

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANALISIS

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
LICENCIADO EN MICROBIOLOGIA CLINICA Y APLICADA

“EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE PHELLINUS SPP. EN DIFERENTES
SUSTRATOS”

HUGO DAVID JATIVA
JOSÉ ENRIQUE OÑA NEACATO

DIRECTORA: DOCTORA JOSEFINA EGAS BENAVIDES

QUITO, 2010

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la Dra. Josefina Egas y a la Lic. Verónica Luna por su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para terminar esta investigación.

También quiero agradecer a todos los (docentes) profesores que compartieron conmigo sus conocimientos a lo largo de mi formación universitaria en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, quienes además difundieron su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, y en particular su motivación y optimismo que me ayudaron en momentos críticos de la Tesis.

DEDICATORIA

Queremos dedicar esta tesis a nuestras familias.

A nuestros padres, por su comprensión y apoyo, quienes están a nuestro lado en las adversidades para no desfallecer. A ellos les debemos lo que somos como persona, nuestros valores, nuestros principios, nuestra perseverancia y nuestro empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio.

RESUMEN

En el Parque Nacional Yasuní existe una gran biodiversidad de flora y fauna, la cual incluye a los organismos pertenecientes al reino fungi. Este proyecto se planteó realizar el cultivo in vitro de las cepas de *Phellinus sp.* encontradas en nuestra expedición por el Parque Nacional Yasuní; para esto se comparó el desarrollo de las cepas de este hongo según el sustrato utilizado en el medio de cultivo. Los sustratos utilizados fueron aserrín de álamo, aserrín de eucalipto, aserrín de roble y aserrín común.

Los resultados reflejaron una variación significativa en el desarrollo analizando la productividad de las cepas utilizadas, mientras que no hubo una diferencia significativa entre los sustratos analizados, el medio agar extracto de malta fue en el que mejor desarrollo se obtuvo de las cepas de hongos.

En el proceso de fructificación se utilizó la cepa MEBP 459 debido a que obtuvo un mejor desarrollo en los cultivos y el sustrato eucalipto. Al final se obtuvo desarrollo de los primordios del hongo mas no del cuerpo fructífero debido a que no se pudo determinar el iniciador de producción de cuerpos fructíferos.

SUMMARY

In the Parque Nacional Yasuní exists a great biodiversity of flora and fauna, which includes to the organisms pertaining to the fungi kingdom. This project considered to establish the in vitro culture of the strains of *Phellinus sp.* found in our expedition by the Parque Nacional Yasuní; therefore the strains of this fungus was compared according to the substrate used in cultures. The used substrates were sawdust of poplar, sawdust of eucalyptus, sawdust of oak and common sawdust.

The results reflected a significant variation in the development analyzing the productivity of the used stocks, whereas there was no a significant difference between the analyzed substrates, the means agar Malta extract was in which better development was obtained from the stocks of fungi.

In the fruition process stock MEBP 459 was used because it obtained a better development in the cultures and the substrate eucalyptus. In the end development of the primordios of the fungus but not of the fruitful body was obtained because the initiator of production of fruitful bodies could not be determined.

Contenido

CAPITULO I: Marco Referencial	8
1.1 Introducción	8
1.2 Antecedentes	9
1.3 Objetivos	
12	
1.3.1 Objetivo General	
12	
1.3.2 Objetivos Específicos	
12	
CAPITULO II: Marco Teórico	
13	
2.1 Taxonomía	
13	
2.2 Generalidades de <i>Phellinus sp.</i>	17
2.2.1 Características de la división Basidiomycota	17
CAPITULO III: Marco Metodológico	24
3.1 Recolección de muestras	24
3.2 Materiales y reactivos	25
3.2.1 Medios de cultivo	25
3.2.2 Sustratos	26
3.2.3 Materiales	26
3.2.4 Equipos	26
3.3 Manejo del experimento	27

3.3.1	Evaluación del crecimiento micelial	27
3.3.2	Fructificación	28
3.3.2.1	Preparación de inóculo	28
3.3.2.2	Sustratos para fructificación	28
3.3.2.4	Evaluación de la fructificación	29
CAPITULO IV: Resultados y discusión		31
4.1	Sustrato aserrín álamo	31
4.2	Sustrato aserrín común	32
4.3	Sustrato aserrín eucalipto	33
4.4	Sustrato aserrín roble	34
4.5	Medio control	35
4.6	Estadística descriptiva	
¡Error! Marcador no definido.		
4.7	Comparación de Resultados	38
4.7.1	Cepa MEBP 459	41
4.7.2	Cepa MEBP 389	42
4.8	Fructificación	42
CAPITULO V: Conclusiones y Recomendaciones		44
5.1	CONCLUSIONES	44
5.2	RECOMENDACIONES	46
BIBLIOGRAFIA		47
ANEXOS		52
FOTOGRAFIAS		56

CAPITULO I

MARCO REFERENCIAL

1.1 Introducción

Los hongos no son plantas, ni animales. Comparten características similares como el poseer núcleo, vacuolas y mitocondrias, y que les haría parecer a una típica célula eucariótica animal, pero el poseer pared celular los hace semejantes a plantas; sin embargo estas paredes fúngicas están formados por quitina, carbohidratos, proteínas y lípidos, compuestos muy estudiados por el potencial uso industrial de los hongos. Todos los hongos son quimiorganotrofos, carecen de clorofila por lo que no realizan fotosíntesis; poseen requerimientos nutricionales simples y sus procesos biosintéticos no son inusuales al resto de microorganismos²³.

Los hongos tienen diferentes orígenes por lo que ha sido difícil clasificarlos en una taxonomía específica, esto debido a los diferentes hábitats en los cuales pueden ser encontrados. Algunos son acuáticos de agua dulce y otros de ambientes marinos; sin embargo la mayoría son de ambientes terrestres, viven en el suelo o sobre plantas muertas

lo cual ayuda a la mineralización del carbono orgánico. Otros son parásitos de plantas y animales y causan grandes pérdidas económicas en la producción²³.

Los hongos están íntimamente relacionados con el ser humano, pudiendo ser estos benefactores o perjudiciales para la vida. Los hongos intervienen en procesos de fermentación, con los cuales es posible la fabricación de vino, cerveza, pan, queso, etc. En la industria farmacéutica a partir de los hongos se fabrican antibióticos y otras sustancias que pueden traer grandes beneficios a la salud. Los hongos son responsables de la desintegración de la materia orgánica, y en simbiosis con algunos árboles producen un mayor crecimiento de éstos; pero no todos son beneficiosos: algunos hongos son causantes de determinadas enfermedades en las plantas, (con deterioro de cosechas), en animales y humanos. Por consiguiente es muy importante el estudio de los hongos para así poder aprovechar de la mejor manera los beneficios que estos organismos puedan traer, pero también evitar los posibles daños que puedan causar.

1.2 Antecedentes

Las cepas de *Phellinus sp.* motivo de este estudio son nativas del Parque Nacional Yasuní.

El Parque Nacional Yasuní constituye uno de los sitios de mayor Biodiversidad en el mundo, donde habitan los más variados representantes de la fauna y flora tropical. Comprende una superficie de 982.000 hectáreas, que le convierten en la zona protegida más extensa del Patrimonio Nacional de Áreas Naturales. Dentro del parque está ubicada la Estación Científica Yasuní - PUCE, localizada en la ribera del Río Tiputini entre las provincias de Orellana y Pastaza; el objetivo de esta estación es favorecer logísticamente a estudiantes y profesionales que realizan diversas investigaciones para la preservación de

las especies que habitan en el parque.

En el marco del proyecto de investigación "Conformación de una colección de hongos políperos nativos de Yasuní y región noroccidente de Pichincha" financiado por la PUCE, se organizó una salida de campo, con la participación de docentes y estudiantes de la Escuela de Bioanálisis y dos profesores asesores de la micoteca de la Universidad Católica de Lovaine – Bélgica, para la recolección de hongos en la Estación Científica Yasuní PUCE en donde se obtuvo alrededor de 400 cepas de hongos, entre ellos del género *Phellinus* que se caracteriza por tener propiedades antitumorales sobre las células del cáncer de piel, pulmón, próstata, entre otros.

El cáncer constituye una importante causa de muerte en la humanidad y toda búsqueda para aliviar este mal tiene un justificativo profesional y humanitario. En la actualidad el cáncer constituye un síndrome con altos índices de mortalidad en los humanos inclusive en países desarrollados.

