas, picnidios, esclerocidos. (Bueno, 1998).

**La conservación con aceite mineral** consiste en recubrir con aceite mineral estéril un cultivo que se encuentre en condiciones óptimas de crecimiento micelial y esporulación generalmente (Jong & Atkins 1986), esta técnica disminuye la deshidratación del medio, es utilizado en pequeñas colecciones cuando la liofilización no resulta económica (Jong & Birmingham, 2001). Un amplio rango de hongos a sobrevivido por este método por un período de 12 a 30 meses (Smith et al. 1994).

**La desecación** es un método de conservación que reduce drásticamente el metabolismo. Sin embargo, no todos los microorganismos sobreviven a estos

métodos de secado, por lo que se hace necesario añadir agentes protectores (leche descremada, glutato sódico al 10%). La conservación en suelo es una técnica que ha sido usada ampliamente en laboratorios industriales para el mantenimiento de cultivos de importancia comercial (Jong et al. 1985). Este método es usado para cultivos que producen esporas y estructura de resistencia, las cepas pueden almacenarse en diferentes sustratos como arena, papel filtro. El método consiste en esterilizar y secar el suelo el cual es utilizado como medio absorbente con una pequeña cantidad de inóculo, preserva la viabilidad en un período de tres a ocho años (Jong et al. 2001).

Métodos a largo plazo son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero estas no han muerto. Así se garantiza el máximo de estabilidad genética (García et al., 1991) dentro de estos métodos se tendría:

**La liofilización** Es un proceso en el cual se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara al vacío para realizar la separación del agua por sublimación, es otro de los métodos de conservación de hongos por tiempo prolongado. Si bien es muy recomendado, requiere contar con un liofilizador, lo que no siempre está al alcance de todos los investigadores. La liofilización es un proceso de conservación, que también involucra la deshidratación de las conidias o cualquier otra estructura propagativa (Ames, n.d.). El período de viabilidad para algunos hongos conservados por este método es de 23 años (Smith et al. 1994).

**La criocongelación** se basa en la utilización de una temperatura extremadamente fría para poder disminuir de forma controlada las funciones vitales del organismo que se pretende conservar y que éste se conserve vivo, pero “dormido” durante un período de tiempo muy elevado sin que pierda sus propiedades, su principio radica en que toda célula, tejido u organismo sometido a bajas temperaturas disminuye sus funciones vitales permaneciendo en estado de dormancia por períodos prolongados, es decir, sus actividades metabólicas están suprimidas (Pasarellt & McGinnis, 1992; Rico *et al.*, 2004).

## 2.3 Producción de Biomasa

La obtención de compuestos derivados de la producción de *Pycnoporus spp.* se realiza mediante procesos fermentativos, que pueden llevarse a cabo en medios de crecimiento líquidos (Fermentación en Estado Líquido; FEL) o sólidos (Fermentación en Estado Sólido; FES). Investigaciones efectuadas por Acosta-Urdapilleta y colaboradores (2010), indican que los metabolitos primarios y secundarios producidos por el género *Pycnoporus* dependen de la especie y las condiciones de cultivo del mismo.

### 2.3.1 Parámetros de operación

El nivel de humedad del sustrato ejerce un efecto significativo en el proceso de FES, recomendándose una humedad del 70 % (Annuar, Sammantha, Murthy, & Sabanatham, 2010). Así mismo, el aumento del oxígeno en el ambiente favorece la tasa y la extensión de la degradación de la biomasa por parte de *Pycnoporus spp* (Hatakka & Uusi-Rauva, 1983), lo que se traduce en un aumento de la bioconversión. Por otro lado, el pH del medio de cultivo está directamente relacionado con el crecimiento del micelio, dándose un mayor descenso de pH en medios que presentan mayor crecimiento micelial (Holler & Brooks, 1980). No obstante, la mayoría de estos estudios han sido realizados en condiciones *in vitro*, no contemplando la influencia de factores que pueden modificar los resultados en procesos a mayor escala (Behrentz & Giraldo, 1993).

### 2.3.2 Medios de cultivo

Las fuentes de carbono comúnmente usadas en los procesos de FEL son lactosa, maltosa, glucosa, fructuosa, extracto de levadura, harinas de algunos cereales entre otros (Chegwin A. & Nieto R., 2013; Suárez Arango & Nieto, 2013). La glucosa y la fructosa permiten obtener una alta densidad de biomasa pues son más fáciles de asimilar que la maltosa; no obstante pueden ser inhibidores de reacciones metabólicas secundarias del hongo (Ander, Eriksson, y Yu, 1983). Los suplementos de medios de cultivo más utilizados son tartrato de diamonio, tartrato

disódico,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y extracto de levadura (Eggert et al. 1996; Gocenoglu y Pazarlioglu, 2014; Herpoël, Moukha, Lesage-Meessen, Sigoillot, & Asther, 2000a; Levasseur et al. 2014).

*Pycnoporus spp.* puede cultivarse fácilmente a escala de laboratorio y en planta piloto, obteniendo altos rendimientos de producción a partir del uso de substratos como: almidón, extracto de malta, maltosa, metilcelulosa, sacarosa, dextrosa, caldos suplementados con extracto de levadura y/o fosfolípidos (Holler & Brooks, 1980; Oddou, Stentelaire, Lesage-Meessen, Asther, & Colonna Ceccaldi, 1999), salvado de maíz, salvado de trigo y salvado de arroz (FuQuan & QiJin, 2008; Levasseur et al. 2014; Zimbardiet al. 2016); también se reporta el uso de residuos agroindustriales como el bagazo de la caña de azúcar, residuos de cultivo de plátano, virutas de madera, cáñamo, cáscaras de algodón, hojas de palma de aceite y residuos de frutas (Annur et al. 2010; Leštan, Štrancar, & Perdih, 1990).

Existe una estrecha relación entre el aumento del crecimiento micelial del hongo con el carbono total disponible en el medio de cultivo (Holler & Brooks, 1980). El rápido crecimiento del hongo en medios pobres, sobre todo cuando no se añade ninguna fuente de carbono, puede ser causado por la expansión de su micelio como estrategia para evitar la inanición (Levasseur et al. 2014). Levasseur y colaboradores (2014) sugieren que un alto contenido de lignina en el medio de cultivo inhibe el crecimiento de *P. cinnabarinus* en condiciones de cultivo en donde la lignina es la única fuente de carbono disponible.

### **2.3.3 Incubación**

La mayoría de estudios de estimación de la velocidad de crecimiento micelial, se realizan midiendo el diámetro del micelio del hongo en las placas de petri, sin embargo, el crecimiento también se relaciona con la densidad de micelio en el medio (Royse, 1997).

FuQuan y QiJin (2008), estudiaron el crecimiento de *P. cinnabarinus* por FES en bolsas con 0,75 kg de salvado de trigo y aserrín suplementado con sacarosa y  $\text{CaCO}_3$ , a una temperatura de crecimiento de 25 a 30 °C, un pH 7,0 y una humedad



del sustrato del 60 al 65 %; logró una colonización completa del micelio después de los 26 a los 30 días, y la obtención de carpóforos transcurridos 32 días después de la aparición de los primordios.

Holler y Brooks (1980) estudiaron el crecimiento del micelio de *P. cinnabarinus* por FEL utilizando extracto de malta suplementado con NaNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KCL y FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y sacarosa, a partir de una suspensión de esporas y tacos de agar con micelio; se cultivó a 28 °C por un intervalo de 4 días. El medio de levadura-extracto de almidón mostró el mayor aumento de peso seco del micelio (10,638 mg), en comparación con el medio extracto de madera (0,336 mg).

## 2.4 Producción de metabolitos

### 2.4.1 Cinnabarina

La producción de cinnabarina, puede realizarse *in vitro* en medios sólidos y líquidos, o *in vivo* a partir de los basidiocarpos, cuya obtención es más fácil. Las mayores concentraciones de este pigmento se obtienen en Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) y Agar Extracto de Malta (MEA, por sus siglas en inglés), mientras el mayor crecimiento micelial se obtiene en medios conformados por los extractos de los materiales lignocelulósicos de donde las cepas fueron aisladas (Cruz Muñoz et al 2015b). Baumer y colaboradores (2008), indican que la velocidad de crecimiento del hongo, no implica necesariamente una mayor producción de cinnabarina. Investigaciones efectuadas por Acosta-Urdapilleta y colaboradores (2010), sugieren que el mejor sustrato para producir cinnabarina en primordios de *P. sanguineus* es el aserrín de pino, seguido por el de encino y el de cedro sin importar la cepa utilizada. En dichos experimentos, el contenido promedio del cinnabarina en cajas de petri fue de 6-9 mg/ g de micelio, mientras en primordios del hongo fue de 56 mg/g de micelio y en cuerpos fructíferos bien desarrollados de 68 mg/g de carpóforo. La ventaja de usar basidiocarpos en vez de primordios para la extracción de cinnabarina es la posibilidad de realizar hasta dos o más cosechas del hongo, lo que requiere de 242 a 356 días. Sin embargo, el cultivo en caja de petri permite obtener cinnabarina mucho más rápido, entre 7 a 15 días, con una

mayor actividad antioxidante (Acosta-Urdapilleta, Alonso-Paz, Rodríguez, M. Adame, & col., 2010). Hay que evaluar la situación, si la cinnabarina es requerida para investigaciones conviene producir el hongo en cajas de petri, pero si es requerida para uso industrial, conviene más producir primordios o cuerpos fructíferos.

#### **2.4.2 Vainillina**

El hongo *P. cinnabarinus* fue cultivado por Falconnier y colaboradores (1994) utilizando un medio que contenía maltosa como fuente de carbono, tartrato de diamonio como fuente de nitrógeno y suplementos como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  y extracto de levadura, obteniendo una concentración en el medio de cultivo de 64 mg/L de vainillina. En comparación, Oddou y colaboradores (1999) demostraron que este hongo basidiomiceto presenta una mayor producción de vainillina (760 mg/L), usando una mezcla compuesta por fosfolípidos y glucosa, obteniendo además una gran densidad de biomasa fúngica. El proceso fermentativo se llevó a cabo en un biorreactor agitado a una velocidad de 120 rpm, con un flujo de aire de 0,93 vvm (volúmenes de aire / unidad de volumen de medio por minuto) al principio del proceso fermentativo y 0,28 vvm posterior a los tres días, manteniendo una temperatura constante de 30 °C. Lo anterior respalda lo dicho por Lešťan y colaboradores (1990), quienes demostraron que la combinación de lípidos y glucosa induce el crecimiento del micelio de algunos basidiomicetos (Ander et al. 1983).

#### **2.4.3 Enzimas ligninolíticas**

Zimbardi y colaboradores(2016) indicaron que las fuentes de nitrógeno más efectivas para la producción de lacasas de *P. sanguineus* por FES, son en orden descendente:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , peptona, extracto de malta, caseína, urea, extracto de levadura, asparagina,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ . Siendo la mejor fuente de carbono para la producción de lacasa el salvado de trigo. María Eugenia Eugenio, Carbajo, Martín, González, y Villar (2009) concluyeron que la producción de lacasa

por hongos no sólo depende de las fuentes de carbono y nitrógeno, sino también de la concentración de nitrógeno del medio de cultivo.

La obtención de celulasa a partir de este hongo fue estudiada por Onofre, Santos, Kagimura, y Mattiello (2015), quienes reportaron que *P. sanguineus* fue cultivado en bagazo de caña enriquecido con carboximetilcelulosa, glucosa, NaNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KCl, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub> y urea, a una temperatura de 30 °C y pH 5.5, presentando una actividad enzimática de la celulasa de 16,32 ± 2,65 U·g<sup>-1</sup>. La tabla 1.3 y 1.4 especifican las condiciones de cultivo para la producción de lacasa por *Pycnoporus spp.* y sus respectivos rendimientos.

#### 2.4.4 Inductores

La adición de inductores enzimáticos constituye una estrategia para aumentar la producción de compuestos metabólicos mediante la optimización de las condiciones de cultivo (Schliephake et al. 1993).

Según Lomascolo y colaboradores (2003), la producción de lacasa fúngica es influenciada por la presencia de inductores, que regulan la síntesis de la enzima a nivel transcripcional, empero, el efecto de cada compuesto y la concentración óptima para la producción de lacasa varía según las diferentes cepas fúngicas. Compuestos fenólicos como como 2,5-xilidina, se adicionan al medio de cultivo para incrementar la producción de lacasa (Schliephake y col., 1993); también se reporta el uso de ácido ferúlico (Levasseur et al. 2014; Lomascolo y col., 2003), etanol (Eggert et al. 1996), alcohol veratrílico e iones Cu<sup>2+</sup>. Estos dos últimos son los inductores más comunes de actividad lacasa, su efecto en la producción enzimática por FEL ha sido más estudiada que por FES (Piscitelli et al. 2011; Rivera-Hoyos et al. 2013). Por su parte, el etanol, a pesar de tener un efecto inhibitorio inicial en el crecimiento del micelio, es un fuerte inductor de la expresión de lacasa en *P. cinnabarinus*, permitiendo obtener altos rendimientos. Meza y colaboradores (2003), estudiaron el efecto del etanol en la producción de lacasas de *P. cinnabarinus* en bagazo de caña de azúcar y encontraron que la adición de etanol al inicio de la fermentación incrementa rápidamente la actividad enzimática, 215 veces más que el sustrato que no contenía etanol, alcanzando niveles máximos de

129 U·L<sup>-1</sup> después de 15 días, los cuales se mantienen constantes hasta la final de la fermentación. Por otro lado, el alcohol veratrílico estimula la producción de peroxidasa total (Piscitelli et al. 2011), mientras los compuestos que aportan iones de manganeso como MnSO<sub>4</sub> son específicos para manganeso peroxidasa (MnP) (Pezzella, Guarino, & Piscitelli, 2015). Las tablas 2.3 y 2.4, muestran la influencia de algunas sustancias inductoras en la producción de lacasa fúngica a través de procesos FEL y FES respectivamente.

Tabla 2.3 Producción de lacasa por *Pycnoporus spp.* con inductores por FEL.

Especie/Cepa	Inductor	Actividad enzimática	Condiciones fermentación	Referencia
<i>P. sanguineus</i>	Sin inductor	5 117 U L <sup>-1</sup>	pH 5,0; 28 °C; 150 rpm	(Lu y col., 2007a)
	2,5-xilidina	1 368 U L <sup>-1</sup>	pH 4,5; 25 °C; 125 rpm	(S. Pointing, Jones, y Vrijmoed, 2000)
	sacarosa-asparagina	820 000 U L <sup>-1</sup>	28°C; 200 rpm	(María Eugenia Eugenio y col., 2009)
<i>P. cinnabarinus</i>	2,5-xilidina	9 600 U L <sup>-1</sup>	pH 4,5; 30 °C; 60 rpm	(Eggert y col., 1996)
	ácido ferúlico	29 000 U L <sup>-1</sup>	30 °C; 120 rpm	(Herpoël y col., 2000a)
	etanol	266 600 U L <sup>-1</sup>	30 °C; 120 rpm	(Lomascolo y col., 2003)

\*Los valores con unidades en rpm, hacen referencia a la velocidad de agitación en el biorreactor.

Tabla 2.4 Producción de lacasas de *Pycnoporus spp.* por FES.

Especie/Cepa	Componentes principales del sustrato	Rendimiento obtenido	Condiciones de fermentación	Ref.
<i>P. sanguineus</i>	Hojas de palma de aceite, urea, CaCO <sub>3</sub>	46,6 U g <sup>-1</sup>	Humedad 75-85 %; 25 °C; densidad del inculo 30 %.	(Vikineswary y col., 2006)
	Mazorca de maíz, CuSO <sub>4</sub> , NH <sub>4</sub> Cl	138,6 U g <sup>-1</sup>	Humedad 4,1 mL g <sup>-1</sup> sustrato; 26 °C	(Zimbardi y col., 2016)

Especie/Cepa	Componentes principales del sustrato	Rendimiento obtenido	Condiciones de fermentación	Ref.
<i>P. cinnabarinus</i>	Bagazo de caña, alcohol veratrílico	85,0 U · g <sup>-1</sup>	Humedad: 70 %, 25 °C	(Meza, Auria, Lomascolo, Sigoillot, y Casalot, 2007)
	Bagazo de caña, etanol gaseoso	90,0 U · g <sup>-1</sup>	24 °C; Flujo suministro etanol: 40 mL min <sup>-1</sup>	(Meza, Lomascolo, Casalot, Sigoillot, y Auria, 2005)

Duarte, Tiba, Santiago, Garcia y Bara (2012) estudiaron el efecto de distintos compuestos inductores en la producción de tirosinasa por *P. sanguineus* en condiciones de luminosidad como estrategia para disminuir la producción de lacasa (la cual aumenta en la oscuridad), demostrando que sustancias como ácido de sodio, ácido salicilhidroxámico y feniltiourea, poseían una actividad inhibitoria, mientras que L-tirosina, fue el mejor inductor para la producción de esta enzima, seguido de L-dopa (L-dihidroxifenilalanina 3,4), ácido cafeico (ácido 3,4 dihidroxicinámico), ácido 2-(4-Hydroxyphenyl) propanoico y guayacol.

## 2.5 Importancia industrial

En el anexo 4 se resumen los principales metabolitos producidos por *Pycnoporus spp.* y su uso.

