

UCH-FC
Biotecnología
H519
C.1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO


Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Marlene Henríquez Urrutia**

“Estudio de la biodiversidad fúngica asociada a esponjas marinas antárticas y de su potencial como productores de metabolitos secundarios bioactivos”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dra. Inmaculada Vaca Cerezo

Director Seminario de Título

Inmaculada Vaca


Comisión de Evaluación

Dra. Cecilia Rojas

Presidente Comisión

Cecilia Rojas

Dr. Ricardo Cabrera Paucar

Evaluador

Ricardo Cabrera Paucar

Santiago de Chile, Marzo 2013.



Marlene Henríquez Urrutia

Nací y crecí en Santiago, ciudad rodeada de cerros, en especial, de la hermosa cordillera de los Andes, que forma parte de mi vida. Soy integrante de una familia hermosa, que siempre ha estado a mi lado, apoyándome y enseñando sobre la vida.

DEDICATORIA



Este trabajo es el resultado de la visión y el esfuerzo que mis padres han puesto día a día para que yo pudiera, no sólo para acceder a una buena educación, sino también a un desarrollo personal y espiritual.

Padres, este es el resultado final de años de trabajo y va dedicado a ustedes, que me han apoyado en todo lo que he necesitado a lo largo de mi vida. Sin su presencia y amor incondicional seguramente no sería la persona que soy actualmente.

Dedico también este trabajo a mis hermanas, Michelle y Daniela y mi hermano Jorge que, de alguna forma, me apoyaron todos estos años, con su cariño, sus consejos, sus sonrisas y el amor fraternal.

AGRADECIMIENTOS



Quiero expresar mi gratitud a todas las personas que han formado parte de mi vida durante todos estos años.

En primer lugar, agradecer a la Profesora Inmaculada Vaca, quien me apoyó siempre en el desarrollo de este trabajo. Muchas gracias por las enseñanzas y la paciencia entregada durante todo este tiempo. A mis compañeros de laboratorio, infinitas gracias por hacer del monótono trabajo de laboratorio algo divertido cada día. Especialmente, quiero agradecer a Mitzzy, Javiera y Andrea, quienes me ayudaron mucho en el trabajo de laboratorio y se han convertido en mis amigas.

Agradecer al Profesor Aurelio San Martín, por su ayuda en el desarrollo de mi trabajo, aclarándome numerosas dudas y por cumplir su promesa de viajar a la Antártica.

También quiero agradecer a Dony, que siempre tuvo una palabra de aliento y una solución a todos mis problemas.

Esta tesis fue financiada por el proyecto Fondecyt 11090192 y el Instituto Antártico Chileno (INACH), y fue realizada dentro del marco del proyecto PBCT PDA-13.

Índice de contenido

| | |
|--|-----------|
| BIOGRAFÍA | II |
| DEDICATORIA..... | III |
| AGRADECIMIENTOS..... | IV |
| INDICE DE TABLAS O CUADROS | VII |
| LISTA DE ABREVIATURAS | VIII |
| RESUMEN..... | IX |
| ABSTRACT..... | XI |
| 1.- INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. PRODUCTOS NATURALES VERSUS COMPUESTOS SINTÉTICOS EN LA BÚSQUDA DE NUEVAS DROGAS..... | 1 |
| 1.2. LOS HONGOS FILAMENTOSOS: FUENTE DE METABOLITOS SECUNDARIOS | 2 |
| 1.3. ANTÁRTICA: FUENTE DE RECURSOS BIOLÓGICOS Y QUÍMICOS..... | 10 |
| HIPÓTESIS | 13 |
| OBJETIVO GENERAL | 13 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 14 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 15 |
| 2.1. OBTENCIÓN DE CULTIVOS AXÉNICOS DE HONGOS FILAMENTOSOS ASOCIADOS A ESPONJAS MARINAS ANTÁRTICAS..... | 15 |
| 2.2. ELABORACIÓN DE UN CEPARIO DE HONGOS ASOCIADOS A ESPONJAS MARINAS ANTARTICAS..... | 16 |
| 2.3. EXTRACCIÓN DE ADN DE HONGO | 17 |
| 2.4. AMPLIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS TRANSCRITOS DEL ESPACIADOR INTERNO (ITS) | 18 |
| 2.5. ENSAYOS MORFOLÓGICOS | 19 |
| 2.6. FERMENTACIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS Y EXTRACCIÓN CON SOLVENTES ORGÁNICOS | 20 |
| 2.7. ANÁLISIS QUÍMICO | 21 |
| 2.8. AMPLIFICACIÓN DE GENES PKS Y NRPS | 21 |
| 2.9. ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS | 22 |
| 2.10. ENSAYO ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS. | 23 |
| 3. RESULTADOS..... | 25 |
| 3.1. ELABORACIÓN DE UN CEPARIO DE HONGOS ASOCIADOS A ESPONJAS MARINAS ANTARTICAS..... | 25 |
| 3.2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CADA UNO DE LOS AISLADOS FÚNGICOS..... | 25 |
| 3.2.1. <i>Identificación molecular</i> | 25 |
| 3.2.2. <i>Caracterización morfológica de los aislados fúngicos</i> | 36 |
| 3.2.2.1. <i>Fungal sp.</i> | 36 |
| 3.2.2.2. <i>Geomyces</i> | 40 |
| 3.2.2.3. <i>Pseudeurotium</i> | 43 |
| 3.2.2.4. <i>Thelebolus</i> | 44 |
| 3.2.2.5. <i>Aspergillus versicolor</i> | 45 |
| 3.2.2.6. <i>Penicillium</i> | 45 |
| 3.2.2.7. <i>Cladosporium</i> | 46 |
| 3.2.2.8. <i>Aureobasidium pullulans</i> | 47 |

| | |
|---|------------|
| 3.3.2.9. <i>Phoma herbarum</i> | 48 |
| 3.3.2.10. <i>Epicoccum</i> | 49 |
| 3.3 SCREENING MOLECULAR Y QUÍMICO DEL POTENCIAL DEL METABOLISMO SECUNDARIO DE LOS HONGOS AISLADOS. | 51 |
| 3.3.1. <i>Detección de la presencia de genes de PKS y NRPS</i> | 51 |
| 3.3.2. <i>Análisis de los extractos por cromatografía de placa fina (TLC)</i> | 52 |
| 3.3.2.1. <i>Fungal sp.</i> | 52 |
| 3.3.2.2. <i>Geomyces</i> | 52 |
| 3.3.2.2. <i>Penicillium, Aspergillus, Thelebolus, Pseudeurotium, Cladosporium, Aureobasidium, Phoma y Epicoccum</i> | 60 |
| 3.3.3. ANÁLISIS ¹H-RMN | 64 |
| 3.3.2.1. <i>Fungal sp.</i> | 65 |
| 3.3.2.2. <i>Geomyces</i> | 67 |
| 3.3.2.3. <i>Pseudeurotium</i> | 69 |
| 3.3.2.4. <i>Thelebolus</i> | 70 |
| 3.3.2.5. <i>Aspergillus versicolor</i> | 71 |
| 3.3.2.6. <i>Penicillium</i> | 71 |
| 3.3.2.7. <i>Cladosporium</i> | 71 |
| 3.3.2.8. <i>Aureobasidium pullulans</i> | 73 |
| 3.3.2.9. <i>Phoma herbarum</i> | 74 |
| 3.3.2.10. <i>Epicoccum</i> | 74 |
| 3.4.- EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y ANTIOXIDANTES DE LOS HONGOS OBTENIDOS. | 76 |
| 4. DISCUSIÓN | 82 |
| 4.1. BIODIVERSIDAD DE HONGOS CULTIVABLES ASOCIADOS A ESPONJAS MARINAS ANTÁRTICAS | 82 |
| 4.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA | 89 |
| 4.3. SCREENING MOLECULAR Y QUÍMICO DEL POTENCIAL DEL METABOLISMO SECUNDARIO DE LOS HONGOS AISLADOS. | 96 |
| 4.3.1 <i>Detección de la presencia de genes de PKS y NRPS</i> | 96 |
| 4.3.2. <i>Análisis de los extractos por cromatografía de placa fina (TLC)</i> | 98 |
| 4.3.3. <i>Análisis ¹H-RMN</i> | 100 |
| 4.3.3. <i>Evaluación de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los hongos obtenidos</i> | 100 |
| 5. CONCLUSIONES | 108 |
| 6. REFERENCIAS | 111 |
| ANEXO 1 MATERIALES Y MÉTODOS | 116 |





Índice de Tablas y Figuras

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Policétidos..... | 3 |
| Figura 2. Reacción de síntesis de cadena de policétidos..... | 4 |
| Figura 3. Péptidos no ribosomales..... | 5 |
| Figura 4. Reacción de síntesis de péptidos no ribosomales..... | 6 |
| Tabla I. Nombre asignado a cada esponja y el orden o género al cual pertenece..... | 16 |
| Tabla II. Identificación molecular de los aislados fúngicos obtenidos de esponjas marinas antárticas | 27 |
| Figura 5. Árbol filogenético de las secuencias ITS..... | 34 |
| Figura 6. Abundancia y distribución de los aislados fúngicos en las esponjas marinas . | 35 |
| Figura 7. Ensayos morfológicos del grupo Fungal sp. | 39 |
| Figura 8. Ensayos morfológicos del grupo <i>Geomyces</i> | 42 |
| Figura 9. Ensayos morfológicos del grupo <i>Pseudeurotium sp.</i> | 43 |
| Figura 10. Ensayos morfológicos del grupo <i>Thelebolus sp.</i> | 44 |
| Figura 11. Ensayos morfológicos de 071209-E6-C2-D-GPY-B-D (<i>Aspergillus versicolor</i>)..... | 45 |
| Figura 12. Ensayos morfológicos del grupo <i>Penicillium</i> | 46 |
| Figura 13. Ensayos morfológicos del grupo <i>Cladosporium sp.</i> | 47 |
| Figura 14. Ensayos morfológicos cepa 071209-E6-C2-A-A-A (<i>Aureobasidium pullulans</i>)..... | 48 |
| Figura 15. Ensayos morfológicos cepa 131209-E4-C1-III-GPY-B (<i>Phoma herbarum</i>) . | 49 |
| Figura 16. Ensayos morfológicos del grupo <i>Epicoccum sp.</i> | 50 |
| Figura 17. Cromatografía placa fina extractos grupo Fungal sp..... | 55 |
| Figura 18. Cromatografía placa fina de los extractos grupo <i>Geomyces</i> | 59 |
| Figura 19. Cromatografía placa fina de 8 géneros..... | 62 |
| Figura 20. Espectros de ¹ H-RMN de grupo Fungal sp..... | 66 |
| Figura 21. Espectros de ¹ H-RMN de hongos del grupo <i>Geomyces</i> | 68 |
| Figura 22. Espectros de ¹ H-RMN de hongos del grupo <i>Pseudeurotium sp.</i> | 69 |
| Figura 23. Espectros de ¹ H-RMN extractos del grupo <i>Thelebolus sp.</i> | 70 |
| Figura 24. Espectros de ¹ H-RMN del extracto de 071209-E6-C2-D-GPY-B-D (<i>Aspergillus versicolor</i>)..... | 71 |
| Figura 25. Espectros de ¹ H-RMN de grupo <i>Penicillium</i> | 72 |
| Figura 26. Espectros de ¹ H-RMN de grupo <i>Cladosporium sp.</i> | 73 |
| Figura 27. Espectros de ¹ H-RMN del extracto de 071209-E6-C2-A-A-A (<i>Aureobasidium pullulans</i>)..... | 73 |
| Figura 28. Espectros de ¹ H-RMN del extracto de 131209-E4-C1-III-GPY-B (<i>Phoma herbarum</i>)..... | 74 |
| Figura 29. Espectros de ¹ H-RMN de los extractos grupo <i>Epicoccum sp.</i> | 75 |
| Tabla III. Resultados obtenidos para los bioensayos antimicrobianos y antioxidante y la presencia/ausencia de PKS y NRPS en el genoma..... | 76 |
| Anexo 2. Tabla IV. Diámetro de colonia después de 15 días de crecimiento a la temperatura indicada..... | 120 |

Lista de abreviaturas

| | |
|--|--------------------|
| Ácido desoxirribonucleico | ADN |
| Ácido Etilenediaminotetraacético | EDTA |
| Aciltransferasa | AT |
| Basic Local Alignment Search Tool | BLAST |
| Carrier de acil 4'-Fosfopantoteno | ACP |
| Cetosintasa | KS |
| Cetoreductasa | CR |
| Cloroformo:Alcohol Isoamílico | CIA |
| Medio creatina Sacarosa Agar | CREA |
| Cromatografía placa fina | TLC |
| Medio Czapek-Dox Agar | CZ |
| Medio Czapek Levadura Autolisado | CYA |
| Dimetilsulfóxido | DMSO |
| Deshidratasa | DH |
| Dodecil sulfato sódico | SDS |
| Enoilreductasa | ER |
| Medio Extracto de Malta Autolisado | MEA |
| National Center of Biotechnology Information | NCBI |
| Medio Nitrito Sacarosa Agar | NO ₂ |
| Medio Patata Dextrosa Agar | PDA |
| Policétido sintasa | PKS |
| Reacción en cadena de la polimerasa | PCR |
| Resonancia Magnética Nuclear de Protones | ¹ H-RMN |
| Sintetasa de péptidos no ribosomales | NRPS |
| Transcrito del espaciador interno | ITS |
| 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio | MTT |
| Medio tripticasa soya agar | TSA |
| Trisaminometano | Tris |

RESUMEN

Los hongos son microorganismos que han aportado numerosos compuestos a la industria farmacéutica, dado su activo metabolismo secundario. Sin embargo, la búsqueda de nuevos compuestos provenientes de estos organismos se ve limitada debido a la gran redundancia de las especies fúngicas aisladas en los distintos ambientes, que no aportan compuestos novedosos. El continente Antártico, dado su aislamiento geográfico y extremas condiciones ambientales, es un lugar ideal para la búsqueda de nuevas especies fúngicas, las cuales se han adaptado a esas condiciones de vida y posiblemente provean de compuestos de interés.

Durante la expedición a la isla Rey Jorge, Antártica en el verano austral de 2009, se tomaron muestras de 11 esponjas marinas, de las cuales se obtuvieron 118 aislados fúngicos. A partir de esto, se seleccionaron al azar 87 aislados para continuar con el estudio de biodiversidad y potencial metabólico. Para el análisis de biodiversidad, se obtuvo la secuencia ITS de cada aislado, y mediante análisis filogenéticos se clasificó al 59,7% de los hongos dentro de 9 grupos taxonómicos, siendo el género más abundante, *Geomyces*. El 40,2% restante no fue posible clasificarlo y se denominó *Fungal sp.* Paralelamente, los aislados también se caracterizaron morfológicamente, siendo crecidos en 6 medios de cultivos diferentes, e incubados a 15°C y 25°C. Los resultados mostraron que la temperatura óptima de crecimiento, en la mayoría de las cepas, es 15°C. Además, se encontró crecimiento diferencial dependiendo de la fuente de nitrógeno utilizada y la temperatura de incubación. Así también, se evidenció la

producción de pigmentos rosados y amarillos a 15°C, por hongos de los géneros *Geomyces* y *Epicoccum*.

Los estudios del potencial metabólico se llevaron a cabo mediante técnicas químicas y moleculares. Se fermentó cada hongo y se obtuvieron los extractos del caldo de cultivo, los cuales fueron analizados mediante las técnicas de ¹H-RMN y cromatografía en placa fina (TLC) para obtener el perfil de los metabolitos secretados. Así también se realizaron bioensayos para la determinación de actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos. Finalmente, se analizó la presencia de los genes de las enzimas policeto sintasas (PKS) y las sintetisas de péptidos no ribosomales (NRPS), mediante PCR. Las técnicas de TLC y ¹H-RMN mostraron que cada aislado posee un perfil de metabolitos único, aunque también es posible observar algunas similitudes entre especies de un mismo género. Éstas técnicas también sugieren la presencia de metabolitos secundarios con funciones orgánicas de interés. En cuanto a los bioensayos, la actividad antimicrobiana fue la más abundante, con un 42,5% de extractos con actividad contra *Staphylococcus aureus*. Un 16% de los extractos presentó actividad antioxidante sobre el 20% con respecto al ácido ascórbico. Los genes de las enzimas NRPS se encontraron en 56 aislados y los genes de las enzimas PKS en 22 hongos.

Los hongos asociados a esponjas marinas antárticas presentan una amplia biodiversidad, con el potencial de encontrar nuevas especies fúngicas. Así también podrían ser una buena fuente de metabolitos secundarios nuevos con propiedades biológicas de interés.

ABSTRACT

Fungi are microorganisms that have provided numerous compounds for the pharmaceutical industry, given its active secondary metabolism. However, the search for new compounds derived from these organisms is limited owing to the large redundancy of fungal species isolated from different environments, which do not provide novel compounds.

The Antarctic continent, given its geographic isolation and extreme environmental conditions, is an ideal place to search for new fungal species, which have adapted to these conditions and possibly provide compounds of interest.

During the expedition to King George Island, Antarctica in the austral summer of 2009, 11 samples from marine sponges were taken, of which 118 fungal isolates were obtained. From this, 87 isolates were selected for further study of biodiversity and metabolic potential. For the analysis of biodiversity, ITS sequence was obtained for each isolate, and 59.7% of isolates were classified within 9 taxa, being the most abundant genus, *Geomyces*. The remaining 40.2% could not be classified and was designated as Fungal sp. In parallel, the isolates were also characterized morphologically, being grown in 6 different culture media, and incubated at 15 ° C and 25 ° C. The results showed that the optimum temperature of growth, in most strains is 15 ° C. It was also found differential growth depending on the nitrogen source used and the incubation temperature. Also, some isolates (from genera *Geomyces* and *Epicoccum*) showed the production of pink and yellow pigments 15 ° C.

Metabolic potential studies were carried out by chemical and molecular techniques. Each fungus was fermented and the extracts were analyzed by ¹H-NMR and thin plate

chromatography (TLC) for the profile of metabolites secreted. Bioassays for the determination of antioxidant and antimicrobial activity of the extracts were performed. Finally, the presence of the genes of enzymes policeto synthases (PKS) and the non-ribosomal peptide synthase (NRPS) was analyzed by PCR. The techniques of TLC and ¹H-NMR showed that each fungus has a unique metabolite profile, but it is also possible to note some similarities between isolates of the same species. Also, both techniques suggest the presence of secondary metabolites with organic functions of interest. In terms of bioassays, the most abundant activity was antimicrobial, with 42,5% of extracts with activity against *Staphylococcus aureus*. Genes of NRPS enzymes were found in 56 fungi and genes of PKS enzymes were found in 22 fungal.

Fungi associated with marine sponges have a wide biodiversity, with the potential to find new fungal species. Also, these fungi could be an important source of new secondary metabolites with biological properties of interest.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. Productos naturales versus compuestos sintéticos en la búsqueda de nuevas drogas.

Los productos naturales o metabolitos secundarios son compuestos químicos de bajo peso molecular, producidos por el metabolismo secundario de algunos seres vivos. Si bien estos compuestos no son necesarios para la supervivencia de los organismos productores, les permite competir de manera más eficiente por su nicho ecológico. La alta especificidad que existe entre la estructura química de los productos naturales y su función biológica, les convierte en excelentes candidatos para el descubrimiento de nuevas drogas (Rishton 2008; Schmitt y col., 2011). En efecto, los productos naturales han sido la principal fuente de compuestos muy importantes para la medicina moderna tales como los antibióticos, antiparasitarios, inmunosupresores, antitumorales, entre otros (Koehn & Carter, 2005; Li & Vederas, 2009). Esto se debe a que los metabolitos secundarios presentan una gran diversidad química con estructuras que poseen mayor número de centros quirales y anillos aromáticos, y mayor complejidad estérica que cualquier compuesto de origen sintético (Clardy & Walsh, 2004).

El surgimiento de nuevas tecnologías más rápidas y "eficientes", como la búsqueda automatizada de compuestos (Ortholand & Ganesan, 2004), y la química combinatoria, han hecho que en los últimos 20 años, el área de investigación de productos naturales disminuyera notoriamente. Sin embargo, las promesas de búsqueda y testeo de compuestos en un proceso más rápido y menos costoso, no se han cumplido en su totalidad, puesto que ha disminuido considerablemente la obtención de nuevas drogas. Esto se debe principalmente a que éstas tecnologías diseñan nuevos compuestos bajo estructuras químicas previamente conocidas, intentando maximizar los tamaños moleculares en vez de buscar diversidades

químicas biológicamente relevantes (Newman y col., 2003; Koehn & Carter, 2005). Un ejemplo preocupante de esta falta de diversidad estructural es el de los antibióticos: desde los años 70 sólo han salido al mercado 3 clases de antibióticos distintos. Este hecho, unido al creciente aumento de microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos existentes, hace urgente la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos (Butler & Buss, 2006). Una de las soluciones propuestas es complementar las tecnologías actuales con la búsqueda de nuevos productos naturales, desde diversas fuentes y ambientes.

1.2. Los hongos filamentosos: fuente de metabolitos secundarios

Los hongos filamentosos son microorganismos reconocidos por los numerosos metabolitos secundarios que han sido obtenidos a partir de ellos. La penicilina, proveniente de hongos del género *Penicillium*, marcó un hito en la historia de los productos naturales y la medicina, iniciando los estudios sobre los metabolitos secundarios derivados de este grupo.

Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios existentes en esta área, los metabolitos secundarios siguen representando un enigma. Por un lado, se ha visto que corresponden a compuestos dispensables por el organismo. Pero por el otro, también se reportado que en algunos casos la producción de estos metabolitos está correlacionada con una etapa del desarrollo de los hongos (Keller y col., 2005) o incluso como adaptaciones químicas que les permite desarrollarse en el medio que los rodea (Hanson 2008). De esta forma, distintos factores ambientales tales como temperatura, salinidad, disponibilidad de nutrientes y agua (entre otros) definirían la presencia y/o activación de sus vías de síntesis (Keller y col., 2005). Sin embargo, la

producción de estos metabolitos no es igual para todos los hongos, puesto que se ha observado que la producción de éstos posee una distribución taxonómica restringida, afirmándose que la producción de metabolitos secundarios es especie específica (Larsen y col., 2005).

Los metabolitos secundarios de hongos filamentosos comprenden numerosas estructuras químicas que son clasificadas de acuerdo a sus precursores químicos provenientes del metabolismo primario y de acuerdo con las clases de enzimas que las sintetizan (Teichert & Nowrousian, 2011). Encontramos cuatro grandes clases de compuestos: los Policétidos (ej.: lovastatina) (Figura 1), los Péptidos no ribosomales (ej.: penicilina, ciclosporina, etc) (Figura 3), los Terpenos (ej.: giberelinas), y los Alcaloides (ej.: ergopéptidos).

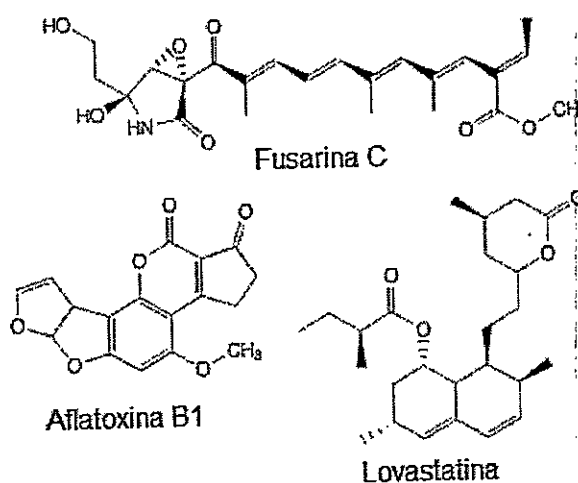


Figura 1. Policétidos. Estructura de 3 policétidos de origen fúngico, como las micotoxinas Aflatoxina B1 y Fusarina C y el regulador del colesterol Lovastatina. Los compuestos policétidos se caracterizan por presentar varios átomos de oxígeno en su estructura (Keller y col. 2005)

Los policétidos son los compuestos más numerosos y estudiados. Las moléculas que forman la estructura básica de un policétido corresponden a Acetil-CoA y Malonil-CoA.

Estos compuestos son reconocidos por las enzimas policétidos sintasas (PKS) quienes catalizan la reacción de condensación de estas dos moléculas para la síntesis de cadenas de policétidos (Figura 2).

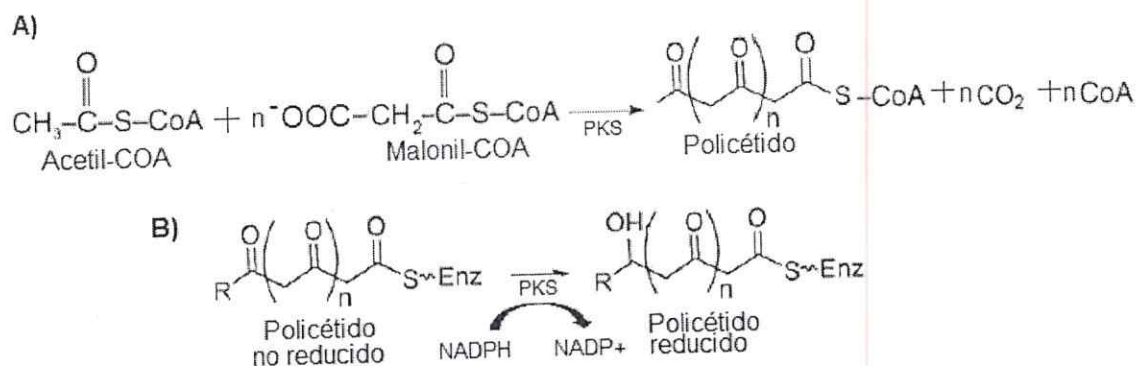


Figura 2. Reacción de síntesis de cadena de policétidos. A) Reacción de condensación de Claisen entre Acetil-CoA y Malonil-CoA para la generación de un policétido. B) Reacción de reducción de grupo carbonilo a grupo hidroxilo con el agente reductor NADPH.

Las enzimas PKS son enzimas multimodulares y presentan 3 dominios catalíticos básicos: Cetosintasa (KS), carrier de acil 4'-Fosfopantoteno (ACP) y aciltransferasa (AT), los cuales llevan a cabo la reacción de condensación.

Dentro del grupo de las enzimas PKS de hongos filamentosos, podemos encontrar las enzimas PKS reductoras y enzimas PKS no reductoras. La diferencia radica en que las enzimas PKS reductoras presentan otros dominios, como el dominio Cetoreductasa (KR) que reduce el grupo carbonilo a grupo hidroxilo con NADPH como reductor (Figura 2), el dominio Deshidratasa (DH) que genera una cadena insaturada liberando una molécula de agua y el dominio Enoil reductasa (ER) que reduce los dobles enlaces presentes generando cadenas alifáticas saturadas (Keller y col. 2005). Por otro lado, las enzimas PKS no reductoras, si bien no presentan dominios de reducción, si pueden llevar dominios ciclasa, lo que permite la generación de compuestos aromáticos.

Adicionalmente, pueden existir modificaciones posteriores realizadas por enzimas codificadas en el mismo cluster de las PKS tales como monooxigenasas, deshidrogenasas, esterasas, metiltransferasas, reductasas, oxidasas, etc, lo que permite la generación de variados compuestos.

Por otro lado, el segundo grupo de metabolitos fúngicos más conocidos, corresponden a los Péptidos no ribosomales (Figura 3). Estos son sintetizados por enzimas multimodulares llamadas Sintetasas de Péptidos no Ribosomales (NRPS).

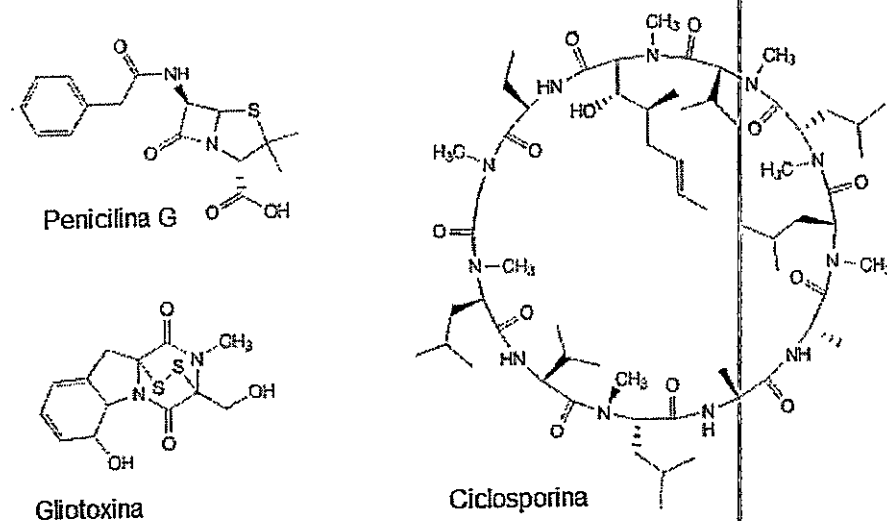


Figura 3. Péptidos no ribosomales. Estructuras de 3 péptidos no ribosomales de origen fúngico. Penicilina G corresponde a un antibiótico, Ciclosporina y Gliotoxina corresponden a compuestos inmunosupresores (Keller y col., 2005).

Las enzimas NRPS son multimodulares y multifuncionales, que catalizan la unión entre aminoácidos, utilizando como sustratos tanto aminoácidos proteinogénicos como no proteinogénicos (Figura 4). La estructura básica de una enzima NRPS se compone de módulos que presentan el dominio de Adenilación (activa el aminoácido con gasto de ATP), dominio de Tiolación (se une el aminoácido activado) y el dominio de condensación (cataliza la formación del enlace peptídico entre los aminoácidos de

distintos módulos). El número de enlaces peptídicos generados usualmente coincide con el número de módulos presentes en la enzima. El producto final puede contar entre 2 a 50 aminoácidos. Adicionalmente, pueden existir otros dominios en la enzima como el dominio de ciclación, epimerización, metilación, oxidación, reducción, que permiten realizar diferentes modificaciones químicas a los péptidos formados. Finalmente, los péptidos no ribosomales pueden sufrir modificaciones posteriores por enzimas codificadas en el mismo cluster de las NRPS, tales como halogenasas, hidroxilasas, glicosilasas, etc. (Keller y col., 2005; Teichert & Nowrousian, 2011).

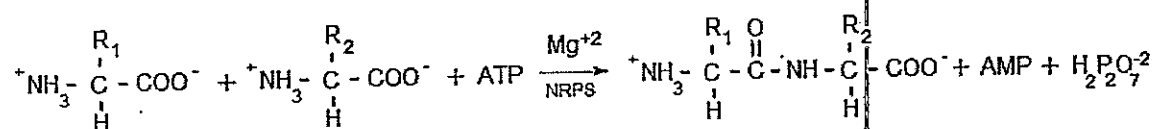


Figura 4. Reacción de síntesis de péptidos no ribosomales. El esquema muestra la formación de un dipéptido. Esta reacción se repite de acuerdo con los módulos presentes en la enzima NRPS para generar péptidos de mayor tamaño.

Hasta el año 2002 se reconoce que los hongos filamentosos son responsables de la producción de más de 6400 compuestos distintos, en su mayoría provenientes de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Bérdy 2005). Las actividades que poseen estos metabolitos secundarios son variadas, donde destacan los antibióticos, pero también se han podido obtener compuestos que inhiben el crecimiento de parásitos, insectos, virus, tumores, así como también compuestos citotóxicos, mutagénicos, enzimas, inmunosupresores, entre otras actividades biológicas (Keller y col., 2005; Blackwell 2011).

Si bien, los hongos filamentosos representan un grupo atractivo para la búsqueda de nuevos productos naturales, las investigaciones en esta área han tenido un bajo rendimiento. Esto se debe a que se han redescubierto las mismas especies fúngicas, lo

que ha llevado al aislamiento de los mismos metabolitos secundarios previamente estudiados (Larsen y col., 2005). Las razones detrás de este redescubrimiento de cepas fúngicas y la consecuente redundancia de metabolitos, son que los estudios se han realizados en nichos ecológicos similares (principalmente tropicales y templados), sin una estrategia de búsqueda definida, lo que favorece la presencia de hongos cosmopolitas con vías metabólicas similares (Bugni & Ireland, 2004).

Si se estima que la biodiversidad fúngica asciende a 5.1 millones de especies (Blackwell 2011), y sólo se han estudiado y mantenido en cepario ~ 64000 aislados del grupo Ascomycete (Richards y col., 2012), se desprende que menos del 5% de los hongos existentes ha sido estudiado. Por lo tanto, un enorme porcentaje de hongos sigue sin ser estudiados. Para tener acceso a esta novedosa biodiversidad, las estrategias de búsqueda de nuevas especies fúngicas se han centrado en nichos ecológicos poco frecuentados. Es así como ambientes con temperaturas, salinidad o pH extremos, han provisto de microorganismos nuevos, con nuevas vías metabólicas y por lo tanto, de nuevos metabolitos secundarios (Larsen y col., 2005).

Al analizar los nichos ecológicos donde se han realizado las búsquedas de hongos filamentosos, se encuentra que un alto porcentaje de las investigaciones se han llevado a cabo en ambiente terrestre, mientras que los estudios sobre hongos marinos sólo representan un 0,6% del total de hongos estudiados (Richards y col., 2012). El grupo de hongos marinos, al igual que los hongos terrestres, se encargan de descomponer la materia orgánica para que los nutrientes vuelvan al ecosistema, sin embargo, su función específica en el ecosistema marino sigue siendo incierto, existiendo hongos marinos obligados y hongos marinos facultativos (los cuales también se pueden encontrar en ambiente terrestre) (Bugni & Ireland, 2004; Abdel-Lateff 2004).

Los análisis sobre la biodiversidad fúngica en el ambiente marino (basados en la comparación de todas las secuencias ITS de hongos marinos que se encuentran en las bases de datos), ha permitido llegar a la conclusión de que los hongos filamentosos presentan mayor biodiversidad en el ambiente marino que en el terrestre, a diferencia de lo que estudios previos han mostrado. Esto incluye linajes de hongos Ascomycetes tales como *Neurospora*, *Aspergillus*, *Cordyceps*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Eupenicillium*, entre otros (Richards y col., 2012). Adicionalmente, en aguas profundas se han encontrado posibles especies nuevas de Ascomycetes y Basidiomycetes, los dos grupos que dominan la presencia de hongos en ambiente marino, lo que daría cuenta de la enorme biodiversidad que queda aún por estudiar (Le Calvez y col., 2009).

La mayoría de estos hongos marinos crece en condiciones únicas y extremas, favoreciendo la capacidad de producción de metabolitos secundarios únicos. Si bien, a pesar de que los hongos marinos han sido poco estudiados y que en ocasiones los metabolitos son análogos a los descubiertos en hongos terrestres, este grupo ha probado ser fuente de promisorios compuestos que poseen estructuras químicas únicas y bioactividades de interés (Bugni & Ireland, 2004). A la fecha se han descrito 272 compuestos provenientes de este grupo, en su mayoría con nuevas estructuras de carbono, evidenciando que los hongos marinos son un grupo con un gran potencial para la producción de compuestos con interés farmacéutico (Bugni & Ireland, 2004). La cefalosporina C, un conocido antibiótico proveniente del hongo marino *Acremonium chrysogenum* es un ejemplo de los compuestos importantes que se han aislado a partir de hongos marinos.

Generalmente, al momento de iniciar una búsqueda de hongos filamentosos marinos, es más fácil encontrarlos asociados a ciertos organismos marinos, como macro invertebrados (esponjas marinas, ascidias, moluscos, entre otros) o algas. La presencia de hongos en estos organismos ha sido interpretada como una simbiosis, donde los metabolitos secundarios de los hongos servirían como mecanismos de defensa del organismo hospedero (Proksch y col., 2003) o simplemente estos organismos actuarían como un reservorio de esporas en estado latente o incluso se ha descrito como una relación parasitaria (Bugni & Ireland, 2004).

Dentro de todos los invertebrados, las esponjas marinas son las que presentan la mayor diversidad de hongos filamentosos marinos. Esto tiene sentido al considerar que más del 40% del volumen de una esponja corresponde a microorganismos que han sido filtrados por ésta (Webster & Taylor, 2012). Por otro lado, se reconoce a las esponjas marinas como importantes fuentes de metabolitos secundarios bioactivos. Sin embargo, en algunos casos, se ha encontrado semejanzas estructurales entre las estructuras de los compuestos obtenidos desde esponjas marinas y los compuestos producidos por microorganismos, lo que sugiere que los microorganismos asociados a las esponjas marinas son los verdaderos productores de los metabolitos secundarios (Webster & Taylor, 2012). Adicionalmente, si se analiza el porcentaje de productos naturales obtenidos desde hongos marinos, el 33% de los compuestos provienen de hongos asociados a esponjas marinas y el 28% de éstos corresponden a compuestos novedosos, por lo que los hongos asociados a esponjas marinas son un grupo atractivo para la búsqueda de nuevos productos naturales (Bugni & Ireland, 2004).