Este estudio planteó probar tres sustratos para el cultivo y multiplicación de *Phellinus sp.* en el laboratorio, con perspectivas de cultivarlo a gran escala bajo invernaderos, y así obtener una alternativa de consumo humano con las ventajas que posee este hongo medicinal. Al género *Phellinus* pertenecen hongos que crecen en los troncos de los árboles, sin importar si son árboles vivos o muertos, desarrollan cuerpos fructíferos que parasitan algunos árboles, especialmente frutales. Entre varias especies del género *Phellinus*, dos especies se destacan por sus bondades antitumorales: *Phellinus linteus* y *Phellinus igniarius*, las mismas que son utilizadas principalmente en China y Japón.

Phellinus linteus es un políporo con una superficie de color negro y un café amarillento en el revés, el micelio y el fruto producen sustancias activas, que previenen el cáncer, puede

ser utilizado como adyuvante en el caso de las quimioterapias; muchos estudios revelan variadas propiedades medicinales³⁵. Crece principalmente en árboles de sauce y olmo, con una edad mayor a 100 años, en estas condiciones el hongo puede desarrollarse por alrededor de 30 a 40 años produciendo un cuerpo fructificado útil para la medicina.

En algunos estudios se afirma que el micelio de este hongo es capaz de inhibir el 70% de sarcoma en ratones, y que el agua extraída del esporóforo tiene gran potencial antitumoral contra el carcinoma de Ehrlich en ratones¹⁵. Además en China se lo considera diurético, tónico digestivo y agente antidiarreico. En la medicina tradicional china se lo utiliza para curar el sangrado uterino, entre otras enfermedades⁷.

El libro antiguo de medicina oriental titulado “Serg Nongs Herbal classic” indica a *Phellinus linteus* como una de las medicinas superiores, es decir medicinas que son efectivas contra múltiples enfermedades que ayudan a mantener el balance del cuerpo y no tiene efectos secundarios, a pesar de ser consumido en altas dosis. El libro de Medicina Imperial, “Shin-nou-nonzokyo”, describe la eficacia del tratamiento con este hongo contra gonorrea, dolor abdominal, desordenes urinarios, problemas estomacales, hematuria, gripes, melena, tumor linfático, diarrea, insomnio, úlceras gástricas, artritis, nefritis, asma, bronquitis, hipertensión, envenenamiento, entre otras⁷.

El estudio realizado por Dr. Leo JLD Van Griensven y Dr. Huunb Savelkoul de Plant International, Wageningen University, demuestra que *Phellinus linteus* induce la producción de IL10 e IL4⁷, que mejora el sistema inmune.

En 2005 el Dr. Gaitán-Hernández evaluó el efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructíferos de *Phellinus sp.*, encontrando que existen diferencias en el desarrollo del hongo según el sustrato utilizado¹³.

En esta temática no existen estudios realizados en América del Sur y menos aún en el Ecuador.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Evaluar diferentes sustratos para el cultivo de *Phellinus sp.*

1.3.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el desarrollo del micelio de *Phellinus sp.* en los diferentes sustratos.
- Determinar el crecimiento de *Phellinus sp.* en el medio (agar extracto de malta) y suplementos (aserrín) a probar, en base a peso, porcentaje de eficiencia biológica, tiempo y fructificación.
- Determinar el mejor sustrato para producción de *Phellinus*.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica de cualquier organismo vivo se realiza utilizando un sistema denominado taxa, que comprende descripciones de reino, divisiones, clases, orden, familia, genero y especie, con el objetivo de relacionar las especies que posean las mismas características en una misma familia, diferenciarlas de otras y evitar las confusiones que ocurren con frecuencia al utilizar los nombres genéricos³⁵.

Para la clasificación se toma en cuenta aspectos citológicos, morfológicos y actualmente estudios mediante biología molecular. La taxonomía de los hongos se modifica rápidamente, no hay un sistema único debido a la gran variedad de tipos de hongos con diferencias en su estructura, difíciles de describir correctamente³⁵.

Los hongos son organismos que forman pequeños hilos llamados hifas que crecen a partir de las esporas: a continuación estas hifas se van a ramificar formando el micelio, el cual luego de la fertilización, entra en la etapa sexual formando esporas. La estructura de mayor tamaño que forme esporas toma el nombre de hongo (fructificación). Es importante tomar en cuenta que, aunque la fructificación es la parte visible del hongo, la mayor parte del organismo se encuentra en el interior del sustrato.

Los nombres científicos de los hongos al igual que los de microorganismos constan del nombre del género, que debe ser escrito con la primera letra mayúscula y el de la especie, que debe ser escrito con minúsculas, todas las especies que pertenecen al mismo género comparten características especiales que los identifican.

Existen varios caracteres que son tomados en cuenta para la clasificación de hongos, entre los que se puede nombrar:

- Aspecto macroscópico
- Tipo de hifa
- Presencia de esterigmatas (esporangióforo o conidióforo).
- Forma, tamaño y distribución de las esporas
- Presencia o no de rhizoides.
- Pruebas de identificación bioquímica (levaduras).

Los hongos macroscópicos se identifican observando las características principales del hongo fructificado, pero también es necesario tomar en cuenta las características microscópicas como por ejemplo la forma de la espora.

Los organismos vivos presentan en el interior de sus células ácidos nucleicos DNA y RNA, los cuales contienen la información genética del ser vivo, y han dado inicio a la clasificación taxonómica a través de la biología molecular. Así al analizar el DNA se pueden distinguir las mutaciones que diferencian a los seres vivos de diferentes poblaciones o especies, permitiendo valorar cuán cerca o cuán lejos están estos individuos filogenéticamente³⁵.

La técnica más utilizada en biología molecular es la PCR (Polymerase Chain Reaction), la

cual permite amplificar selectivamente fragmentos de DNA. Por tanto, es posible realizar un análisis comparativo de genes. Así, cada grupo taxonómico debería tener un DNA con características propias y grupos diferentes presentarían secuencias diferenciables, pudiendo así realizar una mejor clasificación taxonómica de los seres vivos. También es posible determinar qué grupos de organismos están más emparentados unos con otros y cuáles no. Además se puede realiza ampliaciones de secuencias proteínicas de RNA ribosomal para construir los arboles filogenéticos, esto debido a que las secuencias proteínicas del RNA ribosomal se cambia muy lentamente durante la evolución y posee registros históricos intactos¹⁷. En el caso de la división Eumycota se realiza el análisis de la subunidad ribosomal 18s.

El esquema taxonómico empleado para la clasificación del reino fungi contempla: divisiones, clase, subclase, orden, familia, género y especie. A continuación se nombra las divisiones existentes en la actualidad, ubicando el hongo en estudio¹⁹:

- División: Ascomycota: Poseen micelio septados, esporas asexuales exógenas (en las puntas o lados de las hifas) y esporas sexuales llamadas ascosporas.
 - Subdivisión: Taphrinomycotina
 - Clase : Neoelectomycetes
 - Clase: Pneumocystidomycetes
 - Clase: Schizosaccharomycetes
 - Clase: Taphrinomycetes
 - Subdivisión: Saccharomycotina
 - Saccharomycetes
- División: Pezizomycotina

- Clase: Arthoniomycetes
 - Clase: Dothideomycetes
 - Clase: Geoglossomycetes
 - Clase: Eurotiomycetes
 - Clase: Laboulbeniomycetes
 - Clase: Lecanoromycetes
 - Clase: Leotiomycetes
 - Clase: Lichinomycetes
 - Clase: Orbiliomycetes
 - Clase: Pezizomycetes
 - Clase: Sordariomycetes
- División: Basidiomycota: Poseen micelio septados, esporas asexuales exógenas (en las puntas o lados de las hifas) y esporas sexuales llamadas basidiosporas.
 - Subdivisión: Agaricomycotina
 - Clase: Agaricomycetes
 - Clase: Dacrymycetes
 - Clase: Tremellomycetes
 - Subdivisión : Pucciniomycotina
 - Clase: Agaricostilbomycetes
 - Clase: Attractiellomycetes
 - Clase: Classiculomycetes
 - Clase: Cryptomycocolacomycetes
 - Clase: Cystobasidiomycetes

- Clase: Microbotryomycetes
- Clase: Mixiomycetes
- Clase: Pucciniomycetes
- Subdivisión : Ustilaginiomycotina
 - Clase: Ustilaginomycetes
 - Clase: Exobasidiomycetes
- División: Chytridiomycota
- División: Glomeromycota¹⁹
 - Clase: Glomeromycetes: Es un grupo muy pequeño que se caracteriza por formar endomicorrizas con plantas herbáceas. Su reproducción es asexual, y en su mayoría son cenocíticos²³.
- División: Zygomycota
 - Clase: Trichomycetes
 - Clase: Zygomycetes: Habitan en el suelo y se los conoce por estar involucrados en el proceso de putrefacción. Tiene dos tipos de reproducción asexual y sexual (zigosporas)²³.