### 2.5.1 Degradación de compuestos xenobióticos

Los hongos de pudrición blanca pueden degradar compuestos de estructura polifenólica semejante a la lignina como los compuestos xenobióticos, gracias a la acción de enzimas extracelulares ligninolíticas producidas por estas especies que actúan despolimerizando unidades no repetitivas de fenilpropanoide ligadas por varios enlaces carbono-carbono (S. B. Pointing, 2001; Swamy y Ramsay, 1999). Compuestos xenobióticos como los colorantes industriales constituyen

contaminantes persistentes debido a su origen sintético, por lo que pueden dársele a las lacasas de *Pycnoporus spp.* aplicaciones en biorremediación (Bumpus y Aust, 1987). Schliephake y colaboradores (1993) realizaron ensayos exitosos de decoloración de efluentes textiles (con contenido de colorantes sintéticos) dentro de un biorreactor de lecho empacado inmovilizando el hongo *P. cinnabarinus* en una membrana de nylon para que produjera lacasas; demostrando la capacidad del hongo para tolerar residuos potencialmente tóxicos y degradarlos.

### **2.5.2 Control biológico**

El uso de hongos antagonistas ha demostrado ser una eficiente opción para el control biológico de fitopatógenos causantes de diversas enfermedades en cultivos vegetales (Fernández-Larrea, 2001; Infante, Martínez, González, & Reyes, 2009). Estudios realizados en *P. sanguineus* revelan su actividad antifúngica frente a *Mycena citricolor*, hongo promotor de la enfermedad “ojo de gallo” en cultivos de café, causándole parasitosis y destrucción hifal (Ojeda Gutiérrez & Suescum Jaramillo, 2012). Viecelli y Stangarlin (2010) obtuvieron resultados similares contra *Pseudocercospora griseola*, causante de la enfermedad “mancha angular” en cultivos de frijón, tras rociar la superficie de las hojas de la planta con el extracto acuoso obtenido del micelio de *P. sanguineus*.

### **2.5.3 Obtención de compuestos de interés farmacéutico**

Algunas especies de hongos de la familia Polyporaceae, producen pigmentos rojos o anaranjados derivados de ácidos polipóricos y terpenilquinones, los cuales son causales de la coloración naranja de los hongos *Pycnoporus spp.* (Velíšek y Cejpek, 2011). Los principales compuestos producidos por *P. sanguineus* son poliporin, cinnabarina, ácido cinabarínico y tramesanguina (Henrique Rosa et al. 2003). A. Smânia y colaboradores (1995) demostraron que la cinnabarina tiene propiedades antibacterianas (Gocenoglu & Pazarlioglu, 2014), capaces de inhibir el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,

*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y miembros del género *Streptococcus*; siendo más efectiva para el control de cocos grampositivos que de bacilos Gram-negativos (E. de F. A. Smânia et al. 1998). Ensayos utilizando *P. sanguineus* evidenciaron la efectividad del ergosterol-5,8-endoperóxido producido contra amastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis* (Correa et al. 2005).

Es necesario saber, que los metabolitos secundarios producidos por esta especie presentan un gran potencial antioxidante, y que su eficiencia de producción no necesariamente está relacionada con la velocidad de crecimiento micelial (Borderes et al. 2011a).

#### **2.5.4 Producción de aditivos alimentarios**

El ácido ferúlico es un producto de la degradación de la lignina por hongos de podredumbre blanca (Kirk, 1971). Falconnier y colaboradores (1994), demostraron el ácido ferúlico de *P. cinnabarinus* se puede biotransformar en vainillina y alcohol vainílico a través de una vía reductora, o formar metoxihidroquinona a través de la descarboxilación oxidativa. La vainillina es una molécula de alto valor comercial aislada comúnmente de vainas de vainilla, responsable del aroma y sabor de la vainilla (Cid-Perez, 2011). La demanda actual de alimentos producidos de forma natural ha estimulado la búsqueda de medios alternativos de producción de vainillina, convirtiendo a los hongos del género *Pycnoporus spp.* en una excelente opción para la obtención de este aditivo alimentario (Falconnier et al. 1994).

## **2.6 Marco legal**

Según la Organización de los Estados Ibero-americanos (OEI) los cambios y la destrucción de sus hábitats, la contaminación ambiental, la inadecuada política forestal, la recolección de cuerpos fructíferos y la fragmentación de los ecosistemas son las pesadillas de los hongos. En las últimas décadas, han sufrido un descenso «cualitativo y cuantitativo». Por su «papel crucial en el funcionamiento de los ecosistemas», y consciente de que las setas se han omitido en los programas de

conservación, un grupo de micólogos decidió realizar en 2003 la primera «Lista Roja preliminar de hongos en la Península Ibérica», que comprende hasta 67 taxones (subdivisiones de una especie) de hongos amenazados. Es necesario hacer una ley que tenga en cuenta los intereses de todos: de los recolectores acostumbrados a tomar sus setas y de la administración y comunidades autónomas, que deben velar por la conservación de su patrimonio natural.

Legislación internacional los seres humanos han dependido de la biodiversidad, y específicamente de los recursos genéticos, para producir, innovar, mejorar y adaptarla a sus necesidades particulares. Antes de la vigencia del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), el acceso a los recursos genéticos era libre. Normalmente las únicas barreras para el acceso a estos recursos eran las distancias y las fronteras geográficas, el desconocimiento de su existencia, su poca adaptación a otros ecosistemas, su limitada aceptación o la falta de la verificación de su utilidad por parte de otras culturas. (Estrella, Manosalvas, Mariaca, Ribadeneira, 2005).

En el Convenio sobre diversidad biológica se define a los recursos genéticos como “material genético de valor real o potencial” y el material genético como “todo material de origen vegetal, animal, microbiano o de otra índole que contenga unidades funcionales de la herencia”

El principal objetivo de la Federación Internacional de Colecciones de Cultivo (WFCC) la cual es un conjunto de comités, comisiones y federaciones (COMCOF) de la Unión Internacional de Sociedades Microbiología (IUMS), Unión Internacional de Ciencias Biológicas (IUBS) es la promoción y desarrollo de cultivos de microorganismos y líneas celulares. La colección de cultivos se debe realizar de forma segura y de conformidad con las diferentes legislaciones y regulaciones que controlan este tema, en el proceso de aislamiento manipulación, almacenamiento, y distribución de microorganismo y cultivos celulares hay muchas etapas en las que se requiere conformidad con la ley, regulaciones o convenciones internacionales una colección de cultivos debería tener conformidad en:

Requerimientos en salud y seguridad



Clasificación de los microorganismos en función de su riesgo

Regulaciones de cuarentena

Derechos de propiedad intelectual

Convención sobre diversidad biológica Información segura suministrada al receptor de los microorganismos

Regulaciones gubernamentales sobre el envío de cultivos

Control en la distribución de organismos peligrosos

Tratado de Budapest (para los depósitos de patentes). (WFCC, 2010)

### **Legislación nacional**

Que, los artículos 14, 74, 275, 276, 387, 388 de la Constitución de la República, reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir. Declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados. (Constitución política de la república del Ecuador)

Que, el Art. 86 de la Constitución Política de la República declara de interés público a la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y el patrimonio genético del país, a la recuperación de espacios naturales degradados, al establecimiento de un Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas que garanticen la conservación de la biodiversidad y el mantenimiento de los servicios ecológicos.

Que, los Arts. 89, 242 y 248 de la Constitución Política de la República declaran respectivamente que el Estado tomará medidas orientadas a regular, bajo estrictas normas de bioseguridad, la propagación en el medio ambiente, la experimentación, el uso, la comercialización y la importación de organismos genéticamente modificados; que la organización y funcionamiento de la economía responderá,

entre otros principios, al de sustentabilidad; y ratifica el derecho soberano del Estado sobre la biodiversidad, promoviendo su conservación y utilización sustentable con la participación de las poblaciones involucradas, y de conformidad con los convenios y tratados internacionales; Que, el Ecuador suscribió y ratificó el Convenio sobre la Diversidad Biológica, según consta en los Registros Oficiales No. 109 del 18 de enero de 1993 y el 146 del 16 de marzo de 1993. El cual regula la conservación y utilización sustentable de la biodiversidad y sus componentes, y establece la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos asociados, reconociendo el derecho soberano que ejercen los Estados sobre sus recursos biológicos; Que, el Estado ha suscrito y ratificado varios Convenios Internacionales relacionados con la conservación de la biodiversidad tales como la Convención sobre Humedales de Importancia Internacional especialmente como Hábitat de Aves Acuáticas o Convención de Ramsar; la Convención para la Protección del Patrimonio Mundial, Cultural y Natural; la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES), Convenio Marco de Cambio Climático, el Tratado de Cooperación Amazónica, entre los más relevantes. Que, están vigentes en el Ecuador normas de aplicación regional de la Comunidad Andina, de manera especial las Decisiones de la Comisión del Acuerdo de Cartagena Nos. 344, 345, 391 y 486, relativas a la Propiedad Industrial, la protección a los Derechos de los Obtentores de Variedades Vegetales y al Acceso a los Recursos Genéticos. Que, la biodiversidad constituye la base del capital natural del país, capaz de proporcionar un flujo constante de bienes y servicios cuya conservación y utilización sustentable permitan satisfacer las necesidades humanas de consumo y producción; y garanticen el sustento de la vida; Que, la conservación y utilización sustentable de la biodiversidad son de interés nacional, por su importancia económica, ecológica, genética, social, cultural, científica, educativa, recreativa y estética, y por lo tanto tiene un valor estratégico para el desarrollo sustentable presente y futuro del Ecuador. Que, siendo el Ecuador uno de los países de mayor biodiversidad del mundo, catalogado como mega diverso, constituye una prioridad para el país proteger su riqueza biológica y cultural asociada para las generaciones presentes y futuras, ante la preocupante y considerable reducción y pérdida de la biodiversidad

como consecuencia de determinadas actividades humanas en el país. Que, es indispensable expedir normas que rijan la conservación y uso sustentable de la biodiversidad (Ley para la conservación y uso sustentable de la biodiversidad, 1993)

## **CAPÍTULO VIII De la Investigación y Capacitación Forestales**

Art. 50.- El Ministerio del Ambiente promoverá, realizará y coordinará la investigación relativa a la conservación, administración, uso y desarrollo de los recursos forestales y de las áreas naturales del patrimonio forestal.

Art. 51.- Para el cumplimiento de las actividades previstas en el artículo anterior, al Ministerio del Ambiente le corresponde:

a) Crear centros de investigación sobre especies forestales nativas y exóticas, de fauna y flora silvestres.

b) Suscribir convenios relativos a la investigación, capacitación y educación forestales.

c) Ejecutar programas de capacitación y adiestramiento en conservación, administración y desarrollo de recursos forestales y áreas naturales de patrimonio del Estado.

d) Establecer en coordinación con el Ministerio de Educación y Cultura y otras entidades del sector público, programas de educación y divulgación relativas a los aspectos mencionados en el literal anterior.

e) Organizar cursos de capacitación forestal y de conservación, conjuntamente con el Servicio Ecuatoriano de Capacitación Profesional -SECAP- y otras entidades y dependencias del sector público o privado.

f) Las demás que le asignen esta Ley y los reglamentos. (Ley forestal y conservación de áreas 2004)

Toda esta riqueza biodiversa en el Ecuador, corre gran peligro de que por falta de una legislación que lo proteja, sea amenazada por el interés de convertir no en

elementos vitales para el Sumak Kawsay, sino que apetecido por sus componentes convertirlos en mercancías y llevarlos al mercado globalizado. De hecho, parte de la destrucción y desaparición de especies ha sido por falta de una legislación responsable y soberana para la protección de la biodiversidad, así como la responsabilidad de los gobiernos de turno que no han visto a estos seres vivos como titulares de derecho. (Ley orgánica de la biodiversidad, 2011).

El Código Orgánico del Ambiente (COA) manifiesta en el Título III DE LOS DERECHOS, DEBERES Y PRINCIPIOS AMBIENTALES art.5 derecho de la población a vivir en un ambiente sano:

El derecho a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado comprende:

1.- La conservación, manejo sostenible y recuperación del patrimonio natural, la biodiversidad y todos sus componentes, con respeto a los derechos de la naturaleza y a los derechos colectivos de las comunas, comunidades, pueblos y nacionalidades

2.- El manejo sostenible de los ecosistemas, con especial atención a los ecosistemas frágiles y amenazados tales como paramos, humedales, bosques nublados, bosques tropicales secos y húmedos, manglares y ecosistemas marinos y marinos-costeros

3.- La intangibilidad del Sistema Nacional de Áreas Protegidas, en los términos establecidos en la constitución y la Ley.

4.- La conservación, preservación y recuperación de los recursos hídricos, cuencas hidrográficas y caudales ecológicos asociados al ciclo hidrológico.

5.- La conservación y uso sostenible del suelo que prevenga la erosión, la degradación, la desertificación y permita su restauración.

6.- La prevención, control y reparación integral de los daños ambientales

7.- La obligación de toda obra, proyecto o actividad, en todas sus fases, de sujetarse al procedimiento de evaluación de impacto ambiental

8.- El desarrollo y uso de prácticas y tecnologías ambientalmente limpias y sanas, así como de energías alternativas no contaminantes, renovables, diversificadas y de bajo impacto ambiental.

9.- El uso, experimentación y el desarrollo de la biotecnología y la comercialización de sus productos, bajo estrictas normas de bioseguridad, con sujeción a las prohibiciones establecidas en la Constitución y demás normativa vigente.

Los principios ambientales deberán ser reconocidos e incorporados en toda manifestación de la administración pública, así como en las providencias judiciales estos principios son:

- **Responsabilidad integral.** - Responsabilidad de quien promueve una actividad que genere o pueda generar impacto sobre el ambiente
- **Mejor tecnología disponible y mejores prácticas ambientales.** - El estado deberá promover a los sectores públicos y privados, el desarrollo y uso de tecnologías ambientalmente limpias y de energía alternativa no contaminantes y de bajo impacto que minimicen en todas las fases de una actividad productiva

## **TÍTULO I DE LA CONSERVACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD**

**Artículo 31.-** La conservación de la biodiversidad se realizará in situ o ex situ, en función de sus características ecológicas, niveles de endemismo, categoría de especies amenazadas de extinción, para salvaguardar el patrimonio biológico de la erosión genética.

**Artículo 32.-** Se promoverán y regularán las investigaciones científicas in situ y ex situ que comprendan actividades de extracción, colección, recolección, importación, movilización, transportación, exportación y disposición temporal o final de especies de vida silvestre

**Artículo 33.-** La biodiversidad terrestre, insular, marina y dulceacuícola será conservada in situ. Se procurará el uso sostenible de sus componentes de forma tal

que no se ocasione su disminución a largo plazo, para mantener su potencial de satisfacer las necesidades de las generaciones presentes y futuras

**Artículo 35.-** Para la protección de la vida silvestre, se establecen las siguientes condiciones a las personas naturales y jurídicas.

1. Conservar las especies de vida silvestre en su hábitad natural prohibiendo su extracción, salvo las consideraciones para investigación, repoblación de especies con cualquier tipo de amenaza y las establecidas en este código.
2. Reconocer el uso tradicional y el aprovechamiento de las especies de vida silvestre por motivos de subsistencia o por prácticas culturales medicinales.
3. Promover investigaciones sobre vida silvestre para difundir el bioconocimiento dentro del territorio nacional.

**Artículo 66.-** Son medios de conservación de especies de vida silvestre, los que se detallan a continuación:

- Viveros
- Jardines botánicos
- Zoológicos
- Centros de cría y reproducción sostenible
- Centros de rescate y rehabilitación
- Bancos de germoplasma
- Acuarios

#### **TÍTULO IV RECURSOS GENÉTICOS Y SUS DERIVADOS, BIOSEGURIDAD, BIOCOMERCIO**

**Artículo 72.-** Los derechos otorgados sobre los recursos biológicos no conceden derecho alguno sobre los recursos genéticos o sus derivados, no sobre los conocimientos colectivos asociados a estos. Las investigaciones realizadas sobre los recursos genéticos deberán ser sistematizadas y ser recopiladas por el Instituto Nacional de Biodiversidad.

**Artículo 75.-** Las normas de bioseguridad regularán los productos de la biotecnología moderna, con el objeto de contribuir a la conservación y el uso

sostenible de la biodiversidad y garantizar los derechos de la salud humana y el ambiente.

**Artículo 80.-** La Autoridad Ambiental Nacional regulará el biocomercio, para lo cual deberá considerar los objetivos de la conservación de la biodiversidad, la sostenibilidad social, económica y ambiental, así como la distribución justa de los beneficios, de conformidad con las disposiciones de este código.

En los últimos años se ha observado la acción paralela de numerosas organizaciones gubernamentales y no gubernamentales, universidades, comunidades e individuos, que han desplegado acciones en favor de la biodiversidad, del rescate de los conocimientos, prácticas e innovaciones relacionados a ésta, y de la documentación o desarrollo de métodos para la conservación y utilización sostenible de estos recursos, entre otras acciones.