Sin embargo, los estudios sobre la biodiversidad fúngica asociada a esponjas marinas son reducidos (Pivkin y col., 2006, Zhou y col., 2011). Los estudios de este tipo se han

realizado principalmente en aguas templadas, tropicales y mediterráneas: Mar sur de China (Zhou y col., 2011), Océano Pacífico (Li & Wang, 2009), Mar Adriático (Wiese y cols., 2011), en el Océano Índico (Thirunavukkarasu y col., 2012). El único estudio en aguas frías, corresponde al realizado en las costas de la isla Sakhalin, Rusia en el Océano Pacífico (Pivkin y col., 2006). A pesar de que todos estos estudios fueron realizados en ubicaciones geográficas y en esponjas marinas diferentes, se encuentran en todos ellos y en porcentajes mayoritarios, hongos de los géneros cosmopolitas como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Trichoderma*. Frente a estos, una de las soluciones para evitar encontrar especies fúngicas cosmopolitas en las esponjas marinas (y así no encontrar los mismos metabolitos secundarios ya descritos), es realizar este tipo de búsqueda en ambientes poco explorados.

1.3. Antártica: Fuente de recursos biológicos y químicos.

La Antártica es uno de los pocos ambientes prístinos que quedan en el planeta. Las extremas condiciones ambientales que presenta y su aislamiento geográfico, no favorece la existencia de una amplia biodiversidad, pues representa un desafío para el desarrollo de cualquier organismo (Malosso y col., 2006; Brunati y col., 2009). Estas condiciones ambientales (baja temperatura, alta radiación ultravioleta, fuertes vientos) lleva a que la biodiversidad antártica esté centrada en los microorganismos, con las adaptaciones necesarias para sobrellevar estas extremas condiciones (Ruisi y col., 2007).

El estudio de microorganismos antárticos se ha centrado en la búsqueda de bacterias, archeas, líquenes y en menor cantidad, hongos filamentosos (Gunde-Cimerman y col., 2003). En cuanto a los estudios existentes sobre hongos antárticos, éstos han estado

enfocados en el estudio de su biodiversidad, sus relaciones filogenéticas y muy poco sobre su potencial metabólico. Esto, a pesar de que se ha comprobado que los hongos provenientes de zonas climáticas frías (tanto de muestras terrestres como acuáticas), presentan tanto una biodiversidad novedosa como una diversidad química de interés, corroborando las hipótesis de que hongos de climas fríos pueden ser igual de prolíficos en cuanto a metabolitos bioactivos, que hongos de otras latitudes (Larsen y col., 2005; Brunati y col., 2009).

Hasta la fecha existen más de 1000 especies fúngicas descritas en la Antártica, incluyendo levaduras, hongos filamentosos y hongos mayores como las setas, entre otros grupos fúngicos. Estos datos sugieren que la biota fúngica es más variada de lo que se esperaba (Bridge & Spooner, 2012). En cuanto a hongos filamentosos, la mayoría de las especies descritas en la región corresponden a hongos cosmopolitas que no se sabe si han sido traídos como propágulos o se han generado por co-evolución. Sin embargo, hay evidencia que apunta a la presencia de especies endémicas, como lo son los hongos *Cryptococcus vishniacii*, *Geomyces pannorum* y *Thelebolus microsporus* (Ruisi y col., 2006; Bridge & Spooner, 2012). Dichas investigaciones se han llevado a cabo principalmente en muestras terrestres (Bridge & Spooner 2012) y muy poco es lo que se conoce sobre hongos filamentosos acuáticos. Existe un estudio sobre la biodiversidad y el potencial metabólico de hongos provenientes de varios lagos de Larsemann Hills, Vestfold Hills y McMurdo Dry Valleys, donde se obtuvieron 160 aislados fúngicos, en su mayoría pertenecientes al género *Thelebolus* y en menor porcentaje pertenecientes a los géneros cosmopolitas *Cladosporium*, *Curvularia* y *Penicillium*. Así mismo, se evaluaron las propiedades antimicrobianas de los extractos de cada uno, encontrándose que un 29% de los

hongos posee esta actividad (Brunati y col., 2009). En cuanto a los estudios sobre biodiversidad de hongos marinos antárticos, si bien son escasos, recientemente se ha reportado el aislamiento de 12 especies de hongos filamentosos asociados a algas Antárticas, en la Isla Rey Jorge (Loque y col., 2012), encontrándose como género mayoritario *Geomyces* y sólo un aislado representante del género *Penicillium*.

Por otro lado, contrario a lo esperado, en las zonas bálticas de la Antártica se encuentra una amplia diversidad de esponjas marinas; que iguala o supera a la biodiversidad encontrada en los trópicos (Chown 2012). La presencia de estos organismos puede deberse a la antigüedad del continente y su aislamiento geográfico (McClintock y col., 2005). Las esponjas proveen de un importante hábitat para organismos asociados, como bacterias y diatomeas, que frecuentemente colonizan su superficie (McClintock y col., 2005). En efecto, el único estudio sobre la biodiversidad de microorganismos en esponjas marinas antárticas, basado en la amplificación de las secuencias 16S y 18S de procariontes y eucariontes respectivamente, detectó la presencia de numerosas bacterias, diatomeas y dinoflagelados, sin encontrarse secuencias de hongos asociados a ellos (Webster y col., 2004). Estos antecedentes indican que no se ha estudiado la biodiversidad fúngica asociada a esponjas marinas antárticas, lo que se presenta como un área de investigación promisorio para la búsqueda de una biodiversidad fúngica novedosa y el estudio del potencial metabólico de los hongos marinos asociados a esponjas marinas antárticas.

Hipótesis

La Antártica presenta alta biodiversidad de esponjas marinas, es por esto que, al igual que en otras latitudes y dadas sus características de organismos filtradores y alto porcentajes de microorganismos asociados, es probable que presenten hongos filamentosos en su interior.

Además, teniendo en cuenta el ambiente aislado y extremo en el cual se desarrolla la búsqueda, es posible encontrar nuevas especies de hongos, que podrían ser fuentes de novedosos productos naturales de interés. Teniendo en consideración lo anterior, se plantea como hipótesis del trabajo que:

“Las hongos asociados a las esponjas marinas antárticas presentarán una biodiversidad distinta a la encontrada en otras latitudes y proveerán de nuevos compuestos con propiedades bioactivas de interés”

Objetivo General

Estudio de la biodiversidad fúngica de esponjas marinas antárticas y evaluación preliminar del potencial metabólico de estos hongos mediante técnicas químicas y moleculares.

Objetivos Específicos

- 1.- Realización de un cepario de hongos filamentosos provenientes de esponjas marinas antárticas.
- 2.- Identificación molecular y caracterización fenotípica de cada uno de los aislados fúngicos.
- 3.- Screening químico y molecular del potencial bioactivo del metabolismo secundario de los hongos aislados.
- 4.- Evaluación de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los hongos obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de cultivos axénicos de hongos filamentosos asociados a esponjas marinas antárticas

Durante la expedición a la Antártica, realizada en el año 2009 por el equipo del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias, mediante buceo autónomo, se recolectaron 11 esponjas marinas en Bahía Fildes, Isla Rey Jorge. Estas esponjas fueron procesadas, tras su recolección, en el laboratorio de la Base Escudero, Antártica, para la obtención de los hongos filamentosos existentes en su interior. Para ello se cortó un trozo de 2x2 cm aproximadamente, desde el interior de las esponjas. El trozo fue frotado sobre las placas con medio PDA y CYA. Posteriormente, el trozo de esponja fue triturado en agua estéril dentro de un tubo falcon, desde el cual se plaqueó 100µL de la mezcla en las placas con medio PDA y CYA. Las placas se incubaron a 20°C durante 21 días. Cada 7 días, las placas fueron revisadas para repicar en medio nuevo las colonias fúngicas que se habían desarrollado. El punto de partida del trabajo de este seminario de título comenzó con la purificación de los aislados fúngicos hasta la obtención de cultivos axénicos.

La purificación se realizó utilizando la técnica de siembra de diluciones seriadas. Para ello, se obtuvo soluciones de esporas y micelio de cada colonia a purificar raspando dichas colonias con una solución estéril de NaCl al 0.9%. De estas soluciones se realizaron diluciones seriadas de 1/1.000, 1/10.000 y 1/100.000 y se sembraron 100 µL de cada una en placas con medio PDA. Transcurridos 5 días de incubación a 22°C, las placas fueron revisadas, repicándose a placas nuevas de PDA todas las colonias que presentaron fenotipo distinto. Este proceso se repitió al menos tres veces para cada aislado fúngico, hasta la obtención de colonias puras. Se comprobó la pureza de las

colonias fúngicas al realizarle diluciones seriadas y obtener colonias que mostraran el mismo fenotipo.

Las esponjas de las cuales se obtuvieron aislados fúngicos fueron identificadas molecularmente a partir del marcador 18S, pudiéndose determinar su orden y género (ver Tabla I).

Tabla I. Nombre asignado a cada esponja y el orden o género al cual pertenece.

| Esponja | Orden/Género |
|-----------|-------------------------|
| 071209-E1 | <i>Poecilosclérida</i> |
| 071209-E2 | <i>Poecilosclérida</i> |
| 071209-E3 | <i>Tedania sp.</i> |
| 071209-E4 | <i>Hymeniacidón sp.</i> |
| 071209-E5 | <i>Tedania sp.</i> |
| 071209-E6 | <i>Dendrilla sp.</i> |
| 131209-E2 | <i>Hymeniacidon sp.</i> |
| 131209-E3 | <i>Dendrilla sp.</i> |
| 131209-E4 | <i>Hymeniacidon sp.</i> |

2.2. Elaboración de un cepario de hongos asociados a esponjas marinas antárticas.

Finalizado el procedimiento de purificación para la obtención de cultivos axénicos de hongos, se procedió a guardar las esporas de cada uno de los aislados fúngicos obtenidos en tubos criogénicos para su conservación a -20°C . Para ello, se recolectaron las esporas procedentes de dos placas de PDA cada hongo empleando una solución de NaCl 0.9%. Esta solución de esporas y micelios se guardó en tubos

criogénicos con un 50% de glicerol. Para poder realizar un estudio periódico de la viabilidad de estas esporas, se realizó una siembra en medio PDA de diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000 y 1/100.000) de cada tubo. Transcurridos 7 días de incubación a 22 °C, se contaron las colonias de cada una de las placas. Adicionalmente, este procedimiento se empleó para comprobar la pureza del cultivo de cada uno de los gliceroleros chequeando que en cada placa sólo se observaba un fenotipo de colonia.

2.3. Extracción de ADN de hongo

Con la finalidad de realizar estudios moleculares a cada uno de los hongos, se procedió a la extracción del ADN de cada uno siguiendo el protocolo descrito por Fenández 1997, con algunas modificaciones. Para ello, las esporas provenientes de 1 placa de PDA, se inocularon en 50 mL de medio CYA líquido en matraces de 250 mL. Los matraces se dejaron en la incubadora orbital a 22°C y 200 rpm, durante 2 días. Al cabo de los 2 días de crecimiento, se procedió a filtrar el micelio usando filtros Nyltal, lavándolo con solución NaCl 0,9%, para luego secarlo utilizando papel filtro autoclavado. El micelio se congeló con nitrógeno líquido y se trituró en un mortero, para luego, transferir 100 mg del micelio en polvo a tubos Eppendorf de 2 mL. Al tubo se añadió 800 µL de Buffer de Ruptura (Tris-HCl 0,2 M; EDTA 10mM; SDS 1%; pH 8,2) y 800 µL de Fenol básico. La mezcla se agitó mediante vórtex y se dejó 30 minutos a 50°C, agitando cada 5 minutos. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Cada tubo presentó dos fases: la fase fenólica, que contiene los restos de micelio y la fase acuosa, que contiene partículas solubles, entre ellos el ADN. Con cuidado, procurando no tomar la fase fenólica, se

transfirió la fase acuosa a un tubo Eppendorf de 2 mL y agregó 1 volumen de Fenol:CIA (1:1) y se centrifugó a 14000 rpm por 6 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente, se rescató la fase acuosa y se repitió el proceso 2 veces más para asegurar la pureza de esta fase. Al término de esta etapa, se rescató la fase acuosa y se agregó 1 volumen de CIA (Cloroformo: Alcohol isoamílico 24:1), para eliminar los restos de fenol. La mezcla se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm y la fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, añadiéndose 1/10 de volumen de Acetato de sodio (3 M pH 5,2) y 2,5 de volumen de Etanol absoluto frío. Los tubos se guardaron a -20°C durante 20 minutos para la precipitación del ADN. Una vez transcurrido el tiempo, los tubos fueron centrifugados por 15 minutos a 14000 rpm a 4°C. Finalmente, se eliminó el sobrenadante obtenido y el pellet, correspondiente al ADN, se resuspendió en 50 µL de Buffer TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1 mM, pH 8).

2.4 Amplificación y análisis de los transcritos del espaciador interno (ITS)

El DNA genómico obtenido se utilizó como templado para la amplificación de las secuencias conocidas como transcrito del espaciador interno o ITS, utilizando los partidores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) (Anexo 1).

En la reacción de PCR se utilizó el producto Master Mix GoTaq de Promega con los siguientes volúmenes de reacción: 25 µL de Master Mix, 21 µL de agua libre de DNAasa, 2 µL de cada partidor (10 nmol/µL) y 2 µL de ADN de cada hongo, en un volumen de reacción final de 52 µL.

Las condiciones de amplificación fueron:

- 1.- Desnaturación inicial a 95 °C por 5min
- 2.- Amplificación, 30 ciclos compuestos de:

- Desnaturalación a 95 °C por 30 segundos
- Anillamiento a 50 °C por 30 segundos
- Extensión a 72 °C por 30 segundos

3.- Extensión final a 72 °C por 10 minutos

Los productos de PCR obtenidos se purificaron desde el mix de reacción utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega y posteriormente, se enviaron a la empresa MacroGen Inc. (Corea del Sur), para la secuenciación de dichos fragmentos.

Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), donde se escogieron las secuencias con mayor porcentaje de solapamiento y mayor porcentaje de identidad.

Para estudiar las relaciones filogenéticas entre los aislados fúngicos, se realizó alineamientos múltiples con el programa ClustalX2 entre las distintas secuencias ITS obtenidas por la secuenciación y aquellas descargadas desde GenBank para cada uno de los hongos aislados. Los datos obtenidos fueron exportados al programa MEGA para la generación de árboles filogenéticos usando el método de Neighbor-joining, realizando 1000 réplicas.

2.5. Ensayos morfológicos

Con la finalidad de conocer las características fenotípicas y diferenciar morfológicamente los aislados fúngicos obtenidos, se creció cada hongo en 6 medios sólidos distintos: Czapek-Dox agar (CZ); Czapek Levadura Autolisado Agar (CYA);

Extracto de Malta Autolisado agar (MEA); Patato Dextrósa Agar (PDA); creatina sacarosa agar (CREA); y nitrito sacarosa agar (NO₂) (Frisvad and Samson 2004) (Anexo 1).; a dos temperaturas: 15° y 25°C durante 15 días. Para ello, con la punta de un mondadientes estéril, se recogió micelio del hongo y se inoculó tres puntos por cada placa, cada condición por duplicado. Para el seguimiento del crecimiento, se midió el diámetro de las colonias formadas a los 5, 10 y 15 días de crecimiento. Además, se observaron las características morfológicas como el color del micelio, forma de la colonia, textura, cambios de coloración en el agar. Se hizo un registro fotográfico a los 15 días de crecimiento, de todas las colonias.

2.6. Fermentación de los aislados fúngicos y extracción con solventes orgánicos

Para cada hongo, se recolectaron las esporas procedentes de una placa de PDA cultivada durante 7-8 días a 22 °C y se inocularon en 100 mL de medio CYA en matraces de 500 mL. Tras 15 días de cultivo a 22°C y 200 rpm, se separó el micelio del caldo de cultivo con un filtro Nytal. El micelio se lavó con 100 mL de solución NaCl 0,9%, y este lavado se juntó al caldo. La fase acuosa resultante se extrajo tres veces con 70 mL de acetato de etilo en embudo de decantación, posteriormente, el pH de la fase acuosa se disminuyó a 2 con HCl 1 M y se procedió a realizar 3 extracciones más con acetato de etilo. Como última fase de extracción, se agregó 70 mL de Diclorometano y se juntó con el resto de la fase orgánica. La fase orgánica obtenida se secó con sulfato de sodio anhidra y se concentró a presión reducida en un rotavapor. Los extractos concentrados se almacenaron en viales de vidrio a 4°C.

2.7. Análisis químico

El perfil de metabolitos secundarios de cada extracto, se llevó a cabo mediante las técnicas de cromatografía de capa fina (TLC) y resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN). Para la realización de los TLC, una pequeña cantidad de cada extracto se depositó en placas de cromatografía de silica gel mediante el uso de un capilar. Las placas se eluyeron empleando la mezcla de solventes Diclorometano:Metanol (9:1) (10% Metanol). Una vez secas, las placas se revelaron empleando dos técnicas distintas: observándolas bajo luz UV y utilizando reactivo de Liebermann, un revelador general de compuestos orgánicos. La luz UV empleada fue de dos longitudes de onda (264 nm y 356 nm). Para la visualización de moléculas orgánicas, las placas fueron humedecidas con reactivo de Liebermann, aplicándose calor para su revelado.

Para el análisis de ^1H -RMN, los extractos fueron liofilizados y disueltos en 0.6 mL de cloroformo deuterado (CDCl_3). El análisis se realizó en un equipo Bruker Avance AM-400 en la Unidad de Instrumentación de la Universidad Católica de Chile.

2.8. Amplificación de genes PKS y NRPS

Con el fin de conocer el potencial metabólico de los hongos, se buscaron 2 grupos de enzimas en el genoma: las policetido sintasas (PKS) y las sintetisas de péptidos no ribosomales (NRPS). Para la detección de los genes de las enzimas PKS, se usó la serie de partidores LC (LC1-LC2 y LC3c-LC5c) para la identificación del dominio cetosintasa de éstas enzimas (Amnuaykanjanasin y col., 2005). Para la detección de NRPS se utilizaron los partidores de la serie AUG003-AUG0007; AUG003-AUG0006 y AUG005-AUG007, descritos por Slightom y col., (2009). Estos partidores fueron

diseñados a partir del alineamiento de 10 genes de NRPS de hongos, encontrando zonas consenso en los módulos de adenilación y tiolación.

Para la amplificación de las PKS y NRPS se utilizó un volumen de reacción de 13 μL : 6,25 μL de Master Mix GoTaq, 5,25 μL de agua libre DNAasa, 0,5 μL de cada partidor a (10 nmol/ μL) y 1 μL de DNA.

Las condiciones de amplificación para las PKS fueron:

- 1.- Desnaturación inicial a 95 °C por 4 min
- 2.- Amplificación, 35 ciclos compuestos de:
 - Desnaturación a 95 °C por 30 segundos
 - Anillamiento a 50 °C por 1 minuto
 - Extensión a 72 °C por 2 minutos
- 3.- Extensión final a 72 °C por 7 minutos

Las condiciones de amplificación para las NRPS fueron:

- 1.- Desnaturación inicial a 95 °C por 2 min
- 2.- Amplificación, 35 ciclos compuestos de:
 - Desnaturación a 94 °C por 30 segundos
 - Anillamiento a 55 °C por 30 segundos
 - Extensión a 72 °C por 3 minutos
- 3.- Extensión final a 72 °C por 10 minutos

2.9. Ensayo de actividad antioxidante de los extractos

Para la realización del ensayo antioxidante, se utilizó el ensayo del MTT desarrollado por Liu & Nair,(2010). El compuesto denominado bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio o MTT, es un compuesto amarillo que al reducirse cambia a color

morado, el cual es la base de la reacción antioxidante. El ácido ascórbico, es un compuesto con alta capacidad antioxidante, y se usa como control positivo en el experimento. El ácido láurico, es un ácido graso saturado, sin capacidad antioxidante, por lo que se utiliza como control negativo. Para el desarrollo del experimento, se disolvió 1 mg de extracto en 250 μ L de DMSO. Paralelamente, se prepararon las siguientes soluciones: MTT 1mg/1mL en agua, Ácido ascórbico 1mg/mL en DMSO, Ácido Láurico 1mg/mL en DMSO. La reacción se llevó a cabo en viales de vidrio de 25 mL. La reacción comenzó con la adición de 570 μ L de MTT al vial junto con 30 μ L de la solución del extracto a ensayar, mezclándose en vórtex por 1 minuto. Luego se añadió 600 μ L de DMSO y se volvió a mezclar. Las reacciones de cada extracto y control se realizaron por triplicados. Como reacción blanco, se reemplazó los 30 μ L de extracto por DMSO. Los viales se dejaron a 25°C y en oscuridad durante 24 horas. Posteriormente se midió la absorbancia de las soluciones a 570 nm en un espectrofotómetro. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de capacidad antioxidante considerando como 100% la capacidad antioxidante del ácido ascórbico $[(\text{Absorbancia obtenida} \times 100)/\text{Absorbancia Ac. Ascórbico}]$

2.10. Ensayo actividad antimicrobiana de los extractos.

La actividad antimicrobiana de los extractos se midió empleando el ensayo de difusión en agar contra cuatro bacterias: dos bacterias patógenas humanas, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* ATCC25922, y dos bacterias fitopatógenas *Clavibacter michiganensis* 807 y *Xanthomonas campestris* 833. Para la realización de este ensayo, las bacterias se crecieron en medio LB líquido a temperatura ambiente hasta una densidad óptica de 1. Posteriormente, se prepararon placas de cada una de

las bacterias agregando 150 μL del cultivo bacteriano correspondiente a 15 mL de medio TSA. Los extractos se disolvieron en metanol a una concentración final de 1mg/10 μL . Los discos de papel se impregnaron con 10 μL (1mg) de cada extracto y se depositaron en las placas de TSA con bacteria. Estas placas se dejaron 1 hora a 4°C para la difusión de los compuestos y posteriormente, se incubaron a 37°C (*S.aureus* y *P.aeruginosa*) o a 27°C (*C.michiganensis* y *X.campestris*). Transcurridas 24 h de incubación, se midieron los halos de inhibición formados. Como control positivo se utilizó bencilpenicilina (Calbiochem) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/1\mu\text{L}$ para *Staphylococcus aureus* y 0,5 $\mu\text{g}/1\mu\text{L}$ para *Clavibacter michiganensis*; y estreptomycinina (Sigma-Aldrich), a una concentración de 1 $\mu\text{g}/1\mu\text{L}$ para las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Xanthomonas campestris*. Como control negativo se utilizó 10 μL de metanol.

3. RESULTADOS

3.1. Elaboración de un cepario de hongos asociados a esponjas marinas antárticas.

Tras sucesivos pasos de purificación, se obtuvieron 118 aislados fúngicos, provenientes de 9 de las esponjas recolectadas en Bahía Fildes, Antártica. Estos aislados se conservan en tubos criogénicos con 50% de glicerol a -20°C.

3.2. Identificación molecular y caracterización morfológica de cada uno de los aislados fúngicos.

Para llevar a cabo la identificación de los hongos, se seleccionaron al azar 87 aislados fúngicos, los cuales fueron sometidos a un estudio molecular de su secuencia ITS y a una caracterización morfológica.

3.2.1. Identificación molecular

Con la finalidad de identificar los aislados fúngicos a nivel de género o especie, se analizó la secuencia ITS de cada uno de ellos. Las secuencias ITS obtenidas fueron comparadas en la base de datos mediante el uso de BLAST (Basic Local Alignment Search tool) de la NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Con los resultados obtenidos, fue posible identificar 52 aislados (59,7%), de los cuales 16 aislados fueron posibles de identificar a nivel de especie, mientras que los 36 aislados restantes fueron identificados sólo a nivel del género. Los aislados identificados se agrupan en 9 géneros: *Geomyces* (19 aislados a identificados como

Geomyces sp. y 9 aislados identificados como *Geomyces pannorum*, 32,1%), *Epicoccum* sp. (6 aislados, 6,8%), *Thelebolus* sp. (5 aislados, 5,7%), *Penicillium* (2 aislados identificados como *Penicillium polonicum*, 1 aislado identificado como *Penicillium commune*, 1 aislado identificado como *Penicillium solitum*, 4,5%), *Pseudeurotium* sp. (3 aislados, 3,4%), *Cladosporium* sp. (3 aislados, 3,4%), *Aspergillus versicolor* (1 aislado, 1,1%), *Aureobasidium pullulans* (1 aislado, 1,1%) y *Phoma herbarum* (1 aislado, 1,1%). Todos los aislados pertenecen al phylum Ascomycota, agrupándose en 6 órdenes taxonómicos: *Tuberculariales*, *Thelebolales*, *Eurotiales*, *Capnodiales*, *Dothideales* y *Pleosporales* (Figura 5). Los géneros *Geomyces* y *Pseudeurotium* aún no tienen consenso para ser clasificados bajo un orden taxonómico, por lo que se les designa como *Leotiomycetes incertae sedis*

Por otro lado, 35 aislados (40,3%) no pudieron ser identificados molecularmente. Esto se debe a que las secuencias ITS de estos aislados tienen un alto porcentaje de identidad con secuencias ITS de hongos no conocidos. Debido a esto, a este grupo de aislados se les denominó como Fungal sp. En la Tabla II se presenta la identificación asignada a cada uno de los aislados fúngicos.

Las secuencias ITS obtenidas fueron analizadas, encontrándose 22 genotipos distintos. Para la realización del análisis filogenético, se tomó una secuencia representativa de cada genotipo y la secuencia ITS con mayor porcentaje de identidad para cada genotipo, descargada desde BLAST. (Figura 5).

Tabla II. Identificación molecular de los aislados fúngicos obtenidos de esponjas marinas antárticas. Se incluye mejor match en Blast, porcentaje de solapamiento (%Q), porcentaje de identidad (%I), número de nucleótidos (N°) y el número de acceso en Genbank de las secuencias nuevas.

| Genotipo | Aislado | Pariente más cercano | % Q | % I | Identificación asignada | N° | N° acceso Genebank |
|----------------------|--------------------------------|--------------------------|------|------|-------------------------|-----|--------------------|
| Genotipo 1 (n=25) | 071209-E2-C1-A-A | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E2-C5-A-C | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C2-A-A | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C2-A-B | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C2-B-B | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 99% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C2-C-D | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C3-A-A | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C3-A-B | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C3-A-C | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C3-B-A | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C3-B-D | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C5-A-D | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C5-A-E | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C7-A-A | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C7-A-B | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C9-(PDA)- A-A | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C9-(PDA)- C-A | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E4-C10- II(VERDE)-BB | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E6-C1-III-A | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 99% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E6-C4-II- (GPY)-B-B | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E6-C4-II(GPY)- C-C | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 071209-E6-C4-II-(PDA)- C-B | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 99% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 131209-E3-C1-(GPY)-C | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 131209-E3-C2-II-A-A-2 | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |
| | 131209-E3-C2-II-B-B | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845296 |

| | | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|--|------|------|--------------------------------|-----|----------|
| Genotipo 2 | 071209-E4-C5-A-C | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845297 |
| Genotipo 3 | 131209-E3-C2-II-B-A | Fungal sp. GU004207.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845298 |
| | 131209-E2A-C4-II-B-A | Fungal sp. GU004206.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845299 |
| Genotipo 4 | 131209-E2B-C3-III-A | Fungal sp. GU004206.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845299 |
| | 131209-E2B-C3-III-C-B | Fungal sp. GU004206.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845299 |
| Genotipo 5 | 131209-E2B-C3-III-C | Fungal sp. GU004206.1 | 100% | 100% | Fungal sp. | 527 | JX845300 |
| Genotipo 6 | 071209-E4-C1-A | Fungal sp. GU166501.1 | 100% | 99% | Fungal sp. | 522 | JX845302 |
| | 071209-E4-C6-B-C | Uncultured fungus GQ999410.1 | 100% | 94% | Fungal sp. | 540 | JX845301 |
| Genotipo 7 | 071209-E4- C10(ROSADA)A-A | Uncultured fungus GQ999410.1 | 100% | 94% | Fungal sp. | 540 | JX845301 |
| | 131209-E4-C1-III-C | Uncultured fungus GQ999410.1 | 100% | 94% | Fungal sp. | 540 | JX845301 |
| | 071209-E1-C1-II-(PDA)- A-A | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces pannorum</i> . | 527 | JX845279 |
| | 071209-E1-C1-II-B-A | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces pannorum</i> | 527 | JX845279 |
| | 071209-E1-C1-II-B-B- AMARILLO | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces pannorum</i> | 527 | JX845279 |
| Genotipo 8 (n=8) | 071209-E1-C1-II-(PDA)- B-A | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces pannorum</i> | 527 | JX845279 |
| | 071209-E1-C1-III- (GPY)-A | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces pannorum</i> | 527 | JX845279 |
| | 071209-E1-C1-III- (GPY)-D | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces pannorum</i> | 527 | JX845279 |
| | 131209-E4-C11-II-A-B | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces pannorum</i> . | 527 | JX845279 |
| | 131209-E4-C11-II-A-C | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces pannorum</i> . | 527 | JX845279 |
| | 071209-E2(GPY)-A | <i>Geomyces sp</i> JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces sp.</i> | 527 | JX845281 |
| | 071209-E2(GPY)-B | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces sp.</i> | 527 | JX845281 |
| | 071209-E2-C2-A-A | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | 100% | 99% | <i>Geomyces sp.</i> | 527 | JX845281 |
| | 071209-E2-C2-B-A | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces sp.</i> | 527 | JX845281 |
| | 071209-E2-C2-B-D | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces sp.</i> | 527 | JX845281 |
| | 071209-E2-C3-A-A | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces sp.</i> | 527 | JX845281 |

| | | | | | | | |
|----------------------|-----------------------------------|--|------|---------------------|---------------------------------|----------|----------|
| Genotipo 9 (n=18) | 071209-E2-C3-A-B | <i>Geomyces</i> sp. JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces</i> sp. | 527 | JX845281 |
| | 071209-E2-C3-B-A | <i>Geomyces</i> sp. JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces</i> sp. | 527 | JX845281 |
| | 071209-E2-C3-C-A | <i>Geomyces</i> sp. JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces</i> sp. | 527 | JX845281 |
| | 071209-E3-C2-II-A-A (GPY) | <i>Geomyces</i> sp. JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces</i> sp. | 527 | JX845281 |
| | 071209-E3-C2-II-C- (GPY)-A | <i>Geomyces</i> sp. JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces</i> sp. | 527 | JX845281 |
| | 131209-E2A-C2-II-C-B | <i>Geomyces</i> sp. JN630629.1 | 100% | 99% | <i>Geomyces</i> sp. | 527 | JX845281 |
| | 131209-E2A-C5II-D-A | <i>Geomyces</i> sp. JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces</i> sp. | 527 | JX845281 |
| | 131209-E2A-C5II-D-B | <i>Geomyces</i> sp. JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces</i> sp. | 527 | JX845281 |
| | 131209-E2A-C5-II-E-B | <i>Geomyces</i> sp. JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces</i> sp. | 527 | JX845281 |
| | 131209-E4-C10-B-C | <i>Geomyces</i> sp. JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces</i> sp. | 527 | JX845281 |
| 131209-E4-C10-D-A | <i>Geomyces</i> sp. JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces</i> sp. | 527 | JX845281 | |
| 131209-E4-C10-D-B | <i>Geomyces</i> sp. JN630629.1 | 100% | 100% | <i>Geomyces</i> sp. | 527 | JX845281 | |
| Genotipo 10 | 131209-E2A-C5II-A-A | <i>Geomyces</i> sp. JN630629.1 | 100% | 99% | <i>Geomyces</i> sp. | 527 | JX845282 |
| Genotipo 11 | 071209-E5-C3-II-B-A | <i>Geomyces pannorum</i> DQ189227.1 | 100% | 99% | <i>Geomyces pannorum</i> . | 525 | JX845280 |
| Genotipo 12 | 071209-E5-C2-II-B-A | Uncultured <i>Pseudeurotium</i> FJ378726.1 | 100% | 99% | <i>Pseudeurotium</i> sp. | 516 | JX845283 |
| | 071209-E5-C2-II-B-B | Uncultured <i>Pseudeurotium</i> FJ378726.1 | 100% | 99% | <i>Pseudeurotium</i> sp. | 516 | JX845283 |
| Genotipo 13 | 071209-E4-C2-B-A | Uncultured <i>Pseudeurotium</i> FJ378726.1 | 100% | 99% | <i>Pseudeurotium</i> sp. | 516 | JX845284 |
| Genotipo 14 | 071209-E4-C4-A | <i>Thelebolus</i> sp. GU004201.1 | 100% | 100% | <i>Thelebolus</i> sp. | 518 | JX845292 |
| | 071209-E4-C4-B-B | <i>Thelebolus</i> sp. GU004201.2 | 100% | 100% | <i>Thelebolus</i> sp. | 518 | JX845292 |
| | 071209-E6-CI-A-A | <i>Thelebolus</i> sp. GU004201.1 | 100% | 100% | <i>Thelebolus</i> sp. | 518 | JX845292 |
| | 071209-E6-CI-B-A | <i>Thelebolus</i> sp. GU004201.1 | 100% | 100% | <i>Thelebolus</i> sp. | 518 | JX845292 |
| | 071209-E6-CI-B-B | <i>Thelebolus</i> sp. GU004201.1 | 100% | 100% | <i>Thelebolus</i> sp. | 518 | JX845292 |
| Genotipo 15 | 071209-E6-C2-D- (GPY)-B-D | <i>Aspergillus versicolor</i> JN689347.1 | 100% | 100% | <i>Aspergillus versicolor</i> . | 528 | JX845289 |
| Genotipo 16 | 071209-E1-C1-III-B | <i>Penicillium polonicum</i> HQ850925 | 100% | 100% | <i>Penicillium polonicum</i> | 546 | JX845285 |
| | 071209-E1-C1-III-C | <i>Penicillium polonicum</i> HQ850925 | 100% | 100% | <i>Penicillium polonicum</i> | 546 | JX845285 |
| Genotipo 17 | 071209-E3-C3-II-B-B | <i>Penicillium commune</i> JN831239.1 | 100% | 100% | <i>Penicillium commune</i> | 547 | JX845286 |

| | | | | | | | |
|-------------|------------------------|--|------|------|--------------------------------|-----|----------|
| Genotipo 18 | 071209-E4-C1-III-A | <i>Penicillium solitum</i> JN642222.1 | 100% | 100% | <i>Penicillium solitum</i> | 547 | JX845287 |
| Genotipo 19 | 071209-E4-C8-A-C | <i>Cladosporium</i> sp. JF773595.1 | 100% | 100% | <i>Cladosporium</i> sp. | 512 | JX845291 |
| | 071209-E6-C2-verde-A | <i>Cladosporium</i> sp. JF773595.1 | 100% | 100% | <i>Cladosporium</i> sp. | 512 | JX845291 |
| | 071209-E6-C2-verde-B | <i>Cladosporium</i> sp. JF773595.1 | 100% | 100% | <i>Cladosporium</i> sp. | 512 | JX845291 |
| Genotipo 20 | 071209-E6-C2-A-A-A | <i>Aureobasidium pullulans</i> AB693902.1 | 100% | 100% | <i>Aureobasidium pullulans</i> | 542 | JX845295 |
| Genotipo 21 | 131209-E4-CI-III-GPY-B | <i>Phoma Herbarum</i> FN868459.1 | 100% | 98% | <i>Phoma herbarum.</i> | 503 | JX845294 |
| | 071209-E2-C4-(PDA)-A-A | <i>Epicoccum</i> sp. JF773624.1 | 100% | 100% | <i>Epicoccum</i> sp. | 505 | JX845293 |
| | 071209-E2-C4-(PDA)-A-B | <i>Epicoccum</i> sp. JF773624.1 | 100% | 100% | <i>Epicoccum</i> sp. | 505 | JX845293 |
| | 071209-E2-C4-(PDA)-A-C | <i>Epicoccum</i> sp. JF773624.1 | 100% | 100% | <i>Epicoccum</i> sp. | 505 | JX845293 |
| | 071209-E2-C4-(PDA)-A-D | <i>Epicoccum</i> sp. JF773624.1 | 100% | 100% | <i>Epicoccum</i> sp. | 505 | JX845293 |
| | 071209-E2-C4-(PDA)-A-E | <i>Epicoccum</i> sp. JF773624.1 | 100% | 100% | <i>Epicoccum</i> sp. | 505 | JX845293 |
| | 071209-E2-C4-(PDA)-C-A | <i>Epicoccum</i> sp. JF773624.1 | 100% | 100% | <i>Epicoccum</i> sp. | 505 | JX845293 |

El grupo más numeroso corresponde a los aislados que no fue posible identificar y que se denominaron Fungal sp., encontrando 7 genotipos distintos. Los genotipos 1 (n= 25 aislados), genotipo 2 (perteneciente a 071209-E4-C5-A-C) y el genotipo 3 (perteneciente a 131209-E3-C2-II-B-A), poseen un porcentaje de identidad entre 99-100% con la secuencia ITS del aislado fúngico proveniente de muestras de suelo de la Antártica (N° acceso GenBank GU004207.1)

Por otro lado, el genotipo 4 (n=3) y el genotipo 5 (perteneciente a 131209-E2B-C3-III-C) tienen entre 99-100% de identidad con la secuencia ITS de otro aislado proveniente de muestras de tierra obtenidas en la Antártica (N° acceso GenBank GU004206.1)

En el árbol filogenético, estos genotipos se agrupan formando dos grupos cercanos entre sí, dentro del mismo clado de los aislados *Geomyces* sp. JN630629.1. Esto

permite sugerir que los aislados identificados como Fungal sp. pertenecen al menos a la misma clase, Leotiomycetes (Figura 5).