2.2 Generalidades de *Phellinus sp.*

Phellinus sp. pertenece a la siguiente clasificación¹¹:

- Reino: Fungi
- División: Basidiomycota
- Clase: Agaricomycetes
- Orden: Hymenochaetales

- Familia: Hymenochaetaceae
- Género: *Phellinus*

2.2.1 Características de la división Basidiomycota

Esta división junto a la Ascomycota forman el subreino denominado Dikarya, de los hongos superiores, como se los denominaba anteriormente. Se caracterizan por ser hongos filamentosos formados por hifas y por su reproducción sexual mediada por células especializadas denominadas basidias, que producen esporas externas llamadas basidiosporas, estas a menudo se reúnen para formar un himenio revestido por superficies particulares del cuerpo fructífero (basidiocarpo), o bien sobre basidias que surgen de receptáculos especiales que se forman en diversos órganos vegetales. A pesar de que existen algunos *Basidiomycota* que se reproducen asexualmente se los clasificó en este grupo debido a su similitud anatómica, a los componentes de la pared celular y a los análisis moleculares¹⁸.

El ciclo vital de un basidiomiceto consiste en que las basidiosporas germinen y den lugar a un micelio primario, para que luego se produzca la fusión de hifas, obteniendo así un micelio secundario. Este micelio, que se caracteriza por ser siempre septado, es el más abundante en la naturaleza. En este grupo de hongos se destacan: patógenos (royas y tizones), destructores de madera y comestibles como es el caso de los champiñones. También es importante mencionar que en este grupo existen algunos hongos que forman micorrizas¹⁶.

El micelio secundario puede reproducirse asexualmente por medio de conidios, por gemación y esclerocios. Sin embargo, es la reproducción sexual la que se presenta más frecuentemente. El micelio secundario se agrupa en tejidos especializados

formando el micelio terciario. A continuación se forman los cuerpos fructíferos, los basidiocarpos o basidiomas, algunos de los cuales son comestibles. Los basidios se disponen sobre o dentro del basidiocarpo, formando una nueva estructura denominada himenio¹⁹.

- Ciclo de vida

Los hongos de la subdivisión Basidiomycota, a diferencia de los animales y plantas, tienden a tener hifas haploides que representan a cada uno de los sexos, pero al mismo tiempo no se puede distinguir a qué sexo pertenecen. La reproducción de este tipo de hongos se da a través de un proceso denominado meiosis, el cual tiene lugar en una basidia diploide, que es la característica principal por la cual se distingue a los Basidiomycetes. Luego cada uno de los cuatro núcleos haploides presentes en la basidia migran a su propia basidiospora, estas basidiosporas son las que inician el proceso de formación de micelios denominados monocariones, los cuales no se diferencian por el sexo, se juntan a través de factores de compatibilidad presentes. Cuando la compatibilidad se establece se produce la formación del dicarion (en algunas ocasiones es mucho más fuerte que el monocarion), puede llegar a formar las fructificaciones del hongo con basidia o también únicamente basidia, en la cual se van a formar nuevos dicariones iniciando nuevamente el ciclo¹⁸.

- Clasificación

La clasificación adoptada para la división Basidiomycotina incluye a tres subdivisiones: Pucciniomycotina (Septobasidium y Royas), Ustilaginomycotina (algunos pertenecen al anterior grupo denominado hongos tizón), y Agaricomycetidae (Hymenomycetidae). Anteriormente esta subdivisión también

incluía las clases Homobasidiomycetes (verdaderas setas) y Heterobasidiomycetes, que no son utilizadas en la actualidad.

- Pucciniomycotina: Royas

Son hongos microscópicos, parásitos de plantas, con más de un huésped y con un ciclo en el que las basidias separadas transversalmente llevan un número determinado de esporas. Estos hongos dan lugar a la formación de pústulas redondeadas o lineares de color oxido, principalmente en las hojas y tallo, en este grupo se destaca la roya del trigo (*Puccinia graminis*).

- Ustilaginomycotina: Tizón del maíz

Estos hongos reciben este nombre debido a que dan lugar a la formación de masas grandes, parecidas a tumores llenas de polvo negruzco, debido a la gran cantidad de ustilagosporas presentes. En este grupo destacan el tizón de maíz (*Ustilago maydis*) y la caries de trigo (*Tilletia caries*).



Figura 6: *Ustilago maydis*

Fuente: Dieckow Bess. Common Smut of Sweet Corn (10)

- Agaricomycetes

La clase Agaricomycetes es casi idéntica a la antigua clase de los Homobasidiomycetes con la inclusión de los ordenes Auriculariales y Sebacinales. Esta clase incluye 17 órdenes entre las cuales destaca la orden Hymenochaetales.

Todos los hongos de esta clase se caracterizan por producir basidiocarpos, que incluyen hongos muy pequeños hasta grandes políporos, pudiendo medir más de un metro. Casi todos son hongos terrestres, aunque también existen algunos acuáticos, viviendo en gran variedad de hábitats, en los cuales su principal función es la descomposición de madera, incluyendo especies parasitas y simbióticas (ectomicorrizas)³⁶.



Figura 7: Ectomicorrizas

Fuente: González Ana María. Reino Fungi: Micorrizas (16)

- Hymenochaetales

La orden Hymenochaetales fue descubierta por filogenia molecular. Los hongos que pertenecen a esta orden se caracterizan por hifa en la cual la septa es del tipo dolíporo, además de contener parentosomas.

- Hymenochaetaceae

Esta familia se caracteriza principalmente por hongos que parasitan madera, atacando principalmente a los árboles coníferos y frondosos, mediante enfermedades de raíz, pudrición de la madera del tronco, etc³⁰.

- *Phellinus sp.*

Este género fue creado a partir de *Polyporus rubriporus*, el cual fue cambiado de nombre en 1886 a *Phellinus rubriporus*. El género posee las siguientes características: basidiocarpo perenne, himenio estratificado, coloración canela en varias tonalidades; hifas generativas con paredes finas, septadas e hifas esquelética con paredes gruesas³⁷.

El género *Phellinus* es el más grande de la familia *Hymenochaetaceae* con alrededor de 250 especies descritas y se encuentra ampliamente distribuido en las regiones templadas y tropicales del mundo³¹. Entre estas existen especies como *Phellinus pini* que provoca pudrición en varios tipos de arboles madereros, especialmente el género *Pinus* pinea, al cual produce pudrición blanca, y *Phellinus oxius* que provoca la pudrición de raíces de árboles frutales y ornamentales. Pero a pesar de que existen especies como las anteriores que causan grandes enfermedades a plantas y árboles, que provocan cuantiosas pérdidas económicas, también existen especies como *Phellinus linteus*, que proporciona grandes beneficios como suprimir el crecimiento, angiogenesis y el comportamiento invasor de las células cancerosas de seno.



Figura 8: *Phellinus sp.*

Fuente: Lindsey J. Some Miscellaneous June and July Basidiomycota Mushrooms (21)

- *Phellinus linteus*

Phellinus linteus es la especie más conocida del género *Phellinus*, principalmente debido a sus conocidas bondades medicinales, entre otras es inmunomodulador, antitumoral, antiinflamatorio, antibacterial, antioxidante, antiviral, etc. Estas características medicinales se encuentran, de acuerdo a estudios realizados en el 2002 por científicos coreanos, compuestos activos especialmente en los polisacáridos, ergosterol (provitamina D2), ciclofelitol, heteroglicopeptidos de *Phellinus linteus*.

A pesar de las bondades medicinales atribuidas a este hongo no se lo conoce universalmente. Sin embargo en la cultura asiática desde hace varios siglos se lo denomina “song gen” en la medicina china, “sang-hwang” en la coreana y “meshimakobu” en la japonesa. Crece principalmente en moras silvestres de bosques de Japón, Korea y China⁷.

Fue muy gratificante encontrar este hongo en la estación científica Yasuní – PUCE y

poder conservarlo en la colección de la Escuela de Bioanálisis.

CAPITULO III

MARCO METODOLOGICO

3.1 Recolección de muestras

Las cepas de *Phellinus sp.* motivo de este estudio pertenecen a una colección de hongos recolectados en la Estación Científica Yasuní PUCE en el mes de Junio, 2008 por investigadores de la Universidad Católica de Lovaine, profesores y estudiantes de la Escuela de Bioanálisis de la PUCE.

La recolección se realizó durante doce días, respondiendo a la siguiente organización:

- Participantes
 - Dos docentes de la Universidad de Lovaine – Bélgica expertos en micología.
 - Dos docentes, un asistente de investigación y 13 estudiantes de la Escuela de Bioanálisis.
 - Dos guías locales de Yasuní.
- Agenda de trabajo
 - Capacitación y entrenamiento en la recolección de cepas de hongos en el terreno por parte de los docentes de Lovaine en el laboratorio.
 - Capacitación y entrenamiento en la identificación macroscópica y microscópica de los hongos recolectados por parte de los docentes de Lovaine.