El lograr la conservación y uso sostenible de la biodiversidad implica lograr beneficios para el ser humano, sin agotar el recurso, y asegurar las posibilidades de aprovechamiento de la biodiversidad para las próximas generaciones. En este sentido, la biodiversidad puede conservarse mediante dos estrategias:

- La estrategia de conservación in situ;
- La estrategia de conservación ex situ. (Estrella & col, 2005)

### 3 MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1 Aislamiento, identificación y caracterización de la cepa nativa

##### *Pycnoporus spp.*

El objetivo de este experimento es aislar, identificar y caracterizar la cepa nativa ecuatoriana del hongo *Pycnoporus spp.*

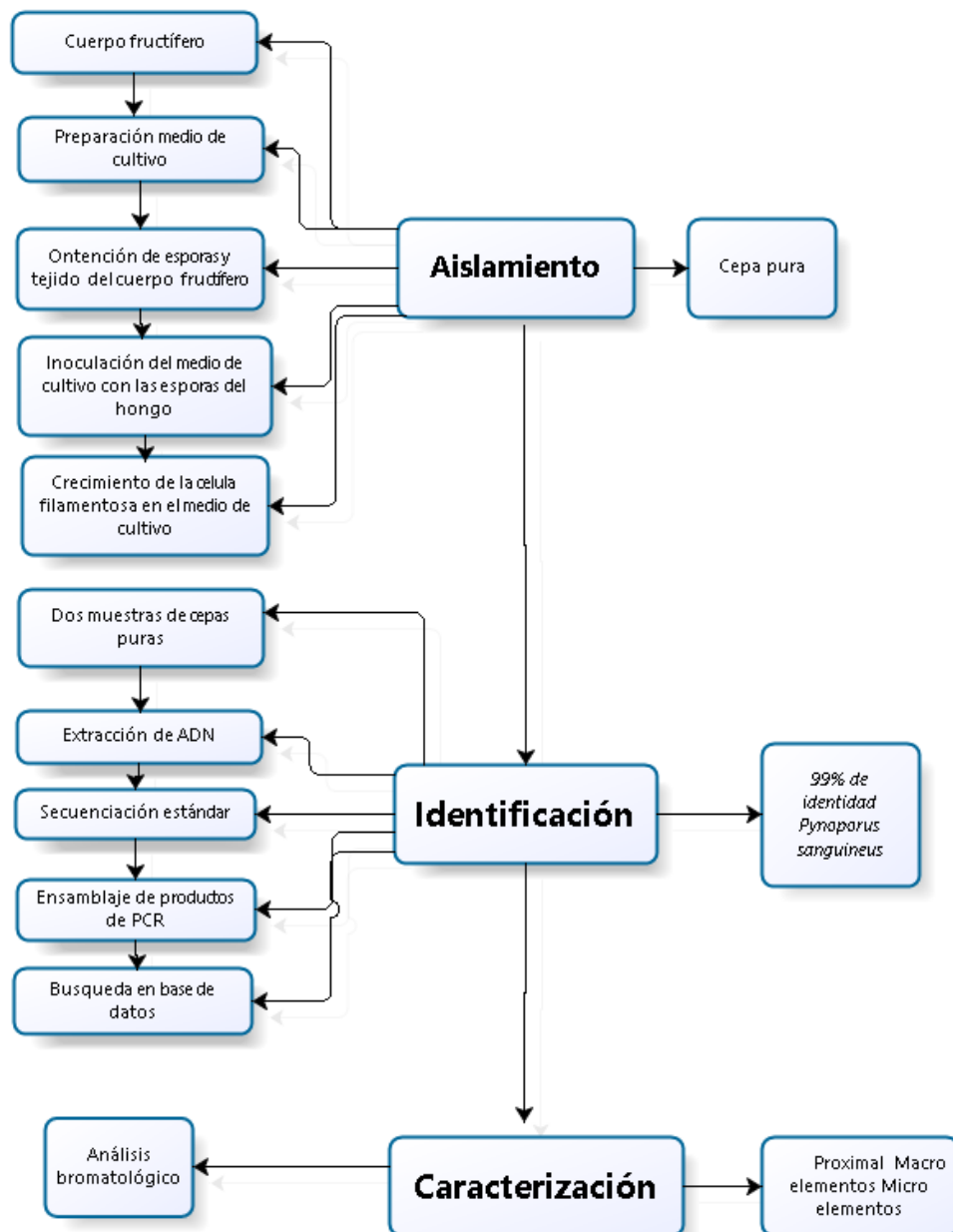


Figura 3.1 Proceso para el aislamiento, identificación y caracterización de *Pycnoporus sanguineus*



### 3.1.1 Materiales y métodos

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biotecnología Fúngica del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA) en convenio con el Ingenio Azucarero del Norte (IANCEM), localizado en la Ciudad de Ibarra a 2241 msnm (UTM WGS84: 17 N 816705 Este 36766 Norte) con una temperatura promedio de 18 °C.

#### 3.1.1.1 Aislamiento

La muestra de hongo *Pycnoporus spp.* se recolectó de un bosque de la ciudad de Tena a una altitud de 543 msnm, UTM WGS84: 18N 186566 Este 9891710 Norte, la misma se encontró creciendo naturalmente en troncos de la madera pigüe (*Pollalesta discolor*) en proceso de descomposición.

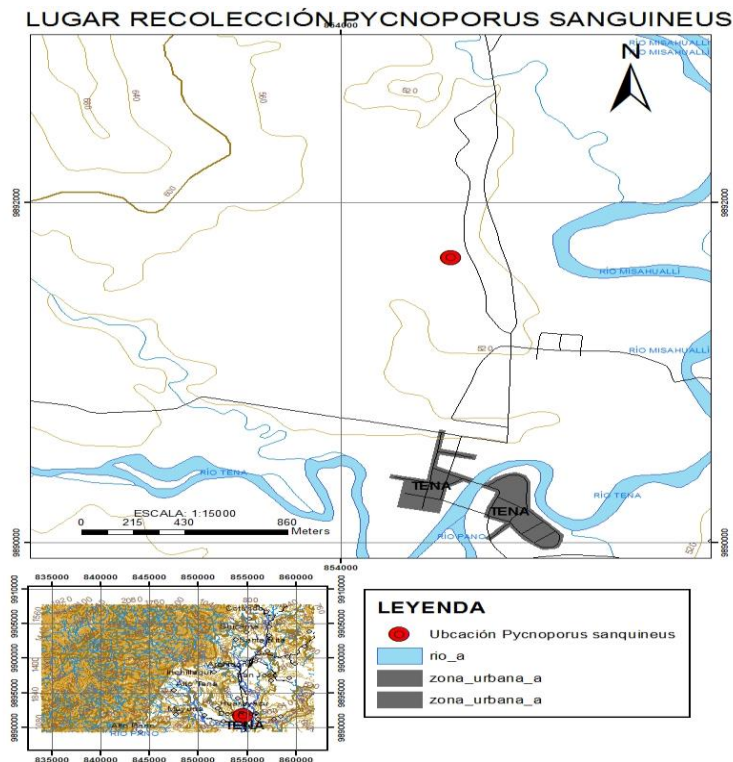


Figura 3.2 Ubicación de recolección del hongo del género *Pycnoporus*



*Figura 3.3 Pycnoporus sanguineus creciendo en troncos en descomposición de Pollalesta discolor*

Para la presente investigación la reproducción celular se realizó tanto por medio de tejido como por esporas, en un medio rico en Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar extracto de Malta (MEA), siguiendo la técnica descrita por Pineda (2014), se preparó el medio con agua destilada y se esterilizó por 15 minutos en autoclave a 15 PSI y 121 °C. El medio estéril se sirvió en caja petri y se procedió a inocular con tejido y espora de la especie seleccionada (Pineda, 2014). Las muestras inoculadas se incubaron a 22 °C y se observó el crecimiento del hongo durante seis días.

#### *3.1.1.2 Identificación*

La identificación fue realizada por el laboratorio especializado IDgen-Identificación Molecular, localizado en la ciudad de Quito. Para ello se usó dos muestras de cepas puras de la especie *Pycnoporus* previamente aisladas con código CEBA-T-PS-010116, son cultivos axénicos de hongos creciendo en agar.

Se realizó la identificación molecular de microorganismos (Extracción de ADN, Amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de

PCR y búsqueda en base de datos). El método de determinación se realizó por identificación molecular por barcoding.

Los procesos de extracción y amplificación de los productos de PCR se describen en el detalle de protocolos (anexo 1). Los productos de PCR fueron depurados previo a su secuenciación. El producto de amplificación limpio y los primeros ITS1, ITS4, ITS5, EF1-983F, EF1-2218R, fueron utilizados para la secuenciación con el método SANGER. Se limpiaron y ensamblaron las secuencias obtenidas con el programa bioinformático GENEIOUS y se compararon las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos de GenBank.

#### *3.1.1.3 Caracterización*

La caracterización del *Pycnoporus sanguineus* estudiada se realizó a través del análisis químico bromatológico, el cual se realizó en el laboratorio del INIAP, localizado en la ciudad de Quito. Se realizó un análisis proximal, macro y micro elementos, siguiendo las normas y métodos de la institución.

### **3.1.2 Resultados y discusión**

#### *3.1.2.1 Aislamiento*

En la figura 3.4 se presenta los cuerpos fructíferos de los hongos *Pycnoporus sanguineus* que se recolectaron en la ciudad del Tena, Ecuador, los mismos que se almacenaron en bolsa de polietileno y se llevaron al laboratorio.



Figura 3.4 Género *Pycnoporus* spp. guardado en una bolsa de polietileno

En la figura 3.5, se presenta el proceso de preparación del medio de cultivo para la especie nativa.



Figura 3.5 Preparación y esterilización del medio rico en PDA y MEA



En la figura 3.6 y 3.7 se presenta el procedimiento para la obtención de esporas, tejido e inoculación de la especie nativa de *Pycnoporus spp.*

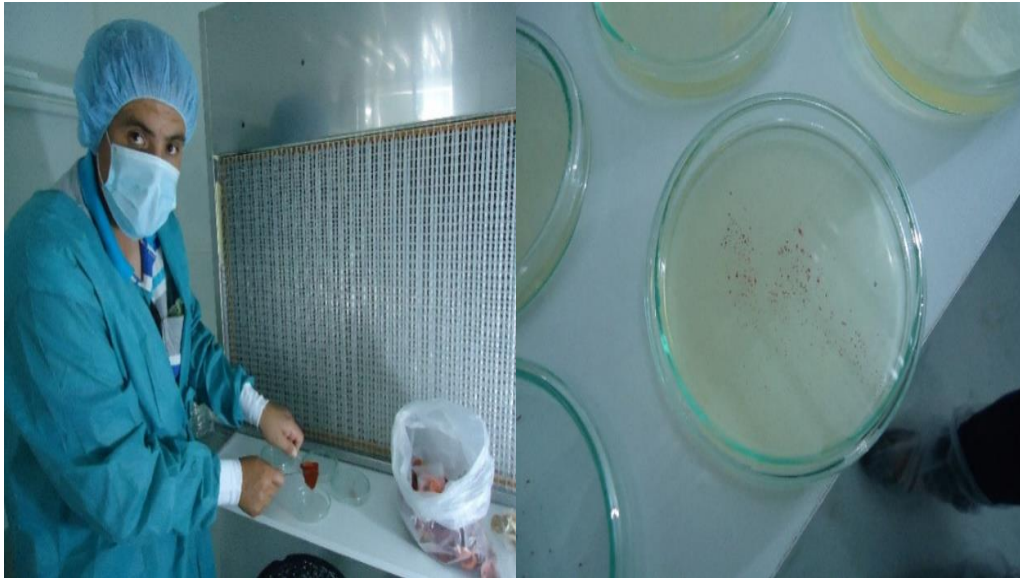


Figura 3.6 Obtención de esporas del cuerpo fructífero del hongo

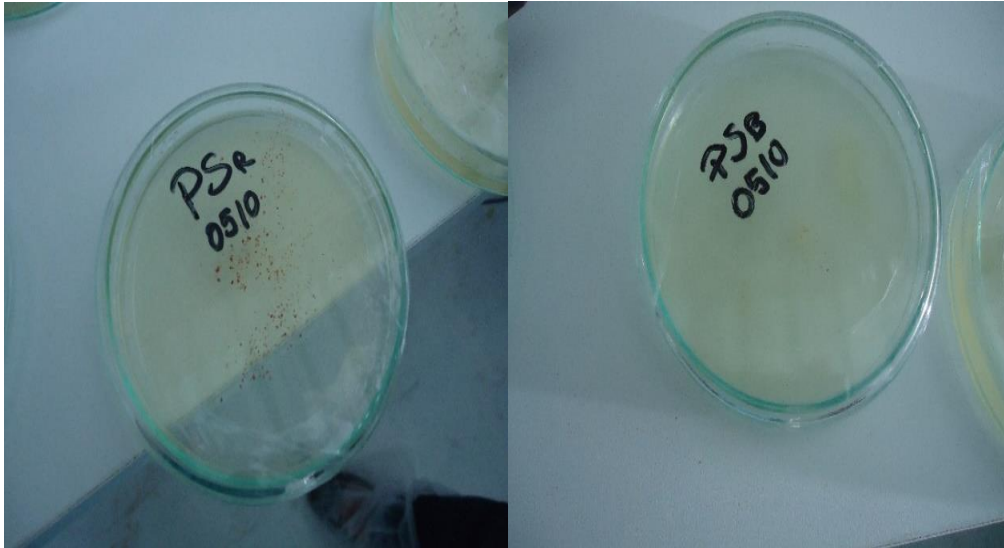


Figura 3.7 Inoculación del medio con esporas del hongo

En la figura 3.8, se presenta el cultivo de *Pycnoporus spp.* creciendo en un medio rico, luego de 6 días de incubación a 22 °C, el mismo que se procedió a su purificación por la técnica de repique hasta lograr una cepa pura, la cual fue

codificada como CEBA-T-PS-010116 y almacenada en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos del CEBA.

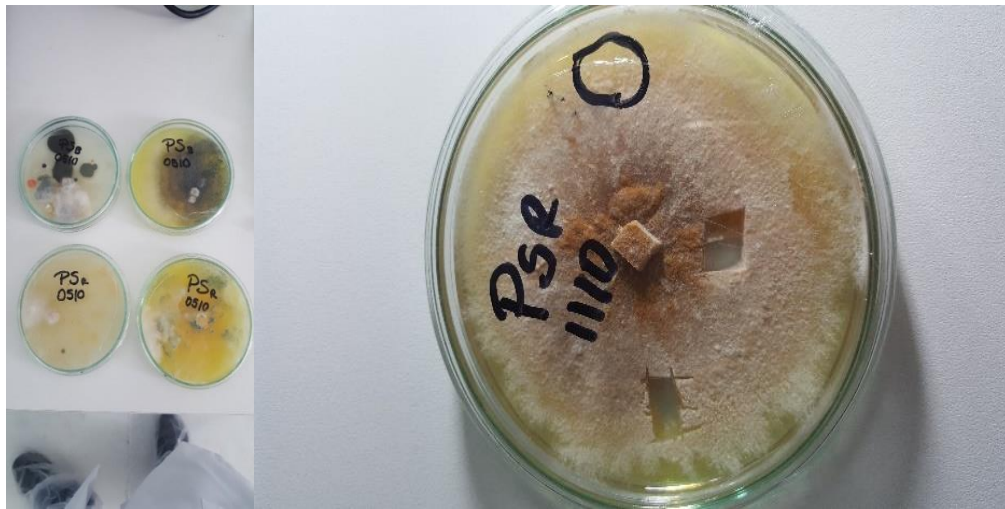


Figura 3.8 Muestras de crecimiento de la célula filamentosa de *Pycnoporus sanguineus*.

(Acosta et al. 2010; Cruz Muñoz et al. 2015a; E. de F. A. Smânia, Smânia Júnior, & Loguercio-Leite, 1998; Vikineswary et al. 2006) coinciden con la técnica utilizada en la presente investigación (Pineda 2014) realizar el aislamiento en un medio de cultivo Agar Papa Dextrosa, mientras (Acosta et al. 2010; Cruz Muñoz et al. 2015a) utilizaron como medio de cultivo Agar Harina Integral de Trigo, así como (Acosta et al. 2010; Atteke y col., 2013; Cruz Muñoz et al. 2015a; Machuca & Ferraz, 2001; Schliephake et al. 1993; Uzan et al. 2010) manifiestan utilizar como medio de cultivo Agar Extracto de Malta, a esto añade (Cruz Muñoz et al. 2015) utilizar como medio de cultivo medios afines al material vegetal de donde se recolectó y (Böse, 1946) utiliza Medio Czapek-Dox con sulfato de manganeso, algunas veces adicionado con extracto de semillas de guisantes o salvado de trigo.

Según (Cruz Muñoz et al, 2015a; Herpoël et al. 2000b; Schliephake et al. 1993). Se toma una pequeña muestra de tejido del carpóforo y se deposita en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) o Agar Extracto de Malta (MEA, por sus siglas en inglés) y se incuba por 35 días a 25 °C en ausencia de luz. Aunque el rango de crecimiento micelial puede oscilar entre 24 a 30 °C. Una vez desarrollado el hongo se hacen repiques hasta obtener una cepa pura

### 3.1.2.2 Identificación

El ADN de cada una de las muestras fue extraído y con el fin de identificar la calidad de la extracción se realizó una electroforesis. Las extracciones de ADN genómico obtenidos evidencian una calidad alta y una concentración superior a 400 ng de ADN por cada 8 ul de extracto. Se utilizó las extracciones de ADN pertenecientes a las muestras para la amplificación del fragmento ITS. Se puede evidenciar que no existen productos de amplificación para las muestras, por lo que para estas se decidió amplificar un fragmento del factor de elongación 1 alfa (EF1a). Adicionalmente, se diluyeron las muestras hasta una concentración de 30ng/uL, para descartar procesos inhibitorios de la PCR debido a una elevada concentración de ADN, previo a su utilización en el ensamblaje de la PCR.

Se determina que la cepa nativa estudiada codificada como CEBA-T-PS-010116, corresponde a la especie *Trametes sanguinea* en la longitud 652, 94,9 % de calidad y 99 % de identidad en el fragmento ITS.

En el método utilizado para la identificación coincido con (Cruz Muñoz y col., 2015) el cual manifiesta: La identificación se realizó a nivel molecular, para lo cual se enviaron dos muestras de colonias puras (punta de hifa) al laboratorio de la Estación Nacional de Epidemiología Cuarentena y Saneamiento Vegetal en Querétaro, Querétaro, para la extracción del ADN ribosomal, y su amplificación, secuenciación y alineación con las bases de datos del banco de genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, EE.UU.).