Por otro lado, el genotipo 6 está representado por el aislado 071209-E4-C1-A, que presenta 100% de identidad con la secuencia ITS del hongo proveniente de la planta *Changnienia amoena Chien* en China (N° acceso GenBank GU166501.1). El genotipo 7 (n=3) posee un 94% de identidad con la secuencia ITS del aislado Uncultured fungus, proveniente de muestras de aire (N° acceso GenBank GQ999410.1).

Al analizar el listado de secuencias con mayor porcentaje de identidad para el genotipo 6 y 7, provisto por BLAST, se encuentran numerosas secuencias de hongos pertenecientes a la clase Sordariomycetes, sugiriendo que los aislados con genotipo 6 y 7 pertenecen a esa clase. Cabe mencionar que estos dos últimos genotipos forman un clado separado del resto de las secuencias Fungal sp.

Los aislados pertenecientes al género *Geomyces*, presentaron 4 genotipos distintos. El genotipo 8 cuenta con 8 secuencias ITS que presentaron 100% de identidad con la secuencia ITS de la cepa *Geomyces pannorum*, proveniente de estudios de los microorganismos asociados a las estructuras de madera existentes en la Antártica (N° acceso GenBank GU212398.1). Los genotipos 9 (n=18) y 10 (perteneciente al aislado 131209-E2A-C5-II-A-A) tienen 99-100% de identidad con la secuencia ITS de la cepa *Geomyces sp.* previamente reportado en muestras de suelo de la Antártica (N° acceso GenBank JN630629.1). Por otro lado, El genotipo 11, pertenece a 071209-E5-C3-II-B-A y posee 100% de identidad con la secuencia ITS que la cepa *Geomyces pannorum*, proveniente de muestras de depósitos marinos en el Ártico (N° acceso GenBank

DQ189227.1). Estos 4 genotipos representan, en el árbol filogenético 3 grupos cercanos entre sí (Figura 5).

Los aislados pertenecientes al género *Pseudeurotium* presentaron el genotipo 12 (n=2) y el genotipo 13 (perteneciente al aislado 071209-E4-C2-B-A). Ambos genotipos poseen un 99% de identidad con la secuencia ITS de la cepa Uncultured *Pseudeurotium* aislada desde Kobresia, planta herbácea de los Himalaya (N° acceso Genbank FJ378726.1) Por otro lado, el genotipo 14 (n=5) presentó 100% de identidad con la secuencia ITS de la cepa *Thelebolus sp*, proveniente de muestras de suelo de la Antártica (N° acceso GenBank GU004201.1). Ambos géneros, *Pseudeurotium* y *Thelebolus* forman dos grupos cercanos en el árbol filogenético, en un cluster adyacente al de los *Geomyces*, pues los tres géneros pertenecen a la misma clase taxonómica, Leotiomycetes.

El aislado 071209-E6-C2-D-GPY-B-D fue el único que presentó el genotipo 15, el cual es igual a la secuencia ITS del aislado identificado como *Aspergillus versicolor*, hongo proveniente de *Panicum virgatum*, Canadá (N° acceso GeneBank JN689347.1). En el caso de los aislados pertenecientes al género *Penicillium*, encontramos el genotipo 16 (n=2) que posee 100% de identidad con la secuencia ITS de la cepa *Penicillium polonicum*, aislada en China (N° acceso GenBank HQ850925.1). El genotipo 17, perteneciente al aislado 071029-E3-C3-II-B-B que presenta 100% de identidad con secuencia ITS de la cepa identificada como *Penicillium comune*, proveniente de la Antártica (N° acceso GenBank JN831239.1). El genotipo 18 se encuentra en el aislado 071209-E4-C1-III-A y presenta 100% de identidad con la secuencia ITS de la cepa *Penicillium solitum*, aislado proveniente de Rusia (N° acceso GenBank JN642222.1).

Ambos géneros, *Aspergillus* y *Penicillium*, se agrupan cercanos en el árbol filogenético, puesto que pertenecen al mismo orden taxonómico, Eurotiales.

Los 3 aislados pertenecientes al género *Cladosporium*, presentan el genotipo 19. Este genotipo presenta 100% de identidad con la secuencia ITS de la cepa *Cladosporium* sp., hongo endófito proveniente de *Taxus globosa*, planta nativa de México (N° acceso GenBank JF773595). En el árbol filogenético, forman un único grupo, perteneciente al orden Capnodiales.

El aislado 071209-E6-C2-A-A-A es el único que presenta el genotipo 20, el cual presenta 100% de identidad con la secuencia ITS del aislado *Aureobasidium pullulans*, proveniente de árboles de manzanas de Japón (N° acceso GenBank AB693902.1). Este forma, en el árbol filogenético, un clado único perteneciente al orden Dothideales.

El aislado 1312009-E4-C1-II-GPY-B, presenta el genotipo 21, que posee 100% de identidad con la secuencia ITS del aislado *Phoma herbarum*, proveniente de muestras de pino en España. Este forma, en el árbol filogenético, un clado único perteneciente al orden Pleosporales (Botella, L. et al., 2010).

Finalmente, el grupo *Epicoccum*, presenta 6 aislados con el genotipo 22 el cual tiene 100% de identidad con la secuencia ITS de la cepa *Epicoccum* sp, hongo obtenido desde la planta *Taxus globosa* de México (N° acceso GenBank JF773624.1). En el árbol filogenético, forma un único clado perteneciente al orden Tuberculariales.

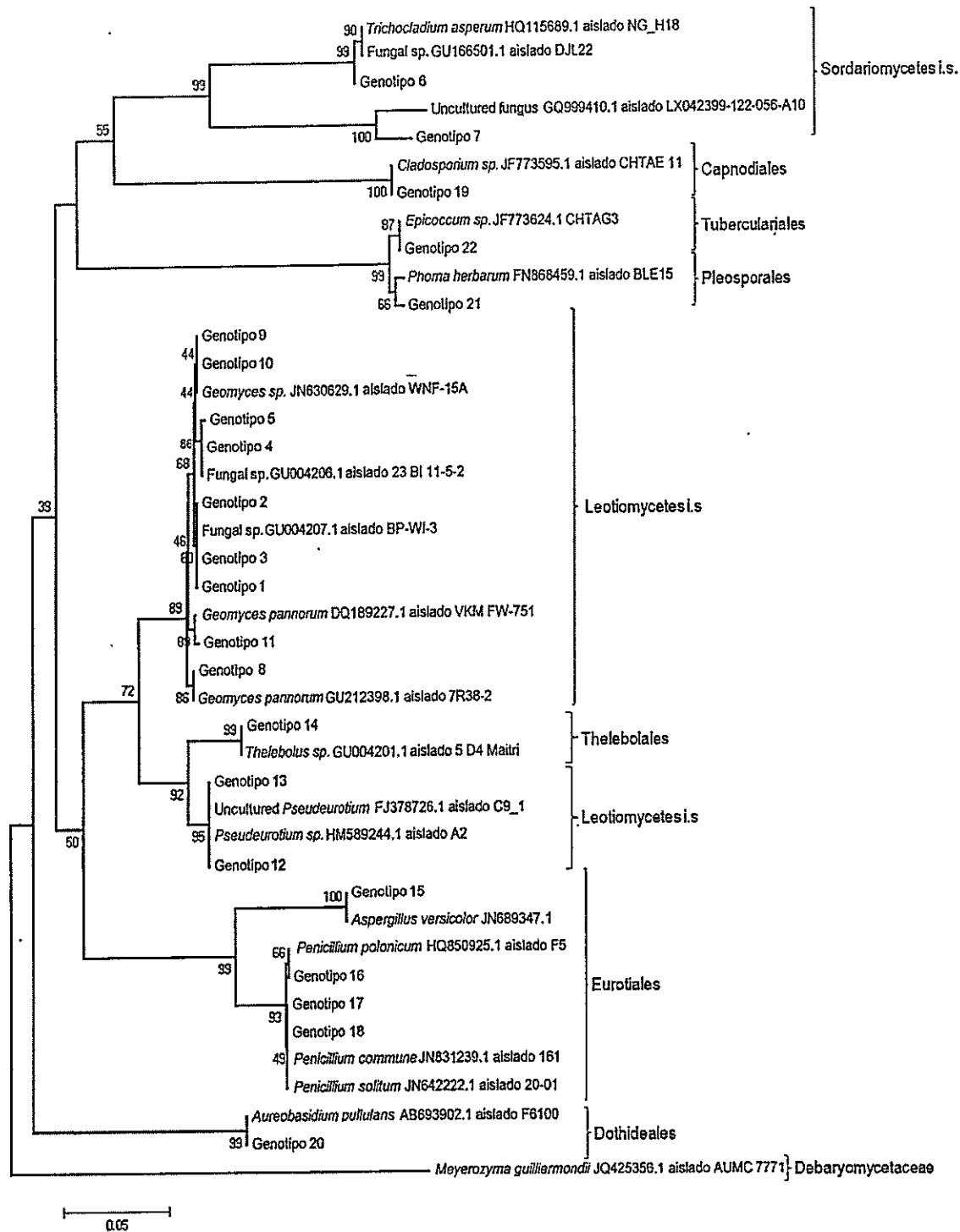


Figura 5. Árbol filogenético de las secuencias ITS. Alineamiento de los 22 genotipos encontrados, incluyendo la secuencia ITS más cercana de cada una de ellas, descargadas desde la NCBI. Se indica el orden taxonómico al que pertenece cada grupo filogenético. La secuencia ITS de *Meyeromyza guilliermondii* (N° Acceso GenBank JQ425356.1) fue utilizada como grupo externo.

Con respecto a la distribución de los aislados fúngicos encontrados en las esponjas, se puede observar que el género *Geomyces* es el que se encuentra mayormente distribuido entre las esponjas (6 de 9 esponjas). Los géneros *Aspergillus*, *Aureobasidium* y *Phoma* se encuentran asociados sólo a una esponja marina (Figura 6).

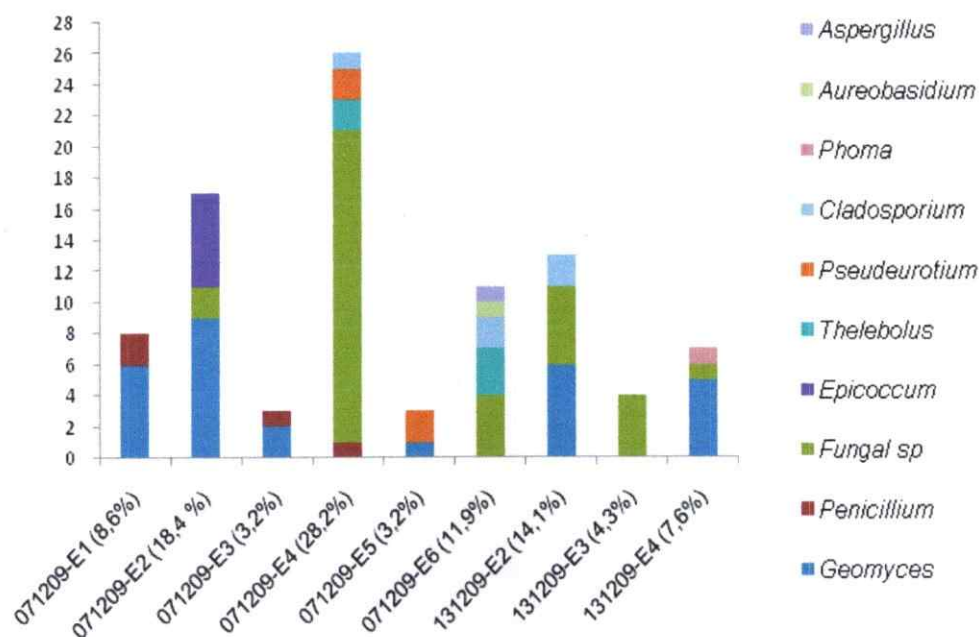


Figura 6. Abundancia y distribución de los aislados fúngicos en las esponjas marinas. Cada color representa un género, además se incluye la abundancia de cada uno en las 9 esponjas y el porcentaje de géneros distintos encontrados en cada esponja. Se incluye también el grupo denominado Fungal sp.

3.2.2. Caracterización morfológica de los aislados fúngicos

Con el fin de poder diferenciar los hongos de acuerdo a sus características morfológicas, cada uno de ellos fue crecido en 6 medios distintos: CYA, PDA, MEA, CZ, CREA y NO₂, incubados a 15°C y a 25°C, durante 15 días.

A continuación se presentan los resultados para cada uno de los géneros fúngicos encontrados así como para el grupo de hongos no identificados (Fungal sp.).

3.2.2.1. Fungal sp.

El crecimiento de los hongos varió de acuerdo al medio de cultivo y a la temperatura de incubación. El crecimiento se siguió midiendo los diámetros de las colonias, datos que se encuentran en la tabla IV (Anexo 2).

Aquellos aislados pertenecientes a la clase Leotiomycetes (identificados como Fungal sp. GU004207.1 y Fungal sp. GU004206.1), presentaron mayor crecimiento a 15°C, pues el diámetro de las colonias fluctuó entre 0,1 y 4,8 centímetros, mientras que a 25°C el diámetro de las colonias varió entre 0,2 y 1,6 cm. Por otro lado, aquellos aislados que pertenecen a la clase Sordariomycetes presentaron dos comportamientos distintos. Por un lado, los 3 aislados identificados como Uncultured fungus GQ999410.1, presentaron mayor crecimiento a 15°C, pues el diámetro de las colonias fluctuó entre 0,3 y 3,9 cm, mientras que a 25°C el diámetro fluctuó entre 0,3 y 0,8 cm. En cambio, el aislado 071209-E4-C1-A identificado como Fungal sp GU166501., presentó mayor crecimiento a 25°C con diámetros de colonia que fluctuaron entre 2,5 y 6,4 cm, mientras que a 15°C, el diámetro fluctuó entre 1,5 y 4,3 cm.

En cuanto a su morfología, en general se observaron diferencias en la coloración, forma y textura de la colonia, dependiendo del medio del cultivo y su temperatura de incubación. Los hongos pertenecientes a la clase Leotiomycetes, en los medios complejos como CYA (Sacarosa y extracto de levadura), PDA (Glucosa y extracto de papa) y MEA (Glucosa y extracto de Malta), a 15°C presentaron colonias circulares, tupidas en filamentos, variando su coloración entre el gris o color beige. En contraste, a 25°C, las colonias se presentaron amorfas, más compactas y con filamentos más cortos. Al evaluar las colonias en medios con diferentes fuentes de nitrógeno se observaron algunas variaciones en la morfología. En medio con nitrato (CZ) se observó que 4 hongos presentaron colonias con morfologías diferentes al resto, con colonias con poco crecimiento de filamentos y traslúcidas (071209-E4-C2-A-B, 071209-E4-C2-B-B, 071209-E4-C2-C-D, 071209-E6-C4-II-PDA-C-B) (Figura 7). Esta misma morfología se observó en 5 hongos crecidos en medio con creatina (CREA). En cuanto a los hongos crecidos en medio con nitrito (NO₂), se observó que 13 hongos no son capaces de crecer en este medio a ninguna de las dos temperaturas. En cambio, 9 de los aislados pueden crecer en este medio sólo a 15°C, y 9 aislados pueden crecer en este medio en ambas temperaturas, formando colonias tupidas en filamentos (Ver tabla IV, Anexo 2).

Con respecto a los aislados pertenecientes a la clase Sordariomycetes, en los medios CYA y PDA se observó que las colonias de los aislados identificados como Uncultured fungus GQ999410.1, a 15°C eran circulares, tupidas en filamentos, con coloración que varió entre blanco y naranja, en cambio a 25°C, se observaron colonias más compactas y amorfas, con filamentos más cortos (aspecto aterciopelado). En el medio MEA, se observó que las colonias no tienen forma definida, siendo más pequeñas y

con menos filamentos, en ambas temperaturas. Por otro lado, en los medios con nitrato (CZ) y con creatina (CREA) se observó un crecimiento mínimo, con filamentos traslúcidos, en el interior del agar. Mientras, que en el medio con nitrito (NO_2) ningún aislado presentó crecimiento. En cambio, el aislado 071209-E4-C1-A identificado como Fungal sp GU166501, en los medios CYA, PDA y MEA y en ambas temperaturas, formó colonias amorfas, con textura de algodón y poco tupida en filamentos. En los medio con nitrato (CZ) y creatina (CREA) y en ambas temperaturas, se observaron filamentos traslúcidos, al interior del agar. No se observó crecimiento en medio con nitrito (NO_2). Estas características permiten diferenciar a estos dos grupos de hongos clasificados bajo la clase Sordariomycetes, indicando que se tratarían de aislados distintos.

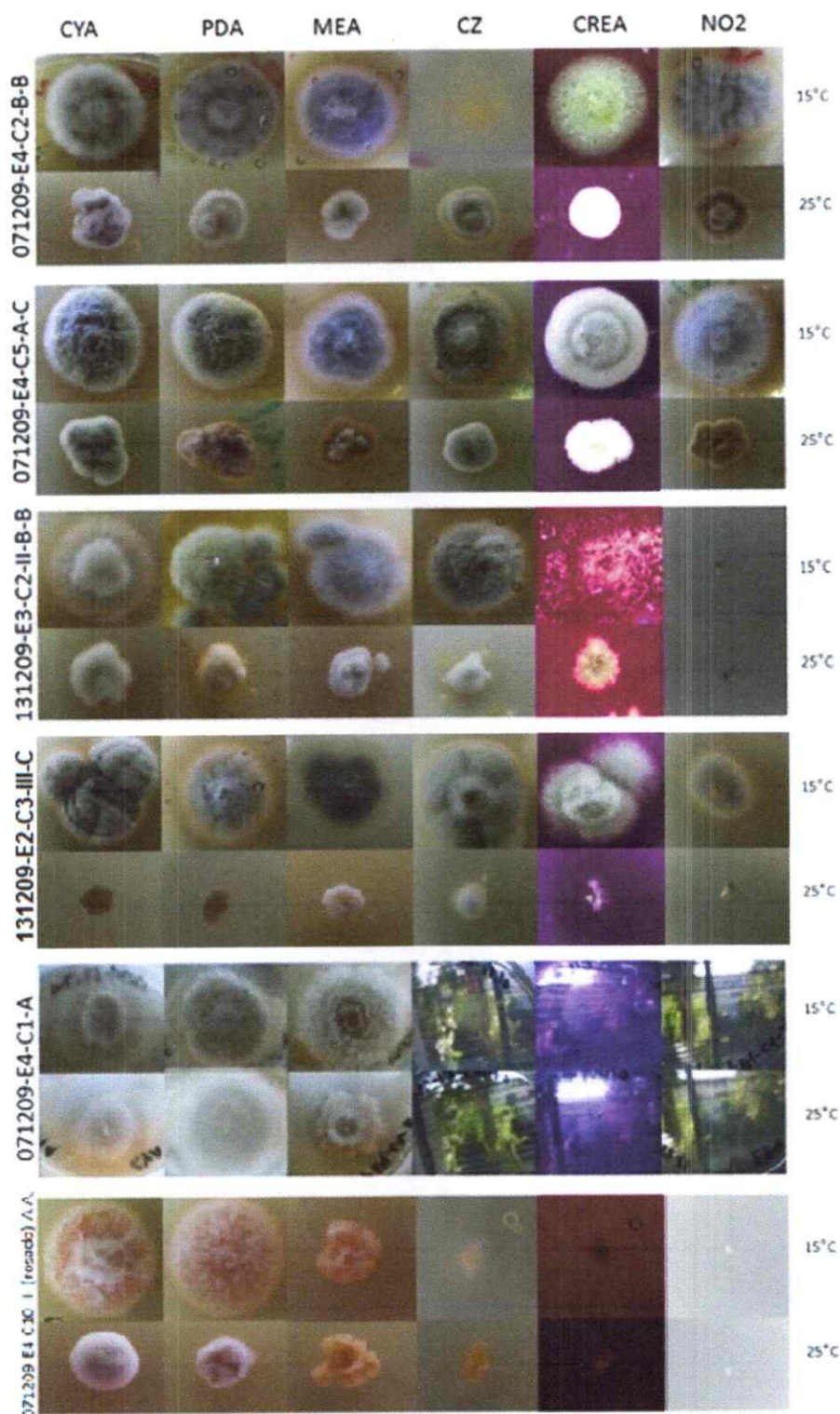


Figura 7. Ensayos morfológicos de grupo Fungal sp. De la clase Leotiomycetes, ejemplo de los aislados identificados como Fungal sp. GU004207.1: 071209-E4-C2-B-B

B presenta morfología distinta en medio CZ a 15°C, 071209-E4-C5-A-C presenta colonias tupidas y redondas en todos los medios, 131209-E3-C2-II-B-B presenta morfología distinta en medio CREA y no presenta crecimiento en NO₂. Uno de los aislados identificados como Fungal GU004206.1: 131209-E2-C3-III-C presenta colonias pequeñas a 25°C y crece en medio NO₂ sólo a 15°C. De la clase Sordariomycetes, el aislado Fungal sp. GU166501.1 denominado 071209-E4-C1-A y un ejemplo de los aislados identificados como Uncultured fungus GQ999410.1, denominado 071209-E4-C10-II-ROSADA-A-A.

3.2.2.2. *Geomyces*

Los datos de crecimiento, que corresponden al diámetro final de la colonia (ver detalle en Tabla IV, Anexo 2), muestran que este grupo de aislados alcanza un mayor tamaño a 15°C, con diámetros de colonia que fluctuaron entre 0,6 y 4,9 cm, mientras que a 25°C las colonias alcanzan diámetros que fluctuaron entre 0,1 y 2,1 cm. No se observó diferencias notorias en el crecimiento entre los 3 tipos de *Geomyces* encontrados.

En cuanto a la morfología a 15°C, en los medios CYA, PDA y MEA, se observó colonias redondeadas, con colores variando entre blanco, beige y grisáceo, tupidas en filamentos (en algunos casos largos y gruesos, y en otros cortos y finos) y arrugas radiales en algunas colonias. Por otro lado, los aislados crecidos a 25°C, presentaron un crecimiento más reducido, con morfología más irregular, compactas y con filamentos más cortos (Figura 8).

Al variar la fuente de nitrógeno, se observó que en el medio con nitrato (CZ) las colonias incubadas a 15°C, presentaron morfología similar a los medios mencionados anteriormente. Sólo el hongo 071209-E2-C3-A-A presentó una morfología diferente, al generar una colonia de filamentos traslúcidos. En cambio a 25°C en medio CZ, las colonias también presentaron menor crecimiento y forma irregular, como se mencionó en los medios de cultivo anteriores. En cuando al medio con creatina (CREA), tanto a 15°C como a 25°C, la mayoría de los hongos presentó un crecimiento muy distinto al

resto de los medios, variando entre filamentos traslúcidos y pequeños filamentos blancos irregulares, sin formar colonias redondeadas y compactas. La única excepción corresponde al hongo 071209-E2-C3-A-A, pues presentó colonias redondeadas y tupidas. Por otro lado, interesantemente, en el medio con nitrito (NO_2), 11 de los aislados no pudieron crecer, a ninguna de las dos temperaturas de incubación; 14 aislados pudieron crecer en este medio sólo a 15°C , y sólo 4 aislados lograron crecer en este medio, en ambas temperaturas. En este medio, las colonias que lograron crecer son redondeadas, con colores variando entre blanco, rosado o gris.

En el grupo de los aislados identificados como *Geomyces sp* JN630629.1 se observó un comportamiento muy interesante. Tres hongos colorearon el agar rosado en medio PDA y MEA a 15°C : 131209-E2-C5-II-A-A, 131209-E2-C5-II-D-B y 131209-E2-C5-II-D-A; y el hongo 131209-E2-C5-II-E-B coloreó el agar rosado en los medios PDA, MEA y CZ a 15°C .

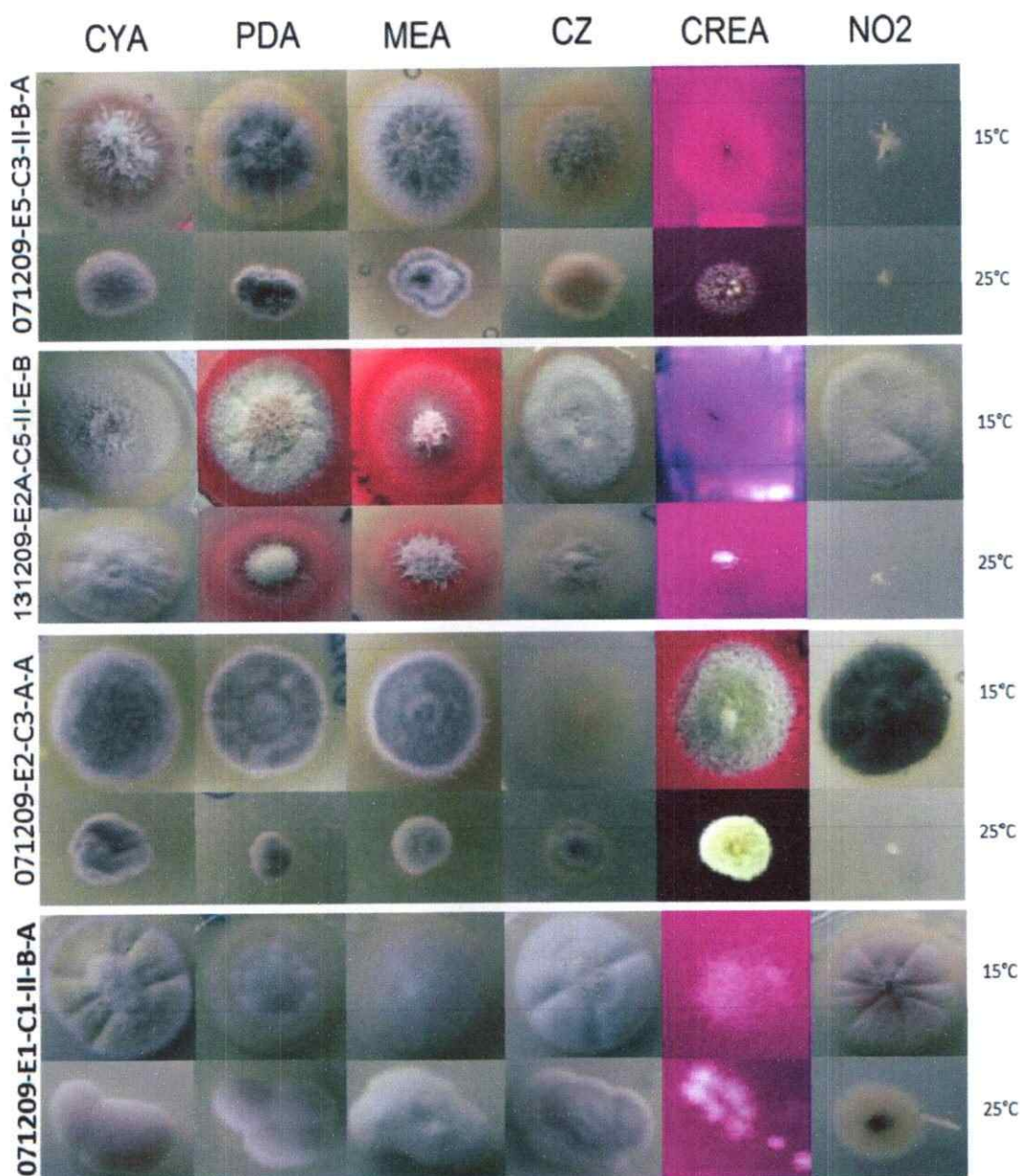


Figura 8. Ensayo morfológico grupo *Geomyces*. Se presentan cuatro ejemplos, ilustrando las variaciones en el crecimiento en todos los medios. Los aislados 071209-E2-C3-A-A y 131209-E2-C5-II-E-B están clasificados como *Geomyces* sp. JN630629.1 Se puede observar que 071209-E2-C3-A-A presenta diferencias en el crecimiento en medio CZ y CREA y que el hongo 131209-E2-C5-II-E-B presenta coloración rosada en medio PDA y MEA. El aislado 071209-E5-C3-II-B-A está identificado como *Geomyces pannorum* DQ189227.1 y 071209-E1-C1-II-B-A está identificado como *Geomyces pannorum*. GU212398.

3.2.2.3 *Pseudeurotium* sp.

Este grupo de hongos presentó un crecimiento similar en ambas temperaturas. El tamaño de las colonias fluctuó entre 2,3 y 3,1 cm de diámetro a 15°C y entre 0,9 y 3,4 cm de diámetro a los 25°C. Todos los hongos fueron capaces de crecer en los medios CYA, PDA, MEA, CZ y CREA en ambas temperaturas. En los medios CYA, PDA y MEA, se observaron colonias redondeadas, de color café-beige, planas, con filamentos muy cortos, características que variaron según el medio de cultivo y la temperatura, observándose en algunos casos arrugas radiales. La morfología de las colonias en CZ y CREA varió considerablemente, pues se observaron colonias formadas por filamentos delgados y traslúcidos. En cuanto al medio NO₂, sólo la cepa 071209-E5-C2-II-B-B logró crecer en este medio a 25°C (Figura 9).

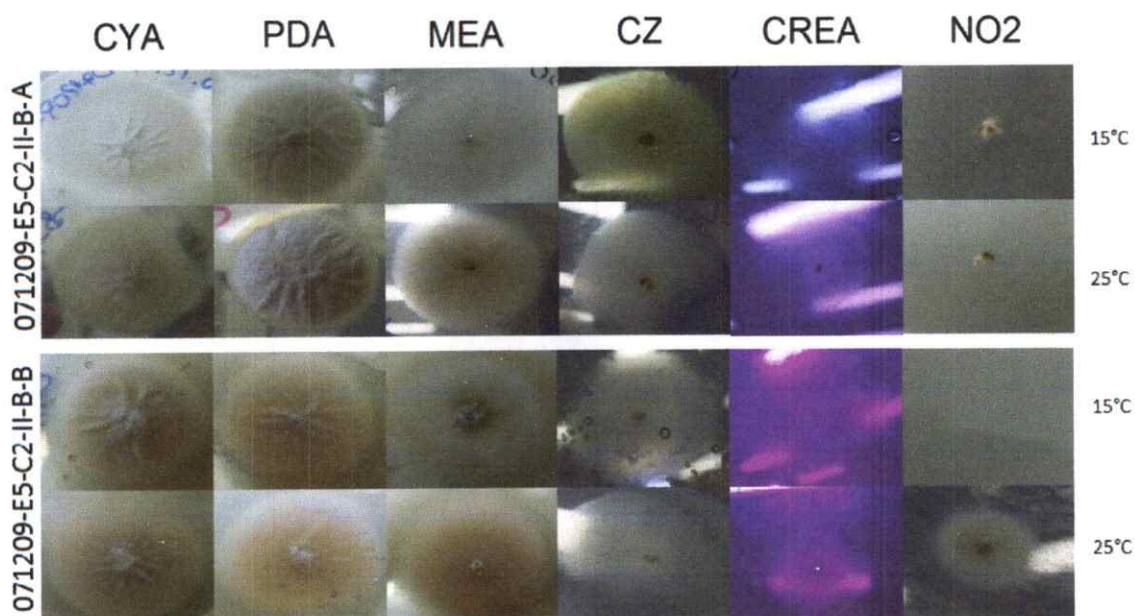


Figura 9. Ensayo morfológico grupo *Pseudeurotium* sp. Se presentan dos hongos: 071209-E5-C2-II-B-A que no presenta crecimiento en medio NO₂ a ninguna temperatura, y 071209-E5-C2-II-B-B presenta crecimiento en este medio sólo a 25°C. En ambos casos se observa el crecimiento diferente que presentan las colonias en medio CZ y CREA.

3.2.2.4. *Thelebolus sp.*

Los 5 aislados pertenecientes al género *Thelebolus* presentaron un crecimiento mayor a 15°C, fluctuando entre 0,4 y 6,2 centímetros de diámetro en la colonia. En cambio, a 25°C se observó un crecimiento más reducido, variando entre 0,3 y 2,9 cm de diámetro. Interesantemente, dos de los aislados, correspondientes a 071209-E4-C4-A y 071209-E6-C1-A-A, no presentaron crecimiento en ningún medio a 25°C.

En cuanto a su morfología en los medios CYA, PDA y MEA en ambas temperaturas, las colonias se observaron de color beige-verdoso, planas, en algunos casos variando a colonias redondeadas y en otros, más filamentosas (Figura 10). En los medios donde varía la fuente de nitrógeno con nitrato, creatina y nitrito (CZ, CREA y NO₂ respectivamente) las colonias se observaron como de filamentosos translúcidos. Cabe resaltar que todos los hongos presentaron crecimiento en medio con nitrito (NO₂) a 15°C y 3 de los aislados presentaron crecimiento en este medio a 25°C.

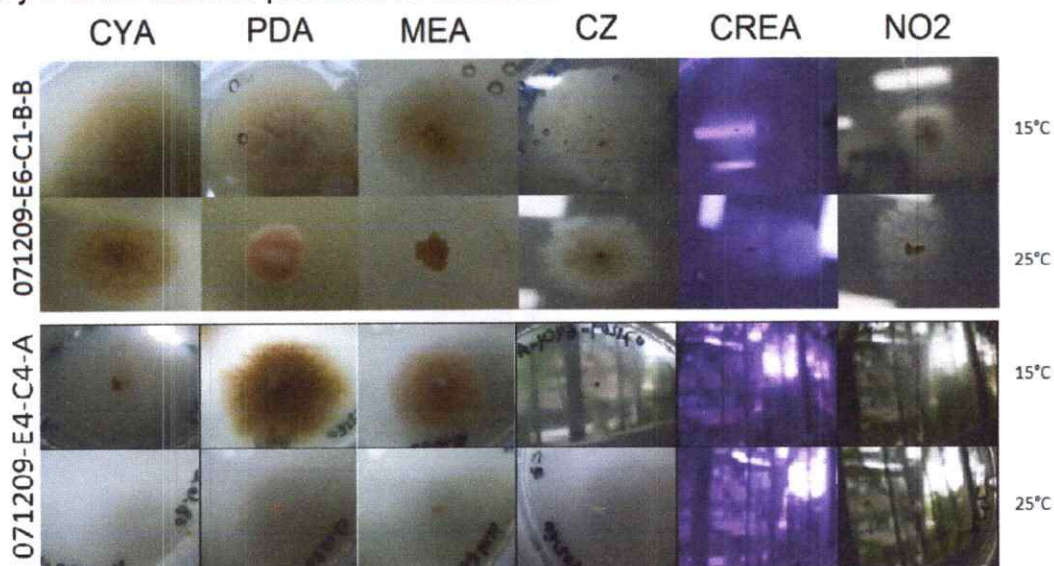


Figura 10. Ensayo morfológico grupo *Thelebolus sp.* Se presentan los hongos 071209-E6-C1-B-B y 071209-E4-C4-A. En ambos casos se observa mayor crecimiento a 15°C, y el crecimiento casi nulo de la cepa 071209-E4-C4-A a 25°C. Se aprecia la morfología de las colonias en los medios CZ, CREA y NO₂, como filamentosos translúcidos.

3.2.2.5. *Aspergillus versicolor*

El único aislado identificado como *Aspergillus versicolor* (071209-E6-C2-D-GPY-B-D), presentó mayor crecimiento a 25°C, con valores de diámetro de colonia que variaron entre 2,9 y 4,4 cm. En cambio, a 15°C, el diámetro de las colonias fluctuaron entre 1,2 cm y 1,7 cm. La coloración de las colonias se vió afectada por la temperatura de incubación: a 15°C presentaron color blanco-grisáceo, mientras que a 25°C presentaron color verdoso, indicando su estado de esporulación (Figura 11). Por otro lado, el aislado fue capaz de crecer en todos los medios de cultivo, y en ambas temperaturas, formando colonias tupidas en filamentos, incluyendo el medio NO₂.

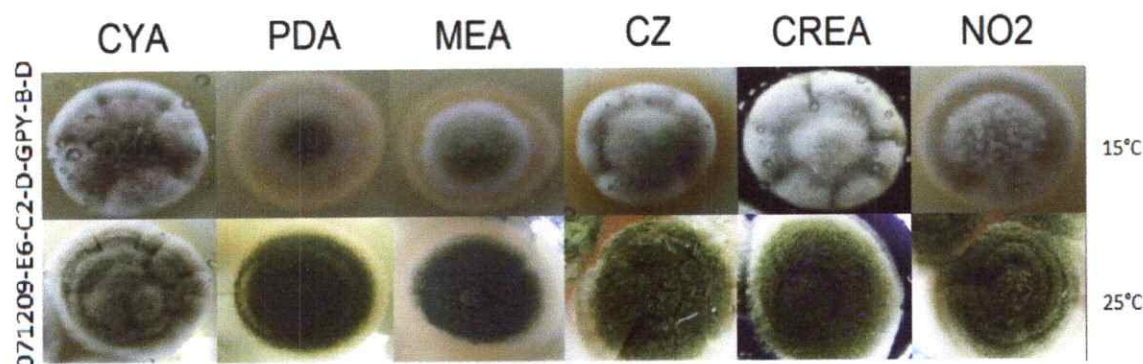


Figura 11. Ensayo morfológico de 071209-E6-C2-D-GPY-B-D (*Aspergillus versicolor*). Las colonias presentan coloración diferente, indicio de su estado de esporulación, que varía de acuerdo con la temperatura de incubación.