- Salidas de campo para la recolección de hongos. En cada mañana se señaló un sendero diferente. Se trabajó en grupos de dos personas, cada grupo recolectaba al menos diez cepas diferentes y se encargaba además de tomar fotografías a cada cepa recolectada.
- En las tardes en el laboratorio con la ayuda de los docentes de Lovaine se determinó por características macroscópicas el posible género para luego confirmarlo en base a características microscópicas, subcultivos, coloraciones, etc.
- Codificación de cepas recolectadas.
- Desecación y almacenamiento de las cepas identificadas y codificadas para trasladarlos al laboratorio de la Escuela de Bioanálisis.
- Siembra de las cepas en cultivo puro en agar papa dextrosa para trasladarlas al laboratorio de la Escuela de Bioanálisis.
- En el laboratorio se realizó la conservación de cepas en aceite mineral y en agua (Anexo1).

3.2 Materiales y reactivos

3.2.1 Medios de cultivo

- PDA: Este medio se utiliza para aislar la cepa pura y es útil para la observación de la morfología y coloración de la colonia. El alto contenido en carbohidratos (almidón y dextrosa) permite un rápido crecimiento. Se preparó hirviendo 200g de papa pelada, para luego cernir y obtener el líquido con almidón de la papa, luego se agregó 20g de dextrosa y 25g de agar; este medio se utilizó para la activación de las cepas de *Phellinus spp.*

- Agar Extracto de Malta: Este medio contiene extracto de malta utilizado como fuente de carbono y glucosa, que es el carbohidrato fermentable. Este medio se utilizó como control (Anexo 2).
- Agar extracto de malta más sustrato: Se preparó medios de cultivo con una mínima cantidad de extracto de malta (para inducir el crecimiento inicial) más el sustrato a evaluar como fuente de carbono (Anexo 3).

3.2.2 Sustratos

Los sustratos probados fueron los siguientes:

- Aserrín común
- Aserrín de álamo
- Aserrín de eucalipto
- Aserrín de roble

3.2.3 Materiales

Para realizar este proyecto se utilizó los siguientes materiales:

- Asas (bacteriológica y micológica)
- Cajas petri
- Petrifilm
- Botellas de vidrio de 500ml de capacidad

3.2.4 Equipos

Para realizar este proyecto se utilizaron los siguientes equipos:

- Autoclave

- Balanza
- Estereomicroscopio

3.3 Manejo del experimento

Dos cepas del hongo *Phellinus sp.* (MEBP 459 y MEBP 389) procedentes de la Estación Científica Yasuní - PUCE fueron utilizadas en este estudio. Las cepas fueron reactivadas y purificadas en PDA. Habiendo terminado el proceso de purificación se procedió de la siguiente manera:

- Se evaluó el crecimiento micelial en cajas petri suplementadas con los diferentes sustratos.
- Se evaluó el crecimiento del hongo en fundas de polipropileno con el sustrato respectivo.

3.3.1 Evaluación del crecimiento micelial

Se preparó cuatro medios de cultivo con extracto de malta en mínima cantidad y el sustrato a evaluar: aserrín común, aserrín de álamo, aserrín de roble y aserrín de eucalipto. Además se preparó agar extracto de malta sin sustrato que fue utilizado como control.

Para estandarizar la siembra se utilizó discos de 0.8cm de diámetro del cultivo del hongo, los cuales se inocularon en el centro de las cajas petri, que contenían el sustrato a evaluar; se realizaron tres repeticiones por sustrato y por cepa.

Las cajas inoculadas se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 12 días. Durante el periodo de incubación, se midió el diámetro de crecimiento micelial cada 48 horas. Esto se pudo realizar dibujando un plano cartesiano en la

tapa de la caja petri, utilizando el centro de la caja como el centro.

3.3.2 Fructificación

Para evaluar la fructificación de las cepas de *Phellinus sp.* MEBP 459 y MEBP 389 se procedió de la siguiente manera:

3.3.2.1 Preparación de inóculo

Se utilizó granos de cebada y trigo, las cuales fueron sometidas al siguiente procedimiento:

1. Se limpió las semillas eliminando maleza, insectos, basura, etc. Se remojó por 2 horas a fuego lento y se lavó con agua. Se dejó escurrir durante toda la noche.
2. Las semillas previamente humedecidas se colocaron en botellas de 500ml de capacidad, siguiendo la siguiente proporción: 100 gramos de cebada, 130 gramos de trigo con una humedad del 70%, para luego esterilizarlas en autoclave.
3. Con mucha precaución se tomó tres discos de 0.8cm de diámetro de las cepas crecidas en PDA por 12 días y se colocó dentro de las botellas y se cerraron con tapón de algodón, para producir el inóculo.
4. Estos inóculos se colocan en cajas de espuma flex a temperatura ambiente y en total oscuridad.
5. Una vez que el hongo colonizó todo el sustrato se procedió a la inoculación de los sustratos para fructificación.

3.3.2.2 Sustratos para fructificación

La fructificación se realizó con el sustrato eucalipto, esto debido a la gran cantidad

de bosques de eucalipto que existe en nuestro medio contrario a otro tipo de madera de difícil acceso como el álamo. Además el crecimiento micelial en este aserrín fue de los mejores.

1. Se utilizaron bolsas plásticas de polipropileno, las cuales fueron llenadas con 300 gramos del sustrato eucalipto y 300 gramos de la granos de cebada previamente humedecidos a 25-30 grados centígrados, de manera que la funda tuvo un peso final de 600 gramos.
2. Las fundas se esterilizaron en autoclave a 121 grados centígrados, 15 libras de presión por 15 minutos.
3. Las fundas fueron inoculadas con 1 – 4% de inóculo producido, y se incubaron a temperatura ambiente y en total oscuridad, durante 20 días o hasta que el sustrato este totalmente colonizado.
4. Una vez que el micelio cubrió totalmente el sustrato se perforaron las bolsas con agujeros de 2cm de diámetro para permitir la liberación de dióxido de carbono producido, esto como proceso para la inducción a la fructificación.
5. En un periodo de 20 a 25 días se obtuvo el desarrollo de los primordios, y a continuación se procedió a rehumidificar los bloques de sustrato cada dos días para obtener los cuerpos fructificos.

3.3.2.4 Evaluación de la fructificación

1. Se determinó el tiempo requerido para la producción de primordios
2. La evaluación de la fructificación se realizó mediante el conteo de primordios producidos en cada funda.
3. Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de eficiencia biológica aplicando la siguiente fórmula:

$$F = E/I * 100$$

donde: F = Porcentaje de eficiencia biológica.

I = ingreso especificado

E = egreso especificado

Al resultado obtenido mediante esta fórmula se puede denominar como la relación entre un ingreso, en este caso la cantidad de sustrato colocado en la funda (peso en gramos), y un egreso, la cantidad de primordios obtenidos (peso en gramos).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

Se trabajó dos cepas de *Phellinus sp.* obtenidas en la Estación Científica Yasuní - PUCE. Para cada análisis se realizaron tres repeticiones con cada cepa a continuación los resultados se describen:

4.1 Sustrato aserrín álamo

Tabla 1: RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICIAL DE PHELLINUS SP EN EL SUSTRATO ALAMO. MEDICION EN CENTIMETROS

TIEMPO	Cepa MEBP 459				Cepa MEBP 389			
	REPETICION			MEDIA	REPETICION			MEDIA
	1	2	3		1	2	3	
DIA 2	0.4	0.5	0.4	0.43333333	0.4	0.4	0.4	0.4
DIA 4	0.8	1.0	1.0	0.93333333	0.9	0.6	0.7	0.73333333
DIA 6	1.4	1.8	1.4	1.53333333	1.5	1.1	1.1	1.23333333
DIA 8	2.5	2.4	2.2	2.36666667	1.9	1.6	1.6	1.7
DIA 10	3.1	2.9	2.8	2.93333333	2.4	2.1	2.1	2.2
DIA 12	3.4	3.5	3.5	3.46666667	2.8	2.6	2.5	2.63333333