De acuerdo con la base de datos Catalogue of Life, la especie estudiada se clasifica:

Filo: Basidiomycota  
Clase: Agaricomycetes  
Orden: Polyporales  
Familia: Polyporaceae  
Género: *Pycnoporus*  
Especie: *sanguineus*

Los sinónimos para *Pycnoporus sanguineus* (L.) (Murrill, 1904) (nombre válido), son *Trametes sanguinea* (L.) (Lloyd, 1924), *Trametes sanguinea* var. *intermedia* (Corner, 1989), *Trametes sanguinea* var. *major* (Corner, 1989), *Trametes sanguinea* var. *sanguinea* (L.) (Lloyd, 1924), determinándose que la especie nativa ecuatoriana pertenece a la especie *Pycnoporus sanguineus* (Roskov Y., 2016).

### 3.1.2.3 Caracterización

De los resultados obtenidos para el análisis proximal por el laboratorio del INIAP se determina que la cepa nativa de *Pycnoporus sanguineus* tiene una humedad 11.12%, cenizas 2.09%, E.E. (Extracto etéreo) 0.89%, proteína 13.72 %, fibra 34.18%, E.L.N (Extracto libre de nitrógenos) 49.12%. Para el análisis de minerales macro elementos se determinó que contiene calcio 0.27%, fósforo 0.35%, magnesio 0.06%, potasio 0.52%, sodio 0.01%. Para micro elementos cobre 3ppm, hierro 136 ppm, manganeso 54 ppm, zinc 58 ppm. En la literatura se encuentran los metabolitos secundarios así tenemos que (Atteke et al. 2013); (Berrio et al. 2007); (Camarero et al. 2004); (Camarero et al. 2005; M.E. Eugenio et al. 2010); (Lu et al. 2007b; Machuca & Ferraz, 2001); (Madhavi & Lele, 2009; Munusamy et al. 2008; Ramírez-Cavazos et al. 2014); (Sigoillot et al. 2002, 2004); (Xu et al. 2000) manifiestan la producción de lacasa, además añade (Böse, 1946; Henrique Rosa et al. 2003) la producción de poliporina. (Achenbach & Blumm, 1991; Acosta et al. 2010; Cruz Muñoz et al, 2015<sup>a</sup>; Dias & Urban, 2009; A. Smânia et al. 2003; E. de F. A. Smânia et al. 1998) manifiestan la producción de Cinabarina fenoxacina, otra consideración la hace (Achenbach & Blumm, 1991) el cual manifiesta la producción O-acetyl-cinabarina, pero ninguno de los autores anteriormente mencionados manifiesta las características químicas a nivel proximal y de minerales de la especie.



### 3.2 Protocolo para la conservación de la especie nativa *Pycnoporus sanguineus*

El objetivo de este experimento es desarrollar un protocolo para la conservación de la cepa nativa del hongo *Pycnoporus sanguineus*.

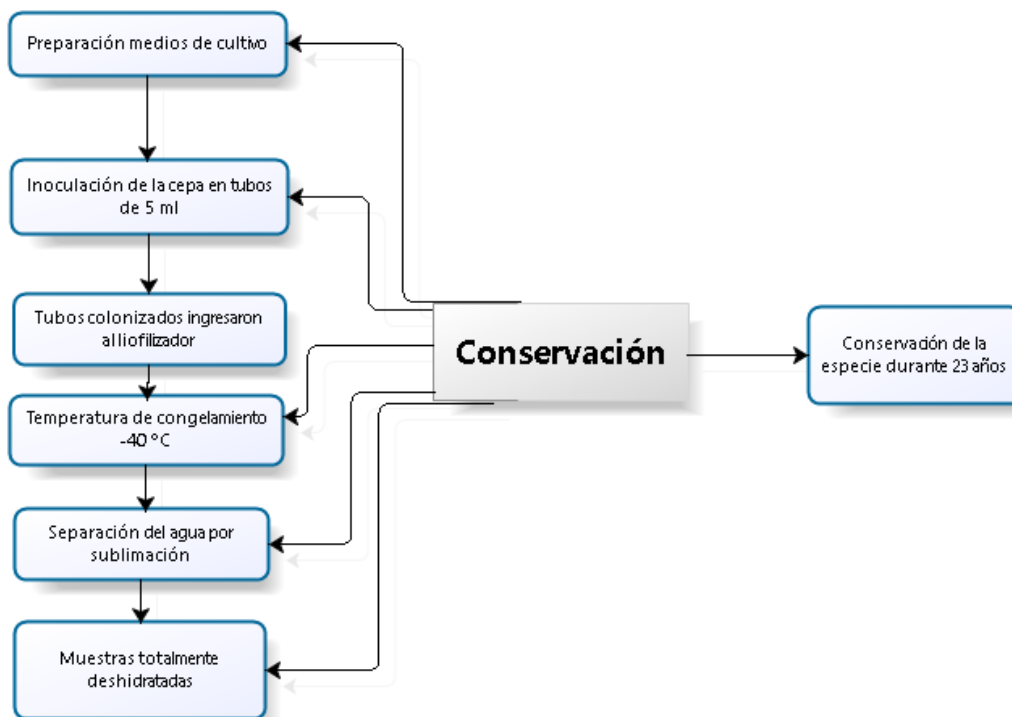


Figura 3.9 Proceso para establecer un protocolo para la conservación de la especie

#### 3.2.1 Materiales y métodos

**Cepa:** se utilizó las cepas del género *Pycnoporus sanguineus*, del banco de recursos genéticos microbianos del CEBA la cual fue aislada en el experimento anterior y codificada como CEBA-T-PS-010116.

**Procedimiento:** se preparó los medios de cultivo MEA y PDA, siguiendo la técnica descrita por Pineda (2014), se esterilizó y se sirvió en tubos de 5 ml y luego se inocularon con la cepa nativa seleccionada, y se incubaron por 7 días a 22 °C. Los tubos colonizados fueron liofilizados en un equipo liofilizador de bandejas marca VirTiswizard 2.0, a una temperatura de -40°C por 26 horas a una presión de

vacío de 300 atm, la cepa liofilizada fue depositada en el banco de recursos genéticos microbianos del CEBA (Pineda, 2014), para su conservación.

### 3.2.2 Resultados y discusión

En la figura 3.10 se presenta el procedimiento para el cultivo de *Pycnoporus sanguineus* en tubos, se observa el crecimiento del micelio en los dos medios de cultivo (MEA y PDA) a una temperatura de 22 °C durante 6 días.

En la figura 3.11 y 3.12 se presenta el procedimiento para la liofilización de las muestras de *Pycnoporus sanguineus*, como se observa se coloca los tubos de ensayo con las cepas cultivadas en la bandeja y luego se carga el liofilizador el cual arranca su operación con una temperatura de 15 °C, disminuyendo la temperatura durante 8 horas hasta llegar -50 °C como se observa en la figura 3.11, disminuyendo 10 °C cada hora durante 8 horas hasta llegar a -50 °C luego empieza el proceso de secado en el cual se aumenta la temperatura 10 °C durante 18 horas hasta llegar a 40 °C a un presión de vacío de menos 300 atm.

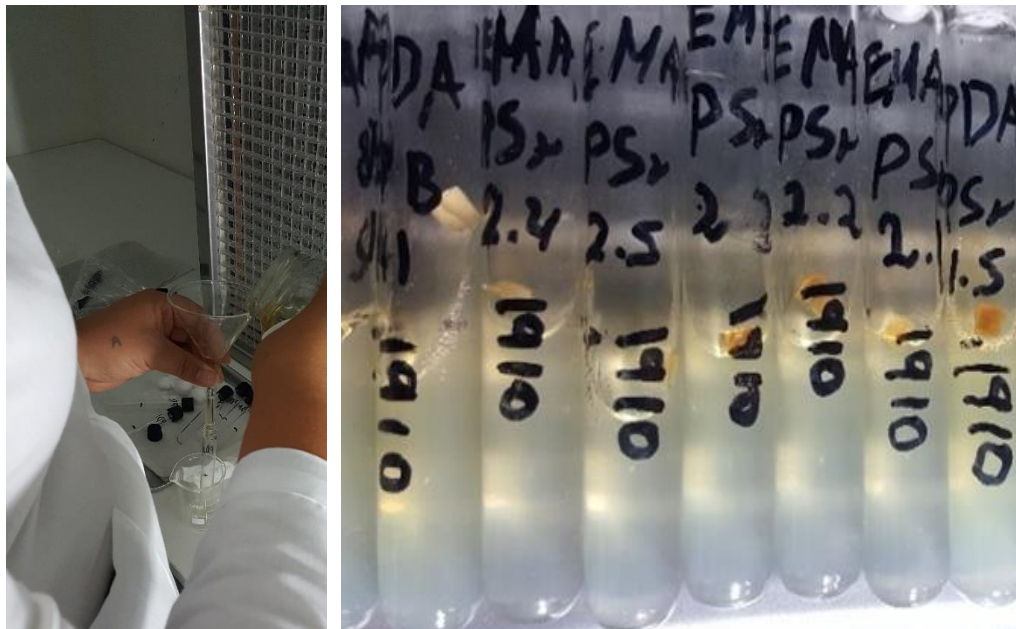


Figura 3.10 Cultivo de *Pycnoporus sanguineus*. en tubos para liofilización

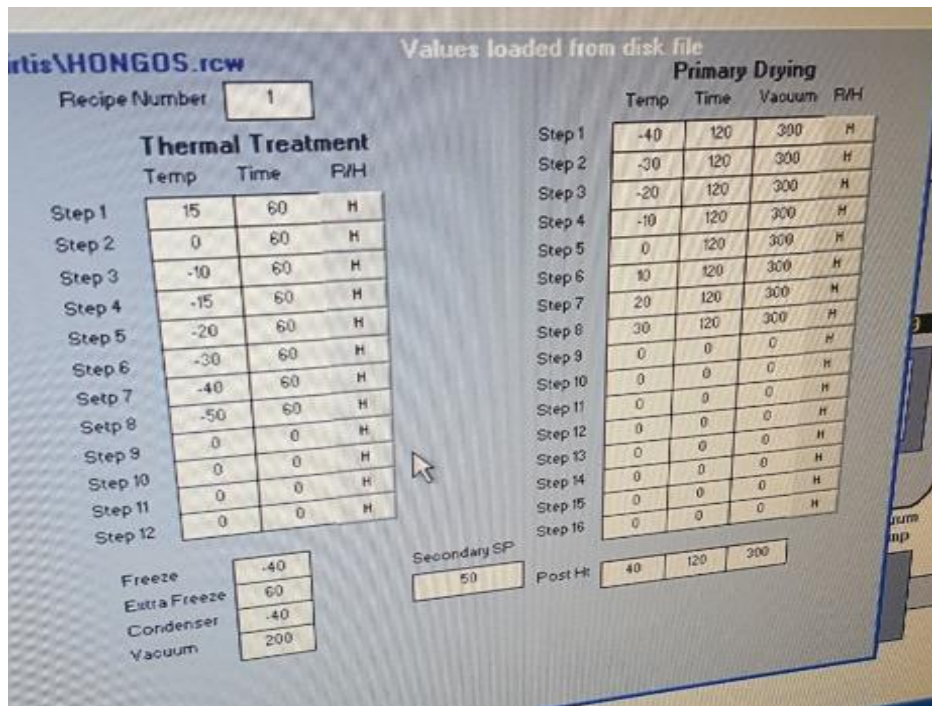


Figura 3.11 Proceso de liofilización



Figura 3.12 Liofilización de la cepa de *Pycnoporus sanguineus*.

En la figura 3.13 se presenta la muestra de *Pycnoporus sanguineus* liofilizada, como se observa luego de 26 horas en el liofilizador las muestras están totalmente deshidratadas y listas para el protocolo de conservación.



Figura 3.13 Muestra de *Pycnoporus sanguineus* liofilizada

Existen métodos de conservación por liofilización para otras especies en la cual los autores solo recomiendan que es el mejor método para conservación, sin embargo, no se establece un procedimiento para realizar esta técnica y mucho menos se encontró información sobre el proceso de liofilización para la especie *Pycnoporus sanguineus*, en la presente investigación queda establecido el procedimiento a seguir para conservar por esta técnica la especie estudiada.

Al conservar la especie a largo plazo se garantiza que por el deterioro o destrucción del ecosistema la especie no desaparezca, aportando con la cepa nativa en:

Ambiental.- el hongo podría emplearse en la biodegradación de compuestos recalcitrantes presentes en los efluentes contaminados, gracias a su sistema enzimático de ligninasas y en la degradación de residuos de madera en aserraderos (Kirk, 1971). *P. sanguineus* revelan su actividad antifúngica frente a *Mycena citricolor*, hongo promotor de la enfermedad “ojo de gallo” en cultivos de café, causándole parasitosis y destrucción hifal (Ojeda Gutiérrez & Suescum Jaramillo, 2012).

Económico. - La implementación de este proyecto a escala industrial generaría ingresos por concepto de venta de metabolitos producidos por la cepa nativa ecuatoriana *Pycnoporus sanguineus*

Social. - *Pycnoporus sanguineus* produce metabolitos con potencial farmacéutico. En América Latina, África y Asia utilizan el hongo para coagular la sangre, eliminar verrugas en la piel y parásitos intestinales, ayudar con problemas menopáusicos y del vientre.

### 3.3 Determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa de *Pycnoporus sanguineus*

El objetivo de este experimento es seleccionar el mejor medio de cultivo para la producción de la cepa nativa del hongo *Pycnoporus sanguineus* a partir de cepa liofilizada.

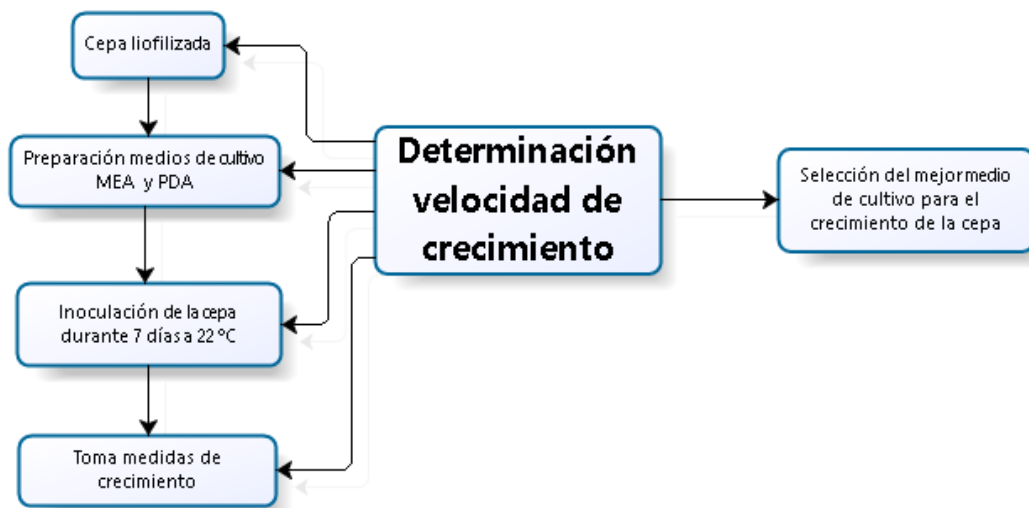


Figura 3.14 Proceso para determinar el mejor medio para la producción de *Pycnoporus sanguineus*

#### 3.3.1 Materiales y métodos

**Cepa:** se utilizó las cepas del género *Pycnoporus sanguineus*, del banco de recursos genéticos microbianos del CEBA la cual fue liofilizada en el experimento anterior y codificada cómo CEBA-T-PS-010116.

**Diseño experimental:** la experimentación se planificó con un diseño completamente al azar (DCA) con cinco réplicas y completamente aleatorio. El factor de estudio fue el medio de cultivo con los niveles MEA y PDA, como variable de respuesta se estableció la velocidad de crecimiento lineal de la cepa del hongo. Los parámetros de operación como la temperatura y la presión se mantuvieron constante a 22°C y 101 325 Pa, como factor de ruido se consideró el nivel de luz.

**Procedimiento:** se preparó los medios de cultivo MEA y PDA, siguiendo la técnica descrita por Pineda (2014), se esterilizó y se sirvió en cajas petri y luego se inocularon con cepa nativa de *Pycnoporus sanguineus*, y se incubaron por 7 días a 22 °C, se tomó las medidas de crecimiento (Pineda, 2014).