3.2.2.6. *Penicillium*

El crecimiento de este grupo de hongos fue ligeramente mayor a 15°C, fluctuando entre 0,3 y 4,9 cm de diámetro de colonia, mientras que a 25°C, el diámetro de las colonias varió entre 0,5 a 3,5 cm. La mayoría de los hongos de este género, lograron crecer en todos los medios a las dos temperaturas ensayadas, con excepción del hongo 071209-E1-C1-III-B que no creció en medio con nitrito (NO₂) a 25°C.

Se observaron colonias de color verde oscuro, muy polvosas y de formas irregulares, esto debido a que se encontraban en estado de esporulación (Figura 12). En cuanto al medio con creatina (CREA), sólo los hongos 071209-E1-C1-III-B y 071209-E4-C1-III-A lograron cambiar el pH del medio, acidificándolo (bajo pH 5,2). Esto se puede apreciar debido a que el medio posee un indicador de pH, púrpura de bromocresol, que se torna de color amarillo al disminuir el pH.

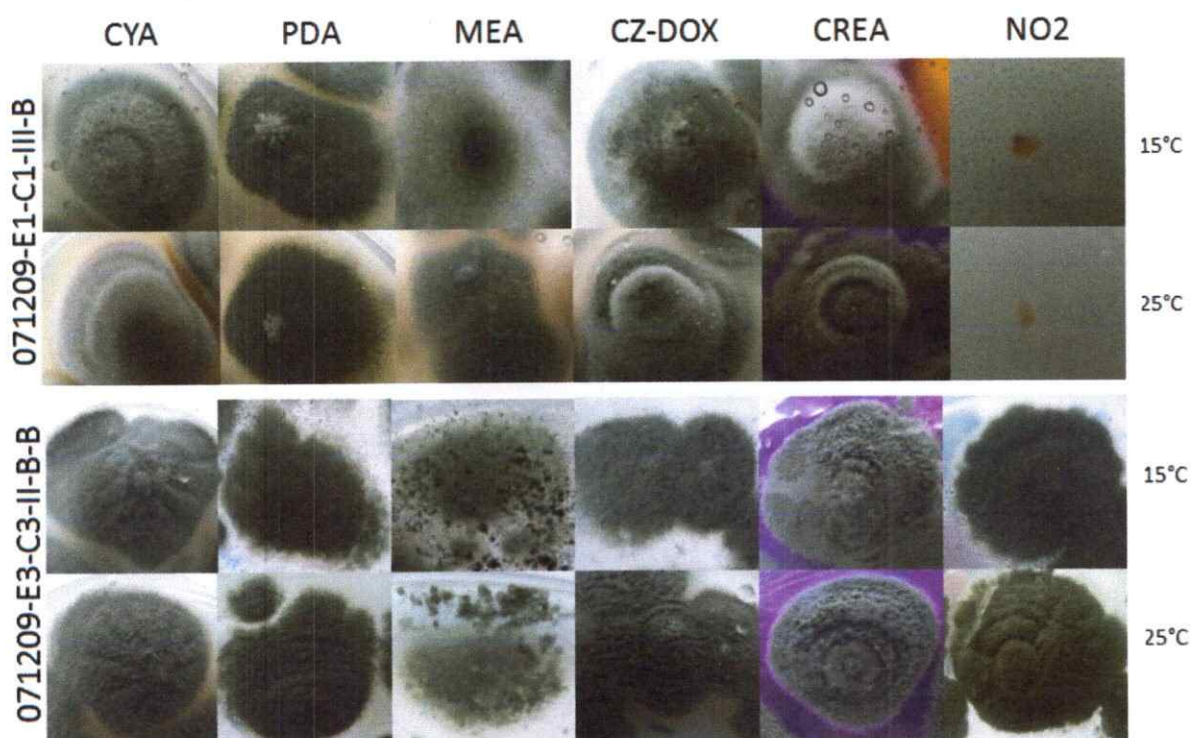


Figura 12. Ensayo morfológico grupo *Penicillium*. Se presentan como ejemplo las cepas fúngicas 071209-E1-C1-III-B, identificada como *Penicillium polonicum* y 071209-E3-C3-II-B-B, identificada como *Penicillium commune*. Ambos crecen como colonias irregulares, de color verde. La principal diferencia se ve en el crecimiento en medio NO₂ y el cambio de pH en medio CREA.

3.2.2.7. *Cladosporium*

El grupo de los hongos identificados bajo el género de *Cladosporium*, presentaron crecimiento similar en ambas temperaturas. A 15°C se registró un diámetro de colonia

que fluctuó entre 2,0 y 4,8 cm, mientras que a 25°C el diámetro de colonia varió 1,4 y 4,2 cm de diámetro. Con respecto a su crecimiento en los distintos medios de cultivo, todos estos hongos fueron capaces de crecer en todos los medios, observándose colonias de color verde oscuro, redondeadas, polvosas, presentando arrugas radiales, principalmente a 25°C (Figura 13).

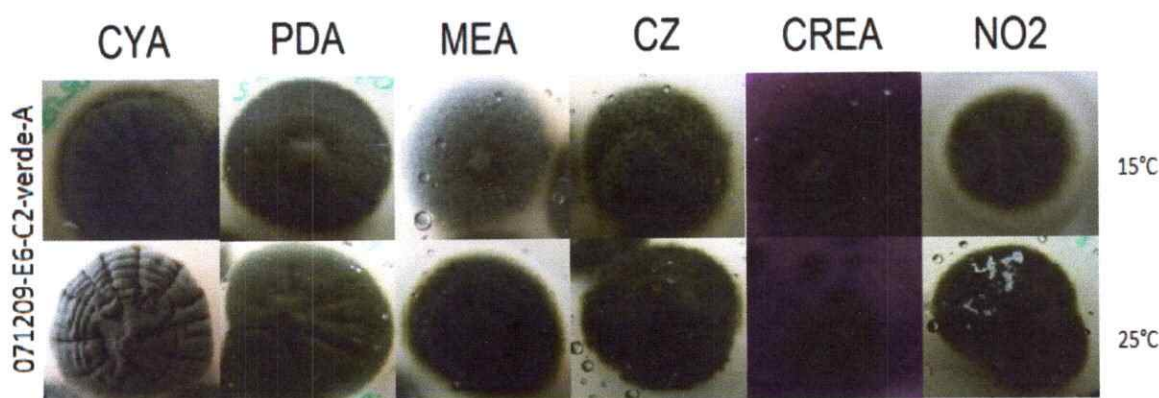


Figura 13. Ensayo morfológico grupo *Cladosporium*. Se presenta como ejemplo la cepa 071209-E6-C2-VERDE-A, donde se aprecia la diferencia en el crecimiento de las colonias en medio NO₂ en ambas temperaturas.

3.2.2.8. *Aureobasidium pullulans*

El único aislado identificado como *Aureobasidium pullulans* (071209-E6-C2-A-A-A) presentó crecimiento similar en ambas temperaturas de incubación. El diámetro de las colonias varió entre 1,8 y 4,5 cm de diámetro de la colonia a 15°C, mientras que a 25°C el diámetro de la colonia varió entre 2,8 y 4,1 cm. Las colonias fueron capaces de crecer en todos los medios, menos en medio NO₂ en ninguna temperatura. Se observaron colonias planas, anaranjadas, de forma irregular. El mayor crecimiento se observó en el medio MEA a 15°C, con un diámetro de 4,5 cm (Figura 14).

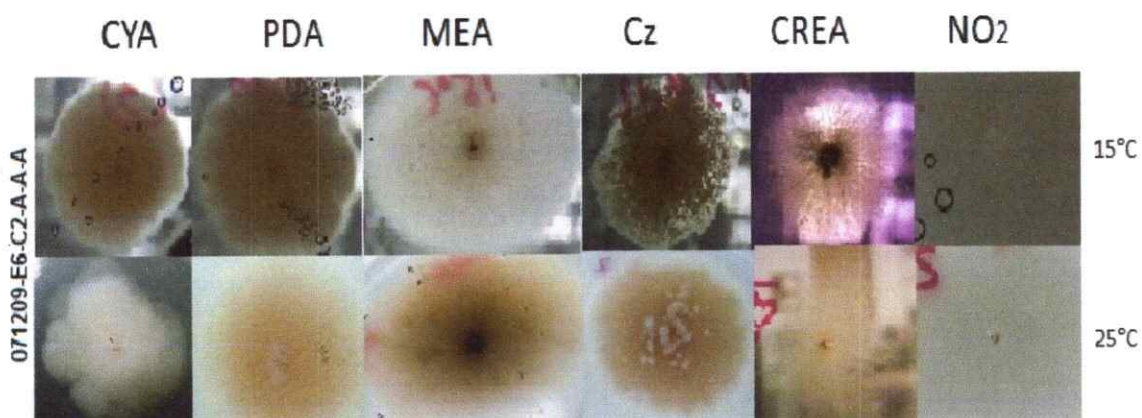


Figura 14. Ensayo morfológico cepa 071209-E6-C2-A-A-A (*Aureobasidium pullulans*). En ambas temperaturas, la cepa mantiene su coloración y morfología. Se observa también la ausencia de crecimiento en medio NO₂ en ambas temperaturas.

3.2.2.9. *Phoma herbarum*

El único aislado identificado como *Phoma herbarum* (131209-E4-C1-III-GPY-B) presentó mayor crecimiento de las colonias a 15°C en todos los medios, variando entre 4,4 y 6.5 cm de diámetro de colonia, mientras que a 25°C el diámetro de la colonia varía entre 3,2 y 5,6 cm. En cuanto a su morfología, se apreciaron las colonias de color café-verdoso en los medios CYA, PDA y MEA. En CZ su apariencia fue más filamentosa con un ligero tinte rosado. En CREA el crecimiento fue de filamentos traslúcidos; y finalmente, no se observó crecimiento en medio NO₂ a ninguna temperatura (Figura 15).

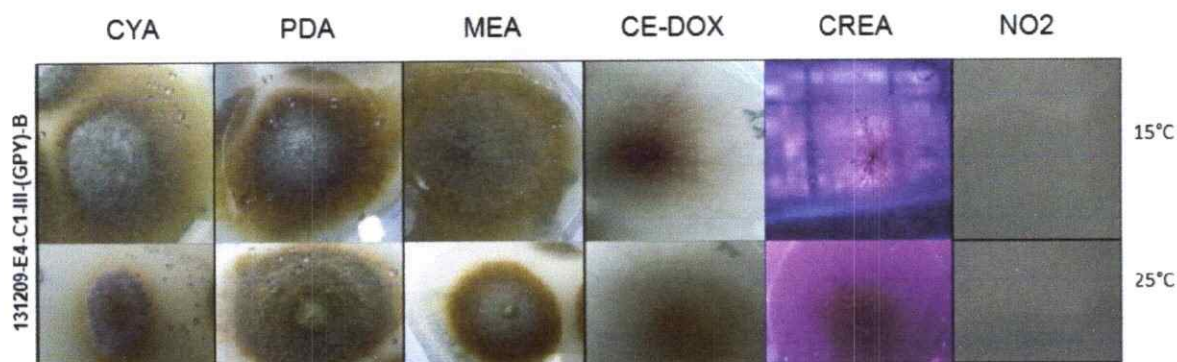


Figura 15. Ensayo morfológico cepa 131209-C4-CI-III-GPY-B (*Phoma herbarum*)
Se observa la diferencia en la morfología de las colonias entre los medios CYA, PDA, MEA y los medios CZ y CREA.

3.2.2.10. *Epicoccum*

Las colonias de aislados fúngicos identificados como *Epicoccum sp.* fueron los que presentan mayor crecimiento entre todos los grupos estudiados. El diámetro de las colonias fluctuó entre 1,9 y 7,0 cm a 15°C, mientras que a 25°C, el diámetro de las colonias fluctuó entre 2,8 cm y 7,3 cm.

Los hongos fueron capaces de crecer en casi todos los medios, con excepción del medio NO₂, pues ningún hongo presentó crecimiento a ninguna temperatura en este medio. Se observaron colonias grandes, de forma irregular, planas, con variadas tonalidades que variaron desde el café oscuro, rojo y blanco. En el medio CREA las colonias se observaron como filamentos rojizos, sin formar una colonia compacta. Todos los hongos estudiados secretaron pigmentos al agar: 071209-E2-C4-PDA-A-A, 071209-E2-C4-PDA-A-C y 071209-E2-C4-PDA-A-E tiñeron el agar de color amarillo intenso, en medio CYA y PDA y MEA a 15°C. En cambio, 071209-E2-C4-PDA-A-B, 071209-E2-C4-PDA-C-A y 071209-E2-C4-PDA-A-D pigmentaron el agar de color rosado en los medios PDA, MEA, CZ y CYA a 15°C (Figura 16).

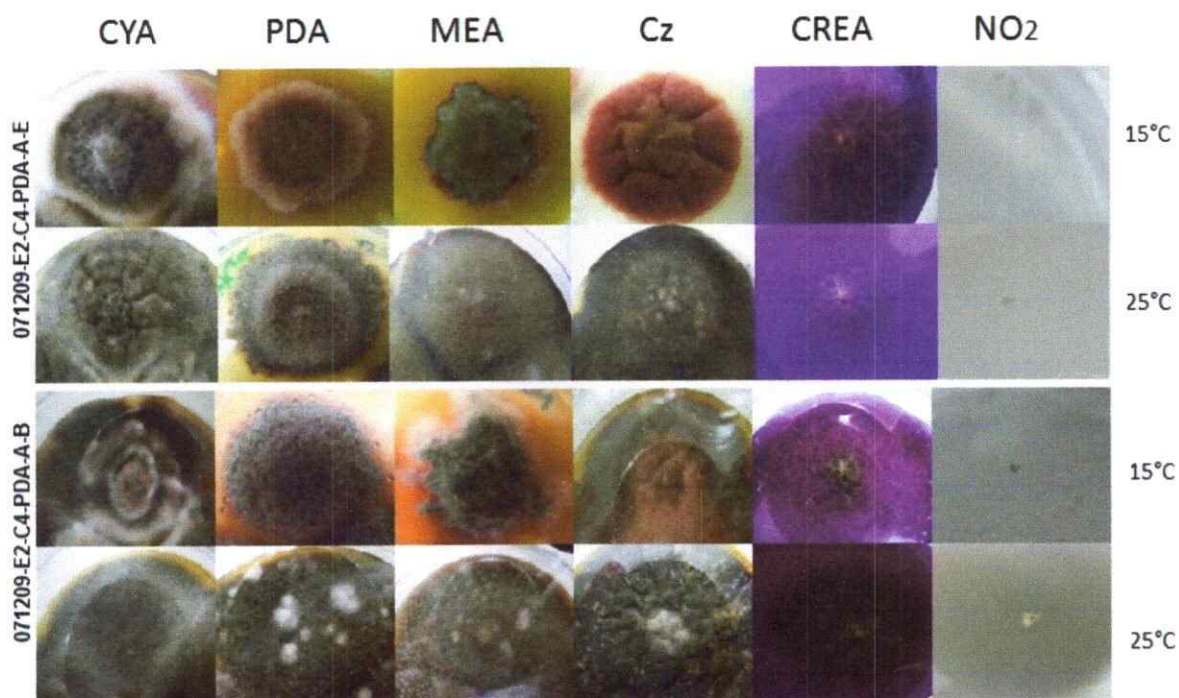


Figura 16. Ensayo morfológico grupo *Epicoccum sp.* Se presentan como ejemplo las cepas 071209-E2-C4-PDA-A-E y 071209-E2-C4-PDA-A-B, las cuales pigmentan el agar amarillo y rojizo, respectivamente. En ambos casos se observa las colonias filamentosas en medio CREA y la ausencia de colonias en medio NO₂.

3.3 Screening molecular y químico del potencial del metabolismo secundario de los hongos aislados.

Con la finalidad de estudiar el potencial del metabolismo secundario de los hongos antárticos aislados, se realizaron dos tipos de análisis. Por un lado, se realizó la detección de los genes de las enzimas PKS (Policeto sintasa) y NRPS (Sintetasa de péptidos no ribosomales) y por otro lado, se analizaron los extractos de los aislados mediante dos técnicas distintas: cromatografía de placa fina (TLC) y espectros de ^1H -RMN.

3.3.1. Detección de la presencia de genes de PKS y NRPS

Para la búsqueda de la presencia de los genes de las enzimas PKS, se utilizaron partidores degenerados que permiten amplificar dominios cetosintasa de distintas enzimas. Este corresponde a un dominio altamente conservado, sin embargo es posible identificar el dominio KS de las enzimas PKS no reductoras mediante el uso de los partidores LC1-LC2. En cambio, los partidores LC3-LC5c permiten amplificar el mismo dominio KS de las enzimas PKS reductoras.

Del total de hongos estudiados, fue posible detectar en 23 hongos (26,4%) el gen de alguna de las 2 enzimas PKS buscadas. La mayor cantidad de genes detectados corresponden a las enzimas PKS no reductoras, amplificadas con los partidores LC1-LC2, con un total de 22 hongos que las presentan en su genoma: *Geomyces* (n=8), Fungal sp. (n=6), , *Penicillium* (n=3), *Pseudeurotium* (n=2), *Epicoccum* (n=2) y *Phoma* (1).

En cambio, los genes de las enzimas PKS reductoras, amplificados con los partidores LC3-LC5, se encontraron únicamente en 5 hongos, 4 pertenecientes al género *Geomyces* y una al género *Penicillium*. Sólo el aislado 131209-E4-C10-D-A, del género *Geomyces*, presentó PKS reductoras de manera exclusiva. Los 4 hongos restantes presentaron ambos genes de las enzimas PKS en su genoma (ver Tabla III, sección 3.4).

Por otro lado, la detección de los genes de las enzimas NRPS se realizó utilizando partidores degenerados, que permiten amplificar zonas de los dominios de adenilación y tiolación de estas enzimas. En el genoma de los 87 hongos analizados, se detectó la presencia de los genes de estas enzimas en 56 hongos (64,3%), distribuidos de la siguiente forma: Fungal (n=22), *Geomyces* (n=19), *Penicillium* (n=4), *Thelebolus* (n=4), *Epicoccum* (n=3), *Pseudeurotium* (n=2), *Cladosporium* (n=1) y *Aspergillus* (n=1). Los únicos géneros que no presentan NRPS son: *Aureobasidium* y *Phoma* (ver Tabla III, sección 3.4).

3.3.2. Análisis de los extractos por cromatografía de placa fina (TLC)

Tras el proceso de fermentación de los 87 aislados fúngicos, se obtuvo los caldos de fermentación para la posterior extracción con solventes orgánicos y generación de los correspondientes extractos. A cada uno de estos, se le realizó un análisis de TLC empleando una mezcla de elución (ver materiales y métodos). Los perfiles de metabolitos secretados correspondientes a cada grupo fúngico se detallan a continuación.

3.3.2.1. Fungal sp.

En el análisis de todos los extractos correspondientes a los hongos denominados como Fungal sp, (bajo las distintas técnicas de revelado utilizadas), se puede apreciar que existen numerosos compuestos, en algunos casos muy similares entre ellos, tanto en coloración como en su migración. Sin embargo, también es posible encontrar compuestos particulares en uno o pocos extractos, revelando que cada aislado fúngico posee un perfil de metabolitos distinto.

En las placas eluidas al 10% Metanol (Figura 17), tras ser reveladas con luz UV de 365 nm, se observaron bandas de tonalidades celestes en la mayoría de los extractos, con diferentes Rf. Destaca una banda celeste que se encuentra en todos los extractos, cuyo Rf fluctúa entre 0,35 y 0,47. Dichas bandas pueden corresponder a compuestos comunes entre todos los aislados fúngicos. El único extracto que no posee estas bandas corresponde a 071209-E2-C1-A-A (1), que presenta bandas de color café-rojizo, destacando entre los demás extractos ensayados.

Al analizar el perfil de compuestos secretados por los aislados pertenecientes a la clase Leotiomycetes (extractos 1 al 25 Figura 17), se observan algunas diferencias. Los 25 aislados identificados como Fungal sp. GU004207.1 presentan mayor variedad de bandas en sus extractos, encontrándose en 14 extractos compuestos de coloración azul con Rf que fluctúa entre 0,37 y 0,47.

Por otro lado, se observan bandas exclusivas y llamativas en algunos extractos. En el extracto de 071209-E4-C3-A-A (7) se observa una banda rosada con Rf de 0,55, que no se encuentra en ningún otro extracto. Además, se observan dos bandas de coloración amarilla en 071209-E6-C4-II-(PDA)-C-B (23) y 131209-E3-C2-II-A-A-2 (25),

con Rf de 0,3 y 0,47 respectivamente. En los extractos de 071209-E2-C1-A-A (1) y 071209-E6-C4-II-GPY-B-B (21) observamos una banda roja con Rf de 0,73 y 0,42 respectivamente.

En los 5 extractos de los aislados identificados como Fungal sp. GU004206.1 (extractos del 26 al 31, Figura 17), eluidos a 10% metanol, sólo se observan bandas de color celeste, sin presentar algún perfil de compuestos llamativo.

Por otro lado, al analizar el perfil de compuestos secretados por los 4 aislados pertenecientes a la clase Sordariomycetes, se observan las bandas celestes comunes a todos los extractos, mencionadas anteriormente (extractos 32 al 35, Figura 17). No se observa mayor diversidad de compuestos, sólo destaca el perfil de compuestos del extracto 071209-E4-C10-II-ROSADA-A-A(34) pues presenta una banda celeste con gran intensidad, con Rf de 0,89.

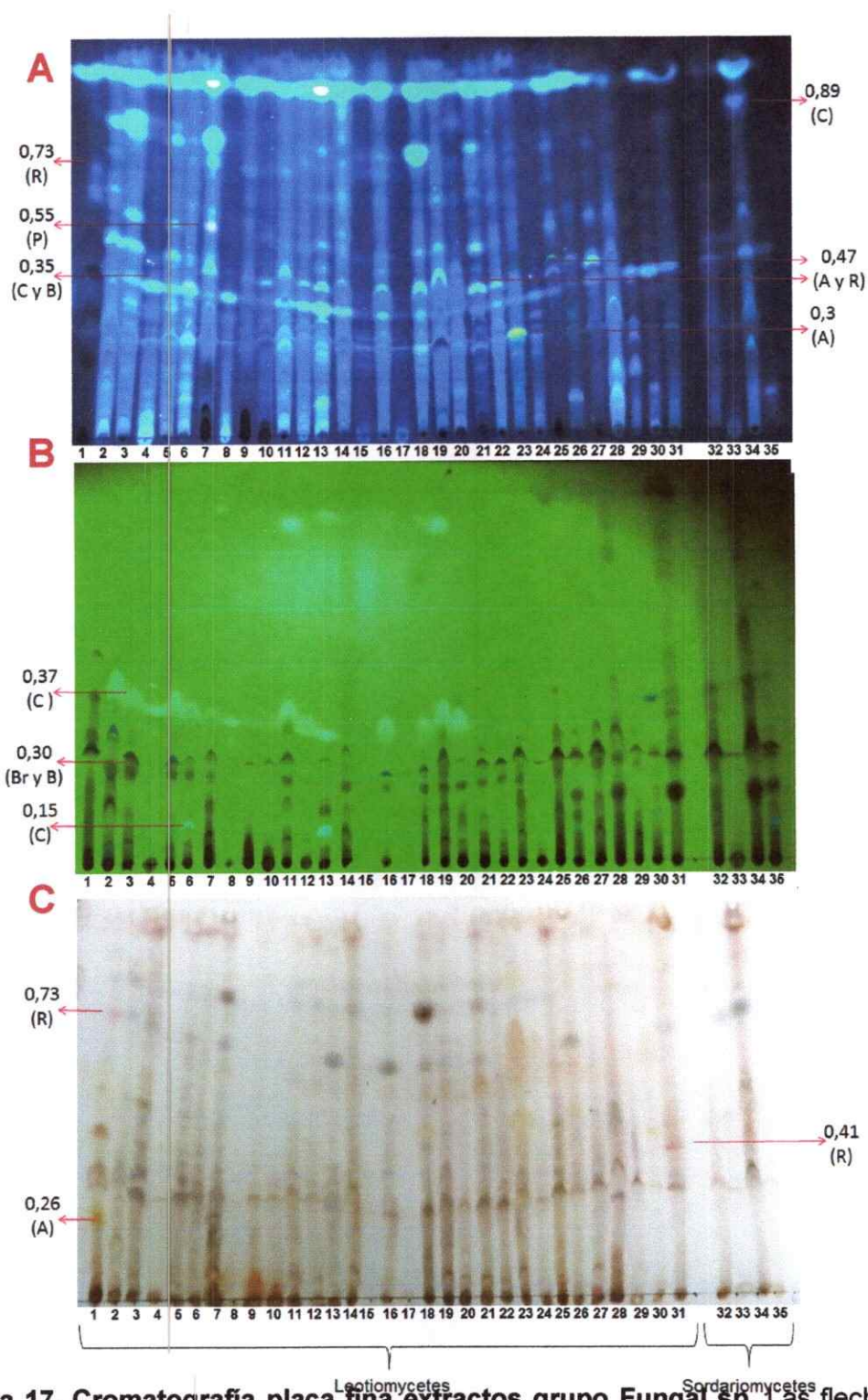


Figura 17. Cromatografía placa fina extractos grupo Fungal sp. Las flechas rojas indican compuestos llamativos con su respectivo Rf. El revelado en **A** Luz UV 365 nm, en **B** Luz UV 254 nm y en **C** reactivo de Liebermann. R (rojo), P (rosado), C(celeste), B (azul), A (amarillo), Br (café).

Al visualizar las placas bajo luz UV 264 nm, se observan bandas de color celeste intenso en 14 extractos, con Rf 0,37 y 0,47, las cuales fueron identificadas como bandas azules por el método de revelación anterior. Así también, se ven bandas de color café con Rf de 0,3 compartidas por todos de los extractos. Superpuesta con esta misma banda, es posible encontrar en 19 extractos una banda de color azul con el mismo Rf. Dichos compuestos pueden corresponder a metabolitos secretados de manera general por los hongos de este grupo. En 5 extractos, correspondientes a: 071209-E4-C2-C-D (6), 071209-E4-C5-A-C (13), 131209-E3-C2-II-B-A (26), 131209-E2-C3-III-C (30) y 131209-E4-C1-III-C (35), se observa una banda de color celeste con Rf de 0,15. Esta banda es encontrada tanto en extractos de hongos de la clase Leotiomycetes como Sordariomycetes y puede corresponder a compuestos específicos de cada aislado.

El uso de luz UV permite identificar compuestos capaces de absorber la luz de una determinada longitud de onda y emitir en otra longitud mayor. Compuestos aromáticos, insaturados o compuestos conjugados son visualizados como bandas negras u oscuras cuando son irradiadas con luz UV 254 nm. Al visualizar las placas bajo luz UV 365 nm también se observan compuestos aromáticos o compuestos con varios dobles enlaces conjugados. Moléculas como antraceno y coroneno, compuestos de varios anillos aromáticos y enlaces dobles conjugados, emiten fluorescencia de color celeste a 365 nm. Por otro lado, compuestos con menor número de anillos aromáticos pero con largas cadenas insaturadas emiten fluorescencia de color azul. Compuestos de coloración amarilla pueden incluir aldehídos, ácidos carboxílicos asociados a anillos bencénicos. Bandas de color rosado pueden indicar compuestos con anillos aromáticos

con funciones nitrogenadas como pirroles. Bandas rojizas pueden corresponder a derivados de triptófano.

Al revelar las placas con el reactivo de Lieberman, la mayoría de los compuestos reacciona tornándose de color café-rojizo. En las placas eluidas al 10% metanol, destaca en el extracto de 071209-E2-C1-A-A (1), una banda roja de de Rf 0,73 y una banda amarilla con Rf de 0,26, que no se encuentran en los demás extractos. Así también se ve una banda rojiza con Rf 0,42 en el extracto de 131209-E2-C3-III-C-B (31). Este tipo de reactivo es un revelador general de enlaces carbono-carbono, indicando principalmente compuestos tipo triterpenos (café-rojizo) y esterorides (azul-verdoso).

3.3.2.2. *Geomyces*

Al analizar en conjunto todos los extractos correspondientes a los hongos clasificados como *Geomyces*, se puede apreciar que si bien poseen compuestos que son comunes en casi todos ellos, también presentan compuestos particulares de uno o pocos extractos, haciendo que cada aislado tenga un perfil metabólico distinto al resto.

En la placa eluida al 10% Metanol, tras ser revelada con luz UV 365 nm, se observan bandas difusas, de tonalidad celeste, que aparecen en la mayoría de los extractos. Destaca una banda de color celeste encontrada en todos los extractos, cuyo Rf fluctúa entre 0,35 y 0,42. Estas bandas, encontradas también en los aislados Fungal sp., pueden corresponder a un compuesto frecuente en los hongos filamentosos.

El revisar el perfil de metabolitos secretados por los 8 aislados identificados como *Geomyces pannorum* GU212398.1 (extractos 1 al 8, Figura 18), se ve que cada uno posee bandas únicas, tanto en coloración como en migración. Destaca el extracto de

071209-E1-C1-II-GPY-A (5) pues presenta una banda de color rosada con Rf de 0,54. Estos compuestos deben ser características exclusivas de ciertas cepas de la especie *Geomyces*. Por otro lado, al revisar el perfil de los 19 extractos provenientes de los hongos identificados como *Geomyces sp.* JN630629 (extractos del 9 al 27 Figura 18), se observan numerosas bandas que distinguen a cada extracto entre sí, con extractos que poseen mayor cantidad de compuestos que otros. Destaca el extracto DE 071209-E2-C3-B-A (16) pues posee dos bandas rosadas con Rf de 0,48 y 0,55. Así también, es llamativo el extracto de 131209-E2-C2-II-C-B (20) por poseer una banda de suave color verde con Rf de 0,55 y el extracto de 131209-E4-C10-II-D-B (26) que posee bandas de color negro de Rf 0,32.

El perfil de compuestos secretados por el aislado 071209-E5-C3-II-B-A (28) identificado como *Geomyces pannorun* DQ189227, presenta pocas bandas. Además de los compuestos comunes, destaca un compuesto de coloración azul de Rf 0,48.

Al revelar la placa con luz de 254 nm, se observan bandas de color café en 20 extractos, cuyo Rf es de 0,27. Este correspondería a un compuesto común a todos los aislados. Superpuesto con esta banda café, se encuentran compuestos con bandas, delgadas y anchas, de color azul, en 18 extractos con Rf 0,32. Estas bandas podrían corresponder a compuestos comunes para estos hongos. Destacan 4 extractos correspondientes a 071209-E2-C3-B-A (16), 131209-E2-C5-II-A-A (21), 131029-E2-C5-II-D-A (22) y 071209-E5-C3-II-B-A (28), con bandas anchas de color celeste intenso, con Rf de 0,47. Tres de ellos están identificados como *Geomyces sp.* y uno como *Geomyces pannorum*. También es llamativo encontrar solo en los extractos de 131209-E4-C11-II-A-C (8), 071209-E2-C2-A-A (11) y 131209-E2-C5-II-A-A (22) una banda celeste con Rf de 0,14.

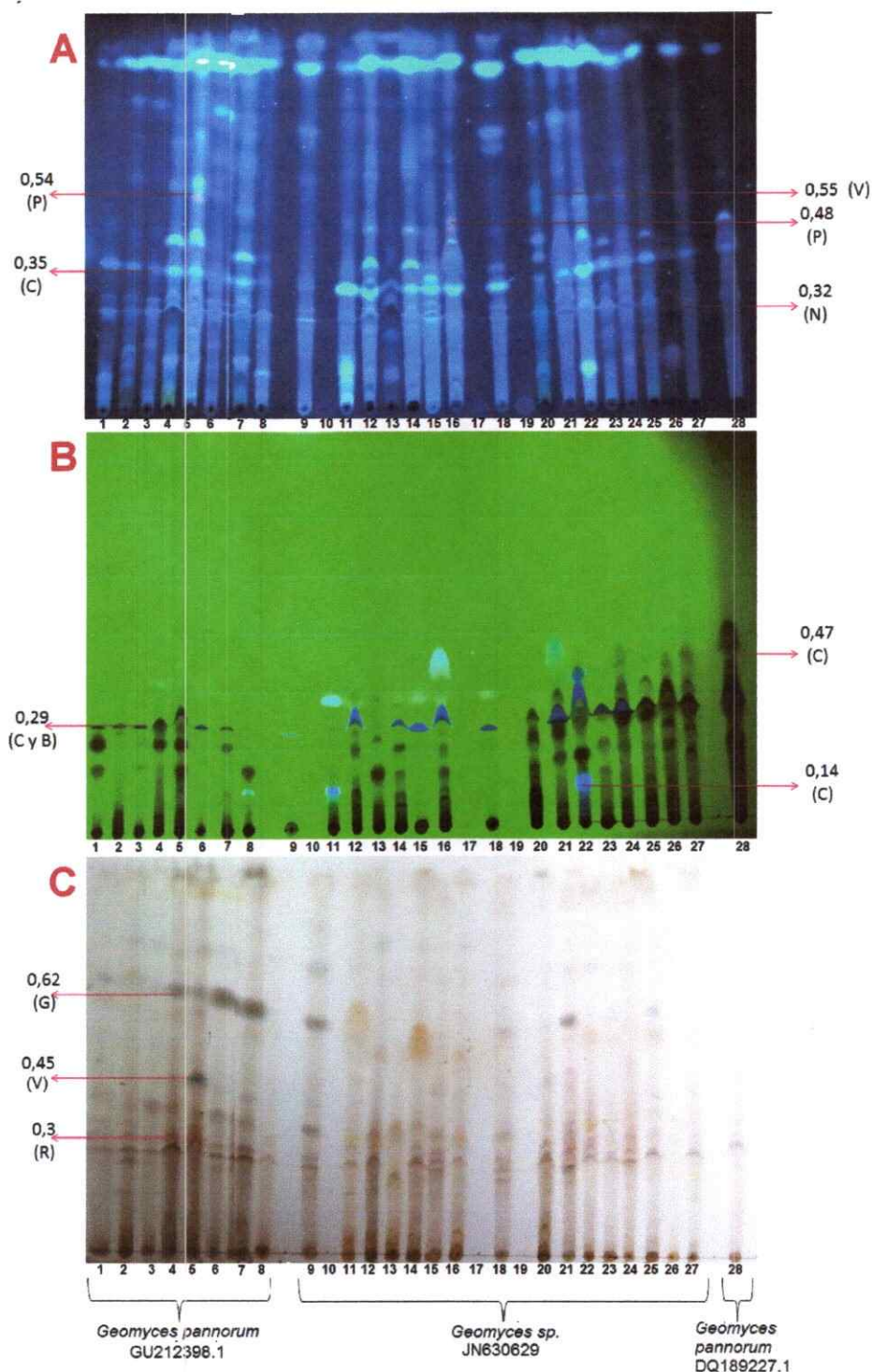


Figura 18. Cromatografía placa fina de los extractos grupo *Geomyces sp.* Se indica con flecha rojas las bandas más características con su respectivo RF. En **A** revelado con Luz UV 365 nm, **B** en revelado con Luz UV 254 nm y en **C** revelado con reactivo de Lieberman. R (rojo), P (rosado), G (gris), C (celeste), B (azul), V (verde).

Tras revelar las placas con el reactivo de Lieberman, se observa que la mayoría de los compuestos se torna de color café. Destacan 5 extractos, correspondientes a 071209-E1-C1-II-PDA-B-A (4), 071209-E1-C1-II-GPY-A (5), 071209-E1-C1-II-GPY-D (6), 131209-E4-C11-II-A-B (7) y 071209-E2-GPY-A (9), pues presentan una banda de color gris con Rf de 0,62. Los cinco primeros extractos están clasificados como *Geomyces pannorum* GU212398 y el último como *Geomyces sp.* Este puede tratarse de un compuesto secretado por hongos de la especie *Geomyces pannorum*.

Particularmente, destacan los extractos de 071209-E1-C1-II-PDA-B-A (4) y 071209-E1-C1-II-GPY-A (5), pertenecientes a hongos identificados como *Geomyces pannorum* GU212398, pues se encuentran dos bandas rojas con Rf de 0,3 y adicionalmente, en el extracto 5 se encuentra una banda de color verde con Rf de 0,45. Estas bandas son únicas para estos extractos.

En los extractos de 071209-E2-GPY-B (10), 071209-E2-C3-C-A (17) y 071209-E3-C2-II-C-GPY-A (18), la concentración de extracto es tan baja, que no es posible observar ningún tipo de compuesto.

3.3.2.3. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Thelebolus*, *Pseudeurotium*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Phoma* y *Epicoccum*

Debido a que son pocos extractos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Thelebolus*, *Pseudeurotium*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Phoma* y *Epicoccum*, se procedió a analizar los extractos en una misma placa de TLC (Figura 19).

Al analizar estos extractos en conjunto, es posible observar compuestos que son compartidos por todos los extractos, independiente del género al que pertenezcan.