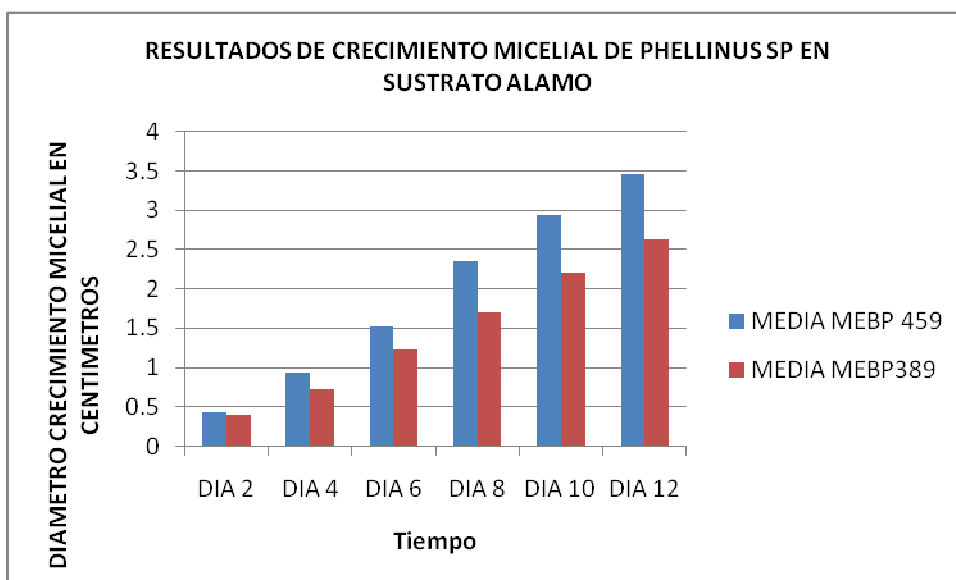


Gráfico 1: RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICELIAL DE PHELLINUS SP EN EL SUSTRATO ALAMO. MEDICION EN CENTIMETROS

Al analizar los resultados obtenidos con los sustratos aserrín álamo se observa que se obtuvo un mejor desarrollo de la cepa MEBP 459 en este sustrato.

4.2 Sustrato aserrín común

Tabla 2: RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICELIAL DE PHELLINUS SP EN SUSTRATO ASERRIN COMUN. MEDICION EN CENTIMETROS

TIEMPO	Cepa MEBP 459				Cepa MEBP 389			
	REPETICION			MEDIA	REPETICION			MEDIA
	1	2	3		1	2	3	
DIA 2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
DIA 4	0.8	0.9	1.0	0.9	0.4	0.4	0.4	0.4
DIA 6	1.4	1.5	1.4	1.43333333	0.4	0.4	0.4	0.4
DIA 8	2.5	2.2	2.2	2.3	0.4	0.4	0.4	0.4
DIA 10	3.1	2.7	2.8	2.86666667	0.4	0.4	0.4	0.4
DIA 12	3.4	3.1	3.5	3.33333333	0.4	0.4	0.4	0.4

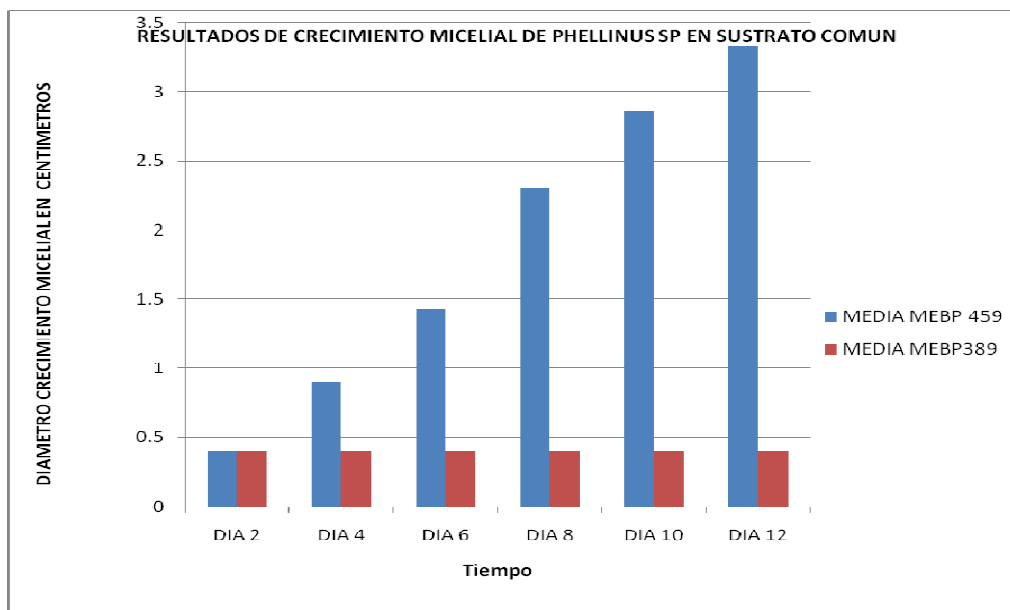


Gráfico 2: RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICELIAL DE PHELLINUS SP EN SUSTRATO ASERRIN COMUN. MEDICION EN CENTIMETROS

Al analizar los resultados obtenidos con los sustratos aserrín común observamos que con la Cepa MEBP 459 se obtuvo crecimiento con este tipo de sustrato, mientras que con la cepa MEBP 389 no se obtuvo crecimiento.

4.3 Sustrato aserrín eucalipto

Tabla 3: RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICELIAL DE PHELLINUS SP EN SUSTRATO EUCALIPTO. MEDICION EN CENTIMETROS

TIEMPO	Cepa MEBP 459				Cepa MEBP 389			
	REPETICION			MEDIA	REPETICION			MEDIA
	1	2	3		1	2	3	
DIA 2	0.5	0.6	0.4	0.5	0.4	0.7	0.6	0.56666667
DIA 4	1.2	1.3	0.8	1.1	0.6	1.0	1.2	0.93333333
DIA 6	1.7	1.8	1.2	1.56666667	1.2	1.2	1.7	1.36666667
DIA 8	2.6	2.3	1.7	2.2	1.5	1.6	2.1	1.73333333
DIA 10	3.3	3.2	2.2	2.9	1.8	1.9	2.8	2.16666667
DIA 12	3.5	3.5	2.8	3.26666667	2.1	2.1	3.0	2.4

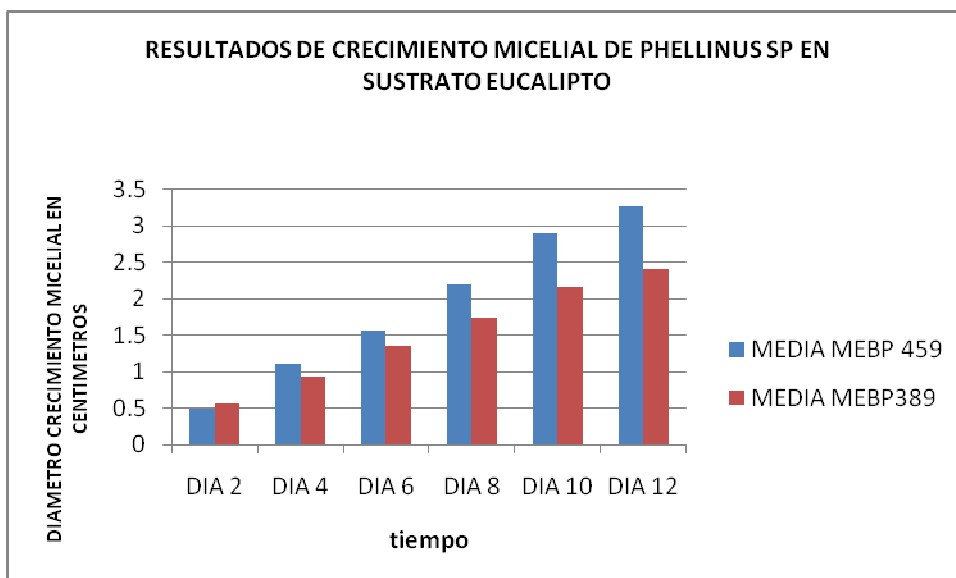


Gráfico 3: RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICELIAL DE PHELLINUS SP EN SUSTRATO EUCALIPTO. MEDICION EN CENTIMETROS

Al analizar los resultados obtenido podemos observar que en el sustrato aserrín de eucalipto se observó que la cepa MEBP 459 tuvo crecimiento micelial mayor al de la cepa MEBP 389 durante los doce días que duró la prueba.