### 3.3.2 Resultados y discusión

En la tabla 3.1 se presenta la matriz de resultados experimentales, como se observa el tratamiento 1 tiene la mayor velocidad de crecimiento lineal medida en mm/día

Tabla 3.1 Velocidad de crecimiento de *Pycnoporus* a partir de cepa liofilizada

Tratamientos	Velocidad de crecimiento	
	MEA	PDA
1	3,92	2,92
2	3,83	2,92
3	3,75	2,83
4	3,83	2,75
5	3,92	2,83
Valor promedio ( $\bar{X}$ )	3,85	2,85
Varianza ( $\sigma^2$ )	0,00515	0,00515
Desviación estándar ( $\sigma$ )	0,0717635	0,0717635
Coficiente de varianza (CV)	1,86399	2,51802



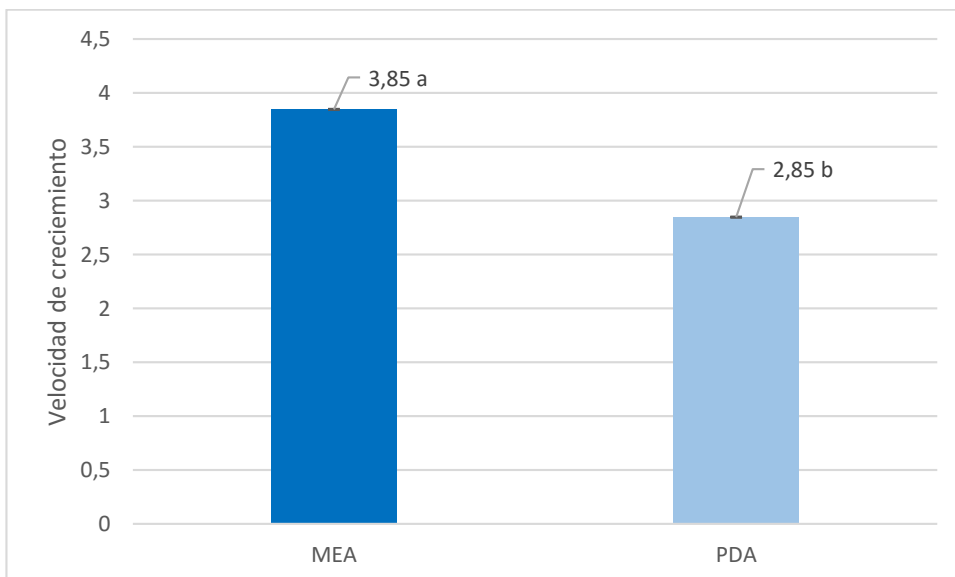


Figura 3.15 Velocidad de crecimiento lineal de *Pycnoporus sanguineus* en dos medios de cultivo

Tabla 3.2 Velocidad promedio de crecimiento de *Pycnoporus sanguineus* en dos medios de cultivo

MEDIOS	Media	Error típ.	Intervalo de confianza 95%	
			Límite inferior	Límite superior
MEA	3,850	,032	3,776	3,924
PDA	2,850	,032	2,776	2,924

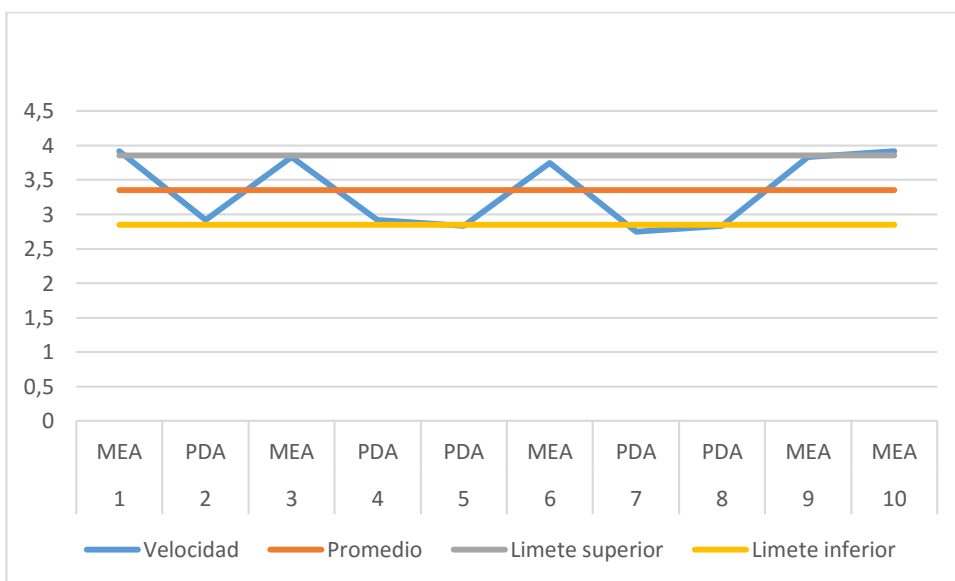


Figura 3.16 Desviación estándar velocidad de crecimiento en dos medios de cultivo

### Análisis de varianza

En la tabla 3.3, se presenta el análisis de varianza que descompone la varianza de Velocidad en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 485,437, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Velocidad entre un nivel de Medio y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 3.3 Análisis de varianza para Velocidad por Medio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,5	1	2,5	485,44	0,0000
Intra grupos	0,0412	8	0,00515		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>2,5412</b>	<b>9</b>			

### Pruebas de Rangos Múltiple para Velocidad por Medio (95,0 % LSD)

Se aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. En la parte superior de la tabla 3.4, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0 % al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla 3.4 Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher

Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PDA	5	2,85	X
MEA	5	3,85	X



Como se observa la mayor velocidad de crecimiento lineal se presenta cuando se trabaja con MEA, con una velocidad promedio de 3,85 mm/día. Identificando que el mejor medio para la producción del hongo es el Agar Extracto de Malta (MEA).

En la figura 3.17 se observar el crecimiento de la cepa y determinar la velocidad de crecimiento lineal en los medios de cultivo estudiados.

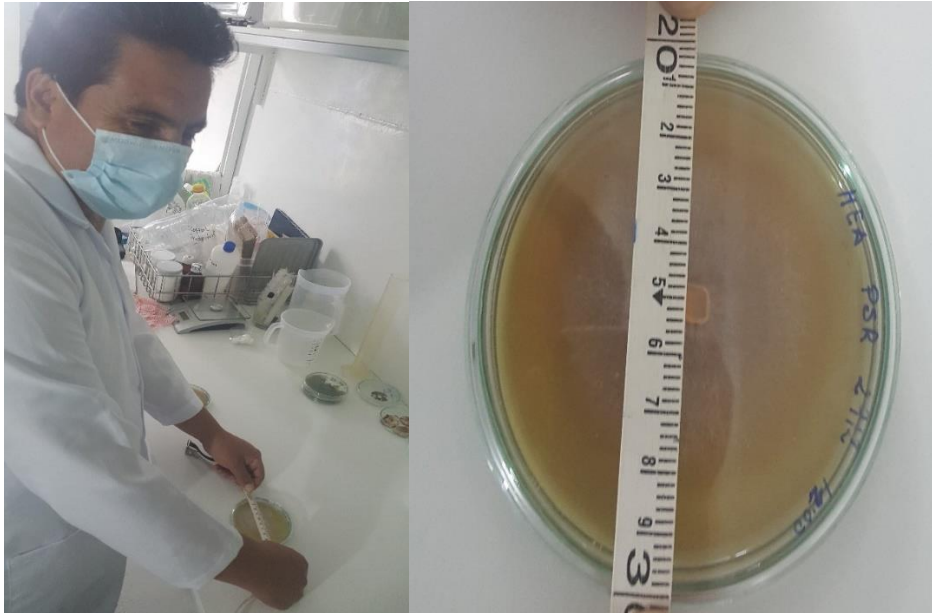


Figura 3.17 Determinación de la velocidad de crecimiento de la Cepa

(Acosta-Urdapilleta et al., 2010) manifiesta de que las velocidades más altas de crecimiento fueron de 9 mm/ día utilizando sustratos hervidos encino, lirio, trigo y avena y la menor velocidad 2 mm/ día se dio con el tratamiento bajo cedro, con PDA obtiene velocidades de crecimiento de 1,7 a 3,5 mm/día, (Cruz Muñoz et al., 2015) manifiesta que obtuvo velocidades de crecimiento de 4,8 mm/día con extracto de casuarina y 6,1 mm/día con extracto de mango, coincido con Acosta (2016) en la velocidad al utilizar extracto PDA ya que en la presente investigación obtuvimos velocidad de crecimiento 2,85 mm/día sin embargo el mejor medio de cultivo utilizado es MEA con 3,85 mm/día

### **3.4 Ficha de cepas microbianas para su conservación en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM)**

El objetivo de este acápite es realizar una ficha para la conservación de la cepa de *Pycnoporus sanguineus*

#### **3.4.1 Introducción**

Al determinar en qué medio de cultivo tuvo mayor velocidad de crecimiento la cepa seleccionada se debería tener un registro en un banco de recursos genéticos microbianos que garanticen la conservación de la cepa para en un futuro aprovechar de manea sustentable el recurso fúngico.

Ecuador posee un vasto territorio con una riqueza microbiológica muy amplia y poco estudiada, por lo que la conservación de los recursos genéticos propios de nuestros ecosistemas resulta esencial para evitar la pérdida de biodiversidad y el acceso a genomas y oportunidades diferentes a las de otras regiones geográficas. Sin embargo, nuestro país no posee aún una ley de Acceso a sus recursos genéticos ni tiene sistematizados los bancos donde estos recursos se conservan.

El objetivo de establecer el banco de recursos genéticos microbianos potenciales para el desarrollo de la Biorefinería ecuatoriana, mediante la identificación, aislamiento, cultivo y conservación de cepas puras, que permitan el máximo aprovechamiento de las materias primas utilizando como insumo la biodiversidad ecuatoriana, en el marco del desarrollo sostenible. (Pineda, 2016), banco de recursos genéticos microbianos es el reguardo inalterable del patrimonio genético nacional de microorganismos. Para esto se debe contar con infraestructura y equipos de laboratorio, contar con profesionales especialistas en el manejo, conservación y preservación de cepas nativas fúngicas. A través de procesos de liofilización se conservan las cepas por un periodo determinado. Respaldos de las muestras y efectivas medidas de seguridad aseguran que la cepa se mantendrá en condiciones óptimas. De esta manera se permitirá potenciar la innovación científica local y posesionar a Ecuador como un centro tecnológico siendo su principal objetivo la conservación a largo plazo de cepas propios de la geografía ecuatoriana

ya que están bajo permanente amenaza de desaparecer, ya sea por acciones humanas o situaciones naturales.

Con la creación del banco de recursos genéticos microbianos se lograría:

- Preservar y proteger los recursos genéticos
- Contribuir y propiciar su uso ordenado, racional y sustentable
- Coadyuvar las acciones de recolección, aislamiento, identificación, caracterización, potenciación, uso y preservación
- Difundir la importancia estratégica de conservación del medio ambiente entre a comunidad científica y la población en general
- Preservar, proteger, mejorar y promover el uso sustentable de la riqueza genética del país

El hongo *Pycnoporus sanguineus* produce metabolitos con potencial farmacéutico. En América Latina, África y Asia utilizan el hongo para coagular la sangre, eliminar verrugas en la piel y parásitos intestinales, ayudar con problemas menopáusicos y del vientre. (Acosta, 2016). Los científicos del banco brasileño están intentando "domesticar", o producir en laboratorios, el hongo *Pycnoporus sanguineus* ya que tiene fines terapéuticos, por ejemplo, señala que la especie *Pycnoporus sanguineus* es usada por indígenas amazónicos para tratar úlceras y cáncer. Y agrega que, si se lograra su cultivo artificial con cepas vigorosas, podría servir en otros laboratorios para investigaciones de carácter químico y biotecnológico por sus propiedades farmacológicas. (BBC, 2015). La definición de la producción anual de hongo fresco, se realiza teniendo en cuenta las políticas y estrategias concebidas dentro del Plan Nacional de Desarrollo del Ecuador. Entre las estrategias se establece el fomento a la producción para el consumo interno mediante el apoyo financiero y técnico a pequeños y medianos productores y a las comunidades campesinas (SEMPLADES, 2009). El costo de cepas de *Pycnoporus sanguineus* no se encontró, sin embargo, el costo para otras especies es de 150 USD por lo que tener conservada las cepas no solo sería rentable, sino también se deja abierto para futuras investigaciones.

### 3.4.2 Ficha *Pycnoporus sanguineus*

## *Pycnoporus sanguineus*

Filo : Basidiomycota  
Clase: Agaricomycetes  
Orden: Polyporales  
Familia: Polyporacea



### **HÁBITAT**

Sobre troncos caídos, principalmente en zonas expuestas (soleadas) y alteradas, incluso sobre troncos quemados.

### **SINÓNIMOS**

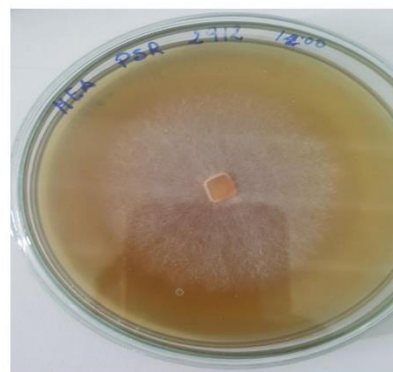
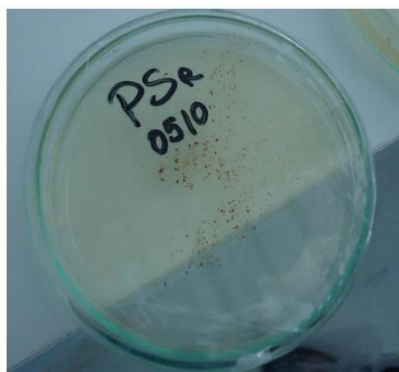
Los sinónimos para *Pycnoporus sanguineus* (L.) (Murrill, 1904) (nombre válido), son *Trametes sanguinea* (L.) (Lloyd, 1924), *Trametes sanguinea* var. *intermedia* (Corner, 1989), *Trametes sanguinea* var. *major* (Corner, 1989), *Trametes sanguinea* var. *sanguinea* (L.) (Lloyd, 1924), *Pycnoporus sanguineus* (Roskov Y., 2016).

### **DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA**

Cuerpo fructífero del hongo posee un basidioma en forma de abanico (flabeliforme) más o menos aplanado, de color naranja intenso y un margen redondeado de color similar al resto del carpóforo; su tamaño puede variar entre 3 a 10 cm de ancho y su carne varía de corchoso a duro. Se encuentra adherido al sustrato por la base, y ocasionalmente los bordes son confluentes, es decir, que se peguen con los de los basidiomas contiguos.

### **USOS**

Degradación de compuestos xenobióticos, control biológico, obtención de compuestos de interés farmacéutico, producción de aditivos alimentarios.



MEDIOS Y CODICIONES DE CULTIVO	
Medio de cultivo	Agar extracto de malta y Agar papa dextrosa
Temperatura de crecimiento	22 °C
Tiempo de incubación	7 días
Condiciones de aireación	Sembrarse en superficie de agar
Relación de medios de cultivo	Agar extracto de malta y Agar papa dextrosa
FORMULA DE MEDIOS DE CULTIVO	
AGAR EXTRACTO DE MALTA	Extracto de malta en polvo 20 g
	Peptona 20 g
	Glucosa 20 g
	Agar 20 g
	Agua destilada 1000 mL
AGAR PAPA DEXTROSA	Papa deshidratada 250 g
	Glucosa 20 g
	Agar 15 g
	Agua destilada 1000 mL
PRECIO DE CEPAS	
Con fines de investigación	\$ 50 MN
Para la industria	\$ 200 MN
Con fines docentes	\$ 50 MN
Cepa liofilizada	\$ 300 MN

### 3.4.3 Registro de la cepa *Pycnoporus sanguineus*

<b>TIPO DE MICROORGANISMO</b>			<b>Código</b>	CEBA-T-PS-010116
Bacteria	Hongo	<input checked="" type="checkbox"/>		

DESIGNACIÓN DE LA CEPA				
Nombre científico	<i>Pycnoporus sanguineus</i>			
Denominación de la cepa utilizada por el depositante				
¿Conoce el tipo de cepa?	Si	<input checked="" type="checkbox"/>	No	
¿El microorganismo alberga un plásmido natural?	Si		No	<input checked="" type="checkbox"/>
¿Se manipulo genéticamente al microorganismo?	Si		No	<input checked="" type="checkbox"/>

INFORMACIÓN RELATIVA			
Datos de muestreo			
Fuente	William Gómez		
País de origen	Ecuador		
Provincia, Ciudad si es posible latitud y longitud	Napo, Tena UTM 18 S 186563	9891708	
Fecha de recolección	14/7/2016		
Recolectado por	William Gómez		

Aislamiento de la cepa	
Fecha del aislamiento	5/10/2016
Provincia, Ciudad donde fue aislado	Imbabura, Ibarra
Aislado por	Dr. Julio Pineda
Si no aisló la cepa, sírvase indicar a los científicos o laboratorios que lo hicieron	

Evaluación del riesgo				
Grupo de riesgo	Grupo 1		Grupo 2	Grupo 3
Patógeno para	Humanos		Animales	Plantas

CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO				
Temperatura	23 °C	Tiempo de encuvación	26 días	
Requerimientos especiales (Luz, gas etc.)				
¿Este microorganismo sobrevive a la congelación?	Si	<input checked="" type="checkbox"/>	No	
Medio de cultivo	Agar malta			

INFORMACIÓN ADICIONAL	
Método usado para la identificación de la cepa	Secuenciación ADN
Motivo del deposito (Aplicaciones biotecnologicas control de calidad	Conservación

IFORMACIÓN DE LA PERSONA QUE DEPÓSITA	
Nombre	William Gómez
Institución	CEBA
Dirección	Tena 8-20 y Tungurahua
Email	<a href="mailto:williamedissn@yahoo.es">williamedissn@yahoo.es</a>
Teléfono	983000610
Fecha	15/2/2017
Firma	

## 4 CONCLUSIONES

- Se estableció un protocolo para el aislamiento, identificación y caracterización del hongo nativo *Pycnoporus spp.* aislado de la ciudad del Tena, lo cual representa un aporte al desarrollo científico y tecnológico
- Por primera vez se desarrolla un procedimiento para la conservación de la cepa nativa ecuatoriana de *Pycnoporus sanguineus* por liofilización, método que garantiza la conservación de la especie por más de 23 años y su manejo de forma sostenible, generando valor agregado a la biodiversidad fúngica ecuatoriana.
- Se estableció que el mejor medio para la producción de la cepa pura de *Pycnoporus sanguineus* es el Agar Extracto de Malta, con una velocidad de crecimiento lineal de 3,85 mm/día, lo cual representa un aporte al desarrollo de las tecnologías de producción fúngica.
- Se presenta una ficha y registro de la cepa *Pycnoporus sanguineus*, lo cual permitirá generar valor agregado a la biodiversidad fúngica ecuatoriana y principalmente la conservación de la especie.