En la placa eluida al 10% Metanol, tras ser revelada con luz UV 365 nm, se observa una banda celeste ancha en todos los extractos cuyo Rf es 0,42. Adicionalmente, se observa una banda de coloración rosada-celeste en todos los extractos con Rf de 0,31. Esto pareciera ser una característica compartida por los extractos de todos los extractos de los hongos estudiados, incluidos los hongos del género *Geomyces* y el grupo Fungal sp..

Al analizar los 4 extractos de hongos del género *Penicillium*, se observa un perfil de compuestos único para cada uno, destacando bandas difusas de tonalidades rosadas. Destaca el extracto de 071209-E1-C1-III-C (2) que posee una banda de color negro con Rf de 0,32.

El extracto del hongo 071209-E6-C2-GPY-B-D (5), identificado como *Aspergillus versicolor*, muestra varios compuestos de color celeste, destacando un compuesto rojizo difuso con Rf de 0,23.

El perfil de compuestos secretados por los 5 hongos identificados como *Thelebolus sp*, muestra bandas muy similares entre sí, destacando los extractos de 071209-E6-C1-A-A (9) y 071209-E6-C1-B-A (10) pues poseen una banda azul difusa con Rf de 0,56 y una banda rosada con Rf de 0,37, respectivamente.

Los extractos pertenecientes a los 3 hongos identificados como *Pseudeurotium sp*. presentan un perfil de compuestos muy similares, sin poder diferenciar compuestos llamativos.

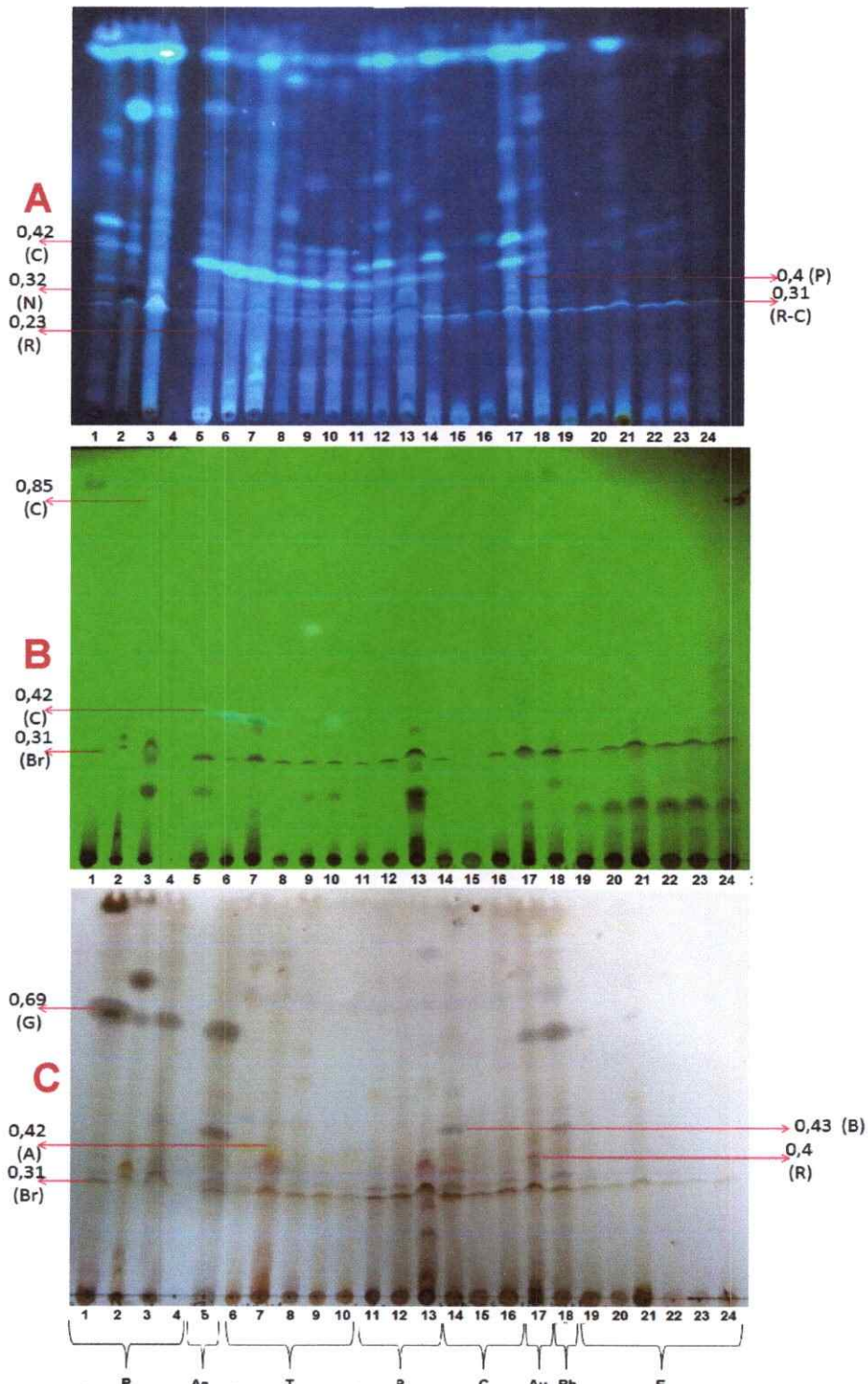


Figura 19. Cromatografía placa fina de 8 géneros. El revelado aplicado, en **A)** Luz 365nm, en **B)** Luz 354 nm y **C)** reactivo de Lieberman. **Claves:** P (*Penicillium*) As (*Aspergillus versicolor*), T (*Thelebolus* sp). Ps (*Pseudeurotium* sp) C (*Cladosporium* sp), Au (*Aureobasidium pullulans*), PH (*Phoma herbarum*), E (*Epicoccum* sp.) R(rojo), A(amarillo), Br (café), B (azul), G (gris), C (celeste), N (negro), P (rosado).

En el perfil de compuestos de los 3 extractos de los hongos identificados como *Cladosporium sp.* se observa una diferencia entre el extracto de 071209-E4-C8-A-C (14), que posee una banda celeste de Rf de 0,45, y los extractos de 071209-E6-C2-VERDE-A (15) y 071209-E6-C2-VERDE-B (16) que no la poseen. Cabe destacar que estos dos últimos tienen un perfil de compuestos idéntico.

El extracto del hongo 071209-E6-C2-A-A-A (18), identificado como *Aureobasidium pullulans* presenta varias bandas de color rosado con Rf que van de 0,32 a 0,42.

El extracto del hongo 131209-E4-C1-III-GPY-B (19), identificado como *Phoma herbarum*, posee bandas de color celeste, con diferentes Rf.

En el perfil de los 6 extractos pertenecientes a los hongos identificados como *Epicoccum sp.*, se observa poca cantidad de compuestos, pues se encontraban en baja concentración, encontrándose un perfil muy similar entre todos.

Al revelar las placas con luz 254 nm, se observa bandas celestes de Rf 0,42 en 7 extractos: 071209-E6-C2-GPY-B-D (5), 071209-E4-C4-A (6), 071209-E4-C4-B-B (7), 071209-E6-C1-A-A (8), 071209-E6-C1-B-A (9), 071209-E6-C1-B-B (10), y 071209-E6-C2-A-A-A (17). de los géneros *Aspergillus*, *Thelebolus*, *Pseudeurotium* y *Aureobasidium*. Se observa también bandas café en todos los extractos, con un Rf de 0,31. En el extracto de 071209-E1-C1-III-C (2) se observa una banda celeste de Rf 0,85.

Al revelar las placas con el reactivo de Lieberman, se observan que las bandas encontradas en todos los extractos con Rf de 0,31 se tornan de color café. Así también, las bandas azules de Rf 0,42 encontradas en 8 extractos, se tornan de color amarillo. Este efecto del reactivo no fue observado en los demás extractos (incluyendo

los extractos de Fungal sp y *Geomyces*), sugiriendo que se trata de un compuesto distinto al encontrado en los demás extractos estudiados.

En el extracto de 131209-E4-CI-III-GPY-B (18), correspondiente a *Phoma herbarum*, se observan 3 bandas rojizas de Rf 0,79; 0,63 y 0,5. Se observan también bandas oscuras de Rf 0,69, en los extractos de los hongos identificados como *Aspergillus* y *Penicillium*. En el extracto de 071209-E4-C8-B-C (14), correspondiente al género *Cladosporium*, se observa una banda azul oscura de Rf 0,43.

Destaca también una banda anaranjada de Rf 0,35 en el extracto de 071209-E1-C1-III-C (2) identificado como *Penicillium polonicum*. También se distingue una banda celeste en el extracto de 071209-E4-C4-A (6) con Rf de 0,45 y una banda de color rojizo en el extracto de 071209-E4-C-B-B (7) con Rf de 0,36, ambos extractos provenientes de hongos identificados como *Thelebolus sp*. Estos compuestos marcarían una diferencia con el resto de los extractos de este grupo.

3.3.3. Análisis ^1H -RMN

Los productos naturales poseen funciones orgánicas que presentan señales características en un espectro de ^1H -RMN. Dichas señales características pueden ser identificadas en los extractos de hongos, pudiendo determinar preliminarmente el tipo de funciones orgánicas presentes y por lo tanto, si el extracto contiene metabolitos secundarios que ameriten posteriores estudios químicos.

Las señales que pueden dar indicios sobre la presencia de compuestos de interés se encuentran entre 4-6 ppm, donde se pueden encontrar las funciones orgánicas como alcoholes, dobles enlaces, éteres, ésteres; también entre 6 y 8 ppm donde se

encuentran los anillos aromáticos y los fenoles, entre 5 y 8 ppm se encuentran las amidas, cercano a 8-9 ppm encontramos los aldehídos y más desplazado, entre 9,5 y 13 ppm, encontramos los ácidos carboxílicos. Dichas señales serán analizadas en los espectros.

3.3.3.1. Fungal sp.

Al analizar los espectros de ^1H -RMN de los extractos de los hongos clasificados bajo la clase Leotiomycetes, se observa que un grupo de 18 espectros presentan señales de interés. Este grupo se subdivide en dos subgrupos. El subgrupo I corresponde a 12 espectros que presentan señales entre 11 y 12 ppm y varias señales entre 6 y 9 ppm, como se observa en la Figura 20 A. Los 6 espectros del subgrupo II sólo presentan numerosas señales entre 6 y 9 ppm como se muestra en la Figura 20 B. Con respecto al resto de los espectros de este grupo taxonómico, se observan pocas señales en torno al 6,5 y 7,5 ppm, como se muestra en la Figura 20 C.

Por otro lado, al analizar los 4 espectros provenientes de los hongos clasificados bajo la clase Sordariomycetes, se observa que sólo el espectro del extracto de 071209-E4-C1-A presenta señales de interés entre 6,6 y 9,7 ppm (Figura 20 D). En cambio, los 3 espectros restantes, presentan algunas señales en torno a 6,5 ppm.

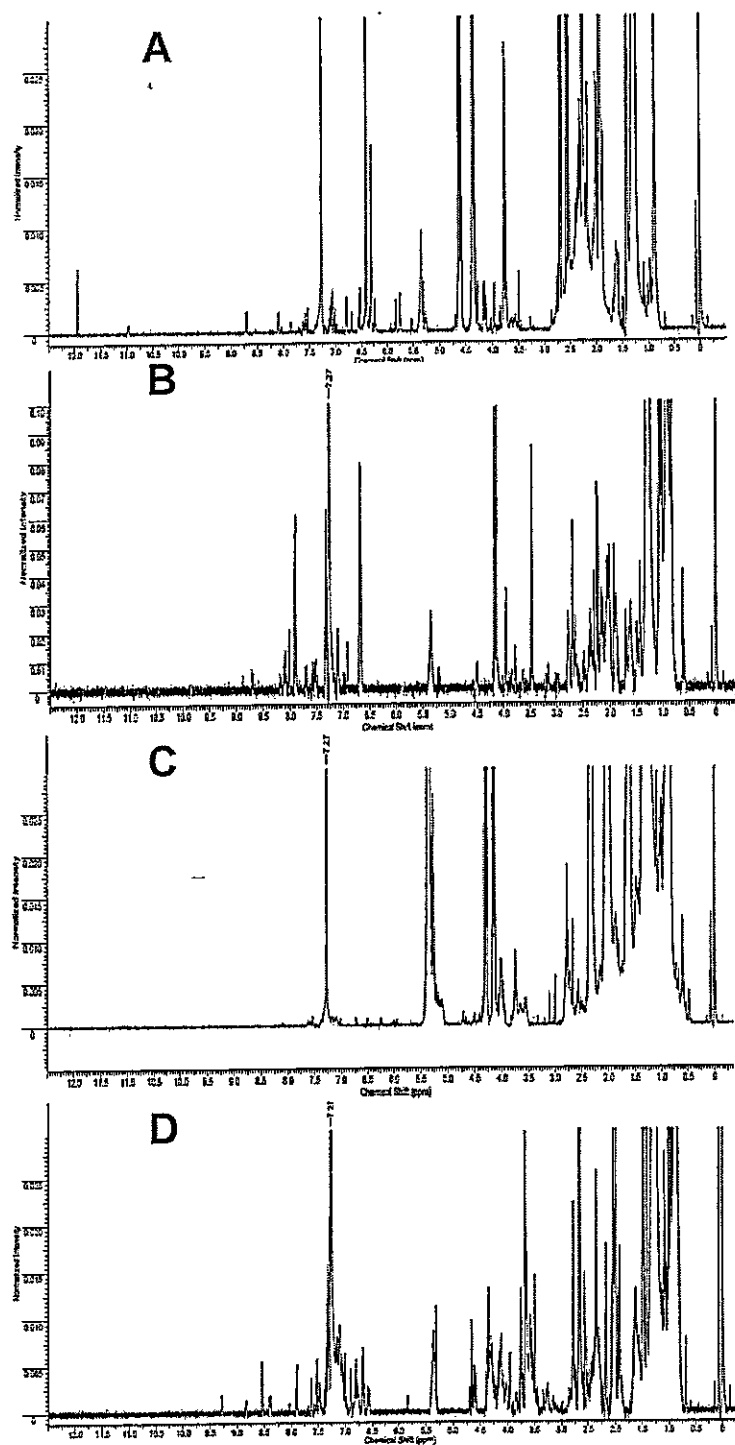


Figura 20. Espectros $^1\text{H-RMN}$ de grupo Fungal sp. En A) 071209-E2-C1-A-A ejemplo de espectro del subgrupo I B) 071209-E4-C10-II-VERDE-B-B ejemplo de espectro del subgrupo II, C) 131209-E2-C3-III-C-B espectro sin señales de interes y D) 071209-E4-C1-A ejemplo espectro clase Sordariomycete.

3.3.3.2. *Geomyces*

En los espectros de ^1H -RMN de los extractos correspondientes a los aislados del género *Geomyces*, se aprecian señales comunes para todos los espectros.

Tras el análisis de los espectros, fue posible encontrar grupos de espectros que presentan tanto señales de interés como similitudes entre sí. El grupo I, compuesto de 9 espectros, presentan señales de interés en torno a 11 ppm, y además 3 señales entre 7-9 ppm, como se muestra en los espectros A y B de la Figura 21. Estos 9 espectros pertenecen a los siguientes hongos: 071209-E2-GPY-A, 071209-E2-GPY-B, 071209-E2-C2-B-A, 071209-E2-C3-B-A, 071029-E2-C3-C-A, 071209-E3-C2-II-A-A-GPY, 131209-E2-C5-II-D-A, 131209-E2-C5-II-D-B y 131209-E4-C10-D-B, los cuales fueron identificados como *Geomyces sp.*.

Por otro lado, se encuentra el grupo II compuesto de 3 espectros, que presentan señales de interés similares entre 8-12 ppm. Estos espectros pertenecen a los extractos de los hongos 071209-E1-C1-II-B-B- AMARILLO, 071209-E1-C1-III-GPY-D, 071209-E5-C3-II-B-A (Figura 21 C). Estos hongos fueron identificados como *Geomyces pannorum*.

Adicionalmente, se encontró una señal de interés en el espectro del extracto del hongo 131029-E4-C11-II-A-B, entre 11,5 y 12 ppm, como se muestra en la Figura 21 D. El resto de los extractos no presentan ninguna señal de interés.

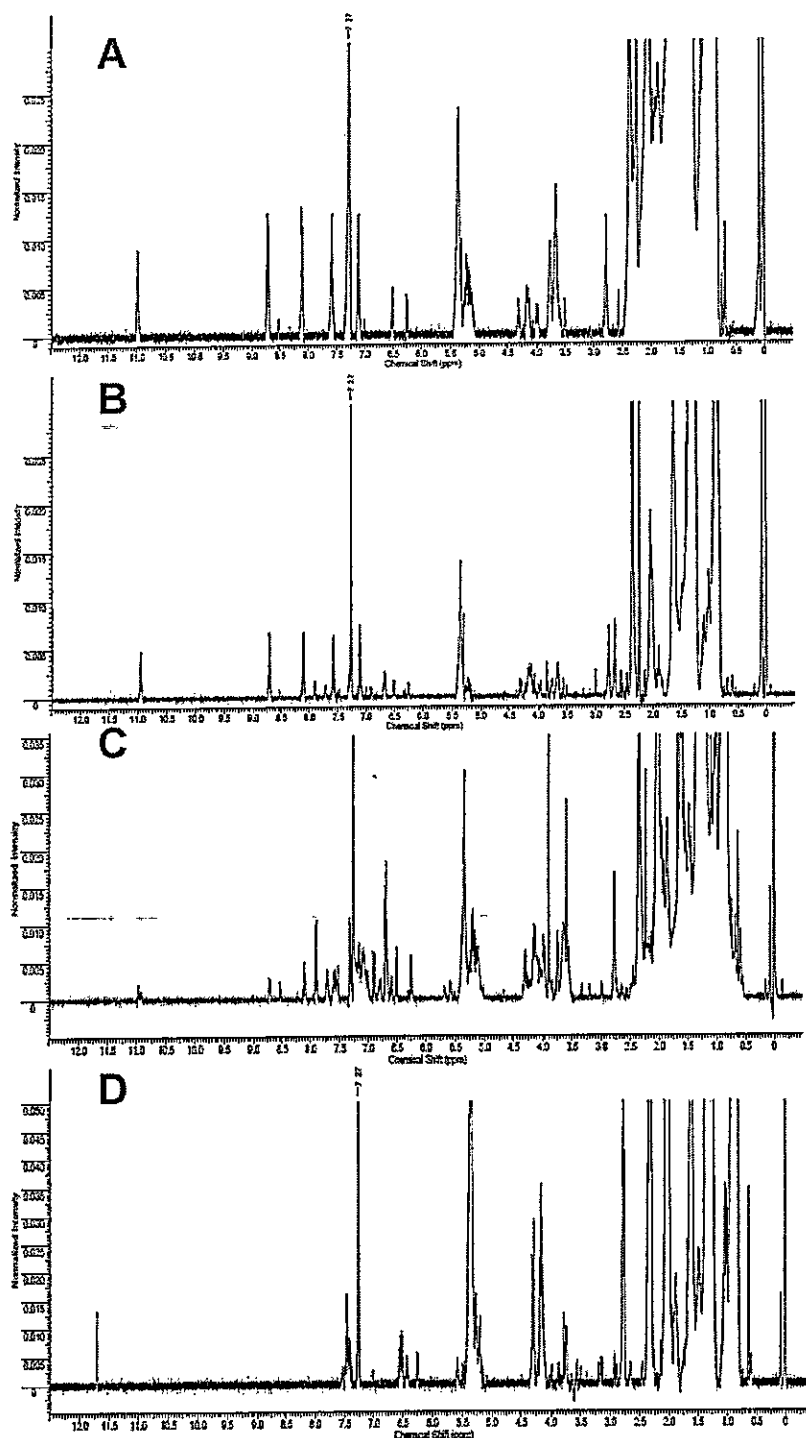


Figura 21. Espectro de ¹H-RMN de hongos del género *Geomyces*. Se observan las señales 5,5 ppm y 4,5-3,5 ppm compartidas por todos los extractos. A) 071209-E2-GPY-A y B)071209-E3-C2-II-A-A-GPY son ejemplos de espectros del grupo I, C)071209-E1-C1-B-B-AMARILLO ejemplo de espectro del grupo II, D)131209-E4-C11-II-A-B espectro con señal de interés.

3.3.3.3. *Pseudeurotium* sp.

Al analizar los espectros ^1H -RMN de los 3 aislados identificados como *Pseudeurotium* sp, se observa que todos los espectros presentan señales comunes entre 1 y 3 ppm, 3,5 y 4,5 ppm y en 5,5 ppm (Figura 22). El espectro de 071209-E5-C2-II-B-A presentan señales en 11, y numerosas señales entre 7 y 9 (Figura 22 A). En cambio, el espectro del hongo 071209-E4-C2-B-A presenta también numerosas señales entre 7 y 9 ppm similares al anterior, pero carece de señales en 11 ppm. Por último, el espectro del hongo 071209-E5-C2-II-B-B, presentan señales entre 7 y 7,5, presentando un perfil distinto al resto y con menor interés (Figura 22 B).

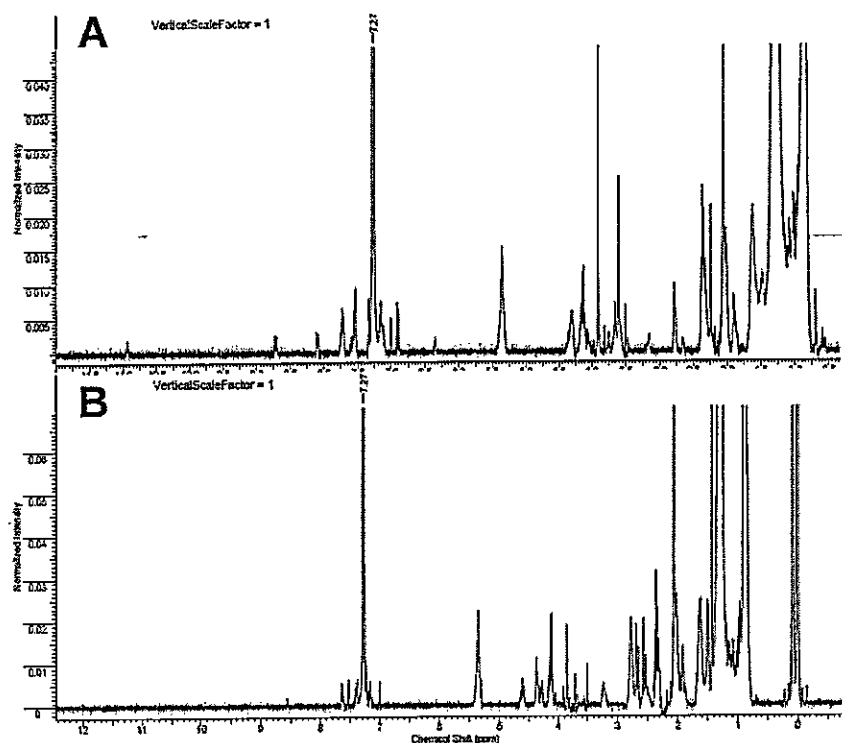


Figura 22. Espectro ^1H -RMN de hongos del género *Pseudeurotium* Se muestran los dos tipos de espectros encontrados. En A) 071209-E5-C2-II-B-A se visualizan señales entre 7 y 9 ppm, y la señal en 11 ppm. En B) 071209-E5-C2-II-B-B se observan pocas señales en 7-7,5 ppm, mostrando un perfil distinto al anterior

3.3.3.4. *Thelebolus* sp.

Al analizar los 5 espectros de los extractos de este grupo, se observan señales entre 7 y 8,5 ppm en todos ellos. Adicionalmente, se observan señales entre 6 y 7 ppm y una característica señal en 5,5 ppm. El patrón de señales entre los extractos es muy similar, destacando el extracto de 071209-E6-C1-A-A, que presenta una pequeña señal en 11 ppm, no encontrada en los demás espectros (Figura 23 A).

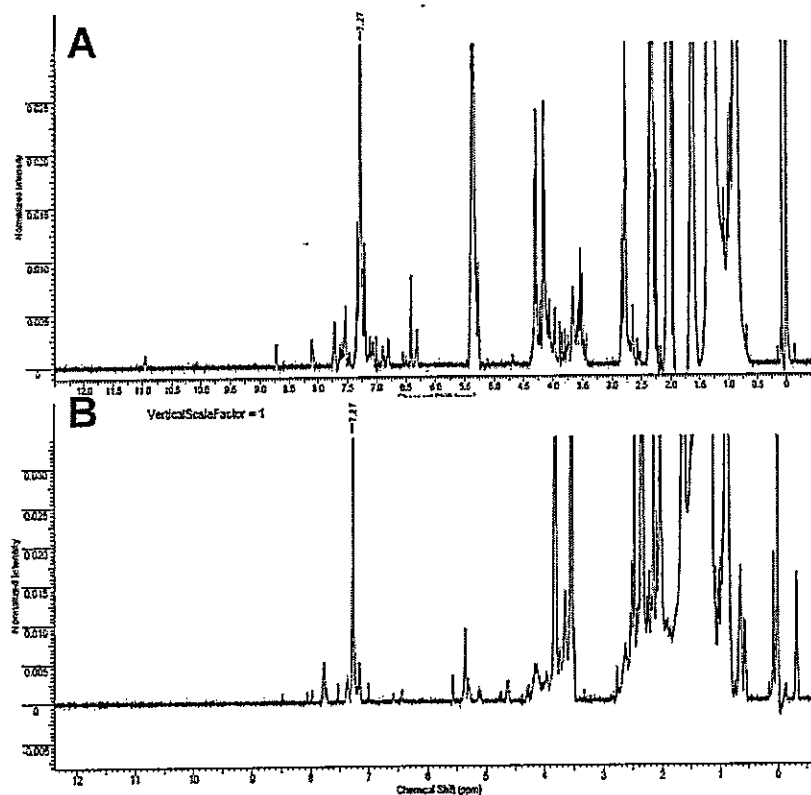


Figura 23. Espectros ¹H-RMN extractos género *Thelebolus* sp. Se presentan dos ejemplos de espectros, que muestran las señales similares que comparten. En A) 071209-E6-C1-A-A, donde se observa una señal en 11 ppm y B) 071209-E4-C4-A.

3.3.3.5. *Aspergillus versicolor*

El espectro del aislado 071209-E6-C2-D-GPY-B-D presenta, además de las señales comunes entre todos los espectros, varias señales entre 7,5 y 9,5. Presenta además 2 señales muy cercanas a 6,5 ppm (Figura 24).

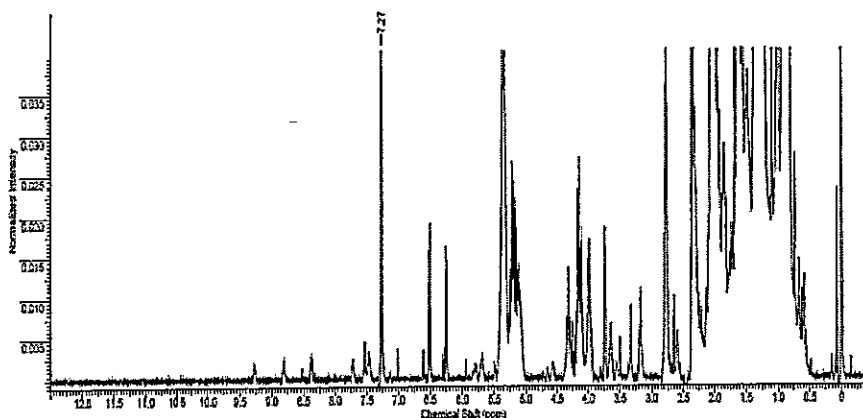


Figura 24. Espectro de ^1H -RMN del extracto de 071209-E6-C2-D-GPY-B-D (*Aspergillus versicolor*)

3.3.3.6. *Penicillium*

Al analizar los 4 espectros de los hongos identificados como *Penicillium*, se observan espectros variados. Tres de los espectros comparten algunas señales como las encontradas entre 6,25 y 6,5 ppm, las cuales también se encontraron en el género *Aspergillus*. Sólo el espectro del hongo 071209-E1-C1-III-B, (Figura 25 A), no presenta las señales descritas, encontrándose sólo dos señales en 5,5 ppm. Mientras que el espectro del hongo 071209-E3-C3-II-B-B presenta, además de las señales en 6 ppm, desplazamientos químicos entre el 7 y 9 ppm (Figura 25 B).

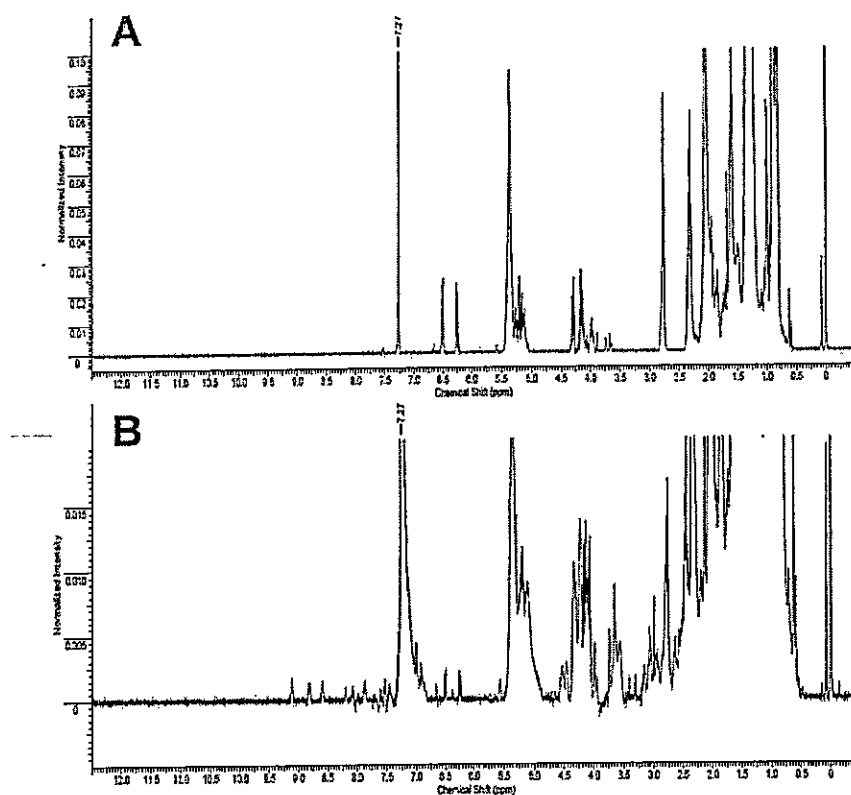


Figura 25. Espectros ^1H -RMN grupo *Penicillium*. Se presentan dos espectros A) 071209-E1-C1-III-B identificado como *Penicillium polonicum* sin señales de interés y B) 071209-E3-C3-II-B-B identificado como *Penicillium commune*, -donde se observa las diferentes señales entre 7-9 ppm.

3.3.3.7. *Cladosporium* sp

Los 3 espectros de este grupo no presentan señales de interés. Las únicas señales presentes son las señales comunes entre todos los hongos: entre 1 y 3 ppm, 3,5-4,5 pmm, y la señal en 5,5 ppm (Figura 26)

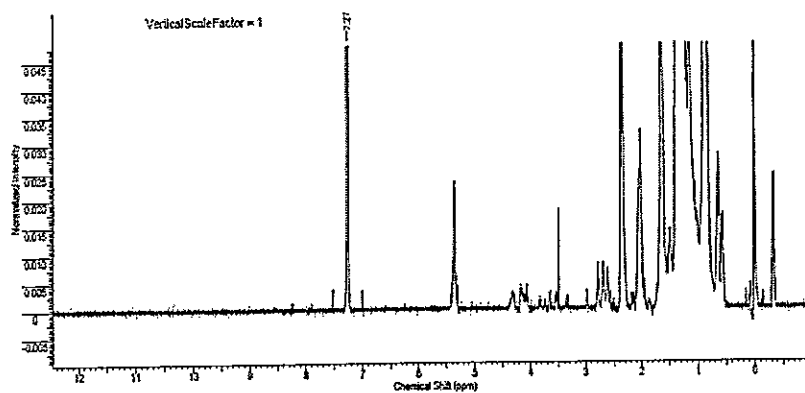


Figura 26. Espectro ^1H -RMN del grupo *Cladosporium sp.* Se presenta el espectro del extracto de 071209-E6-C2-VERDE-A No se observan señales de interés.

3.3.3.8. *Aureobasidium pullulans*

El extracto de 071209-E6-C2-A-A-A no presenta señales superiores a 7. Se ven dos picks en 6,5, al igual que en los espectros de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (Figura 27).

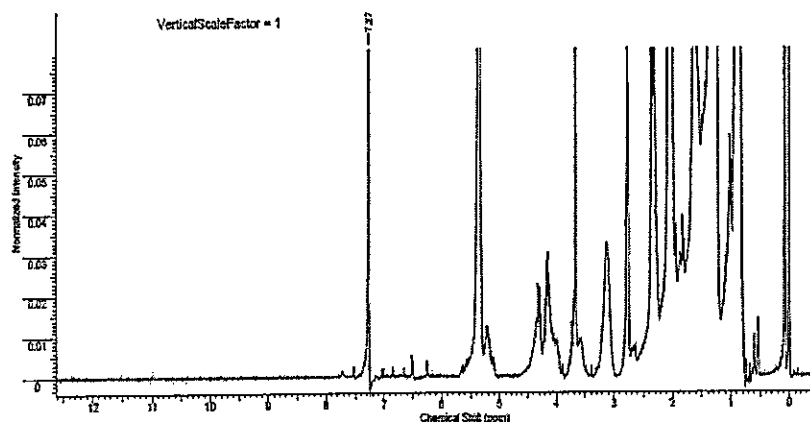


Figura 27. Espectro ^1H -RMN del extracto de 071209-E6-C2-A-A-A. No se observan señales de interés.

3.3.3.9. *Phoma herbarum*

El espectro del aislado 131209-E4-CI-III-GPY-B, presenta pocas señales de interés. Unas se encuentran cercanas a 7,5 y una, más pronunciada cerca de 6,7 (Figura 28).

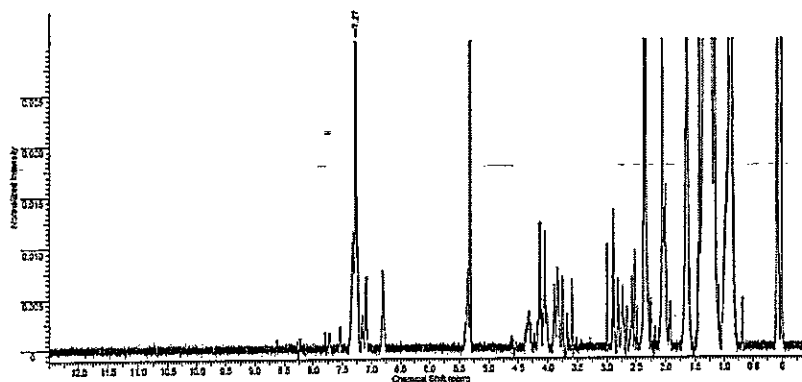


Figura 28. Espectro ^1H -RMN del extracto de 131209-E4-CI-III-GPY-B. Se observan las señales entre 6,5 y 7,5.

3.3.3.10. *Epicoccum sp.*

Al observar los espectros de ^1H -RMN de este grupo, se ve que todos presentan el mismo perfil al compartir las mismas señales entre ellos, variando principalmente en su intensidad. Destacan señales entre 6 ppm y 8,5 ppm. En la Figura 29 se muestran dos espectros representativos de este grupo.

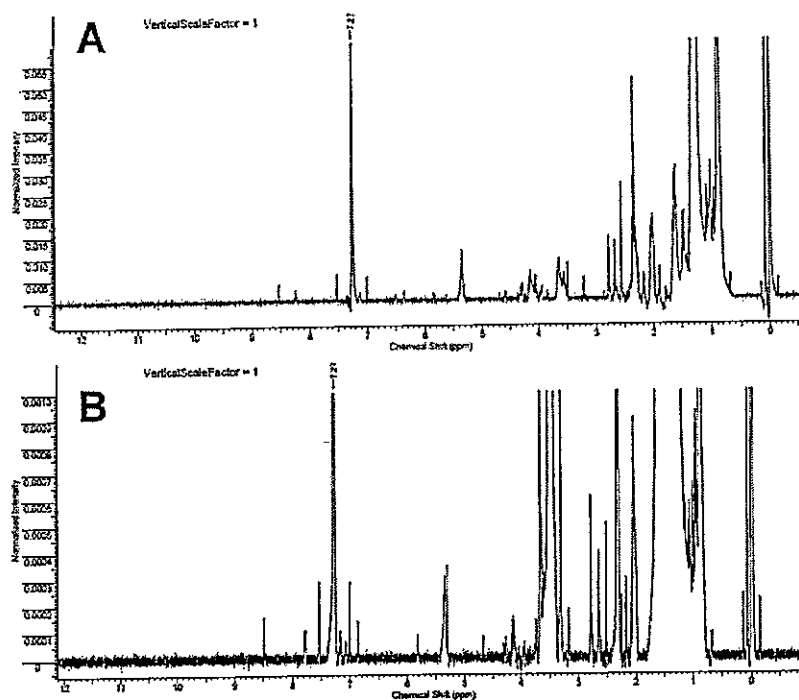


Figura 29. Espectros $^1\text{H-RMN}$ de los extractos grupo *Epicoccum sp.* Se observan pocas señales en los espectros, además de ser espectros iguales, pues sólo se diferencian en la intensidad de sus señales. En A) 071209-E2-C4-PDA-A-D y en B) 071209-E2-C4-PDA-A-B

3.4.- Evaluación de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los hongos obtenidos.