4.4 Sustrato aserrín roble

Tabla 4: RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICELIAL DE PHELLINUS SP EN SUSTRATO ROBLE. MEDICION EN CENTIMETROS

TIEMPO	Cepa MEBP 459				Cepa MEBP389			
	REPETICION			MEDIA	REPETICION			MEDIA
	1	2	3		1	2	3	
DIA 2	0.6	0.4	0.4	0.46666667	0.4	0.8	0.7	0.63333333
DIA 4	1.1	0.8	1.0	0.96666667	0.8	1.1	1.1	1
DIA 6	1.6	1.4	1.7	1.56666667	1.1	1.3	1.3	1.23333333
DIA 8	2.5	2.3	2.4	2.4	1.6	2.0	1.6	1.73333333
DIA 10	3.1	2.9	2.8	2.93333333	2.2	2.5	2.0	2.23333333
DIA 12	3.5	3.2	3.5	3.4	2.7	2.9	2.2	2.6

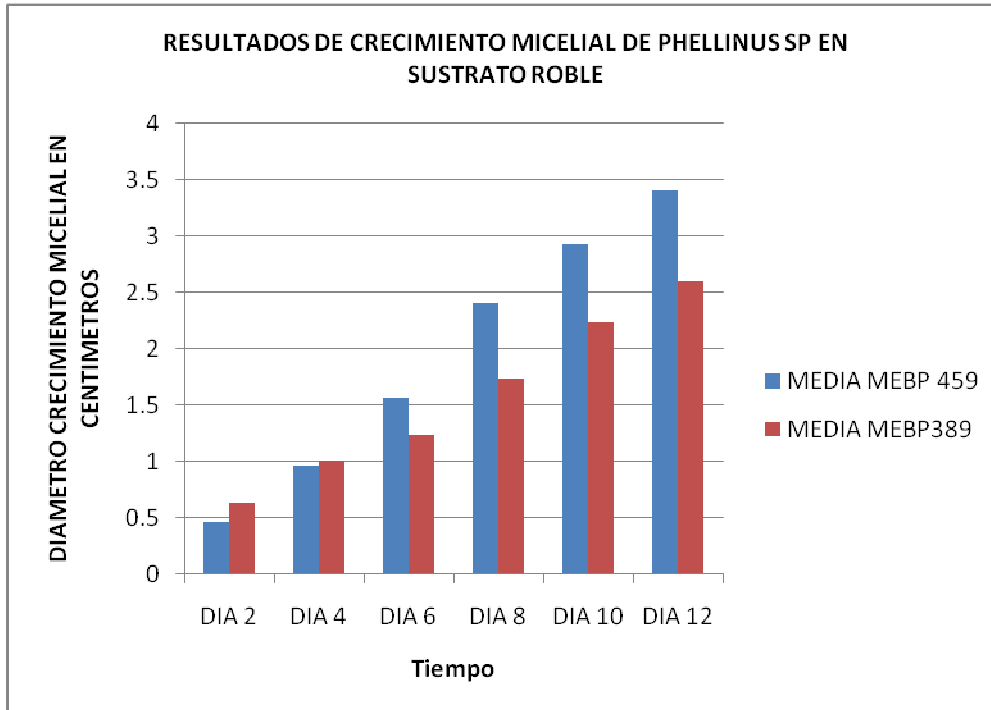


Gráfico 3: RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICELIAL DE PHELLINUS SP EN SUSTRATO ROBLE. MEDICION EN CENTIMETROS

Al analizar los resultados obtenidos en el sustrato aserrín de roble se observó que la cepa MEBP 459 tuvo un mejor crecimiento micelial que la cepa MEBP 389 durante los doce días que duró la prueba.

4.5 Medio control

Tabla 5: RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICELIAL DE PHELLINUS SP EN MEDIO CONTROL. MEDICION EN CENTIMETROS

TIEMPO	Cepa MEBP 459				Cepa MEBP 389			
	REPETICION			MEDIA	REPETICION			MEDIA
	1	2	3		1	2	3	
DIA 2	0.4	0.8	0.4	0.53333333	0.4	0.4	0.4	0.4
DIA 4	0.6	0.9	0.8	0.76666667	0.9	0.8	0.9	0.86666667
DIA 6	1.3	1.6	1.3	1.4	1.8	1.6	1.5	1.63333333
DIA 8	1.9	2.1	2.1	2.03333333	2.4	2.0	2.0	2.13333333
DIA 10	2.9	2.6	2.6	2.7	3.0	2.6	2.5	2.7
DIA 12	3.5	3.4	3.5	3.46666667	3.5	3.1	3.4	3.33333333

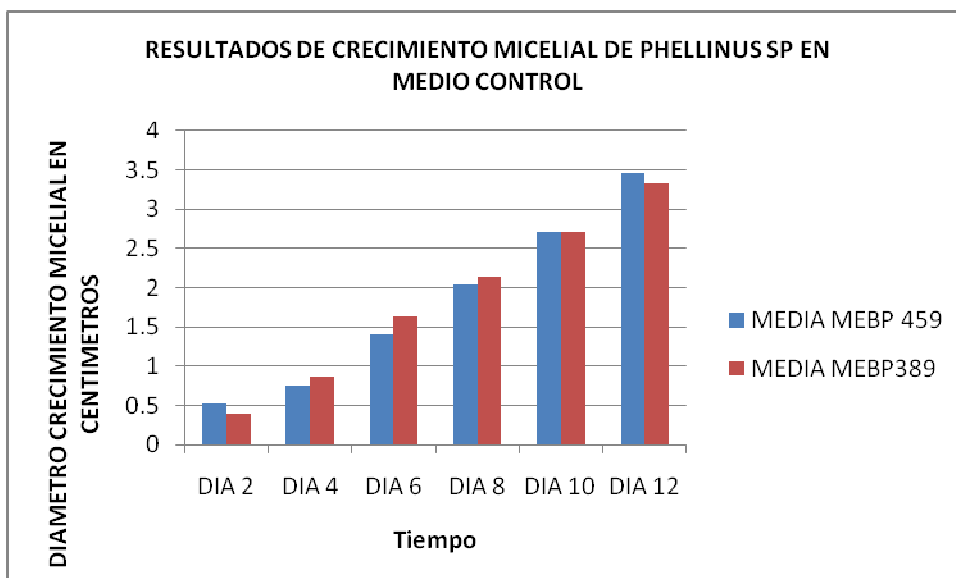


Gráfico 4: RESULTADOS DE CRECIMIENTO MICELIAL DE PHELLINUS SP EN MEDIO CONTROL. MEDICION EN CENTIMETROS

Al analizar los resultados obtenidos en el medio control se observó que la cepa MEBP 459 tuvo un ligeramente mejor crecimiento micelial, que la cepa MEBP 389 durante los doce días que duró la prueba, en todos los medios.

4.6 Estadística descriptiva

Tabla 6

Factores inter-sujetos

		Etiqueta del valor	N
CEPAS	1	MEBP 459	15
	2	MEBP 389	15
SUSTRATO	1	Roble	6
	2	Eucalipto	6
	3	Alamo	6
	4	Control	6
	5	Común	6

Tabla 7

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: Diámetro del crecimiento micelial

CEPAS	SUSTRATO	Media	Desv. típ.	N
MEBP 459	Roble	3,4000	,17321	3
	Eucalipto	3,2667	,40415	3
	Alamo	3,4667	,05774	3
	Control	3,4667	,05774	3
	Común	3,3333	,20817	3
	Total		3,3867	,20307
MEBP 389	Roble	2,6000	,36056	3
	Eucalipto	2,4000	,51962	3
	Alamo	2,6333	,15275	3
	Control	3,3333	,20817	3
	Común	,4000	,00000	3
	Total		2,2733	1,05524
Total	Roble	3,0000	,50596	6
	Eucalipto	2,8333	,63140	6
	Alamo	3,0500	,46797	6
	Control	3,4000	,15492	6
	Común	1,8667	1,61204	6
	Total		2,8300	,93703

$$CV = \frac{S}{X}$$

$$CV = 33.11\%$$

El coeficiente de variación obtenido al ser menor a uno es aceptable.

4.7 Comparación de Resultados

Tabla 8

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Diámetro del crecimiento micelial

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo	257,545 ^a	6	42,924	125,857	,000
CEPAS	9,296	1	9,296	27,258	,000
SUSTRATO	7,981	4	1,995	5,850	,002
Error	8,185	24	,341		
Total	265,730	30			

a. R cuadrado = ,969 (R cuadrado corregida = ,961)

A partir del análisis de varianza se observó lo siguiente:

- Existe una diferencia altamente significativa en el crecimiento según la cepa de *Phellinus spp.* utilizada (P = 0,000).

- Existe una diferencia significativa en el crecimiento según el tipo de aserrín utilizado para cada prueba realizada ($P = 0,002$)

Medias marginales estimadas

Tabla 9

1. Media global

Variable dependiente: Diámetro del crecimiento micelial

Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
		Límite inferior	Límite superior
2,830	,107	2,610	3,050

Tabla 10

2. CEPAS

Variable dependiente: Diámetro del crecimiento micelial

CEPAS	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
MEBP 459	3,387	,151	3,075	3,698
MEBP 389	2,273	,151	1,962	2,585

Observando las medias obtenidas en los diámetros de crecimiento micelial obtenidos en las cepas de *Phellinus sp.* se encuentra que al final de los 12 días de crecimiento la cepa MEBP 459 tuvo un mayor desarrollo.