## 5 RECOMENDACIONES

- Se recomienda aislar, identificar y caracterizar nuevas especies nativas del género *Pycnoporus spp.* que permita incrementar el patrimonio del banco de recursos genéticos microbianos (BRGM).
- Desarrollar la tecnología de producción de cepas nativas en las escalas de banco y piloto, con la finalidad de consolidar el Know How, con posibilidades de patentar los procedimientos.
- Desarrollar la tecnología a escala de laboratorio para la producción de biomasa de cuerpo fructífero de *Pycnoporus spp.*, con fines a su aplicación en la industria farmacéutica y enzimática.

## 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achenbach, H., & Blumm, E. (1991). Investigation of the Pigments of *Pycnoporus sanguineus* - Pycnosanguin and New Phenoxazin-3-ones. *Arch Pharm*, 324(1), 3–6. <http://doi.org/10.1002/ardp.19913240103>
- Acosta-Urdapilleta, L., Alonso-Paz, G. A., Rodríguez, A., Adame, M., Salgado, D., Montiel-Peña, M., & Villegas-Villarreal, E. C. (2010). *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico. En D. Martínez-Carrera, N. Cuvetto, M. Sobal, P. Morales, & V. M. Mora (Eds.), *Hacia un Desarrollo sustentable de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el siglo XXI*. (pp. 531–562). Puebla: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales. COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEMUPAEP-IMINAP. Recuperado a partir de [https://www.researchgate.net/publication/235938991\\_Pycnoporus\\_sanguineus\\_un\\_hongo\\_con\\_potencial\\_biotecnologico](https://www.researchgate.net/publication/235938991_Pycnoporus_sanguineus_un_hongo_con_potencial_biotecnologico)
- Acosta-Urdapilleta, L., Alonso-Paz, G. A., Rodríguez, A., M. Adame, D., Salgado, M., Montiel-Peña, F., ... Villegas-Villarreal. (2010). *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico. En COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM- UPAEP-IMINAP. pp: (Ed.), *Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI* (pp. 531–562). Puebla. Recuperado a partir de <https://books.google.com.co/books?id=k3Ev9gzvIikC&pg=PA186&dq=Hacia+un+Desarrollo+sustentable+de+Producci%C3%B3n-Consumo+de+los+Hongos+Comestibles+y+Medicinales+en+Latinoam%C3%A9rica:+Avances+y+Perspectivas+en+el+siglo+XXI.+Puebla.&hl=es&sa=X&ved=0ahUKE>
- Alexopoulos, C. J., & Beneke, E. S. (1962). *Laboratory Manual for Introductory Mycology*. Minneapolis: Burgess Publishing Company. Recuperado a partir de [https://ia600300.us.archive.org/23/items/Laboratory\\_Manual\\_for\\_Introducto](https://ia600300.us.archive.org/23/items/Laboratory_Manual_for_Introducto)



ry\_Mycology/1962\_alexopoulosBeneke\_laboratoryManualForIntroductoryMycology.pdf

- American Type Culture Collection. (2016a). *Pycnoporus cinnabarinus* (ATCC® 200478™). Manassas.
- American Type Culture Collection. (2016b). *Pycnoporus cinnabarinus* (ATCC® 204166™). Manassas.
- Ander, P., Eriksson, K.-E., & Yu, H. (1983). Vanillie acid metabolism by *Sporotrichum pulverulentum*: before ring-cleavage. *Archives of Microbiology*, 136, 1–6.
- Annuar, M. S. M., Sammantha, S., Murthy, & Sabanatham, V. (2010). Laccase production from oil palm industry solid waste: Statistical optimization of selected process parameters. *Engineering in Life Sciences*, 10(1), 40–48. <http://doi.org/10.1002/elsc.200900044>
- Asamblea Nacional. Constitución de la República del Ecuador, Pub. L. No. Registro Oficial 449 (2008). Quito-Ecuador. Recuperado a partir de [http://www.asambleanacional.gov.ec/documentos/constitucion\\_de\\_bolsillo.pdf](http://www.asambleanacional.gov.ec/documentos/constitucion_de_bolsillo.pdf)
- Asociación Micológica Fungípedia. (2016). *Pycnoporus cinnabarinus*. Recuperado 3 de agosto de 2016, a partir de <https://www.fungipedia.org/hongos/Pycnoporus-cinnabarinus.html>
- Atteke, C., Mounquengui, S., Saha Tchinda, J.-B., Ndikontar, M. K., Ibrahim, B., Gelhaye, E., & Gelhaye, E. (2013). Biodegradation of Reactive Blue 4 and Orange G by *Pycnoporus sanguineus* Strain Isolated in Gabon. *J Bioremed Biodeg*, 4(206), 2155 – 6.199. <http://doi.org/10.4172/2155-6199.1000206>
- Baumer, J. D., Mas Diego, S. M., Pacheco, S., Morgado, A. F. M., & Furigo, A. F. (2008). Comparative study of mycelial growth and production of cinnabarin by different strains of *Pycnoporus sanguineus*. *Revista de Biología e Farmacia - BioFar*, 2(2), 1–5.
- Behrentz, E., & Giraldo, E. (1993). *Modelación a escala del proceso de compostaje*

aerobio, en pila estática y con aireación forzada desarrollo teórico e implementación de laboratorio. (Universidad de los Andes, Ed.) *Centro de Investigaciones en Ingeniería Ambiental*. Santa Fe de Bogotá.

- Berrio, J., Plou, F. J., Ballesteros, A., Martínez, Á. T., & Martínez, M. J. (2007). Immobilization of *Pycnoporus coccineus* laccase on Eupergit C: Stabilization and treatment of olive oil mill wastewaters. *Biocatalysis and Biotransformation*, 25(2-4), 130–134. <http://doi.org/10.1080/10242420701379122>
- Bey, M., Berrin, J.-G., Poidevin, L., & Sigoillot, J.-C. (2011). Heterologous expression of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase in *Pichia pastoris* and involvement in saccharification processes. *Microbial Cell Factories*, 10(113). <http://doi.org/10.1186/1475-2859-10-113>
- Borderes, J., Costa, A., Guedes, A., & Tavares, L. B. B. (2011a). Antioxidant activity of the extracts from *Pycnoporus sanguineus* mycelium. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(6), 1167–1174. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132011000600012>
- Borderes, J., Costa, A., Guedes, A., & Tavares, L. B. B. (2011b). Antioxidant activity of the extracts from *Pycnoporus sanguineus* mycelium. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(6), 1167–1174. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132011000600012>
- Böse, S. R. (1946). Antibiotics in a Polyporus (*Polystictus sanguineus*). *Nature*, 158, 292–296. <http://doi.org/10.1038/158292a0>
- Briceño-León, R. (2000). Bienestar, salud pública y cambio social. En R. Briceño-León, M. De Souza, & C. Coimbra (Eds.), *Salud y equidad: una mirada desde las ciencias sociales* (pp. 15–24). Río de Janeiro: Editora Fiocruz.
- Bumpus, J. A., & Aust, S. D. (1987). Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of the lignin degrading system. *BioEssays*, 6(4), 166–170. <http://doi.org/10.1002/bies.950060405>

- Call, H.-P. (1994). Process for modifying, breaking down or bleaching lignin, materials containing lignin or like substances. Recuperado a partir de <https://www.google.com/patents/CA2182182A1?cl=en>
- Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J., del Río, J. C., Gutiérrez, A., ... Martínez, Á. T. (2004). Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2), 113–120. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.10.019>
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M. J., & Martínez, A. T. (2005). Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and environmental microbiology*, 71(4), 1775–84. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1775-1784.2005> Appl.
- Cao, J., Zhang, H. J., & Xu, C. P. (2014). Culture characterization of exopolysaccharides with antioxidant activity produced by *Pycnoporus sanguineus* in stirred-tank and airlift reactors. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(5), 2075–2080. <http://doi.org/10.1016/j.jtice.2014.05.005>
- Chang, S.-T., & Miles, P. G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. (Eds., Ed.) (2<sup>a</sup> ed.). Florida: CRC Press. Recuperado a partir de <http://books.google.com/books?id=XO4EGzpp1M0C&pgis=1>
- Chanona-Gómez, F., Andrade-Gallegos, R. H., Castellanos-Albores, J., & Sánchez, J. E. (2007). Macromicetos del Parque Educativo Laguna Bélgica, municipio de Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78, 369–381. Recuperado a partir de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmbiodiv/v78n2/v78n2a14.pdf>
- Chegwin A., C., & Nieto R., I. J. (2013). Influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cultivado por fermentación en estado líquido empleando harinas de cereales como fuente de carbono. *Revista mexicana de micología*, 37, 01–09.
- Cid-Perez, T. . Y. a. L.-M. (2011). Extractos de Vainilla- una mezcla de

componentes químicos de aroma y sabor. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*.

Correa, E., Quiñones, W., Torres, F., Cardona, D., Franco, A. E., Robledo, S., & Echeverri, F. (2005). Actividad leishmanicida de *Pycnopus sanguineus*. *Actual Biol.*, 27(1), 39–42.

Cruz Muñoz, R., Piña-Guzmán, A. B., Yáñez-Fernández, J., Valencia-Del Toro, G., Bautista-Baños, S., & Villanueva Arce, R. (2015). Producción de pigmentos de *Pycnopus sanguineus* en medio de cultivo sólido. *Agrociencia*, 49(4), 347–359.

Cruz Muñoz, R., Piña-Guzmán, A. B., Yáñez-Fernández, J., Valencia-Del Toro, G., Bautista-Baños, S., & Villanueva Arce, R. (2015a). Producción de pigmentos de *Pycnopus sanguineus* en medio de cultivo sólido. *Agrociencia*, 49(4), 347–359. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/pdf/302/30239403001.pdf>

Cruz Muñoz, R., Piña-Guzmán, A. B., Yáñez-Fernández, J., Valencia-Del Toro, G., Bautista-Baños, S., & Villanueva Arce, R. (2015b). Producción de pigmentos de *Pycnopus sanguineus* en medio de cultivo sólido. *Agrociencia*, 49(4), 347–359.

Cruz, D. J. (2004). Fungario. Recuperado 20 de junio de 2008, a partir de <http://coleccionbiologicas.utpl.edu.ec/fungario>

de Diego Calonge, F. (2009). *Guía de bolsillo para el buscador de setas*. (Mundi-Prensa Libros, Ed.). Madrid.

Declaración del milenio. (2000). *Resolución aprobada por la Asamblea General*. New York. Recuperado a partir de <http://www.un.org/spanish/milenio/ares552.pdf>

Dias, D., & Urban, S. (2009). HPLC and NMR studies of phenoxazone alkaloids from *Pycnopus cinnabarinus*. *Natural Product Communications*, 4(4), 489–498. Recuperado a partir de <http://europepmc.org/abstract/med/19475991>

Duarte, L. T., Tiba, J. B., Santiago, M. F., Garcia, T. A., & Bara, M. T. F. (2012).

- Production and characterization of tyrosinase activity in *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 crude extract. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1), 21–29.
- Eggert, C., Temp, U., & Eriksson, K.-E. E. L. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1151–1158. <http://doi.org/0099-2240/96>
- Esposito, E., Innocentini-Mei, L. H., Ferraz, A., Canhos, V. P., & Durán, N. (1993). Phenoloxidases and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (UEC-2050 strain): applications. *Journal of Biotechnology*, 29(3), 219–228. [http://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90054-Q](http://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90054-Q)
- Estrella, J., Manosalvas, R., Mariaca, J., & Ribadeneira, M. (2005). *Biodiversidad y recursos genéticos: Una guía para su uso y acceso en el Ecuador*. (Editorial Abya Yala, Ed.). Quito, Ecuador.
- Eugenio, M. E., Carbajo, J. M., Martín, J. A., González, A. E., & Villar, J. C. (2009). Laccase production by *Pycnoporus sanguineus* under different culture conditions. *Journal of Basic Microbiology*, 49(5), 433–440. <http://doi.org/10.1002/jobm.200800347>
- Eugenio, M. E., Santos, S. M., Carbajo, J. M., Martín, J. A., Martín-Sampedro, R., González, A. E., & Villar, J. C. (2010). Kraft pulp biobleaching using an extracellular enzymatic fluid produced by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology*, 101(6), 1866–1870. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.084>
- Falconnier, B., Lapierre, C., Lesage-Meessen, L., Yonnet, G., Brunerie, P., Colonna-Ceccaldi, B., ... Asther, M. (1994). Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-937: Identification of metabolic pathways. *Journal of Biotechnology*, 37(2), 123–132. [http://doi.org/10.1016/0168-1656\(94\)90003-5](http://doi.org/10.1016/0168-1656(94)90003-5)
- Fernández-Larrea, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado De Plagas (Costa Rica)*, (62), 96–100.

Recuperado a partir de <http://www.umoar.edu.sv/biblio/agricultura/enfermedades/controlfitosanitario.pdf>

Forchiassin, F., Papinutti, L., Levin, L., Cinto, I., Diorio, L. A., Grassi, E., ... Carabajal, M. (2014). *Manual de procedimientos de Micología Experimental* (17<sup>a</sup> ed.). Buenos Aires: Departamento de biodiversidad y biología experimental – FCEN – UBA. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

FuQuan, X., & QiJin, H. (2008). Artificial Cultivation of a *Pycnoporus cinnabarinus* Strain Isolated from the Wild in Fujian Province. *Acta Edulis Fungi*, 1, 69–72. Recuperado a partir de <http://www.sjxb.com/EN/abstract/abstract8721.shtml>

Gocenoglu, A., & Pazarlioglu, N. (2014). Cinnabarinic acid : Enhanced production from *Pycnoporus cinnabarinus*, characterization, structural and functional properties. *Journal of Biological Chemistry*, 42(2), 281–290.

Guzmán, G. (1979). *Identificación de los hongos: comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera* (1<sup>a</sup> ed.). México D.F: Editorial Limusa.

Hatakka, A. I., & Uusi-Rauva, A. K. (1983). Degradation of <sup>14</sup>C-labelled poplar wood lignin by selected white-rot fungi. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17(4), 235–242. <http://doi.org/10.1007/BF00510422>

Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95(6), 641–655. [http://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80810-1](http://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80810-1)

Henrique Rosa, L., Gomes Machado, K. M., Jacob, C. C., Capelari, M., Augusto Rosa, C., & Leomar Zani, C. (2003). Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7), 967–974. <http://doi.org/10.1590/S0074-02762003000700019>

- Hernández, M. C., González, S. G. M., Hernández, N. B., Herrera, S., & Camino, M. (2014). Hongos asociados a especies de plantas amenazadas en Cuba Fungi related with threatened plant species in Cuba, *34*, 97–100.
- Herpoël, I., Moukha, S., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J. C., & Asther, M. (2000b). Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. *FEMS Microbiology Letters*, *183*(2), 301–306. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00616-3](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00616-3)
- Herpoël, I., Moukha, S., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J. C., & Asther, M. (2000a). Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. *FEMS Microbiology Letters*, *183*(2), 301–306. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00616-3](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00616-3)
- Holler, J. R., & Brooks, J. C. (1980). Nutritional studies of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Mycological Society of America Nutritional*, *72*(2), 329–337. Recuperado a partir de [http://www.jstor.org/stable/3759256?seq=1&cid=pdf-reference#references\\_tab\\_contents](http://www.jstor.org/stable/3759256?seq=1&cid=pdf-reference#references_tab_contents)
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, *24*(1), 14–21.
- Jaouani, A., Guillén, F., Penninckx, M. J., Martínez, A. T., & Martínez, M. J. (2005). Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*, *36*(4), 478–486. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.11.011>
- Kickbusch, I. (2010). Global Health Diplomacy, (October), 18–22. <http://doi.org/10.3395/reciis.v4i1.342en>
- Kirk, T. . K. (1971). Effects of Microorganisms on Lignin. *Annual Review of Phytopathology*, *9*(1), 185–210. <http://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001153>
- Krings, U., Pilawa, S., Theobald, C., & Berger, R. G. (2001). Phenyl propenoic side chain degradation of ferulic acid by *Pycnoporus cinnabarinus* — elucidation

- of metabolic pathways using [5-2H]-ferulic acid. *Journal of Biotechnology*, 85(3), 305–314. [http://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00396-5](http://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00396-5)
- Lesage-Meessen, L., Haon, M., Uzan, E., Levasseur, A., Piumi, F., Navarro, D., ... Lomascolo, A. (2011). Phylogeographic relationships in the polypore fungus *Pycnoporus* inferred from molecular data. *FEMS Microbiology Letters*, 325(1), 37–48. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02412.x>
- Leštan, D., Štrancar, A., & Perdih, A. (1990). Influence of some oils and surfactants on ligninolytic activity, growth and lipid fatty acids of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 426–428.
- Levasseur, A., Lomascolo, A., Chabrol, O., Ruiz-Dueñas, F. J., Boukhris-Uzan, E., Piumi, F., ... Record, E. (2014). The genome of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: a basidiomycete model with a versatile arsenal for lignocellulosic biomass breakdown. *BMC genomics*, 15(1), 486. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-486>
- Liu, J., Yu, Z., Liao, X., Liu, J., Mao, F., & Huang, Q. (2015). Scalable production, fast purification, and spray drying of native *Pycnoporus* laccase and circular dichroism characterization. *Journal of Cleaner Production*. <http://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.03.154>
- Lomascolo, A., Record, E., Herpoël-Gimbert, I., Delattre, M., Robert, J. L., Georis, J., ... Asther, M. (2003). Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *Journal of Applied Microbiology*, 94(4), 618–624. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01879.x>
- Lozano Valdés, D., Muguercia, H. L., Herrera Torres, M. L., Rivero Arias, E., Zamora Marín, R., & Araújo Praderes, L. J. (1998). Penicilinas. *Acta Medica*, 8(1), 28–39.
- Lu, L., Zhao, M., Zhang, B. B., Yu, S. Y., Bian, X. J., Wang, W., & Wang, Y. (2007a). Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1232–1239.