Con el fin de evaluar el potencial bioactivo de los extractos obtenidos de los aislados fúngicos, se llevaron a cabo dos bioensayos: antimicrobiano y antioxidante. Para cada uno de los ensayos, los resultados se muestran en la Tabla III.

Tabla III. Resultados obtenidos para los bioensayos antimicrobianos y antioxidante y la presencia/ausencia de genes de PKS y NRPS en el genoma.

| Genotipo | Aislado | Pariente más cercano | Pa (a,b) | Sa (a,b) | Cm (a,b) | Xc (a,b) | Antiox % | NRPS | PK S Lc1 - Lc2 | PKS Lc3c- Lc5c |
|----------------------|----------------------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|------|----------------------------|----------------------|
| Genotipo 1 (n=25) | 071209-E2-C1-A-A | Fungal sp. GU004207.1 | - | ++ | ++ | ++ | 28,48 | + | - | - |
| | 071209-E2-C5-A-C | Fungal sp. GU004207.1 | - | + | - | - | 1,4 | - | - | - |
| | 071209-E4-C2-A-A | Fungal sp. GU004207.1 | - | - | - | - | 9,26 | + | - | - |
| | 071209-E4-C2-A-B | Fungal sp. GU004207.1 | - | - | - | - | 38,7 | + | + | - |
| | 071209-E4-C2-B-B | Fungal sp. GU004207.1 | - | + | - | + | 8,6 | + | - | - |
| | 071209-E4-C2-C-D | Fungal sp. GU004207.1 | - | - | - | - | 4 | + | - | - |
| | 071209-E4-C3-A-A | Fungal sp. GU004207.1 | - | - | - | - | 16,2 | + | - | - |
| | 071209-E4-C3-A-B | Fungal sp. GU004207.1 | - | + | - | - | 3,5 | + | - | - |
| | 071209-E4-C3-A-C | Fungal sp. GU004207.1 | - | - | - | - | 15,1 | - | - | - |
| | 071209-E4-C3-B-A | Fungal sp. GU004207.1 | + | - | - | + | 5,3 | + | - | - |
| | 071209-E4-C3-B-D | Fungal sp. GU004207.1 | - | - | - | - | 2,8 | - | + | - |
| | 071209-E4-C5-A-D | Fungal sp. GU004207.1 | - | - | - | ++ | 1,13 | + | - | - |
| | 071209-E4-C5-A-E | Fungal sp. GU004207.1 | - | + | - | - | 2,3 | - | + | - |
| | 071209-E4-C7-A-A | Fungal sp. GU004207.1 | - | - | - | - | 4,2 | - | - | - |
| | 071209-E4-C7-A-B | Fungal sp. GU004207.1 | - | - | - | +++ | 4,7 | + | - | - |
| | 071209-E4-C9- (PDA)-A-A | Fungal sp. GU004207.1 | - | - | - | - | 3,4 | - | - | - |
| | 071209-E4-C9- (PDA)-C-A | Fungal sp. GU004207.1 | - | + | - | + | 1,7 | + | - | - |

| | | | | | | | | | | |
|------------|------------------------------|--|---|-----|----|----|-------|----|----|---|
| | 071209-E4-C10-II(VERDE)-BB | Fungal sp. GU004207.1 | - | + | - | - | 2 | + | + | - |
| | 071209-E6-CI-III-A | Fungal sp. GU004207.1 | - | - | - | - | 14,9 | + | - | - |
| | 071209-E6-C4-II(GPY)-B-B | Fungal sp. GU004207.1 | - | ++ | - | - | 13,3 | - | - | - |
| | 071209-E6-C4-II(GPY)-C-C | Fungal sp. GU004207.1 | - | ++ | - | - | 12,8 | + | - | - |
| | 071209-E6-C4-II(PDA)-C-B | Fungal sp. GU004207.1 | - | + | - | - | 7,75 | + | - | - |
| | 131209-E3-C1-(GPY)-C | Fungal sp. GU004207.1 | - | + | - | - | 3,98 | + | - | - |
| | 131209-E3-C2-II-A-A-2 | Fungal sp. GU004207.1 | - | - | - | - | 30,7 | - | - | - |
| | 131209-E3-C2-II-B-B | Fungal sp. GU004207.1 | - | ++ | - | - | 10,5 | - | + | - |
| Genotipo 2 | 071209-E4-C5-A-C | Fungal sp. GU004207.1 | - | - | - | + | 2,32 | -- | +- | - |
| Genotipo 3 | 131209-E3-C2-II-B-A | Fungal sp. GU004207.1 | - | - | - | - | 11 | - | - | - |
| | 131209-E2A-C4-II-B-A | Fungal sp. GU004206.1 | - | - | - | - | 12 | - | - | - |
| Genotipo 4 | 131209-E2B-C3-III-A | Fungal sp. GU004206.1 | - | - | - | - | 4,5 | + | - | - |
| | 131209-E2B-C3-III-C-B | Fungal sp. GU004206.1 | - | + | - | - | 15,9 | + | - | - |
| Genotipo 5 | 131209-E2B-C3-III-C | Fungal sp. GU004206.1 | - | - | - | - | 8,38 | + | - | - |
| Genotipo 6 | 071209-E4-CI-A | Fungal sp. GU166501.1 | - | +++ | ++ | + | 3,38 | + | - | - |
| | 071209-E4-C6-B-C | Uncultured fungus GQ999410.1 | - | - | - | - | 23,4 | + | - | - |
| Genotipo 7 | 071209-E4-C10(ROSADA)A-A | Uncultured fungus GQ999410.1 | - | + | - | - | 0 | + | - | - |
| | 131209-E4-C1-III-C | Uncultured fungus GQ999410.1 | - | - | - | - | 3,5 | - | - | - |
| | 071209-E1-C1-II(PDA)-A-A | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | - | - | - | - | 1,36 | + | + | - |
| | 071209-E1-C1-II-B-A | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | - | - | - | - | 18,32 | - | - | - |
| | 071209-E1-C1-II-B-B-AMARILLO | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | - | + | - | ++ | 4,2 | - | - | - |
| Genotipo 8 | 071209-E1-C1-II(PDA)-B-A | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | - | - | - | - | 4,2 | - | - | - |
| | 071209-E1-C1-III(GPY)-A | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | - | - | - | - | 2,39 | + | - | - |
| | 071209-E1-C1-III(GPY)-D | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | - | + | - | ++ | 3,96 | - | - | - |
| | 131209-E4-C11-II-A-B | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | - | - | + | - | 3,9 | - | - | - |
| | 131209-E4-C11-II-A-C | <i>Geomyces pannorum</i> . GU212398.1 | - | - | - | - | 0 | + | - | - |

| | | | | | | | | | | |
|-------------|---------------------------|--|---|-----|---|----|-------|---|---|---|
| | 071209-E2(GPY)-A | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | - | - | - | 8,6 | + | + | - |
| | 071209-E2(GPY)-B | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | - | + | - | 6,9 | + | + | - |
| | 071209-E2-C2-A-A | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | - | - | - | 12 | + | - | - |
| | 071209-E2-C2-B-A | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | + | + | - | + | 2,72 | - | - | - |
| | 071209-E2-C2-B-D | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | - | - | - | 30,8 | - | + | - |
| | 071209-E2-C3-A-A | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | - | - | - | 13,3 | - | - | - |
| | 071209-E2-C3-A-B | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | + | - | ++ | 4 | + | - | - |
| | 071209-E2-C3-B-A | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | + | - | ++ | 2,7 | - | - | - |
| Genotipo 9 | 071209-E2-C3-C-A | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | - | - | - | 3,5 | - | + | + |
| | 071209-E3-C2-II-A-A(GPY) | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | + | - | - | 9,6 | + | + | + |
| | 071209-E3-C2-II-C-(GPY)-A | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | - | - | - | 2,4 | + | - | - |
| | 131209-E2A-C2-II-C-B | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | + | - | - | 5,44 | + | - | - |
| | 131209-E2A-C5II-D-A | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | - | + | - | 2,97 | + | - | - |
| | 131209-E2A-C5II-D-B | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | - | + | - | 29,50 | + | - | - |
| | 131209-E2A-C5II-E-B | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | + | - | ++ | 9,2 | + | + | + |
| | 131209-E4-C10-B-C | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | - | - | - | 2,8 | + | - | - |
| | 131209-E4-C10-D-A | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | + | + | + | ++ | 8,5 | + | - | + |
| | 131209-E4-C10-D-B | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | - | - | - | 6,2 | + | - | - |
| Genotipo 10 | 131209-E2A-C5II-A-A | <i>Geomyces sp.</i> JN630629.1 | - | + | - | - | 6 | + | - | - |
| Genotipo 11 | 071209-E5-C3-II-B-A | <i>Geomyces pannorum</i> DQ189227.1 | - | ++ | - | - | 2,22 | + | + | - |
| Genotipo 12 | 071209-E5-C2-II-B-A | Uncultured <i>Pseudeurotium</i> FJ378726.1 | - | - | - | - | 11,6 | + | - | - |
| | 071209-E5-C2-II-B-B | Uncultured <i>Pseudeurotium</i> FJ378726.1 | - | - | - | - | 0 | - | + | - |
| Genotipo 13 | 071209-E4-C2-B-A | Uncultured <i>Pseudeurotium</i> FJ378726.1 | - | - | - | - | 4,54 | + | + | - |
| Genotipo 14 | 071209-E4-C4-A | <i>Thelebolus sp.</i> GU004201.1 | - | - | - | - | 3,9 | + | - | - |
| | 071209-E4-C4-B-B | <i>Thelebolus sp.</i> GU004201.2 | - | - | - | - | 45,7 | - | - | - |
| | 071209-E6-CI-A-A | <i>Thelebolus sp.</i> GU004201.1 | - | ++ | - | - | 6 | + | - | - |
| | 071209-E6-CI-B-A | <i>Thelebolus sp.</i> GU004201.1 | - | +++ | - | ++ | 6,1 | + | - | - |
| | 071209-E6-CI-B-B | <i>Thelebolus sp.</i> GU004201.1 | - | - | - | - | 27 | + | - | - |
| Genotipo 15 | 071209-E6-C2-D-(GPY)-B-D | <i>Aspergillus versicolor</i> JN689347.1 | - | - | - | - | 4,4 | + | - | - |

| | | | | | | | | | | |
|-------------|------------------------|--|---|----|----|----|------|---|---|---|
| Genotipo 16 | 071209-E1-C1-III-B | <i>Penicillium polonicum</i> HQ850925 | - | ++ | - | - | 36 | + | - | - |
| | 071209-E1-C1-III-C | <i>Penicillium polonicum</i> HQ850925 | - | ++ | ++ | + | 2 | + | + | - |
| Genotipo 17 | 071209-E3-C3-II-B-B | <i>Penicillium commune</i> JN831239.1 | - | + | - | + | 20 | + | + | - |
| Genotipo 18 | 071209-E4-C1-III-A | <i>Penicillium solitum</i> JN642222.1 | - | - | - | - | 1 | + | + | + |
| Genotipo 19 | 071209-E4-C8-A-C | <i>Cladosporium</i> sp. JF773595.1 | - | - | - | - | 0,7 | - | - | - |
| | 071209-E6-C2-verde-A | <i>Cladosporium</i> sp. JF773595.1 | - | + | - | - | 2 | - | - | - |
| | 071209-E6-C2-verde-B | <i>Cladosporium</i> sp. JF773595.1 | - | + | - | ++ | 9 | + | - | - |
| Genotipo 20 | 071209-E6-C2-A-A-A | <i>Aureobasidium pullulans</i> AB693902.1 | - | - | - | - | 22 | - | - | - |
| Genotipo 21 | 131209-E4-C1-III-GPY-B | <i>Phoma Herbarum</i> FN868459.1 | - | - | - | - | 2,8 | - | + | - |
| Genotipo 22 | 071209-E2-C4-(PDA)-A-A | <i>Epicoccum</i> sp. JF773624.1 | + | + | - | - | 8 | - | + | - |
| | 071209-E2-C4-(PDA)-A-B | <i>Epicoccum</i> sp. JF773624.1 | - | + | - | - | 6,6 | + | - | - |
| | 071209-E2-C4-(PDA)-A-C | <i>Epicoccum</i> sp. JF773624.1 | - | ++ | - | - | 61,2 | - | - | - |
| | 071209-E2-C4-(PDA)-A-D | <i>Epicoccum</i> sp. JF773624.1 | - | ++ | - | + | 31,5 | + | - | - |
| | 071209-E2-C4-(PDA)-A-E | <i>Epicoccum</i> sp. JF773624.1 | - | - | - | - | 2,97 | - | - | - |
| | 071209-E2-C4-(PDA)-C-A | <i>Epicoccum</i> sp. JF773624.1 | - | - | - | + | 75,8 | + | + | - |

(a) *Staphylococcus aureus* (Sa), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Xanthomonas campestris* (Xc) y *Clavibacter michiganensis* (Cm).

(b) +++ máxima zona de inhibición ($d > 1$ cm); ++ zona de inhibición media ($1 \text{ cm} \geq d > 0.7 \text{ cm}$); + zona de inhibición pequeña ($0.7 \text{ cm} \geq d$); - sin inhibición.

Del total de extractos ensayados, 54 extractos (62,0%) de estos poseen algún tipo de bioactividad, ya sea antimicrobiana, antioxidante o ambas. La actividad antimicrobiana fue la actividad más abundante, con 47 extractos positivos contra alguna de las 4 bacterias ensayadas. Los géneros que no presentaron actividad antimicrobiana fueron: *Pseudeurotium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium* y *Phoma*. En cambio, sólo 14 extractos (16%) presentaron una capacidad antioxidante mayor al 20% (considerando como 100 % a la actividad antioxidante del ácido ascórbico ver Materiales y Métodos).

Con respecto a la actividad antimicrobiana, se encontró que la actividad más abundante es contra la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*. Del total de extractos ensayados, 37 extractos presentan dicha bioactividad. De estos, 15 pertenecen al grupo Fungal sp y 11 pertenecen al género *Geomyces*. El resto de los extractos con esta bioactividad se distribuyen en los siguientes géneros: *Epicoccum* (4 extractos), *Penicillium* (3 extractos), *Cladosporium* (2 extractos) y *Thelebolus* (2 extractos).

El extracto de 071209-E6-C1-B-A, identificado como *Thelebolus* sp. y el extracto de 071209-E4-C1-A identificado como Fungal sp., destacan por ser los que poseen el halo de inhibición de mayor tamaño.

La actividad antimicrobiana contra la bacteria fitopatógica Gram negativa *Xanthomonas campestris*, se encontró en 21 extractos, siendo la segunda bioactividad más abundante. Del total de extractos, 8 pertenecen al grupo Fungal sp y 7 al género *Geomyces*. Otros géneros que presentan actividad antimicrobiana contra *Xanthomonas campestris* son: *Epicoccum* (2 extractos), *Penicillium* (2 extractos), *Cladosporium* (1 extracto) y *Thelebolus*, (1 extracto). El mayor halo de inhibición de crecimiento se encontró en el extracto del hongo 071209-E4-C7-A-B, perteneciente al grupo Fungal sp.

Por otro lado, sólo 8 extractos presentan actividad antimicrobiana contra la bacteria Gram positiva *Clavibacter michiganensis*. Los géneros que presentan actividad contra *C. michiganensis* son: *Geomyces* (5 extractos) Fungal sp. (2 extractos) y *Penicillium* (1 extracto)

En cuanto a la bacteria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*, sólo se encontraron 4 extractos con actividad antimicrobiana contra esta bacteria. Los géneros que

presentaron actividad contra son: *Geomyces* (2 extractos), Fungal sp. (1 extracto) y *Epicoccum* (1 extracto).

Interesantemente, del total de extractos ensayados, sólo el extracto proveniente del hongo 131209-E4-C10-D-A, identificado como *Geomyces* sp. presentó actividad antimicrobiana contra las 4 bacterias ensayadas.

Respecto de la actividad antioxidante, se obtuvo 14 extractos con capacidad antioxidante igual o superior a 20% en relación al ácido ascórbico. Esta actividad fue encontrada en los extractos de los hongos pertenecientes a 7 géneros: Fungal sp. (4 extractos), *Epicoccum* (3 extractos), *Penicillium* (2 extractos), *Geomyces* (2 extractos), *Thelebolus* (2 extractos) y *Aureobasidium* (1 extracto).

Los extractos de dos aislados pertenecientes al género *Epicoccum*, presentaron los mayores porcentajes de actividad antioxidante. Estos corresponden a 071209-E2-C4-(PDA)-C-A y 071209-E2-C4-(PDA)-A-C con porcentajes de actividad antioxidante de 75% y 61% respectivamente.

El aislado 071209-E4-C4-B-B identificado como *Thelebolus* sp, también presentó una elevada capacidad antioxidante, 45%, con respecto a la actividad antioxidante del ácido
ascórbico.

4. DISCUSIÓN

4.1. Biodiversidad de hongos cultivables asociados a esponjas marinas Antárticas

A partir de 9 muestras de esponjas marinas obtenidas en la Antártica, se obtuvo 118 aislados fúngicos, de los cuales se seleccionaron 87 hongos para realizar este estudio. El análisis bioinformático de las secuencias ITS de los 87 aislados, permitió clasificar el 59,7% (52 aislados). El género más abundante fue *Geomyces* (28 aislados, 32,1%), seguido de *Epicoccum sp.* (6 aislados, 6,8%), *Thelebolus sp.* (5 aislados, 5,6%), *Penicillium* (4 aislados, 4,5%), *Pseudeurotium sp.* (3 aislados, 3,4%), *Cladosporium sp.* (3 aislados, 3,4%), *Aspergillus versicolor* (1 aislado, 1,1%), *Aureobasidium pullulans* (1 aislado, 1,1%) y *Phoma herbarum* (1 aislado, 1,1%). Cabe destacar que, a pesar de que la mayoría de los aislados obtuvo entre 98% y 100% de identidad con las secuencias ITS en las bases de datos, sólo el 18,3% de los hongos (16 aislados) fueron identificados a nivel de especie.

Por otro lado, un alto porcentaje de aislados, 40,3% (correspondiente a 35 aislados fúngicos) no pudieron ser identificados, ya que en las bases de datos no existen secuencias ITS de organismos conocidos; por lo que se denominaron Fungal sp. Estos resultados sugieren que la biodiversidad fúngica marina asociada a esponjas marinas antárticas presenta un alto porcentaje de hongos no conocidos, existiendo la posibilidad de que se trate de especies nunca antes descritas. Sin embargo, para confirmar dicha novedad, es necesario realizar posteriores estudios.

La biodiversidad fúngica Antártica ha sido estudiada hace varios años, en sus diferentes zonas geográficas, centrándose principalmente en muestras de suelo. Actualmente se han descrito cerca de 1000 hongos distintos, pertenecientes a distintos grupos de hongos (Ascomycetes, Basidiomycetes, entre otros), con presencia de especies fúngicas cosmopolitas, sin poder asegurar su endemismo o coevolución (Bridge & Spooner, 2012).

En este trabajo se encuentra un alto porcentaje de aislados sin identificar. Al analizar las secuencias ITS de estos aislados, se encontró la presencia de 7 genotipos. De éstos, 3 genotipos se identificaron como Fungal sp. GU004207.1 y 2 se identificaron como Fungal sp. GU004206.1. En el árbol filogenético, estos genotipos se encuentran cercanos al clado de *Geomyces*, por lo que se puede afirmar que los hongos que presentan este genotipo pertenecen a la misma clase, Leotiomycetes. Los dos genotipos restantes, corresponden al genotipo del aislado identificado como Fungal sp. GU166501.1 y al genotipo presente en los 3 aislados identificados como Uncultured fungus GQ999410.1, los cuales se encuentran bastante distanciados del resto de los grupos Fungal sp., en el árbol filogenético. Interesantemente, se encontró que están cercanamente emparentados a aislados que pertenecen al orden Sordariales, por lo que se puede afirmar que ambos grupos pertenecen al menos a la clase Sordariomycetes.

En los resultados encontrados para los aislados identificados como *Geomyces*, se observa que las secuencias ITS de los hongos analizados en este estudio tienen un alto porcentaje de similitud con las secuencias ITS de hongos *Geomyces* aislados previamente en la Antártica (a partir de muestras de suelo y madera) y con un aislado obtenido desde muestras provenientes del Ártico. Esto sugiere la prevalencia de este

tipo de hongos en ambientes fríos. En efecto, sólo se conocen 4 especies de *Geomyces*, considerándose un género keratinofílico y psicrófilico (Loque y col., 2009). La presencia de este género en territorio Antártico ya ha sido estudiada ampliamente, encontrándose con una gran distribución y abundancia. En el estudio de Laichamanová y col. (2009), realizado en la isla James Ross en la península Antártica, los aislados del género *Geomyces* representan el 38% del total de aislados obtenidos. Estudios similares en diferentes zonas de la Antártica (Isla Victoria, Isla Ross) han encontrado resultados similares (Tossi y col., 2002; Arenz y col., 2006; Gesheva & Negoita 2012). La especie más comúnmente aislada corresponde a *Geomyces pannorum* (Brunati y col., 2009).

Por otro lado, también es posible encontrar hongos del género *Geomyces* en muestras marinas, como lo muestra Loque y col. (2009), al analizar la diversidad de hongos presentes en 3 algas marinas recolectadas en la Isla Rey Jorge. En este estudio se encontró que de un total de 75 aislados obtenidos, 21 pertenecen al género *Geomyces*. Estos antecedentes, junto con los resultados obtenidos en este trabajo, permiten vislumbrar la preponderancia de este género por sobre géneros cosmopolitas en ambiente marino, lo que sugiere que se trata de un género endémico de la Antártica (Ruisi y col., 2007; Onofri y col., 2006).

Hongos del género *Epicoccum* han sido escasamente aislados desde la Antártica (Kerry 1990). Se han encontrado en muestras de suelo en distintas zonas antárticas (Tossi y col., 2005), así como también se han encontrado asociados a plantas (Kerry 1990) o incluso en muestras de aire (Marshall 1997), pero en poca cantidad. No existen estudios que describan la presencia de este grupo de hongos en el ambiente marino,

por lo que este sería el primer reporte de esta especie fúngica en el ambiente marino antártico.

En cuanto a los hongos pertenecientes al género *Thelebolus*, todos los aislados fúngicos de este estudio tuvieron 100% de identidad con la secuencia ITS de un hongo *Thelebolus sp.* previamente reportado en la Antártica. Este género ha sido aislado numerosas veces en este territorio, existiendo estudios que muestran las distintas especies y su amplia distribución geográfica (Hoog y col., 2005). Particularmente, existen dos especies, *Thelebolus globosus* y *Thelebolus ellipsoideus* que son consideradas endémicas (Ruisi et al 2007). En cuanto a estudios en ambientes acuáticos, también se ha encontrado que el género *Thelebolus* predomina en numerosos lagos de la zona de McMurdo Dry Valleys (Brunati y col., 2009). Sin embargo no se ha reportado en muestras obtenidas en regiones marítimas antárticas, por lo que sería el primer reporte de este género en el ambiente marino antártico.

Con respecto a hongos pertenecientes al género *Pseudeurotium*, su presencia sólo ha sido reportada en el estudio llevado a cabo por Arenz y col. (2006) en muestras terrestres en la región sur de la Antártica. La baja abundancia encontrada en este género no permite dilucidar si se trata de especies endémicas de la zona o si se trata de propágulos traídos por la actividad humana. De esta forma, este sería el primer reporte de este género en el ambiente marino antártico.

Los hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Cladosporium* también han sido aislados comúnmente en la Antártica desde muestras de suelo, musgos, líquenes y animales, hielo, lagos, con diferentes abundancias de acuerdo al sitio estudiado (Arenz y col., 2006; Fletcher y col., 1985; Brigde & Spooner, 2012; Tosi y col., 2002; Brunati y

col., 2009). Estas especies son consideradas como especies cosmopólitas, dado que tienen una amplia distribución en el mundo, por lo que no es posible determinar si se trata de aislados endémicos de la zona o fueron traídos posteriormente. Hongos del género *Cladosporium* han sido aislados en regiones polares y otros ambientes fríos, al igual que algunas especies de *Penicillium*, que han mostrado tener buen crecimiento a bajas temperaturas. De hecho, se han descrito 7 especies de *Penicillium* en territorio Antártico, incluyendo la especie *Penicillium antarcticum* (Brunati y col., 2009). Al contrastar estos antecedentes con los resultados obtenidos, llama la atención encontrar que los aislados fúngicos pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Cladosporium* y *Aspergillus* se encuentran en un bajo porcentaje (4%, 3% y 1% respectivamente) en este trabajo, mientras que es posible encontrar estudios en otras zonas donde presentan mayor abundancia (Arenz 2010).

Hongos pertenecientes al género *Aureobasidium* también han sido encontrados en territorio Antártico, aunque en menor cantidad que los géneros mencionados anteriormente. Se ha descrito en muestras de suelo, aire y musgos (Bridge & Spooner, 2012; Tosi y col., 2002). Este sería el primer reporte de aislados del género *Aureobasidium* en el ambiente marino antártico.

Finalmente, hongos pertenecientes al género *Phoma* han sido aislados comúnmente en la Antártica desde muestras de madera, rocas, suelo, aire, plantas, siendo especialmente prolífico en musgos (Bridge & Spooner, 2012; Tosi y cols., 2005; Brunati y col., 2009). Este trabajo sería el primer reporte que muestra la presencia de este género en ambiente marino antártico.

Por otro lado, al analizar la distribución de los aislados fúngicos en las esponjas marinas recolectadas en Bahía Fildes, se observa una distribución desigual de los distintos grupos taxonómicos. El género que presentó mayor distribución entre las esponjas (6 de 9 esponjas) fue el género *Geomyces*, seguido del grupo Fungal sp. (presente en 5 esponjas de un total de 9). En cuanto a los géneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Pseudeurotium* y *Thelebolus*, se encuentran presentes en 2 o 3 esponjas. Finalmente, los géneros *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Phoma*, *Acremonium* y *Epicoccum* se encontraron presentes en una única esponja.

Estos resultados difieren de lo encontrado en esponjas marinas de otras latitudes. En todos los estudios sobre diversidad fúngica asociada a esponjas marinas que se han llevado a cabo en diferentes ubicaciones geográficas (en el mar sur de China (Zhou y col., 2011), en las costas de la isla Sakhalin de Rusia (Pivkin y col., 2006), en la isla Oahu de Hawaii (Li & Wang, 2009; Gao y col., 2008) , en el Mar Adriático cerca de Croacia (Wiese y col., 2011; Proksch y col., 2008), en el mar mediterráneo cerca de Israel (Paz y col., 2010) y en las costas de Rameswaran en India (Thirunavukkarasu y col., 2012)), los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* se encuentran en alta cantidad, predominando en todas las esponjas marinas. Esto puede deberse a que se trata de géneros cosmopolitas, lo que hace que sean taxas comúnmente aisladas, denominándose como hongos "esponja-generalistas". El género *Cladosporium*, también es posible encontrarlo en todos estos estudios, sin embargo, en menor abundancia.

Por otro lado, aislados pertenecientes a los géneros *Aureobasidium*, *Epicoccum*, *Phoma* y *Pseudeurotium* se encuentran asociados a esponjas en una limitada distribución geográfica. Aislados del género *Aureobasidium* sólo han sido reportados

en esponjas marinas en Hawaii (Li & Wang, 2009), aislados del género *Epicoccum* sólo se han reportado previamente en esponjas marinas recolectadas cerca de Croacia (Wiese y col., 2011), aislados del género *Phoma* han sido reportado en esponjas marinas recolectadas en Croacia y Rusia (Wiese y cols, 2011; Pivkin y cols., 2006), sin embargo, en baja cantidad. Aislados pertenecientes a los géneros *Geomyces* y *Pseudeurotium*, hasta la fecha, sólo han sido reportados en estudios realizados en Rusia (Pivkin y col., 2006). Interesantemente, aislados pertenecientes al género *Thelebolus* no se han encontrado asociado a ninguna esponja marina estudiada hasta el momento, por lo que este es el primer reporte de este género fúngico asociado a esponjas marinas.

Las diferencias encontradas en la distribución y abundancia de los distintos géneros fúngicos entre las esponjas marinas Antárticas y las esponjas marinas de otras latitudes, puede deberse a efectos del ambiente, específicamente, el aislamiento que presenta el continente Antártico, que genera una barrera geográfica a la diseminación de géneros fúngicos cosmopolitas, favoreciendo la presencia de especies fúngicas endémicas. En cuanto a la diferencia de diversidad fúngica observada entre las esponjas marinas antárticas, se puede deber a factores ambientales (Höller y col., 2000) o a una relación específica entre los hongos y la esponja hospedera (Thirunavukkarasu y col., 2012).

Finalmente, al comparar los reportes sobre biodiversidad fúngica terrestre antártica y los resultados obtenidos en este trabajo, se observa que los aislados del género *Geomyces* y el grupo Fungal sp. se encuentran en mayor cantidad en comparación con los aislados de los géneros cosmopolitas *Penicillium* y *Aspergillus*, que están presentes en baja cantidad. Hongos pertenecientes a estos géneros cosmopolitas se han aislado

frecuentemente desde territorio antártico, e incluso se ha llegado a afirmar que estos géneros prevalecen en suelo antártico (Gesheva 2010). Sin embargo, no es posible afirmar si estos aislados pertenecientes a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* son propios del continente antártico o han llegado como propágulos traídos por los visitantes, pero sí es interesante rescatar la diferencia entre la abundancia de estos géneros descrita para muestras de suelo y la encontrada en ambiente marino, lo que pudiera deberse a que la zona marina no ha sido tan invadida como el ambiente terrestre.

4.2. Caracterización Morfológica

Mediante los ensayos morfológicos se pudo estudiar las características fenotípicas de cada uno de los aislados. Con ello fue posible discernir entre hongos con igual clasificación molecular. Adicionalmente, los ensayos proporcionaron varios datos interesantes en cuanto a la temperatura óptima de crecimiento, capacidad de utilización de nutrientes y secreción de pigmentos.

El 82,7% de los aislados fúngicos presentaron mayor crecimiento a 15°C que a 25°C. Estos aislados pertenecen a los géneros *Geomyces*, *Phoma*, *Thelebolus*, *Penicillium* y el grupo Fungal sp. De acuerdo con Rainey & Oren (2006), la diferencia entre un organismo psicofílico y psicrotolerante está dada por la temperatura más alta a la que pueden llegar a crecer, teniendo los psicrotolerantes un mayor rango de temperatura para crecer. En cuanto a microorganismos Antárticos, en ocasiones se define 25°C como el límite superior para definir a un microorganismo psicofílico. De acuerdo con este criterio, los aislados pertenecientes a los géneros *Geomyces*, *Phoma*, *Thelebolus*,

Penicillium y el grupo Fungal sp. pueden ser clasificados como psicrotolerantes. Existen algunas excepciones, como el caso de los aislados 071209-E6-C1-A-A y 071209-E4-C4-A, pertenecientes al género *Thelebolus*, que no presentaron crecimiento a 25°C, considerándose más bien organismos psicrófilos. Otra excepción corresponde al aislado 071209-E4-C1-A (1,1%), identificado como Fungal sp., pues presenta mayor crecimiento a 25°C, clasificándose como mesófilo. Por otro lado, el 6,8% de los hongos, pertenecientes a los géneros *Cladosporium* y *Pseudeurotium* presentaron crecimiento muy similar en ambas temperaturas, por lo que no es posible afirmar si se trata de organismos psicrotolerantes o mesófilos. En cambio, el 9,2%, correspondiente a los géneros *Aspergillus*, *Aureobasidium* y *Epicoccum* presentaron mayor crecimiento a 25°C sugiriendo que estos organismos son mesófilos (Rainey & Oren, 2006). Estos resultados concuerdan con otros estudios llevados a cabo en la Antártica, donde se ha visto que existen muy pocos microorganismos psicrófilos, sino más bien, son microorganismos psicrotolerantes, capaces de vivir en menores temperaturas, pero su óptimo de crecimiento es entre 15 y 30°C (Bridge & Spooner, 2012)

Con respecto al crecimiento de los aislados en los diferentes medios de cultivo, se observó que todos los hongos lograron crecer con facilidad en los medios CYA, PDA y MEA, observándose colonias redondeadas y tupidas en filamentos. Estos medios de cultivo proveen de numerosos nutrientes, ya que llevan en su composición extracto de levadura, extracto de patata y extracto de malta, respectivamente. Junto a esto, también se observó que algunos aislados secretaron pigmentos que colorearon el medio de cultivo con diferentes tonalidades. Cuatro aislados identificados como *Geomyces* sp., pigmentaron el medio de color rosado en los medios PDA y MEA

(131209-E2-C5-II-A-A, 131209-E2-C5-II-D-B y 131209-E2-C5-II-D-A), y sólo 1 caso pigmentó también en medio CYA (131209-E2-C5-II-E-B). Finalmente, todos los aislados identificados como *Epicoccum sp.* pigmentaron el medio de cultivo. Los aislados 071209-E2-C4-PDA-A-A, 071209-E2-C4-PDA-A-C y 071209-E2-C4-PDA-A-E pigmentaron el agar de color amarillo intenso, en medio CYA y PDA y MEA. En cambio, 071209-E2-C4-PDA-A-B, 071209-E2-C4-PDA-C-A y 071209-E2-C4-PDA-A-D pigmentaron el agar de color rosado en los medios PDA, MEA, CZ y CYA. Interesantemente, todos los casos de pigmentación del medio de cultivo se producen únicamente a 15°C. Este fenómeno ya ha sido reportado en una bacteria antártica, productora de pigmentos rojos con actividad antioxidante. Dicha producción se favorece a bajas temperaturas, llegando a tener el óptimo de producción a 4°C (Correa-Llantén y col., 2012). Considerando que en la Antártica las temperaturas son bajas y existe una alta radiación UVB, los pigmentos producidos a estas bajas temperaturas, podrían corresponder a un tipo de defensa no enzimática contra el estrés oxidativo, así como también podrían estar involucrados en la fluidez de las membranas permitiendo funciones metabólicas a bajas temperaturas (Correa-Llantén y col., 2012).

Adicionalmente, se observa una posible relación entre fuente de carbono presente en el medio de cultivo y la producción de pigmentos. Lo anterior debido a que la pigmentación es más intensa en medios que contienen glucosa (MEA y PDA) que en los medios que contienen sacarosa (CYA). Situaciones similares se han observado en la producción de pigmentos por otras especies fúngicas, donde el tipo de fuente de carbono utilizada y su concentración afecta la producción de pigmentos. En el caso del hongo *Monascus sp.*, la producción de pigmentos se ve favorecida en presencia de

glucosa, fructosa y maltosa, mientras que no se observa producción de pigmentos en medios con sacarosa (Lin & Demain, 1991). Sin embargo, una alta concentración de glucosa disminuye la producción de pigmentos, probablemente debido a los efectos en la regulación catabólica generada por la glucosa (Chen & John, 1994).

La producción de estos pigmentos por parte de los distintos aislados fúngicos, presenta un enorme atractivo para la industria biotecnológica, pues tienen potenciales aplicaciones como colorantes en alimentos, cosméticos y fármacos. Para ello es necesario seguir investigando sobre las propiedades de los pigmentos, los óptimos de producción, su composición, etc.

Con respecto al crecimiento de los hongos en los medios CZ, CREA y NO_2^- se observó algunas dificultades. Estos medios de cultivo corresponden a medios de composición definida donde la fuente de carbono es sacarosa y difieren entre ellos en la fuente de nitrógeno utilizada: nitrato de sodio en el medio CZ, creatina en el medio CREA y nitrito de sodio en el medio NO_2^- . Esto permitió diferenciar morfológicamente a los aislados dependiendo de su capacidad de utilizar diferentes fuentes de nitrógeno.

Los hongos del género *Geomyces* y grupo Fungal sp., en su mayoría, pudieron crecer con facilidad en el medio CZ. Sólo algunas excepciones, correspondientes a 071209-E2-C3-A-A del género *Geomyces* y 071209-E4-C2-A-B, 071209-E4-C2-B-B, 071209-E4-C2-C-D, 071209-E6-C4-II-PDA-C-B, 071209-E4-C6-B-C, 071209-E4-C10-II-ROSADA-A-A, 131209-E4-C1-III-C y 071209-E4-C1-A del grupo Fungal sp., que si bien lograron crecer en este medio, sus colonias presentaron morfología muy distinta, principalmente colonias de pocos filamentos y escasa coloración. En el medio con creatina (CREA), fue posible establecer ciertas diferencias entre el género *Geomyces* y

el grupo Fungal sp.. El 85,7% de los hongos identificados como Fungal sp. son capaces de tener un crecimiento normal formando colonias redondeadas y tupidas en filamentos, mientras que sólo 1 aislado del género *Geomyces* (correspondiente a 071209-E2-C3-A-A) es capaz de crecer de esta forma en medio CREA. Esta es una característica fenotípica que permitiría diferenciar a estos dos grupos de hongos que se encuentran clasificados dentro de la misma clase taxonómica (Leotiomycetes). En el medio con nitrito de sodio, se observan diferencias más drásticas entre los aislados. El 37,9 % de los aislados identificados como *Geomyces* y el 45,7% de los aislados Fungal sp. no pudieron crecer en este medio a ninguna temperatura de incubación. El 48% de aislados identificados como *Geomyces* y el 28,5% de los aislados Fungal sp. lograron crecer en este medio sólo a 15°C y finalmente, el 13,7% de aislados identificados como *Geomyces* y el 25% de los aislados Fungal sp lograron crecer en este medio en ambas temperaturas de incubación.