Tabla 11**3. SUSTRATO**

Variable dependiente: Diámetro del crecimiento micelial

SUSTRATO	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
Roble	3,000	,238	2,508	3,492
Eucalipto	2,833	,238	2,341	3,325
Alamo	3,050	,238	2,558	3,542
Control	3,400	,238	2,908	3,892
Común	1,867	,238	1,375	2,359

vando las

medias obtenidas en los diámetros de crecimiento micelial obtenidos en los sustratos utilizados se encuentra que al final de los 12 días de crecimiento el medio control fue en el que las cepas de *Phellinus sp.* tuvo un mayor crecimiento. Además se puede destacar que el sustrato álamo fue el mejor de los sustrato utilizados para este proyecto.

Tabla 12: Prueba de Tukey para las dos cepas**Diámetro del crecimiento micelial**DHS de Tukey^{a,b}

SUSTRATO	N	Subconjunto	
		1	2
Común	6	1,8667	
Eucalipto	6	2,8333	2,8333
Roble	6		3,0000
Alamo	6		3,0500
Control	6		3,4000
Significación		,059	,464

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,341.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

b. Alfa = ,05.

Con la prueba de Tukey para las dos cepas se dividió a los sustratos en dos subconjuntos. En el mejor está primero el medio control, luego el sustrato álamo, roble y eucalipto, mientras que en el subconjunto de menor calidad se encuentran eucalipto y sustrato común.

4.7.1 Cepa MEBP 459

Tabla 13: Prueba de Tukey para la cepa MEBP 459

Diámetro del crecimiento micelial

HSD de Tukey^a

SUSTRATO	N	Subconjunto para alfa = .05
		1
Eucalipto	3	3,2667
Común	3	3,3333
Roble	3	3,4000
Alamo	3	3,4667
Control	3	3,4667
Sig.		,798

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Analizando los resultados obtenidos con la cepa MEBP 459 se puede observar que no existe una diferencia significativa de crecimiento micelial de esta cepa entre los sustratos utilizados y el medio control.

4.7.2 Cepa MEBP 389

Tabla 14: Prueba de Tukey para la cepa MEBP 389

Díámetro del crecimiento micelial

HSD de Tukey^a

SUSTRATO	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
Común	3	,4000		
Eucalipto	3		2,4000	
Roble	3		2,6000	2,6000
Alamo	3		2,6333	2,6333
Control	3			3,3333
Sig.		1,000	,877	,086

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Con la prueba de Tukey para la cepa MEBP 389 se dividió a los sustratos en tres subconjuntos. En el mejor está primero el medio control, luego el sustrato álamo, roble y eucalipto, en el subconjunto medio se encuentran eucalipto, roble y álamo, mientras que en el subconjunto de menor calidad se encuentra el sustrato común.

4.8 Fructificación

Debido a que la cepa MEBP 459 creció bien en todos los sustratos y con los resultados estadísticos se decidió ensayar la fructificación únicamente en eucalipto, por ser éste la madera más abundante en nuestro medio.

En el proceso de fructificación, que duró tres meses se llegó a obtener fundas colonizadas con primordios de *Phellinus sp.*, mas no el cuerpo fructífero del hongo, debido a que no fue posible determinar las condiciones necesarias para que se produzcan los cuerpos

fructíferos, por lo tanto no fue posible obtener el porcentaje de eficiencia biológica, ya que el peso de los primordios es mucho menor al de los cuerpos fructíferos, dando como resultado un porcentaje de eficiencia biológica con un valor muy bajo.

Tabla 15: RESULTADOS DE FRUCTIFICACION CEPA MEBP 459. PORCENTAJE DE EFICIENCIA BIOLOGICA

	Funda 1	Funda 2	Funda 3	Funda 4	Funda 5
Numero Primordios	150	115	129	179	143
Peso Primordios	7.9 gramos	6.6 gramos	7.2 gramos	8.9 gramos	7.4 gramos

Tabla 16: TABLA DE ESTADISTICA DESCRIPTIVA RESULTADOS DE FRUCTIFICACION CEPA MEBP 359

Variable	Media	Error estándar	Desviación estándar	Coefficiente de variación
Numero Primordios	143.2	10.8	24.1	16.84%

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- En el crecimiento micelial de *Phellinus sp.* se pudo determinar que existe diferencia significativa para las dos cepas entre los sustratos aserrines de álamo, roble, común y eucalipto.
- Las cepas utilizadas tuvieron un mayor desarrollo en el medio agar extracto de malta, utilizado como control, esto es de esperarse por ser éste un medio formulado para el buen desarrollo de los hongos.
- La cepa MEBP 389 en general creció menos en los sustratos probados.
- La cepa MEBP 459 en general creció mejor en todos los sustratos, y para esta cepa no hubo diferencia significativa entre los sustratos.
- Al intentar conseguir la fructificación utilizando el sustrato en fundas de polipropileno se encontró que se obtuvo el desarrollo de primordios de la cepa MEBP 459 de *Phellinus sp.*, mas no de la cepa MEBP 389, utilizando como

iniciador la liberación del dióxido de carbono formado a partir del crecimiento de micelio pero no se desarrolló ningún cuerpo fructífero

- Las dos cepas deben corresponder a especies diferentes de *Phellinus* por su diferente comportamiento de exigencia nutricional.
- La cepa MEBP 459 puede ser candidata para ser utilizada para fines biotecnológicos por su mejor desarrollo en los sustratos evaluados, sin embargo se debería procurar llegar a la identificación a nivel de especie y las características bioquímicas de las cepas utilizadas.
- Para el desarrollo de *Phellinus sp.*, en cultivos artesanales requieren condiciones especiales que no han podido reproducirse en este trabajo

5.2 RECOMENDACIONES

- Se debe analizar cuál es el iniciador de fructificación del hongo *Phellinus sp.*, para así poder realizar cultivos in vitro y estudiar sus principales principios activos, especialmente los géneros conocidos por sus beneficios médicos como *Phellinus linteus*.
- Determinar si las propiedades medicinales, obtenidas a través de sus principios activos, de las especies de *Phellinus sp.* se pueden obtener mediante cultivo in vitro y no solo a través del hongo cosechado en la naturaleza.
- Se sugiere realizar estudios para analizar si el medio PDA, utilizado para el aislamiento de las cepas con las que se realizó este trabajo, preparado de manera artesanal permite un mejor desarrollo de los micelios de hongos que el PDA que se puede obtener comercialmente.
- Realizar nuevos estudios acerca de la biodiversidad biológica y microbiológica presente en nuestro país y principalmente en la cuenca amazónica.

BIBLIOGRAFIA

1. Alvarado Ernesto. “Dificultades en la taxonomía de los seres vivos”. Elementos: Ciencia y Cultura, 2007, Puebla, 2007: 31-34
2. Andrade René. Estudio sobre los hongos (Macromicetos) de tres fincas cafetaleras del municipio de Tapachula, Chiapas, Tapachula Chiapas, Universidad Autónoma de Chiapas, 1995, 3-6
3. Ann Pao-Jen, et al. “Phellinus noxius Brown Root Rot of Fruit and Ornamental Trees in Taiwan”, Plant disease, 2002, Saint Paul , MN, 2002: 820-825
4. Armengol J. “Hongos asociados a decaimientos y afecciones de madera en vid en diversas zonas españolas”, Bol. San.Veg. Plagas, 2001, Valencia, 2001: 137-153
5. Atlas R.M. Handbook of Microbiological Media, Boca Ratón Florida, Crc Press, Segunda Edición, 1997. 69-78
6. Brizuela María Antonieta. “Nueva fuente de metabolitos secundarios” Revista Iberoamericana de Micología, 1998, La Habana: 69-74
7. Chan Frankie. Natural Phellinus Mushroom Story. Internet www.phellinus-research.com. Acceso: (Enero 2009).
8. Chang Heng-Yuan, et al. “Antioxidant and free radical scavenging activities of *Phellinus merrillii* extracts”. Botanical Studies, 2007, Taipei, 2007: 407-417