<http://doi.org/10.1007/s00253-006-0767-x>

Lu, L., Zhao, M., Zhang, B.-B., Yu, S.-Y., Bian, X.-J., Wang, W., & Wang, Y. (2007b). Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. *Biotechnologically Relevant Enzymes And Proteins*, 74(6), 1232–1239. <http://doi.org/10.1007/s00253-006-0767-x>

Machuca, A., & Ferraz, A. (2001). Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(6), 386–391. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00417-3](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00417-3)

Madhavi, V., & Lele, S. S. (2009). Laccase: properties and applications. *BioResources*, 4(4), 1694–1717. Recuperado a partir de [http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes\\_04\\_4\\_1694\\_Madhavi\\_Lele\\_Laccase\\_Props\\_Applications\\_Rev](http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_04_4_1694_Madhavi_Lele_Laccase_Props_Applications_Rev)

Meza, J. C., Auria, R., Lomascolo, A., Sigoillot, J. C., & Casalot, L. (2007). Role of ethanol on growth, laccase production and protease activity in *Pycnoporus cinnabarinus* ss3. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(1-2), 162–168. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.12.018>

Meza, J. C., Casalot, L., Lomascolo, A., Sigoillot, J., Auria, R., Biodépollution, I. R. D. De, ... Filamenteux, C. (2003). Inducción de lacasas en *Pycnoporus cinnabarinus* : Efecto del etanol sobre la expresión enzimática. *Retorno*, 66(2), 2003.

Meza, J. C., Lomascolo, A., Casalot, L., Sigoillot, J. C., & Auria, R. (2005). Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse: Influence of ethanol vapours as inducer. *Process Biochemistry*, 40(10), 3365–3371. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.004>

Mitra, A. K., & Rodríguez-Fernandez, G. (2010). Latin America and the Caribbean: assessment of the advances in public health for the achievement of the Millennium Development Goals. *Int J Environ Res Public Health*, 7(5), 2238–2255. <http://doi.org/10.3390/ijerph7052238>

- Munusamy, U., Sabaratnam, V., Muniandy, S., Abdullah, N., Pandey, A., & Jones, E. B. G. (2008). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase of *Pycnoporus sanguineus* and Toxicity Evaluation of Treated PAH. *Biotechnology*, 7(4), 669–677. <http://doi.org/10.3923/biotech.2008.669.677>
- Oddou, J., Stentelaire, C., Lesage-Meessen, L., Asther, M., & Colonna Ceccaldi, B. (1999). Improvement of ferulic acid bioconversion into vanillin by use of high-density cultures of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(1), 1–6. <http://doi.org/10.1007/s002530051605>
- Ohtakara, A., Hayashi, N., & Mitsutomi, M. (1981). Purification and Some Properties of Acid  $\beta$ -Galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Journal of fermentation technology*, 59(4), 325–328. Recuperado a partir de <http://ci.nii.ac.jp/naid/110002672598/>
- Ojeda Gutiérrez, K. E., & Suescum Jaramillo, J. A. (2012). *Evaluación de cinco cepas de hongos nativos como controladores biológicos de la enfermedad “Ojo de pollo” (Mycena citricolor) en café (Coffea arabica) en condiciones in vitro*. Universidad Técnica Particular de Loja. Recuperado a partir de <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/2841/1/CD.pdf>
- Onofre, S. B., Santos, Z. M. Q., Kagimura, F. Y., & Mattiello, S. P. (2015). Cellulases produced by the endophytic fungus *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill. *African Journal of Agricultural Research*, 10(13), 1557–1564. <http://doi.org/10.5897/AJAR2015.9487>
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2013, agosto 15). Las investigaciones en salud son fundamentales para avanzar hacia la cobertura sanitaria universal. Beijing. Recuperado a partir de [http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/world\\_health\\_report\\_20130815/es/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/world_health_report_20130815/es/)
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2015). *Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud*. New York. Recuperado a partir de [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/186466/1/9789240694873\\_spa.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/186466/1/9789240694873_spa.pdf?ua=1)

- Ortiz, E., Saransi, C., Ayala, K., Faz, L., Benavides, N., Vela, P., ... Pineda, C. A. (2016). Banco de recursos genéticos de *Auricularia spp.* con fines industriales: Una revisión. *Bionatura*, 2 (In Pres.
- Papinutti, L. (2013). *Pycnoporus sanguineus*. *Revista Boletín Biológica*, 29(7), 32–33. Recuperado a partir de [http://www.boletinbiologica.com.ar/pdfs/N29/papinutti\(micologica29\).pdf](http://www.boletinbiologica.com.ar/pdfs/N29/papinutti(micologica29).pdf)
- Pezzella, C., Guarino, L., & Piscitelli, A. (2015). How to enjoy laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(5), 923–940. <http://doi.org/10.1007/s00018-014-1823-9>
- Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., & Faraco, V. (2011). Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current genomics*, 12(2), 104–112. <http://doi.org/10.2174/138920211795564331>
- Pointing, S. B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1-2), 20–33. <http://doi.org/10.1007/s002530100745>
- Pointing, S., Jones, E., & Vrijmoed, L. (2000). Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. *Mycologia*, 92(1), 139–144. <http://doi.org/10.2307/3761458>
- Quiroz-Castañeda, R. E., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., Martínez, A., Folch-Mallol, J., & Anaya, C. M. (2009). Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(4). <http://doi.org/10.2225/vol12-issue4-fulltext-3>
- Ramírez-Cavazos, L., Junghanns, C., Nair, R., Cárdenas-Chávez, D., Hernández-Luna, C., Agathos, S., & Parra, R. (2014). Enhanced production of thermostable laccases from a native strain of *Pycnoporus sanguineus* using central composite design. *J Zhejiang Univ Sci B*, 15(4), 343–352. <http://doi.org/10.1631/jzus.B1300246>
- Ritzer, G. (2001). *Teoría sociológica clásica* (3ª ed.). Madrid: Mc Graw Hill.

- Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Rodríguez-Vázquez, R., & Delgado-Boada, J. M. (2013). Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*, 27(3-4), 67–82. <http://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001>
- Rodríguez, L. (2008). Factores Sociales y Culturales Determinantes en Salud: La Cultura como una Fuerza para Incidir en Cambios en Políticas de Salud Sexual y Reproductiva. En *III Congreso da Associação Latino Americana de População (ALAP)* (p. 21). Córdoba, Argentina: Observatorio de Salud Sexual y Reproductiva (OSSyR). Recuperado a partir de <http://www.ossyr.org.ar/pdf/bibliografia/2.6.pdf>
- Royse, D. J. (1997). Specialty Mushrooms and their Cultivation; Horticulture Review. *Solid substrate cultivation. Springer*, 19, 59–97.
- Schliephake, K., Lonergan, G. T., Jones, C. L., & Mainwaring, D. E. (1993). Decolourisation of a pigment plant effluent by *Pycnoporus cinnabarinus* in a packed-bed bioreactor. *Biotechnology Letters*, 15(11), 1185–1188. <http://doi.org/10.1007/BF00131213>
- Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo [SENPLADES]. (2013b). *Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017* (1ª ed.). Quito: Gobierno Nacional de la República del Ecuador. Recuperado a partir de <http://www.buenvivir.gob.ec/presentacion>
- Senplades. (2009). *Plan Nacional para el Buen Vivir 2009 - 2013*. <http://doi.org/Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo>
- Sigoillot, C., Lomascolo, A., Record, E., Robert, J. ., Asther, M., & Sigoillot, J. . (2002). Lignocellulolytic and hemicellulolytic system of *Pycnoporus cinnabarinus*: isolation and characterization of a cellobiose dehydrogenase and a new xylanase. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(6), 876–883. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00208-9](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00208-9)
- Sigoillot, C., Record, E., Belle, V., Robert, J. L., Levasseur, A., Punt, P. J., ... Asther, M. (2004). Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(3), 346–352.

<http://doi.org/10.1007/s00253-003-1468-3>

Smânia, A., Marques, C. J. S., Smânia, E. F. A., Zanetti, C. R., Carobrez, S. G., Tramonte, R., & Loguercio-Leite, C. (2003). Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phytotherapy Research*, 17(9), 1069–1072. <http://doi.org/10.1002/ptr.1304>

Smânia, A., Monache, F. D., Smânia, E. F. A., Gil, M. L., Benchetrit, L. C., Cruz, F. S., ... Cruz, F. S. (1995). Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Journal of Ethnopharmacology*, 45(3), 177–181. [http://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)01212-I](http://doi.org/10.1016/0378-8741(94)01212-I)

Smânia, E. de F. A., Smânia Júnior, A., & Loguercio-Leite, C. (1998). Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. *Revista de Microbiologia*, 29(4), 317–320. <http://doi.org/10.1590/S0001-37141998000400017>

Stentelaire, C., Lesage-Meessen, L., Oddou, J., Bernard, O., Bastin, G., Ceccaldi, B. C., & Asther, M. (2000). Design of a fungal bioprocess for vanillin production from vanillic acid at scalable level by *Pycnoporus cinnabarinus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(3), 223–230. [http://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)88823-4](http://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)88823-4)

Suárez Arango, C., & Nieto, I. J. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: Una alternativa en la obtención de nutracéuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.riam.2012.03.011>

Swamy, J., & Ramsay, J. A. (1999). The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3-4), 130–137. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00105-7](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00105-7)

Teoh, Y. P., Don, M. M., & Ujang, S. (2011). Media selection for mycelia growth, antifungal activity against wood-degrading fungi, and gc-ms study by *Pycnoporus sanguineus*. *BioResources*, 6(3). Recuperado a partir de [http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes\\_06\\_3\\_2719\\_T](http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_06_3_2719_T)

- Terry, P., Giovannucci, E., Michels, K. B., Bergkvist, L., Hansen, H., Holmberg, L., & Wolk, A. (2001). Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(7), 525–533. <http://doi.org/10.1093/jnci/93.7.525>
- Uzan, E., Nousiainen, P., Balland, V., Sipila, J., Piumi, F., Navarro, D., ... Lomascolo, A. (2010). High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: From gene cloning to enzyme characterization and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), 2199–2213. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04623.x>
- Velíšek, J., & Cejpek, K. (2011). Pigments of higher fungi: A review. *Czech Journal of Food Sciences - UZEI (Czech Republic)*, 29(2), 87–102. Recuperado a partir de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CZ2011000419>
- Viecelli, C. A., & Stangarlin, J. R. (2010). Resistance induction in bean plants against angular leaf spot by extracts from *Pycnoporus sanguineus* mycelium, (August 2016).
- Vikineswary, S., Abdullah, N., Renuvathani, M., Sekaran, M., Pandey, A., & Jones, E. B. G. (2006). Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology*, 97(1), 171–177. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.015>
- World Food Programme [WFP]. (2015). Food Security Analysis. Recuperado 20 de junio de 2007, a partir de <http://www.wfp.org/food-security>
- Xu, F., Kulys, J. J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H.-J. W., ... Schneider, P. (2000). Redox Chemistry in Laccase-Catalyzed Oxidation of N-Hydroxy Compounds. *Appl. Envir. Microbiol.*, 66(5), 2052–2056. <http://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2052-2056.2000>
- Zeikus, J. G. (1981). Lignin metabolism and the carbon cycle: Polymer

Biosynthesis, Biodegradation, and Environmental Recalcitrance. *Advances in Microbial Ecology*, 5, 211–243. [http://doi.org/10.1007/978-1-4615-8306-6\\_5](http://doi.org/10.1007/978-1-4615-8306-6_5)

Zheng, L., Zheng, P., Sun, Z., Bai, Y., Wang, J., & Guo, X. (2007). Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bioresource Technology*, 98(5), 1115–1119. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.03.028>

Zimbardi, A., Camargo, P., Carli, S., Aquino Neto, S., Meleiro, L., Rosa, J., ... Furriel, R. (2016). A High Redox Potential Laccase from *Pycnoporus sanguineus* RP15: Potential Application for Dye Decolorization. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), 672. <http://doi.org/10.3390/ijms17050672>

## 7 ANEXOS

### Anexo 1. Procesos de extracción y amplificación de los productos de PCR



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro  
Teléfono: 0998982450  
e-mail: [idgen.ecuador@gmail.com](mailto:idgen.ecuador@gmail.com)  
R.U.C. 1713443479001

#### Informe de Resultados

**Nombre del Proyecto:** William Gómez – Identificación molecular

**Informe No.:** A-013

**Técnico Responsable:** Ing. Alexis Vela

**Fecha:** 03/01/2017

#### Resultados.

Codificación	Muestra	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Accesoión
A	CEBA-AP3-16	557	75	<i>Pestalotiopsis theae</i>	ITS	99	<a href="#">JX436804.1</a>
B	CEBA-AP1-16	561	98,6	<i>Pestalotiopsis theae</i>	ITS	99	<a href="#">JX436804.1</a>
C*	CEBA-PD-16	1020	68,8	<i>Pleurotus ostreatus</i>	EF1a	85	<a href="#">AY883432.1</a>
D	CEBA-PSB-16	564	99,5	<i>Pestalotiopsis theae</i>	ITS	100	<a href="#">JX436804.1</a>
E	CEBA-PSR-16	652	94,9	<i>Trametes sanguinea</i>	ITS	99	<a href="#">JN164981.1</a>
F	CEBA-IANCEY-TH15-16	NA	NA	NA	NA	NA	NA
G	CEBA-IACEY-TH7-16	NA	NA	NA	NA	NA	NA

\*: Remítase a detalle de resultados

NA: no resultados concluyentes, remítase a detalle de resultados.

Firma autorizada



### Detalle de Resultados

**Nombre del Proyecto:** William Gómez – Identificación molecular

**Técnico Responsable:** Ing. Alexis Vela

**Fecha:** 03/01/2017

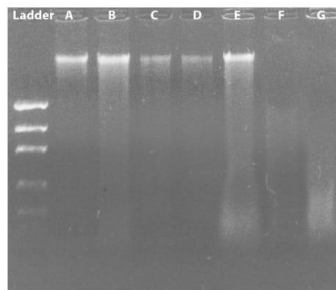
**1. Estudio:** Identificación molecular de microorganismos (Extracción de ADN, Amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y búsqueda en base de datos).

#### Detalles técnicos:

- **Muestras usadas:** Cultivos axénicos de hongos creciendo en agar.
- **Método de determinación:** Identificación molecular por barcoding.
- **Procedimiento:**
  - Los procesos de extracción y amplificación de los productos de PCR se describe en el detalle de protocolos.
  - Los productos de PCR fueron depurados previo a su secuenciación. El producto de amplificación limpio y los primers ITS1, ITS4, ITS5, EF1-983F, EF1-2218R, fueron utilizados para la secuenciación con el método SANGER.
  - Se limpiaron y ensamblaron las secuencias obtenidas con el programa bioinformático GENEIOUS.
  - Se compararon las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos de GenBank

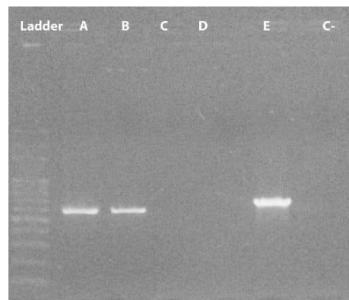
#### Resultados:

El ADN de cada una de las muestras fue extraído y con el fin de identificar la calidad de la extracción se realizó una electroforesis. Las extracciones de ADN genómico obtenidos evidencian una calidad alta y una concentración superior a 400 ng de ADN por cada 8 ul de extracto (Fig.1). Estos resultados permiten evidenciar que los cultivos F y G no poseen una viabilidad tal que se permita la extracción y obtención de ADN de calidad en cantidades significativas.



**Figura1.** Concentración de ADN total genómico visualizados a través de electroforesis en gel de agarosa al 1%, Ladder: Low mass ladder 100bp.

Se utilizó las extracciones de ADN pertenecientes a las muestras A, B, C, D y E, para la amplificación del fragmento ITS. Se puede evidenciar que no existen productos de amplificación para las muestras C y D, por lo que para estas se decidió amplificar un fragmento del factor de elongación 1 alfa (EF1a). Adicionalmente, se diluyeron las muestras hasta una concentración de 30ng/uL, para descartar procesos inhibitorios de la PCR debido a una elevada concentración de ADN, previo a su utilización en el ensamblaje de la PCR (Fig2.).



**Figura 2.** Amplicones del fragmento ITS visualizados en un gel de Agarosa 2%. C-: Control negativo, Ladder: Ladder 1Kb.

#### Conclusiones:

1. La determinación de calidad del ADN a través de gel de agarosa, evidenció la presencia de una alta concentración de ADN y baja contaminación en el ADN de las muestras A, B, C, D, E. Las muestras F y G, evidencian signos de ADN degradado u ausente debido a la mala calidad de estos cultivos; se propone una nueva extracción de ADN de F y G con muestra fresca.
2. El fragmento ITS no amplificó para las muestras C y D, por lo que se amplificó un fragmento de EF1a.
3. Durante el ensamblaje de las secuencias obtenidas, se logra mejorar la calidad de las muestras mediante el uso de herramientas bioinformáticas, identificándose a *Pestalotiopsis theae*, para las muestras A, B y D, *Pleurotus ostreatus* para la muestra C y *Trametes sanguinea* para la muestra E.
4. Para la muestra C, los resultados sugieren que pertenece a el género *Pleurotus*. Sin embargo, el bajo porcentaje de identidad entre la secuencia de EF1a de C y la de *P. ostreatus* sugiere que no existen secuencias de C en la base de datos. Es necesario obtener la secuencia de ITS de C para determinar si éste es un hongo aún no descrito.