En cuanto a los aislados clasificados en los géneros *Pseudeurotium*, *Thelebolus* y *Phoma*, todos presentaron colonias grandes y tupidas en los medios CYA, PDA y MEA, mientras que en los medios CZ, CREA y NO₂, las colonias presentaron crecimiento anómalo (pocos filamentos y falta de coloración). En cambio, los aislados clasificados bajo los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium* y *Epicoccum* presentaron colonias grandes y tupidas en filamentos en CYA, PDA, MEA, CZ y CREA, presentándose sólo algunos aislados fúngicos con problemas de crecimiento en medio NO₂.

La habilidad de utilizar los nutrientes tiene un profundo impacto en el crecimiento y desarrollo de muchos hongos. Particularmente, la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno puede generar alteraciones en la morfología de los hongos (Bugeja y col.,

2012). Compuestos como amonio, glutamina y glutamato, son las fuentes de nitrógeno preferidas por los hongos. Sin embargo, frente a ausencia de éstas, los hongos tienen mecanismos que permiten la captación y utilización de diferentes fuentes de nitrógeno menos preferidas: nitrato, nitrito, purinas, aminoácidos, etc. (Marzluf 1997). La utilización de nitrato como fuente de nitrógeno alternativa está altamente regulada y requiere de la ausencia de la fuente preferida de nitrógeno y la inducción por la presencia de nitrato, llevando a la síntesis de los componentes de las vías metabólicas necesarias. En este caso es necesaria la síntesis de las enzimas nitrato reductasas y nitrito reductasas. Sin embargo mutaciones en los genes codificantes para estas enzimas o mutaciones globales en las vías regulatorias del sistema pueden generar hongos incapaces de utilizar nitrato o nitrito como fuente alternativa de nitrógeno (Marzluf 1997). Estos mutantes existen en la naturaleza y es posible aislarlos desde diferentes fuentes, lo que sugiere que este puede ser uno de los factores que explique la alteración en el crecimiento por parte de algunos aislados fúngicos en los medios CZ y NO₂. Adicionalmente, también se ha descrito que algunos ácidos orgánicos nitrogenados, como la creatina, inhiben el crecimiento de algunos hongos, alterando su metabolismo o la integridad de la membrana (Mueller y col., 2004). De igual forma, el nitrito puede ser tóxico para algunas especies fúngicas, debido a que este compuesto tiene la capacidad de deaminar los aminoácidos y dada su similitud con el ión sulfito, puede interferir con el metabolismo del azufre (Freyre 1997). Esto permitiría explicar el crecimiento anómalo observado en algunos aislados en los medios CREA y NO₂, pero no en CZ.

Así también, en el estudio realizado por Bugeja y col. (2012), se generó una cepa de *Penicillium marneffeii* mutante para el gen *AreA* (regulador de la respuesta a

situaciones limitantes de nitrógeno), observándose la incapacidad de la cepa mutante de crecer en medios con arginina (precursor de la síntesis de creatina) y el escaso crecimiento de la cepa en medios con nitrito. Además, se observó que la cepa logró crecer (aunque mínimamente) a 25°C y no a 37°C utilizando estas fuentes de nitrógeno. La relación entre la fuente de nitrógeno usada y el crecimiento a diferentes temperaturas no es clara, pero se sugiere que otras vías del metabolismo del nitrógeno independientes de *AreA* se activan a una temperatura, pero no son capaces de activarse a una temperatura mayor (Bugeja y col., 2012). Este es el único estudio encontrado que describe este fenómeno, muy similar a lo observado con los aislados fúngicos antárticos, lo que brinda una posible explicación al crecimiento anormal observado en los medios CREA y NO₂. Sin embargo, para poder dilucidar los verdaderos factores involucrados en este fenómeno, se hace necesario estudiar las vías del metabolismo del nitrógeno y sus reguladores en estos aislados.

Finalmente, 2 aislados, pertenecientes al género *Penicillium* (071209-E1-C1-III-B y 071209-E4-C1-III-A) fueron capaces de modificar el pH del medio CREA, lo que se evidencia con cambio de coloración del medio. Esto permite identificar ciertas especies de *Penicillium* que producen ácidos en medios con creatina y sacarosa, tornando el medio amarillo. Luego de 2-3 semanas aumentan el pH hasta que el medio se torna morado nuevamente (Frisvad & Samson, 2006).

Los resultados obtenidos en los ensayos morfológicos, permiten afirmar que, a pesar de que la clasificación molecular de ciertos hongos sea la misma, estos sí son diferentes entre sí al mostrar distintos comportamientos en los 6 medios de cultivo y las temperaturas ensayadas. De esta forma, se descarta la posibilidad de tener repetidos algunos aislados fúngicos.

4.3. Screening molecular y químico del potencial del metabolismo secundario de los hongos aislados.

4.3.1 Detección de la presencia de genes de PKS y NRPS

El estudio del potencial metabólico a nivel molecular, se realizó mediante la detección de la presencia de los genes de las enzimas PKS y NRPS en el ADN de los aislados. Con respecto a las PKS, se encontró que el 26,4% de los hongos presentan el gen en su genoma, encontrándose en mayor cantidad el gen para la enzima PKS no reductora. Estos corresponden a los géneros *Geomyces*, *Pseudeurotium*, *Penicillium*, *Epicoccum*, *Phoma* y *Fungal* sp.

Los genes de las enzimas PKS ya han sido previamente descritos en los géneros *Penicillium*, *Phoma*, *Epicoccum* y *Pseudeurotium*. Las enzimas PKS del género *Penicillium* han sido altamente estudiadas, encontrándose hasta 22 genes distintos en *P. marneffeii* (Woo y col., 2010). Para el género *Phoma*, se han descrito que algunas enzimas PKS están encargadas de la síntesis de esqualestatina, compuesto inhibidor de la esqualina sintasa, enzima clave en la síntesis de colesterol (Rojas y col., 2012). Algunas enzimas PKS del género *Epicoccum* poseen semejanza con las PKS de *Pyrenophora tritici*, encargada de la síntesis de pigmentos amarillos (Rojas y col., 2012). La producción de pigmentos también fue observada en las cepas antárticas de *Epicoccum* sp. que presentaron estas enzimas. Finalmente, también se han aislado los genes de las PKS del género *Pseudeurotium*, pero no han sido caracterizadas aún (Schmitt y col., 2005).

Por el contrario, no se ha encontrado en la bibliografía descripciones sobre la presencia de las enzimas PKS en hongos del género *Geomyces*. El hecho de que ciertos aislados presenten estas enzimas en su genoma, sugiere la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios del tipo policétido. De ser así, sería interesante poder estudiar la expresión de estos genes en diferentes condiciones de cultivo y optimizar la producción de compuestos por estas enzimas.

Con respecto a los genes de las enzimas NRPS, se encontró que 56 hongos poseen estos genes en su genoma (64,3%). Los géneros *Aureobasidium* (representado por el aislado 071209-E6-C2-A-A-A) y *Phoma* (representado por el aislado 131209-E4-C1-III-GPY-B) fueron los únicos que no las presentaron.

De acuerdo con estos resultados, este sería el primer reporte de la presencia de genes de las enzimas NRPS en los géneros *Geomyces*, *Pseudeurotium*, *Thelebolus* y *Epicoccum*. Esto sugiere que estas cepas poseen un buen potencial para la producción de metabolitos secundarios tipo péptidos no ribosomales, lo cual puede ser estudiado mediante optimizaciones en las condiciones de fermentación y análisis químicos.

La presencia de los genes de las enzimas PKS y NRPS ya ha sido estudiada en hongos asociados a esponjas marinas en el mar de China (Zhou y col., 2011). En este estudio se encontró 15 genes de PKS (9 correspondientes a PKS reductoras y 6 a PKS no reductoras) en 7 hongos (5 hongos del género *Penicillium* y 2 del género *Aspergillus*). Por otro lado se encontraron 4 fragmentos de genes de NRPS en 2 aislados pertenecientes al género *Penicillium*. La búsqueda de estos genes se realizó a un total de 177 aislados, lo que indica que el 3,9% de los aislados presentaron genes de enzimas PKS y 1,12% de los aislados presentaron genes de enzimas NRPS. Esto

permite comparar la frecuencia de estos genes en hongos obtenidos en otras latitudes, resaltando el hecho de que en este estudio sobre hongos marinos antárticos, se obtuvo mayor cantidad de hongos con genes para estas enzimas. Además, se encontraron genes de las enzimas PKS y NRPS en géneros en los cuales no se habían descrito anteriormente. Esto implica que existe un importante potencial metabólico en estos hongos antárticos, con genes de enzimas nunca antes registradas, pudiendo ser responsables de la síntesis de metabolitos secundarios novedosos.

4.3.2. Análisis de los extractos por cromatografía de placa fina (TLC)

La cromatografía en placa fina ha sido usada desde hace más de 20 años para determinar los perfiles de metabolitos producidos por hongos, permitiendo una identificación y comparación rápida de los compuestos producidos por hongos de la misma especie (Larsen y cols., 2005). En este estudio se realizó una comparación entre los perfiles metabólicos de los extractos de todos los hongos aislados pertenecientes a un mismo grupo taxonómico y también entre distintos géneros.

Como resultado, se encontró que existen compuestos compartidos por todos los grupos taxonómicos, al presentar igual coloración en los distintos métodos de revelación utilizados y además, una migración muy similar. De igual forma, también es posible encontrar compuestos que sólo son compartidos por la mayoría de los aislados de un mismo grupo taxonómico y no se encuentran en otros grupos. Como ejemplo, se encontró una banda gris compartida por varios aislados identificados como *Geomyces pannorum* y por un aislado identificado como *Geomyces sp.* Esto sugiere que el aislado identificado como *Geomyces sp.* pudiera tratarse de otra cepa de *Geomyces pannorum*

al compartir un perfil de metabolitos similar. Sin embargo, a pesar de las similitudes encontradas, la mayoría de los extractos (salvo 2 extractos del género *Cladosporium*) presentan perfiles de compuestos únicos, destacando principalmente aquellos perfiles que presentan compuestos con coloraciones llamativas bajo los distintos métodos de revelado utilizados. Estos resultados muestran que, si bien existen aislados con una misma identificación molecular, los metabolitos que producen son distintos, por lo tanto, corresponderían a aislados fúngicos diferentes.

Estas observaciones concuerdan con el hecho conocido de que los hongos producen compuestos semejantes, pero también son capaces de producir compuestos específicos restringidos a un género taxonómico, así como también es posible encontrar producción de compuestos especie específica o incluso cepa específica (Larsen y col., 2005).

Por otro lado, mediante la utilización de distintas técnicas de revelado (Luz UV y reactivo de Liebermann) es posible tener una noción general sobre el tipo de compuestos presentes. Al revelar las placas con luz UV 356 nm se observa la presencia de compuestos celestes, que pueden corresponder a compuestos con anillos aromáticos o compuestos con varios enlaces dobles. También se observó la presencia de compuestos con coloraciones menos comunes como amarillo (posiblemente aldehídos, ácidos carboxílicos o bencenos), rosado (posiblemente anillos aromáticos asociados a pirroles) y rojo (posiblemente derivados del triptófano) que indican la presencia de compuestos exclusivos de cada aislado. Al revelar las placas con luz UV 254 nm se confirma la presencia de compuestos aromáticos o con varios dobles enlaces conjugados al observarse como bandas negras u oscuras. Finalmente, el

revelado con reactivo de Liebermann permite revelar los compuestos tipo terpenos o esteroides.

4.3.3. Análisis ^1H -RMN

Además del estudio de los TLC, los perfiles metabólicos de todos los aislados se analizaron empleando la técnica de ^1H -RMN. Mediante esta técnica se pudo detectar la presencia de ciertos grupos funcionales presentes en los metabolitos secundarios. El uso de ^1H -RMN permite identificar los grupos funcionales de los metabolitos partir de distintas muestras (fluidos, organismos, tejidos o extractos) (Yosra 2012). Frecuentemente, esta técnica ha sido usada para estudiar el perfil de metabolitos producidos por plantas, con la finalidad de comparar los compuestos producidos en diferentes estados de estrés, frente a infección por patógenos o como una herramienta para visualizar las diferencias de perfil de compuestos secretados por líneas transgénicas. (Choi y col., 2004). En hongos, esta técnica no ha sido utilizada para la generación de perfiles metabólicos, sino más bien se utiliza una vez obtenidos compuestos puros.

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de señales similares y compartidas por todos los hongos. Sin embargo, dentro de un mismo grupo taxonómico se observan diferencias, principalmente, en la zona de señales de interés, que abarca desde 6 a 14 ppm. Esto permitió diferenciar dos grupos de espectros. El primer grupo está conformado por los espectros que presentan señales entre 6 y 12 ppm. Aquí encontramos: 19 espectros pertenecientes al grupo Fungal sp., 14 espectros del género *Geomyces*, los 6 espectros del género *Epiocum*, los 5 espectros del género

Thelebolus, 3 espectros del género *Penicillium*, los 3 espectros del género *Pseudeurotium*, el espectro del aislado 071209-E6-C2-II-GPY-B-D identificado como *Aspergillus versicolor*, el espectro del aislado 071209-E6-C2-A-A-A identificado como *Aureobasidium pullulans* y el espectro del aislado 131029-E4-C1-III-GPY-B identificado como *Phoma herbarum*. De este grupo, cabe destacar que la mayor cantidad de espectros con señales entre 11-12 ppm pertenecen al género *Geomyces* (14 espectros), al grupo Fungal sp. (12 espectros), al aislado 071209-E5-C2-II-B-A del género *Pseudeurotium* y al aislado 071209-E6-C1-A-A del género *Thelebolus*. Estas señales podrían corresponder a ácidos carboxílicos, señal considerada de alto interés, pues podrían corresponder a metabolitos con bioactividades nuevas.

El segundo grupo de espectros corresponde a aquellos que presentan señales entre 1 y 5 ppm, zona considerada de poco interés en este estudio, puesto que presenta demasiadas señales sobrepuestas. La ausencia de señales de interés en estos espectros puede deberse a que no todos los hongos producen compuestos de esas características bajo las condiciones ensayadas o que la concentración es tan baja que no es posible detectarlos.

Por otro lado, al tratarse de espectros realizados a extractos no purificados, las señales observadas corresponden al conjunto de compuestos presentes, por lo que no es posible identificar algún compuesto particular. Sin embargo, se evidenció, en la mayoría de los extractos, señales entre 5-6 ppm, lo que indicaría la presencia de compuestos con dobles enlaces. Así también, se encontró gran cantidad de espectros con señales entre 7-9 ppm, zona en la cual se pueden detectar anillos aromáticos, fenoles y aldehídos y finalmente, señales entre 11-12 que podrían corresponder a ácidos carboxílicos. Particularmente los espectros de los hongos identificados como

Geomyces y *Fungal* sp. presentaron éstas señales. Este tipo de funciones orgánicas son muy frecuentes en compuestos del tipo policétido o péptido no ribosomal, por lo que sugiere que puede tratarse de este tipo de compuestos, mas no es una prueba concluyente que afirme la presencia de este tipo de metabolitos en los extractos, ya que los compuestos alcaloides y terpenos también pueden presentarlos. Los policétidos son muy ricos en funciones orgánicas como cetonas, dobles enlaces, anillos aromáticos, metilos, entre otros. Por otro lado, los péptidos no ribosomales presentan principalmente funciones nitrogenadas y ácidos carboxílicos (como la penicilina), pero también es posible encontrar anillos aromáticos, alcoholes, entre otros.

Al comparar los resultados obtenidos con las técnicas de TLC y $^1\text{H-RMN}$, se observa que ambas técnicas permiten tener una noción general de los compuestos producidos por los hongos, encontrándose con ambas técnicas compuestos y señales compartidos por todos los aislados, así como también compuestos y señales únicas para cada grupo taxonómico y aislado, permitiendo reafirmar que los aislados que poseen la misma identificación molecular sí producen metabolitos diferentes, por lo que no se trataría de una redundancia de aislados fúngicos.

Por otro lado, ambas técnicas sugieren el tipo de funciones orgánicas presentes en los extractos de los aislados fúngicos, principalmente relacionado con la presencia de compuestos con anillos aromáticos o dobles enlaces, aldehídos y ácidos carboxílicos, que si bien son funciones orgánicas presentes en los compuestos policétidos o péptidos no ribosomales, no es posible afirmar que correspondan a éstos.

Finalmente, en algunos casos, como el del extracto 071209-E2-C1-A-A, que posee un perfil metabólico muy distinto en TLC y presenta señales entre 11-12 ppm en el

espectro de ^1H -RMN, es posible relacionar la presencia de un perfil de metabolitos interesantes en TLC con la presencia de señales de interés en un espectro de ^1H -RMN, sin embargo, esta relación no es verdadera para todos los extractos. Esto puede deberse a que en la técnica de TLC es posible visualizar compuestos interesantes, aunque se encuentren en baja cantidad (particularmente al ser revelados con luz UV 365 nm) y que posiblemente no pudieron ser detectados mediante la técnica de ^1H -RMN.

4.3.4. Evaluación de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los hongos obtenidos.

Los extractos de todos los aislados fúngicos fueron sometidos a un ensayo para medir la capacidad antimicrobiana y a un ensayo para medir la capacidad antioxidante, con la finalidad de testear su potencial bioactivo. En el ensayo antimicrobiano se encontró que 47 extractos (54%) poseen actividad contra alguna de las 4 bacterias ensayadas.

La actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas fue la que se encontró en mayor cantidad. Un total de 37 extractos (42,5%) presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus*, 4 extractos presentaron actividad contra *Clavibacter michiganensis* y 4 extractos presentaron actividad contra ambas bacterias. En cambio, sólo 18 extractos (20.4%) presentaron actividad antimicrobiana contra la bacteria Gram negativa *Xanthomonas campestris* y 4 extractos presentaron actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Xanthomonas campestris*.

Los géneros que presentaron actividad antimicrobiana contra alguna de las 4 bacterias fueron: *Geomyces*, *Epicoccum*, *Thelebolus*, *Cladosporium* y *Penicillium*. Existen antecedentes que reportan estos géneros como fuentes de compuestos con actividad

antimicrobiana. Los hongos del género *Penicillium* son conocidos por secretar numerosos metabolitos, entre ellos, compuestos antimicrobianos, como la ya conocida Penicilina. A partir del aislado antártico *Geomyces* sp. se ha obtenido compuestos antimicrobianos derivados del ácido astérico (Li y col., 2008), así como también se han descrito compuestos antimicrobianos derivados de la Cis-decalina en cepas de *Geomyces pannorum* (Parish y col., 2009). Desde el hongo *Epicoccum purpuracens* se ha obtenido la Epicoccamide, compuesto derivado del ácido tetrámico que presenta actividad antimicrobiana (Wright y col., 2003), así también se han obtenido las Epicoccarinas (derivados también del ácido tetrámico) desde cepas de *Epicoccum* sp. (Wangun & Hertweck, 2007). Desde muestras de lagos antárticos también se han obtenido aislados pertenecientes al género *Cladosporium* que han demostrado tener actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* (Brunati y col., 2009).

En el estudio de Brunati y col., (2009), al analizar la diversidad fúngica presente en lagos antárticos y el potencial metabólico que presentan, no encontraron actividad antimicrobiana por parte de las cepas del género *Thelebolus*. Este antecedente difiere con los resultados encontrados, puesto que el aislado 071209-E6-CI-B-A, identificado como *Thelebolus* sp. fue uno de los que generó el mayor halo de inhibición contra la bacteria *Staphylococcus aureus*. Esto sugiere que los aislados fúngicos estudiados en el presente trabajo son una fuente promisoría de compuestos antimicrobianos.

Por otro lado, al revisar el estudio donde igualmente se ensayó la actividad antimicrobiana de los hongos asociados a esponjas marinas en China, se encontró que el 6% (11 de 177) de los aislados estudiados presentó actividad contra alguna bacteria. De estos, 8 extractos presentaron actividad contra bacterias Gram negativas y 6 extractos presentaron actividad contra bacterias Gram positivas. (Zhou y col., 2011).

Por otro lado, estudios sobre el potencial metabólico de hongos asociados a esponjas marinas en Irlanda, mostraron que el 18,75% los aislados posee actividad contra bacterias Gram positivas, siendo ésta la actividad más abundante (Baker y col., 2009). Al comparar estos antecedentes con los resultados obtenidos, se encuentra que los hongos asociados a esponjas marinas antárticas presentan un mayor porcentaje de aislados con actividad antimicrobiana (54%), lo que sugiere que estos hongos presentan mayor potencial para la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana que los encontrados en otras latitudes.

Con respecto a la actividad antioxidante, en el presente trabajo se encontró que 14 extractos (16%) presentan actividad antioxidante superior al 20% (considerando como 100% la capacidad antioxidante del ácido ascórbico, ver Materiales y Métodos). Esta actividad se concentró en los aislados pertenecientes a los géneros *Epicoccum*, *Penicillium*, *Geomyces*, *Thelebolus Aureobasidium* y el grupo Fungal sp. Los extractos de los hongos 071209-E2-C4-(PDA)-C-A y 071209-E2-C4-(PDA)-A-C, ambos identificados como *Epicoccum sp.* presentaron los mayores porcentajes de actividad antioxidante: 75% y 61% respectivamente. La actividad antioxidante ya ha sido descrita en hongos del género *Epicoccum*. Esta actividad se le atribuye a los polisacáridos que secretan (Sun y col., 2011).

El estudio de Thirunavukkarasu y col. 2012, realizado en el sur de India, es el único estudio donde se ha ensayado la actividad antioxidante por parte de hongos asociados a esponjas marinas. En dicho estudio se encontró que 10 aislados de un total de 21 (47,6%), presentaron actividad antioxidante, un porcentaje mayor que el encontrado en este trabajo, por lo que los hongos asociados a esponjas marinas antárticas no se presentan como una buena fuente de compuestos antioxidantes.

Al analizar en forma conjunta la presencia y/o ausencia de los genes de las enzimas PKS y NRPS en el ADN de los hongos y las bioactividades encontradas, los resultados muestran que el 66,6% de los hongos con algún tipo de bioactividad (antimicrobiana o antioxidante) presenta el genes de las enzima PKS o NRPS. De acuerdo con esto, es posible observar una correlación entre la existencia de los genes de las enzimas del metabolismo secundario y actividades de interés. Sin embargo, no es posible afirmar que los compuestos encargados de las bioactividades sean producidos por dichas enzimas, puesto que se requiere posteriores estudios de purificación de los compuestos bioactivos y estudio de los genes de para confirmarlo. Caso contrario, se encontraron hongos (si bien, la minoría), que presentaron algún tipo de bioactividad, sin embargo, no se encontraron los genes de las enzimas PKS y NRPS en el ADN de los hongos. Esto sugiere que la producción de metabolitos secundarios bioactivos puede ser llevada a cabo por otro tipo de enzimas del metabolismo secundario que no fueron detectadas en este trabajo. Así también se encontró hongos que presentaron los genes de las enzimas PKS y NRPS, pero no presentaron ninguna de las bioactividades ensayadas. Por un lado, esto sugiere que las vías metabólicas secundarias no fueron activadas por las condiciones bajo las cuales los hongos fueron fermentados, para lo cual sería necesario probar otras condiciones de cultivo para favorecer su activación. Pero por otro lado, la falta de actividad y la presencia de los genes de las enzimas también sugieren que los experimentos diseñados para la detección de bioactividad fueron escasos. De esta forma los extractos podrían tener otro tipo de actividad que no fue ensayada. Para ello sería útil desarrollar otros ensayos de screening como antitumorales, antifúngicos, inhibidores de quórum sensing, antivirales, etc.

En resumen, la presencia de los genes de las enzimas PKS y NRPS es un buen indicador para la selección de aislados con potencial metabólico promisorio, pero también es importante considerar las bioactividades encontradas a la hora de seleccionar aislados para posteriores estudios, incluso si no presentan los genes de las enzimas en su ADN, puesto que pueden existir otras vías metabólicas que sean las encargadas de la síntesis de los metabolitos secundarios de interés.

De manera interesante, se observa que 27 hongos (50%) con algún tipo de bioactividad posee un espectro de ^1H -RMN con señales de interés, pudiendo usarse esta técnica como método de selección de aislados para posteriores estudios. Sin embargo, la ausencia o presencia de estas señales de interés no es categórica al momento de querer determinar si un hongo presenta o no potencial metabólico, pues se encontraron extractos con las señales de interés mencionadas que no presentaron ninguna de las dos bioactividades estudiadas. Este hecho también permite discutir sobre si se realizaron pocos bioensayos para testear el potencial metabólico de los hongos, puesto que aquellos hongos que presentaron espectros con señales de interés pero no ninguna de las bioactividades ensayadas, pueden ser capaces de producir metabolitos cuyas actividades no es posible detectar con los ensayos antimicrobiano y antioxidante. Para ello sería necesario ampliar la búsqueda de bioactividades usando ensayos antitumorales, antifúngicos, entre otros.

El uso de variadas formas de screening (químico, bioensayos y molecular), permiten tener una noción inicial sobre el potencial metabólico que pueden presentar estos hongos a la hora de buscar metabolitos secundarios de interés. También sugiere que si ciertos hongos no presentaron alguna actividad visible, se puede deber a las condiciones de crecimiento que no favorecieron la expresión de las vías del

metabolismo secundario. Para ello sería necesario optimizar las condiciones de crecimiento en cuanto a la temperatura, fuente de carbono, salinidad, entre otras.

Finalmente, si bien son pocos los estudios sobre el potencial metabólico de hongos filamentosos antárticos, si se ha estudiado el potencial metabólico de hongos obtenidos desde lagos en la Antártica. En dicho estudio se ha demostrado que los porcentajes de aislados fúngicos con actividades antimicrobianas son iguales o incluso mayores que en otros lugares del mundo, con mayor actividad contra organismos Gram positivos (Brunati y col., 2009). Estos antecedentes concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, la novedad de este trabajo es que, las bioactividades encontradas, provienen principalmente de aislados del género *Geomyces* y no de hongos cosmopolitas como se ha descrito por otros autores. Así pues, el grupo *Geomyces*, además de presentar una alta biodiversidad en el ambiente marino, también presenta un alto potencial metabólico, por lo que se constituye como una excelente fuente de compuestos bioactivos novedosos para futuros estudios químicos.

5. CONCLUSIONES

- Las esponjas marinas antárticas presentan una biodiversidad fúngica que poseen composición y abundancia de especies distintas de la biodiversidad fúngica que se ha encontrado en esponjas marinas de otros puntos del planeta. Este es el primer reporte de hongos del género *Thelebolus* asociado a esponjas marinas. Destaca también que los hongos del género *Geomyces* se encuentran en gran abundancia en las esponjas marinas antárticas.
- Las secuencias ITS de los aislados que fueron identificados como pertenecientes a los géneros *Geomyces* y *Thelebolus*, presentan alta homología con las secuencias ITS de cepas fúngicas aisladas desde suelo antártico. Lo anterior, refuerza la hipótesis de que estos géneros son nativos de la región Antártica.
- En la Antártica, la biodiversidad fúngica asociada a esponjas marinas difiere de la biodiversidad fúngica terrestre descrita en otros estudios, con menor preponderancia de especies cosmopolitas en el medio marino. Esto puede indicar que los hongos aislados desde esponjas marinas no son el resultado de un arrastre de esporas desde la tierra al medio marino.
- Mediante técnicas moleculares no fue posible identificar el 40,2% de los aislados fúngicos, lo que sugiere que las esponjas marinas antárticas pueden ser una buena fuente para la búsqueda de nuevas especies fúngicas, particularmente dentro de las clases taxonómicas Leotiomycetes y Sordariomycetes que fueron detectadas mediante un análisis filogenético.

- La caracterización morfológica permitió diferenciar a los aislados que poseen la misma identificación molecular. Así también se encontró hongos capaces de secretar pigmentos, otorgándole características únicas a ciertos aislados fúngicos. Dichos pigmentos presentan interés para el desarrollo de algún producto biotecnológico.
- El 82,7% los aislados crece mejor a 15°C, clasificándose como psicrotolerantes. Estos aislados pertenecen al género *Geomyces*, *Phoma*, *Thelebolus*, *Penicillium* y el grupo Fungal sp. Sólo 2 aislados, 071209-E6-C1-A-A y 071209-E4-C4-A pertenecientes al género *Thelebolus* presentan carácter psicrófilico, pues no lograron crecer a 25°C y sí a 15°C. Los aislados pertenecientes a los géneros *Epicoccum*, *Aspergillus* y *Aureobasidium* presentaron carácter mesófilo al presentar mayor crecimiento a 25°C.
- El 62,1% y 54,3% de los hongos identificados como *Geomyces* y Fungal sp., respectivamente, presentaron crecimiento dependiente de la temperatura de incubación en el medio de cultivo con nitrito.
- La actividad antimicrobiana fue la más abundante encontrada entre todos los hongos, con mayor actividad contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Clavibacter michiganensis*.
- La actividad antioxidante se encontró en un bajo número de extractos, indicando que estos aislados fúngicos no son una buena fuente de compuestos antioxidantes. Una excepción son los dos aislados del género *Epicoccum* que sí presentaron alta capacidad antioxidante con respecto al ácido ascórbico.

- Los genes de las enzimas PKS se encontraron en 23 aislados fúngicos hongos, con 22 aislados con los genes de las enzimas PKS no reductoras y 5 aislados con los genes de las enzimas PKS reductoras. El gen de la enzima NRPS fue la más abundante, pues un 64,3% de hongos lo presenta. Esta es la primera vez que se reporta la presencia de los genes de las enzimas PKS en el género *Geomyces* y el primer reporte de los genes de las enzimas NRPS en *Geomyces*, *Pseudeurotium*, *Thelebolus* y *Epicoccum*.
- Métodos químicos (TLC y ^1H -RMN) y biológicos (moleculares y bioensayos) de análisis permiten tener una noción general del perfil de metabolitos y el potencial metabólico de los hongos, aunque no es posible afirmar de qué tipo de compuestos se trata. Por lo tanto, para seleccionar una cepa promisoría para posteriores estudios, se deben emplear varios criterios de evaluación, ya que se ha visto que tienen resultados complementarios.
- Los aislados del género *Geomyces* fueron los más abundantes. Así también presentaron varias bioactividades de interés, por lo que podrían representar una importante fuente de productos naturales novedosos. Particularmente, la cepa 131209-E4-C10-D-A presenta alto potencial como fuente de compuestos antimicrobianos de amplio espectro, al presentar actividad antimicrobiana contra las 4 bacterias ensayadas.

6. REFERENCIAS

- Abdel-Lateff, A. (2004). "Secondary Metabolites of Marine-Derived Fungi." Universitäts-und Landesbibliothek Bonn.
- Amnuaykanjanasin A., Punya J., Paungmoung P., Rungrod A., Tachaleat A., Pongpattanakitshote S., Cheevadhanarak S., Tanticharoen M.(2005) Diversity of type I polyketide synthase genes in the wood-decay fungus *Xylaria* sp. BCC 1067. *FEMS Microbiology Letters*. 251(1):125-36
- Arenz B., Held B., Jurgens J., Farrell R., Blanchette R. (2006). Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 3057–3064.
- Arenz B. (2010). Fungi in Antarctica: a circumpolar study of biodiversity in soils and historic structures. Tesis doctoral, Universidad de Minnesota.
- Baker, P., J. Kennedy, Dobson A., Marchesi J. (2009). "Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of fungi associated with *Haliclona* simulans isolated from Irish coastal waters." *Marine biotechnology* (New York, N.Y.) 11: 540-547.
- Bérdy, J. (2005). "Bioactive microbial metabolites." *The Journal of antibiotics* 58: 1-27.
- Blackwell, M. (2011). "The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?" *American journal of botany* 98: 426-464.
- Bridge P y Spooner B.(2012). Non-lichenized Antarctic fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem?. *Fungal Ecology* 5: 381-394
- Brunati M, Rojas JL, Sponga F, Ciciliato I, Losi D, Göttlich E, de Hoog S, Genilloud O, Marinelli F. (2009). Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. *Marine Genomics* 2: 43-50
- Bugeja, H., M. Hynes, Michael J; Andrianopoulos, A. (2012). "AreA controls nitrogen source utilisation during both growth programs of the dimorphic fungus *Penicillium marneffelii*." *Fungal biology* 116: 145-199.
- Bugni, T. y Ireland C. (2004). "Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms." *Natural product reports* 21: 143-206.
- Butler M. y Buss A. (2006) Natural products--the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical pharmacology*. 71(7):919-29
- Chen M. y Johns M. (1994) Effect of carbon source on ethanol and pigment production by *Monascus purpureus* *Enzyme Microbiology Technology* vol. 16, July
- Choi, Y., E. Tapias, Elisabet C; Kim, Hye K; Lefeber, Alfons W; Erkelens, Cornelis; Verhoeven, Jacobus T., Brzin J., Zel, J., Verpoorte, R. (2004). "Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using ¹H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis." *Plant physiology* 135(4): 2398-2410.

Chown, S. (2012). "Antarctic marine biodiversity and deep-sea hydrothermal vents." *PLoS biology* 10.

Clardy, J. y C. Walsh (2004). "Lessons from natural molecules." *Nature* 432: 829-866.

Correa-Llanten D., Amenabar M., Blamey J. (2012) Antioxidant Capacity of Novel Pigments from an Antarctic Bacterium *The Journal of Microbiology* Vol. 50, No. 3, pp. 374-379

Fletcher L., Kerry E., Weste G. (1985). Microfungi of MacRobertson and Enderby Lands, Antarctica. *Polar Biology* 4:81-88

Freyre L. (1997) Introducción al estudio de la micología. Universidad Nacional del Litoral Pag. 33-36

Frisvad, J. C. y R. A. Samson (2004). "Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins." *Studies in Mycology* 49.

Gao Z., Li B., Zheng C., Wang G. (2008). Molecular Detection of Fungal Communities in the Hawaiian Marine Sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 74, No 19 p. 6091-6101

Gao, Q. y Z. Yang (2010). "Ectomycorrhizal fungi associated with two species of *Kobresia* in an alpine meadow in the eastern Himalaya." *Mycorrhiza* 20: 281-288.

Gesheva V.(2010). Production of antibiotics and enzymes by soil microorganisms from the windmill islands region, Wilkes Land, East Antarctica. *Polar Biology* 33:1351-1357.

Gesheva, V. y T. Negoita (2011). "Psychrotrophic microorganism communities in soils of Haswell Island, Antarctica, and their biosynthetic potential." *Polar Biology* 35.

Gesheva V. y Negoita T. (2012). Psychrotrophic microorganism communities in soils of Haswell Island, Antarctica, and their biosynthetic potential. *Polar Biology* 35:291-297

Gunde-Cimerman, N., S. Sonjak, Zalar P., Frisvad J., Diderichsen B., Plemenitaš A. (2003). "Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity." *Physics and Chemistry of the Earth*, 28: 1273-1278

Hanson, J. R., Ed. (2008). *The Chemistry of Fungi*, RSC Publishing.

Höller H, Wright AD, Matthee GF, König G, Draeger MS, Aust HJ, Schulz B.(2000). Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycology Res* 104:1354-1365

Hoog G., Göttlich E., Platas G., Genilloud O., Leotta G., Brummelen J. (2005). Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. *Studies in Mycology* 51: 33-76.

Keller, N., Turner G., Bennett J.(2005). "Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics." *Nature reviews. Microbiology* 3(12): 937-947

Kerry E. (1990). Microorganisms Colonizing Plants and Soil subjected to Different Degrees of Human Activity, Including Petroleum Contamination, in the Vestfold Hills and MacRobertson Land, Antarctica. *Polar Biology* 10:423-430

Koehn, F. y Carter G. (2005). "The evolving role of natural products in drug discovery." *Nature reviews. Drug discovery* 4: 206-226.

Laichmanová M., Selbmann L., Barták M. (2009). Diversity of microfungi from James Ross Island, Antarctica. *Structure and Function of Antarctic Terrestrial Ecosystems*, Masaryk University, Brno, Czech Republic 22-23 October 2009. Book of Abstracts and Contributed Paper, pp.10-14

Larsen, T., Smedsgaard J. Nielsen K., Hansen M. y Frisvad J. (2005). "Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery." *Natural product reports* 22: 672-767.

Le Calvez, T., G. Burgaud, Georges S., Vandenkoornhuyse P. (2009). "Fungal diversity in deep-sea hydrothermal ecosystems." *Applied and environmental microbiology* 75: 6415-6436.

Li Q. y Wang G., (2009), Diversity of fungal isolates from three Hawaiian marine sponges *Microbiological Research* 164: 233—241

Li Y., Sun, B., Liu S., Jiang L., Liu X., Zhang H., Che Y. (2008). Bioactive Asterric Acid Derivatives from the Antarctic Ascomycete Fungus *Geomyces* sp. *Journal of Natural Product*. 71:1643—1646

Li, J. y Vederas J. (2009). "Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?" *Science (New York, N.Y.)* 325: 161-166.