9. Delgado A. E. y Urdaneta L. M. “Hongos Basidiomycota, orden Agaricales, en cinco municipios del estado Zulia”. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 2002, Maracaibo Venezuela, 2002: 56-70
10. Dicikow Bess. Common Smut of Sweet Corn (*Ustilago maydis*). Internet: www.umassvegetable.org/.../corn_smut.html. Acceso: (Marzo 2010).
11. Ellis J. y Ellis Martin. Fungi without gills (hymenomycetes and gasteromycetes): an identification handbook. Chapman and Hal. Londres, 1990
12. Escobedo, Roberto. “Producción de hongo seta”. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación, 2008, Zacatlán Puebla, 2008: 2-6
13. Gaitán-Hernández Rigoberto. “Evaluación in vitro del hongo comestible *Pleurotus eryngii*: Efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructífero”. Revista Mexicana de Micología, 2005, Ciudad de México, 2005:78-84
14. García Guemes y Montero G. Influencia de ciertas variables selvícolas en la producción provocada por *Phellinus pini* sobre *Pinus pinea*. Investigación Agraria Sistemas y Recursos Forestales, 1998, Madrid,1998: 203-218
15. Gregory F. et al. Studies of antitumor substances produced by Basidiomycetes. Mycologia. Corvallis, OR. 1966: 80-90
16. González Ana María. Reino Fungi: Micorrizas. Internet: www.biologia.edu.ar/fungi/micorrizas.htm. Acceso: (Marzo 2010)
17. Herrera Mauricio. Filogenia Bacteriana mediante el análisis del RNA 16s. Universidad Nacional Autónoma de México, 2005. México, 2005

18. Herrera Teófilo. El Reino de los Hongos Micología Básica y Aplicada. Distrito Federal de México, Universidad Nacional Autónoma de México Fondo de Cultura Económica, México, segunda Edición, 1990. 20-30
19. Hibbet David. A higher level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 509–547.
20. Hobbs Christopher. Medicinal Mushrooms. Botanica Press US, Interweave Press
21. Lindsey J. Some Miscellaneous June and July Basidiomycota Mushrooms. Internet: <http://www.commanster.eu/commanster/Mushrooms/Basidio/SuBasidio/Phellinus.ignarius.html>. Acceso: (Marzo 2010).
22. López Joaquín. “Técnicas de Biología Molecular Aplicadas a la Taxonomía y Filogenia de Moluscos”. *Spira*, 2004, Pisa, 2004: 23-33
23. Madigan Michael. Brock: Biology of Microorganisms. Madrid, Prentice Hall Iberia, Octava Edición, 1999: 769-784
24. Montreal José Antonio. Contribución al conocimiento de los hongos lignívoros en el arbolado urbano de Albacete. Albacete, Centro de estudios de Castilla-La Mancha, 1996. 10-15
25. Moore Royal. Taxonomic proposals for the classification of marine yeasts and other yeast-like fungi including the smuts. *Botanica Marina*, 1980, Halifax, 1980: 361-373.
26. Müller Emil. Mycology. Stuttgart, Georg Thieme Publishers, Segunda Edición, 1976. 118-125.
27. Oei, Peter. Mushroom Cultivation. Tiel Nederland, Tool Publications, 1996. 40-43
28. Orson Miller. Mushrooms of North America. New York, EP Dutton, 1977, 24-28

29. Piaggio Mario. Curso de Biología vegetal: Atlas de imágenes. Internet: <http://micol.fcien.edu.uy/atlas/index.html>. Acceso: (Marzo, 2010).
30. Pinzón-Picaseño Luis Manuel. “Comprobación del tipo de pudrición y selectividad de sustrato de 15 hongos poliporoides xilófagos de Los Tuxtlas”. Revista Mexicana de Micología, 2004, Veracruz México, 2004: 47-59
31. Raymundo Tania, et al. “Dos especies nuevas del género *Phellinus* (Hymenochaetales, Basidiomycota) en México”. Revista Mexicana de Biodiversidad, 2008, México 2008: 295-301
32. Ruiz Herrera José. “El asombroso reino de los hongos”. Avance y Perspectiva, octubre 2001, México Distrito Federal, 2001: 275-281
33. Sliva D, Jedinak A, Harvey K y Slivova V. “Phellinus linteus suppresses growth, angiogenesis and invasive behavior of breast cancer cells through the inhibition of AKT signaling”. British Journal of Cancer, 2008, Londres, 2008:1348-1356
34. Stamets Paul. Gourmet and Medicinal Mushrooms. Berkeley California, Ten Speed Press, Tercera Edición, 2002. 349-354
35. Stamets Paul. Myco Medicinals. Olympia WA, Myco Media, Tercera Edición. 2002.55-63
36. Stevens Rusell. Mycology Guidebook. Seattle, University of Washington Press, 1974. 250-266
37. Telleria M. T. “El género *Phellinus* (Aphylophorales, Basidiomycetes) en España”. Instituto Botánico A J. Cavanilles, 1977, Madrid, 1977: 59-70
38. Tosco Uberto. Atlas de Botánica. Barcelona, Editorial Teide. 1971. 45-51

39. Valenzuela Ricardo. “La Familia Hymenochaetaceae en México II: Especies poco conocidas del género Phellinus”. Revista Mexicana de Micología, 2005, México, 2005: 13-19

ANEXOS

ANEXO 1

Conservación de cepas en aceite mineral y en agua

1. Los cultivos puros en PDA o Agar Extracto de Malta se pasan a tubos inclinados con PDA o extracto de malta.
2. Para la conservación de las cepas se utilizó por Aceite mineral (Parafina líquida grado farmacéutico). Se distribuyó 10ml en tubos y se autoclava durante una hora a 121°C., el aceite se vuelve turbio después de la esterilización hay que esperar que se clarifique y se enfríe.
3. Se trabaja en condiciones estériles procurando evitar contaminaciones.
4. Una vez que el crecimiento del hongo es abundante, en el tubo inclinado se añade el aceite de tal manera que quede 2cm. bajo el borde del tubo.
5. Cada cultivo debe tener su respectivo duplicado.
6. De la misma manera se procede con otros dos tubos en los que se añade agua estéril para conservarlos (potable NO destilada). En este caso la tapa debe ser hermética.

ANEXO 2

Agar Extracto de Malta

- Composición:

Extracto de Malta	30gramos
Peptona micológica	5 gramos
Agar	15 gramos
Agua destilada	1 litro

- Ajustar el pH del medio a 5.4

ANEXO 3

Agar Extracto de Malta + sustrato

- Composición:

Extracto de Malta	4 gramos
Agar	15 gramos
Agua destilada	1 litro
Sustrato (aserrín)	30gramos

- Ajustar el pH del medio a 5.4

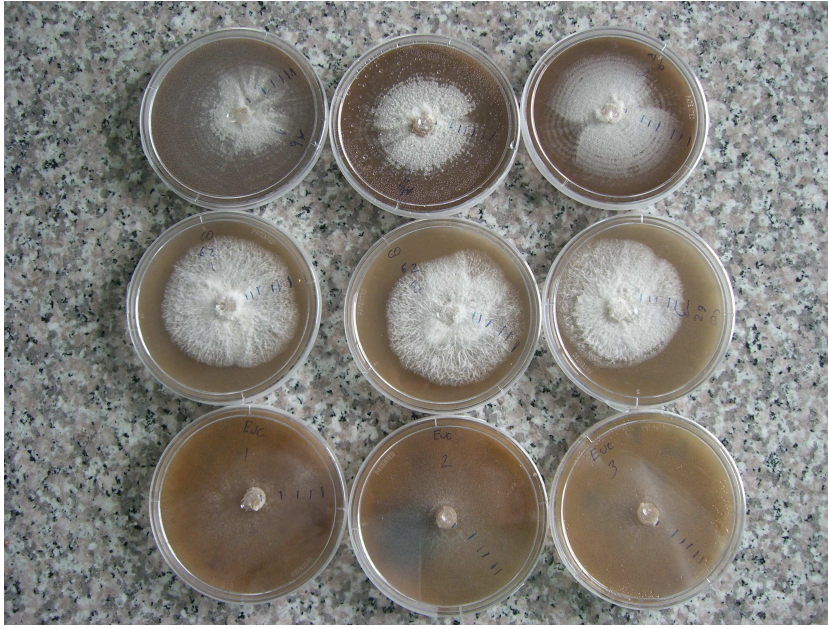
FOTOGRAFIAS



1. Medio con sustrato aserrín común sembrado con el disco de 0.8cm de diámetro.



2. Medio con sustrato aserrín común con desarrollo del hongo *Phellinus sp.* al cuarto día de crecimiento.



3. Medio con diferentes sustratos aserrines con crecimiento de las cepas de *Phellinus* *sp.*



4. Botellas utilizadas para la preparación del inoculo



5. Botellas colonizadas por el inculo



6. Fundas de polipropileno con el sustrato para la fructificación



7. Fundas de polipropileno con sustrato colonizadas al sexto día de prueba



8. Fundas de polipropileno con sustrato colonizado por primordios al día doce de la prueba.