**Detalle de protocolos**

**Proyecto:** Secuenciación de ADN total genómico proveniente de tejido fúngico.

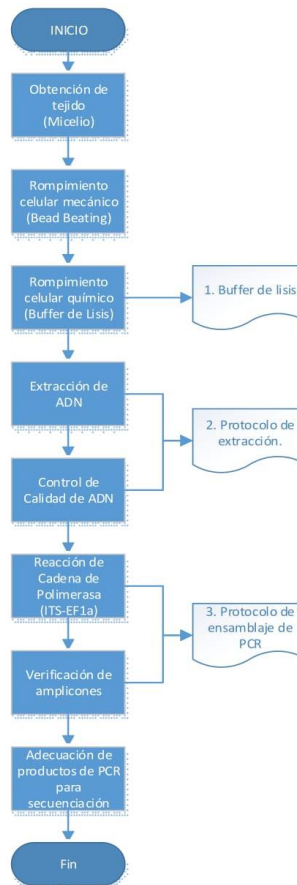
**Fecha:** 27/12/2016

**Técnico responsable:** Ing. Alexis Vela Arias

**Desarrollo:**

**Diagrama de flujo:**

El siguiente diagrama de flujo esta verificado y estandarizado por los responsables técnicos y científicos del laboratorio de diagnóstico e identificación molecular **IDgen**.



**Fig.1:** Diagrama de flujo para el procesos de extracción de ADN y secuenciación de los fragmentos ITS – EF1a.

**Nota:** Todos los protocolos detallados en el presente documento fueron desarrollados y probados por el laboratorio **IDgen**. Este documento es de uso exclusivo para información, se prohíbe su uso para la replicación de protocolos y su reproducción total o parcial.

### 1. Composición del Buffer de Lisis optimizado para micelio.

El siguiente buffer de lisis fue estandarizado y probado por el laboratorio **IDgen**.

- Manitol 140mM
- Tris HCl, pH8, 220mM
- EDTA 220mM
- NaCl 800mM
- CTAB 0.8%
- Salrkosyl 1%
- b-mercaptoethanol 0,2% (v/v)

### 2. Protocolo de extracción de ADN de micelio.

El siguiente protocolo de extracción fue estandarizado y probado por el laboratorio **IDgen**.

- Mediante raspado en placa, se toma 0,1 gramos de micelio y se lo coloca en tubos libres de DNAsa y RNAsa, previamente adecuados con esferas de rompimiento.
- Agitar muestra en el bead beater a su máxima potencia por 0,5 minutos.
- Adicionar 500 µl de tampón de extracción.
- Incubar en baño María por 45 minutos a 65 °C.
- Añadir 500 µl de Fenol:Cloroformo:Isoamilalcohol (25:24:1) y homogenizar la muestra.
- Centrifugar las muestras durante 5 minutos a 14500 gravedades.
- El sobrenadante obtenido es puesto en un nuevo tubo estéril de 1,5 mL (libre de DNAsa y RNAsa).
- Al extracto se añadió un volumen igual de etanol absoluto frío, 150 µl de acetato de sodio 3M y 300 µl de etanol al 70% para precipitar el ADN. (La muestra se dejó enfriar a -20 °C durante toda la noche).
- Centrifugar durante 10 minutos a 14500 gravedades y se eliminó el sobrenadante.
- Secar los tubos en la cámara de flujo laminar durante media hora.
- Resuspender el pellet obtenido con 100 µl de agua estéril y libre de nucleasas, se adiciono 1.5 unidades de ARNsA y se incubo durante 20 minutos a 37 °C.
- Pare verificar la calidad del ADN se realizó una electroforesis en gel de Agarosa al 1% y se utilizó un low mass ladder para determinar la concentración de ADN de la muestra. Adicionalmente se confirmó estos resultados mediante el uso del nanodrop.
- Las muestras son almacenadas a -20 °C, hasta su uso.

### 3. Ensamblaje de PCR.

El siguiente protocolo de ensamblaje de PCR fue estandarizado y probado por el laboratorio **IDgen**.

La PCR fue ensamblada bajo cabina de bioseguridad con un flujo positivo, y en un termo bloque a -5 °C, se utilizaron tubos PCR de 200uL para realizar el ensamble.

El siguiente cuadro detalla los reactivos usados durante el ensamble de la PCR por reacción.

**Nota:** Todos los protocolos detallados en el presente documento fueron desarrollados y probados por el laboratorio **IDgen**. Este documento es de uso exclusivo para información, se prohíbe su uso para la replicación de protocolos y su reproducción total o parcial.

Reactivo	Volumen (uL)	Concentración final (25uL volumen final)
GreenGo Taq 2X	12,5	1X
Primer Forward (5uM)	2,5	500nM
Primer Reverse (5uM)	2,5	500nM
Agua PCR	4,5	-----
ADN (150 ng – 70 ng)	3	5 ng – 20 ng

Los primers universales ITS1, ITS4, ITS5 y los primers EF1-983F, EF1-2218R, fueron utilizados para amplificar los fragmentos ITS e EF1a.

Los protocolos de termociclado se describen a continuación:

**EF1a:** 95 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 1 min, y 72 °C por 3 min; 72 °C por 7 min; y 4 °C en espera.

**ITS:** 95 °C por 3 min; 31 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 45 s, y 72 °C por 1 min 30 s; 72 °C por 7 min; y 4 °C en espera.

Finalmente, los amplicones fueron observados mediante una electroforesis en gel de agarosa 2% y comparados con un ladder 1Kb para verificar el tamaño del amplicon.

Los productos de PCR fueron adecuados y enviados a secuenciación, para su posterior ensamblaje y depuración mediante el programa bioinformático **Geneious**.



**Firma autorizada**


Francisco Flores Ph.D.

**Nota:** Todos los protocolos detallados en el presente documento fueron desarrollados y probados por el laboratorio **IDgen**. Este documento es de uso exclusivo para información, se prohíbe su uso para la replicación de protocolos y su reproducción total o parcial.




## Anexo 2 Resultados análisis bromatológico *Pycnoporus sanguineus*

MC-LSAIA-2201-04



**INSTITUTO NACIONAL AUTONOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS**  
 ESTACION EXPERIMENTAL SANTA CATALINA  
 DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y CALIDAD  
**LABORATORIO DE SERVICIO DE ANALISIS E INVESTIGACION EN ALIMENTOS**  
 Panamericana Sur Km. 1, Cutigagua Tls. 2696691-3007134, Fax 3007134  
 Casilla postal 17-01-340



**INFORME DE ENSAYO No: 17-024**

**NOMBRE PETICIONARIO:** Sr. William Gómez  
**DIRECCION:** Ibarra  
**FECHA DE EMISION:** 16 de febrero de 2017  
**FECHA DE ANALISIS:** Del 8 al 16 de febrero de 2017

**Particular**  
 Sr. William Gómez  
 07/02/2017  
 08H28  
 Proximal, Minerales

**INSTITUCION:**  
**ATENCION:**  
**FECHA DE RECEPCION:**  
**HORA DE RECEPCION:**  
**ANALISIS SOLICITADO**

ANÁLISIS	HUMEDAD	CENIZAS <sup>U</sup>	E.E. <sup>U</sup>	PROTEINA <sup>U</sup>	FIBRA <sup>U</sup>	E.L.N. <sup>U</sup>	IDENTIFICACIÓN
METODO	MO-LSAIA-01.01	MO-LSAIA-01.02	MO-LSAIA-01.03	MO-LSAIA-01.04	MO-LSAIA-01.05	MO-LSAIA-01.06	
METODO REF.	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	
UNIDAD	%	%	%	%	%	%	
17-0236	11,12	2,09	0,89	13,72	34,78	49,12	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
ANÁLISIS		Ca <sup>U</sup>	P <sup>U</sup>	Mg <sup>U</sup>	K <sup>U</sup>	Na <sup>U</sup>	
METODO	MO-LSAIA-03.01.02	MO-LSAIA-03.01.04	MO-LSAIA-03.01.02	MO-LSAIA-03.01.02	MO-LSAIA-03.01.03	MO-LSAIA-03.01.03	
METODO REF.	U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980	
UNIDAD	%	%	%	%	%	%	
17-0236		0,27	0,35	0,06	0,52	0,01	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
ANÁLISIS		Cu <sup>U</sup>	Fe <sup>U</sup>	Mn <sup>U</sup>	Zn <sup>U</sup>		
METODO	MO-LSAIA-05.02	MO-LSAIA-05.02	MO-LSAIA-05.02	MO-LSAIA-03.02	MO-LSAIA-03.02		
METODO REF.	U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980		
UNIDAD	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm		
17-0236	3	136	54	58			<i>Pycnoporus sanguineus</i>

Los ensayos marcados con Ω se reportan en base seca.  
 OBSERVACIONES: Muestra entregada por el cliente

**RESPONSABLES DEL INFORME**



*Iván Samaniego*  
**Dr. Iván Samaniego, MSc.**  
**RESPONSABLE TÉCNICO**

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.  
 Los resultados arriba indicados solo están relacionados con el objeto de ensayo  
**NOTA DE DESCARGO:** La información contenida en este informe de ensayo es de carácter confidencial, está dirigida únicamente al destinatario de la misma y solo podrá ser usada por este. Si el lector de este correo electrónico o fax no es el destinatario del mismo, se le notifica que cualquier copia o distribución de este se encuentra totalmente prohibido. Si usted ha recibido este informe de ensayo por error, por favor notifique inmediatamente al remitente por este mismo medio y elimine la información.

Anexo 3 Metabolitos producidos por las especies de *Pycnoporus*

Metabolito	Especie	Referencia
Lacasas	<i>P. cinnabarinus</i> , <i>P. coccineus</i> , <i>P. sanguineus</i>	(Atteke y col., 2013; Berrio, Plou, Ballesteros, Martínez, y Martínez, 2007; Camarero y col., 2004; Camarero, Ibarra, Martínez, y Martínez, 2005; M.E. Eugenio y col., 2010; Lu y col., 2007b; Machuca y Ferraz, 2001; Madhavi y Lele, 2009; Munusamy y col., 2008; Ramírez-Cavazos y col., 2014; Sigoillot y col., 2002, 2004; Xu y col., 2000)
Peroxidasas extracelulares (Lignin, Versátil y Manganeso Peroxidasas)	<i>P. cinnabarinus</i> , <i>P. coccineus</i>	(Levasseur y col., 2014; Machuca y Ferraz, 2001)
Celulasas ( $\beta$ -glucosidasas Xilanasas)	<i>P. cinnabarinus</i> , <i>P. coccineus</i>	(Bey, Berrin, Poidevin, y Sigoillot, 2011; Machuca y Ferraz, 2001; Sigoillot y col., 2002)
Celobiosa deshidrogenasa	<i>P. cinnabarinus</i>	(Bey y col., 2011; Sigoillot y col., 2002)
Galactosidasa	<i>P. cinnabarinus</i>	(Bey y col., 2011; Ohtakara, Hayashi, y Mitsutomi, 1981)
DDMP	<i>P. sanguineus</i>	(Teoh y col., 2011)
Poliporina	<i>P. sanguineus</i>	(Böse, 1946; Henrique Rosa y col., 2003)
Cinabarina (3-fenoxacina)	<i>P. sanguineus</i> , <i>P. cinnabarinus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991; Acosta-Urdapilleta, Alonso-Paz, Rodríguez, Adame, y col., 2010; Cruz Muñoz y col., 2015a; Dias y Urban, 2009; A. Smânia y col., 2003; E. de F. A. Smânia y col., 1998)
O-acetyl-cinabarina	<i>P. sanguineus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991)
Ácido cinabarínico	<i>P. cinnabarinus</i> , <i>P. sanguineus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991; Acosta-Urdapilleta, Alonso-Paz, Rodríguez, Adame, y col., 2010; Dias y Urban, 2009; Gocenoglu y Pazarlioglu, 2014)
Tramesanguina	<i>P. sanguineus</i>	(Acosta-Urdapilleta, Alonso-Paz, Rodríguez, Adame, y col., 2010)
Ácido cinabarínico	<i>P. cinnabarinus</i>	(Dias y Urban, 2009)
Pycnoporina	<i>P. cinnabarinus</i>	(Dias y Urban, 2009)
3-I fenoxacina	<i>P. sanguineus</i>	(Cruz Muñoz y col., 2015a)

<b>Metabolito</b>	<b>Especie</b>	<b>Referencia</b>
2-amino-fenoxazin-3-ona	<i>P. sanguineus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991)
Pycnosanguina éter fenoxacina	<i>P. sanguineus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991)
Ergosterol	<i>P. cinnabarinus, P. sanguineus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991; Dias y Urban, 2009)
5-6- dihidroergosterol	<i>P. sanguineus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991)
Ergosterol peróxido	<i>P. sanguineus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991)
Vainillina	<i>P. cinnabarinus</i>	(Falconnier y col., 1994; Krings, Pilawa, Theobald, y Berger, 2001; Stentelaire y col., 2000)



Anexo 4 Principales compuestos bioactivos obtenidos de *Pycnoporus spp.*

Metabolito	Uso/tipo	Especie	Referencia
Lacasas	Enzima ligninolítica	<i>P. cinnabarinus</i> ,	(Eggert y col., 1996; Machuca y Ferraz, 2001; Sigoillot y col., 2002; Xu y col., 2000)
		<i>P. sanguineus</i>	(Ramírez-Cavazos y col., 2014)
	Antiinflamatoria	<i>P. cinnabarinus</i>	(Madhavi y Lele, 2009)
	Biorremediación de aguas residuales	<i>P. coccineus</i>	(Berrio y col., 2007; Jaouani, Guillén, Penninckx, Martínez, y Martínez, 2005)
		<i>P. cinnabarinus</i>	(Munusamy y col., 2008)
	Degradación de colorantes sintéticos	<i>P. cinnabarinus</i>	(Camarero y col., 2005)
		<i>P. sanguineus</i>	(Atteke y col., 2013; Lu y col., 2007b)
Blanqueo de pulpa para papel	<i>P. cinnabarinus</i>	(Camarero y col., 2004; Sigoillot y col., 2004)	
	<i>P. sanguineus</i>	(M.E. Eugenio y col., 2010)	
Peroxidasas totales	Enzima ligninolítica	<i>P. coccineus</i>	(Machuca y Ferraz, 2001)
Lignin peroxidasa	Enzima ligninolítica	<i>P. cinnabarinus</i>	(Levasseur y col., 2014)
Manganeso peroxidasa	Enzima ligninolítica	<i>P. cinnabarinus</i>	(Levasseur y col., 2014)
Versátil peroxidasa	Enzima ligninolítica	<i>P. cinnabarinus</i>	(Levasseur y col., 2014)
$\beta$ -glucosidasas	Enzimas celulasas	<i>P. coccineus</i>	(Machuca y Ferraz, 2001)
		<i>P. cinnabarinus</i>	(Bey y col., 2011)
Xilanasas	Enzimas celulasas	<i>P. cinnabarinus</i>	(Bey y col., 2011; Sigoillot y col., 2002)
		<i>P. coccineus</i>	(Machuca y Ferraz, 2001)
Celobiosa deshidrogenasa	Enzima oxidasa	<i>P. cinnabarinus</i>	(Bey y col., 2011; Sigoillot y col., 2002)
Galactosidasa	Enzima hidrolasa	<i>P. cinnabarinus</i>	(Bey y col., 2011; Ohtakara y col., 1981)
DDMP	Antifúngico	<i>P. sanguineus</i>	(Teoh y col., 2011)

Metabolito	Uso/tipo	Especie	Referencia
Poliporina	Anmicrobiano	<i>P. sanguineus</i>	(Böse, 1946; Henrique Rosa y col., 2003)
Cinabarina (3-fenoxacina)	Pigmento	<i>P. sanguineus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991; Acosta-Urdapilleta, Alonso-Paz, Rodríguez, Adame, y col., 2010; Cruz Muñoz y col., 2015a)
	Antimicrobiana	<i>P. sanguineus</i>	(E. de F. A. Smânia y col., 1998)
	Antiviral	<i>P. sanguineus</i>	(A. Smânia y col., 2003)
	Antitumoral	<i>P. cinnabarinus</i>	(Dias y Urban, 2009)
O-acetyl-cinabarina	Pigmento	<i>P. sanguineus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991)
Ácido cinabarínico	Pigmento	<i>P. sanguineus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991; Acosta-Urdapilleta, Alonso-Paz, Rodríguez, Adame, y col., 2010)
	Antibacterial	<i>P. cinnabarinus</i>	(Gocenoglu y Pazarlioglu, 2014)
	Antitumoral	<i>P. cinnabarinus</i>	(Dias y Urban, 2009)
Tramesanguina	Pigmento	<i>P. sanguineus</i>	(Acosta-Urdapilleta, Alonso-Paz, Rodríguez, Adame, y col., 2010)
Pycnoporina	Antitumoral	<i>P. cinnabarinus</i>	(Dias y Urban, 2009)
3-1 fenoxacina	Pigmento	<i>P. sanguineus</i>	(Cruz Muñoz y col., 2015a)
2-amino-fenoxazin-3-ona	Pigmento	<i>P. sanguineus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991)
pycnosanguin éter fenoxazina	Pigmento	<i>P. sanguineus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991)
Ergosterol	Esterol	<i>P. sanguineus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991)
	Antitumoral	<i>P. cinnabarinus</i>	(Dias y Urban, 2009)
	Antimicrobiano	<i>P. cinnabarinus</i>	(Dias y Urban, 2009)
	Antiviral	<i>P. cinnabarinus</i>	(Dias y Urban, 2009)
5-6-dihidroergostero	Esterol	<i>P. sanguineus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991)
1 Ergosterol peróxido	Esterol	<i>P. sanguineus</i>	(Achenbach y Blumm, 1991)
Vainillina	Saborizante, aromatizante	<i>P. cinnabarinus</i>	(Falconnier y col., 1994; Krings y col., 2001; Stentelaire y col., 2000)