Liu y Nair M. (2010). An Efficient and Economical MTT Assay for Determining the Antioxidant Activity of Plant Natural Product Extracts and Pure Compounds *Journal of Natural Product*. 73: 1193—1195

Lin T. y Demain A. (1991) Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments. *Applied Microbiology Biotechnology* 36:70-75

Loque CP, Medeiros AO, Pellizzari FM, Oliveira EC, Rosa CA, Rosa LH. (2010). Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. *Polar Biology* 33:641-648

Malosso, E., Waite I, English L, Hopkins D., O'Donnell A (2006). "Fungal diversity in maritime Antarctic soils determined using a combination of culture isolation, molecular fingerprinting and cloning techniques." *Polar Biology* 29: 552-1113.

Marshall W. (1997). Seasonality in Antarctic Airborne Fungal Spores. *Applied an Environmental Microbiology*, 63: 2240—2245

Marzluf G. (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 1997, 61(1):17.

McClintock, J., Amsler C., Charles D; Baker, B.; van Soest R. (2005). "Ecology of antarctic marine sponges: an overview." *Integrative and comparative biology* 45: 359-427.

Chown S. (2012) Antarctic marine biodiversity and deep-sea hydrothermal vents. *PLoS biology*. 10(1):e1001232

Mueller G., Bills G., y Foster S. (2004) Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods. Pag 301.

Newman, D., Cragg G., Snader K. (2003). "Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002." *Journal of Natural Products* 66: 1022-1059.

Onofri S, Zucconi L, Tosi S (2007) *Continental Antarctic Fungi*. IHWVerlag, Eching, Germany.

Ortholand, J.-Y. y Ganesan A. (2004). "Natural products and combinatorial chemistry: back to the future." *Current Opinion in Chemical Biology* 8(3): 271-280

Paz Z., Komon-Zelazowska M., Druzhinina I., Aveskamp M., Shnaiderman A., Aluma Y., Carmeli S. Ilan M., Yarden O. (2010). Diversity and potential antifungal properties of fungi associated with a Mediterranean sponge. *Fungal Diversity* 42:17-26

Parish CA, de la Cruz M, Smith SK, Zink D, Baxter J, Tucker-Samaras S, Collado J, Platas G, Bills G, DíezMT, Vicente F, Peláez F, Wilson K (2009) Antisense-guided isolation and structure elucidation of pannomycin, a substituted *cis*-decalin from *Geomyces pannorum*. *Journal of Natural Product* 72: 59-62

Pivkin M., Aleshko S., Krasokhin V. y Khudyakova Y. (2006). Fungal Assemblages Associated with Sponges of the Southern Coast of Sakhalin Island, *Russian Journal of Marine Biology* Vol. 32, No. 4, pp. 207-213.

Proksch, P., R. Ebel, Edrada R. Wray V. Steube K. (2003). "Bioactive natural products from marine invertebrates and associated fungi." *Progress in Molecular and Subcellular Biology* 37: 117-159.

Proksch P., Ebel R., Edrada R., Riebe F., Liu H., Diesel A., Bayer M., Li X., Lin W., Grebenyuk V., Müller W., Draeger S., Zuccaro A., Schulz B. (2008). Sponge-associated fungi and their bioactive compounds: the *Suberites* case. *Botanica Marina* 51: 209-218

Rainey F. y Oren A. (2006). Extremophiles. En *Methods in Microbiology*, Vol 35. Pp 371-374.

Richards T., Jones M., Leonard G., y Bass D.(2012) *Marine Fungi: Their Ecology and Molecular Diversity*. *Annual Review Marine Science* 4:495-522

Rishton, G. (2008). "Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues." *The American journal of cardiology* 101.

Rojas J. , Sette L., Araujo W., Garcez M., Ferreira da Silva L., Furlan R., Padilla G.(2012) The Diversity of Polyketide Synthase Genes from Sugarcane-Derived Fungi *Microbiology Ecology* 63:565-577

Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, Zucconi L, Onofri S. (2007). Fungi in Antarctica. *Review Environmental Science Biotechnology* 6: 127-141

Schmitt, E., Moore C., Krastel P. y Petersen F.(2011). "Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective." *Current Opinion in Chemical Biology* 15: 497-504.

Schmitt I., Martín M., Kautz S., Lumbsch H., (2005) Diversity of non-reducing polyketide synthase genes in the Pertusariales (lichenized Ascomycota): A phylogenetic perspective *Phytochemistry* 66:1241-1253

Slightom J., Metzger B., Luu H., Elhammer A. (2009) Cloning and molecular characterization of the gene encoding the Aureobasidin A biosynthesis complex in *Aureobasidium pullulans* BP-1938. *Gene* 431:67–79

Sun HH, Mao W-J, Jiao J-Y, Xu J-C, Li H-Y, Chen Y, Qi X-H, Chen Y-L, Xu J, Zhao C-Q, Hou Y-J, Yang Y-P (2011) Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by the marine fungus *Epicoccum nigrum* JJY-40 and their antioxidant activities. *Marine Biotechnology* 13:1048–1055

Teichert I y Nowrousian M (2011) Evolution of genes for secondary metabolism in fungi. In: Pöggeler S, Wöstemeyer J (eds) *Evolution of fungi and fungal-like organisms*, The Mycota XIV, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 231-257

Thirunavukkarasu N, Suryanarayanan TS, Girivasan KP, Venkatachalam A, Geetha V, Ravishankar JP, Doble M (2012) Fungal symbionts of marine sponges from Rameswaram, southern India: species composition and bioactive metabolites. *Fungal Diversity* 55: 37-46

Tosi S., Casado B., Gerdol R., Caretta G. (2002). Fungi isolated from Antarctic mosses. *Polar Biology* 25: 262–268

Tosi S., Onofri S., Brusoni M., Zucconi L., Vishniac H. (2005). Response of Antarctic soil fungal assemblages to experimental warming and reduction of UV radiation. *Polar Biology* 28: 470–482

Wangun H., y Hertweck C. (2007) Epicoccarines A, B and epipyridone: tetramic acids and pyridone alkaloids from an *Epicoccum* sp. associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa* *Organic Biomolecular Chemistry*, 5: 1702–1705

Webster N., Negri A., Munro M. y Battershill C. (2004) Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges. *Environmental Microbiology* 6 (3), 288–300

Webster, N. y Taylor M. (2012). "Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships." *Environmental Microbiology* 14: 335-381.

Wiese J., Ohlendorf B., Blümel M., Schmaljohann R., Imhoff J. (2011). Phylogenetic Identification of Fungi Isolated from the Marine Sponge *Tethya aurantium* and Identification of Their Secondary Metabolites. *Marine Drugs* 9, 561-585.

Woo P., Tam E., Chong K., Cai J., Tung E., Ngan A., Lau S., Yuen K. (2010) High diversity of polyketide synthase genes and the melanin biosynthesis gene cluster in *Penicillium marneffei*. *FEBS Journal* 277: 3750–3758

Wright A., Osterhage C., König G. (2003). Epicoccamide, a novel secondary metabolite from a jellyfish-derived culture of *Epicoccum purpurascens* *Organic Biomolecular Chemistry*, 1: 507-510

Yosra, B. (2012). "1H-NMR metabolomics: Profiling method for a rapid and efficient screening of transgenic plants." *African Journal of Biotechnology* 11.

Zhou, K., X. Zhang, Zhang F. y Li Z. (2011). "Phylogenetically diverse cultivable fungal community and polyketide synthase (PKS), non-ribosomal peptide synthase (NRPS) genes associated with the South China Sea sponges." *Microbial Ecology* 62: 644-698.

Anexo 1 Materiales y Métodos

Equipos

- Termociclador Eppendorf Modelo 22331HAMBURGO,
- Microcentrífuga BOECO Modelo m-240r
- Espectrofotómetro Shimadzu Modelo UV-mini-1240,
- Incubadora LabTech Modelo LBI-150E
- Rotavapor IKA Modelo Rb10
- Incubadora-Shaker Labtech Modelo LSI-3016 R,
- Cámara de flujo laminar FiltroMat
- Cámara de electroforesis, Fermello

Reactivos

- Agar técnico Wrinkler
- Extracto de Levadura marca BD, distribuido por Bioslab.
- Extracto de Malta marca BD, distribuido por Bioslab.
- Tripticase soja agar (TSA) marca BD, distribuido por Bioslab.
- Potato dextrose agar (PDA), marca MERCK
- Creatina monohidrato, AppliChem
- Bromocresol púrpura, AppliChem
- Peptona, Oxoid
- Sacarosa, MERCK
- D(+)-Glucosa, MERCK
- Nitrato de Sodio, Synth
- Nitrito de sodio, Merck
- NaCl, Merck
- Di-potasio hidrogenofosfato trihidratado ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) MERCK
- Sulfato de Magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), AppliChem
- Cloruro de Potasio (KCl), BiosLab
- Sulfato férrico (II) (heptahidratado) ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) MERCK
- Sulfato de Zinc hepta-hidratado ($O_4SZn \cdot 7H_2O$) AppliChem
- Cobre (II) sulfato pentahidrato ($CuO_4S \cdot 5H_2O$) MERCK
- Glicerol Winkler

Reactivos Bioensayos

Antioxidante

- MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolbromuro), Invitrogen
- DMSO
- Ácido ascórbico, Merck
- Ácido Láurico, Merck

Antimicrobiano

- bencilpenicilina , sal de potasio CALBIOCHEM
- Estreptomycin sal sulfato, SIGMA-ALDRICH

Cepas bacterianas

- *Staphylococcus aureus* ATCC25922
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Clavibacter michiganensis* 807
- *Xanthomonas campestris* 833

Material biología molecular

- Etanol Absoluto , Merck
- Alcohol Isoamílico, Merck
- Cloroformo, Merck (CH₂Cl₂)
- Sodio-n-Dodecil Sulfato, CalbioChem
- Fenol saturado básico, Winkler
- GoTaq Green Master Mix, 2x, Promega
- 100 bp dna ladder, BiosLabs
- Agarosa LE AGR-LE-100 AXYGEN
- Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega

Secuencia de Partidores

| Partidor | Secuencia (5'→3') | Orientación |
|----------|----------------------------|-------------|
| ITS1 | TCCGTAGGTGAACCTGCG | Forward |
| ITS4 | TCCTCCGCTTATTGATATGC | Reverse |
| LC2 | GTI CCI GTI CCR TGC ATY TC | Reverse |

| | | |
|--------|-------------------------------|---------|
| LC3 | GCI GAR CAR ATG GAY CCI CA | Forward |
| LC5 | GTI GAI GTI GCR TGI GCY TC | Reverse |
| AUG003 | CCGGCACCACCggnnaarcchaa | Forward |
| AUG005 | GTCCACGGACGGATGTACarrachggvga | Forward |
| AUG006 | CCGGACCATGTCTGccngtbykrta | Reverse |
| AUG007 | GCTGCATGGCGGTGATGswrtsnccbcc | Reverse |

Material análisis químico

- Cromatografía placa fina TLC sílica gel 60F256, Merck.
- Metanol
- Diclorometano
- Eter de petróleo
- Acetato de etilo
- Cloroformo deuterado, Merck
- Reactivo de Lieberman Modificado (5% H₂SO₄ -MeOH)
- Filtro Nyltal (Filtros de nylon con un diametro de poro de 30 micras)

Medios de cultivo

Medio Czapek levadura autolisado (CYA) agar (Pitt, 1979):

| | |
|--|---------|
| NaNO ₃ | 0.3% |
| Extracto de Levadura | 0.5% |
| Sacarosa | 3.0% |
| K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O | 0.13% |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.05% |
| KCl | 0.05% |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0.001% |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O . | 0.0005% |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O . | 0.001% |
| Agar | 1.5% |
| Agua destilada, pH 6.3 ± 0.2 | |

Medio extracto de malta autolisado (MEA) agar:(Raper and Thom, 1949)

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Extracto de Malta (Difco) | 3.0% |
| Peptona bacteriológica | 0.1% |
| Glucosa | 2.0% |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.0005% |

ZnSO₄·7H₂O 0.001%
 Agar 2.0%
 Agua destilada, pH 5.3 ± 0.3

Medio Czapek-Dox (Cz) agar (Raper and Thom, 1949):

NaNO₃ 0.3 %
 Sacarosa 3.0%
 K₂HPO₄·3H₂O 0.13%
 MgSO₄·7H₂O 0.05%
 KCl 0.05%
 FeSO₄·7H₂O 0.001%
 CuSO₄·5H₂O. 0.0005%
 ZnSO₄·7H₂O · 0.001%
 Agar 1.5%
 Agua destilada, pH 6.3 ± 0.2

Medio nitrito sacarosa (NO₂) agar (Abe, 1956; Frisvad, 1981):

NaNO₂ 0.3 %
 Sacarosa 3.0%
 K₂HPO₄·3H₂O 0.13%
 MgSO₄·7H₂O 0.05%
 KCl 0.05%
 FeSO₄·7H₂O 0.001%
 CuSO₄·5H₂O 0.0005%
 ZnSO₄·7H₂O 0.001%
 Agar 2.0%
 Agua destilada, pH 6.3 ± 0.2

Medio creatina sacarosa (CREA) agar (Frisvad, 1981, 1985, 1993):

Creatina·1H₂O 0.3 %
 Sacarosa 3.0%
 K₃PO₄·7H₂O 0.16%
 MgSO₄·7H₂O 0.05%
 KCl 0.05%
 FeSO₄·7H₂O 0.001%
 CuSO₄·5H₂O 0.0005%
 ZnSO₄·7H₂O 0.001%
 Púrpura de bromocresol 0.005%
 Agar 1.5%
 Agua destilada, pH to 8.0 ± 0.2

ANEXO 2. Tabla IV. Diámetro de colonia después de 15 días de crecimiento a la temperatura indicada. Los valores corresponden al promedio de diámetro de 6 colonias de cada aislado fungico con su respectivo valor de desviación estándar.

| Genotipo | Nombre | 15°C | | | | | | 25°C | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|----------------------------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|--|--|--|--|--|--|--|
| | | PDA | MEA | CZ | NO2 | CREA | CYA | PDA | MEA | CZ | NO2 | CREA | CYA | | | | | | | |
| Genotipo 1 | <i>Fungal sp.</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 071209-E2-C1-A-A | 1,9±0,14 | 1,5±0,0 | 2,4±0,12 | 2±0 | 2,1±0,0 | 2,6±0,14 | 0,8±0,05 | 0,7±0,0 | 1,3±0,05 | 0±0 | 1,0±0,0 | 1,1±0,0 | | | | | | | |
| | 071209-E2-C5-A-C | 2,0±0,04 | 1,5±0,0 | 2,4±0,08 | 0±0 | 2,1±0,10 | 2,0±0,19 | 0,9±0,08 | 0,7±0,04 | 0,9±0,08 | 0±0 | 0,6±0,19 | 0,8±0,08 | | | | | | | |
| | 071209-E4-C2-A-A | 2,1±0,12 | 1,5±0,19 | 2,0±0,39 | 2,0±0,11 | 2,3±0,08 | 2,3±0,11 | 1±0,044 | 0,6±0,10 | 1,4±0,12 | 0,7±0,24 | 0,9±0,07 | 1,2±0,21 | | | | | | | |
| | 071209-E4-C2-A-B | 2,0±0,08 | 2,0±0,04 | 2,3±0,19 | 1,8±0,19 | 2,3±0,15 | 2,3±0,33 | 0,7±0,06 | 0,5±0,05 | 0,6±0,08 | 0,5±0,12 | 0,8±0,05 | 0,7±0,06 | | | | | | | |
| | 071209-E4-C2-B-B | 2,0±0,22 | 2,0±0,05 | 2,0±0,20 | 2,4±0,041 | 2,4±0,15 | 2,4±0,08 | 0,7±0,05 | 0,5±0,04 | 0,7±0,11 | 0,5±0,28 | 0,7±0,05 | 0,7±0,05 | | | | | | | |
| | 071209-E4-C2-C-D | 1,5±0,12 | 1,8±0,08 | 2,0±0,11 | 2,1±0,35 | 2,5±0,09 | 2,0±0,0 | 0,7±0,04 | 0,6±0,18 | 0,9±0,08 | 0,5±0,21 | 0,8±0,11 | 0,5±0,25 | | | | | | | |
| | 071209-E4-C3-A-A | 2,0±0,08 | 1,8±0,06 | 2,5±0,45 | 0,1±0,37 | 2,4±0,21 | 2,4±0,20 | 0,3±0,06 | 0,2±0,05 | 0,3±0,05 | 0±0 | 0,4±0,0 | 0,2±0,05 | | | | | | | |
| | 71209-E4-C3-A-B | 2,4±0,05 | 2,0±0,09 | 2,6±0,21 | 1,8±1,41 | 2,6±0,13 | 2,4±0,21 | 0,7±0,07 | 0,5±0,12 | 0,6±0,29 | 0±0 | 0,3±0,08 | 0,6±0,08 | | | | | | | |
| | 071209-E4-C3-A-C | 2,0±0,19 | 2,0±0,04 | 3,0±0,08 | 0±0 | 2,3±0,08 | 2,3±0,20 | 0,2±0,15 | 0,3±0,06 | 0,3±0,21 | 0±0 | 0,3±0,09 | 0,1±0,1 | | | | | | | |
| | 071209-E4-C3-B-A | 2,2±0,08 | 1,8±0,08 | 3,3±0,12 | 2,15±0,07 | 2,7±0,13 | 2,3±0,0 | 0,5±0,12 | 0,5±0,08 | 0±0 | 0±0 | 0,5±0,12 | 0,5±0,25 | | | | | | | |
| | 071209-E4-C3-B-D | 2,0±0,04 | 2,0±0 | 2,6±0,08 | 0±0 | 2,5±0,12 | 2,5±0,13 | 0,3±0,12 | 0,3±0,13 | 0,6±0,13 | 0±0 | 0,4±0,08 | 0,3±0,24 | | | | | | | |
| | 071209-E4-C5-A-D | 4,9±0,37 | 4,9±0,23 | 3,0±0,25 | 1±0,11 | 3,0±0,37 | 3,0±1,44 | 4,0±0,28 | 4,0±0,08 | 3,2±0,29 | 1±0,18 | 2,5±0,23 | 4,5±0,26 | | | | | | | |
| | 071209-E4-C5-A-E | 1,8±0,06 | 1,8±0,09 | 2,7±0,13 | 0±0 | 2,3±0,25 | 1,8±0,10 | 1,2±0,08 | 1,0±0,09 | 0,8±0,05 | 0±0 | 0,6±0,08 | 1±0,12 | | | | | | | |
| | 071209-E4-C7-A-A | 1,9±0,13 | 1,9±0,14 | 2,0±0,23 | 1,6±0,14 | 2,0±0,10 | 2,5±0,15 | 1,3±0,09 | 0,8±0,13 | 1,5±0,09 | 0±0 | 1,2±0,22 | 1,6±0,18 | | | | | | | |
| | 071209-E4-C7-A-B | 2,3±0,07 | 2,0±0,42 | 1,8±0,10 | 0±0 | 1,8±0,14 | 2,3±0,08 | 1,3±0,11 | 1,0±0,05 | 1,3±0,08 | 0±0 | 1,3±0,08 | 1,6±0,07 | | | | | | | |
| | 071209-E4-C9-PDA-A-A | 2,0±0,08 | 1,3±0,08 | 2,6±0,37 | 0±0 | 2,1±0,19 | 2,0±0,15 | 1±0,11 | 0,8±0,06 | 1,6±0,56 | 0±0 | 1,3±0,08 | 1,3±0,16 | | | | | | | |
| | 071209-E4-C9-PDA-C-A | 2,0±0,28 | 1,5±0,08 | 2,6±0,15 | 0±0 | 2,5±0,12 | 2,5±0,08 | 0,8±0,21 | 0,6±0,14 | 1,1±0,13 | 0±0 | 1,0±0,33 | 0,9±0,16 | | | | | | | |
| | 071209-E4-C10-II(VERDE)-BB | 1,9±0,09 | 1,6±0,06 | 2,9±0,13 | 0±0 | 2,9±0,08 | 2,9±0,12 | 1,3±0,11 | 0,8±0,04 | 1,4±0,21 | 0±0 | 1,4±0,17 | 1,5±0,13 | | | | | | | |
| | 071209-E6-C1-III-A | 2,2±0,08 | 2,2±0,1 | 2,5±0,25 | 2,0±0,11 | 2,5±0,14 | 2,6±0,05 | 0,9±0,13 | 0,9±0,07 | 1,1±0,08 | 0,8±0,12 | 1,0±0,10 | 1,2±0,11 | | | | | | | |
| 071209-E6-C4-II-GPY-B-B | 1,9±0,19 | 2,0±0,12 | 2,4±0,16 | 1,7±0,23 | 2,5±0,05 | 1,6±0,27 | 1,1±0,08 | 1,0±0,04 | 1,3±0,05 | 0,76±0,25 | 1,1±0,08 | 0,8±0,17 | | | | | | | | |
| 071209-E6-C4-II(PDA)-C-C | 2,0±0,08 | 1,8±0,08 | 2,5±0,20 | 1,5±0,18 | 2,1±0,19 | 2,5±0,13 | 1,2±0,10 | 1,1±0,20 | 1,1±0,15 | 0,2±0,03 | 1,0±0,05 | 1,0±0,08 | | | | | | | | |
| 071209-E6-C4-II | 1,7±0,08 | 1,9±0,05 | 2,4±0,08 | 0,6±0,51 | 2,2±0,17 | 2,4±0,16 | 0,8±0,12 | 0,9±0,05 | 0,9±0,08 | 0±0 | 0,8±0,12 | 1,1±0,14 | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|------------|-------------------------|---------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Genotipo 9 | GPY-D | 131209-E4-C11-II-A-B | 1,5±0,06 | 1,2±0,05 | 1,9±0,23 | 0±0 | 1,7±0,12 | 1,5±0,12 | 0,6±0,10 | 0,5±0,0 | 0,5±0,05 | 0±0 | 0,7±0,20 | 0,6±0,11 |
| | | 131209-E4-C11-II-A-C | 1,7±0,14 | 0,9±0,09 | 1,4±0,07 | 0±0 | 1,2±0,23 | 1,5±0,16 | 0,6±0,08 | 0,4±0,08 | 0,6±0,07 | 0±0 | 0,6±0,19 | 0,7±0,05 |
| | | 071209-E2-GPY-B | 2,6±0,11 | 2,3±0,13 | 3,3±0,19 | 2,4±0,39 | 2,5±0,09 | 2,8±0,11 | 1,3±0,12 | 1,2±0,18 | 1,5±0,06 | 0,5±0,0 | 1,1±0,09 | 1,0±0,08 |
| | | 071209-E2-C2-A-A | 2,7±0,16 | 2,8±0,08 | 2,8±0,08 | 2,4±0,06 | 2,0±0,06 | 2,8±0,15 | 0,9±0,08 | 0,8±0,08 | 1,2±0,11 | 0±0 | 1,0±0,07 | 1,1±0,15 |
| | | 071209-E2-C2-B-A | 2,4±0,06 | 2,1±0,10 | 3,3±0 | 3,0±0,21 | 2,9±0,07 | 3,4±0,08 | 0,8±0,08 | 0,8±0,05 | 0,9±0,05 | 0,5±0,22 | 0,8±0,08 | 1,0±0,05 |
| | | 071209-E2-C2-B-D | 2,7±0,24 | 2,3±0,11 | 3,4±0,19 | 2,5±0,28 | 2,4±0,39 | 3,6±0,17 | 0,8±0,08 | 0,9±0,07 | 1,0±0,08 | 0±0 | 0,9±0,14 | 1,0±0,05 |
| | | 071209-E2-C3-A-A | 1,8±0,15 | 1,5±0,04 | 1,8±0,08 | 1,5±0,17 | 2,0±0,0 | 1,8±0,14 | 0,6±0,05 | 0,6±0,04 | 0,7±0,04 | 0±0 | 0,6±0,05 | 0,8±0,13 |
| | | 071209-E2-C3-A-B | 2,3±0,12 | 2,3±0,13 | 3,4±0,22 | 2,4±0,08 | 2,7±0,12 | 3,4±0,08 | 1,1±0,0 | 1,1±0,12 | 1,2±0,20 | 0±0 | 1,0±0,05 | 1,3±0,05 |
| | | 071209-E2-C3-B-A | 2,5±0,08 | 2,5±0,05 | 2,5±0,38 | 0±0 | 2,5±0,06 | 2,6±0,14 | 0,6±0,12 | 0,4±0,07 | 0,5±0,08 | 0±0 | 0,5±0,08 | 0,8±0,05 |
| | | 071209-E2-C3-C-A | 1,9±0,06 | 1,9±0,12 | 2,2±0,10 | 0±0 | 2,3±0,10 | 2,2±0,15 | 0±0 | 0±0 | 0,2±0,04 | 0±0 | 0,4±0,08 | 0,5±0,04 |
| | | 071209-E3-C2-II-A-A-GPY | 1,8±0,11 | 1,88±s | 2,9±0,14 | 0±0 | 2,6±0,05 | 2,7±0,23 | 0,8±0,07 | 0,7±0,08 | 0,9±0,10 | 0±0 | 0,8±0,09 | 1,0±0,08 |
| | | 071209-E3-C2-II-GPY-C-A | 2,7±0,11 | 2,3±0,08 | 3,3±0,09 | 2,6±0,12 | 2,6±0,12 | 3,2±0,15 | 1,2±0,05 | 2,1±0,11 | 1,6±0,07 | 0,7±0,17 | 1,4±0,10 | 1,3±0,12 |
| | Genotipo 9 | | 131209-E2-C2-II-C-B | 1,8±0,0 | 1,7±0,0 | 2,9±0,0 | 2,5±0,0 | 2,5±0,0 | 2,5±0,0 | 0,2±0,0 | 0,2±0,0 | 0,3±0,0 | 0±0 | 0,1±0,0 |
| | | 131209-E2-C5-II-D-A | 2,7±0,0 | 2,4±0,0 | 2,5±0,0 | 2,1±0,0 | 2,8±0,0 | 3,3±0,0 | 0,7±0,0 | 0,7±0,0 | 0,9±0,0 | 0±0 | 0,6±0,0 | 0,8±0,0 |
| | | 131209-E2-C5-II-D-B | 2,6±0,0 | 2,2±0,0 | 2,8±0,0 | 2,7±0,0 | 2,7±0,0 | 3,1±0,0 | 0,5±0,0 | 0,7±0,0 | 0,5±0,0 | 0,2±0,0 | 0,4±0,0 | 0,6±0,0 |
| | | 131209-E2-C5-II-E-B | 2,9±0,08 | 2,6±0,11 | 3,3±0,08 | 2,6±0,08 | 2,6±0,36 | 3,1±0,05 | 1,0±0,10 | 0,9±0,12 | 0,9±0,10 | 0±0 | 1,0±0,11 | 1,3±0,12 |
| | | 131209-E4-C10-B-C | 2,4± | 2,5±0,51 | 2,9±0,14 | 2,2±0,12 | 2,5±0,08 | 3,1±0,08 | 0,6±0,15 | 0,6±0,11 | 0,5±0,14 | 0±0 | 0,7±0,27 | 0,6±0,23 |
| Genotipo 10 | | 131209-E4-C10-D-A | 2,4±0,09 | 2,3±0,04 | 2,4±0,35 | 2,8±0,07 | 2,9±0,14 | 2,9±0,08 | 0,7±0,18 | 1,0±0,11 | 0±0 | 0±0 | 1,2±0,16 | 0,6±0,19 |
| | | 131209-E4-C10-D-B | 2,5±0,08 | 2,0±0,15 | 2,5±0,15 | 0±0 | 2,5±0,05 | 2,6±0,18 | 0,8±0,05 | 0,2±0,23 | 0,8±0,20 | 0±0 | 0,8±0,07 | 0,8±0,05 |
| | | 131209-E2-C5-II-A-A | 2,4±0,14 | 1,9±0,16 | 2,4±0,26 | 1,4±0,14 | 2,4±0,19 | 2,3±0,27 | 0,5±0,24 | 0,4±0,20 | 0,7±0,04 | 0±0 | 0,4±0,12 | 0,5±0,10 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|---------------------------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|
| Genotipo 11 | 071209-E5-C3-II-B-A | 1,8±0,08 | 1,7±0,12 | 2,2±0,13 | 1,6±0,04 | 1,8±0,09 | 2,1±0,10 | 0,8±0,07 | 0,9±0,07 | 0,9±0,17 | 0±0 | 0,7±0,10 | 0,9±0,05 |
| Genotipo 12 | <i>Pseudovirgatum</i> sp. | 2,5±0,09 | 2,8±0,60 | 2,7±0,35 | 0±0 | 2,9±0,16 | 3,1±0,07 | 2,1±0,13 | 2,9±0,12 | 3,4±0,26 | 0±0 | 2,5±0,38 | 2,9±0,16 |
| Genotipo 13 | 071209-E5-C2-II-B-B | 2,8±0,05 | 2,5±0,04 | 2,4±0,07 | 0±0 | 2,6±0,50 | 2,6±0,15 | 2,6±0,24 | 3,2±0,17 | 3,3±0,14 | 0,9±0,2 | 2,5±0,37 | 2,5±0,14 |
| | 071209-E4-C2-B-A | 2,4±0,05 | 2,5±0,14 | 2,3±0,13 | 0±0 | 2,5±0,18 | 2,6±0,18 | 2,2±0,11 | 2,8±0,23 | 2,8±0,12 | 0±0 | 2,6±0,22 | 2,7±0,16 |
| Genotipo 14 | <i>Filobolus</i> sp. | 4,8±0,26 | 3,5±0,05 | 5,4±0,25 | 3,9±0,15 | 5,3±0,35 | 5,9±0,10 | 0±0,0 | 0±0,0 | 0±0,0 | 0±0 | 0±0,0 | 0±0,0 |
| | 071209-E4-C4-A | 4,6±0,15 | 3,6±0,17 | 5,2±0,14 | 2,1±1,01 | 4,6±0,21 | 5,8±0,23 | 0,1±0,12 | 0,3±0,0 | 0,2±0,10 | 2,9±0,11 | 0,3±0,0 | 0,3±0,0 |
| | 071209-E6-C1-A-A | 4,7±0,15 | 3,6±0,17 | 5,1±0,14 | 4,0±1,01 | 5,5±0,22 | 5,5±0,23 | 0±0 | 0±0 | 0±0 | 0±0 | 0±0 | 0±0 |
| | 071209-E6-C1-B-A | 5,1±0,85 | 3,9±0,99 | 5,3±0,15 | 2,6±0,0 | 4,6±0,51 | 6,2±0,19 | 1,8±0,30 | 0,9±0,13 | 3,0±0,32 | 1,2±0,0 | 1,9±0,33 | 2,3±0,18 |
| | 071209-E6-C1-B-B | 4,3±1,07 | 1,6±0,08 | 4,5±0,24 | 2,2±0,38 | 4,2±0,48 | 5,8±0,28 | 0,9±0,12 | 0,3±0,08 | 1,5±0,12 | 1,0±0,19 | 1,4±0,051 | 1,5±0,23 |
| Genotipo 15 | <i>Aspergillus</i> | 1,2±0,09 | 1,4±0,08 | 1,8±0,13 | 1,4±0,075 | 1,4±0,28 | 1,5±0,1 | 2,9±0,05 | 3,0±0,15 | 4,5±0,10 | 3,8±1,57 | 4,2±0,16 | 4,2±1,06 |
| | 071209-E6-C2-D-GPY-B-D | | | | | | | | | | | | |
| Genotipo 16 | <i>Penicillium</i> | 2,3±0,0 | 1,6±0 | 2,0±0,0 | 0,3±0,05 | 2,9±0,0 | 3,2±0,0 | 2,2±0,0 | 1,9±0,0 | 2,3±0,0 | 0,9±0,27 | 1,6±0,0 | 3,5±0,0 |
| | 071209-E1-C1-III-C | | | | | | | | | | | | |
| Genotipo 17 | 071209-E1-C1-III-B | 2,0±0,38 | 1,5±0,66 | 2,1±1,25 | 0,24±0,05 | 2,2±0,29 | 2,2±0,31 | 0,5±0,0 | 0,31±0,0 | 0,7±0,1 | 0±0 | 0,7±0,1 | 0,48±0,0 |
| | 071209-E3-C3-II-B-B | 4,1±0,64 | 3,4±0,45 | 4,0±0,07 | 3,3±0,69 | 4,0±0,0 | 4,9±0,69 | 2,6±0,37 | 2,4±0,73 | 3,0±1,19 | 3,2±0,28 | 3,1±0,60 | 2,6±0,48 |
| Genotipo 18 | 071209-E4-C1-III-A | 3,3±0,75 | 2,3±0,72 | 2,9±0,73 | 3,4±0,98 | 3,4±0,12 | 3,0±0,53 | 2,6±0,55 | 1,9±0,48 | 2,9±0,25 | 0,5±0,05 | 2,2±0,31 | 2,9±0,54 |
| | <i>Cladosporium</i> sp. | | | | | | | | | | | | |
| | 071209-E4-C8-A-C | 3,9±0,92 | 4,9±0,37 | 3,6±0,22 | 2,2±0,20 | 3,9±0,20 | 3,9±0,36 | 1,5±0,09 | 2,9±0,5 | 4,3±0,24 | 1,6±0,11 | 2,7±0,14 | 2,1±0,33 |
| Genotipo 19 | 071209-E6-C2-VERDE-A | 3,6±0,33 | 4,6±0,58 | 2,8±0,61 | 2,0±0,24 | 2,5±0,23 | 4,0±0,56 | 2,6±1,25 | 3,2±0,41 | 2,3±0,41 | 1,9±0,08 | 1,4±0,20 | 3,8±0,47 |
| | 071209-E6-C2-VERDE-B | 4,7±0,55 | 3,5±0,35 | 3,1±0,15 | 2,0±0,28 | 1,2±0,18 | 2,6±0,22 | 2,2±0,26 | 2,6±0,27 | 2,2±0,08 | 1,7±0,10 | 1,5±0,15 | 3,5±0,0 |
| Genotipo 20 | <i>Aureobasidium</i> | 3,1±0,65 | 4,6±0,28 | 2,6±0,18 | 0±0 | 1,8±0,15 | 3,0±0,15 | 3,8±0,19 | 4,1±0,44 | 2,8±0,46 | 0±0 | 3,0±0,0 | 3,5±0,28 |
| | 071209-E6-C2-A-A-A | | | | | | | | | | | | |
| Genotipo 21 | 131209-E4-C1-III- | 6,6±0,09 | 6,0±0,12 | 5,6±0,34 | 0±0 | 4,4±0,40 | 5,9±0,14 | 5,6±0,0 | 3,7±0,34 | 4,3±0,09 | 0±0 | 3,2±0,23 | 3,6±2,11 |

| Genotipo 22 | GPY-B | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-------|
| | <i>Epilobium</i> | 4,2 ±0,4 | 4,0 ±0,5 | 5,2 ±0,31 | 0 ±0 | 4,9 ±0,25 | 5,3 ±0,48 | 5,8 ±0,51 | 6,4 ±0,29 | 6,2 ±0,5 | 0 ±0 | 5,6 ±0,34 | 6,9 ± |
| 071209-E2-C4-PDA-A-A | | | | | | | | | | | | | |
| 071209-E2-C4-PDA-A-B | 3,2 ±0,39 | 2,8 ±0,20 | 6,1 ±0,39 | 0 ±0 | 5,3 ±0,42 | 6,9 ±0,58 | 5,6 ±0,28 | 7,1 ±0,25 | 6,8 ±0,40 | 0 ±0 | 5,8 ±0,42 | 7,3 ±0,27 | |
| 071209-E2-C4-PDA-A-C | 5,0 ±0,70 | 4,4 ±0,29 | 6,0 ±0,49 | 0 ±0 | 6,6 ±0,26 | 5,1 ±0,32 | 7,2 ±0,28 | 5,8 ±0,21 | 6,5 ±0,75 | 0 ±0 | 6,9 ±0,20 | 7,0 ±0,49 | |
| 071209-E2-C4-PDA-A-D | 4,4 ±0,35 | 5,5 ±0,81 | 4,1 ±0,32 | 0 ±0 | 5,3 ±0,41 | 4,9 ±0,71 | 2,8 ±0,27 | 4,7 ±1,13 | 6,5 ±0,32 | 0 ±0 | 5,8 ±0,25 | 5,1 ±0,28 | |
| 071209-E2-C4-PDA-A-E | 2,1 ±0,36 | 1,9 ±0,13 | 5,8 ±0,52 | 0 ±0 | 4,6 ±0,41 | 5,5 ±0,64 | 4,0 ±0,60 | 7,3 ±0,51 | 6,5 ±0,61 | 0 ±0 | 5,4 ±1,0 | 7,3 ±0,68 | |
| 071209-E2-C4-PDA-C-A | 2,9 ±0,23 | 2,8 ±0,38 | 7,0 ±0,0 | 0 ±0 | 5,7 ±0,14 | 6,2 ±0,49 | 4,4 ±0,51 | 5,6 ±0,26 | 7,0 ±0,0 | 0 ±0 | 5,4 ±0,17 | 6,4 ±0,48 | |